

Enrique Gámez Herrera

Síntesis, caracterización y
aplicación de apósitos nano-
estructurados cargados con
compuestos antimicrobianos de
origen natural

Director/es

Arruebo Gordo, Manuel
Irusta Alderete, Silvia

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE
APÓSITOS NANO-ESTRUCTURADOS CARGADOS
CON COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS DE
ORIGEN NATURAL

Autor

Enrique Gámez Herrera

Director/es

Arruebo Gordo, Manuel
Irusta Alderete, Silvia

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente

2021



**Universidad
Zaragoza**

TESIS DOCTORAL

**Síntesis, caracterización y aplicación de apósitos
nano-estructurados cargados con compuestos
antimicrobianos de origen natural**

AUTOR

Enrique Gámez Herrera

DIRECTORES

Irusta Alderete, Silvia

Arruebo Gordo, Manuel

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

**Ingeniería Química y Tecnologías del Medio
Ambiente**

2021

RESUMEN

RESUMEN

El trabajo aquí presentado, de título “Síntesis, caracterización y aplicación de apósitos nano-estructurados cargados con compuestos antimicrobianos de origen natural” se ha desarrollado íntegramente en el departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza, dentro del grupo de investigación de Partículas y Películas Nanoestructuradas (NFP, *Nanostructured Films and Particles*). Este grupo es miembro del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA), en cuyos laboratorios se ha desarrollado la mayor parte de la experimentación necesaria para la conclusión de este trabajo entre los años 2015 y 2019. Además de en los laboratorios del INA, otra parte de la investigación se ha llevado a cabo en los laboratorios del Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA) de los que el grupo NFP puede hacer uso.

El principal objetivo de esta tesis doctoral es el desarrollo de apósitos poliméricos cargados desde los que se pueda regular la liberación de los compuestos cargados en los mismos. Así pues, se modifican tanto los materiales usados (poliméricos e inorgánicos) como la presentación de los mismos (nanofibras, micro y nanopartículas) para lograr un control de la liberación.

En todos los casos, los compuestos empleados son de origen natural, con propiedades bactericidas como propiedad principal, pero también con propiedades antiinflamatorias, con el objetivo de obtener unos apósitos que reduzcan el riesgo de infección en heridas y aceleren el proceso de concentración de las mismas.

Estos objetivos generales, quedan estructurados y ampliados en los distintos capítulos, a continuación resumidos:

- El **Capítulo I** se trata de una introducción general en la cual se describen los distintos tipos de infecciones que pueden afectar al organismo, clasificadas en función de diversos parámetros, centrado, en el tratamiento de las heridas con distintos tipos de apósitos comerciales. Además, se expone un resumen de distintos nanomateriales empleados en tratamientos con apósitos así como diversas técnicas de síntesis de estos nanomateriales.
- El **Capítulo II** se centra en la optimización de la síntesis de nanofibras de PCL cargadas con distintos compuestos de origen natural mediante *electrospinning*, analizando el perfil de liberación de los compuestos así

como sus propiedades bactericidas, tanto en ensayos *in-vitro* como en ensayos *in-vivo*.

- El **Capítulo III** presenta la síntesis mediante *electrospraying* de micropartículas de PLGA cargadas con un compuesto bactericida de origen natural, el timol, para su posterior incorporación en apósitos de nanofibras de PCL fabricados mediante *electrospinning*. Además del perfil de liberación y carga del compuesto, en este capítulo se analiza la influencia del proceso de *electrospraying* sobre las membranas poliméricas, a través del estudio de sus propiedades mecánicas. Finalmente, se estudian las propiedades bactericidas de los materiales preparados, tanto en ensayos *in-vitro* como en ensayos *in-vivo*.
- El **Capítulo IV** describe la síntesis de nanopartículas inorgánicas de SBA-15 cargadas con timol así como la optimización de su incorporación en nanofibras de PCL para poder emplearlas en apósitos con propiedades farmacológicas. Una vez incorporadas, se comprueba el perfil de liberación del timol al medio, tanto en las partículas libres como incorporadas en las fibras además de analizar sus propiedades bactericidas en ensayos *in-vitro*.
- El **Capítulo V** contiene las conclusiones finales del trabajo previamente descrito.
- En la **Bibliografía** se detallan todas las publicaciones y documentación consultada para la realización de este trabajo.
- El **Anexo 1** detalla todos los reactivos empleados en este trabajo.
- El **Anexo 2** describe las técnicas de síntesis y caracterización comunes a todos los capítulos.
- El **Anexo 3** describe los métodos de evaluación de las propiedades bactericidas empleados a lo largo de este trabajo.
- El **Anexo 4** describe los procedimientos llevados a cabo para la realización de los distintos ensayos con animales que se han llevado a cabo en este trabajo.
- El **Anexo 5** detalla todas las contribuciones al conocimiento científico derivadas de la realización de este trabajo, tanto en forma de artículos científicos como en forma de contribución a congresos científicos.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. INFECCIONES

Los seres más numerosos que pueblan la tierra son los microorganismos, que colonizan todos los ambientes y ecosistemas e interactúan con plantas y animales, incluido el ser humano. Se agrupan en dos categorías: procariotas, que incluyen a arqueas y bacterias, y eucariotas, que engloba a hongos, algas y protozoos, además de incluir de forma convencional pero fuera de estas dos categorías a virus, viroides y priones. Se pueden clasificar en torno a varios criterios, siendo uno de ellos si afectan o no a la salud pública, o lo que es lo mismo, si son o no patógenos¹.

Los microorganismos no patógenos son aquellos que no afectan negativamente a la salud del individuo en el que habitan, llegando incluso a ser beneficiosos cuando se establece una relación de simbiosis. Sin embargo, cuando un organismo patógeno coloniza a un individuo, puede afectar a su salud, infectar uno o más órganos y generar una enfermedad, denominada enfermedad infecciosa o infección. Históricamente, las infecciones han afectado en gran medida a la población, como por ejemplo la lepra (causada por la bacteria *Mycobacterium leprae*), el tifus (enfermedad causada por la bacteria *Rickettsia typhi*), el cólera (causada por la bacteria *Vibrio cholerae*) o las grandes epidemias de peste (causada por la bacteria *Yersinia pestis*) que asolaron Europa entre los siglos XIV y XVIII y que a día de hoy es aún una enfermedad endémica en la República Democrática del Congo, Perú y Madagascar^{1,2}.

Para dar una visión de cómo afectan las infecciones a la salud humana en la actualidad, dentro de las diez principales causas de muerte en 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) situó a las infecciones en vías respiratorias en cuarto puesto con 3 millones de muertes y, en particular, a la tuberculosis (enfermedad causada por la infección de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, *M. tuberculosis*) en el décimo puesto con casi 2 millones de muertos anuales en todo el mundo. Aunque estas infecciones se encuentran entre las principales causas de muerte en todos los países, con independencia de su nivel de ingresos, el problema se agrava en países con un nivel bajo de ingresos, en los que son la principal causa de muerte, con una tasa bruta de mortalidad de 75 muertes por cada 100000 habitantes³. Si centramos los datos en Europa, el Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades estima que, al año, tres millones de pacientes en Europa sufren enfermedades derivadas de infecciones de las cuales medio millar terminan con la muerte del paciente⁴. Con estos datos, no es difícil hacerse una idea del grave problema que presentan las infecciones para la salud mundial.

1.1.1. Clasificación de las infecciones

La clasificación de las infecciones se establece, principalmente, en torno a dos criterios: el tipo de organismo patógeno que la causa y el órgano en el que se produce la infección. A continuación, se presentan ambas clasificaciones.

1.1.1.1. Tipo de patógeno

Uno de los criterios en torno al cual se clasifican las infecciones es en función del tipo de patógeno causante de la misma. Principalmente, estos microorganismos se encuentran dentro de uno de los siguientes grupos^{5,6}:

- **Priones:** son simples moléculas de proteínas, por lo que son los agentes infecciosos más sencillos. No contienen ningún tipo de material genético y se reproducen en el huésped tras el cambio conformacional de la proteína priónica en una isoforma resistente a las proteinasas del huésped.

Tabla I- 1. Enfermedades causadas por distintos virus. Adaptado de Gallego Luque y colaboradores⁶

VIRUS QUE CONTIENEN ADN		VIRUS QUE CONTIENEN ARN	
Virus	Enfermedad	Virus	Enfermedad
Hepadnavidae	Hepatitis B	Rhinovirus	Resfriado común
Papilovirus	Verruga vulgar	Infuenza	Gripe
Mastadenovirus	Faringitis y conjuntivitis	SARS-COV-2	Síndrome Respiratorio Agudo Severo (COVID-19)
Herpesvirus	Herpes simple	Retrovirus	SIDA
Herpes zoster	Varicela	Lyssavirus	Rabia
Virus de Epstein/Barr	Mononucleosis infecciosa	Flavivirus	Fiebre amarilla y dengue
Citomegalovirus	Úlceras intestinales	Virus ECHO	Meningitis
Orthopoxvirus	Viruela	Morbillivirus	Sarampión

- **Virus:** son elementos corpusculares que contienen proteínas y ácidos nucleicos (ADN o ARN, dependiendo de cada virus) y que emplean la maquinaria celular del huésped para su replicación. En la Tabla I- 1 se expone un resumen de las enfermedades más comunes causadas por la infección de distintos tipos de virus en humanos.

- **Organismos eucariotas:** son organismos que contienen orgánulos con una función específica, lo que les confiere una elevada complejidad celular. En estos organismos, se pueden diferenciar infecciones causadas por protozoos (protozoosis, como la enfermedad del sueño o el paludismo), infecciones causadas por hongos (micosis, que pueden ser superficiales, endémicas u oportunistas. Estas últimas están ampliadas en la Tabla I- 2) e infecciones causadas por helmintos (helmintiasis, causadas por gusanos como la *Taenia solium*).

Tabla I- 2. Clasificación de las micosis oportunistas más comunes en humanos. Adaptado de Gallego Luque y colaboradores⁶

GÉNERO	ESPECIE	ENFERMEDAD CAUSADA
Candida	<i>Candida albicans</i>	Esofagitis, candidemia, endoftalmitis
	<i>Candida tropicalis</i>	
	<i>Candida glabrata</i>	
	<i>Candida krusei</i>	
Aspergillus	<i>Aspergillus fumigatis</i>	Neumonía (con diseminación del microorganismo a través de la sangre)
	<i>Aspergillus flavis</i>	
	<i>Aspergillus niger</i>	
Cryptococcus	<i>Cryptococcus neoformas</i>	Neumonía, meningitis
Mucormycosis	<i>Mucormycosis rhizopus</i>	Infección rinocerebral en diabéticos
	<i>Mucormycosis absidia</i>	
Fusarium	<i>Fusarium solami</i>	Infección en catéter

Tabla I- 3. Enfermedades causadas por la infección de distintas bacterias. Adaptado de Gallego Luque y colaboradores⁶

INFECCIONES CAUSADAS POR COCOS GRAM POSITIVO		
Género	Especie	Enfermedad causada
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sepsis, forúnculos, osteomielitis, gastroenteritis
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Infección urinaria, endocarditis, infección de plastias valvulares
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Infección urinaria
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus equisimilis</i>	Infección de las vías respiratorias superiores, erisipela, sepsis
	<i>Streptococcus sanguis</i>	
	<i>Streptococcus faecalis</i>	Infección urinaria, endocarditis bacteriana
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Neumonía lobar, meningitis, sepsis, peritonitis, otitis, sinusitis
INFECCIONES CAUSADAS POR BACILOS COCOS GRAM NEGATIVO		
Género	Especie	Enfermedad causada
<i>Neisseria</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	Meningitis, sepsis meningea
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infección urinaria, otitis, sepsis, infección en quemaduras
<i>Legionella</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	Legionelosis

Tabla I-3 (continuación)

INFECCIONES CAUSADAS POR BACILOS GRAM POSITIVO		
Género	Especie	Enfermedad causada
<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium tetani</i>	Tétanos
	<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo
<i>Rickettsia</i>	<i>Rickettsia Prowazekii</i>	Enfermedad de Brill
	<i>Rickettsia typhi</i>	Tifus endémico murino
INFECCIONES CAUSADAS POR BACILOS GRAM NEGATIVO		
Género	Especie	Enfermedad causada
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	Sepsis, gastroenteritis, meningitis, neumonía
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre tifoidea
	<i>Salmonella arizonae</i>	Gastroenteritis
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Neumonía, meningitis
<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia pestis</i>	Peste bubónica y neumónica
<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
INFECCIONES CAUSADAS POR MICOBACTERIAS		
Género	Especie	Enfermedad causada
<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis
	<i>Mycobacterium leprae</i>	Lepra

Bacterias: son organismos unicelulares procariotas que contienen la información genética en moléculas de ADN y emplean ARN para la transcripción del mismo a proteínas. Están recubiertos por una membrana celular (en muchos casos además de la membrana presentan también una pared celular) y se reproducen independientemente sin necesidad de emplear la maquinaria celular de un huésped. Gran parte de las infecciones que afectan a los humanos están causadas por este tipo de microorganismos, por lo que la investigación en su tratamiento y prevención es muy necesaria. Se pueden clasificar en función de distintas características, pero la clasificación más simple es en función a su respuesta a la tinción de Gram. Las bacterias Gram negativas no incorporan esta tinción debido a la gruesa pared celular (compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y peptidoglicano) que rodea a la membrana citoplasmática. Por otro lado, las bacterias Gram positivas incorporan la tinción ya que la pared celular que rodea la membrana citoplasmática es mucho más delgada y simple (está compuesta únicamente por ácido teicoico y peptidoglicano)⁷. En la Tabla I- 3 se presenta un pequeño resumen de distintas enfermedades causadas por todo tipo de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas.

1.1.1.2. Órgano afectado

Otro criterio de clasificación de las enfermedades infecciosas es en función del órgano en el que se producen. Éstas prácticamente se pueden producir en cualquier localización del huésped dependiendo tanto de la virulencia y efectividad del patógeno como de los propios mecanismos de defensa del huésped. En general, bajo este criterio, las infecciones se agrupan en torno a los siguientes grupos⁶.

- **Infecciones del área otorrinolaringológica y orofaringe:**

- *Faringitis y amigdalitis:* asociadas a generalmente a resfriados y gripes causados por virus (*Rhinovirus*, *Coronavirus* y *Virus influenza*) pero también aparecen asociadas a cuadros de mononucleosis infecciosa. En el caso de ser de tipo bacteriana, estas infecciones suelen estar causadas por estreptococos de grupo A (*Streptococcus pyogenes*, *S. pyogenes*).

- *Laringitis y epiglotitis:* la laringitis generalmente tiene su origen en infecciones víricas mientras que la epiglotitis es de origen bacteriano, principalmente causada por *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) y, con menor frecuencia, por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*).

○ *Sinusitis y rinitis*: la sinusitis es, por lo general, de origen bacteriano (*H. influenzae*, *Moraxella catharralis*, *M. catharralis*, y *S. pneumoniae*) mientras que la rinitis suele ser de origen vírico, aunque es frecuente que en fases posteriores de la enfermedad se encuentre también infección por parte de los patógenos asociados a la sinusitis.

○ *Otitis*: la otitis externa suele estar causada por las bacterias *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) mientras que en la otitis media las bacterias patógenas más comunes son *H. influenzae*, *M. catharralis* y *S. pneumoniae*.

- **Infecciones del sistema osteomuscular:**

○ *Gangrena*: la gangrena gaseosa está causada por la infección de una herida en el músculo por parte de *clostridium* (en el 90 % de los casos, *Clostridium perfringens*). Por otro lado, la piomiositis es una infección aguda del músculo esquelético por parte de *S. aureus*.

○ *Osteomielitis*: mientras que cuando se produce asociada a implantes óseos esta infección está causada principalmente por *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), en el caso de infecciones crónicas, de fracturas abiertas o de pie de diabético se trata de una infección polimicrobiana, mayoritariamente de bacterias Gram negativas, además de *S. aureus*.

○ *Artritis*: las más frecuentes son las artritis bacterianas causadas por *S. aureus*, aunque existe una variabilidad de la bacteria causante dependiendo de la edad del paciente y de la localización de la infección.

- **Infecciones del tracto respiratorio**: mientras que, en el caso de las neumonías producidas en el ámbito extra-hospitalario, la bacteria responsable de la infección es *S. pneumoniae* en el 80 % de los casos, en el ámbito intra-hospitalario la principal bacteria responsable es *P. aeruginosa*.

- **Infecciones del aparato cardiocirculatorio**: dentro de este grupo de infecciones, se distinguen tres sub-grupos de infecciones:

○ *Endocarditis*: la endocarditis bacteriana aguda está causada por *Neisseria gonorrhoeae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. En el caso de la endocarditis bacteriana subaguda, el origen suele estar en estreptococos microaerófilos y *Streptococcus viridans*.

○ **Aortitis y aneurismas:** la aortitis sifilítica se desarrolla en zonas donde previamente ha habido una reacción inflamatoria frente a la bacteria *Treponema pallidum* mientras que los aneurismas se localizan en zonas de la pared bascular cercanas a zonas donde se ha producido bacteriemia o septicemia.

○ **Flebitis, linfagitis y linfadenitis:** mientras que la flebitis y la linfagitis suelen estar causadas por bacterias procedentes de la piel (*S. aureus* y bacilos coliformes en el caso de la primera y *S. pyogenes* en el caso de la segunda), la linfadenitis puede producirse por la infección de cualquier bacteria, virus, protozoo u hongo.

• **Infecciones del sistema nervioso central:** dentro de este grupo de infecciones se distinguen tres tipos distintos de infección:

○ **Meningitis:** es producida por distintas bacterias dependiendo de la edad del paciente. Mientras que en el periodo neonatal la principal causa de meningitis es la infección por bacilos Gram negativos (especialmente, *Escherichia coli*, *E. coli*), a partir del primer mes de vida del paciente las bacterias causantes de la infección son mayoritariamente *H. influenzae* y *Neisseria meningitidis*. En pacientes adultos, generalmente los causantes son meningococos y neumococos, siendo también cada vez más frecuente la infección por parte bacilos Gram negativos.

○ **Encefalitis:** la causa más frecuente es la infección vírica, sobre todo por virus herpes simple de tipo 1 y 2.

○ **Absceso cerebral:** se suele producir por contigüidad o por diseminación hematógena, aislándose por lo general estreptococos, enterobacterias y hongos.

• **Infecciones del aparato digestivo:**

○ **Gastritis:** el patógeno más frecuente en la gastritis es la bacteria *Helicobacter pylori*.

○ **Enteritis:** las infecciones víricas suelen ser la causa más frecuente de esta enfermedad, pero sin consecuencias clínicas graves. También se puede producir por la infección de distintas bacterias, pero también con una escasa afección clínica. Las enteritis por hongos son, sin embargo, muy raras y se producen principalmente en pacientes con una respuesta inmune deficiente.

○ **Esofagitis:** se produce casi exclusivamente en pacientes inmunocomprometidos y la causa más frecuente es la infección por hongos del género *Candida*.

○ **Peritonitis:** se producen en su mayor parte debido a focos continuos intraabdominales (como la peritonitis tuberculosa, causada por la bacteria *M. tuberculosis*), perforación de víscera hueca o tras procedimientos quirúrgicos.

○ **Hepatitis:** en su mayor parte es de origen vírico (causadas por los diferentes virus de hepatitis A, B, C, D y E), aunque su origen puede ser bacteriano (infección de la bacteria *Yersinia enterocolitica*) en forma de abscesos.

- **Infecciones del aparato urogenital:** las bacterias más habituales que causan estas infecciones habitan normalmente en el intestino grueso: *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Enterobacter sp.* y *P. aeruginosa*. Cuando el origen de la infección es un hongo, las levaduras del género *Candida* son los patógenos más frecuentes mientras que en las de origen vírico destacan los adenovirus de serotipo 11 y 21 en cuadros de cistitis hemorrágica aguda infantil.

- **Infecciones de la piel:** la piel puede verse infectada por varios tipos de patógenos. Entre los virus más habituales, se encuentran el virus del herpes simple de tipo 1 y 2 y el virus de la varicela zoster (VVZ). También puede producirse la infección de la piel por una gran variedad de hongos superficiales entre los que se incluyen especies de *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*, aunque los hongos más comunes que infectan la piel son de la especie *Candida albicans* (*C. albicans*). Aunque la piel sana es una barrera excelente frente a las bacterias (es un medio seco que inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas; está expuesta al aire, por lo que se inhibe el crecimiento de bacterias anaerobias, y la presencia de lípidos, ácidos grasos libres y la flora residente impide la proliferación las mismas), en ocasiones el equilibrio se rompe y se produce la infección de la piel, siendo los principales patógenos *S. pyogenes* y *S. aureus*. Ninguno de estos patógenos proliferan en piel sana, pero los propios pacientes son reservorios naturales de los mismos, encontrándose la primera bacteria en la nasofaringe y la segunda en la nariz⁸. Además de en pieles con afectaciones menores (como eccemas, dermatitis atópicas y psoriasis), las infecciones de piel también pueden aparecer asociadas a heridas producidas en la misma. En estos casos, las principales especies encontradas son *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*⁹.

1.2. HERIDAS

De todos los órganos incluidos en la clasificación anterior que pueden ser infectados por patógenos la piel es el más extenso, cubriendo la totalidad de la

superficie corporal y aportando, de media, el 8 % del total del peso corporal¹⁰. Además, se trata de la primera barrera de protección con que cuenta el cuerpo humano ante la posible entrada de los mismos en el organismo. Procesos tan diversos como quemaduras, golpes, operaciones quirúrgicas o, incluso, enfermedades como la diabetes, pueden causar una rotura en la integridad de la piel, dando lugar a distintos tipos de heridas¹¹.

Las heridas, en términos generales, se pueden clasificar en agudas y crónicas¹². Las heridas agudas se producen, generalmente, por un traumatismo (quemaduras, laceraciones, abrasiones...) y pueden curarse incluso sin ninguna intervención de un agente externo al propio organismo, mediante un proceso natural ordenado que finaliza en la sustitución de la piel dañada¹³. En las heridas crónicas, al contrario que ocurre en las agudas, la curación se extiende en un período de tiempo superior a las 8 semanas^{14,15}, por lo que la recuperación de la estructura de la piel puede no alcanzarse totalmente. Dentro de este tipo de heridas, se encuentran, por ejemplo, las úlceras de presión (frecuentes en pacientes con movilidad reducida que, además de a la piel, pueden llegar a afectar progresivamente a capas más internas del organismo como el músculo, los tendones e, incluso, el hueso), las úlceras vasculares (producidas por hipertensión o por fallos en las válvulas venosas) y las úlceras producidas como consecuencia de complicaciones en pacientes diabéticos. Estas úlceras se producen sobre todo en el pie y las consecuencias van desde ampollas y cortes en la zona afectada hasta la amputación del miembro afectado¹⁶.

Al igual que en el caso de las infecciones, el tratamiento de las heridas es un grave problema de salud mundial, así como un gran gasto en los sistemas sanitarios de todos los países. El aumento en la esperanza de vida y la mejora de la calidad de la misma se ha traducido de forma paradójica en un incremento de pacientes que sufren enfermedades crónicas (entre las que se incluyen las heridas crónicas). Además de las consecuencias clínicas y emocionales en los pacientes, este tipo de heridas tienen un gran impacto en los sistemas de salud pública, ya que su tratamiento implica la hospitalización del paciente, la atención periódica de la herida por parte de los equipos de enfermería, tratamientos más largos e intensivos que en el caso de las heridas agudas y, en muchos casos, intervenciones quirúrgicas. Trasladando estos datos a cifras, al analizar los datos del programa de salud pública estadounidense, Nussbaum y colaboradores encontraron que cerca del 15 % de los beneficiarios de dicho programa (aproximadamente 8.5 millones de pacientes) hicieron uso del mismo para el tratamiento de todo tipo de heridas durante el año

2014, lo que supuso un coste estimado para el programa de 28000 millones de dólares¹⁷.

Además del problema que implican por sí mismas las heridas en los pacientes, estas son una vía de entrada de patógenos al organismo que pueden producir la infección de la herida, aumentando así la gravedad de la misma y dificultando su tratamiento y curación. Esta infección puede ser causada por la exposición a microbios presentes en el ambiente o, también, por los propios patógenos presentes en la piel (que no tienen ningún riesgo para la salud en caso de una piel sana). Sin embargo, una vez que se produce la infección de la herida, ésta debe ser tratada eliminando los tejidos dañados (si es necesario), limpiándola y aplicando un tratamiento antibiótico o antiséptico adecuado a los posibles patógenos que puedan colonizar la herida¹⁸. Una vez la herida está tratada y desinfectada se cubre con un apósito, que debe proteger la formación de tejido nuevo, actuar como barrera frente a patógenos ambientales y mantener un ecosistema adecuado para la curación de la herida (absorbiendo los fluidos producidos durante la curación y permitiendo una adecuada permeabilidad del oxígeno y el vapor de agua que impida la maceración de la herida).

1.3. APÓSITOS

El apósito ideal tiene multitud de características. Así pues, debería potenciar el proceso de curación manteniendo la herida libre de tejido desechado durante el mismo, absorbiendo los exudados que de manera natural se generan durante el proceso y manteniendo un entorno libre de contaminantes y con unos niveles óptimos de gases y humedad. Además, debería no ser tóxico para las células implicadas en el proceso de curación, no provocar una reacción alérgica en el organismo, proteger a la herida de golpes que se pudieran producir durante la curación y tener una baja adherencia en los tejidos que se están regenerando para que a la hora de retirarlo no se elimine parte del tejido nuevo. Finalmente, dicho apósito debería prevenir futuras infecciones, ser fácil de colocar, tener una duración larga para que la frecuencia de cambio del mismo sea la mínima posible, ser cómodo y adaptarse a la topología de la zona herida^{10,19,20}. En la Figura I- 1 se representa la situación de una herida sin proteger con un apósito frente a otra tratada con un apósito ideal²¹. En ella se representa cómo, tras proteger la herida con un apósito ideal, las condiciones favorecen la proliferación de células que participan en el proceso de curación (como fibroblastos y queratinocitos) además de impedir el paso de patógenos como hongos, virus y bacterias. Además, al incluir compuestos

activos, éstos se liberan en la herida y combaten la infección de los patógenos que hayan logrado atravesar la barrera.

1.3.1. Tipos de apósitos

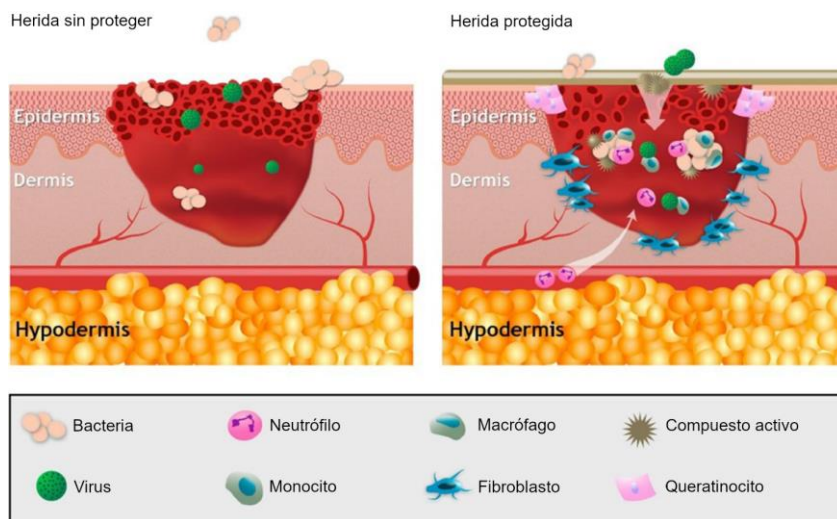


Figura I- 1. Representación de una herida sin proteger con un apósito frente a otra herida protegida con un apósito que incluye compuestos activos que favorecen la curación y previenen la infección. Adaptado de Homaeigohar y Boccaccini²¹

Los apósitos pueden clasificarse de distintas maneras, dependiendo de su función en la herida, del material con el que están fabricados o de la apariencia externa del apósito. Una clasificación aún más amplia que las anteriores, los divide en apósitos primarios (están en contacto con la herida), secundarios (se emplean para cubrir a los apósitos primarios) o de tipo isla (están formados por una región central absorbente rodeada de un material adhesivo). Finalmente, la clasificación que se expone en este trabajo divide a los apósitos entre apósitos tradicionales (que solamente mantienen un entorno seco en la herida) y apósitos modernos (que mantienen una mayor humedad en la herida), divididos estos últimos en función del tipo de material con el que se fabrican y las características físicas del mismo¹⁹. Así mismo, en la Tabla I- 4 se presenta un resumen de esta clasificación.

1.3.1.1. Apósitos tradicionales

Dentro de este grupo se incluyen gasas y vendajes fabricados a partir de materiales naturales (generalmente, lana y algodón) y sintéticos. Este tipo de

materiales mantienen seco el entorno de la herida y se emplean tanto como apósitos primarios como secundarios y también como parte de apósitos compuestos por varios materiales, cada uno con una función específica.

Las vendas se fabrican tanto con materiales naturales (algodón, lana o celulosa) como con materiales sintéticos como la poliamida y se emplean con diferentes funciones. Por ejemplo, la venda comercial *Cotton Conforming Bandage 1988* se emplea como apósito secundario para sujetar otros tipos de apósitos primarios mientras que las vendas de compresión se emplean para aplicar una presión sostenida en el tratamiento de la insuficiencia venosa²².

Por otro lado, las gasas se fabrican con fibras (tejidas o no) de algodón, poliéster o una combinación de ambos. Estos materiales (previamente esterilizados) se han utilizado tradicionalmente para absorber los exudados de las heridas además de usarlas como filtros a la hora de drenar fluidos desde las mismas. Aunque este tipo de apósitos necesitan ser cambiados con regularidad para evitar la maceración del tejido que se está regenerando, han demostrado tener un menor coste que otros apósitos más modernos²³.

Aunque las gasas puedan aportar cierta protección frente a bacterias y otros patógenos, en cuanto se humedecen (bien por los exudados de la herida, bien por fluidos externos) pierden esta capacidad. Además, este tipo de apósitos tienden a adherirse al tejido nuevo cuando disminuye la producción de fluidos de la herida, lo que provoca que su sustitución puede ser dolorosa para el paciente. También permiten que se evaporen los fluidos circundantes a la herida provocando la deshidratación de la herida, lo cual no es beneficioso para el proceso de curación de la misma. Así pues, la tendencia actual es emplear este tipo de apósito bien en heridas limpias y secas, bien como apósitos secundarios para absorber los exudados y actuar como protección mecánica de la herida.

1.3.1.2. Apósitos avanzados

Frente a los apósitos tradicionales, los apósitos avanzados expuestos a continuación se han desarrollado con la intención de mejorar las características de sus predecesores, principalmente para mantener el nivel de la humedad en la herida y facilitar su curación. Este tipo de apósitos se clasifican fundamentalmente de acuerdo con el material con el que están fabricados.



Figura I- 2. Presentaciones comerciales de distintos apósitos hidrocoloideos

- **Apósitos hidrocoloideos:** están fabricados a partir de coloides (materiales que forman geles) combinados con elastómeros y adhesivos. Los coloides más empleados son la carboximetilcelulosa, la gelatina y la pectina. Se comercializan bajo distintas marcas (Granuflex™, Aquacel™, Comfeel™ y Tegaderm™, ejemplos mostrados en la Figura I- 2) en forma de *films* y hojas o combinados con otros materiales como el alginato. Este tipo de materiales, además de adherirse a superficies secas gracias al adhesivo que los acompaña se pueden

emplear en superficies húmedas ya que, al absorber humedad, el proceso de gelificación que se produce en el material hace que se adhiera a la superficie. Por tanto, esta característica permite su empleo en heridas con un nivel de exudación bajo o moderado. Estos materiales, sin alterar, son impermeables al vapor de agua, pero al contacto con los exudados de la herida se produce un cambio físico en el material, formándose una capa de gel que cubre la herida, por lo que se convierte en progresivamente más permeable a los gases y al vapor de agua. Además, esta capa de gel hace que no se adhiera a la herida, lo que reduce la posibilidad de causar dolor al retirarlo^{24,25}.

- **Apósitos de alginato:** están fabricados a partir del ácido polisacárido formado por ácido manurónico y ácido gulurónico, el ácido alginico (en su forma de sales de sodio y calcio), y se emplean en forma de espumas producidas mediante liofilización o en forma de fibras flexibles. Estos materiales, cuando entran en contacto con la herida, absorben las secreciones producidas por la misma y se forma un gel que permite un adecuado intercambio de gases y vapor de agua para mantener el ambiente de la herida en unas

condiciones óptimas para su curación. El proceso de gelificación está relacionado con la presencia de los iones de calcio, que permite el entrecruzamiento de las cadenas de ácido alginico. Este proceso hace que el gel de alginato formado se degrade más lentamente y mantenga su estructura durante un tiempo superior a, por ejemplo, los apósitos hidrocoloides, por lo que lo hace un material ideal en ingeniería de tejidos. Comercialmente, se distribuyen bajo diversas denominaciones (SorbsanTM, KaltostatTM, Comfeel PlusTM o TegadermTM, por ejemplo, Figura I- 3) y se emplean en heridas con un nivel entre moderado y alto de exudación. Su retirada es sencilla ya que pueden ser rápidamente lavados con suero salino, lo que impide que, con su retirada, se elimine parte del tejido nuevo generado en la herida¹⁹.

- **Apósitos de hidrogel:** los hidrogeles son materiales insolubles en agua e hinchables (aunque insolubles en ella, pueden absorber agua aumentando su tamaño) fabricados a partir de polímeros sintéticos como polimetacrilatos y polivinilpirrolidona (PVP). Se emplean tanto en forma de gel amorfo como en *films* elásticos. En el segundo caso, se realiza un proceso de entrecruzamiento, lo que hace que puedan atrapar moléculas de agua en su estructura, por lo que pueden retener volúmenes significativos de este líquido



Figura I- 3. Distintos apósitos de alginato comerciales



Figura I- 4. Apósito de hidrogel comercial en tipo film (Nu-GelTM) y tipo gel amorfo (PurilonTM)

cuando se encuentran en contacto de heridas que supuran. En el caso de que se apliquen en forma de gel amorfo, se hace necesario el empleo de un apósito secundario y requiere que se cambie con regularidad. Al igual que en los casos anteriores, se comercializan bajo diferentes marcas, como por ejemplo Nu-gel™ y Purilon™ (Figura I- 4)¹⁹.

- **Apósitos adhesivos semi-permeables:** este tipo de apósitos originalmente se fabricaron a partir de derivados de nylon rodeados de polietileno adhesivo, por lo que se engloban dentro de los apósitos de tipo isla. Sin embargo, estos materiales no conseguían absorber una cantidad suficiente de humedad, por lo que se formaba una película de humedad entre la herida y el apósito que provocaba la maceración de la herida y aumentaba el riesgo de una infección en la misma debido a la proliferación de bacterias. Actualmente, en lugar de nylon se emplea poliuretano cubierto con derivados acrílicos, lo que hace que este tipo de apósitos sea permeable al vapor de agua y a gases, pero no a los líquidos exudados por la herida. Debido a la naturaleza elástica y flexible de estos polímeros, se adapta perfectamente a los contornos del cuerpo, por lo que no requiere emplear un apósito secundario para su uso. Se comercializan bajo distintas marcas comerciales (Opsite™, Cutifilm™ o Bioclusive™, por ejemplo) que difieren entre sí en términos de permeabilidad al vapor, adaptación a los contornos, extensión o capacidad adhesiva (Figura I- 5)²⁶.



Figura I- 5. Apósitos semipermeables comerciales

- **Apósitos de espuma:** este tipo de apósitos se fabrican a partir de membranas de espuma de poliuretano y, en algunos casos (por ejemplo, en la marca Tielle™), se emplean capas adicionales con distintas funciones, como evitar que el tejido nuevo se adhiera al apósito, evitar una pérdida excesiva de fluidos o impedir la infección bacteriana. Estos apósitos mantienen un ambiente húmedo alrededor de la herida, proporcionan un aislamiento térmico, y poseen una elevada absorción de fluidos (que se puede regular en función de las propiedades físicas de la espuma) y una elevada tasa de transmisión de vapor de agua. Además de Tielle™, se comercializan bajo otras marcas comerciales como Lyofoam® o Allevyn®²⁶.

- **Apósitos bioactivos:** este tipo de apósitos, además de regular los niveles de humedad en la herida toman parte en el proceso de curación de la herida. Por

un lado, están fabricados con polímeros que tienen un papel activo en el proceso de curación de la herida como el colágeno (que promueve la proliferación de los fibroblastos), el ácido hialurónico (componente de la matriz extracelular) o el quitosano (que promueve la formación de tejido granular durante la fase de proliferación celular de la curación). Por otro lado, en este tipo de apósitos se incorporan otros compuestos como factores de crecimiento celular o compuestos con diferentes propiedades farmacológicas (analgésica, bactericida o antiinflamatoria, entre otras), que favorecen la curación de la herida. Finalmente, están formados por polímeros biodegradables que pueden incorporarse a las rutas metabólicas del organismo, eliminando la necesidad de retirarlos de la herida²⁶.

- **Sustitutos de piel (*Tissue Engineered Skin Substitutes*):** se trata de la última generación de apósitos, que combinan el empleo de polímeros como andamios para sustratos que reemplazan el tejido celular perdido y, así, se acelera el proceso de curación. En general, hay dos tipos de matrices, dependiendo de si contienen o no células. Las matrices que no contienen células se fabrican bien a partir de colágeno y compuestos presentes en la matriz extracelular (como el ácido hialurónico) o bien a partir de dermis natural a la que se le ha extraído todos los componentes celulares manteniendo la arquitectura del fragmento. Las matrices con contenido celular se fabrican a partir de una lámina de polímeros biodegradables (como, por ejemplo, el colágeno) sobre la cual se siembran células epiteliales (del paciente u obtenidas a partir de células madre) para favorecer el crecimiento de nuevo tejido. En ambos casos, los apósitos poseen unas propiedades mecánicas similares a las de la piel además de que se degradan gradualmente dejando tras de sí una estructura adecuada, por lo que son ideales para su empleo como apósitos. Sin embargo, a pesar de las ventajas que presentan y el gran potencial de estos apósitos, su uso está limitado debido tanto a los altos costes de fabricación como a los problemas éticos y legales derivados de la investigación con células madre. Comercialmente, se pueden encontrar bajo diversas marcas como IntegraTM, BiobraneTM, AllodermTM o Dermagraft^{TM19,26}.

Tabla I- 4. Tipos de apósitos y sus principales características

TIPO DE APÓSITO		PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS
APÓSITOS TRADICIONALES	Vendas	SopORTE para apósitos primarios. Capaces de mantener una compresión
	Gasas	Barrera contra patógenos (sin humedecer). Absorción de exudados
APÓSITOS MODERNOS	Apósitos hidrocoloides	Adhesión en superficies secas y húmedas. Permeable a humedad y gases. Baja adhesión al tejido nuevo
	Apósitos de alginato	Permeable a humedad y gases. Lenta degradación. Retirada de la herida mediante lavado
	Apósitos de hidrogel	Aplicación tanto en forma de lámina como en forma de gel. Alta retención de líquido
	Apósitos semi-permeables	Permeable a vapor de agua y gases. Impermeable a líquido. Elásticos y flexibles
	Apósitos de espuma	Mantienen un ambiente húmedo. Absorben fluidos. Permeables al vapor de agua. Aislamiento térmico
	Apósitos bioactivos	Fabricados a partir de compuestos integrantes del proceso de curación. Biodegradables
	Sustitutos de piel	Propiedades mecánicas similares a la piel. Biodegradables

1.3.2. Sistemas de liberación de fármacos

Como se ha mencionado anteriormente, el ideal de apósito debería favorecer la curación de la herida y mantener el entrono libre de patógenos que pudieran infectarla y alterar el proceso normal de curación. Estas características se pueden alcanzar incluyendo en los apósitos compuestos con distintas propiedades, como antibióticos, antiinflamatorios, factores de crecimiento o suplementos minerales (cinc y cobre) y vitaminas (principalmente A, C y E). Este tipo de compuestos se aplican tanto en apósitos tradicionales (como gasas impregnadas de parafina) como en apósitos avanzados (incluyendo hidrocoloides, hidrogeles, alginatos, espumas y geles de silicona)¹⁹.

Sin embargo, el principal reto a la hora de aplicar estos compuestos es su liberación. En estos casos es necesario “liberar en el lugar correcto la concentración indicada durante el tiempo adecuado”²⁷ el fármaco en cuestión. La correcta combinación de estos tres factores (lugar de liberación, concentración liberada y espacio temporal) viene determinada en función tanto de las características físico-químicas del fármaco empleado como de las barreras biológicas que éste debe atravesar para realizar su función. El problema de muchos fármacos, altamente activos en las condiciones adecuadas, es que no son tan efectivos a la hora de aplicarlos ya que no poseen una suficiente biodisponibilidad debido a que son insolubles en fluidos biológicos y/o tienen una baja permeabilidad a través de las diferentes barreras del cuerpo humano. Por tanto, su efectividad terapéutica no viene tan determinada por su actividad sino por su biodisponibilidad en el lugar objetivo.

Los sistemas convencionales de liberación de fármacos incluyen tabletas, píldoras, cápsulas, soluciones inyectables, supositorios, aerosoles, líquidos, cremas o ungüentos, en función de la enfermedad a tratar y del órgano afectado. Estas formas de administración suelen ir acompañadas de efectos adversos que se atribuyen principalmente a dos factores: una bio-distribución poco específica y una liberación no controlada del fármaco, que provoca una elevada concentración en un momento puntual seguida de una ausencia del mismo. Debido a esto, la investigación en nuevos sistemas de liberación se ha conducido buscando dos requisitos básicos: por un lado, liberar el fármaco en el lugar correcto a una dosis adecuada dependiendo, idealmente, de las demandas del organismo, y por otro lado monitorizar la actividad del fármaco durante el tratamiento. En resumen, “la

razón fundamental en la investigación en nuevos sistemas de liberación de fármacos es permitir una liberación sostenida y controlada del fármaco para mantener unos niveles eficientes del mismo y simultáneamente reducir sus efectos adversos”^{28–30}.

En esta línea de avance, la nanotecnología se ha erigido como una solución muy apropiada para la fabricación de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos. Durante los últimos treinta años, la nanotecnología ha sido considerada por algunos como uno de los campos más importantes de la ciencia moderna. Este campo engloba a los materiales que se encuentran en la escala de 1 y 100 nm, lo que les proporciona una relación área-volumen muy elevada lo cual determina muchas de las propiedades del material (por ejemplo, solubilidad, estabilidad mecánica y sus propiedades físico-químicas, entre otras). El empleo de estos materiales, por un lado, ha permitido mejorar la liberación del fármaco en el órgano objetivo, mientras que por otro lado se ha conseguido monitorizar su acumulación y desplazamiento a través de células y tejidos, permitiendo obtener una mejor comprensión de su farmacocinética y farmacodinámica^{31,32}.

El empleo de nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos ha demostrado numerosas ventajas, como la reducción de las dosis de fármaco requeridas, la reducción en las variaciones del efecto del tratamiento dependiendo del paciente, la reducción de la dependencia del efecto en función de si el paciente se encuentra o no en ayunas, una mejor solubilidad en fluidos biológicos, una mejor biodisponibilidad tras su administración oral, una mejor velocidad de disolución y un mayor control de la acción terapéutica tras su administración. Además, en función de los materiales empleados se puede manejar su presencia en el organismo controlando la degradación (o la no degradación) de las mismas a partir de los materiales y técnicas empleados en su síntesis³².

Tradicionalmente, los nanomateriales se han clasificado en función de su tamaño, dividiéndose en función del número de dimensiones de sus medidas que se encuentren fuera de la escala nanométrica^{32,33}.

- **Estructuras sin ninguna dimensión fuera de la escala nanométrica (*zero-dimensional nanostructures*):** en este tipo de estructuras de forma esférica o en forma de *clusters* se incluyen nanopartículas y nanopartículas funcionalizadas con estructuras dendríticas.

- **Estructuras con una dimensión fuera de la escala nanométrica (*one-dimension nanostructures*):** en esta sección se engloban fibras, cables y estructuras

en forma de varilla (*rods*) con una de sus dimensiones fuera de la escala nanométrica.

- **Estructuras con dos dimensiones fuera de la escala nanométrica (*two-dimension nanostructures*):** se incluyen dentro de esta sección películas, placas y redes con dos de sus dimensiones fuera de la escala nanométrica.

- **Estructuras con tres dimensiones fuera de la escala nanométrica (*three-dimension nanostructures*):** en este tipo de materiales se incluyen aglomeraciones de nanopartículas y nanocables que, aunque sus dimensiones se encuentran fuera de la escala nanométrica, poseen características comunes con los nanomateriales.

1.3.2.1. Nanomateriales empleados como sistemas de liberación de fármacos

La clasificación presentada anteriormente, es muy amplia y engloba a todo tipo de nanomateriales. Sin embargo, no todos ellos se pueden emplear como sistemas de liberación de fármacos. A continuación, se presentan los tipos de nanomateriales usados con mayor frecuencia para la liberación de fármacos (resumido en la Tabla I- 5) con las características y aplicaciones más relevantes de cada grupo.

- **Nanomateriales basados en carbono:** los nanotubos de carbono son estructuras cilíndricas formadas por redes hexagonales de átomos de carbono con un diámetro aproximado de 1 nm y una longitud de entre 10 y 100 nm. Poseen una alta conductividad eléctrica y una gran resistencia. Los fullerenos son agrupaciones de 60 o más átomos de carbono con una estructura poligonal que pueden ser funcionalizados para la liberación de distintos fármacos y biomoléculas como por ejemplo gemcitabina, doxorubicina, anfotericina B y precursores de cisplatino^{31,34,35}.

- **Nanopartículas metálicas:** se trata de nanopartículas de entre 0.8 y 200 nm de diámetro basadas en oro, plata, níquel y óxido de hierro principalmente, y, aunque poseen una elevada área superficial y pueden incorporar una dosis alta de fármaco, presentan el inconveniente de su toxicidad frente a células humanas^{36,37}. En biomedicina se emplean mayoritariamente nanopartículas de oro y de plata y su estudio se centra en sus efectos antimicrobianos ya que este tipo de nanopartículas pueden interactuar con la membrana celular de microorganismos patógenos, como algunas bacterias^{36,38}. Finalmente, la superficie de este tipo de nanopartículas se puede modificar con diferentes grupos funcionales, empleándose las

nanopartículas obtenidas en transfección de genes o alterando el objetivo terapéutico donde actúan^{36,39}.

- **Nanocristales:** se trata de partículas de fármaco que cristalizan en dimensiones nanométricas y presentan en su superficie macromoléculas de polímero y surfactantes no iónicos. Esto permite reducir la acumulación de partículas portadoras en el organismo, que el fármaco se encuentre disponible rápidamente en el lugar de actuación y un aumento de solubilidad del mismo⁴⁰. Algunos de los fármacos empleados bajo esta forma son la rapamicina, el megestrol, el fenofibrato o el aprepitant³².

- **Quantum dots:** se trata de nanocristales de materiales semiconductores de un tamaño de entre 1 y 5 nm formados por un núcleo de semiconductor inorgánico rodeado por un recubrimiento orgánico. Debido a sus propiedades ópticas, en biomedicina se emplean como trazadores de procesos intracelulares y en aplicaciones de bioimagen para monitorización de procesos en tiempo real. Como herramientas terapéuticas también se emplean en procesos de hibridación de ADN y como vectores no virales en terapias génicas⁴¹.

- **Dendrímeros:** están formados por estructuras hiper-ramificadas en las que se pueden diferenciar tres regiones (el núcleo, las unidades de ramificación y la superficie). Poseen un tamaño menor de 10 nm y una estructura globular repleta de cavidades internas, además de ser capaces de ensamblarse entre sí unidades con distintas propiedades. En este tipo de estructuras, el fármaco se puede incorporar tanto encapsulado en las cavidades como unido a los grupos funcionales de la superficie. Además, la posibilidad de funcionalizar con distintas moléculas la superficie de los dendrímeros permite modular tanto su citotoxicidad como su biopermeabilidad³².

- **Liposomas:** se trata de vesículas cerradas formadas por la hidratación de fosfolípidos. Se encuentran de forma natural en los organismos ya que las membranas celulares y vesículas intra y extracelulares están compuestas por fosfolípidos, al igual que los liposomas, que los emplean para controlar el tránsito de moléculas entre el interior y el exterior celular. En el laboratorio, se pueden emplear como sistemas de liberación de fármacos dada su alta eficiencia de encapsulación de distintos fármacos y su biocompatibilidad, ya que este tipo de partículas poseen una estructura similar a las membranas celulares⁴². Dada la naturaleza anfifílica de los fosfolípidos, los liposomas pueden transportar tanto fármacos hidrofílicos (en el interior acuoso de la partícula) como hidrofóbicos

(insertados en la membrana lipídica que forma la partícula). Sin embargo, presentan el inconveniente de que son retirados rápidamente del sistema circulatorio a través del retículo endotelial y del sistema fagocítico. Actualmente, se comercializan diferentes formulaciones como Calyx® y Miocet®, que incorporan doxorubicina o Daunosome®, que incorpora daunorrubicina, ambos fármacos empleados en terapias contra el cáncer^{32,43}. Además de para la administración de fármacos, los liposomas se han empleado también para la aplicación de vacunas basadas en ARN mensajero, como la desarrollada por los equipos de Pfizer y Moderna frente al coronavirus SARS-COV-2⁴⁴.

- **Polimerosomas:** se trata de vesículas esféricas formadas por bloques de co-polímeros anfifílicos. Este polímero está formado por una subunidad hidrofílica, como el ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) y por una subunidad hidrofóbica como el poli-etilenglicol (PEG) o la poli-caprolactona (PCL). Este tipo de estructuras son similares a los liposomas, ya que al igual que ellos adoptan forma de membrana bicapa. La diferente carga electrostática que presentan los polimerosomas en comparación con los liposomas, retrasa la interacción con las membranas plasmáticas, lo que, a diferencia de los liposomas, permite modular la liberación de los fármacos cargados en los mismos, así como aumentar el tiempo de circulación en el sistema sanguíneo⁴⁵⁻⁴⁷.

- **Nanopartículas poliméricas:** se trata de partículas de entre 10 y 100 nm de diámetro fabricadas a partir de multitud de polímeros tanto sintéticos (PLGA, PCL, poli-acrilamida o poli-acrilato, entre otros muchos) como naturales (como albúmina, alginato, colágeno, gelatina o quitosano). Dependiendo del polímero empleado, la nanopartícula sintetizada es o no biodegradable, pudiéndose modular además su velocidad de degradación³². La amplia variedad de polímeros permite la encapsulación de todo tipo de fármacos con distintas propiedades físico-químicas. Generalmente, se distinguen dos tipos, partículas esféricas (en las que el fármaco se encuentra distribuido dentro de la matriz polimérica) y cápsulas (en las que se distingue un núcleo, generalmente de fármaco, rodeado de una membrana de un material diferente, normalmente el polímero). Finalmente, la posibilidad de emplear distintos materiales permite el empleo de polímeros que liberen el fármaco encapsulado como respuesta a distintos estímulos, como pueden ser, entre otros, la temperatura o el pH⁴⁸.

Tabla I- 5. Características y aplicaciones de distintas nanoestructuras empleadas como sistema de liberación de fármacos (adaptado de Khan y colaboradores)³²²

TIPO	TAMAÑO (nm)	PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS	PRINCIPALES APLICACIONES BIOMÉDICAS
Nanotubos de carbono	0.5-3 nm (diámetro) 20-1000 nm (longitud)	Elevada resistencia mecánica y propiedades eléctricas únicas	Transporte de péptidos y genes al citoplasma y al núcleo celular
Nanopartículas metálicas	< 100 nm	Área superficial elevada, posibilidad de funcionalizar la superficie, estables en disolución	Liberación de fármacos y genes, herramienta de diagnóstico y ablación térmica
Nanocristales y quantum dots	2 - 9.5 nm	Fluorescentes, espectro de emisión estrecho, elevada foto-estabilidad	Imagen celular, hibridación de ADN, marcaje de marcadores de cáncer de mama y otras células cancerosas
Dendrimeros	< 10 nm	Altamente ramificados y peso molecular monodisperso	Liberación controlada de compuestos bioactivos, liberación de compuestos dirigida a los macrófagos y al hígado
Liposomas	< 100 nm	Biocompatibles, alta eficiencia de encapsulación, facilidad de síntesis	Liberación pasiva y activa de genes, proteínas y péptidos, entre otras moléculas
Polimerosomas	10-100 nm	Alta eficiencia de encapsulación, elevada bioestabilidad	Liberación dirigida de fármacos
Nanopartículas poliméricas	10 - 100 nm	Biodegradables, biocompatibles, protección de los compuestos encapsulados	Liberación controlada de fármacos y liberación activa y pasiva de compuestos bioactivos

1.3.3. Nanomateriales empleados como sistema de liberación de fármacos en apósitos

Como se ha podido comprobar, hay una amplia variedad de nanomateriales que pueden ser empleados como sistemas de liberación de fármacos. Como se menciona en la sección 1.3.2, para la obtención del apósito ideal es necesaria la encapsulación y liberación controlada de ciertas biomoléculas terapéuticas. Sin embargo, debido a sus características, no todos pueden ser incluidos eficazmente en apósitos para el tratamiento de heridas. A continuación, se presenta una serie de materiales que han sido utilizados para este fin.

1.3.3.1. Nanotubos de carbono

Como ya se ha mencionado anteriormente, los nanotubos de carbono se pueden emplear para la encapsulación de diferentes fármacos y moléculas activas. Zhicheng y colaboradores prepararon nanotubos de carbono cargados factor de crecimiento endotelial vascular, una proteína involucrada en los procesos de formación de nuevos vasos sanguíneos, o de reparación de los ya existentes, en el organismo. Tras la síntesis de estos nanotubos cargados de proteína, los incluyeron en membranas ultrafinas de PLGA en distintas proporciones, para después incluirlas en otras membranas de matriz dérmica acelular para probar su eficacia *in-vitro*. En todos los casos, las membranas sintetizadas probaron que favorecen el crecimiento celular de fibroblastos y endotelios, además de demostrar una liberación sostenida de la proteína a lo largo del tiempo⁴⁹. Por otra parte, Simmons y colaboradores prepararon nanotubos de carbono recubiertos de iodopolivinilpirrolidona (también denominada povidona), un antiséptico ampliamente empleado en heridas. Posteriormente, depositaron los nanotubos sintetizados en membranas de politetrafluoroetileno (PTFE) para obtener apósitos con propiedades antisépticas y con una liberación sostenida de la povidona, consiguiendo la inhibición *in-vitro* del crecimiento de *E. coli* hasta 48 horas tras la aplicación del tratamiento⁵⁰.

1.3.3.2. Nanopartículas metálicas

La actividad bactericida de los iones plata frente a distintas bacterias (incluyendo especies resistentes a diversos fármacos^{51,52}) es bien conocida, por lo que una forma de emplearlos como tratamiento es su liberación a partir de nanopartículas de este metal. Moreno y colaboradores prepararon membranas de

polimetilmetacrilato (PMMA) como apósitos en las que incluyeron nanopartículas de plata mediante un proceso de reducción de nitrato de plata que previamente habían incluido en el proceso de síntesis de las membranas. En su estudio, logran regular la liberación de plata desde las membranas en función de la cantidad de Ag(0) (a mayor tiempo de reducción, mayor cantidad de plata metálica, lo que hace que la liberación de los iones Ag⁺ se produzca de forma más sostenida), además de comprobar su efectividad frente a *S. aureus*⁵³. Otro ejemplo académico del uso de nanopartículas en apósitos lo presentan Tian y colaboradores, cargando nanopartículas de plata de aproximadamente 14 nm de diámetro en apósitos. Probaron la eficacia *in-vivo* de estos apósitos para combatir una infección en heridas producidas por quemaduras y comprobaron que ninguno de los animales tratados con estos apósitos desarrolló ninguna infección hasta cinco días después del tratamiento, mientras que en los animales a los que no se les aplicó ningún tratamiento desarrollaron infección desde el día uno tras provocar la quemadura. Además, comprobaron que el tiempo de tratamiento necesario para curar completamente la herida con estos apósitos se reducía en comparación con el necesario tras el tratamiento con amoxicilina y metronidazol⁵⁴. Pero la plata no es el único metal empleado como fármaco en membranas. Dorazilová y colaboradores incluyeron en dos tipos de membranas (de colágeno y de una mezcla de éste con quitosano) nanopartículas de selenio dado su potencial uso como agente bactericida. Ambos tipos de membranas (con y sin quitosano) presentaron una mayor actividad bactericida frente a *S. aureus* y *E. coli* que las membranas sin partículas empleadas como control⁵⁵. Balcucho y colaboradores ensayaron la posibilidad de emplear nanopartículas de óxido de cobre frente a *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), comprobando que estas partículas tienen efecto bactericida frente a este microorganismo. Posteriormente, incluyeron estas partículas en membranas de PCL y ensayaron sus propiedades bactericidas. En los resultados obtenidos, los autores comprobaron que, a partir de un 0.07 % m/m de nanopartículas respecto a PCL, las membranas presentaban efecto bactericida frente a MRSA, por lo que las mismas presentaron potencial para ser empleadas como apósitos con propiedades bactericidas⁵⁶.

1.3.3.3. Liposomas

Aunque este tipo de estructuras se emplean habitualmente en forma “libre”, también se pueden encontrar ejemplos de su uso en sistemas de liberación controlada de fármacos en forma de membrana para su posible empleo como

apósitos. Así, Nunes y colaboradores incluyeron liposomas cargados de ácido úsnico (un metabolito de diversos líquenes con propiedades antibióticas, antiinflamatorias y analgésicas, entre otras) en membranas de colágeno⁵⁷. Estas membranas las emplearon en ensayos *in-vivo* como tratamiento en quemaduras de segundo grado, comprobando como la incorporación de los liposomas cargados con ácido úsnico aceleraba la curación del proceso en comparación con los animales tratados con los materiales control (membranas de colágeno con liposomas vacíos y sin liposomas)⁵⁸. La eficacia de estos materiales es clara, ya que posteriormente da Silva y colaboradores extendieron su empleo a lesiones oculares en ratones de laboratorio, comprobando cómo son capaces de acelerar el proceso de curación en heridas causadas por quemaduras químicas⁵⁹. Xi y colaboradores prepararon liposomas cargados con el plásmido IL-4 (molécula que regula una de las rutas de la respuesta inflamatoria del organismo, además de promover la regeneración de los tejidos dañados) incorporando posteriormente estos liposomas en la superficie de nanofibras tipo *core-shell* de ácido poli-láctico (PLA) orientadas en una única dirección, para favorecer el crecimiento de las nuevas células en una dirección. El incluir los liposomas en este tipo de fibras permitió a los autores regular la liberación del plásmido en función del pH al que se encuentra el apósito, obteniendo un material capaz de responder en función del entorno en que se encuentra⁶⁰. Como último ejemplo del empleo de los liposomas como sistemas de liberación de fármacos en apósitos se presenta el trabajo de Wang y colaboradores. Los autores prepararon liposomas cargados con criptotansinona, un diterpeno de origen natural con propiedades bactericidas y antiinflamatorias empleado en el tratamiento del acné. Posteriormente, incluyeron estos liposomas en un hidrogel de poliácido de sodio y fabricaron apósitos de distintos tamaños empleando la impresión 3D como técnica. La inclusión del compuesto en los liposomas permitió una liberación más sostenida del fármaco que en los mismos apósitos en los que se incluyó el compuesto libre, además de aportar una mejor permeación a través de la piel en los ensayos *ex-vivo* llevados a cabo por los autores⁶¹.

1.3.3.4. Nanopartículas poliméricas

Al igual que en el caso de los liposomas, las nanopartículas poliméricas cargadas con fármaco se suelen emplear de forma directa, administrándose oralmente o en forma de suspensión inyectable. Sin embargo, para el tratamiento de heridas estas formas de administración no son adecuadas por lo que, para aprovechar el potencial de estas estructuras en el tratamiento de heridas, muchos

autores han trabajado en la posibilidad de incluir nanopartículas poliméricas en distintos tipos de membranas para desarrollar apósitos con propiedades cercanas a las de las partículas.

Amanat y colaboradores describieron la síntesis de nanopartículas de acetato-butirato de celulosa cargadas con resveratrol, un compuesto polifenólico con diversas propiedades farmacológicas (antioxidante, antiinflamatorio, cardioprotector, hepatoprotector e inmunoregulador). Estas partículas presentaron un perfil de liberación sostenida del polifenol, por lo que decidieron incorporarlas en membranas de una mezcla de carboximetil celulosa y quitosano. Las membranas cargadas con nanopartículas mostraron en ensayos *in-vitro* un perfil de liberación similar al de las nanopartículas “libres” por lo que los autores ensayaron *in-vivo* el efecto de las membranas en la curación de heridas. En estos ensayos, las membranas cargadas con nanopartículas mostraron su potencial uso en curación de heridas (aceleraron el ritmo de curación) frente a los controles en los que usaron membranas sin partículas o con partículas sin resveratrol⁶². Por otro lado, Kaparekar y colaboradores sintetizaron nanopartículas de quitosano cargadas con ácido gálico (un polifenol de origen natural con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes y que ha demostrado su potencial uso en la aceleración del curado de heridas) mediante el método de gelación ionotrópica. Posteriormente, incluyeron estas partículas en membranas de una mezcla de fibrina y colágeno empleando genipina como agente entrecruzante. En ensayos *in-vitro*, tanto las nanopartículas libres como las incluidas en membranas mostraron un perfil de liberación de ácido gálico similar, además de mostrar actividad antioxidante frente a los materiales análogos que no incluían al polifenol. Las membranas cargadas con nanopartículas mostraron también, tanto en ensayos *in-vitro* como *in-vivo* su potencial uso en regeneración de heridas, acelerando el proceso de migración celular (en ensayos *in-vitro*) y reduciendo el período de epitelización en heridas provocadas en animales de laboratorio frente a materiales análogos que no incluían nanopartículas cargadas con ácido gálico⁶³.

Alberti y colaboradores prepararon nanopartículas de lecitina de soja cargadas con un extracto de própolis verde, una mezcla rica en polifenoles que estimula la proliferación de fibroblastos 3T3 en ensayos *in-vitro* e induce una mayor velocidad en el cierre de heridas en ensayos *in-vivo*. El incluir el extracto encapsulado en nanopartículas poliméricas proporciona una mayor homogeneidad en su distribución dentro de las nanofibras de alcohol polivinílico (PVA), ya que es poco soluble en agua, disolvente empleado para la síntesis de estas nanofibras. En los

ensayos *in-vivo* llevados a cabo por los autores, las membranas con nanopartículas cargadas con el extracto presentaron un mayor porcentaje de cierre de las heridas tras 7 días de tratamiento al compararlo con el resultado obtenido para el tratamiento del mismo tipo de heridas con membranas cargadas con nanopartículas sin el extracto y la herida control, sin ningún tratamiento aplicado⁶⁴.

Karimi y colaboradores prepararon nanopartículas de quitosano cargadas con el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, molécula que juega un papel fundamental en el proceso de curación de las heridas ya que estimula la producción de multitud de células implicadas en el proceso de reparación de tejidos. Posteriormente, incluyeron las nanopartículas sintetizadas en membranas de ácido hialurónico, adicionando además celulosa nanocristalina para mejorar las propiedades mecánicas de las membranas. Las membranas con nanopartículas cargadas, además de proporcionar *in-vitro* una liberación sostenida del factor estimulante, demostraron en ensayos *in-vivo* su capacidad para acelerar la curación de heridas, ya que tras 14 días de tratamiento se alcanzó la curación total mientras que en las heridas no tratadas, o tratadas con un material análogo que no contenía el factor estimulante, no se observó el cierre total de las heridas tras ese período de tiempo⁶⁵.

Como último ejemplo de nanopartículas poliméricas empleadas como medio de liberación de fármacos en membranas se expone la síntesis de hidrogel presentada por Farghaly y colaboradores. En un primer paso, los autores sintetizaron nanopartículas de mezclas de PEG y PVP en las que cargaron simvastatina, un fármaco que se emplea para prevenir la hiperlipidemia y que recientemente ha demostrado ser capaz de acelerar el proceso de curación de las heridas, (incrementando los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular) para posteriormente incluir las nanopartículas sintetizadas en un hidrogel de Carbopol® 934. En los ensayos *in-vitro* demostraron la liberación sostenida del fármaco, dependiente además del pH del medio, ya que se libera aproximadamente el doble de rápido en pH 5.5 respecto a pH 7.4, así como la permeación de la simvastatina a través de la piel en ensayos *ex-vivo*. Finalmente, emplearon el hidrogel preparado un modelo *in-vivo* de herida, comprobando como en los grupos de heridas tratadas con este material el tamaño de la herida se reducía más rápidamente que en el caso de las heridas control, demostrando la posibilidad de emplear este hidrogel cargado con nanopartículas como un apósito que favorece la curación de las heridas⁶⁶.

1.3.3.5. Nanofibras poliméricas

En todos los casos anteriores, las membranas se han empleado como mero soporte para la aplicación de otros tratamientos en la herida. Sin embargo, pueden ser empleadas a la vez como soporte y sistema de liberación de fármaco, reduciendo el número de variables a optimizar en el proceso de síntesis y el número de compuestos susceptibles de presentar problemas de citotoxicidad. Por estos motivos, numerosos autores han investigado la posibilidad de incluir fármacos y otras moléculas activas directamente en las nanofibras que forman el apósito.

Wutticharoenmongkol y colaboradores prepararon nanofibras de acetato de celulosa mediante *electrospinning* en las que incluyeron ácido gálico que, además de las propiedades mencionadas anteriormente, también posee propiedades bactericidas. Además de comprobar que el polifenol se liberaba de forma sostenida al medio externo, determinaron que las membranas cargadas con ácido gálico presentan actividad bactericida frente a la bacteria *S. aureus*, por lo que este material es un posible candidato para ser empleado como apósito ya que puede prevenir y combatir una infección bacteriana en heridas⁶⁷.

Rath y colaboradores, por su parte, prepararon nanofibras de gelatina en las que incluyeron cefazolina, un antibiótico de amplio espectro y estudiaron tanto la liberación como el efecto *in-vitro* e *in-vivo* de estos materiales. Los estudios de liberación demostraron que el antibiótico se libera de forma sostenida durante, al menos, 24 horas y los ensayos bactericidas *in-vitro* frente a *S. aureus* demostraron su potencial uso como material bactericida, al mostrar un halo de inhibición no presente en las muestras tratadas con membranas sin incluir el antibiótico. Finalmente, en los ensayos *in-vivo*, las membranas sin incluir antibiótico mostraron una mayor velocidad de curación que en las heridas sin tratamiento, siendo aún mayor esta velocidad en las heridas tratadas con las membranas cargadas con antibiótico, lo cual demuestra su potencial uso tanto para prevenir y tratar infecciones como para acelerar la curación en heridas⁶⁸.

Shin y colaboradores prepararon nanofibras de tipo *core-shell* de ácido hialurónico y PLGA en las que incluyeron galato de epigallocatequina (un polifenol con propiedades bactericidas, antiinflamatorias y actividad angiogénica) en el recubrimiento de PLGA. Estas fibras presentaron una liberación sostenida del polifenol hasta 28 días y mostraron su eficacia en la curación de heridas, ya que en comparación con otras heridas tratadas con membranas sin incluir el compuesto o con Rapiderm (un material comercial empleado comúnmente en este tipo de

tratamientos) el área de la herida en los distintos tiempos de estudio se vio reducida⁶⁹.

Como último ejemplo de nanofibras empleadas como sistemas de liberación controlada de fármacos se presenta el trabajo de Alavarse y colaboradores en el que prepararon nanofibras de una mezcla de PVA y quitosano cargadas con cloruro de tetraciclina un antibiótico de amplia aplicación en infecciones urinarias y periodontales. Las nanofibras sintetizadas presentaron una liberación brusca de la tetraciclina en las primeras horas seguida de una liberación más sostenida del fármaco. Estos materiales presentaron actividad bactericida frente a las bacterias *S. epidermidis* y *S. aureus* así como una baja citotoxicidad a las concentraciones bactericidas frente a células musculares lisas aórticas de ratón, lo que los presenta como unos candidatos adecuados para su uso como apósitos con propiedades bactericidas⁷⁰.

1.4. NANOMATERIALES POLIMÉRICOS

Como se puede comprobar en el apartado anterior, los nanomateriales poliméricos son la opción mayoritariamente elegida a la hora de encapsular fármacos para su posterior liberación al organismo. Estos materiales pueden ser preparados mediante múltiples procesos, por lo que a continuación se presentan algunos de los métodos de síntesis de nanopartículas y nanofibras más comunes. En la Figura I- 7 se presenta un resumen de los mismos.

1.4.1. Síntesis de nanopartículas poliméricas

Para la síntesis de nanopartículas poliméricas, en general, se pueden distinguir dos tipos de métodos de síntesis, en función de si se produce la polimerización de monómeros para generar nanopartículas poliméricas o de si se emplea una disolución o dispersión del polímero para producir las nanopartículas⁷¹.

1.4.4.1. Métodos de polimerización de monómeros

- **Polimerización de emulsiones:** este método emplea generalmente agua, un monómero con una reducida solubilidad acuosa, un surfactante y un iniciador soluble en agua. En estas condiciones, el monómero se encuentra disperso en agua y cuando entra en contacto con el iniciador (o se genera un radical por un estímulo externo como puede ser la radiación ultravioleta) se inicia la reacción de polimerización, separándose en dos fases (polímero y fase acuosa) y generándose las nanopartículas^{72,73}.

- **Polimerización de mini-emulsiones:** se trata, básicamente, de una modificación del método anteriormente descrito en la que se añade un co-estabilizador de bajo peso molecular y para generar la emulsión se emplea una fuente de energía, como los ultrasonidos. Mientras que mediante el método anterior se obtienen partículas de entre 50 y 300 nm de diámetro, con la generación de mini-emulsiones las partículas sintetizadas se encuentran en el rango de 10-30 nm^{74,75}.

- **Polimerización de micro-emulsiones:** en este caso, el iniciador no está en la fase acuosa donde se produce la dispersión polimérica (formada por micelas de en torno a 10 nm diámetro) si no que se añade tras la formación de dichas micelas. Este cambio se traduce en un cambio en las condiciones termodinámicas de la reacción de polimerización respecto a las producidas en la polimerización clásica de emulsiones, con lo que se generan unas nanopartículas de menor diámetro y con un menor índice de polidispersidad⁷¹.

- **Polimerización interfacial:** en este método de síntesis intervienen dos monómeros disueltos cada uno en un disolvente, con lo que se forman dos fases. La polimerización se produce en la interfase entre ambas por diversas reacciones como el entrecruzamiento, la poli-condensación o la polimerización radicalaria, generándose una suspensión de nanocápsulas⁷⁶.

1.4.4.2. Métodos de dispersión de polímero

- **Evaporación del disolvente:** se trata del primer método desarrollado para la síntesis de nanopartículas poliméricas a partir de polímero⁷⁷. Para la preparación de las partículas, se añade una disolución de polímero sobre un disolvente inmiscible y se aplica energía (mediante agitación o ultrasonidos) para la generación de la emulsión. Finalmente, se deja evaporar el disolvente, quedando una suspensión con las nanopartículas sintetizadas, que se pueden separar del disolvente mediante liofilización. Dentro de este proceso de síntesis, se emplean dos estrategias para la formación de emulsiones: la emulsión simple (una emulsión de fase orgánica, con el polímero, en agua) o la emulsión doble (una emulsión de fase acuosa en disolvente orgánico disperso a su vez en una fase acuosa), que permite la preparación de partículas con una geometría de cápsula. Inicialmente, se emplearon diclorometano y cloroformo como fases orgánicas, pero actualmente se han sustituido por acetato de etilo dada su menor toxicidad según la farmacopeia⁷⁸.

- **Precipitación salina (*salting-out*):** este método evita el empleo de disolventes clorados, al emplear disolventes miscibles con agua. Para ello, se emplea una disolución polimérica en un disolvente miscible en medio acuoso (como la acetona) y una disolución acuosa con una elevada fuerza iónica, por ejemplo, con una concentración muy alta de sal. Al añadir la disolución acuosa sobre la polimérica, bajo agitación continua, se forma una emulsión (dado que la elevada fuerza iónica impide la mezcla de ambos disolventes). Una vez formada la emulsión, se añade una cantidad suficiente de agua para reducir la salinidad del medio y permitir la mezcla del disolvente orgánico, que difunde a través del polímero, dejando como resultado una suspensión de nanopartículas poliméricas^{79,80}.

- **Nanoprecipitación:** este método es similar a la precipitación salina, sustituyendo la sal que proporciona una elevada fuerza iónica a la disolución acuosa por un surfactante como Tween o Pluronic, entre otros. Al añadir la disolución polimérica sobre esta disolución acuosa, se produce el desplazamiento de parte del disolvente orgánico, lo que permite la formación de pequeñas gotas de polímero que producen las nanopartículas poliméricas⁸¹. La diferencia con la emulsión-evaporación de solvente es que aquí el disolvente orgánico es miscible con el agua.

- **Diálisis:** en este método, el polímero se disuelve en un disolvente orgánico que se coloca en una membrana de diálisis del tamaño de poro adecuado (*molecular weight cut-off*), empleando como disolvente para realizar la diálisis uno miscible con el empleado para la disolución pero que no disuelva el polímero. Al desplazarse el disolvente del polímero fuera de la membrana, el polímero se agrega progresivamente precipitando, lo que genera una suspensión de nanopartículas homogéneas⁸²⁻⁸⁴.

- **Electrospraying:** el *electrospraying* (también denominado atomización electro-hidrodinámica) se basa en la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico del orden de kilovoltios entre una disolución polimérica conductora y el colector donde se depositan las partículas. En las condiciones adecuadas, se generan gotas cargadas de la disolución, que por diferencia de potencial viajan hacia el colector y durante ese trayecto el disolvente se evapora, quedando las partículas sólidas depositadas sobre el colector. Este método ha demostrado obtener una baja polidispersidad en el tamaño de las partículas sintetizadas, así como obtener unas altas eficiencias de encapsulación de otras moléculas y principios activos en las partículas, por lo que es un método atractivo para la preparación de nanopartículas⁸⁵.

1.4.2. Síntesis de nanofibras poliméricas

Al igual que en caso de las nanopartículas poliméricas, para la síntesis de nanofibras poliméricas hay distintos métodos de síntesis con sus propias características.

- **Estirado:** es el método más sencillo, en el cual se deposita una gota de disolución polimérica sobre una superficie y se estira de la misma lentamente para generar la nanofibra. Además de que se trata de un proceso discontinuo (al tener que preparar cada fibra individualmente) es difícilmente reproducible^{86,87}.

- **Síntesis mediante plantilla:** en este método, se hace pasar una disolución polimérica a través de una membrana de poro cilíndrico (con las dimensiones de la fibra deseada) que actúa como plantilla. Al otro lado del poro, la disolución de polímero interactúa con una disolución de precipitación con lo que se genera la nanofibra. Mediante este método se pueden generar nanofibras de diversos polímeros, así como materiales inorgánicos, pero tiene el inconveniente de que no se puede trabajar en continuo ya que hay que limpiar la plantilla tras cada síntesis^{88,89}.

- **Separación de fases:** se trata de un proceso largo de síntesis, que implica la disolución del polímero, su gelificación, la extracción del disolvente empleado y la congelación y posterior liofilización de la membrana. Además de la cantidad de tiempo necesaria para la obtención de las nanofibras, este proceso solo se puede emplear para la preparación de fibras de gelatina o de PLA⁹⁰⁻⁹².

- **Auto-ensamblado:** con este proceso, las fibras se construyen a partir de moléculas (denominadas bloques de construcción básicos) que se ordenan en forma de nanofibra mediante interacciones no covalentes. La estructura final se puede modificar ajustando factores como el pH, la temperatura y los bloques de construcción seleccionados^{93,94}.

- **Soplado en fusión:** las fibras se producen por la extrusión de polímero fundido a través de un orificio mediante una corriente de aire caliente. Es un método de síntesis rápido y escalable a nivel industrial y elimina los problemas derivados de la toxicidad de los disolventes empleados en otros métodos de síntesis. Permite además una mayor reproducibilidad en el diámetro de las fibras obtenidas así como la posibilidad de trabajar en continuo, pero presenta limitaciones a la hora de preparar fibras de diámetros menores de 400 nm,

encontrándose el diámetro medio de las fibras disponibles comercialmente entre 1 y 2 μm ⁹⁵⁻⁹⁷.

- **Electrospinning:** esta técnica tiene el mismo fundamento que el *electrospraying*. La diferencia radica principalmente en las características de la disolución polimérica. Si en el caso anterior, se generaban gotas de disolución cargadas, en este caso se genera un *jet* continuo cargado que produce una fibra de disolución. Esta fibra, al secarse en su trayecto entre el emisor y el colector se deposita en forma de membrana de nanofibras poliméricas libres de disolvente⁹⁸. Aunque los efectos de aplicar una diferencia de potencial a una disolución polimérica ya se observaron por Rayleigh en 1897, se estudiaron por Zeleny en 1914⁹⁹ y el primer equipo de producción de fibras mediante esta técnica se patentó por Formhals en 1934¹⁰⁰, no es hasta el siglo XXI cuando esta técnica empieza a implementarse en el ámbito académico e industrial y empieza a crecer exponencialmente, superando desde el año 2018 hasta el día de hoy la barrera de las 3000 publicaciones anuales (Figura I- 6). Una de las principales ventajas de esta técnica de síntesis, de cara a la encapsulación de fármacos, son las condiciones de síntesis suaves, ya que no se requieren de altas temperaturas (la evaporación del disolvente, por norma general, se produce a temperatura ambiente) para la preparación de las fibras, por lo que es difícil que se produzca la degradación del fármaco. El campo eléctrico no afecta a muchos fármacos. Además, el abanico de polímeros y disolventes que se pueden usar es muy amplio, por lo que se pueden encapsular fármacos con las más diversas propiedades físico-químicas^{97,98}.

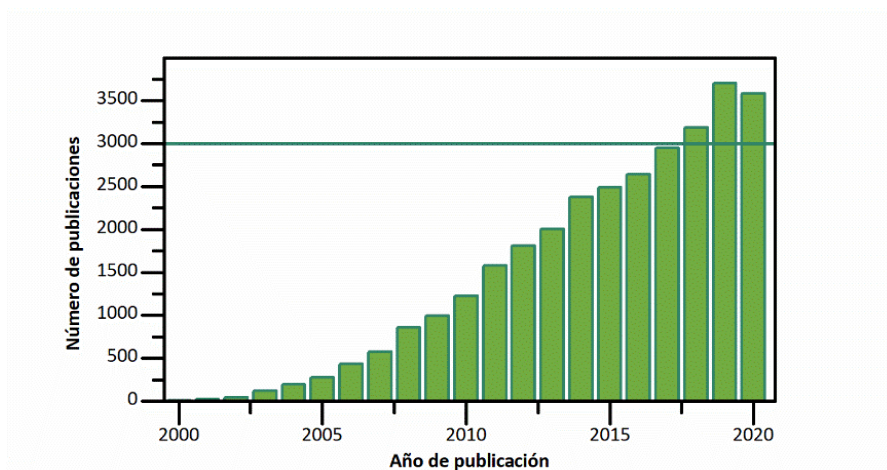


Figura I- 6. Número de publicaciones científicas anuales acerca de electrospinning entre los años 2000 y 2020. Fuente: Web Of Science

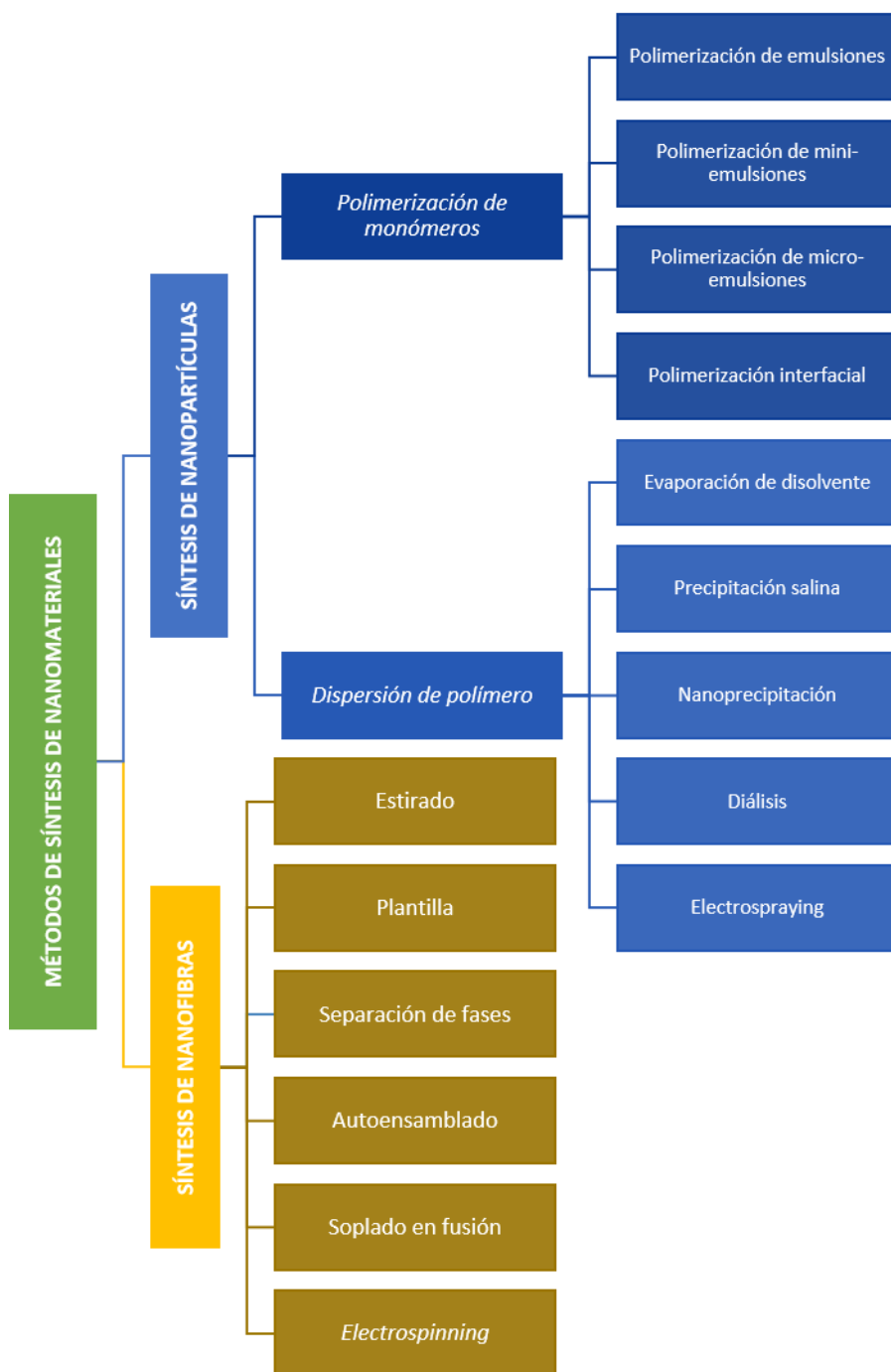


Figura I- 7. Resumen de métodos de síntesis de nanomateriales poliméricos

1.4.3. Control de la liberación en nanomateriales poliméricos

Además de elegir el método de síntesis más adecuado para la aplicación terapéutica que se requiera, es necesario controlar la dosificación del fármaco que incorpora al organismo a tratar. Para ello, es necesario conocer qué factores afectan a la liberación del fármaco al organismo. Así, en los materiales poliméricos las primeras vías de estudio del perfil de liberación se basan en el tamaño del material sintetizado, la porosidad del mismo y el peso molecular del polímero del que se compone dicho material¹⁰¹.

En el caso del tamaño del material, un elevado número de estudios han demostrado la relación entre el tamaño de las partículas o fibras sintetizadas y el perfil de liberación que presenta el fármaco encapsulado en las mismas. Por ejemplo, Chen y colaboradores prepararon microesferas de PLGA cargadas de gefitinib en cuatro rangos de diámetro distintos entre 20 y 100 μm . Además de diferencias en la cantidad de fármaco encapsulado, encontraron que, mientras que las partículas de entre 20 y 50 μm y las de menos de 20 μm liberaban todo el fármaco a lo largo de una semana, las de mayor diámetro (de entre 50 y 100 μm y mayores de 100 μm) mostraban una liberación más sostenida durante la primera semana, tardando hasta más de 3 meses en liberar todo el fármaco cargado¹⁰². Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, como Berkland y colaboradores, que sintetizaron partículas de PLGA de distintos diámetros cargadas con piroxicam. Mientras que las partículas de menor diámetro presentaron una liberación muy rápida del fármaco cargado, al aumentar el tamaño de las mismas se redujo la velocidad de liberación¹⁰¹. Este efecto puede ser explicado en base a la difusión del fármaco a lo largo del polímero, ya que, si la partícula tiene un tamaño mayor, mayor es también el camino a recorrer hasta abandonar la matriz polimérica. Pero, dado que de por sí, esta hipótesis no parece suficiente para explicar los distintos efectos, diversos autores proponen que el mecanismo de liberación está también influenciado por la relación área/volumen de los sistemas sintetizados: a un menor diámetro, este parámetro aumenta con lo que también aumenta la cantidad de agua que entra en contacto con el sistema y que extrae al medio externo el fármaco¹⁰¹. Por tanto, uno de los parámetros a tener en cuenta a la hora de diseñar un sistema polimérico de liberación de fármacos es el tamaño del mismo.

Otro factor a tener en cuenta es la porosidad del material sintetizado. Al igual que en el caso del tamaño del material, diversos autores han estudiado la influencia de la porosidad del mismo en el perfil de liberación del fármaco cargado. Kim y colaboradores prepararon microesferas porosas de PLGA cargadas con progesterona de aproximadamente 100 μm de diámetro. En comparación con partículas no porosas del mismo polímero y diámetro, las partículas porosas liberaron la totalidad del fármaco encapsulado tras 14 días de ensayo, mientras que en ese mismo período de tiempo las partículas no porosas liberaron sólo el 70 % del fármaco¹⁰³. Este efecto, fue confirmado, entre otros, por Klose y colaboradores empleando en su caso lidocaína como fármaco modelo. Mientras que las partículas porosas liberaron el total de lidocaína cargado antes de 30 días, para las partículas no porosas este porcentaje de liberación no se alcanzó hasta 45 días después de comenzar el experimento¹⁰⁴. Al igual que en el caso del tamaño de la partícula, un menor camino difusional a recorrer y una mayor relación área/volumen hace que, al aumentar la porosidad del material sintetizado aumente a su vez la liberación al medio de los fármacos cargados en el mismo.

Además de por el tamaño y la porosidad del material sintetizado, la liberación del fármaco se puede controlar en función del peso molecular del polímero utilizado. Así, para un mismo polímero, tipo de material y fármaco cargado, los sintetizados con un polímero de menor peso molecular presentan una liberación más acelerada en el período inicial mientras que los sintetizados con un polímero de peso molecular más elevado presentan una liberación más sostenida del fármaco en la primera fase de la liberación^{101,105}. Por ejemplo, Mylonaki y colaboradores sintetizaron partículas de PLGA de diversos pesos moleculares (entre 8 y 45 kDa) cargadas con atorvastatina, manteniendo constantes tanto la carga de fármaco como el tamaño de partícula. En todos los casos, tras 30 días de ensayo de liberación *in-vitro* se alcanzó el mismo porcentaje de fármaco liberado. Sin embargo, el perfil de liberación del mismo fue muy distinto entre ellos. Conforme los autores aumentaron el peso molecular del polímero empleado la liberación del mismo se produjo de forma más sostenida: mientras que en las partículas sintetizadas con PLGA de menor peso molecular el porcentaje máximo de liberación se alcanzó a los 14 días de experimento, para el resto de partículas este valor no se obtuvo hasta el día 30¹⁰⁶. Los polímeros de menor peso molecular, en general, absorben una cantidad menor de agua que los de mayor peso molecular, lo que favorece la difusión del fármaco hacia el medio externo. Además, esta mayor absorción de agua

también favorece la degradación del polímero, lo que erosiona el material y favorece una liberación más rápida del fármaco al medio^{107,108}.

A parte de estos 3 parámetros relacionados con la síntesis del material y que pueden ser considerados como una vía “pasiva” de control de la liberación del fármaco, ésta también se puede controlar de forma “activa” como respuesta a estímulos tanto internos como externos al organismo a tratar. Este tipo de estímulos son de diverso origen, pudiendo encontrar polímeros sensibles al pH del medio, al potencial redox, a distintas enzimas, a campos magnéticos y eléctricos, a ultrasonidos, a variaciones de la temperatura o a la incidencia de luz de una determinada longitud de onda. Mientras que en los casos anteriores (aun controlando el perfil de liberación) el inicio de la liberación está unido al inicio de la administración del material y a partir de ese momento no se puede detener, empleando polímeros sensibles a determinados estímulos se puede decidir tanto el inicio como el fin del tratamiento con solo aplicar o no el estímulo determinado^{109,110}. A continuación, se presenta un pequeño resumen de los estímulos empleados en la liberación de fármacos cargados en nanomateriales.

- **Temperatura:** los polímeros termosensibles cambian su estructura dependiendo de la temperatura a la que se encuentren. Este cambio puede ser inducido, bien por la propia temperatura del organismo o por estímulos externos como la luz (mediante un efecto fototérmico) o un campo magnético a través de la hipertermia. El ejemplo más común de polímero termosensible empleado en aplicaciones biomédicas es el poli(*N*-isopropilacrilamida), PNIPAm, que presenta un cambio reversible de su conformación hidrofílica a su conformación hidrofóbica cuando supera los 30°C aunque esta temperatura se puede modular en virtud de la proporción de sus monómeros constituyentes^{111,112}.

- **Luz:** la luz se trata de un estímulo físico que no necesita de un contacto directo y que puede ser activado y desactivado fácilmente. Principalmente, el espectro luminoso se divide en tres regiones (ultravioleta, visible e infrarrojo) en las cuales las moléculas fotosensibles pueden ser activadas. De las tres, la franja infrarroja del espectro es la más empleada en aplicaciones biomédicas debido a su mayor penetración y menor atenuación cuando tiene que atravesar tejidos biológicos en comparación con las otras dos regiones. En este tipo de aplicaciones, se suele dopar el polímero con moléculas fotosensibles (por lo general, azobenceno) y el cambio conformacional del polímero viene dado por uno de tres posibles mecanismos: por efecto fototérmico (en el que un compuesto aumenta su

temperatura al incidir luz sobre el mismo), por la absorción de dos fotones o por el uso de nanopartículas de tipo *up-conversion*, que absorben radiación en el rango infrarrojo y la emiten en el rango visible o en el ultravioleta (promoviendo un efecto fotodinámico más intenso que si la radiación producida estuviera en el rango infrarrojo)^{113,114}.

- **Campos magnéticos:** el empleo de campos magnéticos alternos en combinación con partículas sensibles a ellos, induce una estimulación térmica debido a la vibración de partículas magnéticas por fenómenos de relajación de Néel y Brownianos. Este efecto se ha aprovechado en combinación con polímeros termosensibles en los que se carga, actuando el polímero como protector de las partículas magnéticas y las partículas como fuente de calor que inducen la liberación del fármaco cuando se activa el estímulo magnético^{112,115}.

- **Campos eléctricos:** los polímeros conductores de electricidad son una opción para la carga de fármacos y su posterior liberación mediante la aplicación de un campo eléctrico controlado. El polímero conductor más usado se trata del polipirrol, dado su estabilidad y su capacidad de liberar y cargar un amplio espectro de fármacos^{116,117}.

- **Ultrasonidos:** la energía generada mediante ultrasonidos puede provocar el calentamiento de un polímero termosensible o producir cambios conformacionales en un polímero, por lo que se trata de un estímulo atractivo para su uso en liberación controlada de fármacos. En particular, los ultrasonidos de alta intensidad (dada su elevada energía y la posibilidad de enfocarlos en un área milimétrica) se han empleado en combinación con nanopartículas de PLGA, entre otras, para la liberación de fármacos¹¹⁸.

- **pH:** los cambios en el pH que se dan entre un tejido sano y uno afectado por una patología pueden ser aprovechados para emplear polímeros sensibles al pH, que varían su grado de ionización en función de la acidez/basicidad del medio. Este cambio puede derivar en un cambio conformacional en su estructura que, en el caso de llevar cargado un fármaco, lo puede liberar al medio de forma análoga a los polímeros termosensibles. De esta forma, mientras se encuentra en un tejido sano, el polímero no libera el fármaco mientras que cuando ese tejido se ve afectado se produce el cambio de pH que induce la liberación del mismo. Sin embargo, en general estos polímeros presentan la desventaja que, una vez inducido el cambio conformacional, no pueden volver a su conformación anterior, por lo que no se puede detener la liberación del fármaco^{119,120}.

- **Potencial redox:** el glutatión, por ejemplo, es una proteína que regula el entorno reductor del medio extracelular, además de ser capaz de romper los enlaces de tipo di-sulfuro. Esta molécula en tejidos tumorales se encuentra en una concentración cuatro veces superior que en tejidos sanos. Si se emplean polímeros con enlaces di-sulfuro para encapsular fármacos y si se administran en un tejido sano, apenas se liberarían al medio mientras que si llegan a un tejido tumoral, la alta concentración de glutatión provocaría la degradación del polímero y la liberación del fármaco en el punto de interés, sin verse afectados en otros puntos sanos del organismo¹¹⁰.

- **Enzimas:** este tipo de moléculas son catalizadores muy específicos que, en ciertos casos, se encuentran sobre-expresadas cuando se da una patología. En aplicaciones biomédicas, se puede aprovechar este hecho modificando la superficie de materiales para que se inicie su degradación por la presencia de una enzima característica de una patología, obteniendo así un material que solo libera el fármaco encapsulado cuando la patología está activa¹²¹.

1.5. RESISTENCIAS BACTERIANAS

Como se puede comprobar en esta breve revisión bibliográfica, son muchos los esfuerzos llevados a cabo por la comunidad científica para desarrollar nuevos apósitos con el objetivo de proteger y mejorar la velocidad y calidad de curación de las heridas producidas en el cuerpo humano. Sin embargo, además de desarrollar un material que libere la dosis adecuada de fármaco en el momento y lugar precisos, el fármaco debe ser eficaz frente al tratamiento que se desea aplicar. En general esto no suele ser un problema, pero cuando se emplean antibióticos para tratar o prevenir una infección bacteriana el escenario cambia.

Aunque originalmente los antibióticos fueron concebidos para su uso en humanos, en la actualidad se han extendido también a las terapias para animales y plantas. Este hecho, unido al abuso y mal uso que se da también en humanos ha conducido a un aumento desmesurado en el desarrollo de resistencias bacterianas, alcanzando niveles alarmantes a lo largo de todo el mundo¹²²⁻¹²⁴. Ya en 2014, se produjeron aproximadamente 700000 muertes debido a infecciones producidas por cepas resistentes a antibióticos de bacterias relativamente comunes (como *E. coli* o *S. aureus*). Además, cerca de 200000 personas mueren al año de tuberculosis debido a la infección por cepas resistentes a múltiples antibióticos y en India las infecciones neonatales por bacterias resistentes a antibióticos causan la muerte aproximadamente a 60000 bebés. En el mismo estudio O'Neill considera que estas

cifras son incluso más bajas de la realidad debido a problemas de notificación y diagnóstico en determinadas zonas. En cualquier caso, se estima que para el año 2050 el número de muertes anuales debido a infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos conocidos se dispare hasta cerca de 10 millones de pacientes a lo largo de todo el mundo superando por ejemplo a los decesos que se producirán por cáncer¹²⁵.

Este último dato, que en 2014 sólo era una estimación, está cada vez más cerca de convertirse en realidad. Según los datos publicados por el Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés) en su informe sobre la resistencia bacteriana en Europa en el año 2018 sólo en este continente se produjeron más de 670000 infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos disponibles actualmente. De esta cifra, aproximadamente 33000 pacientes fallecieron como consecuencia directa de la infección y los costes en los sistemas de salud de los países implicados se estimaron en 1.1 billones de euros sólo durante ese año. Sólo a modo de muestra, en la Unión Europea el 58.3 % de las muestras aisladas de *E. coli* durante 2018 presentaron resistencia a, al menos, un antibiótico que se había mostrado eficaz anteriormente para su tratamiento¹²⁶.

Por tanto, es obvia la necesidad del desarrollo de nuevos antibióticos efectivos y que no generen resistencias. Sin embargo, esto presenta un problema crucial: mientras que el desarrollo de nuevos antibióticos sintéticos es costoso tanto en términos económicos y temporales, la plasticidad genética de las bacterias hace que aparezca una mutación que conduzca a una resistencia mucho más rápido de lo que se puede desarrollar un nuevo compuesto^{127,128}.

Debido a este hecho, muchos investigadores han dirigido sus esfuerzos al estudio de compuestos de comprobada eficacia a lo largo del tiempo. Dentro de estos, se encuentran los compuestos aislados a partir de aceites esenciales de plantas. Históricamente, especias como el tomillo, el clavo o el romero (y los aceites esenciales obtenidos de los mismos) han sido empleados como conservantes debido a sus propiedades antimicrobianas, que impiden que las bacterias, hongos y levaduras colonicen los alimentos y los descompongan. Hoy día se siguen usando las mismas plantas como conservantes, por lo que sus propiedades bactericidas no se ven afectadas por mutaciones de las bacterias, lo que hace a estos aceites una potencial fuente de compuestos bactericidas alternativos a los antibióticos actuales con los que combatir el creciente problema de las resistencias bacterianas^{129,130}. Los antibióticos generalmente solo tienen una única diana en las bacterias dada su especificidad, pero, por otro lado, ésta hace que las probabilidades de que las

bacterias desarrollen mutaciones genéticas en contra de dicho antibiótico son muy altas. Sin embargo, los componentes de los aceites esenciales muestran múltiples mecanismos de acción por lo que las probabilidades de que las bacterias desarrollen múltiples mutaciones genéticas se minimizan.

I.6. OBJETIVOS

Con todos estos precedentes, en el presente trabajo se planteó el diseño de membranas nanoestructuradas para su empleo como apósitos que controlaran y eliminaran infecciones bacterianas, además de contribuir en otros aspectos del proceso de curación de heridas, como la reducción de los procesos inflamatorios.

En un primer lugar, se planteó la síntesis de nanofibras de PCL cargadas con compuestos activos con propiedades tanto bactericidas como antiinflamatorias para el tratamiento de heridas. El polímero elegido presentó un perfil de liberación que, aunque es sostenido, tiene efecto únicamente en un corto período de tiempo. La técnica de síntesis elegida para la preparación de las mismas fue el *electrospinning*, una técnica rápida y versátil para la síntesis de nanofibras poliméricas.

Con el objetivo de controlar la liberación, se planteó la modificación del polímero empleado como reservorio del compuesto activo, así como de la morfología del material en el que se encapsula el fármaco. Para ello, se planteó el empleo de micropartículas de PLGA como material de encapsulación del compuesto activo. Dado que las partículas por sí mismas no constituyen ningún apósito, para su empleo en heridas se depositaron sobre las nanofibras poliméricas sintetizadas con anterioridad, con la excepción de que no se incluyó compuesto activo en las mismas. El cambio de polímero tuvo un efecto en el perfil de liberación del compuesto activo, que se prolongó durante un período de tiempo mayor que en el caso de las nanofibras poliméricas. La técnica de síntesis elegida para las micropartículas de PLGA fue el *electrospraying*, que, al igual que el *electrospinning*, es una técnica rápida, versátil y muy apropiada cuando la volatilidad de los compuestos activos elegidos es alta. El objetivo fue el demostrar que es posible alcanzarse un control cinético en la liberación de un principio activo desde un apósito.

Finalmente, y para obtener un apósito que proporcionara al medio compuesto durante un período de tiempo mayor que en los casos anteriores, se planteó la encapsulación del mismo en nanopartículas inorgánicas. El material elegido en este caso fue la SBA-15, en forma de nanopartículas de tipo bastón preparadas mediante

síntesis hidrotermal y en las que se cargó el compuesto activo mediante el método de impregnación-adsorción. Para su empleo en apósitos, dichas partículas se depositaron sobre nanofibras de PCL mediante un proceso de *electrospraying* de las partículas pre-sintetizadas sobre las nanofibras. Este material presentó un perfil de liberación mucho más extendido en el tiempo que sus predecesores, así como una eficiencia de encapsulación del compuesto activo y de inclusión de las partículas en las fibras muy alto.

Transversalmente a estos tres objetivos, la elección de los compuestos activos empelados se basó en minimizar la posible generación de resistencias bacterianas con el uso de los materiales preparados. Para ello, los compuestos activos elegidos se seleccionaron a partir de los componentes principales presentes en los aceites esenciales de origen natural (en concreto de origen vegetal) que, como se ha presentado en párrafos anteriores son menos susceptibles a la generación de resistencias bacterianas. Se seleccionaron los principios activos para los cuales había evidencia científica de su claro efecto antiinflamatorio y bactericida.

CAPÍTULO II: NANOFIBRAS DE PCL

II.1. INTRODUCCIÓN

II.1.1. Compuestos bactericidas obtenidos de aceites esenciales

Tal y como se indica en el capítulo I, una alternativa a los antibióticos empleados actualmente es el tratamiento con aceites esenciales extraídos de plantas. El que estos aceites se hayan podido emplear durante tanto tiempo sin verse alteradas sus propiedades bactericidas y que apenas generan resistencias bacterianas son dos de sus grandes ventajas. Múltiples autores han buscado explicación a su reducida capacidad de generar resistencias, coincidiendo en que la razón se encuentra en los múltiples mecanismos de acción que poseen los compuestos presentes en los aceites esenciales lo que reduce drásticamente la posibilidad de que una misma bacteria genere múltiples mutaciones simultáneas que combatan estos mecanismos^{131–135}. Sin embargo, la complejidad en la composición de estos aceites (generalmente en los mismos se encuentran presentes entre 20 y 60 compuestos, pudiendo llegar hasta el centenar de compuestos) así como la variación de la composición en función de múltiples factores (estación de recolección, edad de la planta, clima, órganos de donde se extrae e, incluso, método de extracción)¹³⁶ hace que sea necesario enfocar el estudio de sus propiedades bactericidas en unos pocos componentes. En este trabajo se ha centrado la atención en carvacrol y timol, dos de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*)¹³⁷ entre otros, que presentan actividad bactericida frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas¹³⁸.

Betancourt y colaboradores¹³⁹ proponen que el mecanismo de acción del carvacrol y timol se basa en su capacidad para desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, lo que conduce a la liberación de lipopolisacáridos, incrementa la permeabilidad de la membrana citoplasmática al adenosín trifosfato y permite la salida de iones del citoplasma, lo cual rompe el equilibrio homeostático del medio celular. Además, proponen que el mecanismo de inhibición está también relacionado con la interferencia del carvacrol y timol con la acil-homoserina lactona, afectando a su síntesis y actividad. Esta molécula actúa en procesos de señalización intercelulares, conocidos como *quorum sensing*, relacionados con la formación de *biofilm* (ecosistema microbiano organizado formado por una o varias especies de microorganismos asociados a una superficie biótica o abiótica y con características funcionales y estructuras complejas). Estos procesos están relacionados con la

supervivencia, virulencia y patogenicidad de estos microorganismos, por lo que se ha incrementado la atención en el desarrollo de terapias que actúen como inhibidores del *quorum sensing*, empleando compuestos extraídos de aceites esenciales para ello¹⁴⁰. Para el caso de las bacterias Gram positivas, se ha descrito que estos compuestos pueden alterar su membrana citoplasmática dañando la bicapa lipídica. Esto afecta a la permeabilidad de la membrana, provocando una liberación al medio externo de iones K^+ y ATP¹⁴¹. Recientemente en nuestro grupo de investigación se ha evaluado la actividad bactericida y el mecanismo de acción de diferentes compuestos de origen natural (ácido rosmarínico, β -cariofileno, carvacrol, cinamaldehído, escualeno, eugenol y timol)¹³⁸. Los resultados obtenidos en dicho estudio confirman el mecanismo anteriormente propuesto en la bibliografía para carvacrol y timol (de los compuestos ensayados, los que mayor actividad bactericida presentan), por el cual estos compuestos dañan la membrana celular, produciendo la rotura de la misma y el vaciado de los componentes intracelulares.

II.1.2. Nanofibras cargadas con compuestos con actividad bactericida

Como alternativa a los tratamientos actuales para evitar o eliminar las infecciones en heridas, es necesario el desarrollo de apósitos bactericidas con una reducida citotoxicidad frente a células humanas. Con este fin, las membranas compuestas por nanofibras fabricadas mediante *electrospinning* se presentan como unos materiales muy prometedores, ya que su gran relación entre superficie y volumen hacen que sea posible una elevada carga con compuestos activos (bactericidas, regenerativos o antiinflamatorios) y la liberación de los mismos en concentraciones terapéuticas. Así mismo, este tipo de materiales poseen una estructura porosa que permite el intercambio de gases con el ambiente, así como una permeabilidad al vapor de agua que permiten mantener unas condiciones adecuadas de humedad en la herida, lo que facilita la curación de esta.

Por un lado, se pueden fabricar membranas de polímeros con propiedades bactericidas. Por ejemplo, Da Silva y colaboradores prepararon fibras de Eudragit L-100 y de una mezcla del mismo con óxido de poli-etileno (PEO). El recubrimiento de las mismas con polipirrol proporciona a las fibras sintetizadas actividad bactericida frente a *Staphylococcus aureus* sin la necesidad de incorporar ningún componente “no polimérico”¹⁴². De Paula y colaboradores prepararon mediante *electrospinning* fibras de PCL mezcladas con PEG y metacrilato de gelatina (GelIMA). Estos

materiales se mostraron capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa*, siendo mayor esta capacidad cuando al material sintetizado se le sometía a un proceso de entrecruzamiento mediante luz UV¹⁴³. Como último ejemplo, Inal y colaboradores prepararon fibras de gelatina y una mezcla de gelatina y cloruro de [2-(metacriloíloxi)etil]trimetil-amonio en diferentes proporciones mediante *electrospinning*, comprobando como la incorporación de la mezcla incrementa el poder bactericida de las fibras frente a *S. aureus*, MRSA, *Acinetobacter baumannii* y *E. coli*¹⁴⁴.

Además del empleo de polímeros con actividad bactericida, otra alternativa para la síntesis de materiales con propiedades bactericidas es la incorporación de nanopartículas metálicas con conocidas propiedades biocidas, quedando así las fibras como soporte de las mismas. Shalumon y colaboradores prepararon mediante *electrospinning* fibras de alginato de sodio y PVA en las que incorporaron nanopartículas de óxido de Zn¹⁴⁵. La incorporación de estas nanopartículas (que poseen propiedades bactericidas debido a sus propiedades fotocatalíticas¹⁴⁶) hace que las fibras presenten propiedades bactericidas frente a *E. coli* y *S. aureus*. Rath y colaboradores incorporaron nanopartículas de plata en fibras de colágeno sintetizadas mediante *electrospinning* a partir de una disolución del polímero y las nanopartículas ya sintetizadas. La incorporación de las nanopartículas de plata hace que las fibras muestren actividad bactericida frente a *S. aureus* y *P. aureginosa*¹⁴⁷. Finalmente, Ahire y colaboradores incorporaron nanopartículas de cobre en fibras de poli-acrilonitrilo y de una mezcla de PEO y ácido poli-d-l-láctico, comprobando en ambos casos que esta incorporación confería a las fibras propiedades bactericidas frente a *E. coli*¹⁴⁸.

Además de materiales nanoestructurados con propiedades bactericidas se han incluido en fibras otros compuestos con estas propiedades. Cui y colaboradores incorporaron doxiciclina, un antibiótico de amplio espectro, en nanofibras de PLA sintetizadas mediante *electrospinning*. La incorporación de este antibiótico hace que las fibras presenten actividad bactericida frente a *E. coli*¹⁴⁹. Ajmal y colaboradores comprobaron que la incorporación en fibras de PCL de ciprofloxacino (otro antibiótico de amplio espectro) junto con quercetina (un antioxidante de origen natural con propiedades antiinflamatorias) hace que las fibras presenten actividad bactericida frente a *S. aureus*. Además, estas fibras presentaron una liberación sostenida del fármaco, comprobándose que tras siete días mantenían su capacidad bactericida (aunque con un efecto menor que en el día inicial)¹⁵⁰. Bakhsheshi-Rad y colaboradores incluyeron cefalexina (un tipo de cefalosporina)

como agente bactericida en fibras de una mezcla de PCL y GelIMA. Con la inclusión de un 2 % de este antibiótico, las fibras presentaron actividad bactericida frente a *E. coli* y *S. aureus*¹⁵¹.

Aunque la incorporación de estos antibióticos (y partículas con propiedades bactericidas) en nanomateriales suele implicar una reducción en la concentración necesaria para tener efecto terapéutico (es decir, se reduce la concentración mínima bactericida, MBC) siguen siendo fármacos que generan resistencias bacterianas (al igual que los antibióticos, las nanopartículas con propiedades bactericidas también pueden generar resistencias^{152,153}). Por eso, este capítulo se enfocó hacia la síntesis y caracterización de membranas de nanofibras poliméricas cargadas con carvacrol y timol, compuestos que, como ya se ha explicado anteriormente, es difícil que generen resistencias bacterianas. En bibliografía se encontraron pocos ejemplos de la inclusión de estos dos compuestos en nanofibras de PCL. Tampau y colaboradores^{154,155} reportaron la síntesis de nanofibras de PCL cargadas con carvacrol mediante *electrospinning*, a partir de distintas disoluciones del polímero mezclado con carvacrol en ácido acético glacial, obteniendo una eficiencia de encapsulación de entre el 50 y el 86 %, dependiendo de la formulación empleada. Posteriormente, estos mismos autores incluyeron estas fibras en un sistema multicapa junto con láminas de almidón y evaluaron la capacidad bactericida de este sistema con el objetivo de usarlo en el envasado de alimentos¹⁵⁵. Por otro lado, Karami y colaboradores prepararon nanofibras de PCL cargadas con timol mediante *electrospinning*, con un porcentaje teórico del 9 % m/m de timol respecto al polímero¹⁵⁶. Sin embargo, sólo muestran los resultados bactericidas obtenidos mediante un ensayo de difusión en disco de nanofibras híbridas de PCL y PLA cargadas con timol sin ofrecer resultados cuantitativos.

II.1.3. Compuestos de origen natural con propiedades antiinflamatorias

Además de propiedades bactericidas, los aceites esenciales poseen otros tipos de propiedades con aplicaciones farmacológicas, como son las propiedades antiinflamatorias. Así pues, en bibliografía se pueden encontrar ejemplos tanto de aceites esenciales completos como de compuestos individuales extraídos de los mismos que son capaces de modular efectivamente la respuesta inflamatoria celular^{157,158}.

Algunos de estos compuestos pueden ser empleados como antiinflamatorios ya que interfieren en la ruta de señalización del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas (NF- κ B), factor que estimula la proteína activadora, desencadenando la transcripción de genes pro-inflamatorios. Por ejemplo, el escualeno (un triterpeno presente en numerosas fuentes naturales como arroz, trigo o aceituna) o la curcumina (un polifenol presente en el rizoma de la cúrcuma) interfieren en puntos de la ruta de señalización del NF- κ B, modulando la respuesta inflamatoria^{159,160}. Dos compuestos que ya se ha comentado que poseen actividad bactericida, el carvacrol y el timol, disminuyen el nivel de la interleucina-2 y del interferón γ . Estas citoquinas desencadenan distintos mecanismos de respuesta inflamatoria, por lo que la reducción en el nivel de las mismas tiene un efecto antiinflamatorio¹⁶¹. Además de estas referencias bibliográficas, recientemente en nuestro grupo de investigación se ha evaluado la capacidad antiinflamatoria de 4 compuestos de origen natural: carvacrol, escualeno, timol y tirosol. De este estudio, el escualeno se presenta como el más activo seguido del tirosol¹⁶².

Así pues, en este capítulo se presenta la síntesis de membranas compuestas por nanofibras de PCL cargadas con compuestos de origen natural (carvacrol y timol) para su uso como apósitos con propiedades bactericidas frente a bacterias Gram positivas (*S. aureus*) y frente a bacterias Gram negativas (*E. coli*). Así mismo, se preparan también membranas compuestas por nanofibras de PCL cargadas con compuestos de origen natural con propiedades antiinflamatorias (escualeno y tirosol) y su combinación con las anteriores para la obtención de membranas híbridas que combinen propiedades bactericidas y antiinflamatorias.

II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1. Optimización de disoluciones y electrospinning de nanofibras

Para la síntesis de nanofibras de PCL se partió de una disolución del polímero en una mezcla de diclorometano (DCM) y *N-N*-dimetilformamida (DMF) (en relación 1:1 en volumen) con una concentración de 10 % m/m. Para la preparación de las disoluciones, a 5 mL de DCM y 5 mL de DMF se añadieron 1.2 g de PCL en un bote de polipropileno hermético (debido a la alta volatilidad de los disolventes) y se mantuvieron toda la noche bajo agitación para garantizar la completa disolución del polímero y la homogeneidad de la disolución.

Para la síntesis de nanofibras de PCL cargadas con compuesto activo, se partió de una disolución de 10 % m/m de PCL a la que se le añadieron concentraciones crecientes de los distintos compuestos activos. Los porcentajes ensayados se indican en la Tabla II- 1. Debido a la elevada volatilidad de la mayoría de los compuestos empleados, éstos se añadieron a la disolución de polímero 30 minutos antes del proceso de *electrospinning*, tiempo suficiente para su completa disolución y homogeneización en la disolución polimérica.

Tabla II- 1. Disoluciones preparadas de PCL 10 % m/m con distintas concentraciones de compuestos activos

Compuesto	Concentración (% m/m)	Compuesto	Concentración (% m/m)
Timol	10	Carvacrol	10
	20		20
	30		30
	40		40
Tirosol	20	Escualeno	20
Timol-Escualeno	20 (Timol) 20 (Escualeno)	Timol-Tirosol	20 (Timol) 20 (Tirosol)

Todos los materiales preparados en este capítulo se sintetizaron en el equipo YFlow 2.2 D500 descrito en el anexo A.2.A.2.1 equipado con el colector plano de 30 x 30 cm o con el colector rotatorio de varillas.

Para la preparación de las membranas cargadas con un solo compuesto activo, la disolución de PCL con el compuesto se traspasó a una jeringa de 10 mL que se colocó en el soporte de una de las bombas de jeringa del equipo, conectándola a través de tubos de teflón a una aguja para *electrospinning*. Para esta síntesis se utilizó el colector plano de aluminio de 30 x 30 cm (cubierto con papel de aluminio).

Para la preparación de las membranas cargadas con dos compuestos activos, se preparó cada disolución independientemente y se traspasaron a sendas jeringas de 10 mL que se colocaron en los soportes de las bombas de jeringa del equipo, conectando cada jeringa a una aguja para *electrospinning* a través de tubos de teflón. En este caso, se empleó el colector rotatorio de varillas (cubierto de papel de aluminio) programado a una velocidad de 200 rpm.

En ambos casos, la distancia entre la punta de la aguja y la superficie del colector se fijó en 18 cm. El voltaje en el colector se mantuvo constante a -4 kV mientras que el voltaje positivo aplicado a la aguja se mantuvo entre +7.42 y +12.96 kV, variándolo en cada caso para mantener un cono de Taylor estable. En todos los casos, el proceso se desarrolló a temperatura ambiente y con una humedad relativa de entre 30-50 %.

II.2.2. Caracterización

II.2.2.1. Morfología

Para la caracterización morfológica de las membranas sintetizadas en este capítulo, se recurrió principalmente a la microscopía electrónica de barrido (SEM).

II.2.2.2. Carga de compuesto activo

II.2.2.2.1. GC-MS

Para calcular la cantidad de compuesto activo incorporado en las nanofibras sintetizadas, se empleó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Para ello, se preparó una recta de calibrado entre 1 y 30 ppm en metanol para cada compuesto y se añadió una concentración de 5 ppm de S-(-)-limoneno como patrón interno para corregir posibles alteraciones puntuales en la inyección.

Para la preparación de las muestras, se disolvieron aproximadamente 10 mg de membrana en 10 mL de una mezcla de acetonitrilo y DCM (en relación volumétrica 1:1), se realizaron dos diluciones de la misma con metanol (1:10 y 1:20) para ajustar la concentración esperada de compuesto activo a la recta de calibrado y se añadieron 5 ppm del patrón interno. Una vez realizada la medida, se empleó la recta de calibrado para cada compuesto para el cálculo de la concentración de compuesto activo en cada muestra. Para el cálculo del porcentaje de compuesto activo incorporado en cada material se midieron tres réplicas de, al menos, tres síntesis independientes de cada material. Los resultados obtenidos se presentan como la media de las medidas y el error obtenido se expresa como la desviación estándar de las mismas.

II.2.2.2.2. RMN-¹H

Para las muestras cargadas con carvacrol y timol, se empleó también la resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) como técnica de cuantificación, realizados en el Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén con la colaboración de la Profesora Sofía Salido Ruiz. Para ello, se preparó en un tubo para RMN (5 mm diámetro externo) una disolución de PCL en cloroformo deuterado (CDCl₃) a una concentración de 20 mg/mL a la que se le añadieron cantidades crecientes de una

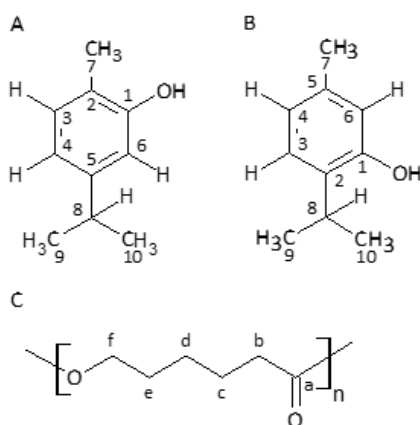


Figura II- 1. Estructuras químicas de las moléculas de carvacrol (A), timol (B) y PCL (C) con la numeración empleada en la descripción de RMN-¹H

disolución de 20 mg/mL de carvacrol o timol en CDCl₃. El rango de concentraciones empleado para el caso del carvacrol se situó entre 1.96 y 20.63 % m/m y para el caso del timol entre 1.60 y 17.80 % m/m. El espectro de protón se adquirió en un equipo Bruker DPX 400. La cuantificación se basó en la relación entre la señal del grupo metileno f (-O-CH₂-) de la PCL (4.04 ppm, triplete, J = 6.6 Hz) y la señal de H-3 (Figura II- 1) para el carvacrol (7.06 ppm, doblete, J = 7.6 Hz) o el timol (7.08 ppm, doblete, J = 7.6 Hz). Con estos datos, se construyó una recta de calibrado representando la relación entre la

intensidad de ambas señales frente a la concentración de carvacrol o timol.

Para el análisis de muestras se disolvieron 20 mg de muestra en 700 μL de CDCl_3 y la disolución resultante se transfirió a un tubo para RMN para su medida. Una vez obtenida la relación entre las señales previamente mencionadas, se interpoló su valor en la recta de calibrado construida para obtener la concentración de carvacrol o timol en la muestra.

II.2.2.3. Determinación del perfil de liberación

El perfil de liberación de un material proporciona la cantidad de compuesto activo liberado en cada instante de tiempo. La determinación de este perfil es fundamental para comprobar si se ha obtenido un material que libere el compuesto activo cargado de forma sostenida a lo largo del tiempo. Para la determinación de los perfiles de liberación de los materiales sintetizados en este capítulo, se eligió un modelo dinámico, en el cual una bomba cromatográfica (Shimadzu LC-10AT VP) impulsa fluido biológico simulado a través de una cantidad determinada (100 mg) de material a un flujo controlado (1 mL/h) y del que se recogen alícuotas de 1 mL a tiempos determinados gracias a un automuestreador programable¹⁶³. El fluido biológico simulado se compone de tampón fosfato salino (PBS) con un 2 % m/v de Tween 80 (en el caso de las muestras que contienen como compuesto activo escualeno se empleó como fluido biológico simulado agua destilada con un 2 % m/v de Tween 80) y las alícuotas recogidas se analizaron mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC-UV-Vis) con los equipos y métodos descritos en el anexo A.2.5. Las alícuotas se recogieron cada minuto durante los primeros 10 minutos, cada 10 minutos entre 10 y 60 minutos, cada 30 minutos entre 1 y 3 horas y cada hora entre 3 y 8 horas.

II.2.2.4. RMN- ^{13}C

Para las muestras cargadas con timol y carvacrol, se empleó la técnica de desacoplamiento protónico de banda ancha en espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (RMN- ^{13}C) para analizar la naturaleza del enlace existente entre el compuesto activo y el polímero. Para ello, se empleó el mismo equipo que para el análisis de RMN- ^1H , adquiriendo el espectro a 100 MHz con una ventana espectral entre 0 y 250 ppm. Las muestras se prepararon disolviendo 40 mg de una mezcla de PCL y carvacrol (o timol), en una proporción 1:1, en 700 μL de CDCl_3 , transfiriendo la disolución al mismo tipo de tubos que se emplearon para la cuantificación mediante RMN- ^1H . Al igual que en el caso de los experimentos de RMN- ^1H , éstos

fueron realizados en colaboración con la Profesora Sofía Salido Ruiz en la Universidad de Jaén.

II.2.2.5. Propiedades bactericidas

II.2.2.5.1. Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC)

Dado el potencial uso como agentes bactericidas, se eligieron membranas cargadas con carvacrol y con timol para realizar ensayos que determinaran su capacidad bactericida, calculando la MIC (concentración a la cual se inhibe el crecimiento visible de la bacteria)⁷ y la MBC (concentración a la cual se elimina la totalidad de las bacterias presentes en la muestra). En este trabajo, el valor de MIC se estableció como la reducción de $3 \log_{10}$ en el crecimiento respecto del control. Dada la naturaleza hidrofóbica del polímero, se empleó el ensayo bactericida de superficie (adaptación de la norma ASTM E-2180¹⁶⁴) descrito en el anexo A.3.1. Para este ensayo se empleó como modelo de bacteria Gram + la bacteria *S. aureus* ATCC 25923 y como modelo de bacteria Gram - la bacteria *E. coli* S17.

II.2.2.5.2. Influencia del contacto

Para evaluar la influencia del contacto entre la membrana y la bacteria en la capacidad bactericida de la primera, se analizaron los compuestos liberados de la membrana a diferentes tiempos. Para ello, se siguió el protocolo descrito en el anexo A.3.2. Los tiempos de medida elegidos fueron 1, 2 y 7 días y los modelos bacterianos empleados fueron los mismos que se utilizaron para determinar MIC y MBC.

II.2.2.5.3. Influencia de la volatilidad del compuesto activo

Debido a la alta volatilidad del carvacrol y del timol, se diseñó un ensayo para confirmar que el efecto bactericida observado en las determinaciones de MIC y MBC no fuera debido a la exposición de vapores del compuesto provenientes de otra muestra. Para ello, se llenó un pocillo de una placa *multiwell* de 6 pocillos con 2 mL de medio de cultivo de triptona de soja sólido (TSA) inoculado con 10^6 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mL) del microorganismo correspondiente. En otro pocillo se añadió la cantidad necesaria para alcanzar la MIC o la MBC para cada compuesto y cada microorganismo¹³⁸. Cada condición, así como el control de crecimiento, se colocó en placas diferentes, que se incubaron durante 24 horas a 37

°C en una caja cerrada con agua. Finalmente, cada muestra se trató de la misma forma que las muestras empleadas para la determinación de la MIC y MBC.

II.2.2.5.4. Microscopía confocal

Para observar cualitativamente el crecimiento bacteriano sobre las membranas preparadas, se empleó un kit de tinción de bacterias (LIVE/DEAD™ BacLigh™ Bacterial Viability Kit, Invitrogen™) que tiñe selectivamente las bacterias vivas y las muertas y permite su posterior visualización mediante microscopía confocal.

Para ello, tras esterilizar las muestras (mediante irradiación UV a 254 nm durante 30 minutos por cada cara), se incubaron con 1 mL de medio de cultivo de triptona de soja (TSB) inoculado con 10^6 UFC/mL del correspondiente organismo en una placa *multiwell* de 24 pocillos. Debido a la naturaleza hidrofóbica del polímero, para asegurar que la muestra se mantiene en el fondo del pocillo se emplearon unos insertos *CellCrown*™ (Scaffdex). Pasado el tiempo de incubación, se retiró el TSB y la muestra se lavó con solución salina estéril. Posteriormente, se tiñó siguiendo las instrucciones del fabricante y se lavó el exceso de tinción con solución salina antes de su colocación en un portaobjetos de vidrio para su visualización en un microscopio confocal Leica TCS SP2.

II.2.2.6. Estudio microbiológico in-vivo

Además de la determinación de la MIC y MBC de parte de las membranas sintetizadas, dentro del grupo de investigación se ensayaron las propiedades bactericidas de las membranas cargadas con timol en un modelo escisional de herida infectada en ratón. Todos los experimentos fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza de acuerdo con la Política Española para la Protección Animal (RD53/2013) y la Directiva de la Unión Europea 2010/63 para la protección de los animales destinados a la investigación científica.

El procedimiento experimental empleado se describe en el anexo A.4.1) empleando como modelo de Gram + la bacteria *S. aureus* ATCC 25923. Se emplearon discos de 12 mm de diámetro de las membranas sintetizadas con una masa suficiente para alcanzar la MBC frente a *S. aureus* determinada previamente en los ensayos *in-vitro*. Se establecieron 6 grupos experimentales de 6 ratones cada uno: a) grupo control (con heridas no infectadas), b) grupo infectado con heridas

tratadas con membranas de PCL, c) grupo infectado con heridas tratadas con membranas de PCL-TIM, d) grupo infectado con heridas tratadas con timol, e) grupo infectado con heridas tratadas con clorhexidina (usado como control de un antiséptico de amplio espectro comúnmente utilizado). En cada grupo, 3 de los ratones se sacrificaron tras 3 días de tratamiento, mientras que los otros 3 se sacrificaron a los 7 días, momentos en los que las heridas se midieron y fotografiaron.

La progresión de la infección se siguió de forma semi-cuantitativa mediante el cultivo de muestras de exudado circundante tomadas a distintos tiempos (1, 2, 3 y 7 días) en agar sangre y agar McConkey, identificándose la presencia de la cepa empleada de *S. aureus* mediante un re-sembrado de las muestras y el análisis de las mismas mediante espectrometría de masas con un sistema de desorción/ionización de la matriz asistido por láser acoplado a un detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés). Además, se determinó cuantitativamente la concentración de bacterias en la herida mediante la técnica de reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR). Ambos procesos se describen en el anexo A.4.2. También se realizó el estudio histopatológico de las heridas mediante el procedimiento descrito en el anexo A.4.3.

II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1. Optimización de las disoluciones y caracterización morfológica

La optimización de las disoluciones empleadas en este trabajo se centró en conseguir la mayor carga inicial posible de compuesto activo intentando comprometer en la menor medida posible la estructura de nanofibras generada. Para ello, en primer lugar, se preparó una disolución de PCL con una concentración del 10 % m/m en una mezcla de DCM y DMF 1:1. Con esta disolución, trabajando a un flujo de 1 mL/h y empleando el rango de voltajes indicado en la sección II.2.1, se

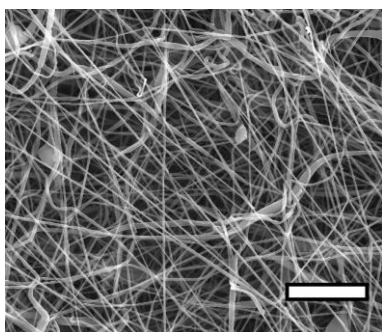


Figura II- 2. Imagen de SEM de NFs de PCL. La escala corresponde con un valor de 10 μ m

obtuvo una membrana con un diámetro homogéneo de fibra de 263 ± 68 nm (Figura II- 2). A disoluciones con esta concentración de polímero se les agregaron concentraciones crecientes de distintos compuestos activos (carvacrol, CAR; escualeno, ESC; timol, TIM y tirosol, TIR), partiendo desde un 10 % m/m (referido a la masa de polímero) hasta un máximo de 50 % m/m antes de realizar el proceso de *electrospinning*. Tras someter a estas disoluciones a un proceso de *electrospinning* (con un flujo de 1 mL/h y el

voltaje indicado en la sección II.2.1), se tomaron muestras para su observación en SEM y poder así determinar el tipo de material producido. En las imágenes obtenidas se midió el diámetro de las fibras y los resultados se muestran en la Tabla II- 2.

Usando el timol como compuesto de referencia, se observó que para concentraciones mayores al 30 % m/m no se obtienen fibras. Las imágenes de SEM muestran que para las concentraciones de 10 % m/m y 20 % m/m (Figura II- 3 A y B), se obtuvo una membrana con un diámetro de fibra muy próximo al de las nanofibras de PCL sin cargar con ningún compuesto activo (282 ± 77 y 299 ± 69 nm respectivamente frente a 263 ± 68 nm de las nanofibras de PCL). Sin embargo, para la concentración de un 30 % m/m de timol (Figura II-4 A), aunque se observaron fibras, estas son de un diámetro muy reducido y parecen estar rodeadas por estructuras de mayor diámetro, de ahí que su medida arrojará un diámetro mucho

mayor y poco homogéneo (1295 ± 552 nm). Para las concentraciones del 40 % m/m y 50 % m/m de timol no llegó a observarse estructura alguna de nanofibras.

Tras la optimización de las membranas cargadas con timol, se continuó con la optimización de las membranas cargadas con carvacrol, siguiendo el mismo esquema. Los resultados obtenidos para este compuesto fueron similares a los obtenidos para el timol. Las disoluciones con concentraciones de 10 % y 20 % m/m de carvacrol (Figura II-3 C y D) generaron membranas con diámetro de fibra de 245 ± 42 y 259 ± 47 nm respectivamente, valores cercanos al generado a partir de una disolución de PCL sin ningún compuesto añadido (263 ± 68 nm). Sin embargo, para un 30 % m/m de carvacrol (Figura II-4 B) sólo se observó una capa de polímero sin estructura, mientras que para una concentración del 40 % m/m de carvacrol sólo se observó macroscópicamente una mezcla viscosa compuesta por el polímero disuelto en el carvacrol.

A partir de estos datos, se consideró como óptima una concentración del 20 % m/m del compuesto activo ya que, por encima de esta concentración, el material obtenido pierde la regularidad en su morfología, cuando no pierde toda su estructura. La adición de otros compuestos a la disolución optimizada de PCL hace que la concentración del polímero disminuya, lo que provoca a su vez una disminución en la viscosidad de la disolución. Ambos parámetros (concentración y

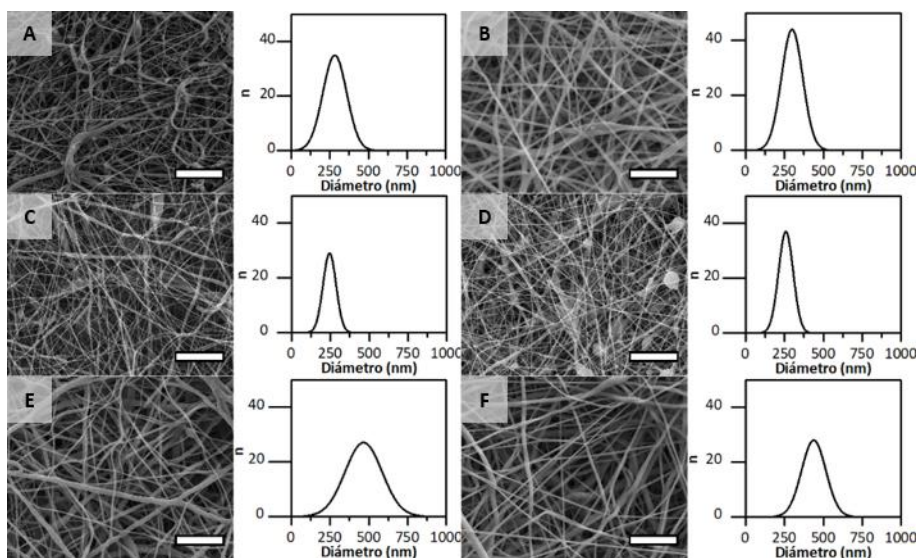


Figura II- 3. Imágenes de SEM e histogramas de distribución de diámetro de fibra de las membranas sintetizadas. A: 10 % TIM, B: 20% TIM, C: 10 % CAR, D: 20 % CAR, E: 20 % TIR, F: 20 % ESC. En todas las micrografías la escala corresponde con un valor de $10 \mu\text{m}$

viscosidad) tienen una gran influencia en el proceso de *electrospinning*^{165,166}: en general, a partir de disoluciones de concentración de polímero y viscosidad bajas se obtienen fibras de diámetro reducido y con un gran porcentaje de *beads* (inclusiones poliméricas de forma más o menos esférica dentro de la estructura de fibras) mientras que si se aumentan ambos parámetros, la presencia de *beads* desaparece y el diámetro de fibra aumenta. Sin embargo, una excesiva disminución de estos parámetros impide la formación de fibras como ocurre al añadir concentraciones mayores del 20 % en que la disolución de polímero presenta una viscosidad tan baja que no permite la formación de nanofibras.

A partir de los resultados obtenidos para carvacrol y timol para la síntesis de las membranas cargadas con tirosol y las cargadas con escualeno se empleó una concentración de compuesto activo del 20 % m/m. A partir de las disoluciones de polímero con un 20 % m/m de tirosol, se obtuvieron membranas nanoestructuradas con un diámetro de fibra de 380 ± 67 nm (Figura II-3 E). Para las membranas cargadas con escualeno, a partir de las disoluciones de polímero con un 20 % m/m de este compuesto, también se obtuvieron membranas nanoestructuradas (Figura II-3 F), en este caso con un diámetro de fibra de 438 ± 78 nm. En estos casos, se observó un aumento en el diámetro de fibra respecto al de las membranas sin cargar (263 ± 68 nm), mayor en el caso del escualeno que en el del tirosol. Este hecho se puede explicar a partir del voltaje necesario para obtener un cono de Taylor estable en cada caso. Mientras que para obtener las membranas sin cargar se aplicó a la aguja un voltaje positivo de 10.17 ± 0.36 kV, para las membranas cargadas con tirosol y para las cargadas con escualeno fue necesario aplicar un voltaje de 9.11 ± 0.62 y 7.42 ± 0.54 kV, respectivamente. Al igual que la viscosidad y la concentración polimérica, el voltaje es un parámetro que afecta a la morfología de las fibras obtenidas mediante *electrospinning*, siendo menor el diámetro de las fibras obtenidas cuanto mayor es el voltaje aplicado al emisor (aguja)^{98,167}. Por lo tanto, la disolución a la que se aplicó un menor voltaje (la que contiene un 20 % m/m de escualeno) produce nanofibras con un diámetro superior al resto. Para el caso de carvacrol y timol, los voltajes aplicados fueron de 10.42 ± 0.36 kV y 10.28 ± 0.46 kV respectivamente, valores

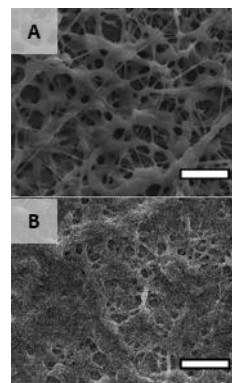


Figura II- 4. Imágenes de SEM de las membranas sintetizadas. A: 30 % TIM, B: 30 % CAR. En ambos casos, la escala corresponde con un valor de 10 μ m

cercanos al de las membranas sin cargar, lo que concuerda con los diámetros de fibra comentados con anterioridad.

Con estos resultados, se planteó la incorporación de dos compuestos activos distintos dentro de un mismo material para combinar sus propiedades. Para sintetizarlo, se pueden seguir dos alternativas: preparar una disolución que incluya ambos compuestos o conseguir una “mezcla” de fibras a partir de dos disoluciones independientes. Como se puede deducir de los resultados anteriores, la adición de más de un 20 % m/m de compuesto activo a la disolución disminuye la viscosidad de la misma, lo que compromete la formación de nanofibras. Así pues, en el caso de que se adicionaran dos compuestos en una proporción 1:1, se podrían obtener nanofibras con un 10 % m/m de cada compuesto activo en el material final.

Otra manera de obtener un material con dos compuestos activos implica, además de la preparación de dos disoluciones independientes con un 20 % m/m de compuesto activo en cada una, el empleo de dos agujas para *electrospinning* conectadas a una misma fuente de voltaje positivo. El problema de esta aproximación fue que, al encontrarse dos focos de voltaje positivo tan cercanos, se producía una repulsión entre los dos *jets* de polímero, lo que se reflejó en que cada disolución se depositó en zonas opuestas del colector plano por lo que no se podría obtener un material que mezclara ambos tipos de fibra. Ante esta situación, se planteó emplear un colector rotatorio de varillas (recubierto de papel de aluminio,

para una mayor facilidad a la hora de recoger la muestra, Figura II-5). Las agujas se situaron a la misma distancia del colector, una a cada lado del mismo, se conectaron ambas a la fuente de voltaje positivo y se activó la rotación del colector. Manteniendo el colector sin rotación, se observó cómo se deposita cada disolución en dos zonas separadas, pero al activar el movimiento se observa cómo se produce una membrana continua, en la cual no fue posible distinguir ambos tipos de fibras, lo que se

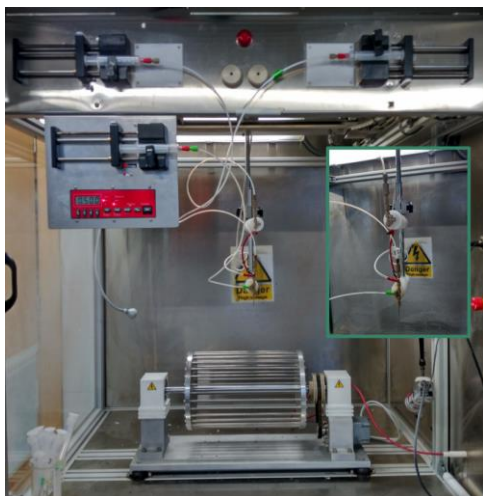


Figura II- 5. Electrospinner equipado con un colector rotatorio y dos agujas. Inserto: detalle de la colocación de ambas agujas

comprobó posteriormente al evaluar el contenido de ambos aceites en distintas zonas del material obtenido.

Un posible problema empleando esta técnica es la alineación de las fibras producidas: a velocidades de rotación lo suficientemente altas, las fibras se depositan alineadas en una única dirección^{168,169}. Por este motivo, se seleccionó la menor velocidad con la que permite trabajar el equipo, 200 rpm, como velocidad de trabajo. Con ella, se obtuvo un material en el cual ambos tipos de fibras se mezclaron homogéneamente orientadas aleatoriamente (Figura II- 6). Mantener la aleatoriedad en la orientación de las nanofibras es muy importante, ya que la alineación de las mismas podría cambiar la porosidad de las membranas, dificultando así la comparación entre las membranas cargadas con un solo compuesto y las cargadas con dos compuestos.

Una vez optimizadas las disoluciones para la síntesis de membranas cargadas con un compuesto activo, éstas se emplearon para la síntesis de membranas cargadas con dos compuestos activos, en concreto las combinaciones timol-tirosol y timol-escualeno, para las que se emplearon disoluciones de 10 % m/m de PCL con un 20 % m/m de timol, tirosol o escualeno. Se eligieron estas combinaciones de compuesto activo para obtener un material que combinara las propiedades bactericidas del timol y las propiedades antiinflamatorias de tirosol y escualeno.

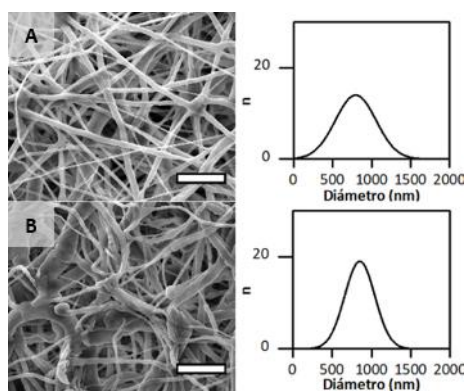


Figura II- 6. Imágenes de SEM e histogramas de distribución de diámetro de fibra de las membranas sintetizadas. A: PCL-ESC-TIM, B: PCL-TIM-TIR. En ambas micrografías, la escala corresponde con un valor de 10 μm

Para la síntesis de nanofibras cargadas con timol y escualeno (PCL-TIM-ESC, Figura II- 6A) a partir de dos disoluciones con un 20 % m/m de cada compuesto se obtuvieron fibras de 797 ± 261 nm mientras que para la síntesis de nanofibras cargadas con timol y tirosol (PCL-TIM-TIR, Figura II-6 B) a partir de sus disoluciones correspondientes se obtuvieron fibras de 852 ± 192 nm.

En general, la técnica de *electrospinning* está afectada (además de por la viscosidad y la concentración de polímero, como ya se ha mencionado anteriormente) por

variables como la conductividad de las disoluciones (relacionadas con la concentración de polímero, aditivos y disolventes en los que se prepara la disolución), el voltaje aplicado, la temperatura y humedad ambiental y la distancia entre la punta de la aguja y el colector^{170,171}. Como se puede observar en la Tabla II-2, hay una gran variación de diámetro al comparar las fibras cargadas con un solo

Tabla II- 2. Diámetro de NFs obtenidos para los materiales sintetizados

Compuesto	Concentración teórica (% m/m)	Diámetro (nm)	Compuesto	Concentración teórica (% m/m)	Diámetro (nm)
Timol	10	282±77	Carvacrol	10	245±42
	20	299±69		20	259±47
	30	1295±552		30	Sin fibras
	40	Sin fibras		40	Sin fibras
Tirosol	20	380±67	Escualeno	20	438±78
Timol-Escualeno	10 (Timol) 10 (Escualeno)	797±261	Timol-Tirosol	10 (Timol) 10 (Tirosol)	852±192

compuesto activo con las cargadas con dos. Esto puede ser debido principalmente a una diferente distancia entre la punta de la aguja al emplear un colector plano o uno rotatorio o a cierta distorsión del campo eléctrico debido a la presencia de dos agujas conectadas al polo positivo.

II.3.2. Carga de compuesto activo

II.3.2.1. GC-MS

Una vez optimizada la síntesis de los distintos materiales, se procedió a la cuantificación de la cantidad de compuesto activo cargada en las membranas. La técnica elegida para la determinación de los mismos fue GC-MS, técnica mediante la cual los componentes de una mezcla se separan en una columna cromatográfica en función de su temperatura de ebullición y la interacción con la fase estacionaria. Por tanto, dada la naturaleza de los componentes presentes en los materiales, esta técnica se ajusta perfectamente.

Para la preparación de las muestras para su análisis mediante GC-MS, en primer lugar, se intentó eliminar el polímero de las mismas mediante la disolución

de la muestra en DCM y su posterior precipitación con otro disolvente. Dado que no se consiguió eliminar totalmente el polímero de la muestra de esta forma, y a la posibilidad de que durante el proceso de precipitación se perdiera parte del compuesto activo a cuantificar, se decidió inyectar directamente en el cromatógrafo una disolución de polímero en una mezcla de DCM y acetonitrilo empleando un *liner* con lana de vidrio para retener el material que no volátil de la muestra. Se observaron trazas de ϵ -caprolactona (monómero a partir del cual se obtiene la PCL) en el cromatograma y restos de polímero en el *liner*, pero sin afectar al análisis de los compuestos de interés. A modo de ejemplo, en la Figura II- 7 se presenta el cromatograma para una muestra de PCL-TIM-ESC. En él se puede observar cómo, aunque el pico cromatográfico de la ϵ -caprolactona aparece cerca del pico

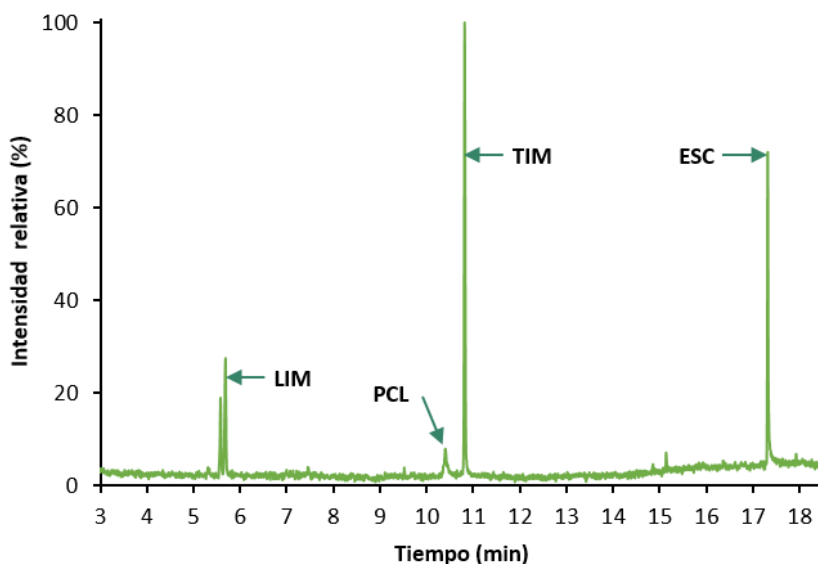


Figura II- 7. Cromatograma de GC-MS de una muestra de PCL-TIM-ESC

cromatográfico correspondiente al timol, ambos están lo suficientemente resueltos como para poder cuantificar el compuesto sin interferencias del polímero. Los cromatogramas para el resto de compuestos se encuentran representados en el anexo A.2.4.

A partir de la concentración del compuesto obtenida mediante esta técnica se calculó la carga de compuesto (CC) y la eficiencia de encapsulación (EE) considerando la masa de compuesto teórica (m_t), la masa de compuesto medida experimentalmente (m_e) y la masa de membrana (m_m) (Ecuación II- 1 y Ecuación II- 2):

$$CC (\%) = \frac{m_e}{m_m} \times 100$$

Ecuación II-1. Cálculo del porcentaje del compuesto activo en la membrana

$$EE (\%) = \frac{m_e}{m_t} \times 100$$

Ecuación II: Cálculo de eficiencia de encapsulación del compuesto activo en la membrana

Como se detalla en la Tabla II- 3, en todos los casos se obtuvo una eficiencia de encapsulación superior al 70 % para los compuestos ensayados, lo que se traduce en una carga entre el 15.4 y el 17.7 % (entre un 7.2 y un 7.8 % para cada compuesto individual en el caso de las membranas cargadas con dos componentes).

Tabla II- 3. Carga de compuesto activo y eficiencia de encapsulación de los distintos compuestos activos en los materiales sintetizados (calculado mediante GC-MS)

Material	Carga (% m/m)	Eficiencia de encapsulación (%)
PCL-CAR	15.40±1.44	77.00±7.18
PCL-TIM	17.13±1.61	85.65±8.05
PCL-TIR	17.72±1.80	88.62±8.99
PCL-ESC	16.32±1.40	81.61±7.01
PCL-TIM-ESC	7.75±0.17 (TIM) 7.27±0.73 (ESC)	77.52±7.16 (TIM) 72.73±7.88 (ESC)
PCL-TIM-TIR	7.46±1.35 (TIM) 7.17±1.12 (TIR)	74.62±7.98 (TIM) 71.71±11.19 (TIR)

Las altas eficiencias de encapsulación obtenidas se pueden justificar por las condiciones de síntesis relativamente suaves empleadas. Aunque dos de los compuestos cargados (carvacrol y timol) son altamente volátiles (presión de vapor igual a 2.12¹⁷² y 3.95¹⁷³ Pa, respectivamente), al no emplearse una alta temperatura durante la evaporación del disolvente (el proceso se

lleva a cabo a temperatura ambiente) la fracción de compuesto que se evapora durante el proceso es relativamente baja. Los valores de eficiencia de encapsulación obtenidos en este trabajo son mayores que los reportados en bibliografía para otras técnicas de encapsulación (con un valor máximo del 47 % para el timol frente al 86 % obtenido en este trabajo)¹⁷⁴⁻¹⁷⁷ además de ser coherentes con otros trabajos encontrados en bibliografía para la encapsulación de carvacrol en NFs de PCL mediante *electrospinning* (una EE del 80 % frente al 77 % obtenido en este

trabajo)¹⁵⁴ por lo que el *electrospinning* es una técnica adecuada para la encapsulación de compuestos volátiles en matrices poliméricas.

II.3.2.2. RMN-¹H

Como confirmación para los resultados de cuantificación mediante GC-MS, se empleó el RMN-¹H como técnica de cuantificación para las membranas cargadas con carvacrol y las cargadas con timol. En la Figura II-8 se presentan los espectros obtenidos para las muestras de PCL-CAR y PCL-TIM junto con una ampliación de las regiones empleadas para la cuantificación.

Para ello se recurrió a la integración de la señal del grupo metileno del polímero (4.04 ppm) que aparece en una región limpia del espectro sin solapar con otras señales y a la señal del protón en posición 3 para carvacrol y timol (7.06 y 7.08 ppm respectivamente). Se prepararon disoluciones con 10 mg de PCL y cantidades crecientes del compuesto activo y se representó el cociente entre la integral de la señal escogida para el compuesto y la seleccionada para la PCL frente a la masa de compuesto activo presente en cada disolución para preparar una recta de calibrado. Siguiendo el mismo procedimiento con las muestras, se obtuvo la concentración de compuesto activo presente en la muestra.

En la Tabla II- 4 se puede comparar la carga medida mediante GC-MS y la medida mediante RMN-¹H para ambos materiales. Como se puede comprobar, mediante ambos métodos se obtuvieron resultados iguales, por lo que se puede asegurar que ambas metodologías son válidas para el cálculo de la cantidad de compuesto activo presente en este tipo de materiales.

Tabla II- 4. Comparación de la carga de compuesto medida mediante GC-MS y RMN-¹H para las membranas de NFs de PCL-CAR y PCL-TIM

Material	Carga por GC-MS (% m/m)	Carga por RMN- ¹ H (% m/m)
PCL-CAR	15.40±1.44	16.54±0.30
PCL-TIM	17.13±1.61	17.46±0.60

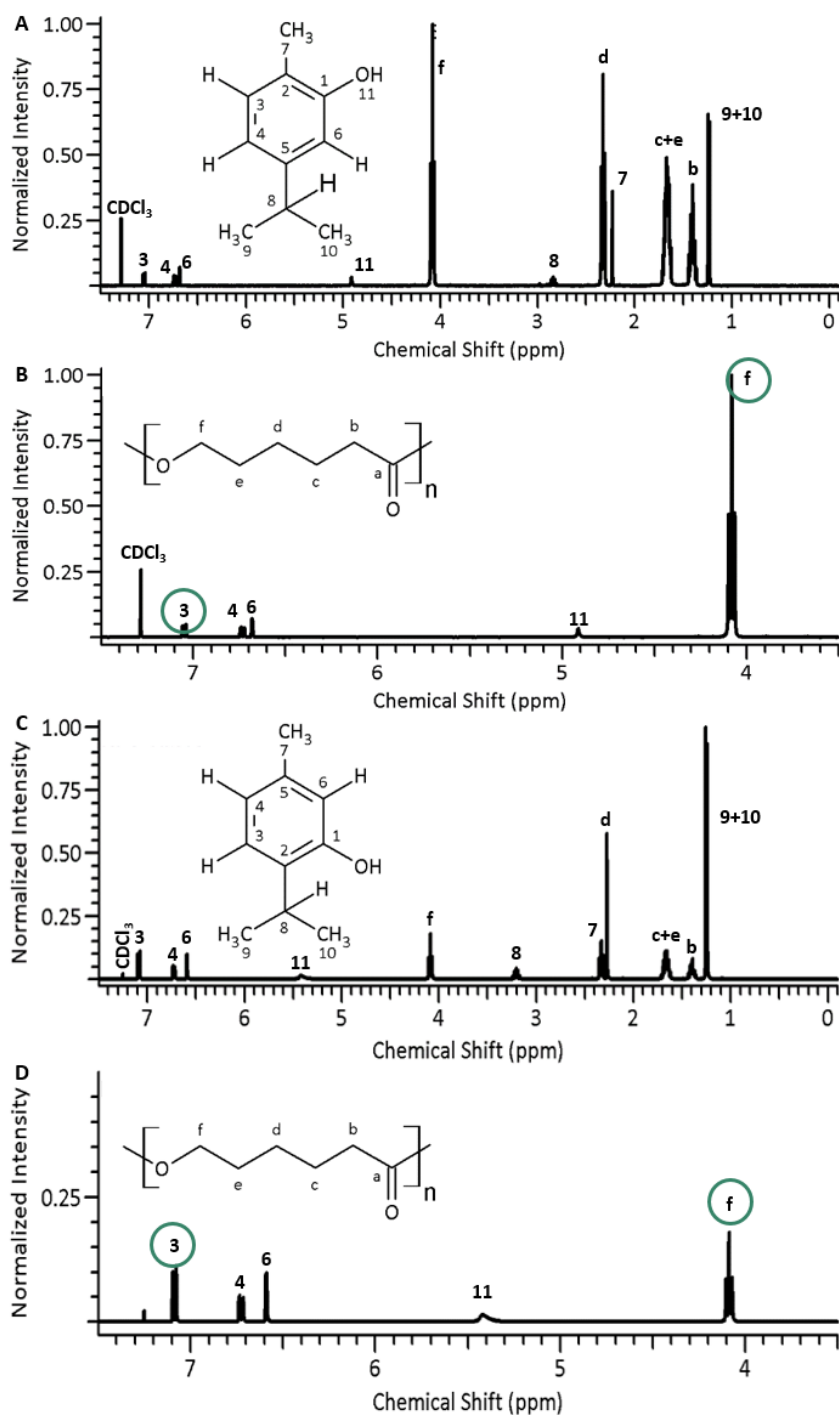


Figura II- 8. Espectros de RMN- ^1H de PCL-CAR (A: ventana completa, y B: zoom de la región de cuantificación) y PCL-TIM (D: ventana completa, y E: zoom de la región de cuantificación), así como la asignación de las señales correspondientes al compuesto activo

II.3.3. Determinación del perfil de liberación de los materiales sintetizados

Dado que las membranas sintetizadas están pensadas como apósitos para la liberación de compuestos activos, es necesario conocer cómo se produce esta liberación del compuesto a lo largo del tiempo.

Debido a la hidrofobicidad del polímero y a su flotabilidad, para este ensayo se recurrió a un experimento mediante el cual la membrana sintetizada actúa a modo de filtro por el que se hace pasar un flujo constante a su través de 1 mL/min de fluido biológico simulado, asegurando así el contacto entre la membrana y el fluido. Para la construcción del perfil de liberación, se tomaron muestras de fluido a diferentes tiempos que se analizaron mediante UPLC-UV-Vis.

En bibliografía, este método de liberación se muestra como adecuado para el análisis de materiales estructurados en forma de membranas o *films*¹⁷⁸. En la Tabla II- 5 se muestran los resultados obtenidos de estos experimentos. El compuesto que se liberó en mayor medida fue el tirosol liberándose en torno al 60 % de la cantidad cargada en las membranas que sólo contienen tirosol y en torno al 40 % en las membranas cargadas con timol y tirosol. Dado que se trata del mismo compuesto cargado en el mismo polímero, la diferencia entre ambos valores puede ser

Tabla II- 5. Porcentaje de compuesto activo liberado en los materiales sintetizados

Material	Compuesto liberado tras 24 h (%)
PCL-CAR	5.78±0.93
PCL-TIM	7.33±2.56
PCL-TIR	61.74±5.23
PCL-ESC	0
PCL-TIM-ESC	8.92±1.18 (TIM) 0 (ESC)
PCL-TIM-TIR	5.36±0.01 (TIM) 41.38±0.70 (TIR)

atribuida al límite de cuantificación de la técnica de determinación. Debido a que la carga inicial es de, aproximadamente, la mitad en el caso del material cargado con ambos compuestos, para un mismo porcentaje de compuesto liberado, la concentración liberada en la alícuota de medida será la mitad. Para el caso de los primeros puntos de la liberación, este hecho no afecta a la medida, ya que la concentración a determinar es relativamente alta (por ejemplo, para el punto tomado a 10 minutos, la concentración medida para el material cargado con tirosol es de 113.44 ppm, mientras que para el material cargado con timol y tirosol es de 72.15 ppm). Sin

embargo, en puntos posteriores se puede observar como a los 60 minutos ya no es cuantificable la liberación de tirosol en el material cargado con timol y tirosol mientras que en el cargado sólo con tirosol el compuesto se puede detectar hasta el punto tomado a 6 horas.

Carvacrol y timol presentaron un comportamiento similar, liberándose apenas un 5.8 % en el caso del primero y un 7.3 % en caso del segundo, mientras que de los experimentos realizados se puede deducir que el escualeno no se libera del material sintetizado. Tan dispar comportamiento de los compuestos, incluso usando un surfactante (Tween80) que simule el efecto de los compuestos anfifílicos presentes en el medio biológico (como los fosfolípidos), puede ser atribuido a las diferentes solubilidades de los mismos en agua. Así pues, si ordenamos los cuatro compuestos siguiendo una solubilidad creciente, la lista quedaría de la siguiente forma: escualeno (menor de 1 mg/mL a 19 °C), timol (0.9 mg/mL, a 20 °C), carvacrol (1.25 mg/mL a 25 °C) y tirosol (106.9 mg/mL)¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Debido a estas diferencias en la solubilidad es lógico que se libere mayor cantidad de tirosol que del resto de compuestos, a pesar de que la cantidad inicial de compuesto activo sea muy similar.

En la Figura II- 9 se presenta el perfil de liberación de las membranas sintetizadas. En todos los casos, se puede observar la rápida liberación del compuesto activo en la primera media hora de experimento, seguida de una liberación sostenida hasta alcanzar las primeras 8 horas. Este efecto puede ser indicativo de que el compuesto activo está distribuido homogéneamente en todo el polímero, liberándose en primer lugar el compuesto que se encuentra en la capa externa del polímero. Posteriormente se libera el compuesto incluido en el núcleo polimérico en función de la degradación del mismo, proceso que en el caso de la PCL es del orden de meses¹⁸².

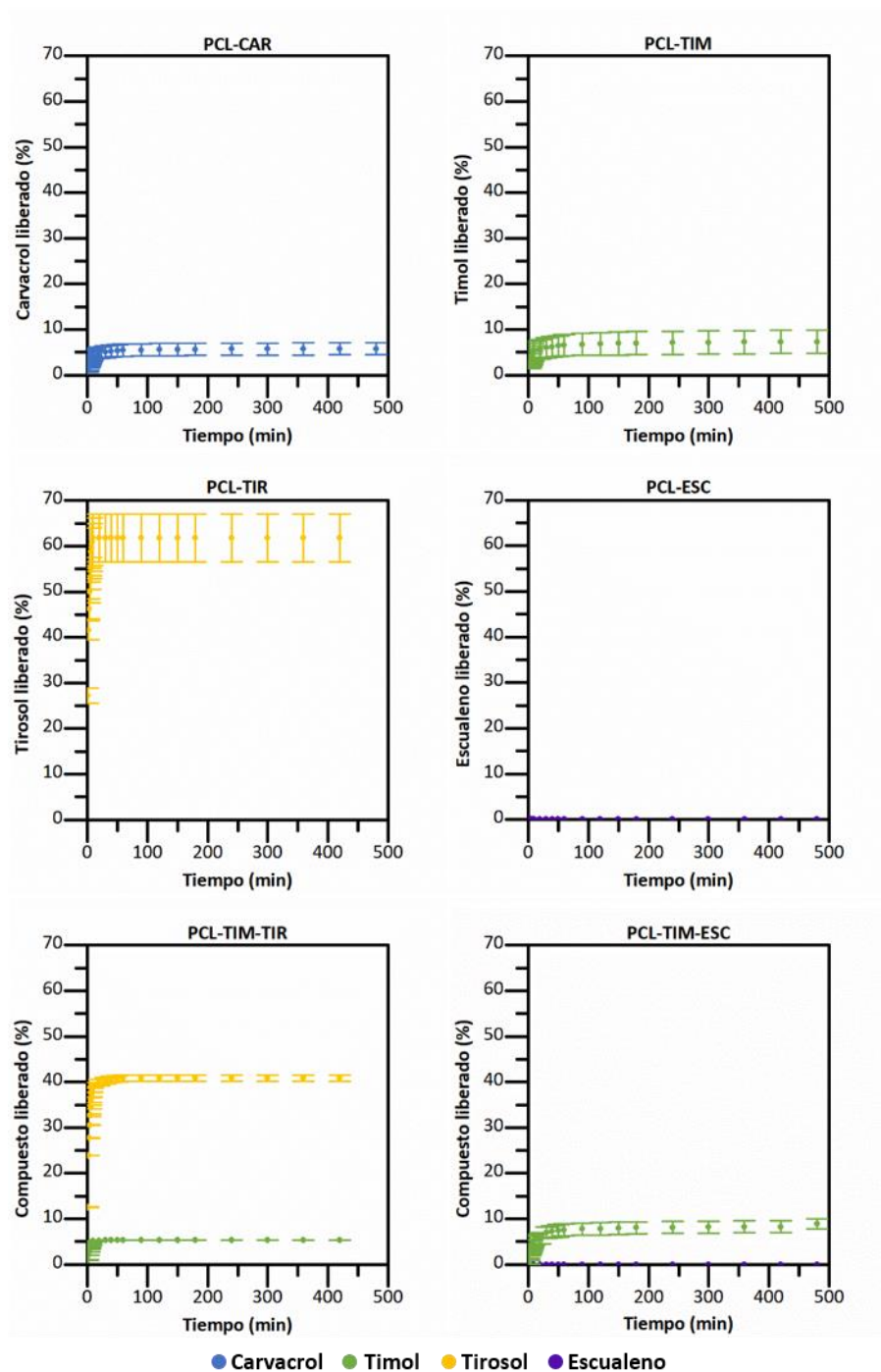


Figura II- 9. Perfiles de liberación de los materiales sintetizados

II.3.4. Análisis del enlace compuesto activo-polímero

Otra de las causas que puede contribuir al bajo porcentaje liberado de carvacrol y timol tras 24 h (5.8 y 7.3 %, respectivamente), así como la alta eficiencia de encapsulación, puede ser la interacción que se puede establecer entre ellos y la PCL. De su estructura química (Figura II- 1) se puede plantear la formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de carvacrol o timol y el grupo carbonilo presente en la molécula de PCL.

Para confirmarlo, se recurrió al RMN-¹³C ya que el valor de desplazamiento químico (δ) de los carbonos en el espectro es muy reproducible (con variaciones, como máximo, de 0.05 ppm en una ventana espectral de 250 ppm). Además, bibliográficamente está reportado que el valor de desplazamiento químico de los carbonos es sensible a la formación de enlaces de hidrógeno¹⁸³. Por otro lado, aunque el grado de formación de este tipo de enlaces decrezca con la dilución del compuesto (o compuestos) en disolventes no polares (como el CDCl₃), esta técnica ha sido ampliamente utilizada para el estudio de la formación de enlaces de hidrógeno, tanto intra- como inter-moleculares^{184,185}.

Para realizar este experimento se prepararon mezclas de PCL y carvacrol o timol (en proporción 1:1) en CDCl₃, ya que es un disolvente no polar que tiende a no formar enlaces de hidrógeno. En la Figura II- 10 se presenta el espectro de RMN-¹³C de las mezclas de PCL con carvacrol y timol (A y B respectivamente), centrado en la región que engloba a las señales de los compuestos activos. En ambos casos, el espectro en color azul se corresponde con la mezcla mientras que el espectro en color verde se corresponde con el timol o el carvacrol sin mezclar.

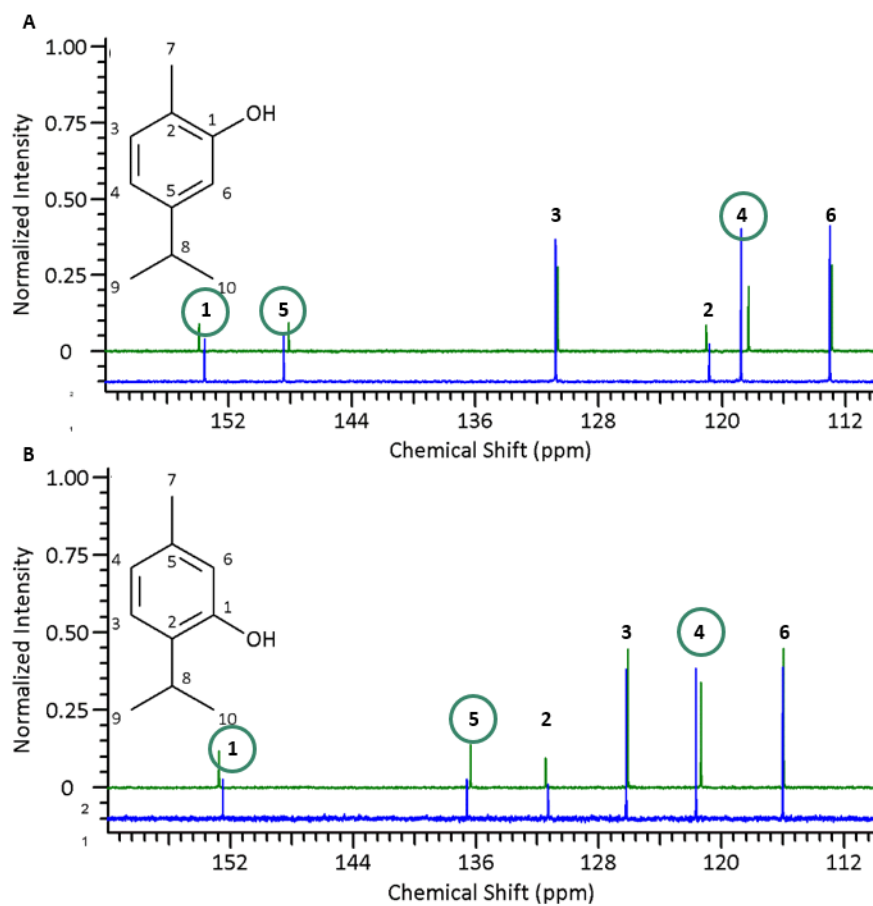


Figura II- 10. Espectros de RMN- ^{13}C de carvacrol (A en azul), timol B en azul) y sus mezclas con PCL (A y B en verde, respectivamente)

En ellos se pudo observar cómo los átomos con mayor variación en el desplazamiento fueron el carbono C-1 (el que porta el grupo hidroxilo) y el carbono C-4 (en posición *para* respecto al anterior) y el carbono C-5 (en posición *meta* respecto al carbono C-1 y portando grupos alquílicos). En la Tabla II- 6 se presentan los valores de desplazamiento que se obtuvieron para las señales, tanto en el compuesto puro como en mezcla. Se observó cómo el carbono que porta el grupo hidroxilo (C-1) se encontró más desapantallado (aparece a un valor mayor de desplazamiento químico) mientras que los carbonos en posición C-4 y C-5 se encontraron más apantallados (aparecen a un valor menor de desplazamiento químico) en la mezcla con PCL que en estado puro. Estos datos, que son coherentes con los encontrados en bibliografía¹⁸⁴, permiten afirmar que entre las moléculas de timol (o carvacrol) y las de PCL se establece un enlace de hidrógeno, lo que contribuiría a la alta eficiencia de encapsulación de estos compuestos y su bajo porcentaje de liberación.

Tabla II- 6. Valores de δ de ^{13}C para timol, carvacrol y sus mezclas con PCL y variación de δ ($\Delta\delta$) cuando se encuentran en la mezcla respecto a cuando se encuentran libres

Nº de C	δ (ppm) TIM	δ (ppm) PCL-TIM	$\Delta\delta$ (ppm) PCL-TIM	δ (ppm) CAR	δ (ppm) PCL-CAR	$\Delta\delta$ (ppm) PCL-CAR
1	152.50	152.75	+0.25	153.57	153.93	+0.36
2	131.31	131.45	+0.14	120.84	121.03	+0.19
3	126.22	126.11	-0.11	130.80	130.66	-0.14
4	121.67	121.34	-0.33	118.78	118.30	-0.48
5	136.59	136.35	-0.24	148.43	148.10	-0.33
6	116.02	115.96	-0.06	113.02	112.90	-0.12
7	20.83	20.80	-0.03	15.25	15.31	+0.06
8	26.73	26.60	-0.13	33.64	33.58	-0.06
9 y 10	22.66	22.62	-0.04	23.94	23.93	-0.01

II.3.5. Propiedades bactericidas

II.3.5.1. Influencia de la volatilidad del compuesto activo

Debido a la alta volatilidad tanto del carvacrol como del timol, antes de ensayar la capacidad bactericida de las membranas cargadas se diseñó un experimento para comprobar la influencia de los vapores de los compuestos. Las muestras incubadas en la misma placa que el compuesto libre presentaron un crecimiento en el mismo orden de magnitud que el crecimiento de las muestras control incubadas en una placa aparte (del orden de 10^8 UFC/mL para *E. coli* y 10^9 UFC/mL para *S. aureus*), por lo que se concluyó que, pese a la alta volatilidad de los compuestos empleados, no hay efecto bactericida de los vapores de los compuestos y por tanto no hay interferencia entre pocillos vecinos en la misma placa.

II.3.5.2. Determinación de MIC y MBC

A fin de evaluar su uso como apósitos bactericidas, se realizaron ensayos bactericidas de superficie con distintas masas de material cargado con timol y carvacrol para determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida, de ambos materiales.

En la Tabla II- 7 se presentan los valores obtenidos para cada material (tanto la concentración de membrana como la concentración teórica de compuesto liberada a las 24 horas, obtenida del perfil de liberación) junto con los valores de MIC y MBC para el compuesto libre obtenidos previamente en el grupo de investigación¹³⁸. Se puede observar que, para los valores de MIC de las membranas sintetizadas, se obtuvo una concentración teórica de compuesto liberada al medio inferior a la cantidad necesaria de compuesto libre (usando Tween80 como solubilizante). Este efecto también se observó en los valores para la MBC, excepto en el caso de las membranas de PCL-TIM frente a *S. aureus*, que el resultado obtenido es del mismo orden en ambos casos.

Estos resultados mostraron una influencia importante del contacto en el modo de acción de los materiales sintetizados, ya que la cantidad liberada fue muy inferior a la teórica necesaria. Así pues, se planteó estudiar el efecto del contacto en la capacidad bactericida de los materiales mediante un experimento en el cual se incubó, durante distintos tiempos, una membrana (en una concentración suficiente como para alcanzar la MBC) en medio de cultivo estéril, para después retirarla del

medio y comprobar la capacidad bactericida tanto de la membrana como del compuesto liberado al medio (exudados) tras este proceso.

Tabla II- 7. MIC y MBC obtenidas para los materiales sintetizados. Los resultados se obtuvieron por triplicado en cuatro experimentos distintos, para cada combinación de material y bacteria

Bacteria	Material	MIC		MBC	
		Concentración (mg/mL)	Concentración liberada tras 24 h (mg/mL)	Concentración (mg/mL)	Concentración liberada tras 24 h (mg/mL)
<i>E. coli</i>	CAR	0.2		0.4	
	PCL-CAR	2.10	0.02	15.00	0.13
	TIM	0.2		0.3	
	PCL-TIM	7.50	0.09	10.00	0.12
<i>S. Aureus</i>	CAR	0.2		0.3	
	PCL-CAR	10.00	0.09	25.00	0.22
	TIM	0.2		0.3	
	PCL-TIM	10.00	0.12	30.00	0.38

La Figura II- 11 muestra los resultados de este experimento. Como se puede observar, para todos los casos la membrana mantuvo sus propiedades bactericidas, a pesar de haber liberado parte del compuesto, mientras que en ninguno de los casos los exudados produjeron efecto bactericida, ya que el crecimiento bacteriano fue igual al del control positivo (medio de cultivo inoculado sin ningún agente bactericida). En los gráficos se presentan dos controles de crecimiento (control +) distintos ya que la capacidad bactericida de las membranas se evalúa en medio sólido, con TSA inoculado con 10^6 UFC/mL, mientras que la capacidad bactericida de los exudados se evalúa en suspensión, con TSB inoculado con 10^6 UFC/mL.

Tras estos resultados se planteó un último experimento para confirmar la importancia del contacto entre la membrana y la bacteria en la capacidad bactericida de la misma. Para ello se prepararon membranas de tres capas

(membranas tri-capas), en las cuales se intercala una capa de PCL cargada con el compuesto activo entre dos capas de PCL sin compuesto activo, en una relación de masa 1:2:1.

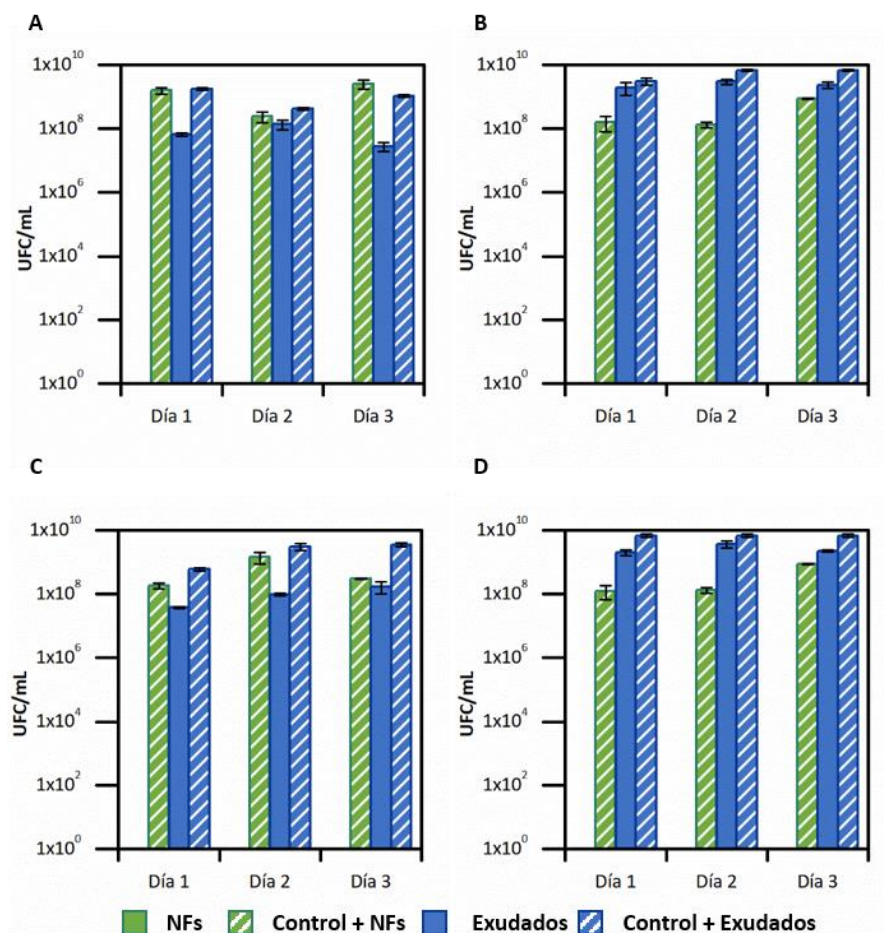


Figura II- 11. Crecimiento bacteriano de los distintos componentes (membranas y exudados, junto con sus controles) para el experimento de exudados. A) PCL-CAR frente a *E. coli*; B) PCL-CAR frente a *S. aureus*; C) PCL-TIM frente a *E. coli*; D) PCL-TIM frente a *S. aureus*

Debido a la relación de masa entre PCL cargada con compuesto activo y PCL sin cargar, las membranas tri-capas contienen únicamente un 50 % de PCL cargada con compuesto activo, lo que hace que la carga total de compuesto activo en las membranas tri-capas sea la mitad que en las membranas cargadas mono-capas. Por lo tanto, para alcanzar la misma masa final de compuesto activo en las membranas tri-capas que en las mono-capas, en este experimento se ensayó con el doble de la

MBC detallada en la Tabla II-7 para cada material (30 y 50 mg/mL de PCL-CAR tri-capa frente a *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente, y 20 y 60 mg/mL de PCL-TIM tri-capa frente a *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente)

En estas muestras se obtuvo un crecimiento del mismo orden de magnitud que en los controles (aproximadamente 10^8 UFC/mL para *E. coli* y 10^9 UFC/mL para *S. aureus*) lo que, junto con los resultados obtenidos anteriormente, indica que el contacto entre la membrana y la bacteria es imprescindible para el efecto bactericida de los materiales sintetizados.

II.3.5.3. Microscopía de fluorescencia confocal

Para observar la viabilidad de las bacterias en la superficie de la membrana, se incubaron durante 24 h membranas de PCL y de PCL cargadas con carvacrol (en la concentración de MIC para cada microorganismo detallada en la Tabla II- 7) en TSB inoculado con 10^6 UFC/mL de *E. coli* y de *S. aureus*. Posteriormente, se tiñeron las muestras con un kit específico para su observación mediante microscopía confocal. Las bacterias vivas se tiñeron con SYTO 9, un fluoróforo que tiene el máximo de excitación a 483 nm (y un máximo de emisión a 500 nm) mientras que las bacterias

muertas lo hicieron con yoduro de propidio, cuyo máximo de excitación se encuentra a 531 nm (y el máximo de emisión a 615 nm). Así pues, usando el láser de Ar/Kr (que proporciona una línea monocromática a 488 nm) y el láser de He/Ne (que proporciona una línea monocromática a 543 nm) del microscopio confocal, las bacterias vivas se visualizaron en color verde, las muertas en color rojo y las que tienen la membrana plasmática dañada se visualizaron en tonos amarillo-anaranjados por la superposición de zonas verdes y rojas. Finalmente, empleando la línea de 514 nm del láser de Ar/Kr se pudo

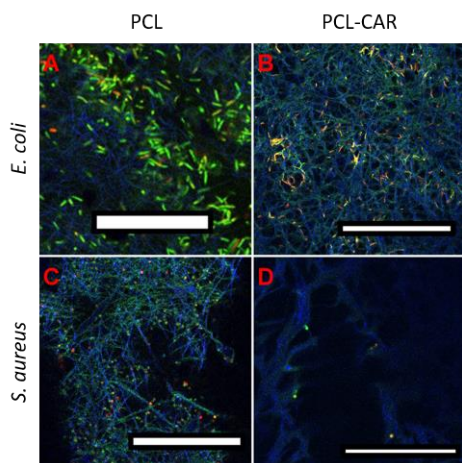


Figura II- 12. Imágenes de microscopía confocal de NFs de PCL y de NFs de PCL-CAR (concentración de MIC, A y B respectivamente) inoculadas con *E. coli* y NFs de PCL y de NFs de PCL-CAR (concentración de MIC, C y D respectivamente) inoculadas con *S. aureus*. La barra de escala corresponde con 30 μ m

visualizar (representado en color azul en la figura) mediante reflexión la estructura de nanofibras.

En la Figura II- 12 se presentan los resultados obtenidos mediante esta técnica. Como se puede observar en las imágenes A y C, en ausencia de compuesto bactericida, la mayoría de las bacterias encontradas sobre la superficie se visualizaron vivas. Sin embargo, en presencia de concentraciones inhibitorias de membranas cargadas con carvacrol (imágenes B y D), la concentración de bacterias fue mucho menor, además de encontrar una gran cantidad de ellas muertas o con la membrana seriamente dañada. Este resultado es coherente con los obtenidos anteriormente, ya que, a esta concentración, si bien no se erradica el 100 % de las bacterias presentes en la muestra, sí se reduce su crecimiento, hallándose una mortalidad superior que en muestras donde no está presente el agente bactericida.

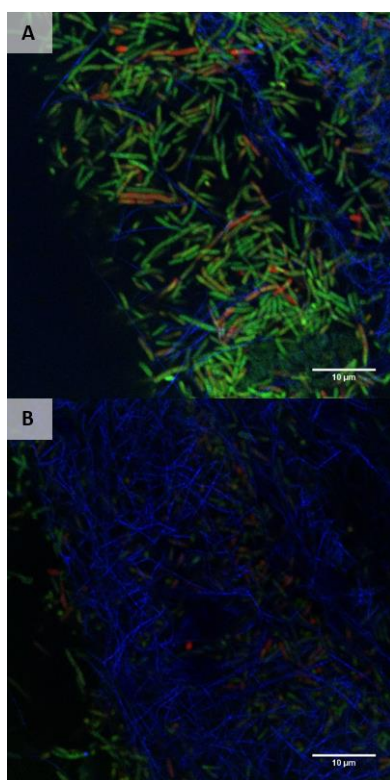


Figura II- 13. Vista de la superficie (A) y a una profundidad de 2 μm (B) de una membrana de NFs de PCL inoculada con *E. coli*

Adicionalmente, mediante esta técnica de microscopía también se pueden obtener imágenes a distintas alturas de la muestra, con lo que, además de poder explorar la muestra en los ejes x e y, podemos profundizar en el eje z. Así, se tomaron imágenes del interior de la membrana, como muestra la Figura II- 13. En la imagen superior se muestra la superficie de una membrana de PCL incubada con un cultivo de *E. coli*, pudiendo observar las bacterias sobre la superficie de fibras. La imagen inferior se corresponde con la misma zona de la muestra, solo que tomada profundizando 2 μm en el interior de la membrana. Como se puede observar, no se encontró presencia bacteriana en el interior de la membrana, por lo que este material no permite el paso de las bacterias.

Este resultado, en un ejemplo de aplicación como apósito, indica que, además de eliminar las posibles bacterias presentes en la superficie de la herida, se impediría la colonización de la misma por bacterias

provenientes de otras fuentes, ya que el tamaño de poro es demasiado pequeño como para que una bacteria del tamaño de *E. coli* pase a través de ella.

II.3.6. Estudio microbiológico in-vivo

Tras estudiar las propiedades bactericidas *in-vitro* de las membranas de PCL cargadas con carvacrol y timol frente a *S. aureus* se decidió estudiar dichas propiedades *in-vivo* en un modelo de herida infectada. Para ello, se emplearon las membranas de cargadas con timol en forma de discos de 12 mm de diámetro con una masa de 30 mg (el valor de la MBC determinada previamente frente a la cepa de *S. aureus* empleada).

Los resultados de dichos experimentos obtenidos en el grupo de investigación¹⁸⁶ se presentan en la Figura II-14 A, donde se muestran imágenes de heridas representativas de cada grupo experimental, junto con la evaluación semi-cuantitativa del nivel de infección. El grupo control no presentó infección (NG) en ninguno de los tiempos estudiados mientras que el grupo infectado y tratado con membranas de PCL presentó una infección masiva (+++) en todos los puntos estudiados. En las heridas tratadas con PCL-TIM se encontró una ligera infección (+) durante los tres primeros días de tratamiento que finalmente aumentó hasta un nivel moderado (++) en el punto final del experimento. Si comparamos los resultados con los obtenidos para la aplicación de una dosis de un antiséptico empleado en la práctica clínica, la clorhexidina, se puede observar que se obtuvieron resultados similares en todos los puntos excepto en el primer día. Para el primer día no se detectó infección en la herida tratada con clorhexidina, pero a partir del segundo día los niveles de infección fueron similares a los observados en las heridas tratadas con membranas de PCL-TIM. Para el timol libre, los resultados que se obtuvieron fueron siempre de un nivel mayor de infección en comparación con los obtenidos para la clorhexidina y para las membranas de PCL-TIM, llegando incluso a una infección masiva (+++) en el último día de experimento. Atendiendo a los resultados cuantitativos obtenidos mediante qPCR (Figura II-14 B) se puede ver cómo, tras 3 días de tratamiento, se consiguió una reducción de, al menos, 10^2 UFC/mL respecto a la concentración de bacterias determinada en las heridas tratadas con membranas de PCL, lo que indica que las membranas de PCL-TIM actúan como inhibidores del crecimiento de *S. aureus* de una forma tan efectiva como la clorhexidina. Además, en estudios previos dentro del grupo de investigación se comprobó cómo la clorhexidina reduce la viabilidad de varias líneas celulares por debajo del 70 % (umbral determinado para considerar a un compuesto

citotóxico según la norma ISO 10993-5¹⁸⁷) a concentraciones tan bajas como 4 µg/mL, mientras que las muestras tratadas con timol mantuvieron la viabilidad por encima de dicho umbral para una concentración de 60 µg/mL. Por tanto, la encapsulación de timol en membranas de PCL presenta un efecto bactericida similar a un compuesto usado actualmente en el tratamiento clínico, la clorhexidina, y dicha encapsulación del timol ha demostrado ser menos citotóxico.

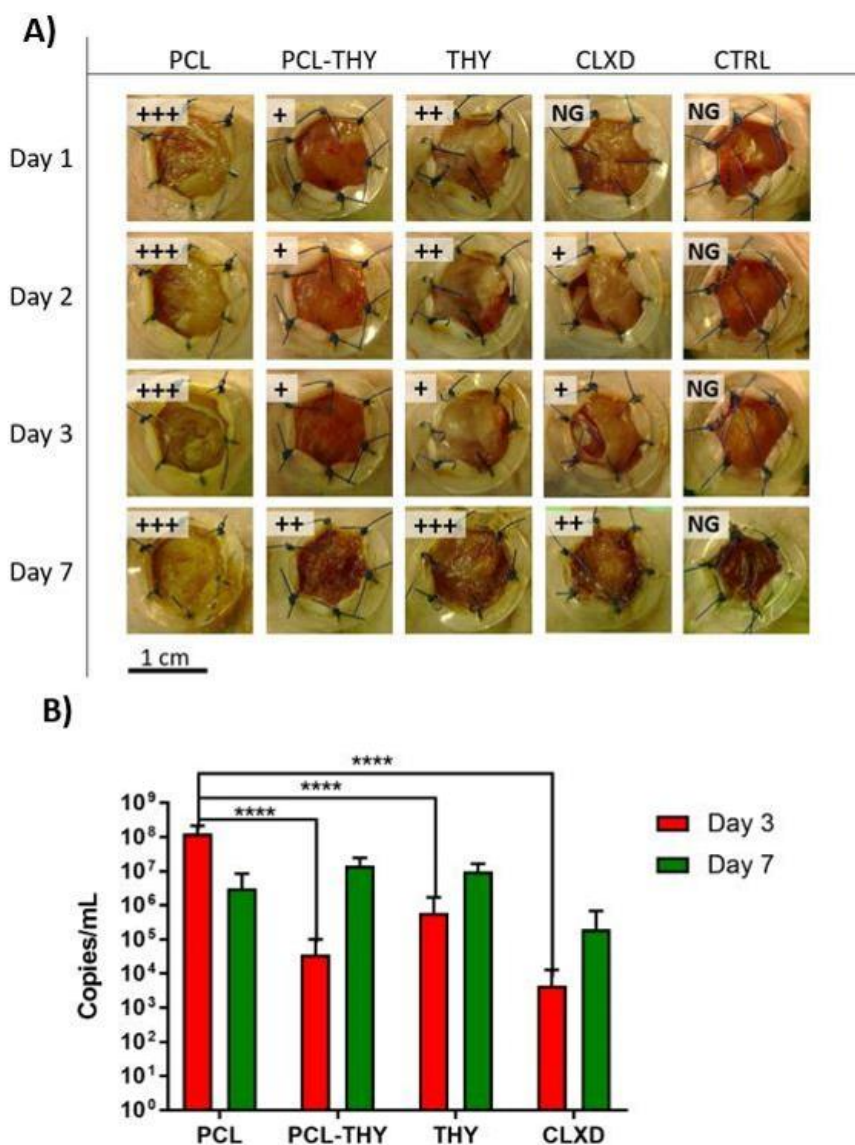


Figura II- 14. Resultados de los ensayos in-vivo. A) Imágenes representativas de cada grupo experimental a los distintos tiempos de ensayo. B) Carga bacteriana obtenida mediante qPCR para los distintos grupos experimentales a 3 y 7 días. Adaptado de García-Salinas y colaboradores¹⁸⁶

De forma complementaria, se realizaron estudios histopatológicos de las heridas para analizar mediante una tinción inmunohistoquímica el grado de angiogénesis producido en las heridas tratadas. Los resultados obtenidos (Figura II-

15) mostraron cualitativamente que, tres días tras la infección, la formación de nuevos vasos sanguíneos es similar en todos los grupos experimentales (áreas teñidas de marrón y marcadas con flechas). Sin embargo, siete días después de la infección puede apreciarse cómo el área teñida se incrementa ligeramente en la imagen correspondiente a la herida tratada con membranas de PCL-TIM, lo que puede indicar una mayor regeneración de los vasos sanguíneos que con el resto de tratamientos. Por tanto, además de ayudar a controlar la infección por *S. aureus* las membranas de PCL-TIM sintetizadas pueden contribuir a la regeneración de los tejidos en heridas infectadas.

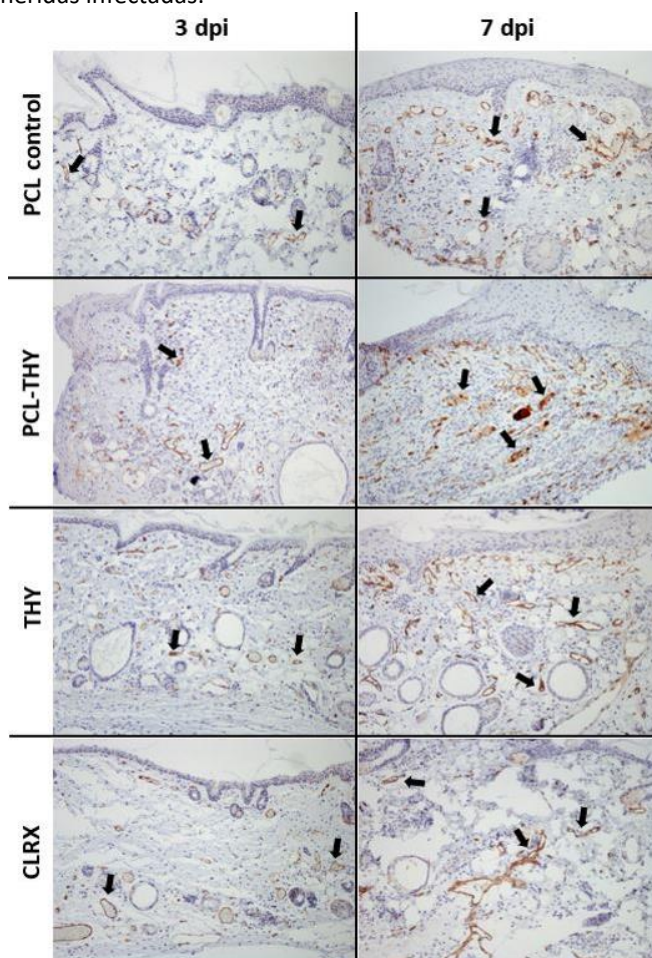


Figura II- 15. Tinción inmunohistoquímica del tejido circundante a las heridas para los distintos grupos experimentales a 3 y 7 días tras la infección. Adaptado de García-Salinas y colaboradores¹⁸⁶

II.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se optimizó la síntesis de nanofibras de PCL cargadas con carvacrol, escualeno, timol, tirosol y combinaciones de escualeno y timol y de tirosol y timol mediante electrospinning. Esta síntesis se realizó a partir de disoluciones del polímero conteniendo los compuestos activos, obteniendo unas membranas con un diámetro de fibra homogéneo y una eficiencia de encapsulación de entre el 71 y el 88 % para todos los compuestos.

Dada la alta eficiencia de encapsulación, se analizó el enlace establecido entre PCL y carvacrol y timol mediante técnicas de RMN, comprobando que se establecen enlaces de tipo puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo del polímero y el grupo hidroxilo de dichos compuestos activos, dicha interacción favorece una liberación sostenida en el tiempo.

Se analizó también el perfil de liberación de los compuestos cargados en las membranas, comprobando que este varía dependiendo del compuesto analizado. En general, de los perfiles obtenidos, se observó que en la primera media hora se libera la mayor parte del compuesto activo, seguida de una liberación mucho más sostenida hasta las 8 horas.

Dada la naturaleza bactericida del carvacrol y timol, se evaluó el poder bactericida de las membranas cargadas con estos compuestos, obteniendo la MIC y MBC frente a un modelo de bacteria Gram + y otro de bacteria Gram -. Así mismo, se evaluó la influencia del contacto de la membrana con las bacterias, determinando que es necesario dicho contacto para observar el efecto bactericida de las membranas.

Dados los resultados positivos obtenidos en los ensayos *in-vitro*, se evaluó el poder bactericida de las membranas cargadas con timol en un modelo de herida infectada en ratón con bacteria Gram +. Aunque no se consiguió la completa erradicación de la infección, se obtuvieron resultados similares al tratamiento con un antiséptico comercial, la clorhexidina, siendo este antiséptico más tóxico para células en ensayos *in-vitro* que el timol. Además, los resultados obtenidos a partir de tinciones inmunohistoquímicas muestran una mayor regeneración de los vasos sanguíneos en las heridas tratadas con las membranas de PCL cargadas con timol.

CAPÍTULO III:
NANOFIBRAS DE PCL
DECORADAS CON
MICROPARTÍCULAS DE
PLGA

III.1. INTRODUCCIÓN

III.1.1. *Partículas poliméricas como sistemas de liberación controlada de fármacos*

En el capítulo II se sintetizaron nanofibras poliméricas cargadas con distintos compuestos presentes en aceites esenciales, comprobando que es factible su empleo como apósitos con propiedades bactericidas y/o antiinflamatorias, dependiendo del compuesto cargadas en las mismas. Sin embargo, a pesar de su efectividad frente a *E. coli* y *S. aureus*, no se consiguió un control de la liberación de los compuestos al medio empleado, ya que en todos los casos se produjo una liberación rápida del compuesto durante la primera media hora de experimento de liberación en medios fisiológicos. Por tanto, se encontró la necesidad de emplear otros sistemas de liberación de fármacos que ofrezcan un mayor control sobre el perfil de liberación de los mismos. Para ello, una alternativa a las membranas de nanofibras sintetizadas anteriormente es el empleo de partículas poliméricas cargadas con antimicrobianos. Al igual que con las nanofibras, las partículas pueden estar fabricadas con polímeros naturales o sintéticos y muestran una alta estabilidad (dependiendo del polímero empleado se puede regular el período de degradación de las mismas tanto *in-vitro* como *in-vivo*) y una buena biocompatibilidad, en función de la naturaleza del polímero empleado. En cuanto a la liberación del compuesto cargado al medio, las nanopartículas poliméricas permiten modular la liberación al medio del mismo (por ejemplo, Papadimitriou y colaboradores modificaron el perfil de liberación de cloruro de dorzolamida, un fármaco usado para tratar hipertensión, desde nanopartículas de quitosano variando la proporción empleada en la síntesis entre el polímero y el fármaco¹⁸⁸), lo que permite modular el tratamiento aplicado en función de las necesidades. Además del modo de liberación, la encapsulación de antibióticos en partículas poliméricas ofrece ventajas como una mejora en la biodistribución de dichos antibióticos ayudando a superar las barreras de los tejidos y de las membranas celulares, con lo que se consigue una mayor concentración del compuesto bactericida en la zona infectada. Muchas veces, el tratamiento de la infección es complicado debido al rápido lavado de los antibióticos en el órgano a tratar o debido a la desactivación del compuesto cuando atraviesa la barrera de los tejidos, como pueden ser las mucosas de los sistemas ocular, gastrointestinal y respiratorio^{189–192}. Sin embargo, este tipo de partículas pueden proteger el antibiótico frente a los

mecanismos de degradación celulares y facilitar su transporte a través de las distintas barreras del tejido (Figura III- 1).

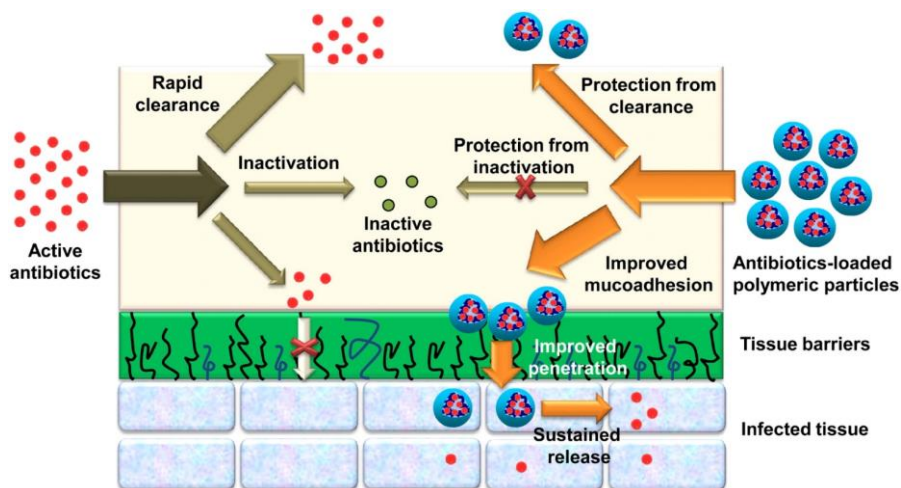


Figura III- 1. Mecanismos de protección y transporte de antibióticos mediante nanopartículas poliméricas. Adaptado de Xiong y colaboradores¹⁸⁹

Para la síntesis de partículas destinadas a la carga y liberación de fármacos, los polímeros usados son muy variados. Así, se pueden encontrar partículas fabricadas a partir de ácido poli-glicólico, ácido poli-láctico, alginato, PCL, PEG, PLGA, distintos poli-acrilatos o quitosano, por mencionar algunos ejemplos^{193,194}. Frezza y colaboradores prepararon nanopartículas de poli-alquil-cianocrilato cargadas con mesilato de perfloxacino y ofloxacino. Aunque en todos los casos mantuvieron constante la relación entre polímero y antibiótico los autores consiguieron variar el perfil de liberación modificando el surfactante empleado durante la síntesis. Además, en todos los casos las nanopartículas presentaron una actividad bactericida mayor que la del antibiótico libre frente a *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*¹⁹⁵. Misra y colaboradores sintetizaron nanopartículas de PCL y PLGA cargadas con doxiciclina mediante el método de doble emulsión, en las que modificando distintas variables como la relación entre polímeros o el disolvente orgánico empleado, consiguieron controlar tanto la carga como el tamaño de las nanopartículas. Con estas partículas obtuvieron una liberación controlada del fármaco durante las primeras horas de experimento, además de comprobar cómo el antibiótico encapsulado era más estable que en su forma libre, lo que potencia su efecto bactericida frente a *E. coli*. Tras 3 días de tratamiento, mientras que las nanopartículas seguían teniendo efecto bactericida, el antibiótico libre veía disminuidas sus propiedades¹⁹⁶. Por otro lado, Singh y colaboradores prepararon

mediante el método de nanoprecipitación nanopartículas de alginato funcionalizado cargadas con ciprofloxacino que demostraron ser eficaces en el tratamiento de biofilms generados por la bacteria *P. aeruginosa*¹⁹⁷. Estas partículas, además, tienen la particularidad de liberar el antibiótico más rápidamente a un pH menor, lo que permite regular la administración del mismo en función del pH del medio.

Como se puede comprobar con estos ejemplos, las nanopartículas poliméricas permiten controlar la liberación de los antibióticos cargados en ellas, ya no sólo variando el tipo de polímero empleado, si no que para un mismo polímero (o combinación de ellos) se puede modificar el perfil simplemente variando los parámetros de la síntesis. Además, en general presentan tanta o mayor eficacia bactericida frente a distintos microorganismos que el antibiótico libre, lo que permite disminuir la dosis empleada.

III.1.2. Partículas de PLGA con propiedades bactericidas

Uno de los polímeros más ampliamente usado en aplicaciones médicas es el copolímero de los ácidos poli-láctico y poli-glicólico, el PLGA (Figura III- 2). Este es un polímero biodegradable y altamente biocompatible, razones por las cuales tanto

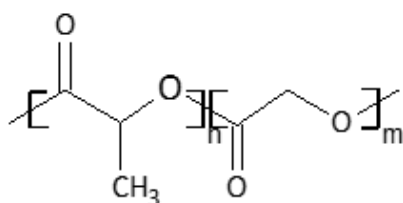


Figura III- 2. Estructura química del ácido poli-(láctico-co-glicólico), PLGA

la Agencia Europea del Medicamento como la Administración de Alimentos y Medicamentos estadounidense (EMA y FDA respectivamente, por sus siglas en inglés) han aprobado su empleo farmacológico en muchas formulaciones y dispositivos médicos usados en humanos¹⁹⁸. Otras características que impulsan su empleo como medio de encapsulación de fármacos

es su disponibilidad comercial, su degradación en condiciones fisiológicas, la posibilidad de modificar sus propiedades superficiales y físico-químicas (con lo que se modifica a su vez la velocidad de degradación) y la posibilidad de obtener la liberación sostenida de los fármacos encapsulados en el polímero¹⁹⁹. En condiciones fisiológicas, la degradación del polímero se produce por la hidrólisis de los enlaces éster del polímero, lo que lo fragmenta en sus monómeros (ácido láctico y ácido glicólico) que pueden ser fácilmente metabolizados en el organismo mediante el ciclo de Krebs formando dióxido de carbono y agua ¹⁹⁸. En cuanto a las modificaciones del polímero, variando el porcentaje de cada monómero empleado

se consigue la modificación en su velocidad de degradación. Así, la composición más ampliamente empleada contiene un 50 % de cada monómero y se degrada en un período de tiempo de entre 50 y 60 días, pero si se aumenta el porcentaje de ácido láctico se aumenta progresivamente el tiempo de degradación del polímero *in vivo*¹⁹⁹.

Uno de los principales problemas en la administración de fármacos es su solubilidad en agua, que juega un papel esencial en su absorción por parte del organismo, sobre todo en los clasificados como clase IV por el Sistema Biofarmacéutico de Clasificación que se caracterizan por una baja solubilidad y permeación a través de las membranas biológicas²⁰⁰. Esta característica hace que sea necesario aumentar la dosis aplicada para obtener el mismo efecto con el riesgo que supone para el paciente, así como el aumento de las posibilidades de generar resistencias bacterianas²⁰¹. Ante este problema, el empleo de la nanotecnología (por ejemplo, en forma de nanopartículas) en la administración de este tipo de fármacos ha demostrado su potencial para aumentar tanto la solubilidad como la permeabilidad en su administración²⁰². La ventaja básica del empleo de nanopartículas es que aumenta tanto el área superficial con que se administra el fármaco como el gradiente de concentración con el medio, por lo que se aumenta el porcentaje de fármaco disuelto de acuerdo con la ecuación de Noyes-Whitney^{200,203}. Con estas características, la incorporación de antibióticos hidrofóbicos en partículas de PLGA para aumentar su solubilidad en agua es una aproximación muy atractiva y empleada actualmente para la administración de fármacos con una reducida solubilidad en agua. Imbuluzqueta y colaboradores incluyeron gentamicina modificada con el surfactante aniónico bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio en nanopartículas de PLGA de 263 nm de diámetro con una carga del 22 % de antibiótico. Probaron su eficacia frente a dos cepas de *S. aureus* (una susceptible y otra resistente a meticilina, MSSA y MRSA respectivamente), *P. aeruginosa* y *Listeria monocytogenes*. Los valores de MIC y MBC en las nanopartículas apenas variaron frente a las del antibiótico libre, lo que indica que la inclusión del antibiótico en las nanopartículas no afectó a la actividad bactericida del mismo²⁰⁴. Sadozai y colaboradores sintetizaron nanopartículas de PLGA cargadas con ketoconazol con un diámetro de entre 172 y 271 nm, dependiendo del porcentaje de ketoconazol incluido en la formulación. El distinto porcentaje del fármaco cargado en las partículas, además de influir en el tamaño de las nanopartículas lo hizo también en la liberación del mismo, siendo más rápido cuanto mayor es el porcentaje de fármaco en las mismas. La formulación elegida para

probar su actividad frente a *C. albicans* fue la que contenía un 12.5 % de ketoconazol, siendo menos efectivo a las 24 horas que la misma concentración de antibiótico libre, lo cual los autores lo explican debido a que en ese tiempo sólo se ha liberado un 10 % aproximadamente del antibiótico cargado en las nanopartículas²⁰⁵. Dimer y colaboradores prepararon dos tipos de nanocápsulas de PLGA cargadas con claritromicina, una de las cuales recubierta con quitosano para darle un carácter catiónico a la superficie de las nanopartículas. Obtuvieron nanopartículas con un diámetro de 95 y 121 nm (para las no recubiertas y las recubiertas con quitosano, respectivamente) y ensayaron sus propiedades bactericidas frente a *Mycobacterium abscessus*, *S. aureus*, *Staphylococcus carnosus* y *S. pneumoniae* comprobando que el fármaco es más efectivo al estar incluido en las nanocápsulas²⁰⁶. Quiao y colaboradores incluyeron moxifloxacino y una mezcla de moxifloxacino y rifampicina en microesferas de PLGA de entre 16 y 20 µm. Con ambos tipos de partículas se encontraron resultados bactericidas frente a *S. aureus*, aumentando su efectividad con el tiempo, lo que concuerda con la liberación sostenida de los fármacos que obtuvieron en los ensayos de liberación *in-vitro*²⁰⁷. López y colaboradores prepararon nanopartículas de PLGA cargadas con levofloxacino mediante dos métodos distintos: nanoprecipitación (variando tanto el surfactante empleado como el pH de la fase acuosa) y doble emulsión-evaporación (variando el pH de la fase acuosa). En todos los casos se obtuvieron nanopartículas de entre 220 y 1000 nm, en función del método de síntesis y de las condiciones empleadas. Ensayaron las propiedades bactericidas de las nanopartículas sintetizadas frente a *E. coli*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *Mycobacterium phlei*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* y encontraron unos valores de MIC mayores que los del levofloxacino libre (tras 24 horas de ensayos), lo que según los autores es debido a la liberación sostenida que obtuvieron en los ensayos de liberación *in-vitro* en los que a 24 horas sólo se liberó el 50 % del antibiótico cargado en las nanopartículas²⁰¹.

III.1.3. Partículas de PLGA cargadas con compuestos bactericidas obtenidos de aceites esenciales

Como se detalla en la sección anterior, hay numerosos ejemplos del empleo de partículas de PLGA sintetizadas por distintos métodos y cargadas con distintos antibióticos. La encapsulación consigue liberar el antibiótico cargado de una manera sostenida a lo largo del tiempo. Sin embargo, todos estos antibióticos son los empleados tradicionalmente mientras que, para seguir la línea de investigación

desarrollada a lo largo de este trabajo, se desea analizar el empleo de compuestos antimicrobianos obtenidos a partir de aceites esenciales.

En bibliografía se puede encontrar la encapsulación tanto de extractos sin purificar de elementos naturales como compuestos aislados de dichos extractos. Así, por ejemplo, el extracto del própolis se ha encapsulado en partículas de PLGA dadas sus propiedades bactericidas, antioxidantes, estimuladoras del sistema inmune y de reducción en la proliferación de células cancerosas²⁰⁸. Iadnut y colaboradores prepararon nanopartículas cargadas con un extracto de própolis marrón (por lo general es marrón oscuro, pero se pueden encontrar variedades verdes, rojas, negras o blancas dependiendo de las fuentes de resina que pueden ser encontradas en los alrededores de la colmena) compuesto mayoritariamente por ácido gálico, quercetina, pinocembrina, crisina y galangina. Las nanopartículas, sintetizadas mediante el método de emulsión-evaporación empleando diferentes cargas de extracto, se obtuvieron con unos diámetros de entre 178 y 475 nm y con una eficiencia de encapsulación superior al 85 % en todos ellos. Los ensayos antibióticos realizados, empleando la *C. albicans*, como modelo, revelaron una mayor actividad del extracto encapsulado que en su forma libre, justificado por los autores con el aumento de la solubilidad de estos compuestos poco solubles en agua cuando se encuentran encapsulados en el polímero²⁰⁸. De Mélo y colaboradores centraron su investigación en la encapsulación de un extracto etanólico de própolis rojo en nanopartículas de PLGA para destruir *biofilms* generados por *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Así pues, mediante el método de emulsión-difusión obtuvieron nanopartículas de 224 nm con una eficiencia de encapsulación del 97 %. Estudiaron sus propiedades bactericidas frente a las bacterias mencionadas anteriormente, obteniendo efecto bactericida, pero a mayores concentraciones que el extracto libre, lo que confirma el control de la liberación que realizan las nanopartículas que provoca una menor actividad bactericida al comienzo del experimento²⁰⁹. También Pereira y colaboradores encapsularon extractos de fuentes naturales, en este caso el extracto fenólico de la fruta de la guabiroba. Los componentes mayoritarios de este extracto son los ácidos gálico, elágico, ferúlico y p-cumárico, con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, bactericidas y anticarcinogénicas. Así, sintetizaron nanopartículas de PLGA cargadas con el extracto mediante el método de emulsión-evaporación, obteniendo unas nanopartículas de 202 nm de diámetro con una eficiencia de encapsulación del 39 %. Dichas partículas mostraron su capacidad para inhibir el crecimiento de la bacteria *Listeria innocua* a una concentración menor que la del extracto libre debido a la presencia de PVA en el recubrimiento de las

nanopartículas, que mejora la adhesión de las nanopartículas a la pared bacteriana y potencia la adsorción del compuesto a través de la membrana celular²⁰⁹.

Además de extractos sin purificar de fuentes naturales, también se han encapsulado previamente compuestos purificados a partir de dichos extractos. Por ejemplo, Gao y colaboradores encapsularon curcumina en nanopartículas mediante el método de nanoprecipitación. Variando la proporción entre la fase acuosa y la orgánica, así como la concentración de curcumina, obtuvieron nanopartículas de entre 132 y 304 nm, con unas eficiencias de encapsulación de entre el 51 y el 95 %. Ensayaron las propiedades bactericidas de las nanopartículas frente a *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sonorensis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Salmonella*, obteniendo en todos los casos una reducción en la MIC para las nanopartículas en comparación con la curcumina libre²¹⁰. Además de Gao y colaboradores, Parmar y colaboradores prepararon nanopartículas de PLGA cargadas con bencilisotiocianato (un compuesto obtenido de la familia de las plantas crucíferas con propiedades bactericidas y antiinflamatorias) mediante el método de emulsión-evaporación, obteniendo partículas de 106 nm con una eficiencia de encapsulación del 74 %. Estas nanopartículas presentaron una mayor actividad bactericida frente a *E. coli* que el compuesto libre, aunque sin conseguir determinar la razón por la que aumenta la capacidad bactericida del compuesto al estar encapsulado²¹¹.

Así pues, en este capítulo se plantea la síntesis de partículas de PLGA cargadas con timol mediante el método de *electrospraying* para obtener un perfil de liberación del mismo distinto al obtenido con otros métodos de síntesis utilizados en este trabajo y de esta manera disponer de distintos métodos de fabricación que permitan producir partículas cargadas de biocidas naturales presentando distintos perfiles de liberación. La elección del *electrospraying* como método de síntesis de las partículas es debido a la alta volatilidad del timol. Mientras que otros métodos de síntesis de nanopartículas poliméricas, como la nanoprecipitación o la emulsión-evaporación, requieren de largos períodos de evaporación al aire de los disolventes orgánicos empleados, en el *electrospraying* dicha evaporación se produce de forma mucho más rápida, lo que puede reducir la pérdida de timol durante la síntesis. Adicionalmente, se plantea la inclusión de dichas partículas en membranas de PCL, para su empleo como apósitos para la protección de heridas frente a infecciones bacterianas.

III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1. Optimización de síntesis de micropartículas de PLGA cargadas con timol (PLGA-TIM)

Para la síntesis de micropartículas de PLGA se partió de una disolución del polímero en DMF con una concentración de 10 % m/m. Para preparar esta disolución se disolvieron 1.1 g de PLGA en 10 mL de DMF en un bote de polipropileno y se mantuvieron en agitación toda la noche para garantizar la completa disolución del polímero.

Para la síntesis de micropartículas de PLGA cargadas con timol (PLGA-TIM) se añadieron concentraciones crecientes de timol (5, 7.5, 10 y 15 % m/m) 30 minutos antes del proceso de *electrospinning*, para evitar la volatilización del compuesto y garantizar su completa disolución y homogeneización en la disolución polimérica.

Todos los materiales preparados en este capítulo se sintetizaron en el equipo YFlow 2.2 D500 descrito en el anexo A.2.1 equipado con un colector plano de aluminio de 8 cm de diámetro recubierto de papel de aluminio. La distancia entre la punta de la aguja y el colector se fijó en 30 cm, el voltaje aplicado al colector se mantuvo constante a -4.30 kV, el voltaje aplicado a la aguja se mantuvo entre +10.08 y +14.10 kV (variándolo en cada caso para mantener un cono de Taylor estable) y se emplearon caudales volumétricos de disolución de 0.5 y 1.0 mL/h. En todos los casos, el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente y con una humedad relativa entre el 30 y el 50 %.

III.2.2. Optimización de síntesis de nanofibras de PCL decoradas con micropartículas de PLGA cargadas con timol (PCL@PLGA-TIM)

Para la síntesis de membranas de PCL decoradas con micropartículas de PLGA-TIM (PCL@PLGA-TIM) en primer lugar se prepararon las membranas de nanofibras de PCL a partir de una disolución de PCL 10 % m/m en una mezcla de DCM y DMF (1:1 en relación volumétrica). Se empleó un caudal volumétrico de 1 mL/h, la distancia entre la punta de la aguja y el colector se fijó en 18 cm, el voltaje aplicado al colector se mantuvo constante a -4.0 kV y el voltaje aplicado a la aguja se fijó a +10.50 kV. Para obtener una membrana con un espesor homogéneo se empleó el módulo de movimiento de la aguja en 2D con el que está equipado el equipo y se

empleó un colector plano de aluminio de 8 cm de diámetro cubierto con papel de aluminio. En todos los casos, el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente y con una humedad relativa entre el 30 y el 50 %.

Una vez sintetizadas las membranas, se procedió al *electrospraying* de las micropartículas sobre las mismas. Para ello, se emplearon las mismas condiciones que las descritas en el apartado 2.1, empleando disoluciones de PLGA sin timol para las muestras control (PLC@PLGA) y con timol (PCL@PLGA-TIM) para las membranas con propiedades bactericidas.

III.2.3. Caracterización

III.2.3.1. Morfología

Para la caracterización morfológica de los materiales sintetizados en este capítulo se recurrió a la microscopía SEM, preparando las muestras tal y como se describe en el anexo A.2.2.

III.2.3.2. Propiedades mecánicas

Dado que, tras la preparación de las membranas mediante *electrospinning*, se les sometió a un proceso posterior de *electrospraying*, se comprobó que no se viera afectada la estructura de la misma a partir de un estudio de sus propiedades mecánicas. Para ello, se cortaron seis muestras de cada material en forma de probeta de 50 x 10 mm para someterlas a un test de tracción. Los ensayos se realizaron en un equipo de test uniaxial Instron equipado con un video extensómetro 5548 (celda de carga de 1 KN y a una velocidad de extensión de 1 mm/min).

III.2.3.3. Composición

III.2.3.3.1. GC-MS

Para determinar el porcentaje de timol incluido en los materiales sintetizados en este capítulo se empleó la técnica GC-MS, preparando una recta de calibrado en metanol entre 1 y 50 ppm de timol y añadiendo una concentración de 5 ppm de S-(-)-limoneno como patrón interno.

Para la preparación de las muestras, se disolvieron aproximadamente 10 mg de material en 10 mL de acetonitrilo hasta la completa disolución del mismo. A 450 µL de esta disolución, se añadieron 50 µL de una disolución de S-(-)-limoneno (para

obtener una concentración de patrón interno de 5 ppm) y 500 μ L de metanol, se centrifugó la muestra a 13300 rpm para separar el polímero precipitado del sobrenadante y se filtró este último (a través de un filtro de 200 nm de diámetro de poro) para separarlo del polímero. El sobrenadante filtrado se diluyó en metanol para ajustar la concentración de timol a la recta de calibrado y las muestras resultantes se midieron con el método cromatográfico descrito en el anexo A.2.4. Para el cálculo del porcentaje de timol incorporado en los materiales sintetizados se midieron tres réplicas de, al menos, tres síntesis independientes de cada material. Los resultados obtenidos se expresan como la media de las medidas junto con la desviación estándar de dichas medidas.

III.2.3.3.2. RMN-¹H

Para determinar el porcentaje de PCL y PLGA que compone cada muestra y confirmar el porcentaje de timol presente, calculado previamente mediante GC-MS, se empleó la técnica espectroscópica de RMN-¹H como técnica de cuantificación. Igual que en el caso de los experimentos de RMN realizados en el capítulo II, estos experimentos fueron realizados en la Universidad de Jaén en colaboración con la Profesora Sofía Salido Ruiz. Para la recta de calibrado se prepararon disoluciones en CDCl₃ de PCL (4 mg/mL), PLGA (4 mg/mL), timol (4 mg/mL) y piperonal (5 mg/mL). La disolución de piperonal en CDCl₃ se empleó como patrón interno y se adicionó el mismo volumen (80 μ L) a cada tubo de RMN (5 mm de diámetro externo), ya fuera una disolución de muestra en CDCl₃ (20 mg/mL) o disoluciones de PCL, PLGA y timol preparadas para los diferentes puntos de la recta de calibrado. Todos los espectros se obtuvieron en un equipo Bruker DPX 400, trabajando a 400 MHz y en una ventana espectral entre 0 y 13 ppm.

Para obtener la máxima intensidad de señal para cada protón se optimizó el parámetro de relajación D_1 . Para ello, se empleó la secuencia de pulsos del método de inversión-recuperación, calculando así el tiempo de relajación longitudinal, T_1 , en las disoluciones de PCL, PLGA, timol y piperonal mientras se aplica un pulso de 90° de 10.4 μ s de ancho. El valor más alto para T_1 se encontró para la señal a desplazamiento de 9.80 ppm del piperonal, con un valor de 4.45 s, por lo que el valor de D_1 se fijó en 15 s (un valor más de 3 veces superior al valor de T_1).

Una vez ajustados los parámetros, se utilizó como valor de referencia la integración de la señal singlete a 9.80 ppm del piperonal y se emplearon para la cuantificación la integración del doblete a 7.05 ppm para el timol, el multiplete entre 4.53 y 4.95 ppm para el PLGA y el multiplete entre 3.95 y 4.10 ppm para la

PCL. Los resultados se obtuvieron, por duplicado, a partir de la medida de 3 muestras sintetizadas independientemente. Estos se expresan como la media de las medidas junto con la desviación estándar de dichas medidas.

III.2.3.4. Determinación del perfil de liberación

Para la determinación del perfil de liberación de timol desde los materiales sintetizados en este capítulo se empleó un modelo estático. Para ello, se sumergieron 25 mg de membrana de PCL@PLGA-TIM en 10 mL de fluido biológico simulado (PBS con 2 % m/v de Tween 80) y se mantuvieron a 37 °C bajo agitación constante a 250 rpm. Estas condiciones se mantuvieron durante 15 días, reemplazando todo el fluido a tiempos determinados para su posterior análisis mediante cromatografía UPLC (anexo A.2.5).

III.2.3.5. Propiedades bactericidas

Para la determinación de las propiedades bactericidas de los materiales sintetizados en este capítulo se empleó el ensayo de Susceptibilidad Antimicrobiana en Disco del *US Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*²¹². Para ello, se cortaron discos con diferentes diámetros (12, 14, 18 y 20 mm) de los distintos materiales y se esterilizaron bajo luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) 30 minutos por cada cara. Posteriormente, cada placa Petri de TSA estéril empleada se inoculó con 200 μ L de una suspensión bacteriana de *S. aureus* ATCC 25923 (10^7 UFC/mL) y se colocaron los discos (hasta 2 discos por placa) sobre el agar, poniendo en contacto la cara sobre las que se depositaron las micropartículas de PLGA o las micropartículas de PLGA cargadas con timol. Las muestras se incubaron a 37 °C durante diferentes períodos de tiempo (1 y 5 días) en una caja cerrada con agua para mantener un nivel de humedad adecuado, tras lo cual se tomaron distintas fotografías de las muestras para evaluar el diámetro del halo de inhibición producido.

III.2.3.6. Estudio de citotoxicidad in-vitro

Para el estudio de la citotoxicidad de los materiales sintetizados en este capítulo se emplearon dos líneas celulares distintas: fibroblastos humanos y queratinocitos (HaCaT) como modelos de células epiteliales. Ambas líneas se cultivaron en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM)* con L-glutamina (2 mM) y suplementado con *Fetal Bovine Serum (FBS, 10 % v/v)* y antibióticos (1 %

de penicilina-estreptomicina-anfotericina B) a una temperatura de 37 °C y en una atmósfera con un 5 % de CO₂.

Para asegurar la viabilidad de las células, éstas se sembraron 24 h antes del tratamiento en placas de 6 pocillos con una densidad de 1.2×10^5 células por pocillo. Transcurrido ese tiempo, y para asegurar la correcta adhesión de las células, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por medio fresco añadiendo a cada pocillo timol o los distintos materiales sintetizados (membranas de PCL, membranas de PCL@PLGA y membranas de PCL@PLGA-TIM). Cada membrana se esterilizó durante 1 h por cada cara bajo luz ultravioleta. Tras una incubación de 24 h se realizó un ensayo de viabilidad *Blue cell* para estudiar el metabolismo celular. Se retiraron las membranas, el medio de cultivo se sustituyó por medio fresco añadiendo el reactivo correspondiente (10 % v/v) y se incubaron las muestras durante 4 h, tiempo tras el cual se midió la fluorescencia de cada muestra (535 nm para la excitación y 590 nm para la emisión) en un lector de microplacas Synergy HT. La viabilidad se calculó por interpolación, considerando las muestras control (a las que no se les añadió timol o membrana) como el 100 % de viabilidad. Los datos se obtuvieron a partir de 6 experimentos por cada material llevados a cabo por duplicado (12 datos por cada material), expresando el valor como media de los datos obtenidos junto con desviación estándar de los mismos.

III.2.3.7. Estudio microbiológico in-vivo

Además de los estudios *in-vitro* de las propiedades bactericidas y la citotoxicidad de los materiales sintetizados en este capítulo, el grupo de investigación ensayó la eficacia de los mismos en un modelo escisional de herida infectada en ratón. Todos los experimentos fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza de acuerdo con la Política Española para la Protección Animal (RD53/2013) y la Directiva de la Unión Europea 2010/63 para la protección de los animales destinados a la investigación científica.

El procedimiento experimental del modelo de herida se describe en el anexo A.4.1 empleando como modelo de bacteria Gram + la bacteria *S. aureus* ATCC 25923. Se emplearon discos de 12 mm de diámetro de los materiales sintetizados, apilando el número necesario de los mismos hasta obtener la masa de material necesaria para obtener efecto bactericida calculada en los ensayos bactericidas *in-vitro*. Para los ensayos se establecieron cuatro grupos de 6 ratones cada uno: a) grupo control (con heridas no infectadas); b) grupo infectado (con heridas

infectadas sin tratar con los materiales sintetizados); c) grupo infectado tratado con PCL@PLGA; d) grupo infectado tratado con PCL@PLGA-TIM. 3 ratones de cada grupo se sacrificaron tras 3 días de tratamiento, mientras que los otros 3 se sacrificaron tras 7 días de tratamiento, momento en el cual las heridas se midieron y fotografiaron.

La identificación de los microorganismos presentes en cada herida se realizó la técnica de MALDI-TOF mientras que la cuantificación de las bacterias presentes en la herida se realizó mediante qPCR. Ambos procedimientos se describen en el anexo A.4.2. Se realizó también el estudio histopatológico de las heridas empleando para ello el procedimiento descrito en el anexo A.4.3.

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.3.1. Optimización de síntesis de micropartículas de PLGA cargadas con timol (PLGA-TIM)

Previo paso a su inclusión en membranas de nanofibras de PCL para la obtención de un material que proporcionara una liberación de timol sostenida en el tiempo, se procedió a la optimización del porcentaje de timol incluido en las micropartículas de PLGA sintetizadas mediante la técnica de *electrospraying*. Al igual que en el capítulo II, dicha optimización se centró en conseguir la mayor carga inicial de timol en las micropartículas comprometiendo lo menos posible la estructura de las mismas para preservar su morfología.

Para ello, se partió de una disolución de PLGA (10 % m/m) en DMF a la que se adicionaron concentraciones crecientes de timol (5, 7.5, 10 y 15 % m/m de timol respecto a la masa de PLGA), fijando un caudal volumétrico de 0.5 mL/h y los voltajes indicados en la sección 2.1. Los resultados de dichos experimentos se pueden observar en la Figura III- 3. Para una concentración de hasta un 10 % m/m de timol, se obtuvieron micropartículas de en torno a 1.5 μm de diámetro (1.8 ± 0.2 , 1.4 ± 0.2 y 1.6 ± 0.2 μm para las concentraciones de 5, 7.5 y 10 % m/m de timol, respectivamente) con una distribución de tamaños muy estrecha, como se puede observar en los respectivos histogramas. Sin embargo, para una concentración del 15 % m/m de timol, no se han formado partículas si no que, tal y como se puede

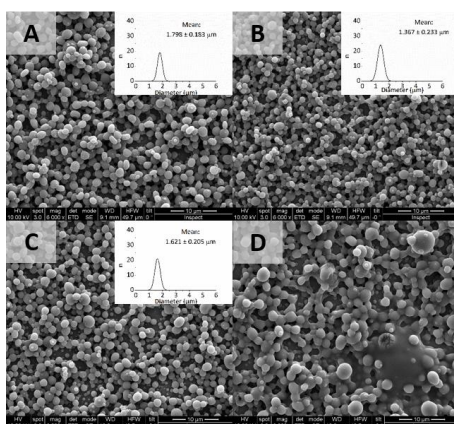


Figura III- 3. Imágenes de SEM de micropartículas de PLGA-TIM ((A: 5 % TIM m/m; B: 7.5 % TIM m/m; C: 10 % TIM m/m y D: 15 % TIM m/m)

apreciar en la imagen de SEM (Figura III- 3 D), hay formaciones poliméricas conectadas entre sí en vez de las partículas esféricas separadas que se pueden observar para el resto de concentraciones (Figura III- 3 A, B y C). Dichas aglomeraciones se deben evitar ya que no permitirían controlar los perfiles de liberación del principio activo contenido en su interior.

De la misma forma que se ha comprobado en el capítulo II para la síntesis de nanofibras cargadas con distintos compuestos, la viscosidad de

la disolución afecta a la formación de partículas mediante *electrospraying* de modo similar a como afecta a la formación de fibras mediante *electrospinning*, ya que ambos procesos se encuentran englobados dentro de las denominadas técnicas electrohidrodinámicas y se encuentran gobernadas por los mismos factores²¹³. Por tanto, al aumentar el porcentaje de timol añadido a la disolución de PLGA, la viscosidad de la misma disminuye, haciendo que no sea posible obtener micropartículas de un diámetro homogéneo.

Así pues, se estableció como óptima una concentración de 10 % m/m de timol para la síntesis de micropartículas de PLGA-TIM. Además del porcentaje de timol, se aumentó el caudal volumétrico de disolución empleado para aumentar así la producción de partículas, ensayando además de a 0.5 mL/h a 1 mL/h. En la Figura III- 4 se muestran los resultados de este incremento en el caudal volumétrico de disolución. Mientras que para un caudal volumétrico de 0.5 mL/h se obtienen

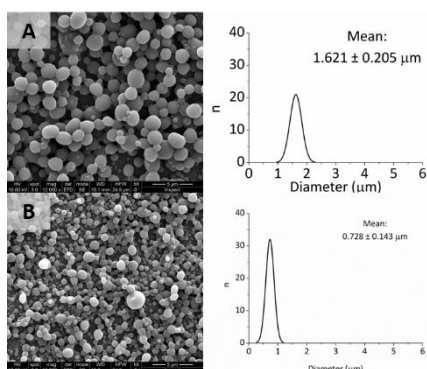


Figura III- 4. Imágenes de SEM de micropartículas de PLGA-TIM con un 10 % m/m de timol sintetizadas a distintos caudales volumétricos (A: 0.5 mL/h; B: 1 mL/h)

micropartículas $1.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$, para un caudal volumétrico de 1 mL/h se obtienen micropartículas de $0.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$. Aunque al aumentar el caudal volumétrico, se podría pensar que el diámetro de las micropartículas obtenidas debería aumentar debido al incremento del polímero aportado al proceso, en este caso se comprobó cómo al aumentar el caudal volumétrico el diámetro de las micropartículas disminuye. De igual forma que para la técnica de *electrospinning*, la técnica de *electrospraying* se ve afectada por

distintos parámetros, entre los que se encuentra el voltaje aplicado a la disolución. Para un caudal volumétrico de 0.5 mL/h es necesario aplicar a la aguja un voltaje de 12.57 kV para obtener un cono de Taylor estable mientras que para un caudal volumétrico de 1 mL/h el voltaje necesario para mantener estable el cono de Taylor es de 14.09 kV. Al igual que ocurre con el proceso de *electrospinning* (explicado en la sección II.3.1), el aumento del voltaje aplicado a una disolución a partir de la que se están obteniendo partículas mediante *electrospraying* hace que las partículas

obtenidas sean de un diámetro menor, así como con una distribución de tamaño más estrecha que en el caso de aplicar un voltaje menor²¹⁴⁻²¹⁶.

III.3.2.Optimización de síntesis de nanofibras de PCL decoradas con micropartículas de PLGA (PCL@PLGA) y micropartículas de PLGA cargadas con timol (PCL@PLGA-TIM) y caracterización morfológica

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la obtención de micropartículas de PLGA-TIM (10 % m/m de timol y caudal volumétrico de disolución de 1 mL/h, que produce micropartículas de $0.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$) se planteó su inclusión en un soporte para poder emplearlas como dispositivos de liberación de timol en apósitos y así obtener unas membranas con un perfil de liberación distinto al ya conseguido en el capítulo anterior ya que, en función del escenario patológico, se necesita un perfil de liberación distinto. El soporte elegido fueron membranas de nanofibras de PCL preparadas mediante *electrospinning* tal y cómo se describe en el capítulo II.

Para ello, en primer lugar, se prepararon las membranas soporte de nanofibras de PCL a partir de una disolución de dicho polímero en una mezcla de DCM y DMF (en relación volumétrica 1:1) a una concentración del 10 % m/m. A partir de la misma, y con las condiciones detalladas en la sección III.2.2, se obtienen membranas con un diámetro de fibra de $484 \pm 83 \text{ nm}$ (Figura III- 5 H), empleando para ello un colector circular de aluminio de 8 cm de diámetro (recubierto con papel de aluminio para facilitar la recuperación de la membrana).

Una vez sintetizadas las membranas, se procedió al *electrospraying* de micropartículas de PLGA-TIM sobre las mismas, en las condiciones determinadas como óptimas en la sección III.3.1. A fin de determinar el tiempo necesario para cubrir toda la membrana, se tomaron muestras a distintos tiempos del proceso para comprobar la estructura mediante imágenes de SEM. Los tiempos ensayados fueron 0.5, 1, 1.5, 2 y 3.5 horas y los resultados obtenidos se ilustran en la Figura III- 5. Se observó cómo, al aumentar progresivamente el tiempo de *electrospraying* sobre la membrana, esta se fue recubriendo gradualmente de micropartículas hasta las 2 horas (imágenes A a D). Sin embargo, el aumento de tiempo de *electrospraying* hasta 3.5 horas no aporta un incremento aparente de la cantidad de micropartículas sobre la superficie de la membrana. Por lo tanto, se fijó el tiempo de *electrospraying* de micropartículas de PLGA-TIM sobre la membrana en 2 horas. Para asegurar una

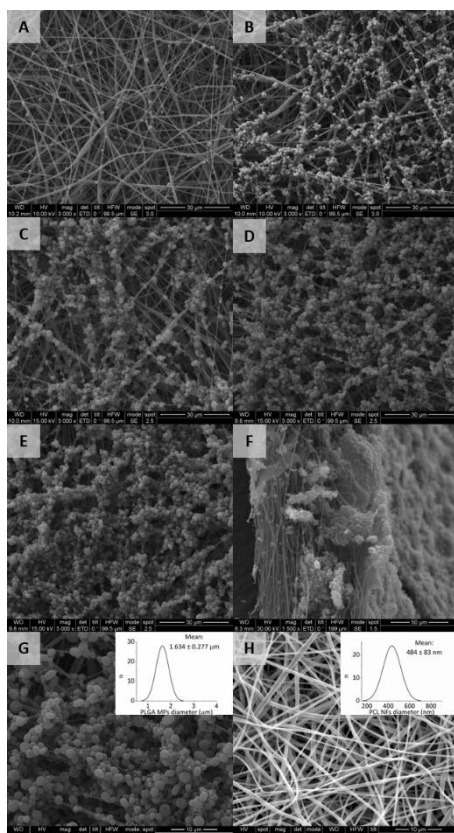


Figura III- 5. Optimización del tiempo de recubrimiento de las membranas. A: 0.5 h; B: 1 h; C: 1.5 h; D: 2 h; E: 3.5 h; F: corte transversal de la membrana final; G: cara superior de la membrana final; H: cara inferior de la membrana final

distribución homogénea de las mismas sobre la superficie, se empleó también el módulo de movimiento en 2D del equipo, para evitar la concentración de micropartículas en una zona.

En las imágenes F y H de la Figura III- 5 se puede observar como en el material final (las membranas de nanofibras de PCL decoradas con micropartículas de PLGA-TIM, PCL@PLGA-TIM) todas las micropartículas se encuentran concentradas en una de las caras de la membrana (imagen G) mientras que en la otra cara no se aprecia la presencia de micropartículas (imagen H) indicando que no ha habido percolación a través de la membrana. En la imagen F se muestra un corte transversal de la misma, en el que se puede observar cómo las micropartículas se concentran en la cara situada a la derecha de la imagen (la cual corresponde a la cara sobre la que se realizó el *electrospraying* de las partículas), mientras que en la parte

izquierda de la misma (la cara inversa) no se encuentra apenas ninguna micropartícula, siendo atribuibles las pocas que se pueden observar a una ocasional transferencia durante la preparación de la muestra para su visualización mediante SEM. Sin embargo, se observó un aumento de diámetro de las micropartículas, desde $0.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$ cuando se sintetizan independientemente hasta $1.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ cuando se sintetizan sobre la membrana de nanofibras. Mientras que durante la optimización de la síntesis de nanopartículas se empleó el colector cubierto con papel de aluminio para llevar a cabo el proceso de *electrospraying*, en el material final el *electrospraying* se lleva a cabo sobre una membrana de PCL. Dicha membrana aísla parcialmente el colector, por lo que el voltaje real en la superficie

de la membrana (dónde se depositan las micropartículas) es menor que el aplicado por la fuente. Esta disminución de voltaje, como ya se ha comentado con anterioridad, puede provocar el aumento del diámetro de las micropartículas^{214–216}, que es el efecto observado.

Además de membranas decoradas con micropartículas cargadas con timol se sintetizaron membranas decoradas con micropartículas de PLGA sin incluir timol (PCL@PLGA) para emplearlas como control de crecimiento positivo en posteriores ensayos microbiológicos y de citotoxicidad. Para ello se emplearon las condiciones detalladas en la sección III.2.1 sustituyendo la disolución de PLGA con timol (10 % m/m de PLGA con un 10 % m/m de timol respecto al polímero) por una disolución de PLGA en DMF a una concentración del 10 % m/m, fijando el caudal volumétrico de la misma en 1 mL/h y fijando el tiempo de *electrospraying* de micropartículas en 2 horas.

En la Figura III- 6 se presentan imágenes de los materiales obtenidos. Como se puede observar, superficialmente se obtuvo una membrana similar a la obtenida para PCL@PLGA-TIM, con las fibras totalmente recubiertas por micropartículas. Sin embargo, se puede observar como el diámetro de las micropartículas se vio afectado, variando desde los 1.64 μm (para las partículas cargadas con timol) hasta $1.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ para las partículas sin cargar. Esta variación en el diámetro de las micropartículas obtenidas se puede explicar de igual forma que la variación obtenida al modificar el caudal de disolución en la sección III.3.1. Mientras que para

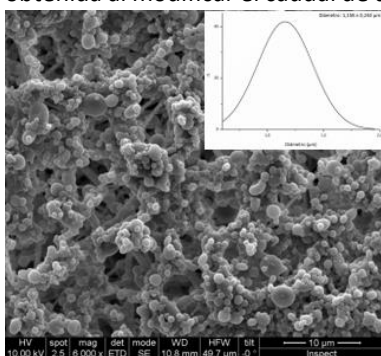


Figura III- 6. Imagen de SEM de una membrana de PCL@PLGA

estabilizar el cono de Taylor generado por una disolución de PLGA 10 % m/m con un 10 % m/m de timol es necesario aplicar a la aguja un voltaje de 14.09 kV (a un caudal volumétrico de 1 mL/h) para estabilizar una disolución del mismo polímero sin timol (al mismo caudal volumétrico) es necesario aplicar a la aguja un voltaje de 15.61 kV, por lo que el mayor voltaje aplicado a la disolución de PLGA sin timol hace que el diámetro de las micropartículas obtenidas disminuya^{214–216}.

III.3.3. Caracterización de las membranas sintetizadas

III.3.3.1. Propiedades mecánicas

Aunque teóricamente durante el proceso de *electrospraying* se evapora el disolvente y las partículas llegan a la superficie del colector en estado sólido, se decidió estudiar las propiedades mecánicas de las membranas preparadas en este capítulo para comprobar que la adición de las micropartículas de PLGA o la inclusión de timol en las mismas no afecta a las características mecánicas de las membranas. Para ello, se realizaron ensayos de tracción a probetas de 50 x 10 mm de membranas de PCL, PCL@PLGA y PCL@PLGA-TIM.

En la Figura III- 7 se presenta el diagrama de los ensayos de tracción realizados. Para las membranas de PCL sin incorporar las micropartículas se obtuvo un valor para la tensión de rotura de 3.6 ± 0.8 MPa produciéndose la rotura a una elongación del 147.4 ± 16.8 %, valores que concuerdan con los reportados en bibliografía²¹⁷. Tras la incorporación de las micropartículas, en las membranas de PCL@PLGA se obtuvo una tensión de rotura de 2.8 ± 0.2 MPa con una elongación del 174.0 ± 12.4 %, valores que así mismo coinciden con los reportados por nuestro grupo previamente para membranas de PCL decoradas con partículas de PLGA²¹⁸. Anteriormente, Aragón y colaboradores emplearon un colector rotatorio para la síntesis simultánea de nanofibras de PCL y micropartículas de PLGA cargadas con rifampicina, obteniendo membranas en las que se combinan nanofibras y micropartículas a lo largo de todo el espesor de las mismas, para obtener “*scaffolds*” que se implanten tras

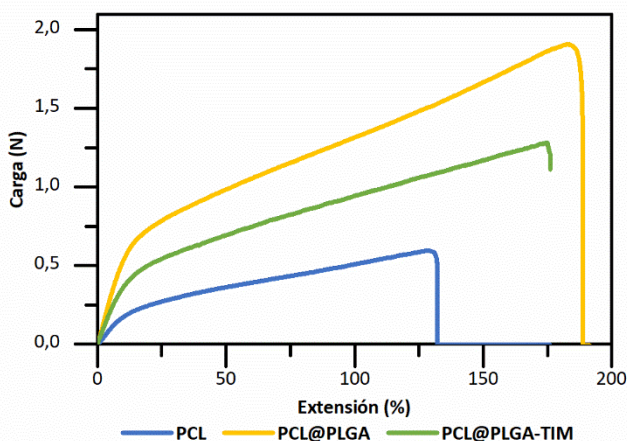


Figura III- 7. Diagrama de ensayos de tracción para las membranas de PCL, PCL@PLGA y PCL@PLGA-TIM

tratamientos ortopédicos como sustitutivos óseos y prevenir así posibles infecciones óseas, por lo que se consideró adecuado el incluir las micropartículas en toda la membrana. En este trabajo, sin embargo, se decidió depositar las micropartículas únicamente sobre una cara de las membranas previamente sintetizadas mediante *electrospinning*, ya que el objetivo principal es obtener apósitos para el tratamiento de heridas y se consideró prioritario el concentrar el antibiótico en la superficie en contacto con la herida. Por tanto, aunque en ambos casos el material es similar (micropartículas de PLGA cargadas con un antibiótico y depositadas en una membrana de nanofibras de PCL) el método de síntesis es totalmente diferente. Sin embargo, a pesar de que emplear dos métodos de síntesis distintos podría alterar las propiedades mecánicas de las membranas obtenidas, los ensayos de tracción realizados demostraron que, en este caso, el método de síntesis empleado no altera dichas propiedades.

La incorporación del timol en las micropartículas apenas varió los resultados obtenidos, ya que las membranas de PCL@PLGA-TIM presentaron una tensión de rotura de 2.7 ± 0.8 MPa y una elongación de rotura del 168.4 ± 0.4 %. Una variación tan pequeña de los parámetros obtenidos tras la incorporación tanto de micropartículas de PLGA como de PLGA-TIM en las membranas indica que el proceso de incorporación de las mismas no afecta a la estructura mecánica de las membranas cuando son sometidas a tracción.

Con estos resultados, aunque se puede observar una reducción en la tensión de rotura en las membranas de PCL@PLGA y PCL@PLGA-TIM respecto a las membranas de PCL, todas ellas presentan unos valores en el rango requerido para su aplicación como apósitos (entre 2 y 16 MPa) y con una elongación de rotura superior al de la piel humana (que se encuentra entre el 70 y el 77 %) ²¹⁹.

III.3.3.2. Composición

Para determinar la cantidad de timol incluida en las membranas se empleó la cromatografía GC-MS. Previo paso a la medida, se trataron las muestras de modo que se eliminó el PLGA de las mismas para evitar interferencias en la medida. El tratamiento con acetonitrilo disuelve el PLGA mientras que la adición de metanol provoca su precipitación, por lo que es posible separarlo de la disolución mediante centrifugación y filtración del sobrenadante.

Se determinó una carga de 1.30 ± 0.16 % m/m de timol respecto a la masa de polímero total. Teniendo en cuenta que el porcentaje teórico de timol incorporado

en las membranas es del 4.94 % m/m respecto al total de polímero, se obtuvo una eficiencia de encapsulación del 23.31 %, un valor inferior que el reportado previamente por otros autores para partículas de PLGA cargadas con timol mediante diferentes técnicas. Por ejemplo, Zhu y colaboradores obtuvieron una eficiencia de encapsulación de timol del 47 % al preparar nanopartículas de PLGA cargadas con este compuesto mediante el método de emulsión-evaporación¹⁷⁷, Rajan y colaboradores consiguieron una eficiencia de encapsulación del 63 % de timol en nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ recubiertas con PLGA preparadas mediante el método de emulsión-evaporación²²⁰ y Moreira y colaboradores alcanzaron una eficiencia de encapsulación de timol del 50-56 % (en función del origen del aceite esencial empleado) en partículas de PLGA sintetizadas mediante un proceso de coacervación²²¹.

Dados los bajos valores de eficiencia de encapsulación obtenidos respecto a valores bibliográficos se analizó si el origen de los mismos se encontraba en una escasa encapsulación del timol en las micropartículas de PLGA o si, por el contrario, el origen estaba en que se incorporara a la membrana un menor porcentaje de micropartículas del teórico. Para ello, se recurrió a la técnica espectroscópica de RMN-¹H como técnica de cuantificación para el PLGA y el timol realizando una recta de calibrado para ambos compuestos y empleando piperonal como patrón interno.

En la Tabla III- 1 se presentan los resultados obtenidos en dichos experimentos. En primer lugar, se pudo comprobar que los datos del porcentaje de timol incluido en las membranas obtenidos mediante GC-MS eran correctos, ya que el porcentaje de dicho compuesto medido mediante RMN-¹H es similar al medido mediante GC-MS (1.30 y 1.20 % m/m mediante GC-MS y RMN-¹H, respectivamente). Por otro lado, para las membranas de PCL@PLGA se obtuvo un porcentaje de PLGA del

Tabla III- 1. Porcentaje de PLGA y timol incorporado en las membranas de PCL@PLGA y PCL@PLGA-TIM

Material	% PLGA (% m/m)		% TIM (% m/m)		
	Teórico	RMN- ¹ H	Teórico	GC-MS	RMN- ¹ H
PCL@PLGA	45.45	11.28 ± 3.39	-	-	-
PCL@PLGA-TIM	43.21	17.46 ± 2.15	4.94	1.30 ± 0.16	1.20 ± 0.41

11.28±3.39 % m/m que, teniendo en cuenta el porcentaje teórico del mismo (45.45 % m/m), indica una eficiencia de incorporación de micropartículas del 24.82 %. Para el caso de las membranas de PCL@PLGA-TIM se obtuvo un 17.46±2.15 % m/m de PLGA y un 1.20±0.41 % m/m de timol que, teniendo en cuenta el porcentaje teórico de ambos (42.31 y 4.94 % m/m para el PLGA y el timol respectivamente), indica que se ha incorporado un 38.76 % del total teórico de micropartículas de PLGA-TIM. Estos valores por debajo del 40 % pueden ser debidos a que, al encontrarse el colector cubierto con una capa de polímero de espesor creciente conforme avanza el tiempo de *electrospraying*, la superficie colectora se vuelve más aislante y las partículas no sean atraídas a la misma con la misma intensidad, depositándose fuera del colector. Este hecho explicaría también en que no se observe un aumento significativo en la cantidad de micropartículas depositadas en la superficie al aumentar del tiempo de 2 a 3.5 horas de *electrospraying* (Figura III- 5 D y E).

En cuanto al porcentaje de timol incluido en las micropartículas de PLGA-TIM, si tenemos en cuenta los datos obtenidos mediante RMN-¹H, las micropartículas depositadas en las membranas contienen un 6.87 % m/m de timol, lo que equivale a una eficiencia de encapsulación de timol del 66.99 %. Este valor es similar al reportado por Rajan²²⁰ y superior a los reportados por Zhu¹⁷⁷ y Moreira²²¹ (63, 47 y 50-56 % respectivamente). En los tres casos, los autores emplean métodos de síntesis con un largo proceso de evaporación al aire del disolvente orgánico que puede provocar la pérdida de timol debido a su alta volatilidad, mientras que mediante la técnica de *electrospraying* el proceso de evaporación del disolvente es mucho más rápido, lo cual es una gran ventaja para la encapsulación de compuestos volátiles.

III.3.3.3. Adhesión de las micropartículas de PLGA-TIM a la membrana de PCL

Para determinar la fortaleza de la unión entre las micropartículas de PLGA-TIM y las nanofibras de la membrana de PCL se diseñó un experimento en el cual las membranas se sumergieron en agua y se les sometió a agitación mecánica y cavitación en un baño de ultrasonidos (a frecuencia de 40 kHz y una potencia constante de 360 W) durante un tiempo de 18 minutos, tomando muestras a distintos tiempos (0, 6, 12 y 18 minutos) para su análisis mediante SEM.

Como se puede observar en la Figura III- 8, las burbujas inducidas por cavitación en el baño no afectan ni a la unión entre las fibras y las micropartículas

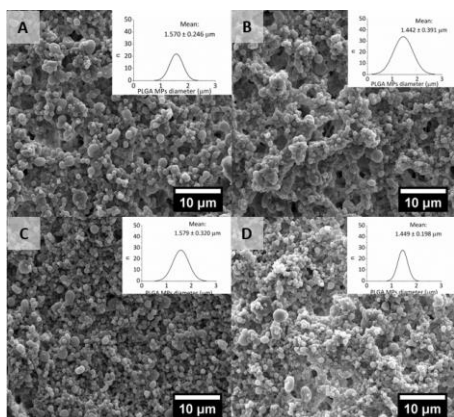


Figura III- 8. Estudio de estabilidad de unión entre nanopartículas de PLGA-TIM y nanofibras de PCL a distintos tiempos (A: 0 min., B: 6 min., C: 12 min. y D: 18 min.)

(no se observa zonas en las que se aprecien las nanofibras sin cubrir o con una menor presencia de micropartículas que en el punto inicial de la imagen A) ni a la morfología propiamente dicha, ya que mantienen un diámetro de en torno a 1.4-1.5 µm en todos los casos. Por ello se concluyó que la interacción entre las fibras y las partículas era fuerte. Esta fortaleza de enlace podría deberse a pequeñas trazas de disolvente presentes en las micropartículas que, al llegar a la superficie de la membrana, interactuaran con el polímero de las

nanofibras, disolviéndolo ligeramente y favoreciendo la adhesión de las micropartículas a las nanofibras. Además, al emplear como método de síntesis el *electrospraying*, el timol se encuentra distribuido por todo el volumen de las mismas, incluyendo la superficie. Como ya se ha comprobado en el capítulo II, entre el timol y la PCL se establecen puentes de hidrógeno que, en el caso de las membranas de PCL@PLGA-TIM puede favorecer la unión entre las nanofibras de PCL y la superficie de las micropartículas formada por una mezcla de PLGA y timol.

III.3.3.4. Determinación del perfil de liberación

Ya que estas membranas se diseñaron para su uso como apósitos con una liberación sostenida del compuesto bactericida (timol) se hizo necesario estudiar el perfil de liberación al medio del mismo. Para ello, se eligió un modelo estático en el cual la membrana se sumerge en un volumen determinado de fluido biológico simulado y se mantiene a 37 °C bajo agitación constante. Durante el experimento se sustituyó la totalidad del fluido por fluido fresco en determinados tiempos para analizar su contenido en timol mediante UPLC.

En la Figura III- 9 se presenta el perfil de liberación de timol desde las membranas de PCL@PLGA-TIM, extendido durante 24 horas. En él se puede observar cómo, tras 24 horas se liberó un 71.07±8.11 % con una liberación muy rápida durante las primeras 3 horas (se libera hasta un 60.12±7.71 % del timol incluido en las membranas) seguido de una liberación más sostenida del mismo

hasta las 24 horas. Aunque se observó una liberación rápida del timol encapsulado, con la encapsulación en PLGA se consiguió retardar la liberación del mismo si se compara con la obtenida para las membranas de PLC-TIM sintetizadas en el capítulo II. Mientras que en las membranas de PCL-TIM no se detectó la liberación del timol más allá de las 8 horas de experimento, en las membranas de PLGA la liberación del compuesto se extendió 3 veces más, hasta las 24 horas. Por otro lado, al comparar el perfil de liberación obtenido para ambos materiales, aunque en ambos casos se obtuvo una liberación muy rápida al inicio del experimento, para las membranas de PCL-TIM este efecto se mantuvo durante los primeros 20 minutos de experimento (en los que se liberó el 5.70 % del timol cargado) en las membranas de PCL@PLGA-

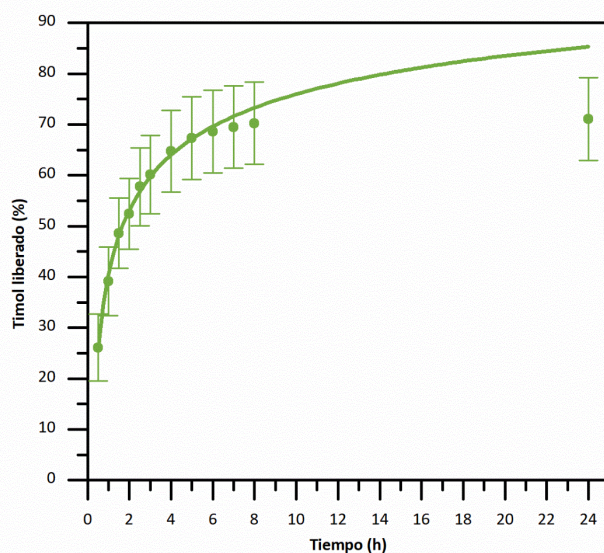


Figura III- 9. Perfil de liberación de timol desde las membranas de PCL@PLGA-TIM

TIM este efecto se extendió hasta 3 horas (en las que se liberó el 60.12 % del timol cargado). Por lo tanto, cambiando el polímero en el que se carga el timol se consiguió modificar el perfil de liberación de las membranas obtenidas, aumentando la cantidad liberada y ralentizando la velocidad de liberación del timol al emplear PLGA en lugar de PCL.

Para estudiar la liberación del timol desde este tipo de membranas se recurrió al ajuste de los datos obtenidos mediante varios modelos matemáticos, encontrando que el modelo que mejor se ajustaba (con coeficiente de regresión lineal, R^2 , de 0.995) a los datos obtenidos es el modelo de Peppas-Sahlin²²², descrito mediante la Ecuación III-1, dónde M_t/M_∞ es la fracción de compuesto liberado a

tiempo t , K_1 es la constante asociada a la liberación por difusión del compuesto a través de la matriz, K_2 es la constante asociada a la liberación de compuesto gracias a los mecanismos de relajación de las cadenas poliméricas y n es un exponente de difusión puramente Fickiano:

$$M_t/M_\infty = K_1 \cdot t^n + K_2 \cdot t^{2n}$$

Ecuación III-1. Ecuación que describe el modelo de liberación de Peppas-Sahlin

Este modelo se puede emplear con cualquier geometría de material, teniendo en cuenta de que solo se puede aplicar hasta un 60 % de compuesto liberado, por lo que en este caso se usó para liberación de compuesto durante las primeras 3 horas. El valor obtenido para el coeficiente n , 0.69, indica un mecanismo de transporte anómalo en el que se combina la difusión del timol a través de las capas externas de la matriz polimérica con la liberación debida a la relajación y erosión de las cadenas poliméricas. Para las constantes de difusión (K_1) y de relajación (K_2) se obtuvieron valores de 48.77 h^{-n} y -9.71 h^{-2n} respectivamente. Aunque la contribución de ambos mecanismos se considera aditiva, al obtener una relación K_1/K_2 en torno a 5 se puede considerar que el mecanismo que controla el proceso de liberación de timol en las membranas de PCL@PLGA-TIM es de difusión Fickiana.

III.3.3.5. Propiedades bactericidas de las membranas de PCL@PLGA-TIM

La inclusión de micropartículas de PLGA-TIM en membranas tiene por objetivo el desarrollar apósitos con propiedades bactericidas por lo que es necesario estudiar dichas propiedades. En este caso, dado que el material bactericida se encuentra concentrado solo en una de las caras de la membrana. Se decidió emplear el ensayo de Susceptibilidad Antimicrobiana en Disco, empleando como modelo bacteriano *S. aureus*.

En dicho ensayo, se evalúa el diámetro del halo de inhibición (área alrededor de la muestra sin crecimiento bacteriano) generado alrededor de cada muestra. Para ello, se ensayaron distintas áreas de membrana de PCL@PLGA-TIM (discos de 12, 14, 18 y 20 mm) empleando como control de crecimiento positivo membranas de PCL y PCL@PLGA para confirmar que el efecto bactericida observado es consecuencia de la inclusión del timol en las muestras y no de un posible efecto bactericida de los polímeros. Para discos de 12, 14 y 18 mm no se observó efecto bactericida en ninguno de los 3 tipos de membranas, mientras que los resultados

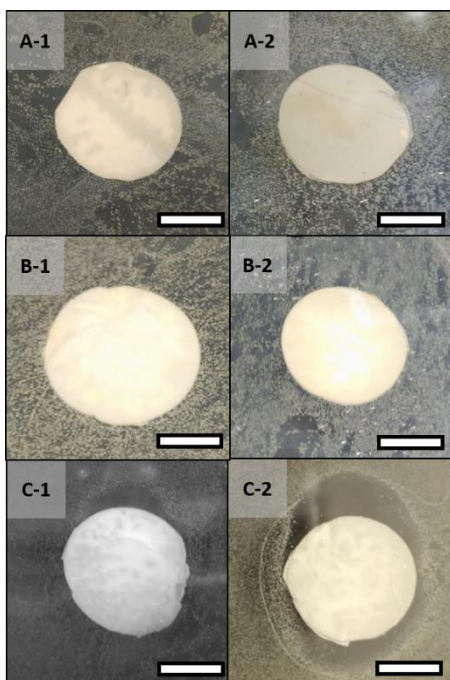


Figura III- 10. Halo de inhibición obtenido para las membranas de PCL (A), PCL@PLGA (B) y PCL@PLGA-TIM (C) a uno (1) y cinco días (2). En todos los casos, el valor de la escala es de 10 mm

obtenidos para discos de 20 mm se muestran en la Figura III- 10. Mientras que en las membranas de PCL y PCL@PLGA no se observa ningún halo de inhibición alrededor de las muestras ni a un día (Figura III- 10 A-1 y B-1) ni a cinco días (Figura III- 10 A-2 y B-2) se puede observar, sin embargo, como para las membranas de PCL@PLGA-TIM sí hay efecto, generándose un halo de inhibición tanto a uno como a cinco días de experimento (Figura III- 10 C-1 y C-2, respectivamente). El diámetro de dicho halo es mayor a los cinco días que al primer día (29.9 ± 0.6 y 24.8 ± 0.2 mm, respectivamente) lo que indica que se produce una liberación de timol a través del agar desde las membranas, haciendo mayor el área afectada por la presencia de timol en el mismo. De acuerdo con la norma ASTM E2149-01²²³, la generación de un halo de

inhibición superior a 1 mm por parte de un material indica que este puede ser considerado un buen agente bactericida, por lo que las membranas de PCL@PLGA-TIM pueden ser consideradas como materiales bactericidas.

Con estos resultados, se obtuvo una masa de 28.9 ± 4.6 mg (masa de un disco de 20 mm de diámetro) de membrana de PCL@PLGA-TIM como la mínima necesaria para tener efecto bactericida frente a una carga bacteriana de *S. aureus* de 10^7 UFC/mL. Teniendo en cuenta la carga de timol y la liberación del mismo, esta masa de membrana contiene 0.38 mg de timol, de los cuales se liberan al medio 0.27 mg tras 24 horas. Si se compara este valor con el obtenido previamente en el grupo de investigación para el timol libre frente a la misma cepa de *S. aureus* (0.3 mg/mL ¹³⁸) se comprueba cómo descende la cantidad necesaria de timol, lo cual puede deberse al efecto del contacto entre el material bactericida y las bacterias, efecto que también se observó para las membranas de PCL-TIM y PCL-CAR preparadas en el capítulo II. Las bacterias tienden a adherirse a las superficies, en especial

superficies rugosas y de carácter hidrofóbico²²⁴, como las nanofibras de PCL. En este caso, la superficie sobre la que se adhiere contiene un biocida por lo que el efecto antimicrobiano se ve aumentado respecto del escenario en el cual las bacterias se encuentran en su forma planctónica.

III.3.3.6. Citotoxicidad in-vitro de las membranas de PCL@PLGA-TIM

Dado su potencial uso como apósitos bactericidas, se consideró necesario estudiar la citotoxicidad de las membranas de PCL@PLGA-TIM (empleando la cantidad bactericida determinada anteriormente, discos de 20 mm) frente a fibroblastos humanos y queratinocitos. Con ello se pretendía demostrar que a la dosis requerida para producir un efecto bactericida no se produciría un efecto citotóxico en células somáticas humanas. Se incluyeron en el estudio las membranas de PCL y PCL@PLGA, así como la concentración liberada de timol desde discos de 20 mm de PCL@PLGA-TIM (0.52 mg/mL) para comprobar el efecto de las membranas sin compuesto bactericida y del compuesto bactericida libre en las distintas líneas celulares.

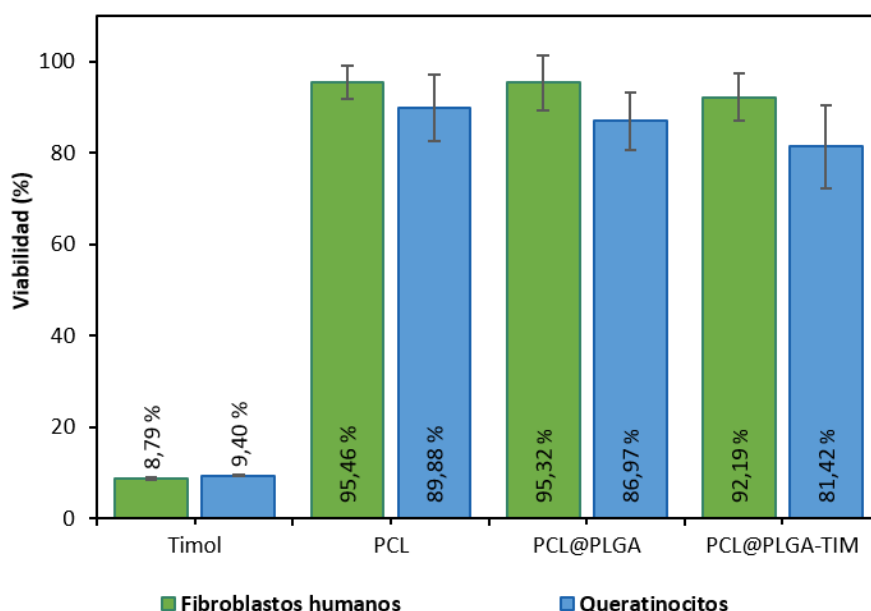


Figura III- 11. Viabilidad de muestras de fibroblastos humanos y queratinocitos en presencia de timol, membranas de PCL, membranas de PCL@PLGA y membranas de PCL@PLGA-TIM

De acuerdo con la norma ISO 10993-5¹⁸⁷, una viabilidad celular de en torno al 70 % es considerada como el umbral para considerar que un material o compuesto no es citotóxico. Como se muestra en la Figura III- 11, ninguna de las membranas ensayadas (para discos de 20 mm de diámetro) es citotóxica frente a ninguna de las dos líneas celulares, ya que en todos los casos se obtienen una viabilidad superior al 80 %. Sin embargo, la concentración teórica de timol liberada al medio provoca un daño celular elevado, con una viabilidad inferior al 10 % en ambas líneas celulares. Dado que, teóricamente, se ha liberado al medio la misma concentración de timol desde las membranas de PCL@PLGA-TIM que la contenida en las muestras de timol, la reducción en la citotoxicidad se puede atribuir a la liberación sostenida de dicho compuesto al medio desde las micropartículas de PLGA-TIM. Por tanto, se puede afirmar que la inclusión de timol en micropartículas de PLGA (y su posterior adhesión en membranas de nanofibras de PCL) no altera la capacidad bactericida del compuesto, pero sí reduce su citotoxicidad, por lo que permite su empleo como apósito con propiedades bactericidas.

III.3.3.7. Estudio microbiológico *in-vivo*

Una vez comprobada la eficacia *in-vitro* de las membranas de PCL@PLGA-TIM frente a *S. aureus* y la ausencia de citotoxicidad en las líneas celulares empleadas anteriormente, en el grupo de investigación se decidió comprobar la eficacia de estas membranas en un modelo de herida infectada en ratón¹⁸. Dado el diámetro de las heridas realizadas en los ratones (8 mm) se emplearon membranas de 12 mm de diámetro, el diámetro máximo que se podía implantar bajo la piel circundante a la herida. Este diámetro de membrana en los ensayos bactericidas *in-vitro* no mostró actividad bactericida, por lo que en el modelo *in-vivo* se decidió superponer varios discos de 12 mm hasta alcanzar la masa bactericida de membrana (28.9 mg) del disco de 20 mm determinado previamente.

Los resultados obtenidos con las heridas de los grupos infectados se muestran en la Figura III- 12-A. En ellos se observar cómo tras una semana de tratamiento con las membranas de PCL@PLGA-TIM y PCL@PLGA la infección se redujo cualitativamente desde un número de colonias incontable (+++) a un alto número de colonias (++) respecto a las heridas infectadas sin tratar. Estos resultados se corroboraron mediante qPCR, técnica mediante la que se confirmó una reducción estadísticamente significativa de la carga bacteriana en las heridas tratadas (Figura III- 12-B). En ninguno de los casos se consiguió eliminar toda la carga bacteriana con los tratamientos empleados, probablemente debido a la alta carga bacteriana inicial

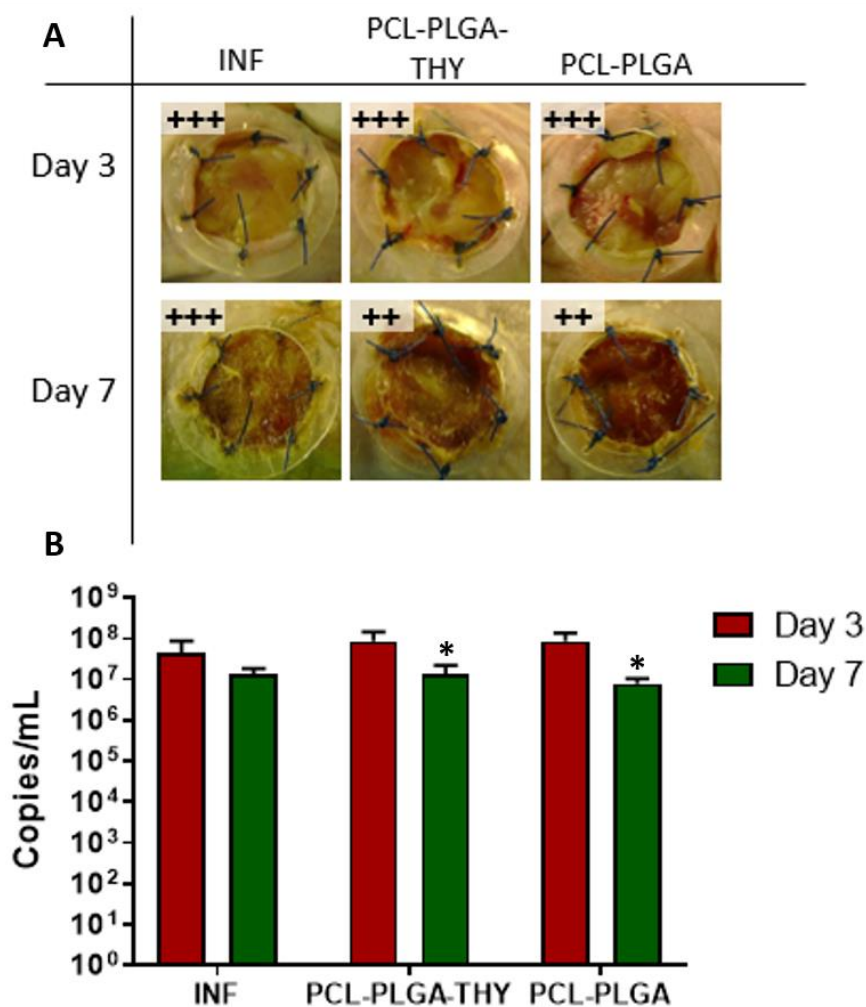


Figura III- 12. Resultados de los ensayos in-vivo. A) Imágenes de las heridas sin tratar (INF), tratadas con membranas de PCL@PLGA-TIM y membranas de PCL@PLGA tras 3 y 7 días de experimento. B) Carga bacteriana obtenida mediante qPCR para los distintos grupos experimentales tras 3 y 7 días de tratamiento. Adaptado de Gámez-Herrera y colaboradores¹⁸

usada experimentalmente (4×10^8 UFC/mL), pero sí se observaron diferencias entre ambos tratamientos, siendo más eficaz el que emplea las membranas cargadas con timol, que redujo la carga bacteriana tras 7 días hasta 10^6 UFC/mL mientras que las membranas de PCL@PLGA sólo redujeron la carga bacteriana hasta 10^7 UFC/mL. Además de una concentración elevada de bacterias al inicio del experimento, la reducción de efectividad de las membranas de PCL@PLGA-TIM puede estar

relacionada con un contacto no eficaz entre las membranas y las bacterias. Cómo ya se ha comprobado en el capítulo II, en este tipo de materiales el contacto entre bacteria y la membrana es fundamental para conseguir la actividad bactericida. Sin embargo, debido al diseño experimental, se tuvo que superponer más de una membrana de un diámetro inferior al obtenido en los ensayos *in-vitro*, lo que hace que no todas las micropartículas bactericidas se encuentren en contacto con los microorganismos, traducándose en una reducción del efecto bactericida. Sin embargo, y a pesar de todo esto, las membranas de PCL@PLGA-TIM demostraron actividad bactericida tanto en ensayos *in-vitro* como en ensayos *in-vivo*.

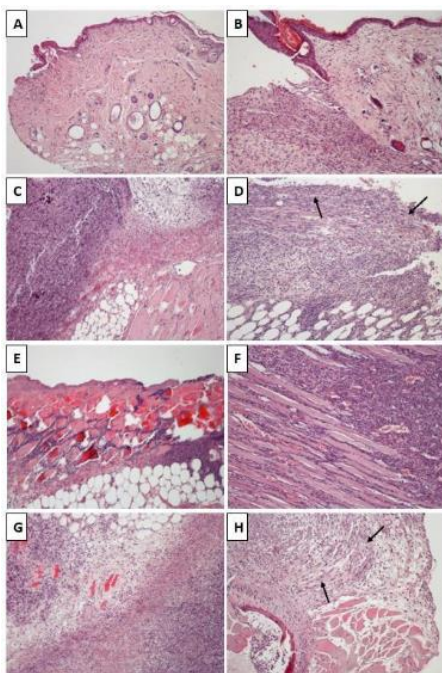
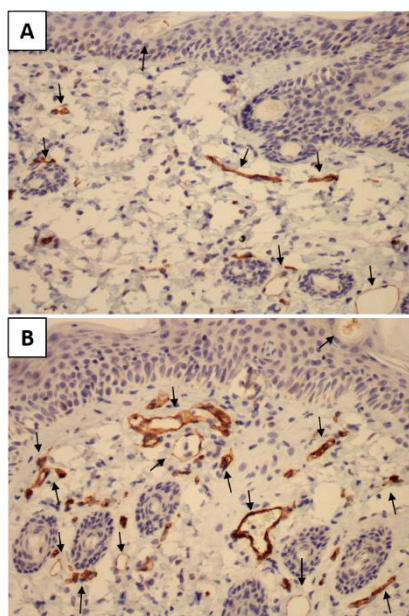


Figura III- 13 Evaluación histopatológica de la infección en las heridas mediante tinción con hematoxilina-eosina (aumento empleado: 10x). Imágenes del grupo control (A y B), grupo infectado (C y D), grupo tratado con PCL@PLGA (E y F) y grupo tratado con PCL@PLGA-TIM (G y H) 3 días (A, C, E y G) y 7 días (B, D, F y H) tras la infección. Adaptado de Gamez-Herrera y colaboradores¹⁸

Adicionalmente, se realizaron estudios histopatológicos de las heridas para analizar el avance de la infección, así como la reparación de los tejidos y la angiogénesis tanto en las heridas infectadas como en las no infectadas. En todos los casos, se pudo observar una intensidad de las lesiones similar 3 y 7 días después de la infección con una severa inflamación que llega a alcanzar el tejido adiposo y las capas musculares de la dermis. En todos los casos, tras 7 días desde la infección se puede observar un alto grado de fibroplasia en los tejidos (indicado mediante flechas en la Figura III- 13), pero, al analizar la formación de vasos sanguíneos mediante una tinción inmunohistoquímica se encontró un mayor número de nuevos vasos alrededor de las heridas tratadas con las membranas de PCL@PLGA-TIM (tejido teñido de marrón e indicado mediante flechas en la Figura III- 14) que en las heridas infectadas en las que no se aplicó ningún tratamiento. Estos resultados sugieren que, además de



controlar la infección de *S. aureus*, el tratamiento con las membranas de PCL@PLGA-TIM favorece la cicatrización de las heridas.

Figura III- 14. Tinción inmunohistoquímica del tejido circundante a la herida del grupo infectado (A) y del grupo tratado con PCL@PLGA-TIM (B) 3 días después de la infección (aumento empleado: 20x).

Adaptado de Gámez-Herrera y colaboradores¹⁸

III.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se sintetizaron micropartículas de PLGA cargadas con un porcentaje teórico de timol del 10 % m/m mediante la técnica de *electrospraying*. Las micropartículas sintetizadas se obtuvieron con un diámetro de 0.7 μm y se incluyeron en una membrana de nanofibras de PCL previamente sintetizada mediante *electrospinning* llevando a cabo el proceso de síntesis de las micropartículas sobre la membrana. Tras dos horas de *electrospraying* se obtuvo una membrana totalmente cubierta de partículas de PLGA-TIM, que no traspasan la membrana. El diámetro de las micropartículas aumentó de 0.7 μm a 1.6 μm debido potencialmente al efecto aislante de la membrana polimérica sobre el colector.

Se estudiaron las propiedades mecánicas de las membranas sintetizadas comprobándose que, aunque la resistencia a la rotura descendía en las membranas de PCL@PLGA-TIM al compararla con las membranas de PCL, los parámetros obtenidos se mantenían en el rango de los requeridos para su empleo como apósitos. Además, se estudió la adhesión de las micropartículas en la membrana, comprobando que la elevada energía mecánica inducida por cavitación en un baño de ultrasonidos no desprendía las micropartículas de la superficie.

El porcentaje de PLGA y timol que componen las membranas se determinó mediante RMN- ^1H , obteniéndose un 17.5 % m/m de PLGA y un 1.2 % m/m de timol lo que supone una eficiencia de incorporación de las micropartículas de PLGA-TIM del 38.8 %.

Se analizó el perfil de liberación del timol desde las membranas de PCL@PLGA-TIM, comprobándose como, aunque durante las primeras 3 horas se libera un 60 % del timol incluido en las mismas, la liberación continúa de forma sostenida hasta las 24 horas. Aunque se siguió observando la liberación de una gran cantidad de timol durante la primera parte del experimento, el perfil de liberación desde las membranas de PCL@PLGA-TIM indicó una liberación más sostenida del compuesto que la obtenida desde las membranas de PCL-TIM. El perfil de liberación se ajustó al modelo de Peppas-Sahlin, cuyos coeficientes indican que el proceso que gobierna la liberación de timol en estas partículas es el de difusión Fickiana.

Se estudiaron las propiedades bactericidas de las membranas de PCL@PLGA-TIM frente a un modelo de bacteria Gram +, obteniéndose un halo de inhibición de 29.9 mm a partir de una membrana de 20 mm de diámetro tras 5 días de ensayo, diámetro muy superior al establecido por la norma ASTM E2149-01 para considerar

bactericida a un material (1 mm). Se comprobó así mismo que el efecto era debido a la presencia de timol en las membranas, ya que membranas de PCL y de PCL@PLGA de 20 mm de diámetro no presentaron halo de inhibición.

Se ensayó la toxicidad de las membranas de PCL@PLGA-TIM frente a dos líneas celulares distintas, a la concentración bactericida determinada anteriormente. Las membranas de PCL@PLGA-TIM no tuvieron efectos citotóxicos en ninguna de las líneas celulares, como tampoco los tuvieron las membranas de PCL y PCL@PLGA empleadas como control. Sin embargo, una concentración equivalente de timol a la liberada al medio tras 24 horas por la masa de PCL@PLGA-TIM ensayada sí tuvo un marcado efecto citotóxico en las líneas celulares estudiadas. Por tanto, la encapsulación de timol en membranas de PCL@PLGA-TIM reduce la citotoxicidad del compuesto sin reducir sus propiedades bactericidas.

Se ensayaron las propiedades bactericidas de las membranas de PLC@PLGA-TIM en un modelo de herida *in-vivo*. Aunque no se consiguió la erradicación de la infección experimentalmente inducida en las heridas debido a la reducción del área de contacto entre las membranas y la herida, si se observó un efecto bactericida de las membranas al reducir en 2 logaritmos decimales la carga bacteriana en comparación con una herida sin tratar. Además, se comprobó histológicamente que en las heridas tratadas con estas membranas durante la curación de la herida se favorece potencialmente la regeneración de los vasos sanguíneos.

CAPÍTULO IV:
NANOFIBRAS DE PCL
DECORADAS CON
NANOPARTÍCULAS DE
SBA-15

IV.1. INTRODUCCIÓN

Como ya se ha visto anteriormente, las matrices nanoestructuradas pueden emplearse como portadores de compuestos con diferentes propiedades terapéuticas. En el capítulo II se ha comprobado cómo, incluyendo compuestos hidrofóbicos en matrices poliméricas nanoestructuradas, se potencia el efecto bactericida de estos compuestos ya que el contacto entre las bacterias y el material antimicrobiano es fundamental para su efectividad debido a la tendencia a formar *biofilms* de estos microorganismos.

El *biofilm* consiste en una agrupación de bacterias inmovilizadas sobre un sustrato y embebidas en una matriz polimérica segregada por los propios microorganismos²²⁵. Dependiendo del organismo que esté formando el *biofilm*, éste puede estar constituido por entre un 10 y un 25 % de células, siendo el porcentaje restante la matriz extracelular segregada por las bacterias. La formación de *biofilms* es altamente beneficiosa para las bacterias, ya que les proporciona protección frente a antibióticos, desinfectantes y ambientes cambiantes^{226–228}. Además, la comunicación inter-celular que se establece permite la rápida modificación del nivel de expresión de determinados genes, lo que les permite variar su fenotipo temporalmente para adaptarse a cambios puntuales de su entorno²²⁹. Por todas estas razones, se calcula que aproximadamente el 99 % de la población bacteriana mundial se encuentra en forma de *biofilm* en diversos estados de crecimiento²³⁰.

La formación de estas agrupaciones constituye un grave problema para los sistemas sanitarios: en forma de *biofilm*, los organismos son menos susceptibles a su tratamiento con antibióticos, y la tendencia al crecimiento sobre superficies hace que colonicen fácilmente todo tipo de implantes médicos (a modo de ejemplo, en su revisión bibliográfica Donlan enumera una serie de dispositivos en los que se han detectado *biofilms*, entre los que incluye catéteres, lentillas, dispositivos intrauterinos y prótesis de articulaciones, entre otros muchos)²²⁴. Numerosos microorganismos son capaces de formar *biofilms*, en esa misma revisión, Donlan cita la identificación de *C. albicans*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pyogenes* entre otros, colonizando diversas prótesis implantadas en humanos. Por otro lado, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. pyogenes* son los principales patógenos presentes en heridas²³¹.

Tanto en el mecanismo de formación de *biofilm* propuesto por Characklis y Marshal como en el propuesto por Fletcher (recogidos por Garret y colaboradores en su artículo de revisión bibliográfica²³⁰) las etapas iniciales implican la adhesión

de un número suficiente de bacterias a una superficie que permita el crecimiento de las mismas. En este paso, las características de la superficie son fundamentales para la formación del *biofilm*, creciendo en general más rápidamente sobre superficies rugosas e hidrófobas^{224,232–234}.

Como ya se ha comprobado en el capítulo II, el contacto entre las fibras de PCL cargadas con compuestos bactericidas y la bacteria es imprescindible para su acción bactericida: debido a la hidrofobicidad del polímero, las bacterias tienden a depositarse sobre el mismo, lo que permite un acceso más fácil al compuesto bactericida y su posterior acción. Sin embargo, aunque hay una rápida liberación al medio de la fracción más externa del compuesto bactericida, el compuesto que se encuentra dentro de las fibras se libera muy lentamente debido a la velocidad de degradación de la PCL (del orden de meses, tanto en ensayos *in vitro* como en ensayos *in vivo*¹⁸²). Tratando de solventar este problema, se plantea la carga de compuestos bactericidas en materiales que aporten un perfil de liberación sostenido en el tiempo para aplicaciones que así lo requieran, como puede ser el tratamiento de heridas crónicas.

Aunque los materiales basados en sílice mesoporosa han sido tradicionalmente empleados en otras aplicaciones como catálisis o sensado, durante las últimas dos décadas se ha investigado acerca de su potencial uso como sistemas de liberación de fármacos^{235–238}. Estos materiales están caracterizados por su tamaño de poro (entre 2 y 50 nm con una distribución de tamaños muy estrecha), su elevada superficie específica (ca. 1000 m²/g), su elevado volumen de poro (ca. 1 cm³/g) y su tamaño controlado (en forma de nanopartículas de entre 50 y 300 nm)^{239,240}. Los materiales de esta familia, aunque no biodegradables, son biocompatibles, presentan una baja toxicidad y pueden ser modificados (tamaño de poro y grupos funcionales presentes en su superficie) con relativa facilidad mediante silanización, por lo que son ideales como sistemas de liberación controlada²⁴¹.

IV.1.1. SBA-15 como sistema de liberación de fármacos

De los distintos materiales basados en sílice mesoporosa, la SBA-15 (que pertenece a uno de los grupos más importantes de estos materiales, *Santa Barbara Amorphous type material*) posee una estructura bidimensional hexagonal, unos poros relativamente grandes (de entre 5-30 nm) y su superficie está constituida por grupos silanol (-Si-OH) que facilitan su interacción con diversos compuestos mediante la formación de enlaces por puentes de hidrógeno.

El alojamiento en sus poros de moléculas de distintos tamaños (siempre en el rango del tamaño de los poros de la partícula) tiene también un efecto “protector” sobre dichas moléculas. En su revisión bibliográfica, Qian y colaboradores exponen cómo se ve reducida la movilidad de una molécula relativamente simple (el naftaleno) según esté o no incluida en poros de SBA-15²⁴². Para moléculas más complejas, como la indometacina (un anti-inflamatorio no esteroideo), Limnell y colaboradores comprobaron el efecto protector de las partículas sobre el fármaco, comprobando cómo, tras 3 meses almacenadas en condiciones de alta temperatura y humedad, el fármaco cargado en las partículas de SBA-15 mantenía su estabilidad²⁴³. Posteriormente, Wang y colaboradores estudiaron más a fondo el efecto protector de las partículas sobre la indometacina. En su forma amorfa, este fármaco presenta una mayor solubilidad en agua que en su forma cristalina, lo que potencia su efecto farmacológico. Sin embargo, de forma espontánea pasa de estado amorfo a cristalino. Sin embargo, estos investigadores comprobaron cómo, tras tres meses en condiciones de alta temperatura y humedad, la indometacina incluida dentro de las partículas de SBA-15 mantenía su estado amorfo mientras que la indometacina libre, en las mismas condiciones, pasaba a su forma cristalina. La explicación dada por los autores para estos resultados está en línea con la reducción de la movilidad del naftaleno, ya que la no-recristalización de la indometacina se debe al confinamiento de la molécula en los poros y la reducción en la movilidad de la misma²⁴⁴. Finalmente, este tipo de partículas también se han empleado para la protección de moléculas de mayor tamaño, como las proteínas. Siefker y colaboradores reseñan diversas investigaciones de este efecto sobre mioglobina, comprobando cómo esta proteína mantiene su actividad incluso fuera de su rango óptimo de pH cuando se encuentra adsorbida sobre SBA-15²⁴⁵.

Otra de las razones por la que estas partículas se emplean como sistemas de liberación de fármacos es el incremento de la solubilidad de los mismos que se observa tras cargarlos en las partículas. Así pues, en partículas de SBA-15 se han encapsulado una amplia variedad de fármacos como antiinflamatorios (celecoxib²³⁸ e indometacina²⁴²), vasodilatadores (papaverina²⁴⁶), psicoactivos (cafeína²⁴⁷), fármacos para trastornos estomacales (atenolol²⁴⁸, fenofibrato²⁴⁹, furosemida²⁵⁰ y nimodipina²⁵¹), proteínas (insulina²⁵²) y fungicidas (itraconazol²⁵³).

Además, la facilidad para modificar la superficie de este tipo de partículas²³⁵ permite ampliar la variedad de grupos funcionales con los que puede interactuar el fármaco, pudiéndose así modificar tanto la carga como la liberación del mismo. Kamarudin y colaboradores compararon las características de nanopartículas de

sílice sin modificar con las de nanopartículas de sílice con distintos porcentajes de aluminio, cargadas todas con ibuprofeno²³⁷. En su investigación describen cómo el aumento del porcentaje de metal en las nanopartículas reduce la capacidad de carga de ibuprofeno de las mismas, a la vez que hace que la liberación del mismo al medio sea más lenta. Con el fin de ralentizar la liberación de distintos tipos de fármacos como naproxeno²⁵⁴ y keftofreno²⁵⁵ (antiinflamatorios), captoril y aliskiren²⁵⁶ (para trastornos estomacales) o amoxicilina²⁵⁷, cefalexina²⁵⁸ y tetraciclina²⁵⁹ (antibióticos), se ha modificado con grupos amino la superficie de las nanopartículas, consiguiendo una liberación de los mismos más lenta que en partículas de SBA-15 sin modificar. Además de estas dos modificaciones, también se ha funcionalizado la superficie de nanopartículas de SBA-15 buscando un distinto perfil de liberación con grupos sulfonato (liberación de metropolol²⁶⁰ y cefalexina²⁵⁸), grupos ácidos (liberación de sufadiazina²⁶¹) y grupos tiol (liberación de amoxicilina²⁵⁷) así como desactivando los grupos silanol terminales para controlar la liberación de amoxicilina²⁵⁷.

IV.1.2. Encapsulación de compuestos obtenidos de aceites esenciales en nanopartículas de SBA-15

De todas las aplicaciones farmacéuticas mencionadas anteriormente, este capítulo se centra en aplicaciones bactericidas y antibióticas. Los ejemplos mencionados anteriormente, son sólo una pequeña muestra de la gran cantidad de antibióticos que se han incluido dentro de nanopartículas de SBA-15. Todos estos ejemplos están referidos a antibióticos usados tradicionalmente. Sin embargo, siguiendo la línea de investigación desarrollada a lo largo de todo este trabajo, se prefiere el empleo de compuestos obtenidos de aceites esenciales por todas las razones expuestas con anterioridad.

A este respecto, son pocos los trabajos publicados relacionados con la carga de aceites esenciales (o compuestos purificados a partir de ellos) en materiales de sílice. Jobdeedamrong y colaboradores describen la encapsulación de varios aceites esenciales (de canela, clavo, pimienta y tomillo) en nano-contenedores porosos de sílice (con un diámetro hidrodinámico tras la encapsulación de entre 65 y 146 nm). La encapsulación de estos aceites estabiliza la estructura *core-shell* de los nano-contenedores y la posterior funcionalización con ácido hialurónico hace que la liberación de los aceites sea más lenta²⁶². Belostozky y colaboradores, por su parte describen la síntesis de micro-esferas huecas de sílice en las que encapsulan aceite de jojoba para facilitar su empleo en cosmética ya que la encapsulación aporta una

formulación hidrofílica del aceite. Las micro-esferas tienen un diámetro de 2.5 μm , cargan un 10 % de aceite y no tienen efectos citotóxicos en queratinocitos (a una concentración de 0.1 mg/mL)²⁶³. Por otro lado, Ribes, Peña-Gómez y colaboradores describen en varios artículos la síntesis de micropartículas de MCM-41 en las que inmovilizan eugenol, timol y vainillina, mediante un enlace covalente entre los grupos silanol de las partículas y el aldehído derivado de estos compuestos. Los autores proponen estas micropartículas para su uso como conservante alimenticio y como agente filtrante para la conservación de zumos debido a sus propiedades bactericidas frente a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *E. coli*, *Penicillium expansum*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces rouxii*^{264–266}.

Para el caso específico de las nanopartículas de SBA-15, los antecedentes bibliográficos también son pocos. Janković-Tomašić y colaboradores describen la diferente actividad de la emodina comparando el caso de estar o no cargada en nanopartículas de SBA-15²⁶⁷. La emodina es una antraquinona metabolito secundario presente en 17 familias de plantas. Este compuesto tiene numerosas propiedades biológicas, entre las que se incluyen propiedades bactericidas, fungicidas, inmunosupresoras, hepatoprotectoras y anti-cancerígenas²⁶⁸. En concreto, en dicho estudio se centran en las propiedades antioxidantes del compuesto, demostrando como únicamente en el caso de las nanopartículas cargadas con emodina se produce un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes ensayadas. Según los autores, la emodina tiene una baja biodisponibilidad *in vivo*, ya que a la pobre absorción intestinal de esta molécula se suma una rápida eliminación vía gluconoración debido a los grupos funcionales que porta (hidroxilo y metilo). Sin embargo, cuando se encuentra cargada en las partículas, estas protegen la molécula de la interacción con las enzimas responsables de la gluconoración, aumentando así su biodisponibilidad.

Finalmente, Wu y colaboradores²⁶⁹ reportan la carga de curcumina en nanopartículas de SBA-15 y su posterior inclusión en membranas de quitosano preparadas mediante la técnica de *casting*. La curcumina es un polifenol presente en los rizomas de la planta de cúrcuma que posee unas interesantes propiedades antioxidantes y bactericidas. En concreto, estos autores se centran en sus propiedades bactericidas comparando unas membranas compuestas por quitosano y curcumina con el mismo tipo de membranas en las cuales la curcumina se encuentra cargada en nanopartículas de SBA-15. Ambos compuestos poseen actividad bactericida frente a *S. aureus* y *E. coli*, siendo más efectivo el material compuesto de quitosano y curcumina que el que incorpora la curcumina cargada en

nanopartículas de SBA-15. Los autores atribuyen esta diferencia en la actividad bactericida de ambos materiales a la distinta liberación de la curcumina desde los compuestos, ya que se libera más lentamente cuando se encuentra cargada en las partículas de SBA-15 que cuando se encuentra cargada en la matriz polimérica.

Con todos estos datos previos, en este capítulo se plantea la carga de un compuesto de origen natural con propiedades bactericidas, el timol, por primera vez en nanopartículas sin modificar de SBA-15 para obtener un material con una liberación más sostenida que la que la obtenida previamente al incluir timol en nanofibras de PCL. Además, se plantea la incorporación de dichas nanopartículas (con un tamaño compatible con el diámetro de las fibras) en membranas de PCL, para poder usar estas membranas como apósitos para la prevención y eliminación de infecciones en heridas.

IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1. Síntesis de nanopartículas de SBA-15 cargadas con timol (SBA-TIM)

Para la síntesis de las nanopartículas de SBA-15 se empleó el proceso de síntesis hidrotermal descrito por Johansson y colaboradores²⁷⁰. Para la formación del gel, se disolvieron 1.2 g de Pluronic® P-123 y 14 mg de fluoruro de amonio en 40 mL de ácido clorhídrico (1.75 M). La mezcla se mantuvo en un baño a 20 °C y agitando a 1200 rpm hasta la completa disolución del polímero. Independientemente, se mezclaron 8.5 mL de heptano con 3.25 mL de tetraetil ortosilicato y la mezcla se añadió a la disolución de polímero. Para completar la formación del gel, la disolución resultante se mantuvo bajo agitación vigorosa durante 4 minutos. Una vez formado el gel, éste se transfirió a un autoclave para someterlo a un proceso de síntesis hidrotermal a 100 °C durante 24 horas. Tras este proceso, la muestra se filtró y se lavó con agua destilada, previo paso a un proceso de calcinación a 550 °C durante 5 horas para la eliminación del surfactante presente en el interior de los poros de las nanopartículas.

Para la carga de las nanopartículas de SBA-15 sintetizadas con timol (SBA-TIM NPs) se empleó un proceso de impregnación²⁷¹ previamente optimizado en el grupo de investigación. Para ello, se secaron 100 mg de SBA-15 a 100 °C durante toda una noche para eliminar el agua adsorbida en los poros. Posteriormente, se añadieron 2.3 mL de una disolución de timol en acetato de etilo (322 mg/mL) a las nanopartículas y la suspensión se mantuvo en agitación moderada (350 rpm) durante una hora. Transcurrido este tiempo, la suspensión se filtró a través de un filtro de celulosa (diámetro de poro: 0.45 µm) y las nanopartículas se lavaron con agua destilada. Finalmente, las nanopartículas se mantuvieron 24 horas a 37 °C para eliminar los posibles restos de disolvente antes de su uso.

IV.2.2. Optimización de síntesis de nanofibras de PCL decoradas con nanopartículas de SBA-15 (PCL@SBA-15)

IV.2.2.1. Electrospinning y electrospraying simultáneos

Para la síntesis de PCL@SBA-15 mediante *electrospinning* y *electrospraying* simultáneo, se prepararon dos disoluciones independientes. Para *electrospinning* de nanofibras se empleó una disolución de PCL (10 % m/m) en una mezcla de DCM

y DMF (en relación volumétrica 1:1). Para la incorporación de las nanopartículas mediante *electrospraying* se preparó una suspensión de 10 mg/mL de las mismas en una mezcla de agua y DMF (1:1). Para la alcanzar una suspensión homogénea, la mezcla se mantuvo en agitación durante una hora y se sonicó durante 30 minutos antes de su empleo.

Para la síntesis de PCL@SBA-15 mediante este procedimiento se empleó un colector rotatorio de varillas (cubierto con papel de aluminio para poder separar fácilmente la capa depositada obtenida) con la velocidad de rotación fija a 200 rpm así como dos agujas independientes para ambas disoluciones. Ambas agujas se situaron a 18 cm de la superficie del colector y el voltaje del colector se mantuvo constante a -4 kV, variando el voltaje aplicado a las agujas entre +8.00 y +9.85 kV para la obtención de un cono de Taylor estable. El caudal volumétrico de la disolución de polímero se mantuvo constante a 1 mL/h mientras que el caudal volumétrico de la suspensión de nanopartículas se incrementó entre 2 y 4 mL/h con la intención de aumentar el porcentaje de las mismas incorporado en el material. En todos los casos, el proceso se desarrolló a temperatura de laboratorio y a una humedad relativa de entre 25 y 50 %.

IV.2.2.2. Electrospraying de nanopartículas sobre nanofibras de PCL preformadas

Para la síntesis de PCL@SBA-15 mediante *electrospraying* de SBA-15 NPs sobre nanofibras de PCL preformadas se emplearon las mismas disoluciones que en el apartado IV.2.2.1 mientras que el colector empleado en este caso fue un colector plano de aluminio de 8 cm diámetro (cubierto con papel de aluminio).

En un primer paso, se sintetizó la membrana de PCL a partir de la disolución de polímero, con un caudal volumétrico de 1 mL/h, con una distancia entre aguja y colector de 18 cm y unos voltajes de -4 kV para el colector y entre +7.05 y +9.22 kV para la aguja. Una vez preparada la membrana soporte, se incorporaron las nanopartículas de SBA-15 sobre la misma mediante *electrospraying*. Para ello se empleó un caudal volumétrico de disolución de 2 mL/h, y se aplicó un voltaje de -4 kV al colector y de entre +11.30 y +12.29 kV a la aguja, separada 18 cm del colector. Como en el caso anterior, el proceso se llevó a cabo a temperatura de laboratorio y a una humedad relativa entre el 25 y el 35 %.

IV.2.2.3. Electrospinning de nanofibras tipo core-shell de PCL decoradas con nanopartículas de SBA-15

Para la síntesis del núcleo (*core*) de este tipo de nanofibras se empleó una disolución de PCL mientras que para el recubrimiento (*shell*) se preparó una suspensión de nanopartículas en una disolución de PCL. La concentración de nanopartículas se fijó en 20 mg/mL y se emplearon dos concentraciones distintas de polímero: 5 y 10 % m/m. Para todas las disoluciones el disolvente empleado fue una mezcla de DCM y DMF en relación volumétrica 1:1.

Para la síntesis de estos materiales, se empleó un colector plano de aluminio de 8 cm de diámetro recubierto con papel de aluminio, mientras que el caudal volumétrico empleado para cada una de las disoluciones se varió según se especifica en la Tabla IV- 1. En todos los casos, el voltaje del colector se fijó en -4 kV mientras que el voltaje aplicado a la aguja varió entre +8.57 y +10.67 kV, buscando obtener un cono de Taylor estable. Como en los casos anteriores, la síntesis se llevó a cabo a temperatura de laboratorio y con entre el 25 y el 40 % de humedad relativa.

Tabla IV- 1 Condiciones experimentales empleadas para la síntesis de NFs core-shell de PCL decoradas con NPs de SBA-15

Material	Core		Shell		
	% PCL (%m/m)	Caudal volumétrico (mL/h)	% PCL (% m/m)	Caudal volumétrico (mL/h)	% SBA-15 (mg/mL)
PCL0.5@PCL5-SBA1.0	10	0.5	5	1.0	20
PCL0.5@PCL5-SBA1.5	10	0.5	5	1.5	20
PCL1.0@PCL5-SBA1.0	10	1.0	5	1.0	20
PCL0.5@PCL10-SBA1.0	10	0.5	10	0.5	20

IV.2.3. Caracterización

IV.2.3.1. Composición

Para determinar la estructura interna de las nanopartículas sintetizadas se empleó la difracción de rayos X (XRD) de ángulo bajo, así como la adsorción isoterma de nitrógeno y la medida del área superficial BET. Para la obtención de los patrones de XRD se utilizó la radiación Cu-K α y se trabajó a un voltaje de 45 kV y una intensidad de corriente de 40 mA, analizando las muestras entre 0.5 y 8°, con un tamaño de paso de 0.01°. Las isotermas de adsorción de nitrógeno se obtuvieron a -195.8 °C, con las muestras desgasificadas a 200 °C (40 °C en el caso de las muestras con timol, para evitar la descomposición del mismo) durante 8 h antes de la medida. A partir de estos datos se determinó la distribución del tamaño de poro empleando el método BJH (Barrett, Joyner y Halenda). La medida del área superficial BET se llevó a cabo a una presión relativa de 0.05-0.20, calculando el volumen de poro para $P_0/P = 0.96$.

Para comprobar la presencia de timol en las nanopartículas sintetizadas, se empleó la espectroscopía ATR-FTIR, obteniendo los espectros como media de 40 escaneos con una resolución de 4 cm⁻¹ en el rango entre 4000 y 600 cm⁻¹.

Para determinar el porcentaje de timol y la cantidad de nanopartículas incluidas en los materiales sintetizados se llevó a cabo un análisis termogravimétrico (TGA). Las muestras (aproximadamente 5 mg de las mismas depositadas en un crisol de sílice) se analizaron en una atmósfera oxidante (aire a un flujo de 50 mL/min) con una rampa de temperatura entre 40 y 600 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

IV.2.3.2. Morfología

Para la caracterización morfológica de las nanopartículas y los materiales sintetizados en este capítulo se empleó tanto la microscopía electrónica de transmisión (TEM) como la microscopía SEM. Para la caracterización mediante TEM de las nanopartículas, se depositaron 25 μ L de una suspensión en agua de las mismas sobre una rejilla de cobre con recubrimiento de carbono y se dejó secar antes de la medida. Para la caracterización mediante TEM de las nanofibras, se depositaron sobre una rejilla de cobre con recubrimiento de carbono durante la producción de las mismas. Para la caracterización mediante SEM, las muestras se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en el anexo A.2.2.

IV.2.3.3. Determinación del perfil de liberación

Para la determinación del perfil de liberación de timol desde las nanopartículas y las membranas sintetizadas en este capítulo se empleó un modelo estático. Para el caso de las nanopartículas de SBA-TIM, se incubaron 15 mg de las mismas en 14 mL de fluido biológico simulado (PBS con un 2 % m/v de Tween 80), empleando un dispositivo de diálisis Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Device para poder sustituir el fluido sin tener que centrifugar las nanopartículas. Para el caso de las membranas se incubaron 75 mg de PCL@SBA-TIM en 10 mL de fluido biológico simulado. Ambos tipos de muestra se mantuvieron bajo agitación constante a 37 °C, manteniéndose estas condiciones hasta 15 días y reemplazando la totalidad del fluido a tiempos determinados para su posterior análisis mediante cromatografía UPLC (anexo A.2.5).

IV.2.3.4. Propiedades bactericidas

IV.2.3.4.1. Determinación de MIC y MBC

Para determinar las propiedades bactericidas de los materiales sintetizados en este capítulo, se empleó una modificación de la norma ASTM-E-2180 descrita en el anexo A.3.1. Como modelo bacteriano se empleó la bacteria *S. aureus* (ATCC 25923) a la cual se enfrentaron concentraciones crecientes de membranas (previamente esterilizadas durante 30 minutos por cada cara bajo luz ultravioleta) hasta obtener tanto la MIC como la MBC.

IV.2.3.4.2. Influencia del contacto

Para evaluar la influencia del contacto entre la membrana y la bacteria en la capacidad bactericida de la primera, se analizaron los compuestos liberados de la membrana a diferentes tiempos siguiendo el protocolo descrito en el anexo A.3.2. Para este ensayo se emplearon concentraciones que permitían alcanzar la MBC, incubando el material en TSB estéril durante 1, 3, 5, 7, 10 y 14 días para después ensayar por separado la capacidad bactericida de la membrana y del exudado.

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.3.1. Caracterización de nanopartículas de SBA-15 y nanopartículas de SBA-15 cargadas con timol (SBA-TIM)

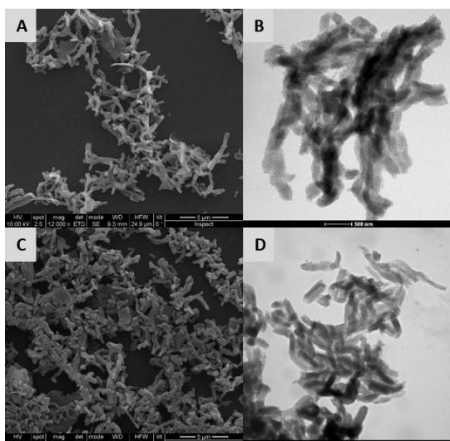


Figura IV- 1. Imágenes de SEM y TEM de NPs de SBA-15 (A y B) y SBA-TIM (C y D)

Empleando la síntesis hidrotermal descrita en la sección 2.1 se obtuvieron nanopartículas de SBA-15 con forma de bastón y con canales paralelos ordenados a lo largo del eje longitudinal de la nanopartícula, tal y como se puede apreciar en las imágenes de SEM (A) y TEM (B) de la Figura IV- 1. Las dimensiones de las nanopartículas son 138 ± 30 nm de diámetro y 563 ± 100 nm de longitud, valores que no se vieron afectados tras incluir en las mismas timol mediante el método de impregnación, tal y como se

puede comprobar en las imágenes de SEM (C) y TEM (D) de la Figura IV- 1.

A partir de los patrones de difracción de rayos X de ángulo bajo (Figura IV- 2), se encontraron 3 picos bien resueltos asignados a los planos de difracción (100), (110) y (200), característicos, según la bibliografía²⁷², de los materiales mesoporosos basados en SBA-15. El primer pico es

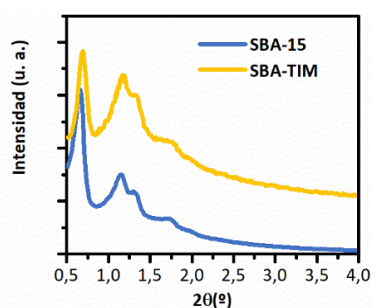


Figura IV- 2. Patrón de difracción de rayos X de ángulo bajo de NPs de SBA-15 y NPs de SBA-TIM

característico de mesoporos hexagonales, mientras que los otros dos picos de menor intensidad son característicos de los mesoporos altamente ordenados. La incorporación de timol no afecta significativamente a esta estructura, aunque la presencia de este compuesto desplaza los picos a valores menores de 2θ , lo que puede estar relacionado con una disminución en el tamaño de los mesoporos tras el llenado de los mismos²⁷³.

La reducción en el tamaño de poro se comprobó mediante medidas de adsorción de nitrógeno. Las nanopartículas de SBA-15 presentaron un diámetro de poro con la distribución centrada en 10.5 nm mientras que las nanopartículas de SBA-TIM presentaron la distribución centrada en 9 nm. Sin embargo, tras la incorporación del timol en las nanopartículas, el volumen de poro disminuyó desde 1.50 cm³/g en las nanopartículas de SBA-15 hasta 0.05 cm³/g en las nanopartículas de SBA-TIM, lo que puede indicar el llenado de los mesoporos con timol. Además del tamaño de poro, el área superficial también disminuyó drásticamente tras la incorporación del timol (de 66.17 m²/g para las nanopartículas de SBA-15 a 7.3 m²/g para las nanopartículas de SBA-TIM), probablemente debido a la presencia del compuesto tanto en los mesoporos como en los canales externos de las nanopartículas.

La presencia del timol se confirmó mediante espectroscopía FTIR (Figura IV- 3). En el espectro obtenido para las nanopartículas de SBA-15 se observaron dos picos a 1100 y 800 cm⁻¹, característicos de la vibración de estiramiento asimétrico y simétrico de los enlaces Si-O-Si, así como un pico a 960 cm⁻¹ característico de la vibración del enlace Si-OH. En las nanopartículas de SBA-TIM, además de los picos anteriores, se identificaron varios picos característicos del timol, como por ejemplo la vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo aromáticos a 1250 y 1255 cm⁻¹, la vibración de estiramiento fuera del plano de los enlaces C-H (entre 900 y 650 cm⁻¹) o la vibración de estiramiento de los enlaces aromáticos C=C (800 cm⁻¹), valores

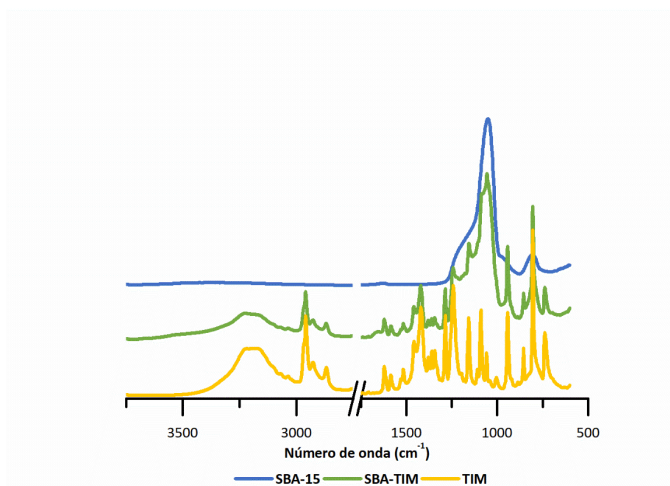


Figura IV- 3. Espectros de FTIR de timol, NPs de SBA-TIM y NPs de SBA-15

todos ellos que concuerdan con los reportados previamente en bibliografía para este tipo de compuestos²⁷⁴.

La carga de timol en las nanopartículas de SBA-TIM se comprobó también a partir de las curvas de degradación de TGA (Figura IV- 4). Mientras que para las nanopartículas de SBA-15 no se observa ninguna degradación en el intervalo entre 50 y 600 °C en las nanopartículas de SBA-TIM se observa una pérdida de masa entre 50 y 220 °C, que puede ser atribuida a la descomposición del timol localizado en mesoporos y superficie de las nanopartículas. Para el timol, esta descomposición se produce en un rango más estrecho de temperaturas, entre 50 y 140 °C, lo que podría indicar que el soporte de las nanopartículas otorga una mayor estabilidad térmica al timol. A partir de las curvas de TGA también se determinó la carga de timol en las nanopartículas, comprobando que en las nanopartículas de SBA-TIM se incluyó un 70.79 ± 5.21 % m/m de timol, lo que implica una eficiencia de encapsulación del 80.3 %. La carga tan alta obtenida se atribuyó al exceso de timol empleado en la impregnación (5 veces más que el volumen teórico de los mesoporos), lo que hace que el compuesto se incluya tanto en los mesoporos como en los canales externos de las nanopartículas.

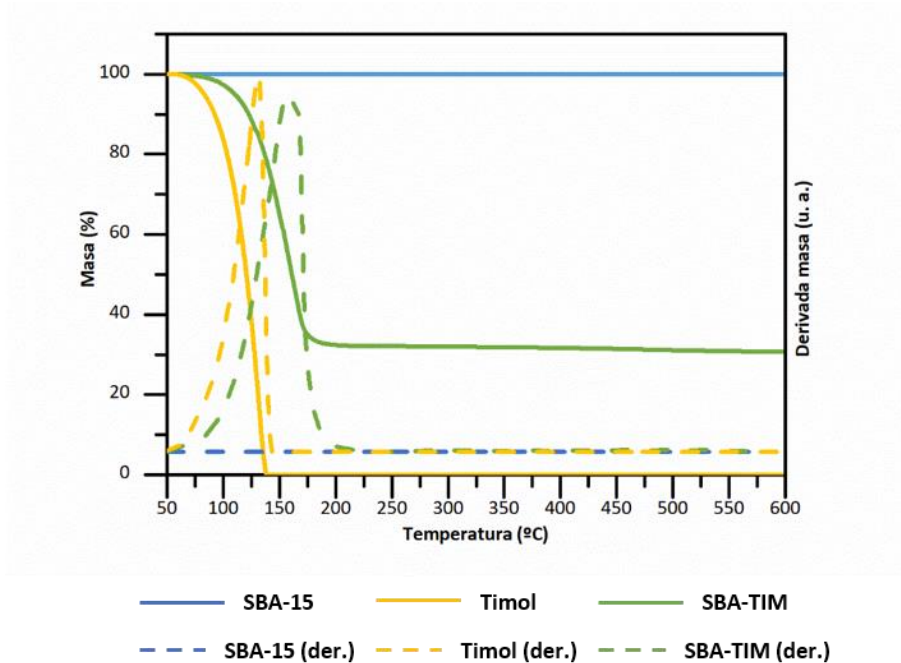


Figura IV- 4. Termograma y derivada del termograma de timol, NPs de SBA-15 y NPs de SBA-TIM

IV.3.2. Optimización de síntesis de nanofibras de PCL decoradas con nanopartículas de SBA-15 (PCL@SBA-15)

IV.3.2.1. Electrospinning de NFs de PCL combinado con electrospraying simultáneo de NPs de SBA-15

Para la incorporación de nanopartículas de SBA-15 presintetizadas en nanofibras de PCL se siguieron varias estrategias. La primera de ellas consistió en combinar el *electrospinning* de nanofibras de PCL con el *electrospraying* de nanopartículas de SBA-15 presintetizadas a partir de dos disoluciones independientes. Para la síntesis de nanofibras que conforman la estructura del material, se empleó como en los anteriores capítulos una disolución de PCL (10 % m/m) a un caudal volumétrico de 1 mL/h mientras que para la incorporación de la SBA-15 se empleó una suspensión de nanopartículas de 10 mg/mL. Para garantizar la distribución homogénea de las nanopartículas en la superficie, se empleó un colector rotatorio, de la misma forma que la descrita en el capítulo II.



Figura IV- 5. Vista macroscópica de NFs de PCL con NPs de SBA-15 incorporadas mediante electrospraying simultáneo

Para un caudal volumétrico de la suspensión de nanopartículas de 2 mL/h, macroscópicamente se observó la formación de una membrana continua (Figura IV- 5). Sin embargo, a ambos lados de esta se observó la deposición de un material polvoriento (marcado en rojo en la Figura IV- 5), el cual se puede corresponder con nanopartículas no depositadas sobre el polímero. Microscópicamente, se confirmó la incorporación de nanopartículas en las membranas sintetizadas (Figura IV- 6), por lo que el

paso siguiente fue la determinación del porcentaje de nanopartículas presente en el material, para lo cual se empleó la técnica de TGA. Esta técnica monitoriza la masa de una muestra al mismo tiempo que se va aumentando la temperatura de la misma, proporcionando información sobre fenómenos tales como transiciones de fase, absorción, adsorción, desorción o descomposición, entre otros. Mientras que

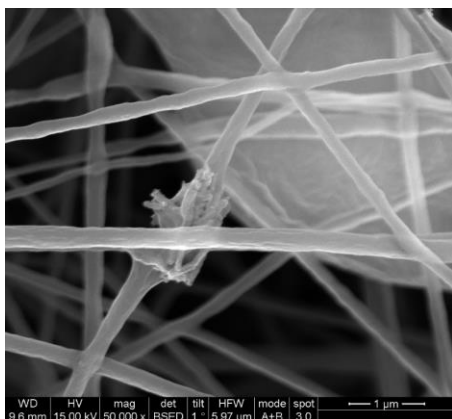


Figura IV- 6. Imagen de SEM de NFs de PCL con NPs de SBA-15 incorporadas mediante electrospinning simultáneo

la PCL muestra una descomposición a 390 °C, las nanopartículas de SBA-15 no muestran ninguna descomposición por debajo de 600 °C (Figura IV- 7), por lo que esta técnica nos permite calcular por diferencia el porcentaje de SBA-15 incorporado en las membranas a partir del porcentaje descompuesto antes de 600 °C. Empleando esta técnica, se calculó la incorporación de un 2.75 % m/m de SBA-15 en las membranas sintetizadas, solo un 20.07 % del total de SBA-15 que se podría haber incorporado teóricamente (el valor teórico de SBA-15 para estas condiciones de síntesis es del 13.70 % m/m).

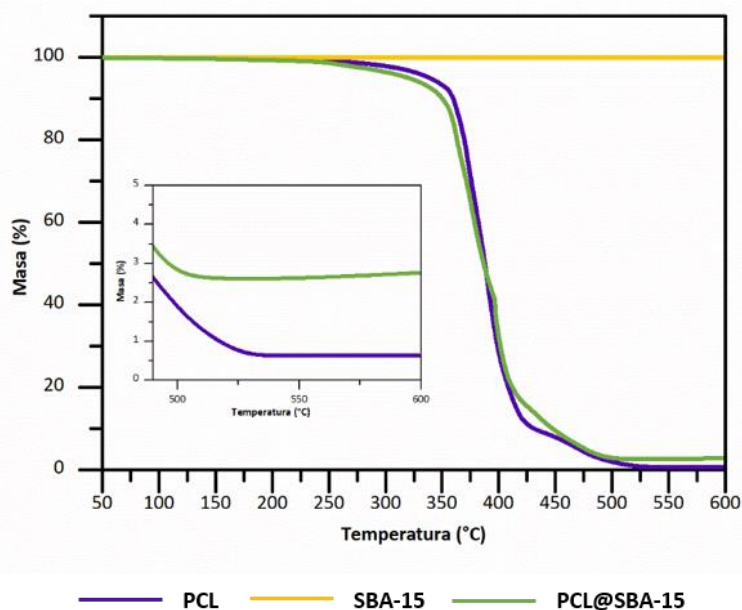


Figura IV- 7. Termograma para una muestra de NFs de PCL, NPs de y una membrana de PCL@SBA-15 sintetizada mediante electrospinning simultáneo

Debido al bajo porcentaje experimental de SBA incorporado, se decidió aumentar el caudal volumétrico de la suspensión de nanopartículas, para

comprobar si aumentando el aporte de nanopartículas se podría aumentar el porcentaje incorporado. Mediante SEM se pudo confirmar la incorporación de las nanopartículas en la membrana (Figura IV- 8). Sin embargo, mediante TGA se pudo comprobar cómo, a pesar de ser estas nanopartículas observables en la membrana, la cantidad incorporada de las mismas era muy pequeña (Tabla IV- 2): sólo un 0.72 % m/m de SBA-15 para un caudal volumétrico de suspensión de nanopartículas de 3 mL/h y un 0.58 % m/m de SBA-15 para un caudal volumétrico de 4 mL/h. Al aumentar el caudal volumétrico de suspensión de nanopartículas, no solo no aumenta, sino que incluso disminuye la cantidad de nanopartículas depositadas, además de seguir observándose una gran cantidad de material pulverulento (nanopartículas) fuera de las fibras. Al aumentar el caudal podría aumentar el diámetro de la espiral del jet^{275,276}, ampliándolo que amplía el área de

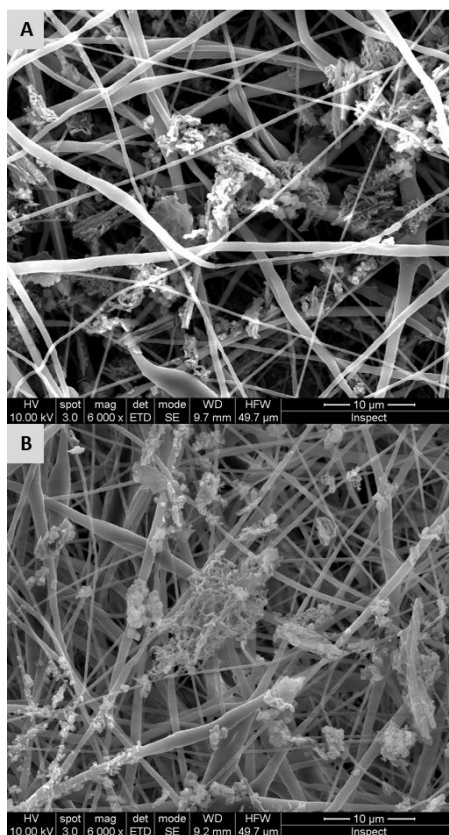


Figura IV- 8. Imágenes de SEM de NFs de PCL con NPs de SBA-15 incorporadas mediante elctrospraying simultáneo con distintos caudales de la dispersión de NPs (A: 3 mL/h, B: 4 mL/h)

deposición de las nanopartículas depositándose éstas fuera de las fibras. En los resultados de TGA puede influir también la heterogeneidad del material obtenido.

Los resultados de los análisis termogravimétricos, junto con la observación de la deposición del material polvoriento fuera de la membrana, parece indicar que esta técnica no es la más adecuada para incorporar las nanopartículas de SBA-15 a la membrana.

IV.3.2.2. *Electrospraying* de nanopartículas de SBA-15 sobre nanofibras de PCL pre-sintetizadas

Con los resultados del apartado anterior, se decidió cambiar el colector a uno de menor tamaño, para comprobar si reduciendo el área del colector se podría reducir la dispersión a la hora de depositarse las nanopartículas. Para ello, se empleó un colector circular plano de 8 cm de diámetro. Sin embargo, este colector no permite que, a partir de dos disoluciones independientes, tengamos un material que sea mezcla homogénea de ambos.

Para la incorporación de nanopartículas en la membrana empleando este colector se propuso una nueva aproximación: realizar el *electrospraying* de una suspensión de nanopartículas sobre una membrana de nanofibras preparada separadamente con anterioridad. Este método de síntesis concentraría todo el material bactericida en una de las dos caras de la membrana. Ya que estos materiales están pensados para su empleo como apósitos esta asimetría entre ambas caras de la membrana no supondría una desventaja, ya que se optimizaría la distribución del material bactericida en la cara del apósito que se encuentra en contacto con la herida para proporcionarle profilaxis o bien un tratamiento.

Tabla IV- 2. Condiciones experimentales empleadas para la obtención de NFs de PCL con NPs de SBA-15 incorporadas mediante *electrospraying* simultáneo

Material	Caudal volumétrico suspensión SBA-15 NPs (mL/h)	% SBA teórico (%)	% SBA experimental (%)	Eficiencia encapsulación (%)
PCL@SBA_2mL	2	13.70	2.75	20.07
PCL@SBA_3mL	3	19.23	0.72	3.74
PCL@SBA_4mL	4	24.09	0.58	2.41

En esta aproximación, en todos los ensayos se empleó una disolución de PCL (10 % m/m) a un caudal volumétrico de 1 mL/h para la síntesis de nanofibras y una suspensión de SBA-15 (20 mg/mL en una mezcla de agua y DMF en relación 1:1) a un caudal volumétrico de 2 mL/h para la incorporación de nanopartículas. En este caso, el porcentaje teórico de SBA-15 incorporado se moduló en función del tiempo de *electrospinning* y *electrospraying* empleados y el porcentaje real se determinó mediante TGA.

Para una relación de tiempo entre *electrospinning* y *electrospraying* de 1:1, el porcentaje teórico incorporado es del 13.58 % m/m de SBA-15. Sin embargo, la medida en TGA de muestras preparadas en estas condiciones, indicó una carga de un 0.92 % de SBA-15. Si se cambia la relación de tiempo a 1:2, el porcentaje teórico aumenta hasta un 24.1 %, aunque los resultados experimentales mantuvieron una incorporación del 0.36 % m/m de SBA-15. En ambos casos, los resultados experimentales se encontraron muy por debajo de los teóricos, además de mantenerse en el mismo orden que los obtenidos mediante *electrospinning* y *electrospraying* simultáneo. Así mismo, aunque en este caso la membrana cubría por completo la superficie del colector, se pudo observar fuera del mismo, y en toda la cabina del *electrospinner*, la deposición de una película de polvo blanco, relacionada con la deposición de nanopartículas fuera del colector de la misma forma que cuando se realizaba *electrospinning* y *electrospraying* simultáneo. Una razón importante de que las dos anteriores estrategias no permitan la deposición de nanopartículas sobre las fibras, sino en el colector sin fibras, puede estar asociada a la poca conductividad del polímero que causa que el jet de la suspensión de nanopartículas sea atraído hacia el colector desnudo conectado al potencial negativo. Debido a esto, se decidió que la combinación de *electrospraying* de nanopartículas y *electrospinning* de nanofibras (simultáneo o no) no es un método adecuado para la incorporación de este tipo de nanopartículas en nanofibras de PCL.

IV.3.2.3. *Electrospinning* de nanofibras de PCL tipo *core-shell* decoradas con nanopartículas de SBA-15

A partir de los resultados obtenidos en los apartados IV.3.2.1 y IV.3.2.2, se deduce que el *electrospraying* de nanopartículas preformadas de SBA-15 sin ningún soporte polimérico no permite la incorporación de un porcentaje significativo de las mismas en membranas. Por ello, se planteó la síntesis de nanofibras tipo *core-shell*, formadas por un núcleo de PCL (con una función meramente estructural) y un recubrimiento también de PCL, en el cuál se incorporaron las nanopartículas de SBA-

15 inicialmente sin nada contenido en sus mesoporos y posteriormente cargados de timol. Este tipo de fibra *core-shell* se plantea, además de para proporcionar un soporte sólido a la nanopartícula, con la intención de maximizar la exposición de las nanopartículas al entorno (lo que permitiría un mayor contacto con las bacterias del mismo) concentrándolas en la superficie externa de la fibra. Además, la presencia de una fina película de polímero alrededor de las nanopartículas podría modificar la cinética de liberación contribuyendo a obtener una liberación más sostenida.

Para ello, se emplearon dos disoluciones poliméricas diferentes. Para el núcleo se empleó una disolución de PCL (10 % m/m) mientras que para el recubrimiento se empleó una suspensión de nanopartículas de SBA-15 (20 mg/mL) en una disolución de PCL. Mientras que la concentración de nanopartículas de SBA-15 se mantuvo constante en todos los casos, se emplearon 2 concentraciones distintas de polímero (5 y 10 % m/m) para, junto con la combinación de distintos caudales volumétricos de la disolución del núcleo y la del recubrimiento (Tabla IV- 1), variar el porcentaje de SBA-15 incluido en las membranas. Ya que no era necesaria la mezcla de dos disoluciones simultáneas, el colector elegido para la síntesis de estas membranas fue un colector plano recubierto con papel de aluminio para facilitar la retirada de las membranas tras su síntesis.

Para cada una de las condiciones ensayadas en la Tabla IV- 3 se detalla el porcentaje teórico de SBA-15 en cada uno de los casos, así como el porcentaje real incorporado (% SBA-15 medido) determinado mediante TGA. Se puede comprobar que mediante este método de síntesis se consigue una eficiencia incorporación de las nanopartículas (eficiencia de encapsulación) mayor del 75 % para todas las condiciones ensayadas. Estos valores están muy por encima de los obtenidos con los métodos anteriormente detallados. Además, estos resultados también están en consonancia con lo observado macroscópicamente. Mientras que con los métodos descritos en los apartados IV.3.2.1 y IV.3.2.2 se podía observar claramente como había gran cantidad de nanopartículas depositadas fuera de la zona de deposición del polímero (incluso fuera del colector), con la incorporación de las nanopartículas en el recubrimiento de las fibras tipo *core-shell* no se observó la deposición de nanopartículas fuera de la zona donde se deposita el polímero. Por tanto, se decidió que este es el método óptimo para incorporar este tipo de nanopartículas en nanofibras de PCL.

Como ya se comentó anteriormente, el jet de la disolución de las nanopartículas, cargado positivamente, no es atraído por la superficie no conductora formada por las fibras depositadas, por lo cual tienden a depositarse

sobre el colector sin fibras con potencial negativo²⁷⁷. Sin embargo, incorporando las nanopartículas a la disolución que formará el recubrimiento de unas nanofibras tipo *core-shell* se consigue que, una vez evaporado el disolvente, las nanopartículas de SBA-15 queden incluidas en la matriz polimérica, que se deposita sobre el colector con una pérdida reducida de nanopartículas (como refleja Tabla IV- 3, la pérdida, en el peor de los casos, es de sólo el 24 %).

Una vez elegido este método de síntesis como óptimo para incluir estas nanopartículas en las nanofibras, se eligieron las condiciones de síntesis finales. La combinación elegida fue un caudal volumétrico de 0.5 mL/h para el núcleo y un caudal volumétrico de 1.0 mL/h de la disolución de PCL al 5 % m/m para el recubrimiento (PCL0.5@PCL5-SBA1.0, en adelante PCL@SBA-15). Con esta disolución se consiguió una eficiencia de encapsulación del 90.1 %, superior a la conseguida con el resto de condiciones ensayadas. Además, es con la que se consiguió un porcentaje mayor de nanopartículas incorporadas en el material, alcanzando el 12.3 % de la masa del material sintetizado, aun no siendo el que mayor porcentaje teórico de las mismas debiera incorporar.

Si este material se compara con los materiales PCL0.5@PCL5-SBA1.5 y con el material PCL0.5@PCL10-SBA1.0 la menor encapsulación se justifica debido a que en estos dos casos se produce la deposición de material en la punta de la aguja externa, lo que termina reduciendo el flujo de disolución a través de la misma y, por tanto, el porcentaje de nanopartículas incluido en las nanofibras. Para este tipo de síntesis, se empleó un sistema de inyección formado por una aguja externa (diámetro interno, 1.4 mm) y una aguja interna (diámetro externo, 0.9 mm) centrada en el interior de la externa mediante un muelle de acero. Este muelle, además de generar una restricción al flujo por la aguja externa, hace que las nanopartículas vayan quedando depositadas en el mismo, reduciendo el volumen disponible para la circulación de la disolución de polímero. Así, en el caso del material PCL0.5@PCL5-SBA-1.5 el caudal a través de la aguja externa es demasiado elevado como para que la bomba del equipo pueda asumirlo, ya que en sucesivas pruebas se comprobó que, a partir de media hora de trabajo, el caudal por la aguja externa se reducía drásticamente hasta casi interrumpirse. Para el material PCL0.5@PCL10-SBA1.0 los problemas no derivan del caudal de disolución si no de la viscosidad de la disolución. Al ser mayor la concentración de polímero para esta disolución (se pasa del 5 % al 10 % de PCL) la viscosidad de la misma aumenta en consecuencia. Si a la deposición de nanopartículas en el muelle se le suma una mayor viscosidad de la disolución, el resultado es similar al caso anterior, tras un tiempo de trabajo, la bomba del equipo

no es capaz de proporcionar el caudal programado para la disolución de recubrimiento dando como resultado un material con un porcentaje de nanopartículas menor que el teórico. Sin embargo, para el material PCL@-SBA-15 (PCL0.5@PCL5-SBA1.0) el caudal por la aguja externa, así como la viscosidad de la disolución que circula por ella, son adecuados para que no se produzca la deposición de nanopartículas en el muelle y que la disolución circule de forma continua generando un material homogéneo, otro de los motivos por lo que estas condiciones se eligieron como óptimas.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de síntesis para las nanofibras cargadas con nanopartículas de SBA-15, se extrapolaron para la incorporación de nanopartículas de SBA-15 cargadas con timol (SBA-TIM NPs) para su aplicación como apósito con propiedades bactericidas.

Tabla IV- 3. Resultados experimentales de la síntesis de NFs core-shell de PCL decorados con NPs de SBA-15

Material	% PCL core (% m/m)	Caudal volumétrico core (mL/min)	% PCL shell (% m/m)	Caudal volumétrico shell (mL/min)	% SBA-15 teórico (%)	% SBA-15 medido (%)	Eficiencia incorporación SBA-15 (%)
PCL0.5@PCL5-SBA1.0	10	0.5	5	1	13.64	12.30	90.13
PCL0.5@PCL5-SBA1.5	10	0.5	5	1.5	15.94	12.10	75.91
PCL1.0@PCL5-SBA1.0	10	1.0	5	1	9.53	7.82	82.06
PCL0.5@PCL10-SBA1.0	10	0.5	10	0.5	7.32	6.46	88.25

IV.3.3. Síntesis de nanofibras de PCL decoradas con nanopartículas de SBA-15 cargadas con timol (PCL@SBA-TIM)

Para la síntesis de las nanofibras de PCL decoradas con nanopartículas de SBA-15 cargadas con timol (PCL@SBA-TIM) se emplearon las condiciones definidas como óptimas en el apartado IV.3.2.3. La carga de estas nanopartículas con timol ha sido desarrollada en trabajos previos del grupo de investigación y no afecta a su morfología (Figura IV- 1), manteniendo tanto su diámetro (138±30 nm) como su longitud (563±100 nm) tras la incorporación del compuesto. Además, poseen actividad bactericida frente a *S. aureus*, reflejadas en los valores de MIC y MBC²⁷¹, de 0.35 y 0.55 mg/L respectivamente, concentraciones a las cuales se comprobó que las nanopartículas de SBA-15 no tienen ningún efecto frente a dicha bacteria.

IV.3.3.1. Composición

La presencia de SBA-TIM NPs se confirmó mediante TGA. En la Figura IV- 9 se puede observar como en el termograma correspondiente a las PCL@SBA-TIM en torno a 135 °C se produce una caída que no se observa en la correspondiente a las

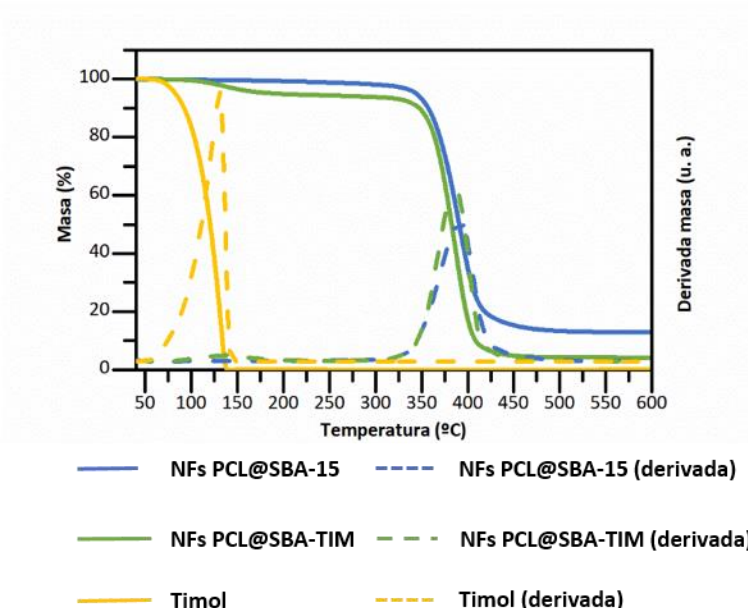


Figura IV- 9. Termograma y derivada del termograma de timol, PCL@SBA-15 y PCL@SBA-TIM

PCL@SBA-15. Como se puede comprobar en la Figura IV- 10 (que muestra en detalle la gráfica de la derivada del termograma para ambos materiales y timol entre 50 y 200 °C), a dicha temperatura hay un máximo local tanto como para el timol como para las PCL@SBA-TIM, lo que indica que en las nanofibras encontramos timol. También se puede observar como las nanopartículas dan una mayor estabilidad térmica al timol respecto a su forma no encapsulada. Esto se observa en la gráfica de la derivada, en la que se observa como el timol libre, aunque el punto máximo está a la misma temperatura, empieza y termina de descomponerse a una temperatura menor que cuando se encuentra encapsulado en las nanopartículas de SBA-15. En concreto, la descomposición del timol libre se produce entre 60 y 140 °C mientras que la del timol en las nanopartículas se produce entre 80 y 200 °C. Esta mayor estabilidad térmica del timol cuando se encuentra dentro de los poros de las nanopartículas está en consonancia con el efecto protector que tienen las nanopartículas sobre los fármacos alojados en sus poros que se había mencionado con anterioridad en la sección IV.1.1^{243,244}.

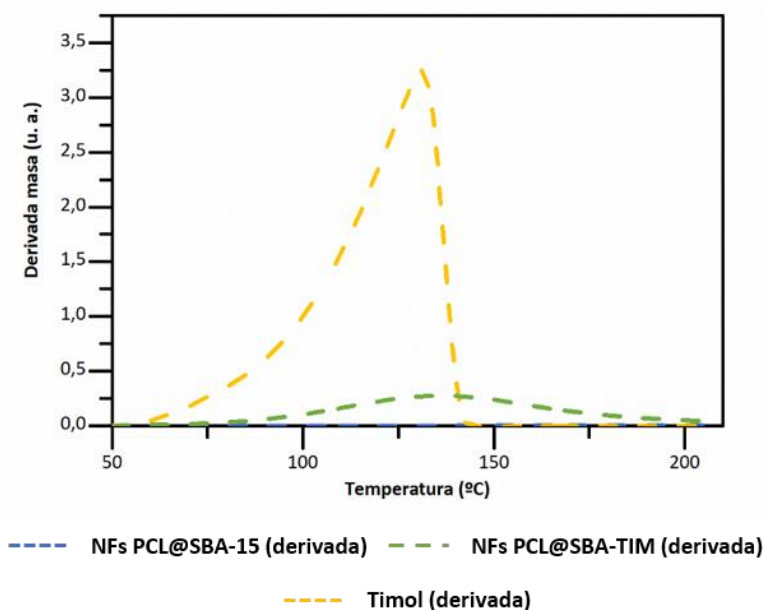


Figura IV- 10. Detalle de la derivada del termograma entre 50 y 200 °C para timol, PCL@SBA-15 y PCL@SBA-TIM

Como ya se ha comentado anteriormente, las nanopartículas empleadas en la síntesis de las membranas de PCL@SBA-TIM contenían un 70.79 % de timol, por lo

que para las condiciones de síntesis de nanofibras elegidas la carga teórica de timol sería del 9.43 %. Con este procedimiento de síntesis (y empleando la TGA como método de cuantificación) se obtuvieron nanofibras cargadas con un 5.59 ± 1.24 % de timol, lo que equivale a una eficiencia de encapsulación, referida al timol, del 59.27 %. Si sumamos el porcentaje de timol y SBA-15 incorporado a las nanofibras (Tabla IV- 4) obtenemos que el material sintetizado contenía un 10.55 % de

Tabla IV- 4. Caracterización de las membranas de PCL@SBA-15 y PCL@SBA-TIM sintetizadas

Material	% PCL		% SBA		% Timol	
	Teórico	Real	Teórico	Real	Teórico	Real
PCL@SBA-15	86.35	87.4 ± 2.73	13.64	12.55 ± 2.73	0	0
PCL@SBA-TIM	86.35	89.46 ± 1.12	4.22	4.96 ± 0.58	9.43	5.59 ± 1.24

nanopartículas de SBA-TIM, frente a un 13.65 % teórico, lo que significa que se incorporó un 77.29 % de las nanopartículas en disolución, un dato menor que el obtenido con la incorporación de nanopartículas de SBA-15 sin cargar (92.01 %).

Las nanopartículas empleadas para la síntesis de estos materiales contenían un 70.79 % de timol, mientras que considerando la masa de timol y sílice dadas por los resultados de TGA (5.59 % de timol y 4.22 % de SBA-15), el porcentaje de timol en las nanopartículas incorporadas en las nanofibras fue del 53 %, valor menor que el de partida. Este hecho se explica como consecuencia del proceso de *electrospinning*. Para el mismo, las nanopartículas en una disolución de DCM y DMF que extraen parcialmente el timol cargado en las nanopartículas. Además, como ya se ha discutido durante el capítulo II, debido a la volatilidad del timol, durante el proceso de *electrospinning* se produce la evaporación de parte del compuesto, lo que impide alcanzar eficiencias de encapsulación cercanas al 100 %.

IV.3.3.2. Morfología

Ambos materiales fueron caracterizados morfológicamente mediante SEM y TEM. A partir de las imágenes de SEM de membranas cargadas y sin cargar con SBA se comprobó si la incorporación de las nanopartículas afecta al diámetro de nanofibras obtenido. Para ello, se prepararon fibras en las mismas condiciones (concentración de polímero y caudal volumétrico de disoluciones) que para los

materiales finales con la diferencia de que no se adicionaron las nanopartículas en la disolución empleada para la capa exterior.

En estas condiciones, se obtuvieron unas fibras de sólo PCL de 262 ± 49 nm de diámetro, siendo 239 ± 56 nm el diámetro obtenido para las PCL@SBA-15 y 260 ± 51 nm el obtenido para las PCL@SBA-TIM. A partir de estos resultados, así como de las imágenes de SEM presentadas en la Figura IV- 11, se puede afirmar que la

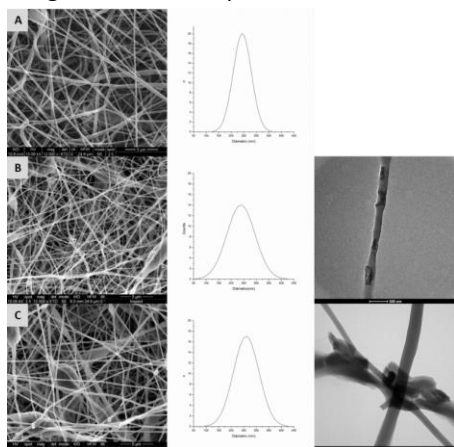


Figura IV- 11. Imágenes de SEM, TEM e histogramas de NFs de PCL sintetizadas mediante core-shell (A), NFs de PCL@SBA-15 (B) y NFs de PCL@SBA-TIM (C)

incorporación de las nanopartículas (estén o no cargadas con timol) en el recubrimiento de las fibras no afecta considerablemente a su morfología. Además, si se comparan estos valores con los obtenidos para las nanofibras de PCL sin cargar preparadas en el capítulo II (263 ± 68 nm) tampoco se observa una variación en el diámetro. Aunque en cada material se utilice una configuración de aguja distinta y disoluciones de distinta concentración, al mantenerse igual la masa de polímero aportada, el diámetro de fibra permanece constante.

IV.3.3.3. Determinación del perfil de liberación

Dado que estas membranas están diseñadas para su uso como apósitos con una liberación sostenida de un compuesto bactericida (timol), es necesario conocer el perfil de liberación del mismo. En este caso, se eligió un modelo estático en el cual la membrana se sumerge en el fluido biológico simulado y se mantiene a 37°C y bajo agitación constante, retirando a determinados tiempos el fluido (y sustituyéndolo por fluido fresco) para analizar su contenido en timol mediante UPLC.

En la Figura IV- 12 se presenta el perfil de liberación de timol desde las nanopartículas de SBA-TIM y desde las membranas de PCL@SBA-TIM. Un gran porcentaje de timol se liberó durante la primera media hora de experimento (aproximadamente el 43 % del timol cargado en la membrana), liberando al cabo de 15 días un 55.4 ± 3.7 % del timol cargado. Si se compara este perfil con el obtenido en este grupo de investigación para las nanopartículas sin incluir en las

membranas²⁷¹, se observa cómo el porcentaje total liberado es menor en el caso de las membranas (un 55.4 % en membranas frente a un 66.2 % en nanopartículas tras 15 días) así como que la liberación en los primeros 5 días es mucho más sostenida en el caso de las nanopartículas que en el de las membranas. Esta diferencia en el perfil de liberación de timol en función de que las nanopartículas estén o no incluidas en las membranas se atribuye al método de inclusión de las nanopartículas en las membranas. Al estar dispersas en la disolución polimérica durante la síntesis, parte del timol cargado en las nanopartículas se extrae de éstas y pasa al polímero que forma el *shell* de las nanofibras. Así, si se compara el perfil de liberación de las membranas de PCL-TIM sintetizadas en el capítulo II con el de las membranas de PCL@SBA-TIM, se observa en ambos casos una liberación muy rápida de la mayoría del timol en las primeras etapas del experimento. Sin embargo, mientras que para las membranas de PCL-TIM no se libera más timol más allá de 8 h de experimento, en el caso de las membranas de PCL@SBA-TIM la liberación se extiende hasta los 15 días. Estos resultados, junto con el mayor porcentaje liberado de timol en las membranas de PCL@SBA-TIM que en las membranas de PCL-TIM (un 55.4 % y un 7.3 % de timol respectivamente), sugieren que el perfil de liberación del timol desde

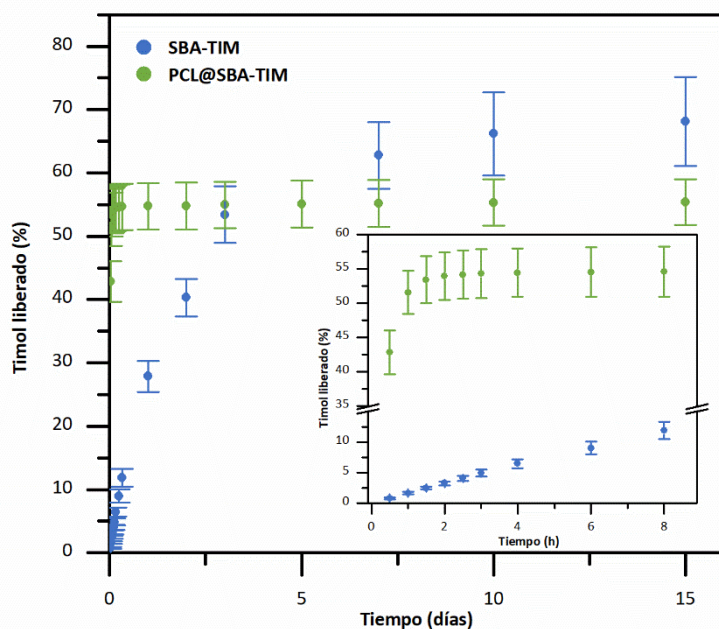


Figura IV- 12. Perfil de liberación de NPs de SBA-TIM y NFs de PCL@SBA-TIM

las membranas de PCL@SBA-TIM es una combinación de la liberación desde nanopartículas de SBA-TIM y de la liberación desde el *shell* de las fibras.

IV.3.4. Propiedades bactericidas de las membranas de PCL@SBA-TIM

IV.3.4.1. Determinación de MIC y MBC

Como ya se ha indicado con anterioridad, el incluir las nanopartículas de SBA-TIM en nanofibras de PCL tiene el objetivo de crear un apósito con propiedades bactericidas. Dado esto, es necesario calcular la MIC y MBC de estos materiales.

Empleando como modelo bacteriano la bacteria *S. aureus* ATCC 25923 se obtuvieron unos valores de MIC y MBC de 7.5 y 10 mg/mL de membrana de PCL@SBA-TIM, lo que en términos de timol liberado desde las membranas se traduce en 0.22 y 0.30 mg/mL, respectivamente (Tabla IV- 5). Aunque estos valores son más altos (tanto en material neto como en timol liberado) que los obtenidos para las nanopartículas sin incluir en la membrana, este hecho se puede explicar por la menor disponibilidad de las nanopartículas cuando se encuentran incluidas en una membrana ya que el PCL puede constituir una barrera difusional que ralentiza la liberación del timol. Mientras que en los ensayos realizados con las nanopartículas “libres” todas están expuestas al contacto con las bacterias, al estar

Tabla IV- 5. Comparación entre las propiedades bactericidas de timol, NPs de SBA-TIM y membranas de PCL@SBA-TIM y PCL@SBA-15

Material	MIC		MBC	
	Masa de material (mg)	Masa de timol liberado (24 h, mg/mL)	Masa de material (mg)	Masa de timol liberado (24 h, mg/mL)
Timol	0.2	-	0.3	-
SBA-TIM ²⁷¹	0.35	0.07	0.55	0.11
PCL@SBA-TIM	7.50	0.22	10.00	0.30
PCL@SBA-15	> 10.0	-	> 10.0	-

incluidas en una membrana sólo una parte de las mismas están en contacto con el medio, por lo que se ve limitado uno de los mecanismos de acción del timol frente a las bacterias: la disrupción de la capa de peptidoglicano que rodea a la pared celular de esta bacteria por contacto con el timol.

Por otra parte, si se compara con las membranas de PCL-TIM sintetizadas en el capítulo II, los valores de MIC y MBC se han visto reducidos desde 10 y 30 mg/mL hasta 7.5 y 10 mg/mL, incluso con un material cuyo contenido de timol es mucho menor (5.59 % frente a un 17.13 % cargado en las membranas de PCL-TIM). Esto es debido a la diferente liberación de ambas membranas. Tras 24 h en el caso de las membranas de PCL@SBA-TIM se liberó una concentración de 0.22 mg/mL de timol (partiendo de una concentración de membrana igual a la MIC) mientras que para el caso de las membranas de PCL-TIM, para la concentración de membrana de MIC, sólo se liberó al medio una concentración de timol de 0.12 mg/mL. Esta mayor liberación complementa el efecto del contacto potenciando el efecto bactericida de las membranas sintetizadas en este capítulo.

Finalmente, cabe comentar que el efecto bactericida de estas membranas viene dado por el timol cargado en las nanopartículas de SBA-15 y no por un posible efecto del material sin cargar. Esto se comprobó enfrentando concentraciones de 10 mg/mL (la mayor concentración ensayada para las membranas de PCL@SBA-TIM) de membranas de PCL@SBA-15 a las mismas condiciones que las empleadas anteriormente. En este experimento, el crecimiento bacteriano fue el mismo para las muestras con membrana que para las muestras control, lo que significa que las membranas de PCL@SBA no tienen ningún efecto bactericida a la concentración de 10 mg/mL.

IV.3.4.2. Influencia del contacto

Para evaluar el efecto del contacto en la acción bactericida de los materiales sintetizados, se incubaron en medio de cultivo (TSB) estéril sin bacterias muestras de membranas de PCL@SBA-TIM y PCL@SBA-15 en una concentración 10 mg/mL (MIC para las membranas de PCL@SBA-TIM). Se mantuvieron incubando a 37 °C durante diferentes tiempos, al final de los cuales se separó la membrana del medio de cultivo y se comprobó la capacidad bactericida tanto de la membrana como del compuesto liberado al medio de cultivo (exudado).

Los resultados obtenidos de este experimento se presentan en la Figura IV- 13 A para las membranas y B para los exudados. Se puede comprobar cómo, hasta el

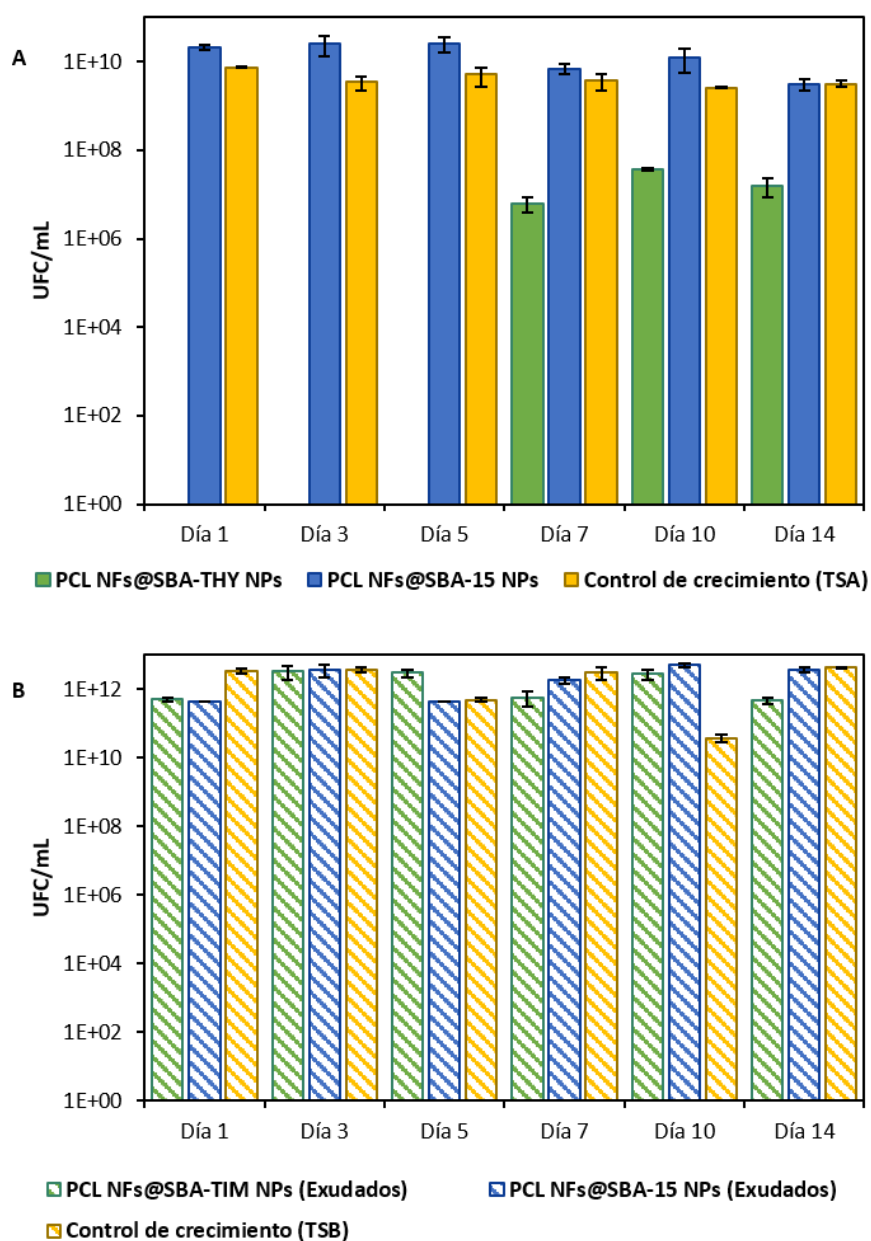


Figura IV- 13. Ensayos de exudados frente a *S. aureus* para las membranas de PCL@SBA-15 y PCL@SBA-TIM

quinto día, las membranas mantienen su capacidad bactericida, a pesar de haber liberado parte de su carga de timol al medio. A partir del séptimo día, aunque la capacidad bactericida de las membranas se ve reducida, aún poseen una carga

suficiente de timol en contacto con el medio como para tener un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano. Por otro lado, si bien las membranas mantienen sus propiedades bactericidas, el timol liberado al medio no es suficiente como para tener efecto bactericida, según se deduce de los resultados obtenidos en el apartado B.

De estos resultados se puede deducir que, si bien se libera una mayor concentración de timol que en caso de las membranas de PCL-TIM, el contacto entre la membrana y las bacterias sigue siendo un factor clave para conseguir un efecto bactericida de las mismas.

IV.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se sintetizaron nanopartículas de SBA-15 (con una longitud de 563 y un diámetro de 138 nm) en las que posteriormente se incorporó un 71 % de timol mediante el método de impregnación incipiente. Además, se optimizó la incorporación de estas partículas en nanofibras de PCL, empleando para ello tres métodos distintos (*electrospinning* y *electrospraying* simultáneo, *electrospraying* de nanopartículas sobre nanofibras pre-sintetizadas y *electrospinning* de nanofibras de PCL con nanopartículas incluidas en el *shell* de las nanofibras). De los tres métodos, se eligió como óptimo el tercero, obteniendo unas membranas con un diámetro de fibra homogéneo y una eficiencia de incorporación de nanopartículas del 77 %.

Se analizó el perfil de liberación de timol tanto para las nanopartículas cargadas como para las membranas que las incorporan. En general, se obtienen perfiles de liberación sostenida de timol hasta 15 días, si bien para el caso de las membranas se observa una liberación más rápida de timol durante las primeras horas que para las nanopartículas sin incorporar a las mismas.

Dada la naturaleza bactericida del timol se evaluó la capacidad bactericida de las membranas obtenidas frente a un modelo de bacteria Gram + obteniendo los valores de MIC y MBC. Se comprobó que este efecto era debido a la presencia del timol en las nanopartículas, ya que para las mismas concentraciones de membranas con nanopartículas sin cargar no se observó ningún efecto bactericida. Así mismo, se evaluó la influencia del contacto entre las bacterias y las membranas y, dado el perfil de liberación del agente bactericida, se evaluó su efecto a tiempos largos, comprobando cómo hasta 14 días las membranas mantienen sus propiedades bactericidas, aunque a partir del día cinco ven ligeramente reducida su actividad.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos a lo largo de la realización de este trabajo, se puede obtener una serie de conclusiones, resumidas al final de cada capítulo. A continuación, se sintetizan las más relevantes de entre todas ellas.

- Los métodos de síntesis empleados (*electrospinning*, *electrospraying* y una combinación de impregnación de nanopartículas de sílice mesoporosa tipo SBA-15 con *electrospinning*) demostraron ser muy adecuados para la encapsulación de compuestos bactericidas volátiles como el timol, ya que en todos los casos se obtuvieron valores de eficiencia de encapsulación superiores al 55 % en las membranas finales.

- El proceso de *electrospraying* al que fueron sometidas las membranas de PCL para la incorporación de las micropartículas de PLGA no afectó significativamente a sus propiedades mecánicas, por lo que este proceso puede ser empleado para la combinación de varios polímeros con diferentes propiedades.

- Comparada con la actividad de los compuestos libres, la actividad bactericida de los mismos compuestos encapsulados se mantuvo en las diferentes membranas preparadas. Además, esta actividad bactericida depende fuertemente del contacto entre la membrana y la bacteria, como quedó demostrado al evaluar la capacidad bactericida del timol liberado desde membranas de PCL-TIM y de PLC@SBA-TIM.

- En las membranas de PCL@PLGA-TIM, la actividad bactericida se demostró que proviene del timol encapsulado en las mismas y no del PLGA con el que están preparadas ya que, mientras que membranas de PCL@PLGA no demostraron tener capacidad bactericida alguna, membranas del mismo diámetro de PCL@PLGA-TIM sí demostraron ser capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, actuando el PLGA tan sólo como vehículo para conseguir una liberación sostenida en el tiempo.

- Las membranas de PCL@PLGA-TIM demostraron no tener efecto citotóxico (en concentraciones bactericidas) frente a dos líneas celulares distintas, mientras que una concentración equivalente de timol sí lo presentó, por lo que este material se puede considerar adecuado para tener un efecto terapéutico bactericida sin afectar negativamente al tejido tratado.

- Tanto las membranas de PCL-TIM como las de PCL@PLGA-TIM demostraron ser capaces de controlar la infección experimental de una herida aguda en un modelo *in-vivo* de herida infectada en ratón con bacterias Gram +. Aunque no se consiguió la completa erradicación de la infección, sí se consiguió la

inhibición temporal de la misma. Además, en el caso de las membranas de PCL-TIM, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con un antiséptico tópico comercial de amplio espectro, la clorhexidina.

- Además de controlar la infección, las membranas de PCL-TIM y PCL@PLGA-TIM demostraron contribuir a la aceleración en el proceso de curación de heridas en el modelo *in-vivo* de herida, ya que en las heridas tratadas con estos materiales se comprobó una regeneración más acelerada de los vasos sanguíneos y tejidos que en las muestras control, resultado atribuido al efecto proliferativo y regenerativo del timol.

- Existe poca evidencia científica y, en muchos casos, poco concluyente que indique que el tratamiento de heridas infectadas agudas con apósitos que contienen fármacos (antisépticos o antibióticos tópicos) es más eficaz que el tratamiento clínico habitual con, por ejemplo, clorhexidina. Así pues, este trabajo ha servido para aportar evidencias basadas en la aplicación del método científico acerca de que apósitos que contienen timol son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano y producen menor citotoxicidad en células eucariotas que la aplicación de un antiséptico comercial ampliamente empleado en la práctica clínica, la clorhexidina.

- Además, es posible controlar el perfil de liberación de un antiséptico de origen natural (como es el timol) variando tanto la naturaleza del material que lo contiene como la forma de incorporación del mismo. Mientras que las membranas de PCL presentaron una liberación muy rápida del timol, al decorar la superficie de la membrana con micropartículas de PLGA cargadas con timol la velocidad de liberación se redujo considerablemente. Finalmente, al incorporar el compuesto en nanopartículas inorgánicas de SBA-15 cargadas con timol en la superficie de las fibras que forman la membrana, se obtuvo una liberación del compuesto mucho más sostenida que en los casos anteriores. De esta forma, con unas ligeras modificaciones en el proceso de síntesis de apósitos se consiguieron tres formas totalmente distintas de liberar el mismo fármaco.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Montañó, N.; Pérez, A.; Ricalde, S.; Sanchez-Yañez, J. Los microorganismos: pequeños gigantes. *Elem. Cienc. y Cult.* **2010**.
- (2) OMS. Peste <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/plague>.
- (3) OMS. Las 10 principales causas de defunción <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- (4) Eur. Cent. Dis. Prev. Control. *Microbes Without Borders: Key Facts on Infectious Diseases in Europe*; 2007.
- (5) García Palomo, J. D.; Agüero Balbín, J.; Parra Blanco, J. A.; Santos Benito, M. F. Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación. *Medicine (Baltimore)*. **2010**, 10 (49), 3251-3264. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70027-5](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70027-5).
- (6) Gallego Luque, C.; Montero Pérez-Barquero, M.; Cuadrado Marín, P.; Jurado Porcel, A. Clasificación clínica de las enfermedades infecciosas. *Medicine (Baltimore)*. **2002**, 8 (61), 3231-3240. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(02\)70603-3](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(02)70603-3).
- (7) Stephen, J. C.; Ivonne, D. R.; Ronald, J. H. *Manual of antimicrobial susceptibility testing*; Microbiology, A. S. for, Ed.; 2005.
- (8) Pereiro Ferreirós, M.; Toribio Pérez, J. Infecciones bacterianas de la piel. Clasificación. Formas clínicas. Enfermedades mediadas por toxinas. Diagnóstico diferencial. Actitudes terapéuticas. *Med. - Programa Form. Médica Contin. Acreditado* **2002**, 8 (88), 4737-4743. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(02\)70880-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-5412(02)70880-9).
- (9) Twum-Danso, K.; Grant, C.; Al-Suleiman, S. A.; Abdel-Khader, S.; Al-Awami, M. S.; Al-Breiki, H.; Taha, S.; Ashoor, A.-A.; Wosornu, L. Microbiology of postoperative wound infection: a prospective study of 1770 wounds. *J. Hosp. Infect.* **1992**, 21 (1), 29-37. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(92\)90151-B](https://doi.org/10.1016/0195-6701(92)90151-B).
- (10) Mayet, N.; Choonara, Y. E.; Kumar, P.; Tomar, L. K.; Tyagi, C.; Du Toit, L. C.; Pillay, V. A Comprehensive Review of Advanced Biopolymeric Wound Healing Systems. *J. Pharm. Sci.* **2014**, 103 (8), 2211-2230. <https://doi.org/10.1002/jps.24068>.
- (11) Li, S.; Li, L.; Guo, C.; Qin, H.; Yu, X. A promising wound dressing material with excellent cytocompatibility and proangiogenesis action for wound healing: Strontium loaded Silk fibroin/Sodium alginate (SF/SA) blend films. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 104 (Pt A), 969–978.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.020>.
- (12) Andreu, V.; Mendoza, G.; Arruebo, M.; Irusta, S. Smart Dressings Based on Nanostructured Fibers Containing Natural Origin Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Regenerative Compounds. *Materials (Basel)*. **2015**, *8* (8), 5154-5193. <https://doi.org/10.3390/ma8085154>.
 - (13) Nicks, B. A.; Ayello, E. A.; Woo, K.; Nitzki-George, D.; Sibbald, R. G. Acute Wound Management: Revisiting the Approach to Assessment, Irrigation, and Closure Considerations. *Int. J. Emerg. Med.* **2010**, *3* (4), 399-407. <https://doi.org/10.1007/s12245-010-0217-5>.
 - (14) Kręcichwost, M.; Czajkowska, J.; Wijata, A.; Juszczak, J.; Pyciński, B.; Biesok, M.; Rudzki, M.; Majewski, J.; Kostecki, J.; Pietka, E. Chronic wounds multimodal image database. *Comput. Med. Imaging Graph.* **2021**, *88*, 101844. <https://doi.org/10.1016/j.compmedimag.2020.101844>.
 - (15) Nunan, R.; Harding, K. G.; Martin, P. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Dis. Model. & Mech.* **2014**, *7* (11), 1205 LP - 1213. <https://doi.org/10.1242/dmm.016782>.
 - (16) Sen, C. K.; Gordillo, G. M.; Roy, S.; Kirsner, R.; Lambert, L.; Hunt, T. K.; Gottrup, F.; Gurtner, G. C.; Longaker, M. T. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen.* **2009**, *17* (6), 763-771. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x>.
 - (17) Nussbaum, S. R.; Carter, M. J.; Fife, C. E.; DaVanzo, J.; Haught, R.; Nusgart, M.; Cartwright, D. An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. *Value Heal.* **2018**, *21* (1), 27-32. <https://doi.org/10.1016/J.JVAL.2017.07.007>.
 - (18) Gámez-Herrera, E.; García-Salinas, S.; Salido, S.; Sancho-Albero, M.; Andreu, V.; Pérez, M.; Luján, L.; Irusta, S.; Arruebo, M.; Mendoza, G. Drug-eluting wound dressings having sustained release of antimicrobial compounds. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *152*, 327-339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.05.025>.
 - (19) Boateng, J. S.; Matthews, K. H.; Stevens, H. N. E.; Eccleston, G. M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97* (8), 2892-2923. <https://doi.org/10.1002/jps.21210>.
 - (20) Seaman, S. Dressing Selection in Chronic Wound Management. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* **2002**, *92* (1), 24-33. <https://doi.org/10.7547/87507315-92-1-24>.
 - (21) Homaeigohar, S.; Boccaccini, A. R. Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings. *Acta Biomater.* **2020**, *107*, 25-49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.022>.

- (22) British Pharmacopoeia. Conforming Bandage <https://www.pharmacopoeia.com/omitted-text?sort-by=html-title&page-size=80> (accessed ene 4, 2021).
- (23) Harding, K.; Cutting, K.; Price, P. The Cost-Effectiveness of Wound Management Protocols of Care. *Br. J. Nurs.* **2000**, *9* (19 Suppl), S6, S8, S10 passim. <https://doi.org/10.12968/bjon.2000.9.Sup3.12483>.
- (24) Thomas, S. Hydrocolloids. *J. Wound Care* **1992**, *1* (2), 27-30. <https://doi.org/10.12968/jowc.1992.1.2.27>.
- (25) Thomas, S.; Loveless, P. A comparative study of twelve hydrocolloid dressings. *World Wide Wounds* **1997**, *1*, 1-12.
- (26) Dhivya, S.; Padma, V. V.; Santhini, E. Wound Dressings - a Review. *BioMedicine* **2015**, *5* (4), 22. <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0022-9>.
- (27) Bheemidi, V. S.; Tiruckovela, M.; Varanasi, P. An Imperative Note on Novel Drug Delivery Systems. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2011**, *2* (7), 1-7. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000125>.
- (28) Laffleur, F.; Keckeis, V. Advances in drug delivery systems: Work in progress still needed? *Int. J. Pharm. X* **2020**, *2*, 100050. <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2020.100050>.
- (29) Akhtar, N. Vesicles: A Recently Developed Novel Carrier for Enhanced Topical Drug Delivery. *Current Drug Delivery*. 2014, pp 87-97. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/15672018113106660064>.
- (30) Jain, S.; Jain, V.; Mahajan, S. C. Lipid Based Vesicular Drug Delivery Systems. *Adv. Pharm.* **2014**, *2014*, 574673. <https://doi.org/10.1155/2014/574673>.
- (31) De Jong, W. H.; Borm, P. J. A. Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards. *Int. J. Nanomedicine* **2008**, *3* (2), 133-149. <https://doi.org/10.2147/ijn.s596>.
- (32) Khan, A. U.; Khan, M.; Cho, M. H.; Khan, M. M. Selected nanotechnologies and nanostructures for drug delivery, nanomedicine and cure. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2020**, *43* (8), 1339-1357. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02330-8>.
- (33) Gupta, S.; Nautiyal, U.; Aggarwal, A. NANO-TECHNOLOGY AND ITS USE: A REVIEW. *Eur. J. Environ. Ecol.* **2016**, *3* (2), 55-68.
- (34) Muller, J.; Huaux, F.; Moreau, N.; Misson, P.; Heilier, J. F.; Delos, M.; Arras, M.; Fonseca, A.; Nagy, J. B.; Lison, D. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *207* (3), 221-231. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.01.008>.
- (35) Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, *354* (6348), 56-58. <https://doi.org/10.1038/354056a0>.
- (36) Parveen, S.; Misra, R.; Sahoo, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery,

- therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2012**, *8* (2), 147-166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.016>.
- (37) Xu, Z. P.; Zeng, Q. H.; Lu, G. Q.; Yu, A. B. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61* (3), 1027-1040. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.06.019>.
- (38) Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramírez, J. T.; Yacaman, M. J. The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16* (10), 2346-2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>.
- (39) Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Control. Release* **1999**, *57* (2), 171-185. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00116-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00116-3).
- (40) Muller, R. H.; Keck, C. M. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J. Biotechnol.* **2004**, *113* (1), 151-170. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.007>.
- (41) Amato, G. Silica-Encapsulated Efficient and Stable Si Quantum Dots with High Biocompatibility. *Nanoscale Res. Lett.* **2010**, *5* (7), 1156-1160. <https://doi.org/10.1007/s11671-010-9619-9>.
- (42) Sapra, P.; Allen, T. M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42* (5), 439-462. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00032-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00032-8).
- (43) Lin, H.-Y.; Thomas, J. L. PEG-Lipids and Oligo(ethylene glycol) Surfactants Enhance the Ultrasonic Permeabilizability of Liposomes. *Langmuir* **2003**, *19* (4), 1098-1105. <https://doi.org/10.1021/la026604t>.
- (44) Hrkach, J.; Langer, R. From micro to nano: evolution and impact of drug delivery in treating disease. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2020**, *10* (3), 567-570. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00769-6>.
- (45) Cai, S.; Vijayan, K.; Cheng, D.; Lima, E. M.; Discher, D. E. Micelles of Different Morphologies—Advantages of Worm-like Filomicelles of PEO-PCL in Paclitaxel Delivery. *Pharm. Res.* **2007**, *24* (11), 2099-2109. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9335-z>.
- (46) Pata, V.; Dan, N. The Effect of Chain Length on Protein Solubilization in Polymer-Based Vesicles (Polymersomes). *Biophys. J.* **2003**, *85* (4), 2111-2118. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74639-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74639-6).
- (47) Efremova, N. V.; Bondurant, B.; O'Brie, D. F.; Leckband, D. E. Measurements of Interbilayer Forces and Protein Adsorption on Uncharged Lipid Bilayers Displaying Poly(ethylene glycol) Chains†. *Biochemistry* **2000**, *39* (12), 3441-

3451. <https://doi.org/10.1021/bi992095r>.
- (48) Coelho, J. F.; Ferreira, P. C.; Alves, P.; Cordeiro, R.; Fonseca, A. C.; Góis, J. R.; Gil, M. H. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA J.* **2010**, *1* (1), 164-209. <https://doi.org/10.1007/s13167-010-0001-x>.
- (49) Song, Z.; Yang, Z.; Yang, J.; Liu, Z.; Peng, Z.; Tang, R.; Gu, Y. Repair of Abdominal Wall Defects In Vitro and In Vivo Using VEGF Sustained-Release Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWNT) Composite Scaffolds. *PLoS One* **2013**, *8* (5), e64358.
- (50) Simmons, T. J.; Lee, S.-H.; Park, T.-J.; Hashim, D. P.; Ajayan, P. M.; Linhardt, R. J. Antiseptic single wall carbon nanotube bandages. *Carbon N. Y.* **2009**, *47* (6), 1561-1564. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.02.005>.
- (51) Silvestry-Rodriguez, N.; Sicairos-Ruelas, E. E.; Gerba, C. P.; Bright, K. R. Silver as a Disinfectant. En *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*; Springer New York: New York, NY, 2007; pp 23-45. https://doi.org/10.1007/978-0-387-69163-3_2.
- (52) Atiyeh, B. S.; Costagliola, M.; Hayek, S. N.; Dibo, S. A. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns* **2007**, *33* (2), 139-148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.06.010>.
- (53) Moreno, I.; Navascues, N.; Irusta, S.; Santamaria, J. Modulation of bactericidal action in polymer nanocomposites: light-tuned Ag⁺ release from electrospun PMMA fibers. *RSC Adv.* **2016**, *6* (81), 78036-78042. <https://doi.org/10.1039/C6RA16876K>.
- (54) Tian, J.; Wong, K. K. Y.; Ho, C.-M.; Lok, C.-N.; Yu, W.-Y.; Che, C.-M.; Chiu, J.-F.; Tam, P. K. H. Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. *ChemMedChem* **2007**, *2* (1), 129-136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cmdc.200600171>.
- (55) Dorazilová, J.; Muchová, J.; Šmerková, K.; Kočiová, S.; Diviš, P.; Kopel, P.; Veselý, R.; Pavlíňáková, V.; Adam, V.; Vojtová, L. Synergistic Effect of Chitosan and Selenium Nanoparticles on Biodegradation and Antibacterial Properties of Collagenous Scaffolds Designed for Infected Burn Wounds. *Nanomaterials* **2020**, *10* (10), 1971. <https://doi.org/10.3390/nano10101971>.
- (56) Balcucho, J.; Narváez, D. M.; Castro-Mayorga, J. L. Antimicrobial and Biocompatible Polycaprolactone and Copper Oxide Nanoparticle Wound Dressings against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Nanomaterials* **2020**, *10* (9), 1692. <https://doi.org/10.3390/nano10091692>.
- (57) Nunes, P. S.; Bezerra, M. S.; Costa, L. P.; Cardoso, J. C.; Albuquerque, R. L. C.; Rodrigues, M. O.; Barin, G. B.; da Silva, F. A.; Araújo, A. A. S. Thermal

- characterization of usnic acid/collagen-based films. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2010**, 99 (3), 1011-1014. <https://doi.org/10.1007/s10973-009-0661-8>.
- (58) Nunes, P. S.; Albuquerque-Júnior, R. L. C.; Cavalcante, D. R. R.; Dantas, M. D. M.; Cardoso, J. C.; Bezerra, M. S.; Souza, J. C. C.; Serafini, M. R.; Quitans-Jr, L. J.; Bonjardim, L. R.; et al. Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 2011, 761593. <https://doi.org/10.1155/2011/761593>.
- (59) da Silva, F. R.; Silva, R. O.; de Castro Oliveira, H. M.; Nunes Dourado, L. F.; da Costa, B. L.; Lima, B. S.; Lima Santos, N. G.; Palanch Repeke, C. E.; Menezes, G. B.; de Souza Araújo, A. A.; et al. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposomes: A new treatment strategy for corneal healing. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, 130, 110391. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110391>.
- (60) Xi, K.; Gu, Y.; Tang, J.; Chen, H.; Xu, Y.; Wu, L.; Cai, F.; Deng, L.; Yang, H.; Shi, Q.; et al. Microenvironment-responsive immunoregulatory electrospun fibers for promoting nerve function recovery. *Nat. Commun.* **2020**, 11 (1), 4504. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18265-3>.
- (61) Wang, Z.; Liu, L.; Xiang, S.; Jiang, C.; Wu, W.; Ruan, S.; Du, Q.; Chen, T.; Xue, Y.; Chen, H.; et al. Formulation and Characterization of a 3D-Printed Cryptotanshinone-Loaded Niosomal Hydrogel for Topical Therapy of Acne. *AAPS PharmSciTech* **2020**, 21 (5), 159. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01677-1>.
- (62) Amanat, S.; Taymouri, S.; Varshosaz, J.; Minaian, M.; Talebi, A. Carboxymethyl cellulose-based wafer enriched with resveratrol-loaded nanoparticles for enhanced wound healing. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2020**, 10 (5), 1241-1254. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00711-w>.
- (63) Kaparekar, P. S.; Pathmanapan, S.; Anandasadagopan, S. K. Polymeric scaffold of Gallic acid loaded chitosan nanoparticles infused with collagen-fibrin for wound dressing application. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 165, 930-947. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.212>.
- (64) Alberti, T. B.; Coelho, D. S.; de Prá, M.; Maraschin, M.; Veleirinho, B. Electrospun PVA nanoscaffolds associated with propolis nanoparticles with wound healing activity. *J. Mater. Sci.* **2020**, 55 (23), 9712-9727. <https://doi.org/10.1007/s10853-020-04502-z>.
- (65) Karimi Dehkordi, N.; Minaian, M.; Talebi, A.; Akbari, V.; Taheri, A. Nanocrystalline cellulose-hyaluronic acid composite enriched with GM-CSF loaded chitosan nanoparticles for enhanced wound healing. *Biomed. Mater.* **2019**, 14 (3), 35003. <https://doi.org/10.1088/1748-605x/ab026c>.
- (66) Farghaly Aly, U.; Aboutaleb, H. A.; Abdellatif, A. A.; Sameh Tolba, N. Formulation and evaluation of simvastatin polymeric nanoparticles loaded in hydrogel for optimum wound healing purpose. *Drug Des. Devel. Ther.*

- 2019**, Volume 13, 1567-1580. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S198413>.
- (67) Wutticharoenmongkol, P.; Hannirojram, P.; Nuthong, P. Gallic acid-loaded electrospun cellulose acetate nanofibers as potential wound dressing materials. *Polym. Adv. Technol.* **2019**, 30 (4), 1135-1147. <https://doi.org/10.1002/pat.4547>.
 - (68) Rath, G.; Hussain, T.; Chauhan, G.; Garg, T.; Goyal, A. K. Development and characterization of cefazolin loaded zinc oxide nanoparticles composite gelatin nanofiber mats for postoperative surgical wounds. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, 58, 242-253. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.050>.
 - (69) Shin, Y. C.; Shin, D.-M.; Lee, E. J.; Lee, J. H.; Kim, J. E.; Song, S. H.; Hwang, D.-Y.; Lee, J. J.; Kim, B.; Lim, D.; et al. Hyaluronic Acid/PLGA Core/Shell Fiber Matrices Loaded with EGCG Beneficial to Diabetic Wound Healing. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, 5 (23), 3035-3045. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adhm.201600658>.
 - (70) Alavarse, A. C.; de Oliveira Silva, F. W.; Colque, J. T.; da Silva, V. M.; Prieto, T.; Venancio, E. C.; Bonvent, J. J. Tetracycline hydrochloride-loaded electrospun nanofibers mats based on PVA and chitosan for wound dressing. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, 77, 271-281. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.199>.
 - (71) Rao, J. P.; Geckeler, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. Elsevier Ltd julio 1, 2011, pp 887-913. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>.
 - (72) Asua, J. M. Emulsion polymerization: From fundamental mechanisms to process developments. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2004**, 42 (5), 1025-1041. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pola.11096>.
 - (73) Thickett, S. C.; Gilbert, R. G. Emulsion polymerization: State of the art in kinetics and mechanisms. *Polymer*. Elsevier BV noviembre 16, 2007, pp 6965-6991. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.09.031>.
 - (74) Cohen, S.; Gelber, C.; Natan, M.; Banin, E.; Corem-Salkmon, E.; Margel, S. Synthesis and characterization of crosslinked polyisothiuronium methylstyrene nanoparticles of narrow size distribution for antibacterial and antibiofilm applications. *J. Nanobiotechnology* **2016**, 14 (1), 56. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0208-7>.
 - (75) Jiang, X.; Dausend, J.; Hafner, M.; Musyanovych, A.; Röcker, C.; Landfester, K.; Mailänder, V.; Nienhaus, G. U. Specific Effects of Surface Amines on Polystyrene Nanoparticles in their Interactions with Mesenchymal Stem Cells. *Biomacromolecules* **2010**, 11 (3), 748-753. <https://doi.org/10.1021/bm901348z>.
 - (76) Gaudin, F.; Sintès-Zydowicz, N. Core-shell biocompatible polyurethane nanocapsules obtained by interfacial step polymerisation in miniemulsion.

- Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, 331 (1-2), 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.07.028>.
- (77) Gurny, R.; Peppas, N. A.; Harrington, D. D.; Banker, G. S. Development of Biodegradable and Injectable Latices for Controlled Release of Potent Drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1981**, 7 (1), 1-25. <https://doi.org/10.3109/03639048109055684>.
- (78) Anton, N.; Benoit, J. P.; Saulnier, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *Journal of Controlled Release*. Elsevier junio 24, 2008, pp 185-199. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.007>.
- (79) Vauthier, C.; Bouchemal, K. Processing and Scale-up of Polymeric Nanoparticles. En *Intracellular Delivery. Fundamental Biomedical Technologies*, vol 5; Prokop, A., Ed.; Springer, Dordrecht, 2011. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1248-5_16.
- (80) Ganachaud, F.; Katz, J. L. Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices. *ChemPhysChem* **2005**, 6 (2), 209-216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cphc.200400527>.
- (81) Mishra, B.; Patel, B. B.; Tiwari, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Elsevier Inc. febrero 1, 2010, pp 9-24. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.008>.
- (82) Jeon, H. J.; Jeong, Y. Il; Jang, M. K.; Park, Y. H.; Nah, J. W. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *Int. J. Pharm.* **2000**, 207 (1-2), 99-108. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00537-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00537-8).
- (83) Jeong, Y.-I.; Cho, C.-S.; Kim, S.-H.; Ko, K.-S.; Kim, S.-I.; Shim, Y.-H.; Nah, J.-W. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles without surfactant. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, 80 (12), 2228-2236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.1326>.
- (84) Kostag, M.; Köhler, S.; Liebert, T.; Heinze, T. Pure Cellulose Nanoparticles from Trimethylsilyl Cellulose. *Macromol. Symp.* **2010**, 294 (2), 96-106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/masy.200900095>.
- (85) Castro Coelho, S.; Nogueiro Estevinho, B.; Rocha, F. Encapsulation in food industry with emerging electrohydrodynamic techniques: Electrospinning and electrospraying – A review. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd marzo 1, 2021, p 127850. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127850>.
- (86) Ondarçuhu, T.; Joachim, C. Drawing a single nanofibre over hundreds of microns. *Europhys. Lett.* **1998**, 42 (2), 215-220. <https://doi.org/10.1209/epl/i1998-00233-9>.

- (87) Xing, X.; Wang, Y.; Li, B. Nanofiber drawing and nanodevice assembly in poly(trimethylene terephthalate). *Opt. Express* **2008**, *16* (14), 10815-10822. <https://doi.org/10.1364/OE.16.010815>.
- (88) Feng, L.; Li, S.; Li, H.; Zhai, J.; Song, Y.; Jiang, L.; Zhu, D. Super-Hydrophobic Surface of Aligned Polyacrylonitrile Nanofibers. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41* (7), 1221-1223. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020402\)41:7<1221::AID-ANIE1221>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020402)41:7<1221::AID-ANIE1221>3.0.CO;2-G).
- (89) Martin, C. R. Membrane-Based Synthesis of Nanomaterials. *Chem. Mater.* **1996**, *8* (8), 1739-1746. <https://doi.org/10.1021/cm960166s>.
- (90) Chen, W.; Ma, J.; Zhu, L.; Morsi, Y.; El-Hamshary, H.; Al-Deyab, S. S.; Mo, X. Superelastic, superabsorbent and 3D nanofiber-assembled scaffold for tissue engineering. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *142*, 165-172. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.050>.
- (91) Yang, F.; Murugan, R.; Ramakrishna, S.; Wang, X.; Ma, Y.-X.; Wang, S. Fabrication of Nano-Structured Porous PLLA Scaffold Intended for Nerve Tissue Engineering. *Biomaterials* **2004**, *25* (10), 1891-1900. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.062>.
- (92) Liu, X.; Ma, P. X. Phase separation, pore structure, and properties of nanofibrous gelatin scaffolds. *Biomaterials* **2009**, *30* (25), 4094-4103. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.024>.
- (93) Hartgerink, J. D.; Beniash, E.; Stupp, S. I. Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers. *Science* **2001**, *294* (5547), 1684-1688. <https://doi.org/10.1126/science.1063187>.
- (94) Duan, Y.; Yan, S.; Zhou, X.; Xu, W.; Xu, H.; Liu, Z.; Zhang, L.; Zhang, C.; Cui, G.; Yao, L. The morphology transformation from helical nanofiber to helical nanotube in a diarylethene self-assembly system. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (61), 8335-8338. <https://doi.org/10.1039/C4CC02580F>.
- (95) Ellison, C. J.; Phatak, A.; Giles, D. W.; Macosko, C. W.; Bates, F. S. Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup. *Polymer (Guildf)*. **2007**, *48* (11), 3306-3316. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.04.005>.
- (96) Hassan, M. A.; Yeom, B. Y.; Wilkie, A.; Pourdeyhimi, B.; Khan, S. A. Fabrication of nanofiber meltblown membranes and their filtration properties. *J. Memb. Sci.* **2013**, *427*, 336-344. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.09.050>.
- (97) Anstey, A.; Chang, E.; Kim, E. S.; Rizvi, A.; Kakroodi, A. R.; Park, C. B.; Lee, P. C. Nanofibrillated polymer systems: Design, application, and current state of the art. *Progress in Polymer Science*. Elsevier Ltd febrero 1, 2021, p 101346. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2020.101346>.
- (98) Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication

- technique. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28* (3), 325-347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>.
- (99) Zeleny, J. The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces. *Phys. Rev.* **1914**, *3* (2), 69-91. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.3.69>.
- (100) Formhals, A. Process and apparatus for preparing artificial threads. US1975504A, 1934.
- (101) Yoo, J.; Won, Y.-Y. Phenomenology of the Initial Burst Release of Drugs from PLGA Microparticles. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6* (11), 6053-6062. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01228>.
- (102) Chen, W.; Palazzo, A.; Hennink, W. E.; Kok, R. J. Effect of Particle Size on Drug Loading and Release Kinetics of Gefitinib-Loaded PLGA Microspheres. *Mol. Pharm.* **2017**, *14* (2), 459-467. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00896>.
- (103) Kim, S.; Sah, H. Merits of sponge-like PLGA microspheres as long-acting injectables of hydrophobic drug. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2019**, *30* (18), 1725-1743. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1659712>.
- (104) Klose, D.; Siepmann, F.; Elkharraz, K.; Krenzlin, S.; Siepmann, J. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *Int. J. Pharm.* **2006**, *314* (2), 198-206. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.07.031>.
- (105) Kamaly, N.; Yameen, B.; Wu, J.; Farokhzad, O. C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (4), 2602-2663. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>.
- (106) Mylonaki, I.; Allémann, E.; Delie, F.; Jordan, O. Imaging the porous structure in the core of degrading PLGA microparticles: The effect of molecular weight. *J. Control. Release* **2018**, *286*, 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.07.044>.
- (107) Busatto, C.; Pesoa, J.; Helbling, I.; Luna, J.; Estenoz, D. Heterogeneous hydrolytic degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: Mathematical modeling. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (43), 45464. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.45464>.
- (108) Solorio, L.; Olear, A. M.; Hamilton, J. I.; Patel, R. B.; Beiswenger, A. C.; Wallace, J. E.; Zhou, H.; Exner, A. A. Noninvasive Characterization of the Effect of Varying PLGA Molecular Weight Blends on *In Situ* Forming Implant Behavior Using Ultrasound Imaging. *Theranostics* **2012**, *2* (11), 1064-1077. <https://doi.org/10.7150/thno.4181>.
- (109) Alejo, T.; Uson, L.; Arruebo, M. Reversible stimuli-responsive nanomaterials with on-off switching ability for biomedical applications. *J. Control. Release*

- 2019**, **314**, 162-176.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.036>.
- (110) Abasian, P.; Shakibi, S.; Maniati, M. S.; Nouri Khorasani, S.; Khalili, S. Targeted delivery, drug release strategies, and toxicity study of polymeric drug nanocarriers. *Polym. Adv. Technol.* **2020**, *n/a* (n/a).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pat.5168>.
- (111) Zhang, X.; Liu, W.; Wang, H.; Zhao, X.; Zhang, Z.; Nienhaus, G. U.; Shang, L.; Su, Z. Self-assembled thermosensitive luminescent nanoparticles with peptide-Au conjugates for cellular imaging and drug delivery. *Chinese Chem. Lett.* **2020**, *31* (3), 859-864. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2019.06.032>.
- (112) Peralta, M. E.; Jadhav, S. A.; Magnacca, G.; Scalarone, D.; Mártire, D. O.; Parolo, M. E.; Carlos, L. Synthesis and in vitro testing of thermoresponsive polymer-grafted core-shell magnetic mesoporous silica nanoparticles for efficient controlled and targeted drug delivery. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *544*, 198-205. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.02.086>.
- (113) Wang, S.; Wu, W.; Manghnani, P.; Xu, S.; Wang, Y.; Goh, C. C.; Ng, L. G.; Liu, B. Polymerization-Enhanced Two-Photon Photosensitization for Precise Photodynamic Therapy. *ACS Nano* **2019**, *13* (3), 3095-3105. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b08398>.
- (114) Gwon, K.; Jo, E. J.; Sahu, A.; Lee, J. Y.; Kim, M. G.; Tae, G. Improved near infrared-mediated hydrogel formation using diacrylated Pluronic F127-coated upconversion nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *90*, 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.029>.
- (115) Hegazy, M.; Zhou, P.; Wu, G.; Wang, L.; Rahoui, N.; Taloub, N.; Huang, X.; Huang, Y. Construction of polymer coated core-shell magnetic mesoporous silica nanoparticles with triple responsive drug delivery. *Polym. Chem.* **2017**, *8* (38), 5852-5864. <https://doi.org/10.1039/C7PY01179B>.
- (116) Zhu, Y.; Yao, L.; Liu, Z.; Weng, W.; Cheng, K. Electrical Potential Specified Release of BSA/Hep/Polypyrrole Composite Film and Its Cellular Responses. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (28), 25457-25464. <https://doi.org/10.1021/acsaami.9b09333>.
- (117) Hosseini-Nassab, N.; Samanta, D.; Abdolazimi, Y.; Annes, J. P.; Zare, R. N. Electrically controlled release of insulin using polypyrrole nanoparticles. *Nanoscale* **2017**, *9* (1), 143-149. <https://doi.org/10.1039/C6NR08288B>.
- (118) Luo, Z.; Jin, K.; Pang, Q.; Shen, S.; Yan, Z.; Jiang, T.; Zhu, X.; Yu, L.; Pang, Z.; Jiang, X. On-Demand Drug Release from Dual-Targeting Small Nanoparticles Triggered by High-Intensity Focused Ultrasound Enhanced Glioblastoma-Targeting Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (37), 31612-31625. <https://doi.org/10.1021/acsaami.7b10866>.
- (119) Hajebi, S.; Rabiee, N.; Bagherzadeh, M.; Ahmadi, S.; Rabiee, M.; Roghani-Mamaqani, H.; Tahriri, M.; Tayebi, L.; Hamblin, M. R. Stimulus-responsive

- polymeric nanogels as smart drug delivery systems. *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc julio 1, 2019, pp 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.018>.
- (120) Kocak, G.; Tuncer, C.; Bütün, V. pH-Responsive polymers. *Polym. Chem.* **2017**, 8 (1), 144-176. <https://doi.org/10.1039/C6PY01872F>.
- (121) Raza, A.; Rasheed, T.; Nabeel, F.; Hayat, U.; Bilal, M.; Iqbal, H. M. N. Endogenous and Exogenous Stimuli-Responsive Drug Delivery Systems for Programmed Site-Specific Release. *Molecules* . 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24061117>.
- (122) Bungau, S.; Tit, D. M.; Behl, T.; Aleya, L.; Zaha, D. C. Aspects of excessive antibiotic consumption and environmental influences correlated with the occurrence of resistance to antimicrobial agents. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* **2021**, 19, 100224. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.10.012>.
- (123) Furfaro, L. L.; Payne, M. S.; Chang, B. J. Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles . *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* . 2018, p 376.
- (124) Hiltunen, T.; Virta, M.; Laine, A.-L. Antibiotic resistance in the wild: an evolutionary perspective. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2017**, 372 (1712), 20160039. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0039>.
- (125) O'Neill, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev. Antimicrob. Resist.* **2014**.
- (126) European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2018*; Stockholm, 2018. <https://doi.org/10.2900/22212>.
- (127) Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A. K. M.; Wertheim, H. F. L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G. L.; Gould, I. M.; Goossens, H.; et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet. Infect. Dis.* **2013**, 13 (12), 1057-1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9).
- (128) Zaha, D. C.; Bungau, S.; Aleya, S.; Tit, D. M.; Vesa, C. M.; Popa, A. R.; Pantis, C.; Maghiar, O. A.; Bratu, O. G.; Furau, C.; et al. What antibiotics for what pathogens? The sensitivity spectrum of isolated strains in an intensive care unit. *Sci. Total Environ.* **2019**, 687, 118-127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.076>.
- (129) Sendra, E. Essential Oils in Foods: From Ancient Times to the 21st Century. *Foods (Basel, Switzerland)* **2016**, 5 (2), 43. <https://doi.org/10.3390/foods5020043>.
- (130) Elshafie, H. S.; Camele, I. An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health. *Biomed Res. Int.* **2017**, 2017, 9268468. <https://doi.org/10.1155/2017/9268468>.

- (131) Langeveld, W. T.; Veldhuizen, E. J. A.; Burt, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit. Rev. Microbiol.* **2014**, *40* (1), 76-94. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.763219>.
- (132) Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (2), 909-915. <https://doi.org/10.1128/AAC.05741-11>.
- (133) Walsh, S. E.; Maillard, J.-Y.; Russell, A. D.; Catrenich, C. E.; Charbonneau, D. L.; Bartolo, R. G. Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility. *J. Hosp. Infect.* **2003**, *55* (2), 98-107. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(03\)00240-8](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(03)00240-8).
- (134) Bassolé, Imaël Henri Nestor; Juliani, H. R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules.* **2012**. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>.
- (135) Billing, J.; Sherman, P. W. Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol.* **1998**, *73* (1), 3-49. <https://doi.org/10.1086/420058>.
- (136) Bilia, A. R.; Guccione, C.; Isacchi, B.; Righeschi, C.; Firenzuoli, F.; Bergonzi, M. C. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2014**, *2014*, 651593. <https://doi.org/10.1155/2014/651593>.
- (137) Satyal, P.; Murray, B. L.; McFeeters, R. L.; Setzer, W. N. Essential Oil Characterization of *Thymus Vulgaris* from Various Geographical Locations. *Foods (Basel, Switzerland)* **2016**, *5* (4), 70. <https://doi.org/10.3390/foods5040070>.
- (138) García-Salinas, S.; Elizondo-Castillo, H.; Arruebo, M.; Mendoza, G.; Irusta, S. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. *Molecules* **2018**, *23* (6). <https://doi.org/10.3390/molecules23061399>.
- (139) Betancourt, L.; Phandanauvong, V.; Patiño, R.; Ariza-Nieto, C.; Afanador-Téllez, G. Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *origanum* and *lippia* genus. *Rev. la Fac. Med. Vet. y Zootec.* **2012**, *59* (1), 21-31.
- (140) Vatter, D. A.; Mihalik, K.; Crixell, S. H.; McLean, R. J. C. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia* **2007**, *78* (4), 302-310. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2007.03.009>.
- (141) Nazzaro, F.; Fratianni, F.; De Martino, L.; Coppola, R.; De Feo, V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* **2013**, *6* (12), 1451-1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>.

- (142) da Silva, F. A. G.; Alcaraz-Espinoza, J. J.; da Costa, M. M.; de Oliveira, H. P. Synthesis and characterization of highly conductive polypyrrole-coated electrospun fibers as antibacterial agents. *Compos. Part B Eng.* **2017**. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.07.080>.
- (143) De Paula, M. M. M.; Bassous, N. J.; Afewerki, S.; Harb, S. V.; Ghannadian, P.; Marciano, F. R.; Viana, B. C.; Tim, C. R.; Webster, T. J.; Lobo, A. O. Understanding the impact of crosslinked PCL/PEG/GelMA electrospun nanofibers on bactericidal activity. *PLoS One* **2018**, *13* (12), 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209386>.
- (144) İnal, M.; Mülazımoğlu, G. Production and characterization of bactericidal wound dressing material based on gelatin nanofiber. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.119>.
- (145) Shalumon, K. T.; Anulekha, K. H.; Nair, S. V.; Nair, S. V.; Chennazhi, K. P.; Jayakumar, R. Sodium alginate/poly(vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011, pp 247-254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.04.005>.
- (146) Sirelkhatim, A.; Mahmud, S.; Seeni, A.; Kaus, N. H. M.; Ann, L. C.; Bakhori, S. K. M.; Hasan, H.; Mohamad, D. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-micro Lett.* **2015**, *7* (3), 219-242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>.
- (147) Rath, G.; Hussain, T.; Chauhan, G.; Garg, T.; Goyal, A. K. Collagen nanofiber containing silver nanoparticles for improved wound-healing applications. *J. Drug Target.* **2016**, *24* (6), 520-529. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1095922>.
- (148) Ahire, J. J.; Neveling, D. P.; Dicks, L. M. T. Polyacrylonitrile (PAN) nanofibres spun with copper nanoparticles: an anti-Escherichia coli membrane for water treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102* (16), 7171-7181. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9051-0>.
- (149) Cui, S.; Sun, X.; Li, K.; Gou, D.; Zhou, Y.; Hu, J.; Liu, Y. Polylactide nanofibers delivering doxycycline for chronic wound treatment. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109745>.
- (150) Ajmal, G.; Bonde, G. V.; Thokala, S.; Mittal, P.; Khan, G.; Singh, J.; Pandey, V. K.; Mishra, B. Ciprofloxacin HCl and quercetin functionalized electrospun nanofiber membrane: fabrication and its evaluation in full thickness wound healing. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **2019**, *47* (1), 228-240. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1548475>.
- (151) Bakhsheshi-Rad, H. R.; Ismail, A. F.; Aziz, M.; Akbari, M.; Hadisi, Z.; Daroonparvar, M.; Chen, X. B. Antibacterial activity and in vivo wound healing evaluation of polycaprolactone-gelatin methacryloyl-cephalexin electrospun nanofibrous. *Mater. Lett.* **2019**.

- <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126618>.
- (152) Niño-Martínez, N.; Salas Orozco, M. F.; Martínez-Castañón, G.-A.; Torres Méndez, F.; Ruiz, F. Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Metal and Metal Oxide Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* . 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20112808>.
 - (153) Panáček, A.; Kvítek, L.; Smékalová, M.; Večeřová, R.; Kolář, M.; Röderová, M.; Dyčka, F.; Šebela, M.; Pucek, R.; Tomanec, O.; et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat. Nanotechnol.* **2018**, *13* (1), 65-71. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y>.
 - (154) Tampau, A.; González-Martínez, C.; Chiralt, A. Carvacrol encapsulation in starch or PCL based matrices by electrospinning. *J. Food Eng.* **2017**, *214*, 245-256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.07.005>.
 - (155) Tampau, A.; González-Martínez, C.; Chiralt, A. Release kinetics and antimicrobial properties of carvacrol encapsulated in electrospun poly-(ε-caprolactone) nanofibres. Application in starch multilayer films. *Food Hydrocoll.* **2018**, *79*, 158-169. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.021>.
 - (156) Karami, Z.; Rezaeian, I.; Zahedi, P.; Abdollahi, M. Preparation and performance evaluations of electrospun poly(ε-caprolactone), poly(lactic acid), and their hybrid (50/50) nanofibrous mats containing thymol as an herbal drug for effective wound healing. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *129* (2), 756-766. <https://doi.org/10.1002/app.38683>.
 - (157) Justo, O. R.; Simioni, P. U.; Gabriel, D. L.; Tamashiro, W. M. da S. C.; Rosa, P. de T. V.; Moraes, Â. M. Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line: the influence of vehicle type. *BMC Complement. Altern. Med.* **2015**, *15* (1), 390. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0896-9>.
 - (158) Soares-Bezerra, J. R.; Calheiros, S. A.; Da Silva Ferreira, C. N.; Da Silva Frutuoso, V.; Alves, A. L. Natural Products as a Source for New Anti-Inflammatory and Analgesic Compounds through the Inhibition of Purinergic P2X Receptors. *Pharmaceuticals* . 2013. <https://doi.org/10.3390/ph6050650>.
 - (159) Cárdeno, A.; Aparicio-Soto, M.; Montserrat-de la Paz, S.; Bermudez, B.; Muriana, F. J. G.; Alarcón-de-la-Lastra, C. Squalene targets pro- and anti-inflammatory mediators and pathways to modulate over-activation of neutrophils, monocytes and macrophages. *J. Funct. Foods* **2015**, *14*, 779-790. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.03.009>.
 - (160) Liang, G.; Zhou, H.; Wang, Y.; Gurley, E. C.; Feng, B.; Chen, L.; Xiao, J.; Yang, S.; Li, X. Inhibition of LPS-induced production of inflammatory factors in the macrophages by mono-carbonyl analogues of curcumin. *J. Cell. Mol. Med.*

- 2009**, 13 (9b), 3370-3379. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00711.x>.
- (161) Gholijani, N.; Gharagozloo, M.; Kalantar, F.; Ramezani, A.; Amirghofran, Z. Modulation of Cytokine Production and Transcription Factors Activities in Human Jurkat T Cells by Thymol and Carvacrol. *Adv. Pharm. Bull.* **2015**, 5 (Suppl 1), 653-660. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.089>.
- (162) García-Salinas, S.; Evangelopoulos, M.; Gámez-Herrera, E.; Arruebo, M.; Irusta, S.; Taraballi, F.; Mendoza, G.; Tasciotti, E. Electrospun anti-inflammatory patch loaded with essential oils for wound healing. *Int. J. Pharm.* **2020**, 577. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119067>.
- (163) Moreno, I. Síntesis de nanofibras por electrospinning: materiales avanzados para aplicaciones diversas, Universidad de Zaragoza, 2016.
- (164) International, A. ASTM E2180-18, Standard Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) In Polymeric or Hydrophobic Materials. <https://doi.org/10.1520/E2180-18>.
- (165) Sarabi-Mianeji, S.; Scott, J.; Pagé, D. J. Y. S. Impact of electrospinning process parameters on the measured current and fiber diameter. *Polym. Eng. Sci.* **2015**, 55 (11), 2576-2582. <https://doi.org/10.1002/pen.24150>.
- (166) Nasouri, K.; Shoushtari, A. M.; Mojtahedi, M. R. M. Effects of polymer/solvent systems on electrospun polyvinylpyrrolidone nanofiber morphology and diameter. *Polym. Sci. Ser. A* **2015**, 57 (6), 747-755. <https://doi.org/10.1134/S0965545X15060164>.
- (167) Megelski, S.; Stephens, J. S.; Chase, D. B.; Rabolt, J. F. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules* **2002**, 35 (22), 8456-8466. <https://doi.org/10.1021/ma020444a>.
- (168) Lopresti, F.; Carfi Pavia, F.; Vitrano, I.; Kersaudy-Kerhoas, M.; Brucato, V.; La Carrubba, V. Effect of hydroxyapatite concentration and size on morpho-mechanical properties of PLA-based randomly oriented and aligned electrospun nanofibrous mats. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2020**, 101, 103449. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.103449>.
- (169) Aijaz, M. O.; Karim, M. R.; Alharbi, H. F.; Alharthi, N. H. Novel optimised highly aligned electrospun PEI-PAN nanofibre mats with excellent wettability. *Polymer (Guildf)*. **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2019.121665>.
- (170) Mishra, R. K.; Mishra, P.; Verma, K.; Mondal, A.; Chaudhary, R. G.; Abolhasani, M. M.; Loganathan, S. Electrospinning production of nanofibrous membranes. *Environ. Chem. Lett.* **2019**, 17 (2), 767-800. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-00838-w>.
- (171) Luo, C. J.; Nangrejo, M.; Edirisinghe, M. A novel method of selecting solvents

- for polymer electrospinning. *Polymer (Guildf)*. **2010**, 51 (7), 1654-1662. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2010.01.031>.
- (172) Oliveira, C. E. L. de; Cremasco, M. A. Determination of the vapor pressure of *Lippia gracilis* Schum essential oil by thermogravimetric analysis. *Thermochim. Acta* **2014**, 577, 1-4. <https://doi.org/10.1016/J.TCA.2013.11.023>.
- (173) H. Jones, A. Sublimation Pressure Data for Organic Compounds. *J. Chem. & Eng. Data* **2002**, 5 (2), 196-200. <https://doi.org/10.1021/je60006a019>.
- (174) Ghaderi-Ghahfarokhi, M.; Barzegar, M.; Sahari, M. A.; Azizi, M. H. Nanoencapsulation Approach to Improve Antimicrobial and Antioxidant Activity of Thyme Essential Oil in Beef Burgers During Refrigerated Storage. *Food Bioprocess Technol.* **2016**, 9 (7), 1187-1201. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1708-z>.
- (175) Hosseini, S. F.; Zandi, M.; Rezaei, M.; Farahmandghavi, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 95 (1), 50-56. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.02.031>.
- (176) Kumar, A.; Kujur, A.; Singh, P. P.; Prakash, B. Nanoencapsulated plant-based bioactive formulation against food-borne molds and aflatoxin B1 contamination: Preparation, characterization and stability evaluation in the food system. *Food Chem.* **2019**, 287, 139-150. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.02.045>.
- (177) Zhu, Z.; Min, T.; Zhang, X.; Wen, Y. Microencapsulation of Thymol in Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA): Physical and Antibacterial Properties. *Materials (Basel)*. **2019**, 12 (7). <https://doi.org/10.3390/ma12071133>.
- (178) Sievens-Figueroa, L.; Pandya, N.; Bhakay, A.; Keyvan, G.; Michniak-Kohn, B.; Bilgili, E.; Davé, R. N. Using USP I and USP IV for Discriminating Dissolution Rates of Nano- and Microparticle-Loaded Pharmaceutical Strip-Films. *AAPS PharmSciTech* **2012**, 13 (4), 1473-1482. <https://doi.org/10.1208/s12249-012-9875-3>.
- (179) National Center for Biotechnology Information. Squalene, CID=638072 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Squalene> (accessed oct 19, 2019).
- (180) Sitaramaraju, Y.; van Hul, A.; Wolfs, K.; Van Schepdael, A.; Hoogmartens, J.; Adams, E. Static headspace gas chromatography of (semi-)volatile drugs in pharmaceuticals for topical use. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 47 (4-5), 834-840. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2008.04.006>.
- (181) J. Queimada, A.; L. Mota, F.; P. Pinho, S.; A. Macedo, E. Solubilities of Biologically Active Phenolic Compounds: Measurements and Modeling. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113 (11), 3469-3476.

- <https://doi.org/10.1021/jp808683y>.
- (182) Bartnikowski, M.; Dargaville, T. R.; Ivanovski, S.; Hutmacher, D. W. Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry, geometry and environment. *Progress in Polymer Science*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2019.05.004>.
 - (183) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; Bryce, D. L. *Spectrometric identification of organic compounds*; John Wiley & Sons, 2014.
 - (184) Castola, V.; Mazzoni, V.; Corticchiato, M.; Bighelli, A.; Casanova, J. Hydrogen-bonding effect on carbon-13 NMR chemical shifts of naturally occurring phenols. *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.* **1997**.
 - (185) Charisiadis, P.; Kontogianni, V. G.; Tsiafoulis, C. G.; Tzakos, A. G.; Siskos, M.; Gerothanassis, I. P. ¹H-NMR as a structural and analytical tool of intra- and intermolecular hydrogen bonds of phenol-containing natural products and model compounds. *Molecules* **2014**, *19* (9), 13643-13682. <https://doi.org/10.3390/molecules190913643>.
 - (186) García-Salinas, S.; Gámez, E.; Asín, J.; de Miguel, R.; Andreu, V.; Sancho-Albero, M.; Mendoza, G.; Irusta, S.; Arruebo, M. Efficiency of Antimicrobial Electrospun Thymol-Loaded Polycaprolactone Mats In Vivo. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3* (5), 3430-3439. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00419>.
 - (187) ISO 10993-5:2009: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.
 - (188) Papadimitriou, S.; Bikiaris, D.; Avgoustakis, K.; Karavas, E.; Georgarakis, M. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *73* (1), 44-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.007>.
 - (189) Xiong, M.-H.; Bao, Y.; Yang, X.-Z.; Zhu, Y.-H.; Wang, J. Delivery of antibiotics with polymeric particles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *78*, 63-76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.02.002>.
 - (190) José Alonso, M. Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomed. Pharmacother.* **2004**, *58* (3), 168-172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2004.01.007>.
 - (191) Nagarwal, R. C.; Kant, S.; Singh, P. N.; Maiti, P.; Pandit, J. K. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *J. Control. Release* **2009**, *136* (1), 2-13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.12.018>.
 - (192) Ensign, L. M.; Cone, R.; Hanes, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64* (6), 557-570. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.009>.
 - (193) Priyanka, R.; Bhattacharyya, S. A REVIEW ON PROMISING ANTIBIOTIC

- THERAPY BY NOVEL DELIVERY SYSTEMS. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2018**, *11* (5 SE-Review Article(s)). <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i5.23999>.
- (194) Oh, D.-H. Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. *IET Nanobiotechnology* **2015**, *9* (6), 396-400(4).
- (195) Fresta, M.; Puglisi, G.; Giammona, G.; Cavallaro, G.; Micali, N.; Furneri, P. M. Pefloxacin Mesilate- and Ofloxacin-Loaded Polyethylcyanoacrylate Nanoparticles: Characterization of the Colloidal Drug Carrier Formulation. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84* (7), 895-902. <https://doi.org/10.1002/jps.2600840721>.
- (196) Misra, R.; Acharya, S.; Dilnawaz, F.; Sahoo, S. K. Sustained Antibacterial Activity of Doxycycline-Loaded Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) and Poly(Epsilon-Caprolactone) Nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. **2009**, *4* (5), 519-530. <https://doi.org/10.2217/nnm.09.28>.
- (197) Singh, N.; Romero, M.; Travanut, A.; Monteiro, P. F.; Jordana-Lluch, E.; Hardie, K. R.; Williams, P.; Alexander, M. R.; Alexander, C. Dual bioresponsive antibiotic and quorum sensing inhibitor combination nanoparticles for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in vitro and ex vivo. *Biomater. Sci.* **2019**, *7* (10), 4099-4111. <https://doi.org/10.1039/C9BM00773C>.
- (198) Chereddy, K. K.; Vandermeulen, G.; Pr  at, V. PLGA based drug delivery systems: Promising carriers for wound healing activity. *Wound Repair Regen.* **2016**, *24* (2), 223-236. <https://doi.org/10.1111/wrr.12404>.
- (199) Mundargi, R. C.; Babu, V. R.; Rangaswamy, V.; Patel, P.; Aminabhavi, T. M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J. Control. Release* **2008**, *125* (3), 193-209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.013>.
- (200) Alshora, D. H.; Ibrahim, M. A.; Alanazi, F. K. Chapter 6 - Nanotechnology from particle size reduction to enhancing aqueous solubility; Grumezescu, A. M. B. T.-S. C. of N., Ed.; William Andrew Publishing, 2016; pp 163-191. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42861-3.00006-6>.
- (201) López-López, M.; Fernández-Delgado, A.; Moy  , M. L.; Blanco-Ar  valo, D.; Carrera, C.; de la Haba, R. R.; Ventosa, A.; Bernal, E.; López-Cornejo, P. Optimized Preparation of Levofloxacin Loaded Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutics* . 2019. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020057>.
- (202) Ochubiojo Emeje, M.; Chinwude Obidike, I.; Ibanga Akpabio, E.; Ifianyi Ofoefule, S. Nanotechnology in Drug Delivery. En *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*; Sezer, A. D., Ed.; IntechOpen, 2012; pp 69-106. <https://doi.org/10.5772/51384>.
- (203) Noyes, A. A.; Whitney, W. R. THE RATE OF SOLUTION OF SOLID SUBSTANCES IN THEIR OWN SOLUTIONS. *J. Am. Chem. Soc.* **1897**, *19* (12), 930-934. <https://doi.org/10.1021/ja02086a003>.

- (204) Imbuluzqueta, E.; Lemaire, S.; Gamazo, C.; Elizondo, E.; Ventosa, N.; Veciana, J.; Van Bambeke, F.; Blanco-Prieto, M. J. Cellular Pharmacokinetics and Intracellular Activity against *Listeria Monocytogenes* and *Staphylococcus Aureus* of Chemically Modified and Nanoencapsulated Gentamicin. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67* (9), 2158-2164. <https://doi.org/10.1093/jac/dks172>.
- (205) Sadozai, S. K.; Khan, S. A.; Karim, N.; Becker, D.; Steinbrück, N.; Gier, S.; Baseer, A.; Breinig, F.; Kickelbick, G.; Schneider, M. Ketoconazole-loaded PLGA nanoparticles and their synergism against *Candida albicans* when combined with silver nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *56*, 101574. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101574>.
- (206) Anversa Dimer, F.; de Souza Carvalho-Wodarz, C.; Goes, A.; Cirnski, K.; Herrmann, J.; Schmitt, V.; Pätzold, L.; Abed, N.; De Rossi, C.; Bischoff, M.; et al. PLGA nanocapsules improve the delivery of clarithromycin to kill intracellular *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium abscessus*. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2020**, *24*, 102125. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102125>.
- (207) Qiao, Z.; Yuan, Z.; Zhang, W.; Wei, D.; Hu, N. Preparation, in vitro release and antibacterial activity evaluation of rifampicin and moxifloxacin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **2019**, *47* (1), 790-798. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1581792>.
- (208) Iadnut, A.; Mamoon, K.; Thammasit, P.; Pawichai, S.; Tima, S.; Preechasuth, K.; Kaewkod, T.; Tragoolpua, Y.; Tragoolpua, K. In Vitro Antifungal and Antivirulence Activities of Biologically Synthesized Ethanolic Extract of Propolis-Loaded PLGA Nanoparticles against *Candida albicans*. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2019**, *2019*, 3715481. <https://doi.org/10.1155/2019/3715481>.
- (209) de Mélo Silva, I. S.; do Amorim Costa Gaspar, L. M.; Rocha, A. M. O.; da Costa, L. P.; Tada, D. B.; Franceschi, E.; Padilha, F. F. Encapsulation of Red Propolis in Polymer Nanoparticles for the Destruction of Pathogenic Biofilms. *AAPS PharmSciTech* **2020**, *21* (2), 49. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1576-8>.
- (210) Gao, M.; Long, X.; Du, J.; Teng, M.; Zhang, W.; Wang, Y.; Wang, X.; Wang, Z.; Zhang, P.; Li, J. Enhanced curcumin solubility and antibacterial activity by encapsulation in PLGA oily core nanocapsules. *Food Funct.* **2020**, *11* (1), 448-455. <https://doi.org/10.1039/C9FO00901A>.
- (211) Parmar, A.; Kaur, G.; Kapil, S.; Sharma, V.; Sharma, S. Central composite design-based optimization and fabrication of benzylisothiocyanate-loaded PLGA nanoparticles for enhanced antimicrobial attributes. *Appl. Nanosci.* **2020**, *10* (2), 379-389. <https://doi.org/10.1007/s13204-019-01185-0>.
- (212) Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. Antibiotic

- Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, 45 (4_ts), 493-496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493.
- (213) Chakraborty, S.; Liao, I.-C.; Adler, A.; Leong, K. W. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, 61 (12), 1043-1054. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.013>.
- (214) Nguyen, D. N.; Clasen, C.; Van den Mooter, G. Pharmaceutical Applications of Electrospraying. *J. Pharm. Sci.* **2016**, 105 (9), 2601-2620. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.024>.
- (215) Huang, W.; Hou, Y.; Lu, X.; Gong, Z.; Yang, Y.; Lu, X.-J.; Liu, X.-L.; Yu, D.-G. The Process-Property-Performance Relationship of Medicated Nanoparticles Prepared by Modified Coaxial Electrospraying. *Pharmaceutics* **2019**, 11 (5), 226. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050226>.
- (216) Haider, S. Electrohydrodynamic Processes and Their Affecting Parameters; Haider, A., Ed.; IntechOpen: Rijeka, 2019; p Ch. 1. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89929>.
- (217) Heydari, Z.; Mohebbi-Kalhari, D.; Afarani, M. S. Engineered electrospun polycaprolactone (PCL)/octacalcium phosphate (OCP) scaffold for bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, 81, 127-132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.041>.
- (218) Aragón, J.; Feoli, S.; Irusta, S.; Mendoza, G. Composite scaffold obtained by electro-hydrodynamic technique for infection prevention and treatment in bone repair. *Int. J. Pharm.* **2019**, 557, 162-169. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.002>.
- (219) Trinca, R. B.; Westin, C. B.; da Silva, J. A. F.; Moraes, Â. M. Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions. *Eur. Polym. J.* **2017**, 88, 161-170. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.01.021>.
- (220) Rajan, B.; Sathish, S.; Jayakumar, S.; Madankumar, A.; Gokuladhas, K.; Premkumar, T.; Elamaram, R.; Gopikrishnan, M.; Devaki, T. Synthesis and in vitro anticancer evaluation of 2-isopropyl-5-methylphenol Loaded PLGA based iron oxide nanoparticles. *Biomed. Prev. Nutr.* **2014**, 4 (2), 137-141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bionut.2013.12.004>.
- (221) Moreira, A. C. G.; Martins, I. M.; Fernandes, I.; Barreiro, M. F.; Rodrigues, A. E. Microencapsulation of red and white thyme oil in poly(lactic-co-glycolic) acid: Assessment of encapsulation efficiency and antimicrobial capacity of the produced microcapsules. *Can. J. Chem. Eng.* **2016**, 94 (3), 469-475. <https://doi.org/10.1002/cjce.22411>.
- (222) Peppas, N. A.; Sahlin, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int. J. Pharm.* **1989**, 57 (2), 169-172. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90306-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90306-2).

- (223) International, A. ASTM E2149-01, Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions (Withdrawn 2010). **2001**. <https://doi.org/10.1520/E2149-01>.
- (224) Donlan, R. M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, 33 (8), 1387-1392. <https://doi.org/10.1086/322972>.
- (225) Characklis, W. G.; Cooksey, K. E. Biofilms and Microbial Fouling; Laskin, A. I. B. T.-A. in A. M., Ed.; Academic Press, 1983; Vol. 29, pp 93-138. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70355-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70355-1).
- (226) Goldberg, J. Biofilms and antibiotic resistance: A genetic linkage. *Trends Microbiol.* - *TRENDS MICROBIOL* **2002**, 10, 264. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02381-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02381-8).
- (227) Peng, J.-S.; Tsai, W.-C.; Chou, C.-C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, 77 (1), 11-18. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00060-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00060-0).
- (228) Chen, M. J.; Zhang, Z.; Bott, T. R. Direct measurement of the adhesive strength of biofilms in pipes by micromanipulation. *Biotechnol. Tech.* **1998**, 12 (12), 875-880. <https://doi.org/10.1023/A:1008805326385>.
- (229) Kjelleberg, S.; Molin, S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr. Opin. Microbiol.* **2002**, 5 (3), 254-258. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00325-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00325-9).
- (230) Garrett, T. R.; Bhakoo, M.; Zhang, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog. Nat. Sci.* **2008**, 18 (9), 1049-1056. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>.
- (231) Bowler, P. G.; Duerden, B. I.; Armstrong, D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, 14 (2), 244-269. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.244-269.2001>.
- (232) Rashid, H. The effect of surface roughness on ceramics used in dentistry: A review of literature. *Eur. J. Dent.* **2014**, 8 (4), 571—579. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.143646>.
- (233) Teughels, W.; Van Assche, N.; Sliepen, I.; Quirynen, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin. Oral Implants Res.* **2006**, 17 (S2), 68-81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>.
- (234) Fletcher, M.; Loeb, G. I. Influence of Substratum Characteristics on the Attachment of a Marine Pseudomonad to Solid Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, 37 (1), 67-72.
- (235) Vallet-Regi, M.; Rámila, A.; Del Real, R. P.; Pérez-Pariente, J. A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chem. Mater.* **2001**, 13 (2), 308-311.

- <https://doi.org/10.1021/cm0011559>.
- (236) Halamová, D.; Zeleňák, V. NSAID naproxen in mesoporous matrix MCM-41: Drug uptake and release properties. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2012**, 72 (1-2), 15-23. <https://doi.org/10.1007/s10847-011-9990-x>.
- (237) Kamarudin, N. H. N.; Jalil, A. A.; Triwahyono, S.; Sazegar, M. R.; Hamdan, S.; Baba, S.; Ahmad, A. Elucidation of acid strength effect on ibuprofen adsorption and release by aluminated mesoporous silica nanoparticles. *RSC Adv.* **2015**, 5 (38), 30023-30031. <https://doi.org/10.1039/c4ra16761a>.
- (238) Eren, Z. S.; Tunçer, S.; Gezer, G.; Yildirim, L. T.; Banerjee, S.; Yilmaz, A. Improved solubility of celecoxib by inclusion in SBA-15 mesoporous silica: Drug loading in different solvents and release. *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, 235, 211-223. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.08.014>.
- (239) Nieto Peña, A. Aplicaciones biomédicas de materiales mesoporosos de sílice y de carbón, Universidad Complutense de Madrid, 2011.
- (240) Feng, Y.; Panwar, N.; Tng, D. J. H.; Tjin, S. C.; Wang, K.; Yong, K.-T. The application of mesoporous silica nanoparticle family in cancer theranostics. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 319, 86-109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.04.019>.
- (241) Chen, Y.; Liu, S.; Hou, Z.; Ma, P.; Yang, D.; Li, C.; Lin, J. Multifunctional electrospinning composite fibers for orthotopic cancer treatment in vivo. *Nano Res.* **2015**, 8 (6), 1917-1931. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0701-y>.
- (242) Qian, K. K.; Bogner, R. H. Application of mesoporous silicon dioxide and silicate in oral amorphous drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.* **2012**, 101 (2), 444-463. <https://doi.org/10.1002/jps.22779>.
- (243) Limnell, T.; Heikkilä, T.; Santos, H. A.; Sistonen, S.; Hellstén, S.; Laaksonen, T.; Peltonen, L.; Kumar, N.; Murzin, D. Y.; Louhi-Kultanen, M.; et al. Physicochemical stability of high indomethacin payload ordered mesoporous silica MCM-41 and SBA-15 microparticles. *Int. J. Pharm.* **2011**, 416 (1), 242-251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.06.050>.
- (244) Wang, Y.; Zhao, Q.; Hu, Y.; Sun, L.; Bai, L.; Jiang, T.; Wang, S. Ordered Nanoporous Silica as Carriers for Improved Delivery of Water Insoluble Drugs: A Comparative Study between Three Dimensional and Two Dimensional Macroporous Silica. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, 8, 4015-4031. <https://doi.org/10.2147/IJN.S52605>.
- (245) Siefker, J.; Karande, P.; Coppens, M.-O. Packaging biological cargoes in mesoporous materials: Opportunities for drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, 11 (11), 1781-1793. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.938636>.

- (246) Moritz, M.; Łaniecki, M. Application of SBA-15 mesoporous material as the carrier for drug formulation systems. Papaverine hydrochloride adsorption and release study. *Powder Technol.* **2012**, *230*, 106-111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.powtec.2012.06.061>.
- (247) Liédana, N.; Marín, E.; Téllez, C.; Coronas, J. One-step encapsulation of caffeine in SBA-15 type and non-ordered silicas. *Chem. Eng. J.* **2013**, *223*, 714-721. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.03.041>.
- (248) Sousa, A. de; Sousa, E. M. B. de. Ordered mesoporous silica carrier system applied in nanobiothecnology. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2005**, *48* (spe2), 243-250. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000700036>.
- (249) Ahern, R. J.; Hanrahan, J. P.; Tobin, J. M.; Ryan, K. B.; Crean, A. M. Comparison of fenofibrate–mesoporous silica drug-loading processes for enhanced drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *50* (3), 400-409. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.026>.
- (250) Ambroggi, V.; Perioli, L.; Pagano, C.; Marmottini, F.; Ricci, M.; Sagnella, A.; Rossi, C. Use of SBA-15 for furosemide oral delivery enhancement. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *46* (1), 43-48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.02.004>.
- (251) Yu, H.; Zhai, Q.-Z. Mesoporous SBA-15 molecular sieve as a carrier for controlled release of nimodipine. *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, *123* (1), 298-305. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.04.013>.
- (252) Siavashani, A. Z.; Nazarpak, M. H.; Bakhsh, F. F.; Toliyat, T.; Solati-Hashjin, M. Preparation of Mesoporous Silica Nanoparticles for Insulin Drug Delivery. *Adv. Mater. Res.* **2014**, *829*, 251-257. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.829.251>.
- (253) Mellaerts, R.; A. G. Jammaer, J.; Van Speybroeck, M.; Chen, H.; Van Humbeeck, J.; Augustijns, P.; Van den Mooter, G.; A. Martens, J. Physical State of Poorly Water Soluble Therapeutic Molecules Loaded into SBA-15 Ordered Mesoporous Silica Carriers: A Case Study with Itraconazole and Ibuprofen. *Langmuir* **2008**, *24* (16), 8651-8659. <https://doi.org/10.1021/la801161g>.
- (254) Halamová, D.; Badaničová, M.; Zelenák, V.; Gondová, T.; Vainio, U. Naproxen drug delivery using periodic mesoporous silica SBA-15. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, *256* (22), 6489-6494. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.04.044>.
- (255) Moritz, M.; Łaniecki, M. SBA-15 mesoporous material modified with APTES as the carrier for 2-(3-benzoylphenyl)propionic acid. *Appl. Surf. Sci.* **2012**, *258* (19), 7523-7529. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.04.076>.
- (256) Alexa, I. F.; Ignat, M.; Popovici, R. F.; Timpu, D.; Popovici, E. In vitro

- controlled release of antihypertensive drugs intercalated into unmodified SBA-15 and MgO modified SBA-15 matrices. *Int. J. Pharm.* **2012**, *436* (1), 111-119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.036>.
- (257) Vallet-Regí, M.; Doadrio, J. C.; Doadrio, A. L.; Izquierdo-Barba, I.; Pérez-Pariente, J. Hexagonal ordered mesoporous material as a matrix for the controlled release of amoxicillin. *Solid State Ionics* **2004**, *172* (1), 435-439. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ssi.2004.04.036>.
- (258) Basaldella, E.; Legnoverde, M. Functionalized silica matrices for controlled delivery of cephalexin. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2010**, *56*, 191-196. <https://doi.org/10.1007/s10971-010-2293-7>.
- (259) Hashemikia, S.; Hemmatinejad, N.; Ahmadi, E.; Montazer, M. Optimization of tetracycline hydrochloride adsorption on amino modified SBA-15 using response surface methodology. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *443*, 105-114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.11.020>.
- (260) Moritz, M.; Janiecki, M. Modified SBA-15 as the carrier for metoprolol and papaverine: Adsorption and release study. *J. Solid State Chem.* **2011**, *184* (7), 1761-1767. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jssc.2011.05.015>.
- (261) Popova, M. D.; Szegedi, Á.; Kolev, I. N.; Mihály, J.; Tzankov, B. S.; Momkov, G. T.; Lambov, N. G.; Yoncheva, K. P. Carboxylic modified spherical mesoporous silicas as drug delivery carriers. *Int. J. Pharm.* **2012**, *436* (1), 778-785. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.061>.
- (262) Jobdeedamrong, A.; Jenjob, R.; Crespy, D. Encapsulation and Release of Essential Oils in Functional Silica Nanocontainers. *Langmuir* **2018**, *34* (44), 13235-13243. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01652>.
- (263) Belostozky, A.; Bretler, S.; Kolitz-Domb, M.; Grinberg, I.; Margel, S. Solidification of oil liquids by encapsulation within porous hollow silica microspheres of narrow size distribution for pharmaceutical and cosmetic applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *97*, 760-767. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.093>.
- (264) Ribes, S.; Ruiz-Rico, M.; Pérez-Esteve, É.; Fuentes, A.; Talens, P.; Martínez-Mañez, R.; Barat, J. M. Eugenol and thymol immobilised on mesoporous silica-based material as an innovative antifungal system: Application in strawberry jam. *Food Control* **2017**, *81*, 181-188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.006>.
- (265) Ribes, S.; Ruiz-Rico, M.; Pérez-Esteve, É.; Fuentes, A.; Barat, J. M. Enhancing the antimicrobial activity of eugenol, carvacrol and vanillin immobilised on silica supports against *Escherichia coli* or *Zygosaccharomyces rouxii* in fruit juices by their binary combinations. *LWT* **2019**, *113*, 108326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108326>.
- (266) Peña-Gómez, N.; Ruiz-Rico, M.; Fernández-Segovia, I.; Barat, J. M. Study of apple juice preservation by filtration through silica microparticles

- functionalised with essential oil components. *Food Control* **2019**, *106*, 106749. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106749>.
- (267) Janković-Tomanić, M.; Todorović, D.; Stanivuković, Z.; Perić Mataruga, V.; Wessjohann, L. A.; Kaluđerović, G. N. Mesoporous silica nanoparticles SBA-15 loaded with emodin upregulate the antioxidative defense of euproctis chrysorrhoea (L.) larvae. *Turkish J. Biol.* **2017**, *41* (6), 935-942. <https://doi.org/10.3906/biy-1705-76>.
- (268) Dong, X.; Fu, J.; Yin, X.; Cao, S.; Li, X.; Lin, L.; Huyiligeqi; Ni, J. Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. *Phyther. Res.* **2016**, *30* (8), 1207-1218. <https://doi.org/10.1002/ptr.5631>.
- (269) Wu, C.; Zhu, Y.; Wu, T.; Wang, L.; Yuan, Y.; Chen, J.; Hu, Y.; Pang, J. Enhanced functional properties of biopolymer film incorporated with curcumin-loaded mesoporous silica nanoparticles for food packaging. *Food Chem.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.010>.
- (270) M. Johansson, E.; A. Ballem, M.; M. Córdoba, J.; Odén, M. Rapid Synthesis of SBA-15 Rods with Variable Lengths, Widths, and Tunable Large Pores. *Langmuir* **2011**, *27* (8), 4994-4999. <https://doi.org/10.1021/la104864d>.
- (271) Gámez, E.; Elizondo-Castillo, H.; Tascon, J.; García-Salinas, S.; Navascues, N.; Mendoza, G.; Arruebo, M.; Irusta, S. Antibacterial effect of thymol loaded SBA-15 nanorods incorporated in PCL electrospun fibers. *Nanomaterials* **2020**, *10* (4). <https://doi.org/10.3390/nano10040616>.
- (272) Kryszak, D.; Stawicka, K.; Calvino-Casilda, V.; Martin-Aranda, R.; Ziolk, M. Imidazole immobilization in nanopores of silicas and niobiosilicates SBA-15 and MCF—A new concept towards creation of basicity. *Appl. Catal. A Gen.* **2017**, *531*, 139-150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apcata.2016.10.028>.
- (273) Xie, W.; Zhang, C. Propylsulfonic and arenesulfonic functionalized SBA-15 silica as an efficient and reusable catalyst for the acidolysis of soybean oil with medium-chain fatty acids. *Food Chem.* **2016**, *211*, 74-82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.025>.
- (274) Arrieta, M. P.; Peltzer, M. A.; Garrigós, M. del C.; Jiménez, A. Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *J. Food Eng.* **2013**, *114* (4), 486-494. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.09.002>.
- (275) Reneker, D. H.; Yarin, A. L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer (Guildf)*. **2008**, *49* (10), 2387-2425. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.02.002>.
- (276) Widartiningsih, P. M.; Iskandar, F.; Munir, M. M.; Viridi, S. Predicting jet radius in electrospinning by superpositioning exponential functions. *J. Phys. Conf. Ser.* **2016**, *739*, 12097. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/739/1/012097>.

-
- (277) Reneker, D. H.; Yarin, A.; Zussman, E.; Koombhongse, S.; Kataphinan, W. *Nanofiber manufacturing: Toward better process control*; 2006; Vol. 918.
- (278) Galiano, R. D.; Michaels, J. 5th; Dobryansky, M.; Levine, J. P.; Gurtner, G. C. Quantitative and Reproducible Murine Model of Excisional Wound Healing. *Wound Repair Regen.* **2004**, *12* (4), 485-492. <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x>.
- (279) Wang, X.; Ge, J.; Tredget, E. E.; Wu, Y. The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nat. Protoc.* **2013**, *8* (2), 302-309. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.002>.

ANEXOS

A.1. REACTIVOS

Para la realización del presente trabajo, se emplearon reactivos de diferentes casas comerciales, todos ellos sin realizar ninguna purificación previa a su empleo. A continuación, se detallan los mismos, separados en función de la casa comercial en la que se adquirieron.

- **Sigma-Aldrich:** ácido clorhídrico (HCl, 37 %), carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol, CAR, ≥ 95 %), escualeno ((6E,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexametil-tetracos-2,6,10,14,18,22-hexaeno, ESC, ≥ 98 %), cinamaldehído ((2E)-3-fenilprop-2-enal, CIN, > 95 %), heptano (≥ 99 %), naproxeno sódico ((S)-2-(6-metoxi-2-naftil)-propanoato de sodio, 98-102 %), policaprolactona (PCL, Mn = 80000 Da), pluronic® P-123 (Mn ≈ 5800 Da), (S)-(-)-limoneno ((S)-1-metil-4-(1-metiletenil)-ciclohexeno, ≥ 95 %), tampón fosfato salino (PBS), tetraetil ortosilicato (TEOS, ≥ 99.0 %), tirosol (4-(2-hidroxyetil)fenol, TIR, 98 %) y Tween 80 (Sigma-Aldrich).

- **Fisher Scientific:** diclorometano (DCM, < 99 %) y *N-N*-dimetilformamida (DMF, > 99 %).

- **Acros Organics:** timol (2-isopropil-5-metilfenol, TIM, 99 %).

- **VWR:** acetona (grado HPLC), acetonitrilo (≥ 99.9 %) metanol (≥ 99.9 %), ácido fórmico (98-100 %) y cloroformo deuterado (CDCl₃, 99.8 % D).

- **Laboratorios Conda-Pronadisa:** medio de cultivo de triptona de soja (*Tryptone Soy Broth*, TSB) y medio de cultivo de triptona de soja sólido (*Tryptone Soy Agar*, TSA).

- **Fluka:** fluoruro de amonio (NH₄F, ≥ 98.0 %).

- **Industrias Evonik AG:** ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) RESOMER® RG 504 (50:50, terminación éster).

- **Biowest:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* con L-glutamina (2 mM) y antibióticos (penicilina-estreptomicina-anfotericina B, 1 %) (DMEM).

- **Gibco:** *Fetal Bovine Serum* (FBS).

- **Salvat:** gluconato de clorhexidina (clorhexidina, 1 %)

A.2. TÉCNICAS DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

A.2.1. *Electrospinning*

Para la síntesis de todos los materiales se ha empleado un equipo de *electrospinning* YFlow 2.2 D500 (YFlow S.D.) equipado con tres bombas de jeringa independientes, dos fuentes de alto voltaje (una conectada a la aguja de inyección para proporcionar un voltaje positivo y la otra conectada al colector para proporcionar un voltaje negativo) y varios colectores intercambiables. Los colectores disponibles son un colector plano de aluminio de 30 x 30 cm, un colector plano de aluminio con forma de disco de 8 cm de diámetro y un colector rotatorio de varillas de 30 cm de largo y 20 cm de diámetro. Este último permite configurar la velocidad de rotación entre 200 y 1500 rpm.

Este equipo permite la síntesis de materiales tanto mediante la técnica de *electrospinning* como mediante la técnica de *electrospraying* cuyo fundamento ya se ha explicado previamente en la sección I.4.



Figura A.2- 1. Equipo de *electrospinning* YFlow 2.2 D500

A.2.2. SEM

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) permite observar la morfología de los materiales observados, así como determinar sus dimensiones. En este trabajo todas las muestras analizadas mediante esta técnica se visualizaron en un microscopio Inspect F50 de la compañía FEI, perteneciente al Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) del Instituto de Nanociencia de Aragón.

Para la visualización de las muestras mediante esta técnica, se cortó una pequeña sección de la misma que se adhirió a un porta-muestras con cinta de doble cara de carbono. Antes de la visualización al microscopio, dado que los polímeros empleados no son conductores, las muestras se recubrieron con una capa de 5 nm de Au/Pd. Para este proceso de recubrimiento se empleó una metalizadora Leica EM ACE200.

La técnica SEM se basa en el bombardeo de la muestra con un haz de electrones acelerados, barriéndose toda la superficie de la muestra. Cuando este haz incide en la muestra, los electrones del mismo interaccionan con los átomos de la muestra generando electrones secundarios, electrones retrodispersados y rayos X. Cada uno proporciona una información diferente, usándose los electrones secundarios como base para la generación de las imágenes de SEM. Las imágenes generadas mediante electrones retrodispersados aportan información sobre la composición química de la muestra mientras que los rayos X generados se pueden emplear para obtener información sobre la composición química de la muestra mediante espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDX).

Para el cálculo del diámetro de fibra y partículas sintetizadas, se midió el diámetro de 100 fibras o partículas en diversas zonas de, al menos, dos imágenes distintas de cada muestra. Con estos datos se calcularon el diámetro medio y la desviación estándar de las medidas. Estas medidas se realizaron con el programa ImageJ®.



Figura A.2- 2.
Microscopio Inspect
F50

A.2.3. TEM

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) permite la caracterización morfológica de materiales a unas magnificaciones más altas que las que se pueden alcanzar mediante SEM. En este trabajo, las muestras analizadas mediante TEM se visualizaron en un equipo Tecnai T20 de la compañía FEI.



Figura A.2- 3.

Microscopio Tecnai

T20

En esta técnica, se genera un haz de electrones que, mediante una serie de lentes condensadoras, converge sobre la muestra en un ángulo que determina la magnificación. Al atravesar la muestra, interaccionan los electrones con la misma y el haz de electrones generados tras esta interacción se emplea para construir la imagen final de la muestra.

Para la visualización de la muestra, ésta debe tener un espesor pequeño (de entre 200 y 400 nm) y estar depositada sobre una rejilla específica, en este trabajo en concreto de cobre con recubrimiento de carbono.

Para la obtención de las imágenes de TEM de este trabajo se ha contado con la ayuda de los doctores Nuria Navascués y Víctor Sebastián.

A.2.4. GC-MS

Para la determinación de la cantidad de compuesto cargado tanto en las membranas como en las partículas poliméricas, la técnica escogida fue la Cromatografía de Gases con detección mediante Espectrometría de Masas (GC-MS, por sus siglas en inglés). Esta técnica se basa en la separación de los distintos compuestos de la muestra debido a sus diferentes puntos de ebullición además de por su interacción con la columna cromatográfica, realizándose la elución del analito mediante un flujo de gas portador inerte mientras se aplica temperatura a la columna cromatográfica.

En este trabajo se empleó un cromatógrafo GC-MS Shimadzu 2010SE equipado con una columna capilar Zebron ZB-50 (Phenomenex, 30m x 0.25 mm, 0.25 μ m de espesor de fase), se utilizó Helio como gas portador a un flujo constante de 1 mL/min, se inyectó 1 μ L de muestra, trabajando en modo *split* con una proporción de 1:10.



Figura A.2- 4. Cromatógrafo Shimadzu 2010SE

A.2.4.1. Análisis de carvacrol y timol

Para el análisis de muestras con carvacrol y timol (además de limoneno, empleado como patrón interno) el programa de temperaturas empleado fue: temperatura inicial, 50 °C mantenida durante 1 minuto, subida hasta 160 °C a una velocidad de 10 °C/min y un incremento final hasta 200 °C a una velocidad de 20 °C/min. Las temperaturas del detector y del inyector se configuraron a 250 °C mientras que las temperaturas de la fuente de iones y la línea de transferencia se configuraron ambas a 200 °C. Con este método, se obtuvieron los siguientes tiempos de retención: carvacrol, 11.6 minutos; timol, 11.3 minutos y limoneno, 6.1 minutos.

A.2.4.2. Análisis de escualeno, tirosol y mezclas timol-tirosol y timol-escualeno

Para el análisis de muestras con escualeno, tirosol y su combinación con timol (además de limoneno, empleado como patrón interno) el programa de temperatura empleado fue: temperatura inicial, 50 °C mantenida durante 0.5 minutos, subida hasta 160 °C a una velocidad de 10 °C/min y un incremento final hasta 300 °C a una

velocidad de 35 °C/min, manteniendo esta temperatura durante 3 minutos. Las temperaturas del detector y del inyector se configuraron a 250 °C mientras que las temperaturas de la fuente de iones y la línea de transferencia se configuraron ambas a 200 °C. Con este método, se obtuvieron los siguientes tiempos de retención: escualeno, 17.3 minutos; tirosol, 13.3 minutos; timol, 10.8 minutos y limoneno, 5.7 minutos.

A.2.5. UPLC-UV-Vis

Para el análisis de las muestras obtenidas en los ensayos de liberación del compuesto activo se empleó la Cromatografía de Líquidos de Ultra-Alta Resolución (UPLC, por sus siglas en inglés). Esta técnica de separación se basa en la distinta afinidad que establece el analito entre la fase sólida depositada en la columna y el disolvente (o mezcla de ellos) empleados para su elución en función de su polaridad. La diferencia del UPLC respecto a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) se fundamenta en poder emplear unas presiones de fase móvil mucho más altas en combinación con el empleo de partículas de fase estacionaria mucho más pequeñas, lo que se traduce en un menor tiempo de elución sin pérdida de resolución, ya que los picos se hacen mucho más estrechos. Este estrechamiento de pico también se traduce en una disminución de la concentración mínima que se puede detectar, ya que, para una misma concentración, la altura de pico es mayor y se puede diferenciar más fácilmente del ruido de fondo.

En este trabajo, para el análisis de muestras mediante UPLC, se empleó un cromatógrafo ACQUITY UPLC® (Waters) equipado con un módulo calefactor para la columna, un detector de UV-Vis ACQ-PDA, una bomba cuaternaria ACQ-QSM y un módulo de control de muestra ACQ-FTN, controlado por el software Waters® Empower™. Para la cuantificación de los compuestos analizados, se preparó una recta de calibrado entre 2.5 y 300 ppm en metanol (etanol absoluto, en el caso del escualeno), añadiendo en todos los puntos una concentración de 25 ppm de naproxeno sódico (para las muestras que contienen carvacrol, timol, tirosol o una mezcla de timol y escualeno) o de 5 ppm de limoneno (para las muestras que

contienen escualeno) como patrón interno. Las muestras se inyectaron sin ningún tratamiento de las mismas más allá de la adición del patrón interno.



*Figura A.2- 5. Cromatógrafo
ACQUITY UPCL*

A.2.5.1. Análisis de carvacrol y timol

Para la cuantificación de muestras de carvacrol y timol se empleó una columna Acquity UPCL® BEH C18 (2.1 x 50 mm, diámetro de partícula 1.7 μm , Waters) con un filtro en línea de 0.2 μm (Waters). Se optimizó un método isocrático con una mezcla de agua mili-Q (ácido fórmico 0.1 % v/v) y acetonitrilo en relación 50:50 como fase móvil. La temperatura de columna se mantuvo constante a 40 °C, se inyectaron 2 μL de muestra, el flujo de fase móvil empleado fue de 0.5 mL/min y ambos compuestos (además del patrón interno) fueron detectados y cuantificados a una longitud de onda de 275 nm. El tiempo de retención para el carvacrol es de 0.91 minutos, para el timol es de 0.95 minutos y para el naproxeno es de 0.57 minutos.

A.2.5.2. Análisis de tirosol y mezclas de timol-tirosol

Para la cuantificación de muestras de tirosol y de mezclas de timol y tirosol se empleó una columna Kinetex EVO C18 (2.1 x 100 mm, diámetro de partícula: 1.7 μm , Phenomenex) con un filtro en línea de 0.2 μm (Waters). Se optimizó un método de gradiente a una temperatura constante de 40 °C. La primera etapa del gradiente parte de una mezcla de acetonitrilo y acetona 3:97 hasta llegar a una composición de 60:40 en 1.5 minutos. Esta composición se mantiene durante un minuto, volviendo a las condiciones iniciales en 1.5 minutos. El volumen de muestra inyectado fue de 3.5 μL , el flujo de fase móvil empleado fue de 0.6 mL/min y los dos

compuestos (además del patrón interno) fueron detectados y cuantificados a una longitud de onda de 275 nm. El tiempo de retención para el timol es de 2.44 minutos, para el tirosol es de 1.28 minutos y para el naproxeno es de 2.24 minutos.

A.2.5.3. *Análisis de escualeno*

Para la cuantificación de muestras de escualeno se empleó una columna Kinetex EVO C18 (2.1 x 100 mm, diámetro de partícula: 1.7 μm , Phenomenex) con un filtro en línea de 0.2 μm (Waters). Se optimizó un método isocrático con una mezcla de acetona y acetonitrilo (10:90) como fase móvil. La temperatura de columna se mantuvo constante a 40 °C, el volumen de muestra inyectado fue de 2 μL , el flujo de fase móvil empleado fue de 0.8 mL/min y tanto patrón interno como analito fueron detectados y cuantificados a una longitud de onda de 205 nm. El tiempo de retención para el escualeno es de 0.79 minutos y para el limoneno es de 0.23 minutos.

A.2.5.4. *Análisis de mezclas timol-escualeno*

Para la cuantificación de muestras con mezcla de timol y escualeno se empleó una columna Kinetex EVO C18 (2.1 x 100 mm, diámetro de partícula: 1.7 μm , Phenomenex) con un filtro en línea de 0.2 μm (Waters). Se optimizó un método de gradiente de tres disolventes: acetonitrilo, agua mili-Q (ácido fórmico 0.1 % v/v) y acetona. La composición inicial del método es de 50:50:0 manteniéndose constante durante un minuto y posteriormente cambiando en un minuto a una composición de 90:0:10. Esta composición se mantiene durante tres minutos, volviendo a las condiciones iniciales en un minuto. La temperatura de columna se mantuvo constante a 40 °C, el volumen de muestra inyectado fue de 3.5 μL y el flujo de fase móvil empleado fue de 0.8 mL/min. Ambos compuestos (además del patrón interno) fueron detectados y cuantificados a una longitud de onda de 205 nm. El tiempo de retención para el escualeno es de 3.26 minutos, para el timol es de 0.67 minutos y para el naproxeno es de 0.48 minutos.

A.2.6. *Análisis termogravimétrico*

La termogravimetría es una técnica en la cual se monitoriza la masa de una muestra en función de la temperatura aplicada cuando se le somete a una rampa de temperatura en una atmósfera controlada. Con esta técnica se pueden determinar diversas propiedades de la muestra como la resistencia térmica, la

pérdida de disolventes o el porcentaje de cada componente que se presenta en el material analizado.

Para el análisis de muestras sólidas mediante esta técnica, la muestra se deposita en un crisol que se soporta sobre una balanza de precisión (por lo general, una microbalanza de cristal de cuarzo). Este crisol se introduce en un horno que permite controlar la temperatura durante el análisis, así como mantener una atmósfera controlada empleando gas nitrógeno, aire sintético o una mezcla de ambos en proporciones controladas.

En este trabajo, se empleó un equipo de termogravimetría TGA/SDTA 851 de la compañía Mettler Toledo. Se empleó una rampa de temperatura de 10 °C/min dese 40 °C hasta 600 °C con un flujo de aire sintético de 50 mL/min.



*Figura A.2- 6. Mettler Toledo
TGA/SDTA 851*

A.2.7. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Esta técnica se basa en las propiedades mecano-cuánticas de los núcleos atómicos, en concreto aquellos cuyo espín nuclear es distinto de 0 (como el protón, ^1H , el carbono-13, ^{13}C , o el nitrógeno-15, ^{15}N). Estos núcleos, al interactuar con un campo magnético resuenan a una frecuencia proporcional a la fuerza del campo incidente. A una fuerza dada, todos los núcleos iguales resuenan a la misma frecuencia, sin embargo, esta frecuencia puede ser modificada por la presencia de electrones de otros núcleos próximos, fenómeno denominado apantallamiento, y que se aprovecha para la determinación estructural mediante RMN. Así, en función de la frecuencia a la que aparece un núcleo, se puede determinar el tipo de núcleos que le rodean, también conocido como entorno químico.

En este trabajo se ha empleado tanto la técnica de RMN de protón (RMN- ^1H) como la de carbono-13 (RMN- ^{13}C). Los espectros fueron adquiridos en un equipo Bruker DPX 400 de la compañía Bruker Daltonik GmbH, trabajando a una frecuencia de 400 MHz en el caso de los espectros de protón (en una ventana espectral entre 0 y 15 ppm) y a una frecuencia de 100 MHz en el caso de los espectros de carbono-13 (en una ventana espectral entre 0 y 250 ppm).



*Figura A.2- 7. Espectrómetro
Bruker DPX 400 equipado con
brazo automuestreador*

A.2.8. Difracción de rayos X (XRD)

Mediante esta técnica es posible conocer propiedades estructurales de la muestra analizada tales como la orientación del crecimiento de los cristales que la forman, si posee o no estructura cristalina (y qué estructura presenta), el espesor de películas delgadas, su densidad, el parámetro de red o la superestructura que presenta.

Los rayos X son radiaciones electromagnéticas cuya longitud de onda se encuentra en el rango entre 0.5 y 10 nm. Cuando se produce la interacción de un haz de rayos X (de una determinada longitud de onda) con una sustancia cristalina se produce la difracción de los mismos. Esta difracción está basada en la dispersión coherente del haz por parte de la materia, que genera una interferencia

constructiva de las ondas en fase y que se dispersan en distintas direcciones, fenómeno que sólo se produce cuando se cumple la ley de Bragg.

Para el análisis de muestras mediante XRD en este trabajo se empleó un difractómetro Empyrean de la compañía Panalytical equipado con un ánodo de Cu y un monocromador para seleccionar la radiación Cu-K α ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) y trabajando con un voltaje de 45 kV y una intensidad de corriente de 40 mA. Los patrones de difracción se registraron entre 0.5° y 8° en incrementos de 0.01° . Para su análisis, las muestras se depositaron en polvo sobre el soporte del equipo, realizando las medidas la Dra. Nuria Navascués.



*Figura A.2- 8. Difractómetro
Panalytical Empyrean*

A.2.9. Isotermas de adsorción de nitrógeno

La medida de las isotermas de adsorción de N₂ por parte de un material es una medida del tamaño de los poros que contiene en función del volumen de gas adsorbido por el mismo. Para ello, se introduce una cantidad conocida de gas puro en un volumen cerrado que contiene a la muestra y se monitoriza la presión en el sistema, manteniendo la temperatura constante. A medida que el material adsorbe al gas, la presión va disminuyendo hasta que se alcanza el equilibrio. De esta manera se construye tanto la curva de adsorción como la curva de desorción de N₂ para la muestra estudiada. De los datos obtenidos mediante estas curvas, se puede calcular el área superficial de la muestra, mediante el método BET así como la distribución de tamaño de poro mediante el método BJH.

En este trabajo, se empleó un equipo TriStar 3000 de la compañía Micrometrics para la medida de las isothermas de adsorción de N_2 . Antes de la medida, las muestras se desgasificaron durante 8 horas a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el caso de las muestras cargadas con compuesto activo). El área superficial se calculó para una presión relativa entre 0.05 y 0.20 y el volumen total de poro se calculó para una relación P_0/P de 0.96.



Figura A.2- 9. Micrometrics

TrisStar 3000

A.3. ENSAYOS BACTERICIDAS

A.3.1. Determinación de MIC y MBC en medio sólido

Para la determinación de la MIC y la MBC en medio sólido se empleó una adaptación de la norma ASTM E-2180 (Método estándar para la determinación de la actividad de agentes antimicrobiano en materiales poliméricos o hidrofóbicos)¹⁶⁴.

En primer lugar, se preparó un cultivo estado estacionario (con una concentración de 10^9 UFC/mL) tomando una colonia de la bacteria deseada con un asa de siembra estéril y dispersando esta colonia en 4 mL de TSB estéril. Este cultivo se incubó entre 18 y 24 horas a 37 °C para alcanzar la concentración deseada. Posteriormente, se dispensó en TSA templado (45 ± 2 °C) el volumen necesario de cultivo estacionario para alcanzar una concentración de 10^6 UFC/mL. Paralelamente, se cortaron fragmentos de membrana de diferentes masas y se esterilizaron bajo una luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm, 30 minutos por cada cara). Una vez esterilizadas, se colocó cada muestra en un pocillo de una placa *multiwell* de 12 pocillos y se añadió 1 mL de TSA inoculado. Cada placa se incubó a 37 °C durante 24 horas en una caja cerrada con agua (para mantener un nivel adecuado de humedad).

Pasado este tiempo, cada muestra se reconstituyó en 10 mL de TSB estéril, se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 1 minuto y se agitó en un agitador tipo vortex durante otro minuto para separar las bacterias del agar. Una vez separadas las bacterias del agar, para la medida de su crecimiento se empleó el método estándar de microdilución. Para ello, se realizaron 6 diluciones seriadas 1:10 de cada muestra en DPBS. De cada dilución, se sembraron 3 gotas de 25 μ L en una placa Petri con TSA estéril y se incubaron a 37 °C durante toda la noche para poder contar el número de colonias resultantes de cada muestra. Para el cálculo de las UFC/mL, se empleó la Ecuación A-3.1:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{número de colonias} \cdot \text{factor de dilución}}{0.025 \text{ mL}}$$

Ecuación A.3-1: Cálculo de UFC/mL

A.3.2. Determinación de la influencia del contacto

Para evaluar la influencia del contacto entre las membranas y la bacteria se diseñó un ensayo para evaluar la capacidad bactericida de la membrana tras haber

estado sumergida en medio de cultivo líquido, así como la capacidad bactericida de los posibles compuestos liberados al medio.

Para ello, se prepararon muestras de una masa suficiente como para alcanzar la MBC de la membrana ensayada frente a cada microorganismo y se esterilizaron bajo luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm, 30 minutos por cada cara). Tras la esterilización, se sumergió cada muestra con 1 mL de TSB estéril durante diferentes tiempos manteniendo una agitación constante (150 rpm) y a una temperatura de 37 °C. Una vez alcanzado el tiempo final, cada membrana se separó de su medio de cultivo (denominado “exudado”). El exudado fue inoculado con 10^6 UFC/mL del correspondiente microorganismo, incubado durante 24 horas a 37 °C y 150 rpm y analizado el crecimiento bacteriano mediante el método de microdilución descrito el anexo A.3.1. Para determinar la capacidad bactericida de las membranas tras haber liberado parte de su contenido, una vez separadas del exudado, fueron tratadas tal como se describe en el anexo A.3.1.

A.4. ENSAYOS CON ANIMALES

A.4.1. Modelo de herida infectada en ratón

Para la evaluación de la efectividad *in-vivo* de los materiales sintetizados en este trabajo, se puso a punto un modelo de herida infectada en ratón a partir de la modificación de otros trabajos previos^{278,279}. En todos los casos, se emplearon ratones sin pelo SKH1, que para el procedimiento quirúrgico fueron anestesiados con un 5 % de isoflurano, compuesto que se mantuvo a una concentración del 1 % durante todo el proceso (con un flujo de 1 L/min de oxígeno). Para mantener la esterilidad en la zona intervenida, la piel se limpió con una solución de etanol (70 % v/v) y para aliviar el dolor, se al animal se le administró de forma diaria (hasta 48 h después de la cirugía) Meloxicam de manera subcutánea (2.5 mg/kg de peso).

Para realizar las heridas (dos en cada animal), en primer lugar se marcó con una perforadora para biopsias estéril (de 8 mm de diámetro) la zona de intervención a ambos lados de la línea media del ratón, retirando por completo la piel dentro de dichas marcas. Posteriormente, se colocaron dos anillos de silicona, suturados con 6 suturas 4/0, para impedir el cierre natural de la herida por contracción de la piel.

Una vez realizadas las heridas, se procedió a la infección de las mismas con la bacteria elegida en cada caso, inoculando 10^7 UFC dispersas en 25 μ L de PBS. Una vez infectada la herida, se colocaron los distintos tratamientos sobre la misma y se cubrió la herida con esparadrapo adhesivo y vendas, que se sustituyeron diariamente durante 3 días, dejando a partir de ese momento la herida al descubierto, tal y como se recomienda en la práctica clínica. Adicionalmente, para vigilar la potencial pérdida de peso durante el proceso, este parámetro se monitorizó diariamente.

A.4.2. Evaluación microbiológica del modelo de herida infectada en ratón

A.4.2.1. Análisis semi-cuantitativo de la infección

Para la evaluación semi-cuantitativa de las muestras tomadas, éstas se cultivaron en agar sangre y en medio McConkey Nº 3 durante 24 horas a 37 °C. Tras la evaluación semi-cuantitativa (SC: sin crecimiento, +: crecimiento leve, ++ crecimiento moderado, +++ crecimiento masivo), se identificó el microorganismo tras resembrar las muestras y analizarlas mediante la técnica de MALDI-TOF.

A.4.2.2. PCR cuantitativa (qPCR)

Para la cuantificación de la cepa de interés presente en la herida, se recurrió a la técnica de qPCR. Para ello, se extrajo el ADN de la muestra empleando un kit DNeasy Blood & Tissue (Quiagen) y la muestra extraída se amplificó mediante un kit específico para *S. aureus* EXOone MIX qPCR kit (Exopol) en un sistema 7500 FAST Real Time PCR System (Applied Biosystems). Tras una pre-incubación (1 ciclo, 5 min, 95 °C) se realizó una amplificación de 42 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C para finalmente leer la señal fluorescente.

A.4.3. Estudio histopatológico de heridas infectadas

Para realizar los correspondientes estudios histopatológicos, los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ tras 3 o 7 días desde la intervención. Tras el sacrificio, se eliminaron todos los materiales incorporados en las heridas (anillos de silicoa, suturas, apósitos, vendas y esparadrapos y se extirpó todo el tejido de la herida hasta un radio de, aproximadamente, 5 mm alrededor de la misma. Las muestras extirpadas fueron fijadas durante 24 horas en una disolución al 4 % de paraformaldehído y conservadas en parafilm.

Tras la conservación, secciones de 5 µm de espesor se tiñeron con hematoxilina y eosina para las determinaciones histopatológicas y con tinción de Gram para la determinación de bacterias. Para la evaluación de la angiogénesis en el tejido de la herida se realizó una evaluación inmunohistoquímica empleando anticuerpos de ratón policlonal CD31. Para su conservación y posterior visualización, las muestras se deshidrataron en xileno y posterior mente se rehidrataron con series de etanol. La recuperación de los anticuerpos se llevó a cabo con un tratamiento en un tampón de alto pH (CC1m) añadiendo un 3 % de H₂O₂. Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario (1:50, 60 minutos) seguido del correspondiente sistema de visualización de peroxidasa de rábano, empleando tetracloruro de 3,30-diaminbencidina para la detección de la reacción inmunohistoquímica. Para la tinción del núcleo celular se empleó hematoxilina de Carazzi y, finalmente, las muestras se deshidrataron y se montaron permanentemente.

A.5. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

A.5.1. Artículos

- **TÍTULO:** Antimicrobial Electrospun Polycaprolactone-Based Wound Dressings: An *In Vitro* Study About the Importance of the Direct Contact to Elicit Bactericidal Activity.

AUTORES (p.o. de firma): Enrique Gámez, Gracia Mendoza, Sofía Salido, Manuel Arruebo y Silvia Irusta.

REVISTA: Advances in Wound Care, volume 8, issue 9, 438-451 (2019)

- **TÍTULO:** Drug-eluting wound dressings having sustained release of antimicrobial compounds.

AUTORES (p.o. de firma): Enrique Gámez-Herrera, Sara García-Salinas, Sofía Salido, María Sancho-Albero, Vanesa Andreu, Marta Pérez, Lluís Luján, Silvia Irusta Manuel Arruebo y Gracia Mendoza.

REVISTA: European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 152, 327-339 (2020).

- **TÍTULO:** Antibacterial Effect of Thymol Loaded SBA-15 Nanorods Incorporated in PCL Electrospun Fibers.

AUTORES (p.o. de firma): Enrique Gámez, Hellen Elizondo-Castillo, Jorge Tascon, Sara García-Salinas, Nuria Navascues, Gracia Mendoza, Manuel Arruebo y Silvia Irusta.

REVISTA: Nanomaterials, 10, 616 (2020).

- **TÍTULO:** Efficiency of Antimicrobial Electrospun Thymol-Loaded Polycaprolactone Mats In Vivo.

AUTORES (p.o. de firma): Sara García-Salinas, Enrique Gámez, Javier Asín, Ricardo de Miguel, Vanesa Andreu, María Sancho-Albero, Gracia Mendoza, Silvia Irusta y Manuel Arruebo.

REVISTA: ACS Applied Biomaterials, 3, 3430-3439 (2020).

- **TÍTULO:** Electrospun anti-inflammatory patch loaded with essential oils for wound healing.

AUTORES (p.o. de firma): Sara García-Salinas, Michael Evangelopoulos, Enrique Gámez-Herrera, Manuel Arruebo, Silvia Irusta, Francesca Taraballi, Gracia Mendoza y Ennio Tasciotti.

REVISTA: International Journal of Pharmaceutics, 577, 119067 (2020).

A.5.2. *Contribuciones a congresos*

- **TÍTULO:** Electrospun PCL nanofibers loaded with carvacrol for wound dressing applications

AUTORES (p.o. de firma): Enrique Gámez Herrera, Silvia Irusta y Manuel Arruebo.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster.

LUGAR: International Conference on Nanomedicine And Nanobiotechnology 2016 (ICONAN 2016), París (Francia), 28-30 de septiembre de 2016.

- **TÍTULO:** Electrospun PCL Nanofibers Loaded with Carvacrol for Wound Dressing Applications

AUTORES (p.o. de firma): Enrique Gámez-Herrera, Hellen Elizondo-Castillo, Sara García-Salinas, Gracia Mendoza, Manuel Arruebo y Silvia Irusta.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster.

LUGAR: 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), Atenas (Grecia), 4-8 de septiembre de 2017.

- **TÍTULO:** Apósitos bactericidas electro-hilados basados en policaprolactona: estudio in vitro de la importancia del contacto directo en la citotoxicidad

AUTORES (p.o. de firma): Enrique Gámez, Gracia Mendoza, Sofía Salido, Manuel Arruebo y Silvia Irusta.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral.

LUGAR: 1er Congreso sobre Material Multifuncionales para Jóvenes, Granada (España), 3-4 de septiembre de 2018.