



Trabajo Fin de Máster

Nanopartículas cargadas con aceites esenciales para aplicación en apósitos.

Essential oils loaded nanoparticles for wound dressing application.

Juan Miguel Pardo Fanlo

Máster en Ingeniería Biomédica

Directora: Silvia Irusta.

Escuela de Ingeniería y Arquitectura
2016/ 2017



**DECLARACIÓN DE
AUTORÍA Y ORIGINALIDAD**

(Este documento debe acompañar al Trabajo Fin de Grado (TFG)/Trabajo Fin de Máster (TFM) cuando sea depositado para su evaluación).

D./Dª. Juan Miguel Pardo Fanlo,

con nº de DNI 18173503-F en aplicación de lo dispuesto en el art.

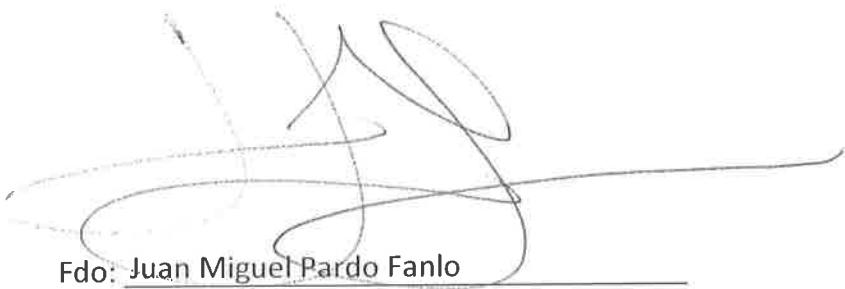
14 (Derechos de autor) del Acuerdo de 11 de septiembre de 2014, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba el Reglamento de los TFG y TFM de la Universidad de Zaragoza,

Declaro que el presente Trabajo de Fin de (Grado/Máster) Máster, (Título del Trabajo)

Nanopartículas cargadas con aceites esenciales para aplicación en apóitos.

es de mi autoría y es original, no habiéndose utilizado fuente sin ser citada debidamente.

Zaragoza, 30 de Enero de 2017



Fdo: Juan Miguel Pardo Fanlo

Nanopartículas cargadas con aceites esenciales para aplicación en apósitos.**RESUMEN**

El tratamiento de quemaduras y heridas crónicas que tardan en cicatrizar necesitan del desarrollo de materiales apóstitos que presenten una estructura similar a la matriz extracelular y que además liberen sustancias bactericidas, antiinflamatorias y cicatrizantes con una cinética de liberación determinada por las necesidades de cada patología en cada momento. Por otro lado, debido al aumento de las resistencias a antibióticos que está apareciendo en los últimos años, la utilización de aceites esenciales supone una alternativa frente al uso de antibióticos en el desarrollo de nuevos apóstitos. Los aceites esenciales son biomoléculas naturales que presentan actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, analgésica y cicatrizante, necesaria en materiales para apóstitos.

Como objetivo se pretendía mejorar la liberación controlada de principios activos mediante su encapsulación en sistemas nanoparticulados los cuales preservan la estabilidad del principio activo y permiten su liberación directa sobre la herida aumentando su efectividad. El trabajo constó de dos partes:

En la primera parte se llevó a cabo la síntesis de dos tipos de nanopartículas: partículas de PLGA y niosomas. En su interior se quería encapsular la mayor cantidad posible de tres principios activos de aceites esenciales, que fueron el Carvacrol, el Timol y el Cinamaldehído. Se realizó un estudio de la máxima cantidad de principio activo que era posible encapsular tanto en los niosomas como en las nanopartículas de PLGA. Ambos sistemas nanoparticulados junto con el principio activo encapsulado fueron perfectamente caracterizados físico-químicamente utilizando las distintas técnicas disponibles: Espectrometría de masas para conocer su composición; Dispersión Dinámica de la luz (DLS) para determinar el radio hidrodinámico; Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para analizar morfología y tamaño.

Una vez logrado un diseño óptimo de la encapsulación de los aceites, en la segunda parte del trabajo se procedió al estudio de la capacidad bactericida de las nanopartículas cargadas sobre la bacteria *Escherichia coli*. Para ello se realizaron ensayos microbiológicos que permitieron obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivos generales.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1. Materiales.....	12
3.2. Métodos de síntesis de las nanopartículas	12
3.2.1. Método de preparación de niosomas	12
3.2.3. Método de preparación de NPs de PLGA por emulsión simple (o/w)	13
3.2.4. Purificación de las NPs.....	14
3.3. Caracterización físico-química de las NPs	15
3.3.1. Distribución del tamaño de partícula.....	15
3.3.2. Determinación de la carga superficial de la partícula	15
3.3.3. Determinación de la morfología de las partículas	15
3.3.4. Estimación de la concentración de partícula obtenida	16
3.3.5. Concentración de aceites encapsulados	16
3.4. Estudios de la acción bactericida de las NPs sintetizadas	16
3.4.1. Cultivo bacteriano.....	17
3.4.2. Estudio de la supervivencia bacteriana en las NPs finales	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. Caracterización física de las NPs.....	19
4.1.1. Niosomas Vacíos	19
4.1.2. Niosomas encapsulando Carvacrol, Timol y Cinamaldehído	20
4.1.2.1. Niosomas encapsulando Carvacrol.....	20
4.1.2.2. Niosomas encapsulando Timol.....	22
4.1.2.3. Niosomas encapsulando Cinamaldehído	24
4.1.3. NPs de PLGA vacías	25

Juan Miguel Pardo Fanlo

4.1.4. NPs de PLGA encapsulando Carvacrol, Timol y Cinamaldehído	26
4.1.4.1. NPs de PLGA encapsulando Carvacrol.....	26
4.1.4.2. NPs de PLGA encapsulando Timol	28
4.1.4.3. NPs de PLGA encapsulando Cinamaldehído	29
4.2. Rendimiento de la producción de NPs	29
4.3. Concentración de EO encapsulado	30
4.4. Ensayos microbiológicos	31
5. CONCLUSIONES.....	35
6. BIBLIOGRAFÍA	38
7. ANEXOS.....	41

ABREVIATURAS

CFU	Unidades Formadoras de Colonias
AcOEt	Acetato de etilo
Da	Dalton
DHP	Dihexadecil fosfato o dicetilfosfato
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Dispersión dinámica de la luz)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EOs	<i>Essential Oils</i> (Aceites esenciales)
h	Hora
H ₂ O	Agua
kDa	KiloDalton
kV	Kilovoltio
m	Metro
MBC	Concentración mínima bactericida
MeOH	Metanol
MIC	Concentración mínima inhibitoria
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mV	Milivoltio
nm	Nanómetro
NPs	Nanopartículas
o/w	<i>Oil in water</i> (Aceite en agua)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampon fosfato salino)
PDI	Índice de polidispersidad
PLGA	Ácido poli-d-l-láctico-co-glicólico
REV	<i>Reverse Phase Evaporation</i> (Evaporación en fase reversa)
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SIMM	<i>Slit Interdigital Micromixer Microreactor</i>
T amb	Temperatura ambiente
TEM	Microscopía electrónica de Transmisión
TSA	<i>Tryptone Soy Agar</i> (Agar de triptona de soja)
TSB	<i>Tryptone Soy Broth</i> (Caldo de triptona de soja)
μL	Microlitro
μm	Micrómetro

TABLAS

Tabla 1	Materiales empleados en la síntesis de niosomas.....	8
Tabla 2	Preparación de las muestras para su análisis por espectrometría de masas.....	16
Tabla 3	Caracterización mediante DLS de niosomas con distintas cargas de Carvacrol.....	20
Tabla 4	Caracterización mediante DLS de niosomas con distintas cargas de Timol	22
Tabla 5	Caracterización mediante DLS de niosomas con distintas cargas de Cinamaldehído.....	24
Tabla 6	Caracterización mediante DLS de las NPs de PLGA con distintas cargas de Carvacrol...	26
Tabla 7	Caracterización mediante DLS de las NPs de PLGA con distintas cargas de Timol..	28
Tabla 8	Caracterización mediante DLS de las NPs de PLGA con distintas cargas de Cinamaldehído.....	29
Tabla 9	Rendimiento de la síntesis de niosomas.....	30
Tabla 10	Rendimiento de la síntesis de partículas de PLGA.....	30
Tabla 11	Concentración de EO encapsulado en el interior de la NP y eficiencia de encapsulación	31
Tabla 12	Concentraciones de niosomas vacíos probadas con <i>E.coli</i> y las CFUs obtenidas...	32
Tabla 13	Concentraciones de EO encapsulados en niosomas probadas con <i>E.coli</i> y las CFUs obtenidas	32
Tabla 14	Concentraciones de NPs de PLGA vacías probadas con <i>E.coli</i> y las CFUs obtenidas..	32
Tabla 15	Concentraciones de EO encapsulados en NPs de PLGA probadas con <i>E.coli</i> y las CFUs obtenidas.....	33
Tabla 16	MIC y MBC para Carvacrol, Timol y Cinamaldehído puros en contacto con <i>E.coli</i> . 33	

FIGURAS

Figura 1	Estructura química de algunos componentes de EOs. Monoterpenos: Carvacrol y Timol, y un compuesto aromático: Cinamaldehído.....	7
Figura 2	Estructura de los niosomas.....	8
Figura 3	Estructura química del ácido poli-d,l-láctico-co-glicólico	9
Figura 4	Método de preparación de niosomas	13
Figura 5	Método de síntesis de NPs de PLGA.....	14
Figura 6	Proceso de lavado de las NPs para eliminar los restos de EO no encapsulado	14
Figura 7	Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de las NPs vacías. A) Vista general de niosomas comprimidos. B) Niosomas de simetría ovalada. C) Detalle de las multilamelas. D) Niosoma comprimido por acción de niosomas adyacentes.....	20
Figura 8	Imágenes TEM de los niosomas con diferentes cantidades de Carvacrol, agregado durante la síntesis. A-B) 12 mg. C-D) 14 mg. E-F) 16 mg. G-H) 18 mg. I-J) 20 mg.....	21
Figura 9	Imágenes de TEM de niosomas encapsulando diferentes cantidades de Timol. A-B) 14 mg. C-D) 16 mg. E-F) 18 mg.....	23
Figura 10	Imágenes de TEM de niosomas encapsulando diferentes cantidades de Cinamaldehído. A-B) 16 mg. C) 18 mg.....	24
Figura 11	Imágenes de SEM para partículas de PLGA vacías	25
Figura 12	Imágenes de SEM para NPs de PLGA con diferentes cantidades de Carvacrol. A-B) 50 mg de Carvacrol. C-D) 75 mg E-F) 100 mg G-H) 150 mg I-J) 200 mg.....	27
Figura 13	Imágenes de SEM para NPs de PLGA encapsulando Timol. A-B) 100 mg de Timol.	28
Figura 14	Imágenes de SEM para NPs de PLGA encapsulando Cinamaldehído. A-B) 100 mg de Cinamaldehído	29

1. INTRODUCCIÓN.

El proceso de curación y cicatrización de una úlcera cutánea crónica o de una herida es un proceso habitualmente costoso y dinámico sobre el cual influyen muchos factores. Estos factores son, generales como la edad, factores de riesgo, ingesta de fármacos, etc. y locales como la humedad, el pH tisular o la infección. La alteración o daño en la piel es de vital importancia ya que la piel constituye nuestra primera barrera de protección, por lo que es necesaria una reparación rápida y eficiente para evitar la colonización bacteriana, la cronificación o incluso la aparición de lesiones más graves. Los tratamientos empleados para curar una herida pueden ser muy variados y constituyen una carga enorme para el sistema sanitario [1]. La búsqueda de terapias rentables para lograr una mejor cicatrización de heridas se está convirtiendo en un reto para investigadores de todo el mundo.

El tratamiento húmedo de heridas actualmente es considerado un procedimiento estándar para muchas heridas en las que se necesita reconstituir los tejidos. Su fundamento científico fue establecido por G. D. Winter cuando en 1962 comprobó que se conseguía una curación más rápida de la herida si se aplicaba un apósito activo que creara un entorno húmedo, comparado con un ambiente seco y en contacto con el aire, que era la forma habitual hasta el momento de curar las heridas [2]. Un apósito es un producto que cubre, protege y aísla la herida de factores externos perjudiciales al medio y que actúa de manera pasiva absorbiendo exudados, o de manera activa modificando el lecho de la herida e interviniendo en el proceso de cicatrización [3].

Conseguir un proceso de cicatrización de heridas rápido y eficaz reduciría costes y mejoraría considerablemente la calidad de vida de los pacientes. Los apóositos desarrollados en los últimos años no combinan todos los requerimientos para una regeneración cutánea óptima y con garantías de éxito. Para ello se intenta aprovechar las ventajas que ofrece la nanotecnología en el campo de la medicina mejorando los materiales y las estructuras utilizadas en el cuidado tópico de heridas buscando liberar en la piel de forma controlada compuestos antiinflamatorios, antimicrobianos y regenerativos que permitan además la aceleración del proceso curativo. Los apóositos basados en materiales nanoestructurados pueden solventar las limitaciones de los apóositos actuales.

La resistencia desarrollada por los microorganismos frente a los antibióticos se ha convertido cada vez más en un problema en los últimos años porque el ritmo al que estamos descubriendo nuevos antibióticos se ha ralentizado drásticamente, mientras que el uso de antibióticos está aumentando. Y no es sólo un problema confinado a las bacterias, sino de todos los microbios que tienen el potencial de mutar y hacer que nuestros medicamentos sean ineficaces. Con el fin de solucionar este problema, se está investigando el desarrollo de sistemas que contengan otro tipo de sustancias alternativas, los denominados aceites esenciales [5]. Estas sustancias naturales presentan propiedades antibióticas y regenerativas que combinadas con los sistemas nanoestructurados ayudarán en la generación de nuevos apóositos.

Aceites esenciales

Los aceites esenciales (*Essential Oils*: EOs) son componentes volátiles lipofílicos extraídos de una materia prima vegetal ya sea por destilación o bien mediante extracción mecánica de la capa externa de los frutos. Los aceites esenciales son mezclas naturales muy complejas que pueden contener aproximadamente 20-60 componentes a concentraciones muy diferentes. Se caracterizan por contener dos o tres componentes principales a concentraciones superiores (20-70%) en comparación con otros componentes presentes en trazas. Por ejemplo, el carvacrol (30%) y el timol (27%) son los componentes principales del aceite esencial de *Origanum compactum*. Generalmente, estos componentes principales determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales. El grupo principal se compone de terpenos y terpenoides y el resto de constituyentes aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por un bajo peso molecular, Figura 1. El perfil químico de los EOs no difiere únicamente en el número y en el tipo de sus moléculas, sino que también difiere en su estereoquímica [6-7].

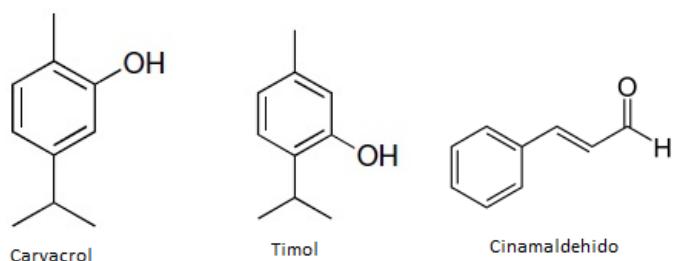


Figura 1. Estructura química de algunos componentes de EOs. Monoterpenos: Carvacrol y Timol, y un compuesto aromático: Cinamaldehído. [6]

Debido al gran número de componentes que presentan, los aceites esenciales parecen no tener objetivos celulares específicos. La capacidad citotóxica de los EOs basada en una actividad prooxidante puede convertirlos en excelentes agentes antisépticos y antimicrobianos para uso personal, es decir, para la purificación del aire, la higiene personal y para el uso insecticida en la conservación de cultivos o alimentos. Una gran ventaja es el hecho de que por lo general carecen de riesgos genotóxicos a largo plazo. Además alguno de ellos muestra capacidad antimutagénica que podría estar ligada a su capacidad anticancerígena [7].

Pese a todo, los EOs son inestables y susceptibles a la degradación cuando se exponen a tensiones ambientales en presencia de oxígeno, temperatura y la luz. Por lo tanto, se han hecho intentos para conservarlos mediante su encapsulación en diversos sistemas coloidales tales como nanocápsulas, nanoesferas, nanoemulsiones, liposomas y complejos de inclusión molecular [6]. La encapsulación de estos EOs requieren una formulación adecuada constituida por compuestos biodegradables que los protejan de la degradación y la evaporación al mismo tiempo que permite una liberación sostenida. La encapsulación ha sido ampliamente utilizada para administración de compuestos bioactivos y para lograr una mayor función biológica del EO [8]. De este modo, la nanocapsulación de EOs representa una estrategia prometedora para

Juan Miguel Pardo Fanlo

superar las limitaciones de EOs, reducir su dosis y aumentar la seguridad a largo plazo de estos constituyentes.

En este trabajo nos centramos en la encapsulación de tres principios activos: el carvacrol, el timol y el cinamaldehído en niosomas y en nanopartículas (NPs) de ácido poli-d-láctico-co-glicólico (PLGA).

Niosomas

Los niosomas son vesículas formadas por el autoensamblaje de tensioactivos no iónicos, colesterol y de un estabilizador como puede ser el dihexadecil fosfato (DHP). En medios acuosos, dan como resultado estructuras bicapa cerradas que se pueden usar como portadores de compuestos hidrófilos en el interior de la capsula, e hidrófobos que se dispondrían en la bicapa del surfactante (Figura 2). Son vehículos biocompatibles y biodegradables que presentan la posibilidad de ser dirigidos hacia lugares específicos funcionalizando su superficie con moléculas biológicas [9-11]. El uso de niosomas para la encapsulación de EOs supone un nuevo enfoque para tratar de superar los problemas de estabilidad fisicoquímica que incluyen la sensibilidad al oxígeno, la luz, la temperatura y la volatilidad, y su biodisponibilidad reducida que se debe a la baja solubilidad en agua.

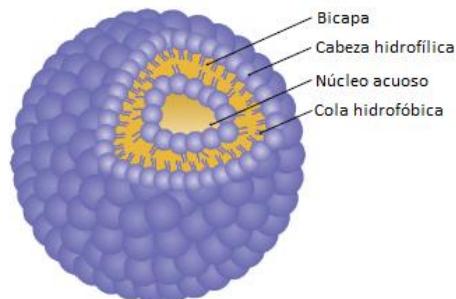


Figura 2. Estructura de los niosomas [10]

Tabla 1. Materiales empleados en la síntesis de niosomas. [10,11,28]

SURFACTANTES NO IÓNICOS	EJEMPLOS
Alquil éteres	Glicerol Hexadecil Éter.
Alquil ésteres:	
i) Ésteres de ácidos grasos de sorbitano (Spans).	Span 20, Span 40, Span 60, Span 65, Span 85, Span 85.
ii) Ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano. (Tweens)	Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 65.
Ácidos grasos	Ácido esteárico.
Copolímero bloque	Pluronic F105.
COMPONENTES LIPÍDICOS	Colesterol.
MOLÉCULAS CARGADAS	
I) Carga negativa.	Dicetilfosfato.
II) Carga positiva.	Estearilamina.

La eficacia de un sistema de administración de fármacos depende de sus componentes utilizados en la síntesis, los cuales deben poseer las propiedades físico-químicas necesarias

Juan Miguel Pardo Fanlo

para la formación de niosomas junto con biocompatibilidad y relevancia clínica. En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de los materiales usados en la preparación de niosomas.

A diferencia de los liposomas, la preparación de niosomas es habitualmente más fácil dada la resistencia contra la oxidación del aire que ofrece el tensioactivo. Se han descrito numerosas técnicas para la preparación de niosomas algunas de las más utilizadas son la Hidratación de Película delgada (THF) y la Evaporación en Fase Reversa (REV). La técnica THF proporciona un modo de preparar niosomas multilamelares a partir de la obtención de una película delgada seca que posteriormente es hidratada. Por otro lado la técnica REV sirve para la preparación de grandes vesículas unilamelares mediante la emulsificación de una fase orgánica, que contiene los surfactantes y una fase acuosa con el fármaco [9,27,28]. En este trabajo se ha utilizado una adaptación de la técnica REV combinada con la Microfluídica como técnica de síntesis debido a sus múltiples ventajas: gran uniformidad, tamaño pequeño y gran reproducibilidad en la obtención de niosomas. La técnica aprovecha la mezcla rápida y de manera controlada de los flujos de los fluidos de fármaco y de los tensioactivos en microcanales precisamente definidos. El impacto de alta velocidad y energía empleada conduce a la formación de niosomas [12].

PLGA

El biopolímero PLGA es uno de los polímeros más utilizados en sistemas nanoestructurados debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Es un copolímero lineal que puede ser preparado en diferentes ratios dependiendo de sus monómeros constituyentes, ácido láctico (LA) y glicólico (GA) que se muestran en la Figura 3.

Ha sido utilizado en medicina para distintos propósitos como ingeniería de tejidos, encapsulación de distintos fármacos, tratamiento de lesiones o defectos óseos y en vacunas [13-14].

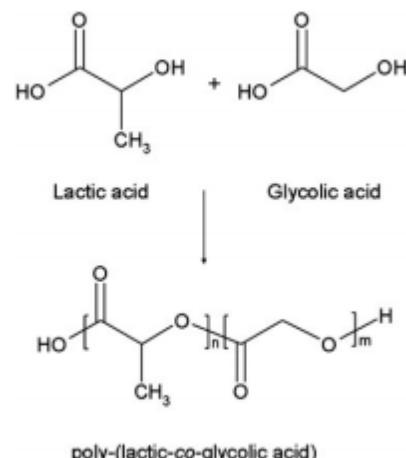


Figura 3. Estructura química del ácido poli-d,L-láctico-co-glicólico [15].

El PLGA es uno de los nanosistemas biodegradables utilizado más exitoso debido a que sufre hidrólisis en el interior del cuerpo produciendo metabolitos también biodegradables: ácido láctico (LA) y glicólico (GA). El cuerpo es capaz de tratar estos dos monómeros, por lo que se asocia una toxicidad mínima al uso del PLGA para liberación de fármacos o como biomaterial en aplicaciones biomédicas [15].

Las formas de PLGA son normalmente identificadas por el ratio del monómero utilizado. Este ratio molar de los monómeros constituyentes de forma individual, en la cadena del copolímero determina el peso molecular y por tanto el ratio de biodegradación. El más

Juan Miguel Pardo Fanlo

usado es el PLGA con un contenido 50:50 de ácidos láctico y glicólico, el cual se hidroliza mucho más rápido que cualquiera otra proporción de ambos monómeros [16].

En cuanto a la preparación de NPs poliméricas de PLGA se encuentran distintos métodos desarrollados entre los que destacan el de emulsión-difusión del disolvente, el método *salting-out* y el método emulsión-evaporación de disolvente. El método *salting-out* se puede considerar una variante del método de emulsión-difusión cuyo principio consiste en disolver el polímero en una fase orgánica parcialmente miscible en agua y posteriormente dicha fase se emulsiona con una solución acuosa.

En este trabajo utilizamos el método emulsión-evaporación del disolvente. La evaporación en emulsión es el método más antiguo usado para formar NPs poliméricas a partir de polímeros preformados. Este método consta de dos pasos principales. Primero se dispone el polímero y el fármaco en un disolvente orgánico en el que son miscibles. Se añade una fase acuosa que actúa como estabilizadora. Se lleva a cabo el proceso de emulsificación mediante la aplicación de elevada energía con US. El segundo paso consiste la evaporación del disolvente orgánico bajo vacío, lo que conduce a la precipitación del polímero y la formación de NPs. Se pueden usar emulsiones normales, aceite en agua (o/w) o agua en aceite (w/o) y emulsiones dobles (w/o/w) para acomodar la encapsulación de componentes activos con diferentes propiedades. La emulsión o / w se utiliza para la encapsulación de compuestos hidrófobos, mientras que la emulsión doble w/o/w se utiliza para la encapsulación de compuestos hidrófilos. El método se utiliza ampliamente para la nanoencapsulación porque es fácil de escalar, no requiere un alto esfuerzo cortante y puede ajustarse para encapsular fármacos solubles en agua. [17-18]

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo general.

El presente trabajo tiene como objetivo elaborar dos tipos de NPs distintas, niosomas y PLGA, que permitan la encapsulación de principios activos naturales con características regenerativas, bactericidas y antiinflamatorias. Es un reto elaborar un vehículo que permita la liberación controlada de un principio activo permitiendo la mejora de los apósitos actuales. Sistemas que permitan controlar la liberación son mucho más eficaces e interesantes desde el punto de vista regenerativo.

Una vez sintetizadas las NPs, estas serán caracterizadas fisicoquímicamente y se determinará su eficiencia de encapsulación por espectrometría de masas.

También se llevarán a cabo estudios microbiológicos para determinar su acción bactericida.

2.2. Objetivos específicos.

- Elaboración de Niosomas vacíos y Niosomas encapsulando por separado de los principios activos de los EO: Carvacrol, Timol y Cinamaldehído.
- Elaboración de NPs de PLGA vacías y encapsulando por separado de Carvacrol, Timol y Cinamaldehído.
- Caracterización físico-química de las NPs obtenidas, utilizando diferentes técnicas como son: Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para determinar morfología y tamaño, Dispersión Dinámica de la luz (DLS) para obtener el diámetro hidrodinámico y potencial zeta para determinar la carga superficial.
- Realizar ensayos microbiológicos con bacteria *Escherichia coli* para determinar la acción bactericida de las NPs vacías y con EO.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Materiales.

Los reactivos empleados para la síntesis de niosomas fueron Colesterol (MW 386,65 Da, Sigma-Aldrich) y Span20 (MW 346,47 Da); DHP (MW 546,85 Da) como estabilizador; acetato de etilo (Sigma-Aldrich) como disolvente y agua MilliQ como fase acuosa.

Los reactivos empleados en la síntesis de NPs de PLGA, fueron el polímero PLGA 50:50 (MW: 38-54 kDa, Sigma-Aldrich), Pluronic ®F68 (MW 8350 Da en promedio, Sigma-Aldrich) como surfactante, agua milliQ como medio acuoso y acetato de etilo como disolvente.

Los principios activos de EO encapsulados fueron Carvacrol, Timol y Cinamaldehído (todos proporcionados por Sigma-Aldrich).

En los ensayos microbiológicos se emplearon la bacteria *Escherichia coli* S17 (Donada por el grupo del Dr. J. A. Aínsa), PBS (Biowest) como disolución salina, TSB (Conda), TSA (Conda), y Estreptomicina (Sigma-Aldrich).

3.2. Métodos de síntesis de las NPs.

En primer lugar se llevó a cabo un proceso de optimización de la síntesis tanto para niosomas como para NPs de PLGA con el cual se buscaba encapsular la mayor cantidad posible de EO en el interior de ambas partículas consiguiendo preservar las propiedades del EO así como las propiedades físico-químicas de la NP.

3.2.1. Método de preparación de niosomas.

Los niosomas fueron sintetizados utilizando una adaptación de la técnica “Reverse Phase Evaporation” de forma directa [10]. Es una técnica microfluídica que emplea un microreactor y que fue previamente desarrollada en el grupo de investigación [11]. La técnica mejorada consigue un ahorro en el tiempo de operación, operabilidad y economía del proceso de producción.

Se pesaron en un vial 52 mg de Span20, 58 mg de Colesterol y 8,6 mg de DHP. Cuando se encapsula el principio activo requerido, se añadieron los mg necesarios de EO en este paso que se disolvieron en 400 µL de acetato de etilo y se homogeneizó la disolución mediante agitación magnética durante 5 minutos en un baño a 60°C. Trascurridos los 5 minutos y manteniendo la temperatura, se introdujo la disolución en una jeringa de 3 mL. En otra jeringa de 20 mL distinta se colocó agua milliQ a 35°C que se utiliza para la mezcla. Las dos jeringas se colocaron en sendas bombas de jeringas PHD Ultra de Harvard Apparatus, cuya función consiste en impulsar el émbolo de las jeringas a velocidades adecuadas de forma constante. Como resultado de la mezcla de ambos reactivos y de la fuerza de choque entre ambos flujos en el microreactor, se formó una emulsión de niosomas, la cual se dejó en agitación magnética a temperatura ambiente y 600 rpm durante 2-3 horas. Finalmente las muestras se filtraron con

Juan Miguel Pardo Fanlo

filtros Millex® Duapore® de PVDF con tamaño de poro 0,22 µm (Sigma-Aldrich). Se muestra un esquema del proceso en la Figura 4.

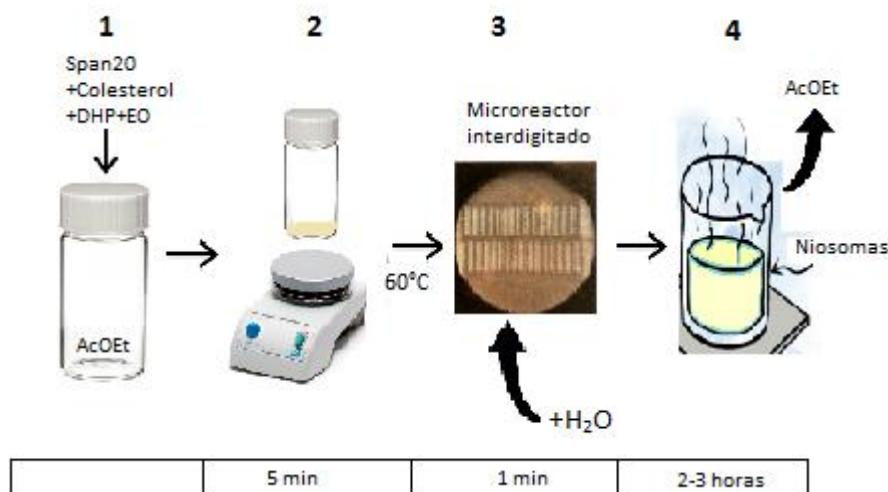


Figura 4. Método de preparación de niosomas. 1. Se mezclan los componentes y se introduce el acetato de etilo. 2. Se mezclan durante 5 min a 60°C con agitación. 3. La disolución se introduce en el microreactor junto con la fase acuosa. 4. Se deja evaporar la muestra durante 2-3 h a T amb con agitación.

Se sintetizaron NPs sin EO, vacías y se realizó su caracterización para tener una base probada de las propiedades de las NPs sin encapsular ninguna sustancia. Posteriormente se procedió a la optimización del proceso de encapsulación. Para ello se comenzó con el Carvacrol preparando síntesis de niosomas con cantidades de 12, 14, 16, 18 y 20 mg de EO. Una vez se puso a punto la técnica para el Carvacrol, se pasó al Timol y en última instancia al estudio con el Cinamaldehído.

El microreactor utilizado fue el SIMM (*Slit Interdigital Micromixer*) proporcionado por el Instituto Mikrotechnik Mainz (Alemania). El SIMM está formado por dos piezas con una hendidura que reparte el flujo de las dos corrientes iniciales, las cuales se dividen en múltiples canales. Combina el patrón de flujo regular creado por la multi-laminación con el enfoque geométrico que acelera la mezcla líquida. Debido a esta mezcla en dos etapas, los mezcladores de hendidura son susceptibles de una amplia variedad de procesos tales como mezcla, emulsión, síntesis orgánica monofásica y multifásica. Trabaja a temperaturas entre -40 y -220 °C con tiempos de residencia comprendidos entre 14,4 – 720 ms. La capacidad de volumen interno es de 8 µL.

3.2.2. Método de preparación de NPs de PLGA por emulsión simple (o/w).

Se utilizó el método emulsión-evaporación para la preparación de las NPs de PLGA[18]. Se pesaron en un bote 50 mg de PLGA y 150 mg del tensioactivo Pluronic®68. Se adicionaron 5 mL de acetato de etilo como disolvente. Posteriormente se adicionaron los mg de EO necesarios en el bote que contenía la muestra con agitación magnética. Una vez la disolución presentaba un aspecto transparente, se adicionaron 10 mL de agua MilliQ a la fase orgánica y la mezcla resultante se sonicó en un baño de hielo durante 25 segundos con un sonicador (Digital Sonifier 450, Branson, USA) a 40% de amplitud. Para la eliminación del disolvente, la emulsión final se dejó en agitación magnética a 600 rpm hasta completa

Juan Miguel Pardo Fanlo

evaporación del acetato de etilo, aproximadamente 3 horas. En la Figura 5 se muestra un esquema del proceso.

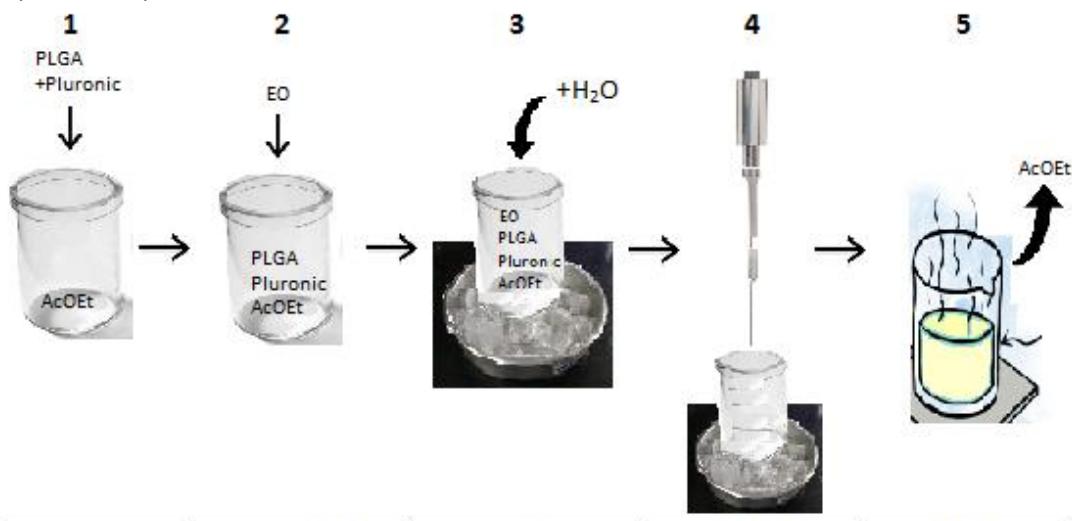


Figura 5. Método de síntesis de NPs de PLGA. 1. Se mezclan los componentes y se introduce el acetato de etilo. 2. Se mezclan durante 5 min y se añade EO a encapsular. 3. Se adiciona H_2O y se introduce en baño de hielo. 4. Se sonica la muestra. 5. Se deja evaporar el acetato de etilo con agitación constante.

Se sintetizaron NPs sin EO, vacías y se realizó su caracterización para tener una base probada de las propiedades de las NPs sin encapsular ninguna sustancia. Posteriormente se procedió a la optimización del proceso de encapsulación. Para ello se comenzó con el Carvacrol preparando síntesis de NPs de PLGA con cantidades de 50, 75, 100, 150 y 200 mg de EO. Una vez se puso a punto la técnica para el Carvacrol, se pasó al Timol y en última instancia al estudio con el Cinamaldehído.

3.2.3. Purificación de las NPs.

Tras el proceso de síntesis tanto de niosomas como de PLGA, se realizó una etapa de purificación. Es un proceso de lavado con el objetivo de eliminar los restos de EO que no se ha conseguido encapsular. Se representa en la Figura 6.

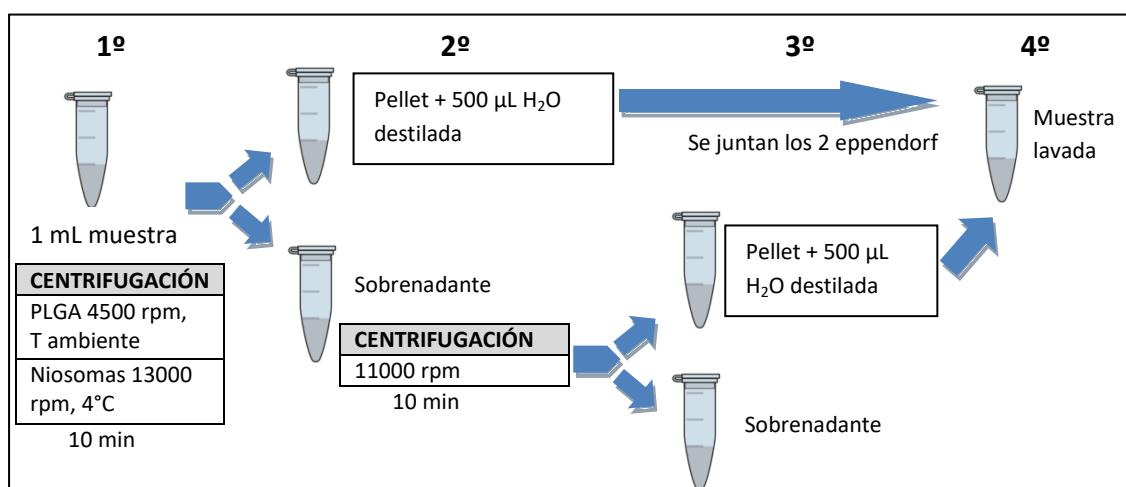


Figura 6. Proceso de lavado de las NPs para eliminar los restos de EO no encapsulado. 1. Se toma una alícuota de 1 mL de muestra. Se centrifuga 10 min. 2. Se recoge por un lado un eppendorf con el pellet al que se añade H_2O y por otro lado el sobrenadante en otro eppendorf. El sobrenadante se vuelve a centrifugar. 3. Se recoge de nuevo el pellet y se añade H_2O y por otro el sobrenadante. 4. Se juntan los dos eppendorf que contenían el pellet y se obtiene la muestra final lavada.

3.3. Caracterización físico-química de las partículas.

3.3.1. Distribución del tamaño de partícula.

El tamaño hidrodinámico de partícula es una propiedad clave para conocer la estabilidad, propiedades físicas, y biomédicas de las partículas como suspensiones coloidales. La determinación del diámetro y distribución (índice de polidispersidad, PDI) de las NPs fue realizada a través de correlación de fotones o *Dynamic Light Scattering* (DLS) utilizando un equipo 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, USA), el cual trabaja a una longitud de onda de 658 nm.

3.3.2. Determinación de la carga superficial de la partícula.

El potencial zeta representa la intensidad de campo eléctrico estático de la capa doble en el límite entre la partícula y el medio que la rodea y es un indicador de la capa superficial de la partícula, indicando su estabilidad en dispersión. El potencial zeta fue medido en 90 Plus Zeta Particle Analyzer, utilizando el principio de la movilidad electroforética bajo un campo eléctrico. La carga superficial de las NPs es un parámetro importante para la evaluación de la estabilidad y la interacción de las nanoestructuras entre sí y con otras sustancias.

3.3.3. Determinación de la morfología de las partículas.

La morfología de los niosomas ha sido determinada mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), utilizando un microscopio FEI-TECNAI T20, el cual trabaja a 200 kV. Las muestras siguieron un proceso previo de preparación: un volumen conocido de muestra se puso en contacto con el mismo volumen de ácido fosfotungstico (actúa como agente de contraste sobre los componentes orgánicos permitiendo su visualización bajo un haz de electrones) y se dejó en movimiento en un agitador de rodillos durante 2 horas. Pasado ese tiempo, se hicieron 3 lavados con agua destilada por centrifugación con el objetivo de eliminar el ácido fosfotungstico no fijado a las NPs y mejorar la calidad de la imagen. Se tomó una gota de niosomas en suspensión y se depositó en una rejilla hasta secado. Una vez seca, la rejilla estaba lista para su visualización en el equipo.

Para determinar la morfología de las NPs de PLGA se visualizan las muestras mediante SEM utilizando un equipo InspectTM F50 Scanning Electron Microscope (FEI, USA) operando en un voltaje de aceleración de 200 V – 30 kV equipado con una fuente Schottky Field Emission. Las distintas muestras de NPs de PLGA también necesitaron de un proceso de preparación previo a su visualización en el equipo. Una alícuota de 200 µL de NPs fue mezclada con 200 µL de ácido fosfotungstico. La mezcla de nuevo se dispuso en un rodillo durante 2 horas en movimiento. Posteriormente se hicieron 3 lavados con agua destilada por centrifugación. A continuación una gota de NPs en suspensión fue depositada sobre placas de silicio. Finalmente esta placa fue recubierta por una capa de platino mediante un proceso de sputtering quedando la muestra lista para su visualización en el microscopio.

3.3.4. Estimación de la concentración de partículas obtenida.

Para conocer el rendimiento másico de niosomas y de NPs de PLGA, se hicieron tres síntesis de cada tipo de partícula encapsulando cada tipo de aceite así como de las partículas vacías.

Posteriormente se tomaron distintos volúmenes de cada una de ellas (25, 50, 75 y 100 µL). Dichos volúmenes se introdujeron en unos pocillos pesados previamente. Los pocillos con los distintos volúmenes se dejaron 24h en una estufa a 60°C para niosomas, y a 35°C durante 48h para PLGA, con el fin de evaporar la fase acuosa de la emulsión. El siguiente paso consistía en pesar los pocillos donde tras evaporación quedaba la muestra sólida que estaba presente en la emulsión inicial. Con los pesos obtenidos se realizó una recta patrón de cada tipo de nanopartícula con cada aceite y se consiguió conocer la masa final obtenida y la concentración de cada síntesis.

3.3.5. Concentración de aceites encapsulados.

Para conocer la concentración de EO que se logra encapsular en las NPs se realizó el análisis de las mismas por espectrometría de masas con un espectrómetro de masas acoplado con un cromatógrafo de gases Shimadzu QP 2010 SE. La técnica requiere de una preparación de la muestra previa que se describe en la Tabla 2. El resto de parámetros empleados en la técnica se describe en el *anexo 1*.

Tabla 2. Preparación de las muestras para su análisis por espectrometría de masas.

Preparación Niosomas	Preparación PLGA
1. 1 mL de muestra se centrifuga a 4°C, 13300 rpm, 20 min. 2. Tomar pellet + 450 µL MeOH. 3. Mezclar 30 min en agitador de rodillos. 4. Añadir 50 µL Limoneno (P.I.) 5. Sonicar 15 min. 6. Centrifugar T amb, 13.300 rpm, 20 min. 7. Filtrar la muestra y depositar en vial.	1. 1 mL de muestra se centrifuga a T amb, 4500 rpm, 20 min. 2. Tomar pellet + 475 µL Acetonitrilo. 3. Mezclar 30 min en agitador de rodillos. 4. Añadir 475 µL MeOH + 50 µL Limoneno (P.I.) 5. Centrifugar T amb, 13.300 rpm, 20 min. Filtrar la muestra y depositar en vial.

3.4. Estudios de la acción bactericida de las NPs sintetizadas.

El objetivo de estos estudios es poder determinar la acción bactericida de nuestras partículas. Para ello se realizaron ensayos microbiológicos que permitieron obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC).

Las muestras de NPs sintetizadas deben ser esterilizadas previamente para poder realizar el ensayo. Cada muestra se esterilizó con unos filtros Millex ® Duapore® de PVDF con tamaño de poro 0,22 µm (Sigma-Aldrich).

3.4.1. Cultivo bacteriano.

Partimos de un cultivo bacteriano en el que las bacterias se encuentran en su fase estacionaria de crecimiento, es decir en un rango 10^7 - 10^8 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (CFU/mL), de forma que se pueda determinar la supervivencia de las mismas tras la encapsulación. Trabajamos con la bacteria *E. coli* S17 como modelo. Es una bacteria que se encuentra presente en las heridas [19] y que ha sido utilizada previamente en ensayos *in vitro* con principios activos [4].

Siembra de bacterias en tubos: Se cogió 1 tubo Pyrex previamente autoclavado a 121°C y se añadieron 4 mL de disolución TSB líquido (*anexo 2.1.*) que es el medio de cultivo, junto con 8 µL de estreptomicina y 50 µL de *E.coli*. Se debe añadir estreptomicina porque se trabaja con una cepa resistente a dicho antibiótico, y se pretende que la bacteria que crezca sea la resistente para así asegurarnos de que solo crece nuestra bacteria de interés. Se dejaron crecer las bacterias durante 24 h en un incubador Shaker IKA KS4000i control a 37°C y con agitación constante de 150 rpm.

Tras las 24 h, se midió la turbidez del medio para conocer, de manera orientativa, la fase de crecimiento en la que se encontraban las bacterias. Cuando la medida de la densidad óptica del caldo de cultivo, es decir, la medida de la absorbancia del medio a $\lambda=600$ nm, es aproximadamente la unidad, se puede afirmar que las bacterias están en su fase exponencial de crecimiento.

3.4.2. Estudio de la supervivencia bacteriana en NPs finales.

Se pusieron en contacto las bacterias preparadas en el punto 3.4.1. con las distintas muestras. Partimos de un volumen de *E.coli* en fase estacionaria con una concentración de 10^5 CFU/mL . Se prepararon las concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL para niosomas sin EO y por otro lado 0.0010 y 0.0015 mg/mL para de niosomas con EO. Para los ensayos con las muestras de NPs de PLGA se prepararon por una parte concentraciones de 0,25, 0,5, 1, 2, y 2,4 mg/mL para NPs sin EO y por otra parte 0,05, 0,1 y 0,2 mg/mL para NPs de PLGA con EO. En todos ellos se depositaron 11 µL de *E.coli* y 8 µL de estreptomicina. Los volúmenes de NPs y TSB añadidos en cada caso se detallan en el *anexo 2.2.* Los tubos preparados se dejaron en la incubadora otras 24 horas, con agitación y a 37 °C.

Para realizar la determinación de la supervivencia, se realizaron diluciones de las concentraciones preparadas (desde 10^1 hasta 10^6) en una placa MW96. A continuación se realizó la siembra tomando gotas de volúmenes fijos (25 µL) en placas de Agar (*anexo 2.3.*) y dichas placas se depositaron en estufa durante 24 h a 37°C para favorecer el crecimiento de las colonias. Por último se realizó el conteo del número de colonias crecidas y se cuantificó la concentración de bacterias, CFU/mL mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de bacterias } \left(\frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{nº de colonias}}{V \text{ gota (mL)}} \times \text{Factor de dilución}$$

Para cada grupo de pruebas se realizaron los respectivos controles positivos con el fin de, en el caso de no observar crecimiento bacteriano, poder eliminar la hipótesis de que la colonia inoculada no sea viable desde el principio de la prueba.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Caracterización física de las NPs.

Como punto de partida se caracterizaron las NPs vacías, sin encapsular ninguna sustancia con el objetivo de conocer las propiedades físico-químicas de las NPs y posteriormente tratar de preservar dichas propiedades en la encapsulación de los distintos principios activos. La caracterización de nuestros nanosistemas es necesaria para el control de la calidad del producto, que es un requisito previo para su desarrollo y aplicaciones clínicas.

4.1.1. Niosomas vacíos.

Las emulsiones de niosomas presentaron un aspecto homogéneo y un color blanquecino. Las partículas se encontraron en un rango de tamaños de 227 ± 82 nm. En cuanto a su PDI presentaron un valor medio de $0,133 \pm 0,018$. Se dice que el radio hidrodinámico de partículas en suspensión es monodisperso cuando el valor del PDI es menor que 0,100 y por lo tanto podemos concluir que las emulsiones sintetizadas sin encapsulación de ninguna sustancia presentaron partículas con radio hidrodinámico disperso. La carga superficial presentó un valor promedio de $-46,3 \pm 6,8$ mV a pH 6. Estos valores negativos son debidos al surfactante DHP. Dicho surfactante aporta carga negativa a la superficie para evitar así la agregación de NPs y crear una mayor estabilidad en la suspensión, pues un niosoma presenta estabilidad cuando el modulo del potencial Z es mayor que 30 mV [9].

Mediante la observación al TEM podemos conocer el aspecto y la morfología de los niosomas (Figura 7). En las Figuras 7A-D se observa cómo mediante la técnica de síntesis empleada se lograron sintetizar niosomas multilamelares. En la Figura 7A se observan niosomas comprimidos por la acción contigua de partículas. Se observan niosomas agregados a causa del secado de la muestra en la preparación para el TEM. Se disponen muchas partículas en un espacio reducido, se juntan y se amoldan unas con otras dejando hueco para partículas contiguas debido a la alta flexibilidad que presentan. En las Figuras 7C y 7D se observa cómo la zona multilamelar envuelve la zona hidrófila entre bicapas de surfactante y colesterol. La Figura 7D es una clara demostración de que los niosomas presentan un elevado índice de deformación [9]. En ella se muestra un niosoma comprimido por la acción de otros niosomas adyacentes.

Las propiedades del niosoma están específicamente dictadas por el tamaño, la forma y la química de la superficie, que son capaces de modificar la farmacocinética intrínseca del principio activo y su liberación en la zona donde se presenta la patología. Por ello es fundamental conocer las características del niosoma previamente a la encapsulación de distintos EO.

Juan Miguel Pardo Fanlo

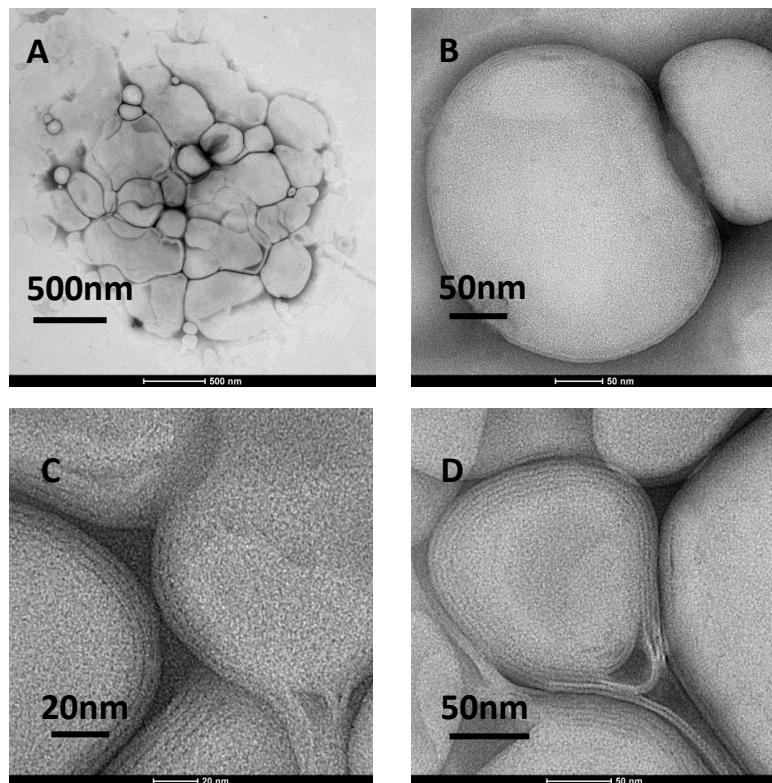


Figura 7. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de las NPs vacías. A) Vista general de niosomas comprimidos. B) Niosomas de simetría ovalada. C) Detalle de las multilamelas. D) Niosoma comprimido por acción de niosomas adyacentes.

4.1.2. Niosomas encapsulando Carvacrol, Timol y Cinamaldehído.

Primero fue realizada la optimización de la encapsulación de Carvacrol en niosomas y en base a los resultados con este EO se pasó a la optimización de la encapsulación de Timol y Cinamaldehído.

4.1.2.1. Niosomas encapsulando Carvacrol.

Se probó el agregado de cantidades de 12, 14, 16, 18 y 20 mg de Carvacrol en distintas síntesis y siguiendo la técnica descrita en el apartado 3.2.1. Posteriormente se realizó su caracterización. En la Tabla 3 se muestran los tamaños de las partículas encapsulando Carvacrol junto con el PDI y la carga superficial.

Tabla 3. Caracterización mediante DLS de los niosomas con distintas cargas de Carvacrol.

Cantidad de Carvacrol	Tamaño de niosoma (nm)	PDI de la muestra	Carga superficial (mV)
12 mg	240 ± 85	0,143 ± 0,021	-45,7 ± 2,1
14 mg	222 ± 75	0,117 ± 0,023	-44,9 ± 3,2
16 mg	225 ± 76	0,115 ± 0,012	-41,8 ± 4,4
18 mg	229 ± 75	0,111 ± 0,028	-44,7 ± 4,1
20 mg	235 ± 71	0,115 ± 0,012	-42,7 ± 6,9

Cada valor representa el promedio de 5 síntesis diferentes ± desviación estándar.

Juan Miguel Pardo Fanlo

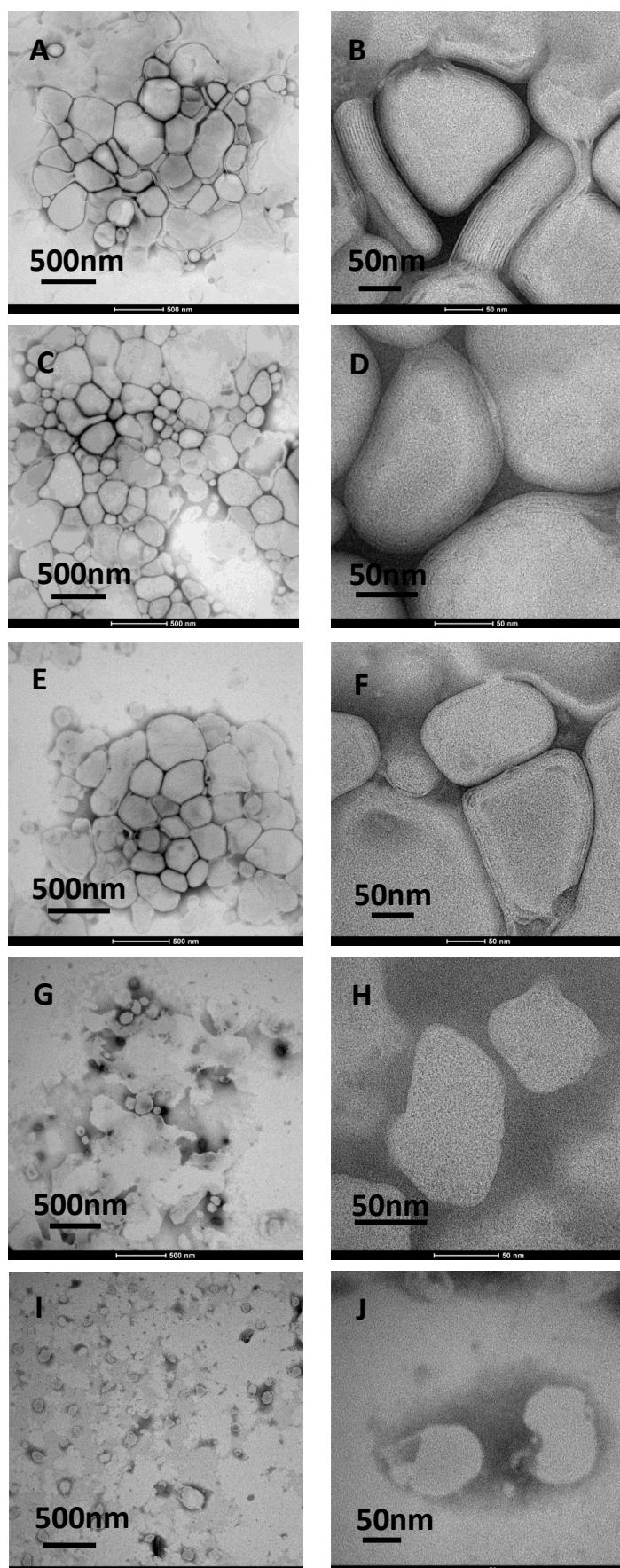


Figura 8. Imágenes TEM de los niosomas con diferentes cantidades de Carvacrol, agregado durante la síntesis A-B) 12 mg de Carvacrol. C-D) 14 mg. E-F) 16 mg. G-H) 18 mg. I-J) 20 mg.

Para todas las cantidades de Carvacrol probadas, los tamaños resultaron similares a los obtenidos para niosomas vacíos. En cuanto al índice de polidispersidad de las distintas muestras, los valores obtenidos estuvieron todos por encima de 0,100 lo que indicaba que las partículas tenían cierta polidispersidad (Tabla 3). En cuanto a su carga superficial todas ofrecían valores similares respecto a los que ofrecían las vesículas vacías y además estos valores estaban todos por debajo de -30 mV lo que indica que nuestras partículas presentan estabilidad y es difícil que tiendan a sufrir agregación entre ellas.

A continuación se realizó su visualización al TEM para poder caracterizar su morfología. En la Figura 8 se muestran las imágenes obtenidas para las distintas cantidades de Carvacrol probadas en el proceso de encapsulación.

En las Figuras 8A-F se observa claramente como los niosomas con cantidades de 12 a 16 mg de Carvacrol en la síntesis se forman por completo preservando su estructura y forma. Cuando se introdujeron en la síntesis 18 mg (Figuras 8G y 8F) los niosomas ya no se formaban por completo y presentaban un aspecto irregular y deformado. Para 20 mg de Carvacrol (Figura 8I) el efecto de deformación era más marcado que para las anteriores partículas. Por tanto a la vista de las imágenes, 16 mg es la máxima cantidad de Carvacrol que se podía incorporar en la síntesis. En la imagen 8E se tiene una vista general de los niosomas con 16 mg de Carvacrol, perfectamente formados, los cuales habían sido comprimidos por el secado de la preparación de la muestra de TEM. En la Figura 8F se aprecian multilamelas en el contorno de los niosomas formados. Se pudo concluir que los niosomas sintetizados con 16 mg de carvacrol (0,275 mg Carvacrol/mg Colesterol) fueron los más óptimos si se comparaban con las imágenes de TEM de la síntesis de niosomas vacíos (Figura 7).

4.1.2.2. Niosomas encapsulando Timol.

Una vez establecido que 16 mg es la mayor cantidad de Carvacrol posible para la síntesis de los niosomas, para Timol se probaron cantidades de 14, 16 y 18 mg. Se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 4. En ella se observa que el tamaño de las vesículas fue comparable al de los niosomas vacíos y los niosomas con Carvacrol. Los valores del PDI se encontraban por encima de 0,100 lo que indica a priori una polidispersidad en el tamaño hidrodinámico de las NPs. La carga superficial presentaba valores similares a los obtenidos en Carvacrol con lo cual la dispersión de las partículas en la suspensión está garantizada.

Tabla 4. Caracterización mediante DLS de los niosomas con distintas cargas de Timol.

Cantidad de Timol	Tamaño de niosoma (nm)	PDI de la muestra	Carga superficial (mV)
14 mg	219 ± 58	0,103 ± 0,023	-41,2 ± 5,4
16 mg	219 ± 70	0,114 ± 0,013	-43,6 ± 2,3
18 mg	228 ± 61	0,106 ± 0,042	-44,7 ± 3,5

Cada valor representa el promedio de 5 síntesis diferentes ± desviación estándar.

En la Figura 9 se presentan las imágenes obtenidas al TEM para niosomas con 14, 16 y 18 mg de Timol. En las Figuras 9A-D para cantidades de 14 y 16 mg de Timol, se observa como los niosomas se formaron correctamente. En la Figura 9C se observan las multilamelas en los niosomas que presentaba una estructura bastante regular, casi esférica. Por otra parte en la Figura 9D, aparece una vista general de los niosomas donde se puede apreciar que las vesículas se formaban de manera similar a la presentada en niosomas con Carvacrol (Figura 8). Cuando se añadieron 18 mg de Timol en la encapsulación (Figuras 9E y 9F) los niosomas se formaban mostrando una peor apariencia y un aspecto más irregular que para menores cantidades de EO. Los niosomas presentaban deformaciones y un aspecto deteriorado como se muestra en la Figura 9F. Concluimos por tanto que la máxima cantidad posible de Timol que se podía añadir en la síntesis eran 16 mg (0,275 mg Timol/mg Colesterol).

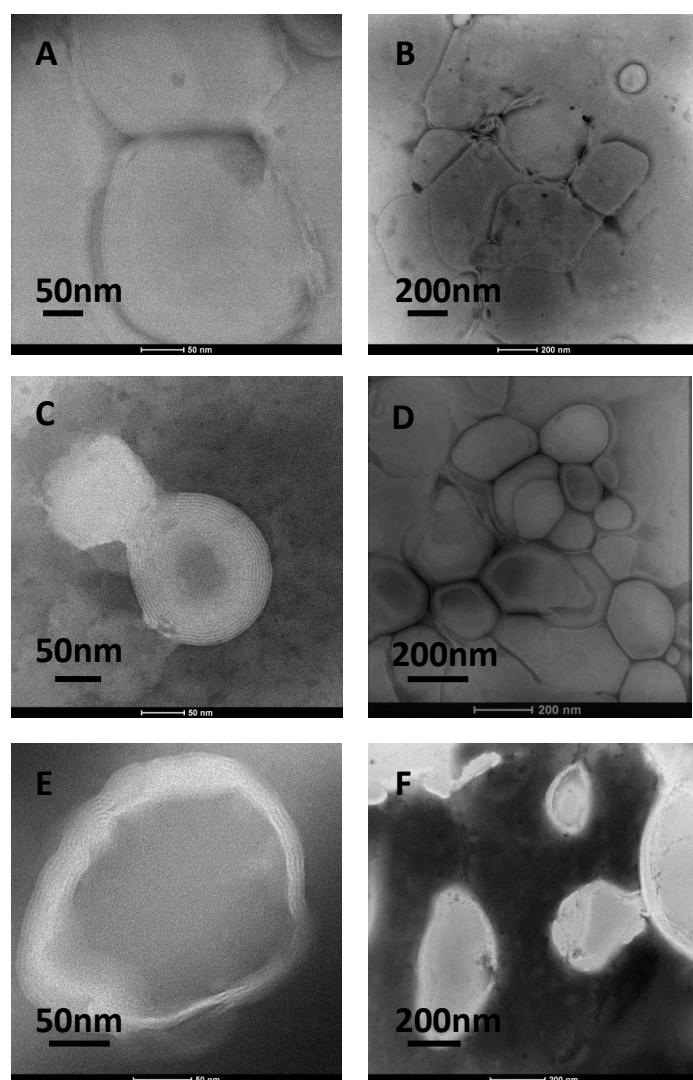


Figura 9. Imágenes de TEM de niosomas encapsulando diferentes cantidades de Timol. A-B) 14 mg de Timol. C-D) 16 mg. E-F) 18 mg.

4.1.2.3. Niosomas encapsulando Cinamaldehído.

Tras la optimización de Carvacrol y Timol, se sintetizaron niosomas añadiendo 16 y 18 mg de Cinamaldehído en la síntesis. En la Tabla 5 se muestran el tamaño de las NPs, la polidispersidad de las muestras y la carga superficial para los niosomas encapsulando Cinamaldehído.

Tabla 5. Caracterización mediante DLS de los niosomas con distintas cargas de Cinamaldehído.

Cantidad de Cinamaldehido	Tamaño de niosoma (nm)	PDI de la muestra	Carga superficial (mV)
16 mg	229 ± 79	0,120 ± 0,041	-47,5 ± 3,0
18 mg	231 ± 70	0,118 ± 0,017	-44,2 ± 5,2

Cada valor representa el promedio de 5 síntesis diferentes ± desviación estándar.

Los resultados concuerdan con lo comentado anteriormente para las cantidades probadas de Cinamaldehído. Resultados adecuados de tamaño, PDI por encima de 0,100 indicando que las NPs son polidispersas y valores de carga por debajo de -30 mV permitiendo que los niosomas no se agreguen entre sí.

Las imágenes de TEM obtenidas para 16 y 18 mg de Cinamaldehído se muestran en la Figura 10. En ellas se observa la formación adecuada de niosomas con 16 mg de Cinamaldehído (Figuras 10A y 10B) donde hay un gran número de niosomas formados y esto concuerda con las imágenes obtenidas para niosomas vacíos (Figura 7) preservando sus propiedades. Para 18 mg de Cinamaldehído (Figura 10C) los niosomas no se forman de manera adecuada como lo hacían para cantidades menores de EO.

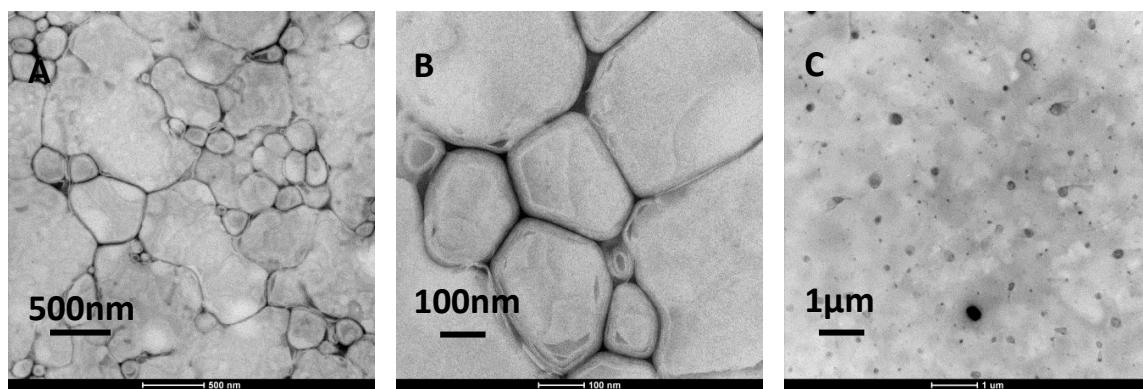


Figura 10. Imágenes de TEM de niosomas encapsulando diferentes cantidades de Cinamaldehído. A-B) 16 mg de Cinamaldehído. C) 18 mg.

Se concluyó por tanto a partir de las imágenes de la Figura 10 que 16 mg era la máxima cantidad posible de Cinamaldehído que se podía incorporar en la síntesis (0,275 mg Cinamaldehído/ mg Colesterol) preservando las características físicas de los niosomas y permitiendo su correcta formación.

4.1.3. NPs de PLGA vacías.

Para las síntesis de las NPs poliméricas fue utilizada una metodología basada en la técnica de emulsión-evaporación del disolvente descrita en el apartado 3.2.2.

Previo a la elaboración de las NPs cargadas con EO, el procedimiento de síntesis fue optimizado en NPs sin EO. Las NPs fueron sintetizadas utilizando como estabilizador el surfactante Pluronic F68 que se adiciona a la fase orgánica. El surfactante determina la formación de micelas y afecta a la distribución de tamaño de la partícula. Las partículas medidas en mediante DLS presentaron tamaños de 131 ± 53 nm. Otras investigaciones mostraron resultados similares utilizando el Pluronic F68 como agente estabilizador de NPs de PLGA [20]. Hemos utilizado como disolvente acetato de etilo, que se prefiere sobre diclorometano y cloroformo porque es menos tóxico para aplicaciones *in vivo*. De acuerdo a las imágenes obtenidas por SEM mostradas en la Figura 11 se observan NPs de tamaños uniformes. Las NPs presentaron forma esférica, lo que está de acuerdo con otros estudios que indicaron que el acetato de etilo genera la formación de partículas más esféricas y de menor tamaño que con otro disolvente [21].

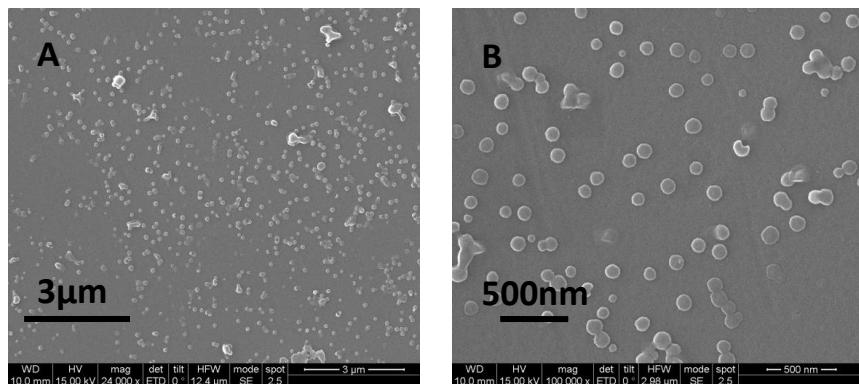


Figura 11. Imágenes de SEM para partículas de PLGA vacías.

Se obtuvieron valores de polidispersidad de $0,110 \pm 0,017$ que indican una limitada variabilidad del tamaño medio de las partículas. Ratzinger y colaboradores (2010) obtuvieron similares resultados mediante el método de emulsión-evaporación [22]. Por tanto, los resultados fueron considerados adecuados. La carga superficial de las NPs como ya hemos comentado con anterioridad es un parámetro importante para la evaluación de la estabilidad y la interacción de las NPs entre sí y con otras sustancias. Para NPs de PLGA cuanto mayor es el valor absoluto del potencial zeta mayor es la cantidad de carga de la superficie. Valores de potencial Z elevados sugieren mayor estabilidad al sistema, ya que la repulsión de partículas previene el fenómeno de aglomeración/agregación [23]. El resultado promedio de carga superficial obtenido para NPs de PLGA vacías fue $-17,1 \pm 1,8$ mV a pH 6.

4.1.4. PLGA encapsulando Carvacrol, Timol y Cinamaldehído.

En primer lugar se comenzó con el Carvacrol preparando síntesis de NPs de PLGA con el agregado en la síntesis de cantidades de 50, 75, 100, 150 y 200 mg de EO. Una vez se puso a punto la técnica para el Carvacrol, se pasó al Timol y en última instancia al estudio con el Cinamaldehído.

4.1.4.1. PLGA encapsulando Carvacrol.

El parámetro del tamaño de partícula es una característica física importante, ya que está relacionada con el área superficial de las partículas y su relación Superficie/Volumen y consecuentemente con la velocidad de difusión del EO a partir de la matriz polimérica, modificando la velocidad de la liberación del EO a partir del sistema nanoparticulado. En la Tabla 6 se muestran los resultados de tamaño de la NP, polidispersidad y la carga superficial obtenidos para las distintas cantidades de Carvacrol probadas.

Para todas las cantidades probadas de Carvacrol se obtuvieron tamaños similares respecto a los obtenidos para NPs vacías. El índice de polidispersidad en la medida del tamaño hidrodinámico de todas las muestras resultó por encima de 0,100 lo que indica que las partículas no son de tamaño homogéneo. La carga superficial presenta valores similares comparados con los obtenidos para NPs de PLGA vacías.

Tabla 6. Caracterización mediante DLS de las NPs de PLGA con distintas cargas de Carvacrol.

Cantidad de Carvacrol	Tamaño NPs PLGA (nm)	PDI de la muestra	Carga superficial (mV)
50 mg	141 ± 52	0,140 ± 0,039	-16,8 ± 8,1
75 mg	136 ± 50	0,138 ± 0,038	-18,7 ± 5,2
100 mg	126 ± 50	0,159 ± 0,019	-16,6 ± 5,0
150 mg	135 ± 47	0,130 ± 0,055	-17,3 ± 3,7
200 mg	129 ± 58	0,132 ± 0,030	-16,8 ± 2,2

Cada valor representa el promedio de 5 síntesis diferentes ± desviación estándar.

Para examinar su morfología se tomaron imágenes de SEM de las muestras con las distintas cantidades de Carvacrol agregadas. Dichas imágenes se muestran en la Figura 12.

Juan Miguel Pardo Fanlo

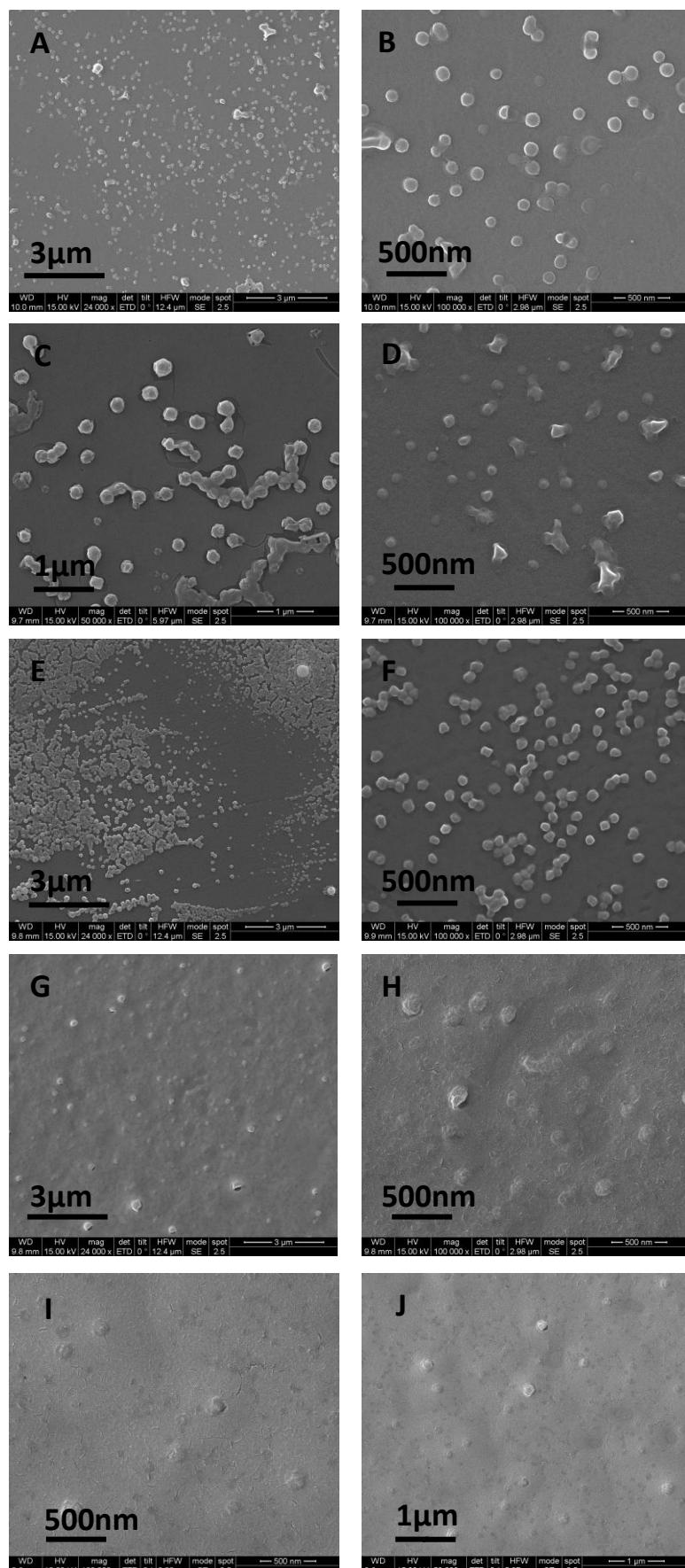


Figura 12. Imágenes de SEM para NPs de PLGA con diferentes cantidades de Carvacrol. A-B) 50 mg de Carvacrol. C-D) 75 mg. E-F) 100 mg. G-H) 150 mg. I-J) 200 mg.

Mirando las imágenes de SEM de NPs encapsulando Carvacrol se observa que para cantidades entre 50 y 100 mg de Carvacrol (Figuras 12A-F) se logra sintetizar NPs de PLGA que presentan formas esféricas y bastante homogéneas. Por otra parte para 150 y 200 mg de Carvacrol, las Figuras 12G-J muestran restos de materia orgánica, de Carvacrol en este caso, que no se ha encapsulado y se sitúa entre las NPs, ocultándolas prácticamente por completo. Este hecho no sucede para cantidades entre 50 y 100 mg de EO, por lo que en las síntesis posteriores se adoptó una relación 2 mg Carvacrol/mg PLGA.

4.1.4.2. PLGA encapsulando Timol.

Se realizaron síntesis de NPs de PLGA con Timol probando las mismas cantidades que con Carvacrol. Tras la observación en el SEM se determinó que las mejores partículas eran las se obtenían agregando 100 mg del EO en la síntesis (2 mg Timol/mg PLGA) ya que las partículas tenían forma esférica y eran bastante homogéneas. Además no se observaban restos orgánicos como sucedía para cantidades de Carvacrol a partir de 150 mg en adelante (Figura 12). Las NPs con 100 mg de Timol se muestran en la Figura 13. En las imágenes también se observa cierta agregación de las NPs. Los resultados de carga obtenidos junto con los de polidispersidad y tamaño se muestran en la Tabla 7. En tamaño y PDI, presentaban valores similares a los obtenidos en la síntesis de NPs vacías y NPs encapsulando Carvacrol, por lo que los consideramos adecuados.

Tabla 7. Caracterización mediante DLS de las NPs de PLGA con distintas cargas de Timol.

Cantidad de Timol	Tamaño NPs PLGA (nm)	PDI de la muestra	Carga superficial (mV)
50 mg	142 ± 43	0,131 ± 0,029	-16,7 ± 5,2
75 mg	156 ± 49	0,114 ± 0,031	-15,2 ± 2,1
100 mg	138 ± 60	0,116 ± 0,030	-18,6 ± 2,3

Cada valor representa el promedio de 5 síntesis diferentes ± desviación estándar.

En la Figura 13 se muestran las imágenes de SEM para 100 mg de timol.

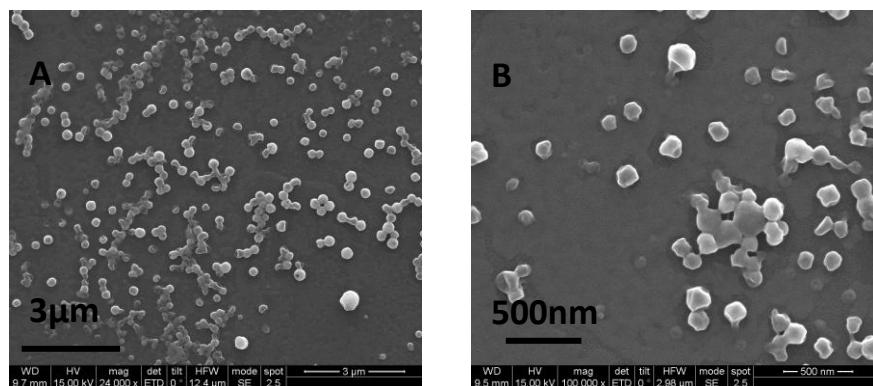


Figura 13. Imágenes de SEM para NPs de PLGA encapsulando Timol. A-B) 100 mg de Timol.

4.1.4.3. PLGA encapsulando Cinamaldehído.

Una vez optimizada la encapsulación para Carvacrol y Timol se probó con las cantidades de 50, 75 y 100 mg de Cinamaldehído. Tras la observación en el SEM se determinó que las mejores partículas eran las obtenidas agregando 100 mg de Cinamaldehído (2 mg Cinamaldehído/mg PLGA) en la síntesis (Figura 14). Para mayores cantidades de Cinamaldehído quedaba gran parte del EO fuera de las NPs.

A partir de las imágenes de SEM de la Figura 14 se determinó una vez más que tenían la estructura y forma esférica adecuada y eran bastante homogéneas en cuanto a tamaño. En la Tabla 8 se muestran los datos recogidos de tamaño, PDI y carga que presentan valores similares a los obtenidos para EO sintetizados previamente.

Tabla 8. Caracterización mediante DLS de las NPs de PLGA con distintas cargas de Cinamaldehído.

Cantidad de Cinamaldehído	Tamaño NPs PLGA (nm)	PDI de la muestra	Carga superficial (mV)
50 mg	146 ± 49	0,120 ± 0,014	-16,8 ± 2,3
75 mg	142 ± 52	0,121 ± 0,014	-16,8 ± 3,0
100 mg	140 ± 49	0,136 ± 0,018	-17,5 ± 1,2

Cada valor representa el promedio de 5 síntesis diferentes ± desviación estándar.

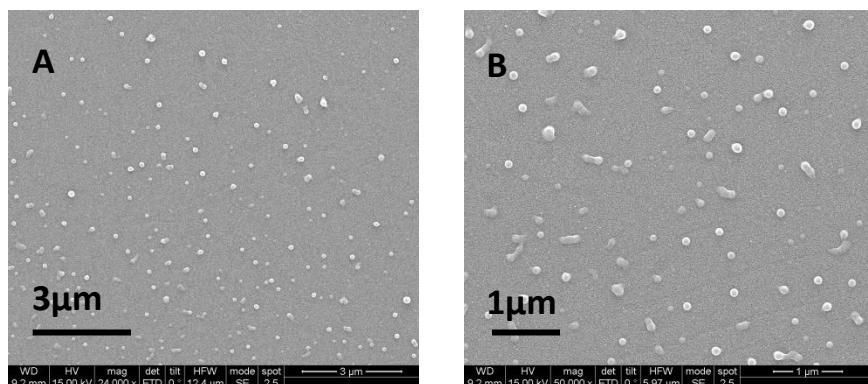


Figura 14. Imágenes de SEM para NPs de PLGA encapsulando Cinamaldehído. A-B) 100 mg de Cinamaldehído.

4.2. Rendimiento de la producción de NPs.

En base a los resultados anteriores, se decidió continuar la caracterización de los niosomas y partículas de PLGA con las mejores características morfológicas, es decir con una relación 0,275 mg EO/mg Colesterol y 2 mg EO/mg PLGA para los niosomas y partículas de PLGA respectivamente. La determinación del rendimiento másico de las síntesis de partículas de PLGA y niosomas vacías y cargadas con EOs se realizó mediante pesada en una microbalanza de los residuos obtenidos de alícuotas de las síntesis luego de eliminado el disolvente por

Juan Miguel Pardo Fanlo

secado. Los resultados se muestran en las tablas 9 y 10. En todas las síntesis realizadas los resultados mostraron reproducibilidad.

Tabla 9. Rendimiento de la síntesis de niosomas

Tipo de partícula	Concentración de partículas (mg/mL)	Volumen final (mL)	Masa (mg)
Niosomas vacíos	0,5 ± 0,2	10,9 ± 0,8	5,4 ± 0,2
Niosomas + Carvacrol	0,7 ± 0,1	10,2 ± 0,5	7,1 ± 0,4
Niosomas + Timol	0,9 ± 0,1	10,4 ± 1,1	9,1 ± 1,0
Niosomas Cinamaldehido	0,7 ± 0,1	11,0 ± 0,4	7,7 ± 0,3

Cada valor representa el promedio de 4 síntesis diferentes ± desviación estándar.

Tabla 10. Rendimiento de la síntesis de partículas de PLGA.

Tipo de partícula	Concentración de partículas (mg/mL)	Volumen final (mL)	Masa (mg)
PLGA vacíos	2,9 ± 0,1	10,7 ± 0,2	30,9 ± 0,6
PLGA + Carvacrol	3,2 ± 0,2	12,0 ± 0,2	38,3 ± 0,7
PLGA + Timol	2,5 ± 0,1	10,8 ± 0,6	26,9 ± 1,6
PLGA + Cinamaldehído	2,1 ± 0,2	10,1 ± 0,6	21,2 ± 1,2

Cada valor representa el promedio de 4 síntesis diferentes ± desviación estándar.

4.3. Concentración EO encapsulado.

Como se describe en el apartado 3.2.3., las muestras de las NPs sintetizadas se sometieron a un proceso de preparación de la muestra para su posterior análisis por espectrometría de masas. Durante dicho proceso se rompían las NPs liberando el EO encapsulado. Se pretendía determinar la cantidad de EO contenido en las partículas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11. La eficiencia de encapsulación (EE) de los sistemas vesiculares se define como la cantidad de principio activo cargada dentro de la estructura nanoparticulada respecto de la cantidad agregada en la síntesis:

$$EE = \frac{\text{Cantidad encapsulada}}{\text{Cantidad total}} \times 100$$

Donde la cantidad total es la cantidad inicial de principio activo que se emplea en la síntesis de las NPs y la cantidad encapsulada es la obtenida por el análisis espectrométrico [9].

Tabla 11. Concentración de EO encapsulado en el interior de la NP y eficiencia de encapsulación.

Tipo de NP	Concentración EO (mg/mL)	Eficiencia encapsulación (%)
Niosomas+ Carvacrol	$2,45 \times 10^{-3} \pm 0,90 \times 10^{-3}$	0,34
Niosomas + Timol	$2,06 \times 10^{-3} \pm 0,34 \times 10^{-3}$	0,28
Niosomas + Cinamaldehído	$2,06 \times 10^{-3} \pm 0,10 \times 10^{-3}$	0,29
PLGA + Carvacrol	$127,66 \times 10^{-3} \pm 26,64 \times 10^{-3}$	2,55
PLGA + Timol	$558,14 \times 10^{-3} \pm 40,88 \times 10^{-3}$	11,16
PLGA + Cinamaldehído	$288,95 \times 10^{-3} \pm 5,74 \times 10^{-3}$	5,78

Cada valor representa el promedio de 4 síntesis diferentes \pm desviación estándar.

A partir de los resultados recogidos en la Tabla 11, se observa que la mayor concentración de EO se encontró en la encapsulación de Timol en NPs de PLGA con una eficiencia de encapsulación del 11.16%. La eficacia de encapsulación de EO en NPs de PLGA fue baja comparada con otros estudios reportados [26]. Por otra parte se encontraron diferencias entre niosomas y NPs de PLGA. Atendiendo a la EE, se observó que los niosomas cargados con EOs presentaban menor EE que las NPs de PLGA cargadas con los mismos EOs. Estos resultados de EE tan bajos podrían deberse a la alta volatilidad de los EOs estudiados y la posibilidad de perder gran parte de su contenido en las fases iniciales de la síntesis, especialmente acusado en niosomas donde en la primera etapa se aplica un proceso de calentamiento de la muestra a 60°C durante 5 min.

4.4. Ensayos microbiológicos.

Como se comentó en el apartado 3.4. se pretendía determinar la acción bactericida de nuestras partículas ya que el objetivo buscado era una aplicación bactericida en apósisos para heridas.

Los resultados del crecimiento de bacterias (CFU/mL) para las distintas los niosomas vacíos (Tabla 12) junto con encapsulaciones de niosomas con EOs (Tabla 13) se muestran a continuación. La concentración de EO se calculó teniendo en cuenta la cantidad de principio activo encapsulado en las NPs determinado experimentalmente (Tabla 11). Se observa que los niosomas vacíos no tienen ningún efecto bactericida en las concentraciones probadas. Por otra parte concentraciones de EO de 0,001 mg/mL tienen un efecto inhibidor (MIC) y si se aumenta a 0,0015 mg/mL no hay crecimiento bacteriano (MBC). Los resultados obtenidos para NPs de PLGA aparecen en la Tabla 14. Para el Control positivo se obtuvo un valor promedio de CFU/mL \pm desviación estándar de $3,30 \times 10^8 \pm 8,80 \times 10^7$.

Tabla 12. Concentraciones de niosomas vacíos probadas con *E.coli* y las CFUs obtenidas.

Tipo NP	Concentración de NP (mg/mL)	CFUs/mL
Niosomas vacíos	0,05	$3,12 \times 10^8 \pm 3,34 \times 10^7$
	0,1	$5,03 \times 10^8 \pm 1,03 \times 10^8$
	0,2	$2,87 \times 10^8 \pm 3,61 \times 10^7$

Cada valor de CFU/mL representa el promedio de 4 ensayos independientes por triplicado ± desviación estándar.

Tabla 13. Concentraciones de EO encapsulados en niosomas probadas con *E.coli* y las CFUs.

tipo NP	Concentración de EO (mg/mL)	CFUs/media
Niosomas Carvacrol	0,0010	$2,71 \times 10^5 \pm 4,58 \times 10^4$
	0,0015	*
Niosomas Timol	0,0010	$5,23 \times 10^3 \pm 2,19 \times 10^3$
	0,0015	*
Niosomas Cinamaldehído	0,0010	$7,33 \times 10^2 \pm 4,46 \times 10^2$
	0,0015	*

Cada valor de CFU/mL representa el promedio de 4 ensayos independientes por triplicado ± desviación estándar.

*No hay crecimiento de bacterias.

Tabla 14. Concentraciones de NPs de PLGA vacías probadas con *E.coli* y las CFUs obtenidas.

Tipo NP	Concentración (mg/mL)	CFUs/mL
NPs de PLGA vacías	0,25	$2,58 \times 10^8 \pm 3,40 \times 10^7$
	0,5	$2,62 \times 10^8 \pm 5,46 \times 10^7$
	1	$2,39 \times 10^8 \pm 2,35 \times 10^7$
	2	$1,17 \times 10^8 \pm 7,41 \times 10^7$
	2,4	$1,89 \times 10^8 \pm 2,36 \times 10^7$

Cada valor de CFU/mL representa el promedio de 4 ensayos independientes por triplicado ± desviación estándar.

Tabla 15. Concentraciones de EO encapsulados en NPs de PLGA probadas con *E.coli* y las CFUs

Tipo NP	Concentración de EO (mg/mL)	CFUs/mL
PLGA Carvacrol	0,05	*
	0,1	*
PLGA Timol	0,05	*
	0,1	*
	0,2	*
PLGA Cinamaldehído	0,05	*
	0,1	*
	0,2	*

Cada valor de CFU/mL representa el promedio de 4 ensayos independientes por triplicado ± desviación estándar.

*No hay crecimiento de bacterias

No se encontró efecto bactericida ni inhibición del crecimiento en las partículas de PLGA vacías. Para NPs de PLGA encapsulando EOs (Tabla 15) se probaron concentraciones de principio activo de 0,05, 1 y 2 mg/mL y no se observó crecimiento bacteriano en ninguna de ellas, incluso para la menor concentración probada, es decir 0,05 mg/mL de todos los principios activos. Se puede decir que la MBC para este caso será menor o igual a 0,05 mg/mL de EO cargado en las partículas. .

De los resultados mostrados en las Tablas 12-15 se concluyó que la MIC para niosomas encapsulando EO se encontraba en un valor de 0,001 mg/mL y para NPs de PLGA la MBC es menor o igual a de 0,05 mg/mL. Se compararon dichos resultados de MIC y MBC con los resultados obtenidos por el grupo en investigaciones anteriores en los que se obtuvo la MIC y la MBC para Carvacrol, Timol y Cinamaldehído puros, sin encapsulación. Estos resultados se presentan en la Tabla 17.

Tabla 16. MIC y MBC para Carvacrol, Timol y Cinamaldehído libres en contacto con *E.coli*.

Principio activo	MIC (mg/mL)	MBC(mg/mL)
Carvacrol	0,1	0,4
Timol	0,1	0,3
Cinamaldehído	0,2	0,3

Los EOs encapsulados en NPs de PLGA y niosomas presentaron en ambos casos una MBC menor que la MBC obtenida para los EOs libres. En el caso de los niosomas, todos los EOs incrementaron significativamente su acción antimicrobiana después de la encapsulación.

Estudios similares con liposomas, vehículos con cierta similitud con niosomas, reportaron resultados semejantes, donde aumentaba la acción de los principios activos tras su encapsulación [24].

En las NPs de PLGA también se vio aumentada la acción antimicrobiana después de la encapsulación de EOs. Esto mismo también ha sido reportado por otros investigadores que utilizaban NPs de PLGA para encapsular EOs y observaron un incremento de sus propiedades antimicrobianas debido a la alteración en la estructura bacteriana causada por las NPs que permiten una mayor inclusión del EO[25].

Es posible que en ambos casos, tanto para niosomas como para NPs de PLGA exista una mayor interacción de las partículas con las bacterias debido a su tamaño nanométrico y esto aumente el efecto de los EOs. Las propiedades antimicrobianas de estas nanopartículas son el resultado del pequeño tamaño de las partículas de principio activo que tienen una alta tensión superficial que puede fusionarse y posteriormente interrumpir la membrana bacteriana[6].

5. CONCLUSIONES.

En este trabajo de investigación se han sintetizado niosomas y nanopartículas de PLGA encapsulando principios activos naturales para aplicaciones biomédicas.

Los niosomas se sintetizaron mediante una técnica combinada de la técnica REV y microfluídica. Tras la síntesis y caracterización de las vesículas se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- A partir de la optimización del proceso de síntesis se determinó que la cantidad máxima de principio activo que permite la formación de los niosomas es 0,275 mg de EO por mg de Colesterol. Las imágenes de TEM revelaron niosomas con una estructura perfectamente definida y multilamelar.
- Los niosomas sintetizados presentaron tamaños hidrodinámicos en un intervalo entre 220 y 230 nm. Los valores del PDI indican poblaciones de tamaños homogéneos. Los valores de carga superficial resultaron ser menores que -30 mV lo que indicaba que los niosomas presentaban una alta carga en su superficie, lo que sugiere una alta estabilidad de las partículas.
- La eficacia de encapsulación para los tres principios activos fue baja sin llegar en ninguno al 1%.
- Los niosomas cargados con EO fueron capaces de incrementar la actividad antimicrobiana del EO respecto de cuando el EO está libre, sin encapsular. Se obtuvo una MIC de 0,001 mg/mL para los tres principios activos encapsulados en niosomas.

Las nanopartículas de PLGA se sintetizaron mediante la técnica emulsión-evaporación del disolvente. Se puede concluir que:

- La máxima cantidad de EO que las NPs de PLGA que se puede agregar en la síntesis eran 2 mg de principio activo por mg de PLGA.
- Las NPs sintetizadas presentaron tamaños hidrodinámicos por debajo de los 200 nm para los tres EOs encapsulados. Las suspensiones sintetizadas en las condiciones óptimas presentaron bajos valores de PDI y los valores de carga superficial aseguran la estabilidad de las NPs.
- Las imágenes obtenidas con el SEM de las NPs de PLGA revelaron una estructura y morfología esférica de las partículas con elevada monodispersidad pero con la desventaja de sufrir cierta agregación.
- Las eficacias de encapsulación varían para la encapsulación de cada principio activo, siendo la mejor EE para el Timol, alcanzando un 11,16 % de eficacia mientras que Carvacrol y Cinamaldehído presentaron valores de 2,55 y 5,78% respectivamente.
- Los estudios bactericidas de las NPs encapsulando los distintos EOs mostraron un incremento de la acción bactericida de los EOs encapsulados respecto de cuando se encuentran puros. Para los tres EOs encapsulados en PLGA se obtuvo una MBC menor o igual a 0,05 mg/mL.

Juan Miguel Pardo Fanlo

Como trabajo futuro habría que realizar un estudio de la cinética de liberación de los principios activos en un medio biológico.

Este trabajo tenía como objetivo la elaboración de dos tipos de NPs distintas que permitiesen la encapsulación de principios activos. Tal y como mostraron los resultados en conjunto, las partículas de elección para continuar en el futuro con el desarrollo de nuevos apósitos con propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y regenerativas serían las NPs de PLGA que ofrecieron mayores cantidades de EO encapsuladas con una mayor eficacia de encapsulación.

Juan Miguel Pardo Fanlo

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría darle las gracias a mi directora, la doctora Silvia Irusta por haberme dado la oportunidad de poder realizar este trabajo. También quiero agradecer la ayuda en todo momento de las doctoras Gracia Mendoza y Nuria Navascués.

Al grupo NFP (Nanostructured Films and Particles) y al INA (Instituto de Nanociencia de Aragón) por haberme acogido en sus instalaciones.

A mis compañeros Rubén, Cris, Enrique, Carlos, Isabel, ya que sin ellos me hubiese resultado imposible completar este trabajo.

Por último quiero darle las gracias en especial a Sara por toda la ayuda y atención prestada y por todo lo que me ha enseñado durante estos meses.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Lazarus, G. S., Cooper, D. M., Knighton, D. R., Margolis, D. J., Percoraro, R. E., Rodeheaver, G., & Robson, M. C. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair and Regeneration*, 2(3), 165-170.
- 2 Winter, George D. "Formation of the scab and the rate of epithelialization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig." (1962): 293-294.
- 3 Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N., & Eccleston, G. M. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(8), 2892-2923.
- 4 Majeed, H., Bian, Y. Y., Ali, B., Jamil, A., Majeed, U., Khan, Q. F., ... & Fang, Z. (2015). Essential oil encapsulations: uses, procedures, and trends. *RSC Advances*, 5(72), 58449-58463.
- 5 Resistance, A. (2015). Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. The Review on Antimicrobial Resistance, Chaired by Jim O'Neill. December 2014.
- 6 Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- 7 Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- 8 Soliman, E. A., El-Moghazy, A. Y., El-Din, M. M., & Massoud, M. A. (2013). Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and in vitro evaluation of antifungal activity.
- 9 Marianetti, C., Di Marzio, L., Rinaldi, F., Celia, C., Paolino, D., Alhaique, F., ... & Carafa, M. (2014). Niosomes from 80s to present: the state of the art. *Advances in colloid and interface science*, 205, 187-206.
- 10 Selecí, D. A., Selecí, M., Walter, J. G., Stahl, F., & Schepel, T. Niosomes as Nanoparticle Drug Carriers: Fundamentals and Recent Applications.
- 11 Uchegbu, I. F., & Vyas, S. P. (1998). Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *International Journal of pharmaceutics*, 172(1), 33-70.

- 12 Garcia, S. (2016) Diseño y caracterización de un método directo de síntesis de niosomas por técnicas microfluídicas siguiendo los principios del proceso "Reverse Phase Evaporation. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza.
- 13 Mandoli, C., Pagliari, F., Pagliari, S., Forte, G., Di Nardo, P., Licoccia, S., & Traversa, E. (2010). Stem cell aligned growth induced by CeO₂ nanoparticles in PLGA scaffolds with improved bioactivity for regenerative medicine. *Advanced Functional Materials*, 20(10), 1617-1624.
- 14 Bae, S. E., Son, J. S., Park, K., & Han, D. K. (2009). Fabrication of covered porous PLGA microspheres using hydrogen peroxide for controlled drug delivery and regenerative medicine. *Journal of Controlled Release*, 133(1), 37-43.
- 15 Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., & Hatton, P. V. (2014). An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, 15(3), 3640-3659.
- 16 Rosas, J. E., & Pedraz, J. L. (2007). Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 36(2), 134-153.
- 17 Astete, C. E., & Sabliov, C. M. (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(3), 247-289.
- 18 Gutiérrez, J. M., González, C., Maestro, A., Sole, I., Pey, C. M., & Nolla, J. (2008). Nanoemulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(4), 245-251.
- 19 Mihai, M. M., Giurcăneanu, C., Popa, L. G., Niăipir, C., & Popa, M. I. (2015). Controversies and challenges of chronic wound infection diagnosis and treatment. *Modern Medicine*, 22(4), 375-381.
- 20 Song, K. C., Lee, H. S., Choung, I. Y., Cho, K. I., Ahn, Y., & Choi, E. J. (2006). The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly (d, l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 276(1), 162-167.
- 21 Legrand, P., Lesieur, S., Bochot, A., Gref, R., Raatjes, W., Barratt, G., & Vauthier, C. (2007). Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics*, 344(1), 33-43.

Juan Miguel Pardo Fanlo

- 22 Ratzinger, G., Agrawal, P., Körner, W., Lonkai, J., Sanders, H. M., Terreno, E., ... & Gabor, F. (2010). Surface modification of PLGA nanospheres with Gd-DTPA and Gd-DOTA for high-relaxivity MRI contrast agents. *Biomaterials*, 31(33), 8716-8723.
- 23 Shaikh, J., Ankola, D. D., Beniwal, V., Singh, D., & Kumar, M. R. (2009). Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3), 223-230.
- 24 Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food chemistry*, 112(1), 77-83.
- 25 Iannitelli, A., Grande, R., Stefano, A. D., Giulio, M. D., Sozio, P., Bessa, L. J., ... & Cellini, L. (2011). Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. *International journal of molecular sciences*, 12(8), 5039-5051.
- 26 Gomes,C., Moreira, R. G., & Castell-Perez, E. (2011). Poly(DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. *Journal of Food Science*, 76(2), N16-N24.
- 27 Rajera, R., Nagpal, K., Singh, S. K., & Mishra, D. N. (2011). Niosomes: a controlled and novel drug delivery system. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(7), 945-953.
- 28 Chandu, V. P., Arunachalam, A., Jeganath, S., Yamini, K., Tharangini, K., & Chaitanya, G. (2012). Niosomes: a novel drug delivery system. *Int J Novel Trends Pharm Sci*, 2(1), 25-31.