

Resumen

En este proyecto se ha realizado el estudio de un nuevo material compuesto conformado como una matriz de microfibras de dos biopolímeros de diferentes hidrofobicidades, poliláctida (PLA, hidrofóbico) y polietilenglicol (PEG, hidrofílico). Las fibras se obtuvieron mediante la técnica de *electrospinning* o electrohilado de dos disoluciones independientes de cada homopolímero. Para ello, los dos sistemas de inyección fueron posicionados a 180° el uno del otro (en direcciones opuestas), y las electrofibras producidas recogidas en un colector giratorio colocado a una distancia media entre ambas agujas, lo cual permite una superposición de las fibras producidas para obtener matrices con distribución homogénea de ambos polímeros. Matrices con diferentes composiciones de PLA/PEG fueron obtenidas fijando el flujo de la disolución de PEG y variando el flujo de la disolución de PLA.

Las matrices de fibras fueron caracterizadas morfológicamente por microscopía electrónica de barrido (SEM); sus propiedades térmicas se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y por termogravimetría (TGA). También se estudió la estabilidad de las matrices después de eliminar las fibras de PEG mediante su disolución en agua. Así, fueron determinadas las modificaciones estructurales (morfología y diámetro de fibras) mediante SEM, y la pérdida de PEG fue cuantificada por resonancia magnética nuclear (RMN), y cualitativamente demostrada por FTIR.

Las matrices fueron funcionalizadas para una actividad antibacteriana. Para ello, se prepararon matrices cargando en las fibras de PLA el antimicrobiano Triclosan 1 % (TCS) o el polímero antimicrobiano Polihexametilenbiguanida 0,25 % (PHMB). En estas matrices se estudió el comportamiento de liberación de los antimicrobianos en dos medios: en medio con carácter hidrofílico, tampón fosfato salino (PBS), y en medio con carácter hidrofóbico, PBS suplementado al 70 % con etanol absoluto (PBS-EtOH 70 %). Finalmente, se determinó la actividad antimicrobiana de las matrices mediante ensayos microbiológicos de inhibición del crecimiento y adhesión bacteriana. Asimismo, se determinó su biocompatibilidad y aplicación como plataforma 3D para la adhesión y la proliferación celular mediante ensayos de cultivo *in-vitro* de líneas celulares.

Sumario

RESUMEN	1
SUMARIO	2
GLOSARIO	5
1. PREFACIO	7
1.1. Origen del proyecto	7
1.2. Motivación.....	7
1.3. Requerimientos previos	7
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1. Polímeros Biodegradables	8
2.1.1. Generalidades	8
2.1.2. Mecanismos de degradación.....	9
2.1.3. Clasificación.....	10
2.1.4. Poliésteres: Poliláctida.....	11
2.1.5. Poliéteres: Polietilenglicol	14
2.2. Aplicaciones biomédicas de los polímeros biodegradables.....	16
2.2.1. Generalidades	16
2.2.2. Andamios temporales (" <i>temporary scaffolds</i> ").....	17
2.2.3. Regeneración de tejidos (" <i>tissue engineering</i> ")	18
2.3. Materiales para la liberación controlada de fármacos.....	19
2.3.1. Polihexametilenbiguanida (PHMB)	20
2.3.2. Triclosán (TCS).....	21
3. ELECTROSPINNING	22
3.1.1. Generalidades	22
3.1.2. Principios de la técnica	22
3.1.3. Parámetros en el proceso.....	24
3.1.4. Aplicaciones generales	27
3.1.5. Aplicaciones biomédicas	27
4. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	30
5. OBJETIVOS	33
5.1. Objetivo general.....	33
5.2. Objetivos específicos.....	33

6. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1. Reactivos.....	35
6.2. Electrospinning.....	36
6.3. Microscopia	37
6.3.1. Microscopio óptico	37
6.3.2. Microscopio electrónico	38
6.3.3. Análisis por RMN (Resonancia Magnética Nuclear).....	39
6.3.4. Análisis Infrarrojos	41
6.3.5. Análisis térmico: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	43
6.3.6. Ángulos de contacto (CA).....	45
6.3.7. Espectroscopia de ultravioleta (UV).....	46
6.4. Modelos cinéticos de liberación	47
6.5. Cultivos bacterianos.....	48
6.6. Cultivos celulares	49
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
7.1. Optimización de las condiciones operacionales de Electrospinning	53
7.2. Diseño-1: Matrices híbridas de fibras de PLA 7%-wt y fibras de PEG 35%-wt en DCM:DMF (70:30, w:w). Distancia aguja-colector 12 cm.	53
7.2.1. Morfología de las fibras.....	55
7.2.2. Diámetros de las fibras	55
7.2.3. Composición de las matrices.....	58
7.2.4. Estabilidad de las fibras en agua.....	58
7.2.5. Porosidad de las matrices híbridas.....	60
7.2.6. Conclusión	61
7.3. Diseño-2: Matrices híbridas de fibras de PLA 10%-wt en CHCl ₃ :CH ₃ (CO)CH ₃ (2:1, v:v) y fibras de PEG 35%-wt en DCM:DMF (70:30, w:w) Distancia aguja-colector 12 cm.....	61
7.3.1. Análisis mediante microscopia óptica de las matrices híbridas	62
7.3.2. Estabilidad de las matrices híbridas en agua	63
7.3.3. Composición de la matriz (RMN).....	64
7.3.4. Conclusión	65
7.4. Diseño-3: Matrices híbridas de fibras de PLA 10%-wt en CHCl ₃ :CH ₃ (CO)CH ₃ (2:1, v:v) y fibras de PEG 35%-wt en DCM:DMF (70:30, w:w). Distancia aguja-colector 6 cm.....	66
7.4.1. Análisis mediante microscopia óptica.....	66
7.4.2. Morfología de las fibras en las matrices híbridas.....	67
7.4.3. Diámetros de las fibras en las matrices híbridas	68

7.4.4.	Análisis calorimétrico de las matrices híbridas	70
7.4.5.	Análisis por espectroscopia infrarroja de las matrices híbridas	73
7.4.6.	Análisis por espectroscopia infrarroja de las matrices híbridas con PEG disuelto en medio acuoso.	75
7.4.7.	Composición de las matrices híbridas PLA/PEG	77
7.4.8.	Porosidad.....	78
7.4.9.	Ángulos de contacto de las matrices híbridas PLA/PEG	80
7.4.10.	Matrices híbridas PLA/PEG cargadas con drogas antibacterianas	81
7.4.11.	Liberación de las drogas cargadas en las matrices híbridas PLA/PEG.....	84
7.4.12.	Inhibición del crecimiento bacteriano mediante matrices híbridas PLA/PEG cargadas con antimicrobianos	86
7.4.13.	Biocompatibilidad in-vitro de las matrices híbridas PLA/PEG	87
8.	CONCLUSIONES	89
9.	ESTUDIO DE SOSTENIBILIDAD DEL PROYECTO	91
9.1.	Evaluación de impacto medioambiental y salud (EIAS) y social	91
9.2.	Evaluación económica del proyecto	94
10.	AGRADECIMIENTOS	97
11.	BIBLIOGRAFÍA	98

Glosario

DCM: Diclorometano

DCS: Calorimetría Diferencial de Barrido

DMEM: Dulbeccos' Modified Eagle Medium

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetil sulfóxido

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FTIR: Espectroscopia de Infrarrojo de Transformada de Fourier

IR: Espectroscopia de Infrarrojo

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio

MDCK: Células tipo epitelial utilizadas

OM: Microscopia Óptica

PBS: tampón fosfato salino

PEG: Polietilenglicol

PFC: Proyecto Final de Carrera

PLA: Polilactida o Poliláctico

PM: Peso molecular

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

SEM: Microscopia Electrónica de Barrido

TCPS: Placas de cultivo de poliestireno tratado para el cultivo celular

TCS: Triclosán

TEM: Microscopia Electrónica de Transmisión

THF: Tetrahidrofurano

Tf: Temperatura de fusión

Tg: Temperatura de transición vítrea

Tm: Temperatura de cristalización

UV: Espectroscopia de Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

ΔH_m : Entalpía de fusión

ΔH_c : Entalpía de cristalización

ΔC_p : Variación de la capacidad calorífica

1. Prefacio

1.1. Origen del proyecto

El Grupo de Investigación en “Polímeros Sintéticos: Estructura y Propiedades, Polímeros Biodegradables (PSEP)” del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Politècnica de Catalunya (UPC) tiene como uno de sus objetivos el estudio y desarrollo de matrices en base a biopolímeros con aplicaciones biomédicas, p.e. la medicina regenerativa y la liberación controlada de drogas y/o fármacos.

Recientemente, en el PSEP se realizó el Proyecto Final de Carrera (PFC) titulado “Preparación de andamios temporales con distinta hidrofobicidad y respuesta antibacteriana”. En el cual, se prepararon electrofibras obtenidas a partir de mezclas de PLA y PEG en disolución, consecuentemente, se obtuvieron fibras bicomponentes de PLA/PEG. Teniendo en cuenta este antecedente, se plantea la necesidad de estudiar matrices conformadas por mezclas de electrofibras de PLA y PEG. Las fibras de PEG serán elementos estructurales para conformar la matriz y su alta hidrofiliidad permitirá que sean fácilmente removidas mediante disolución en medio acuoso (motivo por el cual puede ser denotado como polímero de sacrificio). Así, se espera obtener una matriz de PLA estable y con propiedades diferenciales como puede ser el incremento de porosidad.

1.2. Motivación

La motivación personal para realizar este PFC surge de mi inquietud por ampliar mis conocimientos relativos a los materiales poliméricos, adquiridos a lo largo de la carrera. Este proyecto me ha permitido adquirir experiencia en el manejo de diversos equipos de laboratorio, iniciarme en la investigación científica y desarrollar mis actitudes para realizar un trabajo en equipo.

1.3. Requerimientos previos

Este PFC es un trabajo que se ha desarrollado mayoritariamente en un laboratorio de investigación, en el cual se han utilizado un gran número de técnicas, que han requerido un aprendizaje previo; una gran variedad de reactivos, que han requerido una búsqueda de fichas técnicas de seguridad para su uso correcto y seguro. Se ha realizado una revisión bibliográfica sobre el tema del proyecto. Contribuyendo de manera importante varios PFC realizados previamente en el PSEP.

2. Introducción

2.1. *Polímeros Biodegradables*

2.1.1. Generalidades

En la actualidad, una gran variedad de polímeros se utilizan en el campo de la medicina y desde hace décadas su uso mayoritario es la sustitución o reparación de órganos y tejidos, como parte de la llamada medicina reparativa. La Ciencia de los Materiales es una actividad multidisciplinaria y tiene como una de sus prioridades el desarrollo de nuevos materiales, y muchos de sus avances se han enfocado a solucionar problemas en el área de la biomedicina. Los materiales de aplicación biomédica se diferencian teniendo en cuenta, si su aplicación en el cuerpo humano es de permanente o temporal. En el caso de materiales de aplicación temporal es donde los polímeros biodegradables (también llamados bioabsorbibles) tienen mayor aplicación.

En forma general, el término biodegradabilidad fue definido por Chandra y Rustgi ^[1] como un proceso por el cual bacterias, hongos, y/o levaduras consumen un polímero como fuente de carbono, y para ello requieren enzimas que reconozcan al polímero como un sustrato. Esto correspondería a una biodegradación mediada por microorganismos. También existe la biodegradación por exposición ambiental, en cuyo caso el principal requisito de los polímeros es que contengan grupos lábiles en sus cadenas que puedan romperse fácilmente por acción de un agente externo de naturaleza física o química. Estos grupos lábiles pueden corresponder a enlaces inestables frente al ataque hidrolítico (p.e., enlaces de tipo éster, éter, amida, etc.).

Los agentes externos (físicos y químicos) pueden modificar la estructura del polímero de diferentes formas:

- 1) *Agente físico*: decoloración, pérdida de brillo superficial, formación de grietas, superficies untuosas, erosión superficial y pérdida de propiedades como resistencia a la tracción-deformación.
- 2) *Agente químico*: rotura de cadenas, cambios en sustituyentes laterales, reacciones de entrecruzamiento, etc. Cada agente externo que conduce a la degradación del polímero da lugar a un mecanismo diferente de degradación (y modifica la estructura del polímero).

La degradación del polímero origina la disminución de su peso molecular que se evidencia como la ocurrencia de fragmentos orgánicos simples y la reducción del grado de polimerización. La biodegradación puede ser un proceso rápido, si también ocurren las condiciones apropiadas de humedad, pH, temperatura y oxígeno disponible.

2.1.2. Mecanismos de degradación

Para aumentar o disminuir la degradabilidad de un material es necesario conocer el mecanismo de su degradación. En la actualidad, los principales mecanismos de degradación son los siguientes:

- 1) *Fotodegradación*: inducida por la luz solar.
- 2) *Termodegradación*: a causa de la temperatura.
- 3) *Degradación química*: esta puede ser de dos tipos.
 - a. Oxidativa: debida a la acción de aditivos químicos o agentes atmosféricos.
 - b. Hidrolítica: el agente causante de degradación es el agua.
- 4) *Mecánica*: debida a los esfuerzos a los que es sometido el material.
- 5) *Biodegradación*: el agente causante es la acción de microorganismos como bacterias, hongos o algas.

En general, la degradación de un material en el medio ambiente puede ser debida a varios de estos mecanismos, pero es posible identificar un único mecanismo como el predominante. Esto es claramente demostrado en el caso de polímeros cuyo proceso de degradación ha sido mejorado mediante modificaciones estructurales para acelerar este proceso.

La degradación de un material bioabsorbible requiere un estudio meticuloso debido a que existen situaciones en las cuales los productos de la degradación del polímero pueden provocar reacciones adversas para el paciente como: intoxicación, reacciones inmunológicas, necrosis de tejido, neoplasias, etc. Por otro lado, la degradación de materiales no-absorbibles o permanentes (p.e., prótesis o implantes articulares, cardiovasculares, etc.) requieren nueva intervención quirúrgica para su recambio.

2.1.3. Clasificación

Según su procedencia, los polímeros biodegradables pueden clasificarse en ^[2]:

- 1) Naturales, englobando todos aquellos polímeros que provienen de recursos naturales. Por su naturaleza química conforman 4 subgrupos:
 - a. Polisacáridos:
 - i. Homopolisacáridos: almidón, celulosa, quitina
 - ii. Heteropolisacáridos: gomas naturales
 - b. Proteínas
 - c. Lípidos
 - d. Poliésteres alifáticos
 - i. Poliésteres producidos por microorganismos o por plantas: PHA, PHB
 - ii. Poliésteres sintetizados a partir de monómeros biológicos: PLA
- 2) Sintéticos, aquellos diseñados a partir de fuentes fósiles/petrolíferas. Se clasifican en 6 subgrupos:
 - a. Poliésteres alifáticos: PCL.
 - b. Poliésteres aromáticos o mezclas de ambos.
 - c. Poliamidas: Nylon 6 poliprolactama; nylon 6,6 polihexametilendiamina adipato
 - d. Poliéteres: PEG.
 - e. Polivinilalcoholes: PVOH, PEVOH.
 - f. Poliolefinas modificadas: PE con almidón

A priori, los polímeros naturales son frecuentemente asociados al concepto de biodegradabilidad; pero, en los últimos años se han diseñado y producido polímeros sintéticos que presentan esta propiedad. Muchos polímeros sintéticos con aplicaciones biomédicas han tenido que ser optimizados por sus propiedades como material

biodegradable y biocompatible, es decir, el material debe tener una velocidad de degradación controlable y capacidad para cumplir la función asignada (compatibilidad con el organismo).

En general, se puede indicar que los polímeros sintéticos son muy versátiles porque ellos pueden transformarse y/o modificarse química y físicamente, obteniéndose materiales de manera sencilla, económica, y las formas más adecuadas para su uso. Por ejemplo, los primeros polímeros utilizados en la medicina fueron de origen natural, pero actualmente, han sido sustituidos por polímeros sintéticos. Esta evolución ha ocurrido porque los polímeros sintéticos permiten la optimización de sus propiedades que son necesarias tanto para la obtención de un material biodegradable y biocompatible. Sin embargo, en los últimos años se ha desarrollado paralelamente la producción de polímeros de origen natural con propiedades muy similares a los sintéticos, y pueden ser obtenidos por métodos biotecnológicos.

2.1.4. Poliésteres: Poliláctida

Las propiedades de los poliésteres son determinadas por la proporción de grupos éster (-COO-) en su estructura y por la geometría, polaridad y movilidad de sus unidades repetitivas. Al no existir unas interacciones moleculares especialmente fuertes, las propiedades de los poliésteres son más sensibles a las variaciones de la estructura en relación con otros polímeros como las poliamidas o los poliuretanos.

Los poliésteres lineales se clasifican en poliésteres alifáticos y poliésteres que contienen unidades aromáticas. En función de los monómeros utilizados para su síntesis, los poliésteres alifáticos se clasifican en dos grupos:

- 1) Poli(hidroxiácidos): Sintetizados mediante la autopolicondensación de hidroxiácidos o mediante polimerización por apertura de anillo de lactonas y lactidas.
- 2) Poli(alquilendicarboxilatos): Sintetizados mediante la policondensación entre dioles y diácidos.

El ácido poliláctico (PLA) pertenece al primero de los dos grupos, concretamente al grupo de los poli(α -hidroxiácidos) que se diferencian de los (β -hidroxiácidos) al contener el grupo -OH en posición α respecto al grupo -COOH. Éstos son polímeros semicristalinos con puntos de fusión relativamente altos.

El PLA puede ser clasificado como biopolímero de origen natural porque su monómero (ácido láctico) todavía se obtiene mayoritariamente por fermentación de los recursos renovables, materiales con almidón y azúcares. Aunque también podría situarse en la

categoría de los poliésteres sintéticos porque puede ser sintetizado a partir de fuentes petrolíferas^[4].

El PLA se puede preparar tanto por condensación/esterificación directa del ácido láctico, como por polimerización por apertura de anillo de la lactida. La policondensación directa del hidroxiácido produce material de bajo peso molecular. En cambio sí se obtiene por apertura de anillo de su dímero cíclico, la lactida, el material obtenido es de elevado peso molecular y con un punto de fusión algo superior a 170°C, *Figura 2.1*.

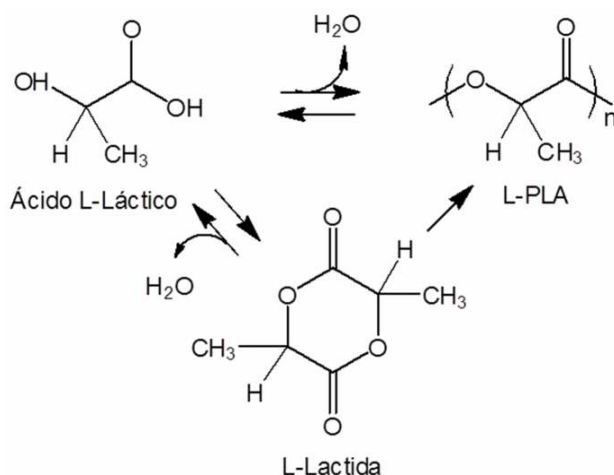


Figura 2.1.- Obtención de la polilactida

Para usos biomédicos, el PLA es preparado por este último procedimiento, si bien el proceso completo implica una polimerización térmica del hidroxiácido hasta un PLA de bajo peso molecular que es despolimerizado y ciclado posteriormente. El material final es obtenido a partir de la lactida así preparada.

La unidad repetitiva del PLA consta del grupo éster y de un grupo $-\text{CH}(\text{CH}_3)$, *Figura 2.2*. Desde el punto de vista de su estructura química, el carbono alfa de la unidad repetitiva es un carbono quiral y en consecuencia puede presentar dos configuraciones distintas.

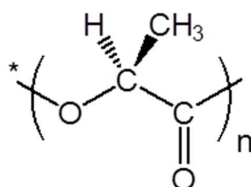


Figura 2.2.- Unidad repetitiva de la polilactida

La lactida es el dímero cíclico del ácido láctico, que existe en forma de dos isómeros ópticos, el D y el L, como se muestra en la *Figura 2.3*. El monómero cíclico tiene dos carbonos asimétricos por lo que es factible preparar polímeros con diferentes taticidades. La L-lactida es el dímero obtenido a partir del estereoisómero natural, mientras la D,L-lactida está formada por los dos estereoisómeros. El homopolímero derivado del monómero natural, L-láctico (L-PLA), es un polímero semicristalino (grado de cristalinidad del 37%), debido principalmente a su estereoregularidad. Tiene alta resistencia a la tensión y baja elongación, y consecuentemente tiene un *módulo de Young* elevado, lo que hace al polímero muy adecuado para aplicaciones que tienen que soportar una carga, como son las suturas y fijaciones ortopédicas^{[6][7]}. Térmicamente, se caracteriza por tener un punto de ebullición elevado (175-178 °C) y una temperatura de transición vítrea comprendida entre 60 y 65 °C.

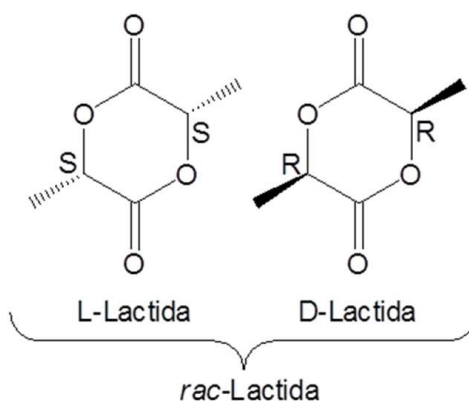


Figura 2.3.- Enantiómeros del ácido láctico: D-láctico y L-láctico.

El poli (D,L-láctico) (DLPLA) es un polímero amorfo, ya que está formado por los dos isómeros del ácido láctico con una distribución aleatoria, hecho que impide que la estructura sea cristalina. Consecuentemente, este polímero tiene una resistencia a la tensión más baja, alta elongación, y una elevada velocidad de degradación que hace que sea un material muy atractivo para los sistemas de liberación de fármacos. También se preparan copolímeros de L-PLA y D,L-PLA para disminuir la cristalinidad del polímero quiral y controlar el proceso de degradación^{[5][6]}.

Actualmente se utiliza en suturas, tornillos, cirugía maxilofacial, liberación de fármacos, *stents* (mallas) para cirugía cardiovascular y clavos para la unión de ligamentos, fijación de fracturas y reparación de meniscos. Una de las aplicaciones más recientes del PLA se encuentra en el campo de la *Ingeniería de Tejidos*, donde se pretende regenerar tejidos a partir de células del mismo paciente cuyo crecimiento es guiado *in-situ* mediante andamios (*scaffolds*) reabsorbibles^[7].

La Figura 2.4 ilustra el ciclo de vida de este polímero biodegradable:

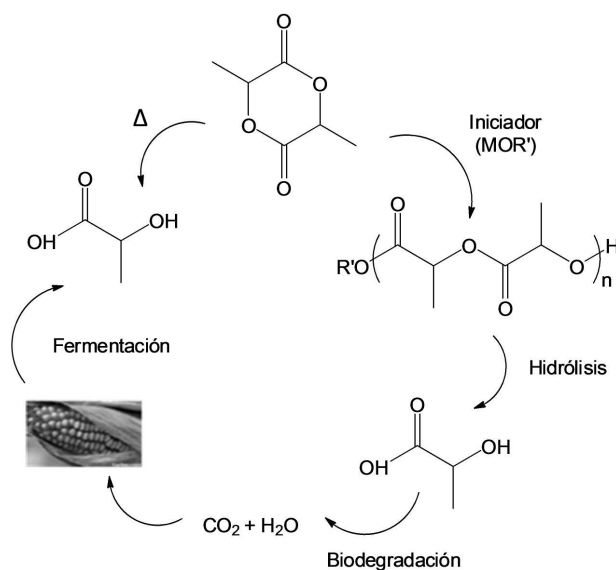


Figura 2.4.- Ciclo de vida de la poliláctida (PLA).

2.1.5. Poliéteres: Polietilenglicol

La síntesis de poliéteres constituye uno de los ejemplos más antiguos de obtención de macromoléculas. Normalmente, estos se obtienen mediante la polimerización por apertura de anillo de éteres cíclicos. Históricamente, los primeros poliéteres que se prepararon fueron oligómeros derivados del óxido de etileno, cuyo estudio sistemático contribuyó al establecimiento de las bases de la actual química de polímeros. El desarrollo de nuevos iniciadores y el conocimiento del mecanismo de polimerización llevaron, posteriormente, a la preparación de polióxido de etileno de alto peso molecular. La facilidad para obtener la mayoría de monómeros oxiránicos a partir de intermedios de la industria petroquímica y el interés que despertó esta familia de polímeros, llevó al desarrollo de un gran número de nuevos poliéteres basados en diferentes monómeros, como por ejemplo el óxido de propileno, el óxido de estireno o el tetrahidrofurano^[8]. El espectacular avance experimentado en la síntesis de poliéteres a partir de los años 60 se vio impulsado por sus buenas propiedades físicas y químicas, lo que permitía su aplicación en una gran variedad de campos tecnológicos.

Los poliéteres se caracterizan por tener propiedades marcadamente diferenciadas de sus análogos vinílicos. Estas diferencias pueden llegar a ser muy acusadas como en el caso del polietilenglicol, cuya solubilidad en agua contrasta con la insolubilidad en este medio de su análogo: el polietileno^[8].

Las diferentes propiedades de este tipo de polímeros se deben fundamentalmente a la presencia del enlace éter en la cadena principal. Las uniones éter poseen una baja polaridad relativa y unas interacciones de *Van der Waals* relativamente débiles, propiedades que hacen que se asemejen a los enlaces carbono-carbono (C-C) en los hidrocarburos.

Sin embargo, las uniones carbono-oxígeno (C-O) poseen una menor energía de rotación, debido al menor volumen del oxígeno respecto al grupo metilénico. Este hecho permite un aumento en el número de conformaciones permitidas de la cadena, lo que repercute en un aumento de la flexibilidad del polímero. Además, la unión C-O presenta una energía de enlace similar a la unión carbono-carbono y una inercia química muy superior a las uniones acetal, éster o amida, lo que le confiere unas buenas propiedades de estabilidad frente a gran variedad de agentes químicos.

Como ya se ha mencionado, la accesibilidad de monómeros oxiránicos a bajo coste, junto a las notables propiedades fisicoquímicas de los polímeros, hizo que ya en los años 50 se comercializaran a gran escala poliéteres de bajo y medio peso molecular. Estos poliéteres se obtenían principalmente mediante iniciadores de carácter aniónico, más específicamente óxidos e hidróxidos de metales alcalinos. La preparación de los primeros poliéteres de elevado peso molecular se llevó a cabo gracias a la utilización de iniciadores más complejos, basados inicialmente en derivados de hierro (III), y posteriormente en los compuestos obtenidos a partir de la hidrólisis parcial de alquilos de aluminio y de zinc. Estos iniciadores complejos eran mucho más efectivos y resultaron seguir un mecanismo de polimerización distinto, que permitía obtener poliéteres con diferentes grados de estereoregularidad, lo que supuso un nuevo impulso en la investigación de este tipo de polímeros^{[8][9]}.

A continuación se hará especial hincapié en el poliéter utilizado en este proyecto: el polietilenglicol.

El polietilenglicol (PEG) es un poliéter ampliamente empleado en la industria. Su nombre generalmente aparece asociado a un número que hace referencia a la masa molecular del polímero u oligómero; por ejemplo, un PEG con $n = 195-265$ poseerá una masa molecular media de unos 10000 Da (g/mol), por lo que se llamará PEG 10000. Su estructura química puede representarse como se muestra en la *Figura 2.5*.

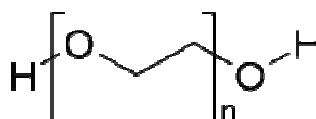


Figura 2.5.- Unidad repetitiva del polietilenglicol.

Este polímero es soluble en muchos solventes orgánicos, como el benceno, cloroformo, dimetilformamida, acetonitrilo, tolueno, diclorometano, entre otros. El polietilenglicol se disuelve perfectamente en agua y dicha solubilidad aumenta a medida que el peso molecular de éste es mayor.

El polietilenglicol, *Figura 2.6.*, se produce por la interacción de óxido de etileno con agua, etilenglicol u oligómeros de etilenglicol. La reacción está catalizada por catalizadores ácidos o básicos. Se prefiere partir de etilenglicol o sus oligómeros que del agua, ya que esto permite obtener polímeros de baja polidispersión. La longitud de la cadena de polímero depende de la proporción de reactantes^[10].

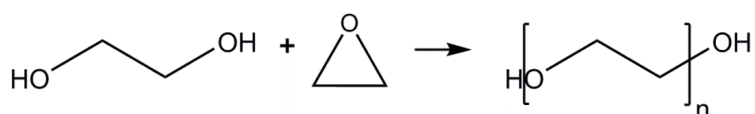


Figura 2.6.- Obtención del polietilenglicol.

Polímeros con bajo peso molecular pueden ser usados como disolventes no volátiles. Los polímeros más usados en una gran variedad de aplicaciones son polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG). Además, estos polímeros permiten reciclar catalizadores valiosos, al igual que los disolventes fluorosos.

El polietilenglicol es soluble en agua, por lo que la mayoría de sus aplicaciones se dan en disoluciones acuosas, posee baja inflamabilidad y baja presión de vapor. En comparación con otros disolventes alternativos, el PEG es biodegradable, biocompatible y no tóxico; y puede ser recuperado y reciclado de la disolución por extracción o destilación directa. Por todas estas propiedades, se utiliza en investigación médica y farmacéutica.

2.2. Aplicaciones biomédicas de los polímeros biodegradables

2.2.1. Generalidades

No es hasta la *Segunda Guerra Mundial* que se produce un rápido avance en la ciencia de los polímeros, principalmente enfocado a las aplicaciones médicas. El poli (metilmetacrilato) (PMMA) fue uno de los primeros polímeros utilizados como material biomédico, aplicándose como material para reparar la córnea humana.

Los polímeros no únicamente reemplazaron a otros materiales en aplicaciones médicas, como la sustitución de los catéteres metálicos por polietileno, sino que abrieron el campo a otras nuevas aplicaciones antes difícilmente asequibles. Así, en 1950 se fabrica el primer corazón artificial, llevado a la práctica a finales de 1960. En la actualidad el empleo de polímeros continúa creciendo y sus aplicaciones son cada vez mayores dentro del campo de la medicina, mejorando las propiedades de los materiales ya existentes y desarrollando nuevos polímeros para aplicaciones específicas^[8].

Existen algunas características que deben presentar los materiales poliméricos para poder ser utilizados en aplicaciones biomédicas. Los materiales y sus subproductos no deben ser: mutagénicos, carcinogénicos, antigénicos, tóxicos y, lógicamente deben ser antisépticos, esterilizables, compatibles con el tejido receptor, de fácil procesado y capaz de conformarse en distintas formas entre otros requisitos. Hoy en día, una gran parte de la investigación en el área de los polímeros para aplicaciones biomédicas tiene lugar con polímeros sintéticos.

Algunas de las aplicaciones más habituales son las suturas quirúrgicas, de las más antiguas que existen; dispositivos de fijación ortopédica, coberturas de heridas, dispositivo portador para la liberación controlada de fármacos.

2.2.2. Andamios temporales (“*temporary scaffolds*”)

Una importante aplicación de los polímeros es su uso como dispositivos de sujeción denominados *andamios temporales*. Su función es actuar como soporte artificial sobre un tejido que ha sido debilitado ya sea por enfermedad, lesión o cirugía; hasta que éste recupere su forma y resistencia características.

A continuación se detallan algunos ejemplos del uso de andamios temporales con polímeros biodegradables^{[11][12]}.

- En odontología, se utilizan partículas poliméricas porosas como relleno del hueco originado tras la extracción dental, para acelerar el proceso de cicatrización del hueso de la mandíbula^[13].
- Como dispositivos ortopédicos de fijación en zonas donde las propiedades mecánicas requeridas son pequeñas, por ejemplo, como tornillos de interferencia en el tobillo, rodilla o mano, tachuelas y pasadores para la unión de ligamentos y la reparación del menisco, y varillas y pasadores para la fijación de fracturas. En cambio, todavía no son aplicables como placas óseas o en aplicaciones con sustento de carga, debido a que no tienen suficiente resistencia^{[13][14][15]}.

En la actualidad el término de *biodegradable scaffold* se asocia específicamente a materiales de estructura tridimensional y porosa, que sirven de soporte para el crecimiento celular in vitro, con el fin de construir un sustituto biológico para un órgano o tejido que ha perdido su función^{[13][14][15][16]}. Esta aplicación, es la base de la *ingeniería de tejidos*, y es uno de los campos de la investigación biomédica más interesantes^{[13][14][15][16]}.

2.2.3. Regeneración de tejidos (“*tissue engineering*”)

En la actualidad se trabaja con la tercera generación de biomateriales. En el diseño de los materiales se busca la interacción con el tejido de forma específica, mediante estímulos a nivel celular y molecular así como la combinación de las propiedades de bioabsorbabilidad y bioactividad dentro del mismo material.

Este tipo de implantes se utilizan para suplantar la función de algún órgano lesionado y deben desaparecer durante el periodo de recuperación del mismo. Normalmente las especies implicadas en la ingeniería de tejidos son células vivas y componentes extracelulares que participan en el desarrollo de dispositivos que permitan, estimulen o favorezcan la reparación o restauración de un órgano o tejido dañado.

Los polímeros sintéticos bioabsorbibles con capacidad de degradarse, gracias a reacciones de hidrólisis, en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo y eliminarse completamente por vías metabólicas, son los materiales más atractivos para la elaboración de *scaffolds* en ingeniería de tejidos. De esta manera los *scaffolds* pueden soportar el crecimiento de tejidos completamente naturales creados por el propio organismo, evitando los problemas de infección y formación de tejido fibroso, asociados a los implantes permanentes^{[17][18][19]}.

El uso de la metodología de la ingeniería de tejidos implicaría la disminución de muchos de los problemas relacionados con otras técnicas como^{[20][21]}:

- Intervenciones costosas y dolorosas para la extracción del tejido en el caso de autoinjertos.
- Disponibilidad de donantes y las reacciones de rechazo en el caso de los aloinjertos.
- Riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas en el caso de los xenoinjertos.

A continuación se muestra un esquema de cómo funciona el desarrollo de andamios tridimensionales la *Figura 2.7.*:

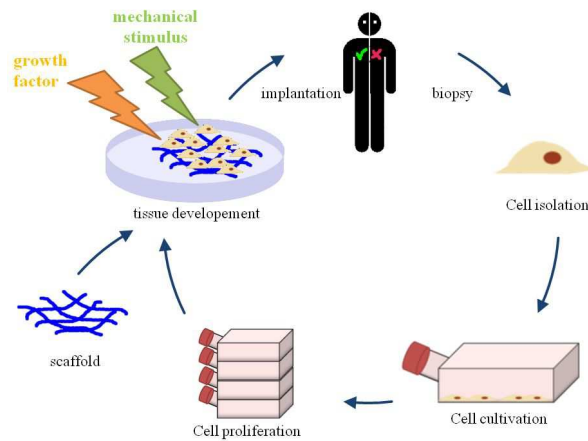


Figura 2.7.- Desarrollo de scaffolds en ingeniería de tejidos.

2.3. Materiales para la liberación controlada de fármacos

Las primeras investigaciones sobre el uso de materiales poliméricos, como la goma de silicona y polietileno, en la liberación controlada de fármacos datan de los años 60. Debido a la falta de degradabilidad de dichos materiales, implicaba una extracción quirúrgica y en consecuencia su aplicación se veía limitada. Para evitar este inconveniente, durante la década de los años 70, se sugirió el empleo de polímeros biodegradables.

El empleo de una matriz polimérica para controlar la liberación y carga de medicamentos es de gran interés por dos aspectos fundamentales:

- El primero de ellos, la obtención de un nivel terapéutico apropiado durante un periodo de tiempo mayor (meses) que en una administración convencional (unas horas). Este tipo de dosificación es muy interesante ya que proporciona la dosis óptima, reduce su frecuencia y facilita su aplicación minimizando las molestias e incluso los posibles daños al paciente mejorando potencialmente la salud humana.

Un claro ejemplo de la mejora de calidad de vida se da en el tratamiento a los pacientes con afecciones de tipo crónico que necesitan medicación constante.

- El segundo, es la capacidad de dirigir el efecto del fármaco al tejido enfermo en vez de distribuirlo por todo el organismo. Este aspecto es de gran importancia cuando se trata con fármacos de alta toxicidad sistémica, como los anticancerígenos.

Un ejemplo de este tipo de materiales son las micro/nano esferas en las cuales se pueden encapsular sustancias para liberarlas de forma controlada^[21].

Cuando un polímero cristaliza desde soluciones concentradas o por subenfriamiento ($T < T_f$) desde el estado fundido, se forman agregados con una morfología esférica en lugar de monocristales. Estos agregados son las esferas, denominadas *esferulitas*.

Una de las investigaciones más recientes ha sido el desarrollo de esferas metalorgánicas, formadas por material parcialmente orgánico y parcialmente metálico, que disponen de las propiedades intrínsecas del metal, como el magnetismo, la fluorescencia o la conductividad.

Su interés en el campo de la medicina reside en su aplicación en el radiodiagnóstico, por ejemplo, la electrónica o los sensores. Otros ejemplos de este tipo de materiales, más conocidos debido a su uso cotidiano, son la aplicación de agentes anti-inflamatorios, factores de crecimiento o los parches que contienen nitroglicerina o anticonceptivos, fármacos que se absorben a través de la piel.

Además, el hecho de que existe una amplia gama de polímeros degradables de distintos orígenes; junto con la posibilidad de incorporar distintos agentes bioactivos, la diversidad de conformación y los medios de administración; hacen posible que este tipo de sistemas sean capaces de utilizarse en muchas aplicaciones terapéuticas.

2.3.1. Polihexametilenbiguanida (PHMB)

La Polihexametilenbiguanida es un biocida catiónico comercializado mundialmente debido a su excelente actividad antimicrobiana, estabilidad química, baja toxicidad y coste razonable.

Su efectividad contra organismos celulares se debe a la presencia del grupo biguanida unido al grupo hexametileno. La PHMB es el antiséptico de uso más extendido cuando se necesita un uso y/o contacto prolongado^[23]. La presencia de PHMB en campos de la vida cotidiana es muy extensa como por ejemplo^[24].

- Desinfectantes de piscinas
- Cosméticos
- Conservantes del cuero
- Líquidos para limpieza de lentes de contacto
- Manipulación de alimentos
- Fibras y textiles

La PHMB actúa uniéndose a los grupos de cabeza de los fosfolípidos de la pared celular bacteriana, causando un incremento de la rigidez, llevando los segmentos apolares al dominio hidrofóbico, esto crea una alteración en la membrana citoplasmática lo que posteriormente acabará en muerte celular^[24].

La síntesis de la PHMB puede hacerse por diferentes rutas, normalmente se obtiene por policondensación de dicianamida sódica y hexametildiamina en dos pasos. En la *Figura 2.8.*, se muestra la estructura de PHMB y su modelo^{[24][25]}. Las cinco aminas presentes en la estructura de PHMB tienen capacidad para unirse a moléculas vecinas mediante la formación de puentes de hidrógeno^[26].

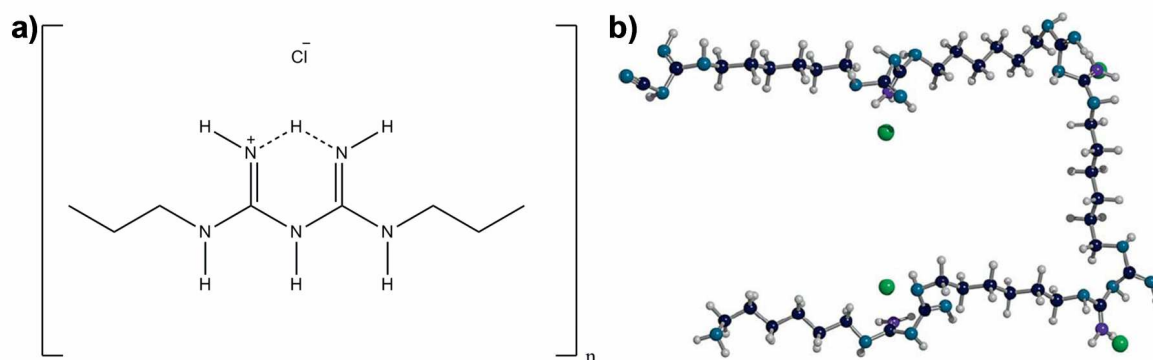


Figura 2.8.- a) Estructura de PHMB. b) Modelo de PHMB [23]

2.3.2. Triclosán (TCS)

El Triclosán o Irgasán (TCS) (*Figura 2.9*) es un potente agente antibacteriano y fungicida de amplio espectro. Es un polvo cristalino blanco, de olor débilmente aromático y poco soluble (su solubilidad en agua a 20°C es de 0,01 g/L). Sin embargo, se disuelve fácilmente en presencia de bases (p. e. NaOH 1 M). El triclosán presenta un punto de fusión de 55-60°C. La alta lipofilidad del triclosán es una característica relevante ya que lo hace un buen candidato para su liberación a través de la piel.

El triclosán (2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter), es un antiséptico ampliamente utilizado, por ejemplo en productos hospitalarios (soluciones para lavado de manos quirúrgico, jabones para lavado de pacientes) y productos de consumo cotidiano (desodorantes, dentífricos, colutorios). Así, ha sido incorporado en polímeros sintéticos por un simple proceso de fusión conjunta^{[27][28]}.

Niveles muy bajos de triclosán (por debajo ppm) evitan el crecimiento de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Micrococcus luteus* (*M. luteus*). Su mecanismo de acción es mediante la difusión a través de la membrana citoplásmica e inhibición de la síntesis de RNA, lípidos y proteínas^[29].

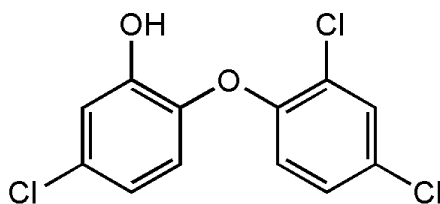


Figura 2.9.- Triclosán o Irgasán (TCS)

3. Electrospinning

3.1.1. Generalidades

El *Electrospinning* es una técnica que utiliza fuerzas eléctricas para producir fibras, de una forma relativamente simple y a bajo coste, con diámetros que varían desde unos pocos nanómetros hasta algunos micrómetros a partir de polímeros tanto sintéticos como naturales mediante el uso de fuerzas eléctricas^[30].

Esta técnica se conoce desde hace más de 60 años en la industria textil y se utilizaba para la fabricación de telas no tejidas de fibra. En los últimos años ha habido un creciente interés por esta tecnología, que permite producir fibras a micro y nano escala. Como ya se ha comentado anteriormente, en *biomedicina* las microfibras obtenidas son utilizadas para la fabricación de andamios temporales en ingeniería de tejidos.

3.1.2. Principios de la técnica

El primer fenómeno de interacción de líquidos con campos eléctricos y magnéticos fue descrito por Guillermo Gilberto ya en 1628. Sólo después de mediados de 1900, Geoffrey Ingram Taylor produjo la primera discusión teórica de la interacción de una gota de fluido con el campo eléctrico. No fue hasta principios de los años 90 cuando se empezó a hablar acerca del término spinning electrostático, anunciado por Reneker, y desde esa fecha el número de publicaciones y estudios fue aumentando progresivamente, extendiéndose primero desde su impulsor, EEUU, hasta nuevos pioneros como Alemania o Corea. En estos últimos 20 años, pero más significativamente durante la última década, se han dedicado un número importante de esfuerzos al desarrollo y mejora de esta técnica, cuyo nombre actual, *electrospinning*, fue cuñado alrededor de 1994. Aun así, la patente por el *electrospinning* se registró en el 1934 por Formhals y ésta describía un dispositivo experimental para la producción de filamentos de polímero empleando un campo electrostático^[43].

El crecimiento del uso de esta técnica podría atribuirse al interés actual en las microfibras y nanofibras. El *electrospinning* inicialmente solía producir fibras muy finas de materiales poliméricos para obtener matrices con alta superficie. Actualmente, la técnica se orienta a la fabricación de micro/nanofibras con multitud de aplicaciones, desde la cosmética, ensayos ópticos, textiles, hasta la investigación médica, entre otras^{[7][44][45]}.

La técnica del *Electrospinning* consiste en aplicar un campo electrostático elevado entre dos polos, conformados por una aguja de un sistema de inyección y una placa metálica o colector (el cual está a potencial 0) donde se depositan las fibras nano o micrométricas formando un tejido o matriz porosa (llamada *electrospun* o *mat*) con textura, color, y densidad características^{[31][32][45][46]}.

La *Figura 3.1.*, muestra la distribución de un equipo de *electrospinning*. Como se puede observar, en la parte izquierda se sitúa la jeringa cargada con la disolución del polímero previamente preparada. Para impulsar el fluido con el flujo deseado se utiliza una bomba de infusión o perfusión donde se sitúa la jeringa de manera que la bomba empuja el émbolo generando una presión constante que se transmite a la disolución de polímero en la aguja. El campo eléctrico genera una polarización y carga que hace que la solución sea atraída en forma de chorro hacia la superficie conductora, situada a cierta distancia, y conectada a tierra. El solvente se evapora gradualmente a medida que hace el recorrido entre la aguja y la placa colectora, de esta manera se obtienen micro o nanofibras no tejidas distribuidas al azar que se van depositando en la placa colectora. Al flujo de fluido impulsado desde la inyección hasta la placa colectora se le denomina *jet*.

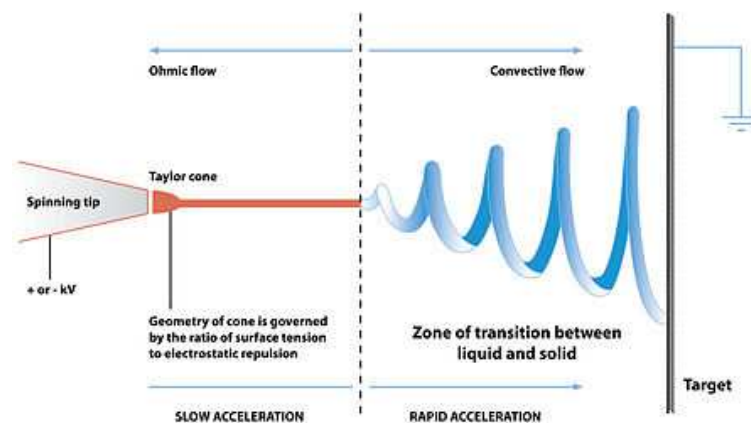


Figura 3.1.- Imagen del jet saliendo de la aguja y depositándose en el colector

Como consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico, se forma un menisco electrificado en forma de cono, conocido como el *Cono de Taylor*. Este cono se forma debido al fenómeno de polarización y carga; que se produce por la inducción de cargas en el fluido mediante la distancia de separación entre los dos electrodos, rompiéndose la tensión superficial a través del campo electrostático y descomponiéndose esta tensión en una tangencial y otra normal. A medida que el cono se acelera, su diámetro es menor y las componentes tangencial y normal se equiparan hasta llegar a ser iguales. En este momento, el cono se solidifica creando las fibras y depositándose sobre la placa colectora [18][32][45][46][47]. En la *Figura 3.2.*, se puede observar el fenómeno anteriormente explicado a partir de las fuerzas que actúan en la gota de polímero: la tensión superficial y las cargas electrostáticas.

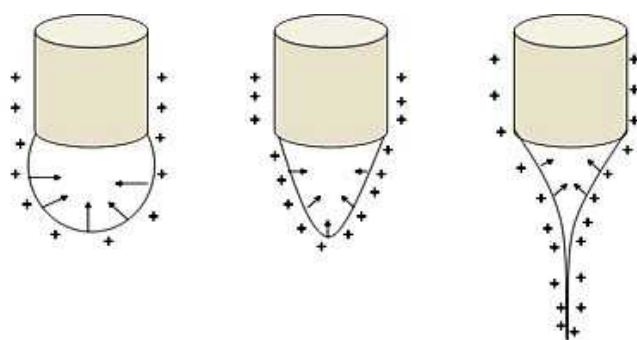


Figura 3.2.- Fuerzas actuando en la gota: Tensión superficial vs cargas electrostáticas

El proceso descrito anteriormente genera una aceleración significativa en el *jet* de manera que su diámetro disminuye en magnitud. El *jet* acaba solidificándose y se convierte en una fibra de medidas micro o nanométricas. La corriente aplicada en la operación es de alto voltaje pero intensidad muy reducida, del orden de microamperios [31]

La obtención de los resultados esperados no siempre es posible, depende del control de las variables del proceso como la naturaleza del disolvente empleado, la concentración del polímero en la disolución u otras variables de aspecto operativo del equipo de *electrospinning*. En algunos casos el polímero no se transforma en fibras sino que se queda como polímero en gotas o fibras mezcladas con gotas (*electrospraying*).

3.1.3. Parámetros en el proceso

El control de la técnica del *electrospinning* es aparentemente sencillo, pero el proceso se complica al existir varios parámetros que influyen simultáneamente sobre las propiedades de las fibras que se obtienen. Estos parámetros se pueden clasificar en tres grandes grupos [15][48][49].

- I. **Propiedades de la disolución:** tipo de polímero empleado, peso molecular de éste, estructura del polímero (lineal, ramificado, etc.), concentración, viscosidad, conductividad y densidad de carga en la superficie, tensión superficial y constante dieléctrica del solvente.
- II. **VARIABLES DEL EQUIPO:** velocidad de flujo, potencial eléctrico, distancia entre la punta de la aguja y el colector, geometría y tipo de colector.
- III. **Parámetros ambientales:** humedad, temperatura de la disolución y velocidad del aire en la cámara de *electrospinning*.

En la *tabla 3.1* se muestra la influencia de algunos de estos parámetros en las características de las fibras preparadas. No obstante, hay que tener en cuenta que la interrelación de unos con otros complica el proceso y que siempre es necesaria la realización de múltiples ensayos experimentales que conduzcan a encontrar las condiciones idóneas para el experimento^{[31][44]}.

Tabla 3.1.- Efectos sobre las fibras causados por los distintos parámetros de electrospinning.

Parámetros del proceso		Efectos sobre la morfología de las fibras	
Propiedades de la disolución			
Peso molecular	Un incremento del peso molecular provoca una disminución del número de gotas y aglomeraciones. Por este motivo, se suelen utilizar polímeros de alto peso molecular.		
Viscosidad/Concentración	<p>Parámetros directamente proporcionales.</p> <p>Para cada solución, existe un mínimo y un máximo de concentración donde se producen fibras sin aglomerados.</p> <p>Si la concentración aumenta, el diámetro de fibra aumenta.</p> <p>Con bajas viscosidades se obtienen fibras discontinuas y con altas viscosidades, se dificulta la movilidad de la disolución en el equipo. Es por eso que se requiere una viscosidad óptima en cada proceso de <i>electrospinning</i>.</p>		
Conductividad/Densidad de carga en la superficie	<p>Un aumento de la conductividad ayuda a obtener fibras uniformes y sin defectos.</p> <p>En general, altas conductividades implican diámetros de fibra pequeños.</p>		
Momento dipolar/Constante dieléctrica	Si la constante dieléctrica del solvente es alta, se obtiene mejores resultados con el <i>electrospinning</i> .		
Variables del equipo			
Velocidad de flujo	Velocidad de flujo baja, fibras de diámetro pequeño		
Potencial eléctrico	<p>Cuando existe un campo eléctrico más intenso, se obtienen fibras de menor tamaño.</p> <p>Para que se produzca el <i>electrospinning</i>, potencial entre 0KV i 50KV.</p>		
Distancia aguja-colector	<p>Se requiere una distancia mínima para la formación de fibras.</p> <p>A distancias demasiado cercanas, se produce goteo y/o aglomeración de polímero.</p> <p>Rango entre 5 y 30 cm.</p>		
Tipo colector	Si éste es móvil, el resultado de las fibras dependerá de la velocidad de giro		
Parámetros ambientales			
Parámetros ambientales	Un aumento de temperatura provoca una disminución de la viscosidad de la disolución, consiguiendo fibras de diámetro más pequeño.		

3.1.4. Aplicaciones generales

Existen múltiples y recientes aplicaciones de las fibras de *electrospinning* en diversos campos científicos. Pero si nos fijamos en el gran número de patentes que existen sobre *electrospinning*, observamos que aproximadamente el 66% de las aplicaciones de estas fibras se encuentra en el campo de la medicina. A continuación se resumen algunas aplicaciones generales más destacadas, esquematizadas en la *Figura 3.3.*^[32]

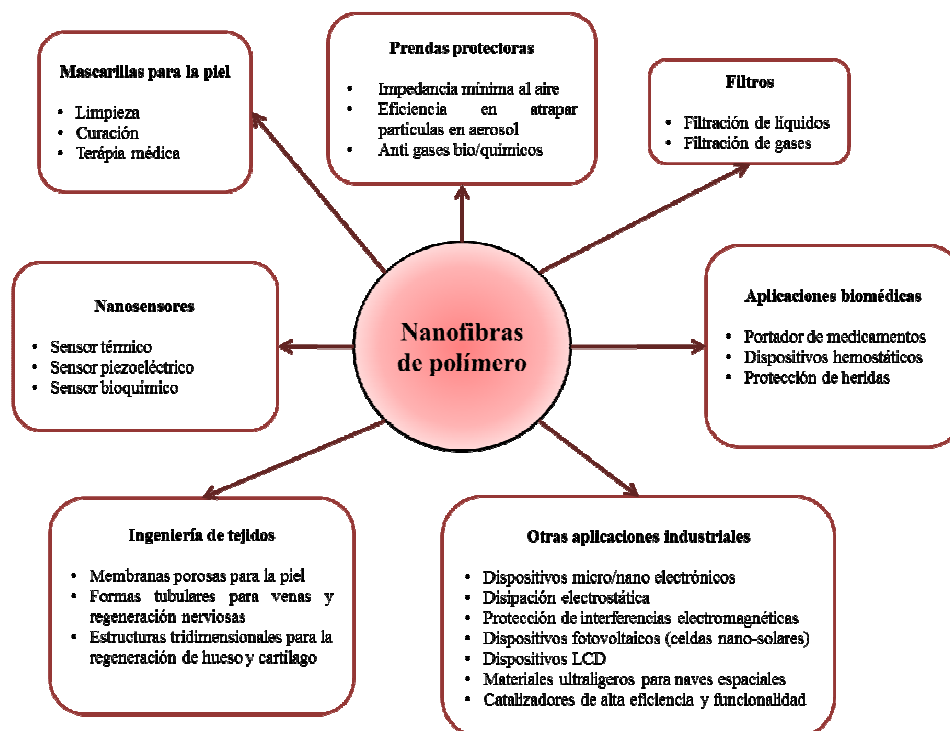


Figura 3.3.- Esquema de aplicaciones de nanofibras de polímero

3.1.5. Aplicaciones biomédicas

Como se ha mencionado anteriormente el campo de la medicina es en el que más se están estudiando y utilizando las aplicaciones de las fibras de *electrospinning*. Esto se debe a que la mayoría de los tejidos y órganos humanos como los huesos, el colágeno, el cartílago o la piel están estructurados jerárquicamente en redes de nanofibras. A continuación se exponen algunas de las diferentes aplicaciones^[14].

- I. Prótesis médicas: para esta aplicación es para la que más se ha estudiado el uso de micro/nanofibras obtenidas por *electrospinning*, ya que se pueden utilizar para la fabricación de un gran número de prótesis de tejido blando. Existen varias patentes en EEUU para aplicaciones como venas, vascular, mama, etc. También se puede

dar uso a estas fibras como films que recubran las prótesis de tejido rígido actuando como interfaz para evitar o prevenir que la prótesis falle^{[33][34]}.

Soportes para el crecimiento del tejido humano: en el campo de los biomateriales encontramos futuras aplicaciones. En biomateriales se diseñan refuerzos óptimos que puedan imitar las estructuras y funciones biológicas de la matriz extracelular.

Para que la adhesión de las células se vea favorecida es necesario que los diámetros de las fibras sean menores que los de éstas. Por ello se necesita el desarrollo de estructuras fibrosas para la adhesión y proliferación de las células^[43]. En los últimos años la investigación para generar refuerzos a partir de polímeros sintéticos biocompatibles ha tenido mayor dedicación^[35].

- II. Protección de heridas: las heridas o quemaduras en la piel pueden ser tratados con capas poliméricas de nanofibras. De esta manera se impulsa el crecimiento de la piel y se evita la formación de cicatrices. Este método se ve limitado por las diferencias de tratamiento que requieren hueso y piel, ya que no se puede utilizar el mismo tipo de fibra para ambos casos^{[36][37]}.
- III. Administración de medicamentos: El suministro de fármacos en seres vivos depende de la distribución de estos en el organismo según sus propiedades físicas como solubilidad, coeficiente de partición y carga. Debido a esto los fármacos pueden alcanzar tejidos y órganos que no lo necesiten. Además, en muchos de ellos, es posible que estén fuera del intervalo terapéutico, que sean inactivos o que su acción sea indeseada o nociva y por ello cause efectos secundarios negativos^{[38][39]}.

En la actualidad la administración de fármacos se realiza conjuntamente con otras sustancias que mejoran su funcionamiento. En la mayoría de casos estas sustancias son de naturaleza polimérica. Existen dos metodologías generales para optimizar la acción de los fármacos:

- IV. Liberación controlada: trata de eliminar o reducir los efectos secundarios produciendo una concentración terapéutica óptima para el organismo.

Generalmente se intenta que los cambios en la concentración del fármaco en el organismo sean nulos, es decir que su cinética de liberación sea de orden 0.

- V. Liberación dirigida: trata de que el fármaco se dirija a lugares específicos de manera que se asegure la liberación de éste en el lugar requerido, al mismo tiempo se mantiene el fármaco inactivo en cualquier otro lugar del organismo.

El diseño de la administración de medicamentos permite definir diferentes tipos de respuesta. Por ejemplo es la determinación de la velocidad de administración, el momento de activación, si la administración se requiere constante o por impulsos, etc. Normalmente, la absorción de medicamentos en el cuerpo humano es mejor si éstos son pequeños y si la capa de recubrimiento es fina. La administración de medicamentos se rige con el principio que cuanto mayor sea la superficie del medicamento y de la estructura que lo soporta, mayor será la velocidad de disolución.

Desde el punto de vista de las nanofibras la administración de medicamentos se puede enfocar desde diferentes puntos de vista^[40]:

- Las partículas de medicamento se incorporan a la superficie de las nanofibras que sirven de matriz.
- Tanto el medicamento como la matriz se encuentran en forma de nanofibras y el producto resultante está formado por los dos tipos de fibras entrelazadas.
- La mezcla del medicamento y del soporte en un solo tipo de fibras que contiene los dos componentes.
- La matriz se dispone por medio de *electrospinning* en formas tubulares y las partículas del medicamento se encapsulan en su interior.

4. Antecedentes Bibliográficos

La técnica del electrohilado es un método eficaz para elaborar micro o nanofibras para aplicaciones muy específicas. Se ha utilizado con polímeros naturales y sintéticos (hidrofóbicos e hidrofílicos), entre ellos poli(láctico-glicólico), policaprolactona, colágeno, acetato de celulosa, quitosano, alginatos y muchos otros. Las nanofibras obtenidas se han empleado en campos como ingeniería de tejidos, liberación controlada de fármacos, apósitos para heridas, nanosensores, elaboración de filtros, etc.

Para la liberación controlada de drogas es frecuente utilizar copolímeros en bloque o mezclas de polímeros con objeto de regular la hidrofobicidad de la matriz y así poder variar la velocidad de salida del fármaco al medio.

Para exponer el estado del arte con estos materiales, se resumen siete artículos que pueden dar al lector una visión general de los trabajos que se desarrollan con fibras de PLA (componente hidrofóbico) y PEG (componente hidrofílico) obtenidas mediante *electrospinning*. Los artículos se han agrupado en función de que los componentes de las fibras estén en forma de copolímero (PLA-*b*-PEG), como mezcla de polímeros (PLA/PEG), y también se comentan artículos que utilizan la técnica de electrohilado para fabricar fibras coaxiales.

A) En forma de copolímero (PLA-*b*-PEG):

A.1) B.S. Hsiao et al. ^[50], prepararon en 2004 scaffolds constituidos a partir de microfibras compuestas por una mezcla PLGA/PLA/PEG-*b*-PLA (80:5:15), electrohiladas con cefoxitina sódica (*MefoxinR*: un antibiótico). La morfología y la densidad del *scaffold* son influenciadas por la carga del antibiótico debido al efecto sal durante el electrohilado. El empleo del copolímero en bloque PEG-*b*-PLA con carácter anfifílico tiene una importancia clave en la liberación del fármaco que puede extenderse hasta una semana. La estructura del antibiótico fue verificada mediante RMN tras la liberación, así como su eficacia para inhibir el crecimiento de la bacteria *S. aureus*.

A.2) S.M. Mai et al. ^[51] describieron en 2009 la preparación de copolímeros dibloque y tribloque a partir de L-lactida y D,L-lactida, que se polimerizaron utilizando PEG-monohidroxido y PEG-dihidroxido respectivamente como iniciadores. Asimismo, prepararon copolímeros multibloque por transesterificación de PLA con un poliéster preparado a partir de HO-PEG-OH y ácido succínico.

Todos estos copolímeros fueron caracterizados por GPC, NMR, DSC, SAXS/WAXS y características superficiales (ángulo de contacto). Con objeto de medir su potencial uso

como *scaffolds*, estos copolímeros fueron electrohilados con resultados diversos. Las mejores fibras se obtuvieron a partir de copolímeros multibloque, resultado que los autores atribuyen a mayores pesos moleculares.

B) Como mezcla de polímeros (PLA/PEG):

B.1) I. Rashkov et al. ^[52], en 2007 publicaron un artículo en el que describen, por primera vez, el electrohilado de disoluciones de mezclas de PLA y PEG en cloroformo. En el trabajo se utilizaron disoluciones PLA/PEG con proporciones en peso de 90:10, 80:20 y 70:30. Sus resultados muestran que el diámetro de la fibra y la morfología son dependientes de la viscosidad de la solución a electrohilar y del campo eléctrico aplicado.

El análisis mediante DSC de las microfibras de PLA y PLA/PEG comparado con el de los films obtenidos por evaporación del disolvente pone de manifiesto que el electrohilado incrementa la cristalinidad de PLA y PEG.

La biocompatibilidad de los andamios construidos con estas fibras fue evaluada con fibroblastos y osteoblastos *MG-63* que se adhieren por igual a las nanofibras de PLA/PEG. En los cultivos de estas células durante periodos más largos, se observó que los osteoblastos tienden a adherirse mejor a los *scaffolds* con mayor contenido en PEG.

B.2) Z.Y.Qian et al. ^[53], publicaron este año 2012 un trabajo en el que describen el comportamiento de matrices de microfibras de mezclas PLA/PEG obtenidas, mediante *electrospinning*, de disoluciones de ambos homopolímeros en cloroformo. El contenido en PEG de estas matrices alcanza hasta el 30% en peso y su estructura fue estudiada mediante SEM, DSC y medida del ángulo de contacto.

Sus resultados indican que la adición de PEG mejora el proceso de electrohilado, originando fibras más continuas. Los datos de degradación hidrolítica muestran una pequeña pérdida de peso de las fibras con bajo contenido en PEG, pero un descenso importante en el peso para fibras con 20 y 30% en PEG, que los autores atribuyen a un proceso de disolución. La biocompatibilidad *in-vitro* se estudió con células *NIH3T3*, estudiando la adhesión y proliferación de éstas sobre las matrices de PLA/PEG de todas las composiciones preparadas.

B.3) En un siguiente artículo Z.Y.Qian et al. ^[54], ampliaron su estudio sobre el comportamiento de las matrices de PLA/PEG. Mediante *electrospinning*, prepararon *scaffolds* a partir de mezclas PLA/PEG 95:5, y las pusieron en contacto con células madre mesenquimales (*MSC*), comprobando que éstas se adhirieran y proliferasen sobre las matrices. Las células *MSC* penetran en el *scaffold* por los intersticios entre fibras y en esta situación aumentan su capacidad para diferenciarse en células asociadas al hueso. La

biocompatibilidad *in vivo* de estos *scaffolds* fue verificada mediante su implantación en músculos del muslo de ratas y un posterior estudio de las células inflamatorias y los tejidos próximos al implante. Los autores concluyen que estas matrices presentan un buen comportamiento para su empleo en ingeniería de tejidos óseos.

C) Fibras coaxiales con un componente formando el centro de la fibra (*core*) y el otro como capa exterior envolvente (*sheath*).

C.1) Xiabin Jing et al. ^[55], elaboraron en 2006 nanofibras coaxiales mediante *electrospinning* de una emulsión constituida por una fase acuosa, conteniendo PEG, y una fase orgánica, formada por un copolímero dibloque (PLA-*b*-PEG) disuelto en cloroformo. Las fibras preparadas están formadas por un eje central de PEG recubiertas de una capa externa de PEG-PLA. En este trabajo se añadió fluoresceína a la fase acuosa para poder medir el grosor del eje central de la microfibra. Según los autores, es factible modificar los grosores relativos de ambos constituyentes. Asimismo, indican que la técnica es aplicable a otros pares de polímeros, uno de ellos hidrosoluble y el otro liposoluble.

C.2) Estos mismos autores ^[56], publicaron en 2008 un artículo en el que describen la preparación y propiedades de fibras coaxiales cargadas con Doxorubicina clorhidrato (DOX), un agente anticancerígeno. La estrategia utilizada en este trabajo consiste en electrohilar una emulsión obtenida a partir de una solución acuosa de DOX y otra de copolímero dibloque (PLA-*b*-PEG) disuelto en cloroformo. La nanofibra coaxial (*core-sheath*) fabricada, está formada por un eje central conteniendo agregados de DOX dispersos en (PLA-*b*-PEG) y una capa externa de (PLA-*b*-PEG) prácticamente carente de agente anticancerígeno.

La liberación del DOX a partir de este sistema consta de tres etapas controladas por difusión, con una segunda etapa más rápida que la primera, pero todas ellas de acuerdo con la segunda *Ley de Fick*. Los autores concluyen que este dispositivo puede ser considerado de tipo reversible, en el que la velocidad de liberación desciende al aumentar el contenido en DOX de la fibra.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Este PFC tiene como objetivo estudiar un nuevo material compuesto estructurado como una matriz de microfibras de poliláctida (PLA, poliéster hidrofóbico), y polietilenglicol (PEG, poliéster hidrofílico). Para ello, se realizaron los *electrospinning* simultáneos de soluciones independientes de PLA y PEG. La variación del flujo de las soluciones durante el proceso de *electrospinning* permitió obtener una mezcla de ambas microfibras en forma de malla, y de diferentes composiciones PLA/PEG. Las fibras de PEG en la malla fueron usadas como polímero de sacrificio, su carácter hidrofílico condicionó la disolución de las fibras de PEG cuando la malla fue incubada en un medio acuoso (remoción de PEG). Este cambio en la estructura de la malla de fibras fue evidenciado por un incremento en la porosidad de la malla. Así, las mallas de microfibras de PLA/PEG antes y después de la remoción de PEG fueron estudiadas mediante SEM, RMN, FTIR, DSC, etc. Para estudiar las aplicaciones biomédicas de este material compuesto, las fibras de PLA fueron cargadas con moléculas antimicrobianas. En concreto, se seleccionó el triclosán y la polihexametilbiguanida para determinar las posibilidades de estas matrices como sistema liberador de drogas, y como soporte para el cultivo de células.

5.2. Objetivos específicos

Con la finalidad de desarrollar el objetivo general planteado para este PFC, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Establecer las condiciones óptimas del electrospinning dual para la producción de las matrices híbridas de fibras de PLA y de PEG. Entre los parámetros operacionales de electrohilado que serán optimizados se encuentran la distancia colector-aguja o el flujo de inyección de la solución. Las disoluciones de los polímeros también serán optimizadas (p.e., disolventes, concentración de polímero, etc.)
- 2) Caracterizar morfológicamente las electrofibras de la matriz. Asimismo, las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) permitirán establecer el diámetro de las fibras.
- 3) Determinar en los polímeros de las fibras posibles cambios estructurales mediante el análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y por termogravimetría (TGA).

- 4) Cuantificar la remoción de PEG en medio acuoso mediante el análisis por métodos espectroscópicos: análisis por infrarrojos (FTIR) y resonancia magnética nuclear (RMN).
- 5) Determinar la porosidad de las matrices híbridas después de la remoción de las fibras de PEG.
- 6) Preparar matrices híbridas cargadas con antibacterianos. Para ello el triclosán (TCS) y la polihexametilbiguanida (PHMB) serán cargados en la disolución de PLA.
- 7) Estudiar la liberación del TCS y PHMB desde las matrices híbridas en dos medios de diferente hidrofobicidad: buffer fosfato salino (PBS) y en PBS suplementado con etanol.
- 8) Evaluar el efecto antibacteriano de las matrices híbridas sobre el crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* (Gram negativa) y *Micrococcus luteus* (Gram positiva).
- 9) Determinar la biocompatibilidad de las matrices híbridas mediante los ensayos de adhesión y proliferación celular usando cultivos de líneas celulares.

6. Materiales y métodos

6.1. Reactivos

Los disolventes y reactivos utilizados para las diferentes pruebas realizadas son los siguientes:

1) Productos químicos:

Ácido poliláctico (PLA)

Polietilenglicol (PEG)

Triclosán o Irgasán (TCS)

Polihexametenbiguanida (PHMB)

Ácido fórmico

Tiosulfato de sodio

DMEM (Dulbeccos' Modified Eagle Medium)

EDTA

Extracto de levadura

MTT

Peptona

Tripsina

2) Disolventes:

Acetona

Cloroformo

Diclorometano

Dimetilformamida

Agua destilada

Agua desionizada milipore

Etanol 96°

PBS

DMSO

6.2. *Electrospinning*

A continuación se muestra un esquema de la disposición de los equipos utilizados en el proceso de electrospinning (*Figura 6.1*):

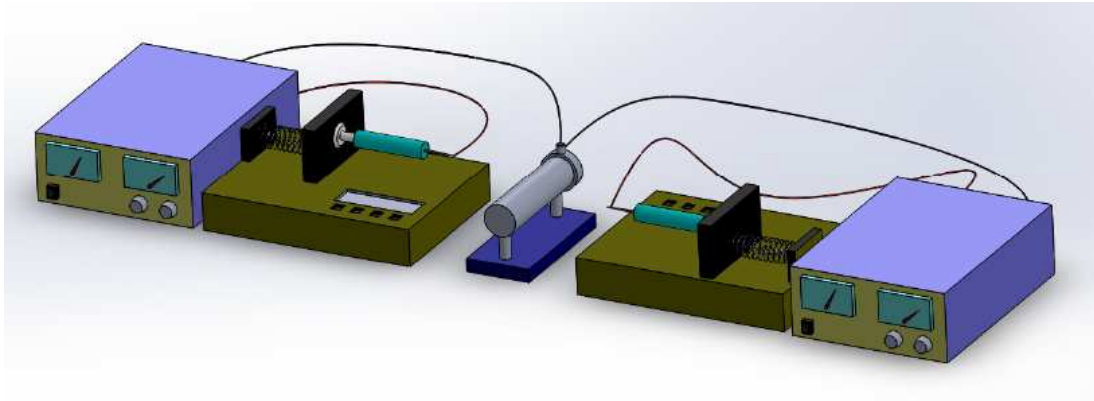


Figura 6.1.- Esquema de la disposición de los equipos de electrospinning

El equipo de *electrospinning* está compuesto por los siguientes elementos:

Rodillo: Componente eléctrico en forma de cilindro que gira en torno a su eje y a una velocidad ajustable, permitiéndonos recoger simultáneamente en toda su superficie las fibras producidas por las disoluciones poliméricas inyectadas por cada una de las dos bombas, una a cada lado del mismo. A su vez, se encuentra conectado a uno de los dos electrodos de las dos fuentes de alimentación para poder crear el campo eléctrico suficiente y producirse el *electrospinning*. Dado que en este proceso se aplican altos voltajes, es recomendable no manipular el rodillo o cualquier parte del montaje ya que puede resultar peligroso. En éste caso, no podemos colocar ningún elemento de protección ya que nuestra configuración para el *electrospinning*, no nos lo permite.

Fuente de alimentación: Es el aparato que nos proporciona la diferencia de potencial entre la aguja y el rodillo, provocando la producción de fibras y su depositación en la superficie del mismo. Al tener dos disoluciones poliméricas, necesitaremos dos fuentes de alimentación, una para cada solución. En nuestro caso trabajamos con la fuente de alimentación *Gamma High Voltage Research* que proporciona alto voltaje, en el rango de 0-30 kV y una intensidad de 0-750 mA.

Bomba inyectora: Aparato electrónico que nos permite dosificar y regular la inyección de la disolución polimérica hasta la aguja a un flujo constante definido por el usuario. La bomba de inyección utilizada es la *KdScientific* 120 de 230 V y 50/60 Hz.

Jeringa: La función de la jeringa es el almacenamiento de la solución y la canalización hacia la aguja.

Aguja: Parte de equipo por donde fluye la disolución polimérica. Se conecta al electrodo restante de la fuente de alimentación provocando un campo eléctrico que nos permite la producción de fibras mediante *electrospinning*.

6.3. Microscopia

6.3.1. Microscopio óptico

Dado el pequeño diámetro de las fibras obtenidas mediante *electrospinning*, no es posible ver, evaluar su regularidad, su forma y medir su diámetro a simple vista. En consecuencia, es habitual disponer de un microscopio óptico próximo al equipo de *electrospinning* con el que hacer un primer examen de las fibras obtenidas.

El microscopio óptico es muy útil para establecer las mejores condiciones para conseguir micro/nanofibras. Para ello las muestras se recogen directamente sobre una lámina cubreobjetos o laminilla que puede analizarse fácilmente mediante microscopía óptica. Sin embargo, el microscopio óptico es poco útil para realizar mediciones precisas del diámetro de las fibras, puesto que su forma cilíndrica produce dispersión en el borde de la fibra dando lugar a sombras alrededor de la imagen que dificultan la determinación exacta del diámetro de las fibras.

El microscopio óptico se sirve de la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto. El más simple es la lente convexa doble con una distancia focal corta. Estas lentes pueden aumentar un objeto hasta 15 veces. Por lo general se utilizan microscopios compuestos, que disponen de varias lentes para poder alcanzar mayores aumentos, llegando excepcionalmente a magnificaciones de x2.000. En nuestro caso, trabajaremos a una baja magnificación con objetivos de 20 y 40 aumentos.

El microscopio compuesto consiste en dos sistemas de lentes, el objetivo y el ocular, montados en extremos opuestos de un tubo cerrado. El objetivo está compuesto de varias lentes que crean una imagen real aumentada del objeto examinado.

Las lentes de los microscopios están dispuestas de forma que el objetivo se encuentre en el punto focal del ocular. Cuando se mira a través del ocular se ve una imagen virtual aumentada de la imagen real. El aumento total del microscopio depende de las longitudes focales de los dos sistemas de lentes.

El microscopio óptico utilizado se trata del *Carl Zeiss Standard 20* para una primera observación en la realización de fibras mediante *electrospinning* y *Carl Zeiss AXIOSCOP 40* con una cámara *Axio Cam Mrc5* y el software *Axio Vision Rel.4.8* para una observación más detallada (Figura 6.2).



Figura 6.2.- Microscopio óptico con cámara y equipo informático

6.3.2. Microscopio electrónico

El microscopio electrónico es aquel que utiliza electrones en lugar de fotones o luz visible para formar imágenes de objetos diminutos. Los microscopios electrónicos permiten alcanzar una capacidad de aumento muy superior a los microscopios convencionales debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la de los fotones "visibles".

El microscopio electrónico de barrido o SEM (*Scanning Electron Microscope*), es un instrumento que realiza un barrido, mediante un rastreo programado, la superficie de un sólido mediante un haz de electrones de energía elevada. Como consecuencia de ello se producen diversos tipos de señales que permiten observar y caracterizar la superficie de materiales. Algunas de las propiedades más significativas de este tipo de microscopia son la obtención de imágenes en apariencia tridimensional, enfocar de una sola vez una gran parte de la muestra, y a su vez una sencilla preparación de éstas. En nuestro caso, el microscopio usado es el *Carl Zeiss Neon 40* (Figura 6.3).

La preparación de dichas muestras consiste en aplicar un recubrimiento conductivo, en este caso un film de carbono de unos 5-7nm de espesor^[41], mediante un evaporador *Balzers SCD-004 Sputter-coater*. Este recubrimiento previene la formación de carga eléctrica sobre la muestra debido a la baja conductividad del polímero y que dicha carga interactúe con el haz de electrones incidente. Si esto ocurriera se distorsionarían las imágenes, por este motivo es imprescindible un recubrimiento óptimo para la obtención de

imágenes. Además, el recubrimiento tiene función protectora, desde que los polímeros funden cuando son expuestos al alto voltaje del haz de electrones.

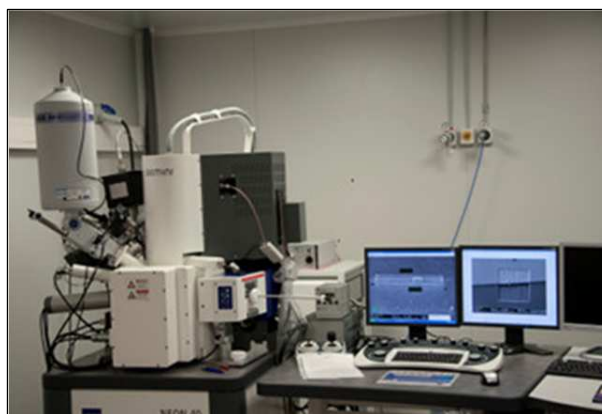


Figura 6.3.- Microscopio de haz de iones focalizados FIB/SEM (Focused Ion Beam Zeiss Neon40)

6.3.3. Análisis por RMN (Resonancia Magnética Nuclear)

La técnica de RMN se utiliza para complementar la información obtenida por IR y así verificar la constitución química de la molécula y la disposición de sus enlaces. Además, permite determinar la presencia de grupos terminales asociados a muestras de bajo peso molecular (monómeros u oligómeros). A su vez, esta técnica permite confirmar que la reacción de polimerización ha finalizado, es decir, que no se encuentran trazas de monómero u oligómero, y para comprobar la ausencia de moléculas anómalas debido a reacciones secundarias.

Su fundamento teórico se basa en determinar la absorción de energía a frecuencias específicas que presentan determinados núcleos atómicos. La absorción de energía está asociada a un cambio de orientación, provocada por la irradiación con ondas de radio, en los núcleos que se hallan en el interior de un campo magnético.

De la misma manera que ocurre en todos los procesos que se llevan a cabo a escala atómica o molecular, la absorción de energía está cuantificada mediante valores específicos para determinadas fuerzas magnéticas y frecuencias de radiación electromagnética.

No obstante, no todos los núcleos son sensibles bajo la aplicación de un campo magnético. Es por este motivo que en este PFC se realizan análisis de los núcleos de ^1H , que son en los que se basan la mayoría de estudios de análisis orgánico.

- Espectros de ^1H -RMN: Los núcleos de hidrógeno se encuentran en regiones cuyas densidades de electrones son distintas. En consecuencia, los protones de estos

compuestos absorben a intensidad de campo magnético ligeramente diferentes. Estas desigualdades se deben al medio magnético en que se encuentre cada protón, y a su vez, el medio depende de los campos magnéticos generados por los electrones circulantes y los que resultan de otros protones cercanos.

Un espectro de RMN proporciona información sobre la estructura de los átomos de hidrógeno del compuesto estudiado, en la gráfica se analizan las siguientes características:

- Número de señales: corresponde a la cantidad de tipos de hidrógenos que presenta cada compuesto.
- Áreas relativas de los picos (señales): son proporcionales al número de hidrógenos que producen la señal. Permiten asignar los picos a grupos de hidrógenos en particular.
- Acoplamiento de señales: fenómeno producido por las influencias magnéticas de los hidrógenos presentes en átomos adyacentes. Este hecho provoca que las señales se dividan en $n+1$ picos donde n es el número de protones vecinos equivalentes químicamente, pero distintos al núcleo observado. Así, pueden surgir dobletes cuando hay un protón vecino, tripletes cuando son dos, etc. Si el núcleo observado tiene protones vecinos distintos entre sí, los acoplamientos de ambos se multiplican.

Para la realización de los espectros, se pesan 20 mg de muestra y se disuelven en CDCl_3 y esta disolución se analiza en el espectrofotómetro.

Tanto para el poliéster como para el poliéter estudiado en este PFC, los espectros de RMN de protón (^1H -RMN) se realizaron en un espectrómetro *Brucker AMX-300* (Figura 6.4) de transformada de Fourier trabajando a 300,13 MHz.



Figura 6.4.- ^1H -RMN

6.3.4. Análisis Infrarrojos

El análisis de un polímero mediante IR, permite realizar un estudio cualitativo para determinar los grupos funcionales que lo constituyen. El IR es una técnica de caracterización fisicoquímica basada en la excitación de los modos de vibración de las moléculas mediante la absorción de radiación infrarroja. A una temperatura mayor a la de cero absoluto los enlaces químicos entre dos átomos se encuentran en vibración. Ésta puede ser de dos tipos: tensión o flexión. Las vibraciones de tensión suponen un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje de enlace entre dos átomos. En cambio, las de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo formado por dos enlaces. Los tipos de flexión son: de tijereteo, de balanceo, de aleteo y de torsión (*Figura 6.5*).

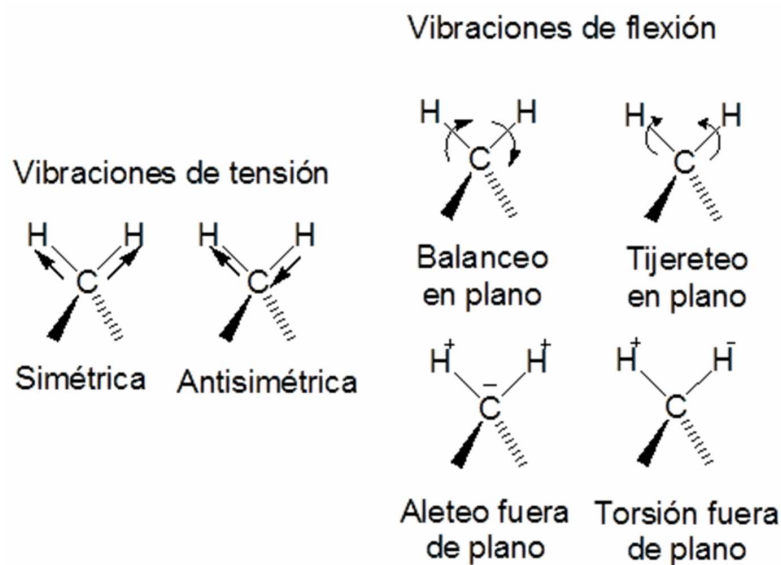


Figura 6.5.- Diferentes tipos de vibración flexión

Cuando se produce un cambio en la amplitud de cualquiera de estas vibraciones da lugar a un pico de absorción del espectro. La luz infrarroja se encuentra en el mismo rango de frecuencia de vibración que los enlaces de la molécula analizada. Es por ello que cuando a ésta se le aplica una radiación IR absorbe todas las frecuencias que son idénticas a las de vibración de los distintos enlaces que constituyen dicha molécula.

En consecuencia, cuando los compuestos orgánicos interactúan con la radiación IR se produce una excitación de los enlaces químicos y esto da como resultado una absorción de energía en unas longitudes de ondas específicas para cada enlace.

Por lo tanto, el espectro IR de un compuesto no es más que una representación gráfica de la absorción que tiene lugar en la región infrarroja del espectro en función de la frecuencia de la radiación. Para poder cuantificar la cantidad de radiación absorbida se determina el

porcentaje de transmitancia (T%). La identificación de los grupos funcionales se realiza basándose en que cada uno de ellos tiene una absorción característica para una longitud de onda determinada.

Respecto a los tipos de espectrofotómetros que existen se clasifican en dos grupos: los de barrido de doble haz y los de transformada de Fourier (FTIR) cuyos esquemas pueden observarse, respectivamente en las *Figuras 6.6 y 6.7*, respectivamente.

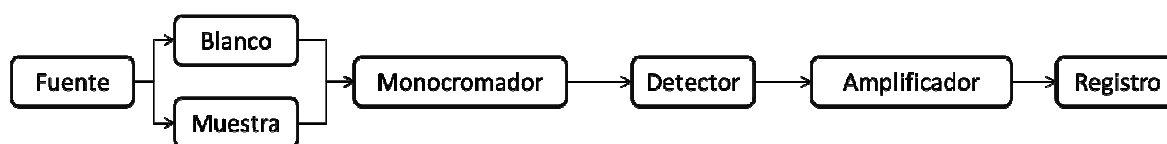


Figura 6.6.- Espectrofotómetro de barrido de doble haz

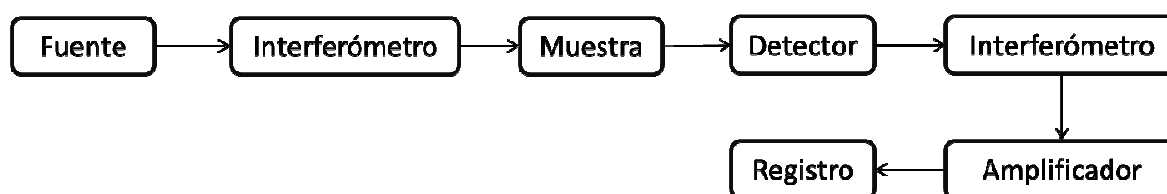


Figura 6.7.- Espectrofotómetro de Transformada de Fourier

El IR de barrido de doble haz analiza las distintas longitudes de ondas absorbidas comparándolas con un blanco, generalmente aire. Las diferencias entre los dos haces se representan mediante un pico o banda de transmisión a una determinada longitud de onda.

Los denominados de tipo transformada de Fourier se basan en hacer incidir todo el espectro de longitudes de onda varias veces sobre la muestra. Para obtener el espectro se recoge la radiación transmitida como una señal de interferencias (interferograma) y se le aplica la operación matemática de transformada de Fourier.

En el presente PFC, el procedimiento seguido para la realización de los espectros, teniendo en cuenta que las muestras analizadas son sólidas, fue el siguiente: con una espátula se coloca la muestra sólida, en forma de polvo, directamente sobre la ventana del equipo. Con la ayuda de una prensa, formada por una punta de zafiro, se presiona la muestra.

La finalidad es formar una fina capa en cuya superficie penetre ligeramente y se refleja el rayo de luz del espectrómetro y, a su vez, evitar la acumulación de aire que provoca interferencias en los resultados.

El espectrofotómetro utilizado es un *Jasco FT-IR 4100*, de transformada de Fourier, que opera en un rango entre 500-4000 cm^{-1} (*Figura 6.8*).

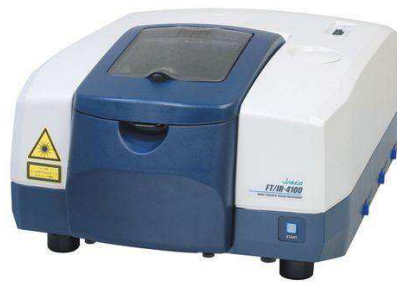


Figura 6.8.- Modelo: FT/IR-4100 //ATR ESPECAC. Marca: JASCO

6.3.5. Análisis térmico: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La DSC es una técnica que permite determinar el flujo de calor intercambiado por una muestra al modificar su temperatura. Debido a que los intercambios de calor están asociados a los cambios físicos y químicos que presenta una sustancia, ésta técnica determina las temperaturas a las cuales suceden estos cambios. A su vez, da información sobre la magnitud energética de éstos.

En un material polimérico las transiciones térmicas que pueden aparecer en un termograma son las siguientes temperaturas: la de transición vítrea (T_g), la de fusión (T_m) y la de cristalización (T_c).

En general una calorimetría de polímeros consta de cuatro barridos, las realizadas en este estudio están formadas por:

- **Primer barrido (primer calentamiento):** Calefacción de la muestra desde temperatura ambiente hasta 90 °C a una velocidad de 20 °C/min y mantenerla 1 min a 90 °C. para obtener la temperatura de fusión (T_f) Ésta generalmente se manifiesta en un pico endotérmico relativamente ancho, aunque en ocasiones pueden aparecer varios picos. Las informaciones que se obtienen con este barrido son el grado de cristalinidad y la temperatura de fusión de la muestra (T_f).
- **Segundo barrido (enfriamiento lento):** Se enfría la muestra desde la temperatura de fusión hasta -90 °C a una velocidad de 10 °C/min tras haberla mantenido a 90 °C durante 1 min. Este proceso se realiza inmediatamente después del primer barrido y permite determinar la cristalización del fundido, mediante un pico exotérmico (T_c). En este caso la posición y área del pico indican el subenfriamiento y la cristalización alcanzada para dicha velocidad de enfriamiento.

- **Tercer barrido (segundo calentamiento):** se calienta de nuevo la muestra hasta la fusión a una velocidad de 20 °C/min después de mantenerla a -90 °C durante 1 min. El hecho de volver a calentar la muestra permite constatar la capacidad de reproducción de las transiciones y a su vez obtener datos de la muestra cristalizada del fundido.
- **Cuarto barrido (tercer calentamiento):** Tras mantener la muestra a 90 °C durante 5 min y se enfría hasta -90 °C rápidamente. Seguidamente se realiza un tercer y último calentamiento hasta alcanzar 90 °C a una velocidad de 20 °C/min. Éste último barrido permite determinar la temperatura de transición vítrea (T_g), en los polímeros amorfos, aparece como una discontinuidad en la línea base.

Se debe remarcar que ésta puede ser difícil de observar en el caso en que la velocidad de enfriamiento previo no sea suficientemente alta como para obtener el polímero amorfo.

Finalmente, añadir que se puede observar una cristalización en frío y registrar nuevamente la fusión.

El equipo que se utiliza para realizar la DSC es el modelo Q100, de *TA-Instruments* (Figura 6.9.), dotado con un sistema automático de recogida de muestra (*DSC Autosampler*); muestreador Automático con capacidad para 50 muestras y 5 referencias y equipado con un sistema de refrigeración mecánica sin nitrógeno líquido (RCS), que permite trabajar con temperaturas comprendidas en el rango -90 a 550 °C. El equipo requiere tres calibraciones en temperatura y energía: sin muestras, con zafiros y mediante la fusión de patrones metálicos de indio ($T_m = 429,75$ K, $\Delta H_m = 3,267$ kJ/mol).

Las muestras se pesaron en una balanza electrónica *Mettler AC 100* con precisión de 0,1 mg o bien en una balanza *Mettler P1210* con precisión de 10 mg, en función de la cantidad de muestra a pesar y de la precisión deseada.



Figura 6.9.- Calorímetro DSC Q-100

6.3.6. Ángulos de contacto (CA)

La medición de ángulos de contacto de equilibrio sólido/líquido/vapor se usa típicamente en el análisis interfacial, y generalmente se considera entre los métodos más sensibles que proporcionan información sobre la superficie más externa de las capas moleculares superiores (0,5 nm).

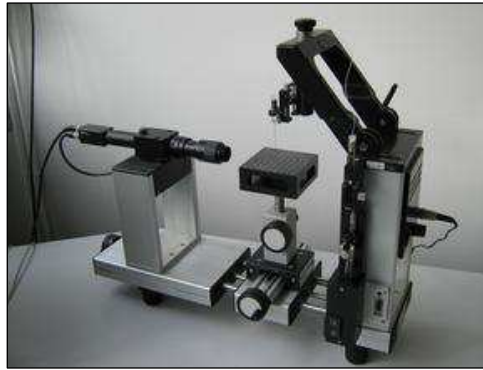


Figura 6.10.- Medidor de ángulos de contacto Data Physics OCA 15

Los ángulos de contacto se midieron mediante el análisis de la forma de la gota. Para esta técnica hay que tener en cuenta dos hipótesis principales:

- La gota es simétrica respecto a un eje vertical por lo tanto es irrelevante desde que dirección es observada.
- La gota no está en movimiento de manera que la viscosidad o la inercia no son relevantes, así pues las únicas fuerzas que afectan a la forma de la gota son la tensión interfacial y la gravedad.

Los ángulos de contacto se miden ajustando una expresión matemática a la forma de la gota y después calculando el ángulo entre la tangente a la forma de la gota y la base de referencia previamente fijada.

Para el ensayo con el equipo *Data Physics OCA 15* (Figura 6.10.), se prepara una jeringa de vidrio con agua y se coloca en el aparato para que este pueda dispensarla. En el *software SCA20* se introducen los datos relativos al tipo de fluido que se va a utilizar así como las características de la gota (volumen) y la manera de dispensarla^[42].

Una vez preparada la jeringa, se coloca la muestra en la superficie metálica del aparato y se fija para que quede plana. Posteriormente se procede al uso de la cámara que deberá estar en la dirección y enfoque adecuados para que inicialmente se observe por la pantalla la muestra y la jeringa. Cuando esto se consigue se procede a dispensar una gota, y se

sube la superficie metálica para que la muestra y la gota se toquen y después se separan, de manera que la gota quede sostenida encima de la muestra (*Figura 6.11.*).

Una vez se tiene la gota sobre la muestra se procede al cambio de enfoque para que la gota quede centrada, aumentada y enfocada en la pantalla. Mediante el software se procede a introducir la línea base sobre la que la gota se apoya y posteriormente el propio programa calculara la forma y ángulos de contacto entre la gota y la superficie de la muestra.

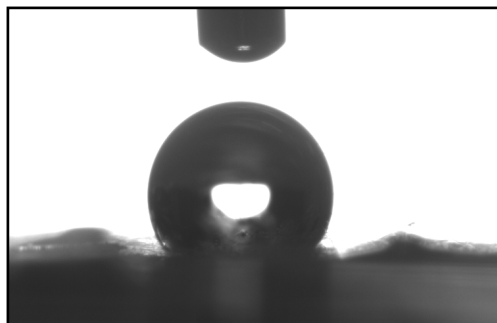


Figura 6.11.- Dispensación de la gota sobre la superficie de la muestra

6.3.7. Espectroscopia de ultravioleta (UV)

La técnica de espectroscopia UV, de la misma manera que la de IR, se basa en la absorción de energía de una longitud de onda (λ) determinada por un compuesto químico. En este caso, se basa en la absorción de luz ultravioleta y visible que se genera en una molécula al pasar un electrón de un orbital de baja energía a uno superior, al ser excitado.

La diferencia energética entre estos orbitales moleculares corresponde a las longitudes de onda del visible. Dichas longitudes de onda se encuentran entre 190 y 780 nm, situadas en la zona del ultravioleta visible.

En el espectro *UV-VIS* normalmente sólo se aprecian 2 ó 3 grandes bandas y en general son anchas, debido a que los electrones pueden tener muchos niveles energéticos dependiendo del entorno (vibraciones y/o rotaciones). Es por este motivo que se suele representar como un solo nivel energético lo que en realidad son muchos subniveles.



Figura 6.12.- Espectrofotómetro SHIMADZU UV-3600

En este trabajo, para la espectroscopia *UV-VIS* se utilizó un espectrofotómetro *SHIMADZU UV-3600* (Figura 6.12.), para cuantificar los ensayos de liberación de CHX y PHMB. Las muestras líquidas recogidas se depositan en una cubeta de cuarzo y se leen a una absorbancia determinada previamente como la absorbancia máxima del fármaco en este medio (en PBS y en PBS-Etanol). Para determinar la concentración de TCS y PHMB en las muestras sus absorciones fueron procesadas usando una curva patrón como referencia.

6.4. Modelos cinéticos de liberación

La liberación de un fármaco es un proceso complejo que depende de diversos factores relacionados con el fármaco (estructura química, cristalinidad, solubilidad, cantidad y tamaño de partícula del fármaco) y de factores dependientes del medio donde tiene lugar la liberación. El gran número de factores que afectan a la liberación hacen de ella un fenómeno difícil de modelar, es por ello que se han planteado diferentes ecuaciones para poder relacionar la cantidad de fármaco liberado en función del tiempo.

El proceso de liberación de un fármaco incluido dentro de una matriz polimérica puede llevarse a cabo mediante varios mecanismos (difusión y relajación o hinchamiento de las cadenas poliméricas).

Existen diferentes modelos capaces de ajustarse al tipo de liberación que se produce cuando el fármaco está en una matriz polimérica, en este proyecto se han utilizado dos modelos matemáticos del tipo mecanicista, el modelo de primer orden y el de Higuchi. Estos modelos tienen limitaciones en función del porcentaje de saturación del fármaco, es decir en función de la concentración máxima que alcanza el fármaco en el medio.

Primer Orden: En este modelo la velocidad de disolución es proporcional a la primera potencia de la concentración del fármaco disuelto.

$$\ln\left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right) = -k_1 t + \ln M_\infty \quad \text{Ec. 1}$$

Este modelo es incapaz de ajustar los primeros datos de la liberación (solo a partir del 40 % de saturación), por ello el análisis cinético se ha complementado con el uso del modelo de Higuchi^[57].

Higuchi: En este modelo la velocidad de disolución es función de la raíz cuadrada del tiempo.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \sqrt{t} \quad \text{Ec. 2}$$

Con este modelo es posible el ajuste de los datos hasta el 60 % de saturación del fármaco.

6.5. Cultivos bacterianos

Las bacterias seleccionadas para llevar a cabo el estudio antibacteriano, fueron: *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Micrococcus luteus* (*M. luteus*), figura 6.13., la primera de tipo Gram negativo y la segunda Gram positivo. De esta forma, se ha evaluado con amplitud el efecto del Triclosán (TCS) y de la PHMB como agente antibacteriano en las matrices de fibras obtenidas por *electrospinning*.

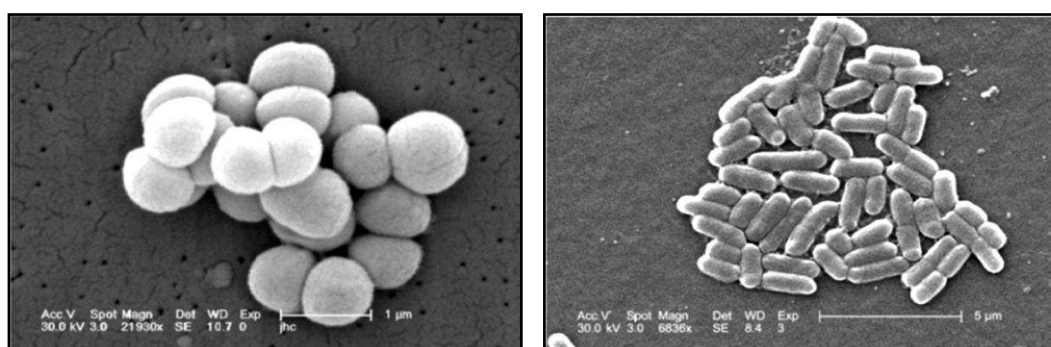


Figura 6.13.- Morfología de las bacterias *E. coli* (izquierda) y *M. Luteus* (derecha). Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

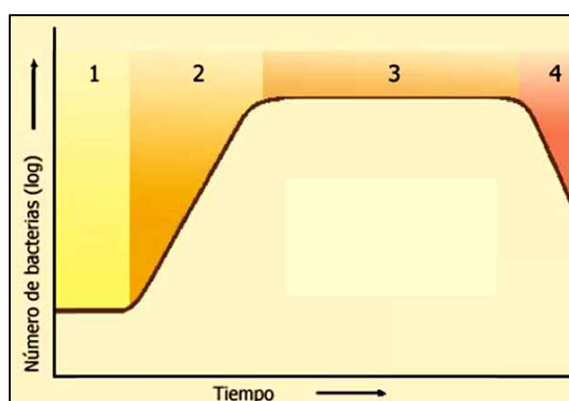


Figura 6.14.- Curva de crecimiento bacteriano donde se indican las 4 fases del crecimiento
1 Fase de adaptación (Lag), 2 Fase exponencial, 3 Fase estacionaria, 4 Muerte celular

Las bacterias fueron cultivadas aeróbicamente hasta la fase exponencial (*Figura 6.14.*) en un medio de cultivo constituido por 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl, y 16 g/L de peptona disueltos en agua destilada (pH 7,2). El crecimiento bacteriano se determinó mediante la medida de absorbancia a 600 nm, y el número de bacterias se calculó mediante una *Curva de McFarland*.

Los experimentos de inhibición del crecimiento bacteriano se realizaron en placas de poliestireno de 24 pocillos. 10^3 UFC (unidades formadoras de colonias) fueron sembradas en 2 mL de medio de cultivo en presencia de las muestras de electrofibras (1 cm x 1 cm x 0,1 cm). Los cultivos se incubaron a 37 °C y se agitaron a 60-100 rpm. Después de incubarse durante 24 h, una alícuota de 0,1 mL de cada pocillo fue colocada en una placa de ELISA para realizar la lectura de absorbancia a 600 nm como medida para determinar el crecimiento bacteriano. El recuento de bacterias se calculó como se ha indicado, mediante una *Curva de McFarland*.

Los experimentos de adhesión bacteriana a la matriz de fibras se llevaron a cabo sembrando 10^3 UFC en 2 mL de medio de cultivo en presencia de fibras. Los cultivos se incubaron a 37 °C y se agitaron a 60-100 rpm durante 24 h. Después de la incubación, el medio de cultivo fue aspirado y posteriormente la matriz fue lavada dos veces con agua destilada. A continuación, se añadió 1 mL de tiosulfato de sodio 0,01 M estéril y la muestra de fibras fue agitada en vórtex durante 2 minutos. Posteriormente, la muestra se mantuvo en incubación a 37 °C y agitación (60-100 rpm) durante 1 h para favorecer la liberación bacteriana desde la matriz de fibras. Finalmente, se añadió 1 mL del medio de cultivo y la matriz fue retirada de los pocillos y seguidamente las placas fueron mantenidas en cultivo durante 24 horas a 37 °C y con una agitación de 200 rpm. El crecimiento bacteriano se determinó tal y como se describe en el ensayo de inhibición bacteriana. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, expresándose todos los resultados como la media \pm la desviación estándar (SD). Se utilizó la *t-Student* para el análisis estadístico en un nivel de confianza del 95 % ($p < 0,05$).

6.6. Cultivos celulares

Se ha estimado que los diferentes tejidos y órganos de un adulto contienen más de 10^{14} células. Todas éstas se derivan originalmente de una única célula que crece y se divide. De igual modo, puede hacerse que células aisladas de ciertos tejidos, crezcan y se dividan en un medio de cultivo artificial, constituyendo lo que se conoce como cultivo de tejidos.

El cultivo de células inmortalizadas (células derivadas de tumores, o células transformadas por elementos virales) es una metodología que permite tener de forma continua células.

Estos cultivos celulares tienen como ventaja que no requiere el sacrificio de animales, ni el aislamiento y purificación celular. Por este motivo, los primeros ensayos de biocompatibilidad son realizados usando este tipo de células. El término biocompatibilidad *in-vitro*, puede entenderse como un material que no produce muerte celular por toxicidad celular (citotoxicidad) y se comporta como soporte apto para la adhesión y proliferación de células.

Para la realización de este estudio se utilizan células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) y MRC-5 (*Homo Sapiens Fibroblast Cells*) las primeras son células epiteliales y las segundas los fibroblastos. Tanto las células MDCK como las células MRC-5 fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero fetal bovino al 10 %, 50 U/cm³ de penicilina, 50 mg/cm³ de estreptomicina y L-glutamina 2 mM, a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % CO₂ y 95 % de aire. El medio de cultivo se cambia cada dos días y, para el subcultivo, las monocapas celulares se lavan con tampón fosfato salino (PBS) y luego se tripsinizan por incubación con tripsina-EDTA (0,25 %) durante 2-5 minutos a 37 °C. La actividad de la tripsina se detiene añadiendo medio de cultivo para obtener una suspensión celular.

La concentración de células en la suspensión se determinó por conteo celular directo en una *Cámara de Neubauer* (Figura 6.15.), usando el colorante vital azul de trypan al 4 % para diferenciar las células vivas de las muertas. Este colorante penetra en las células muertas, y las colorea de azul, mientras que las células vivas no se tiñen. El principio de esta tinción diferencial corresponde a la estabilidad de la membrana celular: las células muertas tienen la membrana celular dañada, mientras que las células vivas tienen una membrana celular íntegra o intacta y por ello no permiten la penetración del colorante al interior citoplasmático.

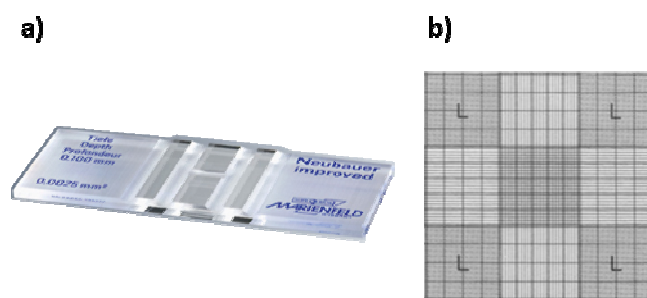


Figura 6.15.- Cámara de Neubauer (a la izquierda se puede observar su aspecto exterior) y el sistema de conteo utilizado (a la derecha)

Todos los experimentos de biocompatibilidad in-vitro fueron realizados con suspensiones celulares con viabilidad celular igual o mayor al 95 %. Se requiere esta alta viabilidad celular inicial para poder evaluar la adhesión y proliferación de las células en contacto directo con el material. La pérdida de viabilidad celular durante los experimentos de biocompatibilidad puede explicarse por citotoxicidad (daño celular y/o muerte celular) inducida por los materiales o productos generados a partir del material ensayado.

Para los ensayos de biocompatibilidad in-vitro, las matrices de microfibras fueron recortadas en cuadrados de superficie aproximada de 1 cm^2 . Estas probetas fueron colocadas en los pocillos (*well*) de placas de cultivo constituidas por un total de 24 pocillos. Las placas de cultivo son de poliestireno (PS) tratado para el cultivo celular (CTRL), tratamiento que consiste en el recubrimiento de la superficie de PS con proteínas típicas de la matriz extracelular (colágeno, fibrina, etc.). Finalmente, las placas de cultivo preparadas con las matrices de microfibras a evaluar fueron esterilizadas por irradiación UV durante 15 min en el interior de una cabina de bioseguridad tipo II. Luego, las células se expusieron al contacto directo con la superficie del material para evaluar tanto la adherencia como la proliferación celular. Alícuotas de $100 \mu\text{L}$ con 5×10^4 células (para la adhesión) o 2×10^4 células (para la proliferación) se depositaron en las probetas de microfibras colocadas en cada pocillo de la placa de cultivo. La placa se incubó en condiciones de cultivo durante 60 minutos para permitir la adhesión celular a la superficie del material.

Posteriormente, se añadió 1 cm^3 del medio de cultivo a cada pocillo. Los controles de la adherencia y proliferación se obtuvieron por cultivo de células en la superficie de CTRL (placa).

La adhesión celular se evaluó por el ensayo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) después de 20 h de cultivo y los resultados fueron normalizados por unidad de superficie (cm^2). La proliferación celular fue evaluada a los 7 días de cultivo. Cada experimento fue repetido 5 veces de manera independiente para posteriormente ser promediado y representado gráficamente. Se realizó el análisis estadístico usando el test *t-Student* con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0,05$).

El ensayo del MTT se utilizó para la determinación de la viabilidad celular. Las células viables contienen deshidrogenasas, que convierten el reactivo MTT en sal de formazán.

Esta transformación del MTT a formazán, se evidencia por la aparición de microcristales en el interior de las células. La formación de formazán es cuantificable cuando se disuelven los cristales y se realiza la lectura de su absorbancia; así, el número de células o concentración celular es proporcional a la absorbancia medida a 540 nm, por lo que puede obtenerse una curva patrón para el recuento celular.

La evaluación de la adhesión y la proliferación celular en las matrices de microfibras se realizó determinando la viabilidad celular y usando como reactivo el MTT. Para ello, finalizado el tiempo de cultivo, se añadieron en el medio 50 μL de reactivo MTT preparado con una concentración de 3 mg/cm^3 . Las muestras fueron mantenidas durante 4 h en las condiciones de cultivo, aspirándose y desechándose posteriormente el medio. Las probetas de microfibras fueron colocadas en pocillos de una placa limpia (*Figura 6.16.*).



Figura 6.16.- Viabilidad celular en un experimento de proliferación celular. Se observan los cristales de formazán que son formados en las células viables

Finalmente, se añadió 1 cm^3 de dimetilsulfóxido (DMSO) tanto a pocillos vacíos como a los que contenían las probetas de microfibras. De esta forma, se pudo cuantificar las células viables sobre las microfibras y sobre la placa (control). Las placas fueron mantenidas en agitación orbital durante 15 min para disolver los cristales de formazán en el DMSO. Luego, el DMSO se leyó a una absorbancia de 540 nm con un lector *ELISA* (*Figura 6.17.*) y se efectuó el recuento celular.

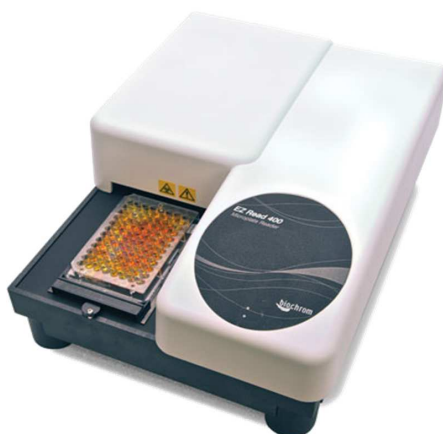


Figura 6.17.- Lector automático de microplacas EZ-READ 400 ELISA

7. Resultados y discusión

7.1. Optimización de las condiciones operacionales de Electrospinning

Para la obtención de fibras tanto si hablamos de PLA como de PEG, fue necesaria la realización de varios ensayos donde se optimizaron los parámetros operacionales del *electrospinning* con la finalidad de obtener fibras regulares, sin defectos y con diámetros homogéneos. Así, como ejemplo de los parámetros que pueden influir en la preparación de las electrofibras se puede indicar el disolvente y la concentración de polímero, la distancia entre el extremo de la aguja y el colector (rodillo) donde se recogen las fibras, etc. En este PFC la optimización para preparar las matrices híbridas de fibras de PLA y PEG mediante el electrospinning dual se desarrolló en tres etapas progresivas, y serán referidas como Diseño 1, 2 y 3.

7.2. Diseño-1: Matrices híbridas de fibras de PLA 7%-wt y fibras de PEG 35%-wt en DCM:DMF (70:30, w:w). Distancia aguja-colector 12 cm.

El punto de partida para realizar la parte experimental de este PFC fueron los resultados previos obtenidos en la preparación de fibras bicomponentes a partir de una mezcla de PLA y PEG.^[61] Así, se prepararon las disoluciones de PLA al 7 y 5 %-wt (para obtener microfibras y nanofibras, respectivamente), y PEG al 35 %-wt (para obtener nanofibras) usando como disolvente la mezcla DCM:DMF (70:30, w:w). Para realizar el electrospinning dual, una jeringa fue cargada con la disolución de PLA y otra con PEG. Las jeringas fueron dispuestas en la misma trayectoria horizontal y en direcciones opuestas con la finalidad de recoger los jets en el mismo colector rotatorio. Esta disposición de las jeringas es importante porque de esta forma se evita la repulsión electrostática entre ambos jets.^[62] El colector rotatorio es un elemento importante porque cumple la función de mezclar continuamente las fibras generadas durante el proceso para obtener una matriz híbrida formada por fibras independientes de PLA y PEG entremezcladas en la matriz. El flujo y voltaje aplicados a cada una de las jeringas fueron controlados de manera independiente (*Figura 7.1*).

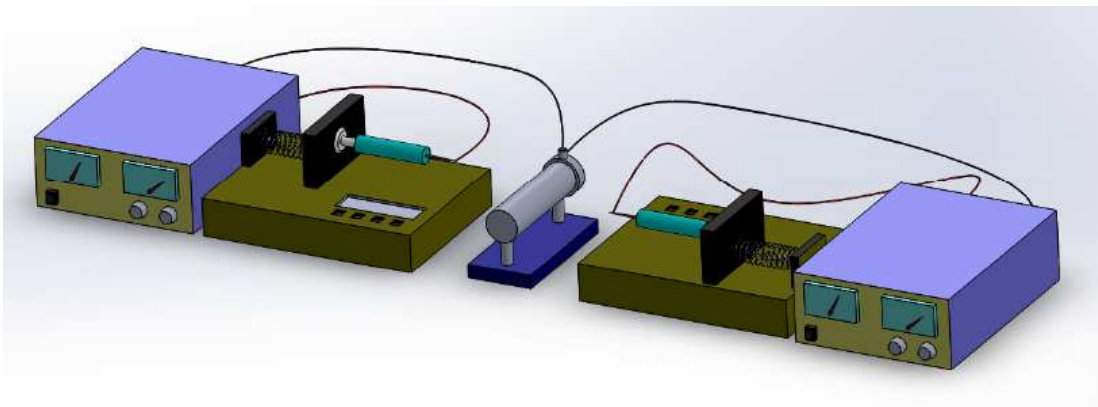


Figura 7.1.- Disposición de los equipos de electrospinning dual para la preparación de matrices híbridas por distribución random de fibras de PLA y fibras de PEG.

Los parámetros optimizados para el *electrospinning* dual son mostrados en la *Tabla 7.1*. Los parámetros de flujo y distancia entre la punta de la aguja (18G, ϕ interno 0.8 mm aprox.) y el cilindro del colector fueron iguales para todas las disoluciones. Pero, los voltajes aplicados fueron diferentes, lo cual hace evidente que se requieran dos equipos de *electrospinning* que puedan ser operados de forma independiente.

Tabla 7.1.- Solventes y parámetros usados en el Diseño 1

%(w/w)	Solvente	Flujo (ml/h)	Distancia (cm)	Voltaje (kV)
PLA 7%	DCM:DMF (70:30)	0.8	12	16
PLA 5%	DCM:DMF (70:30)	0.8	12	16
PEG 35%	DCM:DMF (70:30)	0.8	12	20

7.2.1. Morfología de las fibras

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) permiten describir la morfología de las fibras. En la *Figura 7.1* se muestran las fibras de PLA con típicas rugosidades a manera de hendiduras que han sido descritas previamente y de aspecto rígido (*Figura 7.2a*).^{[61][63]} Las fibras de PEG por el contrario son lisas y tortuosas, y claramente son heterogéneas en su diámetros (*Figura 7.2b*). Finalmente, en la matriz híbrida se observan fibras rugosas y lisas, con lo cual su origen es fácilmente deducible (*Figura 7.2c*).

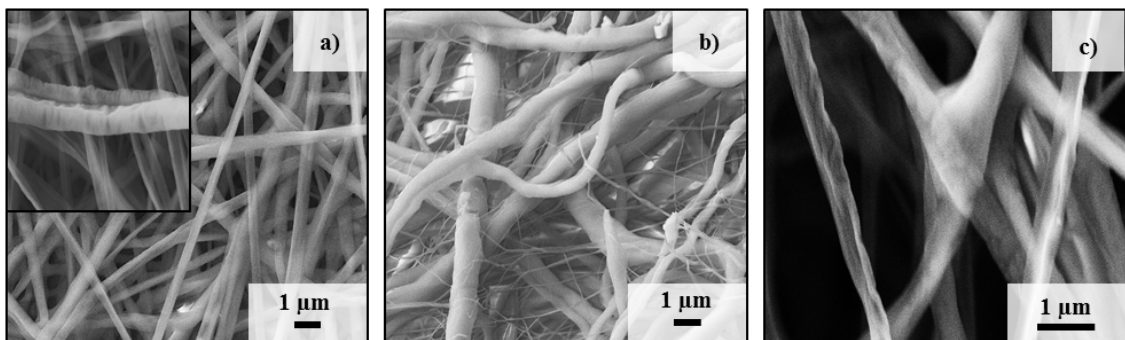


Figura 7.2.- Morfología de las fibras de PLA/PEG w/w; a) fibras rugosas 7/0, b) fibras lisas 0/35, c) fibras rugosas y lisas 7/35

7.2.2. Diámetros de las fibras

Las imágenes obtenidas por la técnica SEM también fueron utilizadas con fines cuantitativos para realizar el análisis de las distribuciones de diámetros de las fibras. El diámetro medio de las fibras es una medida que informa sobre la homogeneidad de las fibras en la matriz. Para ello, se midieron los diámetros de un número significativo de fibras para cada mezcla. Una buena estadística de la distribución de diámetros se consigue realizando entre 70-100 medidas, evitando medir repetidamente la misma fibra, y midiendo los diámetros de fibras de diferentes zonas de la matriz.

En este estudio las medidas fueron realizadas utilizando el programa *Smart Tiff* de libre distribución (*Carl Zeiss*). Los valores medidos fueron tratados mediante el programa *Origin* (*Origin Pro v8. Microcal*) que permite analizar la distribución de diámetros y realizar las representaciones gráficas de estas distribuciones.

En la *Figura 7.3* se muestran microfotografías (imágenes SEM) de matrices obtenidas con electrofibras de PLA al 7 y 5 %-wt (*Figura 7.2a* y *b*, respectivamente), y la imagen SEM para la matriz de fibras de PEG al 35 %-wt (*Figura 7.2c*). El respectivo análisis de la distribución de diámetros para cada una de estas matrices indica que sus fibras

constituyentes se distribuyen de forma unimodal. Las fibras de PLA 7 %-wt y PEG 35 %-wt tienen un rango de distribución similar (250-650 nm) con promedios de 405 ± 10 nm y 440 ± 7 nm, respectivamente (Tabla 7.2). Por otro lado, en la matriz de fibras de PLA al 5 %-wt se observaron fibras con diámetros en un rango de 150-450 nm, y con un diámetro promedio de 293 ± 2 nm. La diferencia entre los diámetros de las fibras de PLA es explicado por la diferencia entre las concentraciones de las disoluciones de PLA que originan las fibras.

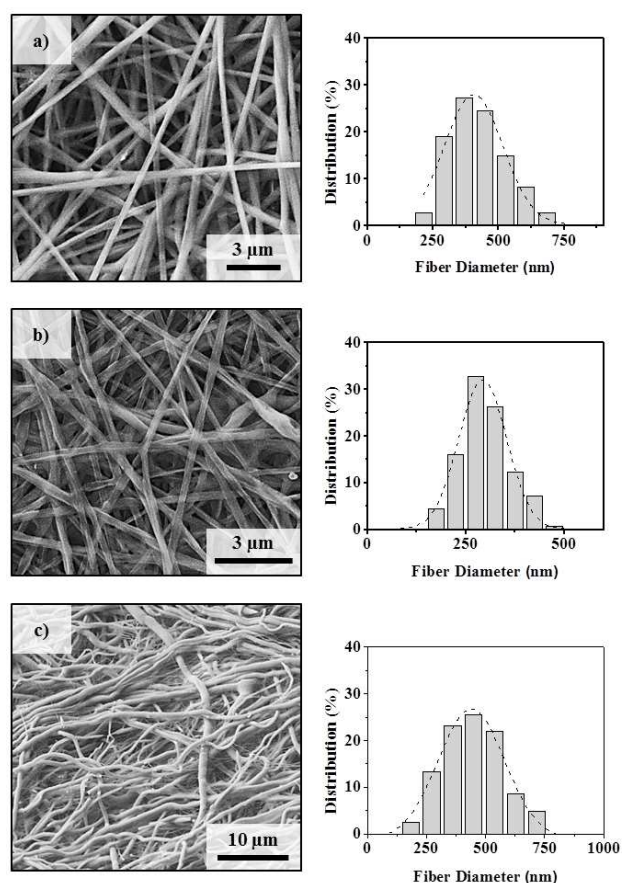


Figura 7.3.- Distribución de tamaños de diámetros de las electrofibras en las matrices preparadas con homopolímeros. a) PLA 7%-wt, b) PLA 5%-wt, c) PEG 35%-wt.

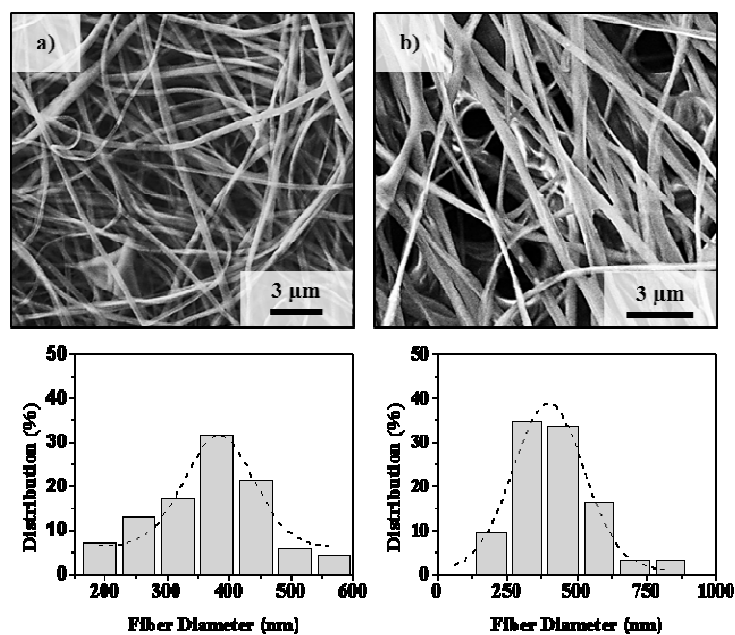


Figura 7.4.- Distribución de tamaños de las mezclas PLA/PEG w/w; a) 7/35; b) 5/35.

En la *Figura 7.4* se muestran los resultados sobre el diámetro de las fibras en las matrices híbridas de fibras de PLA y PEG. El aspecto general de las matrices es bastante homogéneo, pero las matrices han perdido el aspecto de estar conformadas por fibras rígidas (p.e. ver las matrices de PLA, *Figura 7.2a* y *b*), en estas matrices híbridas (imágenes de la *Figura 7.3*) algunas fibras muestran curvaturas de manera similar a las fibras de PEG.

En ambas matrices de PLA/PEG 7/35 y 5/35 se han determinado diámetros promedios para las fibras muy similares, con valores de 383 ± 9 nm y 398 ± 10 nm, respectivamente (*Tabla 7.2*). Así, en el caso de las fibras PLA/PEG 7/35 el valor del diámetro de fibra se ajusta al valor de las fibras en las matrices PLA 7 %-wt y PEG 35 %-wt. Pero la matriz PLA/PEG 5/35 muestra un valor promedio mayor que las matriz de PLA 5 %-wt, esto claramente esta indicando que la población de fibras de PEG han contribuido en la estadística para establecer el diámetro promedio de las fibras en la matriz PLA/PEG 5/35.

Tabla 7.2. Diámetro promedio de las fibras en las matrices de homopolímeros y en las matrices híbridas preparadas con el Diseño-1.

	Concentración (%w/w)	$\varnothing_{\text{inicial}}$ (nm)
PLA:PEG	7:0	$405,49 \pm 9,97$
	5:0	$293,16 \pm 2,40$
	0:35	$440,45 \pm 7,08$
	7:35	$383,76 \pm 9,20$
	5:35	$398,04 \pm 10,18$

7.2.3. Composición de las matrices

La composición de las matrices fue determinada de forma cuantitativa a partir de los espectros de RMN de cada muestra. Los espectros RMN de los homopolímeros fueron usados para asignar la posición de las señales del PLA y PEG. En la *Tabla 7.3* se muestra que las matrices híbridas estaban mayoritariamente compuestas por PEG con porcentajes molares de 88 % y 91 %, y se corresponden cercanamente con sus valores teóricos de 86 % y 89 % para las matrices PLA/PEG 7/35 y 5/35, respectivamente. En base a estos resultados, se podría indicar que las fibras de PLA y PEG en las matrices híbridas se encontraban homogéneamente bien mezcladas.

Tabla 7.3. Composición molar (%) de las matrices híbridas PLA/PEG preparadas con el Diseño-1

	Concentración (%-w/w)	PLA:PEG (%-M) _{teo}	PLA (%-M) _{exp}	PEG (%-M) _{exp}
	7:0	100:0	100	0
	5:0	100:0	100	0
PLA:PEG	0:35	0:100	0	100
	7:35	14,29:85,71	11,95	88,05
	5:35	10,64:89,36	8,64	91,36

7.2.4. Estabilidad de las fibras en agua

Dado que el PLA y el PEG son polímeros con solubilidades en agua muy diferentes. En un medio acuoso, PEG es altamente soluble (hidrofílico), mientras que el PLA es insoluble (hidrofobo). Esta diferencia de hidrofiliidad del PLA y del PEG fue el motivo para seleccionar ambos polímeros para conformar las matrices híbridas, y usar el PEG como polímero de sacrificio en las matrices sometidas a medios acuosos.

En este contexto, las matrices híbridas PLA/PEG fueron incubadas en agua con la finalidad de disolver las fibras de PEG, y obtener una matriz de fibras PLA con mayor porosidad. Para ello se procedió de acuerdo a la siguiente metodología. A partir de una matriz híbrida PLA/PEG se prepararon por recorte 5 muestras cuadradas de 1 cm² aproximadamente, procurando que cada muestra tenga una masa de 20 mg aproximadamente. Cada muestra fue pesada para registrar su masa inicial (*m*), y luego colocadas en un tubo conteniendo 50

mL de agua milliQ. Los tubos fueron incubados a 37 °C con agitación orbital de 60-100 rpm durante 24 horas. Luego, las matrices fueron retiradas del tubo, y el exceso de líquido secado con papel absorbente, y seguidamente fueron pesadas para registrar el peso húmedo (m_h). A continuación, fueron secadas en vacío a temperatura ambiente hasta obtener un peso constante (rutinariamente durante 16-24 horas aprox.), este peso fue registrado como la masa seca (m_s).

La pérdida de peso de las matrices fue calculada mediante la siguiente expresión:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{m_i - m_s}{m_i} \cdot 100 \quad \text{Ec. 3}$$

La *Tabla 7.4* muestra la pérdida de peso en las matrices híbridas PLA/PEG. Los resultados obtenidos para la matriz de fibras de PEG (PLA/PEG 0/35) demuestran que nuestra metodología fue adecuada para disolver las fibras de PEG. Así, en las matrices híbridas se observa una gran pérdida de peso que se corresponde con los valores esperados de contenido del PEG, y se puede deducir que el componente de PEG de las matrices híbridas fue removido de estas matrices por su disolución en agua. Los pequeños incrementos en los porcentajes de pérdida de peso también estarían indicando que parte de las fibras de PLA (insolubles en agua) pueden ser pérdidas como consecuencia de la inestabilidad de las matrices híbridas por la disolución del PEG.

Tabla 7.4. Pérdida de peso en las matrices híbridas incubadas en agua. Los valores experimentales corresponden al promedio \pm SD para $n=5$

PLA/PEG (%w/w)	Fracción PLA (%) _{teo}	Fracción PEG (%) _{teo}	Pérdida de peso (%) _{exp}
7:0	100	0	1,24 \pm 1,54
5:0	100	0	7,66 \pm 10,49
0:35	0	100	99,97 \pm 0,07
7:35	16,66	83,33	85,68 \pm 3,40
5:35	12,50	87,50	95,65 \pm 4,59

7.2.5. Porosidad de las matrices híbridas

El tamaño y la cantidad de poros en una matriz es un factor importante para su aplicación como *scaffold* para la regeneración de tejidos y la liberación de fármacos. En este trabajo el término porosidad va a ser referido al volumen muerto (espacio vacío) de la matriz. Así, la porosidad debe incrementarse en la medida que las fibras de PEG sean disueltas en las matrices híbridas PLA/PEG.

A partir del estudio de estabilidad de las matrices híbridas en agua, se puede obtener la porosidad aproximada de las matrices mediante la siguiente expresión.

$$P = \frac{V_{disolvente}}{V_{matriz_húmeda}} = \frac{\frac{m_h - m_s}{\rho_{disolvente}}}{\frac{m_h - m_s}{\rho_{disolvente}} + \frac{m_s PLA}{\rho_{PLA}} + \frac{m_s PEG}{\rho_{PEG}}} \quad \text{Ec. 4}$$

Siendo: P = porosidad; m_h = peso húmedo de la matriz; m_s = peso seco de la matriz; $\rho_{disolvente}$ = densidad del agua (1 g/mL); ρ_{PLA} = densidad del PLA (1,24 g/mL); ρ_{PEG} = densidad del PEG (1,07 g/mL). Las m_s del PLA y del PEG fueron calculadas a partir del contenido de polímero determinado por RMN.

En la *Tabla 7.5* se muestran los resultados de las porosidades para las matrices estudiadas. La matriz de PLA 7 %-wt muestra una porosidad (40 %) significativamente más baja que la porosidad (77 %) de las matrices de PLA 5 %-wt. Esta diferencia en las porosidades estaría relacionada al diámetro de las fibras en las matrices. Para un mismo volumen de matriz, en el caso de PLA 5 %-wt, el tamaño de poro es menor pero la cantidad de poros es muy alta; mientras que la matriz PLA 7 %-wt tendría poros de mayor tamaño pero la cantidad de poros sería menor. Por otro lado, la matriz de PEG 35 %-wt muestra una porosidad del 100 % lo cual significa que la matriz se ha disuelto en su totalidad, como se ha evidencia por la pérdida de masa de la matriz (*Tabla 7.4*).

Tabla 7.5. Porosidad (%) de las matrices híbridas PLA/PEG preparadas en el Diseño-1. Los valores corresponden al promedio \pm SD, n=5.

	Concentración (%w/w)	Porosidad (%)
PLA:PEG	7:0	39,66 \pm 7,58
	5:0	76,91 \pm 2,31
	0:35	99,90 \pm 0,22
	7:35	92,26 \pm 1,39
	5:35	93,48 \pm 3,31

Finalmente, las matrices híbridas de PLA/PEG 7/35 y 5/35 también mostraron altos valores de porosidad, 92 % y 93 % respectivamente. Estos valores estarían indicando la presencia de unas pocas fibras de PLA en las matrices, las cuales no son suficientes para mantener la estructura de la matriz.

7.2.6. Conclusión

El análisis de los resultados obtenidos bajo el Diseño-1 para matrices híbridas PLA/PEG permitió establecer diversas consideraciones que finalizaron en la conclusión que este diseño no es adecuado para preparar estas matrices.

- 1) Las matrices híbridas fueron homogéneas en su contenido de PLA y PEG como se demuestra por RMN, y se ha evidenciado morfológicamente. Estos resultados indican que las fibras de PLA y las PEG se encuentran bien mezcladas. Así, cualquier sector de la matriz tiene las mismas propiedades.
- 2) El contenido de PEG es excesivamente elevado, y perjudicial para la estructura de la matriz PLA/PEG. La matriz pierde estabilidad porque el PEG es removido fácilmente en medio acuoso.
- 3) Las porosidades de las matrices híbridas de PLA/PEG se incrementan significativamente respecto a las matrices de PLA. Sin embargo, las escasas fibras de PLA que conforman las matrices híbridas luego de la remoción de las fibras PEG resultan ser insuficientes para estructurar 3D un *scaffold*.
- 4) Finalmente, las consideraciones antes mencionadas sostienen que el Diseño-1 es inviable para preparar matrices híbridas PLA/PEG siendo las fibras de PEG el material de sacrificio en la matriz.

7.3. **Diseño-2: Matrices híbridas de fibras de PLA 10%-wt en CHCl_3 : $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ (2:1, v:v) y fibras de PEG 35%-wt en DCM:DMF (70:30, w:w) Distancia aguja-colector 12 cm.**

De acuerdo a los resultados y conclusiones derivadas del Diseño-1, donde la cantidad de PLA en la matriz fue muy pequeña con respecto a la cantidad de PEG en la misma, se propuso estudiar otro diseño que permita acumular mayor cantidad de fibras de PLA para conseguir una matriz estable luego de la remoción de las fibras de PEG.

La disolución del polímero (p.e. disolvente y concentración de polímero) es una variable que condiciona los parámetros operacionales del *electrospinning*. Una manera de acumular mayor cantidad de polímero en la matriz resulta de realizar el *electrospinning* a mayor flujo.

A partir de estudios previos se conoce que la disolución de PLA preparada en una mezcla de solventes como el cloroformo: acetona (2v:1v) permite operar el *electrospinning* en un amplio rango de flujo para conseguir electrofibras^[11]. El manejo de la concentración del PLA en esta mezcla de disolventes, p.e. PLA al 10 %-w/v o PLA al 5 %-w/v permite obtener microfibras o nanofibras, respectivamente.

Las disoluciones, solventes y los demás parámetros operacionales del *electrospinning* dual del Diseño-2 se muestra en la *Tabla 7.6*. Los equipos de *electrospinning* siguen la disposición mostrada en la *Figura 7.1*. La disolución de PEG 35 %-wt preparada en DCM:DMF (70:30, w:w) fue *electrospineada* a flujo de 0.8 mL/h en todos los casos. Se trabajó con dos disoluciones de PLA, una al 10 %-w/v y otra de 5 %-w/v, ambas preparadas en cloroformo:acetona (2v:1v). El *electrospinning* del PLA se realizó a diferentes flujos entre 0.8 a 10 mL/h, con lo cual se podría depositar diferentes cantidades de PLA en las matrices híbridas.

Tabla 7.6. Solventes y parámetros operacionales del electrospinning dual usados en el Diseño-2.

Disolución	Solvente	Flujo (ml/h)	Distancia (cm)	Voltaje (KV)
PLA 10 % (w/v)	Cloroformo:Acetona (2:1, v:v)	0,8	12	15
		2		
		4		
		6		
PLA 5 % (w/v)		8	12	30
		10		
		0,8		
PEG 35 % (w/w)	DCM:DMF (70:30, w:w)	0,8	12	20

7.3.1. Análisis mediante microscopía óptica de las matrices híbridas

La microscopía óptica es una herramienta muy útil para el control de las fibras obtenidas por *electrospinning*. La observación in-situ por microscopía óptica permite tomar rápidamente decisiones para modificar las condiciones de *electrospinning* con la finalidad de optimizar el proceso.

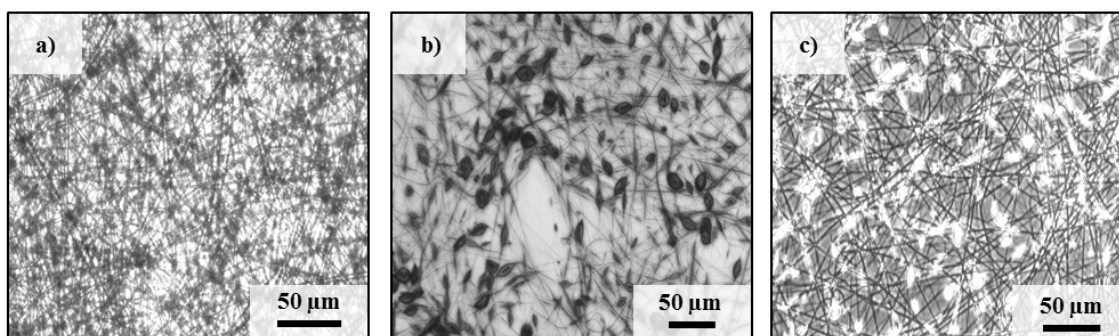


Figura 7.5. Imágenes de microscopía óptica de las matrices híbridas PLA/PEG obtenidas por electrospinning dual. a) matriz con microfibras de PLA 10%-w/w, 15kV, b) matriz con nanofibras de PLA 5%, 20 kV, c) matriz con nanofibras de PLA 5%-w/v, 30 kV.

En la *Figura 7.5*, se muestran tres imágenes obtenidas por microscopía óptica donde se aprecia el efecto de la variación de la concentración de la disolución de PLA y del voltaje aplicado en la producción de fibras. En el primer caso, se muestran matrices híbridas de PLA/PEG (PLA 10 %-w/v y 15KV), se pueden apreciar fibras de PLA y de PEG sin defectos, la calidad de las fibras de PLA no fue afectada por el flujo de la disolución en el rango de 0.8-10 mL/h. Mientras que en los siguientes casos, las matrices híbridas de PLA/PEG (PLA 5 %-w/v, 20KV y 30 KV respectivamente), mostraron las nanofibras de PLA con defectos tipo *beads* (gotas de polímeros sin estirar para formar fibras), y estos defectos fueron observados en todos los flujos ensayados (0.8-10 mL/h). En todos los casos las disoluciones fueron aplicadas con una aguja 18G (ϕ interno 0.8 mm aprox.).

Después de modificar los parámetros operacionales de voltaje y distancia durante el *electrospinning* de la disolución de PLA 5 %-w/v, no se consiguieron fibras sin defectos tipo *beads* y por este motivo, solo se utilizó la disolución de PLA 10 %-w/v para realizar las matrices híbridas PLA/PEG.

7.3.2. Estabilidad de las matrices híbridas en agua

Se estudió la estabilidad de las matrices híbridas PLA/PEG en medio acuoso para determinar la remoción del PEG. Así, la pérdida de peso de la matriz híbrida debe corresponder al peso de PEG en la matriz.

En la tabla 7.7 se muestra el porcentaje teórico en peso para el PLA y el PEG cuando constituyen las matrices híbridas. Se puede observar que conforme se incrementa el flujo de la disolución de PLA 10 %-w/v y se mantiene constante el flujo del PEG 35 %-wt a 0.8 mL/h, la masa de fibras de PLA se incrementa en la matriz, y la masa de PEG disminuye. Las matrices híbridas son denotadas como PLA/PEG-x, donde x corresponde al flujo de inyección de la disolución de PLA.

Los resultados de la pérdida de peso de las matrices luego de la disolución de las fibras de PEG muestran valores que no se corresponden con el contenido de PEG en las matrices híbridas. Además, destaca la gran variabilidad de estos valores. Considerando que las muestras de las matrices híbridas corresponden a puntos de la línea diagonal del paño que se obtiene durante el *electrospinning* dual, se puede deducir que las matrices obtenidas no fueron homogéneas en cuanto a la distribución de las fibras.

Tabla 7.7. Pérdida de peso de las matrices híbridas luego de disolver las fibras de PEG en medio acuoso. Los valores corresponden al promedio \pm SD (n=5).

PLA/PEG-x ^a	PLA, X-wt (%) ^b	PEG, X-wt (%) ^b	Pérdida de peso (%)
0,8	13,55	86,45	34,35 \pm 8,84
2	28,16	71,84	58,22 \pm 21,52
4	43,94	56,06	53,43 \pm 20,78
6	54,04	45,96	42,29 \pm 29,52
8	61,06	38,94	85,07 \pm 5,48
10	66,21	33,79	37,49 \pm 4,75

^a x corresponde al flujo de inyección de la disolución de PLA.

^b Fracción en peso calculada a partir de la disolución de PLA 10%-w/v inyectada en diferentes flujos, y PEG 35%-wt inyectada a 0.8 mL/h

7.3.3. Composición de la matriz (RMN)

Para confirmar la distribución heterogénea de las fibras de PLA y PEG en las matrices híbridas PLA/PEG preparadas con el Diseño-2. Se realizaron los análisis de RMN de algunas matrices. En la Tabla 7.8 se muestran los resultados de la composición de PLA y PEG en las matrices híbridas PLA/PEG-2 y PLA/PEG-4.

Tabla 7.8. Composición de PLA y PEG determinado por RMN en las matrices híbridas PLA/PEG preparadas por el Diseño-2. Los valores experimentales corresponden al promedio \pm SD (n=5)

x	Teórico		Experimental		SD
	% molar PLA	% molar PEG	% molar PLA	% molar PEG	
0.8	17,2	82,8			
2	34,2	65,8	31,2	68,8	14,2
4	50,9	49,1	23,6	76,4	10,2
6	60,9	39,1			
8	67,5	32,5			
10	72,2	27,8			

Los resultados por RMN confirman que las matrices híbridas no fueron homogéneas. En el caso de matriz PLA/PEG-4 se observa una gran diferencia entre la composición molar teórica y la calculada por RMN o experimental. La matriz PLA/PEG-2 muestra experimentalmente valores similares a los teóricos. Sin embargo, en ambos casos se observa una gran desviación en los valores experimentales. Por este motivo, no se realizaron los RMN para el resto de muestras.

7.3.4. Conclusión

Si analizamos los resultados obtenidos anteriormente, tanto para la estabilidad de las matrices híbridas en agua, como para los resultados de RMN, no podemos considerar que las matrices híbridas preparadas con el Diseño-2 sean homogéneas.

La explicación para la distribución heterogénea de las fibras de PLA y PEG en la matriz híbrida fue encontrada en la distancia entre la aguja y el colector. Con una mayor distancia entre estos dos elementos se consigue una mayor dispersión de las fibras, como consecuencia el diámetro del *mat* es mayor. Además, la intensidad del campo eléctrico disminuye y esto produce una movilidad del cono de Taylor, con lo cual la dirección del jet es cambiante. Estos fenómenos del *electrospinning* no son perceptibles cuando se preparan *mats* a partir de una única disolución de polímero(s).

En este sentido, como solución a este problema se plantea focalizar los conos de Taylor de las disoluciones durante el *electrospinning* dual. Esto se debe conseguir reduciendo la distancia aguja-colector. Así, este cambio operacional del *electrospinning* dual fue introducido en el Diseño-3 que se describe a continuación.

7.4. Diseño-3: Matrices híbridas de fibras de PLA 10%-wt en $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ (2:1, v:v) y fibras de PEG 35%-wt en $\text{DCM}:\text{DMF}$ (70:30, w:w). Distancia aguja-colector 6 cm

7.4.1. Análisis mediante microscopía óptica

En este Diseño-3 se planteó como objetivo reducir la distancia aguja-colector con la finalidad de reducir y superponer las áreas de *electrospinning* sobre el colector. En la *Figura 7.6* se muestra el efecto que tiene la disminución de la distancia aguja-colector sobre la morfología de las fibras de PLA obtenidas por *electrospinning* de una disolución de PLA 10 %-wt preparada en cloroformo:acetona (2:1, v:v). Las imágenes claramente demuestran que la morfología de las fibras de PLA se mantiene cuando la distancia aguja-colector se mantiene en el rango de 12 cm a 6 cm. A distancia menor a 6 cm, p.e. a 3 cm de distancia aguja-colector, las fibras muestran defectos de formación, las fibras aparecen con un aspecto húmedo, lo cual debe corresponder a un bajo nivel de evaporación del disolvente de la disolución de PLA.

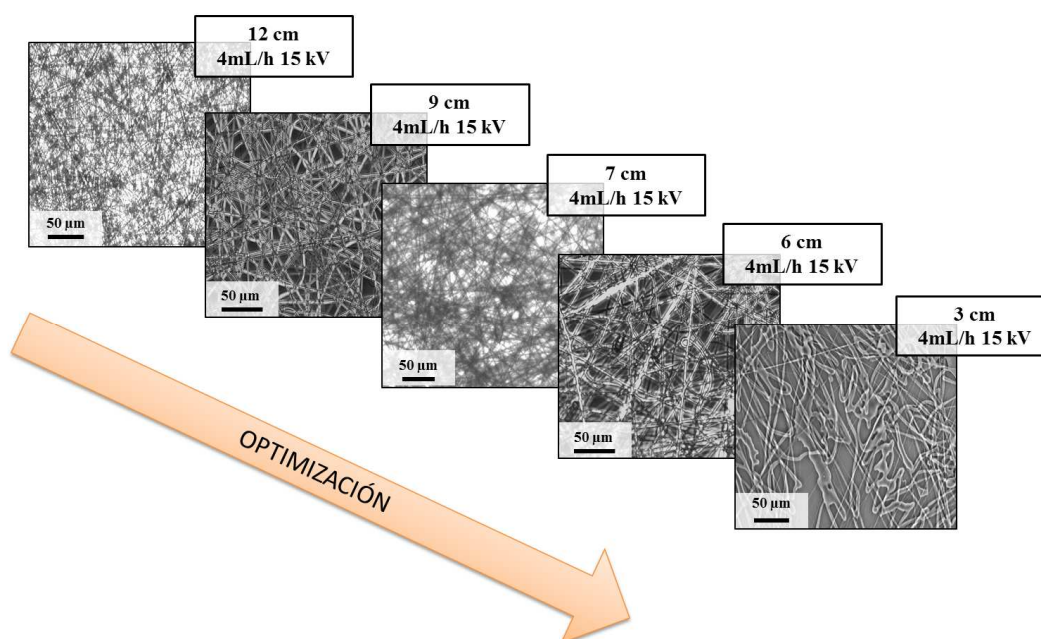


Figura 7.6. Morfología de las fibras de PLA colectadas a diferentes distancias entre la aguja y el colector

La conclusión que se obtiene de estos resultados fue que el *electrospinning* dual para obtener matrices híbridas de PLA/PEG debía ser realizado a una distancia aguja-colector de 6 cm con la finalidad de superponer homogéneamente las áreas de distribución de las fibras de cada polímero.

7.4.2. Morfología de las fibras en las matrices híbridas

En la *Figura 7.7* se muestran las imágenes obtenidas por SEM de las matrices híbridas. Claramente se observa que manteniendo constante el flujo del PEG (0.8 mL/h) y variando el flujo de PLA (0.8-10 mL/h), se pueden obtener matrices híbridas con diferentes ratios PLA/PEG. Las matrices híbridas PLA/PEG 0.8 (PLA y PEG electrohilados con flujo 0.8 mL/h) muestran una gran acumulación de fibras de PEG (*Fig 7.7a*). En las matrices híbridas PLA/PEG 2 y 4 (electrohilado de PEG a 0.8 mL/h, y PLA a 2 y 4 mL/h, respectivamente) se observa la ocurrencia de fibras de PLA características por la rugosidad de su superficie y fibras de PEG de apariencia lisa, además existe una población de fibras de PEG de diámetros muy pequeños. Finalmente, en las matrices híbridas PLA/PEG 8 (electrohilado de PEG a 0.8 mL/h, y PLA a 8 mL/h) se observa el predominio de fibras de PLA con respecto a las de PEG.

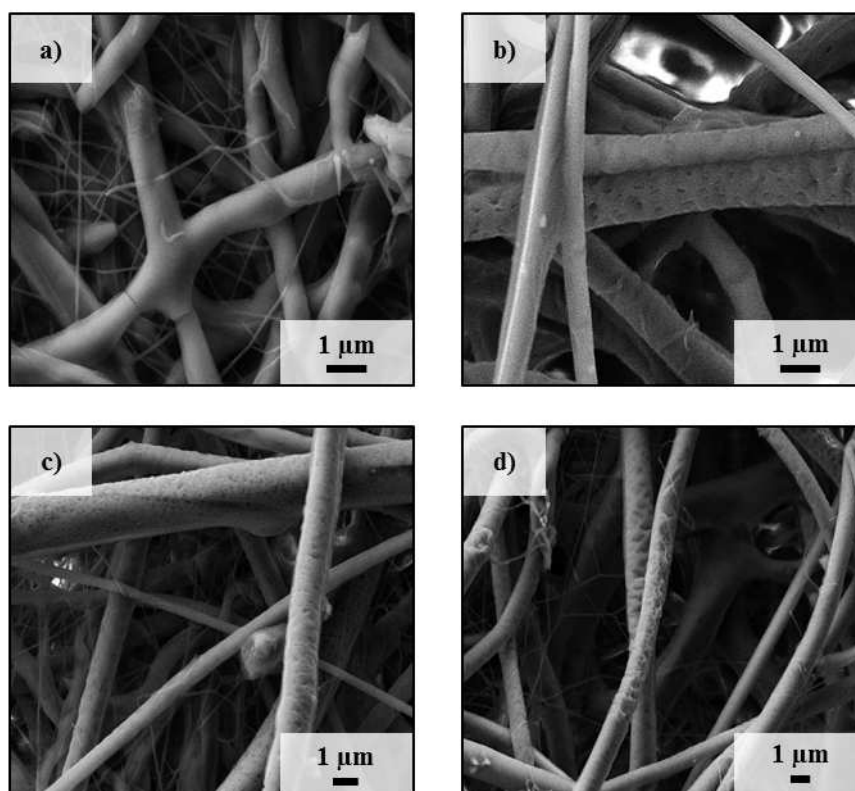


Figura 7.7 Morfología de las fibras de PLA en las matrices híbridas de PLA/PEG. Las matrices fueron preparadas por electrospinning de PLA 10 %-w/v en $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ (2v: 1v), PEG 35 %-wt en DCM:DMF (70:30, w:w), a 6 cm de distancia entre la aguja-colector giratorio. Las imágenes corresponden a matrices híbridas obtenidas con diferentes flujos de inyección de las disoluciones de PLA y PEG. a) PLA/PEG 0.8, b) PLA/PEG 2, c) PLA/PEG 4, d) PLA/PEG 8. El PEG fue electrohilado a flujo 0.8mL/h en todos los casos, y el PLA fue electrohilado a flujo de 0.8, 2, 4 y 8 mL/h, respectivamente.

7.4.3. Diámetros de las fibras en las matrices híbridas

La medida del diámetro de las fibras de las matrices híbridas PLA/PEG fue realizada en imágenes SEM obtenidas a bajos aumentos. La Figura 7.8 muestra estas imágenes para las matrices híbridas PLA/PEG. Claramente, se puede observar como las matrices híbridas van aumentando su población de fibras de PLA con respecto al PEG, conforme se incrementa el flujo de la disolución de PLA de 0,8 mL/h a 10 mL/h.

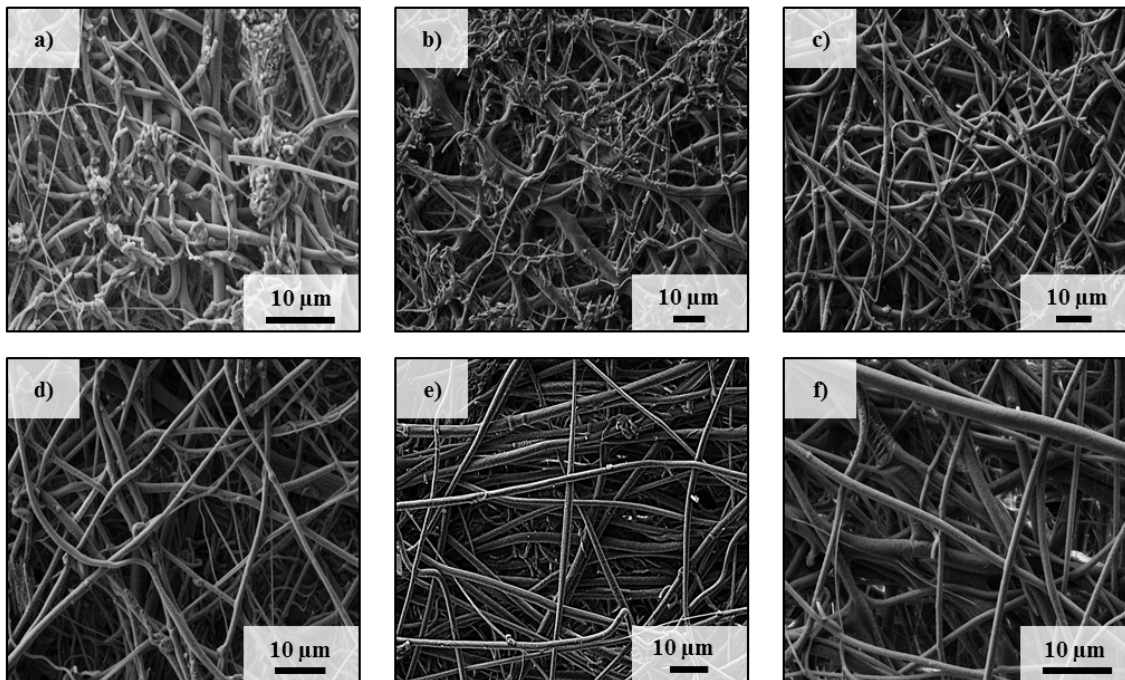


Figura 7.8 Morfología de las matrices de PLA/PEG. Las imágenes SEM fueron obtenidas a bajos aumentos para evaluar una amplia población de fibras en las matrices. Matrices híbridas: a) PLA/PEG 0.8, b) PLA/PEG 2, c) PLA/PEG 4, d) PLA/PEG 6, e) PLA/PEG 8, f) PLA/PEG 10.

La distribución del diámetro de fibras fue realizada sólo para las fibras de PLA, esto es posible dada las diferencias morfológicas entre las fibras de PLA y PEG (ver apartado 7.4.2). Las fibras de PEG no fueron tomadas en consideración por dos razones: 1) porque en todos los casos el *electrospinning* del PEG fue realizado en las mismas condiciones (distancia aguja colector 6 cm, flujo 0.8 mL/h, y 20 kV) con lo cual no se espera cambios en el diámetro de las fibras de PEG, y 2) porque finalmente las fibras de PEG son elementos temporales que serán removidos de la matriz híbrida por disolución en medio acuoso.

El diámetro medio de las fibras de PLA es una medida que informa sobre la homogeneidad de las fibras en el paño (*mat* o *electrospun*). Para ello, se midieron los diámetros de un número significativo de fibras en cada matriz híbrida. Una buena estadística de la distribución de diámetros se consigue realizando entre 50-100 medidas, evitando medir

repetidamente la misma fibra, y midiendo los diámetros de fibras de diferentes zonas del *mat*. En este estudio las medidas fueron realizadas utilizando el programa *Smart Tiff* de libre distribución (*Carl Zeiss*, Alemania). Los valores medidos fueron tratados mediante el programa *OriginPro v8* (*Origin Microcal*, USA) que permite analizar la distribución de diámetros y realizar las representaciones gráficas de estas distribuciones. En la *Figura 7.9* se muestran los gráficos de distribución de diámetros, donde claramente se puede observar la distribución unimodal en todos los casos, lo cual es indicativo que las fibras de PLA fueron electrohiladas bajo condiciones operacionales óptimas.

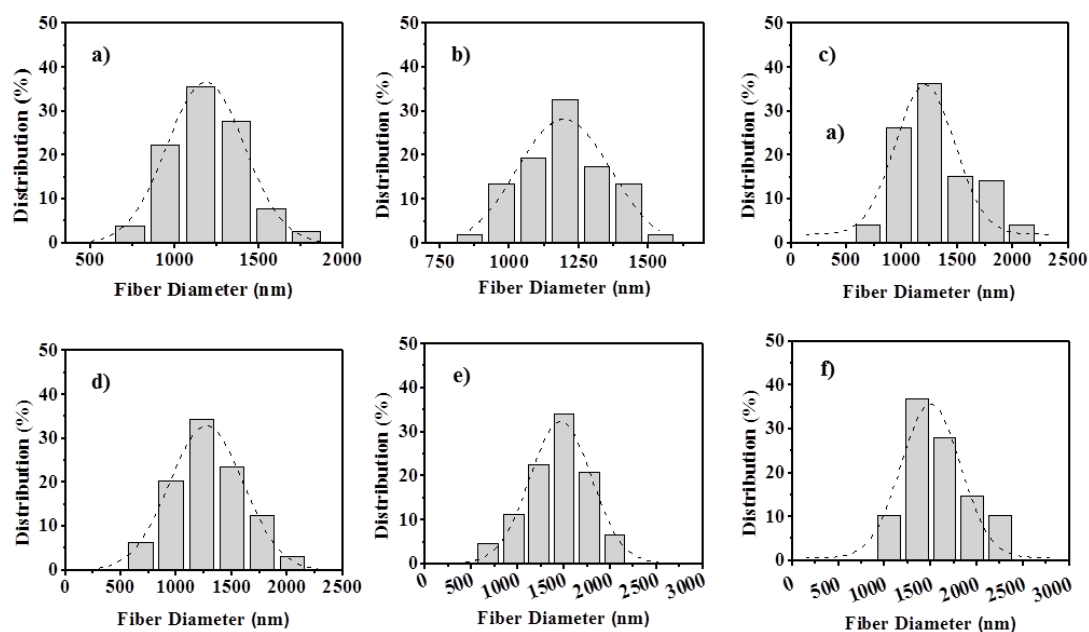


Figura 7.9.- Distribución de los diámetros de las fibras de PLA en las matrices híbridas PLA/PEG. Matrices híbridas: a) PLA/PEG 0.8, b) PLA/PEG 2, c) PLA/PEG 4, d) PLA/PEG 6, e) PLA/PEG 8, f) PLA/PEG 10.

Los valores promedios de las distribución de diámetros de las fibras de PLA son mostrados en la Tabla 7.9. Se puede observar que en todas las matrices híbridas las fibras de PLA se corresponden a microfibras (escala micrométrica). Además, se observa que el diámetro de las fibras aumenta conforme se incrementa el flujo de la disolución. Esto ocurre porque aumenta la masa de disolución en la punta de la aguja y por lo tanto las cargas, como el proceso se realiza siempre al mismo voltaje (15 kV), es decir la intensidad del campo eléctrico siempre es la misma. Lo cual significa que cuando aumenta el flujo habrá menor corriente por unidad de masa, lo cual resulta en la obtención de fibras de mayor diámetro.

Tabla 7.9.- Diámetro de las fibras de PLA en las matrices híbridas PLA/PEG. Los valores corresponden al promedio \pm SD calculado a partir del análisis de distribución de diámetros (ver Fig 7.8)

	Flujo PLA:PEG (mL/h)	$\varnothing_{\text{inicial}}$ (nm)
PLA (%w/v):PEG (%w/w) 10:35	0,8:0,8	1185,35 \pm 6,53
	2:0,8	1195,44 \pm 24,40
	4:0,8	1209,89 \pm 43,30
	6:0,8	1272,69 \pm 14,76
	8:0,8	1465,23 \pm 16,66
	10:0,8	1501,29 \pm 41,41

7.4.4. Análisis calorimétrico de las matrices híbridas

Las propiedades térmicas, tanto de las mezclas de PLA/PEG-x (donde x corresponde al flujo del PLA) como de los homopolímeros PLA y PEG, se estudiaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) siguiendo un protocolo previamente establecido que implica cuatro barridos. En el primer calentamiento, realizado a 20 °C/min, se obtiene información acerca de la fusión de la muestra obtenida en el proceso de electrohilado, es decir, se determina el grado de cristalinidad que puede alcanzar el polímero en el electrohilado. La fusión se manifiesta como un pico endotérmico con subida más o menos gradual y regular, según la naturaleza e historia térmica de la muestra, y una bajada brusca hasta recobrar la línea base.

La recuperación y mantenimiento de la línea base tras la fusión permite también deducir que el material es estable durante la fusión y a temperaturas algo superiores a ésta. Esta propiedad es importante, ya que indica que el material puede ser procesado fácilmente a partir del estado fundido. Si por el contrario, aparecen otros picos, es indicio de que el material analizado no es estable y que sufre un proceso de descomposición simultáneo o posterior a la fusión.

Inmediatamente después de la fusión se procede a un enfriamiento lento de la muestra (10 °C/min) para observar el proceso de cristalización desde el estado fundido (2º barrido). Este enfriamiento lento tiene por tanto como objetivo extraer conclusiones sobre la facilidad de cristalizar del material al analizar el pico exotérmico que puede aparecer, siendo el área del mismo indicativa del grado de cristalización que puede alcanzarse en el proceso. El parámetro es interesante cuando se compara con el valor inicial obtenido del material electrohilado.

Los barridos 2, 3 y 4 se realizan en un rango de temperaturas comprendido entre -90°C y algo por encima de la temperatura de fusión. Los mismos comparan el comportamiento térmico de muestras cristalizadas lentamente (barrido 3) o “quenheadas” (barrido 4) y pueden permitir determinar la temperatura de transición vítrea. Sin embargo, en las mezclas PLA/PEG-x analizados no se observa, a simple vista, un discontinuidad de la línea base, excepto en el caso del homopolímero PLA, alrededor del 65°C . Para determinar dicha temperatura se ha tenido que ampliar la zona para poder visualizarla.

En la *Figura 7.10* se muestran las curvas correspondientes a los primeros barridos del análisis calorimétrico de las seis muestras PLA/PEG-x preparadas mediante electrospinning.

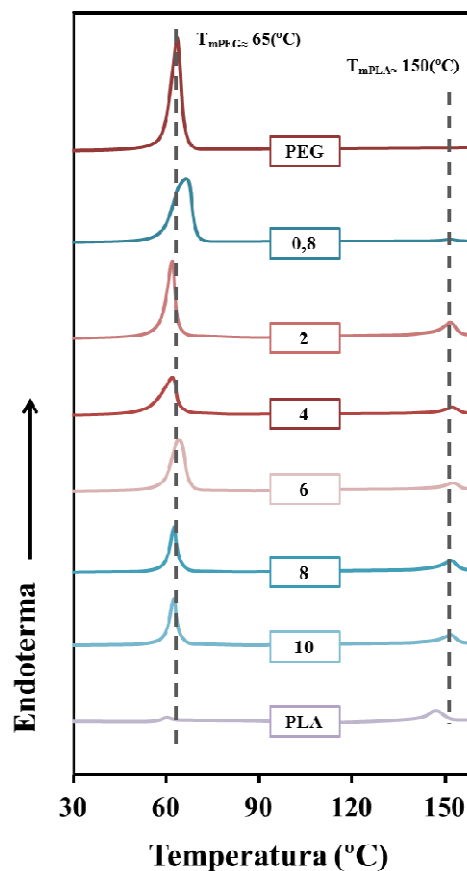


Figura 7.10.- Curvas de DSC para el primer barrido térmico de las matrices híbridas PLA/PEG-x

En la Figura 7.10, la curva inferior y superior corresponden a los dos homopolímeros puros que evidentemente muestran únicamente los picos endotérmicos característicos de la fusión de cada polímero de referencia (p.e. PEG a 65 °C y PLA a 150 °C). En las seis curvas restantes, correspondientes a las mezclas PLA/PEG-x (x: 0.8, 2, 4, 6, 8 y 10), se aprecian siempre los picos de fusión de los dos componentes. Estos aparecen lógicamente a la misma temperatura observada en el barrido de los correspondientes homopolímeros.

En la *Tabla 7.10* se recogen los parámetros obtenidos en el análisis calorimétrico de las distintas fibras. Puede resaltarse que, en las fibras formadas por los dos polímeros, la temperatura de fusión del PEG, alrededor de 65 °C, no es afectada al aumentar el contenido de PLA en el proceso de electrohilado. Dado que los valores de ΔH_{mPEG} se han calculado por gramo de fibra, los valores mostrados en la tabla decrecen a medida que disminuye la proporción del PEG. En cuanto a las temperaturas de fusión del PLA en las mezclas, no varía respecto al homopolímero y se encuentran en el rango esperado, con valor próximo de 150°C. Los valores de ΔH_{mPLA} presentan variaciones pequeñas.

Tabla 7.10.- Parámetros calorimétricos de las matrices híbridas PLA/PEG

Sample	T_{mPEG} (°C)	ΔH_{mPEG} (J/g)	T_{cPEG} (°C)	ΔH_{cPEG} (J/g)	T_{mPLA} (°C)	ΔH_{mPLA} (J/g)	T_{cPLA} (°C)	ΔH_{cPLA} (J/g)
PLA ^o	-	-	-	-	149,8	33,4	-	-
PLA	-	-	-	-	149,6	20,1	111,5	19,8
PEG ^o	65,0	177,2	44,4	177,2	-	-	-	-
PEG	63,8	170,1	44,7	165,7	-	-	-	-
PLA/PEG 0.8	65,7	138,3	44,4	138,9	151,7	2,47	-	-
PLA/PEG 2	62,2	102,1	38,7	72,7	151,9	24,1	-	-
PLA/PEG 4	62,0	87,9	40,9	67,8	152,3	12,9	-	-
PLA/PEG 6	64,3	87,1	42,8	67,3	152,6	12,1	-	-
PLA/PEG 8	63,2	57,2	41,2	44,7	152,2	18,1	-	-
PLA/PEG 10	63,1	55,7	38,9	28,8	151,9	15,8	-	-

El análisis termogravimétrico (TGA) o la degradación térmica de las matrices híbridas PLA/PEG-x muestran dos pasos de degradación con un máximo del peso perdido para cada componente a una velocidad de 20 °C/min correspondientes a 369 °C y 423 °C como característicos en la descomposición de los homopolímeros PLA^[58] y PEG^[59], respectivamente (Figura 7.11).

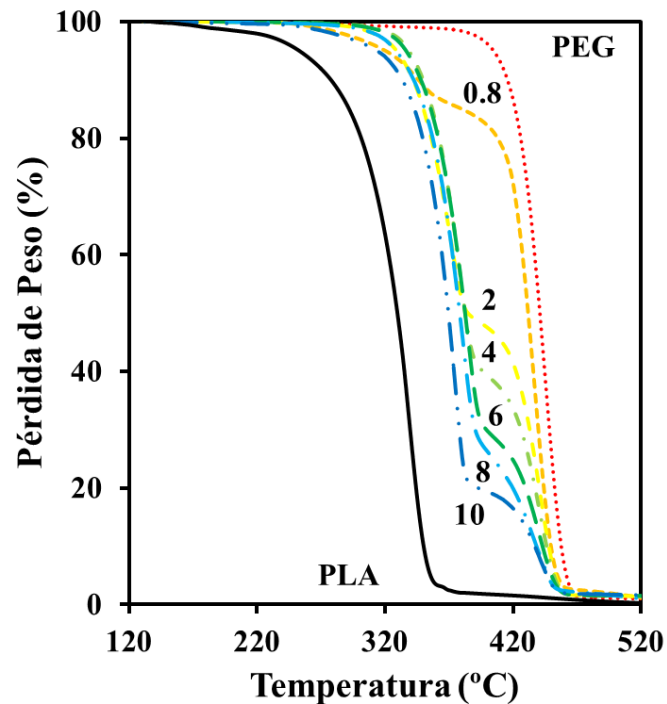


Figura 7.11.- Degradación térmica de las matrices híbridas PLA/PEG

Lógicamente la pérdida de peso que está asociada a cada paso de la descomposición térmica es proporcional al correspondiente contenido de masa de cada homopolímero en la matriz híbrida. Se puede observar que el comportamiento durante la degradación de cada polímero no ha sido alterado por el proceso de electrohilado; incluso en la primera descomposición del PLA, que principalmente da lugar a la lactida, no afecta a la estabilidad del PEG en lo que queda de la matriz híbrida.

7.4.5. Análisis por espectroscopia infrarroja de las matrices híbridas

Mediante la técnica de espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) se ha comprobado de forma cualitativa la presencia de los dos homopolímeros en las matrices híbridas de fibras de PLA y PEG.

En la *Figura 7.12* se muestra de manera comparativa los espectros infrarrojos de las seis matrices híbridas PLA/PEG-x; y además se muestran los espectros FTIR de los respectivos homopolímeros (PLA y PEG).

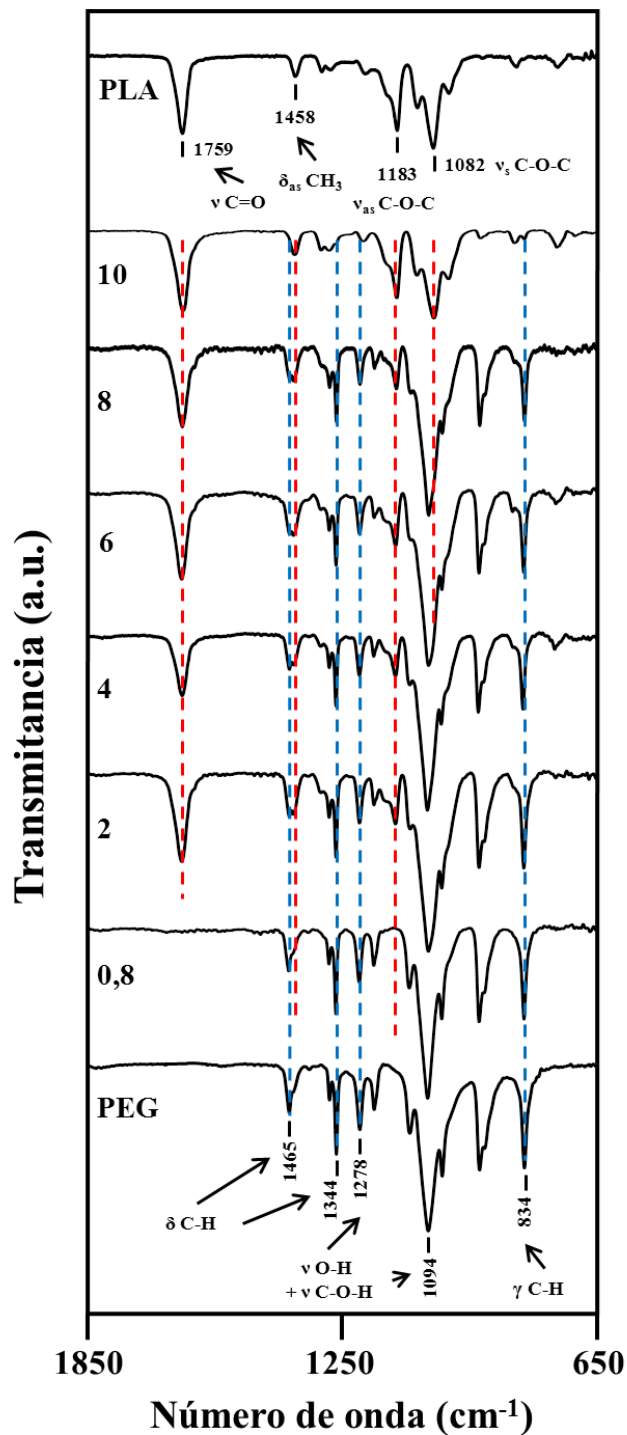


Figura 7.12.- Espectros FTIR de las matrices híbridas PLA/PEG-x. Como referencia se muestran los FTIR para los homopolímeros PLA y PEG.

Las flechas indican las distintas bandas características de cada homopolímero siendo para el PLA: una banda a 1759 cm^{-1} correspondiente al enlace $\nu_{\text{C=O}}$, una banda a 1458 cm^{-1} correspondiente al enlace δ_{ASCH_3} , una a 1183 cm^{-1} correspondiente al enlace $\nu_{\text{ASC-O-C}}$ y a 1082 cm^{-1} correspondiente al enlace $\nu_{\text{SC-O-C}}$ simétrico^[64]. Para el PEG las principales bandas características son: una banda a 1465 cm^{-1} ya 1344 cm^{-1} correspondientes al enlace $\delta_{\text{C-H}}$, una banda a 1278 cm^{-1} y a 1094 cm^{-1} correspondiente a los enlaces $\nu_{\text{O-H}}$ y $\nu_{\text{C-O-H}}$ y a 834 cm^{-1} correspondiente al enlace $\gamma_{\text{C-H}}$ ^[65]. Estas bandas son usadas para demostrar de forma cualitativa la presencia de los dos homopolímeros en la mezcla de fibras PLA/PEG-x tal como se muestra en la *Figura 7.12*.

7.4.6. Análisis por espectroscopia infrarroja de las matrices híbridas con PEG disuelto en medio acuoso.

Las matrices híbridas PLA/PEG fueron caracterizadas fisicoquímicamente mediante FTIR después de la remoción de las fibras PEG por incubar las matrices en agua. El objetivo de este análisis fue determinar el cambio cualitativo en la composición de las fibras cuando ocurre una pérdida significativa de PEG.

En la *Figura 7.13* se muestran los espectros de las seis matrices híbridas PLA/PEG-x después de perder el PEG. Como era de esperar, las señales características del PEG en cada espectro FTIR de las matrices híbridas disminuyen en su intensidad o desaparecen casi por completo. En la *Figura 7.13*, se han marcado las bandas características del PEG (como referencia ver la *figura IR* para el indexado de las bandas) y se observa que para todas las muestras existe una disminución en la señal de las bandas características del PEG (p.e. 961 y 834 cm^{-1}) como consecuencia de su solubilización y extracción por agua. Esta pérdida de las señales del PEG contrasta con las bandas características del PLA que pueden ser observadas antes y después de la incubación en agua (p.e. banda 1753 cm^{-1}).

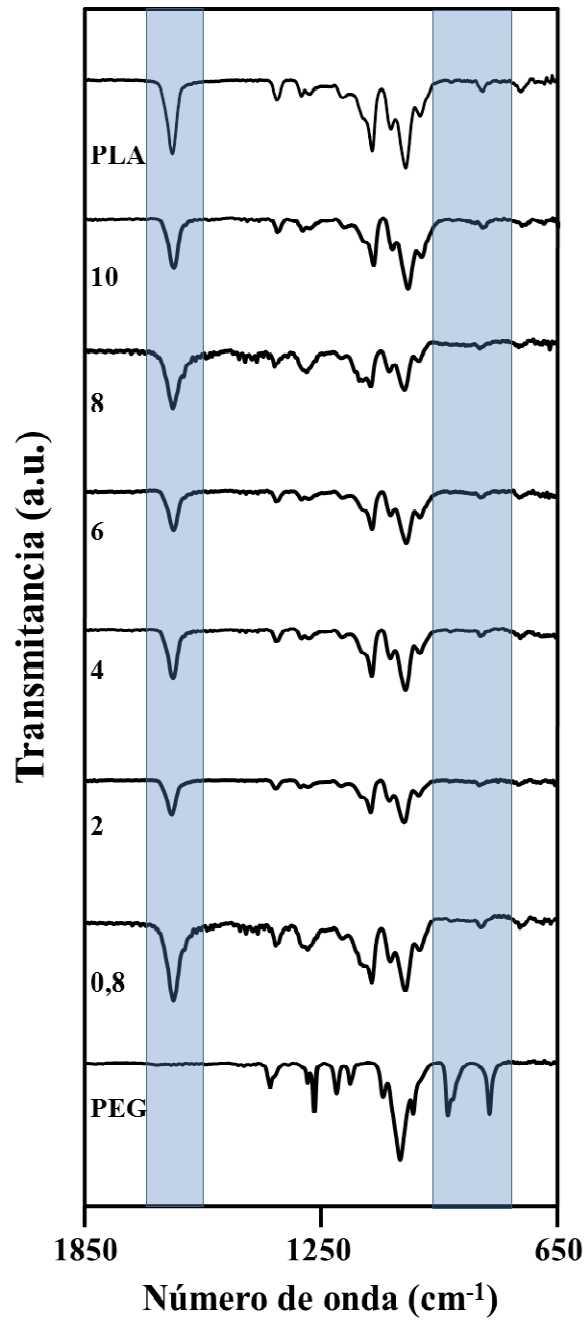


Figura 7.13.- Espectros FTIR de las matrices híbridas PLA/PEG-x incubadas en agua para disolver las fibras de PEG. SE destaca la banda a 1753 cm⁻¹ del PLA y las bandas características del PEG a 961 y 834 cm⁻¹

7.4.7. Composición de las matrices híbridas PLA/PEG

La composición molar de las matrices híbridas PLA/PEG fueron determinadas por resonancia magnética nuclear (H^1 -RMN). Para ello, se tomaron 5 muestras distribuidas sobre la diagonal del *mat* o *electrospun* (pañó de *electrospinning*) de cada una de las matrices híbridas PLA/PEG-x. Las muestras correspondieron a piezas de 1 cm^2 , con peso de 20 mg, ellas fueron introducidas en los tubos de RMN y disueltas con cloroformo deuterado. Los espectros H^1 -RMN de las matrices híbridas PLA/PEG-x mostraron los picos a 0,00 correspondiente al TMS (referencia del espectro), y 7,26 ppm correspondiente al CHCl_3 (disolvente en el análisis). Además, las matrices híbridas presentaron tres picos correspondientes a las tres familias de hidrógenos que contienen las muestras de las matrices híbridas. Un cuadruplete originado por los $-\text{CH}-$ del PLA (1H) que aparece entre 5,18-5,15 ppm. El doblete de los $-\text{CH}_3$ del PLA (3H) aparece entre 1,59-1,57 ppm. Un singulete correspondiente a los dos $-\text{CH}_2-$ del PEG (4H) que aparece a 3,64 ppm. Luego de identificar los picos en el espectro RMN, las áreas de los picos fueron integradas, y su valor es directamente proporcional a la abundancia relativa del correspondiente tipo de hidrógeno. La relación entre las áreas de los picos de ambos polímeros permite calcular la composición molar del PLA y PEG en la matriz híbrida.

$$\% \text{ molar de PLA} = (A_{5,15} + A_{1,57}) * 100 / (A_{5,15} + A_{3,64} + A_{1,57})$$

En la *Tabla 7.11*, se muestran las composiciones molares para las matrices híbridas PLA/PEG-x, antes y después de la remoción de las fibras de PEG, por disolución en agua.

Tabla 7.11.- Composición molar de las matrices híbridas PLA/PEG-x. Los valores calculados antes de eliminar el PEG corresponden al valor promedio ($n=5$). Los valores de las matrices híbridas sin PEG corresponden a muestras únicas.

Matriz	Teórico		Antes		S.D.	Después		Pérdida PEG %
	PLA %M	PEG %M	PLA %M	PEG %M		PLA %M	PEG %M	
PEG 0.8	0	100	0	100	-	-	-	100
PLA 10	100	0	100	0	-	100	-	-
PLA/PEG 0.8	17.2	82.8	9.1	90.9	1.9	99.9	0.1	99.9
PLA/PEG 2	34.2	65.8	28.1	71.9	7.6	99.6	0.4	99.8
PLA/PEG 4	50.9	49.1	47.9	52.1	5.7	99.5	0.5	99.4
PLA/PEG 6	60.9	39.1	49.2	50.8	4.5	99.2	0.8	99.1
PLA/PEG 8	67.5	32.5	64.2	35.8	6.3	98.8	1.2	97.5
PLA/PEG 10	72.2	27.8	77.2	22.8	15.3	97.6	2.4	91.6

Los resultados de las composiciones molares de las matrices híbridas PLA/PEG determinadas por RMN se ajustan a los valores teóricos. Por otro lado, se observa que las desviaciones de los valores son pequeñas, esto es importante porque considerando que las muestras fueron representativas de todo el *electrospun* o *mat*, se puede indicar que las matrices en su composición molar fueron homogéneas.

Finalmente, los RMN de las matrices híbridas PLA/PEG después de ser sumergidas en agua demuestran la efectividad en la disolución de las fibras de PEG en agua. En general, las matrices mostraron un remanente de PEG menor al 2% aproximadamente.

Además, es importante destacar la agudeza del análisis de RMN para cuantificar los componentes de PLA y PEG en las matrices híbridas PLA/PEG antes y después del tratamiento con agua. Hecho que no es fácilmente perceptible con otras técnicas, como fue el caso del FTIR, donde de manera cualitativa se puede determinar la presencia o ausencia de los componentes de las matrices híbridas PLA/PEG.

7.4.8. Porosidad

El objetivo de las matrices híbridas PLA/PEG preparadas como una mezcla homogénea de microfibras de PLA y PEG tiene como finalidad conseguir una matriz con mayor porosidad una vez que el polímero de sacrificio, en nuestro caso PEG, sea eliminado de la matriz. La metodología para realizar el análisis de la porosidad en las matrices híbridas fue descrita anteriormente (ver apartado 7.2.5).

En la *Tabla 7.12* se muestran los resultados de las porosidades calculadas para cada tipo de matriz híbrida PLA/PEG. En este estudio el solvente usado para determinar las porosidades de las matrices fue agua, y la porosidad es calculada como el volumen muerto de la matriz. Como punto de partida para discutir los resultados obtenidos se debe considerar que la porosidad de la matriz de microfibras de PLA fue de 40 % aproximadamente. Mientras que la porosidad de una matriz de microfibras de PEG fue del 100 %, lo cual significa que la matriz de PEG queda totalmente disuelta cuando entra en contacto con el agua. En general, las matrices híbridas de PLA/PEG muestran mayor porosidad que la matriz de PLA, con lo cual el objetivo de incrementar la porosidad mediante la introducción de fibras de sacrificio en la matriz de PLA ha sido satisfactoriamente alcanzada. El incremento observado en las porosidades de las matrices híbridas se corresponde con la aproximadamente total remoción de PEG.

Tabla 7.12.- Porosidades de las matrices híbridas PLA/PEG. Se muestra la composición inicial de las matrices híbridas, y la pérdida de PEG cuando la matriz fue sumergida en agua. Los valores de porosidad corresponden al promedio \pm SD (n=5).

Matriz	Composición inicial		Pérdida de PEG (%)	Porosidad (%)	
	% molar láctico	% molar PEG		Promedio	SD
PEG 0.8	0	100	100	99.9	0.2
PLA 10	100	0	-	39.7	7.6
PLA/PEG 0.8	9.1	90.9	99.9	83.7	1.6
PLA/PEG 2	28.1	71.9	99.8	83.4	2.0
PLA/PEG 4	47.9	52.1	99.4	74.2	3.8
PLA/PEG 6	49.2	50.8	99.1	75.3	3.4
PLA/PEG 8	64.2	35.8	97.5	62.2	9.3
PLA/PEG 10	77.2	22.8	91.6	65.0	8.1

Un análisis más detallado de las porosidades en función de la composición molar de las matrices híbridas PLA/PEG demuestra que el incremento de la porosidad ocurre de manera dependiente al contenido de PEG. Para contenidos de PEG (% molar) en rangos de 20-35 %, 40-60 %, y 70-90 % las porosidades aproximadas fueron de 60 %, 75 % y 80 % (Figura 7.14). Estos resultados indicarían que la porosidad de las matrices híbridas no puede ser manejada de manera directamente lineal en función de la concentración de PEG en las matrices. Sin embargo, esto no es un perjuicio para el concepto de utilizar un polímero de sacrificio con la finalidad de incrementar la porosidad de la matriz de PLA.

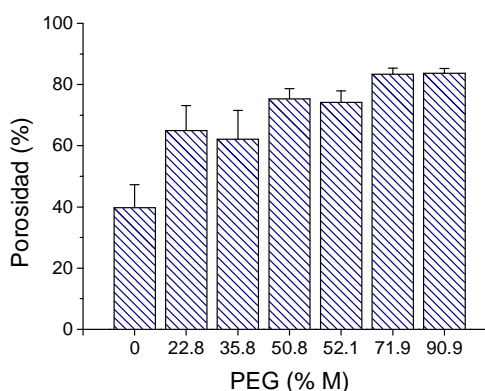


Figura 7.14.- Dependencia de la porosidad de las matrices híbridas PLA/PEG en función de la concentración molar del PEG en la matriz. Los valores son los promedios \pm SD (n=5).

7.4.9. Ángulos de contacto de las matrices híbridas PLA/PEG

Los ángulos de contacto de una superficie dan información acerca de las características superficiales del material, mediante esta medida se puede establecer la hidrofobicidad del material. En este estudio la medida de los ángulos de contacto se ha realizado con el equipo *Data Physics OCA15*. Para ello, se depositó una gota de agua de 5 μ L sobre la superficie de las matrices híbridas de PLA/PEG, y los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 7.15*. Claramente, se muestra que solo se realizaron las medidas de los ángulos de contacto en las matrices PLA/PEG 8 y 10, cuyas composiciones en porcentajes molares de PLA:PEG fueron 64.2:35.8 y 77.2:22.8, respectivamente. Esto demuestra que composiciones mayores a 36 % en mol de PEG en la matriz no permiten determinar el ángulo de contacto debido al hecho que el material absorbe la gota de agua; es decir, ocurre una rápida solvatación de las fibras de PEG; también podría ser interpretado como que el material es extremadamente hidrofílico. Esto correspondería a las matrices híbridas PLA/PEG 0.8, 2, 4, 6 que se corresponde con un contenido de PEG mayor al 50 % en mol.

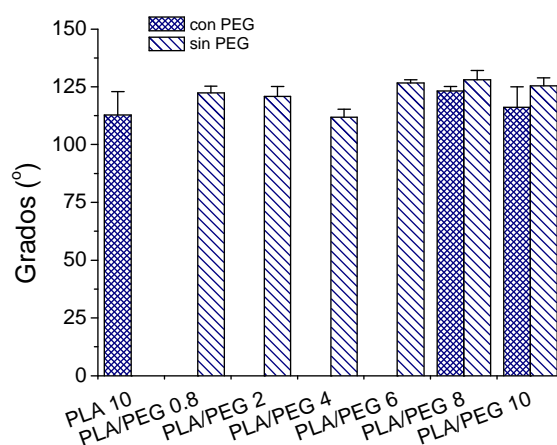


Figura 7.15.- Ángulos de contacto medidos en las matrices híbridas PLA/PEG tal como fueron obtenidas en el electrohilado (con PEG), y luego de remover el PEG sumergiéndolas en agua (sin PEG). Los valores son promedios \pm SD (n=6).

Sin embargo, cuando las fibras de PEG fueron sacrificadas por su disolución en agua, los ángulos de contacto pudieron ser medidos en todas las matrices híbridas PLA/PEG (Figura 7.13). Esto ocurre porque en realidad el ángulo de contacto se está midiendo sobre una matriz híbrida sin fibras de PEG. Así, claramente se puede observar que en las matrices híbridas sin PEG el valor de los ángulos de contacto es similar al valor obtenido para una matriz de PLA preparada por *electrospinning*, la cual fue usada como control.

7.4.10. Matrices híbridas PLA/PEG cargadas con drogas antibacterianas

Las matrices híbridas PLA/PEG fueron funcionalizadas mediante la carga de drogas antibacterianas en las fibras de PLA. Para llevar a cabo esta funcionalización de las fibras de PLA se ha seleccionado al Triclosán (TCS) y a la Polihexametilenbiguanida (PHMB) como drogas antibacterianas. Además, teniendo en consideración los resultados de porosidad al sacrificar las fibras de PEG de las matrices híbridas. Este estudio de funcionalización de las matrices híbridas fue realizado con las matrices PLA/PEG 0.8, 4 y 10, las cuales han demostrado contener 91, 52 y 23 % en mol de PEG (valores obtenidos por H^1 -RMN).

Las drogas antibacterianas TCS y PHMB fueron preparadas por disolución en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), cada una por separado, luego fueron añadidas a la disolución de PLA preparada en $CHCl_3:CH_3-CO-CH_3$ (2v:1v). Las disoluciones para el electrohilado fueron PLA al 10 %-w/v con TCS 1 %-w/v, y PLA al 10 %-w/v con PHMB 0.25 %-w/v. Por otro lado, la disolución del polímero de sacrificio fue PEG 35 %-w/w en DCM:DMF (70:30, w:w). Luego se realizó el electrohilado dual de acuerdo al Diseño-3 (ver apartado 7.4).

En la *Figura 7.16* se muestran las imágenes SEM a bajos aumentos de los *mats* o *electrospun* de las matrices híbridas funcionalizadas con las drogas antibacterianas. Claramente, se observan las fibras de PEG en las matrices PLA/PEG 08 las cuales tienen un alto contenido de PEG (91 % en mol). En una apariencia general, las matrices PLA/PEG 4 y 10 parecen corresponder a matrices de fibras de PLA, por su intermedio y bajo contenido de PEG (52 % y 23 % en mol, respectivamente). En todos los casos, el *electrospinning* dual fue realizado de manera óptima conforme no se observan defectos en las fibras.

Los diámetros de las fibras en las matrices híbridas mostraron distribuciones unimodales como se observa en la *Figura 7.16*, lo cual es característicos de matrices homogéneas en cuanto al diámetro de las fibras. Sin embargo, las matrices híbridas PLA/PEG con fibras de PLA cargadas con los antimicrobianos mostraron una reducción en sus diámetros, la cual fue mucho más notoria cuando el contenido de PEG fue alto (*Tabla 7.13*). En este sentido, la carga de la droga PHMB introdujo mayor reducción en los diámetros de las fibras en comparación al TCS. Esta reducción en los diámetros de las fibras de PLA al ser cargadas con las drogas TCS y PHMB han sido descritas en trabajos previos ^{[60][61]}, y tienen relación a la disposición intralamelar de las drogas en las fibras electrohiladas.

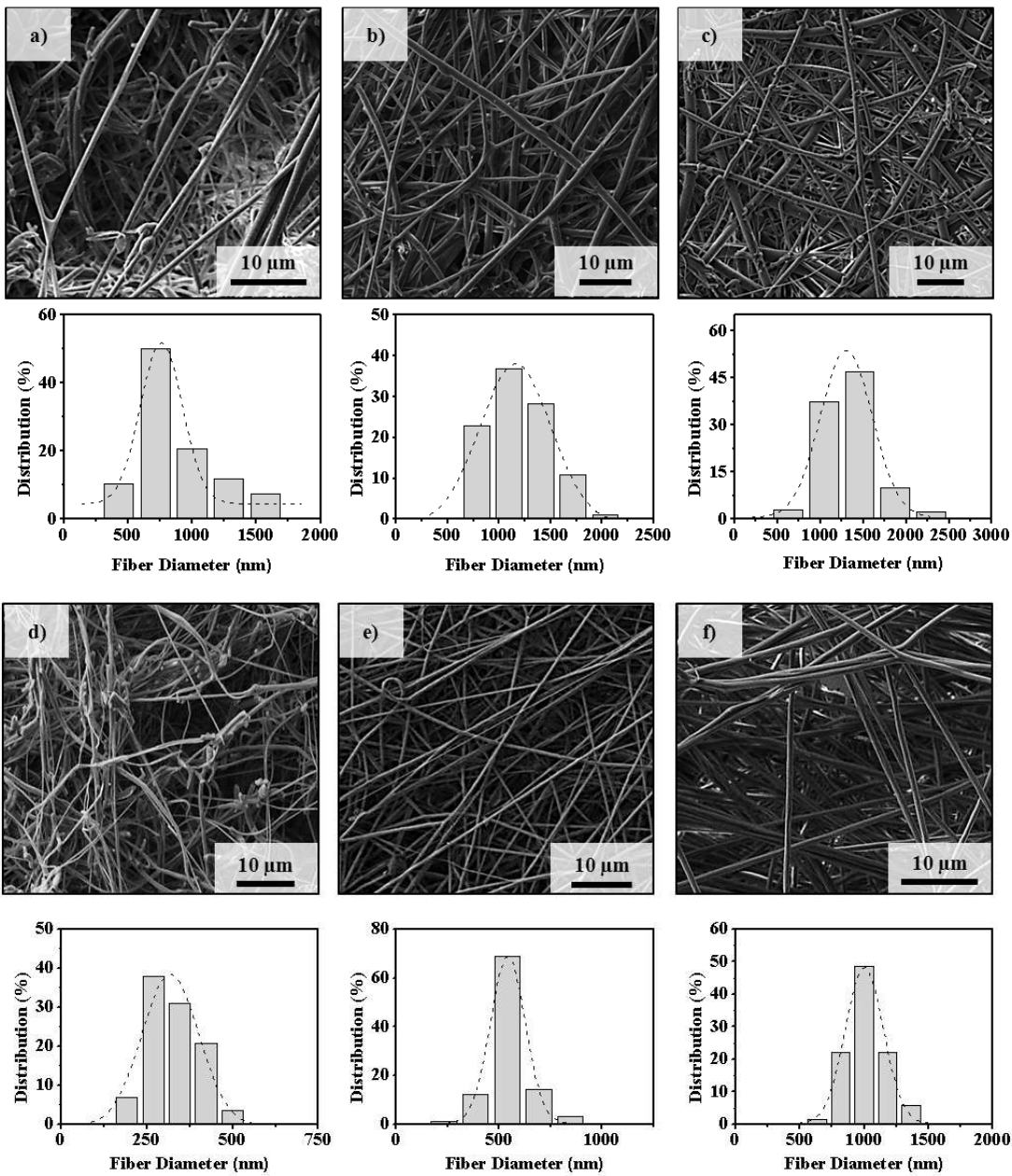


Figura 7.16.- Imágenes SEM de los electrospun de las matrices híbridas PLA/PEG funcionalizadas. Distribución del diámetro de fibras de PLA en las matrices. Las fibras de PLA fueron cargadas con TCS (a, b, c) o PHMB (d, e, f). a y d) PLA/PEG 0.8, b y e) PLA/PEG 4, c y f) PLA/PEG 10.

Tabla 7.13.- Diámetros de las fibras en las matrices híbridas de PLA/PEG funcionalizadas con los antimicrobianos triclosán (TCS) y polihexametilenbiguanida (PHMB).

Flujo PLA:PEG (mL/h)	PLA:PEG (%-M)	Sin carga $\varnothing_{\text{inicial}}$ (nm)	Carga TCS $\varnothing_{\text{inicial}}$ (nm)	Carga PHMB $\varnothing_{\text{inicial}}$ (nm)
0,8:0,8	9,1:90,9	1185,35 ± 6,53	761,65 ± 37,91	318,56 ± 7,34
4:0,8	47,9:52,1	1209,89 ± 43,30	1158,42 ± 23,73	542,48 ± 2,62
10:0,8	77,2:22,8	1501,29 ± 41,41	1304,81 ± 12,53	1002,27 ± 5,06

Las imágenes SEM a mayores aumentos de las matrices híbridas PLA/PEG con las fibras de PLA cargadas con TCS o PHMB son mostradas en la *Figura 7.17* y *Figura 7.18*, respectivamente. Estas imágenes son usadas para estudiar la morfología de las fibras. El TCS cargado en las fibras de PLA no produce cambios morfológicos en las fibras de PLA. Así, en las matrices híbridas se pueden distinguir las fibras de PEG que corresponden a las fibras lisas y de menor diámetro, mientras que las fibras de PLA muestran sus rugosidades típicas (*Fig 7.17*).

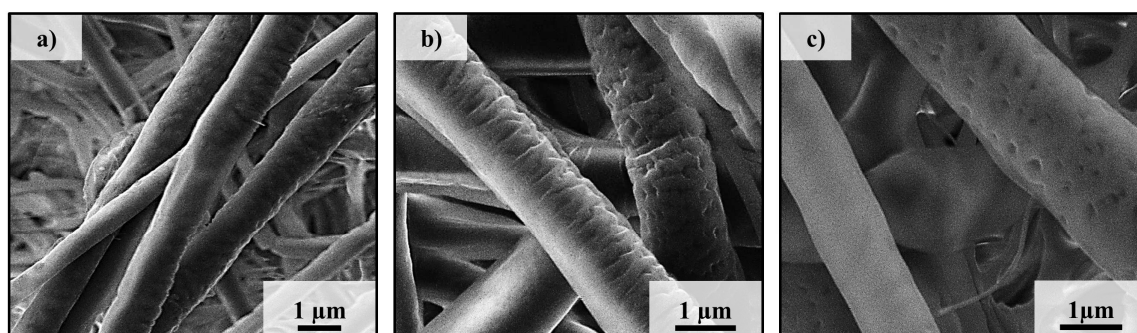


Figura 7.17.- Morfología de las fibras en las matrices híbridas PLA/PEG donde las fibras de PLA fueron cargadas con TCS (1%): (a) PLA/PEG 0.8, (b) PLA/PEG 4, (c) PLA/PEG 10.

La morfología de las fibras en las matrices híbridas PLA/PEG con las fibras de PLA cargadas con PHMB muestran mayores cambios. En la *Figura 7.18*, se puede observar que las fibras tienen menor diámetro y todas son lisas cuando el PLA fue electrohilado a flujo de 0.8 mL/h (PLA/PEG 0.8). En las matrices PLA/PEG 4 y 10 se observó que el diámetro de las fibras de PLA se incrementa y muy pequeñas rugosidades fueron perceptibles en estas fibras. Finalmente, en esta situación es difícil identificar las fibras de PLA con respecto a las fibras de PEG

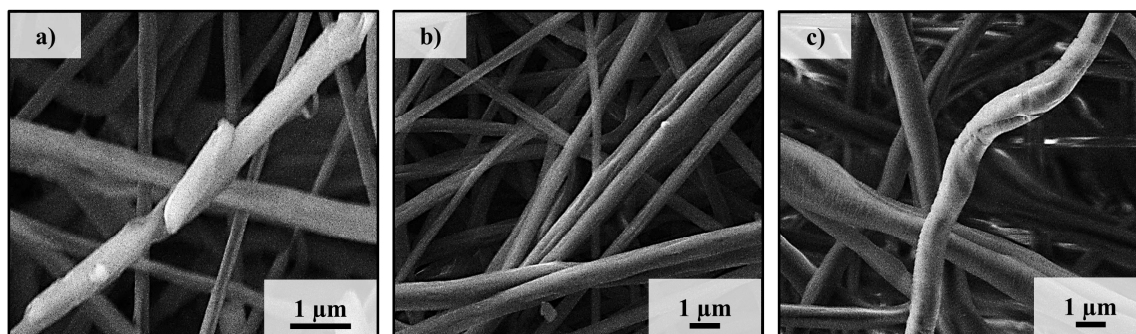


Figura 7.18.- Morfología de las fibras en las matrices híbridas PLA/PEG donde las fibras de PLA fueron cargadas con PHMB (0.25%): (a) PLA/PEG 0.8, (b) PLA/PEG 4, (c) PLA/PEG 10.

7.4.11. Liberación de las drogas cargadas en las matrices híbridas PLA/PEG

Se ha estudiado la liberación de las drogas antimicrobianas TCS y PHMB cargadas en las matrices híbridas PLA/PEG. Estos estudios de liberación fueron realizados en dos medios de diferentes hidrofiliidad. El medio hidrofílico correspondió a un buffer fosfato salino (PBS) a pH 7.2-7.4, y el medio hidrofóbico fue constituido por PBS suplementado con etanol absoluto (grado reactivo) al 70 %-v/v. Los ensayos fueron realizados con muestras triplicadas ($n=3$) de cada matriz híbrida PLA/PEG. Previamente, las muestras fueron pesadas y usualmente se ensayaron muestras de 1 cm^2 y peso aproximado de 20 mg. Los ensayos fueron realizados en tubos de polipropileno de alta densidad con tapa rosca de 50 mL de capacidad. Las muestras fueron sumergidas en 50 mL de medio de liberación, y los tubos fueron mantenidos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y con agitación orbital de 80 -100 rpm. En tiempos predeterminados se muestreo una alícuota de 1 mL de medio de liberación y en su reemplazo se añadió un 1 mL de medio fresco con la finalidad de mantener constante el volumen de liberación durante todo el ensayo. Las alícuotas muestreadas fueron conservadas en microtubos a 4°C hasta el momento de cuantificar la droga liberada.

La cuantificación de las drogas fue realizada por espectroscopia de absorción UV-Vis usando curvas patrones adecuadas a cada droga y medio de liberación. La concentración de TCS fue determinada usando el máximo de absorción del espectro de la droga, siendo el λ máx. a 281 nm. Para el PHMB se usó el λ máx. a 236 nm.

Los resultados de las liberaciones de TCS y PHMB cargados en las matrices híbridas son mostrados en la *Figura 7.19*. Se observó que ambas drogas fueron muy poco liberadas en el medio hidrofílico o PBS. Para ambas drogas la liberación alcanzó un máximo cercano al 30 % a las 8 h de liberación. El TCS fue liberado rápidamente, alcanzando el valor máximo (30 % aprox.) durante la primera hora de liberación. Mientras que el PHMB fue liberado más lentamente.

La liberación de TCS y PHMB realizada en el medio hidrofóbico muestra que el TCS se libera lentamente y alcanza un equilibrio con la liberación máxima del 60-70 % de la droga cargada en las matrices híbridas PLA/PEG 0.8. La liberación de TCS de las matrices PLA/PEG 10 fue la más rápida y su máximo en equilibrio fue del 90 % de la droga cargada. La matriz PLA/PEG 4 mostró un comportamiento intermedio en cuanto a su velocidad inicial de liberación, pero también alcanza el equilibrio cuando liberó el 90 % del TCS cargado. La liberación de PHMB fue diferente a lo observado para el TCS. El PHMB se libera de la matriz PLA/PEG 0.8 lentamente y con un máximo alrededor del 60 % de la droga cargada. Mientras que las matrices PLA/PEG 4 y 10 tienen perfiles de liberación muy similares. El PHMB fue liberado desde ambas matrices con la misma velocidad, y alcanza el equilibrio cuando han liberado el 80-90 % de PHMB cargado.

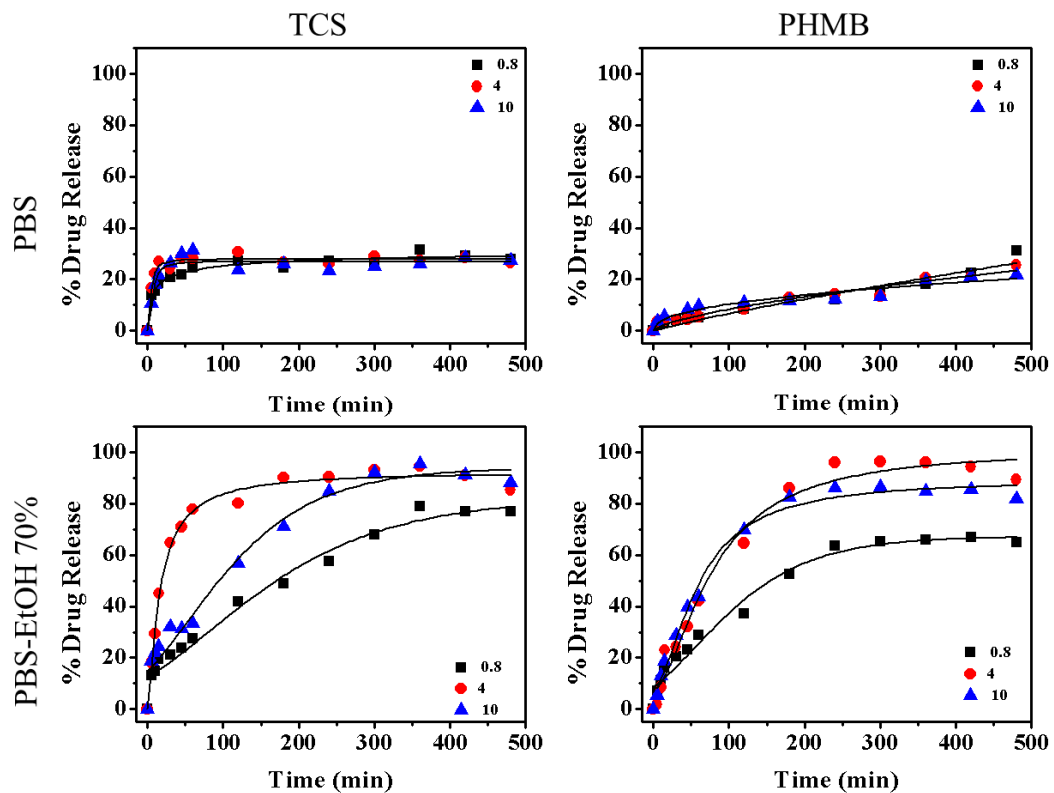


Figura 7.18.- Liberación de TCS y PHMB cargado en las matrices híbridas. La carga de TCS fue del 1%, y para el PHMB fue 0.25%

Las cinéticas de liberación fueron estudiadas mediante el modelo de Higuchi, para explicar la liberación de la droga entre el rango de 0-60 % de la droga cargada, y el modelo de primer-orden para explicar el rango entre 40-100 % de liberación. En la *Tabla 7.14* se muestran los parámetros cinéticos para ambos modelos que en conjunto explican toda la curva de liberación. Los valores de correlación (r) muestran que los parámetros cinéticos

derivados de las gráficas de la *Figura 7.18* son ajustables adecuadamente a ambos modelos.

Tabla 7.14.- Parámetros cinéticos de la liberación de TCS y PHMB de las matrices híbridas PLA/PEG. Las liberaciones fueron realizadas en los medios PBS y PBS-etanol 70%-v/v, medio hidrofílico e hidrofóbico respectivamente. (n=3).

Carga TCS 1 %								
Muestra	PBS				PBS-EtOH 70%			
	$K_H (h^{-0.5})$	r	$K_1 (h^{-1})$	r	$K_H (h^{-0.5})$	r	$K_1 (h^{-1})$	r
PLA_PEG 0.8	1.082	0.886	0.710	0.951	0.371	0.982	0.366	0.955
PLA_PEG 4	1.690	0.989	2.706	0.971	0.906	0.960	0.671	0.956
PLA_PEG 10	3.055	0.969	3.491	0.783	0.424	0.949	0.712	0.979

Carga PHMB 0,25 %								
Muestra	PBS				PBS-EtOH 70%			
	$K_H (h^{-0.5})$	r	$K_1 (h^{-1})$	r	$K_H (h^{-0.5})$	r	$K_1 (h^{-1})$	r
PLA_PEG 0.8	0.101	0.973	0.054	0.994	0.381	0.993	0.447	0.978
PLA_PEG 4	0.134	0.965	0.0556	0.959	0.424	0.961	1.364	0.861
PLA_PEG 10	0.112	0.932	0.048	0.996	0.520	0.980	1.379	0.956

7.4.12. Inhibición del crecimiento bacteriano mediante matrices híbridas PLA/PEG cargadas con antimicrobianos

Con este ensayo se ha demostrado la actividad biológica de las drogas antibacterianas cargadas en las matrices híbridas de PLA/PEG. Para realizar el ensayo, las muestras de 1 cm² de matriz fueron colocadas en los pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos, y a cada pocillo se le añadió 1 mL de caldo de cultivo LB. Luego, los pocillos fueron inoculados con una alícuota que contenía 10³ bacterias. Los cultivos fueron mantenidos durante 24 h a 37 °C y agitación orbital de 60 rpm. La absorbancia a 570 nm fue medida para establecer de forma relativa el crecimiento. Se realizaron dos controles, el control positivo que correspondió al crecimiento de bacterias en ausencia de matriz, y sirve para determinar el

máximo crecimiento; y el control negativo, que corresponde a medio LB sin inóculo de bacterias, utilizado para tener control de posibles contaminaciones.

En la *Figura 7.19* se muestra la disminución significativa del crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* (tipo Gram negativa) y *Micrococcus luteus* (tipo Gram positiva) cuando fueron cultivadas en medio LB en presencia de las matrices híbridas PLA/PEG funcionalizadas con antibacterianos cargados en las fibras de PLA. Para ambos tipos de bacterias se puede observar que las bacterias en presencia de las matrices híbridas crecen de forma similar al control, con lo cual no tienen efecto inhibitorio. Pero las bacterias que crecen en las matrices híbridas funcionalizadas con TCS o PHMB mostraron una clara inhibición en el crecimiento bacteriano, Además, se puede observar que la inhibición es proporcional al contenido de fibras de PLA cargadas con los antibacterianos.

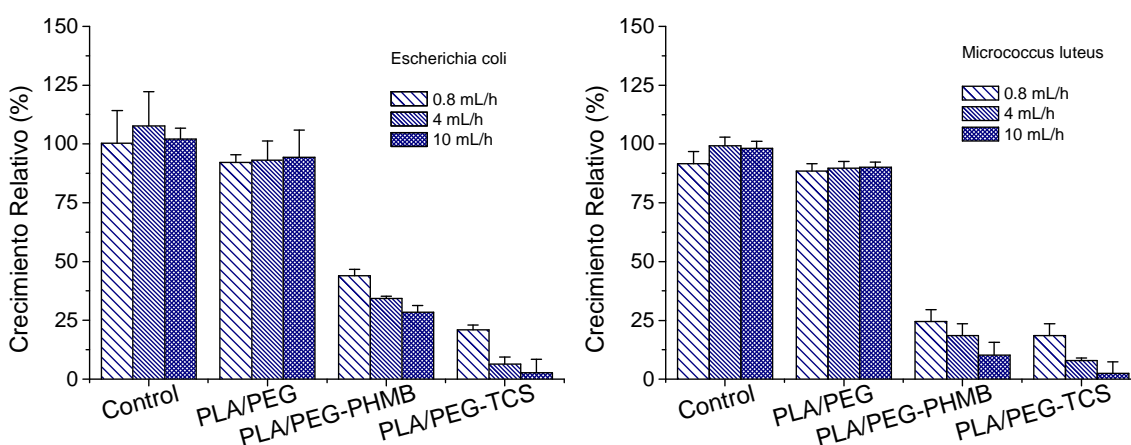


Figura 7.19.- Inhibición del crecimiento bacteriano mediante matrices híbridas PLA/PEG cargadas con triclosan (TCS) y polihexametilbiguanida (PHMB). Las drogas fueron cargadas en las fibras de PLA luego el electrospinning fue realizado a diferentes flujos, y el flujo de PEG fue constante a 0.8 mL/h

7.4.13. Biocompatibilidad in-vitro de las matrices híbridas PLA/PEG

La biocompatibilidad in-vitro de las matrices híbridas de PLA/PEG fueron estudiadas mediante los ensayos de adhesión y proliferación de células. Este estudio sólo fue realizado con las matrices sin funcionalizar porque se sabe que las concentraciones de antimicrobianos cargadas en las matrices a priori resultan ser tóxicas para las células. Para este estudio sean seleccionados dos líneas celulares: la línea MRC-5 que corresponden a células tipo fibroblasto, y la línea VERO que son células tipo epitelial.

Los experimentos de adhesión se realizaron sembrando 50×10^4 células y se evaluó por MTT a las 24 h de cultivo. Los experimentos de proliferación se sembraron 20×10^4 células y se evaluó por MTT a las 96 h de cultivo. Las células fueron sembradas directamente sobre 1 cm^2 de matriz híbrida PLA/PEG. Como control se utilizó el pocillo de la placa de cultivo.

En la *Figura 7.20* se muestran los resultados obtenidos para la adhesión y proliferación celular. En general se puede indicar que las matrices híbridas PLA/PEG 4 y 10 resultaron ser las mejores superficies para el crecimiento y adhesión de las células tipo fibroblastos y epiteliales. La matriz híbrida PLA/PEG 0.8 mostró dificultades para soportar el crecimiento celular, en especial para las células epiteliales. Estos resultados pueden estar relacionados a la poca estabilidad de la matriz cuando el PEG es disuelto en el medio de cultivo. Sin embargo, la adhesión celular no fue muy afectada sobre la matriz PLA/PEG 0.8.

Aparentemente, las células son sensibles a los cambios en la arquitectura de red de fibras que puede sufrir la matriz híbrida durante la remoción del PEG. En este sentido se requieren estudios que puedan contrastar estas hipótesis. Por ejemplo, se podría remover el PEG antes de realizar los cultivos, o se podría usar estabilizadores para la red de la matriz, tipo entrecruzadores u otros aditivos.

Finalmente, se puede concluir que las matrices híbridas PLA/PEG son nuevos materiales que pueden soportar la adhesión y proliferación celular, y sus aplicaciones como material altamente poroso se relacionan a la adecuada proporción entre el polímero constitutivo y el polímero de sacrificio. La porosidad de la matriz puede requerir ser optimizada para sus aplicaciones en la ingeniería de tejidos.

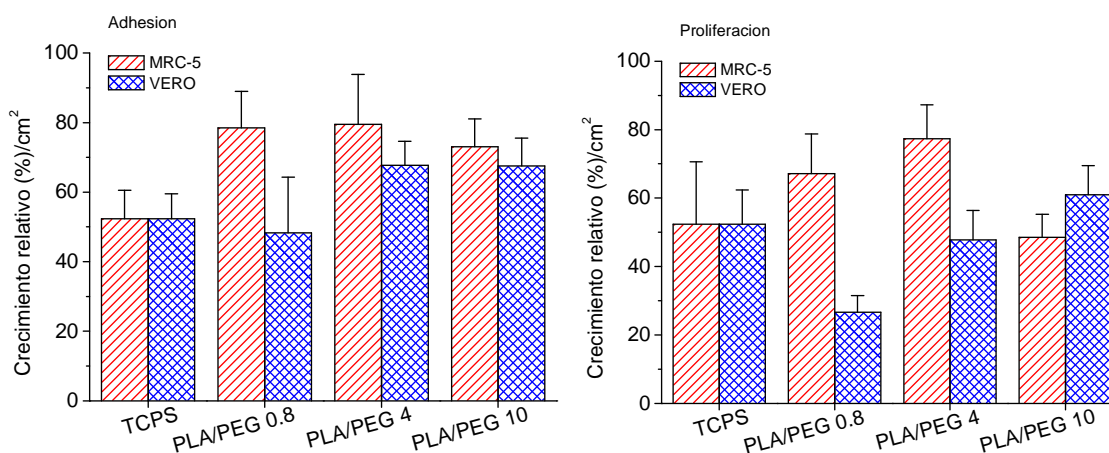


Figura 7.20.- Adhesión y proliferación celular sobre las matrices híbridas PLA/PEG. Los valores representan el promedio \pm SD ($n=4$).

8. Conclusiones

Este PFC tuvo como objetivo estudiar un nuevo material compuesto estructurado como una matriz de microfibras de poliláctida (PLA, poliéster hidrofóbico), y polietilenglicol (PEG, poliéster hidrofílico). Finalizado el estudio, y realizado el análisis de los resultados obtenidos se pueden indicar las siguientes conclusiones:

- 1) El *electrospinning* dual para la producción simultánea de fibras a partir de las disoluciones independientes de PLA y PEG es una metodología adecuada para la producción de matrices híbridas PLA/PEG, siendo el PEG el polímero de sacrificio. Además, indicar que el *electrospinning* dual requiere la optimización de diversos parámetros operacionales, en especial, la distancia aguja-colector para focalizar la superposición de los conos de las fibras producidas, y la posición de las jeringas en el sistema para evitar la repulsión de los jets o chorros de los polímeros.
- 2) La disolución de las fibras de PEG en las matrices híbridas PLA/PEG permite obtener matrices con mayor porosidad. La porosidad en las matrices es una característica que influye en la adhesión y crecimiento celular, en la liberación de fármacos, etc. La disolución de las fibras de PEG fue realizada totalmente cuando las matrices híbridas fueron sumergidas en agua como se ha demostrado de manera cuantitativa por RMN y cualitativamente por FTIR.
- 3) La porosidad de las matrices híbridas PLA/PEG depende del contenido de PEG en las matrices. Diversos contenidos de PEG (a manera de rango) pueden originar la misma porosidad.
- 4) Las matrices híbridas PLA/PEG mantienen las características térmicas de sus polímeros constituyentes de manera independiente. Esta conclusión se soporta por los estudios de DSC y TGA.
- 5) Las matrices híbridas PLA/PEG pueden ser funcionalizadas con propiedades antibacterianas por la incorporación del triclosán (TCS) y polihexametilenguanida (PHMB) en las fibras de PLA. Es interesante mencionar que el TCS es un compuesto hidrófobo, mientras que PHMB es hidrofílico.
- 6) Las drogas TCS y PHMB fueron liberadas en medios hidrofóbicos en forma dependiente del tiempo de liberación. Sin embargo, tienen una escasa liberación en medios acuosos o hidrofílicos.

- 7) Las actividades antibacterianas del TCS y PHMB son mantenidas en las fibras híbridas de PLA/PEG. Esta actividad antibacteriana fue demostrada usando como modelos las bacterias *E.coli* y *M.luteus*, las cuales corresponden a los grupos Gram negativas y Gram positivas, respectivamente.
- 8) Las matrices híbridas de PLA/PEG son plataformas adecuadas para la adhesión y crecimiento de células del tipo fibroblastos y epiteliales como ha sido demostrado por el cultivo de las líneas celulares MRC-5 y VERO, respectivamente.

9. Estudio de sostenibilidad del proyecto

El estudio de sostenibilidad incluye el impacto ambiental y salud, el impacto social y el impacto económico, en relación con el proyecto. Los objetivos de este estudio son los siguientes:

- I. Identificar, describir y valorar los efectos que la realización de este proyecto pueda producir sobre los factores ambientales (salud, recursos naturales y el medio ambiente).
- II. Si el proyecto se llevara a cabo, explicar cuál sería la afectación sobre la sociedad (o una parte de ella) y el impacto ambiental que tendrá a lo largo de su ciclo de vida.
- III. Evaluar el coste global del proyecto realizando el presupuesto del mismo.

9.1. *Evaluación de impacto medioambiental y salud (EIAS) y social*

En primer lugar, lo que se realizará es una evaluación del peligro que conllevan algunas sustancias utilizadas en alguna fase del proyecto. Para ello, se utilizará la normativa vigente en la Unión Europea (UE) **relativa al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (*Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals, REACH*)**.


















El 18 de diciembre de 2006 se aprobó el reglamento **REACH, Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo**. Este Reglamento supone una **reforma total del marco legislativo sobre sustancias y mezclas químicas en la Unión Europea y su principal objetivo es garantizar un alto nivel de protección de la salud humana y el medio ambiente**.

Dos años más tarde, **el Reglamento (CE) Nº 1272/2008 de la comisión de 16 de diciembre de 2008 – que trata la clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (*Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures, CLP*)** ofrece un conjunto de criterios armonizados sobre el peligro de las sustancias químicas. El objetivo general es el de garantizar un nivel elevado de protección

de la salud humana y del medio ambiente, identificando todas las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas de sustancias y mezclas.

Para la realización de este apartado se utilizarán los datos de la normativa mencionada, así se conocerán los riesgos de salud y medioambientales que tienen las sustancias que se han utilizado en la realización de este proyecto de investigación. Para ello, se ha realizado la siguiente tabla esquema (*Tabla 10.1.*).

Tabla 10.1.- Clase, indicaciones y pictogramas de las sustancias involucradas en el PFC

Sustancia química	Clase de peligro			
Acetona	H225 ^(*) H319, EUH066, H336 ^(**)			
Ácido fórmico	H314 ^(**)			
Cloroformo	H302, H351, H373 ^(**)			
Dimetilformadida (DMF)	H312, H319, H332, H360 ^(**)		 	
Diclorometano (DCM)	H351 ^(**)			
DMSO	H300 ^(**)			
Etanol	H225 ^(*)			
Glutaraldehido	H316, H317, H319, H334, H360 ^(**) H401 ^(***)		 	
MTT	H315, H319, H335 ^(**)			
PHMB	H319 ^(**)			
Sodio tiosulfato	H315, H319, H335 ^(**)			
Triclosán	H315, H319 ^(**) H410 ^(****)			

En la *Tabla 10.2.* se resume el significado de los *Hazard Statements* referentes a los reactivos utilizados que se recogen en la *tabla 10.1.*

Tabla 10.2.- Hazard Statements

Statement	Clase de peligro
EUH066	La exposición repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel.
H225	Líquido y vapores muy inflamables.
H300	Letal en caso de ingesta
H302	Nocivo en caso de ingesta.
H312	Nocivo en contacto con la piel.
H314	Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
H315	Causa irritación de la piel.
H316	Causa irritación de la piel leve.
H317	Puede causar reacción alérgica en la piel.
H319	Provoca irritación ocular grave.
H332	Nocivo en caso de inhalación.
H334	Puede causar alergia o síntomas asmáticos o dificultades respiratorias si se inhala.
H335	Puede causar irritación respiratoria.
H336	Puede provocar somnolencia o vértigo.
H351	Se sospecha que provoca cáncer
H360	Puede dañar la fertilidad o el feto.
H373	Puede causar daño en órganos durante exposición prolongada o repetitiva
H401	Toxico para los organismos acuáticos.
H402	Nocivo para los organismos acuáticos.
H410	Muy tóxico para organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos

Por lo que respecta al impacto ambiental del biopolímero utilizado:

- El PLA no es una sustancia nociva según la Directiva 67/548/CEE.
- El PEG no está clasificado como peligroso según la Directiva 67/548/CEE

El *Reglamento (CE) Nº 1272/2008 (CLP)* sustituye la *Directiva 67/548/CEE del Consejo de 27 de junio de 1967*, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas; y la *Directiva 1999/45/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de mayo de 1999*, sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los *Estados* miembros relativas a la clasificación, el envasado y el etiquetado de preparados peligrosos. Eso sí, hasta el *1 de junio de 2015* estas dos directivas no serán derogadas por este *Reglamento*.

Por otra parte, se quiere evaluar el impacto que pueda tener este PFC en la sociedad si se llevara a cabo en un futuro próximo, más específicamente a aquellas personas que necesiten una regeneración/sustitución de tejido dañado. El beneficio que obtienen estas personas es que no tienen la necesidad de ser operadas para la extracción del *scaffold*, ya que éste es biodegradable; en resumen, menos dolor y menos riesgos.

En lo que respecta al efecto medioambiental de estos *scaffolds* durante su ciclo vital, debido a la biodegradabilidad de los materiales que los componen, es prácticamente insignificante.

Se incluyen también en este apartado, lo que se consideran como buenas prácticas por parte de la institución: el tratamiento de los vertidos, aguas residuales, residuos, etc. La empresa gestora de los residuos químicos generados por los laboratorios de la *ETSEIB* es *ECOCAT*, junto con la colaboración del *Centre per a la Sostenibilitat Territorial (CST)*.

Los envases para almacenar los residuos especiales son todos de polietileno de alta densidad (*HDPE*), siendo herméticos los utilizados para residuos biopeligrosos. Algunos de los envases que se han utilizado son los que se pueden ver en la *figura 10.1*

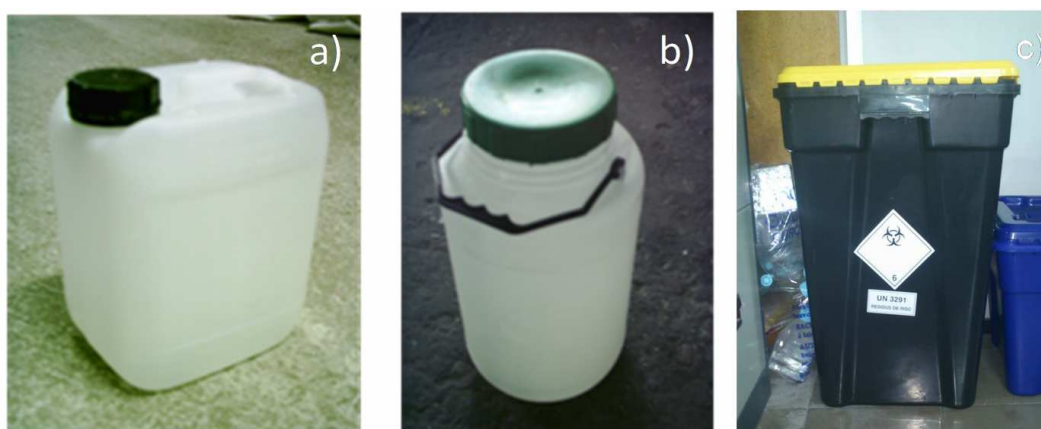


Figura 10.1.- Envases de residuos especiales. a) envase para líquidos (ej.: clorados); b) envase para sólidos (ej.: residuos de polímeros); c) envase para residuos biopeligrosos (ej.: placas utilizadas en ensayos biológicos).

9.2. Evaluación económica del proyecto

Para tomar decisiones respecto a la viabilidad del proyecto es necesario a parte de la evaluación medioambiental realizar también una evaluación económica del proyecto. Tanto un mal resultado en una evaluación medioambiental como en una económica puede llevar a la no realización de un proyecto a pesar de que éste sea de gran nivel.

Para evaluar el coste global de la realización del proyecto, lo dividiremos en cuatro partes diferenciadas:

1) Coste de disolventes y productos químicos, necesarios para la elaboración de las fibras, los medios de liberación (tampón), para la extracción de PEG de las fibras, y el estudio antibacteriano y celular. Los precios de estos disolventes, así como de los productos químicos requeridos, se han obtenido de los catálogos de las empresas suministradoras, tales como *Aldrich*, *Fluka*, etc.

2) Coste de personal.

3) Costes de equipos, teniendo en cuenta la amortización, el número de usuarios que comparten los equipos, un interés interanual del 3 % y la duración del PFC, de unos 10 meses.

4) Otros costes.

A continuación, en la *Tabla 10.3*, se mostrarán los diferentes costes, así como el coste global que lleva asociada la elaboración de este proyecto.

Tabla 10.3.- Presupuesto total PFC

PRESUPUESTO				
Concepto				Total (€)
Coste de disolventes y PQ				
Disolventes	Cantidad			
Acetona	2L			19,25
Cloroformo	1L			81,15
Diclorometano	1L			34,21
Dimetilformamida	1L			121,00
Etanol 96º	0,5L			4,26
Ácido Fórmico	0,5L			13,56
Subtotal Disolventes				273,43
Productos Químicos (PQ)	Cantidad			
PEG35000	1Kg			46,20
PLA	-	Cedido por Natureworks		
Triclosán	25g			43,30
PHMB	-	Cedido por B.Braun		
DMSO	1L			113,75
MTT	100 mg			14,00
KH ₂ PO ₄	25g			14,70
Extracto de levadura	500g			50,23
PBS	500 mL			23,10
Tiosulfato de sodio	250g			14,90
Tripsina-EDTA	100 ml			14,00
Subtotal PQ				334,18
Otros (+40% de Disolventes y PQ)				243,044
Total Disolventes y PQ				850,654
Coste de personal				
Concepto	Cantidad (h)	Precio (€/h)		
Estudio previo y documentación	90	10		900
Experimentación	700	15		10500
Análisis de resultados	240	20		4800
Total Personal				16200
Coste de equipos				
Equipo	Precio (€)	Amortización (años)	Nº usuarios	
Ángulos de contacto	3500	10	4	75,10
<i>Electrospinning</i>	3000	5	6	85,83
MO	12000	15	7	98,10
Cámara digital MO	7800	5	7	191,29
SEM	210000	15	10	1201,67
DSC	62000	10	6	886,94
FTIR	24000	10	10	206,00
RMN	240000	25	12	686,67
UV	12000	10	10	103,00
Total Equipos				3534,60
Presupuesto de actividad				20585,25
Otros costes				
+10% del presupuesto de actividad en concepto de costes de suministros				2058,53
Subtotal PFC				22643,78
Imprevistos (+3% sobre subtotal PFC)				679,31
Overhead (+21% sobre subtotal PFC)				4755,19
TOTAL PFC				28078,28

10. Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer todo el esfuerzo, tiempo y dedicación de mi tutor el Dr. Luís Javier del Valle en la realización de mi PFC. Además de su ayuda, y todos los consejos y conocimientos que me ha transmitido durante este tiempo, me gustaría agradecerle también que haya sabido encontrar un hueco para cada uno de sus pupilos a pesar de lo difícil que se hace a veces. Sin él, la realización de este proyecto hubiera sido imposible.

También quisiera darle las gracias al Dr. Jordi Puiggalí, por un lado, por darme la oportunidad de poder trabajar en el grupo de investigación de PSEP, y por otro, por la ayuda prestada y dedicar parte de su tiempo en la realización de este PFC. También quisiera agradecer a todos los compañeros del laboratorio empezando por profesores, doctorandos y resto de compañeros que están realizando su PFC en el mismo. De buen seguro, todos aportaron su granito de arena.

Debo hacer una mención especial para Elena Llorens, una persona que siempre está dispuesta a ofrecer su ayuda en todo momento y de verdad quisiera agradecerle todo el tiempo y esfuerzos que me ha dedicado durante todo este periodo. Estoy totalmente convencido que si no fuera por ella, este PFC no sería una realidad. No fue un camino fácil, hubo buenos y malos momentos, pero siempre tuve su ayuda hasta el último momento.

Por último, quisiera dar las gracias a mi familia, empezando por mis padres, Josep y Montserrat, por toda la paciencia que han tenido durante todos estos años, a mis hermanos Albert y Laura, y a mi pequeño sobrino Iván, por todos los buenos momentos que he compartido con ellos durante este periodo.

No quisiera antes acabar sin darle las gracias a Simona Havranova. Este proyecto lo empezamos juntos pero no pudimos terminarlo de igual manera, aún así, debo agradecerle todo lo que ella me enseñó, a creer en uno mismo, a no rendirse nunca y a conseguir todo lo que uno se propone en la vida. Si a alguien le debo el que este proyecto sea una realidad, ella es la persona.

11. Bibliografía

- [1] CHANDRA R., RUSTGI R. *Biodegradable Polymers. Progress in Polymer Science.* 1998, Vol. 23, p. 1273-1335.
- [2] INDUSTRY COUNCIL. *Biodegradable Polymers: a Review.* Technical Report, ASTM. 2000, p. 6-7.
- [3] MORIANA-TORRÒ, R. *Desarrollo y caracterización de biocomposites enfibrados procedentes de recursos renovables.* Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València, Octubre 2010, p. 21-22.
- [4] CALMON-DECRIAUD A., BELLON-MAUREL V., IVESTRE F. *Standard Methods for Testing Aerobic Biodegradation of Polymeric, Review and Perspectives.* Advances. Polymer Science. 1998, Vol. 135, p. 29-32.
- [5] LANGFORD J. I, WILSON A. J. C. *Scherrer after sixty years: A survey and some new results in the determination of crystallite size.* Journal of Applied Crystallography. 1978, Vol.11(2), p. 102-113.
- [6] CHO T-Y., STROBL G., *Temperature dependent variations in the lamellar structure of poly(L-lactide).* Polymer. 2006, Vol. 47 (4), p. 1036-1043.
- [7] SILL T.J., VON RECUM H.A. *Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering.* Biomaterials, Mayo 2008, Vol. 29(13), p. 1989-2006.
- [8] AGARWAL S., WENDORFF J.H., GREINER A. *Use of the electrospinning technique for biomedical applications.* Polymer. 2008, Vol. 49, p. 5603-5621.
- [9] PERIS CAMPODARBE, S. *Síntesis y caracterización de poliéteres obtenidos con el sistema iniciador poliiminofosfaceno (t-Bu-P4)3.5-di-terc-butilfenol.* Tesis doctoral, Departamento de Química Analítica y Química Orgánica, Universitat Rovira i Virgili, Junio 2005, p. 3-5.
- [10] PIELICHOWSKI P., FLEJTUCH K. *Differential Scanning Calorimetry Studies on Poly(ethylene Glycol) with Different Molecular Weights for Thermal Energy Storage Materials.* Polymer for Advanced Technologies. 2002, Vol. 13, p. 690-696.
- [11] DEL VALLE L.J., DÍAZ A., ROYO M., RODRÍGUEZ-GALÁN A., PUIGGALÍ J. *Biodegradable polyesters reinforced with triclosán loaded polylactide micro/nano fibers: Properties, release and biocompatibility.* eXPRESS Polymer Letters. 2012, Vol. 6, p. 266-282.
- [12] FRENOT A., CHRONAKIS I.S. *Polymer nanofibers assembled by electrospinning.* Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2003, Vol. 8, p. 64-65.

- [13] MIDDLETON J.C., TIPTON A.J. *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*. *Biomaterials*, 2000, Vol. 21, p. 2335-2346.
- [14] HAYASHI T. *Biodegradable polymers for biomedical applications*. *Program Polymer Science*. 1994, Vol 19, p. 663-702.
- [15] KOHN J., LANGER R. *Biomaterials Science*, (ed. B. Ratner et al), 64; 1996, New York, Academic Press.
- [16] PACHENCE J.M, KOHN J. *Principles of tissue engineering*, (ed. R. Lanza et al.), 273; 1997, New York, Academic Press.
- [17] MIKOS A.G, TEMENOFF J.S: *Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2000, Vol. 3(2), p.2.
- [18] FRENOT A., CHRONAKIS I.S. *Polymer nanofibers assembled by electrospinning*. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2003, Vol. 8, p. 64-65.
- [19] SILL T.J., VON RECUM H.A. *Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering*. *Biomaterials*. 2008, Vol. 29, p. 1989-2006.
- [20] MAQUET V. and R. JEROME. *Design of Macroporous Biodegradable Polymer Scaffolds for Cell Transplantation*. *Materials Science Forum*. 1997, Vol. 250, p. 15-42.
- [21] R. C. THOMSON, M. C. WAKE, M. YASZEMSKI and A. G. MIKOS: *Advanced Polymer Science*. 1995, Vol. 122, p. 245-274
- [22] IMAZ I., HERNANDO J., RUIZ-MOLINA D., MASPOCH D., *Metal-Organic Spheres as Functional Systems for Guest Encapsulation*. S.I.: *Angewandte Chemical International Edition Engl*. 2008 Dec 23.
- [23] KORBURGER, T., HÜBNER, N., BRAUN, M., SIEBERT, J., KRAMER, A., *Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010, Vol 65, p. 1712-179.
- [24] KAEHN, K. *Polyhexanide: a safe and highly effective biocide*. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2010, Vol 23, p.7-16.
- [25] ROSE, F., SWAIN, G. *Polymeric diguanides*. *Gran Bretaña Patente* 702.268, 13, Enero 1954.
- [26] LEBEL, O., MARIS, T., WUEST, J. *Hydrogen-bonded networks in crystals built from bis(biguanides) and their salts*. *Canadian Journal of Chemistry*. Vol. 84, 2006, p. 1426-1433.

- [27] SINHA V.R., BANSAL K., KAUSHIK R., KUMRIA R., TREHAN A. *Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: and overview*. International Journal of Pharmaceutics. 2004, Vol. 278(1), p. 1-23.
- [28] KOCKISCH S., REES G.D., TSIBOUKLIS J., SMART J.D. *Mucoadhesive, triclosán-loaded polymer microspheres for application to the oral cavity: preparation and controlled release characteristics*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2005, Vol. 59(1), p. 207-216.
- [29] CHUNG D., PAPADAKIS S., YAM K. *Evaluation of a polymer coating containing triclosán as the antimicrobial layer for packaging materials*. International Journal of Food Science & Technology. 2003, Vol. 38(2), p. 165-169.
- [30] BOGNITZKI M., CZADO W., FRESE T., SCHAPER A., HELLWIG M., STEINHART M. *Nanostructured Fibers via Electrospinning*. Advanced. Materials, 2001, Vol. 13, p. 70-72.
- [31] BHARDWAJ N., KUNDU C. *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology Advances. 2010, Vol. 28, p. 325-347.
- [32] BURGER C., HSIAO B.S., CHU B. *Nanofibrous materials and their applications*. Annual Review Materials Research. 2006, Vol. 36, p. 333-368.
- [33] BUCHKO C. J., CHEN L. C., SHEN Y., MARTIN D. C. *Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films*. Polymer. 1999, Vol. 40(26), p. 7397-7407.
- [34] BUCHKO C. J., KOZLOFF K. M., MARTIN D. C. *Surface characterization of porous, biocompatible protein thin films*. Biomaterials. 2001, Vol. 22(11), p. 1289-1300.
- [35] LIAO T., ADANUR S. *Computerized failure analysis of nonwoven fabrics based on fiber failure criterion*. Textile Research Journal. 1999, Vol. 69(7), p. 489-496.
- [36] BUSCHLE-DILLER G., COOPER J., XIE Z., WU Y., WALDRUP J., REN X. *Release of antibiotics from electrospun bicomponent fibers*. Cellulose. 2007, Vol. 14(6), p. 553-562.
- [37] AGRAWAL C. M., RAY R. B. *Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research. 2001, Vol. 55(2), p. 141-150.
- [38] JIN R., SHAH N.H., MALICK A.W., RHODES C.T. *Controlled Drug Delivery by Biodegradable Poly(Ester) Devices: Different Preparative Approaches*. Drug Development and Industrial Pharmacy. 1998, Vol. 24(8), p. 703-727.
- [39] IMAZ I., HERNANDO J., RUIZ-MOLINA D., MASPOCH D. *Metal-Organic Spheres as Functional Systems for Guest Encapsulation*. Angewandte Chemical International Edition. 2009, Vol. 48(13), p. 2325-2329.

- [40] RAFAEL USERO & NATALIA SUÁREZ. *Electrospinning de poliesteramidas biodegradables*. Proyecto final de carrera, Ingeniería Técnica Química, EUETIB, UPC, Julio 2009, p. 21-22.
- [41] ANGAMMANA, C.J., JAYARAM S.H. *Effects of Electric Field on the Multi-jet Electrospinning Process and Fiber Morphology*. IEEE Xplore. 2011, Vol. 47(2), p. 1028-1035.
- [42] WOODWARD, R. *Contact angle measurements using the drop shape method*. Porstmouth: physics department of oregon's college of engineer.
- [43] FORMHALS A. US Patent. 1934, 1,975,504.
- [44] HUANG Z-M., ZHANG Y-Z, KOTAKI M., RAMAKRISHNA S. *A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites*. Composites Science and Technology. 2003, Vol. 63, p. 2223-2253.
- [45] SHIN Y.M., HOHMAN M.M., BRENNER M.P., RUTLEDGE G.C. *Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities*. Polymer. 2001, Vol. 42, p. 9955-9967.
- [46] WANG Z-G., WAN L-S., LIU Z., *Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2009, Vol. 56 (4), p. 189-195.
- [47] MARTÍNEZ P., MARÍN P. *Diseño y estudio de una máquina de Electrospinning*. Proyecto final de carrera, Ingeniería Técnica Química, EUETIB, UPC, Julio 2009.
- [48] LI D; XIA Y; *Electrospinning of nanofibers: Reinventing the Wheel?*; Advanced Materials. 2004, Vol. 16 (14), p. 1151-1170.
- [49] HOHMAN M.M., SHIN M., RUTLEDGE G., BRENNER M.P. *Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory*. Physics of Fluids. Vol. 13, 2001, p.2201-20.
- [50] KIM K., LUU Y.K., CHANG C., FANG D, HSIAO B.S., CHU B., HADJIARGYROU M. *Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds*. Journal of Controlled Release. 2004, Vol. 98(1), p. 47-56.
- [51] MAI S., ABBOT A., NORTON, D.; MCKEAN, R.; RYAN A. J. *Synthesis and Characterization of Block Copolymers of Polyoxyethylene and Polylactide with Different Architectures*. Macromolecular Chemistry and Physics. 2009, Vol. 210 10), p. 840-851.
- [52] SPASOVA M., STOILOVA O., MANOLOVA N., RASHKOV I. *Preparation of PLLA/PEG Nanofibers by Electrospinning and Potential Applications*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers. 2007, Vol. 22, p. 62-76.

- [53] WANG B-Y., FU S-Z., NI P-Y., PENG J-R., ZHENG L., LUO F., LIU H., QIAN Z-Y. *Electrospun polylactide/poly(ethylene glycol) hybrid fibrous scaffolds for tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2012, Vol. 100A(2), p. 441-449.
- [54] NI P., FU S., FAN M., GUO G., SHI S., PENG J., LUO F., QIAN Z. *Preparation of poly(ethylene glycol)/polylactide hybrid fibrous scaffolds for bone tissue engineering*. International Journal of Nanomedicine. 2011, Vol. 6, p. 3065-3075.
- [55] XU X., ZHUANG X., CHEN X., WANG X., YANG L., JING X. *Preparation of Core-Sheath Composite Nanofibers by Emulsion Electrospinning*. Macromolecular Rapid Communications. 2006, Vol. 27(19), p. 1637-1642.
- [56] XU X., CHEN X., MA P., WANG X., JING X. *The release behavior of doxorubicin hydrochloride from medicated fibers prepared by emulsion-electrospinning*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2008, Vol. 70(1), p. 165-170.
- [57] HIGUCHI T., *Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drug dispersed in solid matrices*. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 52(12), 1963, p. 1145-1149.
- [58] KOPINKE K.-D., REMMLER M., MACKENZIE K., MÖDER M., WACHSEN O. *Thermal decomposition of biodegradable polyesters-II. Poly(lactic acid)*. Polymer Degradation and Stability. 1996, Vol. 53(3), p. 329-342.
- [59] MADORSICY S.L., STRAUS S. *Thermal degradation of polyethylene oxide and polypropylene oxide*. Journal of Polymer Science: Part A – Polymer Chemistry. 2003, Vol. 36(130), p. 183-194.
- [60] CALDERÓN S., *Andamios temporales basados en mezclas de poliláctico-polibiguanida: material con actividad*. Proyecto final de carrera, Universitat Politècnica de Catalunya (ETSEIB). Marzo 2013.
- [61] FERRÁN R., *Preparación de andamios temporales con distintas hidrofobicidad y respuesta antibacteriana*. Proyecto final de carrera, Universitat Politècnica de Catalunya (ETSEIB). Octubre 2012.
- [62] SKOTAK M., RAGUSA J., GONZALEZ D., SUBRAMANIAN A. *Improved celular infiltration into nanofibrous electrospun cross-linked gelatin scaffolds templated with micrometer-sized polyethylene glycol fibers*. Biomedical Materials. 2011, Vol. 6, p. 055012-22.
- [63] DEL VALLE L.J., CAMPS R., DÍAZ A., FRANCO L., RODRÍGUEZ-GALÁN A., PUIGGALÍ J. *Electrospinning of polylactide and polycaprolactone mixtures for*

preparation of materials with tunable drug release properties. Journal of Polymer Research. Vol. 18, 2011, p. 1903-1917.

- [64] RIBEIRO C., SENCADAS V., COSTA C.M., GOMEZ RIBELLES J.L., LANCEROS-MENDEZ S. *Tailoring the morphology and crystallinity of poly(L-lactide acid) electrospun membranes.* Science and Technology of Advanced Materials. 2011, Vol. 12(1), p. 015001-10.
- [65] KEVADIYA B.D., JOSHI G.V., PATEL H.A., INGOLE P.G., ,PDY H.M. BAJAJ H.C. *Montmorillonite-alginate nanocomposites as a drug delivery system; Intercalation and in vitro release of vitamin B₁ an vitamin B₆.* Journal of Biomaterials Applications. 2010, Vol. 25(2), p. 161-177.