



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES Y
FACULTAD DE QUÍMICA**

**FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANDAMIO DE POLI (ϵ -
CAPROLACTONA) FUNCIONALIZADO CON ANHÍDRIDO MALÉICO
MEZCLADO CON HIDROLIZADOS DE COLÁGENO TIPO I COMO SISTEMA
DE LIBERACIÓN DE DICLOFENACO.**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. PEDRO JAVIER SALAS AMBROSIO

**TUTOR:
DR. RICARDO VERA GRAZIANO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

MÉXICO, AGOSTO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme una vez más la realización de otro proyecto esta vez colaborando en el Instituto de Investigaciones en Materiales y la Facultad de Química.

Al Dr. Ricardo Vera Graziano por permitirme la oportunidad de trabajar en el grupo de investigación, por su apoyo, asesoría, amistad y su confianza.

A la Dra. María Josefa Bernad Bernad, por su gran aportación en la realización de este trabajo pues con su colaboración se lograron hacer los estudios de liberación y modificación de PCL, en el laboratorio 001 de la Facultad de Química.

A Dr. Alfredo Maciel Cerda del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) por su apoyo, confianza y amistad.

A los miembros del jurado: Dra. Sofía Guillermina Burillo Amezcua, Dra. Flora Adriana Ganem Rondero, Dra. Luz María Melgoza Contreras y Dra. Elizabeth Piñón Segundo por su tiempo invertido en la culminación de este proyecto.

A los técnicos del IIM, por su aportación sumamente valiosa en el análisis de las muestras y entrega oportuna de resultados:

- Al Dr. Omar Novelo Peralta, por las sesiones de microscopia electrónica de barrido.
- Al M. en C. Miguel Ángel Canseco Martínez por los análisis ATR-FTIR.
- Al Ing. Gerardo Cedillo Valverde por la caracterización RMN-H¹.
- A la Q.F.B Damaris Cabrero Palomino por los análisis térmicos.
- Al Ing. Ernesto Sánchez Colín por los ensayos mecánicos.

A CONACYT por la beca otorgada durante la maestría cuyo número de becario fue 294738.

A DGAPA-UNAM, Proyecto IN198913

A CONACYT, Proyecto CNPq 117373

Como fruto del trabajo realizado se presentaron carteles: en el congreso de la Red de Biomateriales (IIM, 2014), así como en el Quimi UNAM 2015.

Dedicatoria

A toda mi hermosa familia y en especial a mis padres: Pedro Salas y Hormisdas Ambrosio, gracias por su apoyo.

Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico.....	4
3.1. Andamios celulares	4
3.1.1. Métodos de fabricación de andamios.....	6
3.2. Electrohilado	8
3.2.1. Aplicación del electrohilado.....	14
3.3. Biomateriales en electrohilado	15
3.3.1. Poli (ϵ -caprolactona)	15
3.3.2. Modificación de poli (ϵ -caprolactona)	17
3.3.3. Colágeno.....	18
3.4. La piel	20
3.4.1. Quemaduras.....	22
3.4.2. Inflamación y dolor.....	24
3.5. Diclofenaco.....	25
3.5.1. Farmacocinética y farmacodinamia	26
3.5.2. Toxicidad y efectos adversos.....	27
3.6. Sistemas de liberación de fármacos.....	28
3.7. Caracterización de polímeros y andamios	31
3.7.1. Espectroscopia Infrarroja con transformadas de Fourier (ATR-FTIR)	32
3.7.2. Resonancia magnética nuclear de protón.....	32
3.7.3. Determinación de pesos moleculares por GPC.....	33
3.7.4. Análisis térmico	33
3.7.5. Análisis termogravimétrico (TGA)	33
3.7.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	33
3.7.7. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	33
3.7.8. Ángulo de contacto	34
3.7.9. Pruebas mecánicas de tensión uniaxial.....	34
3.8. Diseño experimental Taguchi (DET)	35
4. Justificación.....	37

5.	Objetivo	38
5.1.	Objetivos particulares	38
6.	Hipótesis.....	39
7.	Materiales y Métodos	40
7.1.	Funcionalización de poli (ϵ -caprolactona) con anhídrido maléico.....	40
7.1.1.	Porcentaje de injerto.....	40
7.1.1.1.	Espectrofotometría	40
7.1.1.2.	Valoración ácido base	41
7.1.2.	Espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier.....	41
7.1.3.	Resonancia magnética nuclear de protón.....	41
7.1.4.	Cromatografía de permeación en gel.....	41
7.1.5.	Análisis termogravimétrico	42
7.1.6.	Calorimetría diferencial de barrido	42
7.2.	Fabricación de andamios.....	42
7.2.1.	Caracterización fisicoquímica.....	43
7.2.2.	Microscopia electrónica de barrido	43
7.2.3.	Ángulo de contacto	43
7.2.4.	Pruebas mecánicas de tensión uniaxial.....	44
7.2.5.	Ensayo de cinética de liberación	44
8.	Resultados y análisis.....	45
8.1.	Funcionalización de poli (ϵ -caprolactona) con anhídrido maléico.....	45
8.1.1.	Porcentaje de injerto.....	45
8.1.2.	Determinación de grupos funcionales por espectroscopia ATR-FTIR.....	46
8.1.3.	Determinación de estructura por RMN- H^1	47
8.1.4.	Determinación de peso molecular por cromatografía de permeación en gel (GPC)	49
8.1.5.	Temperaturas de descomposición por análisis térmico (TGA)	49
8.1.6.	Temperaturas de transición por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	51
8.1.7.	Hidrofobicidad de PCLAM por ángulo de contacto.....	52
8.2.	Andamios PCLAM/CH/DS	53
8.2.1.	Determinación de grupos funcionales por espectroscopia ATR-FTIR.....	53
8.2.2.	Temperaturas de descomposición por análisis termogravimétrico.....	55
8.2.3.	Determinación de temperaturas de transición por DSC	57

8.2.4.	Morfología por SEM	59
8.2.5.	Hidrofobicidad.....	63
8.2.6.	Pruebas mecánicas de tensión uniaxial.....	65
8.2.6.1.	Módulo de Young	65
8.2.6.2.	Porcentaje de Elongación.....	67
8.2.6.3.	Esfuerzo a la tensión en el punto máximo	69
8.2.7.	Cinética de liberación	70
9.	Conclusiones.....	79
10.	Perspectivas	80
11.	Referencias bibliográficas	81
12.	Anexos	86
12.1.	Curva de calibración de ácido acrílico	86
12.2.	Curva de calibración de diclofenaco	86
12.3.	Espectro ATR-FTIR de Diclofenaco	87
12.4.	Espectro ATR-FTIR de hidrolizados de colágeno tipo I.....	87
12.5.	Termogramas TGA y DSC de diclofenaco	88
12.6.	Termogramas TGA y DSC de hidrolizados de colágeno tipo I	89

Índice de Figuras

Figura 1 Esquema de un nanotubo de 50 nm auto ensamblado con péptidos [12].	6
Figura 2 Incremento del número de publicaciones sobre electrohilado ScienceDirect [19].	8
Figura 3 Esquema del dispositivo de electrohilado [14].	8
Figura 4 Micrografías obtenidas por SEM de electrohilados obtenidos a diferente concentración [18].	11
Figura 5 Impacto del voltaje aplicado en electrohilado de soluciones de PEO al 7 % [21].	12
Figura 6 Micrografía de SEM de nanofibras de PVDF al 20 % a) 0,5 mL/h, b) 1 mL/h, c) 2 mL/h, d) 4 mL/h [22].	13
Figura 7 Variación del diámetro de nanofibras de gelatina con respecto a la distancia del colector, electrohiladas a 1 kV/cm [23].	13
Figura 8 Principales campos de aplicación en electrohilado de acuerdo con lo patentado en Estados Unidos [18].	14
Figura 9 Secuencia del colágeno tipo I [47].	18
Figura 10 Esquema de las capas de la piel [49].	20
Figura 11 Tipos de quemadura y daño a en la piel [2].	22
Figura 12 Esquema de la estimulación del dolor, sustancias que son liberadas durante el proceso [54].	25
Figura 13 Estructura molecular de diclofenaco [56].	25
Figura 14 Tipos de liberación de fármacos. Se observa que las formulaciones de dosis doble y dosis múltiple pueden alcanzar niveles tóxicos, mientras que la modificada están en la ventana terapéutica similar a una infusión venosa.	28
Figura 15 Esquema de celda de difusión de Franz. a) Donador, b) membrana, c) chaqueta de regulación térmica, d) agitador magnético, e) receptor y f) toma de muestra	29
Figura 16 Gráfico esfuerzo-deformación. Se observan las regiones más comunes en materiales poliméricos.	34
Figura 17 Espectros ATR-FTIR de PCL y PCLAM. Se muestran las bandas a 2894, 1737 y 1681 cm^{-1} debidas al anhídrido maléico y el incremento en adsorción de C=O en la banda de 1720 cm^{-1} . PCLAM1 y 2 son los polímeros funcionalizados a 110 y 70 °C, respectivamente	46
Figura 18 Espectrogramas de resonancia magnética nuclear de protón de a) PCLAM funcionalizado a 110 °C y b) PCLAM funcionalizado a 70 °C. Se muestran los picos característicos de PCL a 1.22, 1.48, 2.15, 3.90 ppm y del AM a 3.54 ppm, cuyo carbono es el número 8 de la estructura molecular.	48
Figura 19 Termogramas de análisis termogravimétrico de: a) PCL, b) PCLAM funcionalizado a 110 °C y c) PCLAM funcionalizado a 70 °C. Se muestran las temperaturas de descomposición y el porcentaje de pérdida de peso.	50

Figura 20 Termograma comparativo de DSC. Se observan las temperaturas de transición vítrea y las de fusión para PCL y PCLAM funcionalizado a 110 y 70 °C.	52
Figura 21 Análisis ATR-FTIR de los diferentes andamios (A1 a A8) fabricados de acuerdo con el diseño experimental Taguchi (A1-A8). Se resaltan las bandas características de PCLAM (verde), diclofenaco (rojo) e hidrolizados de colágeno tipo I (morado)	54
Figura 22 Análisis termogravimétrico de los andamios obtenidos según el diseño experimental Taguchi (andamios A1 a A8). Se observan tres etapas de descomposición: Etapa I pérdida de agua de CH; Etapa II descomposición de DS; Etapa III descomposición debida a la descomposición en CO ₂ de PCLAM, DS y CH.....	56
Figura 23 Termogramas obtenidos de DSC de los andamios fabricados de acuerdo con el diseño experimental Taguchi L8 (andamios A1 a A8). Se observan las transiciones para PCLAM, DS y de reacción exotérmica de una descomposición.....	58
Figura 25 Análisis gráfico de los resultados de diámetro de fibra del diseño experimental Taguchi (A=Temperatura de funcionalización, B=proporción PCLAM:CH, C=concentración de PCLAM, D=flujo de inyección y E=voltaje). Se observa que el diámetro se ve afectado en mayor proporción por la concentración de PCLAM (C), en menor proporción por el voltaje (E), seguido del efecto B, D y A.63	
Figura 26 Análisis gráfico del diseño experimental Taguchi. De izquierda a derecha se muestra el efecto con mayor impacto, la inclinación y longitud representa la magnitud del impacto. D=Flujo, A=Temperatura de funcionalización, E= Voltaje, B= Proporción PCLAM-CH y C= Concentración PCLAM.	65
Figura 27 Análisis gráfico del módulo de Young de acuerdo con el diseño Taguchi (A=Temperatura de funcionalización, B=proporción PCLAM:CH, C=concentración de PCLAM, D=flujo de inyección y E=voltaje). De izquierda a derecha los factores que mayor impacto tienen.	67
Figura 28 Análisis gráfico del diseño Taguchi para porcentaje de elongación (A=Temperatura de funcionalización, B=proporción PCLAM:CH, C=concentración de PCLAM, D=flujo de inyección y E=voltaje). El impacto de los efectos se encuentra de izquierda a derecha, siendo la concentración de PCLAM la de menor impacto.....	68
Figura 29 Análisis gráfico del diseño Taguchi para el esfuerzo a la tensión (A=Temperatura de funcionalización, B=proporción PCLAM:CH, C=concentración de PCLAM, D=flujo de inyección y E=voltaje). El impacto de los efectos se encuentra de izquierda a derecha, siendo A y B los efectos de mayor impacto.	70
Figura 30 Cinética de liberación del andamio A1, ajuste y valores de los parámetros obtenidos de los modelos matemáticos. La información de los valores muestra que la difusión es de tipo Fick ($n < 0.5$) y además presenta una difusión desde una matriz polimérica ($k_2 = 2.16339 \times 10^{-19}$).....	71
Figura 31 Cinética de liberación del andamio A2. A) Primera etapa de análisis por un método lineal y B) por modelos matemáticos. La información de los valores demuestra hay una liberación durante las primeras 4 horas rápida y posteriormente que la liberación se rige por difusión tipo Fick ($n < 0.5$) y desde el interior de la matriz polimérica.....	71

Figura 32 Cinética de liberación de A3. Donde A representa el ajuste y valores de los parámetros obtenidos del modelo lineal y B la cinética hasta las 336 h. La información de los valores muestra que la liberación posee una velocidad de 8.13 mg/h por gramo de andamio durante las primeras 10 horas.....	72
Figura 33 Cinética de liberación del andamio A4. Donde la gráfica A representa el ajuste y valores de los parámetros obtenidos del modelo lineal y B la cinética hasta las 96 h. La información de los valores muestra que la liberación posee una velocidad de 11.84 mg/h por gramo de andamio durante las primeras 8 horas.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 34 Cinética de liberación del andamio A5. Donde la línea A representa el ajuste y valores de los parámetros obtenidos del modelo lineal y B la etapa donde no hay más liberación. La información de los valores muestra que la liberación posee una velocidad de 11.84 mg/h por gramo de andamio durante las primeras 8 horas.	73
Figura 35 Cinética de liberación del andamio A6. Donde la gráfica A representa el ajuste y valores de los parámetros obtenidos del modelo lineal y B la segunda etapa. La información de los valores muestra que la liberación posee una velocidad de 17.81 mg/h por gramo de andamio durante las primeras 4 horas.	74
Figura 36 Cinética de liberación del andamio A7. Donde la gráfica A representa el ajuste y valores de los parámetros obtenidos del modelo lineal y B la segunda etapa. La información de los valores muestra que la liberación posee una velocidad de 10.53 mg/h por gramo de andamio durante las primeras 8 horas.	75
Figura 37 Cinética de liberación del andamio A8. Donde la gráfica A representa el ajuste y valores de los parámetros obtenidos del modelo lineal y B la liberación hasta las 192 horas. La información de la tabla muestra una liberación de 18.04 mg/hora en las primeras 4 horas.	75

Índice de Tablas

Tabla 1 Parámetros con sus respectivas características [16].	9
Tabla 2 Propiedades mecánicas de PCL dependiendo su peso molecular [14]	16
Tabla 3 Fabricación de electrohilado de PCL, condiciones y diámetro de fibra obtenido.....	16
Tabla 5 Sustancias químicas seleccionadas liberadas con estímulo suficiente para causar daño del tejido [53].	24
Tabla 6 Propiedades fisicoquímicas de diclofenaco [59].	26
Tabla 7 Publicaciones sobre electrohilado como sistemas de liberación.	28
Tabla 8 Diferentes situaciones experimentales y su correspondiente tamaño de experimentos [83]	36
Tabla 9 Diseño Experimental Taguchi L8 a dos niveles	43
Tabla 13 Desplazamiento químico característico del PCL injertado con AM.....	48

Tabla 15 Resultados de ángulo de contacto. Se observa una mayor disminución del ángulo de contacto en PCLAM funcionalizado a 70 °C.	52
Tabla 16 Tipo de vibración, bandas características y asignación de las bandas encontradas por ATR-FTIR de los andamios A1 a A8 fabricados de acuerdo con el diseño experimental Taguchi L8.	55
Tabla 17 Resultados de DTGA y porcentaje de pérdida en masa de los andamios (A1 a A8) fabricados de acuerdo con el diseño experimental Taguchi. Se observa que los picos máximos de las diferentes etapas corresponden con las materias primas y las pérdidas en masa poseen diferencias debidas al diferente contenido por nivel de CH y PCLAM.	57
Tabla 18 Resultados de DSC de los andamios fabricados (A1 a A8) de acuerdo con el diseño experimental Taguchi. Se muestran la Tg, y los máximos de los procesos endotérmicos y exotérmicos encontrados, las cuales corresponden con PCLAM y DS, además de la transición exotérmica debida a la descomposición.	59
Tabla 19 Diámetro de nanofibra con su intervalo de confianza ($p=0.05$). Los andamios que mayor variación presentan son A2, A3, A5 y A6. En general los andamios poseen un diámetro superior a los 500 nm.	61
Tabla 20 Análisis de varianza del diseño experimental Taguchi para diámetro de fibra en andamios A1 a A8. Se observa que la concentración PCLAM es la variable de mayor impacto.	62
Tabla 21 Análisis de varianza del diseño experimental Taguchi para Ángulo de contacto. Se observa que la concentración PCLAM no influye en el resultado y el de mayor impacto es el flujo de inyección.	64
Tabla 22 Análisis de varianza para el módulo de Young. Los efectos que mayor impacto tienen son la temperatura de funcionalización, proporción PCLAM-CH, concentración PCLAM y flujo de inyección.	66
Tabla 23 Análisis de varianza del diseño Taguchi para el porcentaje de elongación de los andamios. El efecto de menor influencia es la concentración PCLAM.	68
Tabla 24 Análisis de varianza del diseño Taguchi para el esfuerzo a la tensión de los andamios. Dos efectos son lo que influyen en el resultado y son la temperatura de funcionalización y la proporción PCLAM-CH.	69
Tabla 25 Comparación de los resultados obtenidos en las cinéticas de liberación de los andamios elaborados de acuerdo con el diseño experimental Taguchi. Se observa que la liberación.	76
Tabla 26 ANOVA del gradiente de liberación de la segunda etapa para los andamios fabricados de acuerdo al diseño experimental Taguchi. Se observa que tanto la concentración de PCLAM como el voltaje aplicado son los efectos que impactan mayormente.	77

Índice de Abreviaturas

PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
AM	Anhídrido maléico
PCLAM	Poli (ϵ -caprolactona) funcionalizado con anhídrido maléico
PCLAM 1	Poli (ϵ -caprolactona) funcionalizado con anhídrido maléico a 110 °C
PCLAM 2	Poli (ϵ -caprolactona) funcionalizado con anhídrido maléico a 70 °C
CH	Hidrolizados de colágeno tipo I
DS	Diclofenaco sódico
SEM	Microscopia electrónica de barrido
ATR-FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier y reflectancia atenuada
RMN-H¹	Resonancia magnética nuclear de protón
TGA	Análisis termogravimétrico
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
Tg	Transición vítrea
Tm	Temperatura de fusión
ASQ	Sociedad americana para la calidad
DE	Diseño de experimentos
DET	Diseño de experimentos Taguchi
TFE	Trifluoroetanol
PLGA	Poli ácido láctico- <i>co</i> -glicólico
PLLA	Poli ácido <i>L</i> -láctico
AINE	Antiinflamatorios no esteroideo
ECM	Matriz extracelular
TIPS	Separación de fases inducida térmicamente
PVA	Poli vinil alcohol
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
PLLA-CL	Poli ácido láctico- <i>co</i> -caprolactona
PEO	Oxido de polietileno
HFP	1,1,1,3,3,3 Hexafluoro-2-propanol
PGE₂	Prostaglandinas E ₂
IL-6	Interleucina 6
IFN-γ	Interferon γ
NK	Células asesinas naturales
COX-1 y 2	Ciclooxigenasa 1 Y 2
DL₅₀	Dosis letal 50 oral en ratones
ANOVA	Análisis de varianza
BPO	Peróxido de benzoilo
THF	Tetrahidrofurano
KOH	Hidróxido de potasio
PBS	Buffer de fosfatos salino pH=7.4
M	Concentración molar (mol/L)
% w/v	Concentración porcentaje masa/volumen
mm Hg	Milímetros de mercurio
kV	Kilo voltios
cm	Centímetros
mL	Mililitros
nm	Nanómetros

h	Horas
MPa	Mega pascales
N	Newton
m	Metro
Mn	Peso molecular número promedio
Mw	Peso molecular peso promedio
PDI	Índice de polidispersidad
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución

1. Resumen

Las lesiones por quemaduras ocurren con mayor frecuencia en los niños, generando dolor, inflamación, posible infección, etc., existen diferentes tratamientos para la regeneración de tejidos como injertos y la administración de fármacos para tratar los síntomas. En este trabajo se fabricaron sistemas de nanofibras obtenidos por medio de electrohilado a partir de la mezcla: poli (ϵ -caprolactona) funcionalizado con anhídrido maléico, hidrolizados de colágeno tipo I y diclofenaco; para su potencial aplicación en liberación de medicamentos y regeneración de tejidos. Se caracterizaron utilizando microscopía electrónica de barrido (*SEM*), espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (*ATR-FTIR*), resonancia magnética nuclear de protón (*RMN- H^1*), pruebas mecánicas de tensión uniaxial, análisis termogravimétrico (*TGA*) y calorimetría diferencial de barrido (*DSC*). La evaluación se realizó con base al diseño experimental Taguchi L8 cuyas variables independientes fueron: temperatura de funcionalización, proporción de polímeros (PCLAM:CH), concentración de PCLAM, flujo de inyección y voltaje. Por último se realizaron estudios de liberación de fármaco.

Se obtuvieron fibras con diámetros de 100 nm a 1 μ m, las fibras no descomponen a temperatura corporal, los componentes no presentan cambios durante el proceso de electrohilado, muestran una liberación constante durante dos semanas y además se obtuvieron las condiciones a las cuales es posible optimizar el sistema, por lo que tiene potencial para ser una alternativa en la regeneración de tejidos en lesiones por quemaduras y en el tratamiento de los síntomas como la inflamación y el dolor.

2. Introducción

Una quemadura es un traumatismo de la piel o de otros tejidos corporales causado por el calor, ocurre cuando algunas o todas las células de la piel o de otros tejidos son destruidas por líquidos y, sólidos calientes o llamas, adicionalmente las lesiones causadas por la radiación, la radiactividad, la electricidad, la fricción o el contacto con productos químicos también se consideran quemaduras [1]. Existen tres grados de quemaduras y dependerán del daño a los tejidos, las de primer grado afectan la epidermis, las de segundo la dermis y las de tercero pueden dañar tejido óseo. Los principales síntomas son el dolor, inflamación y la posible infección para las de primer y segundo grado, mientras que en las de tercero puede no presentarse el dolor debido al daño en el tejido nervioso, para tratar estos síntomas son recetados antiinflamatorios, antibióticos y con el objetivo de promover el crecimiento celular en las quemaduras de segundo y tercer grado se colocan implantes [2].

Una técnica novedosa para promover la regeneración celular es la fabricación de andamios de microfibras (*scaffold* en inglés), diversas investigaciones apuntan que ha sido posible regenerar tejido óseo a partir de este tipo de materiales, esto se debe principalmente a los espacios que existen dentro de estos andamios pues permiten el crecimiento de las células al simular la matriz extracelular de los tejidos. Las microfibras sintetizadas pueden ser de polímeros aprobados por la *FDA*, biodegradables y biocompatibles como lo son poli ácido láctico-*co*-glicólico (PLGA), poli ácido *L*-láctico (PLLA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL), etc., que son acoplados con colágeno o con otras moléculas para permitir la adhesión celular [3-5].

Para la elaboración de microfibras existe una técnica conocida como electrohilado, la cual consiste en extruir una solución polimérica a través de un capilar metálico utilizando una diferencia de potencial. Ejemplo de ello es el trabajo realizado por Ospina [3] en el cual se fabrica un polímero de poli-(ácido láctico)-anhídrido maléico-colágeno (PLLA-g-AM/Col) utilizando la técnica de electrohilado, con el fin de utilizar este andamio para la regeneración de tejidos, además por sus propiedades biodegradables, biocompatibles y presentar adhesión celular gracias al colágeno.

Unos de los síntomas producidos por una quemadura son el dolor y la inflamación por lo cual son administrados analgésicos y antiinflamatorios, entre los cuales se encuentran antiinflamatorios no esteroideos (AINE), así como los que poseen un núcleo esteroideo en su estructura molecular. Un AINE conocido es el diclofenaco, cuyo mecanismo de acción no ha sido totalmente descubierto pero existen evidencias de que inhibe las ciclooxigenasas

I y II incluyendo la lipooxigenasa, ofreciendo analgesia y disminuyendo la inflamación y recientemente se ha encontrado que a ciertas concentraciones es posible utilizarlo como un inhibidor de crecimiento bacteriano [6].

Debido a lo anterior en este trabajo se fabricó un andamio de microfibras de: PCL funcionalizado con anhídrido maléico, colágeno hidrolizado tipo I y diclofenaco; para que éste sea capaz de disminuir el dolor y la inflamación de las lesiones por quemadura. Llevando a cabo las pruebas de caracterización como lo son resonancia magnética nuclear (RMN), microscopia electrónica de barrido (*SEM*), calorimetría diferencial de barrido (*DSC*), análisis termogravimétrico (TGA), análisis de tensión uniaxial y la cinética de liberación del fármaco.

3. Marco teórico

3.1. *Andamios celulares*

La ingeniería de tejidos es una interdisciplina que aplica principios de ingeniería (ciencia de materiales e ingeniería biomédica) y ciencias de la vida (bioquímica, genética, biología celular y molecular) para desarrollar sustitutos que puedan restaurar, mantener o mejorar las funciones celulares. Asimismo la ingeniería de tejidos incluye el aislamiento de células, la inducción del crecimiento por sustancias y colocar células dentro y sobre los andamios [7].

Los tejidos del cuerpo humano están formados de dos principales constituyentes: células, las cuales regulan procesos corporales, realizan mantenimiento normal y cicatrización de heridas; y la matriz extracelular (*ECM*, por sus siglas en inglés), una colección de macromoléculas, las cuales sirven como el mayor componente estructural del cuerpo. La *ECM* forma la mayor proporción del volumen del tejido y provee la peculiaridad geométrica a cada uno de ellos. Consiste en principio, de fibras con diámetro entre 50 y 500 nm, tridimensionales compuestas de polisacáridos y polímeros naturales (colágeno, elastina, fibrinógeno, etc.) y constantemente son sintetizadas, secretadas, orientadas y modificadas por las células para su soporte. Históricamente la función de la *ECM* se consideraba sólo estructural, sin embargo actualmente se sabe que interactúa constantemente con la célula en los procesos de formación de tejidos, cicatrización y apoptosis [8]. Cuando el tejido es dañado en su totalidad por cualquier tipo de lesión son requeridos prótesis, trasplantes o andamios.

De tal manera que es necesario obtener mediante ingeniería de tejidos sistemas que mimeticen las funciones de la *ECM* los cuales son llamados andamios y para su desarrollo se utiliza una combinación de biomateriales, células y moléculas bioactivas [8]. Un andamio ideal debe de cumplir con los siguientes requerimientos:

I. Biocompatibilidad

Habilidad del andamio para funcionar en condiciones óptimas sin ocasionar una reacción inmune o inflamatoria. Si el andamio es no tóxico y degradable eventualmente el tejido nuevo lo reemplazará, además si es biológicamente activo, puede integrarse al tejido circundante, sin embargo, si es biológicamente inactivo

puede encapsularse; en el peor de los casos cuando es tóxico ocurre rechazo y necrosis del tejido [8].

II. Biodegradabilidad

Se debe tomar en cuenta que los andamios generalmente son temporales y que sólo deben funcionar para que el organismo repoblé la zona afectada y eventualmente construya su propia *ECM*, lo ideal es que se biodegraden de manera directamente proporcional a la regeneración del tejido. Los productos de degradación no deben ser tóxicos y deben eliminarse fácilmente del organismo, ya sea por vía metabólica o excreción [9].

III. Propiedades mecánicas

Idealmente, un andamio debe tener las mismas propiedades mecánicas acorde con el sitio anatómico donde se coloca y en la práctica debe ser lo suficientemente resistente para implantarlo quirúrgicamente. Producir andamios que se adecuen a estas características es uno de los grandes retos para la ingeniería de tejidos en especial para la ingeniería en huesos y cartílago. Los andamios que se han obtenido han tenido buenas propiedades mecánicas pero son deficientes en porosidad lo que se traduce al momento de implantarlos en una baja capacidad de vascularización, por lo que se tiene que encontrar un balance entre propiedades mecánicas y suficiente arquitectura porosa para permitir la infiltración celular y una buena vascularización [9].

IV: Arquitectura y naturaleza

Debe poseer una estructura altamente porosa e interconectada para asegurar la penetración celular y una adecuada difusión de nutrientes hacia el interior del andamio, de tal manera que permita la proliferación celular y la formación de *ECM*, además de que esta porosidad permita el drenaje de sustancias de desecho fuera del organismo evitando así que afecte a órganos circundantes. Otra clave es la superficie del andamio, las células interactúan con el andamio vía grupos químicos (ligandos) de la superficie del material. Los andamios sintetizados de material extracelular como colágeno son capaces de permitir la adhesión celular y generalmente los materiales sintéticos necesitan agregar grupos que permitan esta

adhesión. De esta manera es necesario obtener andamios con una porosidad adecuada y superficie óptima que permita la proliferación celular [9].

IV. Manufactura

Con el fin de conseguir un andamio clínica y comercialmente viable, su fabricación debe ser económica y escalable a nivel industrial [9]. Además debe ser fácilmente esterilizable y de fácil manejo de acuerdo al tejido que se debe regenerar [8].

En México diversas instituciones de carácter público y privado trabajan para desarrollar andamios para utilizarlos en ingeniería de tejidos entre ellos figuran el Instituto Nacional de Rehabilitación, Hospital Gea González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Tecnológico de Monterrey, por su puesto la Universidad Nacional Autónoma de México, entre otras, sin embargo, la demanda es muy alta, tan sólo en fracturas de fémur se registran 168 mujeres y 98 hombres por 100,000, si nos enfocáramos en lesiones cardíacas, de rótulas, o bien en quemaduras (107.26 por cada 100,000 habitantes) el mercado sería muy grande [10].

3.1.1. Métodos de fabricación de andamios

Para fabricar andamios existen diversos métodos que han sido empleados en la ingeniería de tejidos entre ellas se encuentra: electrohilado, auto ensamblaje, lixiviado de partículas, espumado por gas, depósito en fundido y separación de fases [11]. El primero es el más económico y se describe en detalle en la siguiente sección por ser el utilizado en este trabajo.

El auto ensamblaje es utilizado con el objetivo de fabricar arquitecturas supramoleculares (Figura 1), es mediada por enlaces no covalentes tales como puentes de hidrogeno, interacciones van der Waals, electrostáticas e hidrofóbicas. Todas las biomoléculas incluyendo los péptidos y proteínas interactúan y se auto ensamblan para formar estructuras bien definidas con funcionalidad asociada a ésta, por lo que pueden funcionar como bloques de construcción para fabricar

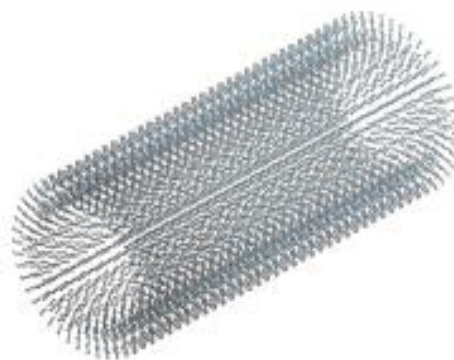


Figura 1 Esquema de un nanotubo de 50 nm auto ensamblado con péptidos [12].

materiales [12]. Ejemplos de ellos incluyen péptidos auto-complementarios iónicos (Figura 1), los cuales están formados de estructuras β -fila en solución acuosa con diferentes surfactantes (uno hidrófilo y otro hidrófobo). Los residuos hidrofóbicos se protegen del agua y se van ensamblando entre ellos en el medio semejando a los sistemas *in vivo* [12, 13].

El lixiviado de partículas es uno de los métodos más empleados en la fabricación de regeneración de tejidos, consiste en colocar partículas de cierto tamaño (azúcar, sal o cera) en un molde en el que se vierte una solución polimérica, una vez que el disolvente se evapora se somete a un tratamiento para eliminar las partículas y obtener una matriz porosa. El principal problema es que si no existe la suficiente interconexión entre partículas, éstas pueden quedar atrapadas en la matriz [14].

El espumado por gas se basa en generar poros en una solución polimérica a partir de la liberación de un gas, por ejemplo utilizando bicarbonato y en presencia de una solución ácida se formará la espuma, sin embargo, existe la probabilidad de drenado causando así un andamio heterogéneo [14].

El depósito en fundido consiste en diseñar un modelo computacional e imprimirlo utilizando un extrusor de depósito en fundido, el cual dibuja tridimensionalmente el andamio capa por capa, la ventaja de esta técnica es que no se utilizan solventes en la fabricación de andamios y se consigue una porosidad del 80% [14].

La última técnica consiste en la separación de fases inducida térmicamente (*TIPS*, por sus siglas en inglés), fue desarrollado recientemente para fabricar nanofibras miméticas al colágeno natural. El proceso incluye: disolución polimérica, separación de fases bajando la solubilidad del polímero (gelación) y liofilización. La red de fibras depende del disolvente y la temperatura de gelación [11]. Ejemplo de esta técnica lo demuestran los andamios obtenidos por Ma & Zhang [15] utilizando polímeros como el poli (L-ácido láctico) (PLLA) y poli (D,L-ácido láctico-glicólico) (PLGA).

3.2. Electrohilado

La técnica fue analizada por Rayleigh en 1897 al evaluar el efecto de inducción de cargas eléctricas en chorros de agua, así como la inestabilidad asimétrica del flujo del jet [16]. El primer electrohilado fue patentado por Morton WJ a principios del siglo XX [17] de la misma manera que Formhals publicó patentes entre 1934 y 1944 donde describía la

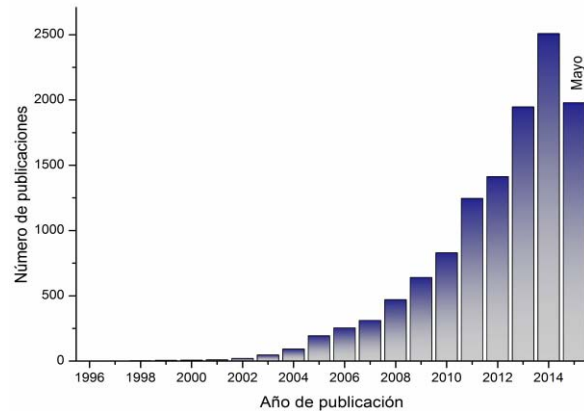


Figura 2 Incremento del número de publicaciones sobre electrohilado ScienceDirect [19].

producción de polímeros filamentosos usando fuerza electrostática [18], sin embargo, hasta el año 1994 se acuñó el término “electrohilado” (*electrospinning en inglés*) e investigadores como Reneker profundizaron en esa técnica, gracias a esto el número de publicaciones para su investigación ha ido en aumento de acuerdo con una búsqueda del término *electrospinning* en la base de datos de *ScienceDirect* (Figura 2) [19].

El fundamento de la técnica consiste en aplicar un alto voltaje a una solución polimérica en la punta de un inyector para que la gota que se forma experimente dos tipos de fuerzas electrostáticas: repulsión entre las cargas de superficie y fuerza coulombica que ejerce un campo eléctrico externo (disipación de carga). La densidad de carga requerida está en función del voltaje de ruptura o aparición del cono de Taylor, es decir, la gota de líquido se

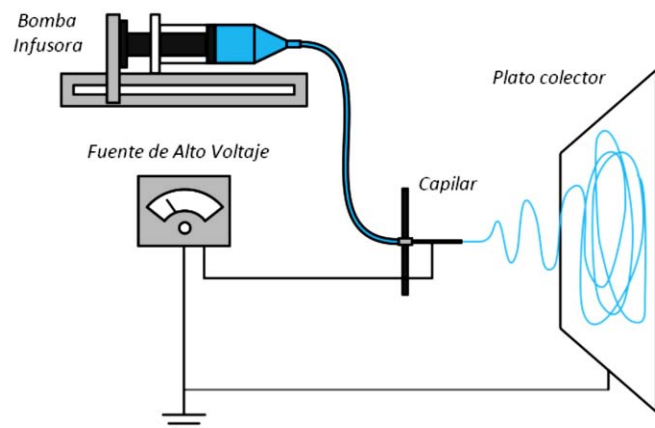


Figura 3 Esquema del dispositivo de electrohilado [14].

distorsiona formándose el cono de Taylor. Una vez que la fuerza del campo eléctrico ha sobrepasado su valor límite las fuerzas electrostáticas superan la tensión superficial de la disolución del polímero y fuerza la eyección de un chorro líquido desde la punta del inyector.

Tabla 1 Parámetros con sus respectivas características [16].

Parámetro	Característica que aporta	
Concentración de la solución de polímero	↑	Dificulta el paso de la solución a través del capilar.
	↓	Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al plato colector.
Tensión superficial	↑	Aparición de defectos (<i>beads</i> en inglés) en las fibras.
	↓	Obtención de fibras lisas, para disminuir la tensión superficial se pueden adicionar solventes con baja tensión como el etanol.
Conductividad de la solución	↑	Mayor transporte de cargas, mayor estiramiento de la solución, fibras más delgadas.
	↓	Menor transporte de cargas, menor estiramiento de la solución, fibras más gruesas.
Voltaje	↑↑	Fibras gruesas, distorsión del jet, aparición de beads.
	↓	Poco impulso para llegada de la solución al plato colector.
Flujo de salida	↑	Fibras más gruesas, beads con mayores tamaños.
	↓	Mayor tiempo para evaporación del solvente, fibras sin defectos.
Distancia aguja-colector	↑	Las fibras pueden romperse debido a su propio peso. Mayor estiramiento de la solución, obtención de fibras delgadas
	↑↑ ↓↓	Aparición de defectos en las fibras al trabajar con muy altas o muy bajas distancias
	↓	Poco tiempo para la evaporación del solvente por tanto, las fibras llegan húmedas al plato colector.
Humedad relativa	↓	Aparición de poros en las nanofibras.

El chorro electrificado sufre una elongación y movimiento de giro de peonza dando lugar a la formación de una hebra fina y larga. Conforme el chorro líquido se estira y el disolvente se evapora, su diámetro puede ser reducido sustancialmente. La fibra cargada se deposita aleatoriamente sobre la superficie del colector en la base con diámetros que van de los 3 nm hasta 1 μm [16, 18, 20].

El dispositivo para electrohilar (Figura 3) está compuesto básicamente de tres partes: un tubo capilar del cual debe ser expulsada la solución polimérica (aguja, cono, etc.); una fuente de voltaje que posee dos electrodos los cuales deben conectarse uno a la punta metálica del inyector de la solución y otro a una placa colectora de metal (lámina, mandril rotativo, etc.) donde se depositarán las fibras posterior a la evaporación del disolvente. El disolvente residual se puede eliminar en estufa al vacío pues puede ser perjudicial para la salud en el caso de que la aplicación sea biológica [16].

La técnica puede ser desarrollada de forma horizontal o vertical según se desee, sin embargo, el principal inconveniente al trabajar en posición vertical es la posible salida de gotas de solución desde el capilar hacia el plato colector las cuales pueden caer sobre las fibras depositas haciendo defectuosa la superficie de las mismas e interrumpiendo el proceso. Para impulsar la solución a través del capilar puede utilizarse una bomba de infusión; o bien, si se trabaja de forma vertical con cono como capilar, la salida de la solución puede estar determinada por la fuerza de gravedad ligada a la viscosidad de la solución [16].

Diversos factores son los que se relacionan con las propiedades y características de las fibras obtenidas por medio de electrohilado, por lo que su control durante el proceso es indispensable. En la Tabla 1 se resumen los parámetros característicos de las fibras obtenidas.

I. Concentración de la solución:

Es uno de los parámetros determinantes del tamaño y la morfología de las fibras. La concentración de polímero en la solución influencia tanto la viscosidad como la tensión superficial de esta, la viscosidad de una solución de polímero está relacionada con el enredo de las cadenas poliméricas, si las cadenas son menos enredadas, la solución tendrá una viscosidad baja y viceversa. El diámetro de las fibras tiende a aumentar con la viscosidad (Figura 4). Si la solución está muy diluida las fibras de polímero se rompen en gotas antes de llegar al plato colector debido al efecto de la tensión superficial, de igual forma si la solución está muy concentrada entonces las fibras no se podrán formar

debido a la alta viscosidad, lo que dificulta el paso de la solución a través del capilar [18].

II. Tensión superficial

La tensión superficial tiende a reducir el área superficial por unidad de masa, cambiando los

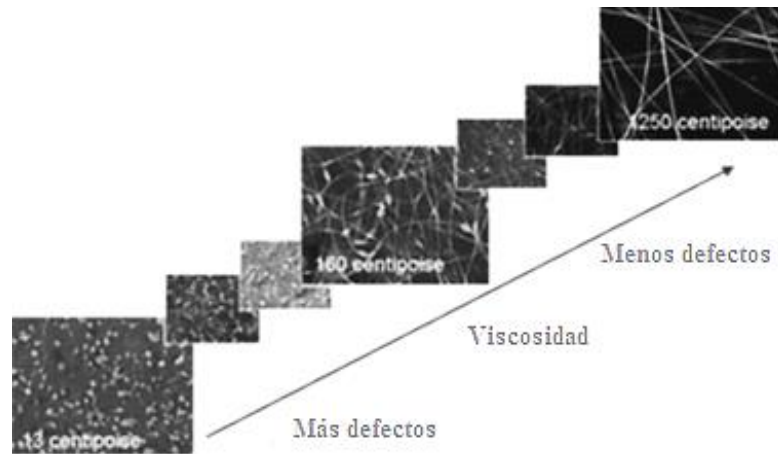


Figura 4 Micrografías obtenidas por SEM de electrohilados obtenidos a diferente concentración [18].

chorros (jets) por esferas, al aplicar el alto voltaje se busca aumentar la superficie oponiéndose a la formación de defectos y favoreciendo la formación de chorros más delgados, en este caso es la fuerza viscoelástica la que se resiste a cambios rápidos en la forma. El coeficiente de tensión superficial depende del polímero y el disolvente, adicionar disolventes como el etanol a una solución disminuye tensión superficial y podría contribuir a la obtención de fibras lisas [16].

III. Conductividad eléctrica de la solución

Soluciones con alta conductividad tendrán mayor capacidad de transportar las cargas de la solución que aquellas con baja conductividad. La adición de sales a la solución incrementa la conductividad y por consiguiente la fuerza eléctrica para el estiramiento del chorro, lo que promueve una reducción en el diámetro de las fibras. Se ha encontrado que con el aumento de la conductividad eléctrica de la solución hay una disminución significativa en el diámetro de las fibras mientras que cuando la conductividad es baja se observa un alargamiento insuficiente del chorro lo que impide la producción de fibras uniformes [16].

IV. Voltaje

El voltaje es uno de los parámetros más importantes dentro del proceso de electrohilado, en la mayoría de los casos un voltaje alto permite un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerza de coulomb en el chorro y un fuerte campo eléctrico, todos estos factores promueven una reducción en el diámetro de las

fibras. La influencia del voltaje depende además de las propiedades viscoelásticas del material base, por ello es importante analizar el comportamiento para cada polímero con su respectivo disolvente [16]. Por otra parte también existe la posibilidad de presentar defectos, un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Deitzel, Kleinmeyer, *et al.* [21] donde ellos electrohilan óxido de polietileno (PEO) y al variar el voltaje se muestran defectos y diferencia en el tamaño de la fibra como lo muestra la Figura 5.

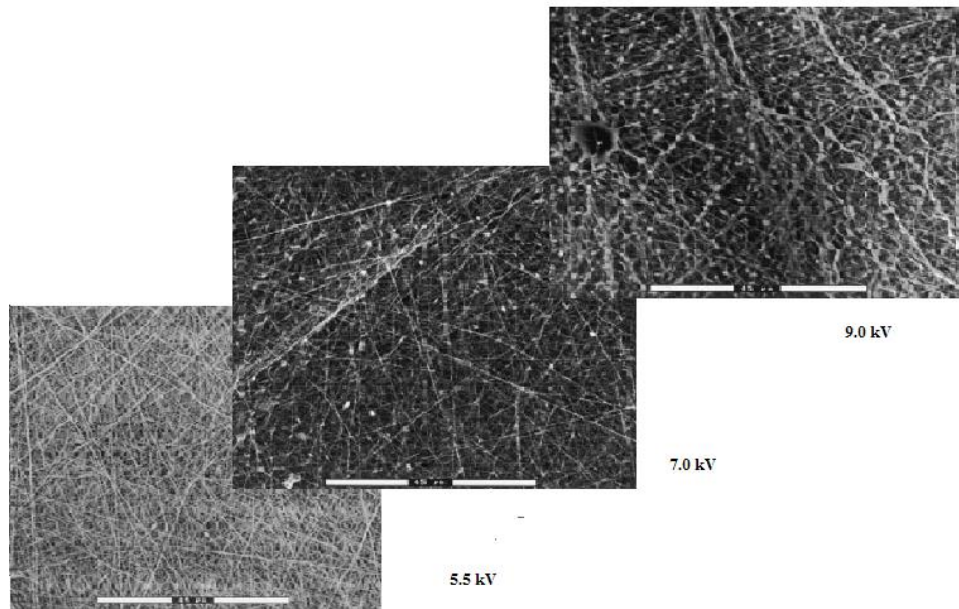


Figura 5 Impacto del voltaje aplicado en electrohilado de soluciones de PEO al 7 % [21].

V. Flujo de salida

Un flujo de salida menor podría ser benéfico ya que el disolvente tendría más tiempo para evaporarse evitando la formación de defectos en las fibras. Cuando el flujo de salida se incrementa ocurre un incremento en el diámetro de las fibras y posiblemente en el tamaño de los defectos. Un mínimo valor de volumen de solución a la salida del capilar debería ser mantenido para obtener un cono de Taylor estable, el flujo de salida determina la cantidad de solución disponible para el proceso de electrohilado [16]. Ejemplo de lo anterior lo encontramos reportado por Ribeiro, Sencadas, *et al.* [22] donde ellos electrohilan a 20 kV, 15 cm de distancia y a diferente flujo obteniendo que principalmente se observa modificación del diámetro de las fibras y además la presencia de defectos Figura 6.

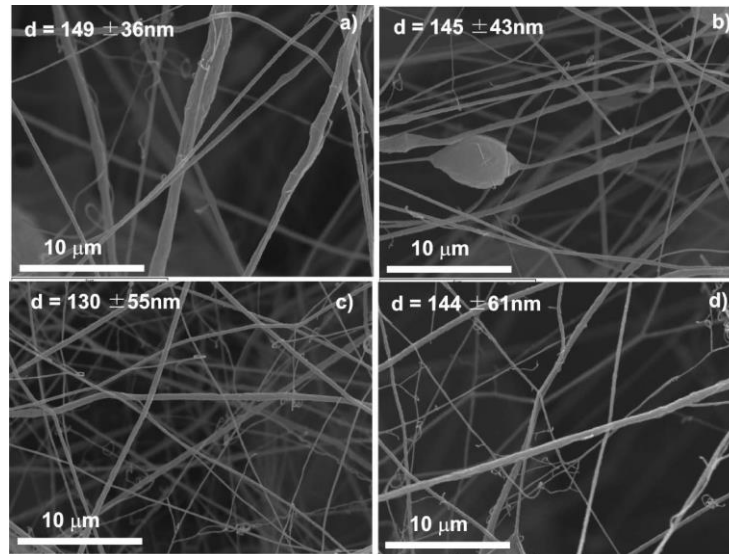


Figura 6 Micrografía de SEM de nanofibras de PVDF al 20 % a) 0,5 mL/h, b) 1 mL/h, c) 2 mL/h, d) 4 mL/h [22].

VI. Distancia entre la aguja y el colector

Dependiendo de las propiedades de la solución el efecto de la variación de la distancia puede o no, tener efecto en la morfología de las fibras. Al trabajar con distancia muy grandes las fibras electrohiladas podrían romperse debido a su propio peso, especialmente si las fibras son de diámetro pequeño. Una mínima distancia es requerida para dar a las fibras el tiempo suficiente para que el disolvente se evapore antes de alcanzar el plato colector, con distancias muy grandes o demasiado pequeñas se ha observado la aparición de defectos o fibras húmedas que promueven la obtención de fibras aplanadas o con forma de cintas. La mayoría de los autores coinciden en que con mayores distancias la solución tendrá mayor tiempo de vuelo lo que promoverá un mayor estiramiento de las fibras antes de depositarse en el plato colector [16]. Por otra parte muchas veces no se observa un cambio tan radical en los diámetros de las fibras al variar la distancia aguja-colector, tal es el caso de lo reportado por Ki, Baek, *et al.* [23] donde varían esta distancia de 7 a 20 cm cuando electrohilan

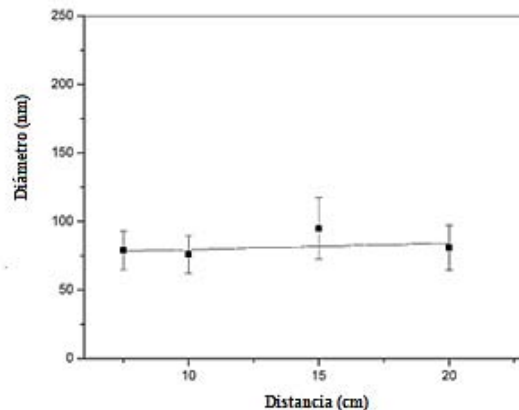


Figura 7 Variación del diámetro de nanofibras de gelatina con respecto a la distancia del colector, electrohiladas a 1 kV/cm [23].

demasiado pequeñas se ha observado la aparición de defectos o fibras húmedas que promueven la obtención de fibras aplanadas o con forma de cintas. La mayoría de los autores coinciden en que con mayores distancias la solución tendrá mayor tiempo de vuelo lo que promoverá un mayor estiramiento de las fibras antes de depositarse en el plato colector [16]. Por otra parte muchas veces no se observa un cambio tan radical en los diámetros de las fibras al variar la distancia aguja-colector, tal es el caso de lo reportado por Ki, Baek, *et al.* [23] donde varían esta distancia de 7 a 20 cm cuando electrohilan

gelatina al 8 % en ácido fórmico a 1 kV/cm y el diámetro de las fibras está en un rango de 75 a 100 nm como se muestra en la Figura 7.

VII. Humedad relativa del medio ambiente

La humedad del ambiente puede determinar la velocidad de evaporación del disolvente en la solución, por lo tanto, a humedad relativa baja un disolvente podría evaporarse muy rápido dando lugar a defectos [16].

VIII. Temperatura

La temperatura puede incrementar la tasa de evaporación y ocasionar un aumento en la viscosidad de la solución, lo cual podría dar lugar a obstrucciones en la aguja y la posible aparición de defectos. Por otro lado, puede depender del punto de fusión del polímero, en el caso de que se desee fabricar electrohilado sin disolventes o bien si se trata de un disolvente con un punto de ebullición alto un aumento de temperatura en el sistema podría reducir el tiempo de secado y evitar la fusión entre fibras [16, 18]

3.2.1. Aplicación del electrohilado

Si bien es cierto que hay una serie de factores que influyen en el electrohilado, la aplicación juega un papel fundamental al momento de optimizarlos, pues no necesariamente se querrá obtener fibras muy delgadas en la mayoría de los casos y, esto tiene fundamento en que las fibras cambian sus propiedades mecánicas, de transporte (difusión) o bien con una mayor superficie en el caso de que sea un sistema con aplicación catalítica [18].

Una aplicación por ejemplo se da en la industria mecánica cuando se desea obtener

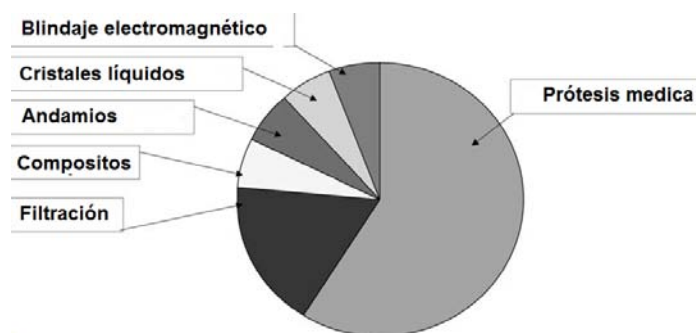


Figura 8 Principales campos de aplicación en electrohilado de acuerdo con lo patentado en Estados Unidos [18].

materiales con una superior resistencia y flexibilidad, por ejemplo de Nylon 2,4[®]. También son encontrados avances en óptica al diseñar materiales con benzimidazoles y nanotubos de carbono, sin embargo, la aplicación va más allá, pues se puede encontrar en medicina, tecnología de filtración,

membranas catalíticas, etc. En la Figura 8 se muestran a grandes rasgos las aplicaciones

y la proporción de ellas en cuanto a patentes publicadas en Estados Unidos. Las diferentes aplicaciones y las potenciales, siguen siendo estudiadas, ejemplo de ello es la obtención de nanofibras con biopolímeros como los polisacáridos, quitosano, etc. [5, 18]

3.3. Biomateriales en electrohilado

Acorde al Instituto Nacional de Salud un biomaterial está definido como cualquier sustancia o combinación de sustancias sintéticas o de origen natural, la cual puede ser usada por un periodo de tiempo tanto dentro como en una parte de un sistema a tratar o algún tejido a reemplazar, órgano o función del cuerpo [24]. En contraste la ISO 10933 (Evaluación Biológica de Dispositivos Médicos) menciona que todos los materiales utilizados en humanos deben cumplir con los ensayos de biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* para verificar la respuesta y comportamiento de las células interactuando con ellos. En general un biomaterial no debe provocar ninguna respuesta indeseable en el paciente local o sistémica [24].

Gran cantidad de materiales han sido investigados para su uso como biomateriales incluyendo los biopolímeros, los cuales son recursos renovables, biodegradables, biocompatibles, y pueden exhibir actividad antibacterial [5]. Existen biopolímeros de origen natural y sintético. Dentro de los de origen natural encontramos a los polisacáridos, las proteínas o mezcla de ambos ejemplos de ellos son: el alginato, el ácido hialurónico, celulosa, colágeno, quitosano, etc. Por otra parte encontramos a los biopolímeros sintéticos como el poli (vinil alcohol) (PVA), poli (ϵ -caprolactona), PLLA, PLGA, etc. Todos los polímeros ya mencionados han sido ampliamente estudiados en el electrohilado cuyas aplicaciones principales están orientadas hacia el área biomédica en la ingeniería de tejidos [25].

3.3.1. Poli (ϵ -caprolactona)

Uno de los polímeros de interés para el área biomédica es poli (ϵ -caprolactona). Es un poliéster alifático lineal con una transición vítrea de $-62\text{ }^{\circ}\text{C}$ y punto de fusión de $55\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ dependiendo del grado de cristalinidad el cual está determinado por el peso molecular (3000 a 100000 g/mol). Es sintetizado a partir de la apertura de anillo de ϵ -caprolactona utilizando como catalizador octanoato de estaño. Es biocompatible, bioabsorbible y un polímero de bajo costo. Debido a su semicristalinidad y naturaleza hidrofóbica exhibe una tasa de degradación elevada de 2 a 4 años dependiendo del peso molecular [26]. Gracias a sus propiedades mecánicas (Tabla 2) es adecuado para diferentes aplicaciones en el área

biomédica como prótesis. Es un material a probado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (*FDA por sus siglas en inglés*) y ha sido clínicamente utilizado como dispositivo en liberación de medicamentos y material de sutura desde la década de 1980 [26].

Tabla 2 Propiedades mecánicas de PCL dependiendo su peso molecular [14] .

PCL			
Peso molecular (g/mol)	37000	50000	80000
Esfuerzo a la tensión (MPa)	13.7	35.3	56.8
Elongación a la ruptura (%)	660	800	900
Tiempo de degradación	1 año	2 años	3 años

Ejemplo de sistema de liberación encontramos a Capronor® el cual es una cápsula, biodegradable subdérmica que libera levonorgestrel en un periodo de 12 a 18 meses, con lo cual se obtiene un sistema anticonceptivo de larga duración [27]. Por otro lado encontramos en investigación microesferas de PCL fabricadas por liofilización de una doble emulsión y con el objeto de utilizarlas en liberación de medicamentos [28]. Empresas como *Innocore Pharmaceuticals* posee una línea de productos entre las que figuran micropartículas y microesferas para liberación de medicamentos bajo el nombre de SynBiosys®, utilizando PCL y otros biopolímeros.

Tabla 3 Fabricación de electrohilado de PCL, condiciones y diámetro fe fibra obtenido.

Referencia	Propiedades de la solución			Electrohilado			Diámetro nm
	Concentración	Disolvente	Voltaje kV	Flujo mL/h	Distancia cm	Colector	
Yoshimoto, Shin, <i>et al.</i> [29]	10 %w/v 80 kDa	Cloroformo	13	6		Vertical	400±200
Li, Mauck, <i>et al.</i> [30]	14 %w/v 80 kDa	TMF/THF 1:1	15		20	Cilíndrico 0 m/s: 9.3 m/s	438±156 519±27
Kolambkar [31]	13 %w/v 80 kDa	DCM:DMF 40:60	14	0.75	0.75	Cilindro metálico	591±199
Pektok, Nottelet, <i>et al.</i> [32]	15 %w/v 80 kDa	CF:EtOH 7:3	20	12	20	Placa metálica	1900
Nisbet, Yu, <i>et al.</i> [33]	10 %w/v	CF:MeOH 3:1	20	0.397	15	10x10x2 cm ² placa de aluminio	750±100
Chew, Mi, <i>et al.</i> [34]	16 %w/v 60 kDa	DCM:MeOH 8:2	7	4	5	Cilíndrico	1030±30
Cao, McHugh, <i>et al.</i> [35]	14 %w/v 65 kDa 9.5 %w/v 65 kDa	TFE:dH ₂ O 5:1 DCM:MeOH 3:2	16-18 13-15	1.5 1.5	13-14 8-9	Cilíndrico	313±5 506±24
Jha, Colello, <i>et al.</i> [36]	50–275 mg/mL 65 kDa	TFE	22-20	2-20	10-30	Placa de dos polos, estacionario	400-1500

PCL no sólo se utiliza en liberación de medicamentos recientemente se ha estado explotando para la fabricación de nanofibras por electrohilado para aplicaciones biomédicas en ingeniería de tejidos, en la Tabla 3 se muestran algunos trabajos reportados sobre el electrohilado con PCL, las condiciones a las cuales se llevó a cabo el proceso, y los diámetros que estas fibras pueden llegar a obtener, se observa que a una mayor concentración se emplea un mayor voltaje o bien una menor distancia y estos parámetros modifican en gran medida el diámetro de fibra obtenido [26].

No sólo se ha investigado electrohilado de PCL, también se reportan trabajos donde se modifica el polímero para injertar otras moléculas con actividad biológica o disminuir la hidrofobicidad, así como la fabricación utilizando copolímeros, por ejemplo de poli-ácido láctico-co-caprolactona PLLA-CL como lo reporta Mo, Xu, *et al.* [37] en una proporción de copolimerización 75:25, obteniendo diámetro de nanofibra de 400 nm a 12 kV, 13 cm de distancia aguja-colector y un flujo de inyección de 2 mL/h.

3.3.2. Modificación de poli (ϵ -caprolactona)

Comparado con otros polímeros PCL posee características fisicoquímicas diferentes a otros materiales como poli-ácido glicólico (PGA), poli-ácido láctico (PLA), una de ellas es que no posee isómeros y por lo tanto no existen mezclas racémicas como es el caso de 8 y PLLA, también los tiempos de degradación son diferentes entre ellos. Su punto de fusión es más bajo que PLA y PGA, sin embargo, su hidrofobicidad es la principal desventaja, resultando en una pobre humectabilidad y baja adhesión celular, por lo que la modificación de la superficie puede ser una alternativa. Entre las técnicas para modificar la superficie encontramos:

- Tratamiento con plasma, el cual mejora la hidrofiliidad al introducir diferentes grupos funcionales como hidroxilo, carbonilo, amino o sulfato, dependiendo del gas que se utilice ya sea O₂, NH₃, SO₂, CO₂ o algún compuesto orgánico. El más común para uso biomédico es el oxígeno.
- El tratamiento químico, consiste en la inmersión de los andamios de electrohilado en soluciones de hidróxido de sodio, con lo cual se consigue la formación de grupos carboxilato incrementando la humectabilidad del material, sin embargo, el tratamiento ocasiona cambios en la morfología de los andamios.

- El recubrimiento por adsorción de proteínas o por unión covalente es otra manera de modificar la superficie de los andamios, ofreciendo una mayor interacción con las células, por ejemplo utilizando laminina, gelatina, fibronectina y colágeno. La desventaja es que PCL no posee sitios de anclaje y se ve limitada esta última manera de disminuir su hidrofobicidad y aumentar su actividad biológica, por lo que autores como Alcántara [14], Zhu, Gao, *et al.* [38] y Kim, Cho, *et al.* [39] modifican a PCL agregando moléculas como anhídrido maléico y metacrilatos, para disminuir la hidrofobicidad y poder anclar moléculas con actividad biológica, por ejemplo con colágeno o factores de crecimiento.

3.3.3. Colágeno

El colágeno es la proteína más abundante en los mamíferos, en particular forma parte de tendones, ligamentos, cornea y huesos, está presente en la piel, vasos sanguíneos y en

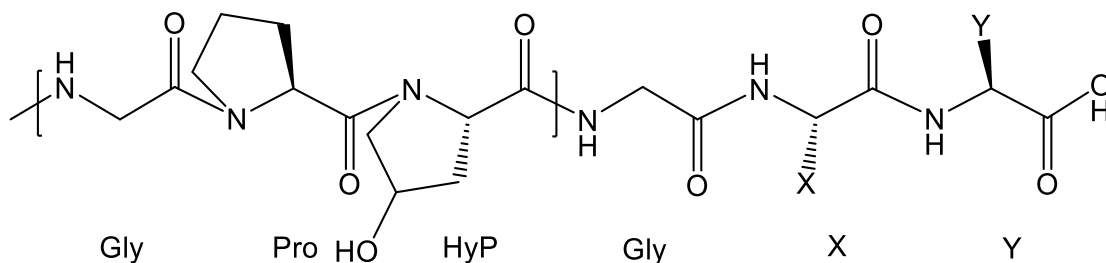


Figura 9 Secuencia del colágeno tipo I [47]

otros tejidos en el cuerpo humano. Dada su amplia localización hasta el 2012 se tienen identificados 50 tipos y existen variedades de formas fibrilar y globular. El marcaje de colágeno consiste en una secuencia basada en: $(Gly-X-Y)_n$, donde X y Y pueden ser aminoácidos (Figura 9). Ésta secuencia conduce a una torsión del filamento molecular lo que permite que estos se ensamblen formando triples hélices. La glicina al ser el aminoácido más pequeño se encuentra en el interior de las hélices, mientras que X y Y se encuentran en la superficie determinando la funcionalidad. En el caso del colágeno tipo I, X y Y son prolina e hidroxiprolina. Debido a la capacidad específica de enlazar cadenas de polipéptidos y entrecruzarlas, pueden dar lugar a la formación de estructuras de soporte y fibrilares, las cuáles, son la base de diversos tejidos extracelulares.

Tabla 4 Fabricación de andamios por electrohilado de colágeno, condiciones y diámetro de fibras

Referencia	Propiedades de la solución			Electrohilado			Diámetro (nm)
	Concentración	Disolvente	Voltaje (kV)	Flujo (mL/h)	Distancia (cm)	Colector	
Huang, Nagapudi, <i>et al.</i> [40]	Colágeno 1-2 %w/v PEO (1:2)	HCl 10 mM	0-30	6		Estacionario	50-150
Matthews, Wnek, <i>et al.</i> [41]	Colágeno I y III 0.04 g/mL	1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2- propanol (HFP)	15-30	5	10-15	Cilíndrico 500 rpm 0.6x0.05x4 cm	250±150
Matthews, Boland, <i>et al.</i> [42]	Colágeno II 0.04 g/mL	HFP	22	2	10	Cilindro 0.1x0.6x2 cm	110±90
Rho, Jeong, <i>et al.</i> [43]	Colágeno I 8% w/V	HFP	40	1.2	8	Cilíndrico	460
Stitzel, Liu, <i>et al.</i> [44]	Colágeno I, elastina PLGA (40:15:45) 15 %w/v	HFP	25	3	15	Cilíndrico	720±350
Venugopal, Zhang, <i>et al.</i> [45]	Colágeno I:PCL (55:25 mg/mL)	HFP	13	3	13	Hoja de aluminio	170±0.756
Lee, Yoo, <i>et al.</i> [46]	Colágeno I:elastina: (PLGA, PLLA, PC) 45:15:40; 10 %w/v	HFP	25	3	10	Cilíndrico	477-765

Una de las principales funciones del colágeno es la mecánica, por ejemplo: transfiriendo cargas entre el hueso y los músculos mediante los tendones y ligamentos, sin embargo, no sólo es mecánica, sino también de soporte para crecimiento y adhesión celular, además tienen una íntima relación entre la producción y el tipo de célula que crece en ese tejido. Debido a esta última propiedad el colágeno es ampliamente utilizado en ingeniería de tejidos [47].

Andamios de colágeno han sido ampliamente estudiados por diversas técnicas, en particular con electrohilado se reportan trabajos a partir del año 2001 (Tabla 4) en el que se preparan fibras por electrohilado con colágeno tipo I y óxido de polietileno (PEO), posterior a esto se realizan investigaciones en electrohilado con colágeno, no sólo del tipo I, también del II, III y IV, además mezclados con otros biopolímeros como PLLA, PLGA y PCL [48], sin embargo, su extracción y purificación es costosa, 250 mg pueden costar más de \$5000 en Sigma-Aldrich®, por lo que una alternativa es utilizar gelatina o bien hidrolizados de colágeno tipo I.

Cuando el electrohilado de colágeno tipo I es alineado posee una carga a la fractura de 1.17 ± 0.34 N con un pico de estrés de 1.5 ± 0.2 MPa, un módulo de Young de 52.3 ± 5.2 MPa, mientras que al no estar alineadas sus propiedades bajan obteniendo una carga a la fractura de 0.75 ± 0.04 N con un pico de estrés de 0.7 ± 0.1 MPa y un módulo de Young de 26.1 ± 0.4 MPa [41].

3.4. La piel

La piel es el órgano que protege músculos, huesos, ligamentos y órganos internos, es uno de los órganos más grandes del cuerpo, posee un área superficial de 1.8 m² y representa alrededor de un 16 % del peso corporal. Tiene muchas funciones, la más importante es de barrera, pues protege el cuerpo de factores nocivos externos y mantiene el sistema interno intacto [49]. Está compuesta de colágeno tipo I al igual que de otros componentes como la elastina, la queratina, sustancias de crecimiento y células. Su estructura se compone de tres capas (Figura 10): la epidermis, la dermis y la hipodermis:

- La epidermis se define como un epitelio escamoso estratificado con un grosor de 0.1 mm en la mayor parte del cuerpo, en las palmas y planta del pie es de 0.8 a 1.4 mm. La principal célula es el queratinocito y es el encargado de producir queratina. Posee cuatro capas: a) La primera es el estrato basal, en esta los queratinocitos pueden estar o no dividiéndose y contienen tonofibrillas de queratina y son aseguradas por hemidesmosomas a la base de la membrana; los melanocitos conforman el 5-10% de la población basal, sintetizan melanina y la transfieren por vía dendrítica a los queratinocitos, se encuentran en mayor proporción en la cara y otros sitios expuestos y dan origen a la cresta neural; las células de Merkel raras veces son encontradas en esta capa, están asociadas con filamentos terminales de nervios cutáneos y juegan rol en la sensación. b) La segunda capa es el estrato espinoso, aquí las células hija migran para formar una capa poliédrica interconectada con desmosomas. En su mayoría se encuentran células de Langerhans, las cuales forman parte de las células presentadoras de antígenos. c) En el estrato granuloso las células se aplanan y pierden

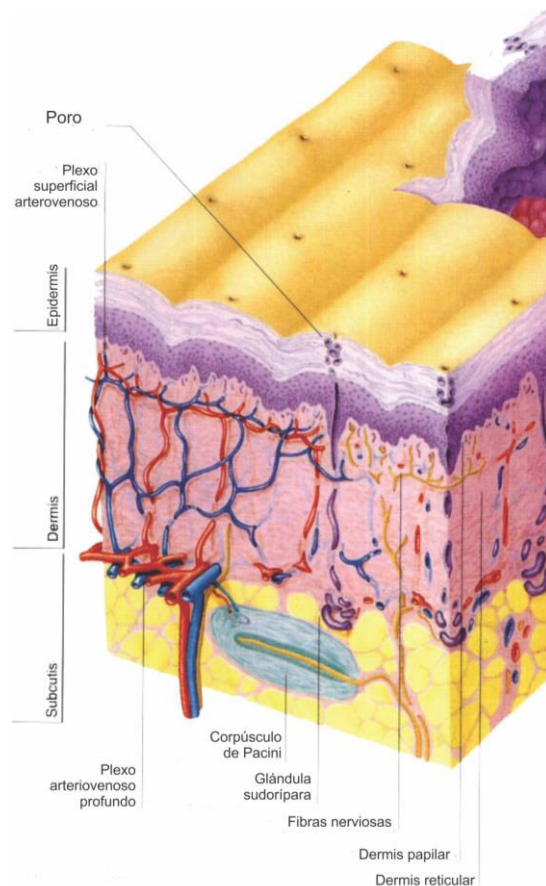


Figura 10 Esquema de las capas de la piel [49].

su núcleo, en el citoplasma se observan gránulos de queratohialina. d) El estrato corneo es el resultado final de la maduración de queratinocitos, ahí son encontradas estas células llamadas corneocitos cuyo citoplasma está formado por tonofibrillas de queratina embebidas en una matriz de gránulos de queratohialina, están dispuestas en capas y unidas por un pegamento lipídico.

- La dermis es la capa principal y se encuentra debajo de la epidermis, consiste de tejido conectivo, conformado de fibras de colágeno y es responsable de las propiedades mecánicas [47].

La dermis puede ser dividida en la dermis papilar y la reticular. En la papilar las pequeñas fibras de colágeno proveen la capacidad de deformación a la superficie del tejido. La reticular proporciona la mayor parte de la dermis y de la piel en conjunto. Su característica es que las fibras de colágeno están interconectadas con fibras delgadas y fibras maduras elásticas. El colágeno fibrilar intersticial está compuesto de tipos I (80-90%) y III (8-12%) el cuál puede estar ensamblado con el tipo V (<5%). La alta proporción de colágeno tipo I le confiere alta fuerza a la tensión y estabilidad a la deformación [47]. Las propiedades mecánicas para la dermis indican un módulo de Young de 0.42 MPa para personas entre 8 y 30 años y 0.85 MPa para personas hasta los 80 años en una piel a 22 °C y un 82 % de humedad relativa [50]. Posee un espesor de 0.6 mm en los párpados a 3 mm en las palmas y plantas de los pies [49].

También están presentes glándulas sudoríparas, folículos pilosos. Las sustancias que forman la matriz extracelular son: glicosaminoglucanos que permiten también la movilidad al igual que la elastina, proteoglucanos, hialuronatos, laminina, fibronectina, fibrinógeno y moléculas de adhesión como las integrinas . Una amplia variedad de células está presente en la dermis entre las que encontramos: fibroblastos, células dendríticas, mastocitos, macrófagos y linfocitos [48].

- La hipodermis formada de tejido conectivo laxo y adiposo, cuya cualidad es termoregular y permite también la motilidad gracias a la elastina presente en esta capa también, inmersos en esta capar se encuentran los vasos sanguíneos y nervios [49].

Diferentes lesiones pueden ocurrir en la piel, entre ellos figuran las quemaduras, cortaduras, enfermedades causadas por hongos, bacterias, actinomicetos, ácaros y virus, así como enfermedades o padecimientos como el vitíligo.

3.4.1. Quemaduras

Una quemadura es un traumatismo de la piel o de otros tejidos corporales causado por el calor. Tiene lugar cuando algunas o todas las células de la piel o de otros tejidos son destruidas por líquidos calientes (escaldaduras), sólidos calientes (quemaduras por contacto) o llamas (quemaduras por fuego). Las lesiones de la piel o de otros tejidos debidas a la radiación, la radiactividad, la electricidad, la fricción o el contacto con productos químicos también se consideran quemaduras. Las causas de mayor incidencia en los niños son por exposición a líquidos calientes (escaldaduras), sólidos calientes (quemaduras por contacto) o llamas (quemaduras por fuego), en el 2004, casi 96 000 menores de 20 años fallecieron a consecuencia de quemaduras por fuego en todo el mundo. Aunque la mayoría de las defunciones infantiles relacionadas con las quemaduras se debieron a quemaduras por fuego (95%), las escaldaduras y las quemaduras por contacto son una causa importante de quemaduras no mortales y de discapacidad [1, 2]. La tasa nacional promedio de quemaduras es 107.26 por cada 100,000 habitantes según Salud [51], lo cual representa un promedio anual de quemados en los últimos 5 años de 113,531 pacientes.

Existen 3 niveles de quemaduras y dependerá del daño a los tejidos (Figura 11):

- Las de primer grado, se caracterizan por eritema sin vesículas, con dolor. El ejemplo clásico es la quemadura solar. La epidermis está afectada sin existir ampollas ni pérdida de líquidos por lo que no se contabilizarán en el cálculo de la superficie corporal quemada. Curan en 3-7 días sin dejar cicatriz [52].

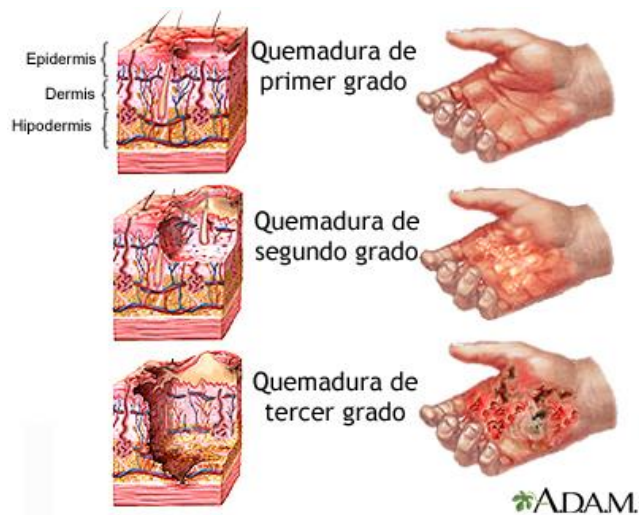


Figura 11 Tipos de quemadura y daño a en la piel [2].

- Las de segundo grado se dividen en dos: a) superficiales: generalmente se producen por líquidos calientes con destrucción de la epidermis y menos del 50% de la dermis. Presentan eritema claro o rojo brillante con dolor, formación de flictenas y aspecto húmedo. El proceso de curación dura 7-10 días pudiéndose producir una mínima cicatriz o hipopigmentación. b)

profundas: están producidas por líquidos calientes. Existe afectación de la epidermis y de más del 50% de la dermis con destrucción de fibras nerviosas por lo que son generalmente menos dolorosas. El color es rojo oscuro o blanco moteado. En quemaduras extensas hay una gran pérdida de líquidos. Habitualmente necesitan injertos. Precisan de 2-3 semanas para la curación con riesgo importante de retracciones y sobreinfección [52].

- Las de tercer grado son producidas por sustancias químicas, eléctricas o contacto prolongado con líquidos calientes. Son las más severas existiendo afectación de todas las capas de la piel, pudiendo también afectar fascia, músculo y hueso. Tienen una apariencia blanca perlada o carbonizada. No son dolorosas ni tienen flictenas y adoptan una textura seca. Tardan varias semanas en curar. Precisan la realización de injertos [52].

Por otro lado encontramos la clasificación por tipos de quemaduras, en primer lugar la térmicas: a) escaldaduras por líquidos calientes o vapor; b) quemaduras por contacto: por sólidos y objetos muy calientes, como la plancha de la ropa, los utensilios de cocina; c) quemaduras por llama o fuego: por celas, lámparas, estufas o los cigarrillos encendidos; d) quemaduras químicas: por la exposición a sustancias químicas agresivas, como los ácidos o los álcalis fuertes; e) quemaduras eléctricas: por una corriente eléctrica que pasa al cuerpo desde tomas, cables, o aparatos eléctricos.

Por otro lado las quemaduras por inhalación: son el resultado de la inhalación de gases extremadamente calientes, vapores, líquidos calientes o emanaciones nocivas procedentes de la combustión incompleta. La inhalación de humo es el factor más importante que determina la defunción por quemaduras [1].

La inflamación en una herida es esencial para la cicatrización de heridas y una defensa contra estos agentes infecciosos, entre más profunda sea los órganos se ven comprometidos más fácilmente a la infección por microorganismos patógenos [2]. Ésta sumada a una depresión del sistema inmune, la avascularidad que evita que agentes antimicrobianos del paciente migren hacia la herida y la exposición de un ambiente rico en proteínas (por el tejido necrosado) contribuyen a complicaciones infecciosas en pacientes con quemaduras. De los agentes infecciosos más comunes en pacientes con quemaduras, se ha determinado que los primeros en colonizar las heridas son los microorganismos *Gram* positivos como *Staphylococcus aureus* en las primeras 48 a 72 horas, inmediato a ellos

colonizan *Gram* negativos como *Pseudomonas* y pueden llegar a presentarse microorganismos oportunistas como hongos después de 5 a 7 días, es por eso que se deben de tener cuidados especiales y administrar antibióticos [53].

3.4.2. Inflamación y dolor

Uno de los síntomas en las quemaduras es la inflamación, así como el dolor. Inicialmente la respuesta inmunológica a las lesiones por quemaduras es proinflamatoria pero después es predominantemente antiinflamatoria en un esfuerzo por mantener la homeostasis, las citoquinas y las respuestas celulares regulan esas fases. Cuando se presenta la inflamación incrementa en los niveles séricos las citoquinas como la interleucina 1 β (IL-1 β) y el factor alfa de necrosis, las cuales son producidas en las quemaduras principalmente por los leucocitos. Ambas citoquinas contribuyen a la producción de fiebre y de un estado de catabólico acelerado, también regulan la producción de prostaglandinas E₂ (PGE₂), IL-6 y factor de activación plaquetario por células endoteliales y macrófagos. IL-6 induce fiebre y la producción de reactivos de fase aguda que contribuyen a la activación de células T. Interferón gama (IFN- γ) es otra citoquina producida por las células NK en respuesta a la lesión, lo cual es importante para la activación de macrófagos y diferenciación de células CD4⁺T en células Th-1. Posterior a la inflamación sigue un periodo antiinflamatorio en el cual el sistema inmune se deprime bajando la producción de monocitos/macrófagos, los macrófagos producen mayor cantidad de PGE₂ y desciende IL-12, lo cual tiene un efecto cooperativo en la diferenciación de células T, las cuales se diferencian en Th-2 y producen citoquinas antiinflamatorias IL-4. El organismo entonces es más vulnerable a los patógenos corriendo el riesgo de sufrir un choque séptico [53].

Por otro lado el dolor, el cual es una sensación incomoda y una experiencia emocional asociada con un daño a un tejido según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP por sus siglas en inglés) desencadenado por la producción de prostaglandinas, se percibe en receptores ubicados en la dermis denominados nociceptores [54], los cuales son terminales nerviosas no especializadas que

Tabla 5 Sustancias químicas seleccionadas liberadas con estímulo suficiente para causar daño del tejido [53].

Sustancia	Fuente
Potasio	Células dañadas
Serotonina	Plaquetas
Bradicinina	Plasma
Histamina	Mastocitos
Prostaglandina	Células dañadas
Leucotrienos	Células dañadas
Sustancia P	Nervios primarios aferentes

convierten estímulos en impulsos nerviosos, que el cerebro interpreta para producir la sensación de dolor. Existen dos tipos: nervios amielínicos que conducen el impulso a una velocidad de 7.2 km/h (fibras C), responden a estímulos termales, mecánicos y químicos; y mielinizados que

conducen el impulso a 72 km/h (fibras A δ), responden a estímulos mecánicos y termomecánicos. El dolor agudo es producido por el estímulo en las fibras A δ , mientras que el dolor retrasado o de larga duración es por las fibras C. La activación periférica de los nociceptores (transducción) es modulada por varias sustancias químicas, que son producidas cuando hay daño celular (Tabla 5), estos mediadores influyen en el nivel de actividad nerviosa, de ahí la intensidad de la sensación del dolor. El estímulo repetido provoca sensibilización de las fibras nerviosas con lo cual una hipersensibilidad por ejemplo en quemaduras de sol, de la misma manera la liberación de sustancia P causa vasodilatación e hinchazón, la histamina incrementa la presencia de mastocitos, la señalización química protege a la herida produciendo comportamientos que mantienen aislada esta área de estímulos mecánicos u otros, en la Figura 12 se describe el proceso de dolor [55].

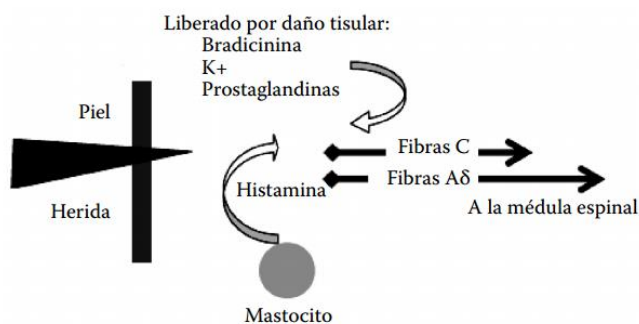


Figura 12 Esquema de la estimulación del dolor, sustancias que son liberadas durante el proceso [54].

3.5. Diclofenaco

Para el tratamiento de la inflamación son administrados fármacos con actividad antiinflamatoria, existen dos grupos los esteroideos y los no esteroideos (AINES), estos últimos incluyen la clase de inhibidores selectivos de la ciclooxygenasa 2 (COX-2) y poseen propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Comprenden un grupo químicamente heterogéneo de sustancias, a menudo sin relación química alguna (aunque muchos de ellos

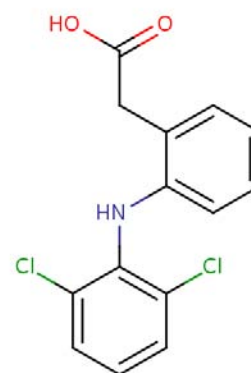


Figura 13 Estructura molecular de diclofenaco [56].

son ácidos orgánicos), pero que, a pesar de todo, comparten algunas acciones terapéuticas y efectos adversos [56, 57].

Dentro del grupo de los AINES se encuentra el diclofenaco. En la Tabla 6 se pueden encontrar descritas sus propiedades fisicoquímicas, así como su estructura en la Figura 13. Dentro de las propiedades farmacológicas se observa que puede producir actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria, es utilizado en el tratamiento sintomático a largo plazo de la artritis reumatoide, la osteoartritis y la espondilitis anquilosante, también es utilizado para tratar por breve tiempo el dolor agudo del aparato locomotor, el dolor posoperatorio y la dismenorrea. La dosis usual es de 100 a 200 mg por vía oral por día, en gel 30 mg/g y en dosis oftálmica 1 mg/mL [58]. Se han diseñado sistemas de liberación modificada a base de nanofibras hechas de Eudragit® L100-55 con objetivo al colon [59] y también utilizando PLLA con lidocaína y diclofenaco como propuesta para regeneración de piel en lesiones por quemaduras [60].

Tabla 6 Propiedades fisicoquímicas de diclofenaco [59].

Número CAS	15307-86-5
Fórmula	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂
Peso molecular (g/mol)	296.149
Punto de fusión	156-158 °C
Solubilidad	2.37 mg/L a 25°C en agua
logP	4.51
pka	4.15
Refractividad	75.46 m ³ /mol
Presión de vapor	6.12x10 ⁻⁸ mm Hg a 25°C
Absorción UV	Metanol 283 nm ε=1.01x10 ⁵ mol/L Buffer de fosfatos pH=7.2 276 nm ε=1.01x10 ⁵ mol/L

3.5.1. Farmacocinética y farmacodinamia

El diclofenaco se absorbe rápidamente, con una fijación a proteínas extensa alrededor del 99%, un tiempo de vida media de 2 horas vía oral y hasta 12 horas vía tópica, un volumen de distribución de 1.3 L/kg y el aclaramiento renal es menor a 1 mL/min (en personas saludables). La biodisponibilidad es del 50% debido a un metabolismo de primer paso, por un miembro de la subfamilia CYP2C que lo metaboliza en el hígado hasta 4-

hidroxiclofenaco principal metabolito; después de la glucoronidación y sulfonación, los metabolitos se excretan por la orina (65%) y por la bilis (35%) [58].

La farmacodinamia contempla que el diclofenaco es un medicamento AINE con propiedades farmacológicas antes descritas debidas a la inhibición de la migración de leucocitos y de enzimas como la ciclooxigenasa 1 y 2, lo cual inhibe la síntesis de prostaglandinas, evitando así que estas interactúen con los receptores del dolor y produciendo analgesia. Los efectos antipiréticos pueden ser debidos a la acción sobre el hipotálamo, resultando en dilatación periférica, incrementando el flujo sanguíneo y subsecuentemente disipación del calor [58].

Se ha demostrado también que puede poseer actividad antimicrobiana contra *Gram* positivos y *Gram* negativos, mientras que piroxicam, ácido mefenámico, naproxeno y oxifenbutazona poseen actividad leve a moderada, en un estudio realizado por Dastidar, Ganguly, *et al.* [6] se encontró que a una concentración de 50 mg/L se reduce el conteo de unidades formadoras de colonia para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* de 2.2×10^8 a 1.0×10^5 en un periodo de 6 horas [61].

3.5.2. Toxicidad y efectos adversos

Los síntomas de sobredosis incluyen pérdida de conciencia, descenso de la presión intracraneal y neumonitis por aspiración. La dosis letal 50 oral en ratones (DL_{50}) es 390 mg/kg.

Los efectos adversos comunes son particularmente gastrointestinales en 20% de los enfermos aproximadamente, en 5 a 15% de los pacientes hay incremento pequeño del nivel de transaminasas hepáticas en el plasma, principalmente se dan de manera concomitante con aspirina. El uso de alcohol, corticoides o suplementos de potasio pueden incrementar el riesgo de efectos gastrointestinales. También se pueden presentar erupciones, reacciones alérgicas, retención de líquido y edema y en rara ocasiones deficiencia de la función renal. Se recomienda no utilizar en personas en riesgo a desarrollar alguna enfermedad cardiovascular o cerebrovascular. Existen interacciones con medicamentos tales como anisindiona, colesevalam, ciclosporinas, dicumarol, ginkgo biloba, metotrexato, rifampicina, tacrina, timolol, tizanidina, trandolapil, treprostinil warfarina [57].

3.6. Sistemas de liberación de fármacos

Un sistema de liberación modificada de fármacos se define como una formulación o dispositivo que es capaz de introducir una sustancia terapéutica en el cuerpo y, mejora su

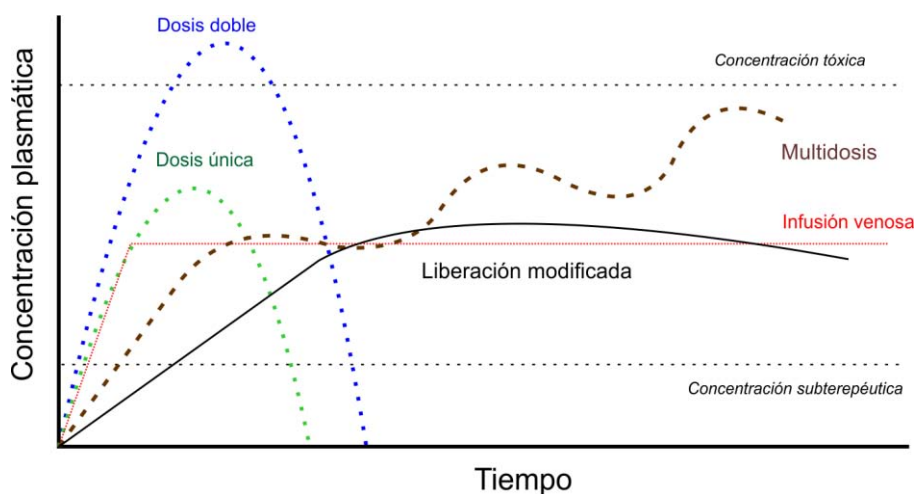


Figura 14 Tipos de liberación de fármacos. Se observa que las formulaciones de dosis doble y dosis múltiple pueden alcanzar niveles tóxicos, mientras que la modificada están en la ventana terapéutica similar a una infusión venosa.

eficacia y seguridad mediante un control de la tasa, tiempo y lugar de liberación de fármacos en el organismo. Este proceso incluye la administración del medicamento, la liberación del principio activo y el subsecuente transporte a través de las membranas al sitio de acción. Existen diferentes tipos de liberación dependiendo del sistema que se diseñe, en la Figura 14 se pueden observar los más representativos, cuya liberación es evaluada en plasma sanguíneo. Principalmente un sistema de liberación se diseña para: extender la duración de la acción del fármaco, reducir la frecuencia de la dosificación, minimizar la fluctuación en los niveles del plasma, mejorar la utilización de fármacos o disminuir efectos adversos, sin embargo, su costo se ve incrementado y puede presentarse variación en el perfil de liberación al consumir alimentos y de un sujeto a otro [62].

Tabla 7 Publicaciones sobre electrohilado como sistemas de liberación.

Referencia	Matriz polimérica	Fármaco
Kenawy, Abdel-Hay, <i>et al.</i> [63]	PCL y poliuretano	Ketoprofeno
Reise, Wyrwa, <i>et al.</i> [64]	PLA	Metronidazol
Chen, Tang, <i>et al.</i> [65]	PDLLA y nanopartículas de hidroxiapatita	Dexametasona
Qi, Guo, <i>et al.</i> [66]	Nanotubos de halosita con PLGA	Clorhidrato de tetraciclina
Krogstad & Woodrow [67]	PVA	Tenofovir

Referencia	Matriz polimérica	Fármaco
Leong, Arshi, <i>et al.</i> [68]	PCL	Heparina
Yadav & Balasubramanian [69]	Poliacrilonitrilo	Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i>

Existe una amplia gama de sistemas de liberación, se pueden encontrar dendrímeros, micelas, nanopartículas, tabletas, pro fármacos, parches, tabletas de liberación sostenida, y un sistema relativamente nuevo es el uso de nanofibras fabricadas por electrohilado, puesto que éstas pueden permitir la regeneración de tejidos al funcionar como andamios y, promover la liberación de fármacos y moléculas con actividad biológica [62, 70], diversos trabajos han sido reportados como lo muestra la Tabla 7.

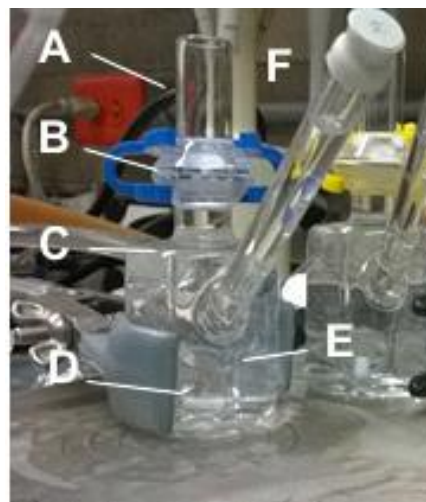


Figura 15 Esquema de celda de difusión de Franz. a) Donador, b) membrana, c) chaqueta de regulación térmica, d) agitador magnético, e) receptor y f) toma de muestra

Para conocer el tiempo y el perfil de liberación se realizan cinéticas de liberación de fármacos *in vitro*, en el que se expone la forma farmacéutica a las condiciones similares al sitio de acción, por ejemplo, en la piel se suele utilizar para sistemas transdérmicos celdas de difusión de Franz. El dispositivo, Figura 15, consiste de dos cámaras una donadora, en la que se coloca la forma farmacéutica; otra receptora que se examina por algún método de análisis cuantitativo, ambas cámaras están separadas por una membrana que semeja la permeabilidad de la piel, o bien, se utiliza piel de cerdo, sin embargo, en el caso particular de sufrir una quemadura de segundo grado la epidermis es destruida y las células que producen y liberan las sustancias que desencadenan la inflamación y el dolor están expuestas, por lo que es necesario únicamente un soporte como una membrana de celulosa o Nylon® que permita el contacto del fluido del donador de la celda con el andamio [71, 72].

El fenómeno que ocurre en la celda de manera *in vitro* y en el organismo es un proceso cinético de transporte de materia (difusión), la velocidad de disolución refleja la cantidad de fármaco disuelto a cierto tiempo. La cinética es afectada por una gran cantidad de factores uno de ellos es de acuerdo a la naturaleza de la forma farmacéutica. En ciertos casos una

ecuación puede ser derivada y describir la dependencia del tiempo de disolución, sin embargo, pueden ser utilizadas relaciones empíricas, a continuación se describen algunos de los modelos matemáticos:

- **Primer orden, modelo de Noyes Whitney.** Asume que el fármaco está disuelto en la matriz polimérica y difunde fuera de la superficie de ésta [73]. A medida que se libera el fármaco, la distancia para la difusión se vuelve cada vez mayor. Por lo que para una matriz más homogénea y porosa le será más fácil difundir al fármaco. El modelo desarrollado es una interpretación de la ley de Fick:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DA(C_s - C)}{Vh} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde dC/dt es la velocidad de fármaco por unidad de área de la superficie expuesta de la matriz, D es el coeficiente de difusión de Fick, A es el área superficial, h es la distancia de la capa de difusión, V es el volumen de la solución, C_s es la concentración de saturación en la forma farmacéutica y C es la concentración al tiempo t . Cuando la concentración disuelta de fármaco C es menor al 20% de la C_s (condiciones *sink*) la ecuación se reduce y queda de la siguiente manera:

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = Kt \quad \text{ó} \quad \ln\left(\frac{M_t}{M_0}\right) = kt \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde $k = DA/h$ y representa la velocidad de liberación, M_t es la masa liberada al tiempo t y M_0 la masa inicial de fármaco.

- **Modelo Korsmeyer Peppas.** Este modelo relaciona la liberación del fármaco exponencialmente conforme transcurre el tiempo.

$$\frac{M_t}{M_0} = k t^n \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde M_t/M_0 es la relación de masa liberada con respecto a la inicial a tiempo t , k es la constante que relaciona la estructura y las características geométricas de la dosificación del fármaco, n es el exponente de la liberación, indicando de acuerdo al valor numérico que tome, cuál es el mecanismo de liberación que ocurre. Los valores que puede tomar son $n = 0.5$ cuando el mecanismo sigue una difusión de Fick, $n < 1.0$ el tipo de transporte es anómalo, $n = 1.0$ el mecanismo es conocido como caso II y se

refiere al transporte desde una matriz que se hincha, también existen valores de $n < 0.5$ en los que existe una liberación por la presencia de poros, acompañada de la liberación por hinchamiento [74, 75].

- **Modelo Peppas-Fassihi.** Con este modelo podemos investigar si la liberación desde una matriz polimérica tiene un efecto estallido, es decir, que la liberación sea inicialmente rápida y conforme pase el tiempo, ésta disminuya y se vuelva constante.

$$\frac{M_t}{M_0} = at^n + b \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde el parámetro de estallido es representado por la magnitud b , cuando se carece de dicho efecto $b = 0$, a es el coeficiente de difusión, n representa el tipo de difusión tomando los valores del anterior modelo.

- **Modelo Peppas-Sahlin.** Este modelo es utilizado cuando se desea investigar si el mecanismo se está llevando a cabo por hinchamiento, sobre todo cuando el coeficiente de difusión del fármaco es pequeño.

$$\frac{M_t}{M_0} = k_1t^n + k_2t^{2n} \quad \text{Ecuación 5}$$

El primer término corresponde a la difusión y el segundo a la relajación del polímero y se consideran fenómenos aditivos, k_1 es la constante correspondiente a la difusión y k_2 corresponde a la relajación polimérica. El mecanismo de liberación se inicia cuando el polímero entra en contacto con el medio disolvente y, las cadenas poliméricas se separan dando lugar a un aumento en el área de contacto entre las fases lo que aumenta la movilidad del fármaco [73, 75].

3.7. Caracterización de polímeros y andamios

Una vez obtenido el producto del proceso como una síntesis o bien la fabricación de un andamio, es necesario realizar una caracterización con el fin de conocer las características y si están son las deseables de acuerdo con su aplicación. Para ello se realizan análisis fisicoquímicos, Infrarrojo, resonancia magnética nuclear, determinación de peso molecular, análisis térmico (calorimetría y termogravimetría), determinación de propiedades mecánicas, morfología mediante microscopía, resistencia química, determinación de propiedades eléctricas, difusión y permeación de gas, etc. [76, 77] . Existe una amplia

variedad de técnicas y su empleo dependerá de la naturaleza y aplicación del producto obtenido, en este trabajo se utilizaron algunas de ellas que a continuación se describen de manera breve.

3.7.1. Espectroscopia Infrarroja con transformadas de Fourier (ATR-FTIR)

Es una de las técnicas más utilizadas en la investigación y en la industria para caracterizar materias primas y productos terminados gracias a la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) [78]. La técnica se basa en la interacción de un haz infrarrojo con la muestra, la cual absorberá ciertas longitudes de onda debido a la interacción con los grupos funcionales. Cuando un haz de radiación pasa de un medio más denso a otro menos denso se produce una reflexión, la fracción del haz incidente que se refleja es mayor a medida que aumenta el ángulo de incidencia y más allá de cierto ángulo crítico, la reflexión es completa. Durante el proceso de reflexión, el haz se comporta como si penetrase una cierta distancia en el medio menos denso antes de reflejarse, la profundidad de penetración puede variar desde una fracción de longitud de onda hasta varias longitudes de onda y depende de la longitud de onda de la radiación incidente, del índice de refracción de los materiales y del ángulo que forma el haz incidente con la interfase. Si el medio menos denso absorbe la radiación, se produce una atenuación del haz en las longitudes de onda de las bandas de absorción, este fenómeno se conoce como reflectancia atenuada. Los espectros pueden obtenerse en el infrarrojo desde 100 hasta los 4000 cm^{-1} [78].

Los espectros de ATR son similares a los de absorción y se observan los mismos picos, pero con intensidades relativas distintas, las absorbancias son independientes del espesor de la muestra, debido a que la radiación sólo penetra unos pocos micrómetros en la muestra (0.5 a 2 μm). La ventaja es que se puede utilizar poca muestra, la técnica es no destructiva y no requiere preparación de muestra, por lo que en los andamios es una herramienta para poder detectar cambios en la composición de los materiales obtenidos [79].

3.7.2. Resonancia magnética nuclear de protón

La resonancia magnética nuclear de polímeros en solución es un importante método para estudiar la estructura molecular. El método se basa en el del desplazamiento químico de las señales de enlaces de átomos de hidrogeno, ^{13}C , ^{19}F , etc. [77], estos desplazamientos se relacionan con la medida de la absorción electromagnética en los átomos (en la región de 4 a 900 MHz) [79].

3.7.3. Determinación de pesos moleculares por GPC

Las macromoléculas pueden ser fraccionadas de acuerdo a su constitución configuración o peso molecular por métodos cromatográficos, una de las más utilizadas es la cromatografía de permeación en gel (GPC), la cual se basa en la separación de pesos moleculares a través de una columna con poros de varios diámetros [77]. Las moléculas son atrapadas eficazmente en los poros y eliminadas por el flujo de la fase móvil, el tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las sustancias; las moléculas más grandes son las primeras en eluir [14].

3.7.4. Análisis térmico

3.7.5. Análisis termogravimétrico (TGA)

En un análisis termogravimétrico se registra continuamente la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada en función de la temperatura o del tiempo en que aumenta su temperatura (por lo general, en forma lineal con el tiempo).

Puesto que TGA verifica la masa del analito con ayuda de la temperatura, la información que proporciona es cuantitativa, pero limitada a las reacciones de descomposición y de oxidación, además a procesos como vaporización, sublimación y desorción. Entre las aplicaciones más importantes están el análisis de composición y los perfiles de descomposición de sistemas con múltiples componentes [79].

3.7.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En este análisis se mide la diferencia del flujo de calor entre la muestra y la referencia en función de la temperatura de la muestra cuando las dos están sometidas a un programa de temperatura controlado que puede aumentar o disminuir linealmente.

Es una técnica que se utiliza ampliamente para estudiar y caracterizar polímeros. Con ella es posible determinar transiciones como punto de fusión (T_m), ebullición, descomposición, oxidación y transición vítrea en el caso de los polímeros (T_g). También a partir de los termogramas es posible interpretar diagramas de fase [79].

3.7.7. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La técnica consiste en barrer mediante un rastreo programado la superficie de un sólido con un haz de electrones de elevada energía y como consecuencia de esa interacción se producen varios tipos de emisión, como electrones retrodispersados, secundarios y Auger,

así como rayos X y otros fotones de diversas energías. Las emisiones son detectadas y transformadas para conseguir una visualización óptica de la zona analizada [79].

3.7.8. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto es una medida de la capacidad de un líquido para extenderse sobre un sólido. Para ello se considera la tensión superficial de una gota de disolvente en la interfase con una superficie homogénea. Con el ángulo de contacto se mide la atracción de moléculas entre sí dentro de una gota, comparado con la atracción o repulsión que experimentan las moléculas de la gota hacia las moléculas superficiales. Éste se define como el ángulo entre, la tangente a la superficie de la gota y la tangente a la superficie en la intersección vapor-liquido-sólido. Un ángulo de contacto grande entre una gota de agua y un material representa que la superficie es hidrófoba ($\theta \geq 90^\circ$) y tiene baja energía superficial, mientras que un ángulo más pequeño ($\theta \leq 90^\circ$) la superficie es hidrófila [14]

3.7.9. Pruebas mecánicas de tensión uniaxial

En los andamios es importante conocer las propiedades mecánicas, principalmente la resistencia del material, la cual dependerá de su capacidad para soportar una carga sin deformación excesiva o falla. Esta propiedad es inherente al material mismo y debe determinarse por experimentación, una de las pruebas más importantes es la de tensión o compresión, cuya aplicación principal sirve para determinar la relación entre el esfuerzo normal promedio y la deformación normal unitaria. La prueba consiste en cortar una muestra con dimensiones estándar (ASTM D1708-96) y son sometidas a un esfuerzo de tensión uniaxial y a partir de los resultados se construye el gráfico esfuerzo-deformación (Figura 16).

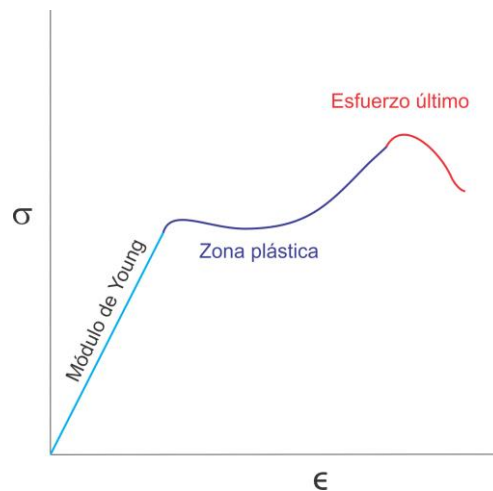


Figura 16 Gráfico esfuerzo-deformación. Se observan las regiones más comunes en materiales poliméricos.

Mediante este gráfico es posible determinar el módulo de elasticidad o módulo de Young:

$$\sigma = E * \epsilon \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde E representa la constante de proporcionalidad (módulo de Young), σ el esfuerzo y ϵ la deformación. Así pues el módulo de Young es una propiedad mecánica que indica la rigidez de un material [80].

3.8. *Diseño experimental Taguchi (DET)*

De acuerdo con la Sociedad Americana para la Calidad (ASQ *por sus siglas en inglés*) el diseño de experimentos (DE) es una rama de la estadística aplicada, en la cual por medio de pruebas realizadas, controladas, planeadas y analizadas se evalúan los factores que influyen sobre el resultado de un parámetro o grupo de parámetros. Muchos experimentos involucran el mantener constante cierto factor y alterar los niveles de otra variable. Esto es “un factor a la vez” con el propósito de estudiar el proceso, sin embargo se vuelve ineficiente cuando se compara con factores que cambian de nivel simultáneamente. Muchos de las herramientas para diseñar experimentos surgieron a partir del trabajo de R.A. Fisher a principios del siglo XX. Fisher demostró que se debe tomar el tiempo para el diseño y ejecución de un experimento antes de hacerlo para evitar problemas durante su análisis. Conceptos clave en la creación de un diseño de experimentos incluyen: el bloqueo, cuando aleatorizar un factor es imposible o demasiado costoso; aleatorización, el orden en el cual los ensayos son realizados y que permite eliminar efectos desconocidos o variables no controlables; y replicación, el número de tratamientos experimentales [81].

Un diseño experimental bien elaborado permite obtener respuestas a preguntas como: ¿cuáles son los factores clave en el proceso? ¿A qué condiciones el proceso puede tener un desempeño aceptable? ¿Qué condiciones podrían dar lugar a una menor variación en el resultado? Y típicamente se realiza un barrido de las variables a estudiar, un diseño factorial completo y un diseño de superficie de respuesta con el propósito de optimizar el proceso [81]. Sin embargo, el electrohilado es una técnica con demasiadas variables, desde la naturaleza del polímero hasta la humedad del ambiente y estas influyen en el resultado, por ejemplo, del diámetro de fibra, es por eso que una alternativa es utilizar un DE más robusto como el diseño experimental Taguchi. Este permite la exploración de efectos factoriales significantes y las condiciones óptimas con un número mínimo de ensayos, lo cual lo se puede apreciar en la Tabla 8 y para su construcción simplemente es colocar las condiciones bajo las cuales se trabajará durante el proceso de acuerdo a las variables que se desean observar y que son consideradas de alto impacto [82, 83].

Para determinar qué factores impactan en determinada respuesta se realiza un análisis de varianza utilizando la estadística F de Fisher y adicionalmente un análisis gráfico para hacer más fácil su interpretación. Los criterios para determinar que una variable no presenta impacto, consisten en que $F_{tablas} < F_{experimental}$ y que las dimensiones de la recta en el análisis gráfico no sean grandes, es decir, una pendiente cercana a cero [83, 84].

Tabla 8 Diferentes situaciones experimentales y su correspondiente tamaño de experimentos [83]

Situación experimental	Condiciones máximas posibles	Tamaño del diseño experimental Taguchi
3 factores a 2 niveles	8	4
7 factores a 2 niveles	128	8
11 factores a 2 niveles	2048	12
15 factores a 2 niveles	32768	16
4 factores a 3 niveles	81	9
7 factores a 3 niveles	2187	18

4. Justificación

Los andamios son sistemas que funcionan como soporte (al simular las funciones de la matriz extracelular) en el crecimiento de células. Existen diferentes técnicas para fabricarlos y una de ellas es el electrohilado que permite la obtención de fibras al aplicar un voltaje a una solución polimérica y que pueden llegar a tener propiedades homogéneas cuando se establecen los parámetros óptimos. Los andamios se fabrican de polímeros sintéticos como PCL, sin embargo, es hidrofóbico, por lo que una alternativa es funcionalizarlo con moléculas como el anhídrido maléico. En la fabricación de andamios también pueden ser utilizados polímeros naturales como el colágeno el cual puede electrohilarse en su forma hidrolizada al ser más barato. Estos polímeros son biocompatibles, biodegradables y no son tóxicos.

Una de las lesiones a tratar en la regeneración de tejidos son las quemaduras, las cuales en los últimos 5 años alcanzan un promedio de 113 531 pacientes en México. El dolor y la inflamación son síntomas que se presenta durante el traumatismo y para aliviarlo se administran analgésicos antiinflamatorios para quemaduras de segundo grado, uno de ellos es el diclofenaco cuya acción es inhibir la síntesis de prostaglandinas.

Por todo lo anterior en este trabajo se fabricaron por medio de electrohilado andamios de PCL modificado con AM mezclados con hidrolizados de colágeno tipo I como sistema de liberación de diclofenaco y se evaluó por medio del diseño experimental Taguchi el efecto en diámetro de fibra, ángulo de contacto y propiedades mecánicas, cuyas variables independientes fueron: temperatura de funcionalización, concentración de PCLAM, relación PCLAM-CH, velocidad de inyección y voltaje.

5. Objetivo

Fabricar, caracterizar y evaluar sistemas de nanofibras obtenidos por medio de electrohilado a partir de la mezcla: poli (ϵ -caprolactona) funcionalizado con anhídrido maléico, hidrolizados de colágeno tipo I y diclofenaco; para su potencial aplicación en liberación de fármacos.

5.1. *Objetivos particulares*

Obtener PCL funcionalizada con anhídrido maléico (PCLAM) mediante una reacción por radicales libres.

Determinar su porcentaje de funcionalización, la reducción de hidrofobicidad y propiedades fisicoquímicas.

Fabricar andamios por la técnica de electrohilado a partir de disoluciones que contienen PCLAM, hidrolizados de colágeno tipo I (CH) y diclofenaco sódico (DS).

Estudiar los posibles cambios en los andamios mediante ATR-FTIR, TGA, DSC,

Evaluar la cinética de liberación *in vitro* de los andamios

Determinar los efectos de mayor impacto en los resultados de diámetro de fibra, propiedades mecánicas y cinética de liberación, a través del diseño experimental Taguchi L8.

6. Hipótesis

Por medio del método de electrohilado y utilizando el diseño de experimentos Taguchi, se obtendrán andamios con la capacidad de liberar un analgésico-antiinflamatorio.

7. Materiales y Métodos

Para la fabricación y la caracterización de las microfibras se adquirieron los siguientes materiales, todos grado reactivo y sin ninguna purificación posterior: poli (ϵ -caprolactona) (PCL) PM 70-80000, peróxido de benzoilo (BPO), anhídrido maléico (AM), tetrahidrofurano (THF), ácido metacrílico, nitrógeno, metanol, diclofenaco sódico (DS) y trifluoroetanol (TFE) adquiridos de *Sigma-Aldrich Co.*; hidrolizados de colágeno tipo I (CH) adquirido de *Russelott®*; fosfato de sodio monobásico, fosfato ácido de sodio, hidróxido de potasio (KOH), tolueno, fenoltaleína adquiridos de *JT Baker S.A de C.V.*, agua destilada a partir de un equipo *Nanopure Diamond®*

7.1. Funcionalización de poli (ϵ -caprolactona) con anhídrido maléico

Con la finalidad de disminuir la hidrofobicidad de PCL se llevó a cabo la funcionalización de ésta utilizando AM, el método se basó en el trabajo realizado por Alcántara [14], y consistió en colocar en un matraz de tres bocas 5 g de PCL, 0.5 g de AM y 0.025 g de peróxido de benzoilo, se agregaron 20 mL de tolueno, se purgó con nitrógeno durante 5 minutos y se calentó a dos temperaturas diferentes 110 °C (PCLAM 1) y 70 °C (PCLAM 2) manteniendo una agitación de 200 rpm durante 15 horas. Posteriormente se agregaron 20 mL de metanol para precipitar el PCLAM, se filtró el polímero al vacío (30 mm Hg), se hicieron lavados con 5 mL metanol, el polímero se secó en una estufa a 30 °C y 40 mm Hg y se almacenó para su análisis.

7.1.1. Porcentaje de injerto

7.1.1.1. Espectrofotometría

La cuantificación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Zhu, Gao, *et al.* [38], el cual consistió en extraer la rodamina 6G de una solución fosfatos 0.2 M pH=12 (10 mg de rodamina 6G en 10 mL) con 25 mL de tolueno, de esta solución se tomaron 30 μ L y se adicionaron a un matraz volumétrico de 2 mL el cual contenía una solución de tolueno con 10 mg de PCLAM, previamente tratado con agua para promover la hidrólisis del anhídrido maléico y secado al vacío. Se le realizó a la muestra una dilución 1 en 10 para poder cuantificarla utilizando un espectrofotómetro *Ocean Optics, Inc. SAD500* a 516 nm. La concentración se calculó mediante una curva de calibración utilizando ácido acrílico como molécula de prueba (ver Anexo 8.1)

7.1.1.2. Valoración ácido base

Este ensayo fue utilizado para comprobar que si hay mayor presencia de grupos donadores de protones debidos a la presencia del anhídrido maléico. La prueba está basada en el método descrito por Nakason, Kaesaman, *et al.* [85], y consiste en colocar en reflujo durante 2 horas con 20 μ L de agua destilada una solución polimérica de PCLAM de 5 mL al 1% (w/v) para promover la hidrolisis del anhídrido maléico, posteriormente se valoró la solución utilizando una solución de hidróxido de potasio al 0.025 M y como indicador se usó fenolftaleína. El porcentaje de injerto se calcula con la siguiente fórmula:

$$\%(AM) = \frac{(v_1 - v_0)M}{2w} * 98 * 100\%$$

Donde w es la concentración (mol/L) de hidróxido de potasio, v_1 y v_0 son el volumen gastado de KOH de la muestra y el blanco (PCL bajo las mismas condiciones) durante la valoración, M es el peso molecular del AM y w es la masa de polímero utilizada en cada valoración.

7.1.2. Espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier

Esta técnica se utilizó para poder observar la presencia de anhídrido maléico en PCL. Las muestras se analizaron en el equipo *Thermo Scientific, Nicolet 6700* y al ser un equipo de reflectancia total atenuada no fue necesaria la preparación de muestras. En el portamuestra fueron colocados alrededor de 10 mg de muestra y se ajustó por medio del tornillo, la señal de CO_2 que se presenta debido al contacto del aire con la muestra. El análisis se efectuó en un intervalo de 4000 a 500 cm^{-1}

7.1.3. Resonancia magnética nuclear de protón

Esta técnica hizo posible la confirmación de la funcionalización con el anhídrido maléico en PCL. Para poder realizar el análisis la muestra se prepara una disolución de 15 mg en 1 mL de cloroformo deuterado (CDCl_3) para PCLAM y PCL, y en agua deuterada (D_2O) para CH y DS: Las muestras se analizan en sonda de líquidos en un equipo *Bruker Avance III microbay* a 400 MHz y se empleó tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

7.1.4. Cromatografía de permeación en gel

Para determinar la distribución de peso molecular de PCL una vez funcionalizado con AM se realizó el análisis por esta técnica. La preparación de muestra consistió en preparar

soluciones en THF (grado HPLC) con una concentración de 2 mg/mL. Las soluciones se analizaron en un cromatógrafo *HPLC Perkin Elmer series 200*, utilizando para la curva de calibración un estándar de poliestireno y como fase móvil THF. Los resultados son reportados como peso molecular número promedio (Mn) y peso promedio (Mw) además del índice de polidispersidad (IP).

7.1.5. Análisis termogravimétrico

Este análisis se realizó para observar si se presentan cambios en la temperatura de descomposición PCLAM y PCL. El método consistió en colocar alrededor de 10 mg de muestra en una charola para TGA, se calentó de 25 a 600 °C a una velocidad de 10 °C/min con una atmósfera de nitrógeno para ello se utilizó el equipo *TA Instruments SDT Q600 Module DSC-TGA Standard*. Los termogramas obtenidos se analizan mediante el software *TA Universal Analysis*.

7.1.6. Calorimetría diferencial de barrido

Para determinar las transiciones vítrea y de fusión de PCL y, del polímero funcionalizado con AM se realizó DSC, con el objetivo de conocer que cambios se presentaban después de la funcionalización y si impactaba para la aplicación destinada. La preparación de la muestra fue similar a TGA, las mediciones se realizaron de -80 a 100 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y con atmósfera de nitrógeno mediante un equipo *TA Instruments DSC Q100* y los resultados se analizaron con el programa *TA Universal Analysis*.

7.2. Fabricación de andamios

Una vez realizada la caracterización fisicoquímica de PCLAM, se buscó un disolvente adecuado para solubilizar la mezcla PCLAM/CH/DS el cual fue el trifluoroetanol.

La fabricación de andamios se realizó con base a un diseño experimental Taguchi L8, el cual es un diseño experimental factorial fraccionado. En la Tabla 9 se muestra el diseño experimental y las variables que se modificaron utilizando dos niveles. Para electrohilar se disolvieron las cantidades de PCLAM y CH en la cantidad necesaria de trifluoroetanol para completar un volumen de 5 mL, posteriormente se adicionó DS en una concentración al 10% (w/w) con respecto a PCLAM, las soluciones se agitaron durante 24 horas a 200 rpm, posteriormente se montaron en jeringas de 5 mL (aguja punta roma calibre 21G, 0.8 mm) en un bomba de inyección y las variables que se fijaron para electrohilar fueron: la distancia

aguja-colector 15 cm, la humedad relativa en un rango de $35\pm 5\%$, el colector utilizado fue una placa de aluminio de 16 cm^2 .

Tabla 9 Diseño Experimental Taguchi L8 a dos niveles

No	Temperatura de síntesis (°C)	Proporción PCLAM-CH	Concentración PCLAM %(w/v)	Flujo (mL/h)	Voltaje (kV)
A1	70	70-30	10	0.3	10
A2	70	70-30	10	0.5	15
A3	70	80-20	15	0.3	10
A4	70	80-20	15	0.5	15
A5	110	70-30	15	0.3	15
A6	110	70-30	15	0.5	10
A7	110	80-20	10	0.3	15
A8	110	80-20	10	0.5	10

7.2.1. Caracterización fisicoquímica

El análisis fisicoquímico fue similar al que se realizó a PCLAM, excepto el análisis de por GPC y RMN H^1 , además se realizó SEM, ángulo de contacto y ensayo mecánico de tensión.

7.2.2. Microscopía electrónica de barrido

Con la finalidad de conocer la morfología, distribución de diámetro de fibras y una aproximación de la superficie porosa se realiza este análisis. La preparación de muestra consiste en colocar un andamio de $4 \times 3\text{ mm}$ sobre un portamuestras de acero inoxidable, posteriormente se recubre la muestra con oro mediante un equipo *JEOL JPC-1100* y se observa en el microscopio *JEOL Field Emission JSM-7600F*, con un detector de electrones retro dispersados (LBE) y electrones secundarios (SE). La medición del diámetro de fibras se realizó con el programa *ImageJ*[®].

7.2.3. Ángulo de contacto

La determinación del ángulo de contacto nos da información sobre la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica de los andamios fabricados. La muestra se recortó con un área de 1 cm^2 , con el cuidado de no tocarla con las manos. El equipo que se utilizó fue un goniómetro *Ramehart, inc. Modelo 100-07-00*, adaptado con un sistema óptico para observar la interacción de la gota de agua ($8\text{ }\mu\text{L}$) con la superficie del andamio, el análisis de imágenes se realizó mediante el programa *ImageJ*[®] para determinar el ángulo de contacto.

7.2.4. Pruebas mecánicas de tensión uniaxial

Para conocer las propiedades mecánicas de los andamios fabricados y poder compararlas entre los diferentes ensayos del modelo experimental Taguchi L6 se realizó el ensayo mecánico de tensión. Para poder analizarlas la muestra necesitó tener un grosor aproximado de 0.2 mm, y se necesitan 5 probetas de acuerdo con la norma *ASTM D1708-96*, las muestras fueron analizadas en un equipo *Instron 5500R*, con una celda de carga de 500 N y velocidad de deformación de 10 mm/min a 25 °C.

7.2.5. Ensayo de cinética de liberación

El ensayo de liberación sirvió para conocer el comportamiento que sigue diclofenaco en un medio de buffer de fosfatos salino pH=7.4 (PBS) desde las nanofibras. El experimento se realizó colocando alrededor de 1 mg de andamio sobre una membrana de poli-fluoruro de vinilideno de 0.22 µm, ambas se colocaron entre la cámara receptora y donadora de la celda de Franz, la cámara receptora se llenó con PBS (6 mL) y se mantuvo regulada térmicamente a 37±1°C. La toma de muestra se realizó tomando una alícuota de 1 mL de la celda y reponiendo con medio fresco a diferentes tiempos. Las muestras se analizaron utilizando un espectrofotómetro *Ocean Optics Inc. SD2000* y se midieron a 280.45 nm, calculando la concentración de acuerdo con una curva de calibración (ver Anexo 8.2). El análisis de resultados se realizó utilizando el software *OriginPro 8.5®*.

8. Resultados y análisis

8.1. Funcionalización de poli (ϵ -caprolactona) con anhídrido maléico

La funcionalización se realizó por medio de una reacción por radicales libres utilizando como iniciador peróxido de benzoilo, el propósito fue reducir la hidrofobicidad del PCL. A continuación se describen los resultados obtenidos.

8.1.1. Porcentaje de injerto

El porcentaje de injerto varió de 4.98 a 5.17%, Tabla 10. Estos resultados son superiores a los obtenidos por Alcántara [14] donde reporta que es hasta de 2.147% , en condiciones de operación similares a las de este trabajo. Cabe mencionar que esos resultados reportados fueron calculados mediante la integración de picos de resonancia magnética nuclear de protón del anhídrido maléico injertado, contrastando así con los obtenidos en este trabajo por espectrofotometría, es importante señalar que un análisis estadístico de comparación de medias demuestra que no hay diferencia entre ellas a un nivel de $p=0.05$ por lo que los resultados guardan relación entre ellos.

Tabla 10 Porcentaje de injerto por espectrofotometría

	Media (%)	σ (%)	t_{calc}	t_{tab}
PCLAM 1	4.98218	0.99618	0.34999	1.7496
PCLAM 2	5.17144	0.84239	0.41544	1.7171

Adicionalmente, como método de comprobación se realizó una prueba para corroborar los resultados obtenidos, la cual consistió en una valoración volumétrica con hidróxido de potasio y de la cual se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 11, donde se observa que efectivamente se llevó a cabo un incremento en la presencia de grupos ácido carboxílico y el análisis estadístico demuestra que a un nivel de $p=0.05$ no existe diferencia entre los resultados obtenidos.

Tabla 11 Porcentaje de injerto por valoración ácido base

	Media (%)	σ (%)	t_{calc}	t_{tab}
PCLAM 1	5.22303	0.45763	1.46211	1.8331
PCLAM 2	6.76966	0.81128	0.17174	2.3534

8.1.2. Determinación de grupos funcionales por espectroscopia ATR-FTIR

El análisis infrarrojo se llevó a cabo para determinar si efectivamente se había llevado a cabo la funcionalización en PCLAM 1 y 2, de esta manera se analizaron los grupos funcionales del polímero modificado mediante la técnica de espectroscopia infrarroja de reflexión total atenuada con transformadas de Fourier (ATR-FTIR). Obteniendo como resultados el espectro de la Figura 17, en el cual se observa que los espectros tanto de PCL como de los polímeros funcionalizados con anhídrido maléico coinciden en la región de 500 a 1500 cm^{-1} , las bandas características de PCL son mostradas en la Tabla 12, cabe mencionar que se presenta disminución de las señales (porcentaje de transmitancia) para

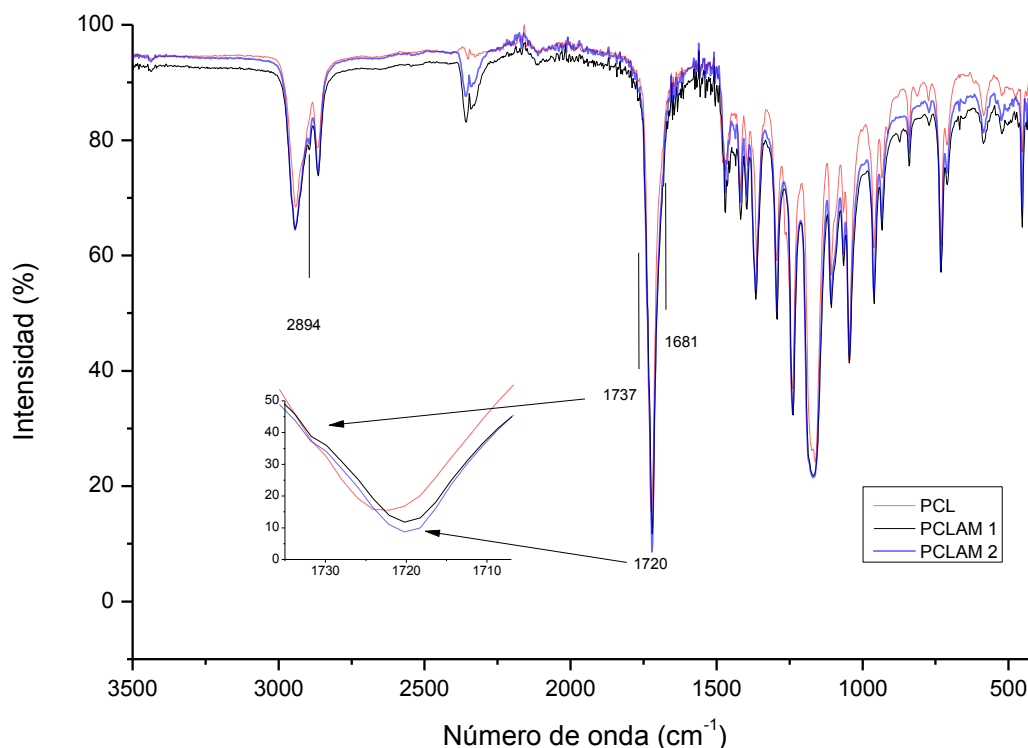


Figura 17 Espectros ATR-FTIR de PCL y PCLAM. Se muestran las bandas a 2894, 1737 y 1681 cm^{-1} debidas al anhídrido maléico y el incremento en adsorción de C=O en la banda de 1720 cm^{-1} . PCLAM1 y 2 son los polímeros funcionalizados a 110 y 70 °C, respectivamente

los polímeros funcionalizados, sin embargo, son claras las diferencias que se presentan a 2894 cm^{-1} cuya vibración corresponde a grupos $\text{R}_3\text{-CH}$ que pertenecen al grupo metino del AM y PCL donde ambos están enlazados, en 1737 y 1681 cm^{-1} se encuentran los pequeños hombros característicos del AM según lo reportado por Wu & Liao [86] y que señalan la presencia de grupo funcional éster y de un ácido carboxílico insaturado, por otro lado la

banda de 1720 cm^{-1} presenta un mayor porcentaje de área bajo la curva, del 3.7% para PCLAM 1 y de 6.9% para PCLAM 2, lo cual se atribuye a que se trata del anhídrido maléico anclado al polímero.

Tabla 12 Bandas características de PCL funcionalizado con AM determinadas de los espectrogramas ATR FTIR

Vibración	Bandas (cm^{-1}) PCL	Bandas (cm^{-1}) PCLAM 1	Bandas (cm^{-1}) PCLAM 2
CH ₂ tensión asimétrica	2940	2942	2944
R ₃ - CH tensión	----	2894	2900
CH ₂ tensión asimétrica	2867	2864	2863
C=O tensión	1722	1737, 1720, 1681	1737, 1720, 1681
C-O y C-C tensión	1294	1292	1293
C-O-C tensión asimétrica	1240	1238	1238
C-O-C tensión asimétrica	1160, 1106, 1045	1168, 1106, 1045	1168, 1106, 1045

8.1.3. Determinación de estructura por RMN-H¹

La caracterización por resonancia magnética de protón, se realizó para determinar la presencia, tanto de los grupos pertenecientes a poli (ϵ -caprolactona) como del protón del grupo metino del carbono número 8 de la molécula que se muestra en la Figura 18.

Los resultados mostraron que una vez funcionalizado el PCL con AM, se detectó un grupo metino a un desplazamiento de 3.54 ppm, contrastando así, con lo reportado en el trabajo de Alcántara [14] en el que asume de igual manera que la detección del pico a 3.85 ppm se debe a la presencia de hidrógenos pertenecientes al AM funcionalizado con PCL.

Por otro lado las señales características de PCL fueron encontradas a 1.22, 1.48, 2.15, 3.90 ppm contrastando así con los resultados en diferentes trabajos como los de Alcántara [14], Kim & Reneker [87] y Song, Liu, *et al.* [88], los cuales están descritos en la Tabla 13.

Por otra parte y de manera cualitativa se observó en este análisis que para PCLAM funcionalizado a una temperatura de 70 °C el pico a 3.54 ppm aumenta en 0.004 unidades con respecto a el funcionalizado a 110 °C, lo cual representa otra prueba de que a menor

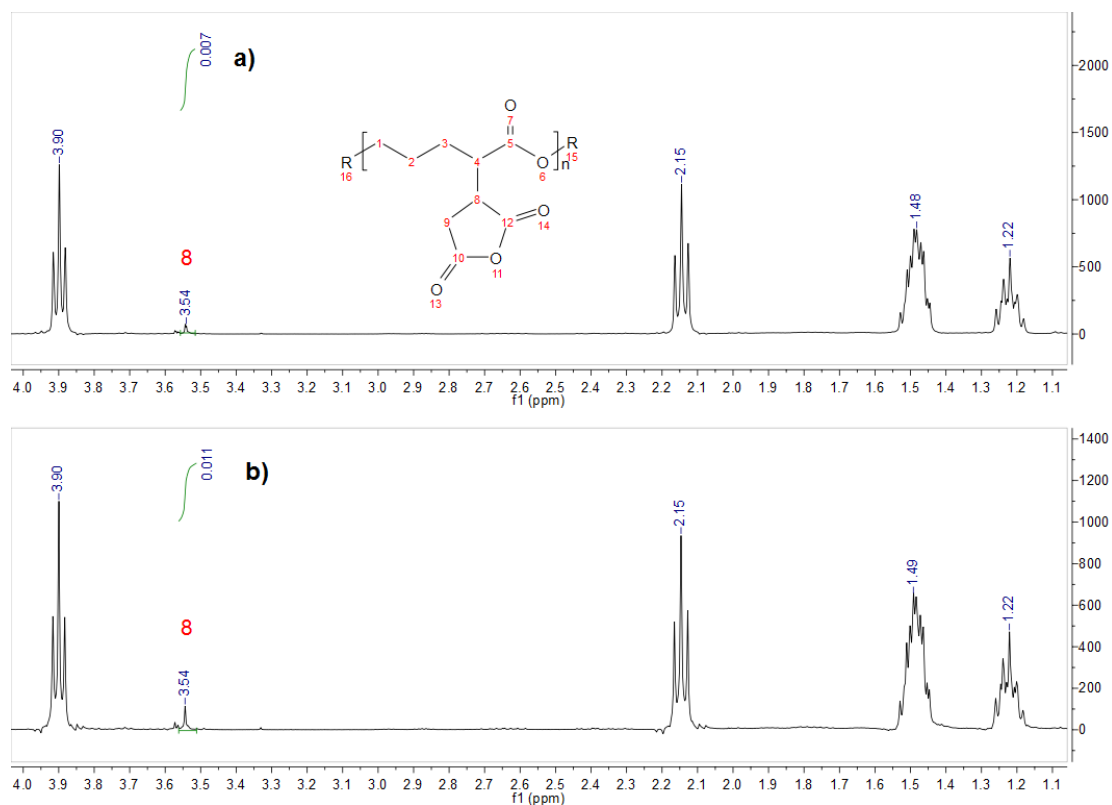


Figura 18 Espectrogramas de resonancia magnética nuclear de protón de a) PCLAM funcionalizado a 110 °C y b) PCLAM funcionalizado a 70 °C. Se muestran los picos característicos de PCL a 1.22, 1.48, 2.15, 3.90 ppm y del AM a 3.54 ppm, cuyo carbono es el número 8 de la estructura molecular.

temperatura de reacción aumenta la funcionalización, sin embargo, no se puede hacer un cálculo preciso por esta técnica, debido a la variación en los resultados en la distribución de pesos moleculares y a que sería necesario estandarizar la técnica, es por ello que las técnicas confirmatorias son las espectrofotométrica y volumétrica.

Tabla 13 Desplazamiento químico característico del PCL injertado con AM

Alcántara [14]	Kim, Cho, et al. [39]	Song, Liu, et al. [88]	PCLAM1	PCLAM2
4.00	4.15	4.1	3.93*	3.93*
3.85	----	-----	3.54	3.54
2.25	2.25	2.3	2.15	2.15
1.59	1.70	1.6	1.48	1.49
1.32	1.25	1.4	1.40	1.22

8.1.4. Determinación de peso molecular por cromatografía de permeación en gel (GPC)

La determinación de peso molecular se realizó con el objetivo de identificar en qué proporción la temperatura de reacción afecta el peso molecular. Los resultados obtenidos por GPC, Tabla 14, muestran los diferentes promedios del peso molecular obtenidos para PCL y, PCLAM a 70 y 110 °C. El peso molecular número promedio (M_n) demuestra que éste disminuye en un 60.7% para el polímero funcionalizado a 110 °C, mientras que para el de 70 °C disminuye en un 56.4%, por lo que un incremento en la temperatura de funcionalización promueve una disminución mayor del peso molecular, debido a que la velocidad de descomposición del BPO aumenta con la temperatura dando lugar a reacciones secundarias, además del hecho que permite una menor funcionalización. Los resultados son contrastantes, pues a partir de una concentración de iniciador, a la cual hay un máximo de funcionalización acorde con Alcántara [14], existe otro factor que influye y es la temperatura a la cual sucede la reacción. Por otra parte lo reportado por John, Tang, *et al.* [89] demuestra que es posible afectar el peso molecular al funcionalizar con anhídrido maléico.

Tabla 14 Resultados obtenidos de peso molecular (g/mol) mediante GPC.

Muestra	M_n	M_w	PDI (M_w/M_n)
PCL	117834	184935	1.569
PCLAM 110 °C	46242	75810	1.639
PCLAM 70 °C	51285	81913	1.023

8.1.5. Temperaturas de descomposición por análisis térmico (TGA)

El análisis térmico por TGA se realizó desde 25 °C hasta 600° con el propósito de conocer bajo qué condiciones no hay cambios químicos en los polímeros, como puede ser una descomposición. Los resultados se muestran en la Figura 19 en la cual se puede observar que la mayor pérdida en masa, tanto para PCL como PCLAM, tuvo lugar entre los 300 y los 500 °C con un punto medio, para PCL, (análisis diferencial) alrededor de los 404 °C, el cual

es debido a la descomposición del polímero como se ha comprobado en diversas investigaciones como la de Wu & Liao [86].

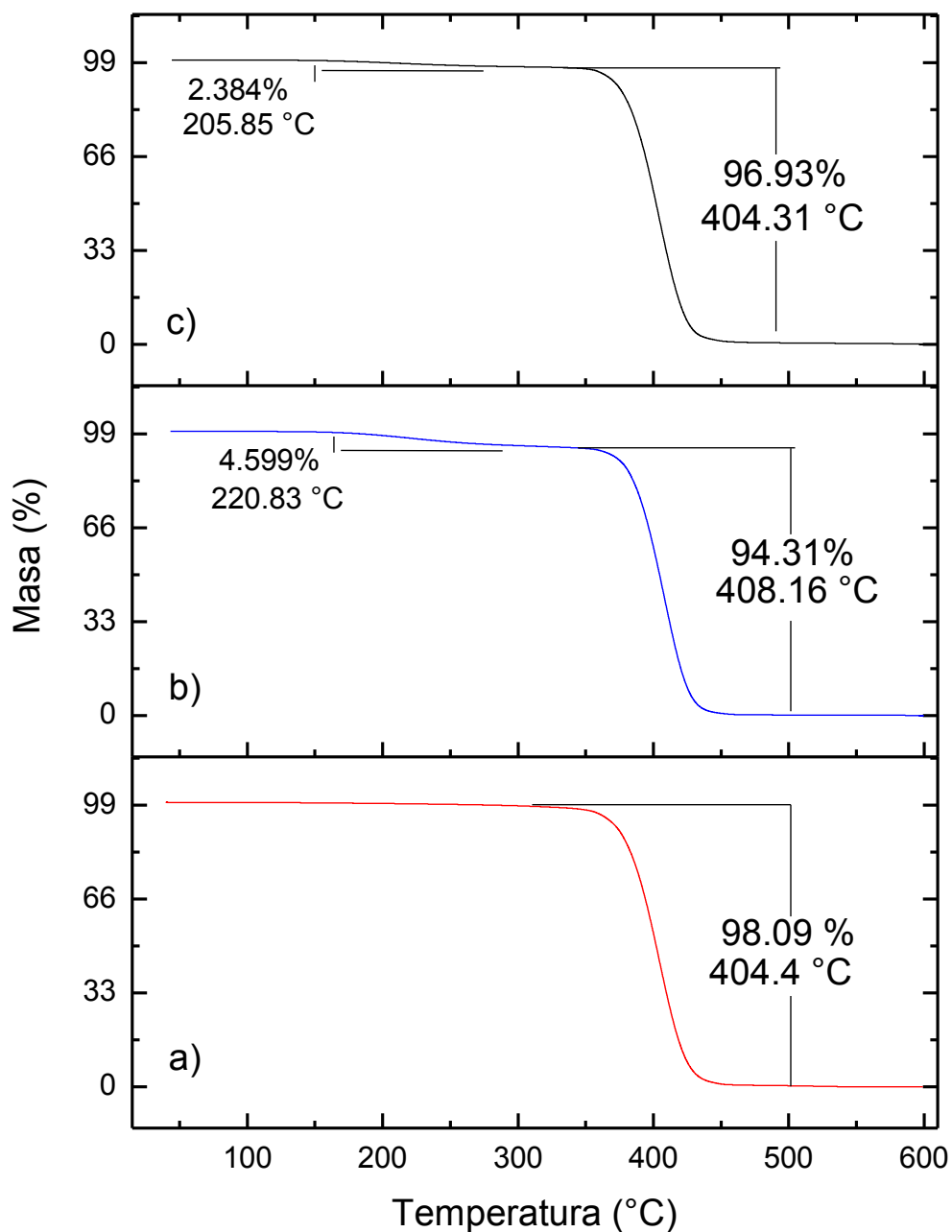


Figura 19 Termogramas de análisis termogravimétrico de: a) PCL, b) PCLAM funcionalizado a 110 °C y c) PCLAM funcionalizado a 70 °C. Se muestran las temperaturas de descomposición y el porcentaje de pérdida de peso.

Por otro lado en los polímeros funcionalizados con anhídrido maléico se encontró que aparece una primera etapa de pérdida en masa que comienza alrededor de los 150 °C, Alcántara [14] menciona que existe la posibilidad de que los oligomeros producidos al romper las cadenas de PCL por la reacción secundaria propia de la funcionalización, pueden dar lugar a esta etapa de descomposición, además el anhídrido maléico presenta un temperatura de descomposición que comienza en los 100 °C con un punto medio de 148 °C. En suma, el porcentaje en pérdida de masa aumenta para una mayor temperatura de funcionalización, debido a una mayor modificación estructural en las cadenas poliméricas como lo demostró la disminución del peso molecular.

8.1.6. Temperaturas de transición por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis DSC por otro lado, se realizó desde -80 °C hasta 110 °C, con el propósito de encontrar las transiciones del material, una de ellas fue la transición vítrea, la cual se encontró alrededor de los -61 °C. En particular es notable que la Tg aumenta de acuerdo con la temperatura de funcionalización (Figura 20), para una funcionalización a 70 °C (PCLAM2) le corresponde un valor de Tg=-60.88 °C, mientras que para el polímero funcionalizado a 110 °C (PCLAM 1) una de -58.83 °C, lo cual se atribuye a la disminución de peso molecular, pues al haber cadenas de menor tamaño la movilidad entre las macromoléculas aumenta dando lugar a que se presente una mayor proporción amorfa con respecto a la cristalina.

Por otro lado el estudio de Nakason, Kaesaman, *et al.* [85] en el injerto de AM al caucho natural también eleva la Tg, pues los grupos polares del AM le dan la capacidad a las moléculas de interactuar más entre ellas ofreciendo flexibilidad entre las cadenas. De esta manera también se explica el resultado obtenido para las transiciones endotérmicas que se encontraron alrededor de los 55 a 60 °C y que son atribuidas a la fusión (Tm) de los polímeros [26]. En particular en los resultados se observó un descenso de la temperatura de fusión al aumentar la temperatura de funcionalización para PCLAM 2 Tm=55.17 °C y para PCLAM 1 Tm= 53.48 °C, lo mismo sucede con su calor de fusión PCLAM 2 60.48 J/g y PCLAM 1 es de 56.06 J/g. Estos resultados demuestran que a pesar de que hay un mayor porcentaje de injerto en PCLAM 2 las propiedades térmicas se ven modificadas mayormente por la disminución del peso molecular, sin embargo, las transiciones ocurren a una temperatura mayor a 37 °C, además la descomposición ocurre a altas temperaturas

por lo cual no se vería comprometida la potencial aplicación como andamio en regeneración de piel.

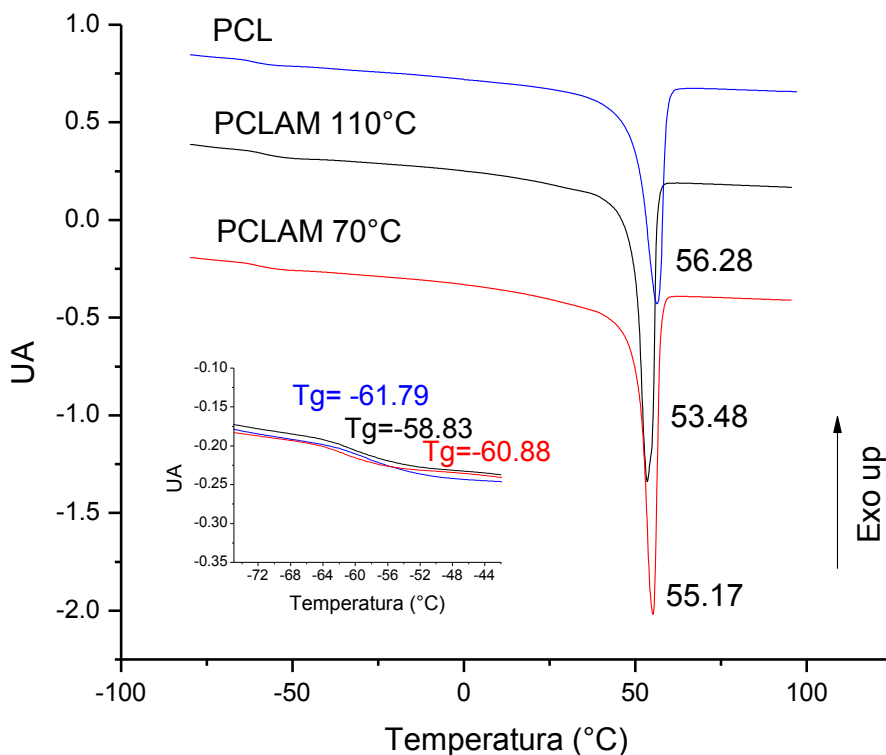


Figura 20 Termograma comparativo de DSC. Se observan las temperaturas de transición vítrea y las de fusión para PCL y PCLAM funcionalizado a 110 y 70 °C.

8.1.7. Hidrofobicidad de PCLAM por ángulo de contacto

Se midió el ángulo de contacto para determinar el efecto de la funcionalización en la hidrofobicidad de PCL. Se confirmó que al funcionalizar PCL disminuye su hidrofobicidad. Las muestras fueron obtenidas por electrohilado de PCLAM utilizando los siguientes parámetros: 10 kV, 10% w/v en TFE, velocidad de inyección 0.5 mL/h, 15 cm de distancia aguja-colector y 35 % HR. Los resultados mostrados en la Tabla 15

Tabla 15 Resultados de ángulo de contacto. Se observa una mayor disminución del ángulo de contacto en PCLAM funcionalizado a 70 °C.

Muestra	Media (θ)	σ (θ)
PCL	127.33	2.76
PCLAM 110 °C	114.81	3.36
PCLAM 70 °C	89.13	15.36

muestran una reducción del ángulo de contacto, lo cual se traduce en una menor hidrofobicidad, gracias a esto se podría presentar una mayor interacción con los componentes del andamio, además puede presentar una mayor interacción con las células de la dermis.

8.2. Andamios PCLAM/CH/DS

Una vez caracterizados los polímeros funcionalizados con AM, se llevó a cabo el electrohilado de los andamios por el diseño experimental Taguchi L8 (Tabla 9) y se analizaron las respuestas por diferentes técnicas para determinar posibles cambios en su composición química y optimizar el proceso de obtención de andamios.

Las diferentes variables se identifican con los siguientes símbolos: A=Temperatura de funcionalización, B=Proporción PCLAM:CH, C=Concentración de PCLAM, D=Flujo de inyección y E=Voltaje. El impacto de cada variable en los resultados del modelo Taguchi L8 se reflejan, de mayor a menor, en la longitud y la inclinación de las líneas en las gráficas de impacto que se muestran en las siguientes secciones.

8.2.1. Determinación de grupos funcionales por espectroscopia ATR-FTIR

Se utilizó esta técnica para analizar la posible reacción química entre los componentes de los andamios obtenidos y el análisis de los andamios fabricados se realizó de acuerdo con el modelo Taguchi. Se encontró que se presentan las bandas características de todos los componentes, (Figura 21) para hidrolizados de colágeno tipo I, la banda de 3294 cm^{-1} correspondió a las vibraciones de tensión de los grupos N-H, Sionkowska, Skopinska-Wisniewska, *et al.* [90] atribuyen la presencia de la amida A del colágeno y la ubica en los 3324 cm^{-1} , de la misma manera la banda a 3084 cm^{-1} concordó con la obtenida en 3072 cm^{-1} , la banda a 1660 cm^{-1} corresponde a la vibración de tensión C=O de amidas, la cual esta referenciada a 1657 cm^{-1} como amida I, a 1556 cm^{-1} se localizó la amida II correspondiente a vibraciones N-H. Para diclofenaco la banda de grupos O-H se localizó a 3294 cm^{-1} , la de C=C de grupos aromáticos se localizó a 1574 cm^{-1} , en 1520 cm^{-1} se encontró la banda perteneciente a aminas secundarias, 1396 cm^{-1} correspondió con la vibración de deformación asimétrica C-H y la banda a 1292 cm^{-1} , en conjunto estas últimas tres representan que el anillo esta trisustituido. También se encontraron las bandas de C-H de flexión fuera del plano, para compuestos aromáticos a 767 y 733 cm^{-1} y la banda 579 cm^{-1} que corresponde a vibraciones =C-C-C de flexión, todas las bandas son las reportadas

por Shen, Yu, *et al.* [59]. Por ultimo en el espectro ATR-FTIR se localizaron las señales características (analizadas anteriormente) de PCLAM a 2943, 2899, 2866, 1738, 1722, 1292, 1165, 1064 y 1045 cm^{-1} . En la Tabla 16 se encuentran a detalle las bandas obtenidas para cada andamio. Los resultados no mostraron la aparición de bandas nuevas, por lo que se descarta la modificación de los componentes a través del proceso de electrohilado.

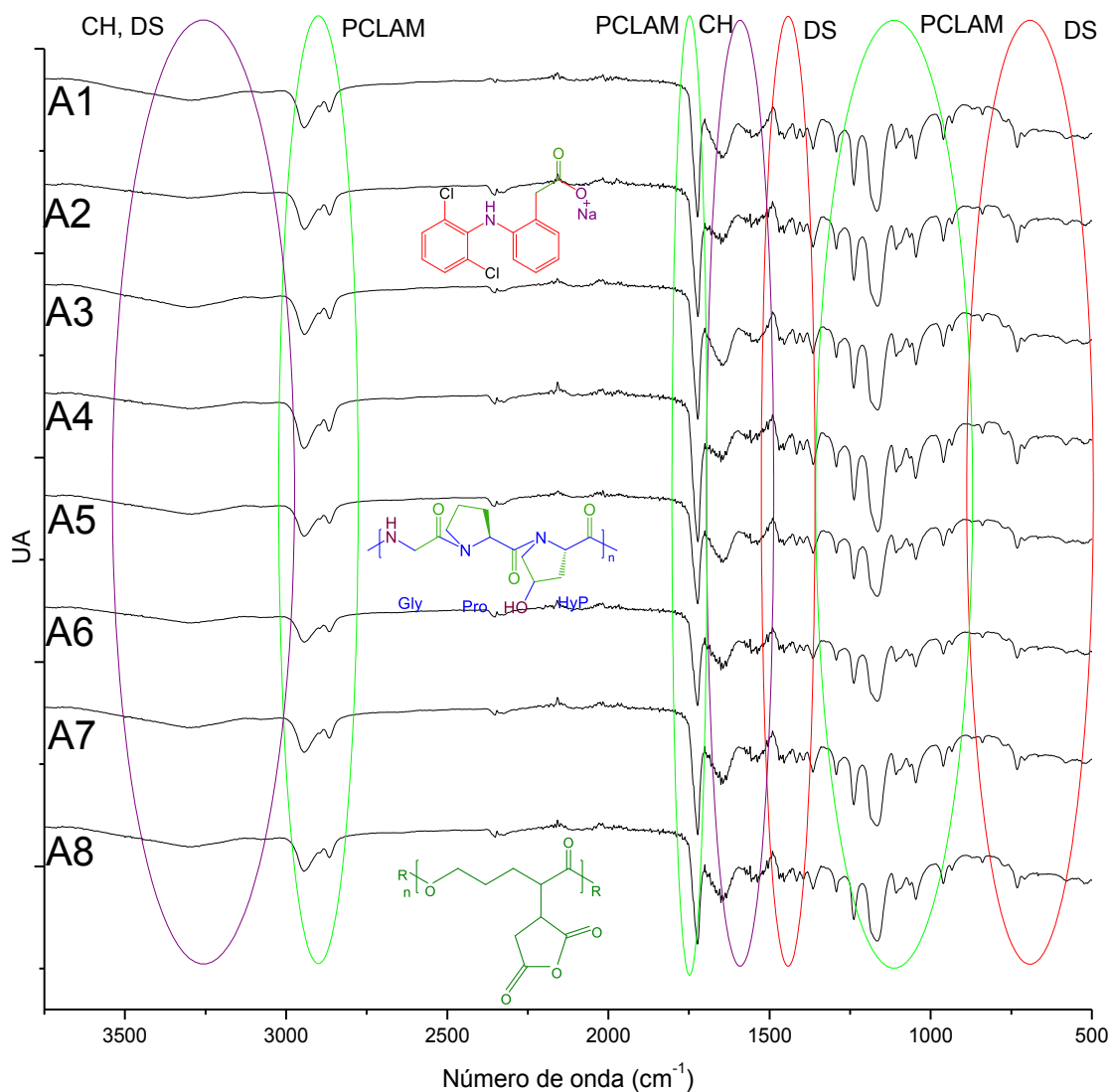


Figura 21 Análisis ATR-FTIR de los diferentes andamios (A1 a A8) fabricados de acuerdo con el diseño experimental Taguchi (A1-A8). Se resaltan las bandas características de PCLAM (verde), diclofenaco (rojo) e hidrolizados de colágeno tipo I (morado)

Tabla 16 Tipo de vibración, bandas características y asignación de las bandas encontradas por ATR-FTIR de los andamios A1 a A8 fabricados de acuerdo con el diseño experimental Taguchi L8.

Tipo de vibración	A 01	A 02	A 03	A 04	A 05	A 06	A 07	A 08	Asignación a:
Número de onda (cm ⁻¹)									
O-H, N-H tensión	3294	3296	3294	3292	3300	3296	3294	3298	CH, DS
O-H, N-H tensión	3078	3070	3072	3072	3070	3070	3072	3078	CH, DS
C=O tensión amida I	1659	1659	1660	1660	1659	1660	1660	1660	CH
N-H	1556	1556	1556	1556	1556	1556	1556	1556	CH
C=C Aromático	1574	1574	1574	1574	1574	1570	1574	1574	DS
-N-CH ₂ amida terciaria	1520	1520	1522	1520	1520	1520	1520	1520	CH
C-H deformación asimétrica	1396	1396	1396	1396	1396	1394	1396	1396	DS, PCLAM
C-O y C-C tensión	1292	1292	1292	1292	1292	1292	1294	1292	DS, PCLAM
Ar trisustituido C-H deformación fuera del plano	766	766	773	773	768	766	766	771	DS
Ar trisustituido C-H deformación fuera del plano	732	733	733	733	733	733	733	733	DS
=C-C-C flexión en el plano	579	579	579	579	579	579	582	579	DS
CH ₂ tensión asimétrica	2945	2943	2943	2945	2945	2943	2943	2945	CH, PCLAM
R ₃ -CH tensión	2900	2899	2895	2897	2899	2900	2897	2895	PCLAM
CH ₂ tensión asimétrica	2866	2866	2866	2868	2866	2865	2866	2866	CH, PCLAM
C=O tensión	1738	1738	1738	1737	1737	1738	1738	1738	PCLAM
C=O tensión	1724	1722	1722	1722	1722	1722	1722	1722	PCLAM
C-O y C-C tensión	1292	1292	1292	1292	1292	1292	1294	1292	PCLAM
C-O-C tensión asimétrica	1167	1165	1165	1165	1167	1165	1167	1167	PCLAM
C-C-C-C tensión simétrica	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	1065	PCLAM
C-C-C-C tensión simétrica	1045	1045	1045	1045	1045	1045	1045	1045	PCLAM

8.2.2. Temperaturas de descomposición por análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico se realizó con el propósito de analizar las principales temperaturas de descomposición de los andamios fabricados y determinar si interferirían durante la administración a los pacientes. De acuerdo con el modelo Taguchi, en la Figura 22, se muestran los termogramas obtenidos de los diferentes andamios fabricados y se encontró que presentan en general tres etapas de descomposición: la primera en un rango de 50 a 120 °C, la etapa II de 120 a 300 °C y la tercera continua hasta los 500 °C. La primera se atribuye a la pérdida de agua del colágeno y la desnaturalización del mismo reportada en otros trabajos como el de Sionkowska, Skopinska-Wisniewska, *et al.* [90], los máximos obtenidos por DTGA se encontraron entre los 49 y 54 °C (Tabla 17), los cuales son cercanos al máximo de CH (hidrolizados de colágeno tipo I), por lo que se confirma que es el pico de la eliminación de agua con una pérdida entre 1.8 a 2.4% y esta variación está relacionada con la variable proporción PCLAM:CH del diseño experimental Taguchi.

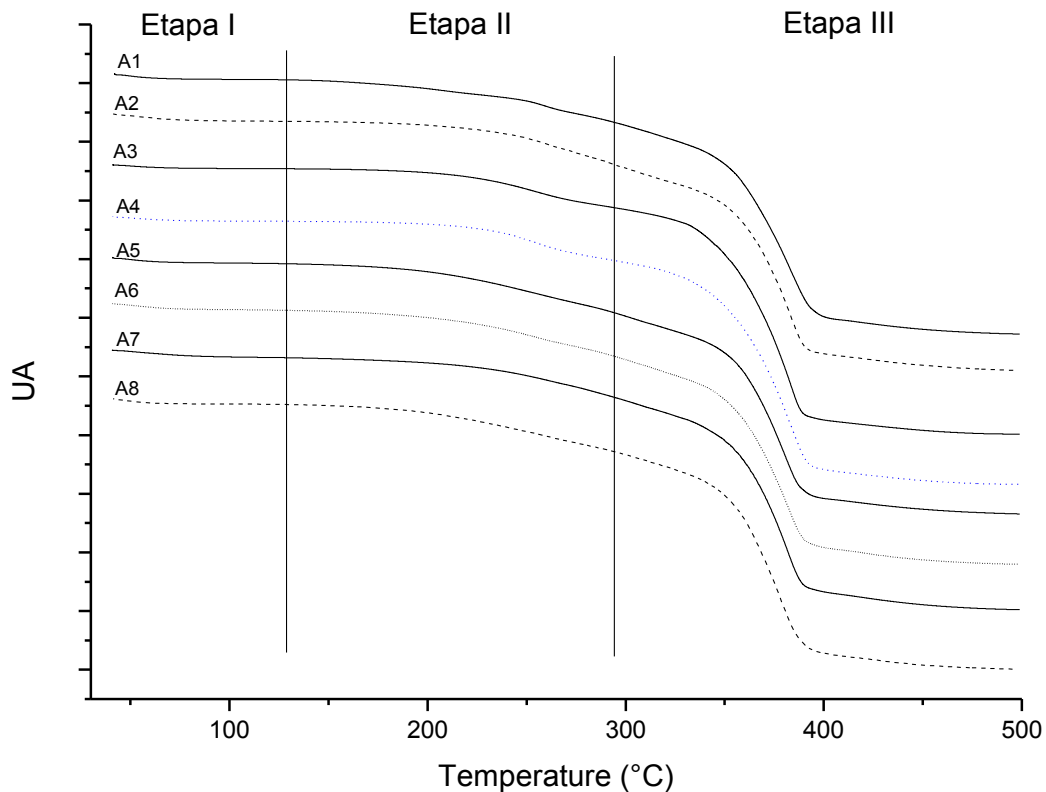


Figura 22 Análisis termogravimétrico de los andamios obtenidos según el diseño experimental Taguchi (andamios A1 a A8). Se observan tres etapas de descomposición: Etapa I pérdida de agua de CH; Etapa II descomposición de DS; Etapa III descomposición debida a la descomposición en CO₂ de PCLAM, DS y CH.

La segunda etapa fue atribuida a la posible descomposición de diclofenaco (DS), encontrando un máximo para los andamios entre los 246 y los 260 °C, comparando estos resultados con los obtenidos de DTGA para DS (Tabla 17) se observó que éste posee dos máximos: 199 y 280 °C; por lo que el descenso a esta temperatura podría estar relacionado con una descomposición. Por otra parte la pérdida en masa abarca un porcentaje entre 12 y 23% y es de hacer notar que en los andamios A5, A6, A7 y A8 es donde se presentó una mayor pérdida en masa y que coinciden con los que se fabricaron utilizando PCLAM funcionalizado a 110 °C y que pueden estar relacionados con una mayor descomposición promovida por la reducción de peso molecular.

La etapa III fue debida a la descomposición de los componentes orgánicos en CO₂ de las materias primas empleadas para la fabricación y con una pérdida en masa ente el 61 y 72%. Además es de notar que A4, A3 y A8 muestran un 8% de residuo a los 497 °C mientras que los otros andamios alrededor de un 11 %, aunque es mínima la diferencia encontrada,

sin embargo, esas muestras fueron fabricadas con una relación 80:20 de PCLAM:CH por lo que ese aumento fue debido a una alta concentración de CH.

Los andamios poseen tres etapas diferentes de descomposición, una de ellas es la eliminación de agua y posible desnaturalización del colágeno, sin embargo, son candidatos para su uso y almacenaje a menos de 50 °C.

Tabla 17 Resultados de DTGA y porcentaje de pérdida en masa de los andamios (A1 a A8) fabricados de acuerdo con el diseño experimental Taguchi. Se observa que los picos máximos de las diferentes etapas corresponden con las materias primas y las pérdidas en masa poseen diferencias debidas al diferente contenido por nivel de CH y PCLAM.

	DTGA Temperatura de pico máximo (°C)			Pérdida en masa (%)		
	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa I	Etapa II	Etapa III
A1	51.2	259.3	383.2	2.1	12.5	72.4
A2	54.4	260.7	382.6	2.4	15.8	67.7
A3	51.6	255.5	382.2	1.3	14.0	76.0
A4	53.2	252.7	383.3	1.6	13.2	76.0
A5	51.3	246.8	379.6	1.9	23.1	61.8
A6	53.6	249.8	381.7	2.2	23.0	63.2
A7	51.4	260.2	381.1	2.4	20.4	65.2
A8	49.8	256.0	377.7	1.8	22.6	67.3
DS		199.2 280.3				
CH	63.2		320.4			
PCLAM 2		205.8	404.3			

8.2.3. Determinación de temperaturas de transición por DSC

El análisis DSC permitió conocer el comportamiento de los polímeros frente a la temperatura para localizar la transición vítrea (Tg) y determinar si el proceso de electrohilado había impactado en las temperaturas de transición de los materiales. Encontrando que presenta las transiciones características tanto de PCLAM como de evaporación de agua de cristalización de DS, como se puede observar en la Figura 23, además se encontró un pico exotérmico que está relacionado con los resultados obtenidos por TGA y que corresponden a una reacción exotérmica de descomposición.

Los resultados de las Tg de los andamios se encuentran en un intervalo de -55 a -60 °C y es de notar que para los andamios A1 a A4 que fueron en los que se utilizó PCLAM 2 se esperaba una Tg alrededor de -60 °C. Una posible explicación a esto es que se haya

presentado una interacción por parte de PCLAM con CH y DS, pues PCLAM 2 tenía un porcentaje mayor de injerto, provocando una menor libertad en las moléculas del polímero

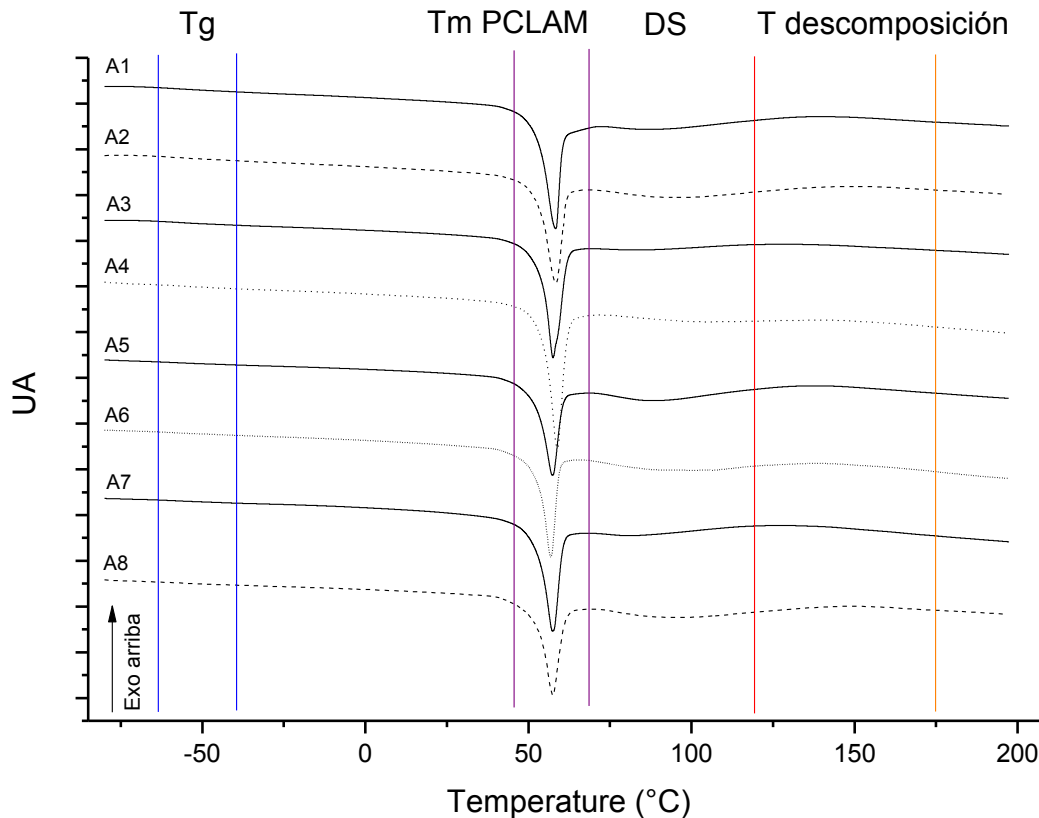


Figura 23 Termogramas obtenidos de DSC de los andamios fabricados de acuerdo con el diseño experimental Taguchi L8 (andamios A1 a A8). Se observan las transiciones para PCLAM, DS y de reacción exotérmica de una descomposición.

y aumentando así la Tg. En contraste, la transición correspondiente a la fusión del PCLAM aumenta ligeramente para todos los andamios y el CH disminuye comparado con PCLAM 2, Tabla 18, lo cual puede estar relacionado con una menor cristalinidad promovida por una mayor interacción entre los componentes del andamio. Esto lo confirman los resultados de A3, A4, A7 y A8 quienes fueron fabricados con una proporción 70:30 PCLAM:CH.

Por otro lado, la transición obtenida entre 82 y 101 °C corresponde a la evaporación de agua de cristalización de DS como se reporta en trabajos como el de Palomo, Ballesteros, *et al.* [91], también puede estar asociada al polimorfismo característico de DS [92] y además a una transición endotérmica a 86 °C por parte del colágeno debida a la desnaturalización de proteínas y liberación de agua como se comprobó por TGA.

La transición exotérmica encontrada entre los 132 y 150 °C es probable que esté relacionada a la evaporación y posible reacción exotérmica entre los componentes del andamio, lo cual fue encontrado también en el análisis TGA.

Tabla 18 Resultados de DSC de los andamios fabricados (A1 a A8) de acuerdo con el diseño experimental Taguchi. Se muestran la Tg, y los máximos de los procesos endotérmicos y exotérmicos encontrados, las cuales corresponden con PCLAM y DS, además de la transición exotérmica debida a la descomposición.

	Tg (°C)	Pico máximo de transición endotérmica (°C)		Transición exotérmica (°C)	dH fusión (J/g)
A1	-59.9	58.4	93.0	139.9	42.6
A2	-57.1	58.4	94.1	150.1	39.7
A3	-57.2	57.5	84.2	128.3	46.5
A4	-55.2	58.9	101.5	143.4	50.3
A5	-58.9	57.4	88.6	137.0	36.2
A6	-59.2	56.8	92.2	141.4	35.1
A7	-58.9	57.4	82.3	132.1	42.0
A8	-58.2	57.6	94.3	150.9	39.6
PCLAM 2	-60.9	55.2			60.4
DS			84.7		
CH			86.0		

8.2.4. Morfología por SEM

El análisis por SEM sirvió para analizar la morfología de los andamios y el diámetro de las fibras, los resultados fueron obtenidos con la ayuda del programa *ImageJ*[®] y se realizó un tratamiento estadístico a los resultados para obtener el intervalo de confianza de los diámetros con $p=0.05$. Posteriormente se realizó el análisis de varianza del diseño experimental Taguchi para determinar qué factores son los que mayor impacto tienen.

Se encontró que las nanofibras en la mayoría de los casos poseen defectos (Figura 24), como la aparición de granulaciones, además se observó que algunas de

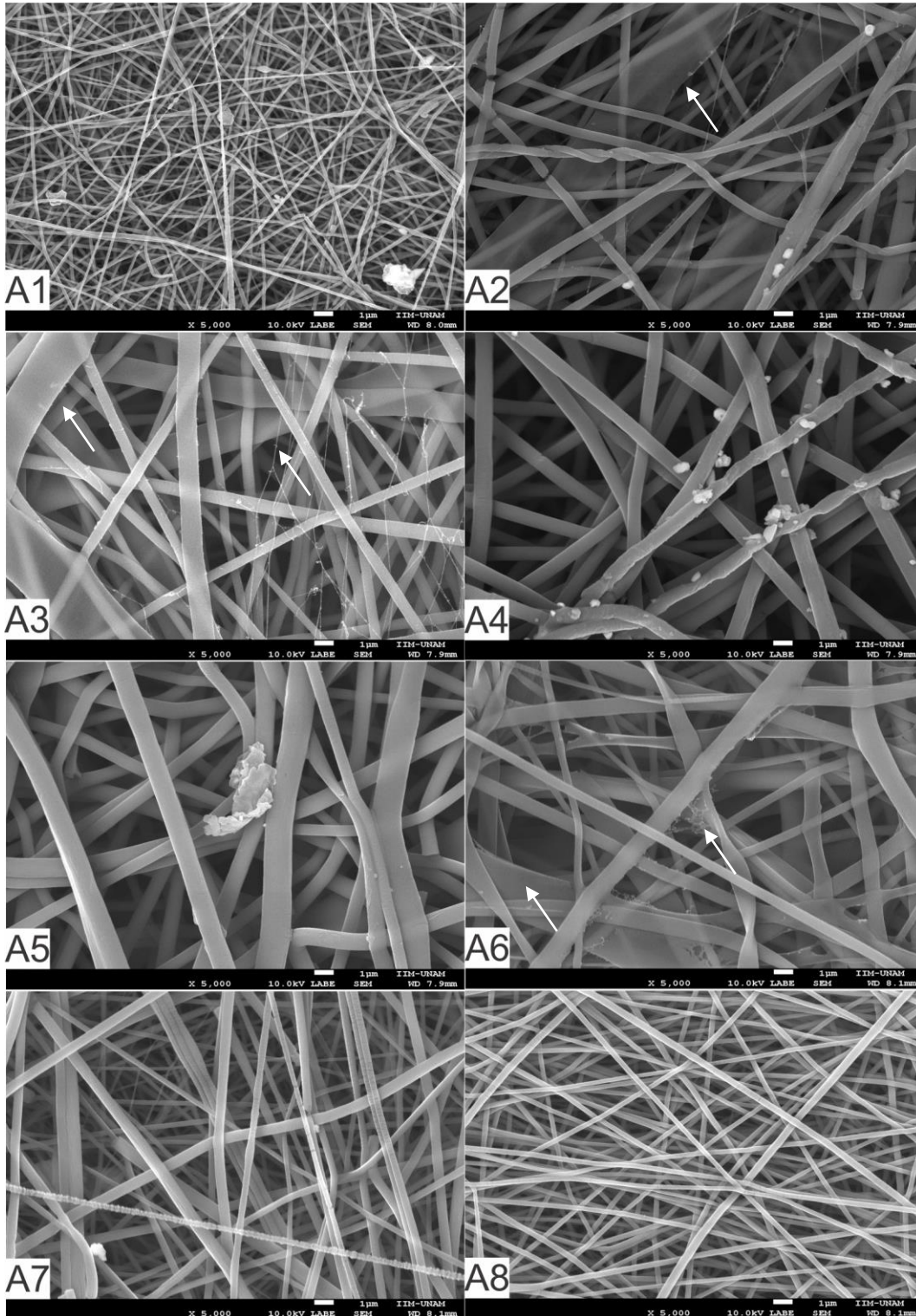


Figura 24 Micrografías de los andamios fabricados de acuerdo al diseño experimental Taguchi obtenidas de SEM (andamios A1 a A8) obtenidas a 5000X con una escala de 1 µm. Se observa que las fibras con tamaño menor y homogéneo son para las muestras A1, A4, A7 y, A8 la cual también presenta menos defectos.

ellas presentaban fibras muy delgadas como en el caso de los andamios A2, A3 y A6, que no fueron posibles medir con precisión debido a la resolución de las micrografías. Por otro lado se encontraron en A2, A3 y A6 fibras de un tamaño por encima de 1 μm . En general las fibras presentan una superficie aparentemente lisa y definida entre cada fibra, excepto por A6 donde se observa que algunas fibras tienden a ramificarse.

Tabla 19 Diámetro de nanofibra con su intervalo de confianza ($p=0.05$). Los andamios que mayor variación presentan son A2, A3, A5 y A6. En general los andamios poseen un diámetro superior a los 500 nm.

	Diámetro promedio (nm)	Intervalo de confianza $t_{(29,0.05/2)}$
A1	136.89	10
A2	741.59	254
A3	762.55	149
A4	849.59	81
A5	1052.61	175
A6	835.98	201
A7	438.93	46
A8	259.40	13

La variación tan grande en los diámetros de fibra obtenidos (Tabla 19) sugiere que las condiciones del proceso de electrohilado deben controlarse mejor. Los andamios con menos variación son A1, A8, A7 y A4 (de menor a mayor diámetro) al obtener un intervalo de confianza menor a 100 nm.

Para encontrar una respuesta a esta variación se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de los factores involucrados en la elaboración de los andamios (Tabla 20), encontrando que el factor que mayor impacto tiene es la concentración de PCLAM, pues el valor de F_{exp} es mayor que F_{tab} . Por otro lado encontramos que la F_{exp} del voltaje es más pequeña que la F_{tab} , lo que también impacta en el tamaño de las fibras, en Figura 25 podemos observar el impacto de estos efectos. Para el efecto: concentración PCLAM se observó que a mayor concentración se presenta un diámetro mayor de fibras, lo cual se presentó en los andamios A3 al A6 una variación alta y la aparición de defectos, de la misma manera ocurre con un incremento en el diámetro al aplicar un voltaje alto, lo cual se mostró reflejado en el andamio A2 con un diámetro de 741 nm y es en este también donde se presentó una alta variación. Es preciso señalar que una alta concentración de la solución así como un elevado voltaje pueden dar lugar a fibras más gruesas y la posible presencia de defectos [16, 21]. Por otro lado cuando se utilizó una proporción PCLAM:CH 70:30 se obtuvo un diámetro de fibra mayor, sin embargo, esto no es general porque en el andamio con el nivel bajo (A1) es el que presentó el menor diámetro y la menor variación.

Si el proceso se quisiera optimizar para obtener un menor tamaño se debería trabajar con C1, E1, B2 y D1.

A pesar de que los diámetros poseen una alta variación, esto no significa que no puedan ser útiles para la regeneración de tejidos como lo demuestran trabajos donde se obtienen nanofibras con diámetros de 500 nm en andamios de PCL con colágeno [93]

Tabla 20 Análisis de varianza del diseño experimental Taguchi para diámetro de fibra en andamios A1 a A8. Se observa que la concentración PCLAM es la variable de mayor impacto.

	EFECTO						RESULTADO	
	Temperatura de funcionalización (°C)	Proporción PCLAM:CH	Concentración PCLAM %(v/w)	Flujo (mL/h)	Voltaje (kV)	e1	e2	Diámetro promedio (nm)
A1	70	70-30	10	0.3	10	1	1	136.89
A2	70	70-30	10	0.5	15	2	2	741.59
A3	70	80-20	15	0.3	10	2	2	762.55
A4	70	80-20	15	0.5	15	1	1	849.59
A5	110	70-30	15	0.3	15	1	2	1052.61
A6	110	70-30	15	0.5	10	2	1	835.98
A7	110	80-20	10	0.3	15	2	1	438.93
A8	110	80-20	10	0.5	10	1	2	259.40
ANOVA								
T1	2490.62	2767.08	1576.81	2390.98	1994.81	2298.4	2261.3	
T2	2586.93	2310.47	3500.73	2686.56	3082.73	2779.0	2816.1	
SC	1159.38	26061.52	462682.21	10921.0	147945.26	eT= 67336.76		
gl	1	1	1	1	1	2		
V	1159.38	26061.52	462682.21	10921.0 2	147945.26	Ve=33668.38		
F_{exp}	0.03	0.77	13.74	0.32	4.39			
F_{tab} (α=0.05, 5, 2)	5.78							

T1 y T2= Totales de cada nivel; SC=suma de cuadrados; eT=SC de e1 y e2; gl= grados de libertad; V=SC/gl; Ve=eT/gl; Fexp= V/Ve

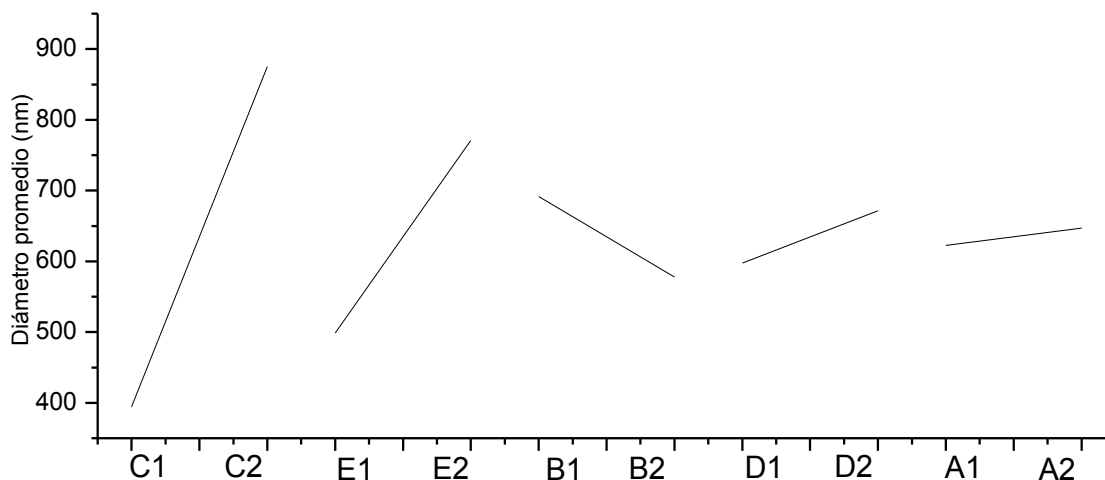


Figura 25 Análisis gráfico de los resultados de diámetro de fibra del diseño experimental Taguchi (A=Temperatura de funcionalización, B=proporción PCLAM:CH, C=concentración de PCLAM, D=flujo de inyección y E=voltaje). Se observa que el diámetro se ve afectado en mayor proporción por la concentración de PCLAM (C), en menor proporción por el voltaje (E), seguido del efecto B, D y A.

8.2.5. Hidrofobicidad

El análisis por ángulo de contacto permitió determinar el efecto de las variables en la hidrofobicidad a través del modelo experimental Taguchi. Se encontró que los andamios son hidrofílicos, esta afirmación se sustentó basada en que la mayoría de los resultados de ángulo de contacto (Tabla 21) se encontraron alrededor de 45°.

El análisis de varianza demostró que los efectos que mayor impacto tienen sobre el ángulo de contacto de los andamios son el flujo de inyección, la temperatura de síntesis y el voltaje, debido a que son los que presentaron una F_{exp} mayor a la F_{tab} , y que son apreciadas de manera gráfica en la Figura 26. La justificación que se le puede atribuir a estos resultados obtenidos es que el flujo de salida puede afectar el ángulo de contacto ya que las fibras son orientadas aleatoriamente dando lugar a la heterogeneidad de la superficie, de la misma manera se ve influenciado el diámetro de la nanofibra y con ello que en la superficie se presente una cantidad mayor de PCLAM dando lugar a un aumento del ángulo de contacto. Por otro lado a una temperatura de funcionalización de 10 °C se presenta un mayor ángulo de contacto, quizá esto se deba a que el anhídrido maléico interactúa en mayor proporción con CH y DS dejando expuestos sobre la superficie grupos hidrófobos como $-CH_2$. La diferencia de potencial aplicado de 10 kV promueve que el ángulo crezca, lo cual está relacionado nuevamente con el tamaño de la nanofibra pues un flujo de inyección alto y un voltaje pequeño da lugar a fibras de mayor tamaño y debido a esto es probable que queden

más cadenas poliméricas expuestas sobre la superficie y si interactúan más con los otros componentes el ángulo aumenta, es por eso que es recomendable optimizar con las condiciones: D1, A2 y E2. Fue también posible determinar que los efectos: proporción PCLAM-CH y concentración PCLAM no afectan en el ángulo de contacto.

Tabla 21 Análisis de varianza del diseño experimental Taguchi para Ángulo de contacto. Se observa que la concentración PCLAM no influye en el resultado y el de mayor impacto es el flujo de inyección.

	EFECTO						RESULTADO	
	Temperatura de funcionalización (°C)	Proporción PCLAM-CH	Concentración PCLAM %(v/w)	Flujo (mL/h)	Voltaje (kV)	e1	e2	Ángulo de contacto
A1	70	70-30	10	0.3	10	1	1	25.36°
A2	70	70-30	10	0.5	15	2	2	51.39°
A3	70	80-20	15	0.3	10	2	2	46.88°
A4	70	80-20	15	0.5	15	1	1	37.6°
A5	110	70-30	15	0.3	15	1	2	3.25°
A6	110	70-30	15	0.5	10	2	1	38.68°
A7	110	80-20	10	0.3	15	2	1	3.41°
A8	110	80-20	10	0.5	10	1	2	46.41°
ANOVA								
T1	161.23	118.68	126.57	78.9	157.33	112.62	105.05	
T2	91.75	134.3	126.41	174.08	95.65	140.36	147.93	
SC	603.4338	30.4981	0.0032	1132.40	475.5528	eT= 326.0253		
gl	1	1	1	1	1	2		
V	603.4338	30.4981	0.0032	1132.40	475.55	Ve=163.0126		
F_{exp}	3.7018	0.1871	1.96E-05	6.9467	2.9173			
F_{tab} (α=0.05, 5, 2)	5.78							

T1 y T2= Totales de cada nivel; SC=suma de cuadrados; eT=SC de e1 y e2; gl= grados de libertad; V=SC/gl; Ve=eT/gl; F_{exp}= V/Ve

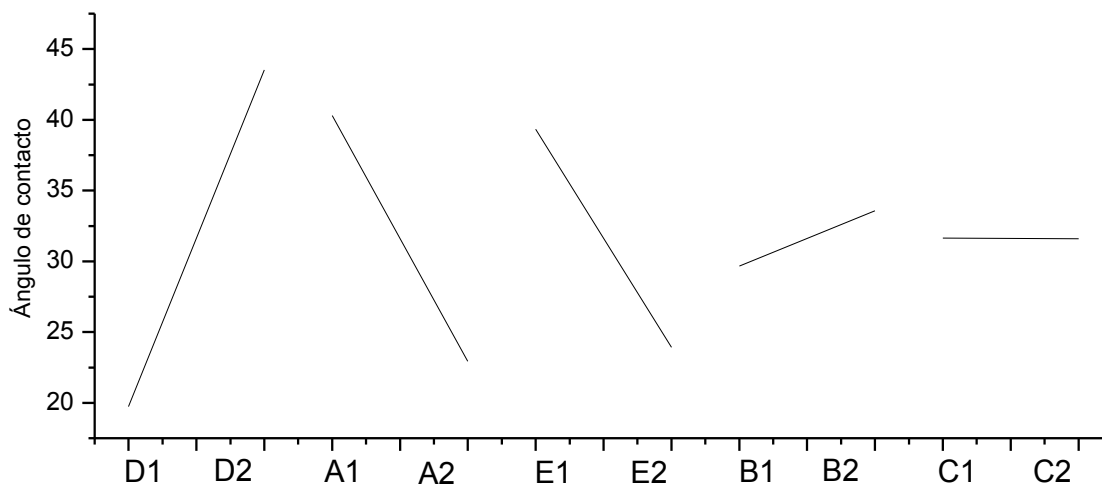


Figura 26 Análisis gráfico del diseño experimental Taguchi. De izquierda a derecha se muestra el efecto con mayor impacto, la inclinación y longitud representa la magnitud del impacto. D=Flujo, A=Temperatura de funcionalización, E= Voltaje, B= Proporción PCLAM-CH y C= Concentración PCLAM.

8.2.6. Pruebas mecánicas de tensión uniaxial

El ensayo de tensión sirvió para evaluar qué efectos predominaban en el resultado del módulo de Young, el porcentaje de elongación y el esfuerzo de tensión.

8.2.6.1. Módulo de Young

Los resultados del módulo de Young en su mayoría están alrededor de 20 MPa y el andamio con el módulo de Young más alto es el A4= 28.38 MPa como se pueden observar en la Tabla 22. Los factores que impactan en el resultado son: temperatura de funcionalización, proporción PCLAM-CH, concentración PCLAM y flujo de inyección como lo demuestra la F_{exp} pues es mayor a la F_{tab} , esto también lo podemos ver en la Figura 27 donde la inclinación y distancia mayor le corresponden a la temperatura de funcionalización, mientras que el voltaje es el que menos influencia presenta en el resultado.

El hecho que la temperatura de funcionalización haya sido el factor que mayor impacto tuvo en el módulo de Young, es debido a que el peso molecular al ser mayor para PCLAM funcionalizado a 70°C permite cadenas de mayor extensión, además que puede tener una mayor interacción con los componentes de la nanofibra propiciada por el anhídrido maléico injertado en el polímero pues el porcentaje de injerto fue mayor que PCLAM1. Por otra parte el segundo factor que impacto, fue la proporción PCLAM:CH y el nivel que presenta un mayor módulo de Young es B2, puesto que fue la que tenía una mayor cantidad de PCLAM. Cuando se tiene una concentración de PCLAM al 10% la fibra presentó un mayor módulo elástico, esto puede tener sentido si se relaciona la proporción PCLAM:CH del 80:20

presentando mayor interacción por parte de PCLAM con CH y DS. El último factor que influyó fue el flujo de inyección y donde se encontró un mayor módulo de Young fue a un flujo de 0.3 mL/h. En conjunto un alto peso molecular (menor temperatura de funcionalización), una proporción PCLAM:CH mayor, una concentración del 10% y un flujo de 0.3 mL/h puede dar como resultado un módulo de Young optimizado y con un módulo cercano a los 30 MPa.

Tabla 22 Análisis de varianza para el módulo de Young. Los efectos que mayor impacto tienen son la temperatura de funcionalización, proporción PCLAM-CH, concentración PCLAM y flujo de inyección.

EFECTO						RESULTADO		
	Temperatura de funcionalización (°C)	Proporción PCLAM:CH	Concentración PCLAM % (v/w)	Flujo (mL/h)	Voltaje (kV)	e1	e2	Módulo de Young (MPa)
A1	70	70-30	10	0.3	10	1	1	24.97
A2	70	70-30	10	0.5	15	2	2	21.72
A3	70	80-20	15	0.3	10	2	2	28.14
A4	70	80-20	15	0.5	15	1	1	28.38
A5	110	70-30	15	0.3	15	1	2	5.35
A6	110	70-30	15	0.5	10	2	1	2.20
A7	110	80-20	10	0.3	15	2	1	18.10
A8	110	80-20	10	0.5	10	1	2	13.25
ANOVA								
T1	103.2352	54.2538	78.0568	76.5819	68.5764	71.971	73.666	
T2	38.9135	87.8949	64.0919	65.5668	73.5723	70.177	68.482	
SC	517.1612	141.4652	24.3771	15.1665	3.1198	eT= 3.7602		
gl	1	1	1	1	1	2		
V	517.1612	141.4652	24.3771	15.1665	3.1198	Ve=1.8801		
F _{exp}	275.0679	75.2425	12.9657	8.0667	1.6594			
F _{tab} (α=0.05, 5, 2)	5.78							

T1 y T2= Totales de cada nivel; SC=suma de cuadrados; eT=SC de e1 y e2; gl= grados de libertad; V=SC/gl; Ve=eT/gl; F_{exp}= V/Ve

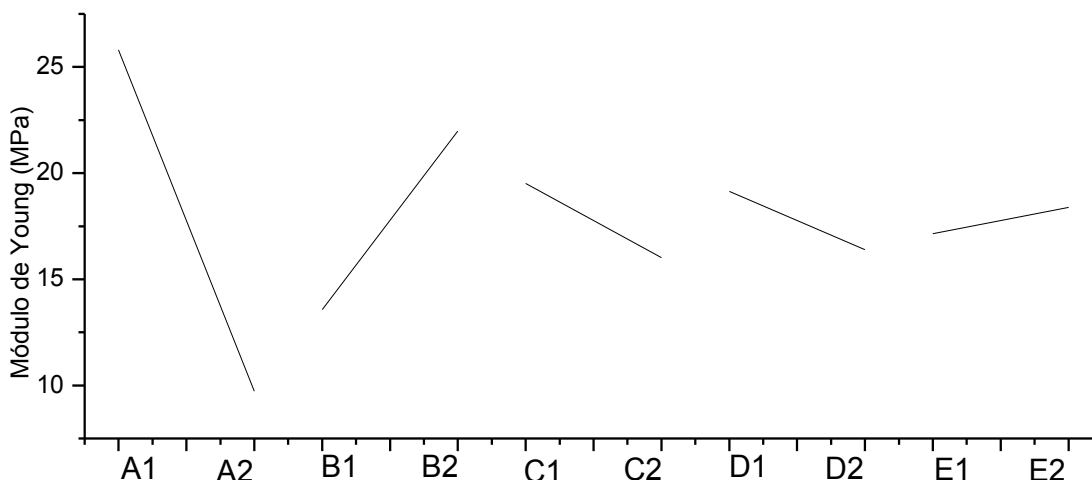


Figura 27 Análisis gráfico del módulo de Young de acuerdo con el diseño Taguchi (A=Temperatura de funcionalización, B=proporción PCLAM:CH, C=concentración de PCLAM, D=flujo de inyección y E=voltaje). De izquierda a derecha los factores que mayor impacto tienen.

8.2.6.2. Porcentaje de Elongación

Los resultados obtenidos son ampliamente heterogéneos desde un 3.00 hasta un 208.96% de elongación, esta amplia variación pudo ser debida a la orientación al azar de las fibras, al diámetro, a la composición de las mismas, etc.

En el análisis de varianza del diseño Taguchi (Tabla 23) se muestran los resultados obtenidos para F_{exp} y se encontró que el efecto con mayor impacto fue la proporción PCLAM:CH, seguida del voltaje, la temperatura de funcionalización y flujo de inyección.

El efecto de menor impacto fue la concentración de PCLAM lo cual también se puede apreciar en la Figura 28, es de notar que los efectos que impactaron los resultados fueron similares a los del Módulo de Young, excepto por la concentración de PCLAM. La proporción PCLAM-CH es la que mayor impacto tuvo pues una mayor cantidad de PCLAM permite una mayor interacción con los componentes CH y DS, además que el peso molecular está relacionado con sus propiedades mecánicas. Por otra parte un voltaje mayor y una temperatura de funcionalización de 70 °C, permiten obtener fibras con alto porcentaje de elongación, pues un mayor peso molecular, alta funcionalización y voltaje alto permiten la interacción química con los otros componentes y la obtención de fibras con un diámetro capaz de permitir un porcentaje de elongación alto.

Para optimizar el resultado de porcentaje de elongación de las fibras, obtenido en la fabricación, se necesita trabajar bajo las condiciones B2, E2, A1, D2 y C1.

Tabla 23 Análisis de varianza del diseño Taguchi para el porcentaje de elongación de los andamios. El efecto de menor influencia es la concentración PCLAM.

EFECTO								RESULTADO
	Temperatura de funcionalización (°C)	Proporción PCLAM-CH	Concentración PCLAM %(v/w)	Flujo (mL/h)	Voltaje (kV)	e1	e2	Elongación (%)
A1	70	70-30	10	0.3	10	1	1	49.05
A2	70	70-30	10	0.5	15	2	2	120.08
A3	70	80-20	15	0.3	10	2	2	118.55
A4	70	80-20	15	0.5	15	1	1	208.96
A5	110	70-30	15	0.3	15	1	2	35.95
A6	110	70-30	15	0.5	10	2	1	3.00
A7	110	80-20	10	0.3	15	2	1	139.63
A8	110	80-20	10	0.5	10	1	2	102.58
ANOVA								
T1	496.63	208.08	411.34	343.18	273.18	396.54	400.64	
T2	281.17	569.72	366.46	434.62	504.62	381.26	377.16	
SC	5803.10	16347.62	251.79	1045.05	6695.93	eT= 98.09		
gl	1	1	1	1	1	2		
V	5803.10	16347.62	251.79	1045.05	6695.93	Ve=49.04		
F _{exp}	118.32	333.33	5.13	21.31	136.53			
F _{tab} (α=0.05, 5, 2)	5.78							

T1 y T2= Totales de cada nivel; SC=suma de cuadrados; eT=SC de e1 y e2; gl= grados de libertad; V=SC/gl; Ve=eT/gl; F exp= V/Ve

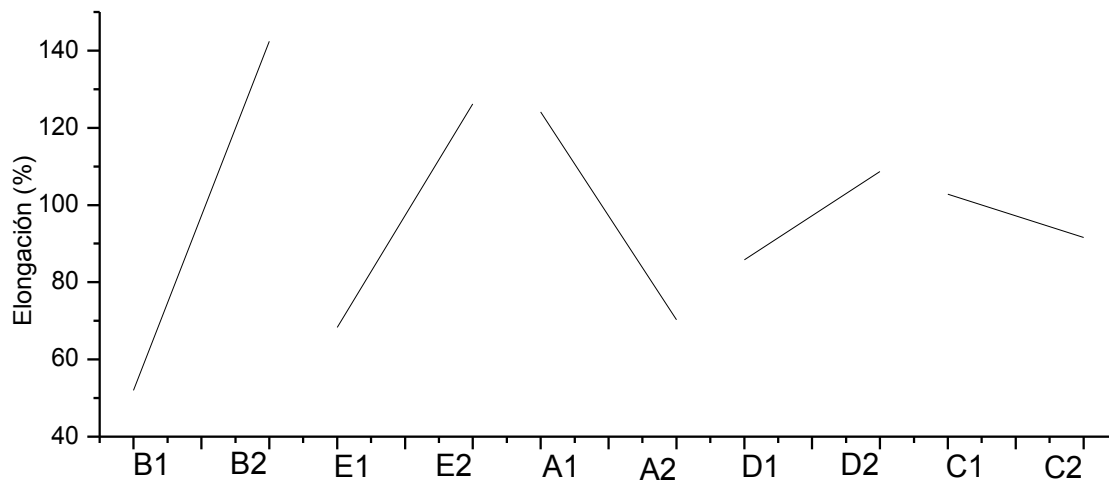


Figura 28 Análisis gráfico del diseño Taguchi para porcentaje de elongación (A=Temperatura de funcionalización, B=proporción PCLAM:CH, C=concentración de PCLAM, D=flujo de inyección y E=voltaje). El impacto de los efectos se encuentra de izquierda a derecha, siendo la concentración de PCLAM la de menor impacto.

8.2.6.3. Esfuerzo a la tensión en el punto máximo

El esfuerzo a la tensión evalúa de qué magnitud debe ser la deformación antes de presentarse ruptura del andamio y se encontró que es posible obtener andamios con un esfuerzo a la tensión de 5.07 MPa como lo demuestra la Tabla 24, es de notar que A6 presentó el valor más pequeño (0.1 MPa), con lo cual fue un mal candidato para el objetivo de este trabajo.

Tabla 24 Análisis de varianza del diseño Taguchi para el esfuerzo a la tensión de los andamios. Dos efectos son lo que influyen en el resultado y son la temperatura de funcionalización y la proporción PCLAM-CH.

EFECTO						RESULTADO		
	Temperatura de funcionalización (°C)	Proporción PCLAM-CH	Concentración PCLAM % (v/w)	Flujo (mL/h)	Voltaje (kV)	e1	e2	Esfuerzo a la tensión (MPa)
A1	70	70-30	10	0.3	10	1	1	2.11
A2	70	70-30	10	0.5	15	2	2	2.36
A3	70	80-20	15	0.3	10	2	2	5.07
A4	70	80-20	15	0.5	15	1	1	4.43
A5	110	70-30	15	0.3	15	1	2	0.55
A6	110	70-30	15	0.5	10	2	1	0.01
A7	110	80-20	10	0.3	15	2	1	1.56
A8	110	80-20	10	0.5	10	1	2	2.75
ANOVA								
T1	13.97	5.03	8.78	9.30	9.94	9.84	8.12	
T2	4.87	13.81	10.06	9.54	8.90	9.00	10.72	
SC	10.36	9.65	0.21	0.01	0.14	eT= 0.94		
gl	1	1	1	1	1	2		
V	10.36	9.65	0.21	0.01	0.14	Ve=0.47		
F_{exp}	22.14	20.64	0.44	0.02	0.29			
F_{tab} (α=0.05, 5, 2)	5.78							

T1 y T2= Totales de cada nivel; SC=suma de cuadrados; eT=SC de e1 y e2; gl= grados de libertad; V=SC/gl; Ve=eT/gl; F_{exp}= V/Ve

De acuerdo con los valores de F_{exp} los factores que impactan al ser mayores a F_{tab} son la temperatura de funcionalización y la proporción de PCLAM-CH (Figura 29). El primer efecto presentó este impacto al tener un peso molecular PCLAM 1 más bajo a PCLAM 2 y sus propiedades mecánicas bajan como se observa en los resultados del ANOVA. La proporción PCLAM-CH 80:20 presentó un mayor esfuerzo a la tensión, la razón confirma que se trata de una mayor interacción con los otros componentes y que al haber mayor cantidad de PCLAM las propiedades mecánicas se mejoran.

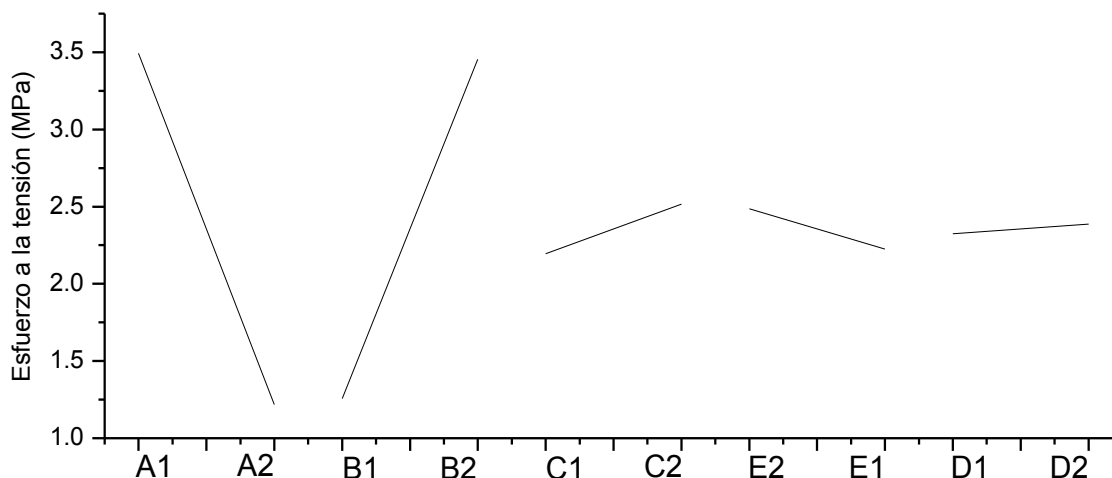


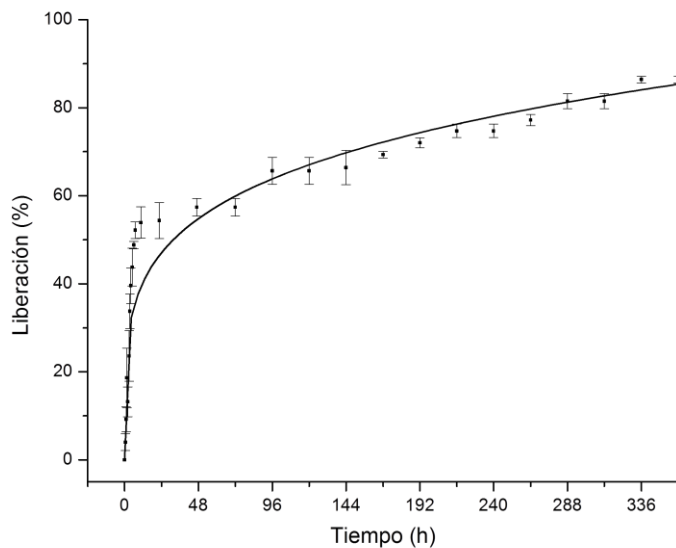
Figura 29 Análisis gráfico del diseño Taguchi para el esfuerzo a la tensión (A=Temperatura de funcionalización, B=proporción PCLAM:CH, C=concentración de PCLAM, D=flujo de inyección y E=voltaje). El impacto de los efectos se encuentra de izquierda a derecha, siendo A y B los efectos de mayor impacto.

Para optimizar el esfuerzo a la tensión de los andamios se sugiere trabajar bajo las condiciones A1 y B2.

8.2.7. Cinética de liberación

El ensayo tuvo como objetivo conocer el comportamiento de la liberación de diclofenaco *in vitro* de cada uno de los andamios fabricados de acuerdo con el diseño experimental Taguchi y se realizó el ajuste a los modelos matemáticos Korsmeyer Peppas, Peppas-Fassihi, Peppas-Sahlin utilizando el software *OriginPro 8.5*[®].

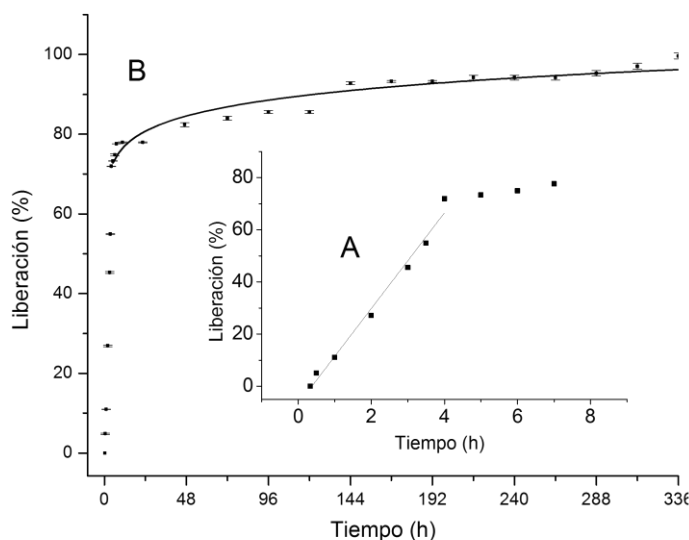
El andamio A1 presentó un mejor ajuste al modelo matemático Peppas-Fassihi (Figura 30) cuya $r^2=0.913$, mientras los modelos Korsmeyer y Peppas-Sahlin son menores a este valor, lo cual se comprobó con la prueba χ^2 pues presentó un valor grande (68.516) mostrando así que los valores se ajustan al modelo descrito. Los valores describen que el mecanismo de liberación es por difusión pues el valor obtenido para k_1 es mayor que k_2 , sin embargo, éste valor ($k_2=2.16 \times 10^{-19}$) demostró que la liberación posterior a las 24 h se llevó a cabo desde el interior de las fibras poliméricas muy lentamente. Además se presentó un fenómeno de liberación rápida durante las 24 horas alcanzando un porcentaje de 54.3% y la liberación se mantuvo hasta las 226 horas, alcanzando un 86.4% de liberación y presentó un incremento de 2.46 mg/24 horas.



Korsmeyer-Peppas $\frac{M_t}{M_0} = k(t^n)$		Peppas-Fassihi $\frac{M_t}{M_0} = a(x^n) + b$	
	Valor		Valor
r^2	0.909	r^2	0.913
χ^2	71.71	χ^2	68.52
k	23.39	a	31.04
n	0.21	n	0.18
		b	-8.76
Peppas-Sahlin $\frac{M_t}{M_0} = k_1(t^n) + k_2(t^{2-n})$			
	Valor		
r^2	0.909		
χ^2	72.107		
k_1	23.395		
k_2	2.163×10^{-19}		
n	0.219		

Figura 30 Cinética de liberación del andamio A1, ajuste y valores de los parámetros obtenidos de los modelos matemáticos. La información de los valores muestra que la difusión es de tipo Fick ($n < 0.5$) y además presenta una difusión desde una matriz polimérica ($k_2 = 2.16339 \times 10^{-19}$).

Los resultados para el andamio A2 mostraron que ningún modelo se ajustó a todos los valores de la cinética de liberación, por lo que se analizó en dos partes, la primera (Figura 31 A) corresponde a la liberación de orden cero, cuya velocidad de liberación es 18.3 mg/h por gramo de andamio y que tuvo lugar durante las primeras 4 horas alcanzando un 71.93% de liberación y cuyo ajuste presentó una $r^2 = 0.986$.



B Korsmeyer-Peppas $\frac{M_t}{M_0} = k(t^n)$		Peppas-Sahlin $\frac{M_t}{M_0} = k_1(t^n) + k_2(t^{2-n})$	
	Valor		Valor
r^2	0.923	r^2	0.931
χ^2	4.900	χ^2	4.709
		k_1	46.64
k	65.393	k_2	19.04
n	0.066	n	0.049
A Lineal $y = m x + b$			
	Valor		
r^2	0.986		
m	18.330		
b	-6.840		

Figura 31 Cinética de liberación del andamio A2. A) Primera etapa de análisis por un método lineal y B) por modelos matemáticos. La información de los valores demuestra hay una liberación durante las primeras 4 horas rápida y posteriormente que la liberación se rige por difusión tipo Fick ($n < 0.5$) y desde el interior de la matriz polimérica.

La segunda etapa (Figura 31 B) se ajustó a dos modelos, pues el modelo Peppas-Fassihí tuvo un ajuste bajo ($r^2 < 0.9$). El modelo que presentó un mayor ajuste fue Peppas-Sahlin con $r^2 = 0.931$, cuyo mecanismo de liberación sigue una difusión tipo Fick ($n < 0.5$) y va acompañado de una liberación promovida por un mecanismo de relajación polimérica desde las fibras con una $k_2 = 19.04$.

Posterior a la primera etapa de liberación, esta presenta un incremento gradual de 1.66 mg cada 24 horas hasta las 336 horas donde se llega a un 99.6%.

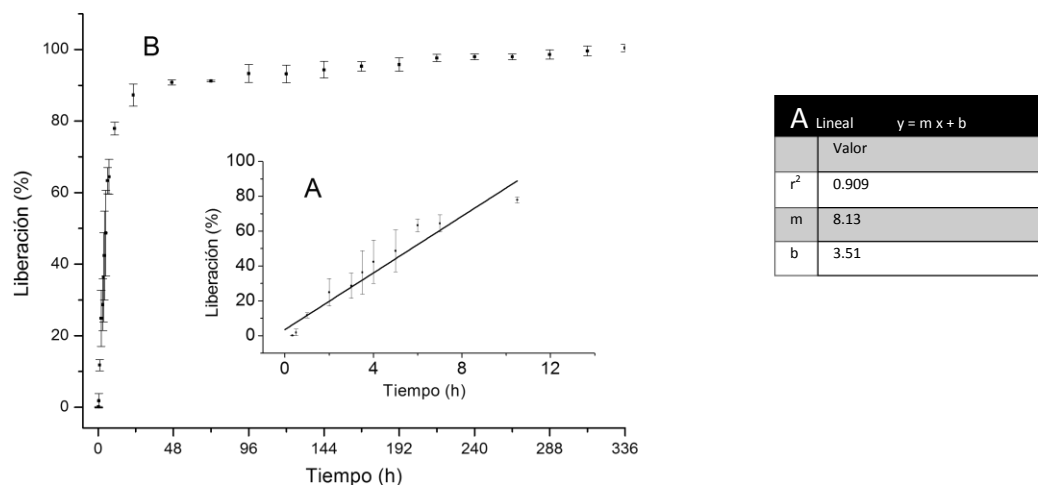


Figura 32 Cinética de liberación de A3. Donde A representa el ajuste y valores de los parámetros obtenidos del modelo lineal y B la cinética hasta las 336 h. La información de los valores muestra que la liberación posee una velocidad de 8.13 mg/h por gramo de andamio durante las primeras 10 horas.

Para la cinética de liberación del andamio A3 los modelos evaluados no fueron satisfactorios al haber presentado una $r^2 < 0.9$, debido a esto se evaluó en dos partes la cinética. La primera, Figura 32 A, se evaluó con un modelo lineal y en las primeras 10 horas se mantiene una velocidad de liberación de 8.13 mg/h por gramo de andamio, la cual llegó a 77.91% de liberación.

La segunda etapa Figura 32 B, no se ajustó a ningún modelo, sin embargo, se encontró que cada 24 horas se libera 1.01 mg por gramo de andamio, alcanzando a las 312 horas un 99.62%

El andamio A4 presentó el mismo inconveniente de análisis frente al ajuste con los modelos matemáticos pues la $r^2 < 0.9$. El análisis demostró que la primera fase de liberación, Figura 32 A, presentó una velocidad de 11.84 mg/h por gramo de andamio durante las primeras 8

horas, y en este tiempo se alcanzó un 89.71% de liberación. Posterior a esta etapa (Figura 33 B) se liberó 0.73 mg de diclofenaco cada 24 horas hasta las 96 horas donde se presentó un estado estacionario a 95.68 % de liberación.

El andamio A5 solamente presentó una etapa de liberación, la cual se puede observar en la Figura 33 A, la cual fue analizada con un modelo lineal, en el que se encontró una velocidad de liberación de 10.34 mg/h por gramo de andamio, alcanzando un 91.4% de liberación a las 10 horas y cuyo valor de $r^2=0.928$. En la segunda etapa, Figura 33 B, se

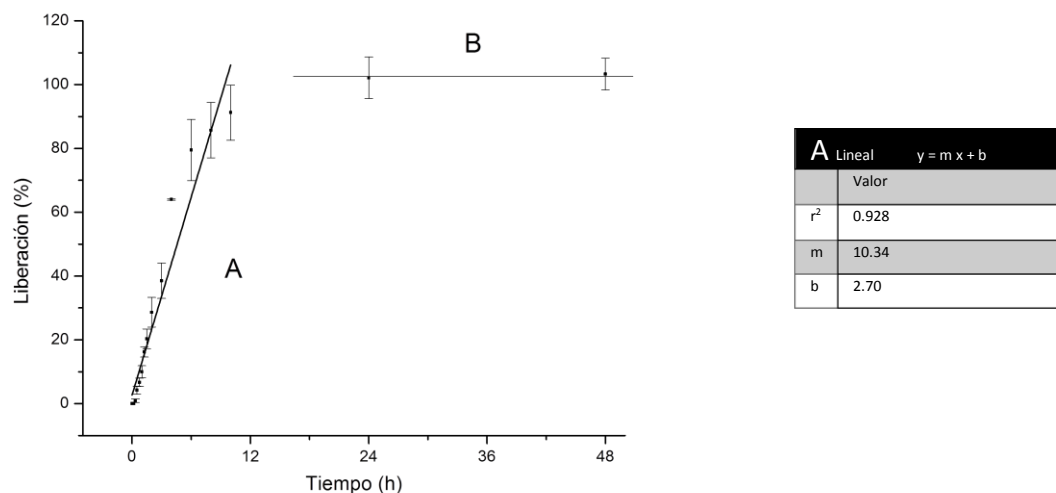


Figura 33 Cinética de liberación del andamio A5. Donde la línea A representa el ajuste y valores de los parámetros obtenidos del modelo lineal y B la etapa donde no hay más liberación. La información de los valores muestra que la liberación posee una velocidad de 11.84 mg/h por gramo de andamio durante las primeras 8 horas.

encontró que ya no hay más liberación de diclofenaco al alcanzarse el 100% de liberación a las 24 horas.

Para el andamio A6, los modelos matemáticos no ajustaron y el análisis se realizó mediante el modelo lineal, Figura 34 A, y se encontró que la velocidad de liberación es de 17.81 mg/h por gramo de andamio, cuyo valor de $r^2=0.954$, además en las 4 horas el andamio liberó un 74.28%. Por otro lado, la segunda etapa liberó 1.33 mg cada 24 horas hasta que alcanzó una velocidad constante a las 120 horas y cuyo porcentaje correspondió al 90.41%.

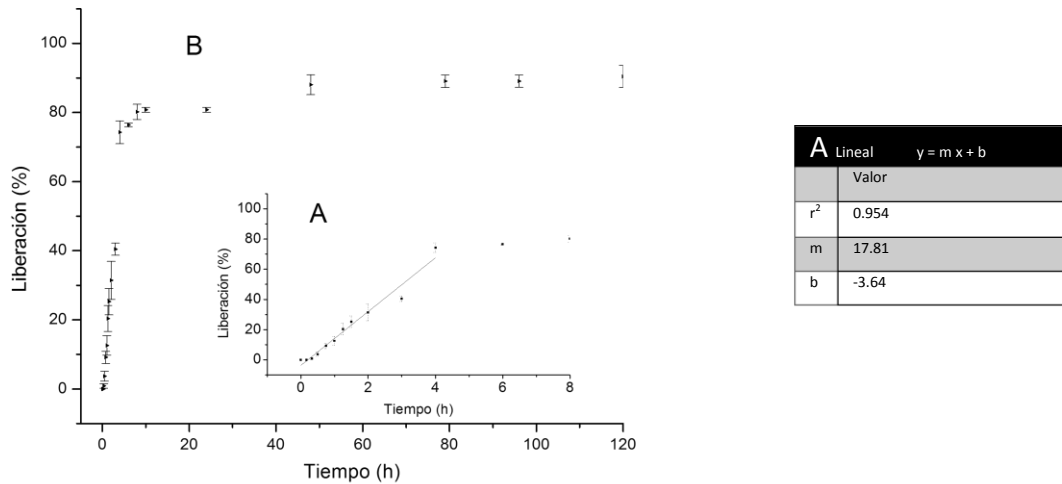


Figura 34 Cinética de liberación del andamio A6. Donde la gráfica A representa el ajuste y valores de los parámetros obtenidos del modelo lineal y B la segunda etapa. La información de los valores muestra que la liberación posee una velocidad de 17.81 mg/h por gramo de andamio durante las primeras 4 horas.

Para el andamio A7, los modelos matemáticos no ajustaron y el análisis se realizó mediante el modelo lineal, Figura 35 A, y se encontró que la velocidad de liberación es de 10.53 mg/h por gramo de andamio, cuyo valor de $r^2=0.933$, además en las 7 horas el andamio liberó un 70.74%. Por otro lado, la segunda etapa, Figura 35 B, liberó 1.16 mg cada 24 horas hasta que alcanzó una velocidad constante a las 300 horas y cuyo porcentaje correspondió al 93.21%.

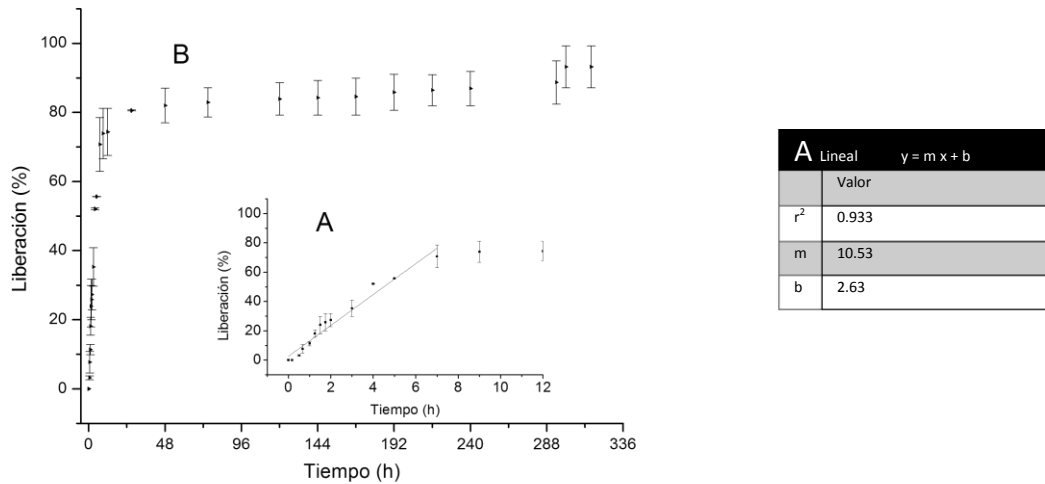


Figura 35 Cinética de liberación del andamio A7. Donde la gráfica A representa el ajuste y valores de los parámetros obtenidos del modelo lineal y B la segunda etapa. La información de los valores muestra que la liberación posee una velocidad de 10.53 mg/h por gramo de andamio durante las primeras 8 horas.

En el análisis del andamio A7, se encontró que los modelos matemáticos no ajustaron a los datos, por lo que el análisis se realizó mediante un modelo lineal, Figura 36 A, y se encontró que la velocidad de liberación es de 18.04 mg/h por gramo de andamio, cuyo valor de

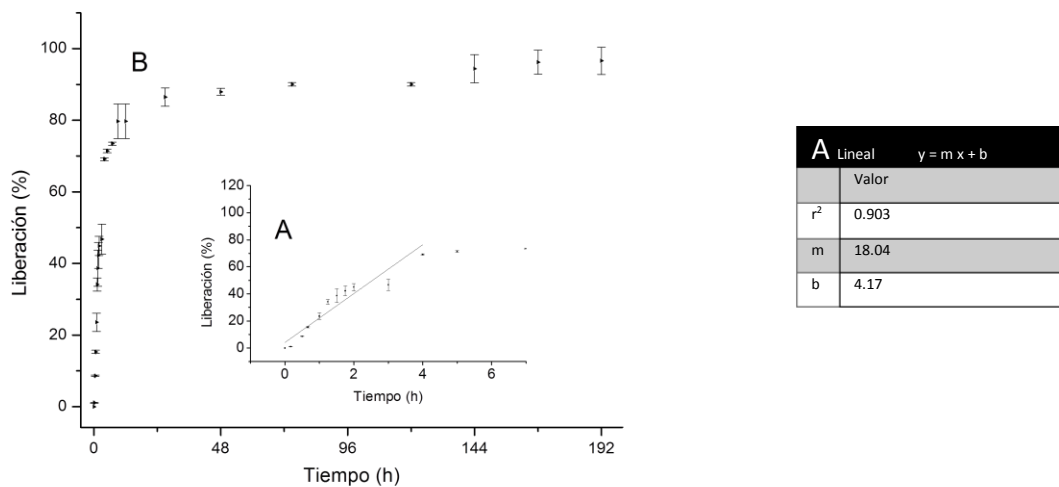


Figura 36 Cinética de liberación del andamio A8. Donde la gráfica A representa el ajuste y valores de los parámetros obtenidos del modelo lineal y B la liberación hasta las 192 horas. La información de la tabla muestra una liberación de 18.04 mg/hora en las primeras 4 horas.

$r^2=0.903$, además en las 4 horas el andamio liberó un 69.12%. Por otro lado, la segunda etapa, Figura 36 A, se liberó 1.33 mg cada 24 horas hasta que alcanzó una velocidad constante a las 216 horas y cuyo porcentaje correspondió al 98.22%,

Los resultados mostraron diferencias en cuanto a la velocidad de liberación, el andamio A1 fue el que se ajustó al modelo Korsmeyer-Peppas, además que se encontró una liberación desde las fibras poliméricas dada la evidencia de k_2 del modelo Peppas-Sahlin. Para los andamios A2-A8 las cinéticas no se ajustaron a los modelos empleados, al poseer una $r^2 < 0.9$, sin embargo, el análisis lineal de la primera etapa de liberación, arrojó que la velocidad de liberación sucede en las primeras 4 horas (Tabla 25) para A2, A6 y A8, con una velocidad alrededor de 18 mg/h por gramo de andamio, mientras que para A1, A3, A4 y A7 el cambio en la pendiente se da entre las 7 y 10 horas, el caso extremo fue A5, donde se liberó el 91% a las 10 horas y a las 24 se alcanzó el 100%. Por otra parte posterior a la inflexión o cambio de pendiente el gradiente de liberación (GL) se encontró entre 0.7 y 2.4 mg por cada 24 horas en los cuales se alcanzaron tiempos que van de las 96 hasta las 336 horas. Esto contrasta con evidencia encontrada previamente por Tammaro, Russo, *et al.* [94] donde se libera el 100% en 30 minutos cuando se electrohila PCL con diclofenaco.

Para poder conocer que factores impactaron en el gradiente de liberación a partir del punto de inflexión en las cinéticas de liberación, se realizó el ANOVA con $p=0.05$ (Tabla 26). Se encontró que la concentración de polímero (variable C) influye en mayor proporción en el

Tabla 25 Comparación de los resultados obtenidos en las cinéticas de liberación de los andamios elaborados de acuerdo con el diseño experimental Taguchi. Se observa que la liberación.

Andamio	Constante de velocidad (mg/h)	Tiempo en la inflexión (h)	Porcentaje de liberación en la inflexión (%)	Gradiente de liberación a partir de la inflexión (mg /24 h)	Tiempo de liberación en fase estacionaria (h)	Porcentaje de liberación en fase estacionaria (%)
A1	8.05 ^a	7	52.20	2.46	N/A	N/A
A2	18.33	4	71.93	1.66	336	99.63
A3	8.13	10	77.91	1.01	336	100
A4	11.84	8	89.73	0.73	96	95.68
A5	10.34	N/A	N/A	0	24	100
A6	17.81	4	74.28	1.33	120	90.41
A7	10.53	7	70.74	1.16	300	93.21
A8	18.04	4	69.12	1.33	216	98.22

^a Calculada de la primera fase de liberación mediante un ajuste lineal con $r^2=0.909$

gradiente de liberación pues fue el que presentó un valor de $F_{exp} > F_{tab}$, de esta manera se comprobó que utilizando una concentración de PCLAM del 10% (Figura 37 C1) se obtiene un gradiente de liberación más alto, lo cual está relacionado con el tamaño, pues a esta concentración se obtienen fibras de menor diámetro y como consecuencia se tendría una mayor área superficial, además en los experimentos donde se utilizó dicha concentración son los que mantienen una liberación por mayor tiempo, lo cual podría darnos información de una interacción entre la matriz polimérica y el diclofenaco tal que permitió una liberación

prolongada y esta interacción se observó más claramente pues cuando hay mayor cantidad de PCLAM el gradiente de liberación disminuye.

Por otro lado el voltaje (variable E) podría llegar a influir pues el valor de F_{exp} es cercano al F_{tab} y este hecho dio la pauta para analizar, que cuando un gradiente de concentración más bajo se liberó fue por una menor interacción por parte del medio en el que difunde al obtenerse un ángulo mayor a 10 kV, e probablemente lo que sucedió fue que las fases no fueron homogéneas de tal manera que la mayor cantidad de fármaco se liberó rápidamente (dentro de las primeras 10 horas) y la cantidad de fármaco que quedó en la matriz polimérica estuvo menos disponible por una mayor hidrofobicidad para el caso de A5 que fue electrohilado a 15 kV y 15 % de PCLAM.

Tabla 26 ANOVA del gradiente de liberación de la segunda etapa para los andamios fabricados de acuerdo al diseño experimental Taguchi. Se observa que tanto la concentración de PCLAM como el voltaje aplicado son los efectos que impactan mayormente.

GL (mg/h)		EFECTO							
			A	B	C	D	E	e1	e2
A1	8.05	T1	5.86	5.45	6.61	4.63	6.13	4.52	5.68
A2	18.33	T2	3.82	4.23	3.07	5.05	3.55	5.16	4.00
A3	8.13	SC	0.52020	0.18605	1.56645	0.02205	0.83205	eT= 0.40400	
A4	11.84	gl	1	1	1	1	1	2	
A5	10.34	V	0.52020	0.18605	1.56645	0.02205	0.83205	Ve= 0.20200	
A6	17.81	F_{exp}	2.58	0.92	7.75	0.11	4.12		
A7	10.53	$F_{tab} (\alpha=0.05, 5, 2)$		5.78					
A8	18.04								

GL=Gradiente de liberación a partir del punto de inflexión, A=Temperatura de funcionalización, B=proporción PCLAM:CH, C=concentración de PCLAM, D=flujo de inyección y E=voltaje. T1 y T2= Totales de cada nivel; SC=suma de cuadrados; eT=SC de e1 y e2; gl= grados de libertad; V=SC/gl; Ve=eT/gl; $F_{exp} = V/Ve$

En suma, los sistemas liberan diclofenaco a un gradiente lo suficientemente aceptable para conseguir un efecto terapéutico, pues en estudios previos se ha demostrado que la dosis mínima para que se presente unión a proteínas en el sitio de aplicación puede estar en un intervalo de 0.15 a 150 $\mu\text{g/mL}$ [57, 58]

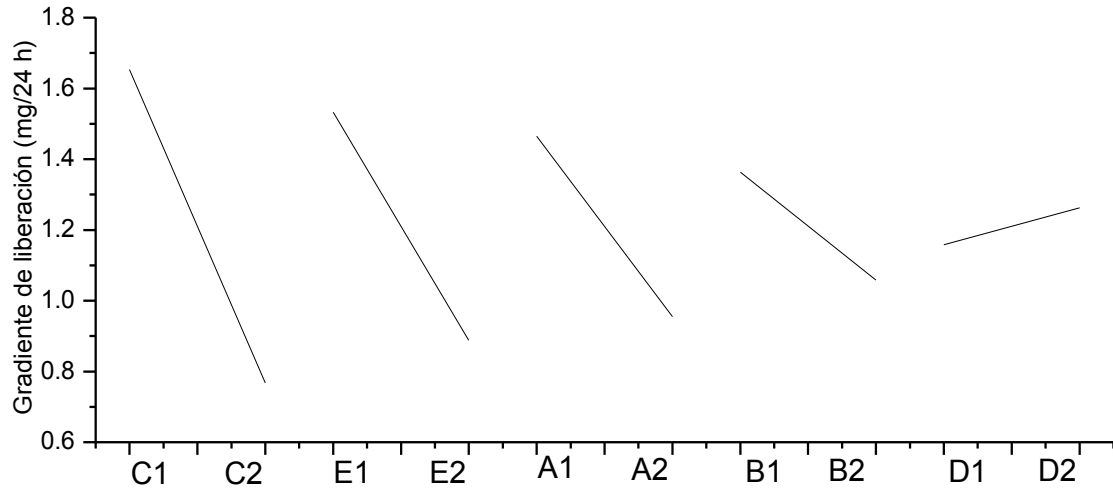


Figura 37 Análisis gráfico del gradiente de liberación de la segunda etapa para los andamios fabricados de acuerdo al diseño experimental Taguchi (A=Temperatura de funcionalización, B=proporción PCLAM:CH, C=concentración de PCLAM, D=flujo de inyección y E=voltaje). Se observa que los factores de impacto son la concentración (C) y el voltaje (E).

9. Conclusiones

Se fabricaron, caracterizaron y evaluaron andamios electrohilados de poli (ϵ -caprolactona) funcionalizados con anhídrido maléico, hidrolizados de colágeno tipo I y diclofenaco (PCLAM/CH/DS) para su potencial aplicación en liberación de fármacos.

Se logró funcionalizar PCL con anhídrido maléico (PCLAM) mediante una reacción por radicales libres obteniéndose un aumento significativo en la hidrofobicidad del polímero.

De acuerdo al diseño experimental Taguchi L8 los andamios son potencialmente útiles en el tratamiento de la inflamación, dolor y la posible regeneración de tejidos dado que presentó las siguientes evidencias:

- La composición química de los andamios no se modifica durante el período de liberación del diclofenaco por lo que pueden considerarse estables.
- Son químicamente estables a temperatura corporal.
- Presentan un módulo de Young superior al de la piel.
- La liberación del diclofenaco se mantiene por dos semanas con un gradiente de liberación mayor a 0.7 mg cada 24 horas, con lo cual se podría conseguir el efecto terapéutico prolongado.

Los resultados de liberación del DS presentaron una tendencia lineal en primera fase de liberación, sin embargo, no se ajustaron a los modelos cinéticos propuestos a excepción del andamio A1 y A2 con una $r^2 \geq 0.90$.

10. Perspectivas

Realizar análisis de: propiedades mecánicas al polímero funcionalizado, estudios de degradación y difracción de rayos con el objetivo de conocer a profundidad sus propiedades.

Determinar el modelo que explique el comportamiento de liberación.

Realizar estudios de potencia microbiológica para demostrar si pueden tener un efecto antibacteriano.

Realizar estudios *In vitro* de citotoxicidad y de viabilidad celular, con el fin de comprobar su potencial implementación en la regeneración de tejidos.

Estudiar la degradación del andamio *in vitro* e *in vivo*, así como.

Evaluar la disminución de la inflamación y la regeneración celular por medio de pruebas *in vivo* en animales para su posterior aplicación en quemaduras de segundo grado.

Probar las condiciones óptimas de acuerdo a las propiedades deseadas:

C1, E1, B2 y D1	↓ Diámetro de fibra
D1, A2 y E2	↓ Angulo de contacto
A1 y B2	↑ Módulo de Young
B2, E2, A1, D2 y C1	↓ Porcentaje de deformación
A1 y B2	↑ Esfuerzo a la tensión máxima

11. Referencias bibliográficas

1. OMS. Informe mundial sobre prevención de las lesiones en los niños. Organización Mundial de la Salud. 2013.
2. MEDLINEPLUS. Quemaduras 2013 [Mayo 23]. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000030.htm>.
3. Ospina A. Obtención y caracterización de nanofibras de poli (ácido láctico) modificado con colágeno mediante la técnica de electrohilado [Maestría en Ciencia e Ingeniería en Materiales]: UNAM; 2011.
4. Perez RA, Won JE, Knowles JC, Kim HW. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(4):471-96.
5. Schiffman JD, Schauer CL. A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polymer Reviews.* 2008;48(2):317-52.
6. Dastidar SG, Ganguly K, Chaudhuri K, Chakrabarty AN. The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2000;14(3):249-51.
7. Tissue Engineering Constructs and Commercialization [Internet]. Madame Curie Bioscience Database. 2013 [Mayo 24]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6008/>.
8. Garg T, Singh O, Arora S, Murthy RSR. Scaffold: A Novel Carrier for Cell and Drug Delivery. 2012;29(1):1-63.
9. O'Brien FJ. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today.* 2011;14(3):88-95.
10. Lucio LN, Cortés EAZ, Hernández AR, González SC, Hernández JE, Briseño RT, *et al.* Consideraciones epidemiológicas de las fracturas del fémur proximal. *Ortho-tips* 2012;8(3):135-9.
11. Smith IO, Liu XH, Smith LA, Ma PX. Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2009;1(2):226-36.
12. Zhang S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat Biotech.* 2003;21(10):1171-8.
13. Zhang S, Marini DM, Hwang W, Santoso S. Design of nanostructured biological materials through self-assembly of peptides and proteins. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2002;6(6):865-71.
14. Alcántara S. Obtención de nanofibras modificadas de poli(e-caprolactona) por electrohilado para aplicaciones biomédicas [Maestría en Ciencia e Ingeniería en Materiales]: UNAM; 2014.
15. Ma P, Zhang R. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1999;46(1):60-72.
16. Sánchez LMD, Rodríguez L, López M. Electrospinning: La era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 2013;14(1):10-27.
17. Morton WJ, inventor; Google Patents, assignee. Method of dispersing fluids. USA patent 705691. 1902 Julio 29, 1902.
18. Huang Z-M, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology.* 2003;63(15):2223-53.
19. ScienceDirect [Internet]. Elsevier B.V. 2015 [Mayo 25]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/>.
20. Teo WE, Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology.* 2006;17(14):R89.

-
21. Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan NC. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*. 2001;42(1):261-72.
 22. Ribeiro C, Sencadas V, Ribelles JLG, Lanceros-Méndez S. Influence of Processing Conditions on Polymorphism and Nanofiber Morphology of Electroactive Poly(vinylidene fluoride) Electrospun Membranes. *Soft Materials*. 2010;8(3):274-87.
 23. Ki CS, Baek DH, Gang KD, Lee KH, Um IC, Park YH. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. *Polymer*. 2005;46(14):5094-102.
 24. Goonoo N, Bhaw-Luximon A, Bowlin GL, Jhurry D. An assessment of biopolymer- and synthetic polymer-based scaffolds for bone and vascular tissue engineering. *Polymer International*. 2013;62(4):523-33.
 25. Krishnan R, Sundarrajan S, Ramakrishna S. Green Processing of Nanofibers for Regenerative Medicine. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2012:n/a-n/a.
 26. Cipitria A, Skelton A, Dargaville TR, Dalton PD, Hutmacher DW. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds - a review. *Journal of Materials Chemistry*. 2011;21(26):9419.
 27. Darney PD, Monroe SE, Klaisle CM, Alvarado A. Clinical evaluation of the Capronor contraceptive implant: preliminary report. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1989;160(5 Pt 2):1292-5.
 28. Nyoke GC, Sultana N. Fabrication of Poly Caprolactone (PCL) Based Microspheres for Drug Delivery and Tissue Engineering Application. *Applied Mechanics and Materials*. 2014;695:191-4.
 29. Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2003;24(12):2077-82.
 30. Li W-J, Mauck RL, Cooper JA, Yuan X, Tuan RS. Engineering Controllable Anisotropy In Electrospun Biodegradable Nanofibrous Scaffolds For Musculoskeletal Tissue Engineering. *Journal Of Biomechanics*. 2007;40(8):1686-93.
 31. Kolambkar YM. Electrospun nanofiber meshes for the repair of large bone defects [PhD]. U.S.: Georgia Institute of Technology; 2007.
 32. Pektok E, Nottelet B, Tille J-C, Gurny R, Kalangos A, Moeller M, *et al*. Degradation and Healing Characteristics of Small-Diameter Poly(ϵ -Caprolactone) Vascular Grafts in the Rat Systemic Arterial Circulation. *Circulation*. 2008;118(24):2563-70.
 33. Nisbet D, Yu L, Zahir T, Forsythe J, Shoichet M. Characterization of neural stem cells on electrospun poly (ϵ -caprolactone) submicron scaffolds: evaluating their potential in neural tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2008;19(5):623-34.
 34. Chew SY, Mi R, Hoke A, Leong KW. The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation. *Biomaterials*. 2008;29(6):653-61.
 35. Cao H, McHugh K, Chew SY, Anderson JM. The topographical effect of electrospun nanofibrous scaffolds on the in vivo and in vitro foreign body reaction. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010;93(3):1151-9.
 36. Jha BS, Colello RJ, Bowman JR, Sell SA, Lee KD, Bigbee JW, *et al*. Two pole air gap electrospinning: Fabrication of highly aligned, three-dimensional scaffolds for nerve reconstruction. *Acta Biomaterialia*. 2011;7(1):203-15.
 37. Mo XM, Xu CY, Kotaki M, Ramakrishna S. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials*. 2004;25(10):1883-90.
 38. Zhu Y, Gao C, Shen J. Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility. *Biomaterials* 2002;23:4889-95.
 39. Kim CH, Cho KY, Park JK. Grafting of glycidyl methacrylate onto polycaprolactone: Preparation and characterization. *Polymer*. 2001;42(12):5135-42.

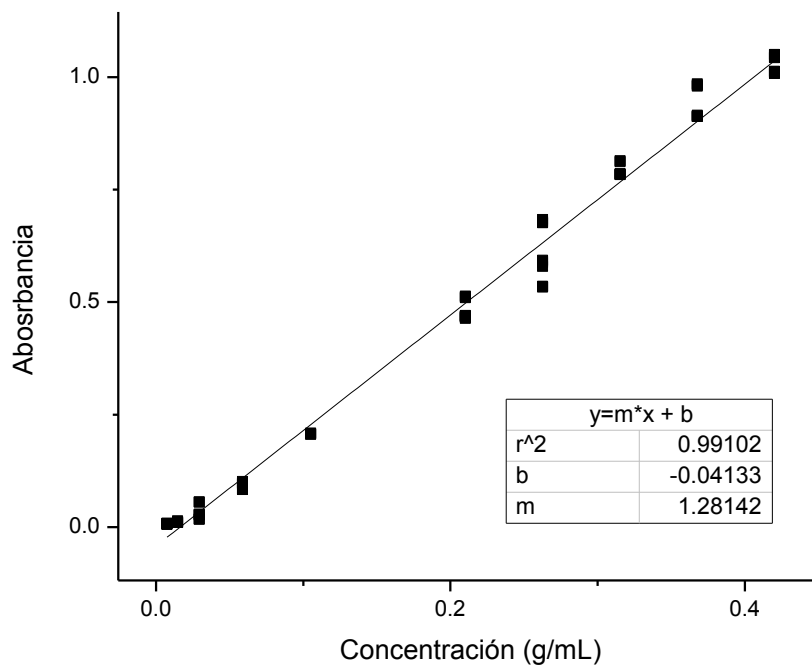
-
40. Huang L, Nagapudi K, Apkarian RP, Chaikof EL. Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2001;12(9):979-93.
 41. Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules*. 2002;3(2):232-8.
 42. Matthews JA, Boland ED, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of Collagen Type II: A Feasibility Study. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2003;18(2):125-34.
 43. Rho KS, Jeong L, Lee G, Seo BM, Park YJ, Hong SD, *et al.* Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials*. 2006;27(8):1452-61.
 44. Stitzel J, Liu J, Lee SJ, Komura M, Berry J, Soker S, *et al.* Controlled fabrication of a biological vascular substitute. *Biomaterials*. 2006;27(7):1088-94.
 45. Venugopal JR, Zhang Y, Ramakrishna S. In Vitro Culture of Human Dermal Fibroblasts on Electrospun Polycaprolactone Collagen Nanofibrous Membrane. *Artificial Organs*. 2006;30(6):440-6.
 46. Lee SJ, Yoo JJ, Lim GJ, Atala A, Stitzel J. In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007;83(4):999-1008.
 47. Wagermaier W, Fratzl P. 9.03 - Collagen. In: Möller KM, editor. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. Amsterdam: Elsevier; 2012. p. 35-55.
 48. Sell SA, Wolfe PS, Garg K, McCool JM, Rodriguez IA, Bowlin GL. The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues. *Polymers*. 2010;2(4):522-53.
 49. Gawkrödger DJ. *Dermatology: an illustrated colour text*. 3rd ed. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2002.
 50. Agache PG, Monneur C, Leveque JL, De Rigal J. Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo. *Archives of Dermatological Research*. 1980;269(3):221-32.
 51. Pasa la voz... Atención a niños con quemaduras [Internet]. 2014 [Enero 14]. Disponible en: <http://salud.edomex.gob.mx/html/article.php?sid=171>.
 52. Citores AP, Pardillo RM. Tratamiento de las quemaduras en urgencias. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Urgencias Pediátricas SEUP-AEP*. España: Asociación Española de Pediatría; 2012. p. 199-204.
 53. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn Wound Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006;19(2):403-34.
 54. Usunoff KG, Popratiloff A, Schmitt O, Wree A. Functional neuroanatomy of pain. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. 2006;184:1-115.
 55. Kopf A, Patel NB. *Guía para el manejo del Dolor en condiciones de bajos recursos*. Estados Unidos: Asociación Internacional para el Estudio del Dolor; 2010.
 56. Goodman, Gillman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 11 ed. Hill MG, editor 2006.
 57. Diclofenac [Internet]. National Center for Biotechnology Information, NHI. 2015 [Septiembre 05].
 58. Diclofenac [Internet]. DrugBank. 2015 [Octubre 20, 2014].
 59. Shen X, Yu D, Zhu L, Branford-White C, White K, Chatterton NP. Electrospun diclofenac sodium loaded Eudragit^(R) L 100-55 nanofibers for colon-targeted drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;408(1-2):200-7.
 60. Toncheva A, Paneva D, Manolova N, Rashkov I, Mita L, Crispi S, *et al.* Dual vs. single spinneret electrospinning for the preparation of dual drug containing non-woven fibrous materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013;439:176-83.

-
61. Dutta NK, Dastidar SG, Kumar A, Mazumdar K, Ray R, Chakrabarty AN. Antibacterial activity of the antiinflammatory agent diclofenac sodium, and its synergism with streptomycin. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004;35:316-23.
 62. Jain KK. *Drug Delivery Systems*: Humana Press; 2008.
 63. Kenawy E-R, Abdel-Hay FI, El-Newehy MH, Wnek GE. Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems. *Materials Chemistry and Physics*. 2009;113(1):296-302.
 64. Reise M, Wyrwa R, Muller U, Zylinski M, Volpel A, Schnabelrauch M, *et al*. Release of metronidazole from electrospun poly(L-lactide-co-D/L-lactide) fibers for local periodontitis treatment. *Dental Materials*. 2012;28(2):179-88.
 65. Chen L, Tang CY, Tsui CP, Chen da Z. Mechanical properties and in vitro evaluation of bioactivity and degradation of dexamethasone-releasing poly-d-l-lactide/nano-hydroxyapatite composite scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2013;22:41-50.
 66. Qi R, Guo R, Zheng F, Liu H, Yu J, Shi X. Controlled release and antibacterial activity of antibiotic-loaded electrospun halloysite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;110:148-55.
 67. Krogstad EA, Woodrow KA. Manufacturing scale-up of electrospun poly(vinyl alcohol) fibers containing tenofovir for vaginal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;475(1-2):282-91.
 68. Leong NL, Arshi A, Kabir N, Nazemi A, Petrigliano FA, Wu BM, *et al*. In vitro and in vivo evaluation of heparin mediated growth factor release from tissue-engineered constructs for anterior cruciate ligament reconstruction. *Journal of Orthopaedic Research*. 2015;33(2):229-36.
 69. Yadav R, Balasubramanian K. Polyacrylonitrile/Syzygium aromaticum hierarchical hydrophilic nanocomposite as a carrier for antibacterial drug delivery systems. *RSC Advances*. 2015;5(5):3291-8.
 70. Thassu D, Deleers M, Pathak Y. *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*: Taylor & Francis; 2007.
 71. Suwantong O, Opanasopit P, Ruktanonchai U, Supaphol P. Electrospun cellulose acetate fiber mats containing curcumin and release characteristic of the herbal substance. *Polymer*. 2007;48(26):7546-57.
 72. Charernsriwilaiwat N, Opanasopit P, Rojanarata T, Ngawhirunpat T. Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;427(2):379-84.
 73. Martin AN, Sinko PJ, Singh Y. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences*: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
 74. Li X. *Design of Controlled Release Drug Delivery Systems*: McGraw-Hill Education; 2005.
 75. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;13(2):123-33.
 76. Seymour RB, Carraher CE. *Structure-property relationships in polymers*: Plenum Press; 1984.
 77. Elias HG. *Macromolecules · 1: Volume 1: Structure and Properties*: Springer US; 2012.
 78. Fried JR. *Polymer Science and Technology*: Prentice Hall PTR; 1995.
 79. Skoog DA, Crouch SR, Holler FJ, Anzures MB. *Principios de analisis instrumental / Principles of Instrumental Analysis*: Cengage Learning Latin America; 2008.
 80. Hibbeler RC. *Mecánica de materiales*: Pearson Educación; 2006.

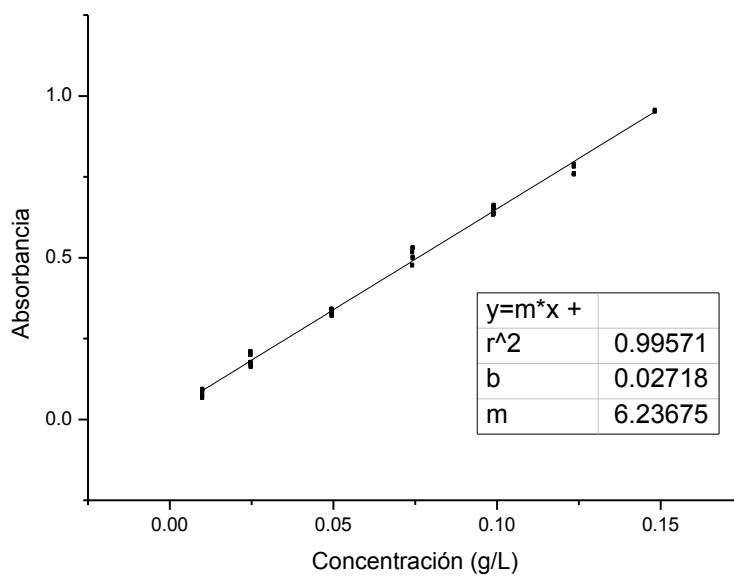
-
81. ASQ. What Is Design of Experiments (DOE)? 2014 [cited 2014 Noviembre 05]. Disponible en: <http://asq.org/learn-about-quality/data-collection-analysis-tools/overview/design-of-experiments.html>.
 82. Mohammad Khanlou H, Chin Ang B, Talebian S, Muhammad Afifi A, Andriyana A. Electrospinning of polymethyl methacrylate nanofibers: optimization of processing parameters using the Taguchi design of experiments. *Textile Research Journal*. 2014.
 83. Roy RK. *Design of Experiments Using The Taguchi Approach: 16 Steps to Product and Process Improvement*: Wiley; 2001.
 84. Perú I. Diseño de experimentos 2014 [cited 2014 Noviembre 05]. Disponible en: http://www.ingenieria.peru-v.com/disenos_experimentos/disenos_experimentos.htm.
 85. Nakason C, Kaesaman A, Supasanthitkul P. The grafting of maleic anhydride onto natural rubber. *Polymer Testing*. 2004;23(1):35-41.
 86. Wu C-S, Liao H-T. Polycaprolactone-Based Green Renewable Eco-composites Made from Rice Straw Fiber: Characterization and Assessment of Mechanical and Thermal Properties. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2012;51(8):3329-37.
 87. Kim J-S, Reneker D. Mechanical properties of composites using ultrafine electrospun fibers. *Polymer Composites*. 1999;20(1):124-31.
 88. Song Y, Liu L, Weng X, Zhuo R. Acid-initiated polymerization of ϵ -caprolactone under microwave irradiation and its application in the preparation of drug controlled release system. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2003;14(3):241-53.
 89. John J, Tang J, Yang Z, Bhattacharya M. Synthesis and characterization of anhydride-functional polycaprolactone. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. 1997;35(6):1139-48.
 90. Sionkowska A, Skopinska-Wisniewska J, Gawron M, Kozłowska J, Planecka A. Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010;47(4):570-7.
 91. Palomo ME, Ballesteros MP, Frutos P. Analysis of diclofenac sodium and derivatives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999;21(1):83-94.
 92. Kurkuri MD, Aminabhavi TM. Poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) sequential interpenetrating network pH-sensitive microspheres for the delivery of diclofenac sodium to the intestine. *Journal of Controlled Release*. 2004;96(1):9-20.
 93. Lee SJ, Liu J, Oh SH, Soker S, Atala A, Yoo JJ. Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions. *Biomaterials*. 2008;29(19):2891-8.
 94. Tammaro L, Russo G, Vittoria V. Encapsulation of diclofenac molecules into poly (ϵ caprolactone) electrospun fibers for delivery protection. *Journal of Nanomaterials*. 2009;2009:1-8.

12. Anexos

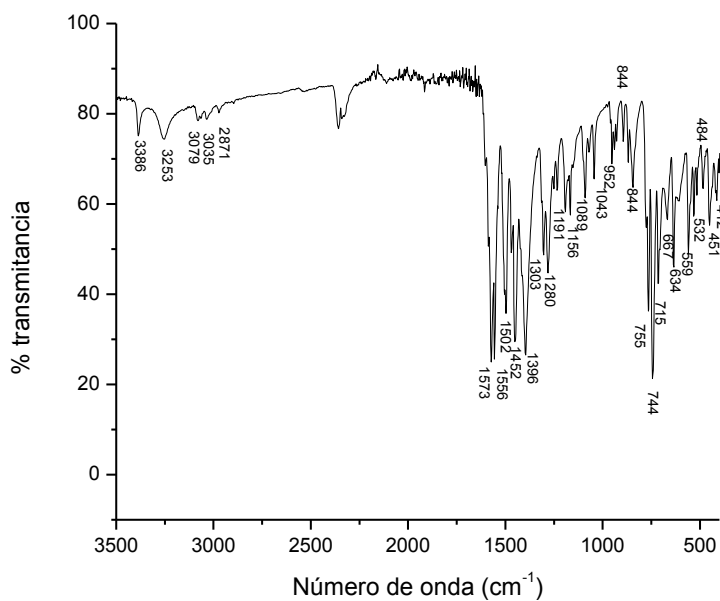
12.1. Curva de calibración de ácido acrílico



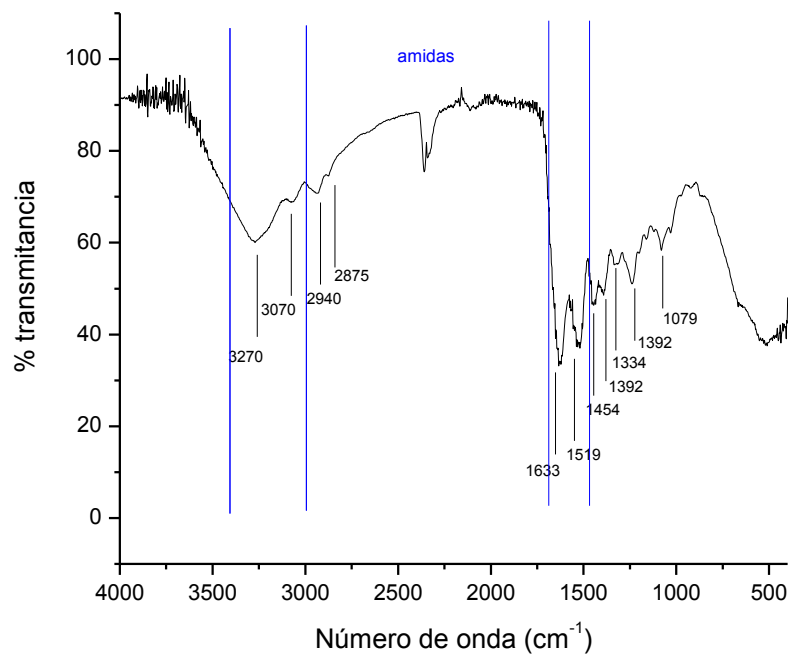
12.2. Curva de calibración de diclofenaco



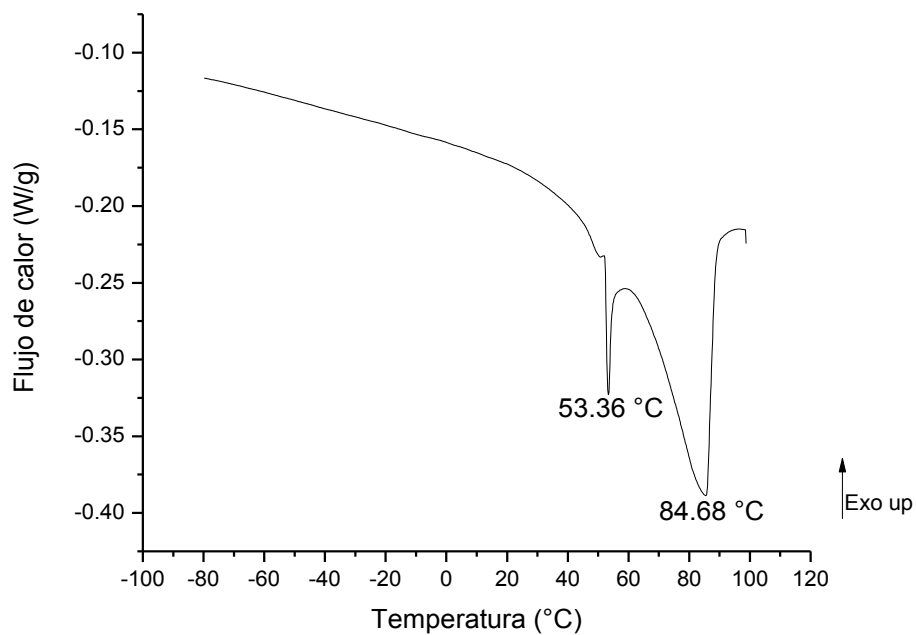
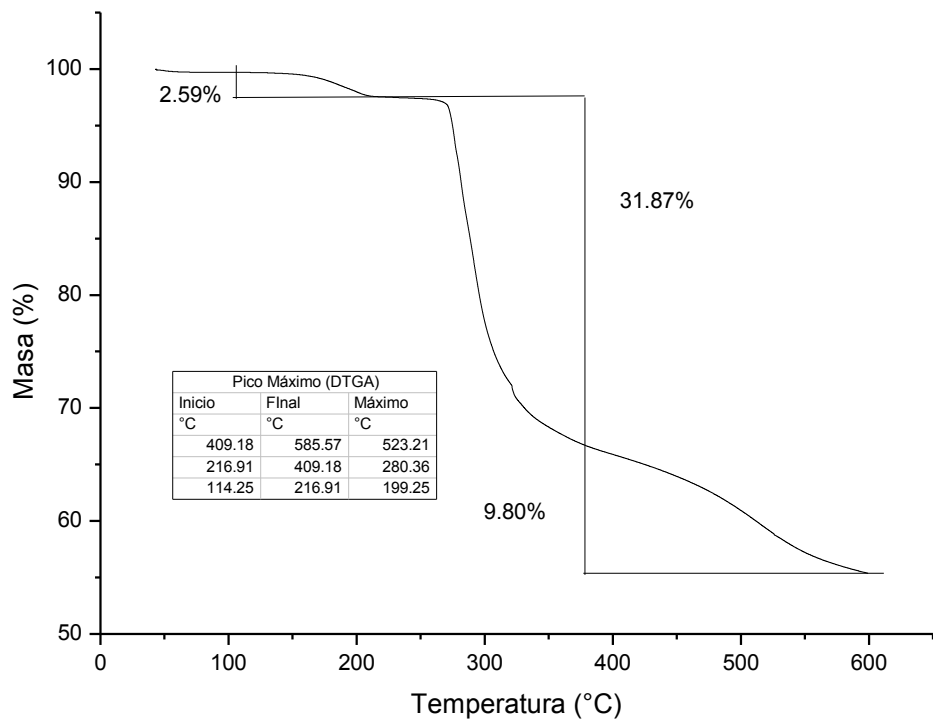
12.3. Espectro ATR-FTIR de Diclofenaco



12.4. Espectro ATR-FTIR de hidrolizados de colágeno tipo I



12.5. Termogramas TGA y DSC de diclofenaco



12.6. Termogramas TGA y DSC de hidrolizados de colágeno tipo I

