



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

**“ANDAMIOS ELECTROHILADOS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) FUNCIONALIZADA CON
ANHIDRÍDO MALÉICO PARA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

PRESENTA:

ING. ERICK ROBLES HURTADO

TUTOR PRINCIPAL

**DR. RICARDO VERA GRAZIANO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM**

COMITÉ TUTOR

**DR. JOEL VARGAS ORTEGA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES SEDE MORELIA, UNAM**

**DR. ANTONIO MARTINEZ RICHA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUANAJUATO**

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2018



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.

*"Yo no estudio para saber más,
sino para ignorar menos"*

Sor Juana Inés De la Cruz.

Quiero agradecer a la Sra. Rita Aurora Hurtado Saldaña (a continuación, mi mamá), al Sr. Eliseo Robles (a continuación, mi papá), a Edgar Robles Hurtado (sin el Sr. porque aún no tiene bendiciones, mi hermano), a Oscar Rodrigo Roa Rodríguez y a la Dra. Rebeca Rodríguez Montoya.

Papá, mamá, gracias por siempre apoyarme y darme las herramientas para poder ser la persona que soy y hacerme el hijo más feliz del mundo por tener a los mejores padres del mundo. Edgar ¿Qué te puedo decir que no sepas? Sólo que eres el mejor hermano que uno puede tener, aunque me hagas enojar.... Rodrigo, llevamos bastante tiempo juntos y quiero agradecerte esas noches de desvelos, fiestas, que te quedes dormido viendo Star Wars (¿Por qué sigo contigo?), toda la felicidad que me has dado y espero poder recompensarte por todo esto y más momentos que han pasado durante estos fabulosos años ¡Te ero!. Dra., muchas gracias por el apoyo que me ha brindado, cuidar a mi familia, siempre estar ahí cuando necesito un abrazo, gracias por todo (Ni aún aquí le puedo decir Rebeca, jejeje). A toda mi familia por todos los momentos de sonrisas, pelás, chascarrillos, reuniones, etc. No sería la persona que soy sin ustedes. Probablemente no sería una persona tan tolerante sin ustedes... XD.

Para que no se me olvide nadie, gracias amigos por recorrer esta senda de vida, que sin ser de mi familia se han convertido en familia. Son muchas personas que han entrado a mi vida para quedarse; ganarse mi respeto, mi admiración, mi amistad y mi cariño, sobre todo. A todos, gracias por esas fiestas interminables, de aprender que ya no aguantamos como cuando teníamos 20 años, las pláticas, abrazos, idas al cine, distracciones, etc. ¡Hacer de mi vida un parque de diversiones interminable!

Dr. Ricardo Vera por el apoyo, correcciones, reuniones, seminarios, por ser mi asesor y brindarme su amistad.

A todos los Doctores involucrados en este proyecto; por el tiempo que me dedicaron para el término de este trabajo. ¡Gracias!

Instituto de Investigaciones en Materiales y la Universidad Nacional Autónoma de México, gracias por darme la oportunidad de cursar la Maestría en Ciencia e Ingeniería de Materiales.

Agradezco a CONACYT la beca otorgada para la realización de este trabajo y al proyecto DGAPA/PAPIIT IN108116.

Por el apoyo en SEM Omar Novelo Peralta, en termogramas Karla Reyes, en Cromatografía GPC Salvador López Morales, Miguel A. Canseco Martínez en ATR-FTIR y UV-VIS, en espectros RMN Gerardo Cedillo Valverde y las facilidades del equipo para pruebas mecánicas a la Dra. Cristina Piña Barba.

Resumen

En este trabajo se presenta el estudio de la funcionalización de la poli(ϵ -caprolactona) con anhídrido maléico, cuya funcionalización es realizada a través de un mecanismo por radicales libres así como la fabricación de andamios electrohilados a partir de los polímeros sintetizados con colágeno hidrolizado tipo I y diclofenaco sódico a diferentes condiciones, con la finalidad de evaluar su biocompatibilidad y observar la viabilidad como liberadores controlados de fármacos para la ingeniería de tejidos. Los polímeros obtenidos se caracterizaron por Resonancia Magnética Nuclear ($^1\text{H-NMR}$), Espectrofotometría, Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Cromatografía de Permeación en Gel (GPC), Análisis Termogravimétrico (TGA), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Los andamios fabricados por la técnica de electrohilado se caracterizaron por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), Ángulo de contacto, Pruebas mecánicas uniaxiales, ensayo de viabilidad celular, y liberación de fármaco *in-vitro*. Para la fabricación de los andamios se utilizó un diseño experimental Taguchi con las siguientes variables: flujo de inyección, diferencia de potencial, distancia, proporciones de polímero funcionalizado, colágeno hidrolizado tipo I y diclofenaco sódico.

Se funcionalizó la poli(ϵ -caprolactona) a tres condiciones 70 °C por 15 horas, 110 °C por 15 horas y 110 °C por 18 horas. El grado de funcionalización fue de 1.63 %, 1.84 % y 2.04 % respectivamente. Hay viabilidad celular en los andamios fabricados en este trabajo, excepto en los andamios con Diclofenaco Sódico.

Glosario de abreviaturas

PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
AM	Anhídrido maléico
Col1 Hidrolizado	Colágeno hidrolizado tipo I
DS	Diclofenaco Sódico
PCLAM1	Poli(ϵ -caprolactona) funcionalizado con anhídrido maléico a 70 °C por 15 horas
PCLAM2	Poli(ϵ -caprolactona) funcionalizado con anhídrido maléico a 110 °C por 15 horas
PCLAM3	Poli(ϵ -caprolactona) funcionalizado con anhídrido maléico a 110 °C por 18 horas
BPO	Peróxido de Benzoilo
TFE	1,1,1,2-Tetrafluoroetano
THF	Tetrahidrofurano
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos pH=7.4
kV	Kilo Voltios
mL	Mililitros
nm	nanómetros
ECM	Matriz extracelular
Xc	Porcentaje de cristalinidad

ÍNDICE

1. Introducción	13
2. Marco teórico.....	16
2.1. Andamios.....	17
2.1.1. Métodos de fabricación	17
2.2. Electrohilado	18
2.2.1. Aplicaciones.....	21
2.3. Biomateriales	22
2.3.1. Poli(ϵ -caprolactona).....	24
2.3.2. Funcionalización de poli(ϵ -caprolactona) usando anhídrido maléico	24
2.4. La piel	25
2.4.1. Colágeno Tipo I Hidrolizado	27
2.5. Liberación controlada de fármacos.....	29
2.5.1. Diclofenaco sódico	30
3. Justificación.....	31
4. Objetivo General	32
5. Objetivos Particulares	33
6. Hipótesis.....	34
7. Materiales y métodos	35
7.1. Funcionalización de poli(ϵ -caprolactona).....	35
7.2. Fabricación de andamios.....	36
7.3. Fabricación de andamios electrohilados de PCLAM/Colágeno Tipo 1 Hidrolizado/Diclofenaco sódico (PCLAM/Col/DS).....	38
7.4. Caracterización de polímeros PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3.....	39
7.4.1. Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier de Reflexión Total Atenuada (ATR-FTIR).....	39
7.4.2. Resonancia Magnética Nuclear de Protón ($^1\text{H-NMR}$)	40
7.4.3. Espectrometría UV-VIS.....	41
7.4.4. Cromatografía de Permeación en Gel (GPC).....	41
7.4.5. Análisis térmico	42
7.4.5.1. TGA	42
7.4.5.2. DSC	42

7.5. Caracterización de andamios electrohilados de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3	43
7.5.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	43
7.5.2. Ángulo de contacto	43
7.5.3. Pruebas mecánicas.....	44
7.5.4. Degradación	44
7.6. Cultivo y sembrado celular.....	45
7.7. Viabilidad celular.....	45
7.8. Liberación de fármaco.....	46
8. Resultados	47
8.1. Funcionalización de PCL con AM.....	48
8.1.1. Porcentaje de funcionalización por medio de espectrocolorimetría.....	50
8.1.2. Análisis de grupos funcionales por FTIR.....	50
8.1.3. Estructura de PCL, PCLAM1, PCLAM2 Y PCLAM3 por ¹ H-NMR	52
8.1.4. Análisis de pesos moleculares por GPC.....	55
8.1.5. Análisis de pérdida de masa por TGA.....	56
8.1.6. Análisis de transiciones por DSC	57
8.2. Caracterización de andamios electrohilados de PCL y PCLAM	58
8.2.1. Morfología de andamios por SEM.....	58
8.2.2. Hidrofobicidad por ángulo de contacto	61
8.2.3. Propiedades mecánicas por pruebas de tensión uniaxial.....	62
8.2.4. Determinación de viabilidad celular sobre los andamios electrohilados PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3	62
8.3. Caracterización de andamios PCLAM/Col /DS	66
8.3.1. Análisis de grupos funcionales por FTIR.....	66
8.3.2. Morfología de andamios por SEM.....	69
8.3.3. Humectabilidad de los andamios PCL/Col /DS, PCLAM1/Col /DS, PCLAM2/Col /DS y PCLAM3/Col /DS.....	75
8.3.4. Determinación de viabilidad celular sobre los andamios	78
8.3.5. Liberación de fármaco.....	85
9. Discusión	88
10. Conclusión	90
11. Anexos	91
12. Referencias.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes etapas de la regeneración in situ del tejido [8].	17
Figura 2. Equipo de electrohilado.	19
Figura 3. Efecto de la concentración de la solución polimérica comenzando con una baja hasta un alta [16].	21
Figura 4. Número de artículos publicados en revistas científicas indexadas en la base de datos de Scopus.	21
Figura 5. Documentos por área. Palabra clave “electrospinning”.	22
Figura 6. Pérdida de masa y peso molecular del PCL [22].	24
Figura 7. Estructura del anhídrido maléico y anhídrido succínico.	25
Figura 8. Estructura de la piel [26].	26
Figura 9. Modelo de triple hélice de colágeno [27].	27
Figura 10. Colágeno tipo I sin hidrolizar (a) e hidrolizado (b) [27].	27
Figura 11. Estructura Glicina.	27
Figura 12. Estructura Prolina.	28
Figura 13. Secuencia Gly-Xaa-Yaa. Se repite cientos de veces en las tres cadenas α del colágeno. Gly es Glicina y generalmente, Xaa es prolina (Pro) y Yaa hidroxiprolina (Hyp); la hidroxiprolina se origina a partir de una modificación de prolina [29].	28
Figura 14. Relación entre los diferentes tipos de fibras que podemos obtener por electrohilado para controlar la liberación de fármaco [32].	29
Figura 15. Estructura del Diclofenaco Sódico.	30
Figura 16. Los ángulos de contacto $\Theta < 90^\circ$ son hidrofílicos, mientras que ángulos de contacto $\Theta > 90^\circ$ son hidrofóbicos [38].	43
Figura 17. Degradación por hidrólisis; ocurre cuando el agua penetra en el andamio y comienza a degradar desde dentro del andamio.	45
Figura 18. Posible mecanismo de reacción. Reacción de funcionalización por radicales libres, usando BPO como iniciador. Modificado de referencias [23,35,43,44].	49
Figura 19. Espectro FTIR de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3. Banda en 2894 cm^{-1} correspondiente al AM, que no aparece el espectro de PCL.	51
Figura 20. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón de la PCL. No muestra ninguna señal en 3.66 ppm.	53
Figura 21. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón de la PCLAM1. Aparece una señal alrededor de 3.66 ppm, perteneciente al protón H_1 y H_{11} del enlace entre C_2 y C_7 ...	54
Figura 22. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón de la PCLAM2. Aparece una señal alrededor de 3.66 ppm, perteneciente al protón H_1 y H_{11} del enlace entre C_2 y C_7 ...	54
Figura 23. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón de la PCLAM3. Aparece una señal alrededor de 3.66 ppm, perteneciente al protón H_1 y H_{11} del enlace entre C_2 y C_7 ...	55
Figura 24. Pérdida de masa en función de la temperatura de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3.	56

Figura 25. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCL. Se obtuvieron diámetros de 687 nm con una desviación estándar de 94 nm.	59
Figura 26. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM1. Se obtuvieron diámetros de 468 nm con una desviación estándar de 185 nm.....	59
Figura 27. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM2. Se obtuvieron diámetros de 395 nm con una SD de 190 nm.....	60
Figura 28. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM3. Se obtuvieron diámetros de 354 nm con una desviación estándar de 75 nm.....	60
Figura 29. Ángulo de contacto de andamios de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3.....	61
Figura 30. Módulo de Young y esfuerzo máximo de PCL, PCLAM1, PCLAM2, PCLAM3.	62
Figura 31. Fibroblasto sembrado en placa multipozo.	63
Figura 32. Cultivo de fibroblastos sobre el andamio PCL. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).....	64
Figura 33. Cultivo de fibroblastos sobre el andamio PCLAM1. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).....	64
Figura 34. Cultivo de fibroblastos sobre el andamio PCLAM2. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).....	65
Figura 35. Cultivo de fibroblastos sobre el andamio PCLAM3. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).....	65
Figura 36. Espectro FTIR de PCL/Col/DS. Se muestra como la banda de los $(OH)^{-1}$ va creciendo por el aumento del Colágeno tipo 1 Hidrolizado en el andamio.	67
Figura 37. Espectro FTIR de PCLAM1/Col/DS. Se muestra como la banda de los $(OH)^{-1}$ va creciendo por el aumento del Colágeno tipo 1 Hidrolizado en el andamio.	67
Figura 38. Espectro FTIR de PCLAM2/Col/DS. Se muestra como la banda de los $(OH)^{-1}$ va creciendo por el aumento del Colágeno tipo 1 Hidrolizado en el andamio.	68
Figura 39. Espectro FTIR de PCLAM3/Col/DS. Se muestra como la banda de los $(OH)^{-1}$ va creciendo por el aumento del Colágeno tipo 1 Hidrolizado en el andamio	68
Figura 40. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCL/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 266 nm con una desviación estándar de 63 nm. 70	
Figura 41. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM1/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 184 nm con una desviación estándar de 44 nm.....	70
Figura 42. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM2/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 201 nm con una desviación estándar de 65 nm.....	71

Figura 43. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM3/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 241 nm con una desviación estándar de 56 nm.....	71
Figura 44. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCL/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 251 nm con una desviación estándar de 75 nm.	72
Figura 45. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM1/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 208 nm con una desviación estándar de 42 nm.....	72
Figura 46. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM2/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 192 nm con una desviación estándar de 37 nm.....	73
Figura 47. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM3/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 265 nm con una desviación estándar de 47 nm.....	73
Figura 48. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCL/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 309 nm con una desviación estándar de 180 nm.	74
Figura 49. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM1/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 219 nm con una desviación estándar de 39 nm.....	74
Figura 50. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM2/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 181 nm con una desviación estándar de 33 nm.....	75
Figura 51. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM3/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 435 nm con una desviación estándar de 166 nm.....	75
Figura 52. Cultivo de fibroblastos sobre los andamios PCL/Col/DS, PCLAM1/Col/DS, PCLAM2/Col/DS y PCLAM3/Col/DS con una relación 50 % de polímero, 50 % de Col y diferentes porcentajes de DS. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio)..	79
Figura 53. Cultivo de fibroblastos sobre los andamios PCL/Col/DS, PCLAM1/Col/DS, PCLAM2/Col/DS y PCLAM3/Col/DS con una relación 80 % de polímero, 20 % de Col y diferentes porcentajes de DS. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio)..	80
Figura 54. Cultivo de fibroblastos sobre los andamios PCL/Col a proporción 50:50 y 80:20. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).	81
Figura 55. Cultivo de fibroblastos sobre los andamios PCLAM1/Col a proporción 50:50 y 80:20. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).	82

Figura 56. Cultivo de fibroblastos sobre los andamios PCLAM2/Col a proporción 50:50 y 80:20. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio). 83

Figura 57. Cultivo de fibroblastos sobre los andamios PCLAM3/Col a proporción 50:50 y 80:20. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio). 84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de fabricación de andamios [10].	17
Tabla 2. Parámetros que se pueden modificar para obtener fibras con determinadas características.	20
Tabla 3. Polímeros usados en Ingeniería de Tejidos [19].	22
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del diclofenaco sódico.	30
Tabla 5. Condiciones de funcionalización.	36
Tabla 6. Arreglo Taguchi L8	37
Tabla 7. Factores y niveles en el diseño de experimento Taguchi	37
Tabla 8. Diseño de experimentos Taguchi L16	38
Tabla 9. Factores y niveles en el diseño de experimento Taguchi	39
Tabla 10. Diseño de experimentos Taguchi L6	39
Tabla 11. Porcentaje de funcionalización de PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3. Tomando como blanco PCL para comprobar la reacción de funcionalización.	50
Tabla 12. Bandas características de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3	52
Tabla 13. Señales en ¹ H-NMR de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3. Teniendo la señal del enlace de la PCL y el AM en 3.66 ppm.	53
Tabla 14. Pesos moleculares PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3.	56
Tabla 15. Temperaturas de degradación por medio de “on set Point”	57
Tabla 16. Tc, Tm y Tg de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3	57
Tabla 17. Condiciones de electrohilado para andamios (PCL,PCLAM1,PCLAM2,PCLAM3)/Col/DS.	66
Tabla 18. Bandas características de Colágeno Tipo 1 Hidrolizado y Diclofenaco Sódico.	69
Tabla 19. Humectabilidad de los andamios con proporción 80 % polímero y 20 % Col.	76
Tabla 20. Humectabilidad de los andamios con proporción 50 % polímero y 50 % Col.	77
Tabla 21. Valores de r ² y K obtenidos mediante la aplicación del modelo dependiente (orden cero, primer orden y segundo orden).	86

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro FTIR de poli(ϵ -caprolactona)	91
Anexo 2. Espectro FTIR PCLAM1	91
Anexo 3. Espectro FTIR PCLAM2	92
Anexo 4. Espectro FTIR PCLAM3	92

1. Introducción



Las heridas son lesiones que rompen la piel u otros tejidos. Para repararlas se hacen otras lesiones como, por ejemplo, las suturas. La ingeniería tisular está definida como “un campo interdisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida al desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función tisular”; emergió a principio de los años 1990’s [1]. Las técnicas actualmente desarrolladas para hacer cultivos celulares se basan en sistemas de cultivo estático que no se asemejan al microambiente de tejido fisiológico [2]. En la ingeniería de tejidos, las células se siembran sobre el andamios, mimetizando la matriz extracelular (ECM) para que las células crezcan con el soporte que ellas necesitan [3]. Los andamios son estructuras donde facilitan la viabilidad celular. Se desea crear andamios fibrilares porque la matriz extracelular es el soporte de las células en los tejidos, donde se encuentran estructuras fibrilares hechas de en su mayoría de Colágeno que sostienen, señalizan y mantienen un ambiente idóneo para que exista viabilidad celular, es decir, que las células se mantengan, colonicen, exista adhesión y proliferen.

Los andamios deben cumplir ciertas propiedades para ser utilizados en la ingeniería de tejidos [1] [3] [4] [5]:

- Tener poros interconectados que favorezcan la integración tisular y vascularización.
- Ser biocompatibles para evitar el rechazo del tejido donde se implante.
- Degradarse mientras que se regenera el tejido.
- Tener buenas propiedades mecánicas similares a la zona de aplicación para mimetizar el ambiente celular.
- Tener una superficie que permita la adhesión celular y viabilidad celular.
- Simular la matriz extracelular.

También es importante el tipo de biomaterial que se quiera utilizar, se debe de tener en cuenta su estructura química, el peso molecular, la solubilidad, su hidrofobicidad, la energía de superficie y su degradación. Existen polímeros naturales y sintéticos como biomateriales.

Los polímeros naturales están divididos en dos grupos principales [4]:

- Polisacáridos (Almidón, celulosa, quitosano, pectinas, alginato, dextrano, pululano, xantano y glicosaminoglicanos).
- Polipéptidos y proteínas (colágeno, fibroína de seda, albumina).

Las ventajas de utilizar este tipo de polímeros son que no inducen una respuesta negativa al implantarlos, pueden imitar más de cerca la matriz extracelular y al degradarse se forma nuevo tejido ayudando al transporte de nutrientes de las células. Las desventajas que tienen son: malas propiedades mecánicas, baja estabilidad química, térmica y un control restringido sobre la bioresorbabilidad,

Los polímeros sintéticos más utilizados son poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ε-caprolactona) (PCL), poli(ácido láctico) y sus copolímeros. Estos polímeros están aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de USA (en inglés, FDA) para el uso clínico. La ventaja de usar estos materiales es su gran diversificación para modificar sus propiedades, por ejemplo, ajustar las propiedades mecánicas, hacer poros en el material como los deseamos, disminuir su tiempo de degradación, modificar su forma, entre otros;

haciendo posible producir andamios con características físicas, biológicas y mecánicas diseñadas. El uso de polímeros degradables evita una cirugía para retirarlos.

Existen diferentes técnicas para la fabricación de andamios. Una de ellas es el electrohilado que proporciona fibras con una alta área de superficie para la adhesión celular, porosidad controlada y un microambiente 3D para la interconectividad de las células. Las fibras convencionales producidas por hilatura mecánica suelen medir decenas de micras de diámetro, minimizando su área superficial.

Fibras de biomateriales con diámetros $<1 \mu\text{m}$ pueden mimetizar la ECM. Las fibras por la técnica de electrohilado pueden ser diseñadas para que tengan las propiedades mecánicas adecuadas del tejido y órgano dañado. Otra ventaja de Electrohilado es la posibilidad del encapsulamiento de fármacos en las fibras [6].

2.1. Andamios

El principal objetivo de la ingeniería tisular es la fabricación de andamios funcionales para tejidos y órganos dañados; representando una opción viable a la implantación convencional de tejidos y órganos. Los andamios facilitan una base adecuada para la viabilidad celular y por consecuencia la regeneración de tejidos [7]. En la Figura 1 se muestra el proceso y la función que tiene un andamio, A) Implantación del andamio. B) Fase inflamatoria. Infiltración de células inmunes y formación de la matriz preliminar. C) Fase proliferativa. Deposición de ECM y afluencia de células productoras de inmunidad y tejido. D) Fase de remodelación y remodelación de ECM (síntesis de elastina y colágeno) E) La homeostasis del tejido se restaura después de una fase de remodelación de la ECM recién formada y la resolución de la inflamación.

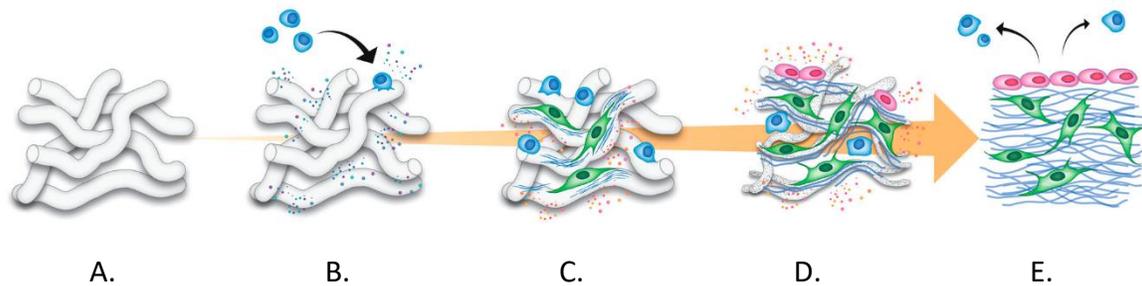


Figura 1. Diferentes etapas de la regeneración in situ del tejido [8].

2.1.1. Métodos de fabricación

Los diferentes métodos de fabricación han sido investigados durante las últimas dos décadas [9], para controlar el tamaño de poro, la interconectividad entre ellos y la difusión rápida de nutrientes y fijación celular. En la Tabla 1, se muestran algunas técnicas utilizadas y sus ventajas y desventajas.

Tabla 1. Métodos de fabricación de andamios [10].

Método	Ventajas	Desventajas
Fundición de solvente/Lixiviación de partículas	Control sobre la porosidad, tamaño de poro y cristalinidad	Propiedades mecánicas limitadas, disolventes residuales y material porógeno
Lixiviación de porógeno	Control sobre porosidad y geometría de poro	Tamaño de poro inadecuado e interconectividad de los poros

Espumado con gas	Libre de solventes orgánicos duros, control de la porosidad y tamaño de poro	Propiedad mecánica limitada, interconectividad inadecuada de los poros
Autoensamblaje	Control sobre la porosidad, tamaño de poro y diámetro de fibra	Material costoso, parámetros de diseño complejos
Electrohilado	Control sobre la porosidad, tamaño de poro y diámetro de fibra	Propiedad mecánica limitada, disminución del tamaño de poro con grosor de fibra
Separación de fases	Ninguna disminución en la actividad de la molécula	Difícil de controlar con presión la morfología
Prototipado rápido	Excelente control sobre la geometría, porosidad, no requiere material de soporte	Tipo de polímero limitado, equipo caro
Malla de fibra	Gran área de superficie para la fijación celular, rápida difusión de nutrientes	Falta de estabilidad estructural
Unión de fibras	Alta relación superficie/volumen, alta porosidad	Propiedades mecánicas bajas, aplicaciones limitadas a otros polímeros
Moldeo por fusión	Control independiente de porosidad y tamaño de poro	Temperatura alta requerida para el polímero no amorfo
Laminación de membrana	Proporcionar matriz 3D	Falta de resistencia mecánica requerida, interconectividad inadecuada de los poros
Secado en frío	No se requiere alta temperatura y paso de lixiviación separado	Tamaño de poro pequeño y tiempo de proceso largo

2.2. Electrohilado

El término “electrohilado”, que se deriva de “hilado electrostático” fue descubierto por Rayleigh en 1897, estudiado a detalle por Zeleny en 1914 y patentado por Formhals en 1934

[11]. El trabajo de Taylor en 1969 sobre chorros eléctricos ha sentado las bases para el electrohilado [12]. El electrohilado es un proceso de fabricación de fibras sólidas que se producen a partir de una solución polimérica suministrada por una jeringa con un diámetro milimétrico. Las fibras que se obtienen generalmente se encuentran con diámetros $<1 \mu\text{m}$ [13].

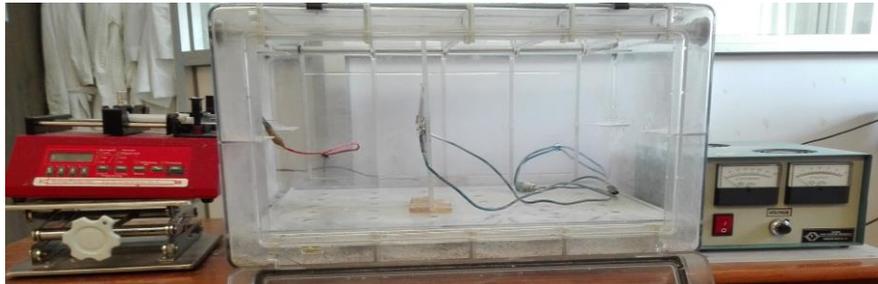


Figura 2. Equipo de electrohilado.

En la Figura 2 se muestra un aparato común de electrohilado, que está compuesto por una fuente de potencial, una jeringa, y colector conductor a tierra (plano y cilíndrico). La solución polimérica se deposita en la jeringa y después se aplica una diferencia de potencial (en kV) entre la aguja de la jeringa (ánodo, +) y el colector (cátodo, -). Bajo las fuerzas de campo eléctrico que se generan, superan la tensión superficial de la solución polimérica que sale de la aguja, la solución se comienza a estirar para formar una estructura cónica denominada cono de Taylor. Cuando sucede se forma un chorro que se elonga continuamente por la repulsión electrostática que forma un hilo largo y delgado hasta que se deposita en el colector. En el transcurso del alargamiento del chorro, se evapora el disolvente, provocando que se formen fibras del polímero solubilizado con diámetros $<1 \mu\text{m}$; formando un andamio fibroso con poros interconectados.

En la Tabla 2 se muestran los parámetros de la solución, del proceso y ambientales con el impacto que tiene sobre la fibra, manipulando estos parámetros se pueden obtener fibras con morfología y diámetros deseados [14] [15]. Se debe utilizar un diseño experimental para optimizar el proceso y encontrar los parámetros cruciales para obtener fibras continuas y homogéneas.

Tabla 2. Parámetros que se pueden modificar para obtener fibras con determinadas características.

Parámetros de la solución	Impacto
Viscosidad	Generación de bulbos bajo, aumento de fibra, desaparición de bulbos.
Concentración	Incremento en el diámetro de la fibra con el incremento de la concentración
Peso molecular del polímero	Reducción del número de bulbos y gotas con el incremento del peso molecular
Conductividad	Decremento del diámetro de la fibra con el incremento en la conductividad de la solución
Tensión superficial	Ninguna consecuencia concluyente con la morfología de la fibra, la alta tensión superficial resulta en la inestabilidad de chorro.
Parámetros del proceso	Impacto
Diferencia de potencial	Decremento en el diámetro de la fibra incrementando el voltaje aplicado
Distancia entre aguja-colector	Generación de bulbos con muy corta o muy larga distancia
Flujo	Decremento en el diámetro de la fibra con decremento en el flujo, generación de bulbos con un flujo rápido
Parámetros ambientales	Impacto
Humedad	Humedad alta resulta en poros circulares sobre las fibras
Temperatura	Incremento en la temperatura resulta en decremento en el diámetro de la fibra

En la Figura 3 se muestra cómo afecta la concentración de la solución polimérica al momento de electrohilar. Por eso es importante un diseño experimental que incluya varias variables para normalizar la técnica.

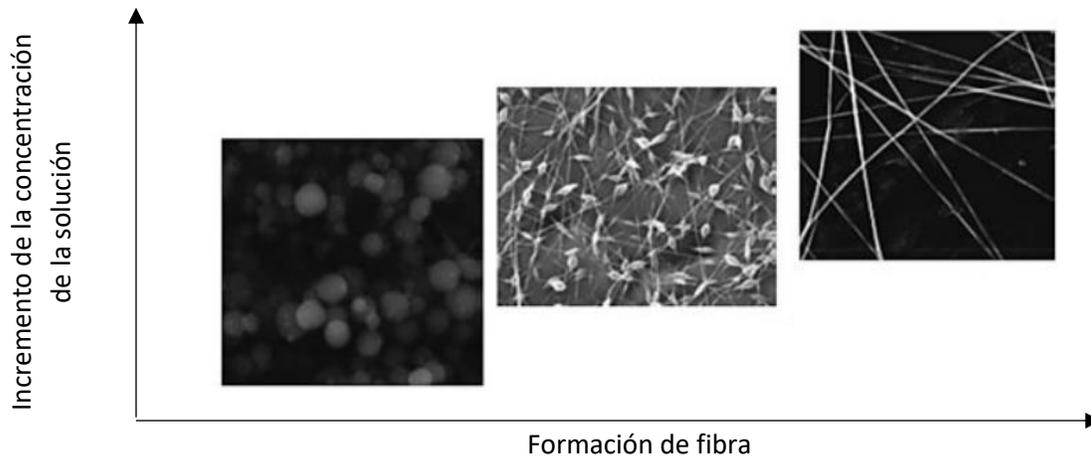


Figura 3. Efecto de la concentración de la solución polimérica comenzando con una baja hasta un alta [16].

2.2.1. Aplicaciones

En la Figura 4 se puede observar el número de artículos sobre la técnica de electrohilado que han sido publicados en revistas científicas, teniendo una tendencia al alza en los últimos años. También se muestra los documentos que han sido publicados este año, siendo el día 18 de agosto del 2017 hecha la consulta de la base de datos de *Scopus*.

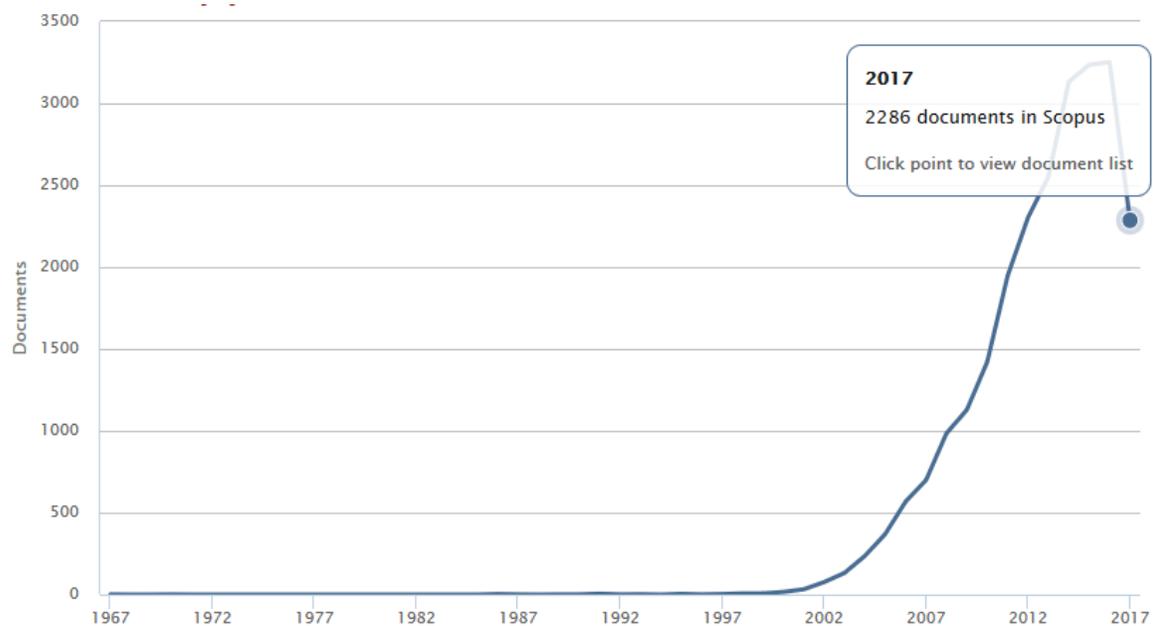


Figura 4. Número de artículos publicados en revistas científicas indexadas en la base de datos de *Scopus*.

Tomando como referencia la base de datos de Scopus, se muestra en la Figura 5, las áreas donde se han estado investigando las fibras obtenidas por la técnica de electrohilado.

Podemos observar que el área de ciencia de materiales predomina en la gráfica porque la mayor parte de investigación de andamios fabricados se limitan a análisis *in-vitro* y morfología [17]. Siendo el día 18 de agosto del 2017 hecha la consulta de la base de datos de Scopus.

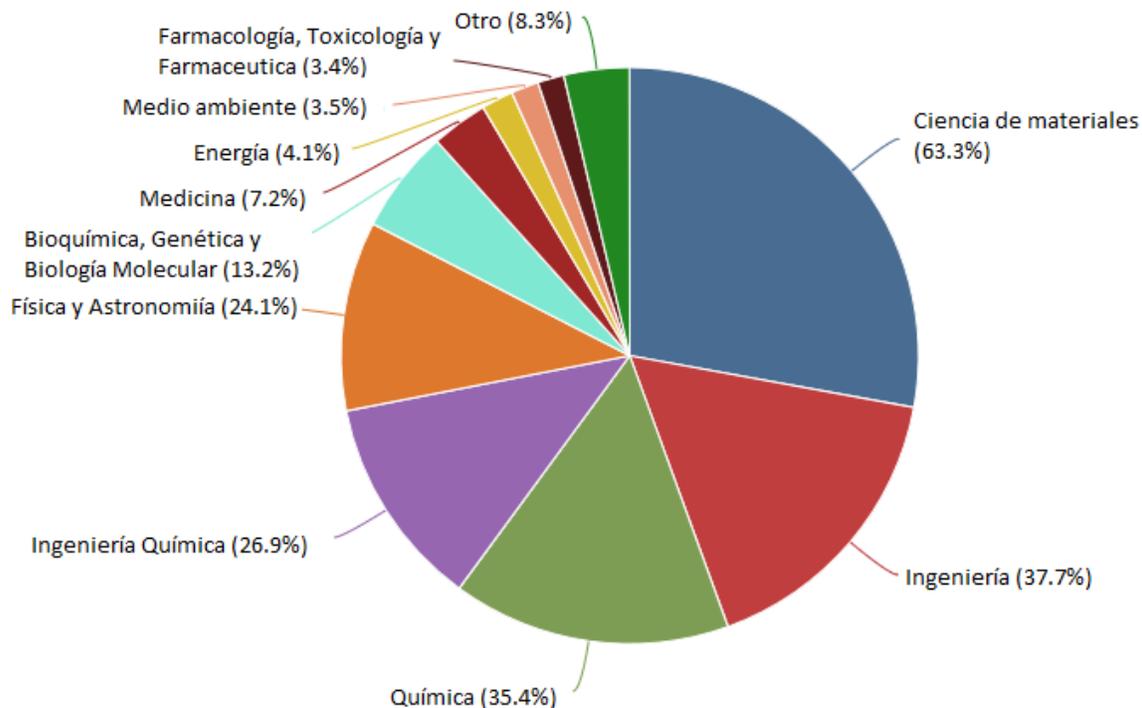


Figura 5. Documentos por área. Palabra clave "electrospinning".

2.3. Biomateriales

La definición de biomaterial que da la Sociedad Europea de Biomateriales "es un material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar, o reemplazar cualquier tejidos, órgano o función del cuerpo". Los biomateriales deben de tener la capacidad de un material para funcionar in situ con una respuesta apropiada y predecible del huésped en una aplicación específica (definición de biocompatibilidad [18]). En la Tabla 3 se muestran los diferentes biopolímeros utilizados en la Ingeniería de Tejidos.

Tabla 3. Polímeros usados en Ingeniería de Tejidos [19].

Polímero	Ventajas	Desventajas	Estructura
Polifosfazenos	Flexibilidad sintética; propiedades mecánicas controlables.	Síntesis compleja.	$\left(\begin{array}{c} R_1 \\ \\ \text{P}=\text{N} \\ \\ R_2 \end{array} \right)_n$

Polianhídridos	Flexibilidad del monómero señalizador; tasas de degradación controlables.	Pesos moleculares bajos; propiedades mecánicas débiles.	$\left(\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{R} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{O} \right)_n$
Poliacetales	Degradación sensible a pH.	Pesos moleculares bajos; síntesis compleja.	$\left(\text{R}_1 - \text{O} - \overset{\text{R}_2}{\underset{\text{R}_3}{\text{C}}} - \text{O} \right)_n$
Poli(orto ésteres)	Tasas de degradación controlables; degradación sensible al pH.	Propiedades mecánicas débiles; síntesis compleja.	$\left(\text{R}_1 - \text{O} - \overset{\text{R}_2}{\underset{\text{O} - \text{R}_3}{\text{C}}} - \text{O} \right)_n$
Polifosfósteres	Compatibilidad de las biomoléculas; productos de degradación altamente biocompatibles.	Síntesis compleja	$\left(\text{R}_1 - \text{O} - \overset{\text{O}}{\underset{\text{R}_2}{\text{P}}} - \text{O} \right)_n$
Policaprolactona	Altamente procesable; Disponible en el mercado.	Degradación limitada.	$\left(\text{O} - \left(\text{CH}_2 \right)_5 - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right)_n$
Poliuretanos	Mecánicamente fuerte.	Degradación limitada; Requiere copolimerización.	$\left(\text{R} - \underset{\text{H}}{\text{N}} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{O} \right)_n$
Polilactida	Altamente procesable; muchos vendedores comerciales disponibles.	Degradación limitada; productos de degradación muy ácidos.	$\left(\text{O} - \overset{\text{H}}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right)_n$
Policarbonatos	Propiedades mecánicas dependientes de la química; erosión superficial.	Degradación limitada; Requiere copolimerización con otros polímeros.	$\left(\text{R} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{O} \right)_n$

Poliamidas	Grupo lateral conjugable; productos de degradación altamente biocompatibles	Degradación muy limitada; toxicidad inducida por carga.	$\left(\text{R}-\underset{\text{H}}{\text{N}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right)_n$
------------	---	---	---

2.3.1. Poli(ε-caprolactona)

La poli(ε-caprolactona) [20] se puede sintetizar por polimerización de apertura de anillo de ε-caprolactona con catalizadores tales como Octoato de Estaño, catalizadores metálicos o por polimerización de 2-metileno-1-3-dioxepano por radicales libres. La PCL es un polímero semi-cristalino hidrofóbico; su cristalinidad puede disminuir con el aumento del peso molecular. Tiene buena solubilidad, punto de fusión entre (59-64) °C y su Tg ronda los -60 °C. El tiempo de degradación completa de la PCL se encuentra entre 3-4 años [21]. La PCL se ha usado en el campo de la medicina como material de sutura (Monacryl®) y anticonceptivos (Carponor®), siendo este un liberador de progestágeno levonorgestrol controlado por hasta 18 meses; el tiempo de degradación de la PCL y su biocompatibilidad han ayudado a que tenga estas aplicaciones. En la Figura 6 se puede observar el proceso que tiene la PCL *in-vivo*; la PCL comienza a hidratarse (0-6 meses), degradándose (6-12 meses), reabsorbiéndose (después de los 12 meses) y metabolizándose (después de los 18 meses). Este estudio lo llevo a cabo Woodward et al. estudiando la degradación *in-vivo* de la PCL en ratas Dawley.

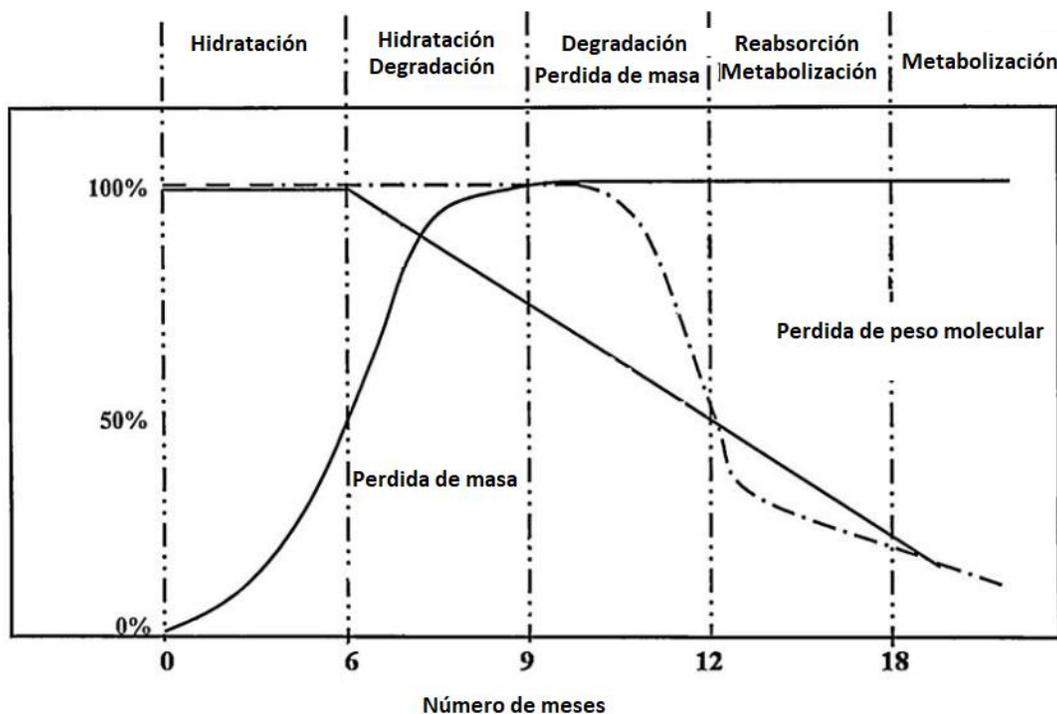


Figura 6. Pérdida de masa y peso molecular del PCL [22].

2.3.2. Funcionalización de poli(ε-caprolactona) usando anhídrido maléico

Un inconveniente de la PCL es su hidrofobicidad, que puede ser desfavorable en las aplicaciones de regeneración de tejidos debido a la mala humectación y la falta de unión celular y la interacción. La funcionalización de la PCL es una opción para bajar la hidrofobicidad de la PCL. El anhídrido maléico que tiene dos grupos carboxilos en su estructura es un buen candidato para funcionalizarlo en la PCL [23]. El anhídrido maléico al injertarlo en la PCL se vuelve anhídrido succínico por la pérdida del doble enlace, en la Figura 7 se observa la diferencia entre ambos compuestos. El anhídrido succínico por medio de sus grupos carboxilos pueden reaccionar con grupos reactivos, por ejemplo, proteínas [24], para mejorar sus propiedades.



Anhídrido maléico

Anhídrido succínico

Figura 7. Estructura del anhídrido maléico y anhídrido succínico.

2.4. La piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo, con el 16% del peso corporal completo de un individuo [25]. La piel funge como una barrera que se compone de tres capas estructurales: la epidermis, la dermis, la hipodermis, cada una con composición y funciones distintas. En la Figura 8 se muestra la estructura de la piel.

La epidermis es una barrera y protege de la radiación UV. La capa más externa de la piel que se puede ver. Se compone principalmente de células muertas (queratinocitos) que están firmemente pegadas entre sí. Se renueva constantemente: se hacen nuevas células en las capas inferiores de la epidermis. Estos se mueven a la superficie dentro de cuatro semanas, donde se endurecen y se desprenden. Esta renovación constante sirve para reemplazar las células que se pierden y caen al suelo cuando se frota la piel. Dependiendo de donde está en el cuerpo, la epidermis varía en grosor. Por ejemplo, es sólo 0,3 milímetros de grosor en los codos y la parte posterior de las rodillas, y hasta 4 milímetros de espesor en otras partes de su cuerpo, como la planta de los pies y las palmas de las manos. La epidermis también contiene otros tipos de células con funciones especiales:

- Los melanocitos producen y almacenan un pigmento negro llamado melanina. Producen más melanina cuando su piel se expone a la luz solar, por lo que se vuelve más oscuro. La melanina nos protege de los dañinos rayos UV del sol.
- Los linfocitos y las células de Langerhans juegan un papel importante en la lucha contra los gérmenes. Ellos "atrapan" los gérmenes y los llevan al ganglio linfático más cercano.

- Las células de Merkel son células nerviosas especiales en la piel que le permiten detectar la presión.

Dermis es un sistema integrado con fibroblastos, macrófagos, mastocitos, redes vasculares, linfáticas, fibras de colágeno resistentes y elásticas y nerviosas. En algunos lugares, la dermis se hincha en el tejido conectivo que rodea nuestros músculos y huesos y los conecta con la piel. La dermis contiene una red de fibras nerviosas y vasos sanguíneos muy pequeños llamados capilares. Los nutrientes y el oxígeno en la sangre pasan de los capilares a las células. La otra función principal de los capilares es ayudar a su cuerpo a enfriarse si se pone demasiado caliente. La dermis es también la capa de la piel que contiene las células más sensoriales (sensación) y las glándulas sudoríparas.

Hipodermis da el soporte mecánico y fisiológico. Se compone principalmente de grasa y tejido conectivo. Entre los pliegues de la dermis e hipodermis, hay minúsculas cavidades. Estas cavidades están llenas de tejido que almacenan grasa y agua. La grasa actúa como un amortiguador, protegiendo los huesos y las articulaciones de golpes o daños. Sirve de aislamiento también. Muchas hormonas se producen en las células de grasa de la hipodermis. Un ejemplo es la vitamina D, que es una vitamina esencial y se hace cuando la piel está expuesta a la luz solar.

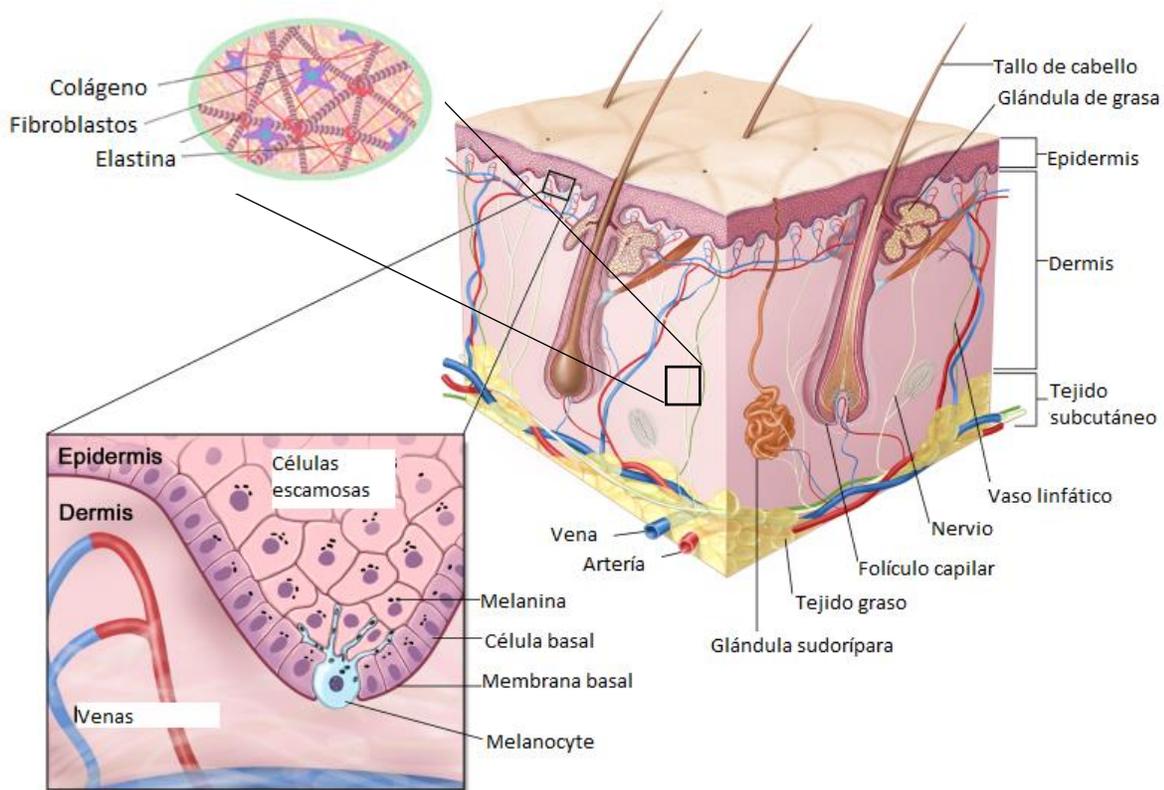


Figura 8. Estructura de la piel [26].

2.4.1. Colágeno Tipo I Hidrolizado

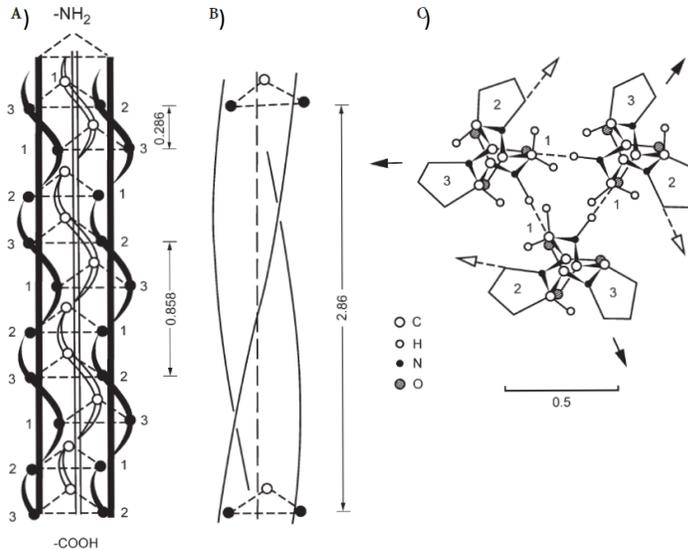


Figura 9. Modelo de triple hélice de colágeno [27].

El colágeno, un componente principal de la matriz extracelular (ECM), imparte integridad estructural y resistencia a la tracción a los tejidos. La alteración del tejido después de la lesión requiere colágeno para la reparación y restauración de la estructura y la función. El colágeno se ha utilizado en una variedad de aplicaciones de ingeniería de tejidos debido a su predominio en la ECM, no inmunogenicidad y los métodos disponibles de

aislamiento de una variedad de fuentes. Las fibras de colágeno también poseen algunas

propiedades estructurales únicas que son importantes para la ingeniería de tejidos: transmiten fuerzas, disipan energía,

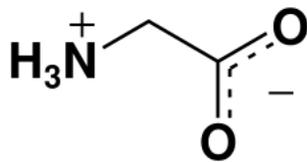


Figura 11. Estructura Glicina

previenen fallas mecánicas prematuras y proporcionan señales biológicas a las células adyacentes que regulan las respuestas funcionales [28].

Además, es reabsorbible, teniendo alta afinidad de agua.

Existen diferentes tipos de

colágeno humano, teniendo 27 tipos. Están subdivididas en diferentes clases: Colágeno fibrilar (tipo I, II, II, V, XI, XXIV y XXVII), Colágeno de membrana basal (tipo IV), Colágeno asociado a fibrillas con hélices triples interrumpida (FACIT, tipo IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX y XXI), Colágeno de cadena corta (tipo VII y X), Colágeno de fibrila de anclaje (tipo VII), Multiplexinas (tipo VII), Colágeno tipo VI.

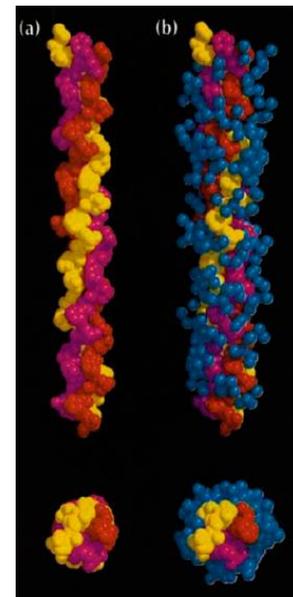


Figura 10. Colágeno tipo I sin hidrolizar (a) e hidrolizado (b) [27].

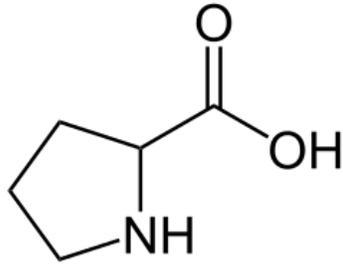


Figura 12. Estructura Prolina.

El colágeno tiene una estructura tridimensional básica de triple hélice. La formación de la triple hélice es una secuencia repetitiva de -Gly-Xaa-Yaa- (Figura 13). Una importante característica estructural y funcional del colágeno es la orientación de las cadenas laterales X y Y que salen de la hélice y están libres para tener interacción de unión. En la Figura 9 muestra la estructura para $(\text{Gly-Pro-Pro})_n$, donde el número 1 se encuentra la Glicina (Figura 11), en 2 y 3 Prolina (Figura 12). En A) y B) se muestra la estructura que tiene el colágeno con una hélice triple

superenrollada. C) se muestra en dirección al eje de la hélice. La glicina (30 % de los aminoácidos presentes en la triple hélice) y la (hidroxi-)prolina (22 % de los aminoácidos presentes en la triple hélice). El hecho de que casi cada tercera posición esté ocupada por glicina (el aminoácido más pequeño, que contiene un átomo de hidrógeno en la posición de la cadena lateral) posibilita que las cadenas formen vueltas cerradas de la cadena α en la triple hélice [29].

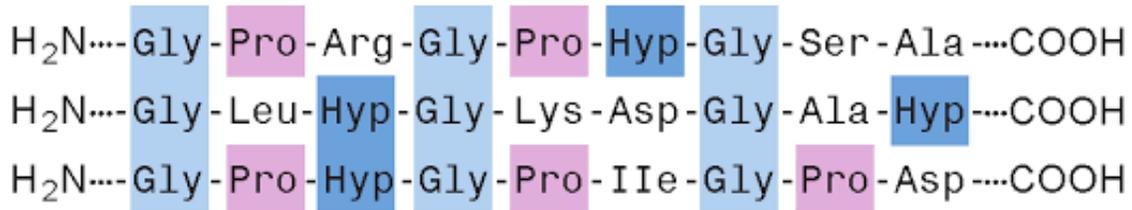


Figura 13. Secuencia Gly-Xaa-Yaa. Se repite cientos de veces en las tres cadenas α del colágeno. Gly es Glicina y generalmente, Xaa es prolina (Pro) y Yaa hidroxiprolina (Hyp); la hidroxiprolina se origina a partir de una modificación de prolina [29].

Las tres cadenas están conectadas por enlaces hidrógeno entre la cadena principal de NH^{+2} de la glicina y la columna vertebral C-O de la prolina en la posición Y (líneas discontinuas) Las flechas indican las direcciones en las que otras cadenas laterales de prolina emergen de la hélice. Las distancias se indican en nm.

La única diferencia entre Colágeno tipo I y colágeno tipo I hidrolizado son los $(\text{OH})^{-1}$ que existe en la triple hélice. La extracción y purificación de colágeno tipo I es complicada y tiene un costo elevado, el colágeno tipo I hidrolizado no lo es. En la Figura 10 se muestra la diferencia entre colágeno tipo I y colágeno tipo I hidrolizado, a) es una vista de la triple hélice desnuda; Las tres cadenas peptídicas se muestran en diferentes colores, b) Incorporación de moléculas de $(\text{OH})^{-1}$ unidas por el hidrogeno a grupos carbonilos, hidroxilo e incluso a la amida en los extremos de la hélice.

2.5. Liberación controlada de fármacos

La liberación controlada de fármacos consiste en sistemas de administración de fármacos para la administración dirigida y/o la liberación controlada de fármacos. Controlan la velocidad de liberación y algunos sistemas también pueden liberar el fármaco en una ubicación determinada [30].

La liberación de fármacos a través de fibras es viable por la alta área superficial que tienen los andamios hechos de fibras, controlando la velocidad de liberación por el tamaño y morfología de la fibra. El fármaco se encuentra disperso en la fibra. Los andamios con el fármaco se pueden aplicar en heridas sobre la piel, ayudar a la cicatrización y dar una acción terapéutica.

Los andamios fibrilares fabricados por la técnica de electrohilado han sido hechos para un suministro sostenido y terapéutico a tejidos específicos. Además, el tipo de polímero, la morfología de las fibras, el uso de partículas adicionales que encapsulan el fármaco permite adaptar el perfil de liberación. Varios estudios han demostrado la eficacia en el suministro de fármacos, recuperando la homeóstasis, teniendo crecimiento y remodelación de tejidos. Se ha investigado la piel para la administración de diversos fármacos potenciales debido a varias ventajas de la vía tópica y transdérmica sobre las formas de dosificación convencionales [31]. Al aplicar el fármaco en donde se necesita se aprovecha la ventana terapéutica del fármaco. Con la administración transdérmica de fármacos podemos hacer que la liberación de fármaco sea controlada, dosificando durante periodos que diseñemos. En la Figura 14 se puede observar el tipo de fibra fabricada por la técnica de electrohilado (a), la distribución del fármaco en la fibra (b) y el tiempo de liberación de cada tipo de fibra (c).

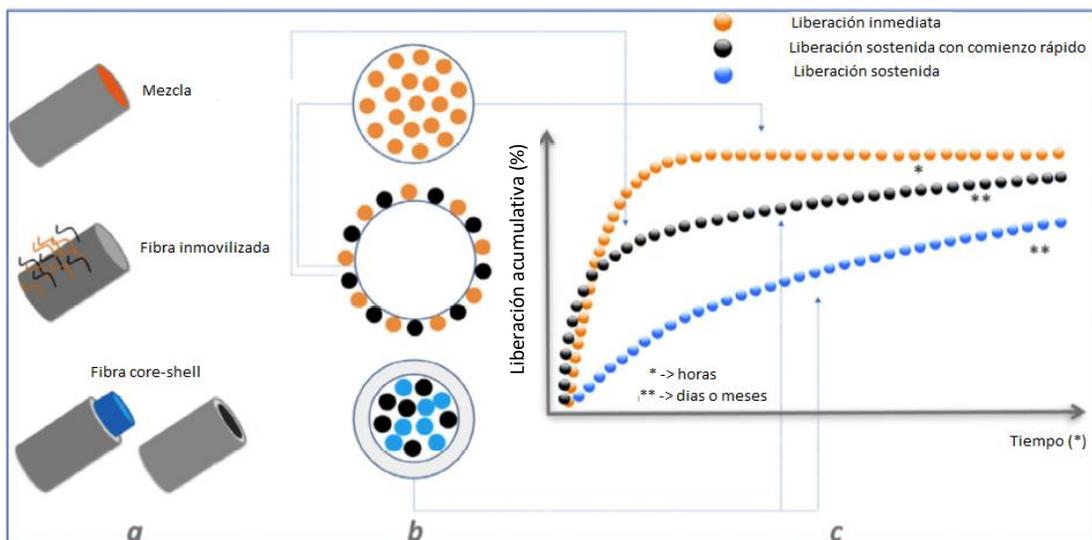


Figura 14. Relación entre los diferentes tipos de fibras que podemos obtener por electrohilado para controlar la liberación de fármaco [32].

2.5.1. Diclofenaco sódico

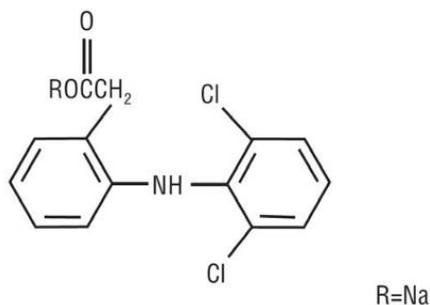


Figura 15. Estructura del Diclofenaco Sódico.

Es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que reduce la inflamación y dolor leves a moderados. Se usa para el dolor dental, migraña molestias menstruales e, incluso, dolor postoperatorio. Se designa químicamente como la sal de 2 - [(2,6-diclorofenil) amino] monosódico del ácido bencenoacético, con una fórmula molecular de $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$. El peso molecular es 318,13. En la Figura 15 se muestra la estructura del diclofenaco sódico. Las propiedades fisicoquímicas de este

compuesto se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del diclofenaco sódico

Número de registro CAS	15307-79-6
Formula	$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$
Peso molecular (g/mol)	318,13
Punto de fusión	284.3 °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 mmHg a 25 C
Absorción UV	Metanol 283 nm $\epsilon=1.01 \times 10^5$ mol/L Buffer de fosfatos pH=7.2 276 nm $\epsilon=1.02 \times 10^5$ mol/L

3. Justificación

La Ingeniería de Tejidos busca desarrollar andamios capaces de reparar o reemplazar la función de tejidos u órganos dañados. Las lesiones en piel pueden ser tratadas con andamios que permitan que las células sean viables, proliferen y sean funcionales. Un andamio es aquel que funge como matriz extracelular para la proliferación de las células. De igual manera se busca que sea biocompatible, se degrade paulatinamente para no tener que hacer una segunda cirugía para retirarlo. La poli(ϵ -caprolactona) (PCL) es un polímero semi-cristalino hidrofóbico que es biocompatible y con múltiples aplicaciones biomédicas; se ha usado como material de sutura y como anticonceptivo. El anhídrido maleico al contar con grupos carbonilos confiere hidrofiliidad promoviendo la adhesión celular al andamio. La matriz extracelular contiene colágeno y elastina. La fabricación de andamios que contienen colágeno mimetiza aún más la matriz extracelular. La utilización de colágeno Tipo I Hidrolizado ayuda a tener este propósito, siendo un producto con un costo bajo a comparación del Colágeno Tipo I extraído de diferentes animales; llegando a costar \$ 14 000 por 100 mg. El Diclofenaco Sódico es un fármaco altamente utilizado porque reduce la inflamación y dolor leves a moderados. Al tener un andamio con Diclofenaco Sódico, se puede proponer para ensayos *in vivo* para el estudio de lesiones en piel y poder tener andamios que regeneren el tejido, reduzcan la inflamación y el dolor, liberando continuamente el fármaco en la lesión.

4. Objetivo General

Fabricar un andamio electrohilado con PCL funcionalizada con AM. Útil en la regeneración de lesiones en la piel y como un sistema de liberación controlada de Diclofenaco Sódico.

5. Objetivos Particulares

- Funcionalizar la PCL con AM (PCLAM).
- Electro hilar PCLAM mediante un diseño experimental Taguchi, encontrando las condiciones para obtener fibras continuas y diámetro de fibra a escala nanométrica.
- Comprobar la viabilidad celular de los andamios electrohilados.
- Fabricar un andamio compuesto de PCLAM, Colágeno Tipo 1 Hidrolizado y Diclofenaco Sódico.
- Observar las diferencias respecto a la viabilidad celular de fibroblastos humanos en los andamios con y sin Colágeno Tipo 1 Hidrolizado.
- Realizar la liberación controlada de fármaco de los andamios fabricados con Diclofenaco Sódico.

6. Hipótesis

1. Obteniendo la funcionalización de la PCL con AM (PCLAM), disminuye su hidrofobicidad del PCL.
2. Al obtener andamios de PCLAM por la técnica de electrohilado, se logrará aumentar la viabilidad celular sobre el andamio.
3. Andamios que contiene material que mimetiza a la matriz extracelular, por ejemplo, el Colágeno, pueden aumentan la viabilidad celular sobre el andamio.
4. Se puede controlar la liberación del Diclofenaco Sódico por medio del diámetro de fibra del andamio.

7. Materiales y métodos

Poli(ϵ -caprolactona) Mn 70000-80000 (PCL), Peróxido de Benzoilo (BPO), Anhídrido Maleico (AM), Tolueno, Tetrahidrofurano (THF), Metanol, Diclofenaco Sodico, 2,2,2-Trifluoroetanol (TFE), de Sigma Aldrich Co., Colágeno tipo I Hidrolizado de Russelott®, fosfato de sodio monobásico, fosfato de ácido de sodio, hidróxido de potasio (KOH) de JT Baker S.A de C.V, agua destilada a partir de un equipo Nanopure Diamond® y Nitrógeno ultra alta pureza de INFRA®.

7.1. Funcionalización de poli(ϵ -caprolactona)

Se funcionalizó la PCL injertando anhídrido maléico por medio de una reacción de radicales libres; como proveedor de radicales se usó el peróxido de benzoilo (BPO). La reacción se llevó en un matraz de dos bocas con un flujo continuo de Nitrógeno. La funcionalización se realizó por dos métodos, en solución [33] y masa [34]. En la Tabla 5 se muestran las condiciones de funcionalización utilizadas.

La funcionalización en solución se llevó a cabo en un matraz de dos bocas con 5 g de PCL, 0.5 g AM y 0.025 g BPO mezclados en 20 mL de Tolueno. El oxígeno del matraz se elimina usando un flujo continuo de Nitrógeno. El Nitrógeno también ayuda a eliminar los reactivos que no reaccionen [34]. Las temperaturas de funcionalización son 70 °C y 110 °C por 15 horas con agitación vigorizante. Después de la reacción de funcionalización, el producto fue disuelto en Tolueno. La solución se decanta en un exceso de Metanol frio y el precipitado color violeta (PCLAM1) y crema (PCLAM2), fueron obtenidos y secados a vacío. Todo el AM que no reacciona y trazas de iniciador que pudiera tener el producto, se removió por medio de lavados con metanol [35].

El segundo método realizado fue una reacción en masa. En un matraz de dos bocas con 5 g de PCL, 0.5 g AM y 0.1 g BPO en 20 mL THF con agitación vigorizante; se mezclan hasta que se disuelvan todos los reactivos. Después se hace vacío al matraz por cuatro horas para retirar el solvente de la reacción. Se hace una atmosfera inerte con un flujo continuo de Nitrógeno. La temperatura de funcionalización es 110 °C por 18 horas. Después de la reacción de funcionalización, el producto fue disuelto en 20 mL de THF. La solución se decanta en un exceso de Metanol frio y el precipitado color crema, PCLAM-110-18 (PCLAM3), fue obtenido y secado a vacío. Todo el AM que no reacciona y trazas de iniciador que pudiera tener el producto, se removió por medio de lavados con metanol [35].

Los polímeros obtenidos se almacenan en un desecador con vacío.

Tabla 5. Condiciones de funcionalización.

Muestra	Temperatura de funcionalización (°C)	Tiempo de reacción (h)	Cantidad de reactivo usada (g)			Tipo de reacción
			PCL	AM	BPO	
PCLAM-1	70	15	5	0.5	0.025	Solución
PCLAM-2	110	15	5	0.5	0.025	Solución
PCLAM-3	110	18	5	0.5	0.1	Masa

7.2. Fabricación de andamios

El diseño experimental tiene sus orígenes en los trabajos de Ronald Fisher (1890-1962), desarrollados en la Estación Agrícola Experimental de Rotaste [36], en el Reino Unido, donde introdujo el concepto de aleatorización y el análisis de varianza. Un arreglo ortogonal busca encontrar las variables claves y sus combinaciones para una aplicación definida. El arreglo ortogonal es una herramienta ingenieril que simplifica y en algunos casos elimina gran parte de los esfuerzos de diseño estadístico. Es una forma de examinar simultáneamente muchos factores en poco tiempo y a un costo menor.

Los diseños experimentales de Taguchi, están basados en arreglos ortogonales y su metodología consiste en:

- Enfatiza en la calidad durante la etapa del diseño del proceso
- Reconoce la importancia relativa de los factores que influyen en el desempeño de los productos o procesos.
- Enfatiza en la reducción de la variabilidad, por medio del uso de la función de pérdida y de la razón señal-ruido (existiendo una para cada objetivo que se quiera lograr con el experimento).
- Se concentra en el concepto de diseño de parámetros que sirvan para disminuir la variabilidad en el desempeño de los productos
- También puede ser utilizada para el mejoramiento de procesos y productos ya existentes.

Un arreglo L8 de Taguchi (el número ocho nos indica ocho corridas), para investigar el efecto de 7 factores en 8 corridas (Tabla 6).

Tabla 6. Arreglo Taguchi L8

corrida	Numero de columnas						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2	2
4	1	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	1	2	1	2
6	2	1	2	2	1	2	1
7	2	2	1	1	2	2	1
8	2	2	1	2	1	1	2

Para cada diseño, cada fila representa una corrida en el experimento. En el diseño de Taguchi los niveles 1,2 significan bajo, alto para cada factor.

Los andamios fueron fabricados en un equipo de electrohilado Figura 2. La solución homogénea fue depositada en una jeringa de 5 mL una jeringa de 34G 1"x1/2". Tres factores fueron seleccionados en este experimento (Tabla 7), dejando la concentración al 13% constante. El diseño Taguchi obtenido se muestra en la Tabla 8.

Tabla 7. Factores y niveles en el diseño de experimento Taguchi

	Factores	Niveles			
		1	2	3	4
A	Distancia (cm)	8	10	15	20
B	Flujo de inyección (ml/hr)	0.3	0.5	0.7	1
C	Diferencia de potencial (kV)	10	12	15	17

Tabla 8. Diseño de experimentos Taguchi L16

Parámetros		
Distancia (cm)	Flujo (ml/hr)	Diferencia de potencial (kV)
8	0.3	10
8	0.5	12
8	0.7	15
8	1	17
10	0.3	12
10	0.5	10
10	0.7	17
10	1	15
15	0.3	15
15	0.5	17
15	0.7	10
15	1	12
20	0.3	17
20	0.5	15
20	0.7	12
20	1	10

7.3. Fabricación de andamios electrohilados de PCLAM/Colágeno Tipo 1

Hidrolizado/Diclofenaco sódico (PCLAM/Col/DS)

Los andamios fueron fabricados en un equipo de electrohilado Figura 2. La solución homogénea fue depositada en una jeringa de 5ml una jeringa de 34G 1"x1/2". Cuatro factores fueron seleccionados en este experimento, dejando la concentración al 13 % de todas las soluciones Tabla 9. El diseño Taguchi obtenido se muestra en la Tabla 10.

Tabla 9. Factores y niveles en el diseño de experimento Taguchi

	Factores	Niveles		
		1	2	3
A	PCL:Col	80:20	50:50	20:80
B	DS	33%	15%	10%
C	Diferencia de potencial (kV)	8	12	15
D	Flujo de inyección (mL/h)	0.3	0.5	1

Tabla 10. Diseño de experimentos Taguchi L6

Parámetros			
PCL:Col	DS	Diferencia de potencial	Flujo
80:20	33	8	0.3
80:20	15	12	0.5
80:20	10	15	1
50:50	33	12	1
50:50	15	15	0.3
50:50	10	8	0.5

7.4. Caracterización de polímeros PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3

Para determinar el porcentaje de funcionalización en los diferentes productos obtenidos (PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3) se caracterizaron por espectrofotometría, Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier de Reflexión Total Atenuada (ATR-FTIR), Cromatografía de Premiación en Gel (GPC), Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

7.4.1. Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier de Reflexión Total Atenuada (ATR-FTIR)

El ATR-FTIR utiliza una fuente de luz infrarroja que atraviesa la muestra y llega a un detector, el cual mide con precisión la cantidad de luz absorbida por la muestra, en una longitud de

onda de (4000-500) cm^{-1} . Esta absorción crea una huella espectral única que se utiliza para identificar la estructura molecular de la muestra y muestra bandas características de los grupos funcionales que tiene la misma.

Las muestras fueron secadas en un desecador con una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo RZ 2.5. Fueron corridas en un equipo Thermo Scientific, Nicolet 6700. Se hizo una corrida del ambiente, se colocó la muestra (alrededor de 20 mg), se sujetó por medio de un tornillo y el rango de medición fue de (4000-500) cm^{-1} . Se trataron los datos con el programa OriginPro 9.0®.

7.4.2. Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H -NMR)

La Resonancia Magnética Nuclear (en inglés, NMR) es una técnica espectrométrica para determinar las estructuras químicas. Cuando un núcleo atómico con un momento magnético se coloca en un campo magnético, tiende a alinearse con el campo aplicado. La energía requerida para invertir esta alineación depende de la fuerza del campo magnético y en menor medida, del entorno del núcleo, es decir, de la naturaleza de los enlaces químicos entre el átomo de interés y su vecindad inmediata en la molécula. Esta inversión es un proceso resonante y sólo se produce en condiciones seleccionadas. Mediante la determinación de los niveles de energía de transición para todos los átomos en una molécula, es posible determinar muchas características importantes de su estructura. Los niveles de energía se pueden expresar en términos de frecuencia de radiación electromagnética y típicamente caen en el rango de (5-600) MHz para campos magnéticos altos. Los cambios espectrales menores debidos al entorno químico son las características esenciales para interpretar la estructura y se expresan normalmente en términos de desplazamientos de una parte por millón (ppm) de la frecuencia, como referencia se toma el Tetrametilsilano.

Las resonancias ^1H son bastante específicas para los tipos de carbono a los que están unidos, y en menor grado a los carbonos adyacentes. Estas resonancias pueden dividirse en múltiples, ya que los núcleos de hidrógeno pueden acoplarse a otros núcleos de hidrógeno cercanos. La magnitud de las divisiones y la multiplicidad pueden utilizarse para determinar mejor la estructura química en la vecindad de un hidrógeno dado. Cuando todas las resonancias observadas se analizan de forma similar, es posible determinar la estructura de la molécula. Sin embargo, como sólo se observa hidrógeno, sólo se puede deducir cualquier rasgo esquelético sin un hidrógeno unido. Pueden surgir complicaciones si la molécula es muy compleja, porque entonces las resonancias pueden superponerse severamente y resultar difíciles o imposibles de resolver.

Las muestras fueron secadas en un desecador con una bomba de vacío marca vacuubrand modelo RZ 2.5. Fueron corridas en un equipo Bruker Avance III a 400 MHz y se empleó Tetrametilsilano (TMS) como referencia. Se colocó la muestra (alrededor de 15 mg) en un

tubo de resonancia con 1 mL de cloroformo deuterado (CDCl₃). Se trataron los datos con el programa MestReNova®.

7.4.3. Espectrometría UV-VIS

La espectroscopia UV-Vis se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética (380nm-780) nm que puede absorber o transmitir una muestra en función de la cantidad de sustancia presente. Cuando la radiación incide sobre la muestra se produce una absorción parcial de esta radiación, lo que hace que se produzca una transición entre los niveles energéticos de la sustancia, el resto es transmitido.

Alrededor de 20 mg de muestra se sumergen en 1 mL de agua desionizada durante 1 h, se secan y se agregan 2 mL de Tolueno. Se disuelven 10 mg de Rodamina 6G en 10 mL de buffer de fosfatos a pH=12. Se hace una separación con Tolueno. Después de la separación se toman 30 µL y se agregan a cada muestra ya disuelta en Tolueno. Después de agregarle la Rodamina 6G a las muestras se dejan reposar 30 min en oscuridad. El porcentaje de funcionalización se midió en un espectrofotómetro UV Ocean Optics, Inc. SAD500 a 535 nm [37]. Se trataron los datos con el programa OriginPro 9.0®.

7.4.4. Cromatografía de Permeación en Gel (GPC)

La Cromatografía de Permeación en Gel (GPC), también conocida como Cromatografía de Exclusión de Tamaño (SEC), es una técnica usada para determinar la distribución de peso molecular promedio de una muestra polimérica. Como su nombre indica, GPC o SEC separa el polímero de acuerdo al tamaño o radio hidrodinámico. Esto se logra inyectando una pequeña cantidad de (100-400) µL de solución de polímero (0,01-0,6) % en un conjunto de columnas que están empaquetadas y que son porosas. Moléculas más pequeñas pueden penetrar en los poros y, por lo tanto, se mantienen en mayor medida que las moléculas más grandes que continúan por las columnas y eluyen más rápido.

El peso molecular promedio en número es el peso molecular promedio estadístico de todas las cadenas de polímero en la muestra y se obtiene por medio de la ecuación 1:

$$Mn = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

Ecuación 1. Peso molecular Mn.

donde M_i es el peso molecular de la cadena y N_i es el número de cadenas con ese peso molecular. M_n puede predecirse por los mecanismos de polimerización y se mide mediante métodos que determinan el número de moléculas en una muestra de un mismo peso.

M_w es el peso molecular promedio en peso. M_w tiene en cuenta el peso molecular de una cadena para determinar las contribuciones al promedio del peso molecular. Mientras más masiva es la cadena, más contribuye a M_w . Está determinado por métodos que son

sensibles al tamaño molecular más que a su número, como las técnicas de dispersión de la luz.

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

Ecuación 2. Peso molecular promedio M_w .

El índice de polidispersidad (PDI) se usa como una medida de la amplitud de una distribución del peso molecular de un polímero. Con una $PDI > 1$ el peso molecular es más amplio. Un polímero monodisperso donde todas las longitudes de cadena son iguales, tiene un $PDI = 1$. Los polímeros sintéticos mejor controlados, tienen un PDI de 1.02 a 1.10. Las reacciones de polimerización por etapas típicamente producen valores de $PDI = 2$, mientras las reacciones en cadena producen valores de PDI de 1.5 y 20. El PDI se define:

$$PDI = \frac{M_w}{M_n}$$

Ecuación 3. Índice de polidispersidad (PDI).

Se utilizó un cromatógrafo HPLC Elmer series 200, con una curva de calibración de poliestireno y como fase móvil THF. Alrededor de 20 mg de muestra se colocó en un vial con 1 mL de THF grado HPLC. Se filtró en un filtro de teflón y se corrieron las muestras para saber el peso molecular de cada una de ellas.

7.4.5. Análisis térmico

7.4.5.1. TGA

El análisis termogravimétrico (en inglés, TGA) mide el grado (rapidez) de cambio en la masa de la muestra como una función de temperatura o tiempo en una atmosfera controlada. La técnica puede analizar materiales que exhiben pérdida o ganancia de masa por descomposición, oxidación o pérdida de volátiles (como la humedad de la muestra).

Las muestras fueron secadas en un desecador con una bomba de vacío marca vacuubrand modelo RZ 2.5. En un equipo TA Instruments SDT Q600 Module DSC-TGA Standard, se colocaron alrededor de 10 mg de muestra en una charola para TGA, se tuvo una rampa de calentamiento de 25 °C a 60 °C con una rapidez de calentamiento de 10 °C/min bajo una atmosfera de N_2 . Se trataron los datos con el programa TA Universal Analysis®.

7.4.5.2. DSC

La calorimetría diferencial de barrido (en inglés, DSC), es una técnica de análisis térmico mediante el cual se obtienen gráficas de capacidad calorífica de los materiales en función de la temperatura. Una muestra con masa conocida es calentada o enfriada y los cambios en su capacidad calórica son detectados como cambios en el flujo de calor. Esto permite la

detección de transiciones como la fusión, transición vítrea, temperatura de cristalización de la muestra.

Las muestras fueron secadas en un desecador con una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo RZ 2.5. En un equipo TA Instruments DSC Q100, se colocaron alrededor de 10 mg de muestra en una charola para DSC, se hizo un ciclo de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ regresando a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una velocidad de calentamiento de $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bajo una atmosfera de N_2 . Se trataron los datos con el programa TA Universal Analysis®.

7.5. Caracterización de andamios electrohilados de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3

Los andamios fabricados por la técnica de electrohilado se caracterizaron por medio de microscopia electrónica de barrido (SEM), ángulo de contacto, pruebas mecánicas, ensayo de degradación y viabilidad celular *in-vitro*. Se trataron los datos con el programa ImageJ®.

7.5.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Cuando el tamaño de la muestra (fibras fabricadas) está en el rango de $<1\text{ }\mu\text{m}$ a 10 nm , es necesario Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Con el SEM se logra ver la morfología y/o hacer análisis de rayos X (composición elemental) de la muestra. Esta técnica es cualitativa.

Las muestras fueron secadas en un desecador con una bomba de vacío marca vacuubrand modelo RZ 2.5. Del colector de aluminio donde se depositaron las fibras, se corta un cuadro de 9 mm^2 . En un portamuestra de SEM, se coloca cinta de carbono de doble vista sobre el portamuestra y se coloca el cuadro previamente cortado sobre la cinta de carbono. Las muestras no son conductoras, se hicieron conductoras con un recubrimiento de oro sobre la muestra por medio de un FINE COAT ION SPUTTER JFC-1100. Se utilizó un equipo JOEL Field Emission JSM-7600F. Se trataron los datos con el programa ImageJ®.

7.5.2. Ángulo de contacto

La comprensión y caracterización del mojado en andamios, está relacionado con muchas aplicaciones como la adhesión celular y la permeabilidad. El mojado se caracteriza por medio de la medición del ángulo de contacto formado entre una gota de líquido y una superficie sólida. Esta medida es una herramienta relativamente simple, útil y sensible para evaluar la energía de superficie de los andamios.

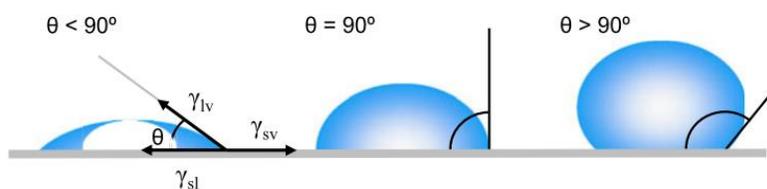


Figura 16. Los ángulos de contacto $\theta < 90^\circ$ son hidrofílicos, mientras que ángulos de contacto $\theta > 90^\circ$ son hidrofóbicos [38].

Si la superficie del andamio es ideal (es decir, rígida, plana, lisa, químicamente homogénea, insoluble y no reactiva), la medición del ángulo de contacto y su interpretación es directa y se puede relacionar con la ecuación de Young. A partir del ángulo de contacto ideal y de la ecuación de Young, la energía superficial se puede calcular utilizando correlaciones apropiadas para las tensiones interfaciales. La ecuación de Young describe el ángulo de contacto de una gota de líquido sobre una superficie ideal que es definida por el equilibrio mecánico de la gota bajo la acción de tres tensiones interfaciales, donde γ_{lv} , γ_{sv} y γ_{sl} representa la tensión líquido-vapor, sólido-vapor y sólido-líquido, respectivamente y θ_Y es el ángulo de contacto.

$$\gamma_{lv} \cos \theta_Y = \gamma_{sv} - \gamma_{sl}$$

Ecuación 4. Ecuación de Young

Las muestras (n=3) fueron secadas en un desecador con una bomba de vacío marca vacuubrand modelo RZ 2.5. Los andamios se retiraron del colector de aluminio para que el aluminio no interfiriera con la medición. La interacción entre la gota y el andamio se capturo por medio del software pinnacle Studio® en un goniómetro Ramehart, inc. Modelo 100-07-00, con una cámara de video de 1080 p. Se utilizó una gota de agua desionizada de 2 μ L a través de un dispensador digital previamente calibrado. Se trataron los datos con el programa ImageJ®.

7.5.3. Pruebas mecánicas

La tensión uniaxial, determina la fuerza y la deformación por medio del estiramiento de una probeta estandarizada. La tensión uniaxial, se define una fuerza (F) que se aplica sobre una probeta con un área (A).

$$\sigma = \frac{F}{A_0}$$

Ecuación 5. Ecuación de esfuerzo

Se siguió la norma ASTM D1708-96 con un numero de probetas n=5 con un espesor en promedio de 0.2 mm. De los andamios fabricados de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3, se cortaron de la placa las probetas por medio de un suaje con una prensa hidráulica. La probeta se desprende de la placa de aluminio. Se analizaron en un equipo CT3 Texture Analyzer, Brookfield con una carga inicial de 0.07 N y una rapidez de 10 mm/min a temperatura ambiente y con las probetas en seco. Se trataron los datos con el programa OriginPro 9.0.

7.5.4. Degradación

La rapidez y el mecanismo de degradación (erosión superficial o masa) afectarán las propiedades mecánicas del andamio: los polímeros donde se erosiona la superficie mantienen su estructura física hasta que la masa molar del polímero es suficientemente

baja para la disolución del polímero en el medio acuoso; van perdiendo propiedades mecánicas lentamente con el tiempo. El proceso regenerativo de los tejidos se verá comprometido por los productos de la degradación si son tóxicos [39]. La degradación es a través de una hidrólisis de la cadena, con productos ácidos, lo que provoca una respuesta inflamatorio [40].

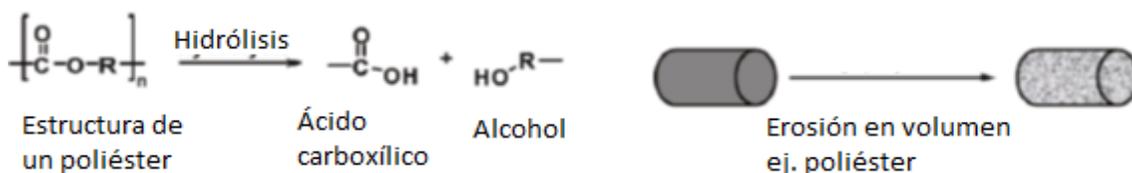


Figura 17. Degradación por hidrólisis; ocurre cuando el agua penetra en el andamio y comienza a degradar desde dentro del andamio.

7.6. Cultivo y sembrado celular

El aislamiento de fibroblastos se realizó a partir de biopsias de piel humana con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina, UNAM. La separación de la epidermis y dermis se llevó a cabo mediante disipar 1 mg/mL y tripsinas EDTA. Las dermis fueron procesadas como explantes y se mantuvieron dos semanas hasta confluencia de las cajas Petri. Los cultivos primarios fueron mantenidos con medio DMEM suplementado con 10 % suero bovino fetal y 1 % antibiótico en condiciones estándar de cultivo 37 °C y 5 % CO₂. El cambio de medio de cultivo se realizó cada tercer día. Se mantuvieron en cultivo primario durante dos semanas.

Los ocho andamios diferentes de PCLAM obtenidos fueron sembrados a una densidad de 15 000 células en cada uno y se mantuvieron en cultivo por varios días en las condiciones antes descritas. Para los ensayos de viabilidad, los andamios sembrados fueron incubados con calceína y homodímero de etidio durante una hora y posteriormente se lavó con PBS para retirar residuos del kit ya mencionado. Finalmente se montaron en un portaobjetos con unas gotas de PBS y se analizaron en el microscopio Olympus Eclipse.

7.7. Viabilidad celular

La viabilidad celular nos indica si el andamio puede mantener a las células vivas o no. Fue evaluada mediante el kit de citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD®. El kit contiene calceína que es metabolizado únicamente por células vivas, reduciéndolo a un fluorocromo que nos dará una señal verde al ser excitado por un microscopio de fluorescencia. El otro componente del kit es el homodímero de etidio que se une al núcleo de aquellas células que presentan una membrana dañada por donde es capaz de penetrar el homodímero. Bajo

microscopio de fluorescencia, los núcleos de estas células se tiñen de rojo. Se estudió la viabilidad a los 2, 8, 14 días de cultivo sobre los andamios.

7.8. Liberación de fármaco

El ensayo de liberación de fármaco fue por medio de la inserción de los andamios en un buffer salino de fosfatos a 1X (PBS) con pH 7.4 a 37 °C. Los andamios fueron sumergidos en 5 mL de PBS a 1X. Se tomaron 2 mL de PBS y se agregó el volumen tomado con PBS nuevo a 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h, 38 h, 86 h y 130 h. Se midió la cantidad de fármaco liberado en un espectrofotómetro Ocean Optics, Inc. SAD500 a 275 nm [41]. La cantidad del fármaco liberado se estimó de acuerdo con una curva de calibración del diclofenaco sódico. Se trataron los datos con el programa OriginPro 9.0.

8. Resultados



"You won't believe it! Anderson's experiment... the results... they're conclusive! *Conclusive* I tell you!"

8.1. Funcionalización de PCL con AM

Existen varios tipos de iniciadores, peróxidos (ROOR) e hidroperóxidos (ROOH) son los más utilizados [42]. Los peróxidos son térmicamente inestables y se descomponen en radicales a una temperatura y rapidez dependientes de la estructura. Para la funcionalización se utilizó BPO (que tiene una estructura ROOR). El BPO experimenta una homólisis térmica para formar radicales benzoiloxi (Figura 18 a). Los radicales benzoiloxi pueden sufrir una variedad de reacciones además de añadir monómero, recombinación, descomposición a radicales fenilo y dióxido de carbono (Figura 18 b). A continuación, los radicales benzoiloxi desprotonizan los átomos de carbono que se encuentran en la posición α de la cadena de PCL; el AM reacciona para atrapar los radicales formados en la cadena de PCL y/o en sus extremos de cadena (Figura 18 c,d), los monómeros con insaturación distribuida simétricamente, tales como el anhídrido maléico, son incapaces de reaccionar con radicales libres derivados de ellos mismos [34]; la probabilidad de formación de poli(anhídrido maléico) durante la reacción de funcionalización es mínima pero no eliminada (Figura 18 f) o hacer una transferencia de cadena (es decir, una extracción de átomos de hidrógeno de la posición C_2 de la cadena de PCL) (Figura 18 e) o combinar con macrorradicales (Figura 18 g) o combinar con otros radicales PCL (Figura 18 h).

El efecto de la temperatura en la funcionalización se ve reflejada en la descomposición del iniciador y por lo tanto con más temperatura se producen más radicales y aumenta la funcionalización de la PCL. Estos radicales pueden recombinarse con otros radicales, eliminando los sitios de injerto, es decir, afectando la eficiencia de la funcionalización. La funcionalización aumenta con la temperatura, alcanza un máximo y luego disminuye. En este trabajo se optó por mantenerse debajo de la temperatura óptima que presenta la referencia [23,34,35], que está alrededor de 150 °C antes de que exista la recombinación entre radicales benzoiloxi.

La concentración del BPO también es importante, porque al aumentar esta concentración aumenta la funcionalización. Esto es porque al haber más radicales hay más puntos donde se puede insertar el AM. En este trabajo se usó una concentración 2 wt % como máxima [23,34,35], para reducir el grado de entrecruzamiento y aumentar el grado de funcionalización.

El porcentaje de funcionalización también está afectado por la concentración de AM, se usó el 10 wt % [23,35] porque se ha demostrado que tiene un buen porcentaje de funcionalización. Una concentración baja de AM puede causar el entrecruzamiento entre las cadenas de PCL [34]. Estas reacciones tienen bajo porcentaje de funcionalización porque el AM tiene impedimento estérico entre las cadenas de PCL.

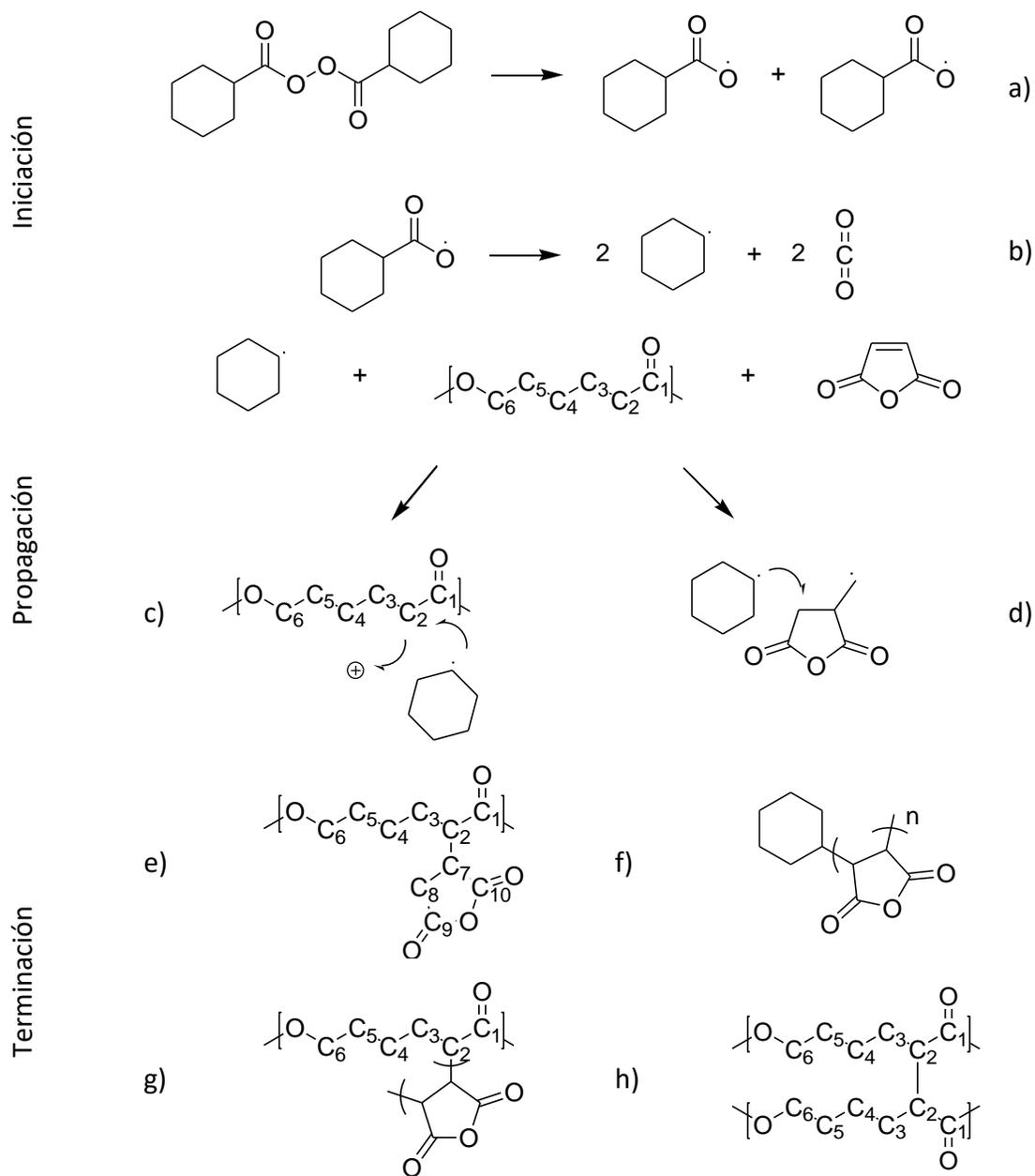


Figura 18. Posible mecanismo de reacción. Reacción de funcionalización por radicales libres, usando BPO como iniciador. Modificado de referencias [23,35,43,44].

Los subproductos de estas reacciones (por ejemplo, grupos terminales hidroxilo, carboxílico y oligómeros) que incluyen monómeros residuales, aumentan la degradación térmica del PCL, dando como resultado la reducción de Mn. Las concentraciones utilizadas de AM y BPO con los tiempos de reacción, desempeñan un papel importante en el grado de injerto y cambio en Mn de PCLAM, esto se puede identificar por GPC [43].

8.1.1. Porcentaje de funcionalización por medio de espectrofotometría

Se obtuvo el mayor porcentaje de injerto en el PCLAM3, esto se debe a que la reacción es por masa y el anhídrido maléico interactúa más con la cadena de PCL ya que tiene una temperatura mayor a la del punto de fusión y por más tiempo. El factor de la temperatura es una variable muy importante como lo podemos observar en la Tabla 11.

Tabla 11. Porcentaje de funcionalización de PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3. Tomando como blanco PCL para comprobar la reacción de funcionalización

Muestra	Concentración de C=O (g/mL)
PCLAM1	1.63
PCLAM2	1.84
PCLAM3	2.04

8.1.2. Análisis de grupos funcionales por FTIR

El espectro de PCL no presenta ninguna banda en 2894 cm^{-1} , a comparación de PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3. La banda 2894 cm^{-1} corresponde a la vibración del enlace $\text{C}_2\text{-H}$ y $\text{C}_7\text{-H}$ que se encuentran en la posición C_2 de la cadena de PCL y el C_7 del anhídrido succínico. La banda $\text{R}_3\text{-CH}$ se encuentra alrededor de $(2890\text{-}2880)\text{ cm}^{-1}$ y son muy débiles, los C=O asimétricos y simétrico se encuentra en 1860 cm^{-1} a 1850 cm^{-1} y 1820 cm^{-1} a 1760 cm^{-1} respectivamente [45]. En la Figura 19 podemos observar las bandas que corresponden al PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3 y no están en el espectro de PCL, confirmando que si existe un anclaje químico en PCLAM. En la Tabla 12 están las bandas características de la PCL obtenidas y con algunas referencias consultadas. En los Anexo 1, Anexo 2, Anexo 3 y Anexo 4 se puede encontrar los espectros de FTIR de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3.

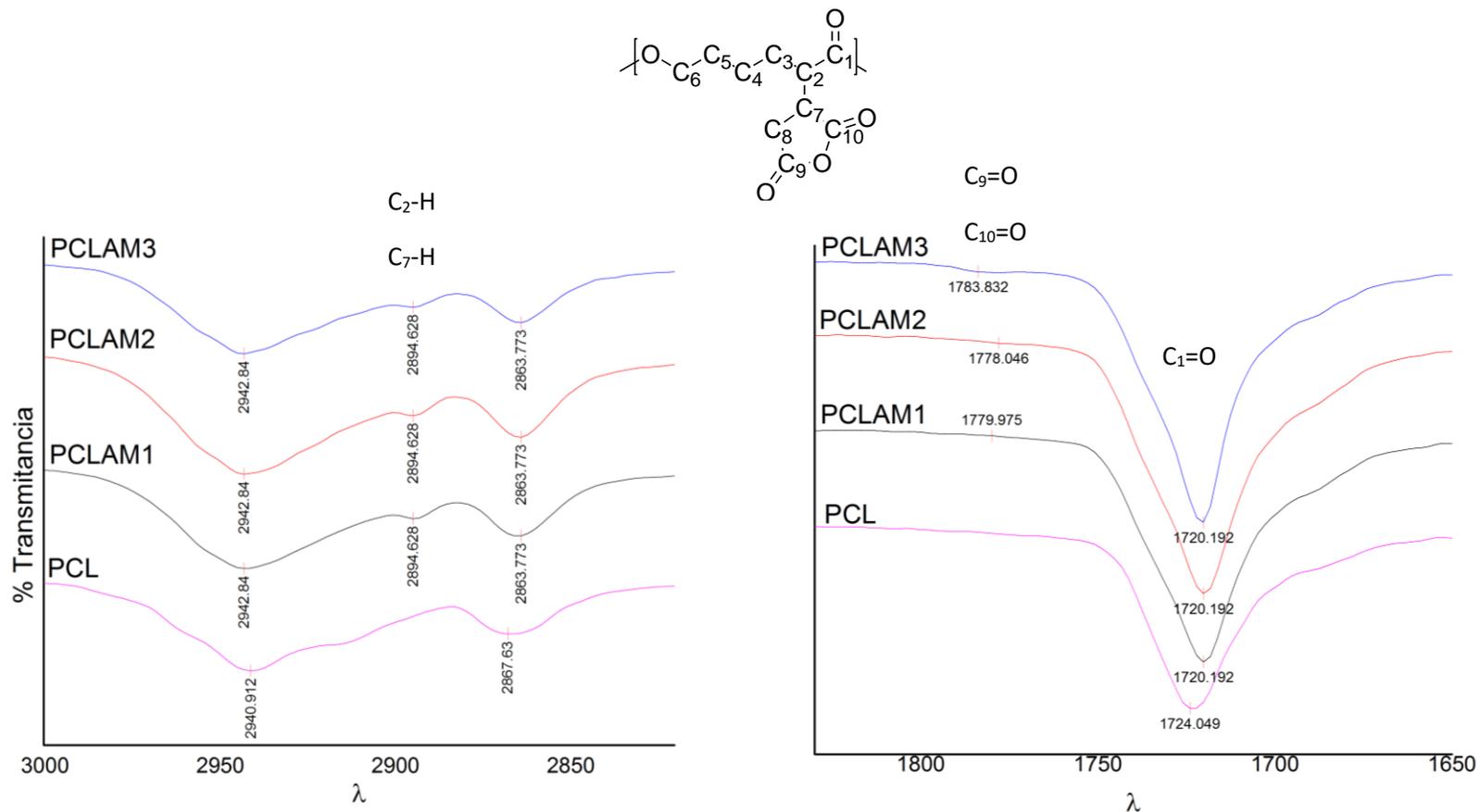


Figura 19. Espectro FTIR de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3. Banda en 2894 cm⁻¹ correspondiente al AM, que no aparece el espectro de PCL.

Tabla 12. Bandas características de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3

	Tipo de vibración	Bandas obtenidas (cm ⁻¹)				Referencias		
		PCL	PCLAM1	PCLAM2	PCLAM3	[46] PCL	[34] PCLAM	[47] PCLAM
PCL	Estiramiento asimétrico CH ₂	2942	2942	2942	2942	2949	-	-
	Estiramiento simétrico CH ₂	2865	2863	2863	2863	2865	-	-
	Estiramiento carbonilo	1724	1720	1720	1720	1727	1725	-
	Estiramiento en la fase cristalina C-O y C-C	1292	1294	1294	1294	1293	-	-
	Estiramiento en fase amorfa C-O y C-C	1157	1166	1157	1164	1157	-	-
	Estiramiento asimétrico C-O-C	1240	1240	1240	1240	1240	-	-
PCLAM	Estiramiento simétrico C=O del AM	-	1779	1778	1783	-	1780	1783
	Estiramiento asimétrico C=O del AM	-	1849	1849	1847	-	1850	1856
	Estiramiento R ₃ -CH	-	2892	2894	2894	-	2892	2892

8.1.3. Estructura de PCL, PCLAM1, PCLAM2 Y PCLAM3 por ¹H-NMR

Con esta caracterización buscamos saber qué estructura presentadas en la Figura 16 e, f, g, h tiene PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3 con respecto al PCL que conocemos previamente.

La señal de los protones de la cadena de PCL se ubican en H₁, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, H₇, H₈, H₉ y H₁₀; las señales de los protones que se formaron del injerto del anhídrido succínico H₁₁, H₁₂ y H₁₃ (Tabla 13). En los lugares de la cadena de PCL donde hubo injerto, H₁₁ y H₁ se traslapan, obteniendo una señal a 3.66 ppm. Las señales de H₁₂ y H₁₃, se traslapan con H₉ y H₁₀ por la cercanía del O del carbonilo del anhídrido; esto lo podemos concluir porque en el espectro de PCL puro, no aparece la señal de H₁₁ y las señales de H₉ y H₁₀ son menores en PCL puro y en PCLAM aumentan. En la Figura 20 (PCL), Figura 21 (PCLAM1), Figura 22 (PCLAM2) y Figura 23 (PCLAM3) se observan las señales obtenida por ¹H-NMR.

Tabla 13. Señales en $^1\text{H-NMR}$ de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3. Teniendo la señal del enlace de la PCL y el AM en 3.66 ppm.

	PCL	PCLAM1	PCLAM2	PCLAM3	[35]
H ₅ , H ₆	4.08	4.08	4.07	4.08	4.08
H ₁ , H ₂	2.32	2,32	2.32	2.32	2.30
H ₃ , H ₄ , H ₇ , H ₈	1.67	1.67	1.66	1.67	1.60
H ₉ , H ₁₀	1.40	1.40	1.39	1.40	1.39
H ₁₁	x	3.67	3.68	3.66	3.65

Se puede concluir que al tener mayor concentración de BPO, hay un porcentaje mayor de injerto del anhídrido succínico en la cadena de PCL. De igual manera lo vemos con el aumento de temperatura de 70 °C a 110 °C.

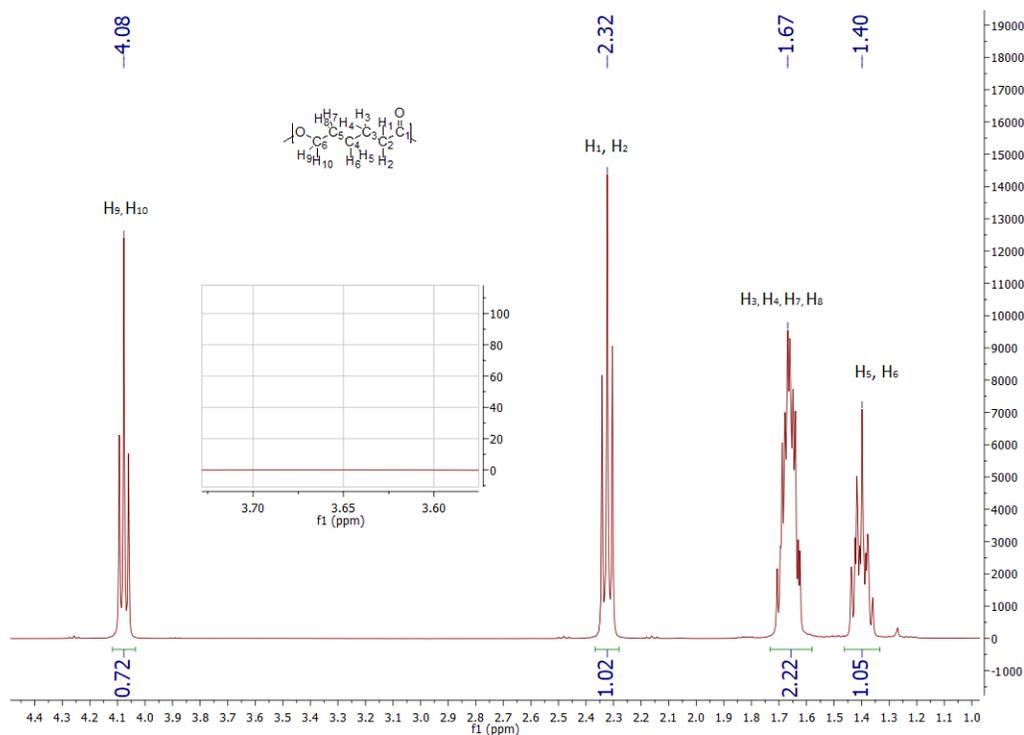


Figura 20. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón de la PCL. No muestra ninguna señal en 3.66 ppm.

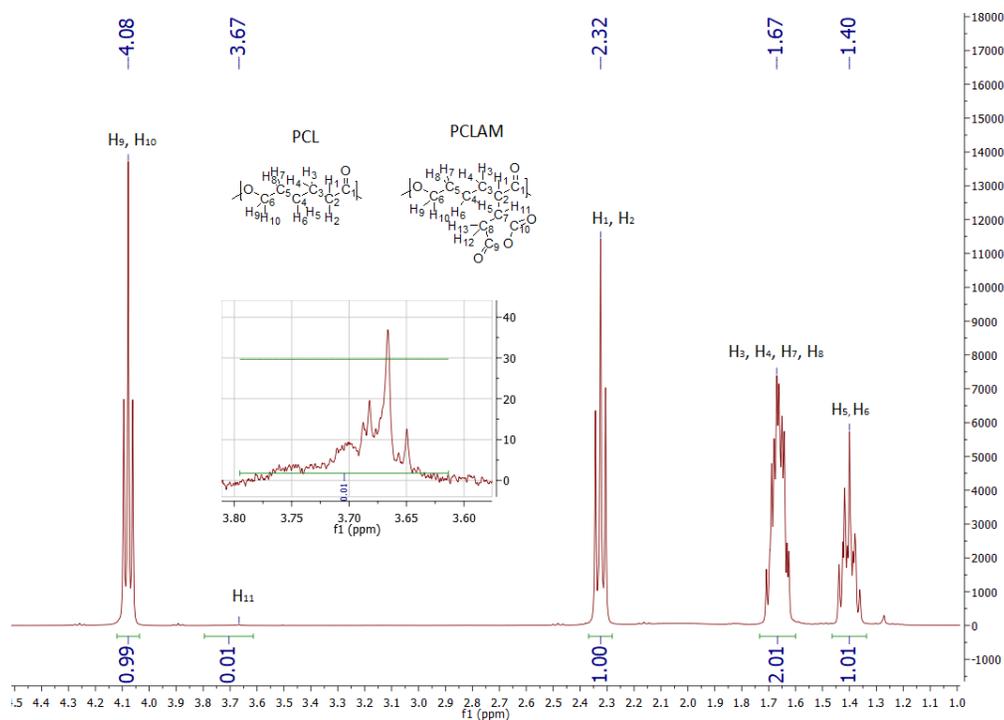


Figura 21. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón de la PCLAM1. Aparece una señal alrededor de 3.66 ppm, perteneciente al protón H_1 y H_{11} del enlace entre C_2 y C_7 .

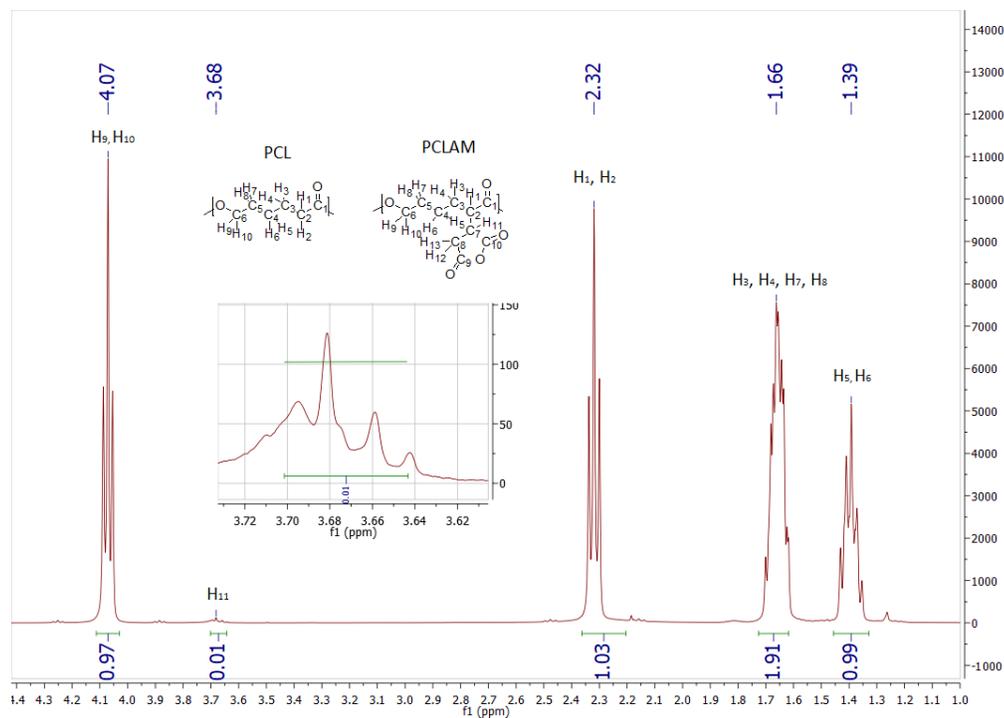


Figura 22. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón de la PCLAM2. Aparece una señal alrededor de 3.66 ppm, perteneciente al protón H_1 y H_{11} del enlace entre C_2 y C_7 .

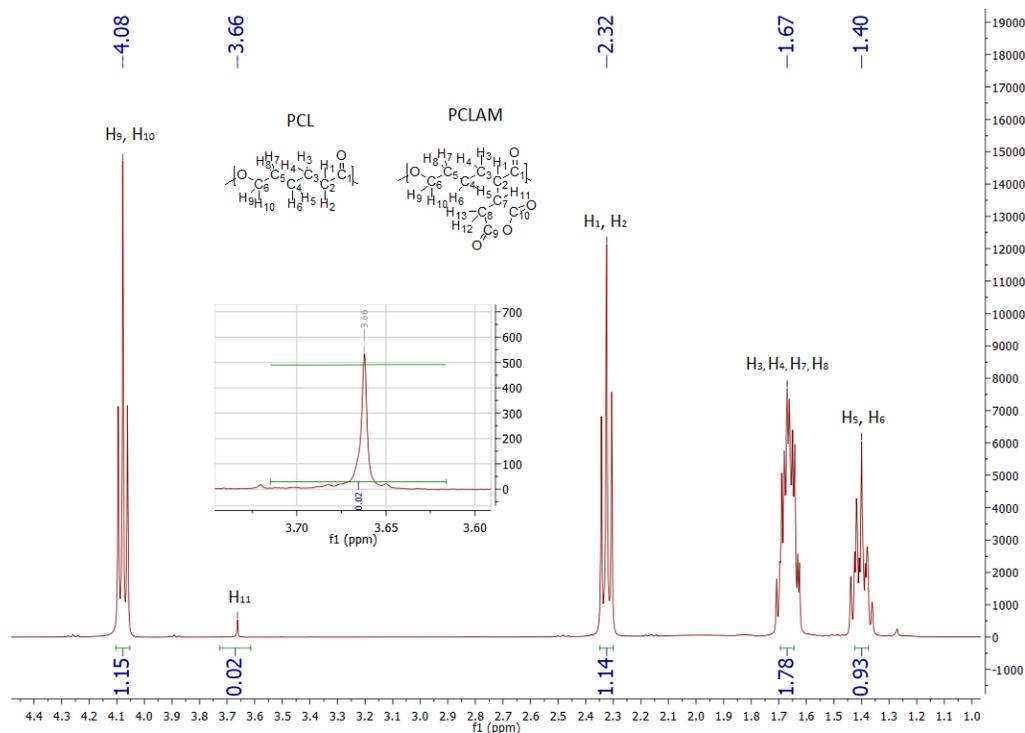


Figura 23. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón de la PCLAM3. Aparece una señal alrededor de 3.66 ppm, perteneciente al protón H_1 y H_{11} del enlace entre C_2 y C_7 .

8.1.4. Análisis de pesos moleculares por GPC

La reacción de funcionalización se basa en la desprotonación de un hidrogeno en la posición C_2 de la PCL. La diferencia de los pesos moleculares calculados por GPC es provocada por la habilidad de los radicales benzoiloxi de tomar el átomo de hidrogeno de la PCL. La solubilidad y/o movilidad también juegan un papel importante en esta reacción porque los radicales benzoiloxi si no se pueden mover, provocaran un entrecruzamiento [34], al contrario, si tienen movilidad en la reacción tienen más posibilidad de encontrar las posiciones C_2 de la cadena de PCL, desprotonizar e injertar el anhídrido succínico en C_2 . En el caso de que tengan movilidad los radicales benzoiloxi bajará el peso molecular (M_n) [43] por las reacciones secundarias que pueden ser de degradación del PCL, homopolimerización de AM o reacciones terminales; esta es la probable explicación de que el PCLAM1 tenga el menor M_n de todos. La funcionalización de PCLAM2, se llevó a cabo en solución, por lo que se puede concluir que los radicales benzoiloxi tuvieron movilidad al inicio de la reacción, conforme el Tolueno se evaporaba lentamente, los radicales perdían su movilidad, al quedar atrapados entre las cadenas las rompían debido a la temperatura utilizada (degradando el material al mismo tiempo); concluyendo, que es muy probable que por estas reacciones secundarias tenga el menor M_n de todos.

Tabla 14. Pesos moleculares PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3.

Polímero	Mn	Mw	PDI
PCL	117 710	201 750	1.71
PCLAM1	93 670	162 880	1.73
PCLAM2	73 280	143 140	1.95
PCLAM3	98 730	202 240	2.04

En la *Tabla 14* se encuentran Mn, Mw y PDI. El PCLAM3, por ser un tipo de funcionalización en masa, es muy probable que exista entrecruzamiento de cadenas por la ausencia de movilidad de los radicales generados, aumentando el Mn a comparación de PCLAM1 y PCLAM2 que son en solución [48]. La polidispersidad (PDI) también se ve afectada en todas las muestras por el incremento de anhídrido succínico injertado en la PCL, que provoca cadenas irregulares y por ende, aumenta la PDI [35]. La disminución de Mw en PCLAM2 a comparación de PCLAM1, es porque las cadenas de PCLAM2 son más cortas a comparación de PCLAM1.

8.1.5. Análisis de pérdida de masa por TGA

Se estudia la estabilidad térmica de la PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3 por medio de análisis termogravimétrico. Es importante este estudio porque nuestras reacciones de funcionalización están a temperaturas por arriba de su temperatura de fusión y por el tipo de reacción que se realizó puede cambiar las propiedades térmicas del PCLAM1, PCLAM2, PCLAM3 a comparación del PCL. La *Figura 24* se encuentran los termogramas realizados con una atmosfera de Nitrógeno, un intervalo de temperatura de 10 °C hasta 600 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min. Las muestras comienzan a degradarse a los 350 °C [49] hasta los 450 °C [50].

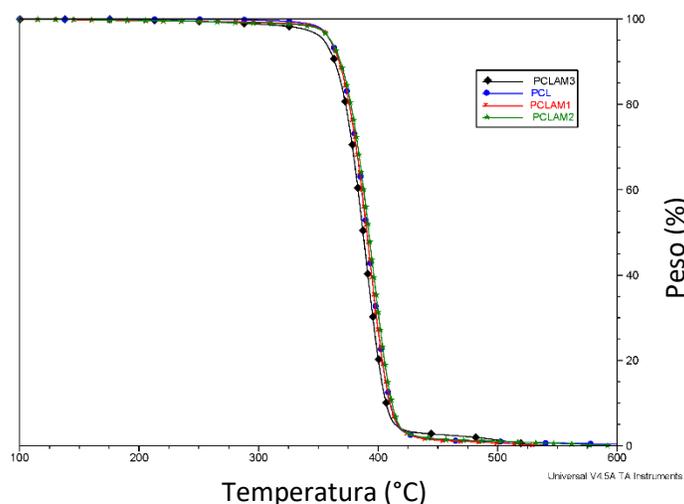


Figura 24. Pérdida de masa en función de la temperatura de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3.

Tabla 15. Temperaturas de degradación por medio de “on set Point”

Muestra	Masa (mg)	Td (°C)	Masa perdida (%)
PCL	6.6540	356.83	99.62
PCLAM1	5.4810	357.56	98.92
PCLAM2	7.4980	357.02	98.50
PCLAM3	4.3920	356.76	97.18

En la *Tabla 15* se observa la temperatura de degradación de los polímeros de este trabajo. Se observa arriba de los 450 °C una pequeña pérdida de masa. No es posible concluir realmente que sea la degradación térmica del ciclo del anhídrido succínico, pero esta va aumentando a mayor porcentaje de injerto. La temperatura de degradación del anhídrido succínico esta entre 351 °C a 502 °C [51]. Las temperaturas de degradación de las diferentes muestras, son muy altas y por ende no afectan a la aplicación de la ingeniería de tejidos que se propone en este trabajo.

8.1.6. Análisis de transiciones por DSC

La cristalinidad se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$X_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_{m0}} \times 100$$

Ecuación 6. Ecuación de porcentaje de cristalinidad.

Donde ΔH_{m0} = 136 J/g que es el calor de fusión de PCL 100 % cristalina [52], ΔH_m entalpia de fusión y ΔH_c entalpia de cristalización.

Tabla 16. Tc, Tm y Tg de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3

Muestra	Tc (°C)	ΔH_c (J/g)	Tm (°C)	ΔH_m (J/g)	Tg (°C)	Xc (%)
PCL	33.66	53.12	56.76	89.35	-60.40	26.63
PCLAM1	35.27	65.06	57.89	107.8	-	31.42
PCLAM2	35.11	55.44	57.11	97.55	-	30.96
PCLAM3	32.87	59.77	54.99	100.3	-	29.80

En la *Tabla 16*, observamos Tc, ΔH_c , que son temperatura de cristalización y entalpia de la temperatura de cristalización, Tm, ΔH_m , es la temperatura de fusión y la entalpia de la temperatura de fusión, Tg, temperatura de transición vítrea y Xc, porcentaje de cristalinidad. En los experimentos realizados, se obtuvo para la PCL Tg=-60.40, Tc=33.6, y Tm=56.76 °C; con referencias consultadas tuvimos resultados semejantes PCL Tg=-60 °C, Tc=29.7 °C [53] y Tm=56 °C [54].

El PCLAM1 cuenta con un $X_c=31.42\%$, seguido por PCLAM2 con $X_c=30.96\%$ y por último PCLAM3 con $X_c=29.80\%$. Existe una tendencia en estos resultados donde se observa que el grado de injerto afecta directamente a la cristalinidad, con los datos de la Tabla 11 se observa que la muestra con mayor injerto es el PCLAM3, dando el menor X_c , PCLAM1 con el menor grado de injerto y es el que tiene más X_c , de las muestras funcionalizadas. Al funcionalizar la PCL, provocamos que la cristalinidad cambie por el tratamiento térmico y por el injerto; la cristalinidad disminuye al aumentar el grado de injerto [48]. La T_c y T_m de las muestras de igual manera cambian por la temperatura que tiene la reacción de funcionalización, se observa que la muestra que tiene menor temperatura de T_c y T_m , es el PCLAM3 y va aumentando conforme tiene más porcentaje de cristalinidad la muestra.

Se corrieron las muestras a una rapidez de calentamiento a 5, 10 y 20 °C/min y en los termogramas no se logran ver la T_g con atmosfera de N_2 . Observamos que el polímero que tiene mayor porcentaje de cristalización % X_c , es el PCLAM1, seguido de PCLAM2, PCLAM3 y siendo el más amorfo la PCL.

8.2. Caracterización de andamios electrohilados de PCL y PCLAM

Los andamios fabricados por electrohilado a las condiciones de 20 cm, 15 kV y 0.5 mL/h sobre una placa de aluminio 8 cm x 8 cm se caracterizaron por medio de SEM, ángulo de contacto, pruebas mecánicas, ensayo de viabilidad y su degradación en un ensayo *in-vitro*.

8.2.1. Morfología de andamios por SEM

El diámetro de fibra más grande se obtuvo para PCL (687 ± 94) nm, las muestras PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3, tienen diámetros de fibras menores tal como se indica en la Figura 25, Figura 26, Figura 27 y Figura 28, esto muy probablemente se debe a que los grupos carboxilos del AM producen que la solución polimérica se haga más conductora, provocando que el campo eléctrico adelgace aún más el jet. Se midieron 100 fibras de las micrografías obtenidas por SEM a x5000 aumentos, con estos datos se realizaron histogramas para tener la distribución de diámetros de las fibras obtenidas de cada muestra.

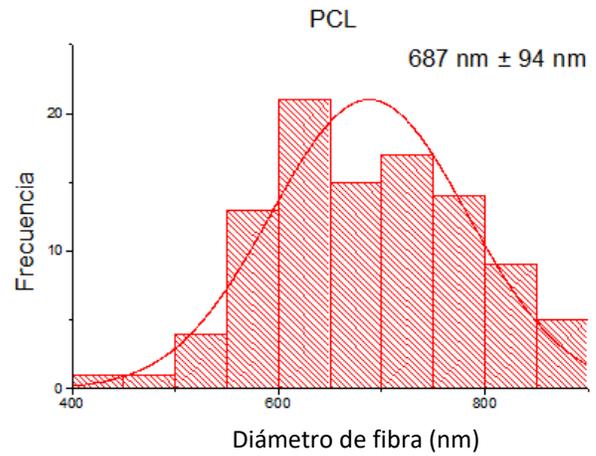
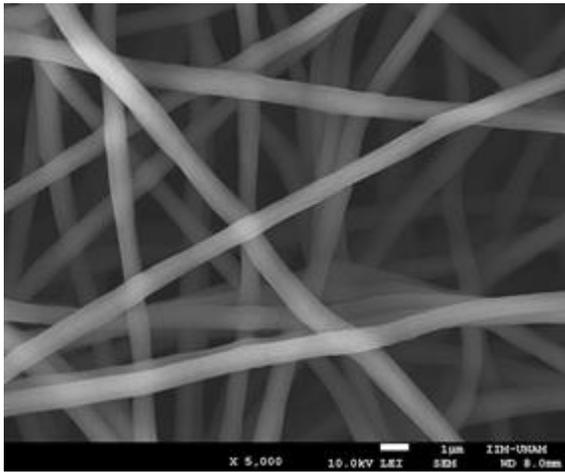


Figura 25. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCL. Se obtuvieron diámetros de 687 nm con una desviación estándar de 94 nm.

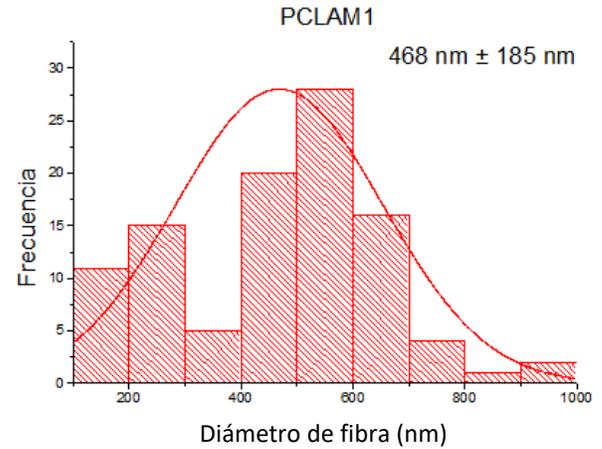
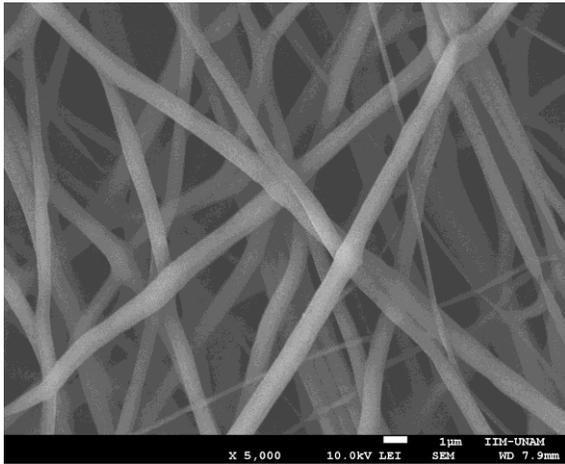


Figura 26. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM1. Se obtuvieron diámetros de 468 nm con una desviación estándar de 185 nm.

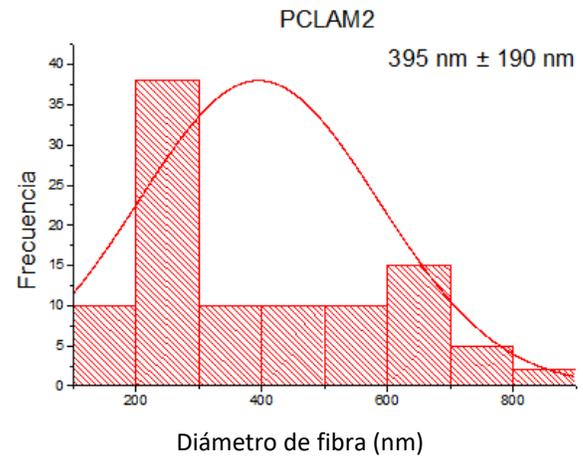
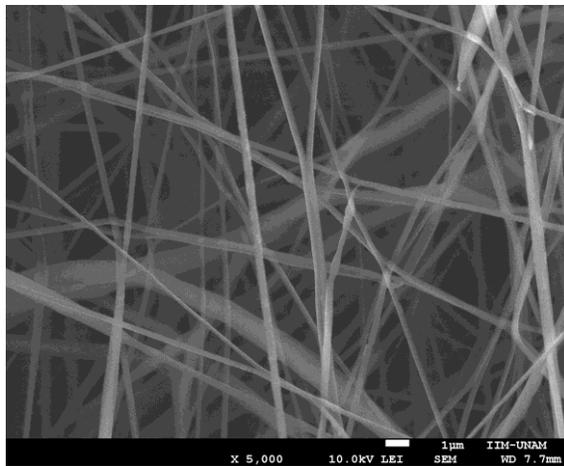


Figura 27. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM2. Se obtuvieron diámetros de 395 nm con una SD de 190 nm.

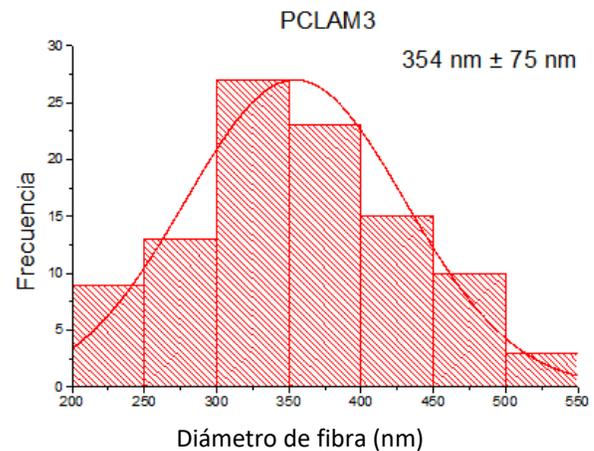
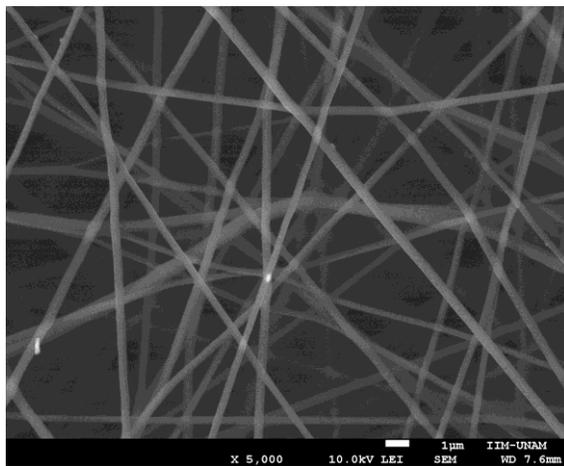


Figura 28. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM3. Se obtuvieron diámetros de 354 nm con una desviación estándar de 75 nm.

Las fibras obtenidas de PCL que se muestran en la Figura 25, tienen una distribución homogénea a comparación de las muestras PCLAM1 (Figura 26) y PCLAM2 (Figura 27). Se observa que son las fibras con el mayor diámetro. La funcionalización logró disminuir el diámetro de fibras, con el aumento de grupos carbonilos sobre la cadena de PCL. PCLAM1 y PCLAM2 tienen una distribución heterogénea en los diámetros, ya que en la micrografía se observan fibras más delgadas que otras con lo que se concluye en el histograma ya que existe una gran desviación estándar en las mediciones de estas dos muestras; representando la desviación estándar la homogeneidad del diámetro de las fibras. Para PCLAM3 (Figura 28) se obtuvieron los diámetros más bajos y homogéneos; probablemente se debe porque es el que tiene un mayor porcentaje de injerto.

8.2.2. Hidrofobicidad por ángulo de contacto

El mojado de los biomateriales es muy importante para que se puede tener una idea de cómo se comportará el andamio en un entorno fisiológico. De esto depende de que las células puedan tener una mejor adhesión al andamio y proliferen en el mismo. Las mediciones del ángulo de contacto (θ) se muestran en la Figura 29, mostrando que los andamios fabricados son hidrofóbicos, el mayor ángulo de contacto lo tiene la PCL; $\theta=(130.46 \pm 2.5)^\circ$ [55]. Se logró reducir la hidrofobicidad con la funcionalización de la PCL.

Cuando se tiene un diámetro de fibra alto, existe una porosidad grande en el andamio, esto provoca que se pueda interiorizar el agua en los poros [56,57], además, con la contribución de los grupos carbonilos (grupos polares) de anhídrido succínico que tiene la cadena de PCL disminuye un poco el ángulo de contacto [58]. Algo que también puede afectar en el ángulo de contacto (o humectación), es la orientación de los grupos carbonilos, composición química sobre la superficie de la fibra cuando el diámetro de fibra se encuentra en escala nanométrica [59]. Estudios hechos con fibras de poli(fluoruro de vinilideno) que es hidrofóbico, por medio de la técnica de Brunauer-Emmett-Teller (BET), las fibras con diámetros pequeños tienen una mayor área superficial a comparación de fibras con diámetros mayores, es decir, con un área superficial mayor el ángulo de contacto aumenta y con una menor cantidad de área superficial el ángulo de contacto disminuye [57].

Por medio de la Figura 25 podemos observar, que el andamio de PCL tiene el mayor diámetro de fibra, teniendo un diámetro de fibra de (687 ± 94) nm, al tener mayor diámetro, tiene menor área superficial [56,57] a comparación de PCLAM1 que tiene un diámetro de fibra de (468 ± 185) nm, PCLAM2 con (395 ± 190) nm y PCLAM3 con (354 ± 75) nm. Se puede concluir que PCLAM1 y PCLAM2 disminuyen el ángulo de contacto por la distribución heterogénea de fibras provocando que tenga menor área superficie por las fibras con mayor diámetro y en PCLAM3 aumenta el ángulo de contacto, porque las fibras son más delgadas, por ende, el área superficial es muchos más alta, impidiendo que la gota humecte la superficie del andamio.

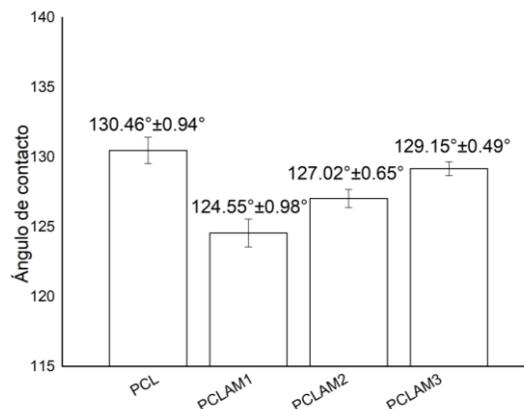


Figura 29. Ángulo de contacto de andamios de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3.

8.2.3. Propiedades mecánicas por pruebas de tensión uniaxial

El andamio debe de cumplir los requerimientos mecánicos donde se quiere implantar. El módulo de Young para la piel se encuentra entre 0.4 MPa - 20 MPa [60,61].

En referencias el módulo de Young de PCL en bulto, se encuentra alrededor de 190 ± 6 MPa [62]. Las pruebas mecánicas se vieron afectadas por el diámetro de fibra [64]; los resultados del módulo elástico fueron PCL (3.86 MPa), PCLAM1 (1.84 MPa), PCLAM2 (3.73 MPa) y PCLAM3 (4.53 MPa) mostrados en la Figura 30. Recordemos que PCLAM1 y PCLAM2, tienen mayor diámetro y PCLAM3 el menor, esto provoca que PCLAM1 tenga mayor porosidad y en consecuencia que el módulo de Young sea el más bajo [63]; conforme disminuye el diámetro de fibra, aumenta el Módulo de Young y el esfuerzo máximo. El esfuerzo a la tensión de varias fibras pequeñas es mucho mayor al esfuerzo de pocas fibras con diámetro mayor. El módulo de Young de andamios electrohilados de PCL se encuentra en 3.8 ± 0.8 MPa [63].

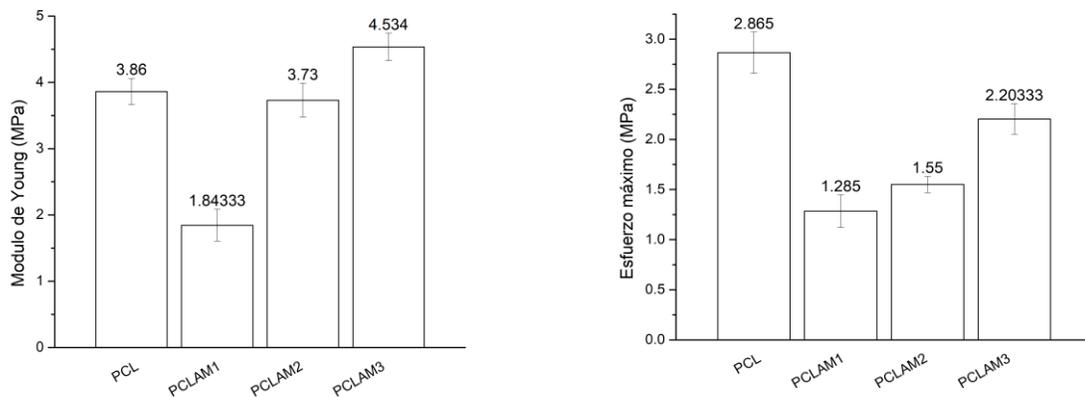


Figura 30. Módulo de Young y esfuerzo máximo de PCL, PCLAM1, PCLAM2, PCLAM3.

8.2.4. Determinación de viabilidad celular sobre los andamios electrohilados PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3

Se evaluó la viabilidad de fibroblastos humanos sobre los andamios de PCLAM1, PCLAM2 Y PCLAM3, teniendo como control aquellos cuyas fibras únicamente eran de PCL. De igual manera, se sembraron células en una placa multipozo de cultivo a la misma densidad que los andamios para evidenciar la morfología y viabilidad de células.

A los dos días de cultivo, los fibroblastos sembrados sobre el andamio de PCL puro, hay pocas células a comparación de PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3. Aunque los PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3 tienen poca diferencia respecto al ángulo de contacto al parecer el cambio en la composición química sí afecta a las células. Esto se ve porque conforme tiene mayor

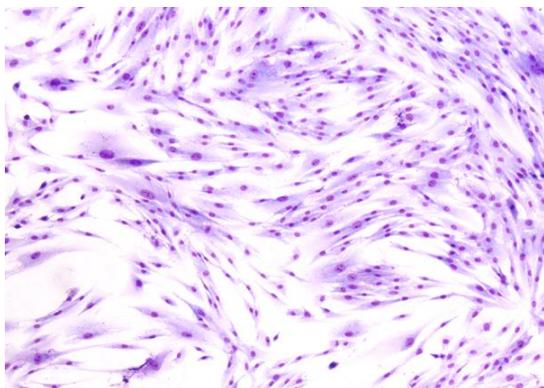


Figura 31. Fibroblasto sembrado en placa multipozo.

funcionalización el polímero, la viabilidad celular aumenta. Cuando los fibroblastos humanos se encuentran en un ambiente idóneo, su morfología es alargada Figura 31, si sucede que la morfología no es alargada, o la célula tiene forma circular u otra forma atípica [65], el ambiente no es el idóneo para las células de fibroblastos humanos.

Indirectamente, podemos evidenciar que a lo largo de los días la confluencia celular aumentó sobre la superficie del andamio. Es evidente como de los 2 días a los 14 días, se presentó una mayor confluencia ya que se puede ver colonizado todo el andamio de fibroblastos, es decir, existe viabilidad

celular en el andamio. De igual forma, indirectamente con la morfología alargada que presentaron podemos sugerir adhesión celular.

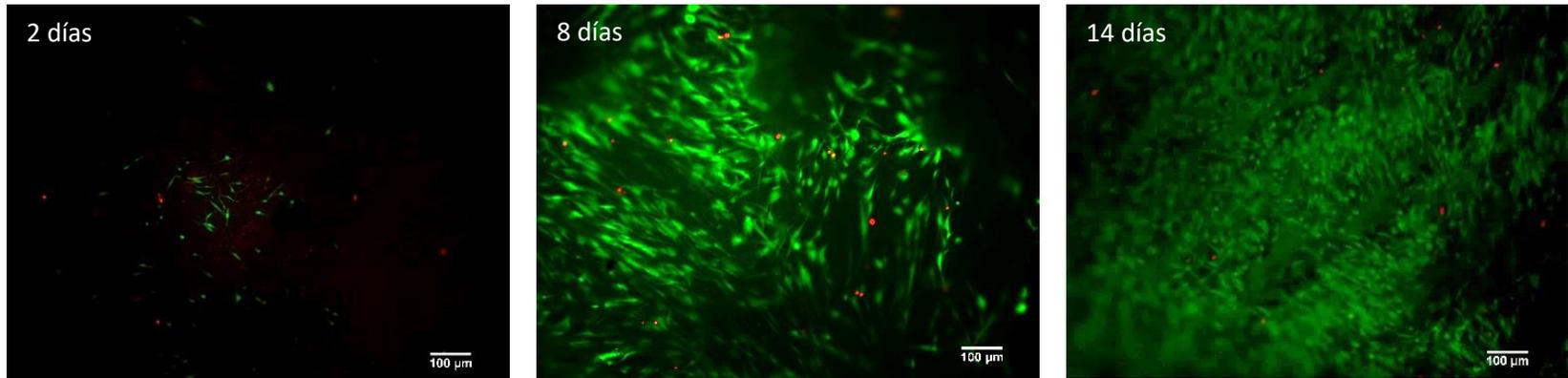


Figura 32. Cultivo de fibroblastos sobre el andamio PCL. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).

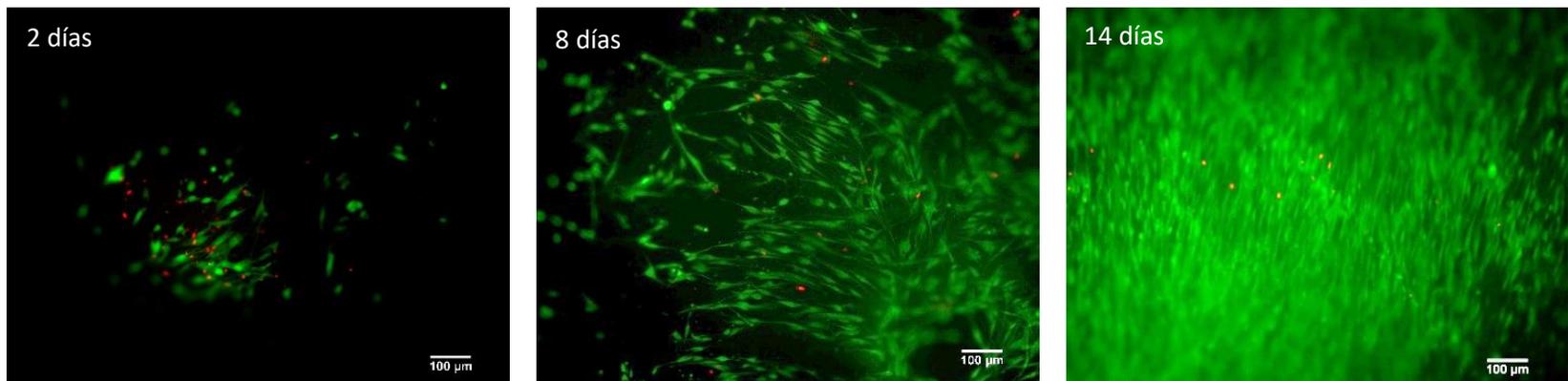


Figura 33. Cultivo de fibroblastos sobre el andamio PCLAM1. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).

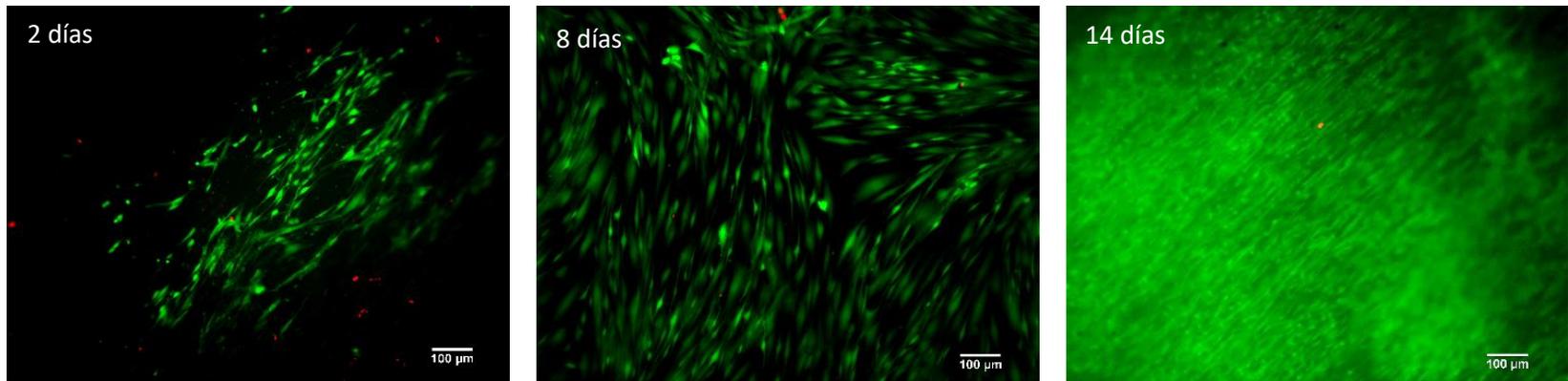


Figura 34. Cultivo de fibroblastos sobre el andamio PCLAM2. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).

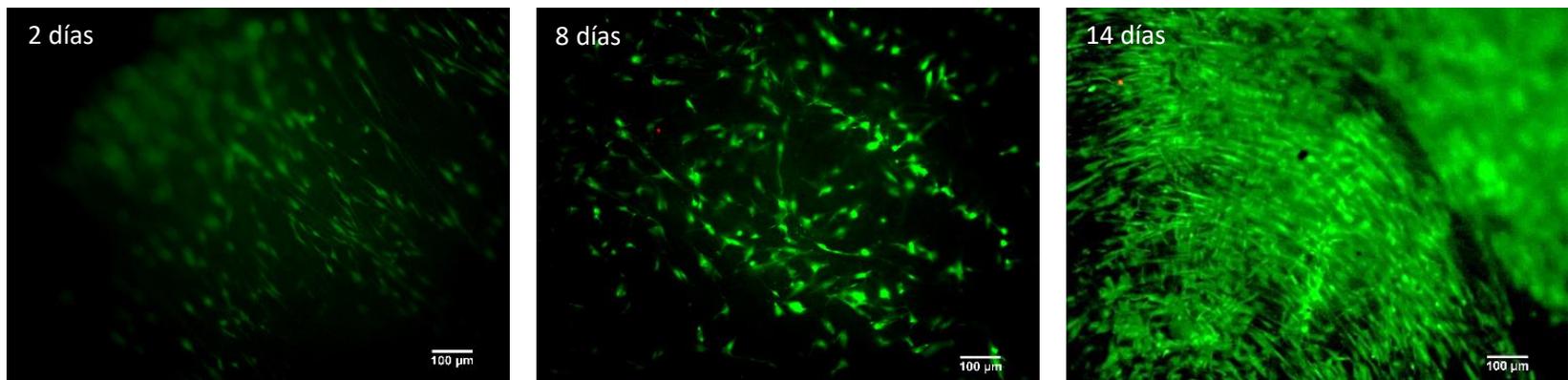


Figura 35. Cultivo de fibroblastos sobre el andamio PCLAM3. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).

8.3. Caracterización de andamios PCLAM/Col /DS

Se fabricaron andamios de los polímeros de este trabajo (PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3) con Colágeno Tipo 1 Hidrolizado (Col) y Diclofenaco Sódico (DS). En la Tabla 17 se encuentran las condiciones con los mejores resultados del diseño experimental (diámetro de fibra pequeño, sin bulbos, fibras continuas). El colector fue de aluminio con medidas de (8 x 8) cm. Se caracterizaron estos andamios por FTIR, SEM, ángulo de contacto, ensayo de viabilidad y liberación del DS *in-vitro*.

Tabla 17. Condiciones de electrohilado para andamios (PCL, PCLAM1, PCLAM2, PCLAM3)/Col/DS.

Muestra	Proporción	DS (%)	Diferencia de potencial (kV)	Flujo (mL/h)
PCL:Col	80:20	33	8	0.3
	50:50	15	15	0.3
	20:80	10	12	0.3
PCLAM1:Col	80:20	10	15	1
	50:50	15	15	0.3
	20:80	10	12	0.3
PCLAM2:Col	80:20	15	12	0.5
	50:50	15	15	0.3
	20:80	10	12	0.3
PCLAM3:Col	80:20	15	12	0.5
	50:50	15	15	0.3
	20:80	10	12	0.3

8.3.1. Análisis de grupos funcionales por FTIR

En los espectros de las Figura 36, Figura 37, Figura 38, Figura 39 se observa que la banda de $(OH)^{-1}$ que se encuentra alrededor de 3264 cm^{-1} y $-NH$ a 3066 cm^{-1} va creciendo con el aumento de Col que tienen los andamios y aparecen bandas cercanas a los 500 cm^{-1} por el diclofenaco sódico [66], que tiene algunas bandas características en 1394 cm^{-1} y 847 cm^{-1} . También prevalecen las bandas características del polímero que se encuentra en 2942 cm^{-1}

(estiramiento asimétrico CH₂), 2865 cm⁻¹ (estiramiento asimétrico CH₂) 1720 cm⁻¹ (estiramiento de C=O) y para el caso de PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3 una banda adicional en 2892 cm⁻¹ (estiramiento R₃-CH).

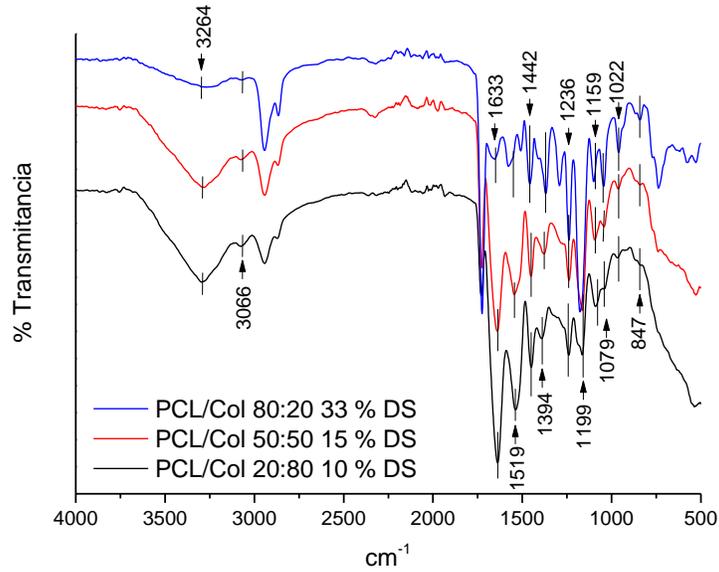


Figura 36. Espectro FTIR de PCL/Col/DS. Se muestra como la banda de los (OH)⁻¹ va creciendo por el aumento del Colágeno tipo 1 Hidrolizado en el andamio.

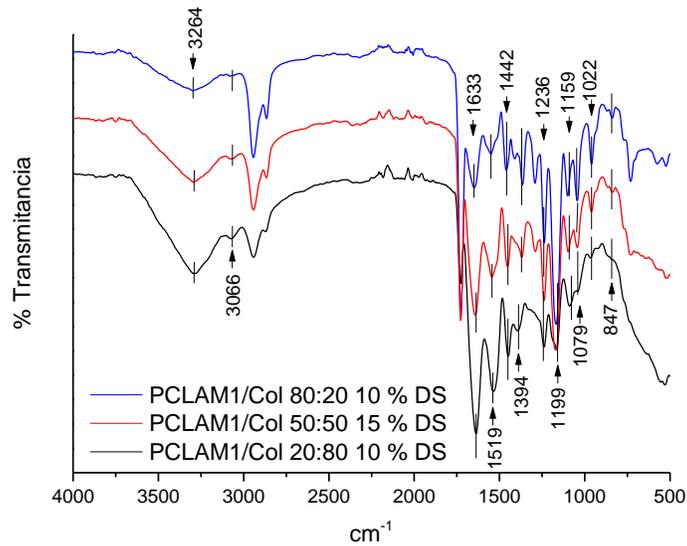


Figura 37. Espectro FTIR de PCLAM1/Col/DS. Se muestra como la banda de los (OH)⁻¹ va creciendo por el aumento del Colágeno tipo 1 Hidrolizado en el andamio.

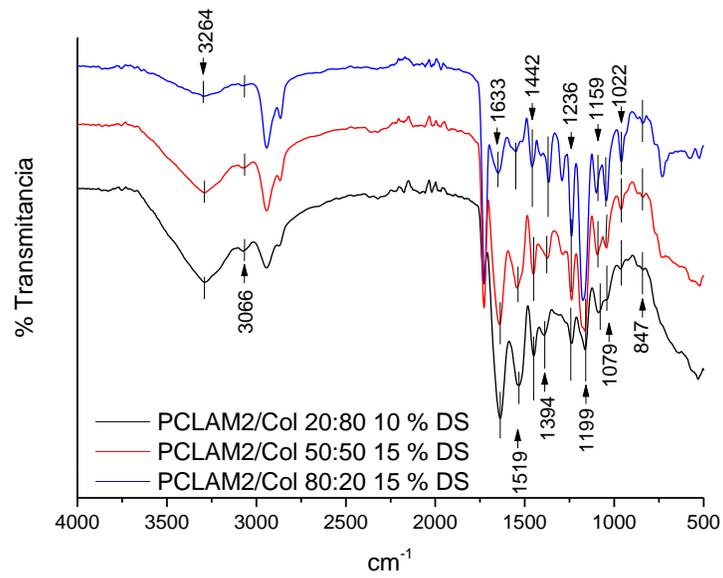


Figura 38. Espectro FTIR de PCLAM2/Col/DS. Se muestra como la banda de los $(OH)^{-1}$ va creciendo por el aumento del Colágeno tipo 1 Hidrolizado en el andamio.

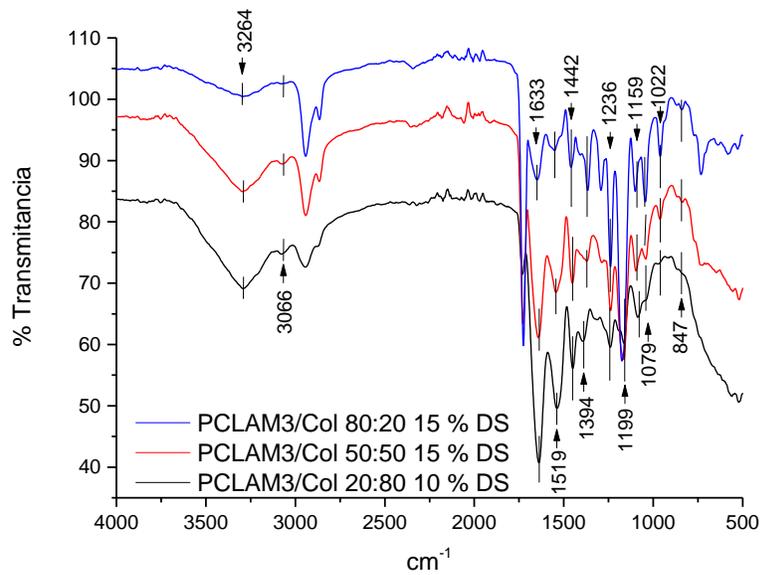


Figura 39. Espectro FTIR de PCLAM3/Col/DS. Se muestra como la banda de los $(OH)^{-1}$ va creciendo por el aumento del Colágeno tipo 1 Hidrolizado en el andamio

Tabla 18. Bandas características de Colágeno Tipo 1 Hidrolizado y Diclofenaco Sódico.

	Tipo de vibración	Bandas obtenidas (cm ⁻¹)	Referencias			
			[67]	[68]	[69]	[66]
Colágeno Tipo I Hidrolizado	Amida A y Amida B (-OH)	3264			3295, 3282	
	Amida A y Amida B (-NH)	3066		3066	2932	
	v(C=O) Amida I C=O	1633, 1519	1700-1600	1650(cuerpo), 1645(pie)	1630-1635	
	δ(CH ₂) y δ(CH ₃)	1442, 1394	1480-1350	2924(cuerpo), 2960(pie)		
	v(C-N) y δ(N-H) Amida III	1236, 1199, 1159	1300-1180	1235(cuerpo), 1242(pie)		
	v(C-O) y v(C-O-C)	1079, 1022	1100-1005	1120(cuerpo), 1122(pie)		
Diclofenaco Sódico	C _{aromático} -Cl	847				800-900
	C _{sp²} -C _{sp²} aromáticos	1394				1400-1500

En la Tabla 18 se encuentran las bandas características del Colágeno Tipo 1 Hidrolizado y el Diclofenaco Sódico de diferentes referencias y las obtenidas en este trabajo. Por medio de los espectros de FTIR podemos concluir que existe Col y DS en los andamios. Las bandas características de los polímeros (PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3) se encuentran en la *Bandas características de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3*

8.3.2. Morfología de andamios por SEM

Los andamios que contienen 50 % de polímero (PCL, PCLAM1, PCLAM2, PCLAM3) con 50 % de Colágeno Tipo 1 Hidrolizado (50:50) y 80 % de polímero y 20 % de Col (80:20), con diferentes porcentajes de Diclofenaco Sódico, dieron un diámetro de fibra menor al obtenido con los andamios de solo PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3. La contribución del Col y DS en la fabricación de los andamios fue que hicieron la solución más conductiva porque el Col es una proteína y el DS contiene Na⁺, esto provoca que aumente la conducción y el jet se adelgace más con el campo eléctrico aplicado en la técnica de electrohilado, produciendo fibras más delgadas. Se puede observar que los andamios fabricados con una relación 50:50, tienen fibras con diámetros menores a comparación a la proporción 80:20.

Se midieron 100 fibras de las micrografías obtenidas por SEM a x5000 aumentos, con estos datos se realizaron histogramas para tener la distribución de diámetros de las fibras obtenidas de cada muestra.

Se observa que la desviación estándar es muchísimo menor, si lo comparamos con el diámetro de fibras de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3, es decir, se obtienen fibras homogéneas en sus diámetros.

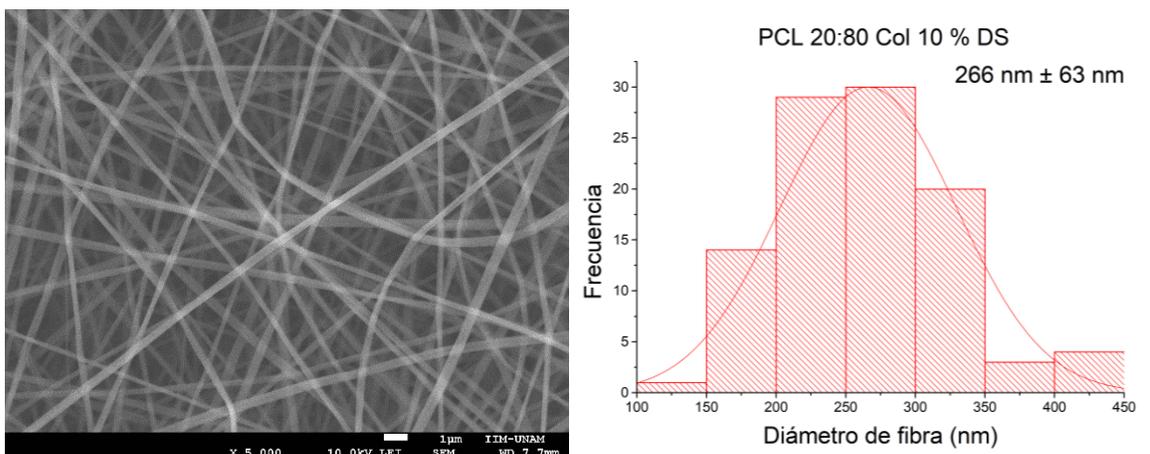


Figura 40. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCL/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 266 nm con una desviación estándar de 63 nm.

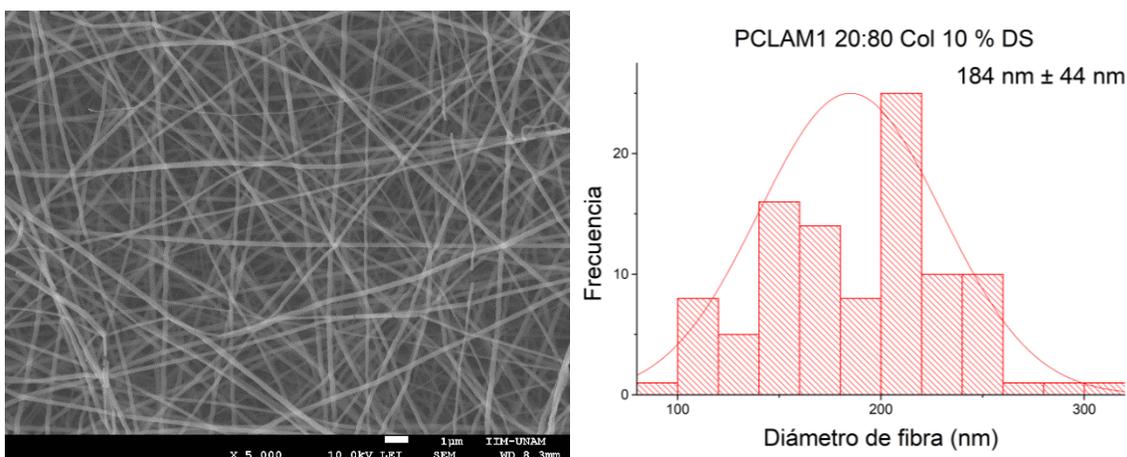


Figura 41. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM1/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 184 nm con una desviación estándar de 44 nm.

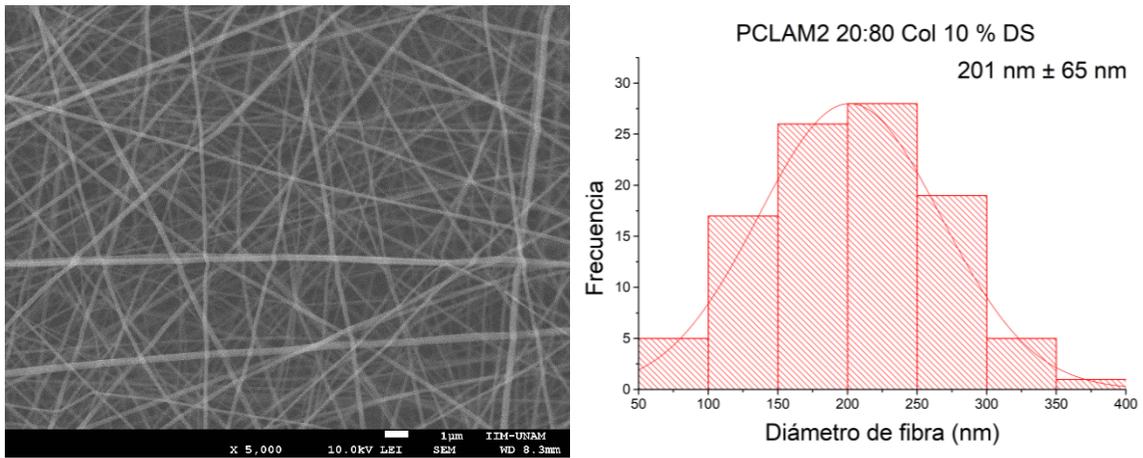


Figura 42. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM2/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 201 nm con una desviación estándar de 65 nm.

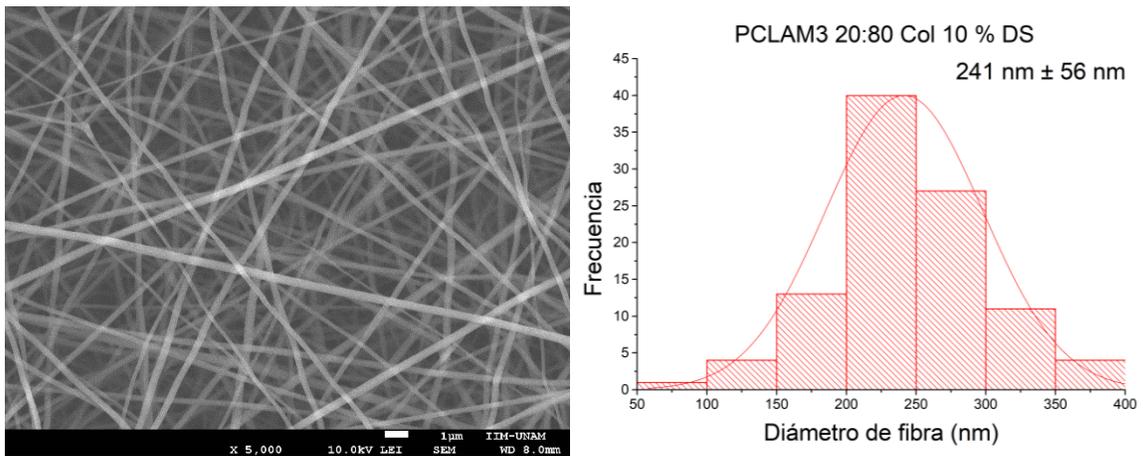


Figura 43. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM3/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 241 nm con una desviación estándar de 56 nm.

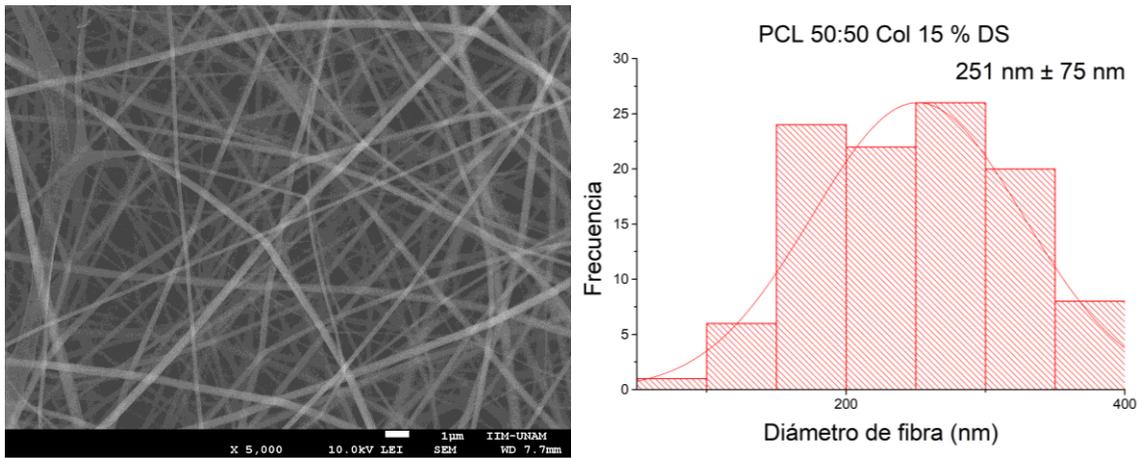


Figura 44. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCL/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 251 nm con una desviación estándar de 75 nm.

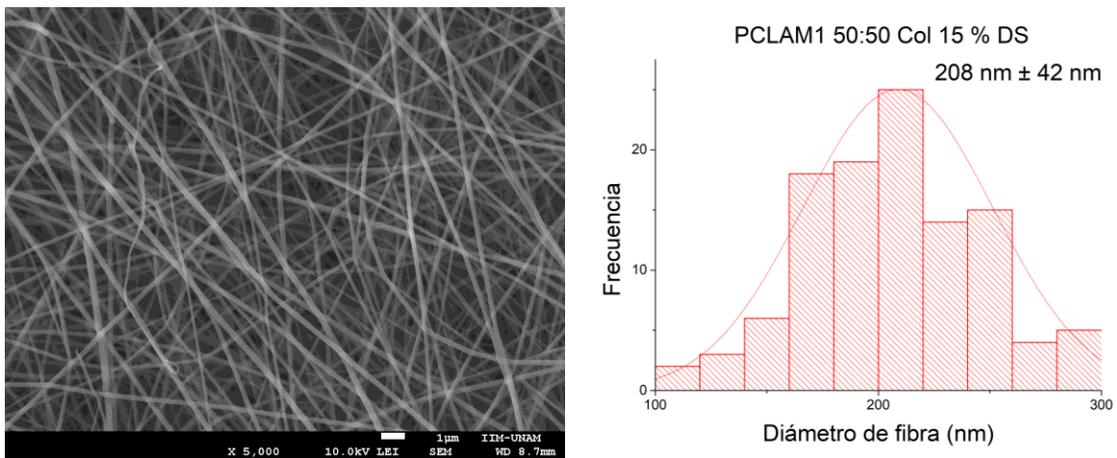


Figura 45. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM1/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 208 nm con una desviación estándar de 42 nm.

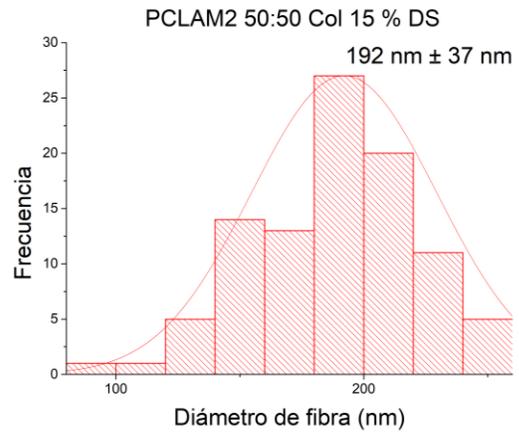
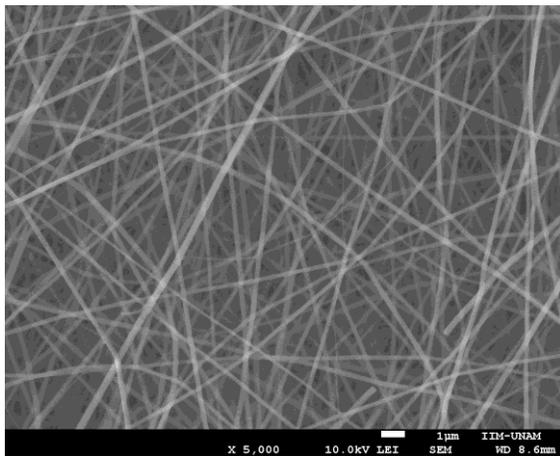


Figura 46. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM2/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 192 nm con una desviación estándar de 37 nm.

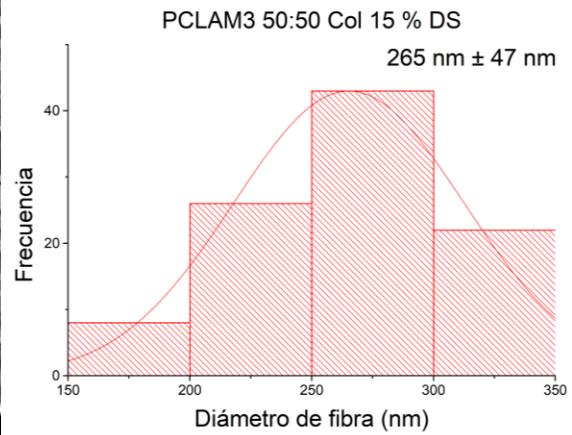
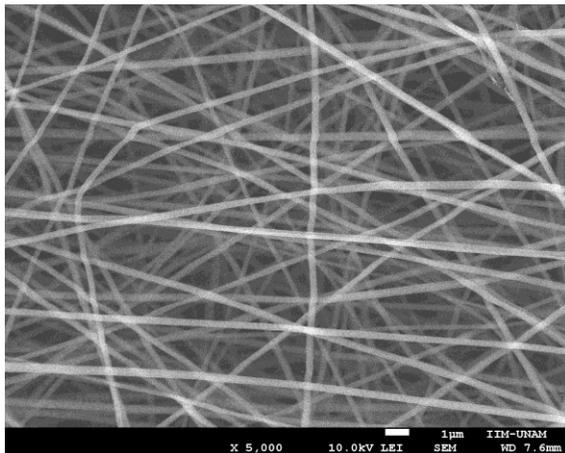


Figura 47. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM3/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 265 nm con una desviación estándar de 47 nm.

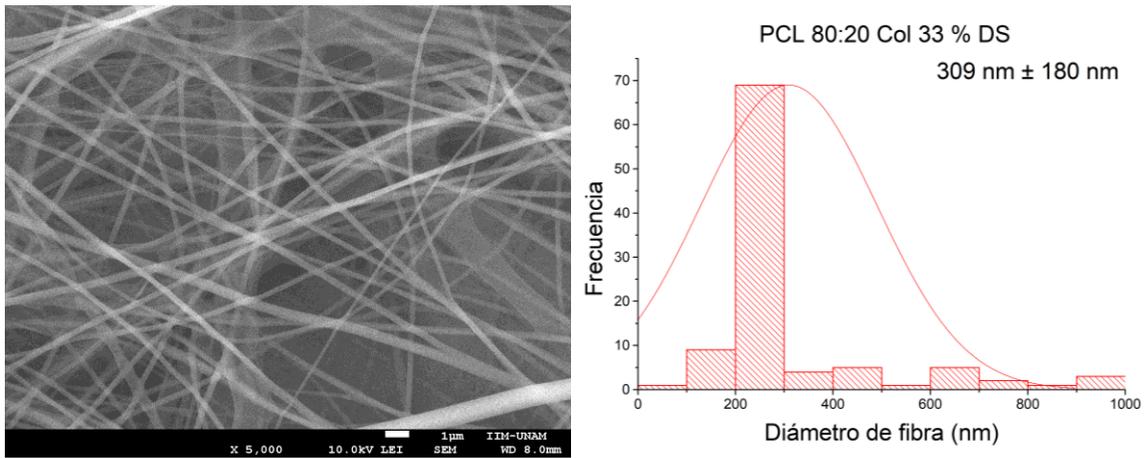


Figura 48. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCL/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 309 nm con una desviación estándar de 180 nm.

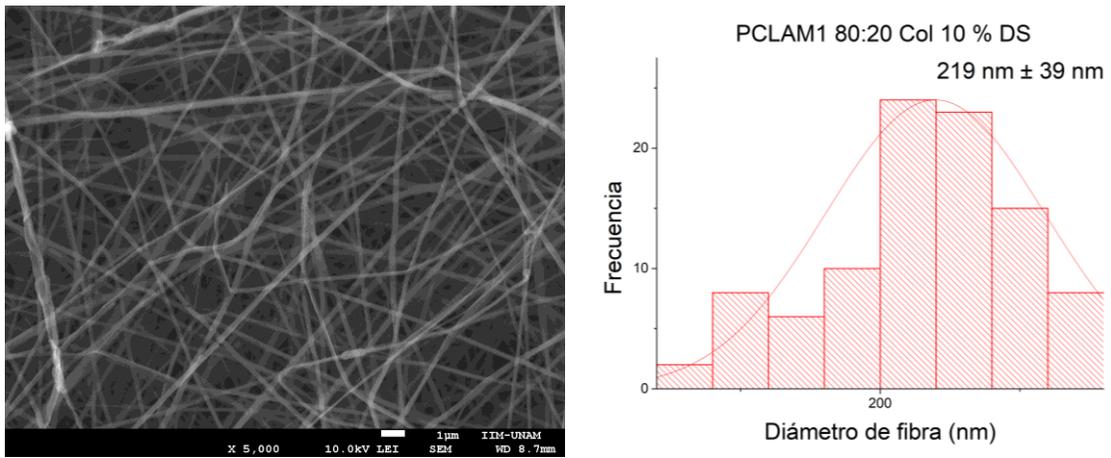


Figura 49. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM1/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 219 nm con una desviación estándar de 39 nm.

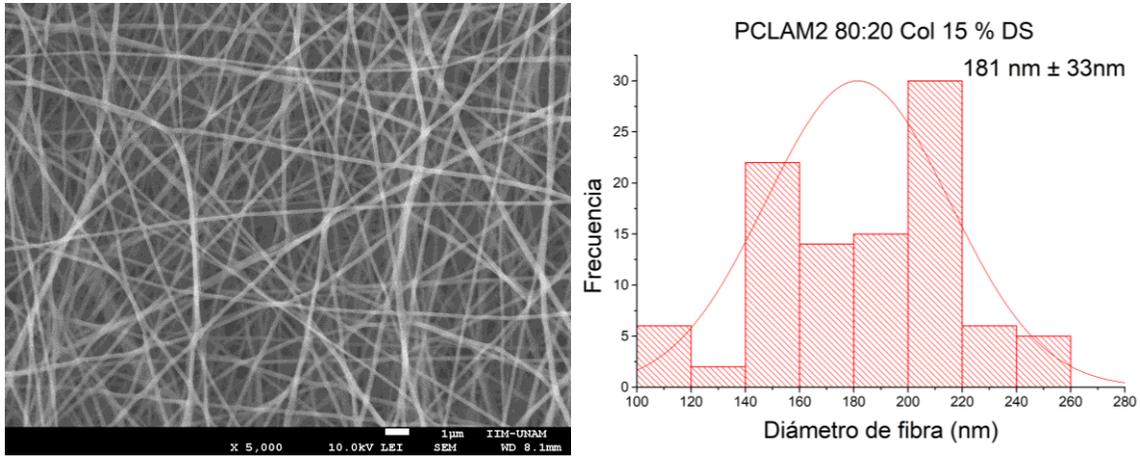


Figura 50. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM2/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 181 nm con una desviación estándar de 33 nm.

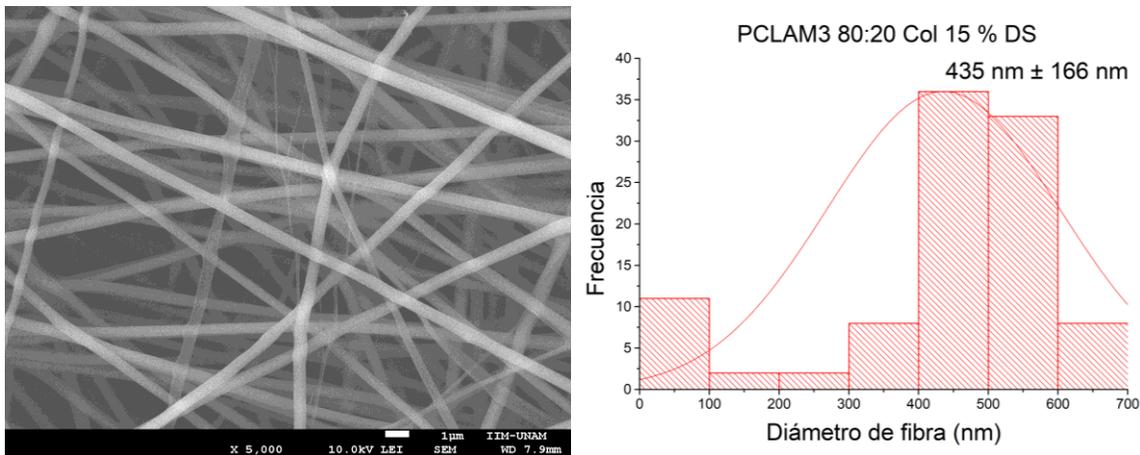


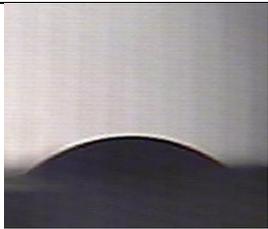
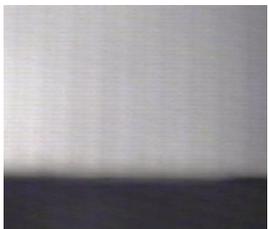
Figura 51. Micrografía de SEM y distribución de diámetros de fibras fabricadas de PCLAM3/Col/DS. Se obtuvieron diámetros de 435 nm con una desviación estándar de 166 nm.

8.3.3. Humectabilidad de los andamios PCL/Col /DS, PCLAM1/Col /DS, PCLAM2/Col /DS y PCLAM3/Col /DS

La humectabilidad se estudió por medio de la técnica de ángulo de contacto. Los andamios fabricados con (PCL, PCLAM1, PCLAM2, PCLAM3)/Col/DS, mostraron ser hidrófobos. No tienen hidrofobicidad porque contienen Col y DS que son solubles en agua. Son compuestos que interactúan con el agua y humectan la superficie del andamio. Se colocó una gota de 2 μ l en la superficie del andamio y en algunos andamios el tiempo en el cual se absorbió por completo la gota fue de 5 s, 10 s y hasta 15 s. Los andamios en los cuales tardó más la gota en ser absorbida, fueron los que contienen 80 % de polímero y 20 % de Col. Los andamios

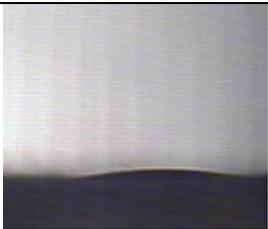
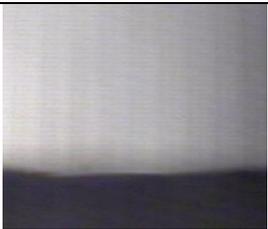
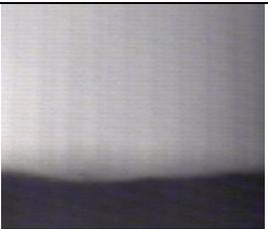
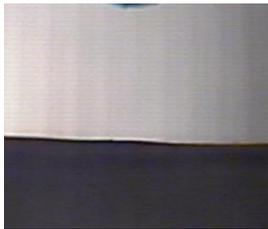
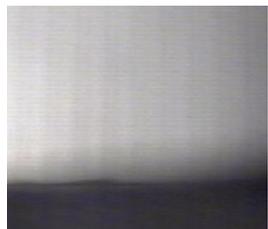
con proporción 50 % de polímero y 50 % de Col tardaron en absorber la gota entre 5 s a 10 s. No se logró medir la humectabilidad a los andamios con proporción 20 % polímero y 80 % Col, ya que fue muy complicado retirarlos de la placa y eran extremadamente frágiles.

Tabla 19. Humectabilidad de los andamios con proporción 80 % polímero y 20 % Col.

Muestra	Tiempo			
	0 s	5 s	10 s	15 s
PCL 80:20 Col				
PCLAM1 80:20 Col				
PCLAM2 80:20 Col				
PCLAM3 50:50 Col				

En la Tabla 19 se encuentra el tiempo en el cual una gota de 2 μL humedece la superficie de los andamios con proporción 80 % polímero y 20 % Col, siguen la tendencia de la Figura 29. Ángulo de contacto de andamios de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3. En la cual el mayor ángulo de contacto lo tiene PCL, seguido por PCLAM3; los andamios PCL 80:20 Col y PCLAM3 80:20 Col, tarda 15 s en humedecer la superficie de los andamios a comparación de PCLAM1 80:20 Col y PCLAM2 80:20 Col que tardan solo 10 s.

Tabla 20. Humectabilidad de los andamios con proporción 50 % polímero y 50 % Col.

Muestra	Tiempo			
	0 s	5 s	10 s	15 s
PCL 50:50 Col				
PCLAM1 50:50 Col				
PCLAM2 50:50 Col				
PCLAM3 50:50 Col				

En la Tabla 20 observamos el tiempo en el cual una gota de 2 μ L humedece la superficie de los andamios con proporción 50 % polímero y 50 % Col, al compararlo con la Tabla 19 se reduce 5 s el tiempo en el cual se humedece la superficie en PCLAM1 50:50 Col, PCLAM2 50:50 Col, PCLAM3 50:50 Col, esto es porque se reduce la cantidad de polímero que tiene el andamio y se aumenta la cantidad de Col. Para el caso de PCL 50:50 Col, el PCL es hidrofóbico y con este resultado podemos inferir que la PCL retrasa la humectación de la superficie por su alta hidrofobicidad, tomando 15 s para poder humedecer la superficie.

8.3.4. Determinación de viabilidad celular sobre los andamios

Se evaluó la viabilidad de fibroblastos humanos sobre los andamios de PCL/Col/DS, PCLAM1/Col /DS, PCLAM2/Col /DS y PCLAM3/Col /DS, teniendo el control de la evaluación de viabilidad de los andamios de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3. De igual manera, se sembraron células en una placa multipozo de cultivo con la misma densidad de los andamios para evidenciar la morfología y viabilidad de celular.

Al realizar el ensayo de viabilidad celular en los andamios con Col y DS, se observó que no había fibroblastos en ningún andamio (Figura 52, Figura 53). Para poder dar una explicación, se debe de realizar una curva de toxicidad del DS sobre los cultivos de fibroblastos para poder conocer si la cantidad de DS que contienen los andamios es toxica para estos cultivos. Se decidió después de este experimento, realizar los andamios sin DS, únicamente electrohilar polímero y Col. La ausencia de DS en los andamios, nos dio un resultado muy prometedor. Se tomaron micrografías a los 2, 8 y 14 días. Los andamios a los dos días ya se encontraban poblados de fibroblastos. Con este resultado se comprobó que los andamios al ser hidrofílicos, existe una confluencia mayor a comparación de los andamios fabricados sin Col. Se comprueba que la adición de Col tiene un impacto positivo en la confluencia de los fibroblastos sobre el andamio. Indirectamente, podemos evidenciar que a los dos días la confluencia celular aumento sobre la superficie del andamio.

Es evidente que los andamios con relación 50% de polímero, 50 % Col y 80 % polímero, 20 % de Col (Figura 54, Figura 55, Figura 56, Figura 57) a los dos días ya se encontraba con una mayor población de fibroblastos a comparación de los dos días de los andamios sin Col (Figura 32, Figura 33, Figura 34, Figura 35). Es importante resaltar la adición del Col en los andamios porque los resultados indican que potencializan la viabilidad de los fibroblastos en ensayos *in-vitro*, de igual manera, estos andamios podrían tener una aplicación directa en lesiones de piel [70], por lo tanto, favorecer a la regeneración del tejido, además de que la PCL se ha demostrado que no libera productos tóxicos [21].

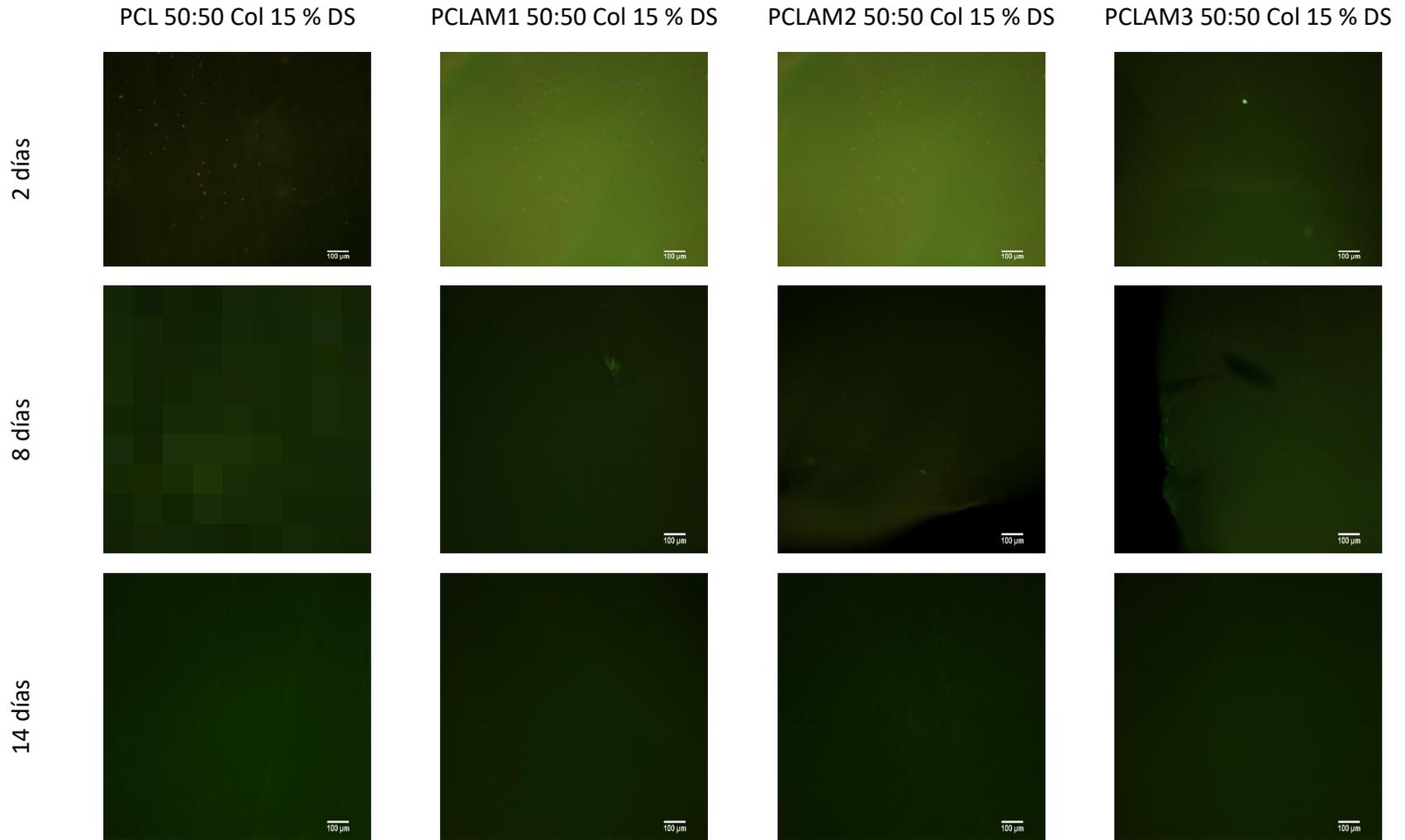


Figura 52. Cultivo de fibroblastos sobre los andamios PCL/Col/DS, PCLAM1/Col/DS, PCLAM2/Col/DS y PCLAM3/Col/DS con una relación 50 % de polímero, 50 % de Col y diferentes porcentajes de DS. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).

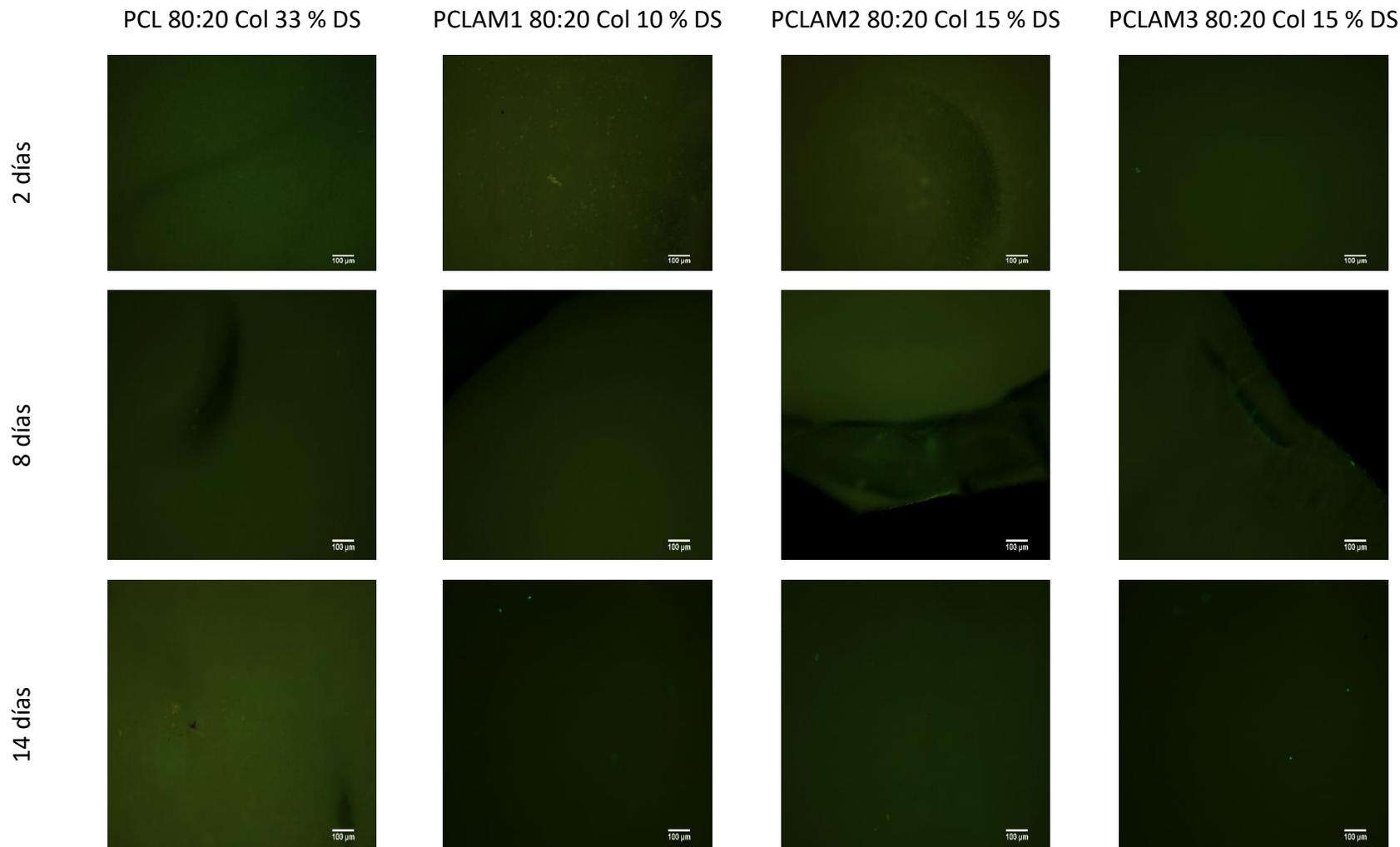


Figura 53. Cultivo de fibroblastos sobre los andamios PCL/Col/DS, PCLAM1/Col/DS, PCLAM2/Col/DS y PCLAM3/Col/DS con una relación 80 % de polímero, 20 % de Col y diferentes porcentajes de DS. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).

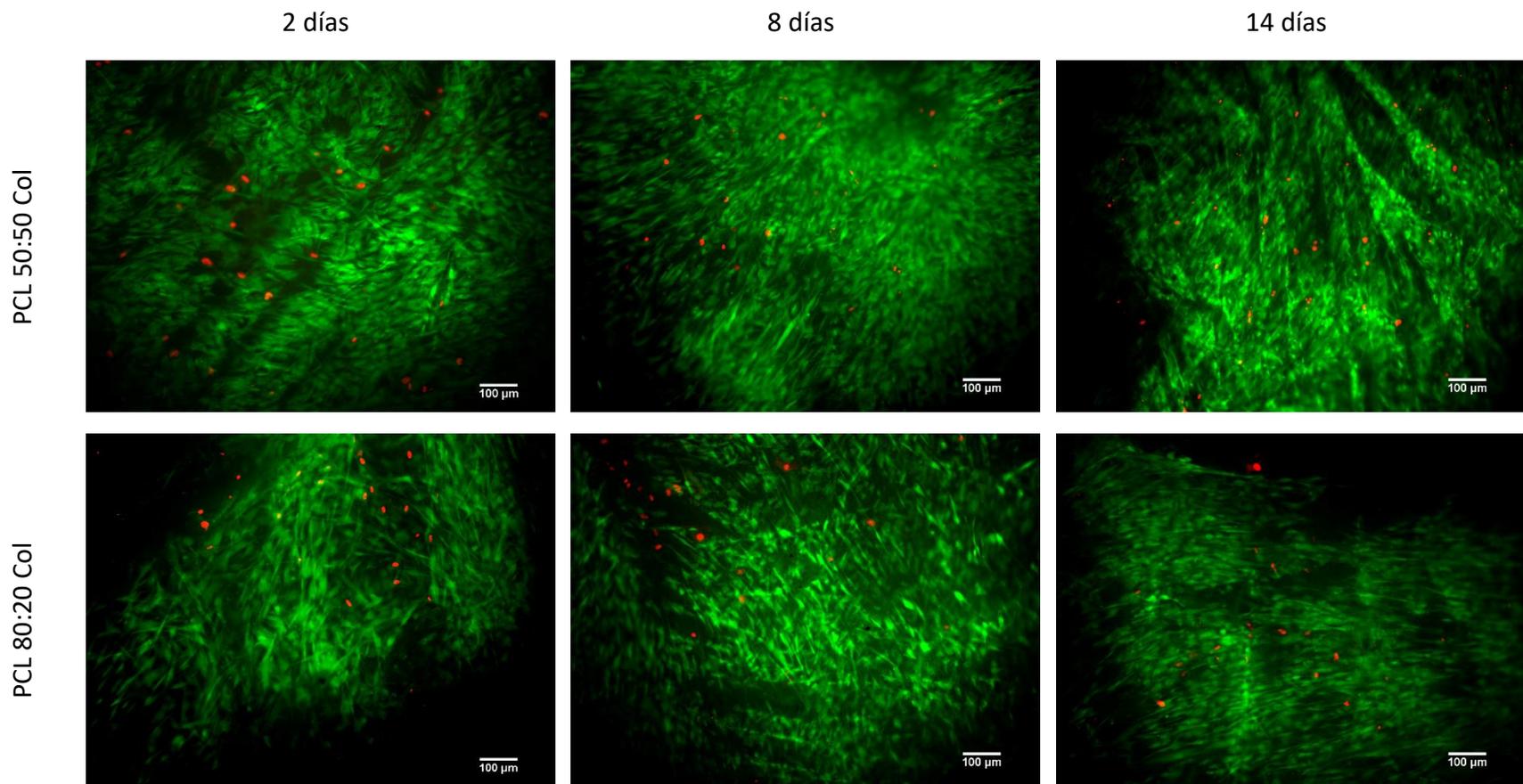


Figura 54. Cultivo de fibroblastos sobre los andamios PCL/Col a proporción 50:50 y 80:20. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. Células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).

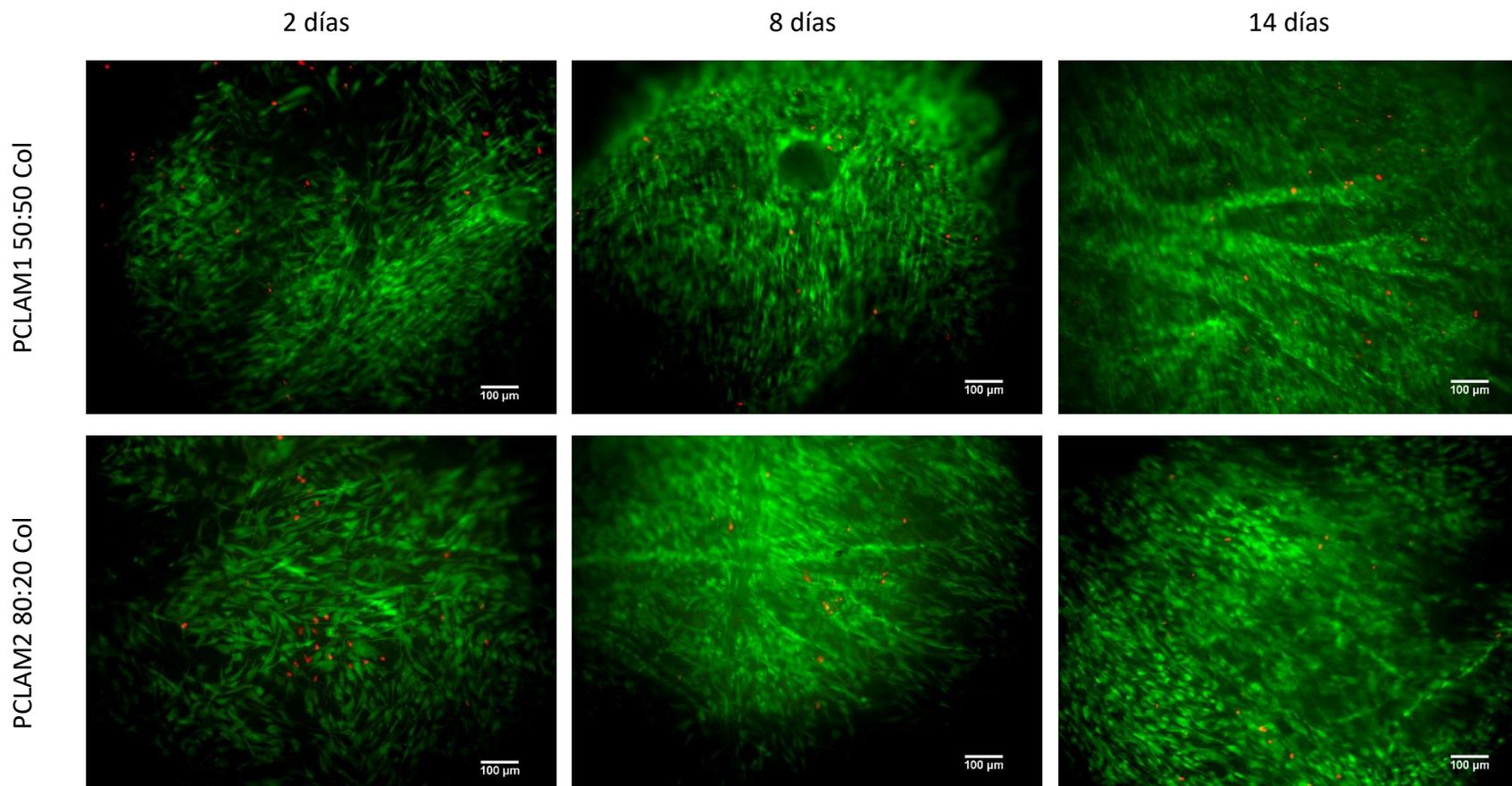


Figura 55. Cultivo de fibroblastos sobre los andamios PCLAM1/Col a proporción 50:50 y 80:20. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).

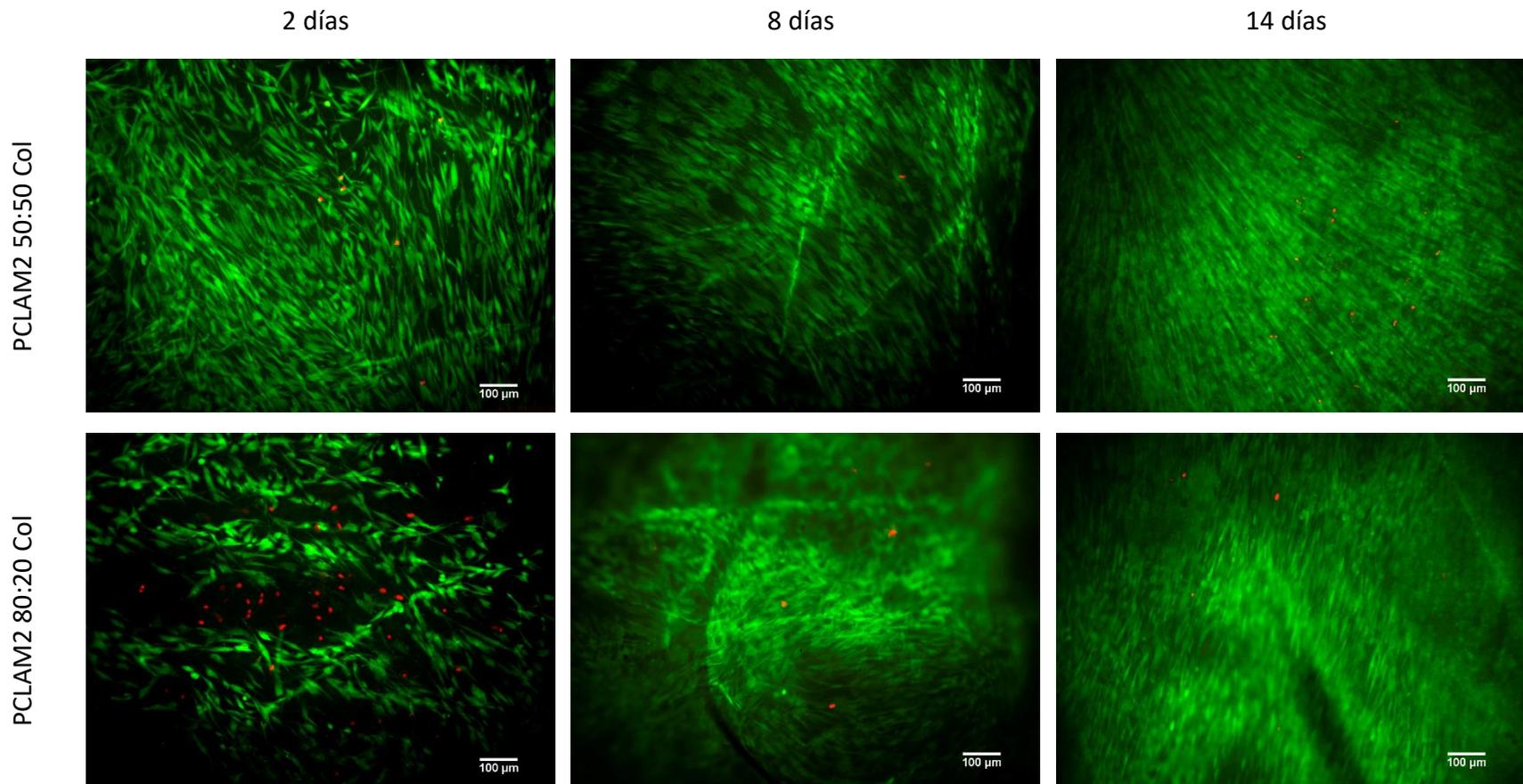


Figura 56. Cultivo de fibroblastos sobre los andamios PCLAM2/Col a proporción 50:50 y 80:20. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).

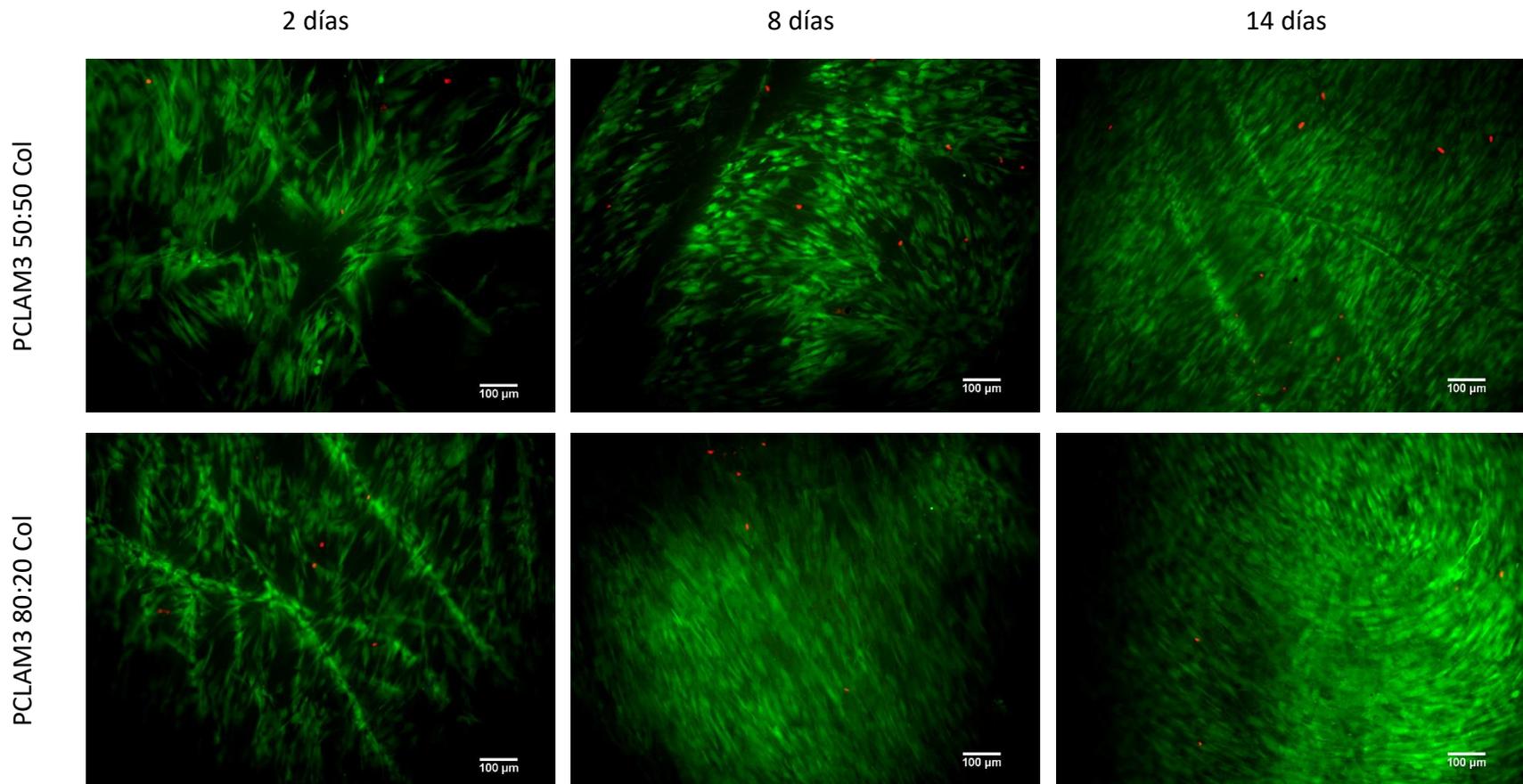


Figura 57. Cultivo de fibroblastos sobre los andamios PCLAM3/Col a proporción 50:50 y 80:20. Micrografías a x10 aumentos, tomadas a los 2, 8 y 14 días. células vivas de color verde (Calceína) y muertas de color rojo (Homodímero de etidio).

8.3.5. Liberación de fármaco

Se realizó un perfil de disolución del andamio cortado en círculo de la placa de aluminio con una circunferencia de 14 mm en 5 mL de PBS. La disolución es extremadamente importante en los sistemas farmacéuticos, especialmente en formas de dosificación sólida, el conocimiento de sus variables críticas ayuda en el desarrollo del producto, control de calidad y su aplicación [71].

Para evaluar el perfil de liberación del diclofenaco sódico de los andamios fabricados, se aplicaron tres modelos matemáticos: orden cero, primer orden y segundo orden; esto para ver a qué modelo se ajustaba nuestro perfil de disolución. Los andamios fabricados se muestran en Tabla 17. Condiciones de electrohilado para andamios (PCL, PCLAM1, PCLAM2, PCLAM3)/Col/DS. Los modelos matemáticos usados se muestran a continuación:

- Orden cero. No depende de la concentración

$$V = k$$

$$[A]_t = -kt + [A]_0$$

$$t_{1/2} = \frac{[A]_0}{2k}$$

Rapidez de reacción

Ecuación

Vida media

- Primer orden. Depende directamente a la concentración.

$$V = k[A]$$

$$\ln[A]_t = -kt \ln[A]_0$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

Rapidez de reacción

Ecuación

Vida media

- Segundo orden. Depende del producto de dos reactivos.

$$V = k[A]^2$$

$$\frac{1}{[A]_t} = kt + \frac{1}{[A]_0}$$

$$t_{0.5} = \frac{1}{k[A]_0}$$

Rapidez de reacción

Ecuación

Vida media

Tabla 21. Valores de r^2 y k obtenidos mediante la aplicación del modelo dependiente (orden cero, primer orden y segundo orden).

		PCL 50:50 Col	PCL 80:20 Col	PCLAM1 50:50 Col	PCLAM1 80:20 Col	PCLAM2 50:50 Col	PCLAM2 80:20 Col	PCLAM3 50:50 Col	PCLAM3 80:20 Col
Orden cero	r^2	0.2453	0.2108	0.2598	0.1549	0.1574	0.1621	0.2372	0.1921
	k	1×10^{-5}	1×10^{-5}	2×10^{-5}	6×10^{-6}	6×10^{-6}	5×10^{-6}	2×10^{-5}	1×10^{-5}
	$t_{1/2}$	3×10^2	5.82×10^2	4.37×10^2	7.48×10^2	7.52×10^2	7.67×10^2	4.34×10^2	6.27×10^2
Primer orden	r^2	0.5725	0.5543	0.5448	0.4452	0.3052	0.4001	0.5624	0.5338
	k	0.005	0.0054	0.0045	0.0039	0.0028	0.0037	.0047	0.0049
	$t_{1/2}$	138.62	128.36	154.03	177.73	247.55	187.33	147.47	141.45
Segundo orden	r^2	0.8722	0.8938	0.8925	0.8112	0.5286	0.7539	0.9712	0.9314
	k	3.6048	6.9539	2.1576	5.0252	2.1104	5.1168	2.75	5.5283
	$t_{1/2}$	0.0043	0.0015	0.0081	0.0016	0.0042	0.0014	0.0063	0.0022

Los análisis de los datos obtenidos se encuentran en la Tabla 21. Estos valores fueron calculados mediante una gráfica de concentración frente al tiempo. La rapidez de reacción es el modo en el que la concentración de los compuestos varía en función del tiempo. Las ecuaciones de rapidez muestran como varía la concentración de una especie con respecto al tiempo (rapidez) como función matemática de una constante de velocidad, representada por la letra k y de las concentraciones de cada especie que interviene en la reacción. De la gráfica de concentración-tiempo, se calcula de la ecuación de la recta y k es la pendiente. Las unidades de la rapidez se expresan en unidades de concentración/tiempo (M/s), k en la inversa de un tiempo (1/s).

De acuerdo con los valores de r^2 en la tabla *Tabla 21* (calculados mediante la ecuación de la recta), se observa que el ajuste de datos se encuentra a una cinética de segundo orden, es decir, que depende del producto de dos reactivos (DS y Col). Nos indica que el fármaco esta interactuando probablemente con el colágeno porque el colágeno también es soluble en agua, lo que hace que su vida media y rapidez del fármaco se vea afectada.

9. Discusión

Se logro funcionalizar la PCL con AM (PCLAM) por medio de una reacción de radicales libres con BPO como iniciador. Los polímeros obtenidos de esta funcionalización se caracterizaron por FTIR, $^1\text{H-NMR}$, GPC, TGA, DSC. Con FTIR, $^1\text{H-NMR}$ y espectrofotometría, se logró comprobar que existe la funcionalización química de la PCL. Por medio de FTIR se observó que aparece una banda alrededor de $(2890-2880)\text{ cm}^{-1}$, que corresponde al grupo $\text{R}_3\text{-C-H}$ en la posición C_2 de la PCL y C_7 del PCLAM, la cual no aparece en la PCL pura (*Figura 18 e*). Por medio de $^1\text{H-NMR}$ se determinó que existe un enlace primario entre la cadena de PCL con el anhídrido. Los espectros de PCLAM sintetizados a diferentes condiciones, muestran una señal en 3.66 ppm perteneciente a protón H_{11} y H_1 (*Figura 20*), donde se localiza el enlace entre la PCL y el PCLAM, que no se encuentra en el espectro de PCL pura. La espectrofotometría, muestra el grado de injerto que tienen los polímeros funcionalizados, tomando como referencia la PCL, los porcentajes de injerto son PCLAM1 1.63 %, PCLAM2 1.84 % y PCLAM3 2.04 %. Estos resultados muestran que el grado de injerto aumenta con el contenido de AM en la mezcla reaccionante. Los datos de GPC muestran que no hay pérdida en el peso molecular drástica después de la reacción de injerto, sin embargo, la PDI aumento con el grado de injerto. No se encontraron grandes variaciones sobre las propiedades térmicas entre el PCL y los PCLAM; la temperatura de degradación de las muestras en el “on set” fue de $\sim 356.5\text{ }^\circ\text{C}$. En los termogramas también aparece una pequeña pérdida de masa por arriba de los $450\text{ }^\circ\text{C}$, no es posible aseverar que ésta pertenezca al anhídrido, pero sí aumenta a mayor porcentaje de injerto. La T_g , T_m , T_c , X_c , se calcularon a partir de los termogramas de DSC. La única muestra que mostró T_g fue la PCL pura, en tanto que el PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3. No existen grandes variaciones en la T_m y T_c de las muestras a comparación de la PCL. El porcentaje de cristalinidad aumentó en las muestras de PCLAM1 (31.42 %), PCLAM2 (30.96 %) y disminuyó en PCLAM3 (29.80 %) por ser el que tiene mayor cantidad de injerto, esto impide que las cadenas no se puedan empaquetar de la misma manera que PCLAM1 y PCLAM2.

En la fabricación de los andamios por electrohilado, se encontraron problemas para tener fibras homogéneas, continuas y de tamaño nanométrico. Sin embargo, el diseño experimental utilizado, permitió obtener las mejores condiciones para obtener estas características. La morfología de las fibras resultó ser homogénea en los andamios de PCL y PCLAM3, pero no en PCLAM1 y PCLAM2. El incremento de grupos carbonilos (grupos polares) en el polímero, debido al anhídrido, permitió la desviación estándar del diámetro de fibra para PCLAM3 (354 ± 75). Con el aumento en el injerto fue disminuyendo el diámetro de fibra en comparación con las fibras de PCL (687 ± 94) nm, PCLAM1 (468 ± 185), PCLAM2 (395 ± 190) nm y PCLAM3 (354 ± 75). La hidrofobicidad en los andamios bajo muy poco en los andamios fabricados por PCLAM1 (124.55°) respecto de la PCL (130.46°). Con el aumento de carbonilos en el polímero, se esperaba que bajara la hidrofobicidad, pero esto no fue así, la hidrofobicidad aumento (PCLAM1 < PCLAM2 < PCLAM3). Esto se atribuye a que el tamaño de fibra juega un factor clave en esta prueba. A mayor diámetro, habrá poros

más grandes donde podrá interiorizarse el agua y en él los de menor diámetros, los poros serán más reducidos, impidiendo que el agua pueda interiorizarse fácilmente en el andamio. Las pruebas mecánicas también se vieron afectadas por el diámetro de fibra; los resultados del módulo elástico fueron PCL (3.86 MPa), PCLAM1 (1.84 MPa), PCLAM2 (3.73 MPa) y PCLAM3 (4.53 MPa); el diámetro de fibra tiene un impacto en estos resultados, recordemos que PCLAM1 y PCLAM2, tienen mayor diámetro y PCLAM3 el menor. Los ensayos de viabilidad celular con fibroblastos humanos permiten concluir que existe viabilidad celular en los andamios fabricados de PCL, PCLAM1, PCLAM2 y PCLAM3. Los ensayos de viabilidad se realizaron a 2, 8 y 14 días. Al paso de los días las células colonizaban más área de los andamios.

Se fabricaron andamios con los polímeros de este trabajo con Colágeno Tipo 1 Hidrolizado y Diclofenaco Sódico. Los ensayos de viabilidad no dieron resultados porque al parecer el DS está a una concentración muy alta para el cultivo de fibroblastos humanos. Se debe hacer una curva de toxicidad del DS sobre estas células para conocer el rango de concentración adecuada de DS. Se optó por preparar los andamios sin el DS. Se cultivaron con fibroblastos humanos con una densidad de 15000 células y estos tienen mayor viabilidad celular a comparación de los andamios que no contienen Colágeno, se concluye cualitativamente con base en la rápida colonización de los fibroblastos en los andamios con Colágeno.

Se realizó un perfil de liberación con los andamios fabricados con DS para conocer cómo se liberaba del andamio. Los valores se ajustaron a un modelo de segundo orden. Esto muestra que el fármaco está interactuando con otro compuesto, se infiere que es con el Colágeno porque también es soluble en agua, lo que hace que su vida media se vea afectada.

10. Conclusión

Se logró funcionalizar la PCL con AM mediante una reacción de radicales libres.

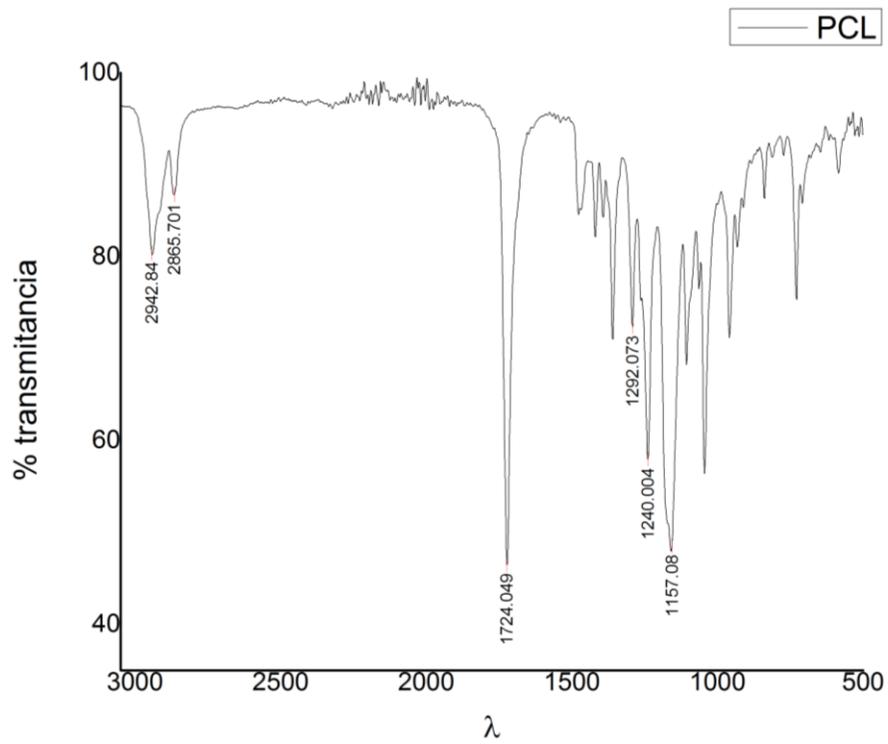
Se fabricaron andamios electrohilados de PCLAM, obteniendo fibras continuas, sin bulbos y en la mayoría de los andamios fabricados fueron homogéneos. Al adicionar Colágeno Tipo I Hidrolizado y DS, bajo el diámetro de fibra promedio y su desviación estándar, es decir, hubo más homogeneidad en los diámetros de fibra.

Existe viabilidad celular en los andamios fabricados de PCLAM con y sin Colágeno a los 2, 8 y 14 días. Los andamios que contienen DS, no tienen viabilidad. Los ensayos de viabilidad no dieron resultados porque al parecer el DS está a una concentración muy alta para el cultivo de fibroblastos humanos. Se debe hacer una curva de toxicidad del DS sobre estas células para conocer el rango de concentración adecuada de DS. Los andamios que contienen Colágeno tipo I Hidrolizado cualitativamente se observan que los fibroblastos colonizan más rápido la superficie del andamio. Indirectamente, podemos evidenciar que a lo largo de los días la confluencia celular aumentó sobre la superficie de los andamios. Es evidente como de los 2 días a los 14 días, se presentó una mayor confluencia ya que se puede ver colonizado todo el andamio de fibroblastos, es decir, existe viabilidad celular en el andamio. De igual forma, indirectamente con la morfología alargada que presentaron podemos sugerir adhesión celular. Con estos resultados *in vitro* podemos proponer estos andamios para la experimentación *in vivo* y su futura aplicación en regeneración de lesiones de piel.

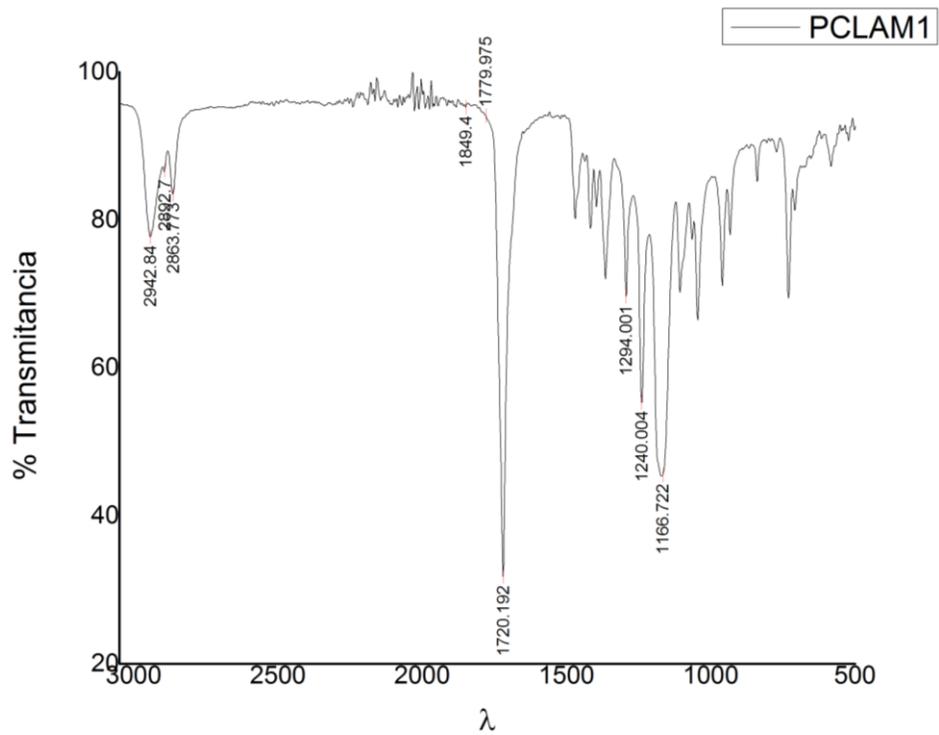
Se realizó un perfil de liberación con los andamios fabricados con DS para conocer cómo se liberaba del andamio. Los valores se ajustaron a un modelo de segundo orden. Esto muestra que el fármaco está interactuando con otro compuesto, se infiere que es con el Colágeno porque también es soluble en agua.

11. Anexos

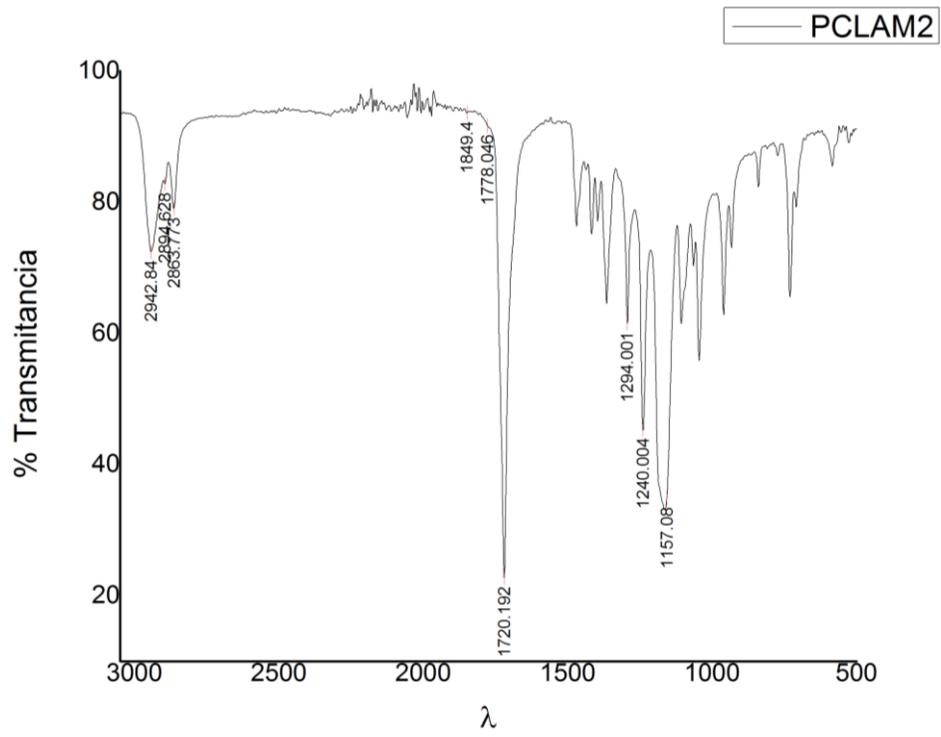
Anexo 1. Espectro FTIR de poli(ϵ -caprolactona)



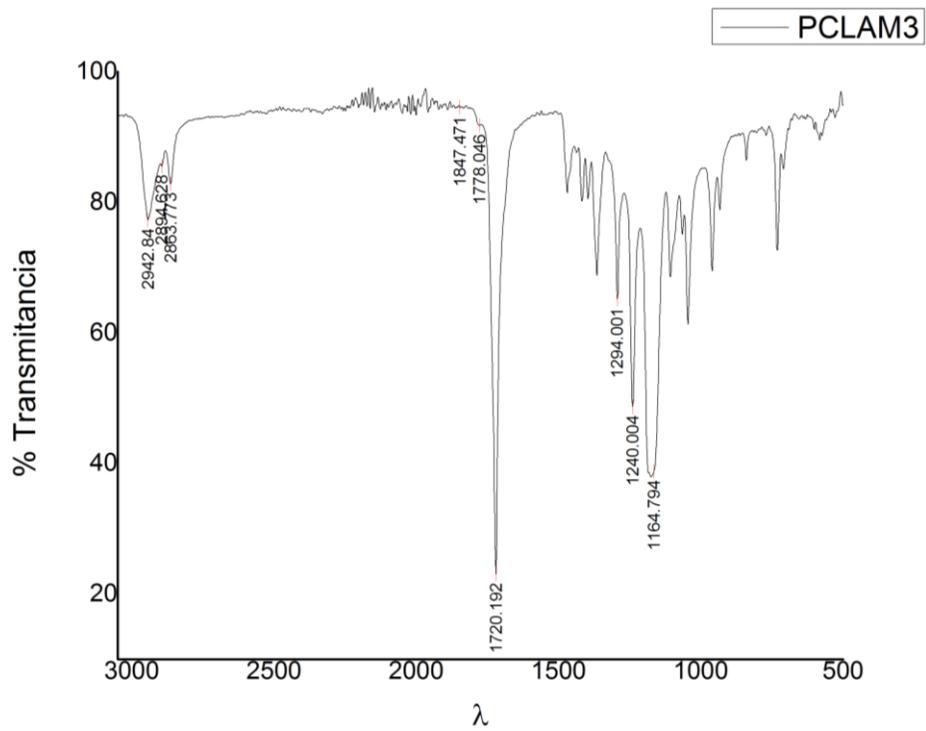
Anexo 2. Espectro FTIR PCLAM1



Anexo 3. Espectro FTIR PCLAM2



Anexo 4. Espectro FTIR PCLAM3



12. Referencias

1. Liu M, Zeng X, Ma C, Yi H, Ali Z, Mou X, Li S, Deng Y, He N. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Res* [Internet]. 2017;5(November 2016):17014. Available from: <http://www.nature.com/articles/boneres201714>
2. Grainger DW. Cell-based drug testing; this world is not flat. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;69–70.
3. Schuerlein S, Schwarz T, Krzimirski S, Gätzner S, Hoppensack A, Schwedhelm I, Schweinlin M, Walles H, Hansmann J. A versatile modular bioreactor platform for Tissue Engineering. *Biotechnol J*. 2017;12(2).
4. Bačáková L, Novotná K, Pařízek M. Polysaccharides as cell carriers for tissue engineering: The use of cellulose in vascular wall reconstruction. *Physiol Res*. 2014;63(SUPPL.).
5. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog Polym Sci*. 2010;35(4):403–40.
6. Chew S, Wen Y, Dzenis Y, Leong K. The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2006;12(36):4751–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2396225&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=12&issue=36&spage=4751>
7. Janik H, Marzec M. A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2015;48:586–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.037>
8. Wissing TB, Bonito V, Smits AIPM. Biomaterial-driven in situ cardiovascular tissue engineering – a multi-disciplinary perspective. Submitted [Internet]. 2017;(May):1–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41536-017-0023-2>
9. Babita Mahanta RN, Mahanta B. An Overview of Various Biomimetic Scaffolds: Challenges and Applications in Tissue Engineering. *J Tissue Sci Eng* [Internet]. 2014;5(2):1–5. Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/an-overview-of-various-biomimetic-scaffolds-challenges-and-applications-in-tissue-engineering-2157-7552.1000137.php?aid=26218>
10. B. Subia JK and SCK. World's largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications. In: Eberli D, editor. *Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for Potential Tissue Engineering Applications* [Internet]. INTECH; 2010. p. 524. Available from: <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/9798.pdf>
11. Villarreal-Gómez LJ, Cornejo-Bravo JM, Vera-Graziano R, Grande D. Electrospinning as a powerful technique for biomedical applications: A critically selected survey. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2016;27(2):157–76.

12. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv.* 2010;28(3):325–47.
13. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2013;19(6):485–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672709>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3826579>
14. Liu Q, Zhu J, Zhang L, Qiu Y. Recent advances in energy materials by electrospinning. *Renew Sustain Energy Rev* [Internet]. 2016;(May):1–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.281>
15. Chong EJ, Phan TT, Lim IJ, Zhang YZ, Bay BH, Ramakrishna S, Lim CT. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomater.* 2007;3(3 SPEC. ISS.):321–30.
16. Li Z, Wang C. One-Dimensional nanostructures. 2013;15–29. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-36427-3>
17. Chew S, Wen Y, Dzenis Y, Leong K. The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine. *Curr Pharm Des.* 2006;12(36):4751–70.
18. Hollinger JO. An introduction to biomaterials. Second edi. CRC Press; 2011. 644 p.
19. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J Polym Sci Part B Polym Phys.* 2011;49(12):832–64.
20. Tokiwa Y, Calabria BP, Ugwu CU, Aiba S. Biodegradability of plastics. *Int J Mol Sci.* 2009;10(9):3722–42.
21. Wang L, Abedalwafa M, Wang F, Li C. Biodegradable Poly-Epsilon-Caprolactone (Pcl) for Tissue Engineering Applications: a Review. *Rev Adv Mater Sci* [Internet]. 2013;34:123–40. Available from: http://www.ipme.ru/e-journals/RAMS/no_23413/02_23413_abedalwafa.pdf
22. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci.* 2010;35(10):1217–56.
23. Muenprasat D, Suttireungwong S, Tongpin C. Functionalization of Poly (Lactic Acid) with Maleic Anhydride for Biomedical Application. *J Met Mater Miner.* 2010;20(3):189–92.
24. Habeeb AFSA, Cassidy HG, Singer SJ. Molecular Structural Effects Produced in Proteins .By Reaction With Succinic Anhydride. *Ann Inst Pasteur Bacteriol Rev A KEPES J MONOD, Compt rend Biochim Biophys Acta Gen Microbiol J Bacteriol Biochim Biophys Acta.* 1955;240(25):7–28.
25. Kamble P, Sadarani B, Majumdar A, Bhullar S. Nanofiber based drug delivery systems for skin: A promising therapeutic approach. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet].

- 2017;41:124–33. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224717301417>
26. Terese Winslow. Melanoma Anatomy [Internet]. Medical and Scientific Illustration. 2008 [cited 2017 Jan 11]. Available from:
<http://www.teresewinslow.com/portshow.asp?portfolioid=%7B4B56C61F-9C24-47C6-9F4D-9444E1D75BA2%7D>
 27. Engel J, Bächinger HP. Structure, stability and folding of the collagen triple helix. *Top Curr Chem*. 2005;247:7–33.
 28. Babitha S, Rachita L, Karthikeyan K, Shoba E, Janani I, Poornima B, Purna Sai K. Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. *Int J Pharm*. 2017;523(1):52–90.
 29. Müller-Esterl W. Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida. In: 8: Las proteínas como componentes estructurales. 2008. p. 124–33.
 30. Lackie JM. D [Internet]. The Dictionary of Cell & Molecular Biology. 2013. 162-198 p. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849311000040>
 31. Kamble P, Sadarani B, Majumdar A, Bhullar S. Nanofiber based drug delivery systems for skin: A promising therapeutic approach. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2017;41:124–33.
 32. Sebe I, Szabó P, Kállai-Szabó B, Zelkó R. Incorporating small molecules or biologics into nanofibers for optimized drug release: A review. *Int J Pharm* [Internet]. 2015;494(1):516–30. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.054>
 33. Ambrosio PJS. 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 [Internet]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2015. Available from:
<http://132.248.9.195/ptd2015/agosto/305059693/Index.html>
 34. John J, Tang J, Yang Z, Bhattacharya M. Synthesis and Characterization of Anhydride-Functional Polycaprolactone. *Polym Sci Part A Polym Chem*. 1996;35(6):1139–48.
 35. Kim CH, Cho KY, Park JK. Grafting of glycidyl methacrylate onto polycaprolactone: Preparation and characterization. *Polymer (Guildf)*. 2001;42(12):5135–42.
 36. Lawson J, Erjavec J, Madrigal JL. Estrategias experimentales para el mejoramiento de la calidad en la industria. Grupo Editorial Iberoamericana; 1992. 378 p.
 37. Ito Y, Inaba M, Chung D, Imanishi Y. Control of Water Permeation by pH and Ionic Strength through a Porous Membrane Having Poly(carboxylic acid) Surface-Grafted. *Macromolecules* [Internet]. 1992;25(26):7313–6. Available from:

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma00052a037>

38. Bracco G, Holst B. Surface science techniques. Vol. 51, Springer Series in Surface Sciences. 2013. 3-5 p.
39. Shoichet MS. Polymer scaffolds for biomaterials applications. *Macromolecules*. 2010;43(2):581–91.
40. Janik H, Marzec M. A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds. *Mater Sci Eng C*. 2015;48:586–91.
41. Peppas NA, Sahlin JJ. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int J Pharm*. 1989;57(2):169–72.
42. Stevens MP. POLYMER CHEMISTRY An Introduction. Second Edi. Oxford University Press, Inc.; 1990. 191-192 p.
43. Detyothin S, Selke SEM, Narayan R, Rubino M, Auras R. Reactive functionalization of poly(lactic acid), PLA: Effects of the reactive modifier, initiator and processing conditions on the final grafted maleic anhydride content and molecular weight of PLA. *Polym Degrad Stab* [Internet]. 2013;98(12):2697–708. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.10.001>
44. Nakason C, Kaesaman A, Supasanthitikul P. The grafting of maleic anhydride onto natural rubber. *Polym Test*. 2004;23(1):35–41.
45. Socrates G. Infrared and Raman characteristic group frequencies. Third Edit. John Wiley & Sons Ltd; 2001. 50-67 p.
46. Elzein T, Nasser-Eddine M, Delaite C, Bistac S, Dumas P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *J Colloid Interface Sci*. 2004;273(2):381–7.
47. Guzman M, Murillo EA. Functionalization of Low-density Polyethylene with Maleic Anhydride in the Molten State. *Polim E Tecnol*. 2014;24(2):162–9.
48. Tsagkalias IS, Manios TK, Achilias DS. Effect of Graphene Oxide on the Reaction Kinetics of Methyl Methacrylate In Situ Radical Polymerization via the Bulk or Solution Technique. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2017;9(9):432. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4360/9/9/432>
49. English PD and. Handbook of biodegradable polymers. Wiseman AJDK y DM, editor. CRC Press; 1997. 63-77 p.
50. Unger M, Vogel C, Siesler HW. Molecular weight dependence of the thermal degradation of poly(epsilon-caprolactone): a thermogravimetric differential thermal Fourier transform infrared spectroscopy study. *Appl Spectrosc* [Internet]. 2010;64(7):805–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20615294>
51. Yamamoto S, Back RA. The thermal and photochemical decomposition of succinic

- anhydride and 2,3-dimethyl succinic anhydride in the gas phase. *Can J Chem*. 1983;59:1342–6.
52. Yang TB, Sun XL, Ren ZJ, Li HH, Yan SK. Crystallizability of poly(ϵ -caprolactone) blends with poly(vinylphenol) under different conditions. *Chinese J Polym Sci (English Ed)*. 2014;32(9):1119–27.
 53. Wang Y, Rodriguez-Perez MA, Reis RL, Mano JF. Thermal and thermomechanical behaviour of polycaprolactone and starch/polycaprolactone blends for biomedical applications. *Macromol Mater Eng*. 2005;290(8):792–801.
 54. Patrício T, Bártolo P. Thermal stability of PCL/PLA blends produced by physical blending process. In: *Procedia Engineering*. 2013. p. 292–7.
 55. Ren K, Wang Y, Sun T, Yue W, Zhang H. Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2017;78:324–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.084>
 56. Hekmati AH, Khenoussi N, Nouali H, Patarin J, Drean J-Y. Effect of nanofiber diameter on water absorption properties and pore size of polyamide-6 electrospun nanoweb. *Text Res J* [Internet]. 2014;84(19):2045–55. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0040517514532160>
 57. Huang F, Wei Q, Cai Y, Wu N. Surface structures and contact angles of electrospun poly(vinylidene fluoride) nanofiber membranes. *Int J Polym Anal Charact*. 2008;13(4):292–301.
 58. K.E. Suckling CJS. *Biological Chemistry: The Molecular Approach to Biological System*. In Cambridge University Press; 1980. p. 26.
 59. Liu H, Tang C. Electrospinning of Cellulose Acetate in Solvent Mixture N,N-Dimethylacetamide (DMAc)/Acetone. *Polym J*. 2007;39(1):65–72.
 60. Agache PG, Monneur C, Leveque JL, De Rigal J. Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo. *Arch Dermatol Res* [Internet]. 1980;269(3):221–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7235730>
 61. Pawlaczyk M, Lelonkiewicz M, Wieczorowski M. Age-dependent biomechanical properties of the skin. *Postep Dermatologii i Alergol*. 2013;30(5):302–6.
 62. Averous L, Moro L, Dole P, Fringant C. Properties of thermoplastic blends: Starch-polycaprolactone. *Polymer (Guildf)*. 2000;41(11):4157–67.
 63. Croisier F, Duwez AS, Jérôme C, Léonard AF, Van Der Werf KO, Dijkstra PJ, Bennink ML. Mechanical testing of electrospun PCL fibers. *Acta Biomater* [Internet]. 2012;8(1):218–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.08.015>
 64. Lowery JL, Rutledge GC, Deen WM. *Characterization and Modification of Porosity in Electrospun Polymeric Materials for Tissue Engineering Applications* by LIBRARIES.

Chemical Engineering. University of Kentucky; 2009.

65. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol.* 2008;26(11):1269–75.
66. Milani ME, Ponzi MI, Herrera P, Flores RC. Intercalación de Diclofenac Sódico en Compuestos tipo Hidrotalcitas. 2013;
67. Belbachir K, Noreen R, Gouspillou G, Petibois C. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem.* 2009;395(3):829–37.
68. Nazeer RA, Kavitha R, Ganesh RJ, Naqash SY, Kumar NSS, Ranjith R. Detection of collagen through FTIR and HPLC from the body and foot of *Donax cuneatus* Linnaeus, 1758. *J Food Sci Technol.* 2014;51(4):750–5.
69. De Campos Vidal B, Mello MLS. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron.* 2011;42(3):283–9.
70. Bonvallet PP, Culpepper BK, Bain JL, Schultz MJ, Thomas SJ, Bellis SL. Microporous Dermal-Like Electrospun Scaffolds Promote Accelerated Skin Regeneration. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2014;20:2434–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24568584>
71. Zylberberg C, Matosevic S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Deliv.* 2016;23(9):3319–29.