



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**APÓSITOS MICROESTRUCTURADOS DE POLI(ÓXIDO DE
ETILENO)/ÁCIDO POLI(LÁCTICO-CO-GLICÓLICO)
PARA LA LIBERACIÓN DE LACTOFERRINA BOVINA**

TESIS

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

PRESENTA:

GERARDO CEDILLO SERVÍN

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. YARELI ROJAS AGUIRRE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM

DR. GENARO VÁZQUEZ VICTORIO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A Maricela y Gerardo, mamá y papá, a quienes dedico este trabajo con amor y gratitud. Gracias por ser los pilares de mi vida, verdaderos ejemplos de entrega y compromiso de quienes cada día aprendo más.

A Isabel y Paulina, por sus valiosas y duraderas amistades y por ser grandes ejemplos de vocación y pasión por la ciencia.

A mis amigos del posgrado, Ángela, Maira, Geovanny, Ema, Sayab, Liliana, Tannia, Anahí, Sara, Vladimir, Angelita y Juan Manuel, por su amistad y las experiencias que hemos vivido juntos.

A la Dra. Concepción Peña, por el gran apoyo tanto académico como personal que me brindó durante esta etapa.

Al Dr. Ricardo Vera, por todo el apoyo y la confianza incondicionales que ha depositado en mí desde el primer día.

A la Dra. Cristina Piña, por siempre recibirme con los brazos abiertos.

A mis compañeros del laboratorio de Nanofibras y el laboratorio de Biomateriales en el IIM, por sus enseñanzas en el día a día.

A la Sra. Isabel Gómez, la Lic. Diana Arias, la Sra. María Luisa Reséndiz y la Lic. Esther Carrillo de la Coordinación del PCEIM, por dar todo su esfuerzo para que los estudiantes podamos hacer nuestra labor.

Índice General

Resumen	v
Abstract	vi
Productos obtenidos	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tablas	xii
Abreviaturas	xiii
Agradecimientos	xvi

PARTE 1: Marco teórico y estado del arte

Capítulo 1. Introducción	3
1.1 La diabetes mellitus tipo 2 y las úlceras de pie diabético: un problema de salud pública	3
1.2 Tratamientos clínicos actuales para heridas cutáneas	5
1.3 Justificación	8
1.4 Objetivos	8
1.5 Hipótesis	9
1.6 Bibliografía de capítulo	9
Capítulo 2. Antecedentes	11
2.1 Heridas cutáneas	11
2.1.1 Anatomía de la piel	11
2.1.2 Procesos en la regeneración de heridas	12
2.1.3 Alteraciones en la regeneración derivadas de la diabetes mellitus tipo 2	15
2.2 Agentes estimuladores de la regeneración cutánea	17
2.2.1 Factores de crecimiento y reguladores genéticos	17
2.2.2 Angiogénesis	18
2.2.3 Inflamación	20
2.3 La leche y la lactoferrina bovina	21
2.3.1 Composición de la leche	21

2.3.2 Lactoferrina: propiedades y aplicaciones terapéuticas	23
2.4 Bibliografía de capítulo	26
Capítulo 3. Técnicas y métodos generales	31
3.1 Procesamiento de mezclas poliméricas con agentes bioactivos	31
3.1.1 Electrohilado de mallas fibrilares	31
3.1.2 Electrorrociado de partículas	32
3.2 Técnicas de caracterización de materiales	32
3.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	32
3.2.2 Análisis termogravimétrico (TGA)	33
3.2.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	35
3.2.4 Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	36
3.2.5 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)	38
3.2.6 Difracción de rayos X (XRD)	39
3.3 Estudio de la cinética de liberación de agentes bioactivos	40
3.4 Bibliografía de capítulo	43

PARTE 2: Desarrollo de apósitos mediante electrorrociado y electrohilado para su aplicación en la liberación cutánea de lactoferrina bovina

Capítulo 4. Fabricación y caracterización de mallas electrohiladas reforzadas mecánicamente a base de poli(óxido de etileno) y dextrina cíclica altamente ramificada ...	49
4.1 Resumen de capítulo	49
4.2 Contexto	49
4.3 Materiales y métodos	47
4.3.1 Materiales	51
4.3.2 Fabricación de microfibras de dextrina	51
4.3.3 Fabricación de microfibras a base de PEO y de mezclas DEX/PEO ...	52
4.3.4 Caracterización morfológica, estructural, química y mecánica de microfibras de DEX, PEO y DEX/PEO	52
4.3.5 Análisis estadístico	53
4.4 Resultados y discusión	53
4.4.1 Fabricación de mallas electrohiladas de DEX, PEO y PEX/PEO	53
4.4.2 Morfología de fibras por FESEM	54

4.4.3	Cristalinidad por XRD	56
4.4.4	Interacciones intermoleculares entre DEX y PEO por espectroscopía FTIR	57
4.4.5	Caracterización por espectroscopía Raman	59
4.4.6	Estructura química por NMR de ¹ H y ¹³ C	61
4.4.7	Análisis uniaxial esfuerzo-deformación de mallas fibrilares de DEX/PEO	62
4.5	Conclusiones y perspectivas	64
4.6	Bibliografía de capítulo	65
Capítulo 5.	Fabricación por electrorrociado y microemulsión de micropartículas de copolímero en bloque poli(ε-caprolactona-etilenglicol) sintetizado por catálisis enzimática y su caracterización	69
5.1	Resumen de capítulo	69
5.2	Contexto	69
5.3	Materiales y métodos	71
5.3.1	Materiales	71
5.3.2	Caracterización química y térmica de PCL-PEG400	72
5.3.3	Fabricación de partículas electrorrociadas de PCL-PEG400	73
5.3.4	Fabricación de partículas de PCL-PEG400 por microemulsión	74
5.3.5	Caracterización morfológica de partículas de PCL-PEG400	74
5.4	Resultados y discusión	74
5.4.1	Análisis espectroscópico por ATR-FTIR y NMR	74
5.4.2	Análisis térmico del copolímero PCL-PEG400 por TGA y DSC	77
5.4.3	Morfología de las micropartículas de PCL-PEG400 producidas por electrorrociado y microemulsión	79
5.5	Conclusiones y perspectivas	80
5.6	Bibliografía de capítulo	81
Capítulo 6.	Encapsulación de lactoferrina bovina en micropartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) mediante electrorrociado de disoluciones no emulsificadas y su caracterización como sistemas de liberación controlada	85
6.1	Resumen de capítulo	85
6.2	Contexto	86
6.3	Materiales y métodos	88
6.3.1	Materiales	88
6.3.2	Electrorrociado de micropartículas de PLGA y PLGA/bLf	89

6.3.3 Caracterización morfológica	89
6.3.4 Caracterización del tamaño de partícula	89
6.3.5 Caracterización espectroscópica por ATR-FTIR	90
6.3.6 Caracterización térmica por TGA y DSC	90
6.3.7 Ensayo de liberación de bLf <i>in vitro</i>	90
6.3.8 Análisis estadístico y ajuste de modelos	91
6.4 Resultados y discusión	91
6.4.1 Morfología de las micropartículas electrorrociadas de PLGA y PLGA/bLf	91
6.4.2 Determinación del tamaño de partícula por DLS	92
6.4.3 Caracterización espectroscópica por ATR-FTIR	93
6.4.4 Caracterización térmica de las micropartículas electrorrociadas de PLGA y PLGA/bLf	95
6.4.5 Liberación acumulada <i>in vitro</i> y cinética de liberación de bLf	97
6.5 Conclusiones y perspectivas	99
6.6 Bibliografía de capítulo	100
Capítulo 7. Conclusiones y perspectivas generales	105
7.1 Conclusiones generales	105
7.2 Propuesta: Parche a base de fibras electrohiladas de poli(óxido de etileno) cargadas con partículas electrorrociadas de ácido poli(láctico-co-glicólico) con lactoferrina bovina encapsulada	105
7.3 Perspectivas generales	106

Resumen

Actualmente en el sistema mexicano de salud pública, las heridas cutáneas de difícil regeneración (en particular, las úlceras de pie diabético) siguen representando un alto gasto, ya que su incidencia está asociada al alza en trastornos metabólicos, los tratamientos son de larga duración y las heridas son vulnerables a infecciones oportunistas. Los métodos clínicamente prevalentes en la actualidad se enfocan prioritariamente en prevenir infecciones por microorganismos y en establecer barreras sobre la herida. Sin embargo, en quemaduras y heridas de curso crónico, es importante promover los procesos regenerativos naturales y/o disminuir los procesos que inhiben la regeneración. Por esto, todavía se requieren dispositivos y agentes terapéuticos novedosos de bajo costo y alta eficacia y escalabilidad para estimular de manera activa la regeneración de la piel no sólo a nivel de prevención de infecciones, sino también en los niveles estructural, vascular e inmunológico. Recientemente en modelos animales de heridas cutáneas, se ha mostrado que los extractos de leche bovina estimulan la regeneración con resultados comparables a la fenitoína, un fármaco que puede usarse como referencia. En particular, la lactoferrina —una proteína presente en el suero lácteo— no sólo tiene dominios de unión de alta afinidad a iones hierro, lo cual le otorga propiedades antimicrobianas, sino que es un agente capaz de reducir la diferenciación de células dendríticas, mitigando los estados de inflamación crónica. Ante esta problemática, se reporta en este trabajo el diseño, fabricación y caracterización de un sistema polimérico microestructurado para la liberación de lactoferrina bovina con el objetivo de contribuir al desarrollo de nuevas propuestas terapéuticas para heridas cutáneas de difícil regeneración.

En este trabajo, se diseñó y evaluó la viabilidad de un apósito a base de mallas fibrilares hidrosolubles y partículas poliméricas cargadas con lactoferrina bovina, como sistemas de liberación controlada. Para esto, mediante electrohilado, se fabricaron mallas fibrilares de mezclas de poli(óxido de etileno) con dextrina cíclica altamente ramificada; y se caracterizaron sus propiedades químicas, morfológicas y mecánicas. Además, se evaluó el electrorrociado en comparación con la microemulsión como técnica de producción de micropartículas a base de polímeros biocompatibles, en particular, de poli(ϵ -caprolactona-co-etilenglicol) —un copolímero en bloque sintetizado por catálisis enzimática. Una vez validadas las técnicas de electrohilado y electrorrociado, se prepararon micropartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) mediante electrorrociado de disoluciones no emulsificadas y se analizó la cinética de liberación *in vitro* de lactoferrina bovina. Por último, tomando estos resultados en conjunto, se incluye una propuesta para la fabricación de mallas fibrilares electrohiladas de poli(óxido de etileno) cargadas con micropartículas electrorrociadas de ácido poli(láctico-co-glicólico) y lactoferrina bovina, esto para su desarrollo como apósitos con potencial aplicación en la regeneración acelerada de heridas cutáneas.

Abstract

In Mexico's current public health system, hard-to-heal skin wounds, especially diabetic foot ulcers, involve high costs since their incidence is associated with ongoing increases in metabolic disorder cases, their treatments are long-lasting, and the wounds are susceptible to opportunistic infections. Currently, prevalent clinical approaches focus on preventing microbial infections and creating mechanical barriers over the wound. However, in chronic wounds and burns, it is essential to promote the natural regenerative mechanisms and mitigate any process that inhibits regeneration. For this reason, there is still a widespread need for novel low-cost therapeutic agents and devices with high efficiency and scalability to actively stimulate skin wound healing, not only by preventing infections, but also by addressing problems at the structural, vascular, and immune levels. Recent studies in skin-wound animal models have shown that bovine milk extracts can stimulate healing with comparable results to those of phenytoin, a drug that can be used as a reference. In particular, lactoferrin —a bovine milk whey protein— has domains with affinity to iron ions, which provide antimicrobial properties and can reduce dendritic cell differentiation, thus mitigating chronic inflammation. In the face of this problem, this work presents the design, fabrication, and characterization of a microstructured polymer system for the release of bovine lactoferrin, intending to contribute to the development of novel therapeutic alternatives for skin wound healing.

This work presents the design and practical viability evaluation of a wound dressing based on water-soluble fiber meshes and bovine lactoferrin-loaded polymer particles as controlled release systems. To this end, electrospinning was selected to fabricate microfiber meshes from poly(ethylene oxide)/highly branched cyclic dextrin blends, and their chemical, morphological, and mechanical properties were characterized. Additionally, electrospaying was evaluated and compared to microemulsion as a method for the production of biocompatible polymer-based microparticles, in particular, poly(ϵ -caprolactone-co-ethylene glycol) —a block copolymer synthesized by enzymatic catalysis. Once the electrospinning and electrospaying techniques were validated, emulsionless electrospaying was used to prepare poly(lactide-co-glycolide) microparticles, which were then evaluated to determine their release kinetics *in vitro* of bovine lactoferrin. Lastly, these results are taken altogether to justify a proposal for the fabrication of electrospun poly(ethylene oxide) fiber meshes loaded with poly(lactide-co-glycolide)/bovine lactoferrin microparticles, with the goal of developing them into wound dressings with potential application in accelerated skin wound healing.

Productos obtenidos

Artículos publicados en revistas indexadas

Rodríguez-Zamora P, Peña-Juárez MC, **Cedillo-Servín G**, Paloalto-Landon A, Ortega-García I, Maaza M, Vera-Graziano R. Characterization of mechanically reinforced electrospun dextrin-polyethylene oxide sub-microfiber mats. *Polym Eng Sci*. Julio 2019: pen.25177. doi:10.1002/pen.25177 (Factor de impacto JCR 2019: 1.917)

Artículos en preparación

Peña-Juarez MC, Pino-Ramos VH, **Cedillo-Servín G**, Bucio-Carrillo E, Vera-Graziano R. Emulsionless electrospray formulation, physico-chemical characterization, and release kinetics *in vitro* of poly(lactide-co-glycolide) microparticles encapsulating bovine lactoferrin.

Peña-Juarez MC, **Cedillo-Servín G**, Martinez-Richa A, Vera-Graziano R. Electro spraying and microemulsion synthesis and characterization of enzymatically polymerized poly(ϵ -caprolactone-*block*-ethylene glycol) microparticles.

Registro de propiedad intelectual

Peña-Juárez MC, **Cedillo-Servín G**, Vera-Graziano R. Solicitud de patente mexicana ante el Instituto Mexicano de Propiedad Industrial, número MX/a/2019/012105, “Proceso de fabricación de andamios para regeneración de tejidos mediante proteínas inmunomoduladoras que promueven procesos antiinflamatorios”, registrada el 9 de octubre de 2019.

Participación en congresos

“Nanocápsulas de ácido poli(láctico-co-glicólico) para el almacenamiento y transporte de proteínas.” Peña-Juárez MC, **Cedillo-Servín G**, Vera-Graziano R. 31° Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México, Puebla, México, 14–18 de octubre de 2018. (cartel y memorias)

“Reforzamiento de microfibras poliméricas electrohiladas de dextrina cíclica ramificada con poli(óxido de etileno) como andamios cargados con fármacos para la regeneración de heridas de piel.” Rodríguez-Zamora P, Peña-Juárez MC, **Cedillo-Servín G**, García I, Vera-Graziano R, Maaza M. 2° Congreso Internacional de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología, Tijuana, México, 25–27 de septiembre de 2019. (exposición oral)

“Micro- y nanotransporters of bioactive molecules of PCL-b-PEG made by electro spraying and microemulsion.” Peña-Juárez MC, **Cedillo-Servín G**, Martínez-Richa A, Vera-Graziano R. 32° Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México, Veracruz, México, octubre de 2019. (cartel) *Premio al mejor cartel en la categoría de Polímeros para aplicaciones biomédicas*.

“Membranas de quitosano y ácido láctico como liberadores tópicos de proteínas lácteas para regeneración cutánea.” **Cedillo-Servín G**, Peña-Juárez MC, Campos-Muñoz MG, Escobar-Chávez JJ, Vera-Graziano R. 6° Congreso Internacional de la Red de Biomateriales e Ingeniería de Órganos y Tejidos, Monterrey, México, octubre de 2019. (cartel)

“Surfactant- and water-free encapsulation of lactoferrin in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with slow release properties *via* emulsionless electrospray.” **Cedillo-Servín G**, Peña-Juarez MC, Pino-Ramos VH, Bucio-Carrillo E, Vera-Graziano R. 1° Congreso LatinXChem, modalidad virtual, septiembre de 2020. (cartel)

“Evaluation of chitosan/glycerol/lactic acid films as low-cost elastic, bioadhesive skin wound dressings.” **Cedillo-Servín G**, Peña-Juárez MC, Vera-Graziano R. 33° Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México, modalidad virtual, noviembre de 2020. (cartel)

“Chitosan-lactic acid films as low-cost bovine milk whey protein carriers for enhanced skin wound healing.” **Cedillo-Servín G**, Peña-Juárez MC, Vera-Graziano R. Materials Research Society Spring/Fall Meeting 2020, modalidad virtual, noviembre de 2020. (cartel)

Índice de figuras

Figura 1.1 Índices anuales de amputaciones mayores en México en comparación con otros países miembros de la OCDE en 2006. Índices anuales de amputaciones en México en 2004 y 2013 según el grado de amputación.	4
Figura 2.1 Estructuras principales de la piel.	11
Figura 2.2 Capas de la piel.	12
Figura 2.3 Fases de la regeneración de heridas cutáneas.	13
Figura 2.4 Acumulación de células inmunes en el sitio de la herida durante las distintas fases de una regeneración sin alteraciones.	14
Figura 2.5 El lactato es un subproducto de la glucólisis en el metabolismo celular anaeróbico.	19
Figura 2.6 Vía disfuncional de señalización celular en hiperglucemia que inhibe la expresión de factores asociados a la revascularización. Vía hiperglucémica corregida por la administración de deferoxamina.	20
Figura 2.7 Fases y microestructura de la leche.	22
Figura 2.8 Posibles mecanismos del aumento en la actividad contráctil de fibroblastos dérmicos humanos en respuesta a la lactoferrina.	25
Figura 3.1 Arreglo experimental típico en la técnica de electrorrociado para la deposición de partículas a partir de una disolución de polímero.	32
Figura 3.2 Componentes de un microscopio electrónico de barrido.	33
Figura 3.3 Componentes de la balanza térmica en un equipo de TGA.	34
Figura 3.4 Curvas características de TGA para distintos tipos de transiciones o eventos térmicos de un material. Curva típica de TGA para un material con tres eventos a distintas temperaturas de pérdida de masa.	34
Figura 3.5 Curva característica de DSC para el polietilentereftalato, mostrando una transición vítrea, una transición de cristalización y un punto de fusión.	36
Figura 3.6 La espectroscopía FTIR opera con base en la generación de vibraciones en los enlaces atómicos.	37
Figura 3.7 Espectro típico de FTIR del formaldehído, con las asignaciones de las señales de absorción.	37

Figura 3.8 Regiones de absorción para diferentes grupos funcionales en el espectro infrarrojo.	38
Figura 3.9 Esquema que relaciona la posición de una señal en el espectro NMR con la densidad electrónica y grado de apantallamiento del átomo asociado.	38
Figura 3.10 Espectro NMR típico de la etilmetilcetona y la información extraída del espectro, ejemplificando el proceso de asignación de señales.	39
Figura 3.11 Difracción de rayos X en un cristal, en donde la relación entre la distancia interplanar y el ángulo del haz difractado está dada por la ley de Bragg.	40
Figura 3.12 Difractograma típico de DRX mediante el método de polvos.	40
Figura 4.1 Reacción de ciclización de amilopectina catalizada por una enzima ramificadora. Estructura molecular general de la dextrina cíclica altamente ramificada.	50
Figura 4.2 Fotografías de mallas fibrilares electrohiladas de DEX depositadas sobre un sustrato de vidrio. Micrografías representativas de FESEM de las fibras electrohiladas de DEX, mostrando superficies lisas y morfología uniforme sin defectos ni bulbos.	54
Figura 4.3 Micrografías representativas de FESEM de fibras electrohiladas de DEX/PEO a proporciones.	55
Figura 4.4 Distribuciones de diámetros de fibra en las mallas electrohiladas de DEX y DEX/PEO a diferentes proporciones.	56
Figura 4.5 Difractogramas de XRD de dextrina y PEO no tratados y de fibras electrohiladas de mezclas DEX/PEO con proporciones 2:1, 1:1 y 1:2.	57
Figura 4.6 Espectros FTIR de fibras electrohiladas de PEO, dextrina y sus mezclas con razones de peso 1:2, 1:1 y 2:1. Espectros FTIR en la región de absorción de C–O–C de las moléculas de PEO en fibras de PEO puro y de mezclas DEX/PEO. Espectros FTIR en la región de absorción de O–H para las fibras de PEO, DEX y mezclas DEX/PEO.	58
Figura 4.7 Espectros Raman de las fibras electrohiladas de PEO, dextrina y sus mezclas con proporciones DEX/PEO 1:2, 1:1 y 2:1.	60
Figura 4.8 Espectros NMR de ^1H y ^{13}C APT de dextrina sin tratamiento previo en DMSO-d_6 como disolvente.	62
Figura 4.9 Propiedades mecánicas de las mallas fibrilares electrohiladas de PEO puro y mezclas DEX/PEO a diferentes proporciones, medidas con ensayos de tensión uniaxial. ..	63

Figura 5.1 Esquema de síntesis del copolímero en bloque PCL-PEG400 por catálisis enzimática libre de disolvente en perlas macroporosas de resina.	72
Figura 5.2 Espectros ATR-FTIR del copolímero PCL-PEG400 sintetizado por catálisis enzimática, tanto sin tratamiento previo como electrorrociado en micropartículas.	75
Figura 5.3 Estructura molecular del copolímero PCL-PEG400 tribloque y dibloque. Espectros NMR de ¹ H y ¹³ C-APT del copolímero PCL-PEG400 (CDCl ₃ , 400 MHz) con las señales asignadas a los átomos correspondientes.	76
Figura 5.4 Termogramas de TGA del copolímero PCL-PEG400 y el polímero PCL de referencia, mostrando las temperaturas umbral (<i>onset</i>) de degradación, las temperaturas para un peso de 90% y los pesos de residuo a 500 °C.	78
Figura 5.5 Curvas de DSC del copolímero PCL-PEG400 y el polímero PCL de referencia, mostrando las temperaturas de transición vítrea y las temperaturas y entalpías/calores de fusión.	78
Figura 5.6 Micrografías de FESEM de micropartículas del copolímero PCL-PCL400 producidas por electrorrociado y microemulsión.	80
Figura 6.1 Esquema gráfico del proceso de encapsulación de bLf en partículas electrorrociadas de PLGA y la caracterización <i>in vitro</i> de su cinética de liberación.	85
Figura 6.2 Micrografías representativas de FESEM de micropartículas de PLGA y PLGA/bLf.	92
Figura 6.3 Distribución bimodal de los diámetros hidrodinámicos de las partículas de PLGA/bLf, determinada por DLS.	93
Figura 6.4 Espectros ATR-FTIR de micropartículas de PLGA y PLGA/bLf, así como de PLGA y bLf sin tratamiento previo.	94
Figura 6.5 Termograma TGA de las micropartículas electrorrociadas de PLGA y PLGA/bLf bajo atmósfera de nitrógeno, mostrando la temperatura con el 10% de pérdida de peso, la temperatura de descomposición y el porcentaje de peso residuo a 700 °C.	96
Figura 6.6 Curvas de DSC de las micropartículas electrorrociadas de PLGA y de PLGA/bLf bajo atmósfera de nitrógeno, mostrando la temperatura de transición vítrea.	96
Figura 6.7 Liberación total <i>in vitro</i> , en mg de proteína por gramo de partículas, de las micropartículas electrorrociadas de PLGA/bLf a 37 °C en disolución salina isotónica, ajustada a una ecuación Peppas-Sahlin.	98

Índice de tablas

Tabla 1.1 Tipos de apósitos disponibles en el mercado para el manejo de heridas cutáneas.	7
Tabla 2.1 Estrategias para la regeneración de heridas crónicas mediante la administración de agentes biológicos.	18
Tabla 2.2 Composición proteica de la leche bovina.	22
Tabla 4.1 Parámetros de disolución y electrohilado usados para la fabricación de microfibras.	52
Tabla 4.2 Asignación de señales de absorción en los espectros FTIR de fibras electrohiladas de DEX y PEO.	58
Tabla 4.3 Asignación de señales de absorción en los espectros Raman de las fibras electrohiladas de DEX y PEO.	61
Tabla 5.1 Asignación de señales de absorción en los espectros ATR-FTIR de PCL-PEG400, PCL-PEG400 electrorrociado y PCL de referencia, según las contribuciones de cada bloque polimérico.	75
Tabla 5.2 Resultados de análisis térmico por TGA y DSC de PCL y PCL-PEG400.	79
Tabla 6.1 Asignación de señales de absorción en los espectros ATR-FTIR de micropartículas de PLGA y PLGA/bLf, así como PLGA y bLf sin tratamiento previo.	94
Tabla 6.2 Parámetros estimados y valores de R^2 y AIC_c obtenidos del ajuste de diferentes modelos de cinética de liberación a los datos experimentales del sistema PLGA/bLf.	98

Abreviaturas

%c	Grado de cristalinidad
ACN	Acetonitrilo
AIC	Criterio de información de Akaike (Akaike's information criterion)
AIC _c	Criterio de información de Akaike de segundo orden (second-order Akaike's information criterion)
APC	Célula presentadora de antígeno (antigen-presenting cell)
APT	Prueba de protón enlazado (attached proton test)
ATP	Adenosina trifosfato (adenosine triphosphate)
ATR	Reflectancia total atenuada (attenuated total reflectance)
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos (basic fibroblast growth factor)
bLf	Lactoferrina bovina (bovine lactoferrin)
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (complementary deoxyribonucleic acid)
cP	Centipoise
DEX	Dextrina cíclica altamente ramificada
DFO	Deferoxamina
DLS	Dispersión dinámica de luz (dynamic light scattering)
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (differential scanning calorimetry)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor)
ERK1/2	Cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2)
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de América (U.S. Food and Drug Administration)
FESEM	Microscopía electrónica de barrido por campo de emisión (field emission scanning electron microscopy)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factor)
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Fourier-transform infrared spectroscopy)
GPC	Cromatografía de permeación en gel (gel permeation chromatography)
HIF-1 α	Factor inducido por hipoxia 1 alfa (hypoxia-induced factor 1 alpha)
IGF	Factor de crecimiento insulínico (insulin-like growth factor)
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton (= kg/mol)
LDH	Lactato deshidrogenasa (lactate dehydrogenase)
LRP-1	Proteína relacionada al receptor de lipoproteína de baja densidad 1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1)

MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matrix (matrix-assisted laser desorption/ionization)
MCT	Transportador de monocarboxilato (monocarboxylate transporter)
MEC	Matriz extracelular
microRNA	Micro-ácido ribonucleico (micro-ribonucleic acid)
MLC	Cadena ligera de miosina (myosin light chain)
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina (myosin light-chain kinase)
M_n	Peso molecular número promedio (number-average molecular weight)
M_v	Peso molecular viscosimétrico (viscosity-average molecular weight)
MW	Peso molecular (molecular weight)
M_w	Peso molecular peso promedio (weight-average molecular weight)
NMR	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (nuclear magnetic resonance spectroscopy)
NP	Nanopartícula
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/v	Peso/volumen
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor)
PDI	Índice de polidispersidad (polydispersity index)
PEG	Poli(etilenglicol)
PEO	Poli(óxido de etileno) (poly(ethylene oxide))
PET	Poli(tereftalato de etileno) (poly(ethylene terephthalate))
PFK	Fosfofructocinasa (phosphofructokinase)
PHD	Prolil hidroxilasa (prolyl hydroxylase)
PLA	Ácido poli(láctico) (poly(lactic acid))
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico) (poly(lactic-co-glycolic acid))
ppm	Partes por millón
PVA	Alcohol poli(vinílico) (poly(vinyl alcohol))
pVHL	Proteína supresora de tumores de von Hippel-Lindau
RGD	Arginina-glicina-aspartato
ROCK	Proteína cinasa asociada a Rho (Rho-associated protein kinase)
ROP	Polimerización por apertura de anillo (ring-opening polymerization)
ROS	Especie reactiva de oxígeno (reactive oxygen species)
RSS	Suma residual de cuadrados (residual sum of squares)
SD	Desviación estándar (standard deviation)
SDF-1	Factor derivado de células estromales 1 (stromal-derived factor 1)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (scanning electron microscopy)
siRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia (small interfering ribonucleic acid)
Sn(Oct) ₂	2-etilhexanoato de estaño(II) (stannous octoate)

T_d	Temperatura de descomposición
T_g	Temperatura de transición vítrea (glass transition temperature)
TGA	Análisis termogravimétrico (thermogravimetric analysis)
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta (transforming growth factor beta)
T_m	Temperatura de fusión (melting temperature)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa (tumor necrosis factor alpha)
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visible
v/v	Volumen/volumen
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor)
XRD	Difracción de rayos X (X-ray diffraction)
YLL	Lipasa extracelular 2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> (<i>Yarrowia lipolytica</i> extracellular lipase 2)
δ	Desplazamiento químico
ΔH_m	Calor de fusión
$\Delta H_{m,cris}$	Calor de fusión de polímero completamente cristalino
ϵ -CL	ϵ -caprolactona
μP	Micropartícula

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 929388 otorgada para los estudios de maestría y la realización de este proyecto, así como al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) y el Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales (PCeIM) de la UNAM por el apoyo para la asistencia a congresos y la compra de reactivos.

La investigación presentada en este trabajo fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM número IG100220 y el proyecto CONACYT Ciencia de Frontera CF-2019 número 140617. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Agradezco el apoyo técnico al Dr. Omar Novelo Peralta en microscopía electrónica, Ing. Karla Eriseth Reyes Morales en análisis térmico, M. en C. Gerardo Cedillo Valverde en resonancia magnética nuclear, M. en C. Eliezer Hernández Mecinas en ensayos mecánicos (todos del IIM-UNAM); a la Dra. María Cristina Piña Barba (IIM-UNAM) por la asesoría y el acceso a equipo de centrifugación y liofilización; al Dr. José Juan Escobar Chávez (FESC-UNAM) por el acceso a equipo de espectroscopía y texturometría; y al Dr. Antonio Martínez Richa (Univ. de Guanajuato) por la donación de polímeros.

Agradezco a la Dra. Yareli Rojas Aguirre (IIM-UNAM) y al Dr. Genaro Vázquez Victorio (FC-UNAM) por su apoyo como miembros del comité tutor y su revisión del presente trabajo; así como a la Dra. María Cristina Piña Barba (IIM-UNAM), Dra. María del Rocío Redón de la Fuente (ICAT-UNAM), Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez (FC-UNAM), Dr. Antonio Martínez Richa (Univ. de Guanajuato) y Dr. Ricardo Vera Graziano (IIM-UNAM) por su revisión del presente trabajo como miembros del jurado para examen de grado.

PARTE 1

Marco teórico y estado del arte

Capítulo 1

Introducción

1.1 La diabetes mellitus tipo 2 y las úlceras de pie diabético: un problema de salud pública

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad metabólica que afecta a todas las edades, todos los países y todas las economías del mundo y que está considerada como una de las mayores emergencias de salud del siglo XXI a nivel mundial. Los principales factores de riesgo a desarrollarla son el sobrepeso y la obesidad. A nivel mundial 422 millones de adultos tenían diabetes en 2014, frente a los 108 millones de 1980. Desde ese año, la diabetes tiene una prevalencia mundial de entre 4.7% y 8.5% en la población adulta (World Health Organization, 2016). Entre las complicaciones de la diabetes de mayor incidencia a largo plazo se encuentran la disminución de la visión o ceguera, las enfermedades renales, la disfunción cardiovascular y las amputaciones de extremidades inferiores. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la tasa de amputación en la población con diabetes diagnosticada es de entre 10 y 20 veces más que la población no diabética, siendo la tasa de amputación en diabéticos de entre 1.5 y 3.5 eventos por cada 1000 individuos entre 2005 y 2015 (World Health Organization, 2016, pp. 30–31).

Las causas de mortalidad en México y el mundo han cambiado recientemente debido a la pandemia derivada del coronavirus SARS-CoV-2. Sin embargo, previo a este acontecimiento global, la DM2 ha estado catalogada como la segunda causa de mortalidad en México con el 15.2% de muertes en 2017, únicamente por debajo de las enfermedades cardiovasculares con un 20.1% (Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, 2020, p. 11). En 2018 la prevalencia de diabetes en adultos de 20 años y más fue del 10.3%, lo que corresponde a más de 8.5 millones de individuos, siendo los estados con mayor proporción de casos Campeche, Tamaulipas, Hidalgo, Ciudad de México y Nuevo León (Instituto Nacional de Estadística y Geografía et al., 2018, pp. 18–19). Además, según la Secretaría de Salud, las tres principales causas de ingreso hospitalario en 2019 de pacientes con diagnóstico previo de DM2 fueron la necrobiosis, los procesos infecciosos y causas quirúrgicas, las cuales en conjunto sumaron un 28.3% del total de los ingresos hospitalarios de pacientes de DM2 (Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, 2020, p. 22). Estas causas de hospitalización se relacionan con complicaciones por infecciones microbianas y procesos de necrosis de tejidos, los cuales se derivan de heridas cutáneas crónicas.

En un contexto mundial, México es el país miembro de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) con mayor prevalencia de diabetes tipo 1 y 2 en adultos (13.1% en 2017), seguido de Turquía (12.1%) y Estados Unidos (10.8%) (OECD, 2019, p. 79). Además, dentro de la OCDE, México presentó la mayor incidencia de amputaciones mayores de extremidades inferiores, definiendo una amputación mayor como aquella realizada por arriba del tobillo y una menor, aquella por debajo del tobillo (**Figura 1.1a**) (OECD, 2009, p. 119). Son escasas las estadísticas publicadas en años recientes sobre el impacto de la incidencia de la DM2 en el número de amputaciones de extremidades

inferiores en la población mexicana; sin embargo, los datos recabados y publicados en la década pasada ayudan a vislumbrar la importancia de la prevención y el tratamiento de la DM2. En 2010, la prevalencia de diabetes en México se estimó en un 5% mayor que en Estados Unidos (OECD, 2009, p. 39); no obstante, el índice de amputaciones mayores en México (2004) fue mayor en un 97% al de Estados Unidos (2007) como se muestra en la **Figura 1.1a** (OECD, 2009, p. 119). Por tanto, es importante aportar en este sector a la prevención de las complicaciones de la DM2, en particular, las úlceras de pie diabético, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de individuos con diabetes.

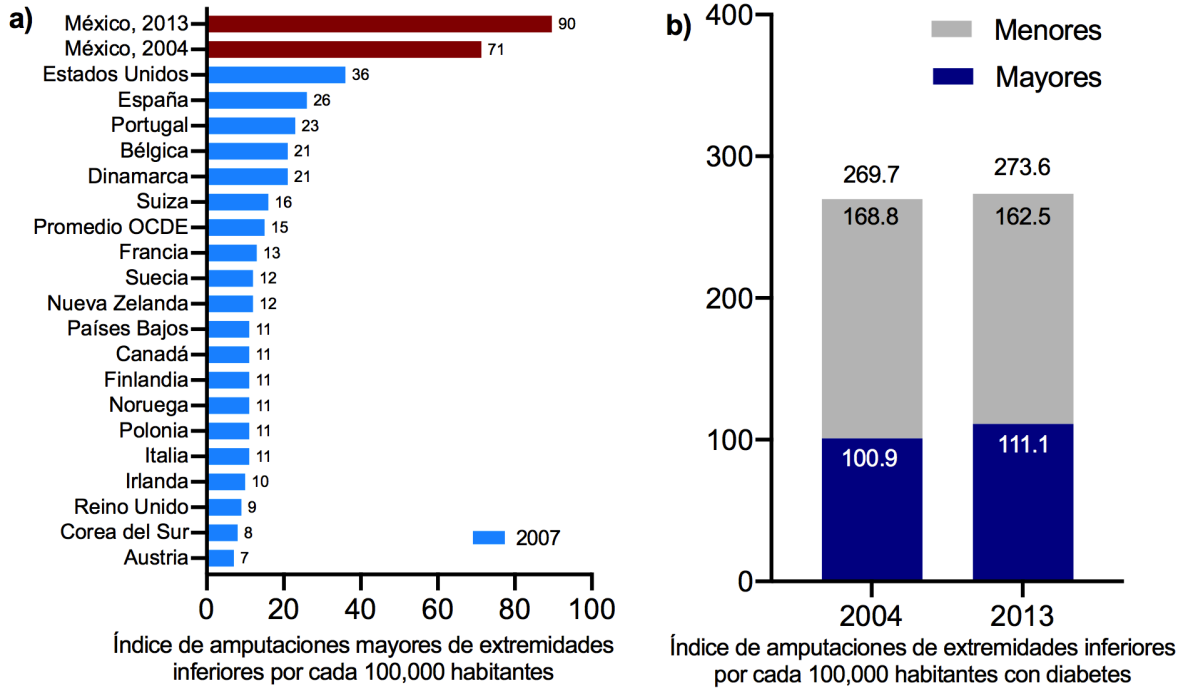


Figura 1.1 a) Índices anuales de amputaciones mayores en México en comparación con otros países miembros de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) en 2006. b) Índices anuales de amputaciones en México en 2004 y 2013 según el grado de amputación. Datos obtenidos de (Cisneros-González et al., 2016; OECD, 2009, p. 119).

Por otra parte, el Instituto Mexicano del Seguro Social ha reportado que el índice de amputaciones de extremidades inferiores derivadas de la DM2 tuvo una tendencia de aumento del 2004 al 2013, periodo durante el cual hubo un aumento del 37.4% al 40.6% en la proporción de amputaciones mayores (**Figura 1.1b**) (Cisneros-González et al., 2016). Considerando que la mediana de la edad de pacientes diabéticos ingresados a hospitales en 2019 fue de 58 años (Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, 2020, p. 14) y que la esperanza de vida promedio en México en 2017 fue de poco más de 75 años (OECD, 2019, p. 67), se puede estimar que los mexicanos con diagnóstico de diabetes viven alrededor de 17 años en promedio con la enfermedad. Además, se ha reportado que, del total de casos de hospitalización en 2019 de pacientes diagnosticados con diabetes, un 63.6% mencionó tener solamente estudios de primaria completa o incompleta o ninguna escolaridad (Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, 2020, p. 15), sugiriendo que

las complicaciones de la diabetes que requieren hospitalización afectan de manera acentuada a los sectores más vulnerables de la población mexicana.

En conjunto, estas observaciones apuntan a que la diabetes es una afección de alto impacto en la calidad de vida, causando incluso discapacidad o la muerte. Además de favorecer la aparición de sobrepeso y obesidad, la diabetes tiene el riesgo importante de presentar complicaciones a largo plazo derivadas del síndrome metabólico, dentro de las que se encuentran la pérdida parcial o total de la visión, la neuropatía, la nefropatía, las disfunciones circulatorias y las complicaciones de la piel, aunque en general los niveles elevados de glucosa y mantenidos por largos periodos de tiempo pueden generar complicaciones en cualquier parte del cuerpo, órgano o sistema. Además, de manera simultánea pueden desarrollarse dos o más complicaciones, afectando a diferentes sistemas y teniendo repercusiones en un tercero, como es el caso del pie diabético.

Se le conoce como hiperglucemia a la condición en la que un individuo presenta niveles de glucosa en sangre muy altos. El mantenimiento de la hiperglucemia durante periodos largos (diabetes descontrolada) tiene como consecuencia, entre otras, el daño a los nervios y los vasos sanguíneos, ocasionando que algunas personas afectadas pierdan sensibilidad específicamente en los pies. Por esto los pacientes no perciben cuando un área específica de esta región ha sufrido alguna lesión, por mínima que sea e incluso generada en ciertos casos por la propia resequedad de la piel que ha perdido su humectación propia a consecuencia de la hiperglucemia. Dado que el sistema circulatorio también se encuentra dañado, el sitio afectado comúnmente entra en estado de hipoxia por la falta de irrigación sanguínea, dificultando el proceso de reparación. En particular en pacientes diabéticos, los altos niveles de glucosa inhiben la formación de nuevos vasos sanguíneos, lo que inicialmente provoca un suministro pobre e inadecuado de sangre conocido como isquemia y eventualmente puede causar necrosis del tejido dañado.

A nivel nacional, se estima que en 2015 el gasto total en México dedicado al tratamiento y prevención de la diabetes fue de más de 5 mil millones de dólares internacionales y para 2040 se proyecta que el gasto en México ascenderá a 30 mil millones de dólares internacionales (International Diabetes Federation, 2015, p. 59), lo que representa una enorme carga financiera para el sistema de salud nacional. Además, al ser un procedimiento altamente invasivo y riesgoso para el paciente, la amputación parcial o total de extremidades inferiores derivada del pie diabético ejerce una carga financiera particularmente alta en el sector hospitalario público. Se estima que el costo directo de amputación asociada al pie diabético, incluyendo los procedimientos quirúrgicos y los tratamientos pre- y post-operatorios como el desbridamiento de tejido necrótico, los tratamientos de antibióticos y el cuidado de heridas, asciende a un monto equivalente entre los 30,000 y 60,000 dólares estadounidenses (Cisneros-González et al., 2016).

1.2 Tratamientos clínicos actuales para heridas cutáneas

Actualmente en el mercado se encuentran productos disponibles para el tratamiento de lesiones cutáneas, entre los que se encuentran los apósitos secos, activos y húmedos; espumas de poliuretano; geles y parches con agentes antimicrobianos como polihexida,

povidona iodada y sulfadiazina de plata (**Tabla 1.1**); antisépticos en diversas presentaciones (parches, aerosoles, ungüentos); pomadas enzimáticas y nanopartículas de dióxido de silicio y dióxido de titanio. Algunos procedimientos quirúrgicos o físicos directos son el desbridamiento continuo de la herida, el láser terapéutico, la cirugía vascular para revascularización, incisiones para descompresión y la amputación del miembro afectado.

Algunos procedimientos indirectos o preventivos son la irradiación con luz ultravioleta (UV), la modificación del calzado, plantillas plantares, moldes de fibra de vidrio o yeso, la rehabilitación neurovascular, el oxígeno hiperbárico, la diatermia y la electroterapia. También existen los tratamientos que actúan de manera sistémica o indirecta sobre la lesión, como los antibióticos sistémicos. También existen los injertos de piel, los cuales normalmente deben obtenerse de una zona de la piel del donador donde el tipo y grosor de la piel sean similares a los de la región receptora. No obstante, los injertos de piel son susceptibles a rechazo por el sistema inmune, sobre todo si provienen de otras especies como el cerdo (xenoinjerto) o incluso de otros donadores humanos (aloinjerto). El éxito del injerto además depende de la profundidad y el estado de la herida.

Las soluciones disponibles en el mercado actual están dirigidas principalmente al control o prevención de infecciones y mantenimiento de la humedad propia del sitio lesionado mediante la formación de una barrera mecánica o la absorción exudados (**Tabla 1.1**), sin intervenir en la respuesta o el proceso regenerativo del tejido. Algunos de estos apósitos sólo son funcionales en etapas específicas del proceso de regeneración del tejido, por ejemplo, durante el proceso de epitelización de la piel que tiene una duración aproximada de entre 1 a 3 semanas, dependiendo de la extensión y el sitio anatómico de la lesión. Además, de mantenerse aplicados por tiempos prolongados sobre una herida con ambiente húmedo, estos apósitos pueden favorecer la proliferación de microorganismos que resulten en infecciones.

Aunque las infecciones en heridas cutáneas son alarmantes en pacientes diabéticos, el proceso de inflamación característico de la diabetes se mantiene latente y constante durante tiempos prolongados, lo cual impide la regeneración del tejido y mantiene la lesión abierta y susceptible a la colonización de microorganismos patógenos. Dado que el problema de la inflamación y de la baja revascularización es el obstáculo principal que impide la regeneración cutánea, es importante que las soluciones aborden también este tema, más allá de simplemente enfocarse en la prevención y tratamiento de infecciones microbianas. La infección puede ser mitigada, pero si la herida no se regenera, seguirá siendo susceptible a infecciones futuras.

Por otro lado, los apósitos biológicos o sustitutos sintéticos de piel, que son aquellos que puede proporcionar contenido celular a la zona afectada, también han sido en algunos casos considerados como un recurso de tratamiento. Sin embargo, el uso de sistemas biológicos que contienen células vivas implica un alto costo de manufactura de dichos productos. El mantenimiento de cultivos celulares para la elaboración de estos constructos es prometedor para su uso en ingeniería de tejidos y órganos de reemplazo, pero no es completamente adecuado para inducir regeneración de la piel. Las células por implantar con el apósito deben pertenecer al sujeto receptor para evitar rechazo por el sistema inmunitario,

por lo que generalmente se recolectan células de la piel del paciente y se les somete a un cultivo donde puedan proliferar, hasta alcanzar un número suficiente que promueva la regeneración una vez que se aplique el sustituto de piel sobre la lesión. Por tanto, este tipo de dispositivos médicos es de los más caros en el mercado. Actualmente se busca desarrollar tecnologías que permitan mejorar las condiciones de salud de los enfermos, pero que además de todo su manufactura, colocación y cuidado sean de bajo costo.

Tabla 1.1 Tipos de apósitos disponibles en el mercado para el manejo de heridas cutáneas.

Apósito (Ejemplo)	Material y características	Interacción con la humedad
Hidrocoloides (Aquacel®, ConvaTec; REPLICARE®, Smith & Nephew)	Apósitos con una matriz hidrocoloide (dispersión de carboximetilcelulosa, pectina y/o gelatina) soportada por una lámina de espuma permeable al vapor. Adherente sin disolverse. Absorbente. Semioclusivo.	Conserva el ambiente húmedo por varios días; ayuda a la autólisis; no recomendable para heridas infectadas.
Apósitos en película (OPSITE®, Smith & Nephew)	Película semirígida y semioclusiva con uso preventivo y de aplicación en heridas en fase de epitelización. No absorbente.	Permeable al vapor de agua y oxígeno; impermeable a microorganismos. No recomendable para heridas infectadas.
Apósito de espuma (Tegaderm®, 3M)	Espuma maleable de poliuretano. No adherente; requiere adhesivo que puede causar dermatitis. No se disuelve y se mantiene hasta su remoción. Funciona como barrera mecánica; semioclusivo.	Su capacidad absorción depende del grosor; mantiene la humedad. Aísla mecánica y térmicamente. Puede mantenerse hasta 7 días.
Apósito con plata impregnada (ACTICOAT®, Smith & Nephew)	Usado para heridas infectadas gracias a la actividad antimicrobiana de iones plata. Antiséptico; costo alto.	Absorbente; reduce exudados y malos olores.
Apósito de povidona iodada (INADINE®, Acelity-KCI)	Tela viscosa con una base de polietilenglicol húmedo cargado con unguento antimicrobiano de polivinilpirrolidona (povidona) y yodo elemental. No adherente.	Absorbe exudados moderados. Después de algunos días, tiende a secarse.
Apósitos de alginatos (Kaltostat®, ConvaTec)	Alginato de calcio u otros que forma gel en contacto con la herida. Adherente; puede removerse fácilmente. Útil en cavidades al hincharse.	Muy absorbente; bacteriostático y hemostático. Puede requerir humedecerlo previo a la aplicación.
Apósito con polihexanida (Suprabsorb®, Lohmann & Rauscher)	Apósito húmedo flexible de celulosa cargada con biguanuro de polihexametileno (polihexanida) como agente antimicrobiano.	Aporta la humedad y absorbe exudados moderados.
Hidrogeles (OPSITE®, Smith & Nephew)	Lámina maleable o perlas de polímeros entrecruzados altamente hidrofílicos (carboximetilcelulosa, dexrán) hinchados con agua. No se disuelve; adherente. Forma una barrera mecánica.	Mantiene la humedad de la herida, rehidratando la herida o absorbiendo exudado. Ayuda a la autólisis. No recomendable en heridas infectadas.

Fuentes: (Frykberg & Banks, 2016; Yazdanpanah, 2015).

1.3 Justificación

Por todas las razones anteriores, aún son necesarias nuevas formas de tratamiento que busquen mitigar las complicaciones derivadas de la DM2, en especial aquellas que impiden la correcta regeneración de lesiones cutáneas y que tienen un alto impacto en la calidad de vida de los pacientes diabéticos y en el gasto de los sistemas de salud. En pacientes diabéticos las lesiones cutáneas, que en su mayoría son de curso crónico, presentan a menudo complicaciones adicionales como infecciones microbianas, las cuales pueden progresar hasta el desarrollo de gangrena, cuyo tratamiento de elección es la amputación del miembro afectado. Particularmente en México, la proporción de amputaciones en la población con diabetes es muy considerable, en particular dentro de los sectores vulnerables, dándole un sentido de urgencia al desarrollo de mejores tratamientos y acciones preventivas para las causas de la amputación de extremidades inferiores derivadas de la diabetes.

Ante esta problemática, se expone en este trabajo una propuesta de diseño y fabricación de apósitos a base de polímeros biocompatibles y microestructurados cargados con lactoferrina bovina, una proteína de origen lácteo con actividad antimicrobiana y antiinflamatoria que es capaz de modular el estado de inflamación sistémica crónica presente en pacientes diabéticos. La propuesta aquí evaluada incluye la encapsulación de lactoferrina en micropartículas electrorrociadas de ácido poli(láctico-co-glicólico), un polímero no hidrosoluble aprobado para usos médicos por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos de América con la capacidad de regular la liberación de fármacos mediante su degradación paulatina. A su vez, estas partículas se cargan en mallas fibrilares electrohiladas de poli(óxido de etileno), un polímero hidrofílico biocompatible, las cuales podrían aplicarse como apósitos temporales sobre heridas cutáneas asociadas al pie diabético para liberar gradualmente la lactoferrina cargada.

Este estudio es el primero que se reporta sobre la encapsulación de lactoferrina bovina mediante electrohilado para su uso potencial en tratamiento de heridas cutáneas, el cual además se beneficia de la rápida disolución de las fibras electrohiladas y de la liberación prolongada de lactoferrina desde las partículas de ácido poli(láctico-co-glicólico). Aunque aún se requieren estudios adicionales en cultivos celulares de fibroblastos (células de la piel) y células dendríticas (células del sistema inmune), así como estudios en modelos murinos de diabetes, el trabajo aquí expuesto representa un paso importante en el desarrollo de apósitos microestructurados con agentes terapéuticos novedosos, con el objetivo de contribuir a los métodos actuales de tratamiento de úlceras de pie diabético.

1.4 Objetivos

Objetivo general

Preparar mallas electrohiladas hidrosolubles de poli(óxido de etileno), partículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) con lactoferrina bovina encapsulada y películas de quitosano/glicerol/ácido láctico cargadas con proteínas de suero lácteo bovino extraídas de leche comercial por precipitación con sales; y estudiar sus propiedades fisicoquímicas,

mecánicas y térmicas para determinar su viabilidad como agentes de liberación controlada de proteínas.

Objetivos particulares

- Elaborar mediante electrohilado mallas fibrilares de poli(óxido de etileno) con dextrina cíclica altamente ramificada para evaluar su viabilidad como apósito cutáneo para la liberación controlada de agentes bioactivos.
- Evaluar la viabilidad del electrohilado como técnica de producción de mallas fibrilares de poli(óxido de etileno) con potencial aplicación como apósitos cutáneos.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las mallas electrohiladas.
- Elaborar mediante electrorrociado y microemulsión micropartículas de copolímero en bloque poli(ϵ -caprolactona-etilenglicol) sintetizado por catálisis enzimática.
- Evaluar la viabilidad del electrorrociado como técnica de producción de partículas.
- Elaborar mediante electrorrociado micropartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) cargadas con lactoferrina bovina como potenciales agentes de liberación controlada de proteínas.
- Estudiar la cinética de liberación *in vitro* de proteínas en las partículas de ácido poli(láctico-co-glicólico)/lactoferrina.
- Evaluar la viabilidad del electrorrociado para el encapsulamiento y liberación controlada de lactoferrina bovina.
- Establecer una propuesta para el encapsulamiento de la lactoferrina bovina en apósitos producidos por electrohilado y electrorrociado para su aplicación en regeneración de heridas cutáneas.

1.5 Hipótesis

La encapsulación de lactoferrina bovina en polímeros hidrosolubles, en forma de mallas fibrilares electrohiladas cargadas con partículas de polímeros no hidrosolubles, permitirá la liberación paulatina de la proteína, lo que contribuirá al desarrollo de nuevos apósitos con propiedades de liberación apropiadas para su potencial aplicación en la regeneración acelerada de heridas cutáneas.

1.6 Bibliografía de capítulo

- Cisneros-González, N., Ascencio-Montiel, I. de J., Libreros-Bango, V. N., Rodríguez-Vázquez, H., Campos-Hernández, Á., Javier Dávila-Torres, Jesús Kumate-Rodríguez, & Víctor Hugo Borja-Aburto. (2016). Índice de amputaciones de extremidades inferiores en pacientes con diabetes. *Rev Med Inst Mex Seg Soc*, 54(4), 472–479.
- Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud. (2020). *Informe Epidemiológico de Cierre 2019 del Sistema de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria de Diabetes Mellitus Tipo 2*.
<https://www.gob.mx/salud/documentos/boletin-diabetes-tipo-2-cierre-2019>

Capítulo 1

- Frykberg, R. G., & Banks, J. (2016). Management of Diabetic Foot Ulcers: A Review. *Federal Practitioner: For the Health Care Professionals of the VA, DoD, and PHS*, 33(2), 16–23.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Secretaría de Salud, & Instituto Nacional de Salud Pública. (2018). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ensanut/2018/doc/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
- International Diabetes Federation. (2015). *IDF Diabetes Atlas (7a ed.)*. International Diabetes Federation. <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/13-diabetes-atlas-seventh-edition.html>
- OECD. (2009). *Health at a Glance 2009: OECD Indicators*. OECD. https://doi.org/10.1787/health_glance-2009-en
- OECD. (2019). *Health at a Glance 2019: OECD Indicators*. OECD. <https://doi.org/10.1787/4dd50c09-en>
- World Health Organization. (2016). *Global Report on Diabetes*. <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/909883/retrieve>
- Yazdanpanah, L. (2015). Literature review on the management of diabetic foot ulcer. *World Journal of Diabetes*, 6(1), 37. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i1.37>

Capítulo 2

Marco teórico y estado del arte

2.1 Heridas cutáneas

2.1.1 Anatomía de la piel

La piel y sus estructuras accesorias componen el sistema tegumentario, el cual tiene la función de proveer una barrera entre el cuerpo y el ambiente externo, proteger de patógenos, daño físico y pérdida de líquidos, así como contribuir al mantenimiento de la homeostasis corporal. La piel en particular se compone de múltiples capas de células y tejidos, los cuales están sujetos a estructuras interiores mediante el tejido conectivo de la dermis. La piel tiene tres capas principales: epidermis, dermis e hipodermis (**Figura 2.1**).

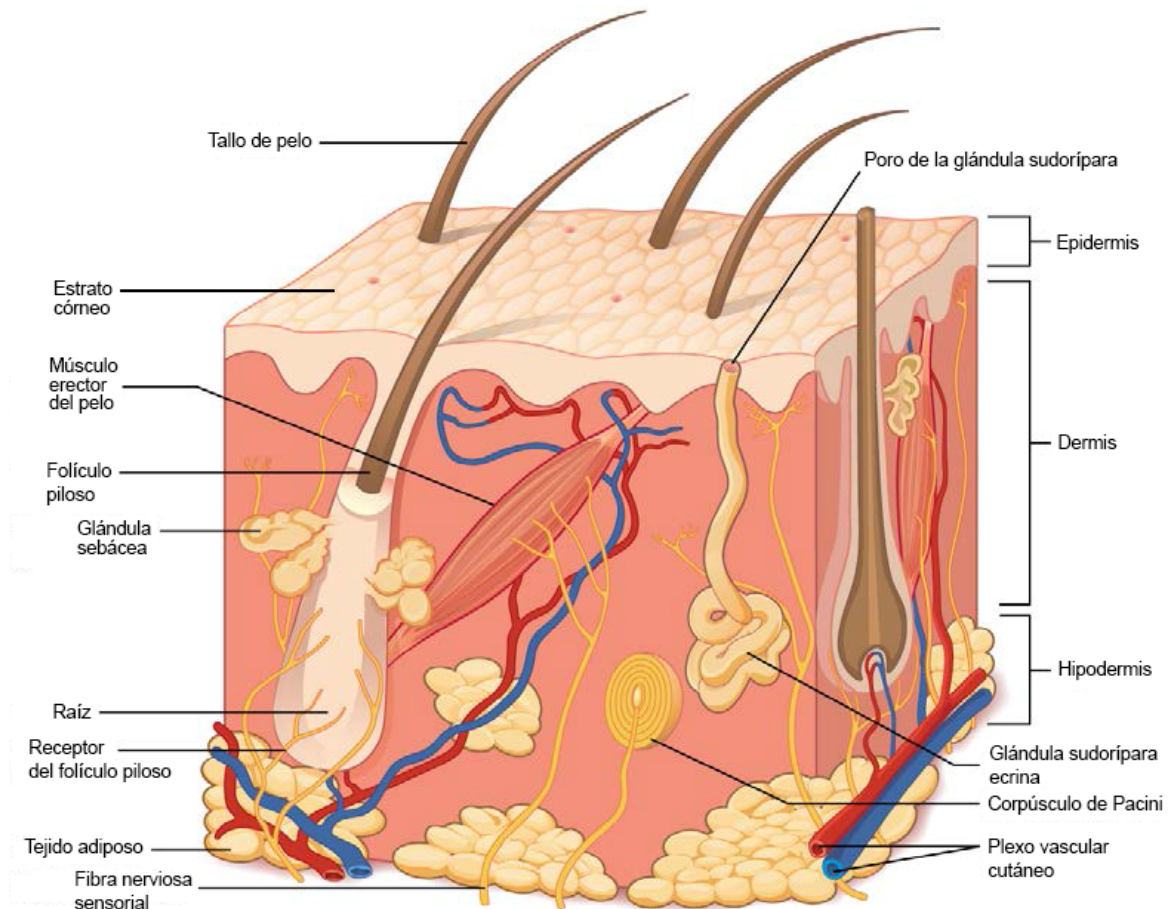


Figura 2.1 Estructuras principales de la piel. Adaptado de (Betts et al., 2017, p. 181).

En la epidermis se encuentran los queratinocitos y melanocitos; las células dendríticas, células de Langerhans y otras células inmunes; los axones sensoriales y la membrana basal epidérmica-dérmica, mientras que en la dermis se encuentran los mastocitos,

fibroblastos, las células presentadoras de antígeno dérmicas, así como células inmunes residentes y circulatorias (**Figura 2.2**) (Rousselle et al., 2019). La piel está densamente poblada por células del sistema inmune debido a su función de barrera contra el ingreso de patógenos; por esto, la correcta función de barrera puede comprometerse cuando hay disregulaciones inmunológicas.

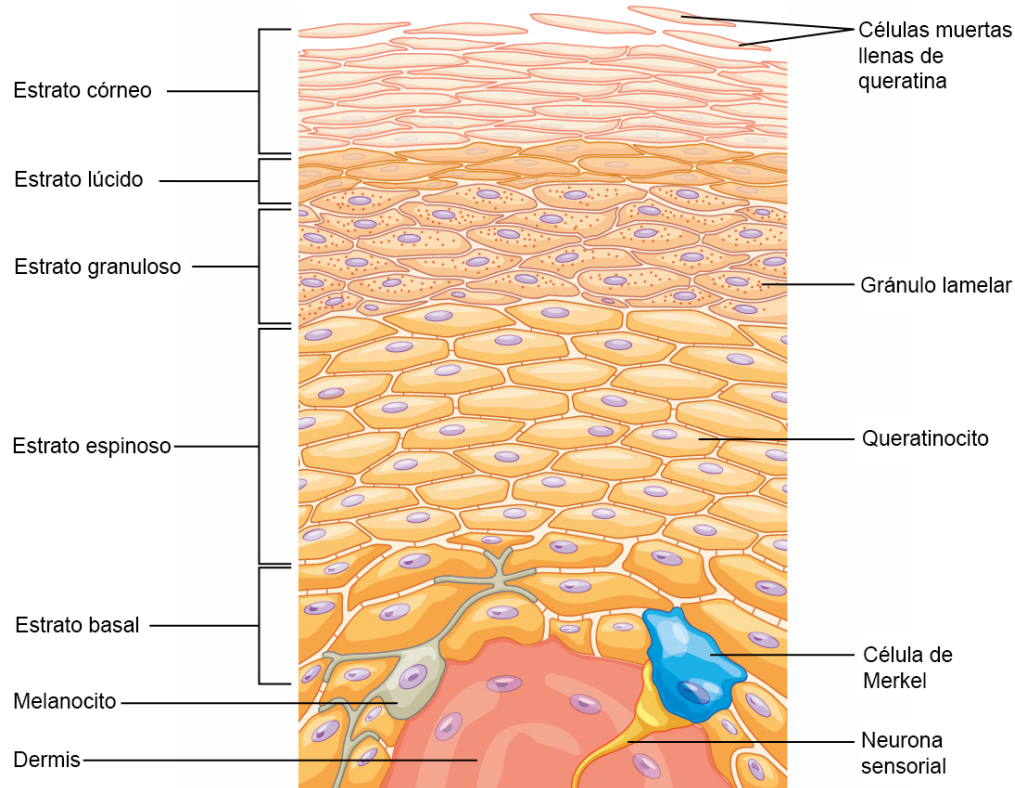


Figura 2.2 Capas de la piel. Adaptado de (Betts et al., 2017, p. 183).

Al ser un tejido conectivo, la dermis contiene los complejos de matriz extracelular que brindan soporte a las conexiones intercelulares y la migración celular y regulan las funciones de los factores de crecimiento y las citocinas, los cuales son señales bioquímicas que dan indicaciones de proliferación, migración o muerte a las células. De igual forma, la dermis y especialmente la hipodermis están sumamente vascularizadas por una red capilar subepidérmica, la cual provee oxígeno y nutrientes y retira dióxido de carbono y desechos celulares (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019).

2.1.2 Procesos en la regeneración de heridas

Después de un daño físico que ha causado una herida, se debe recuperar la integridad de la piel para mantener sus funciones, por lo que una multitud de células inmunes, células residentes de la piel, la matriz extracelular, así como factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas reguladoras llevan a cabo el proceso de regeneración de manera coordinada, lo cual involucra procesos complejos de intercomunicación (Cañedo-Dorantes & Cañedo-

Ayala, 2019). La regeneración de heridas cutáneas puede dividirse en cuatro etapas secuenciales.

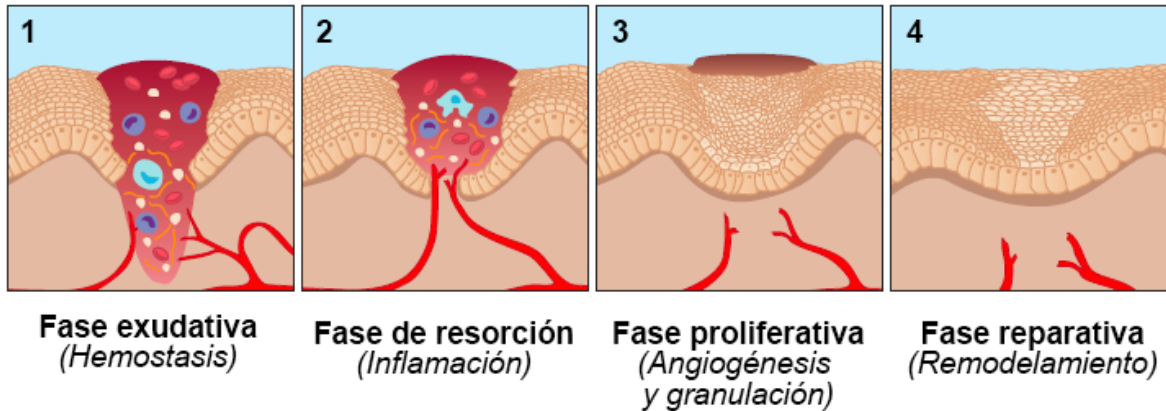


Figura 2.3 Fases de la regeneración de heridas cutáneas. Adaptado de (Montavit, 2020).

1) Fase exudativa

La fase exudativa tiene como objetivo lograr la hemostasis, la cual consiste en dar la primera señal de alarma y detener el daño, principalmente la pérdida de sangre en el sitio de lesión, manteniendo el flujo normal de sangre en el resto. Como resultado, la herida se llena de sangre coagulada y fibrina. Aunque la hemostasis no forma parte propiamente del proceso de regeneración de heridas, puede considerarse una etapa previa. El proceso de hemostasis inicia en los primeros segundos después de la herida y puede durar hasta una hora, durante la cual la pérdida de sangre se detiene gracias a la formación de un tapón por la agregación de plaquetas y la subsecuente deposición de fibrina insoluble a consecuencia de la cascada de coagulación (Gale, 2011). Durante la coagulación, se agregan trombocitos y plaquetas en la red de fibrina, la cual no sólo reestablece la homeostasis y forma una barrera contra la invasión de microorganismos, sino también provee una matriz temporal que da el soporte necesario para la migración de células durante el proceso de regeneración (Gonzalez et al., 2016).

Durante la herida, el daño en las células cutáneas activa las terminales nerviosas sensoriales, las cuales generan potenciales de acción que viajan a la médula espinal causando dolor. Éstos a su vez inician una cadena de señalización que promueve la vasodilatación y el incremento de flujo sanguíneo, permitiendo, entre otros eventos, el reclutamiento de leucocitos inflamatorios (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019).

2) Fase inflamatoria y de resorción

La fase inflamatoria tiene como objetivo contener el daño a una zona localizada y consolidar el proceso de inflamación, mediante el cual los fagocitos (células inmunes con la capacidad de engullir y eliminar desechos y material extraño mediante la fagocitosis, como los monocitos, macrófagos y células dendríticas) eliminan células muertas y patógenos, con el fin de limpiar la herida antes de comenzar la reconstrucción del tejido.

Durante este periodo, aumenta la permeabilidad vascular de las células debido a la vasodilatación, lo que permite que los neutrófilos y monocitos arriben al sitio de la herida. Los mastocitos y células de Langerhans, entre otras células, son activadas y ayudan a regular esta fase mediante la secreción de un conjunto complejo de citocinas, lo cual culmina en la conversión de monocitos a macrófagos, éstos últimos considerados los reguladores maestros de la fase inflamatoria (**Figura 2.4**). Los macrófagos fagocitan y digieren los restos celulares y tisulares y los neutrófilos remanentes, así como secretan factores de crecimiento y citocinas que promueven la proliferación tisular y migración celular (Han & Ceilley, 2017).

Las células inflamatorias contribuyen a la liberación de enzimas lisosomales y especies reactivas de oxígeno y facilitan la degradación de los restos de células (Gonzalez et al., 2016). La inflamación en un proceso de regeneración normal ocurre de manera aguda, es decir, que comienza rápidamente, se vuelve severa durante un periodo corto y puede durar algunos días, después de los cuales comienza a reducirse en el paso a la siguiente fase. Esta inflamación aguda se contraponen a la llamada inflamación crónica, que es menos severa pero prolongada en el tiempo, pudiendo llegar a durar meses. De haber un proceso inmunológico patológico, la inflamación debido a la herida puede tornarse crónica, lo que conlleva una dificultad para la resolución de la inflamación y para el paso a la siguiente fase de la regeneración.

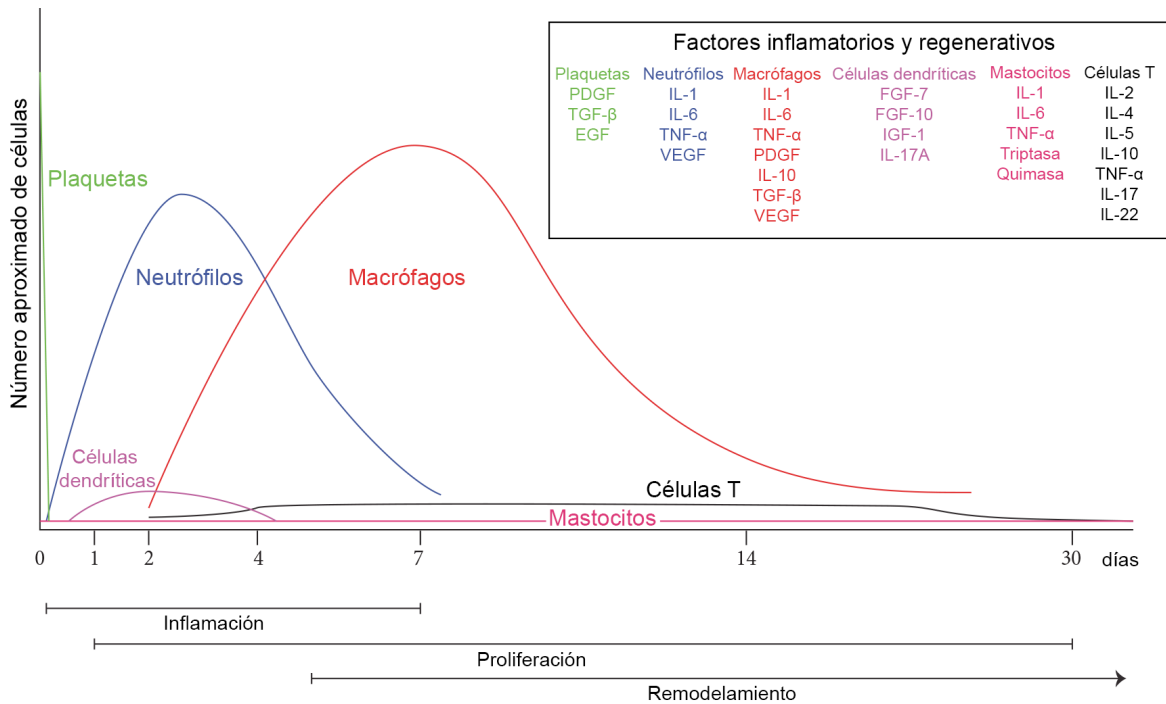


Figura 2.4 Acumulación de células inmunes en el sitio de la herida durante las distintas fases de una regeneración sin alteraciones. Adaptado de (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019).

3) Fase proliferativa

El objetivo de la fase proliferativa es lograr la angiogénesis y la granulación en el sitio de la lesión, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos y nuevas células para llenar la herida. En este periodo ocurre la proliferación de fibroblastos, que constituyen gran parte de la dermis, y su diferenciación en miofibroblastos, así como la deposición de nueva matriz extracelular y la reparación de nervios periféricos dañados (Gonzalez et al., 2016). Al mismo tiempo, el tejido endotelial entra en una etapa de crecimiento rápido y ocurre la angiogénesis en el nuevo tejido formado (también llamado tejido de granulación), creando una red vascular densa que provee nutrientes y oxígeno en esta región tan activa durante la regeneración (Han & Ceilley, 2017).

Además, ocurre la reepitelialización, el proceso en el que la herida se vuelve a cubrir con tejido epitelial y una nueva epidermis. En el caso de heridas de espesor total (aquellas que incluyen daño desde la epidermis hasta la hipodermis), la reepitelialización ocurre desde las orillas de la herida hacia el centro, lo cual requiere la migración de queratinocitos epidérmicos desde las orillas. Este proceso comienza aproximadamente de 16 a 24 horas después de la herida y continúa hasta que toda la superficie de la lesión se ha cubierto por tejido epitelial (Rousselle et al., 2019).

4) Fase reparativa o de remodelamiento

Después de aproximadamente 2 o 3 semanas posterior a la herida, inicia la fase de remodelamiento y maduración, en la que se concluye la formación de células en el borde de la herida, generando nueva piel y cerrando por completo la herida, es decir, concluyendo el proceso de cicatrización en la superficie de la piel. En este periodo, se restituyen los componentes normales de la matriz extracelular, como la restitución del colágeno tipo I en lugar del tipo III que se presenta en una herida reciente. El tejido nuevo en la zona de la herida madura y recupera su estructura y sus grados normales de entrecruzamiento y vascularización (Han & Ceilley, 2017).

2.1.3 Alteraciones en la regeneración derivadas de la diabetes mellitus tipo 2

El proceso traumático que representa una lesión en la piel desencadena una compleja reacción inflamatoria en la que se eleva considerablemente el número de células inmunitarias en el sitio de la lesión, así como la producción de citocinas y factores quimioatrayentes de células inflamatorias (**Figura 2.4**). Este proceso está estrechamente relacionado con el buen funcionamiento del sistema inmunitario, el cual conduce a la permeabilidad, proliferación y migración celular, así como un desbridamiento inmediato, es decir, una degradación y remoción de los restos celulares. Estos efectos del sistema inmunitario, aunados a los buenos cuidados tópicos, promueven una buena resolución del proceso regenerativo, llevando a un incremento en la tasa de cicatrización (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019).

Por otra parte, el correcto suministro de oxígeno en la región de la herida es un factor importante para lograr una cicatrización normal. La regeneración requiere de oxígeno para lograr una buena interacción con las múltiples citocinas, alimentar a las células que proliferan

tan rápidamente y apoyar al buen funcionamiento de la actividad de defensa de los neutrófilos. Se estima que una herida con correcta regeneración necesita una presión de oxígeno de al menos 20 mmHg, mientras que una herida crónica puede tener una presión de oxígeno tan baja como 5 mmHg (Han & Ceilley, 2017). Un suministro pobre de oxígeno no solamente favorece la aparición de tejido necrosado, el cual a su vez facilita el crecimiento bacteriano, sino que también compromete la funcionalidad del sistema inmune para combatir estos patógenos. Por tanto, es esencial tomar precauciones y cuidados especiales en el caso de heridas derivadas de enfermedades vasculares periféricas y en aquellas donde haya disfunción vascular, como en las úlceras diabéticas, que no son más que heridas abiertas que generalmente aparecen en la planta del pie de individuos diabéticos.

Las llamadas células presentadoras de antígeno (APC) son un grupo heterogéneo de células inmunes que incluyen a las células dendríticas, los macrófagos y las células de Langerhans, entre otros. Las APCs median la respuesta celular inmune mediante el procesamiento y presentación de antígenos para su reconocimiento por otras células, por lo que desempeñan un papel muy importante en la regeneración de tejidos dañados, tanto en la salud como en la enfermedad. Particularmente en enfermedades como la DM2 y en quemaduras de segundo y tercer grado, la inflamación en el tejido lesionado es de tipo crónico, ya que los monocitos provenientes de la circulación sanguínea reciben señales que los comprometen a seguir produciendo citocinas proinflamatorias y a diferenciarse en macrófagos con fenotipo proinflamatorio M1. A diferencia del fenotipo M2 que es resolutorio de la inflamación (antiinflamatorio), el fenotipo M1 de los macrófagos tiene la función de mantener la inflamación mientras existan células apoptóticas y tejido necrótico para fagocitar, situación en la que se producen aún más citocinas proinflamatorias. Esta secreción de citocinas y presencia de células apoptóticas en conjunto refuerzan el reclutamiento de más macrófagos (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019). Cuando los macrófagos engullen células apoptóticas, se secretan los factores de crecimiento transformante beta (TGF- β) y endotelial vascular (VEGF), que son las principales moléculas efectoras en la remodelación de tejido (**Figura 2.4**). Sin embargo, en condiciones patológicas, existe una acumulación masiva de iones hierro en los macrófagos proinflamatorios, promoviendo la continua producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el cual bloquea el cambio de los macrófagos de un fenotipo M1 proinflamatorio hacia el M2 antiinflamatorio (Hesketh et al., 2017; Krzyszczyk et al., 2018). Es por esto por lo que una herida que comienza igual tanto en pacientes diabéticos como sanos puede volverse crónica en pacientes diabéticos, en los que ocurre un ciclo de reforzamiento continuo de la inflamación en lugar de un periodo de inflamación aguda seguida de su resolución.

Las heridas de piel se complican en personas con DM2 o quemaduras, puesto que sus procesos cicatrizantes están muy disminuidos. En el caso particular de pacientes hiperglucémicos, es de suma importancia que el proceso de cicatrización se normalice debido a que el constante inmunocompromiso de dichos pacientes puede propiciar el crecimiento o colonización oportunista de microorganismos peligrosos. Desafortunadamente en los pacientes hiperglucémicos los factores inflamatorios del mecanismo de reparación se mantienen activados por periodos largos de manera crónica por diversas causas, entre las que se encuentran (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019; Han & Ceilley, 2017):

- las fallas en los procesos apoptóticos de las propias células inflamatorias;
- el compromiso en mecanismos como el estado de granulación o cicatrización;
- la falta de factores de crecimiento y la baja producción de colágeno;
- la migración reducida de macrófagos que eliminan los restos celulares;
- la expresión reducida por parte de los neutrófilos de metaloproteinasas de matriz, que tienen la función de degradar la matriz extracelular dañada para facilitar la limpieza en la región de la herida;
- complicaciones adicionales por condiciones patológicas como la microangiopatía diabética, que involucra una obstrucción parcial o total de los vasos sanguíneos favorecen la disminución o interrupción del proceso de reparación por falta de suministro de oxígeno y nutrientes.

En general, los problemas de cicatrización de un paciente diabético están asociados principalmente al deterioro circulatorio que se presenta en mayor grado en extremidades inferiores y que, en conjunción con la mala sensibilidad nerviosa, predispone al paciente a ser más susceptible a eventos traumáticos.

2.2 Agentes estimuladores de la regeneración cutánea

2.2.1 Factores de crecimiento y reguladores genéticos

Actualmente existe aún una amplia necesidad no satisfecha de mejoras en el tratamiento de heridas crónicas asociadas a la diabetes. Por lo tanto, se ha propuesto el uso de moléculas biológicas y/o bioactivas que promuevan los procesos de reclutamiento celular, angiogénesis y modulación de la inflamación para mejorar la cicatrización disfuncional en patologías como la DM2. Una primera estrategia es la administración de algunos de los componentes que tienen actividad regulatoria y forman parte de los procesos complejos de regeneración, como los factores de crecimiento, péptidos que favorezcan la adhesión celular y material genético que promueva un comportamiento celular pro-regenerativo (**Tabla 2.1**).

Sin embargo, al proporcionar terapias basadas en factores de crecimiento y reguladores genéticos, se puede incurrir en la promoción de procesos carcinogénicos (Xiao et al., 2017), ya que en éstos últimos justamente ocurre lo opuesto a una herida de difícil regeneración, es decir, una proliferación y vascularización desmedida de tejido. Además, aunque hay avances en la producción de factores de crecimiento y péptidos recombinantes, los cuales no necesitan de cultivos celulares mamíferos para la obtención de estos componentes, aún existen dificultades en su producción a gran escala, la cual sería necesaria para ayudar en la mitigación del problema mundial de las úlceras diabéticas.

Tabla 2.1 Estrategias para la regeneración de heridas crónicas mediante la administración de agentes biológicos.

Agente biológico	Ejemplos	Ventajas	Desventajas
Factores de crecimiento	VEGF, EGF, bFGF, TGF- β	Reguladores potentes de las fases de regeneración de heridas	Potencial carcinogénico; liberación no controlada
Derivados de factores de crecimiento	Péptidos con secuencia RGD	Alta razón costo-beneficio; favorece el reconocimiento celular de materiales sintéticos	Requiere inmovilización o funcionalización covalente
Moléculas bioactivas pequeñas	1) Oxígeno 2) Óxido nítrico	1) Disponible en el mercado 2) Regulador potente de las fases de regeneración	Vida media corta
Reguladores genéticos	cDNA, siRNA, microRNA	Hiperactivan genes disfuncionales o silencian genes patogénicos	Baja eficiencia de entrega; dificultad en la liberación dirigida

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; **EGF**: factor de crecimiento epidérmico; **bFGF**: factor de crecimiento básico de fibroblastos; **TGF- β** : factor de crecimiento transformado beta; **RGD**: arginina-glicina-aspartato; **cDNA**: ácido desoxirribonucleico complementario; **siRNA**: ácido ribonucleico pequeño de interferencia; **microRNA**: micro-ácido ribonucleico. Fuente: (Xiao et al., 2017)

2.2.2 Angiogénesis

Además de suministrar agentes biológicos que estimulen el difícil proceso de regeneración en heridas crónicas, como las úlceras diabéticas, también se ha planteado el aprovechamiento de las propiedades de algunos fármacos y moléculas pequeñas para estimular la angiogénesis, el proceso de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Un primer ejemplo es el ácido láctico o lactato, el cual por muchos años se consideró solamente un subproducto metabólico de la glucólisis en el metabolismo celular anaeróbico en condiciones de hipoxia (disminución del nivel de oxígeno disponible comparado con el normal: normoxia) (**Figura 2.5**). Sin embargo, más recientemente se ha identificado su papel importante en dos aspectos de la regeneración de heridas. Primero, se ha catalogado al lactato como un metabolito asociado a la sepsis, una condición seria que resulta de la respuesta del cuerpo a la presencia de microorganismos en la sangre u otros tejidos, llevando potencialmente al mal funcionamiento de órganos, el choque séptico y la muerte. Durante un proceso de sepsis, puede haber una distribución ineficiente de oxígeno que resulta en hipoxia tisular y en el cambio al metabolismo anaeróbico, produciendo una acumulación de lactato (Ryoo & Kim, 2018; Sun et al., 2017).

Por otra parte, el lactato también contribuye a la regeneración de heridas. En particular, se ha descrito su capacidad de estimular la deposición de colágeno, un componente principal de la matriz extracelular que debe depositarse para restituir las propiedades normales del tejido nuevo. Además, el lactato en células endoteliales estimula la producción y liberación de diversos factores involucrados en las distintas fases de la regeneración, como el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y el factor derivado de células estromales 1 (SDF-1), los cuales tienen un efecto proangiogénico (Porporato et al., 2012). En

un estudio con modelos murinos de herida isquémica, es decir, herida con irrigación sanguínea inadecuada, se implantó de manera subcutánea ácido poli(láctico) (PLA) y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), ambos polímeros biocompatibles cuya degradación paulatina por hidrólisis genera lactato como subproducto, y se evaluó la capacidad de formación de nuevos vasos sanguíneos. Se observó que la administración de lactato proveniente de los implantes subcutáneos aumentó la densidad vascular, evitó la pérdida de masa muscular debido a la isquemia y aceleró la reducción en el tamaño de la herida derivado de una cicatrización más rápida (Porporato et al., 2012).

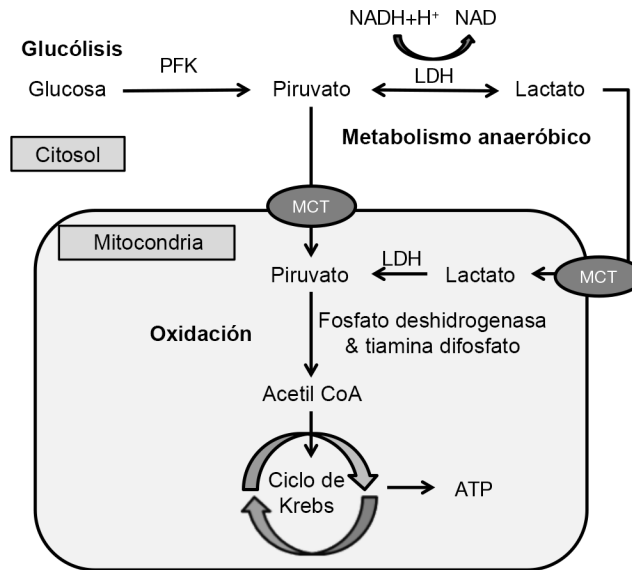


Figura 2.5 El lactato es un subproducto de la glucólisis en el metabolismo celular anaeróbico. **MCT**: transportador de monocarboxilato; **ATP**: adenosina trifosfato; **LDH**: lactato deshidrogenasa; **PFK**: fosfofructocinasa. Adaptado de (Ryoo & Kim, 2018).

Otro ejemplo de agente estimulante de la angiogénesis es la deferoxamina, un fármaco quelante de hierro que podría desempeñar un proceso benéfico para el huésped, ya que sustrae los iones hierro disponibles que pudieran favorecer el crecimiento bacteriano (Thompson et al., 2012). Además, en pacientes diabéticos, la deferoxamina promueve el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos en heridas cutáneas, acelerando el proceso de regeneración que está obstaculizado en individuos con altas concentraciones de glucosa, gracias a su capacidad de quelación de iones Fe²⁺ (**Figura 2.6**) (Hou et al., 2013). Además, la deferoxamina se ha cargado en andamios fibrilares que liberan el fármaco al colocarse sobre la herida, a manera de propuesta de apósito funcional, teniendo un efecto promotor de la proliferación de fibroblastos y la producción de HIF-1 α y VEGF, así como una regeneración acelerada de heridas cutáneas de espesor total (Chen et al., 2016). Estos andamios, en particular aquellos producidos mediante la técnica de electrohilado, tienen una amplia área superficial y estructura microporosa que puede cubrir el área de la herida con mayor eficiencia, así como promover la hemostasis y absorber exudados dependiendo del material utilizado.

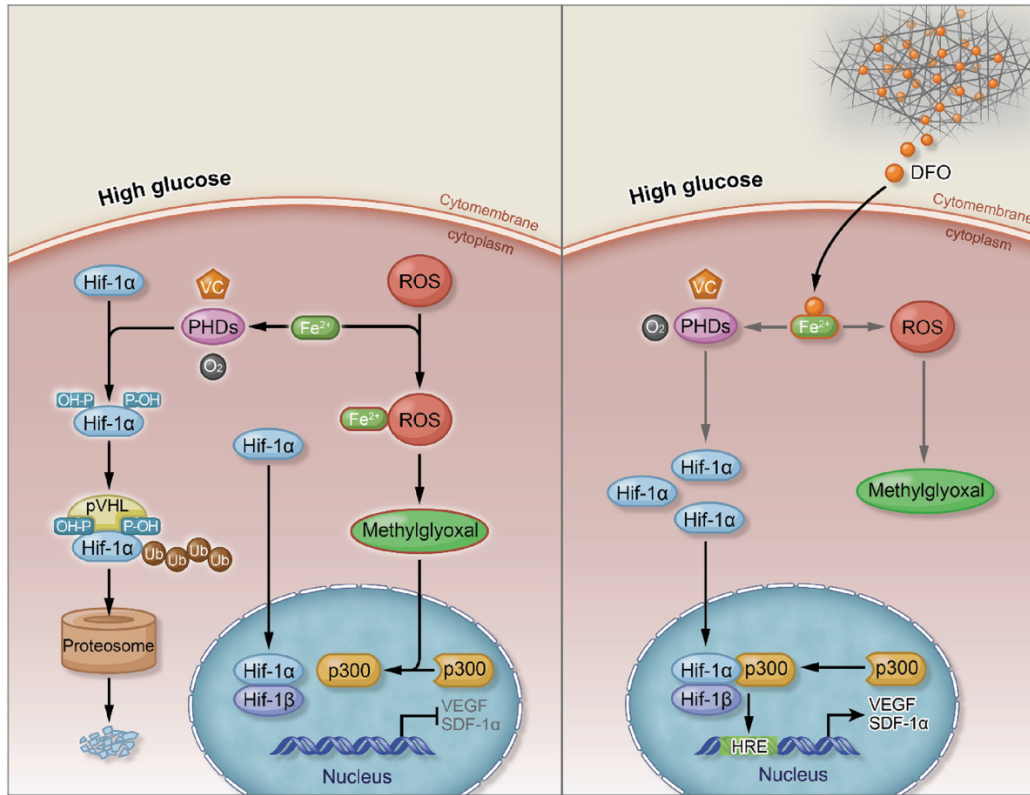


Figura 2.6 (Izquierda) Vía disfuncional de señalización celular en hiperglucemia que promueve la degradación proteosomal de HIF-1 α e inhibe la expresión de factores asociados a la revascularización (VEGF y SDF-1). (Derecha) Vía hiperglucémica corregida por la administración de deferoxamina (DFO), la cual sequestra iones Fe²⁺ evitando la degradación de HIF-1 α y normalizando su actividad como factor de transcripción. **HIF-1**: factor inducido por hipoxia 1; **ROS**: especie reactiva de oxígeno; **PHDs**: prolinas hidroxilasas; **SDF-1**: factor derivado de células estromales; **VEGF**: factor de crecimiento endotelial vascular; **pVHL**: proteína supresora de tumores de von Hippel-Lindau. Fuente: (Chen et al., 2016).

2.2.3 Inflamación

Una estrategia alternativa para estimular la regeneración de heridas como las úlceras diabéticas es enfocar los esfuerzos en mitigar el estado de inflamación crónica, ya sea de manera sistémica o local. La motivación de esta opción es el importante papel que juegan los macrófagos M1 proinflamatorios en la persistencia del estado de inflamación. Por tanto, algunas estrategias experimentales de atenuación de macrófagos M1 para la estimulación de la regeneración cutánea incluyen (Krzyszczuk et al., 2018):

- la administración sistémica de anticuerpos que neutralizan los factores activadores de macrófagos, como el TNF- α ;
- la inyección intradérmica de macrófagos M2 antiinflamatorios diferenciados *in vitro* con el suministro de los factores diferenciadores apropiados;
- la inyección intradérmica cerca de la periferia de la úlcera con macrófagos de donantes de sangre sanos;

- la aplicación tópica de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB);
- la implantación de hidrogeles de polietilenglicol (PEG) funcionalizado con péptidos con secuencia RGD, los cuales pueden modular la infiltración de macrófagos hacia la región lesionada;
- la inyección de hemina, una porfirina cargada con un ion Fe^{3+} , que promueve la síntesis de colágeno y la regeneración de la herida;
- la terapia de oxígeno hiperbárico, que tiene efectos inmunosupresores sobre los macrófagos.

Los macrófagos, las células dendríticas y otras células del sistema inmune son actualmente dianas que atraen mucho interés para nuevas estrategias efectivas para el tratamiento de úlceras diabéticas y otras heridas de curso crónico (Hesketh et al., 2017; Krzyszczyk et al., 2018).

2.3 La leche y la lactoferrina bovina

2.3.1 Composición de la leche

La leche es un alimento líquido que se produce en las glándulas mamarias de los mamíferos y que representa la principal fuente de nutrientes para los mamíferos en la primera infancia. Se le conoce como calostro a la leche producida durante el inicio de la lactancia, en la cual se le confiere a la cría muchos de los anticuerpos de la madre, otorgando de esta manera un primer reforzamiento del sistema inmune de la cría. Además, la leche es una fuente importante de lípidos, aminoácidos, vitaminas y minerales, así como péptidos con actividad metabólica e inmunológica, como inmunoglobinas, hormonas, factores de crecimiento, citocinas y enzimas (Haug et al., 2007).

En su composición, la leche es una emulsión de grasa en agua. El componente acuoso de la leche contiene compuestos disueltos como lactosa y minerales y consiste en una suspensión coloidal de proteínas. La leche en promedio tiene un contenido de agua (87.5%), lípidos (3.9%), proteínas (3.4%) y lactosa y minerales (5.2%) (Haug et al., 2007). Los lípidos de la leche se distribuyen en gotas pequeñas con un tamaño promedio de entre 3 y 4 μm que consisten principalmente de triglicéridos con algunas vitaminas liposolubles (**Figura 2.7a**). La fase acuosa o suero de la leche contiene cientos de tipos de proteínas que pueden estar completamente disueltas en el llamado suero o contenidas en micelas con estructuras jerárquicas; la dispersión de estas micelas le da el color blanco a la leche. Cada micela se compone de muchas submicelas con distintas composiciones y núcleos hidrofóbicos rodeados de proteínas más hidrofílicas (**Figura 2.7b**) (McMahon & Brown, 1984). Las submicelas están estabilizadas y unidas entre sí por partículas de fosfato de calcio, las cuales se desestabilizan a bajo pH, como ocurre durante la coagulación de la leche cuando se le añade un ácido.

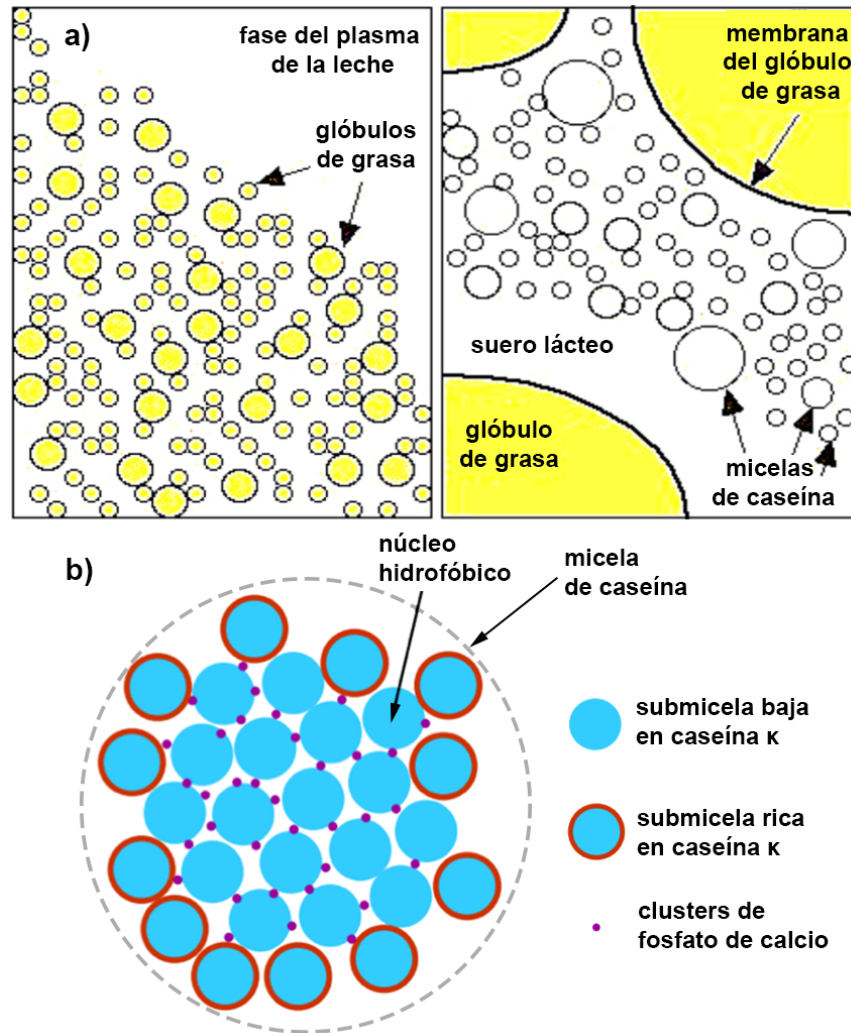


Figura 2.7 Fases y microestructura de la leche. a) Distribución de grasa en la leche. Los componentes lipídicos se muestran en amarillo. b) Microestructura de las micelas de caseína. Adaptado de (McMahon & Brown, 1984).

Las micelas contienen principalmente a las caseínas, que son un grupo de proteínas de bajo peso molecular (15–25 kDa) que forman la mayoría del contenido proteico de la leche. Por su parte, el suero lácteo contiene en menor cantidad otras proteínas de mayor peso molecular que juegan un papel más relevante en las funciones inmunes de los mamíferos, como las inmunoglobulinas que son anticuerpos sintetizados en respuesta a estímulos inmunogénicos como bacterias y virus (**Tabla 2.2**).

Tabla 2.2 Composición proteica de la leche bovina.

	Proteína	Contenido en leche descremada (g/L)	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico
Caseínas	α_{s1} -caseína	12–15	23.5	4.44–4.76
	α_{s2} -caseína	3–4	25.2	
	β -caseína	9–11	24.0	4.83–5.07

Proteínas del suero	κ-caseína	2–4	19.0	5.3–5.8
	β-lactoglobulina	2–4	18.4	5.13
	α-lactalbúmina	0.6–1.7	14.2	4.2–4.5
	Albúmina sérica	0.4	66.4	4.7–4.9
	Inmunoglobulina G1	0.3–0.6	161	5.5–6.8
	Inmunoglobulina G2	0.05	150	7.5–8.3
	Inmunoglobulina A	0.01	385–417	
	Inmunoglobulina M	0.09	1000	
	Componente secretorio	0.02–0.1	63.8	
	Lactoferrina	0.02–0.1	76.1	8.81

Adaptado de (Farrell et al., 2004).

La leche ha sido estudiada respecto a sus propiedades estimuladoras de la regeneración cutánea debido a sus componentes inmunomoduladores y antimicrobianos. Las caseínas, por ejemplo, tienen un importante efecto antimicrobiano, mientras que la fase lipídica de la leche puede brindar humectación a la herida. Asimismo, se han logrado extraer factores de crecimiento de la leche y se ha evaluado su aplicación para tratar desórdenes cutáneos, mucositis intestinal y la resorción ósea que ocurre en la osteoporosis (Pouliot & Gauthier, 2006). En particular, se ha estudiado la aplicación tópica de leche liofilizada en conejos con heridas profundas; se observó que la leche liofilizada redujo el tiempo de regeneración y cicatrización de la herida de manera equiparable a la fenitoína, un fármaco utilizado como control positivo (Hemmati et al., 2018). Otro estudio se enfocó en un ungüento a base de miel, leche y extracto de *Aloe vera*; en comparación con la sulfadiazina de plata (un agente antimicrobiano presente en muchos apósitos disponibles en el mercado), este ungüento redujo de igual forma el tiempo de regeneración en modelos murinos (Farzadinia et al., 2016).

2.3.2 Lactoferrina: propiedades y aplicaciones terapéuticas

La lactoferrina es una glicoproteína de 76 kDa con afinidad a iones hierro secretada por los mamíferos en los fluidos corporales como el calostro, las lágrimas, el sudor, las mucosas y, en menores cantidades, en la leche. Además, es liberada de los gránulos contenidos en los neutrófilos en presencia de microorganismos, por lo que tiene intrínsecamente una función inmunológica. Dentro de las principales actividades biológicas que cumple la lactoferrina se encuentran la unión y transporte de hierro, la afinidad por el lípido A de lipopolisacárido que le confiere una actividad antimicrobiana y, de manera importante, la capacidad de modular el sistema inmunitario, la cual se observa de manera acentuada cuando la lactoferrina administrada es de origen exógeno, por ejemplo, aislada de leche bovina (Siqueiros-Cendón et al., 2014). Su principal actividad inmunomoduladora ha sido descrita principalmente a nivel mucosal y nervioso (Fillebeen et al., 2001; Legrand et al., 2004). Sin embargo, también tiene la capacidad de inducir respuestas en el epitelio cutáneo en las distintas etapas de la regeneración cutánea. La lactoferrina puede promover la fase inflamatoria temprana incrementando la producción de citocinas proinflamatorias, así como

tener actividad antiinflamatoria para neutralizar una respuesta inmune exagerada (Takayama & Aoki, 2012), ejerciendo además una potente modulación sobre células presentadoras de antígeno como los macrófagos y las células de Langerhans (Puddu et al., 2009). A nivel de los macrófagos, la lactoferrina contribuye a suprimir la producción de citocinas proinflamatorias y puede aumentar la actividad fagocítica (Siqueiros-Cendón et al., 2014). Este aumento en la fagocitosis de los macrófagos por acción de la lactoferrina se ha reportado contra una gran variedad de microorganismos, incluyendo bacterias gram positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*), gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) y hongos (*Candida spp.*) (Siqueiros-Cendón et al., 2014).

La lactoferrina y en particular la lactoferrina bovina (bLf) presentan una actividad antimicrobiana importante mediante dos mecanismos principales adicionales a aquellos que dependen de las células inmunes. Primero, al igual que otras moléculas quelantes de hierro como la deferoxamina (Thompson et al., 2012), la lactoferrina tiene actividad bacteriostática debido a su afinidad por iones hierro, disminuyendo la disponibilidad de éstos para la formación y supervivencia de películas bacterianas o *biofilms* (Ammons & Copié, 2013; Singh et al., 2002). La inhibición de películas bacterianas debido a la lactoferrina se ha reportado no sólo para bacterias gram negativas como *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*, sino también gram positivas como *Staphylococcus epidermidis* (Siqueiros-Cendón et al., 2014). Segundo, la lactoferrina tiene regiones catiónicas amplias en su superficie que le imparten una alta afinidad por el lípido A, un componente con carga negativa de los lipopolisacáridos, los cuales contribuyen a la estabilidad estructural de la membrana externa de las bacterias gram negativas. Esta interacción puede dañar la membrana bacteriana al alterar su permeabilidad, lo cual le otorga a la lactoferrina una actividad antibacteriana de amplio espectro que además muestra efectos de sinergia al ser administrada en conjunto con antibióticos comerciales (Jensen & Hancock, 2009). Por estas razones, en el caso de úlceras de pie diabético y heridas cutáneas infectadas, la lactoferrina ha sido catalogada como un método para mitigar infecciones y la formación de películas bacterianas sobre la herida, a la par con formulaciones de yodo y plata (Drago-Serrano et al., 2011; Iorio et al., 2018).

Más allá de su capacidad para la prevención y el tratamiento de infecciones en heridas cutáneas, la lactoferrina podría favorecer la revascularización, un proceso indispensable para la reepitelialización que se encuentra dificultada en pacientes hiperglucémicos. La actividad quelante de hierro de la lactoferrina sugiere que podría contribuir a mitigar los efectos de la hiperglucemia en la señalización celular que inhiben la formación de nuevos vasos sanguíneos, al secuestrar iones hierro y normalizar la actividad de HIF-1 α como factor de transcripción asociado a la revascularización, de manera análoga al mecanismo de acción proangiogénica que se ha reportado para la deferoxamina (Chen et al., 2016) (**Figura 2.6**).

Las potenciales aplicaciones de la lactoferrina en la regeneración dérmica están apoyadas no sólo por su capacidad antimicrobiana y antiinflamatoria, sino también por sus efectos directos en la actividad de las células de la piel. Se ha reportado que la lactoferrina humana promueve la migración y la actividad contráctil de fibroblastos sobre geles de colágeno *in vitro* de forma dependiente de la dosis (Takayama & Mizumachi, 2001). Asimismo, una lactoferrina humana recombinante favoreció la migración y la proliferación de queratinocitos epidérmicos humanos *in vitro* y aumentó el grado de reepitelialización de

heridas en un modelo porcino (L. Tang et al., 2010). Aunque el mecanismo para explicar estos efectos en la actividad celular no se ha dilucidado por completo, se ha propuesto que la lactoferrina se une a la proteína relacionada al receptor de lipoproteína de baja densidad 1 (LRP-1), el cual es un receptor de membrana relacionado con la regulación de la movilidad y contractilidad celular y expresado por fibroblastos dérmicos y queratinocitos epidérmicos (Takayama, 2012). La activación de LRP-1 promueve la activación de las proteínas cinasas asociadas a Rho (ROCK) y las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) (Takayama & Mizumachi, 2001; Ling Tang et al., 2010), las cuales a su vez promueven la activación de la cadena ligera de miosina (MLC) favoreciendo la actividad contráctil (Takayama & Takezawa, 2006) como se muestra en la **Figura 2.8**. La capacidad de contracción de los fibroblastos y queratinocitos inducida por la lactoferrina puede facilitar la migración celular necesaria para la reepitelialización de la herida (Takayama, 2012).

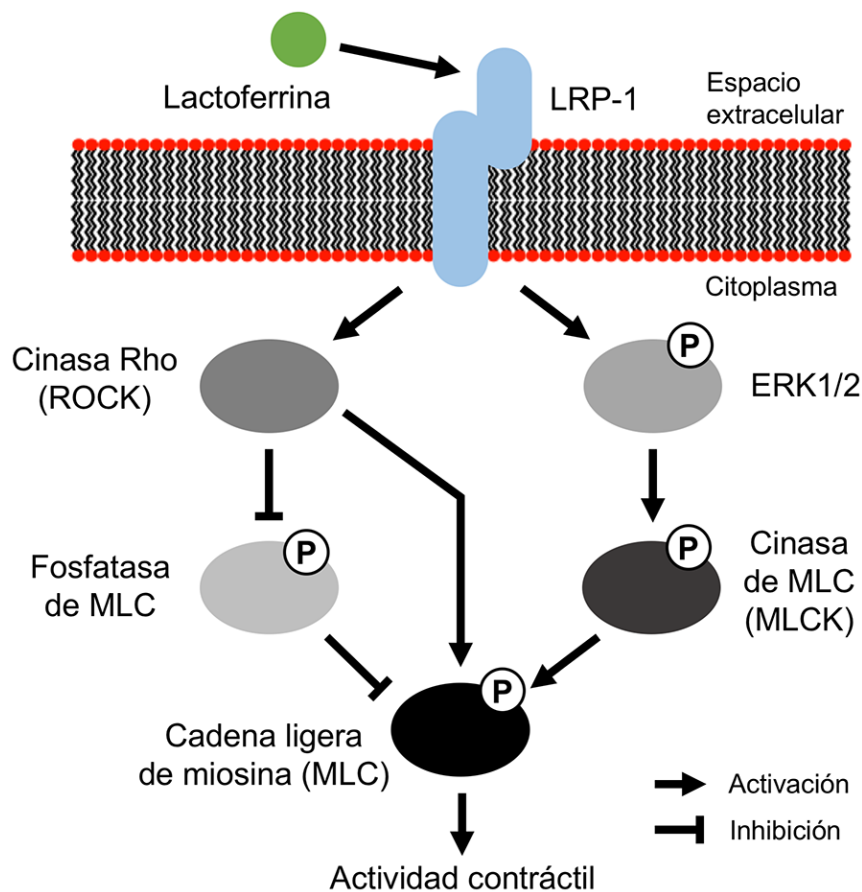


Figura 2.8 Posibles mecanismos del aumento en la actividad contráctil de fibroblastos dérmicos humanos en respuesta a la lactoferrina. **LRP-1**: proteína relacionada al receptor de lipoproteína de baja densidad 1; **ROCK**: cinasa asociada a Rho; **ERK1/2**: cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2; **MLC**: cadena ligera de miosina; **MLCK**: cinasa de la cadena ligera de miosina. Adaptado de (Takayama & Takezawa, 2006).

Además, se ha reportado en fibroblastos dérmicos humanos normales *in vitro* que la presencia de bLf incrementa la síntesis celular de ácido hialurónico y colágeno tipo 1

mediante la expresión aumentada de las enzimas productoras correspondientes (Saito et al., 2011). El ácido hialurónico y el colágeno tipo 1 son componentes principales de la matriz extracelular de la dermis y epidermis y participan de manera importante en la migración y proliferación celulares y la modulación de la respuesta inflamatoria durante el proceso de cicatrización de heridas (Xue & Jackson, 2015). Por esto, la administración de bLf podría estimular la deposición de matriz extracelular necesaria para la reepitelialización exitosa de heridas cutáneas.

En conjunto, sus propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras, así como su potencial en la estimulación de la revascularización y la contractilidad de las células de la piel, hacen de la bLf un agente adyuvante atractivo para el tratamiento o prevención de las úlceras de pie diabético, considerando también la disponibilidad de esta proteína en la leche bovina. La actividad antiinflamatoria y regulatoria de la bLf ha motivado su uso reciente como agente bioactivo en andamios de policaprolactona producidos mediante manufactura aditiva para el cultivo de queratinocitos dérmicos y fibroblastos, mostrando resultados prometedores para su aplicación en la regeneración de tejido dérmico (Hewitt et al., 2019). Es importante recalcar que en este estudio la bLf, junto con otras proteínas del suero lácteo, mantuvieron su actividad en gran medida incluso después de haber sido procesadas en una mezcla con policaprolactona a una temperatura de 85 °C, lo cual es evidencia adicional de la alta estabilidad de estas proteínas como se ha reportado previamente (Sreedhara et al., 2010). Por otra parte, la bLf ha sido utilizada para regenerar tejido corneal en un modelo murino de herida en córnea, observando tiempos menores de regeneración y una reducción en la inflamación (Pattamatta et al., 2013). Quedan por analizar las opciones de administración más adecuadas para que la lactoferrina llegue a sus dianas terapéuticas y al sitio de acción sin perder su actividad, así como diseñar un dispositivo que administre esta proteína y siga las limitantes y los cuidados que requiere el tratamiento de heridas cutáneas crónicas.

2.4 Bibliografía de capítulo

- Ammons, M. C., & Copié, V. (2013). Mini-review: Lactoferrin: a bioinspired, anti-biofilm therapeutic. *Biofouling*, 29(4), 443–455.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2013.773317>
- Betts, J. G., Young, K. A., Wise, J. A., Johnson, E., Poe, B., Kruse, D. H., Korol, O., Johnson, J. E., & Womble, M. (2017). *Anatomy & Physiology*. OpenStax.
<https://www.oercommons.org/courses/anatomy-and-physiology-4>
- Cañedo-Dorantes, L., & Cañedo-Ayala, M. (2019). Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International Journal of Inflammation*, 2019, 1–15.
<https://doi.org/10.1155/2019/3706315>
- Chen, H., Jia, P., Kang, H., Zhang, H., Liu, Y., Yang, P., Yan, Y., Zuo, G., Guo, L., Jiang, M., Qi, J., Liu, Y., Cui, W., Santos, H. A., & Deng, L. (2016). Upregulating Hif-1 α by Hydrogel Nanofibrous Scaffolds for Rapidly Recruiting Angiogenesis Relative Cells in Diabetic Wound. *Advanced Healthcare Materials*, 5(8), 907–918.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201501018>

- Drago-Serrano, M. E., la Garza, M. D., & Campos-Rodriguez, R. (2011). Lactoferrin as an Adjunctive Agent in the Treatment of Bacterial Infections Associated with Diabetic Foot Ulcers. En *Global Perspective on Diabetic Foot Ulcerations*. InTech. <https://doi.org/10.5772/29163>
- Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F., & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641–1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
- Farzadinia, P., Jofreh, N., Khatamsaz, S., Movahed, A., Akbarzadeh, S., Mohammadi, M., & Bargahi, A. (2016). Anti-inflammatory and Wound Healing Activities of *Aloe vera*, Honey and Milk Ointment on Second-Degree Burns in Rats. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 15(3), 241–247. <https://doi.org/10.1177/1534734616645031>
- Fillebeen, C., Ruchoux, M.-M., Mitchell, V., Vincent, S., Benai`ssa, M., & Pierce, A. (2001). Lactoferrin is synthesized by activated microglia in the human substantia nigra and its synthesis by the human microglial CHME cell line is upregulated by tumor necrosis factor α or 1-methyl-4-phenylpyridinium treatment. *Molecular Brain Research*, 96(1–2), 103–113. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00216-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00216-9)
- Gale, A. J. (2011). Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis. *Toxicologic Pathology*, 39(1), 273–280. <https://doi.org/10.1177/0192623310389474>
- Gonzalez, A. C. de O., Costa, T. F., Andrade, Z. de A., & Medrado, A. R. A. P. (2016). Wound healing—A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(5), 614–620. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>
- Han, G., & Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in Therapy*, 34(3), 599–610. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>
- Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>
- Hemmati, A. A., Larki-Harchegani, A., shabib, S., Jalali, A., Rezaei, A., & Housmand, G. (2018). Wound healing property of milk in full thickness wound model of rabbit. *International Journal of Surgery*, 54, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2018.04.030>
- Hesketh, M., Sahin, K. B., West, Z. E., & Murray, R. Z. (2017). Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1545. <https://doi.org/10.3390/ijms18071545>

- Hewitt, E., Mros, S., Mcconnell, M., Cabral, J., & Ali, A. (2019). Melt-electrowriting with novel milk protein/PCL biomaterials for skin regeneration. *Biomedical Materials*. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab3344>
- Hou, Z., Nie, C., Si, Z., & Ma, Y. (2013). Deferoxamine enhances neovascularization and accelerates wound healing in diabetic rats via the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α . *Diabetes Research and Clinical Practice*, *101*(1), 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.04.012>
- Iorio, M. L., Evans, K. K., & Attinger, C. E. (2018). Soft Tissue Reconstructive Options for the Ulcerated or Gangrenous Diabetic Foot. En A. Veves, J. M. Giurini, & R. J. Guzman (Eds.), *The Diabetic Foot* (pp. 345–390). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89869-8_21
- Jenssen, H., & Hancock, R. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*, *91*(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.015>
- Krzyszczczyk, P., Schloss, R., Palmer, A., & Berthiaume, F. (2018). The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in Physiology*, *9*, 419. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00419>
- Legrand, D., Ellass, E., Pierce, A., & Mazurier, J. (2004). Lactoferrin and host defence: An overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *BioMetals*, *17*(3), 225–229. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000027696.48707.42>
- McMahon, D. J., & Brown, R. J. (1984). Composition, Structure, and Integrity of Casein Micelles: A Review. *Journal of Dairy Science*, *67*(3), 499–512. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81332-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81332-6)
- Montavit. (2020). *Wound Healing*. Internet. <https://www.montavit.com/en/areas-therapy/healing-wounds>
- Pattamatta, U., Willcox, M., Stapleton, F., & Garrett, Q. (2013). Bovine Lactoferrin Promotes Corneal Wound Healing and Suppresses IL-1 Expression in Alkali Wounded Mouse Cornea. *Current Eye Research*, *38*(11), 1110–1117. <https://doi.org/10.3109/02713683.2013.811259>
- Porporato, P. E., Payen, V. L., De Saedeleer, C. J., Pr at, V., Thissen, J.-P., Feron, O., & Sonveaux, P. (2012). Lactate stimulates angiogenesis and accelerates the healing of superficial and ischemic wounds in mice. *Angiogenesis*, *15*(4), 581–592. <https://doi.org/10.1007/s10456-012-9282-0>
- Pouliot, Y., & Gauthier, S. F. (2006). Milk growth factors as health products: Some technological aspects. *International Dairy Journal*, *16*(11), 1415–1420. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.006>

- Puddu, P., Valenti, P., & Gessani, S. (2009). Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells. *Biochimie*, *91*(1), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.005>
- Rousselle, P., Braye, F., & Dayan, G. (2019). Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *146*, 344–365. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.019>
- Ryoo, S. M., & Kim, W. Y. (2018). Clinical applications of lactate testing in patients with sepsis and septic shock. *Journal of Emergency and Critical Care Medicine*, *2*, 14–14. <https://doi.org/10.21037/jeccm.2018.01.13>
- Saito, S., Takayama, Y., Mizumachi, K., & Suzuki, C. (2011). Lactoferrin promotes hyaluronan synthesis in human dermal fibroblasts. *Biotechnology Letters*, *33*(1), 33–39. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0389-3>
- Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., & Welsh, M. J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, *417*(6888), 552–555. <https://doi.org/10.1038/417552a>
- Siqueiros-Cendón, T., Arévalo-Gallegos, S., Iglesias-Figueroa, B. F., García-Montoya, I. A., Salazar-Martínez, J., & Rascón-Cruz, Q. (2014). Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacologica Sinica*, *35*(5), 557–566. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.200>
- Sreedhara, A., Flengsrud, R., Langsrud, T., Kaul, P., Prakash, V., & Vegarud, G. E. (2010). Structural characteristic, pH and thermal stabilities of apo and holo forms of caprine and bovine lactoferrins. *BioMetals*, *23*(6), 1159–1170. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9366-5>
- Sun, S., Li, H., Chen, J., & Qian, Q. (2017). Lactic Acid: No Longer an Inert and End-Product of Glycolysis. *Physiology*, *32*(6), 453–463. <https://doi.org/10.1152/physiol.00016.2017>
- Takayama, Y. (2012). Effects of Lactoferrin on Skin Wound Healing. En Y. Takayama, *Lactoferrin and its Role in Wound Healing* (pp. 87–100). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2467-9_5
- Takayama, Y., & Aoki, R. (2012). Roles of lactoferrin on skin wound healing. *Biochemistry and Cell Biology*, *90*(3), 497–503. <https://doi.org/10.1139/o11-054>
- Takayama, Y., & Mizumachi, K. (2001). Effects of lactoferrin on collagen gel contractile activity and myosin light chain phosphorylation in human fibroblasts. *FEBS Letters*, *508*(1), 111–116. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03041-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03041-1)
- Takayama, Y., & Takezawa, T. (2006). Lactoferrin promotes collagen gel contractile activity of fibroblasts mediated by lipoprotein receptors This paper is one of a

selection of papers published in this Special Issue, entitled 7th International Conference on Lactoferrin: Structure, Function, and Applications, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*, 84(3), 268–274. <https://doi.org/10.1139/o06-041>

- Tang, L., Wu, J. J., Ma, Q., Cui, T., Andreopoulos, F. M., Gil, J., Valdes, J., Davis, S. C., & Li, J. (2010). Human lactoferrin stimulates skin keratinocyte function and wound re-epithelialization: HLF stimulates wound re-epithelialization. *British Journal of Dermatology*, 163(1), 38–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.09748.x>
- Tang, Ling, Cui, T., Wu, J. J., Liu-Mares, W., Huang, N., & Li, J. (2010). A rice-derived recombinant human lactoferrin stimulates fibroblast proliferation, migration, and sustains cell survival. *Wound Repair and Regeneration*, 18(1), 123–131. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00563.x>
- Thompson, M. G., Corey, B. W., Si, Y., Craft, D. W., & Zurawski, D. V. (2012). Antibacterial Activities of Iron Chelators against Common Nosocomial Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(10), 5419–5421. <https://doi.org/10.1128/AAC.01197-12>
- Xiao, Y., Ahadian, S., & Radisic, M. (2017). Biochemical and Biophysical Cues in Matrix Design for Chronic and Diabetic Wound Treatment. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 23(1), 9–26. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2016.0200>
- Xue, M., & Jackson, C. J. (2015). Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care*, 4(3), 119–136. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>

Capítulo 3

Técnicas y métodos generales

3.1 Procesamiento de mezclas poliméricas con agentes bioactivos

3.1.1 Electrohilado de mallas fibrilares

El electrohilado, también conocido como hilado electrohidrodinámico, ha recibido gran interés en la producción de andamios y excipientes para la regeneración tisular, puesto que es un proceso versátil para la fabricación electrostática de nano- y microfibras a partir de disoluciones poliméricas, las cuales se recolectan en forma de mallas no tejidas con altas relaciones superficie-volumen (Jiang et al., 2015). El electrohilado tiene una larga historia en la producción de micro- y nanoestructuras, así como mallas fibrilares cargadas con fármacos (Torres-Martinez et al., 2019; Tucker et al., 2012).

En esta técnica, se aplica un alto campo eléctrico (entre 1 y 2 kV cm⁻¹) sobre una disolución de polímero que se extruye a través de un capilar metálico conectado a una fuente de voltaje. Cuando una gota de la disolución crece en la punta del capilar, el campo eléctrico superficial genera una gran cantidad de cargas libres que se repelen mutuamente, lo cual sobrepasa la tensión superficial y la elasticidad fluídica de la disolución y deforma la gota hasta que toma una forma cónica, conocida como el cono de Taylor. Si la repulsión superficial aumenta más allá de un umbral determinado, un chorro de disolución emerge del cono y viaja hacia un colector, es decir, una superficie conductora conectada a tierra física. Debido a la alta tasa de deformación, la viscosidad de la disolución y la evaporación del disolvente, el chorro se adelgaza y se estira mientras viaja del capilar al colector, generando así fibras largas, continuas y secas con orientación aleatoria o alineada, dependiendo de la modalidad de recolección. La viscosidad de la disolución, la presión de vapor y la constante eléctrica del disolvente, así como el voltaje aplicado, la distancia entre el inyector y el colector y la humedad y temperatura ambientales, son todos algunos de los parámetros clave para la producción de fibras electrohiladas con morfologías uniformes y distribución de tamaños regulares.

Las mallas electrohiladas a base de polímeros biocompatibles pueden utilizarse como matrices temporales y seguras que contribuyan a la adhesión y proliferación celular en el sitio de una herida, donde la población celular y su andamio nativo —la llamada matriz extracelular (MEC)— han sido reducidas por una lesión (Liu et al., 2017). Puesto que es posible modular la porosidad de los andamios electrohilados, éstos pueden emular la morfología nativa de la red fibrilar de colágeno de la MEC, mientras que permiten algunos procesos dependientes de la porosidad que son esenciales para la regeneración tisular, como la penetración celular y la revascularización. Además, la biofuncionalidad de los polímeros electrohilados como materiales para ingeniería de tejidos se puede ampliar mediante su uso en plataformas para la encapsulación y liberación local de fármacos, en especial para aplicaciones en regeneración cutánea (Boateng et al., 2008; Braga & Pais, 2018; Villarreal-Gómez et al., 2016).

3.1.2 Electrorrociado de partículas

La técnica de electrorrociado es muy similar a la de electrohilado, ya que también se utiliza la repulsión eléctrica para eyectar una disolución de una jeringa de inyección. Sin embargo, en esta técnica, es necesario modificar los parámetros de voltaje, viscosidad de la disolución, distancia inyector-colector, entre otros, para que se puedan recolectar partículas del polímero usado a partir de la disolución eyectada. Los parámetros de electrorrociado deben optimizarse para lograr la obtención de partículas con la morfología deseada y con una distribución uniforme de diámetros.

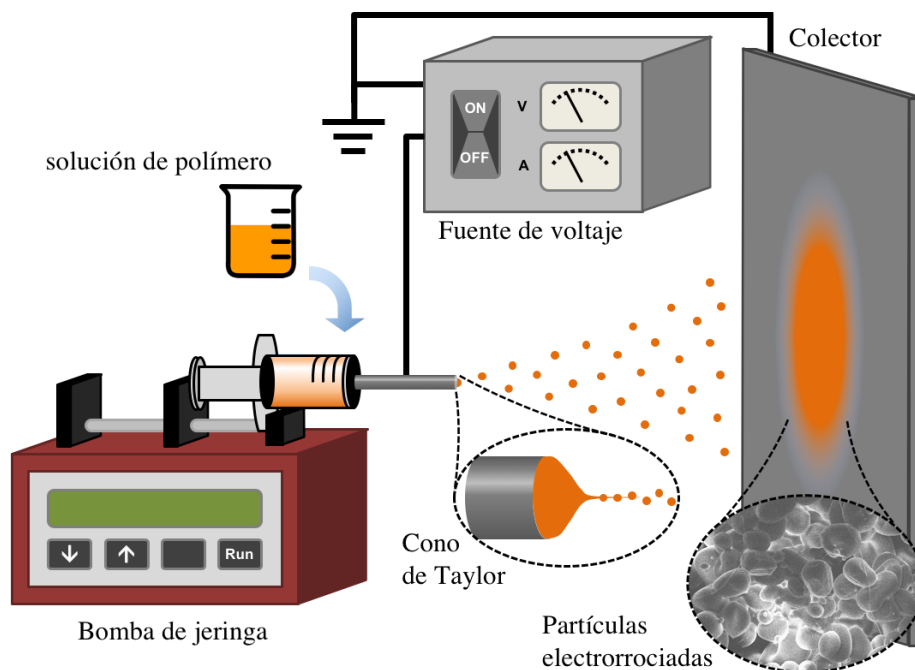


Figura 3.1 Arreglo experimental típico en la técnica de electrorrociado para la deposición de partículas a partir de una disolución de polímero.

3.2 Técnicas de caracterización de materiales

3.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica se basa en el uso de haces de electrones para examinar objetos a escalas muy pequeñas, sobrepasando las limitantes de la microscopía óptica respecto al límite de resolución impuesto por la longitud de onda de la luz visible. En cambio, al ser mucho menores las longitudes de onda de haces electrónicos, la microscopía electrónica permite resolver detalles en la escala de nanómetros, alcanzando magnificaciones de hasta 500,000x.

En particular, la microscopía electrónica de barrido (SEM) consiste en colocar la muestra en una cámara de vacío y retirar todo el aire que se encuentra dentro de ella. De manera inmediata, se enciende el emisor de electrones para bombardear la muestra. Las

fuentes de electrones pueden ser filamentos de tungsteno o de carbono o punta de emisión (para el caso de SEM de campo de emisión) sometidos a altos voltajes. Los electrones viajan a través del arreglo de lentes electromagnéticas diseñadas para obtener un haz convergente de electrones. Las bobinas ubicadas bajo el arreglo de lentes dirigen al haz de electrones de izquierda a derecha y de arriba a abajo de tal forma que se realiza un barrido en toda la superficie de la muestra que se encuentra en la base de la cámara de vacío. Los electrones que golpean la muestra salen difractados hacia el detector. Este último capta esa señal y la manda a un procesador donde se convierte en imagen.

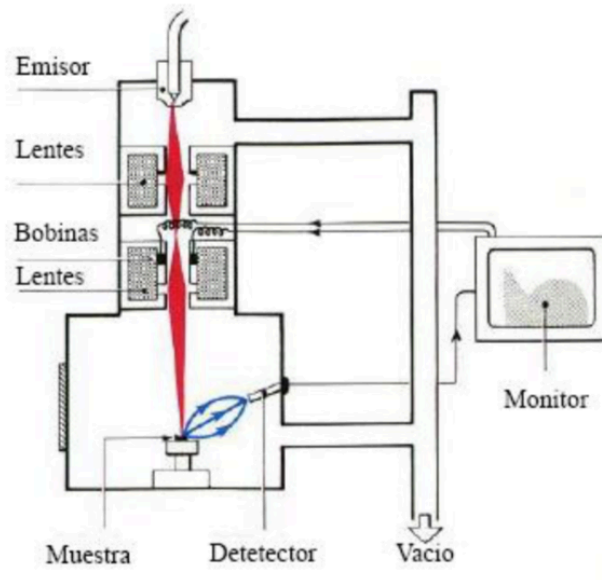


Figura 3.2 Componentes de un microscopio electrónico de barrido.

3.2.2 *Análisis termogravimétrico (TGA)*

La termogravimetría o análisis termogravimétrico (TGA) permite analizar los fenómenos y propiedades térmicas de un material. Esta técnica mide la variación de la masa de una muestra cuando se le somete a un cambio de temperatura en una atmósfera controlada. Esta variación puede ser una pérdida o ganancia de masa, en función de la capacidad de descomposición o adsorción de los componentes de la muestra a distintas temperaturas. Los cambios de masa en el TGA pueden deberse a la absorción o desorción de componentes volátiles, descomposiciones y cambios químicos como oxidaciones y reducciones.

Algunas características de la caracterización por TGA dependiendo del equipo utilizado son:

- El intervalo de temperaturas puede ser de 20 a 1500 °C.
- La tasa o velocidad de calentamiento puede ser de 0 a 200 °C min⁻¹.
- El horno debe estar aislado del resto del dispositivo.
- Los tipos de atmósfera a utilizar pueden ser: oxidante, reductora, autogenerada e inerte.
- La muestra se coloca sobre una platina de un material que no reaccione con los componentes de la muestra, por lo que se debe conocer previamente su reactividad.

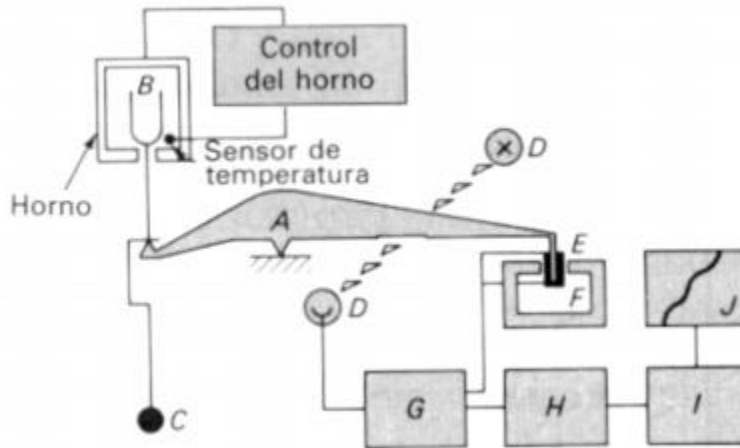


Figura 3.3 Componentes de la balanza térmica en un equipo de TGA. A) Brazo; B) portamuestras y soporte; C) contador de masa; D) lámpara y fotodiodos; E) bobina; F) imán; G) control del amplificador; H) calculador del peso; I) amplificador; J) computadora.

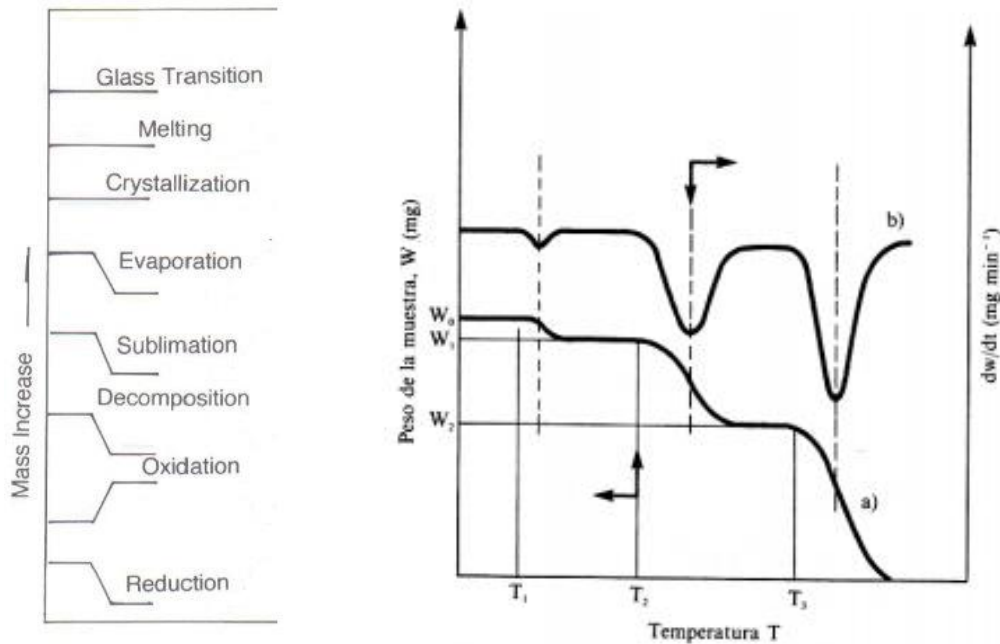


Figura 3.4 Curvas características de TGA para distintos tipos de transiciones o eventos térmicos de un material (izquierda). Curva típica de TGA para un material con tres eventos a distintas temperaturas de pérdida de masa (derecha).

Algunos factores instrumentales que afectan la medición son:

- la geometría del portamuestras
- la velocidad de calentamiento
- la atmósfera

Algunos factores de la muestra que afectan la medición son:

- la masa medida
- la volatilidad de los componentes
- el tamaño de partícula de la muestra

En general, el TGA puede proporcionar una amplia gama de información sobre la muestra, incluyendo la estabilidad térmica oxidativa, la composición de materiales compuestos, la estimación del tiempo de vida de un producto, los puntos de ebullición y la presión de vapor.

3.2.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) permite el estudio de procesos en los que se produzcan cambios de entalpía de un material en función de la temperatura. La información que puede proporcionar este tipo de análisis incluye la capacidad calorífica y calor específico, puntos de ebullición y cristalización, pureza y cristalinidad de los compuestos, entalpías de reacción, fusión y cristalización, transiciones de fase, descomposiciones, entre otros.

El principio de operación de la DSC se basa en la comparación del comportamiento térmico de la muestra y un material de referencia. La muestra y la referencia se colocan en compartimientos separados y se les suministra una magnitud determinada de energía eléctrica a resistencias que la convierten en energía térmica. Se registran las temperaturas de cada compartimiento y la temperatura programada, así como la energía suministrada necesaria para que las temperaturas de ambos compartimientos permanezcan idénticas. En el caso de transiciones de fase, la integral normalizada de la señal correspondiente es la entalpía asociada a esa transición.

Algunos factores instrumentales o de la muestra que afectan la medición son:

- la geometría de los compartimientos
- la velocidad de calentamiento o enfriamiento
- el tipo de registro del termograma
- el tipo de sensor de temperatura
- la atmósfera
- el historial térmico previo
- el grado de división de la muestra
- el tamaño de la muestra

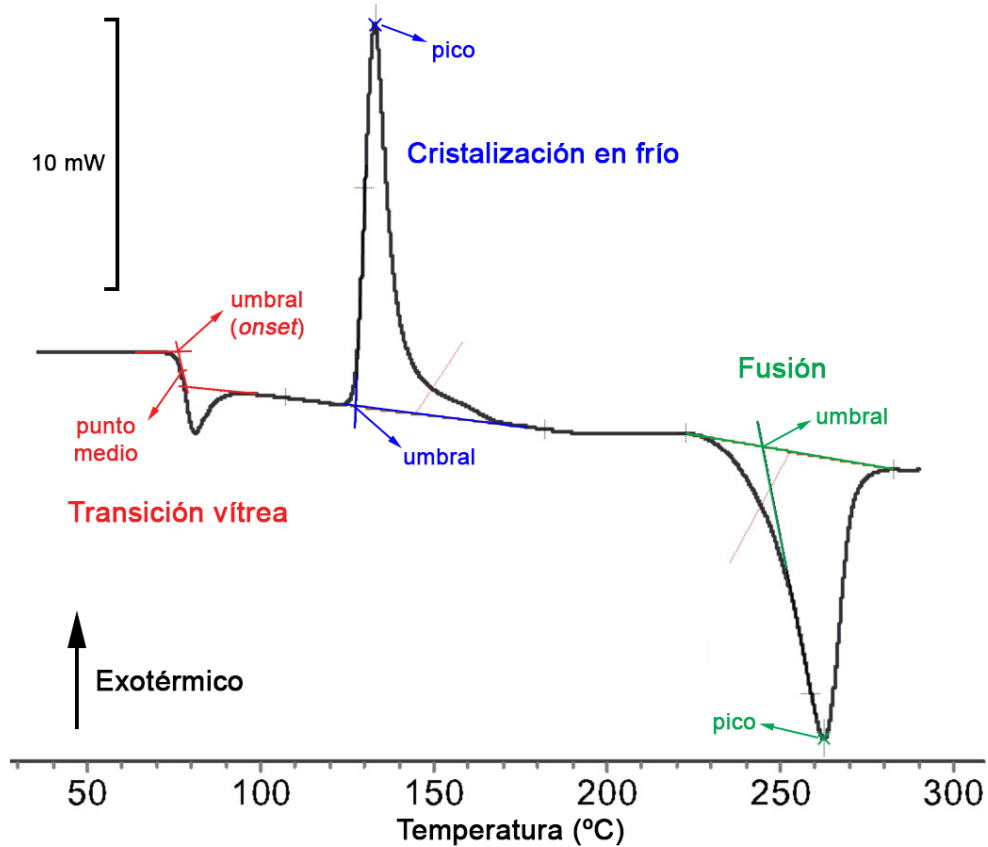


Figura 3.5 Curva característica de DSC para el poli(tereftalato de etileno) (PET), mostrando una transición vítrea, una transición de cristalización y un punto de fusión. Adaptado de (KEP Technologies, s/f).

3.2.4 Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) permite medir las frecuencias de vibración de átomos enlazados, generando distintos modos de vibración en respuesta a la incidencia de radiación en la región infrarroja (generalmente con frecuencias en el intervalo $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$).

Algunos factores que determinan la posición de las señales de absorción en el espectro FTIR son:

- La masa de los átomos: a mayor masa, menor frecuencia de absorción
- El orden o fuerza de enlace: a mayor orden, mayor energía de disociación y mayor frecuencia de absorción
- El ambiente químico: los enlaces de átomos vecinos cambian la fuerza del enlace de interés

Por su parte, la intensidad de la absorción infrarroja depende del cambio en el momento dipolar debido a la vibración (no puede haber absorción si la vibración no genera

un cambio neto en el momento dipolar) y de la concentración de moléculas en la muestra, según la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon LC \quad \text{(Ecuación 3.1)}$$

donde A es la absorbancia, ϵ es la absortividad molar, L es la longitud del camino óptico y C es la concentración de la muestra.

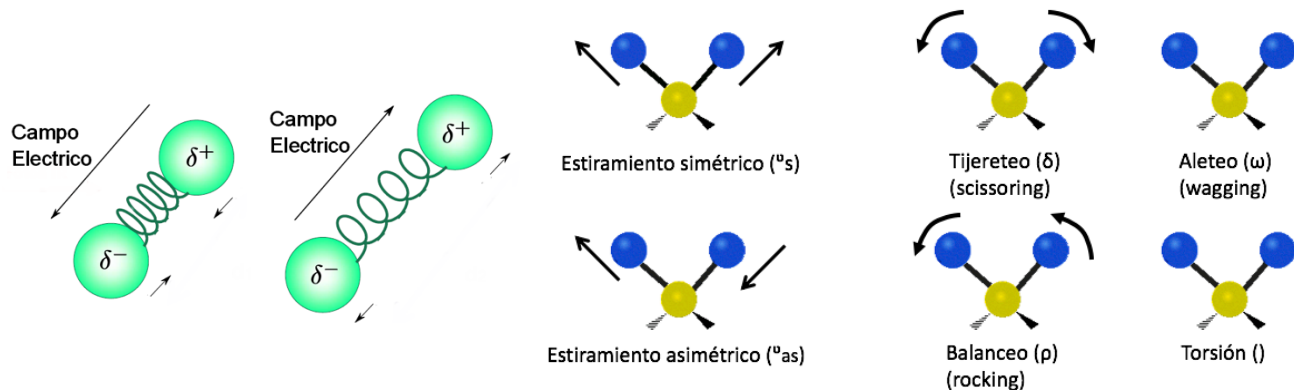


Figura 3.6 La espectroscopía FTIR opera con base en la generación de vibraciones en los enlaces atómicos. Adaptado de (LibreTexts, 2020).

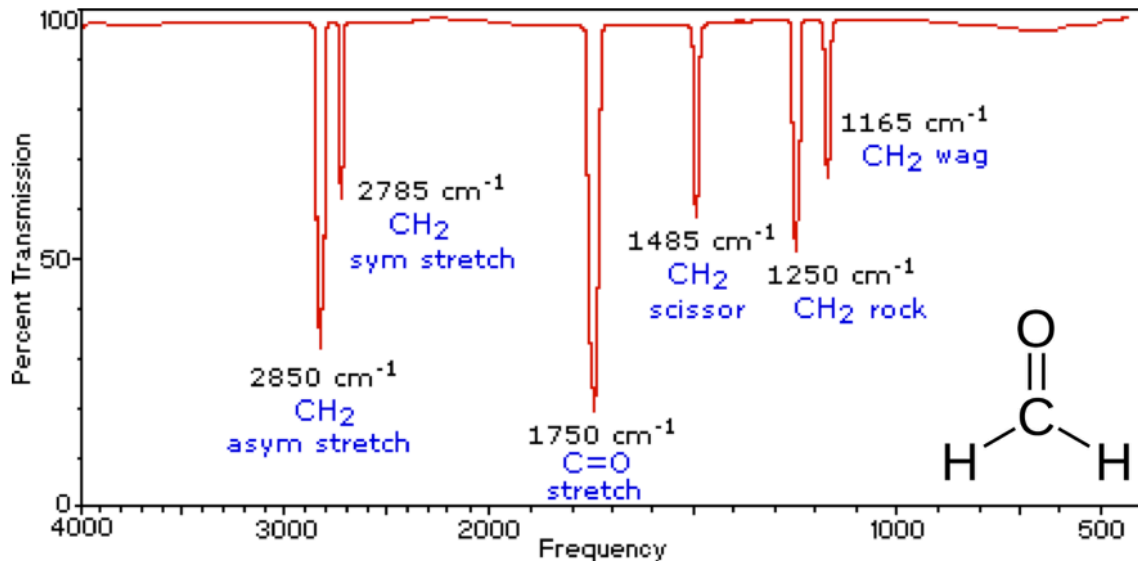


Figura 3.7 Espectro típico de FTIR del formaldehído, con las asignaciones de las señales de absorción. Fuente: (Reusch, 2013)

El ancho de las señales infrarrojas está determinado por el número de ambientes químicos, lo cual se relaciona con la fuerza de las interacciones intermoleculares, como los puentes de hidrógeno. Dado que el número y fuerza de los puentes de hidrógeno difiere con el ambiente químico, varía la fuerza de los enlaces, por lo que cambia la frecuencia a la que las moléculas absorben radiación IR.

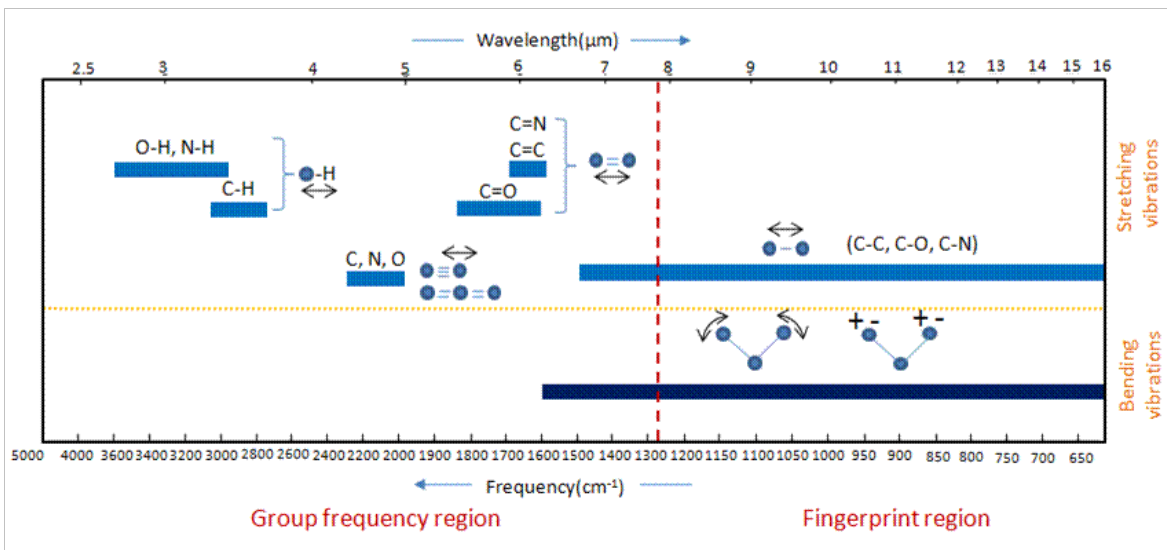


Figura 3.8 Regiones de absorción para diferentes grupos funcionales en el espectro infrarrojo, generando dos regiones: una de grupos funcionales y una llamada región de huella dactilar. Fuente: (Reusch, 2013)

3.2.5 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) es una técnica de análisis no destructiva que permite identificar la estructura molecular de un compuesto mediante las interacciones de los núcleos atómicos de la muestra con un campo magnético externo. Dado que la medición depende de un cambio en la dirección del espín nuclear en un átomo de la muestra, sólo pueden medirse los átomos con un espín nuclear neto distinto de cero, como es el caso de los elementos con masa atómica impar, como ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P .

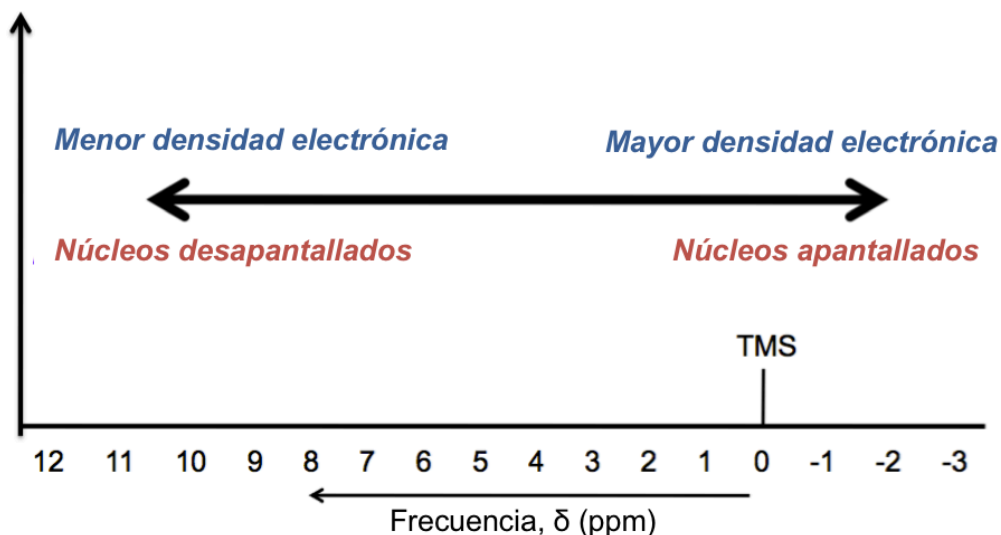
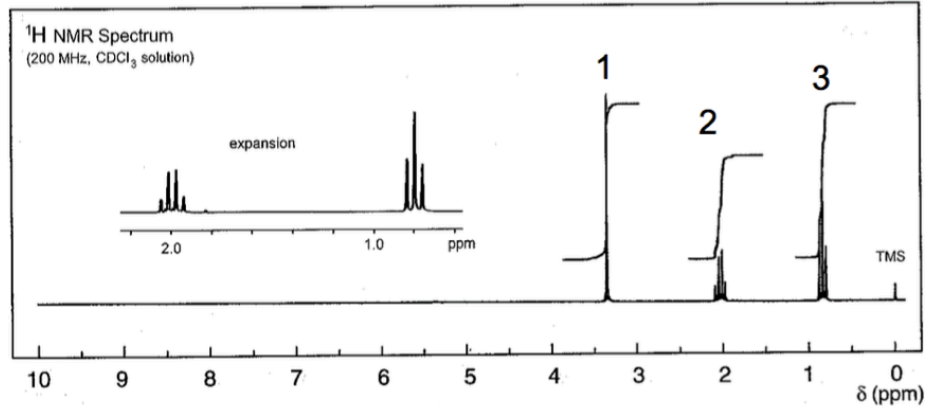


Figura 3.9 Esquema que relaciona la posición de una señal en el espectro NMR con la densidad electrónica y grado de apantallamiento del átomo asociado.

A diferentes campos magnéticos, diferentes átomos de la molécula generarán una señal, dependiendo del ambiente químico de los mismos, en particular, dependiendo de la magnitud del apantallamiento magnético, la electronegatividad y la densidad electrónica del átomo en cuestión y los átomos vecinos.



Señal	ppm	Integral	División	Constante J	Conclusión
1	3.4	3	singulete	----	-CH ₃
2	2.0	2	cuadruplete	misma	-CH ₂ -CH ₃
3	0.5	3	triplete	constante	-CH ₂ -CH ₃

Figura 3.10 Espectro NMR típico de la etilmetilcetona y la información extraída del espectro, ejemplificando el proceso de asignación de señales.

3.2.6 Difracción de rayos X (XRD)

La difracción de rayos X (XRD) es una técnica que permite analizar fases cristalinas de un material a partir de la dispersión coherente de haces de rayos X. Esta dispersión se origina por el choque de fotones incidentes contra electrones firmemente ligados a los átomos de una red cristalina. La periodicidad de la red genera casos de interferencia constructiva en el haz difractado, siguiendo la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{(Ecuación 3.2)}$$

donde n es un número entero positivo, λ es la longitud de onda del haz, d es la distancia interplanar y θ es el ángulo del haz difractado respecto al plano cristalino de difracción.

A partir de la XRD, se puede determinar la distancia interplanar, que dependiendo del ángulo del haz difractado, puede corresponder a un plano cristalino específico.

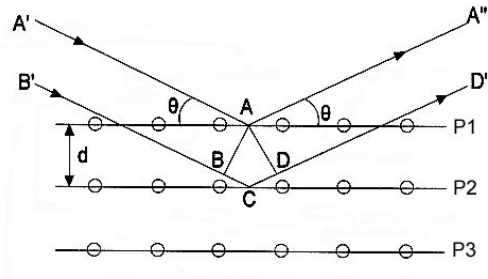


Figura 3.11 Difracción de rayos X en un cristal, en donde la relación entre la distancia interplanar (d) y el ángulo del haz difractado (θ) está dada por la ley de Bragg.

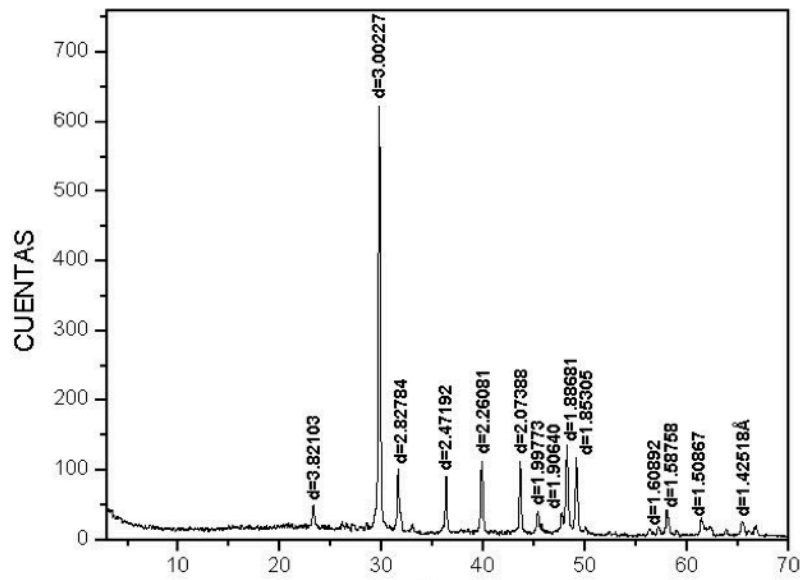


Figura 3.12 Diffractograma típico de DRX mediante el método de polvos.

3.3 Estudio de la cinética de liberación de agentes bioactivos

En el desarrollo de dispositivos cargados con fármacos y otros agentes bioactivos, una labor esencial es la evaluación de la capacidad y la cinética de liberación con el fin de conocer el perfil de liberación en condiciones de laboratorio y poder ajustar las características del dispositivo para lograr una dosis terapéutica deseada en el sitio de administración. Esta evaluación puede realizarse en tres etapas generales:

1. el monitoreo de la cantidad de fármaco liberado por el sistema en diferentes momentos,
2. la normalización de los datos de liberación con relación a la cantidad total de fármaco cargado, y
3. el modelado de los datos de liberación con base en ecuaciones previamente descritas de donde pueden obtenerse los parámetros cinéticos del dispositivo.

Los parámetros cinéticos de un dispositivo describen el mecanismo de liberación de fármaco, que puede incluir procesos de disolución, erosión, degradación y difusión, dependiendo de la formulación y composición del dispositivo, el procedimiento de carga del fármaco y las condiciones a las que el dispositivo está expuesto durante la liberación. Existen diferentes modelos matemáticos que se han utilizado para aproximar datos experimentales de cinética de liberación de diversos sistemas; entre los principales se encuentran (“Mathematical Models of Drug Release”, 2015):

- Ecuación de orden cero

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_D t \quad \text{(Ecuación 3.3)}$$

donde M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberada en un tiempo t y k_D es la constante de orden cero o constante cinética de disolución (Serra et al., 2006). Este modelo describe una liberación lenta mediante la disolución del agente activo en formas farmacéuticas que no se desintegran, lo que da un comportamiento lineal de la liberación en el tiempo. Este comportamiento puede encontrarse en sistemas de liberación de fármaco, como matrices transdérmicas de liberación prolongada y sistemas osmóticos (“Mathematical Models of Drug Release”, 2015).

- Ecuación de Higuchi

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H t^{1/2} \quad \text{(Ecuación 3.4)}$$

donde k_H es la constante cinética de liberación de Higuchi (Serra et al., 2006). Este modelo describe la difusión fickiana y unidireccional del fármaco disperso homogéneamente en una matriz que no se disuelve o hincha significativamente, por lo que este modelo tiene mayor validez para el caso de polímeros que no se hinchan en el agua, como la etilcelulosa (“Mathematical Models of Drug Release”, 2015).

- Ecuación de primer orden

$$\frac{M_t}{M_\infty} = a[1 - \exp(-bt)] \quad \text{(Ecuación 3.5)}$$

donde a y b son constantes de primer orden (Unagolla & Jayasuriya, 2018). Este modelo se ha utilizado para describir la absorción y/o eliminación de diversos fármacos y se basa en que el cambio de concentración de fármaco en el tiempo depende sólo de la concentración, lo cual se observa en varios sistemas de liberación, entre otros, aquellos en los que un agente activo soluble ha sido incorporado en una matriz porosa, por lo que la cantidad de fármaco liberado es proporcional a la cantidad de fármaco remanente en la matriz (“Mathematical Models of Drug Release”, 2015).

- Ecuación de Korsmeyer-Peppas o Ritger-Peppas

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^n \quad \text{(Ecuación 3.6)}$$

donde k_1 es una constante cinética y n es el exponente de difusión que puede asociarse al mecanismo de liberación de fármaco, que para el caso de películas delgadas de hidrogel, obedece lo siguiente (“Mathematical Models of Drug Release”, 2015; Serra et al., 2006):

- Para $n = 0.5$, la liberación está dominada por difusión fickiana, en la que la tasa de transporte del disolvente o de difusión del fármaco es mucho mayor que la de relajación de las cadenas poliméricas de la matriz.
- Para $n = 1$, la liberación ocurre mediante transporte no fickiano de Caso II, que resulta en liberación de orden cero y un mecanismo predominante de hinchamiento o relajación de las cadenas poliméricas de la matriz.
- Para $0.5 < n < 1$, la liberación ocurre mediante transporte anómalo no fickiano, en el que el mecanismo está constituido por difusión e hinchamiento con tasas comparables. En este caso, las cadenas de polímero se reconfiguran de manera lenta y simultánea con la difusión del fármaco.
- Para $n > 1$, la liberación ocurre mediante el llamado transporte de Supercaso II, que involucra una forma extrema de transporte: en contacto por el disolvente, la matriz polimérica se tensa y agrieta (proceso conocido como *solvent crazing*). Esto ocurre debido a que la capa externa de gel de la matriz delimita al núcleo con comportamiento vítreo, restringiendo la expansión del gel asociada al hinchamiento y generando una tensión de compresión en el núcleo. La interfaz de polímero vítreo-gel avanza hasta el centro de la matriz, incrementando la tensión del núcleo hasta que éste se quiebra.

- Ecuación de Peppas-Sahlin

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \quad \text{(Ecuación 3.7)}$$

donde k_1 y k_2 son constantes cinéticas y m es el exponente difusional fickiano. El primer término del modelo corresponde a la contribución de la difusión fickiana a la liberación, mientras que el segundo término representa la contribución debida a la relajación macromolecular de las cadenas poliméricas asociado al transporte Caso II (Serra et al., 2006). Por su parte, el exponente m se refiere a la difusión puramente fickiana en un sistema de cualquier geometría que presente liberación controlada. Este exponente está relacionado con el exponente n del modelo de Ritger-Peppas; la ecuación de Peppas-Sahlin se reduce a la de Ritger-Peppas cuando la contribución relajacional es despreciable (“Mathematical Models of Drug Release”, 2015). Una vez calculados los parámetros cinéticos (las constantes y los exponentes) de este modelo ajustado a datos experimentales de liberación, es posible calcular la razón entre la contribución de difusión fickiana (F) y la contribución de relajación macromolecular (R) mediante la siguiente ecuación (“Mathematical Models of Drug Release”, 2015):

$$\frac{R}{F} = \frac{k_2 t^m}{k_1} \quad \text{(Ecuación 3.8)}$$

3.4 Bibliografía de capítulo

- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E., & Eccleston, G. M. (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2892–2923. <https://doi.org/10.1002/jps.21210>
- Braga, S. S., & Pais, J. (2018). Getting under the skin: Cyclodextrin inclusion for the controlled delivery of active substances to the dermis. En A. M. Grumezescu (Ed.), *Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications* (1a ed., pp. 407–449). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813667-6.00010-3>
- Jiang, T., Carbone, E. J., Lo, K. W.-H., & Laurencin, C. T. (2015). Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. *Progress in Polymer Science*, 46, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.12.001>
- KEP Technologies. (s/f). *DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY (DSC)*. Recuperado el 1 de octubre de 2020, de <http://www.kep-boyuan.com/en/products/DSC.html>
- LibreTexts. (2020). *Infrared spectroscopy*. LibreTexts. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy#](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy#)
- Liu, M., Duan, X. P., Li, Y. M., Yang, D. P., & Long, Y. Z. (2017). Electrospun nanofibers for wound healing. *Materials Science and Engineering C*, 76, 1413–1423. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.034>
- Mathematical models of drug release. (2015). En *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (pp. 63–86). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>
- Reusch, W. (2013, mayo 5). *Infrared Spectroscopy*. <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/infrared/infrared.htm>
- Serra, L., Doménech, J., & Peppas, N. A. (2006). Drug transport mechanisms and release kinetics from molecularly designed poly(acrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. *Biomaterials*, 27(31), 5440–5451. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.011>
- Torres-Martinez, E. J., Pérez-González, G. L., Serrano-Medina, A., Grande, D., Vera-Graziano, R., Cornejo-Bravo, J. M., & Villarreal-Gómez, L. J. (2019). Drugs

- Loaded into Electrospun Polymeric Nanofibers for Delivery. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 22, 313–331. <https://doi.org/10.18433/jpps29674>
- Tucker, N., Stanger, J. J., Staiger, M. P., Razzaq, H., & Hofman, K. (2012). The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 7(2_suppl), 155892501200702. <https://doi.org/10.1177/155892501200702S10>
- Unagolla, J. M., & Jayasuriya, A. C. (2018). Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 114, 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.012>
- Villarreal-Gómez, L. J., Cornejo-Bravo, J. M., Vera-Graziano, R., & Grande, D. (2016). Electrospinning as a powerful technique for biomedical applications: A critically selected survey. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27(2), 157–176. <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1116885>

PARTE 2

Desarrollo de apósitos mediante
electrorrociado y electrohilado
para su aplicación en la liberación
cutánea de lactoferrina bovina

Capítulo 4

Fabricación y caracterización de mallas electrohiladas reforzadas mecánicamente a base de poli(óxido de etileno) y dextrina cíclica altamente ramificada

4.1 Resumen de capítulo

Se produjeron fibras de dextrina cíclica altamente ramificada (DEX) y de DEX/poli(óxido de etileno) (PEO) con diámetros en el intervalo submicrométrico mediante electrohilado de disoluciones de mezclas poliméricas. La morfología, las interacciones moleculares y propiedades mecánicas de las microfibras de dextrina sin y con PEO fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, espectroscopía Raman, difracción de rayos X, espectroscopía de resonancia magnética nuclear y ensayos de tensión uniaxial. Los resultados de espectroscopía confirmaron la formación de enlaces por puente de hidrógeno entre la dextrina y PEO, situando a la dextrina como una fuente de enredamiento molecular que genera un refuerzo mecánico en las fibras electrohiladas. Los ensayos de tensión uniaxial mostraron la aparición de un efecto sinérgico de refuerzo mecánico que varió con la composición de la mezcla polimérica. Las mezclas con DEX y PEO a partes iguales produjeron fibras que soportaron mayor resistencia a la tensión y mayor elongación con un módulo elástico alto; además, resultaron tener mayor resistencia a la ruptura, incluso más que las fibras de PEO puro. Por otra parte, se observó que los módulos elásticos de las mallas fibrilares a base de mezclas DEX/PEO se encuentran en el intervalo de valores propios de la piel humana, lo cual le otorga una aplicabilidad potencial a estas mallas electrohiladas. La técnica presentada en este capítulo muestra un proceso factible y barato para la fabricación de fibras híbridas de polímeros naturales y sintéticos, las cuales combinan la biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad de encapsulación de la dextrina con la flexibilidad y resistencia mecánica del PEO para el desarrollo de andamios fibrilares con aplicaciones en ingeniería de tejidos y liberación tópica de fármacos para la regeneración de heridas cutáneas.

4.2 Contexto

El electrohilado ha recibido gran interés en la producción de andamios y excipientes para la regeneración tisular, puesto que es un proceso versátil para la fabricación electrostática de nano- y microfibras a partir de disoluciones poliméricas, las cuales se recolectan en forma de mallas no tejidas con altas relaciones superficie-volumen (Jiang et al., 2015). Al eyectarse una disolución polimérica a través de una aguja conductora o hilador sobre el cual se ha aplicado un alto voltaje, la disolución viscosa se dirige hacia una superficie colectora conectada a tierra física. Durante el vuelo, el chorro polimérico experimenta una evaporación del disolvente, así como un alto grado de elongación e inestabilidades de curvatura, generando así fibras largas, continuas y secas con orientación aleatoria o alineada, dependiendo de la modalidad de recolección. Las mallas electrohiladas a base de polímeros biocompatibles puede utilizarse como matrices temporales y seguras que contribuyan a la adhesión y proliferación celular en el sitio de una herida, donde la población celular y su

andamio nativo — la llamada matriz extracelular (MEC)— han sido reducidas por una lesión (Liu et al., 2017). Puesto que es posible modular la porosidad de los andamios electrohilados, éstos pueden emular la morfología nativa de la red fibrilar de colágeno de la MEC, mientras que permiten algunos procesos dependientes de la porosidad que son esenciales para la regeneración tisular, como la penetración celular y la revascularización. Además, la biofuncionalidad de los polímeros electrohilados como materiales para ingeniería de tejidos se puede ampliar mediante su uso en plataformas para la encapsulación y liberación local de fármacos, en especial para aplicaciones en regeneración cutánea (Boateng et al., 2008; Braga & Pais, 2018; Villarreal-Gómez et al., 2016).

Los derivados de la dextrina, como la ciclodextrina y la dextrina cíclica altamente ramificada, pueden actuar como agentes encapsuladores y acarreadores no sólo de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos de peso molecular bajo (Fukami et al., 2006; Kadota, Nishimura, et al., 2015), sino también de moléculas bioactivas de mayor tamaño, como la anfotericina B, un agente antifúngico (Del Valle, 2004; Kaneo et al., 2014; Kittisuban et al., 2014). La dextrina cíclica altamente ramificada es un polisacárido dendrítico hidrosoluble con estructura molecular tipo *cluster* con forma de glóbulo que se obtiene de la amilopectina del almidón mediante la reacción de ciclización de una enzima ramificadora (Kittisuban et al., 2014) como se muestra en la **Figura 4.1**.

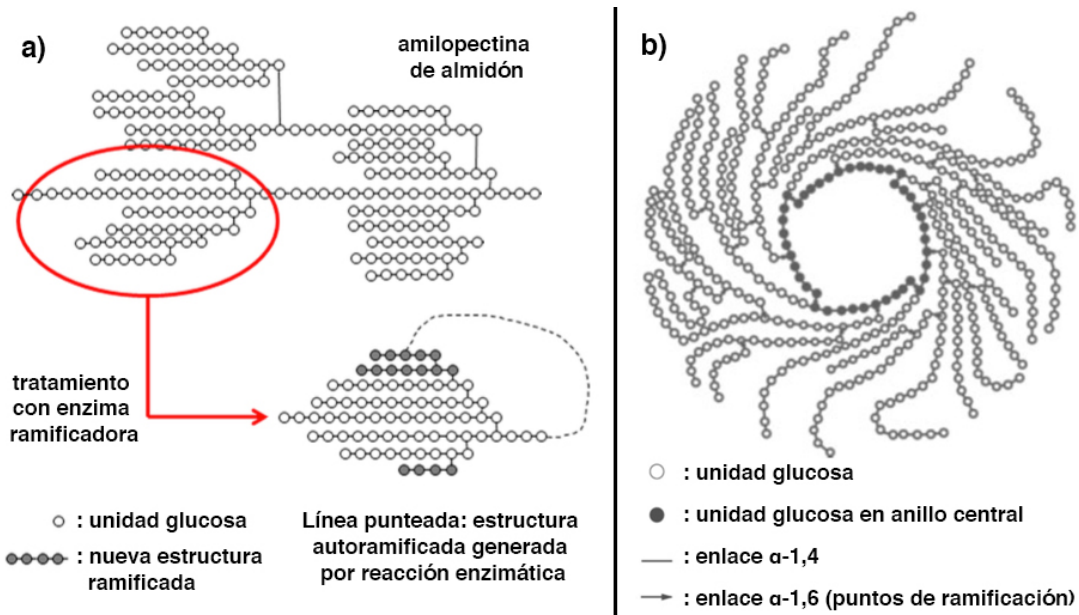


Figura 4.1 a) Reacción de ciclización de amilopectina catalizada por una enzima ramificadora, generando un polisacárido cíclico a partir de la estructura arborescente de la amilopectina. Adaptado de (Kittisuban et al., 2014). b) Estructura molecular general de la dextrina cíclica altamente ramificada, que consiste en un anillo central del que surgen cadenas ramificadas, formando una estructura globular tipo *cluster*. Adaptado de (Ozawa et al., 2009).

Esta dextrina consiste en unidades de α -D-glucopiranososa con un arreglo que incluye una cadena cíclica en el núcleo y cadenas laterales ramificadas, en las cuales los enlaces α -1,6 actúan como puntos de ramificación sobre las cadenas de enlaces α -1,4. Su

biocompatibilidad, biodegradabilidad y carácter no inmunogénico (Kittisuban et al., 2014b) hacen de la dextrina un candidato prometedor para la fabricación de andamios fibrilares antioxidantes y antibacterianos para ingeniería de tejidos (Nazarzadeh Zare et al., 2014) con el potencial de ser combinado con estrategias de liberación tópica de fármacos para regeneración de heridas cutáneas.

En este capítulo, se reporta el primer esfuerzo de integración de dextrina cíclica altamente ramificada en una malla fibrilar electrohilada de PEO, junto con la observación de un refuerzo mecánico sinérgico en las fibras que surge de las interacciones intermoleculares entre la dextrina y el PEO. Se utilizaron la microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM), difracción de rayos X (XRD) y ensayos de tensión uniaxial, así como las espectroscopías de resonancia magnética nuclear (NMR), infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y Raman para examinar la morfología, composición estructural, las interacciones intermoleculares y propiedades mecánicas de microfibras electrohiladas de dextrina/PEO y su dependencia en el contenido de dextrina, con el fin de explorar las posibilidades de nuevos materiales a base de polisacáridos para el desarrollo de andamios tisulares novedosas con capacidades en la liberación de fármacos.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Materiales

El poli(óxido de etileno) en polvo (PEO; $M_v = 400$ kDa; pureza $\geq 99.5\%$) se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). La dextrina cíclica altamente ramificada (DEX) en polvo producida a partir de almidón de trigo se obtuvo de DisChem (Sudáfrica). El PEO y la DEX se utilizaron sin tratamientos previos.

4.3.2 Fabricación de microfibras de dextrina

Debido a su estructura molecular de tipo globular, la dextrina cíclica produce disoluciones de baja viscosidad, dado que, a diferencia de otros polímeros de cadena larga, las moléculas de dextrina no generan puntos de enredamiento entre sí, comportándose como partículas (Ozawa et al., 2009). Por esto, se requirieron altas concentraciones de dextrina para elevar la viscosidad de la disolución a un nivel que propiciara la formación de fibras continuas por electrohilado. Se preparó una disolución de dextrina al 20% p/v en agua doblemente destilada. Primero, la dextrina se agitó en el agua por 30 min antes de calentar a 90 °C por 1 h con agitación. La disolución resultante se dejó reposar durante la noche para obtener una viscosidad de 1–20 P que fuera apropiada para el proceso de electrohilado (Deitzel et al., 2001). Se utilizó un equipo personalizado de electrohilado, que consistió en una bomba de jeringa NE-1000 (New Era Pump Systems, Farmingdale, NY, EUA), una fuente de voltaje (Gamma High Voltage, Ormond Beach, FL, EUA), una jeringa de plástico con un capilar de acero inoxidable con punta roma como aguja o hilador y una placa colectora de aluminio conectada a tierra física, todos colocados dentro de una cámara aislada con humedad relativa de 5–10% y temperatura de 20–25 °C. La placa colectora se colocó a una distancia de 10 cm de la punta del hilador. La disolución de dextrina (5 mL) se cargó en una jeringa de 5 mL con una aguja de calibre 20 G (diámetro interno de 0.6 mm) acoplada a una

bomba. Se aplicó un voltaje variable entre 5 y 15 kV en la aguja para un tiempo de deposición de 30 min con un flujo de inyección de 0.4 mL h⁻¹ y se recolectaron las fibras de dextrina en una placa de aluminio de 8 × 8 cm (**Tabla 4.1**). El voltaje aplicado se ajustó manualmente durante la deposición para mantener la formación de un cono de Taylor estable del cual surgiera el flujo de la disolución polimérica.

Tabla 4.1 Parámetros de disolución y electrohilado usados para la fabricación de microfibras.

Polímeros	Disolvente	Concentración (p/v)		Voltaje [kV]	Flujo [mL h ⁻¹] ¹	Distancia [cm]
		DEX	PEO			
DEX	ddH ₂ O	20%	–	5–15	0.4	10–15
DEX/PEO 2:1	ddH ₂ O	4%	2%	12	0.7	15
DEX/PEO 1:1	ddH ₂ O	3%	3%	12	0.7	15
DEX/PEO 1:2	ddH ₂ O	2%	4%	12	0.7	15
PEO	ddH ₂ O	–	6%	12	0.7	15

ddH₂O: agua destilada dos veces

4.3.3 Fabricación de microfibras a base de PEO y de mezclas DEX/PEO

A diferencia de la dextrina pura (DEX), las mezclas de dextrina con PEO produjeron disoluciones acuosas con alta viscosidad sin necesidad de aumentar la concentración total de polímeros. Por esta razón, para electrohilar fibras de PEO puro y de DEX/PEO a diferentes proporciones, se utilizaron disoluciones con una concentración polimérica total de 6% p/v, ya que se observó que fue suficiente para producir fibras continuas para todas las proporciones. Se prepararon disoluciones de PEO puro y de DEX/PEO en proporciones 2:1, 1:1 y 1:2 en agua doblemente destilada, conservando la concentración total de 6% p/v (**Tabla 4.1**). Las disoluciones obtenidas se mantuvieron en agitación por 8 h a temperatura ambiente (20–25 °C) para asegurar la integración del polímero y el polisacárido. Para la fabricación de mallas fibrilares a partir de estas disoluciones, se utilizó el mismo equipo personalizado de electrohilado que para las disoluciones de DEX, conservando la aguja de acero inoxidable de calibre 20 G. Las fibras se depositaron sobre una placa de aluminio de 8 × 8 cm conectada a tierra física con los parámetros descritos en la **Tabla 4.1**.

4.3.4 Caracterización morfológica, estructural, química y mecánica de microfibras de DEX, PEO y DEX/PEO

La morfología y estructura de mallas fibrilares recolectadas de DEX, PEO y DEX/PEO fueron evaluadas mediante FESEM, XRD y espectroscopía NMR. Las micrografías de FESEM se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo tipo Schottky JSM-7800F (JEOL, Tokyo, Japón) usando un voltaje de aceleración de 5 kV y una amplificación máxima de 1,000,000×. Se determinó la distribución de diámetros de fibra a partir de mediciones tomadas con el software de análisis de imágenes Digital Micrograph (Gatan, Pleasanton, CA, EUA). Se obtuvieron difractogramas por XRD de las muestras de fibras electrohiladas usando un difractómetro D-8 Advance (Bruker, Fällanden, Suiza) con un detector LINXEYE de señales de silicio a temperatura ambiente.

Para corroborar la estructura molecular de la dextrina, se registraron sus espectros de NMR de protón (¹H) y de carbono (¹³C) a 23 °C usando un espectrómetro Avance III HD de

400 MHz (Bruker), equipado con una sonda de disoluciones tipo BBI con gradiente en Z. Se disolvieron 50 mg de dextrina sin tratamiento previo en dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO- d_6 , pureza 99.5%; Sigma-Aldrich) como disolvente y se transfirió la disolución a un tubo de 5 mm para obtener los espectros de 1H y de ^{13}C mediante una secuencia de prueba de protón enlazado (APT). Todos los espectros de NMR fueron procesados con el software MestReNova 12 (Mestrelab Research, España).

Las interacciones intermoleculares entre la dextrina y el PEO, así como los grupos funcionales presentes, se estudiaron mediante espectroscopías FTIR y Raman. Se llevaron a cabo estudios vibracionales por FTIR con un espectrofotómetro FTIR Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Los espectros de transmisión fueron obtenidos preparando una tableta delgada de KBr transparente al infrarrojo para colocar la muestra y adquirir un promedio de 64 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} en el intervalo del infrarrojo cercano ($400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$). Se registraron los espectros Raman usando un sistema de espectrometría DXR2 (Thermo Fisher Scientific) usando la franja de 532 nm de un láser de iones Ar para realizar la excitación. Todos los datos de FTIR y Raman fueron procesados con el software OMNIC 9 (Thermo Fisher Scientific).

Por último, se evaluaron las propiedades mecánicas de las mallas electrohiladas por medio de pruebas de tensión uniaxial realizadas en un equipo de tensión Instron 5500R (Norwood, MA, EUA) con el objetivo de medir el módulo elástico, la resistencia a la tensión y la deformación al quiebre. Muestras de mallas fibrilares electrohiladas de PEO y DEX/PEO se secaron a temperatura ambiente hasta que mantuvieron su peso constante. Posteriormente se realizaron las pruebas mecánicas a una tasa de extensión de 10 mm min^{-1} con una longitud inicial de la probeta de 22.5 mm y una frecuencia de muestreo de 5 s^{-1} . Todas las pruebas mecánicas se realizaron a $23\text{ }^\circ\text{C}$ y una humedad relativa de 75%.

4.3.5 Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos sobre los datos de módulo elástico, resistencia a la tracción y deformación a la carga máxima obtenidos de los ensayos de tensión uniaxial. Se aplicaron pruebas t ($t\text{ test}$) desapareadas con corrección de Welch para poblaciones con diferentes desviaciones estándar y se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Fabricación de mallas electrohiladas de DEX, PEO y PEX/PEO

La técnica de electrohilado de mezclas permitió depositar con éxito fibras recolectadas como mallas a partir de disoluciones acuosas de DEX, PEO y DEX/PEO. Durante la eyección de las disoluciones a través de la aguja de jeringa, se observó que el cono de Taylor —un requisito para un correcto proceso de electrohilado— se formó con facilidad en las disoluciones al 6% p/v con algún contenido de PEO, ya fuera alto o bajo contenido.

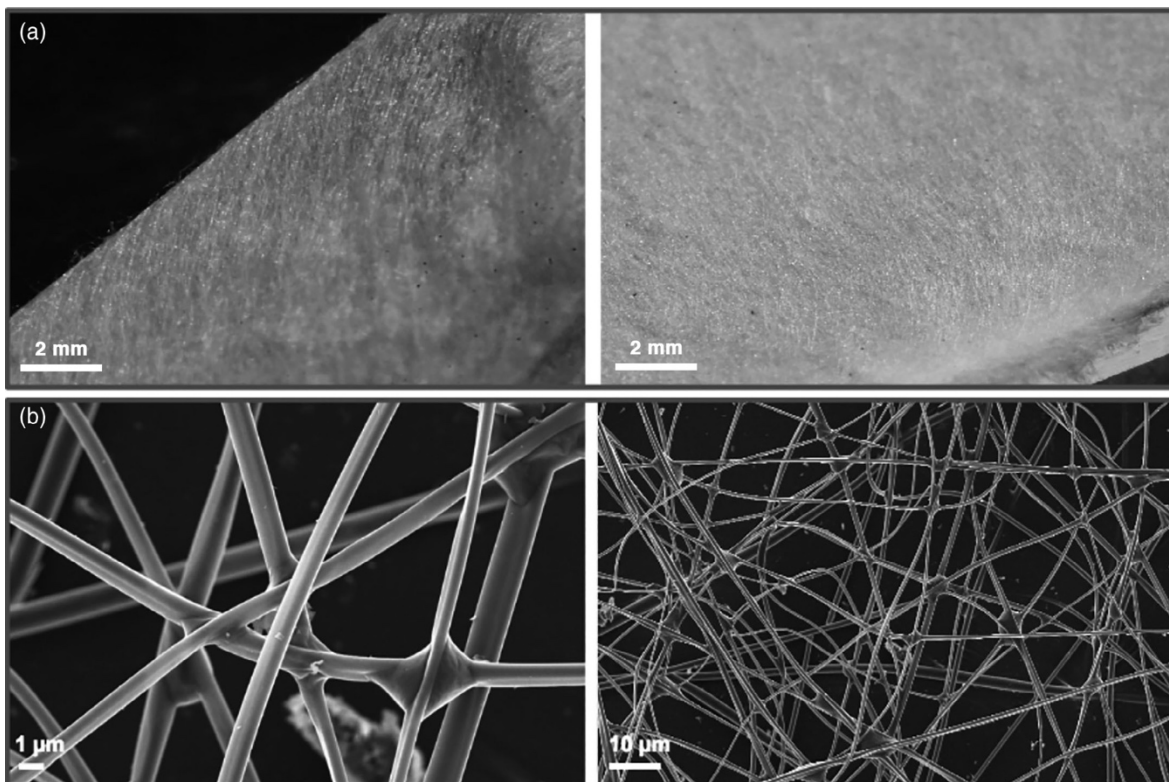


Figura 4.2 a) Fotografías de mallas fibrilares electrohiladas de DEX depositadas sobre un sustrato de vidrio. b) Micrografías representativas de FESEM de las fibras electrohiladas de DEX, mostrando superficies lisas y morfología uniforme sin defectos ni bulbos.

En cambio, la disolución de DEX pura no permitió la formación del cono de Taylor a concentraciones similares, principalmente debido a la baja viscosidad y capacidad de enredamiento intermolecular de la estructura globular de la dextrina. Fue necesario aumentar a 20% p/v la concentración de DEX para poder depositar una malla de fibras (**Figura 4.2a**). Es por esto por lo que, al añadir a la disolución un polímero de alto peso molecular como el PEO utilizado en este trabajo, se logró observar la formación del cono de Taylor y se facilitó el electrohilado de fibras en proporción directa con el contenido de PEO. Esta observación concuerda con otros estudios previos que describen al PEO como un agente que promueve la formación de fibras electrohiladas, en particular cuando se usa un PEO de alto peso molecular en combinación con polisacáridos (Francis et al., 2010). Para el caso de mezclas, se obtuvieron fibras de DEX/PEO en proporciones 2:1, 1:1 y 1:2. Se observó que la reproducibilidad en la deposición de las fibras electrohiladas aumentó notablemente para las mezclas DEX/PEO 1:1 y 1:2, evidenciando que la procesabilidad de las fibras aumenta con un aumento en el contenido de PEO.

4.4.2 Morfología de fibras por FESEM

Las mallas fibrilares de dextrina fueron examinadas por FESEM, lo cual confirmó la formación de fibras continuas sin defectos, bulbos ni abultamientos en su morfología (**Figura 4.2b**). De igual forma, las fibras electrohiladas correspondientes a PEO puro y mezclas DEX/PEO presentaron una morfología regular con pocos defectos (**Figura 4.3**). En el caso

de PEO puro, se observó una mayor variabilidad en los diámetros de fibra que en las mezclas DEX/PEO (**Figura 4.3d**).

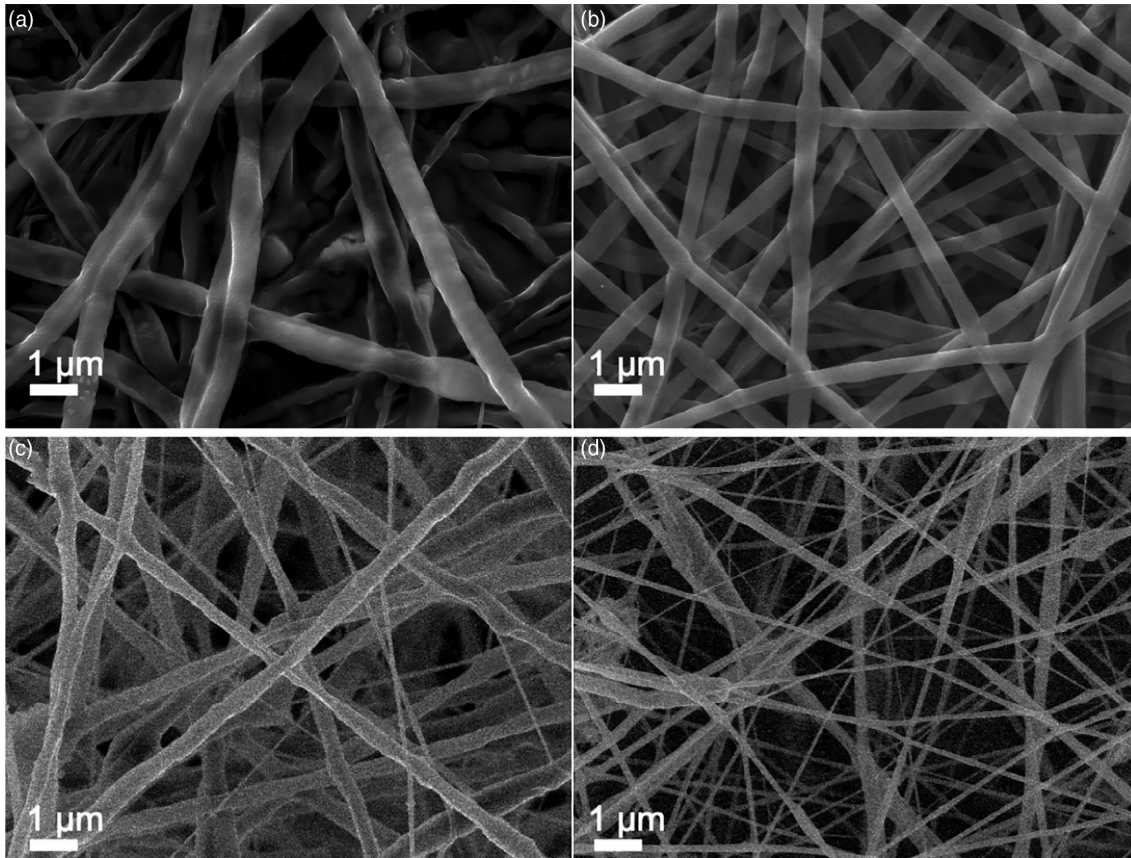


Figura 4.3 Micrografías representativas de FESEM de fibras electrohiladas de DEX/PEO a proporciones: a) 2:1, b) 1:1 y c) 1:2, y d) PEO puro.

Las fibras electrohiladas de dextrina y de DEX/PEO presentaron distribuciones monomodales de diámetros (**Figura 4.4a–e**). Se observó además un aumento en el diámetro de fibra para las mezclas con menor contenido de PEO, siendo el diámetro promedio máximo para las fibras de DEX pura (**Figura 4.4f**). Esto puede atribuirse a la alta higroscopicidad del polisacárido posterior al electrohilado, lo cual resulta en menor hinchamiento a mayor contenido de PEO.

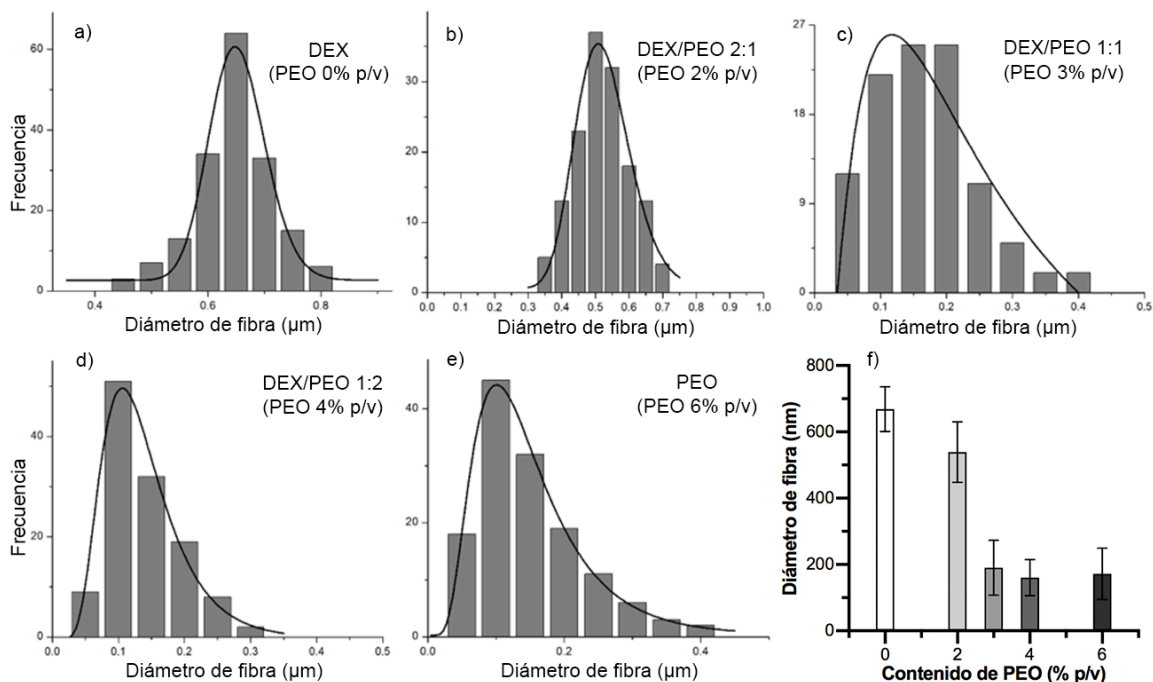


Figura 4.4 a–e) Distribuciones de diámetros de fibra en las mallas electrohiladas de DEX y DEX/PEO a diferentes proporciones. En todos los casos se observaron poblaciones monomodales. f) El diámetro promedio de las fibras electrohiladas de DEX/PEO disminuye con mayor contenido de PEO, manteniéndose estable a partir de 3% p/v.

4.4.3 Cristalinidad por XRD

Las microfibras electrohiladas de DEX, PEO y DEX/PEO con proporciones 2:1, 1:1 y 1:2 fueron examinadas estructuralmente mediante XRD (**Figura 4.5**). El difractograma de las microfibras de DEX pura muestra una señal amplia correspondiente a una estructura amorfa (**Figura 4.5**), en conformidad con la baja cristalinidad de la dextrina (Kadota, Senda, et al., 2015). Para las fibras con proporción de DEX/PEO 2:1, el difractograma correspondiente indica un mezclado de dextrina con PEO, lo cual es evidente por la presencia de dos señales en $2\theta = 19.1^\circ$ y 23.0° superpuestos al patrón de difracción de la dextrina pura, los cuales corresponden respectivamente a los planos de reflexión (120) y (032) del PEO en su fase cristalina monoclinica, observados también en el patrón de XRD de las fibras electrohiladas de PEO puro (Rodríguez-Zamora et al., 2017). De acuerdo con lo esperado, la intensidad de las señales del PEO cristalino aumentó relativamente en proporción con el contenido de PEO en las fibras.

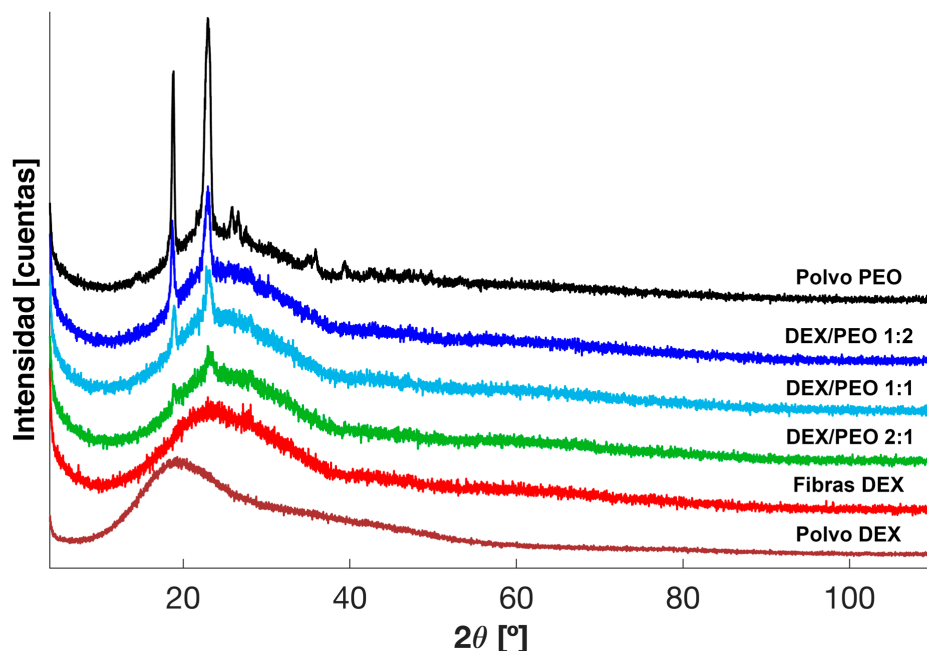


Figura 4.5 Difractogramas de XRD de dextrina y PEO no tratados (Polvo DEX, Polvo PEO) y de fibras electrohiladas de mezclas DEX/PEO con proporciones 2:1, 1:1 y 1:2. El mezclado entre DEX y PEO se observa por la presencia de señales en $2\theta = 19.1^\circ$ y 23.0° superpuestas en la señal amplia de la dextrina, los cuales corresponden a los planos de reflexión (120) y (032) de la fase cristalina monoclinica del PEO.

4.4.4 Interacciones intermoleculares entre DEX y PEO por espectroscopía FTIR

Se realizaron estudios de espectroscopía FTIR sobre las mallas fibrilares electrohiladas de DEX, PEO y DEX/PEO a diferentes proporciones (**Figura 4.6a**). Los espectros de FTIR de las fibras de dextrina pura (DEX) y PEO puro muestran las señales características de absorción en conformidad con la literatura (**Tabla 4.2**). La señal de absorción en el PEO a 529 cm^{-1} debida a la flexión de C–C–O se mantuvo conservada para las fibras de DEX/PEO con razón de peso 1:2. A pesar de que esta señal fue menos intensa para las mezclas DEX/PEO 1:1 y 2:1, su frecuencia no se desplazó, sugiriendo que se conserva la orientación de la cadena de PEO y sus enlaces polares para todas las mezclas DEX/PEO (Bergeron et al., 2012; Yang et al., 2015). Las interacciones moleculares entre la dextrina y el PEO, principalmente constituidas por puentes de hidrógeno, pueden asociarse a desplazamientos de señales y a ausencias en ciertas regiones de los espectros FTIR. En primer lugar, la intensidad del modo de estiramiento del anillo de piranosa en la dextrina ubicado a 1654 cm^{-1} se reduce en gran medida en todas las mezclas con PEO, lo que indica la formación de un complejo entre el PEO y la dextrina mediante la deformación del anillo de piranosa en un proceso de quimisorción que involucra puentes de hidrógeno (Rath et al., 2000).

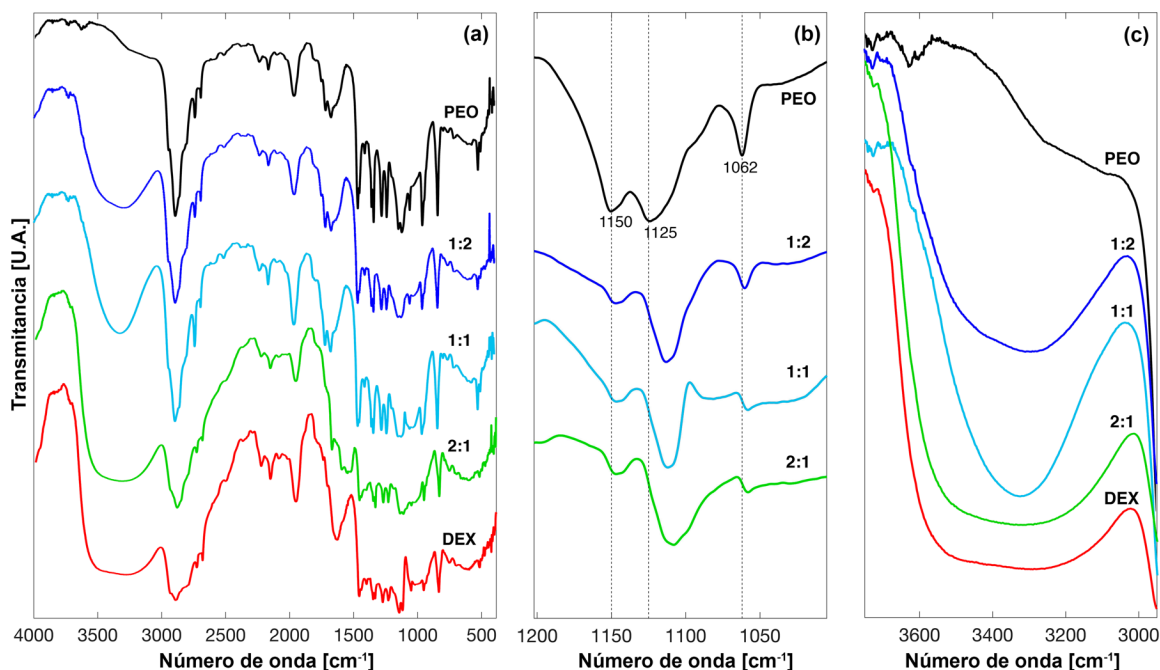


Figura 4.6 a) Espectros FTIR de fibras electrohiladas de PEO, dextrina (DEX) y sus mezclas con razones de peso 1:2, 1:1 y 2:1. b) Espectros FTIR en la región de absorción de C–O–C de las moléculas de PEO en fibras de PEO puro y de mezclas DEX/PEO. Estos espectros se obtuvieron sustrayendo el espectro de DEX pura a los espectros de mezclas DEX/PEO. c) Espectros FTIR en la región de absorción de O–H para las fibras de PEO, DEX y mezclas DEX/PEO.

Tabla 4.2 Asignación de señales de absorción en los espectros FTIR de fibras electrohiladas de DEX y PEO.

Muestra	Ubicación de señal [cm ⁻¹]	Tipo de vibración	Grupo funcional (Referencia)
DEX	3425 (amplio)	Estiramiento O–H	Alcohol (Lee et al., 2018)
DEX	2940	Estiramiento C–H	Anillo piranoide (Nazarzadeh Zare et al., 2014)
DEX	1654	Estiramiento de anillo	Anillo de glucopiranososa (Nazarzadeh Zare et al., 2014)
DEX	1170	Estiramiento asimétrico C–O–C	Puente glucosídico tipo (α -1,4) y (α -1,6) (Zareh et al., 2011)
DEX	1120	Estiramiento CH ₂ –OH	Alcohol
DEX	1076	Estiramiento C–O	Anillo piranoide (Nazarzadeh Zare et al., 2014)
DEX	930	Estiramiento C–C en anillo	Anillo piranoide (Nazarzadeh Zare et al., 2014)
DEX	774	Flexión C–O–C	Puente glucosídico tipo (α -1,4) y (α -1,6) (Lee et al., 2018; Zareh et al., 2011)
PEO	2898	Estiramiento C–H	Alcano
PEO	1469	Tijereteo CH ₂	Alcano
PEO	1345, 1361	Señal doble, aleteo CH ₂	Alcano
PEO	1283	Torsión CH ₂	Alcano
PEO	1062, 1125, 1150	Señal triple, C–O–C	Típico en PEO semicristalino (Noor et al., 2010, p. 50; Rodríguez-Zamora et al., 2017)
PEO	845	Balaceo CH ₂	Alcano
PEO	529	Flexión C–C–O	Éter

La región que contiene las señales en 1062, 1125 y 1150 cm^{-1} atribuidas al estiramiento C–O–C del PEO se muestra en la **Figura 4.6b**. En todas las fibras de mezclas DEX/PEO, estas señales se ven desplazadas consistentemente hacia el rojo en relación con las señales de las fibras de PEO puro. Se observó que la magnitud del desplazamiento en la señal de 1125 cm^{-1} es más dependiente del contenido de dextrina en las fibras. Este desplazamiento hacia frecuencias de absorción menores revela la presencia de enlaces C–O más largos y de menor energía a lo largo de la cadena principal de PEO como consecuencia de los puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno en los grupos éter del PEO y los grupos hidroxilo de la dextrina (**Figura 4.8d**). En las fibras con mayor contenido de dextrina (las muestras de DEX pura y DEX/PEO 2:1), la señal de estiramiento O–H a 3425 cm^{-1} tiene mayor amplitud, lo que probablemente se debe a variaciones en las longitudes de los enlaces O–H a consecuencia de la presencia de múltiples ambientes para la formación de puentes de hidrógeno para los grupos hidroxilo en la dextrina (**Figura 4.6c**). En las muestras DEX/PEO 1:1 y 2:1, la disminución considerable en la intensidad de las vibraciones de aleteo de CH_2 , así como la casi nula conservación de la señal de tijereteo CH_2 del PEO a 1469 cm^{-1} , indican que la estructura semicristalina de las fibras debida al PEO se pierde en gran medida para estas mezclas, en conformidad con las observaciones cualitativas de cristalinidad en los patrones correspondientes de XRD (**Figura 4.5**).

En general, el espectro FTIR de las fibras de DEX/PEO 1:2 no muestra desplazamientos de señales considerables ni cambios en la intensidad respecto al espectro de fibras de PEO puro, lo cual sugiere que la presencia de la dextrina en esta proporción no disminuye la fuerza de los enlaces en el PEO ni su conformación macromolecular, puesto que el PEO es el componente predominante. El espectro FTIR confirmó la incorporación de PEO y dextrina en las fibras electrohiladas de todas las mezclas. Para las proporciones de DEX/PEO 1:1 y 2:1, se observa un acoplamiento entre los espectros de los componentes en el intervalo de 1075–1471 cm^{-1} , evidenciando una interacción enlazante entre el polisacárido y el PEO en las fibras híbridas. Además, el espectro de las fibras de DEX/PEO 1:1 incluye un conjunto nuevo de tres señales traslapadas en el intervalo 1529–1611 cm^{-1} que no se observa en los espectros de fibras de PEO o dextrina puros ni en los de las otras mezclas.

4.4.5 Caracterización por espectroscopía Raman

Los estudios de espectroscopía Raman proporcionaron información complementaria a los espectros FTIR. La región espectral de 2800–3100 cm^{-1} contiene señales intensas sensibles a la composición de las fibras que se atribuyen a los modos de estiramiento C–H de la dextrina, el PEO y las mezclas DEX/PEO con diferentes proporciones (**Figura 4.7a, Tabla 4.3**). Las fibras de la mezcla DEX/PEO 2:1 mostraron un espectro con señales a 2910 y 2943 cm^{-1} similares a las de DEX, aunque aumentadas debido a la incorporación de PEO. Por el contrario, los espectros de las mezclas DEX/PEO 1:1 y 1:2 se asemejan más al comportamiento vibracional del PEO; en particular, la mezcla 1:1 contiene señales más intensas a 2910 y 2943 cm^{-1} por la presencia de la dextrina, mientras que la mezcla 1:2 tiene una señal menos intensa a 2910 cm^{-1} en comparación con la señal de PEO a 2884 cm^{-1} .

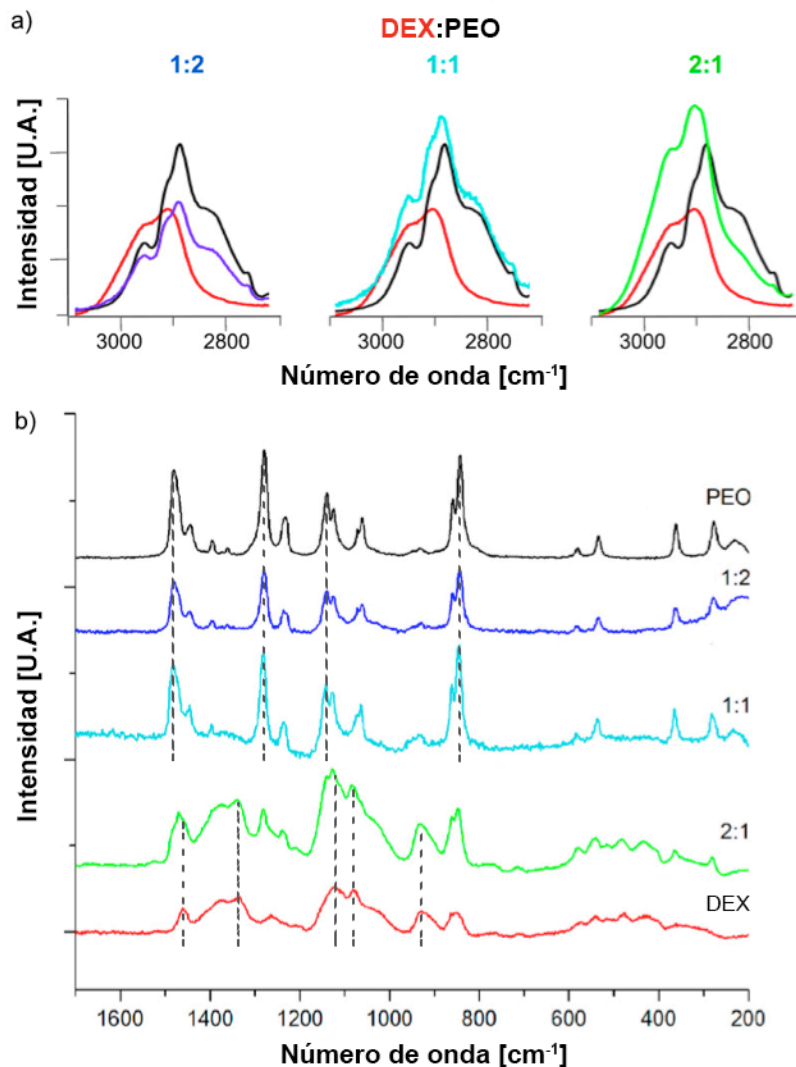


Figura 4.7 Espectros Raman de las fibras electrohiladas de PEO (negro), dextrina (rojo) y sus mezclas con proporciones DEX/PEO 1:2 (azul), 1:1 (cian) y 2:1 (verde). a) Región de 2800–3100 cm⁻¹ que contiene los modos de estiramiento C–H. b) Región de 200–1600 cm⁻¹ que contiene la región de huella dactilar de CH₂ para PEO y dextrina.

Por su parte, los datos obtenidos por espectroscopía Raman en el intervalo de frecuencias de 200–1600 cm⁻¹ abarcan la región de huella dactilar de grupos CH₂ tanto para el PEO como la dextrina, así como vibraciones asociadas a grupos C–O y CC–COC (**Figura 4.7b, Tabla 4.3**). En este rango, la mezcla DEX/PEO 1:2 tiene un espectro muy similar al de las fibras de PEO puro. En la región de 200–750 cm⁻¹, el espectro de la muestra DEX/PEO 1:1 indica un alto grado de acoplamiento entre ambos componentes de las fibras, como se observa por la presencia de señales compartidas, incluyendo la señal doble centrada en 1143 cm⁻¹ y las señales en 1129, 582 y 543 cm⁻¹, las cuales confirman la presencia de PEO asociado a dextrina. Sin embargo, en cuanto al espectro Raman en el intervalo de 750–1500 cm⁻¹, las fibras con proporción 1:1 tienen un comportamiento muy similar al de fibras de PEO puro. Contrario a lo esperado, la intensidad de las señales asociadas a PEO en la muestra DEX/PEO 1:2 fue menor a la intensidad de las mismas señales en la muestra 1:1. El comportamiento

vibracional de los grupos CH₂ a 2950 cm⁻¹ en las mezclas DEX/PEO 1:2 y 1:1 no muestra diferencias respecto a la muestra de PEO puro, mientras que la mezcla 2:1 presenta una vibración de CH₂ a 2943 cm⁻¹ más intensa respecto a la dextrina pura.

Tabla 4.3 Asignación de señales de absorción en los espectros Raman de las fibras electrohiladas de DEX y PEO.

Muestra	Ubicación de señal [cm ⁻¹]	Tipo de vibración/banda	Observaciones (Referencia)
DEX	2943	Estiramiento asimétrico CH ₂	
DEX	2910	Estiramiento simétrico CH ₃	
DEX	1460	Señal débil	
DEX	1377, 1343	Señal doble amplia	Región huella dactilar
DEX	1085		Región huella dactilar
DEX	862		(Kotzianova et al., 2015)
PEO	2950	Estiramiento asimétrico CH ₂	
PEO	2884	Estiramiento CH ₂	
PEO	1483, 1445	Señal doble; flexión CH ₂	(Elashmawi & H. Gaabour, 2015)
PEO	1445		Región huella dactilar
PEO	1397		Región huella dactilar
PEO	1280		Región huella dactilar
PEO	1235	Torsión C-H	Región huella dactilar
PEO	1142	Vibración CC-COC	
PEO	1126	Vibración CC-CH ₂	
PEO	845, 861	Balanceo CH ₂	

4.4.6 Estructura química por NMR de ¹H y ¹³C

El espectro de NMR de ¹H de la dextrina (**Figura 4.8a**; 400 MHz, DMSO-d₆, ppm) muestra señales en δ = 3.36, 3.46 y 3.62 ppm, asignados a los protones H-2, H-4 y H-3,5,6 del anillo de anhidroglucosa respectivamente. El doblete en δ = 5.45 y 5.55 ppm y la señal en δ = 4.99 ppm se atribuyen a los protones anoméricos H-1 localizados en los enlaces (α-1,4) y (α-1,6), respectivamente. Se calculó que la razón entre enlaces (α-1,6) y enlaces (α-1,4) de la dextrina tiene un valor de 1.18, de acuerdo con las respectivas áreas de las señales en el espectro NMR de ¹H (Gidley, 1985). Este valor es evidencia del alto grado de ramificación presente en la muestra de dextrina usada en este trabajo.

El espectro NMR de ¹³C con APT de la dextrina (**Figura 4.8b**; 400 MHz, DMSO-d₆, ppm) tiene dos señales características con fase positiva en δ = 61.24 ppm debido al átomo de carbono secundario del grupo CH₂OH (C-6). Las señales con fase negativa en δ = 70.36, 72.45–73.71, 76.93, 79.95 ppm se atribuyen a los átomos de carbono como es el caso de CH C-2, C-5, C-3 y C-4 sobre el anillo de glucosa, respectivamente, mientras que la región de tres señales con fase negativa en δ = 99.06–103.49 ppm está asociada al carbono anomérico C-1. El multiplete centrado en δ = 39.8 ppm se debe a la presencia de impurezas parcialmente no deuteradas del disolvente DMSO.

En conjunto, los análisis por espectroscopías Raman, FTIR y NMR confirman las interacciones moleculares en las microfibras de DEX/PEO (**Figura 4.8d**), considerando que en las cadenas de dextrina conectadas por enlaces (α-1,4), los grupos hidroxilo en la posición C-6 (OH-6) forman puentes de hidrógeno más favorablemente con los átomos de oxígeno en

los grupos éter del PEO, con respecto a los grupos hidroxilo en C-2 y C-3 (OH-2,3). Esto se debe principalmente a la flexibilidad del grupo CH₂OH, lo cual le permite extenderse hacia la cadena de PEO. Estas interacciones intermoleculares están limitadas por la regioquímica específica de las subunidades de glucopiranososa, como se ha reportado anteriormente (Kondo et al., 1994). La presencia de interacciones intermoleculares por puentes de hidrógeno entre grupos de las cadenas poliméricas, así como en un menor grado las interacciones débiles de van der Waals, incrementan las propiedades de resistencia a la tensión (Dhandayuthapani et al., 2010).

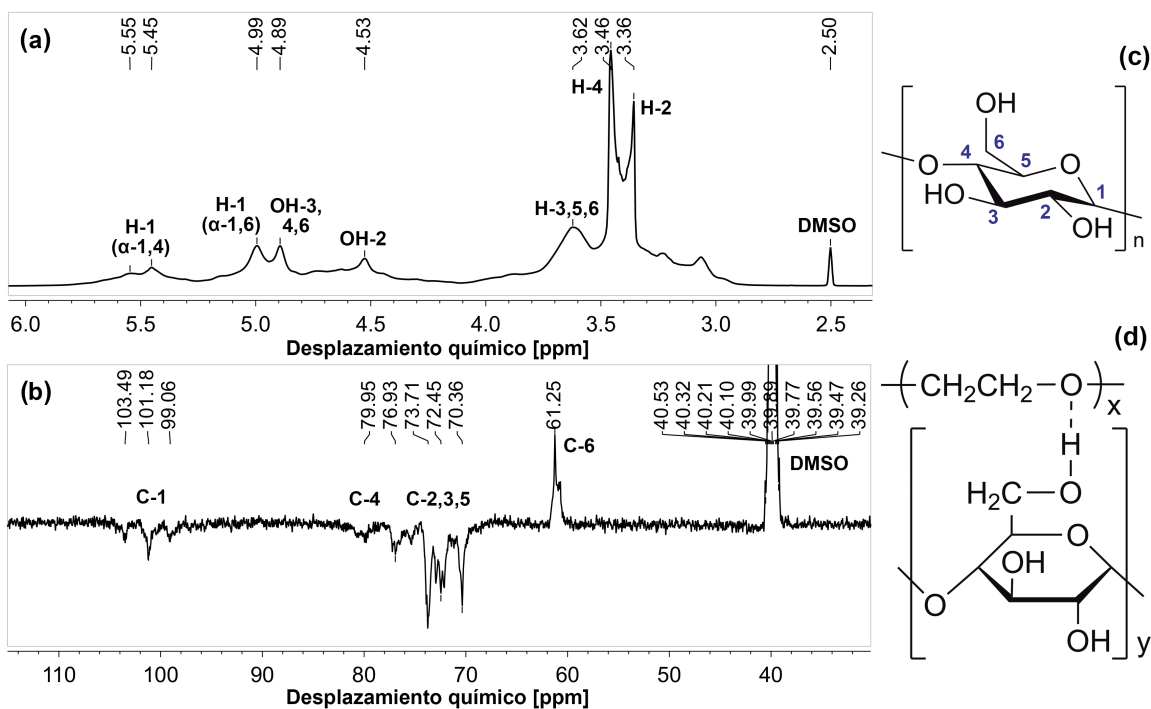


Figura 4.8 Espectros NMR de a) ¹H y b) ¹³C APT de dextrina sin tratamiento previo en DMSO-d₆ como disolvente. c) Estructura molecular de la unidad repetitiva de la dextrina unida por enlaces glucosídicos tipo (α-1,4), con etiquetas sobre los átomos de carbono, siendo C-1 el carbono anomérico y C-6 el carbono secundario. d) Representación de la interacción por puente de hidrógeno propuesta presente en las mezclas DEX/PEO. En las cadenas de dextrina unidas por enlaces (α-1,4), los grupos hidroxilo en la posición C-6 (OH-6) establecen puentes de hidrógeno más favorablemente con el átomo de oxígeno en el grupo éter del PEO que con los grupos hidroxilo en las posiciones C-2 y C-3 (OH-2 y OH-3), principalmente debido a la flexibilidad del grupo CH₂OH, la cual permite que se extienda hacia la cadena de PEO (Kondo et al., 1994).

4.4.7 Análisis uniaxial esfuerzo-deformación de mallas fibrilares de DEX/PEO

Con el objetivo de examinar las propiedades mecánicas de las mallas fibrilares de DEX/PEO, se llevaron a cabo ensayos de esfuerzo-deformación uniaxial para determinar el módulo elástico, la resistencia a la tracción y la deformación a la carga máxima de las fibras

híbridas y compararlos con los valores correspondientes de las fibras de PEO puro (**Figura 4.9**).

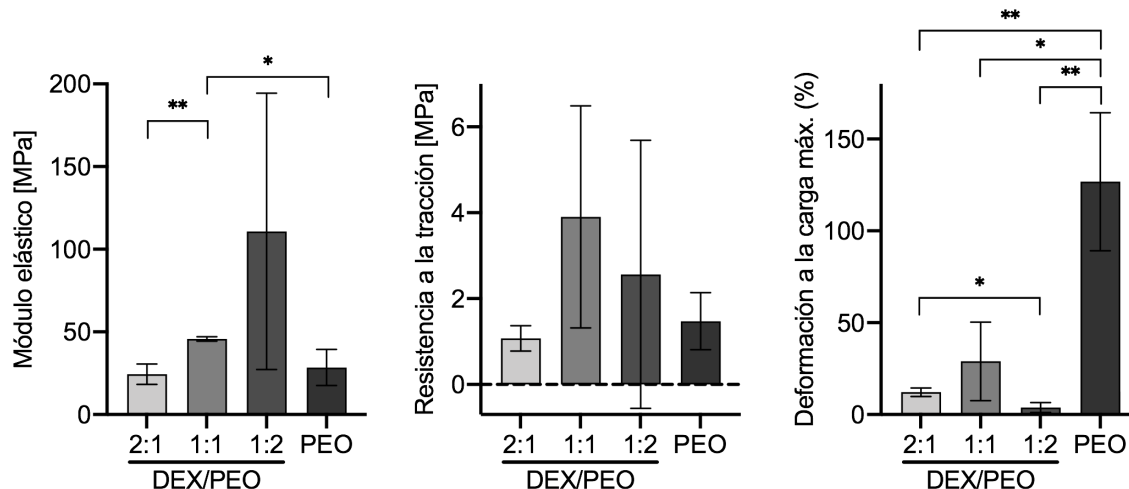


Figura 4.9 Propiedades mecánicas de las mallas fibrilares electrohiladas de PEO puro y mezclas DEX/PEO a diferentes proporciones, medidas con ensayos de tensión uniaxial (* indica $p < 0.05$; ** indica $p < 0.01$; pruebas t desapareadas con corrección de Welch).

Las mallas fibrilares de DEX/PEO tuvieron valores promedio del módulo elástico que aumentaron al aumentar el contenido de PEO. El módulo elástico promedio de las fibras con mayor contenido de dextrina (mezcla 1:2) fue de 110 MPa, siendo superior al de fibras de PEO puro (28 MPa). Las mallas con mezcla 1:1 mostraron casi el doble del módulo elástico de las fibras de PEO (46 MPa), mientras que la mezcla 2:1 mantuvo un módulo similar a las fibras de PEO (24 MPa). En las fibras de mezclas DEX/PEO, los dominios resultantes de PEO cristalino se orientan típicamente a lo largo del eje de la fibra a causa del alto nivel de estiramiento que ocurre durante la formación de fibras en el electrohilado, el cual es un proceso altamente inductor de la cristalización en polímeros (Stephens et al., 2004). Al aplicarle esfuerzo, el PEO probablemente se enreda con las cadenas dendríticas tipo *cluster* de la dextrina, lo cual incrementa los módulos elásticos de las fibras híbridas por encima de los de las fibras de PEO puro (Samanta et al., 2017). En cuanto a la resistencia a la tracción, las mallas fibrilares híbridas no mostraron tener una relación directa con el contenido de PEO; por el contrario, presentaron una resistencia a la tracción máxima de 4 MPa para la mezcla DEX/PEO 1:1. En esta proporción, el módulo elástico y la resistencia a la tracción de las mallas de fibras híbridas aumentaron con respecto a las fibras de PEO puro.

Estas observaciones sugieren la presencia de un efecto sinérgico en el comportamiento mecánico de las mallas fibrilares a base de mezclas DEX/PEO. Las mezclas con mayor contenido de dextrina producen fibras menos resistentes y más quebradizas, como se observó para la mezcla 2:1 (**Figura 4.9**), puesto que hay una menor porción de regiones amorfas resistentes y de dominios cristalinos rígidos de PEO. No obstante, en mezclas con menor contenido de dextrina, los *clusters* o estructuras globulares de la dextrina pueden dispersarse más homogéneamente y actuar con mayor efectividad como sitios de enredamiento durante el deslizamiento de cadenas de PEO, por tanto dándoles a las fibras híbridas un aumento de hasta cinco veces el módulo elástico con una menor pérdida en la

resistencia a la tracción. Este reforzamiento mecánico sinérgico puede asociarse a fuerzas focalizadas secundarias de atracción y a puentes de hidrógeno intermoleculares formados entre el polisacárido y el polímero sintético, lo cual se ha reportado previamente en otros sistemas de fibras poliméricas híbridas (Dhandayuthapani et al., 2010; Huang et al., 2001).

El desempeño mecánico de las fibras de DEX/PEO con alta resistencia a la tracción y alto módulo elástico puede atribuírsele a la optimización de interacciones intermoleculares entre la dextrina y el PEO, como se observó con ayuda de las espectroscopías FTIR y Raman. En comparación con las propiedades mecánicas de las fibras de PEO puro, las fibras de DEX/PEO mostraron un módulo elástico equivalente (en el caso de la mezcla 2:1) o mayor (para las mezclas 1:1 y 1:2), así como una resistencia a la tracción equivalente (en la mezcla 2:1) o mayor (en las mezclas 1:1 y 1:2) y una menor deformación a la carga máxima (**Figura 4.9**). En general, se encontró la mejor relación entre el módulo elástico y la resistencia a la tracción en la proporción DEX/PEO 1:1, probablemente debido a que ésta es la proporción óptima (dentro de las estudiadas en este trabajo) para la formación de puentes de hidrógeno entre la dextrina y el PEO, así como la compensación mutua entre la flexibilidad del PEO y la resistencia al deslizamiento entre cadenas que la dextrina impone; todo esto en conjunto permite que las fibras electrohiladas soporten un alto nivel de esfuerzo tensional y elongación. Además, los módulos elásticos medidos para las fibras híbridas DEX/PEO están en el intervalo reportado de módulos elásticos normales de piel humana, los cuales pueden ser desde 73 ± 16 MPa hasta 127 ± 36 MPa dependiendo de la dirección de tensión con respecto a la orientación intrínseca de la piel, también conocida como líneas de Langer (Gallagher et al., 2012; Luebberding et al., 2014). Como se observó en este trabajo, la composición de las mezclas DEX/PEO puede modificarse para modular el grado de reforzamiento mecánico sinérgico entre ambos componentes, por lo que las propiedades mecánicas de las mallas fibrilares de DEX/PEO pueden ajustarse para emparejar con las propiedades específicas de un sitio de lesión de piel, lo cual tiene utilidad en el desarrollo de andamios cutáneos hechos a la medida de diferentes regiones corporales (Luebberding et al., 2014; Ottenio et al., 2015).

4.5 Conclusiones y perspectivas

El electrohilado de microfibras a base de mezclas de DEX/PEO se ha probado como un proceso viable para la fabricación de materiales biocompatibles de bajo costo y con módulos elásticos que caen en los intervalos correspondientes de la piel humana. Además, se observó un efecto de reforzamiento mecánico sinérgico que varió en magnitud con la composición de las mezclas, lo cual probablemente tiene su origen en la capacidad de los glóbulos moleculares de dextrina de operar como sitios de enredamiento para las cadenas de PEO cuando las fibras se estiran. A pesar de que normalmente un aumento en módulo elástico conlleva una pérdida de la tenacidad, el reforzamiento sinérgico que aquí se reporta aumentó tanto la resistencia a la tracción como el módulo elástico de las mallas de fibras con ambos polímeros, alcanzando una relación óptima en la razón de pesos 1:1 para las mezclas DEX/PEO. A partir del desplazamiento observado de señales vibracionales de FTIR y Raman asociadas a enlaces C–O–C en el PEO y a enlaces O–H en la dextrina, se confirmó la aparición de interacciones intermoleculares favorables que promueven el enredamiento. El

papel de la dextrina como fuente de enredamientos intermoleculares concuerda con el alto grado de ramificación determinado por espectroscopía NMR.

En general, este estudio se enfocó en evaluar el potencial de incluir dextrina en polímeros microestructurados, con el objetivo de expandir el uso de estos materiales como plataforma de liberación de fármacos y agentes bioactivos de alto peso molecular. Todavía se requieren estudios adicionales para evaluar la capacidad de encapsulación de fármacos en andamios fibrilares a base de mezclas dextrina/polímero, así como la cinética de liberación *in vitro* e *in vivo* de los sistemas fármaco/dextrina/polímero. No obstante, este primer estudio de incorporación de la dextrina en un andamio de fibras poliméricas es un paso prometedor en esta dirección.

Con estos resultados, se validó el amplio potencial del electrohilado para la fabricación de fibras con diámetros micrométricos a partir de polímeros hidrosolubles, sean naturales o artificiales. El uso de estas mallas fibrilares como vehículos para la liberación de agentes bioactivos solamente requiere la disolución o dispersión del agente en la disolución polimérica precursora, así que la simplicidad de este proceso es de gran atractivo para esta aplicación. Además, la alta razón área superficial-volumen de las microfibras electrohiladas permitirá una rápida disolución del polímero y la correspondiente liberación de su carga. Por estas razones, se confirmó la selección del electrohilado como método de fabricación de vehículos para la potencial liberación tópica de agentes bioactivos para la regeneración de heridas cutáneas.

4.6 Bibliografía de capítulo

- Bergeron, C., Perrier, E., Potier, A., & Delmas, G. (2012). A Study of the Deformation, Network, and Aging of Polyethylene Oxide Films by Infrared Spectroscopy and Calorimetric Measurements. *International Journal of Spectroscopy*, 2012, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/432046>
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E., & Eccleston, G. M. (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2892–2923. <https://doi.org/10.1002/jps.21210>
- Braga, S. S., & Pais, J. (2018). Getting under the skin: Cyclodextrin inclusion for the controlled delivery of active substances to the dermis. En A. M. Grumezescu (Ed.), *Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications* (1a ed., pp. 407–449). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813667-6.00010-3>
- Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D., & Tan, N. C. B. (2001). The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 42(1), 261–272. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00250-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00250-0)
- Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033–1046. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9)

- Dhandayuthapani, B., Krishnan, U. M., & Sethuraman, S. (2010). Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 94B(1), 264–272. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31651>
- Elashmawi, I. S., & H. Gaabour, L. (2015). Raman, morphology and electrical behavior of nanocomposites based on PEO/PVDF with multi-walled carbon nanotubes. *Results in Physics*, 5, 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2015.04.005>
- Francis, L., Balakrishnan, A., Sanosh, K. P., & Marsano, E. (2010). Characterization and tensile strength of HPC–PEO composite fibers produced by electrospinning. *Materials Letters*, 64(16), 1806–1808. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2010.05.043>
- Fukami, T., Furuishi, T., Suzuki, T., Hidaka, S., Ueda, H., & Tomono, K. (2006). Improvement in Solubility of Poorly Water Soluble Drug by Cogrinding with Highly Branched Cyclic Dextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 56(1–2), 61–64. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9061-x>
- Gallagher, A. J., Annaidh, A. N., & Bruyère, K. (2012). Dynamic tensile properties of human skin. *Proceedings of the International Research Council on Biomechanics of Injury Conference*, 494–502.
- Gidley, M. J. (1985). Quantification of the structural features of starch polysaccharides by n.m.r. Spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 139, 85–93. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(85\)90009-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(85)90009-6)
- Huang, L., Nagapudi, K., P. Apkarian, R., & Chaikof, E. L. (2001). Engineered collagen–PEO nanofibers and fabrics. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 12(9), 979–993. <https://doi.org/10.1163/156856201753252516>
- Jiang, T., Carbone, E. J., Lo, K. W.-H., & Laurencin, C. T. (2015). Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. *Progress in Polymer Science*, 46, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.12.001>
- Kadota, K., Nishimura, T., Hotta, D., & Tozuka, Y. (2015). Preparation of composite particles of hydrophilic or hydrophobic drugs with highly branched cyclic dextrin via spray drying for dry powder inhalers. *Powder Technology*, 283, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.05.014>
- Kadota, K., Senda, A., Ito, T., & Tozuka, Y. (2015). Feasibility of highly branched cyclic dextrin as an excipient matrix in dry powder inhalers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.006>
- Kaneo, Y., Taguchi, K., Tanaka, T., & Yamamoto, S. (2014). Nanoparticles of hydrophobized cluster dextrin as biodegradable drug carriers: Solubilization and encapsulation of amphotericin B. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 24(4), 344–351. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50072-X](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50072-X)

- Kittisuban, P., Lee, B.-H., Suphantharika, M., & Hamaker, B. R. (2014). Slow glucose release property of enzyme-synthesized highly branched maltodextrins differs among starch sources. *Carbohydrate Polymers*, 107, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.033>
- Kondo, T., Sawatari, C., Manley, R. St. J., & Gray, D. G. (1994). Characterization of hydrogen bonding in cellulose-synthetic polymer blend systems with regioselectively substituted methylcellulose. *Macromolecules*, 27(1), 210–215. <https://doi.org/10.1021/ma00079a031>
- Kotzianova, A., Rebicek, J., Zidek, O., Pokorny, M., Hrbac, J., & Velebny, V. (2015). Raman spectroscopy based method for the evaluation of compositional consistency of nanofibrous layers. *Analytical Methods*, 7(23), 9900–9905. <https://doi.org/10.1039/C5AY02671G>
- Lee, H. Y., Danjo, T., & Iwata, T. (2018). Synthesis and characterization of dextrin derivatives by heterogeneous esterification. *Journal of Polymer Research*, 25(3), 183. <https://doi.org/10.1007/s10965-017-1333-1>
- Liu, M., Duan, X. P., Li, Y. M., Yang, D. P., & Long, Y. Z. (2017). Electrospun nanofibers for wound healing. *Materials Science and Engineering C*, 76, 1413–1423. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.034>
- Luebberding, S., Krueger, N., & Kerscher, M. (2014). Mechanical properties of human skin in vivo: A comparative evaluation in 300 men and women. *Skin Research and Technology*, 20(2), 127–135. <https://doi.org/10.1111/srt.12094>
- Nazarzadeh Zare, E., Mansour Lakouraj, M., & Mohseni, M. (2014). Biodegradable polypyrrole/dextrin conductive nanocomposite: Synthesis, characterization, antioxidant and antibacterial activity. *Synthetic Metals*, 187(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2013.09.045>
- Noor, S. A. M., Ahmad, A., Talib, I. A., & Rahman, M. Y. A. (2010). Morphology, chemical interaction, and conductivity of a PEO-ENR50 based on solid polymer electrolyte. *Ionics*, 16(2), 161–170. <https://doi.org/10.1007/s11581-009-0385-6>
- Ottenio, M., Tran, D., Ní Annaidh, A., Gilchrist, M. D., & Bruyère, K. (2015). Strain rate and anisotropy effects on the tensile failure characteristics of human skin. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 41, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.10.006>
- Ozawa, Y., Sawada, S., Morimoto, N., & Akiyoshi, K. (2009). Self-Assembled Nanogel of Hydrophobized Dendritic Dextrin for Protein Delivery. *Macromolecular Bioscience*, 9(7), 694–701. <https://doi.org/10.1002/mabi.200800288>

- Rath, R. K., Subramanian, S., & Pradeep, T. (2000). Surface Chemical Studies on Pyrite in the Presence of Polysaccharide-Based Flotation Depressants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 229(1), 82–91. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.6990>
- Rodríguez-Zamora, P., Simo, A., Khamlich, S., McDonald, E., Peterson, N., & Maaza, M. (2017). Synthesis and characterisation of electrospun poly (ethylene oxide) nanofibers enriched with VO₂ nanoparticles for the development of unidimensional nanomaterials. *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica*, 5(28).
- Samanta, P., Srivastava, R., Nandan, B., & Chen, H.-L. (2017). Crystallization behavior of crystalline/crystalline polymer blends under confinement in electrospun nanofibers of polystyrene/poly(ethylene oxide)/poly(ϵ -caprolactone) ternary mixtures. *Soft Matter*, 13(8), 1569–1582. <https://doi.org/10.1039/C6SM02748B>
- Stephens, J. S., Chase, D. B., & Rabolt, J. F. (2004). Effect of the Electrospinning Process on Polymer Crystallization Chain Conformation in Nylon-6 and Nylon-12. *Macromolecules*, 37(3), 877–881. <https://doi.org/10.1021/ma0351569>
- Villarreal-Gómez, L. J., Cornejo-Bravo, J. M., Vera-Graziano, R., & Grande, D. (2016). Electrospinning as a powerful technique for biomedical applications: A critically selected survey. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27(2), 157–176. <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1116885>
- Yang, S., Liu, Z., Liu, Y., & Jiao, Y. (2015). Effect of molecular weight on conformational changes of PEO: an infrared spectroscopic analysis. *Journal of Materials Science*, 50(4), 1544–1552. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8714-1>
- Zareh, E. N., Moghadam, P. N., Azariyan, E., & Sharifian, I. (2011). Conductive and Biodegradable Polyaniline/Starch Blends and Their Composites With Polystyrene. *Iranian Polymer Journal*, 20(4), 319–328.

Capítulo 5

Fabricación por electrorrociado y microemulsión de micropartículas de copolímero en bloque poli(ϵ -caprolactona-etilenglicol) sintetizado por catálisis enzimática y su caracterización

5.1 Resumen de capítulo

En el campo de la nanomedicina se utiliza una gran variedad de métodos para producir sistemas poliméricos novedosos de encapsulación que sean capaces de almacenar y acarrear moléculas bioactivas para su liberación en dianas específicas minimizando las pérdidas en actividad y cantidad. Estas técnicas siguen ajustándose para optimizar la morfología y tamaño del acarreador y prevenir su eliminación por parte del sistema inmune. En este capítulo se comparan dos métodos para la formulación de micropartículas con potencial para acarrear moléculas bioactivas. A partir de un copolímero en bloque poli(ϵ -caprolactona-etilenglicol) (PCL-PEG400) sintetizado por polimerización enzimática se obtuvieron micropartículas, ya sea mediante el electrorrociado de una disolución de PCL-PEG400 en N,N-dimetilformamida, o bien mediante la técnica de microemulsión y evaporación de disolvente añadiendo una fase de PCL-PEG400 en acetona a una fase acuosa de poli(alcohol vinílico). Ambos métodos produjeron micropartículas, según lo observado por FESEM. El electrorrociado generó una capa uniforme de partículas con superficies lisas y diámetros de alrededor de 5–10 μm , evitando la formación de aglomerados de mayor tamaño. Por su parte, la técnica de microemulsión produjo partículas esféricas con diámetros de 1 a 5 μm , superficies rugosas y algunos aglomerados. El polímero PCL-PEG400 sin tratamiento previo fue analizado por espectroscopías ATR-FTIR y NMR, confirmando así la presencia de PCL y PEG. El análisis térmico mediante TGA y DSC mostró diferencias considerables entre las temperaturas de descomposición y de fusión del copolímero PCL-PEG400 y la PCL de referencia, debido a las diferencias de peso molecular y composición. Ambas técnicas de fabricación dieron como resultado diámetros de partícula y texturas con diferencias importantes, lo cual podría favorecer o entorpecer la captación celular de las partículas y la eliminación por el sistema inmune. Aunque todavía son necesarios estudios adicionales para evaluar estos efectos, los resultados aquí reportados del tamaño y morfología de las partículas sugieren que la técnica de electrorrociado tiene mayor potencial para aplicaciones en nanomedicina.

5.2 Contexto

Las polilactonas son poliésteres de gran interés para aplicaciones en ingeniería de tejidos y entrega de fármacos, especialmente por su alta biocompatibilidad, baja toxicidad, baja inmunogenicidad y su biodegradabilidad, la cual se ha estudiado ampliamente. En particular, la poli(ϵ -caprolactona) (PCL) ha surgido como un polímero biocompatible de alta popularidad aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos de América para su uso en una amplia gama de dispositivos médicos y farmacéuticos, incluyendo apósitos para heridas cutáneas, suturas reabsorbibles, sistemas de liberación controlada de fármacos y andamios celulares sintéticos. La PCL ha tenido

preferencia sobre otros polímeros biocompatibles en aplicaciones que requieren una estabilidad duradera, puesto que su degradación ocurre en periodos más largos (2–3 años) que para los polímeros con base en poli(ácido glicólico) o poli(ácido láctico) (Kobayashi, 2015). La degradación de la PCL semicristalina ocurre principalmente mediante la hidrólisis de sus enlaces éster; por tanto, un dispositivo implantado a base de PCL experimenta un periodo inicial de hidratación, seguido del comienzo de la degradación de cadenas poliméricas (Woodruff & Hutmacher, 2010). No obstante, debido a su carácter hidrofóbico, la PCL a menudo genera una baja adhesión celular, ya que ésta normalmente requiere interacciones electrostáticas favorables de la membrana celular o la matriz extracelular con la superficie del sustrato polimérico. Como resultado, para las aplicaciones biomédicas en las que un alto grado de adhesión celular es esencial, generalmente se llevan a cabo tratamientos superficiales que aumenten la hidrofiliidad de la PCL, como la oxidación con plasma (Yan et al., 2013), la oxidación en disoluciones alcalinas, el procesamiento y mezclado con polímeros hidrofílicos o proteínas (Guarino et al., 2011) y la funcionalización con grupos hidrofílicos o cadenas laterales que generen un polímero anfifílico (C. S. Wu, 2005).

Es común que las polilactonas y sus copolímeros con aplicaciones en ingeniería de tejidos y liberación de fármacos sean sintetizadas mediante polimerización por apertura de anillo (ROP) a partir de ésteres cíclicos (lactonas) usando catalizadores metálicos, especialmente el 2-etilhexanoato de estaño(II), $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (Hwang et al., 2005). Aunque los catalizadores con base de estaño están aprobados por la FDA, aún deben realizarse estudios adicionales sobre los efectos a largo plazo de la liberación de trazas de iones estaño en el polímero producto, poniendo en riesgo la seguridad de su uso en dispositivos biomédicos. Además de no ser un ion fisiológico, el estaño(II) tiene efectos negativos sobre la función de algunas enzimas y receptores, mostrando citotoxicidad y genotoxicidad según diversos estudios con cultivos celulares (Dantas et al., 2002; Schlueter et al., 2016; Viau et al., 2009). Por tanto, ante los riesgos aún desconocidos del uso de catalizadores con base de estaño para la síntesis de polímeros, particularmente para aplicaciones biomédicas, la catálisis enzimática representa una alternativa prometedora para la síntesis por ROP de polilactonas libres de trazas de iones Sn^{2+} .

Dentro de las enzimas útiles en este contexto, muchas lipasas y algunas carboxilesterasas tienen actividad hidrolítica sobre los enlaces éster, por lo que pueden tanto sintetizar como degradar poliésteres alifáticos como la PCL (Almeida et al., 2019), comenzando ya sea a partir de monómeros puros o bien añadiendo alcoholes como iniciadores (Kobayashi, 2015). La ROP por biocatálisis puede llevarse a cabo usando lipasas libres en disolución, lo cual produce PCLs de bajo peso molecular debido a la actividad doble de síntesis y degradación de la enzima (Barrera-Rivera et al., 2006); o bien, usando lipasas inmovilizadas en alguna matriz, lo cual mitiga la degradación enzimática de las cadenas poliméricas y aumenta el peso molecular de la PCL y la conversión del monómero (Öztürk Düşkünkörur et al., 2014; Sandoval et al., 2010). La inmovilización permite una dispersión adecuada y reutilización de la lipasa, además de favorecer su estabilización y activación (Sheldon, 2007).

En el área de liberación de fármacos y nanomedicina, los copolímeros en bloque de PCL con polietilenglicol (PEG) han sido de gran interés, especialmente por su capacidad de autoensamblarse en micelas o polimerosomas a bajas concentraciones (Hu et al., 2017), para producir portadores de fármacos con mejor capacidad de penetración celular y liberación controlada (Deng et al., 2014; Gou et al., 2009). Además, se ha reportado que los copolímeros en bloque de PCL-PEG en altas concentraciones son capaces de formar hidrogeles termosensibles con entrecruzamiento físico a partir de disoluciones acuosas, esto debido a que presentan transiciones sol-gel en un intervalo de temperaturas entre 35–45 °C según el peso molecular y la concentración del copolímero en disolución (Gong et al., 2009; Steinman et al., 2020). Estos hidrogeles termosensibles representan una alternativa para vehículos inyectables de fármacos, ya que a temperatura ambiente se encuentran en un estado sol facilitando la incorporación con el fármaco y su posterior administración, mientras que a 37 °C (la temperatura normal del cuerpo humano) cambian de fase a un estado de gel prolongando el periodo de liberación del fármaco en el sitio de aplicación. Además, se ha descrito que los hidrogeles a base de PCL-PEG presentan la propiedad de tixotropía o adelgazamiento por esfuerzo cortante (Steinman et al., 2020), es decir, experimentan una reducción en el módulo de almacenamiento y un aumento en el módulo de pérdida debido a una transición temporal gel-sol que puede explicarse por la disociación temporal de los sitios de entrecruzamiento físico en la red polimérica. Se ha reportado el uso de hidrogeles termosensibles de copolímeros en bloque de PCL-PEG como vehículo inyectable de proteínas (Ma et al., 2010), vehículo inyectable de colágeno e hidroxiapatita para regeneración ósea (Fu et al., 2012), vehículo inyectable para liberación controlada de factores de crecimiento (Q. Wu et al., 2012) y vehículo de diclofenaco en gotas para liberación ocular (Luo et al., 2016). En este capítulo se reporta la fabricación y caracterización de micropartículas mediante electrorrociado y microemulsión a partir de una mezcla de copolímeros en bloque PCL-PEG/PCL-PEG-PCL sintetizados por ROP libre de disolvente catalizada enzimáticamente.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Materiales

En este estudio, se utilizó una mezcla de dioles de poli(ϵ -caprolactona-etilenglicol) α,ω -telequéricos dibloque y tribloque (PCL-PEG400) sintetizados a partir de ϵ -caprolactona (ϵ -CL) como monómero y poli(etilenglicol) (PEG) de peso molecular (MW) = 400 Da como iniciador mediante polimerización por apertura de anillo (ROP) libre de disolvente y catalizada enzimáticamente por la lipasa extracelular 2 de *Yarrowia lipolytica* (YLL) (**Figura 5.1**), como se ha reportado previamente (Barrera-Rivera et al., 2012; Barrera-Rivera & Martínez-Richa, 2018; Sandoval et al., 2010). En resumen, se obtuvo la YLL como una disolución sobrenadante con una concentración de 0.1568 mg mL⁻¹ a partir de un cultivo de *Y. lipolytica*. Posteriormente la YLL fue inmovilizada sobre perlas esféricas Lewatit® VP OC 1026 (Lanxess, Colonia, Alemania) a base de resina de poliestireno entrecruzado con divinilbenceno y funcionalizado con grupos de bencilamina (amina primaria) con tamaño de partícula en el intervalo 0.315–1.25 mm y tamaño de poro promedio de 25 nm. Se agitó la disolución de YLL (15 mL) con 1 g de perlas previamente activadas en etanol en un agitador rotatorio a 4 °C por 24 h. Se filtró la disolución, se lavaron las perlas con agua destilada y se

secaron al vacío a temperatura ambiente (alrededor de 23 °C). La síntesis de PCL-PEG400 por ROP en bulto (libre de disolvente) catalizada por YLL se llevó a cabo mezclando ϵ -CL (10 mmol) y PEG (1 mmol; MW = 400 Da) en un vial seco, añadiendo 12 mg de YLL inmovilizada y permitiendo el avance de la reacción a 120 °C por 6 h sin usar atmósfera inerte. El producto fue una cera suave que posteriormente se disolvió en cloroformo y se filtró con un filtro de vidrio sinterizado de 10–15 μ m para retirar la enzima inmovilizada. El polímero se secó a 70 °C al vacío por 12 h y se almacenó a temperatura ambiente en un desecador. El producto PCL-PEG400 fue obtenido como una mezcla de dioles PCL-PEG/PCL-PEG-PCL a razón de 44:56 con $M_n = 1211$ Da (determinado por $^1\text{H NMR}$), $M_n = 1120$ Da (determinado por MALDI), $M_n = 4083$ Da y $M_w/M_n = 1.163$ (determinado por GPC). La ϵ -CL, el PEG400, la N,N-dimetilformamida (DMF; anhidro, $\geq 99.8\%$), la acetona (grado ACS, $\geq 99.5\%$), el poli(alcohol vinílico) (PVA; $M_w = 31\text{--}50$ kDa, grado de hidrólisis de 98–99%) y la PCL de referencia (M_n promedio = 80 kDa) fueron todos de grado reactivo, adquiridos de Sigma-Aldrich y usados sin tratamientos previos.

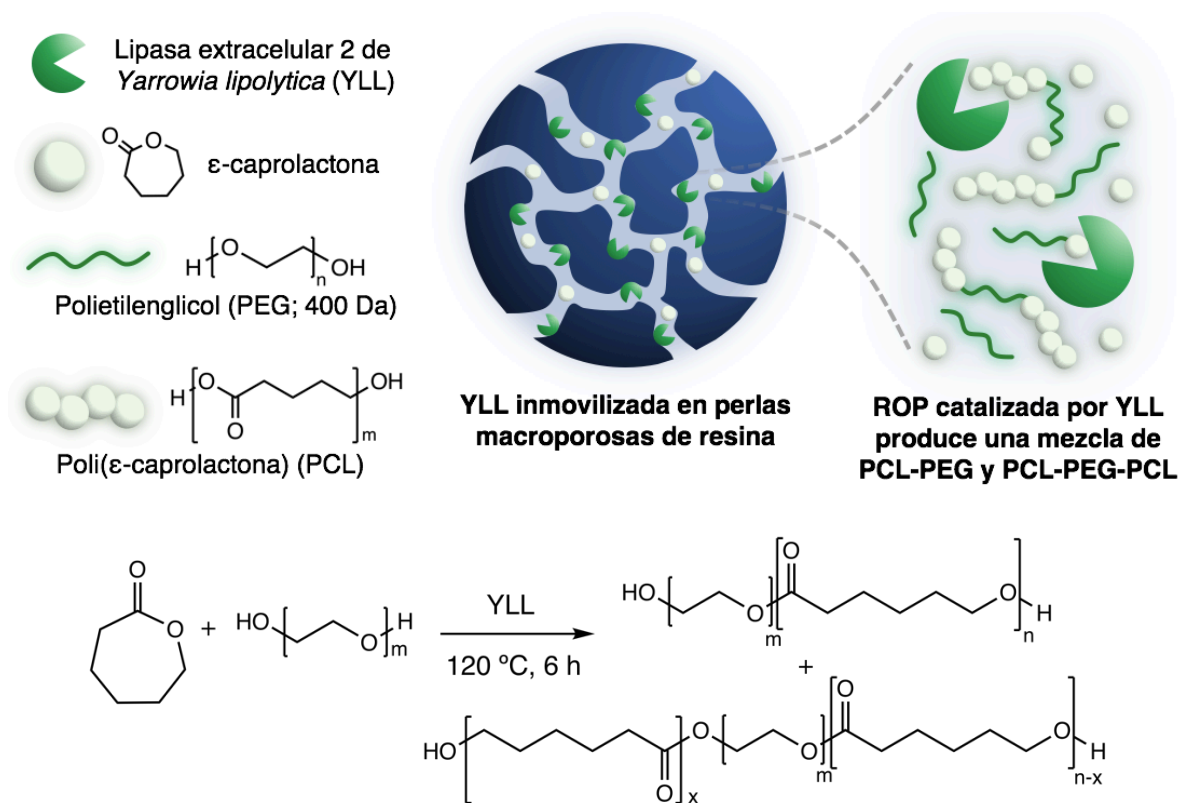


Figura 5.1 Esquema de síntesis del copolímero en bloque PCL-PEG400 por catálisis enzimática libre de disolvente en perlas macroporosas de resina. **ROP**: polimerización por apertura de anillo.

5.3.2 Caracterización química y térmica de PCL-PEG400

Se evaluó el contenido químico del copolímero PCL-PEG400 sin tratamiento previo, de las micropartículas electrorrociadas y de un homopolímero de PCL sintetizado por catálisis metálica como referencia, usando espectroscopía infrarroja por transformada de

Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). Se recolectaron los espectros ATR-FTIR con un espectrómetro Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) acoplado con un accesorio ATR de diamante Smart Orbit, adquiriendo un promedio de 64 barridos con resolución de 1 cm^{-1} en el intervalo del infrarrojo cercano ($400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$). Los datos de FTIR fueron procesados en el software OMNIC 9 (Thermo Fisher Scientific).

Para corroborar la estructura molecular del copolímero PCL-PEG400, se registraron sus espectros de NMR de protón (^1H), así como de carbono con una secuencia de análisis de protones enlazados (*attached proton test*, ^{13}C -APT), ambos a $23\text{ }^\circ\text{C}$ usando un espectrómetro Avance III HD de 400 MHz (Bruker), equipado con una sonda de disoluciones tipo BBI con gradiente en Z. Se disolvieron 50 mg de PCL-PEG400 sin tratamiento previo en cloroformo deuterado (CDCl_3 , pureza 99.5%; Sigma-Aldrich) como disolvente y se transfirió la disolución a un tubo de 5 mm para obtener los espectros de ^1H y de ^{13}C . Como referencia se obtuvieron los espectros NMR de ^1H y ^{13}C de una PCL sintetizada por catálisis con $\text{Sn}_2(\text{Oct})$ ($M_n = 80\text{ kDa}$; Sigma-Aldrich), utilizando el mismo equipo, sonda y método de preparación de muestra. Todos los espectros de NMR fueron procesados con el software MestReNova 12 (Mestrelab Research, España).

Se realizaron análisis térmicos del copolímero PCL-PEG400 mediante análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). El análisis de TGA se realizó para verificar la estabilidad y degradación térmica y la variación de masa al aumentar la temperatura, usando un analizador Q5000-IR (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Una muestra de 7.8 mg fue calentada a $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ de $23\text{ }^\circ\text{C}$ hasta $450\text{ }^\circ\text{C}$ sobre un portamuestra de platino bajo atmósfera de nitrógeno. Por su parte, el análisis de DSC tuvo como objetivo determinar el punto y la entalpía de fusión y la temperatura de transición vítrea (T_g) del copolímero PCL-PEG400. Se realizó en un calorímetro Q2000 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA) usando un portamuestras de aluminio bajo atmósfera de nitrógeno. Una primera muestra se analizó de $-90\text{ }^\circ\text{C}$ a $150\text{ }^\circ\text{C}$ con una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, pero en esta corrida no fue posible resolver la transición vítrea en el termograma debido a que el calentamiento lento permite la relajación paulatina de las cadenas poliméricas, resultando en la ausencia de cambios en el flujo de calor durante la transición vítrea. Por esto, se analizó una segunda muestra del polímero en el mismo intervalo de temperaturas cambiando la velocidad de calentamiento a $20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Como referencia, se analizó también una muestra de PCL sintetizada por catálisis con $\text{Sn}_2(\text{Oct})$ ($M_n = 80\text{ kDa}$; Sigma-Aldrich). Esta PCL de referencia fue analizada bajo atmósfera de nitrógeno, tanto por TGA (tasa de calentamiento = $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$) como por DSC (tasa de calentamiento = $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$). Todos los termogramas de TGA y DSC fueron procesados en el software Advantage 5 (TA Instruments).

5.3.3 Fabricación de partículas electrorrociadas de PCL-PEG400

Se preparó una disolución de PCL-PEG400 al 12% p/v en DMF en un vial seco; posteriormente se mantuvo en agitación magnética por 1 h y se electrorroció usando un dispositivo personalizado. La disolución fue inyectada con una bomba programable para jeringa NE-1000 (New Era Pump Systems, Farmingdale, NY, EUA) a través de un capilar de acero inoxidable con punta roma de calibre 22G usando un flujo de inyección de 0.04 mL

h⁻¹. Se utilizó una fuente de poder (Gamma High Voltage Research, Ormond Beach, FL, EUA) para aplicar una diferencia de potencial de 17 kV sobre el capilar. Como colector se usó una placa de aluminio de 8 × 8 cm conectada a tierra física colocada a 10 cm de la punta del capilar dentro de una cámara aislada de deposición, en la cual la atmósfera se mantuvo a una humedad relativa < 10% y un intervalo de temperaturas de 22–26 °C.

5.3.4 Fabricación de partículas de PCL-PEG400 por microemulsión

Se preparó una fase orgánica disolviendo 5 g de PCL-PEG400 en 25 mL de acetona y agitando por 40 min a temperatura ambiente. Se preparó una fase acuosa mezclando 5 mg de PVA como agente tensoactivo en agua destilada a 80 °C y en agitación por 1.5 h hasta disolver completamente. La disolución de PVA se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió la fase orgánica gota a gota a la fase acuosa y se mantuvo en agitación constante por 7 días para permitir la evaporación completa de la acetona. Las micropartículas obtenidas fueron recolectadas mediante centrifugación a 2717×g en una centrífuga 5810R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y secadas a temperatura ambiente hasta tener peso constante.

5.3.5 Caracterización morfológica de partículas de PCL-PEG400

Se evaluó la morfología de las micropartículas de PCL-PEG400 fabricadas por electrorrociado y por microemulsión mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM). Las micrografías de FESEM se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo tipo Schottky JSM-7800F (JEOL, Tokyo, Japón) con un voltaje de aceleración de 10 kV y una máxima amplificación de 5000x. Previo al análisis por FESEM, las muestras de micropartículas recién recolectadas se dejaron secar al aire hasta tener un peso constante, se fijaron sobre portamuestras con cinta de carbono eléctricamente conductora y se recubrieron con una capa delgada de oro mediante pulverización catódica al vacío, también conocido como *sputtering*.

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Análisis espectroscópico por ATR-FTIR y NMR

Con el objetivo de corroborar que el proceso de electrorrociado no altera los grupos funcionales del copolímero, se analizaron por espectroscopía ATR-FTIR el PCL-PEG400 electrorrociado, el PCL-PEG400 sin tratamiento previo y una PCL de alto peso molecular como referencia (**Figura 5.2**). Los espectros de PCL-PEG400, tanto electrorrociado como sin tratamiento previo, muestran las señales de absorción características de la PCL (**Tabla 5.1**). Resaltan las señales a 2950 y 2898 cm⁻¹ debidas al estiramiento de metileno de tipo asimétrico y simétrico, respectivamente; la señal intensa a 1724 cm⁻¹ debida al estiramiento del grupo carbonilo del poliéster y el grupo de señales de huella dactilar de la PCL debidas a distintos modos vibracionales del metileno en el intervalo de 900–1500 cm⁻¹. Sin embargo, a diferencia del homopolímero de PCL referencia, los espectros de PCL-PEG400 presentan de manera adicional una señal ancha en el intervalo 3150–3650 cm⁻¹ debida a los grupos terminales hidroxilo en el copolímero, siendo la intensidad de esta señal un indicador del relativamente bajo peso molecular del copolímero.

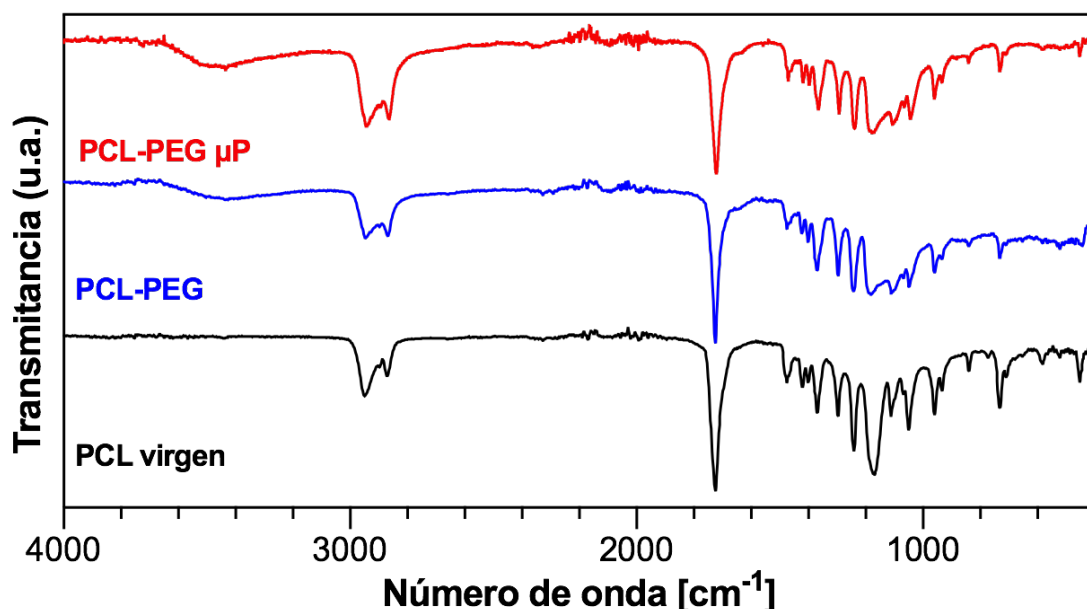


Figura 5.2 Espectros ATR-FTIR del copolímero PCL-PEG400 sintetizado por catálisis enzimática, tanto sin tratamiento previo (PCL-PEG) como electrorrociado en micropartículas (PCL-PEG μ P). Se incluye el espectro de una PCL sintetizada por catálisis metálica como referencia (PCL virgen; $M_n = 80$ kDa; Sigma-Aldrich).

Tabla 5.1 Asignación de señales de absorción en los espectros ATR-FTIR de PCL-PEG400, PCL-PEG400 electrorrociado y PCL de referencia, según las contribuciones de cada bloque polimérico.

Bloque	Ubicación de señal [cm^{-1}]	Tipo de vibración	Grupo funcional (Referencia)
PCL	2950	Estiramiento C–H asimétrico en fase amorfa	–CH ₂ – (Phillipson et al., 2014)
PCL	2898	Estiramiento C–H simétrico en fase cristalina	–CH ₂ – (Phillipson et al., 2014)
PCL	2870	Estiramiento C–H simétrico en fase amorfa	–CH ₂ – (Phillipson et al., 2014)
PCL	1724 (intenso)	Estiramiento C=O en fase cristalina	C–C(=O)–O–C (Coleman & Zarian, 1979; Phillipson et al., 2014)
PCL	1476	Tijereteo –CH ₂ –	–CH ₂ – (Phillipson et al., 2014)
PCL	1422, 1400, 1368	Aleteo –CH ₂ –	–CH ₂ – (Phillipson et al., 2014)
PCL	1296	Estiramientos C–O y C–C	Éster (Elzein et al., 2004)
PCL	1242	Estiramiento asimétrico C–O–C	C–C(=O)–O–C (Elzein et al., 2004; Lin-Vien, 1991, p. 487)
PCL	1168 (intenso)	Estiramiento simétrico C–O–C	C–C(=O)–O–C (Elzein et al., 2004; Lin-Vien, 1991, p. 487)
PCL	1111, 1068, 1050	Deformación –CH ₂ –	–CH ₂ – (Phillipson et al., 2014)
PCL	960	Deformación C–O–; torsión –CH ₂ –	C–C(=O)–O–C (Phillipson et al., 2014)
PCL	839	Balaceo –CH ₂ –	
PCL	731	Balaceo –CH ₂ –	(Lin-Vien, 1991, p. 485)
PCL	584	Deformación –CH ₂ –	

PEG	3650–3150 (amplio)	Estiramiento O–H	–OH terminal
PEG	1476	Tijereteo –CH ₂ –	(Vrandečić et al., 2010)
PEG	1242	Torsión –CH ₂ –	(Vrandečić et al., 2010)
PEG	1200–950	Deformaciones –CH ₂ –; estiramientos C–O y C–C	(Vrandečić et al., 2010)
PEG	960	Torsión –CH ₂ –; estiramiento C–O	(Phillipson et al., 2014; Vrandečić et al., 2010)
PEG	839	Balaceo –CH ₂ –	(Vrandečić et al., 2010)

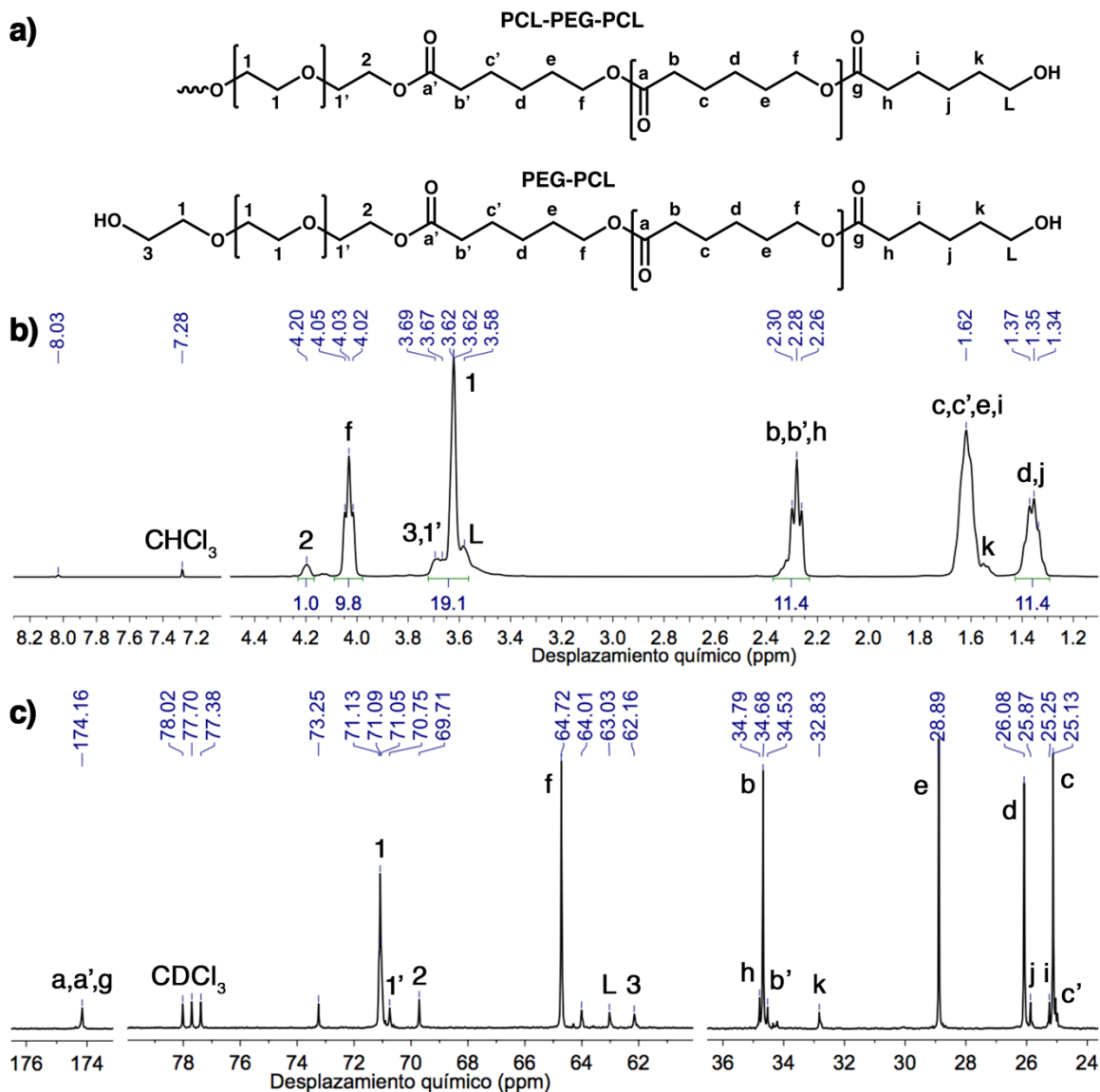


Figura 5.3 a) Estructura molecular del copolímero PCL-PEG400 tribloque (PCL-PEG-PCL) y dibloque (PEG-PCL). Espectros NMR de b) ¹H y c) ¹³C-APT del copolímero PCL-PEG400 (CDCl₃, 400 MHz) con las señales asignadas a los átomos correspondientes.

Por su parte, a partir de los espectros de NMR de ^1H y ^{13}C del copolímero PCL-PEG400 (**Figura 5.3**), se asignaron las señales a cada uno de los núcleos correspondientes a las unidades repetitivas de los polímeros, usando la posición de las señales por correlación con la magnitud de desprotección por átomos electronegativos cercanos. Se asignó la posición de la señal debida al cloroformo disolvente (CDCl_3) y sus impurezas no deuteradas, siguiendo lo reportado por la literatura (Gottlieb et al., 1997), es decir, un singulete en $\delta = 7.28$ ppm para el espectro de ^1H (**Figura 5.3b**) y un triplete centrado en $\delta = 77.7$ ppm para el espectro de ^{13}C (**Figura 5.3c**). Por último, se observó que tanto los espectros medidos de PCL-PEG400 como sus asignaciones están en acuerdo con reportes previos de la síntesis de copolímeros PCL-PEG (Barrera-Rivera et al., 2012).

5.4.2 Análisis térmico del copolímero PCL-PEG400 por TGA y DSC

En un inicio, se realizó la prueba de DSC con una rapidez de calentamiento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ para la muestra de PCL, pero en ésta no se observó la transición vítrea, por lo que se repitió la prueba a $20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, lo que sí permitió observarla (**Figura 5.5**). Esto se debió a la relajación molecular que experimenta el polímero cuando se le calienta a una baja velocidad. En cambio, con una mayor rampa de calentamiento, el polímero cinéticamente no tiene tanta oportunidad de relajarse durante la transición vítrea, por lo que fue posible observar su cambio de absorción de calor y su transición vítrea en el termograma de DSC.

Los grados de cristalinidad (%) de las muestras de PCL y PCL-PEG400 se calcularon a partir de la siguiente expresión (Gupta et al., 2012):

$$\%c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_{m,crist}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

La **Ecuación 5.1** para calcular el grado de cristalinidad no depende del calor de fusión del polímero amorfo, sino sólo del polímero 100% cristalino ($\Delta H_{m,crist}$) y de la muestra (ΔH_m). El grado de cristalinidad de la PCL calculado de 75.1% (**Tabla 5.2**) está dentro de los intervalos reportados (Wypych, 2016). Además, su alta cristalinidad está de acuerdo con el alto peso molecular (80 kDa) de la muestra de PCL. No fue posible calcular el grado de cristalinidad de la PCL-PEG400, ya que no se tiene un valor referencia para el calor de fusión del copolímero cristalino según la contribución de cada bloque polimérico a la cristalinidad total.

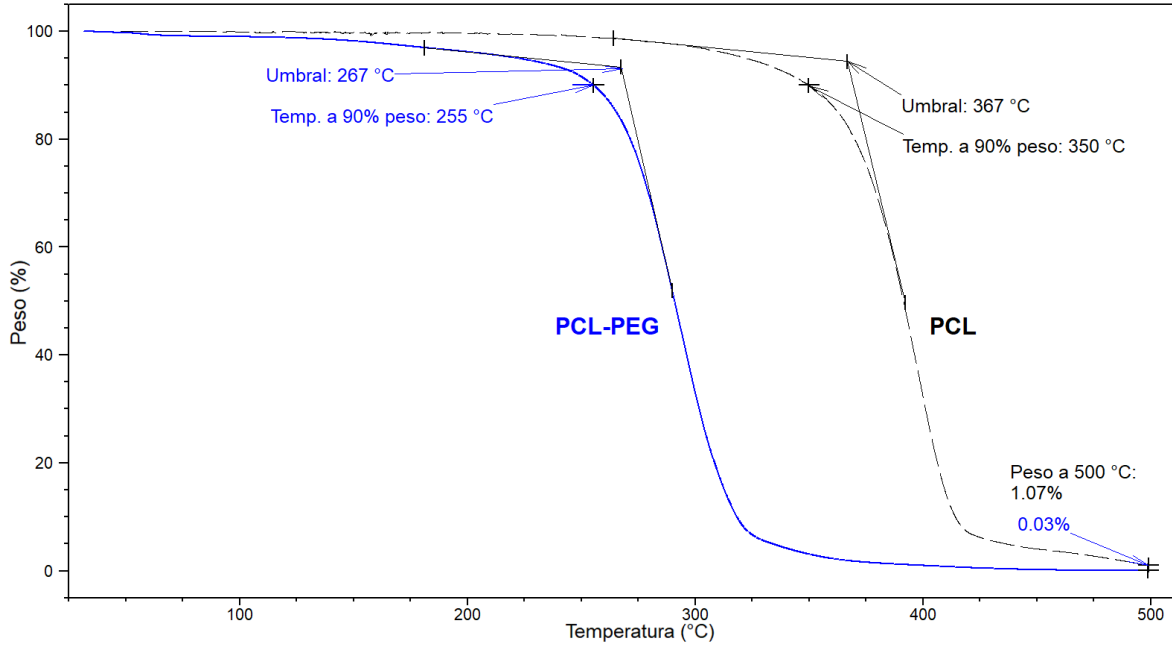


Figura 5.4 Termogramas de TGA del copolímero PCL-PEG400 y el polímero PCL de referencia ($M_n = 80$ kDa; Sigma-Aldrich), mostrando las temperaturas umbral (*onset*) de degradación, las temperaturas para un peso de 90% y los pesos de residuo a 500 °C.

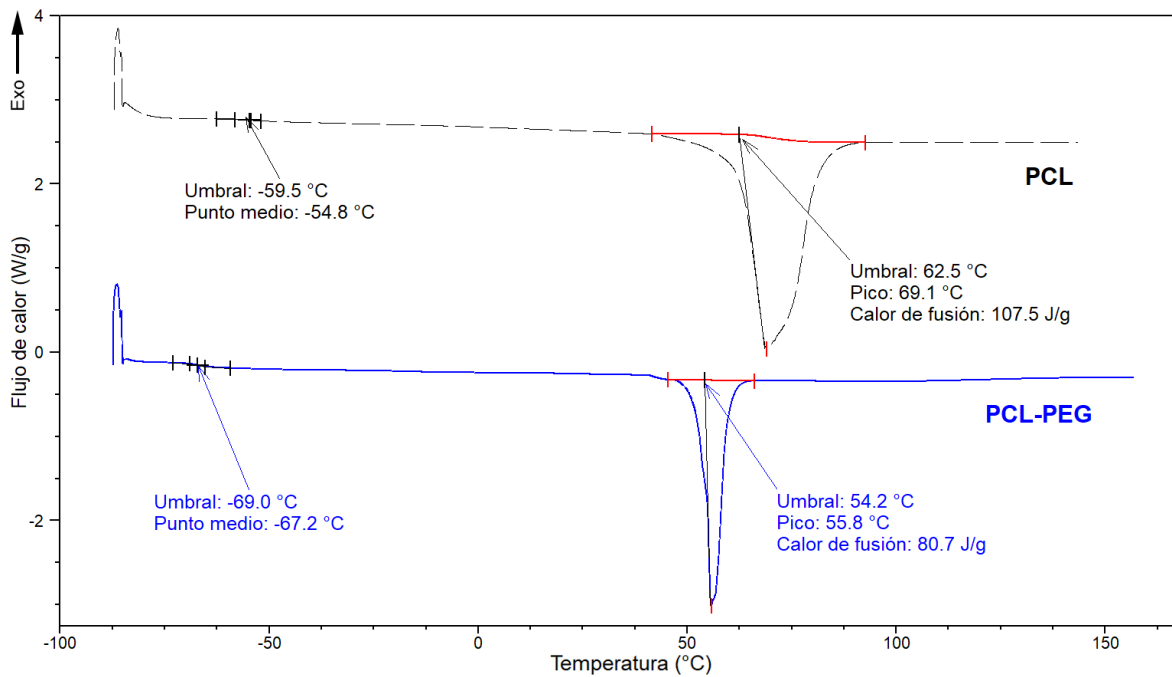


Figura 5.5 Curvas de DSC del copolímero PCL-PEG400 y el polímero PCL de referencia ($M_n = 80$ kDa; Sigma-Aldrich), mostrando las temperaturas de transición vítrea (T_g) y las temperaturas y entalpías/calores de fusión.

Tabla 5.2 Resultados de análisis térmico por TGA y DSC de PCL y PCL-PEG400.

Polímero	T _g [°C]	T _m [°C]	T _d [°C]	ΔH _m [J g ⁻¹]	%c
PCL	-54.8	62.5	367	107.5	75.1
PCL-PEG400	-67.2	54.2	267	80.7	
PCL (literatura)	-60 – -72 *	58 – 63 *		139.5 †	57 – 76 *
PEG (literatura)				188.4 §	

T_g: temperatura de transición vítrea en punto medio; T_m: temperatura de fusión umbral; T_d: temperatura de descomposición umbral; ΔH_m: calor de fusión; %c: grado de cristalinidad.

* Obtenido de (Wypych, 2016).

† Para PCL con 100% de cristalinidad; obtenido de (Gupta et al., 2012).

§ Para PEG con 100% de cristalinidad; obtenido de (Li et al., 2013).

La muestra de PCL tuvo una temperatura de descomposición de 367 °C, la cual es 100 °C mayor que la de PCL-PEG400 (**Tabla 5.2**). Esto se puede relacionar con la alta cristalinidad de la PCL, principalmente por ser un homopolímero de alto peso molecular respecto a PCL-PEG400. Su carácter homopolimérico le permite a PCL cristalizar hasta un grado mayor, mientras que la PCL-PEG400 contiene bloques con poca afinidad química y miscibilidad entre sí, dificultando la organización periódica de las cadenas poliméricas y reduciendo el tamaño de las regiones cristalinas. Esta reducción en la cristalinidad de la PCL-PEG400 se refleja en el bajo calor de fusión medido por DSC respecto a los valores correspondientes de los homopolímeros 100% cristalinos (**Tabla 5.2**). A su vez, la baja cristalinidad de la PCL-PEG400 facilita su descomposición a menores temperaturas que el homopolímero PCL, ya que se necesita menor energía térmica para romper las atracciones intra- e intermoleculares de PCL-PEG400.

Debido a la alta cristalinidad de PCL es que sus temperaturas de fusión y transición vítrea son mayores que en PCL-PEG400 (**Tabla 5.2**). Nuevamente, se requiere mayor energía térmica para cambiar el régimen de vibración molecular (en el caso de la transición vítrea) y para vencer las atracciones intermoleculares (en el caso de la fusión). Además, se puede relacionar el alto peso molecular de PCL con su alta cristalinidad: las cadenas de gran longitud tienen mayor oportunidad de formar dominios cristalinos de mayor extensión que en cadenas cortas. Por tanto, una PCL de alto peso molecular tiende a alcanzar mayor grado de cristalinidad, aunque esto también depende de la historia térmica y el procesamiento.

5.4.3 Morfología de las micropartículas de PCL-PEG400 producidas por electrorrociado y microemulsión

Con el objetivo de evaluar la capacidad de la técnica de electrorrociado para la producción de micropartículas con polímeros diversos, se depositó PCL-PEG400 por electrorrociado y se comparó la morfología de las partículas resultantes con las producidas por microemulsión, una técnica popular para producir micropartículas poliméricas.

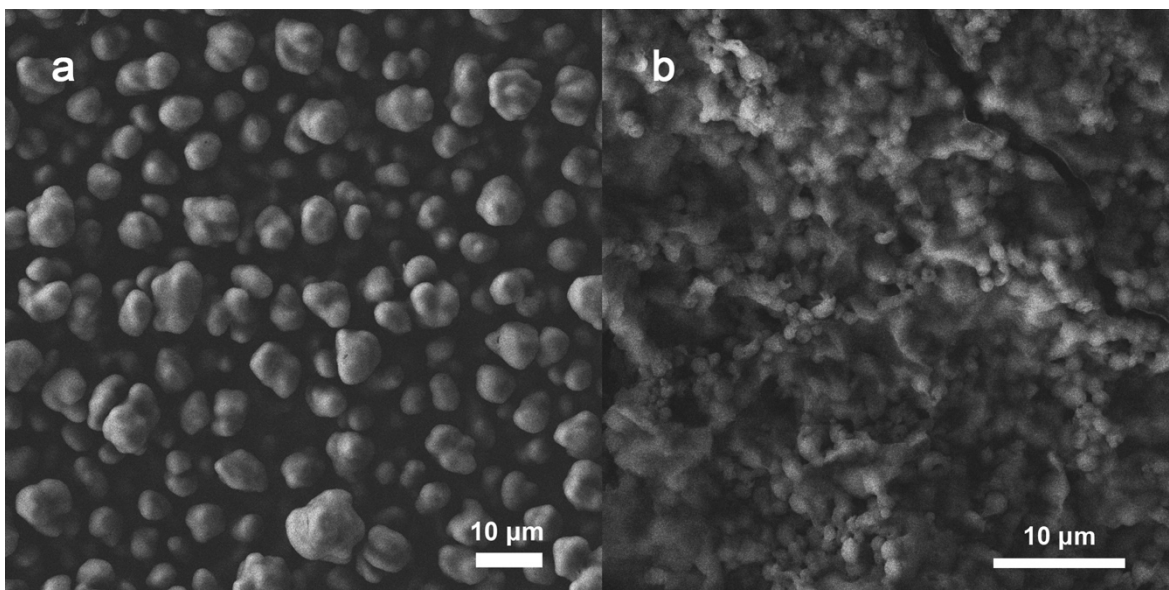


Figura 5.6 Micrografías de FESEM de micropartículas del copolímero PCL-PCL400 producidas por a) electrorrociado y b) microemulsión.

Ambos métodos produjeron micropartículas, según lo observado por FESEM (**Figura 5.6**). La técnica de electrorrociado generó una capa uniforme de partículas de PCL-PEG400 con superficies lisas y diámetros de alrededor de 5–10 μm (**Figura 5.6a**). La deposición de las partículas sobre una placa colectora permitió evitar la formación de aglomerados de mayor tamaño. Por su parte, la técnica de microemulsión produjo partículas esferoides con diámetros de 1 a 5 μm y superficies rugosas (**Figura 5.6b**). Debido a que las partículas debieron centrifugarse para su recolección y observación mediante microscopía electrónica, se encontró la formación de algunos aglomerados de partículas, así como la posible acumulación de PVA durante el secado del material precipitado por centrifugación.

5.5 Conclusiones y perspectivas

Las diferentes técnicas de fabricación dieron como resultado diámetros de partícula y texturas con diferencias importantes, lo cual podría favorecer o entorpecer la captación celular de las partículas y la eliminación por el sistema inmune. Aunque todavía son necesarios estudios adicionales en cultivos celulares *in vitro* para evaluar estos efectos, los resultados aquí reportados del tamaño y morfología de las partículas sugieren que la técnica de electrorrociado tiene mayor potencial para aplicaciones en liberación guiada de agentes bioactivos o para mejorar la dispersabilidad de fármacos con baja hidrosolubilidad.

En el futuro, se buscará mejorar los procesos de recolección de partículas producidas tanto por electrorrociado como por microemulsión. Para el electrorrociado, se recomienda hacer la colección de partículas directamente en un baño de líquido no disolvente, por ejemplo, etanol. El copolímero es una cera suave, por lo que no es posible separar con facilidad el material depositado de la placa colectora sin alterar su micromorfología. Por tanto, la colección de partículas en un baño de no disolvente evitará la obtención de partículas fusionadas entre sí, a diferencia de la recolección sobre una placa conductora, la cual es

común en las técnicas de electrohilado y electrorrociado. En el caso de la microemulsión, se recomienda hacer un análisis de las micelas/partículas obtenidas directamente de la disolución del copolímero en agua sin aditivo estabilizador o tensoactivo. Esto reducirá la posibilidad de aglomeración de partículas durante la centrifugación. Queda aún por evaluar la capacidad del copolímero en bloque aquí reportado para ser usado en sistemas termosensibles basados en hidrogeles, por ejemplo, para la formulación de un gel para la administración tópica de proteínas.

El trabajo reportado en este capítulo permitió validar el electrorrociado como una técnica de fácil acceso para la producción de micropartículas poliméricas, incluso a base de polímeros con diferentes tipos de afinidad, como lo fue en el caso del copolímero anfifílico PCL-PEG. En este caso, se obtuvieron micropartículas en el intervalo de 5–10 μm ; no obstante, es posible modular el tamaño de partícula electrorrociada ajustando la viscosidad y la concentración de la disolución polimérica precursora. Con estos resultados, se procedió a evaluar el potencial del electrorrociado como método de microencapsulación de agentes bioactivos para su liberación controlada.

5.6 Bibliografía de capítulo

- Almeida, B. C., Figueiredo, P., & Carvalho, A. T. P. (2019). Polycaprolactone Enzymatic Hydrolysis: A Mechanistic Study. *ACS Omega*, *4*(4), 6769–6774. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00345>
- Barrera-Rivera, K. A., Flores-Carreón, A., & Martínez-Richa, A. (2006). Synthesis and characterization of poly(ϵ -caprolactone) obtained by enzymatic polymerization with *Yarrowia lipolytica* lipase. *Polymer Preprints*, *47*(8), 278.
- Barrera-Rivera, K. A., Flores-Carreón, A., & Martínez-Richa, A. (2012). Synthesis of Biodegradable Polymers Using Biocatalysis with *Yarrowia lipolytica* Lipase. En G. Sandoval (Ed.), *Lipases and Phospholipases* (Vol. 861, pp. 485–493). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_28
- Barrera-Rivera, K. A., & Martínez-Richa, A. (2018). L-Lysine-Modified Poly(ester-urethane) Based on Polycaprolactone for Controlled Release of Hydrocortisone. En H. N. Cheng, R. A. Gross, & P. B. Smith (Eds.), *ACS Symposium Series* (Vol. 1310, pp. 163–175). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2018-1310.ch012>
- Coleman, M. M., & Zarian, J. (1979). Fourier-transform infrared studies of polymer blends. II. Poly(ϵ -caprolactone)–poly(vinyl chloride) system. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, *17*(5), 837–850. <https://doi.org/10.1002/pol.1979.180170509>
- Dantas, F. J. S., de Mattos, J. C. P., Moraes, M. O., Viana, M. E., Lage, C. A. S., Cabral-Neto, J. B., Leitão, A. C., Bernardo-Filho, M., Bezerra, R. J. A. C., Carvalho, J. J., & Caldeira-de-Araújo, A. (2002). Genotoxic effects of stannous chloride (SnCl_2) in

- K562 cell line. *Food and Chemical Toxicology*, 40(10), 1493–1498.
[https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00087-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00087-X)
- Deng, H., Liu, J., Zhao, X., Zhang, Y., Liu, J., Xu, S., Deng, L., Dong, A., & Zhang, J. (2014). PEG-b-PCL Copolymer Micelles with the Ability of pH-Controlled Negative-to-Positive Charge Reversal for Intracellular Delivery of Doxorubicin. *Biomacromolecules*, 15(11), 4281–4292. <https://doi.org/10.1021/bm501290t>
- Elzein, T., Nasser-Eddine, M., Delaite, C., Bistac, S., & Dumas, P. (2004). FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273(2), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.001>
- Fu, S., Ni, P., Wang, B., Chu, B., Zheng, L., Luo, F., Luo, J., & Qian, Z. (2012). Injectable and thermo-sensitive PEG-PCL-PEG copolymer/collagen/n-HA hydrogel composite for guided bone regeneration. *Biomaterials*, 33(19), 4801–4809.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.040>
- Gong, C. Y., Dong, P. W., Shi, S., Fu, S. Z., Yang, J. L., Guo, G., Zhao, X., Wei, Y. Q., & Qian, Z. Y. (2009). Thermosensitive PEG–PCL–PEG Hydrogel Controlled Drug Delivery System: Sol–Gel–Sol Transition and In Vitro Drug Release Study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(10), 3707–3717. <https://doi.org/10.1002/jps.21694>
- Gottlieb, H. E., Kotlyar, V., & Nudelman, A. (1997). NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry*, 62(21), 7512–7515. <https://doi.org/10.1021/jo971176v>
- Gou, M., Gong, C., Zhang, J., Wang, X., Wang, X., Gu, Y., Guo, G., Chen, L., Luo, F., Zhao, X., Wei, Y., & Qian, Z. (2009). Polymeric matrix for drug delivery: Honokiol-loaded PCL-PEG-PCL nanoparticles in PEG-PCL-PEG thermosensitive hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 9999A, NA-NA.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.32546>
- Guarino, V., Alvarez-Perez, M., Cirillo, V., & Ambrosio, L. (2011). HMSC interaction with PCL and PCL/gelatin platforms: A comparative study on films and electrospun membranes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 26(2), 144–160.
<https://doi.org/10.1177/0883911511399410>
- Gupta, B., Geeta, & Ray, A. R. (2012). Preparation of poly(ϵ -caprolactone)/poly(ϵ -caprolactone-co-lactide) (PCL/PLCL) blend filament by melt spinning. *Journal of Applied Polymer Science*, 123(4), 1944–1950. <https://doi.org/10.1002/app.34728>
- Hu, C., Chen, Z., Wu, S., Han, Y., Wang, H., Sun, H., Kong, D., Leng, X., Wang, C., Zhang, L., & Zhu, D. (2017). Micelle or polymersome formation by PCL-PEG-PCL copolymers as drug delivery systems. *Chinese Chemical Letters*, 28(9), 1905–1909.
<https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.07.020>

- Hwang, M. J., Suh, J. M., Bae, Y. H., Kim, S. W., & Jeong, B. (2005). Caprolactonic poloxamer analog: PEG-PCL-PEG. *Biomacromolecules*, 6(2), 885–890. <https://doi.org/10.1021/bm049347a>
- Kobayashi, S. (2015). Enzymatic ring-opening polymerization and polycondensation for the green synthesis of polyesters. *Polymers for Advanced Technologies*, 26(7), 677–686. <https://doi.org/10.1002/pat.3564>
- Li, Y., Ma, Q., Huang, C., & Liu, G. (2013). Crystallization of Poly (ethylene glycol) in Poly (methyl methacrylate) Networks. *Materials Science*, 19(2), 147–151. <https://doi.org/10.5755/j01.ms.19.2.4430>
- Lin-Vien, D. (Ed.). (1991). *The Handbook of infrared and raman characteristic frequencies of organic molecules*. Academic Press.
- Luo, Z., Jin, L., Xu, L., Zhang, Z. L., Yu, J., Shi, S., Li, X., & Chen, H. (2016). Thermosensitive PEG–PCL–PEG (PECE) hydrogel as an *in situ* gelling system for ocular drug delivery of diclofenac sodium. *Drug Delivery*, 23(1), 63–68. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.903535>
- Ma, G., Miao, B., & Song, C. (2010). Thermosensitive PCL-PEG-PCL hydrogels: Synthesis, characterization, and delivery of proteins. *Journal of Applied Polymer Science*, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/app.31654>
- Öztürk Düşkünkorur, H., Pollet, E., Phalip, V., Güvenilir, Y., & Avérous, L. (2014). Lipase catalyzed synthesis of polycaprolactone and clay-based nanohybrids. *Polymer*, 55(7), 1648–1655. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.02.016>
- Phillipson, K., Hay, J. N., & Jenkins, M. J. (2014). Thermal analysis FTIR spectroscopy of poly(ϵ -caprolactone). *Thermochimica Acta*, 595, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.08.027>
- Sandoval, G., Rivera, I., Barrera-Rivera, K. A., & Martínez-Richa, A. (2010). Biopolymer Synthesis Catalyzed by Tailored Lipases. *Macromolecular Symposia*, 289(1), 135–139. <https://doi.org/10.1002/masy.200900016>
- Schlueter, N., Lussi, A., Ganss, C., & Gruber, R. (2016). L929 fibroblast bioassay on the *in vitro* toxicity of SnCl₂, H₃PO₄, Clearfil SE primer and combinations thereof. *Swiss Dental Journal*, 126(6), 566–572.
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8–9), 1289–1307. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>
- Steinman, N. Y., Bentolila, N. Y., & Domb, A. J. (2020). Effect of Molecular Weight on Gelling and Viscoelastic Properties of Poly(caprolactone)–b–Poly(ethylene glycol)–

- b-Poly(caprolactone) (PCL-PEG-PCL) Hydrogels. *Polymers*, 12(10), 2372. <https://doi.org/10.3390/polym12102372>
- Viau, C. M., Guecheva, T. N., Sousa, F. G., Pungartnik, C., Brendel, M., Saffi, J., & Henriques, J. A. P. (2009). SnCl₂-induced DNA damage and repair inhibition of MMS-caused lesions in V79 Chinese hamster fibroblasts. *Archives of Toxicology*, 83(8), 769–775. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0409-z>
- Vrandečić, N. S., Erceg, M., Jakić, M., & Klarić, I. (2010). Kinetic analysis of thermal degradation of poly(ethylene glycol) and poly(ethylene oxide)s of different molecular weight. *Thermochimica Acta*, 498(1–2), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2009.10.005>
- Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer— Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 35(10), 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>
- Wu, C. S. (2005). A comparison of the structure, thermal properties, and biodegradability of polycaprolactone/chitosan and acrylic acid grafted polycaprolactone/chitosan. *Polymer*, 46(1), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.11.013>
- Wu, Q., Gong, C., Shi, S., Wang, Y., Huang, M., Yang, L., Zhao, X., Wei, Y., & Qian, Z. (2012). Mannan Loaded Biodegradable and Injectable Thermosensitive PCL-PEG-PCL Hydrogel for Vaccine Delivery. *Soft Materials*, 10(4), 472–486. <https://doi.org/10.1080/1539445X.2010.537422>
- Wypych, G. (2016). *Handbook of Polymers*. ChemTec Publishing.
- Yan, D., Jones, J., Yuan, X. Y., Xu, X. H., Sheng, J., Lee, J. C. M., Ma, G. Q., & Yu, Q. S. (2013). Plasma treatment of electrospun PCL random nanofiber meshes (NFMs) for biological property improvement. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 101 A(4), 963–972. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34398>

Capítulo 6

Encapsulación de lactoferrina bovina en micropartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) mediante electrorrociado de disoluciones no emulsificadas y su caracterización como sistemas de liberación controlada

6.1 Resumen de capítulo

La actividad farmacológica de algunas moléculas bioactivas puede disminuir por exposición a condiciones degradantes hidrolíticas, enzimáticas o de pH en el ambiente fisiológico de la vía de administración. El ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) es un candidato prometedor para la formulación de vectores de entrega de fármacos, puesto que es un polímero sintético biodegradable y biocompatible aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos de América. Este polímero es usado en la producción de sistemas de encapsulación y transporte de moléculas bioactivas, con el fin de que alcancen su diana terapéutica evitando pérdidas en su cantidad o actividad. Con base en esto, en este capítulo se reporta la encapsulación de lactoferrina bovina (bLf) en micropartículas de PLGA con diámetros por debajo de los 300 nm producidas por electrorrociado de disoluciones no emulsificadas, técnica que permitió la formulación de micropartículas altamente monodispersas cargadas con proteína sin la necesidad de un medio líquido bifásico. Las micropartículas de PLGA y PLGA/bLf fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido, calorimetría diferencial de barrido, análisis termogravimétrico y dispersión dinámica de luz. El análisis con espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier confirmó la presencia de bLf en las partículas.

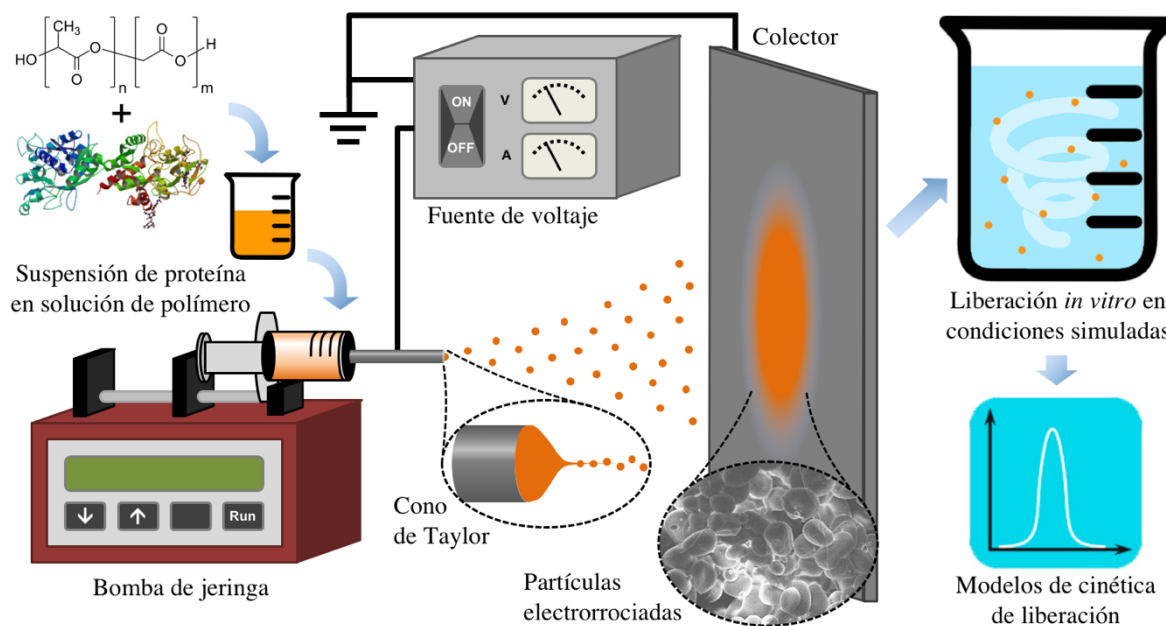


Figura 6.1 Esquema gráfico del proceso de encapsulación de bLf en partículas electrorrociadas de PLGA y la caracterización *in vitro* de su cinética de liberación.

El perfil de liberación de proteína fue evaluado *in vitro* a 37 °C en disolución salina isotónica al 0.9% y ajustado a un modelo Peppas-Sahlin, lo cual reveló que las partículas de PLGA modulan la liberación de bLf principalmente mediante difusión no fickiana. Estos resultados muestran a la técnica de electrorrociado de disoluciones no emulsificadas como apropiada para producir micropartículas poliméricas monodispersas cargadas con proteína que presentan liberación prolongada. Estos acarreadores de bLf puede potencialmente otorgar protección duradera contra condiciones fisiológicas desnaturalizantes y eliminación por parte de células inmunes, justificando así la realización de estudios con cultivos celulares y modelos animales.

6.2 Contexto

En las áreas farmacéutica y de biomedicina, los materiales micro- y nanoestructurados han sido útiles para desarrollar sistemas de transporte y protección de medicamentos, péptidos, antígenos e incluso células, con el objetivo de mantener su actividad terapéutica y viabilidad y reducir las tasas de degradación o metabolización antes de que el agente terapéutico llegue a su diana terapéutica o sitio de acción. Entre los factores limitantes para la actividad de algunos agentes bioactivos se encuentran la baja estabilidad en el ambiente de administración; la existencia de barreras que dificultan la absorción, como la mucosa gastrointestinal (Ensign et al., 2012) y la barrera hematoencefálica (Abbott, 2013); y la baja solubilidad o biodisponibilidad en el ambiente fisiológico. Por lo tanto, es esencial incluir en el diseño de agentes terapéuticos no sólo el sitio de acción, sino también la forma de administración y transporte, para tener mayor control sobre el comportamiento farmacocinético.

Ante este reto, las estructuras poliméricas representan una plataforma versátil para la encapsulación, protección y liberación controladas, dado que pueden adquirir diferentes morfologías debido a sus propiedades macromoleculares físicas y químicas, sus capacidades de autoensamblaje y, de manera importante, la gran variedad de técnicas para su preparación. La naturaleza química y el tamaño molecular de la especie encapsulada determinará el procedimiento de formulación y el polímero a utilizar. Algunos ejemplos de morfologías poliméricas usadas para el transporte molecular, diseñadas según las necesidades específicas de la aplicación o vía de administración, son los hidrogeles (Fang et al., 2018), las micelas (Rösler et al., 2001), los complejos polímero-fármaco (Lakkakula & Maçedo Krause, 2014), las mallas fibrilares (Rodríguez-Zamora et al., 2019; Torres-Martinez et al., 2019) y los polímeros injertados tipo peine (Flores-Rojas et al., 2020; Nalam et al., 2017).

En particular, las cápsulas o partículas poliméricas pueden alcanzar tamaños micro- y nanométricos según la técnica de procesamiento elegida (Rao & Geckeler, 2011), permitiéndoles así evadir algunas de las barreras físicas y fisiológicas presentes dentro del huésped, alcanzar su diana y aumentar la captación celular del agente bioactivo. En muchos métodos para la fabricación de partículas cargadas con medicamentos, es necesaria la solubilidad del fármaco en el medio polimérico, lo cual impone limitantes a la aplicabilidad de estas estrategias, como es el caso de técnicas muy usadas, por ejemplo, la emulsión-evaporación y la nanoprecipitación. Por el contrario, existen otros métodos que no requieren la disolución del fármaco y que logran la encapsulación de moléculas en suspensión.

Uno de estos métodos es el electrorrociado, también conocido como rociado electrohidrodinámico, el cual se deriva del electrohilado, una técnica de gran interés en aplicaciones biomédicas (Rodríguez-Zamora et al., 2019; Villarreal-Gómez et al., 2016), dado que tiene una larga historia en la producción de micro- y nanoestructuras, así como mallas fibrilares cargadas con fármacos (Torres-Martínez et al., 2019; Tucker et al., 2012). En esta técnica, se aplica un alto campo eléctrico (entre 1 y 2 kV cm⁻¹) sobre una disolución de polímero que se extruye a través de un capilar metálico conectado a una fuente de voltaje. Cuando una gota de la disolución crece en la punta del capilar, el campo eléctrico superficial genera una gran cantidad de cargas libres que se repelen mutuamente, lo cual sobrepasa la tensión superficial y la elasticidad fluídica de la disolución y deforma la gota hasta que toma una forma cónica, conocida como el cono de Taylor. Si la repulsión superficial aumenta más allá de un umbral determinado, un chorro de disolución emerge del cono y viaja hacia un colector, es decir, una superficie conductora conectada a tierra física. Debido a la alta tasa de deformación, la viscosidad de la disolución y la evaporación del disolvente, el chorro se adelgaza, se estira e incluso se fracciona en gotículas (como es el caso del electrorrociado) mientras viaja del capilar al colector, donde se depositan las partículas poliméricas (**Figura 6.1**). La viscosidad de la disolución, la presión de vapor y la constante eléctrica del disolvente, así como el voltaje aplicado, la distancia entre el inyector y el colector y la humedad y temperatura ambientales, son todos algunos de los parámetros clave para la producción de partículas electrorrociadas con morfologías uniformes y distribución de tamaños regulares.

Para fabricar partículas cargadas con fármacos macromoleculares, como algunos péptidos y proteínas, muchos de los cuales son hidrosolubles, el electrorrociado de medios bifásicos ha sido el método más usado. Por ejemplo, el electrorrociado de emulsiones de aceite en agua con tensoactivos añadidos se ha empleado para producir partículas de un polímero hidrofóbico con pequeños compartimientos de la fase acuosa que encapsulan a la proteína (Xie & Wang, 2007). Por otra parte, el electrorrociado coaxial, el cual requiere de la inyección simultánea de dos disoluciones separadas a través de capilares coaxiales, ha sido usado para producir partículas con un núcleo hidrofílico cargado con el fármaco y una coraza de un polímero hidrofóbico (Lee et al., 2010; Wang et al., 2013). No obstante, el electrorrociado sin emulsiones de suspensiones de proteínas no se ha explotado y caracterizado completamente, aun cuando representa una opción adicional para la formulación de partículas poliméricas con proteína encapsulada.

En el estudio reportado en este capítulo, se seleccionó el PLGA como polímero encapsulante debido a su uso extenso en la producción de partículas biodegradables cargadas con fármacos (Han et al., 2016; Lee et al., 2010; Xie & Wang, 2007). El PLGA es un copolímero sintético con unidades de ácido láctico y glicólico, los cuales son ambos metabolitos celulares endógenos y pueden ser desechados mediante las rutas metabólicas propias de la célula. El interés en este polímero radica en su biocompatibilidad y baja toxicidad e inmunogenicidad. Además, su cinética de degradación está muy bien definida y controlada; por ejemplo, su tasa de degradación puede ajustarse modificando la relación ácido láctico-ácido glicólico y el peso molecular (Park, 1995). La degradación de PLGA ocurre mediante la hidrólisis de sus enlaces éster catalizada ya sea por moléculas de agua circundantes o por los extremos propios de las cadenas poliméricas cuando éstos contienen

grupos carboxílicos (Houchin & Topp, 2008). La hidrólisis genera oligómeros de PLGA y eventualmente moléculas libres de ácido láctico y glicólico. Estas propiedades hacen del PLGA un excelente candidato para aplicaciones de liberación de fármacos.

En este estudio, se utilizó el PLGA para encapsular lactoferrina, una proteína de mamífero presente en varios fluidos corporales que generó interés en aplicaciones nutraceuticas. La lactoferrina es una glucoproteína globular catiónica de la familia de las transferrinas con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa que consiste en una sola cadena polipeptídica. Se emplea de manera extensa en el campo farmacéutico, ya que ejerce una actividad de defensa primaria de amplio espectro contra bacterias, hongos, protozoarios y virus (Jenssen & Hancock, 2009). La alta afinidad de la lactoferrina a los iones hierro es la causante de sus efectos antimicrobianos y bacteriostáticos, dado que esta propiedad hace a la lactoferrina capaz de secuestrar iones férricos (un nutriente esencial para las bacterias) de la superficie bacteriana, inhibiendo de esta manera el crecimiento microbiano. En particular, la lactoferrina bovina (bLf) se ha estudiado también como un modulador de la diferenciación celular (Perdijk et al., 2018) y un regulador inmunológico (Peña-Juárez et al., 2016), haciéndola de gran interés en el Desarrollo de terapias preventivas y nutraceuticos.

El objetivo de este estudio es producir y caracterizar micropartículas de PLGA mediante electrorrociado de disoluciones no emulsificadas para la encapsulación de bLf, propiciando de esta forma el desarrollo de sistemas que optimicen la administración dirigida de agentes bioactivos. Para este fin, se eligió la bLf como proteína modelo, no sólo por su estabilidad térmica relativamente alta en un intervalo amplio de pH (Sreedhara et al., 2010), sino también por la gran diversidad de sus aplicaciones biomédicas. Debido a la alta estabilidad de la bLf en niveles de pH relativamente bajos, el PLGA se conserva como un polímero prometedor para la encapsulación a pesar del microambiente ácido generado en el bulto de partículas de PLGA durante la degradación del polímero (Houchin & Topp, 2008). Las micropartículas obtenidas fueron caracterizadas para determinar su tamaño, estabilidad térmica y la presencia de proteína encapsulada en las estructuras de PLGA. Se llevaron a cabo estudios de liberación *in vitro* en condiciones isotónicas a 37 °C para determinar el perfil de liberación de bLf a lo largo del tiempo y se ajustaron modelos matemáticos para esclarecer los posibles mecanismos de liberación en juego. Puesto que se produjeron partículas electrorrociadas con una cinética de liberación apropiada a partir de una disolución hidrofóbica de PLGA en la que bLf fue suspendida (no disuelta), estos resultados sugieren que las disoluciones poliméricas no emulsificadas con agentes macromoleculares suspendidos representan una estrategia viable para la formulación de acarreadores poliméricos electrorrociados cargados con fármacos que presentan perfiles de liberación controlada.

6.3 Materiales y métodos

6.3.1 Materiales

El ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA, Resomer® RG 504 H; proporción ácido láctico:glicólico 50:50, grupos terminales ácidos; peso molecular = 38-54 kDa), la lactoferrina bovina (bLf; peso molecular = 80 kDa), acetonitrilo (ACN), N,N-

dimetilformamida (DMF) y cloruro de sodio fueron todos de grado reactivo, obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) y usados sin tratamientos previos.

6.3.2 Electrorrociado de micropartículas de PLGA y PLGA/bLf

El electrorrociado se llevó a cabo usando una fuente de voltaje (Spellman High Voltage Electronics, Hauppauge, NY, EUA), una bomba de jeringa programable NE-1000 (New Era Pump Systems, Farmingdale, NY, EUA) y una placa colectora de aluminio de 8 × 8 cm conectada a tierra física. Se preparó una disolución de PLGA al 6% p/v en una mezcla de disolventes con DMF:ACN en razón 1:3 y se mezcló por 1 h a 180 rpm. Para producir partículas cargadas con bLf, bLf se añadió a una disolución similar de PLGA para una concentración final de bLf de 1.6% p/v y se agitó nuevamente por 20 min hasta obtener una suspensión bien dispersa ligeramente turbia. Para preparar partículas de PLGA se electrorroció la disolución de PLGA, mientras que para preparar partículas de PLGA/bLf se electrorroció la suspensión de PLGA/bLf. Las disoluciones de PLGA o de PLGA/bLf fueron inyectadas a través de una aguja de acero inoxidable de calibre 22 G con punta roma con un flujo de inyección de 1.5 mL h⁻¹. Durante el proceso de electrorrociado de PLGA/bLf, la suspensión se agitó de nuevo al menos cada 30 min para prevenir la sedimentación de bLf. Se aplicó una diferencia de potencial de 15 kV entre la aguja (el hilador) y la placa colectora, colocada a 14 cm del hilador, generando un arreglo de recolección horizontal.

6.3.3 Caracterización morfológica

Se evaluó la morfología de las micropartículas de PLGA y PLGA/bLf depositadas por microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM). Las micrografías de FESEM se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo tipo Schottky JSM-7800F (JEOL, Tokyo, Japón) con un voltaje de aceleración de 10 kV y una máxima amplificación de 5000x. Previo al análisis por FESEM, las muestras de micropartículas recién recolectadas se dejaron secar al aire hasta tener un peso constante, se fijaron sobre portamuestras con cinta de carbono eléctricamente conductora y se recubrieron con una capa delgada de oro mediante pulverización catódica al vacío, también conocido como *sputtering*.

6.3.4 Caracterización del tamaño de partícula

Se evaluó la distribución del tamaño de partícula de las micropartículas electrorrociadas de PLGA y PLGA/bLf mediante análisis por dispersión dinámica de luz (DLS), el cual se realizó en un analizador Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Las partículas de PLGA/bLf recién depositadas se dejaron secar al aire hasta alcanzar peso constante, se suspendieron en agua desionizada y se sonicaron durante 1 min para disgregar los aglomerados formados por interacciones entre partículas. Se tomaron las mediciones por triplicado en celdas capilares desechables a 25 °C usando los siguientes parámetros: viscosidad del dispersante de 0.8872 cP, índice de refracción del dispersante de 1.33, absorción del material de 0.89 e índice de refracción del material de 1.33 (Huang & Zhang, 2018). Los datos de DLS fueron recolectados en el intervalo de tamaño de partícula de 0.4–10000 nm con el software DTS Dispersion Technology Software 5.10 (Malvern

Instruments) y procesados en el software Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

6.3.5 Caracterización espectroscópica por ATR-FTIR

Se evaluó el contenido químico de las micropartículas de PLGA y PLGA/bLf usando espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). Los espectros ATR-FTIR fueron recolectados con un espectrómetro Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) acoplado con un accesorio ATR de diamante Smart Orbit, con una adquisición de un promedio de 64 barridos con resolución de 1 cm^{-1} en el intervalo del infrarrojo cercano ($400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$). Todos los datos de FTIR fueron procesados en el software OMNIC 9 (Thermo Fisher Scientific).

6.3.6 Caracterización térmica por TGA y DSC

Se realizaron análisis térmicos de las micropartículas de PLGA y PLGA/bLf mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). El análisis de TGA se realizó para verificar la estabilidad y degradación térmica y la variación de masa al aumentar la temperatura, usando un analizador TGA Q50 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Cada muestra de 6.2 mg fue calentada a 10 °C min^{-1} de 21 °C hasta 800 °C sobre un portamuestra de platino bajo atmósfera de nitrógeno con un flujo de 50 mL min^{-1} .

El análisis de DSC se realizó en un calorímetro DSC 2010 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Para preparar las muestras, se colocaron partículas electrorrociadas de PLGA con y sin carga de bLf en portamuestras de aluminio; en ambos casos el peso de cada muestra fue de 6.2 mg. Un primer barrido de calentamiento se realizó de 10 a 150 °C con una velocidad de calentamiento de 5 °C min^{-1} para evaporar las trazas de disolventes y borrar el historial térmico del material. El segundo barrido se realizó de 10 a 250 °C con una velocidad de calentamiento de 5 °C min^{-1} . Todos los análisis se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno.

6.3.7 Ensayo de liberación de bLf *in vitro*

Las micropartículas electrorrociadas cargadas con proteína fueron analizadas *in vitro* en condiciones fisiológicas simuladas. Las muestras de micropartículas con y sin carga de bLf (300 mg cada una) se colocaron en viales con 5 mL de disolución isotónica de cloruro de sodio al 0.9%. Durante el monitoreo de la liberación, las suspensiones se mantuvieron a 37 °C con agitación constante a 300 rpm. La cantidad de proteína liberada fue monitoreada tomando alícuotas a diferentes intervalos y midiendo sus valores de absorbancia a 272 nm por espectroscopía de absorción electrónica en la región ultravioleta-visible (UV-vis) en un espectrofotómetro Specord 200 Plus (Analytik Jena, Alemania). El volumen tomado para cada alícuota se reemplazó con nueva disolución de cloruro de sodio para mantener el mismo volumen total del medio de liberación. Se tomaron las micropartículas de PLGA sin carga en disolución de cloruro de sodio con concentración 0.9% p/v como control negativo y fueron monitoreadas en los mismos intervalos. El ensayo de liberación se realizó por triplicado.

6.3.8 Análisis estadístico y ajuste de modelos

Los datos de liberación de bLf fueron procesados para obtener las medias y los errores estándar, analizados por regresión no lineal con el software Prism 8 (GraphPad Software) y ajustados a los modelos Higuchi, de primer orden, Korsmeyer-Peppas y Peppas-Sahlin, los cuales fueron posteriormente comparados entre sí para identificar el modelo que se ajusta de mejor manera a los datos experimentales. Aunque un valor mínimo de la suma residual de cuadrados (RSS) puede usarse como criterio de selección para el modelo con mejor ajuste, la existencia de un alto número de parámetros en las ecuaciones de los modelos puede generar una alta probabilidad de obtener menores valores de RSS (Serra et al., 2006). Dado que en los modelos aquí elegidos el número de parámetros es entre uno y tres, se consideró en su lugar el criterio de información de Akaike (AIC), puesto que es independiente del número de parámetros en el modelo. El AIC está definido como:

$$AIC = N(\ln RSS) + 2p \quad \text{(Ecuación 6.1)}$$

donde N es el tamaño de la muestra y p es el número de parámetros en el modelo. Estadísticamente el modelo con el menor valor del AIC describe mejor los datos experimentales (Serra et al., 2006; Yamaoka et al., 1978).

Sin embargo, cuando el valor de N no es alto respecto a p , se recomienda aplicar el AIC de segundo orden (AIC_C), el cual corrige el sesgo que aparece debido a menores tamaños de la muestra, es decir, cuando $N/p < 40$ (Burnham & Anderson, 2002), y está definido como:

$$AIC_C = AIC + \frac{2p(p+1)}{N-p-1} \quad \text{(Ecuación 6.2)}$$

Por tanto, el AIC_C fue elegido como el criterio discriminatorio para los modelos evaluados para explicar los datos experimentales de liberación.

6.4 Resultados y discusión

6.4.1 Morfología de las micropartículas electrorrociadas de PLGA y PLGA/bLf

Se obtuvieron micrografías de FESEM de las partículas de PLGA y PLGA/bLf para determinar si su morfología es apropiada para aplicarse como acarreador de fármacos, en otras palabras, si las partículas tienen carácter esferoide y no están conectadas por fibras. Se observó que las partículas electrorrociadas de PLGA y PLGA/bLf mostraron morfologías redondas u ovaladas, algunas con regiones planas y todas con superficies lisas (**Figura 6.2**).

Aunque en el electrorrociado es común encontrar partículas conectadas por fibras delgadas dependiendo de los parámetros de la disolución y del proceso de rociado, se encontraron muy pocas o ninguna fibra de este tipo en los sistemas de PLGA y PLGA/bLf (**Figura 6.2**), lo que sugiere que los parámetros de viscosidad de disolución, voltaje aplicado y distancia hilador-colector resultaron en partículas con morfología apropiada.

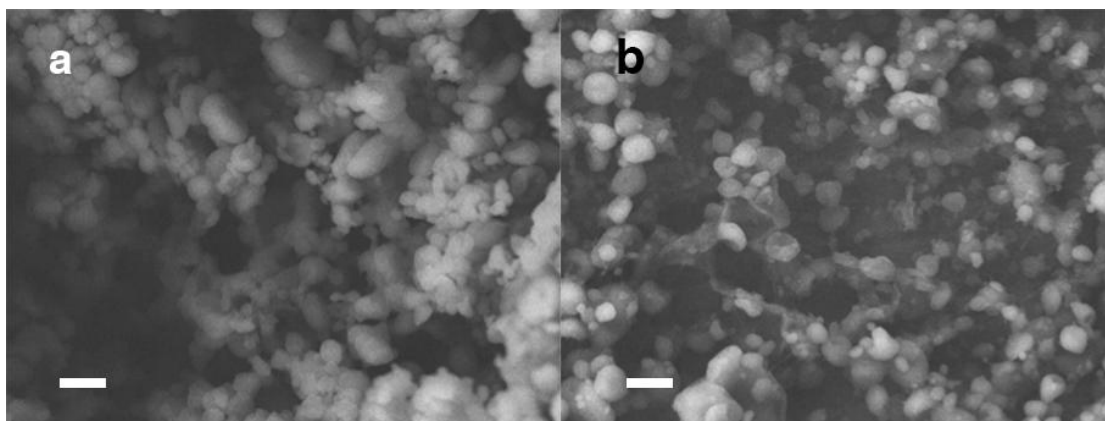


Figura 6.2 Micrografías representativas de FESEM de micropartículas de a) PLGA y b) PLGA/bLf. Barras de escala: 2 μm . Voltaje de aceleración: 10.0 kV. Distancia de trabajo: 8.6 mm.

6.4.2 Determinación del tamaño de partícula por DLS

Se analizaron las partículas electrorrociadas de PLGA/bLf a una concentración de 1% en agua desionizada mediante DLS para determinar la distribución del tamaño de partícula. Los espectros adquiridos por triplicado mostraron la presencia de una distribución bimodal en el diámetro hidrodinámico de las partículas de PLGA/bLf (**Figura 6.3**). Por esta razón, el tamaño de partícula Z-promedio y el índice de polidispersidad (PDI), con valores de 2674 nm y PDI >1 respectivamente, como los calculó el software DTS, no fueron considerados como representativos de las muestras, principalmente debido a la distribución bimodal observada. Por lo tanto, para analizar los datos de DLS de una manera válida en el contexto de este estudio, cada señal fue analizada por separado para determinar su diámetro promedio ponderado por volumen y su PDI asociado. El PDI fue calculado independientemente para cada señal usando la definición:

$$PDI = (\sigma/\bar{x})^2 \quad \text{(Ecuación 6.3)}$$

donde \bar{x} es la media y σ es la desviación estándar (SD) (Bhattacharjee, 2016). Usando el diámetro promedio ponderado por volumen, se calcularon los diámetros hidrodinámicos (media \pm SD) y los valores de PDI tanto para la población completa como para cada señal, como se muestra en la **Figura 6.3**. De manera similar al tamaño Z-promedio calculado por el software DTS, el promedio ponderado por volumen obtenido de toda la población resultó en un PDI > 1, confirmando así la necesidad del análisis considerando cada señal independientemente. Sólo cuando las dos señales se consideran por separado es que se pueden observar como altamente monodispersos, como lo indican los valores pequeños de sus PDIs asociados (**Figura 6.3**). Con respecto a las observaciones de FESEM (**Figura 6.2**), el análisis de DLS reveló que el tamaño de algunas partículas electrorrociadas aumentó considerablemente. Esto se atribuye a que se obtuvieron las imágenes de partículas secas y en vacío, mientras que el análisis de DLS se llevó a cabo en medio acuoso, permitiendo que las partículas se hinchen.

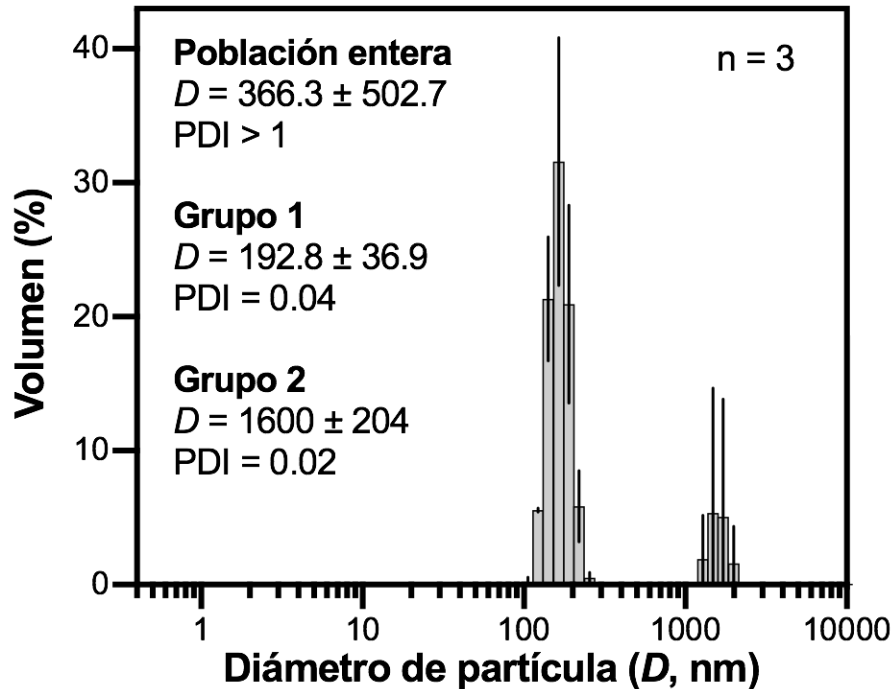


Figura 6.3 Distribución bimodal de los diámetros hidrodinámicos de las partículas de PLGA/bLf, determinada por DLS. Se muestran los diámetros hidrodinámicos promedio ponderados por volumen (D ; media \pm desviación estándar) y los índices de polidispersidad (PDI), calculados para la población completa y por separado para cada señal.

Para el grupo de la población que ocupa la mayoría del volumen de la muestra (**Figura 6.3, Grupo 1**), se observó que el tamaño de partícula cae en el intervalo de 105–255 nm con un PDI asociado de 0.04. Este valor está en conformidad con el criterio usado de manera extensa de que las partículas con $PDI < 0.1$ se consideran altamente monodispersas (Bhattacharjee, 2016), indicando así la capacidad del electrorociado de disoluciones no emulsificadas para producir micropartículas altamente monodispersas. La observación de partículas de mayor tamaño en la distribución de DLS en el intervalo de 1281–1990 nm (**Figura 6.3, Grupo 2**) puede asociarse al hinchamiento del polímero y a la formación de partículas más grandes o agregados, ya sea durante el electrorociado o la suspensión debido a interacciones electrostáticas entre partículas. Además, al considerar cada grupo por separado, el análisis indicó que el Grupo 1 (con menor tamaño de partícula) tiene un volumen total alrededor de dos veces mayor que el Grupo 2 (con mayor tamaño de partícula), lo cual sugiere que el grado de aglomeración de partículas debe ser bajo (**Figura 6.3**).

6.4.3 Caracterización espectroscópica por ATR-FTIR

Se llevó a cabo un análisis por ATR-FTIR para observar las señales de absorción de las micropartículas de PLGA cargadas con bLf (**Figura 6.4**). Para el PLGA sin tratamiento previo, se observan vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico de enlaces C–H, una señal intensa característica del estiramiento de grupos C=O, una señal triple de estiramiento

de C–O en la cadena principal de PLGA, así como una señal triple atribuida a la deformación de C=O (Tabla 6.1).

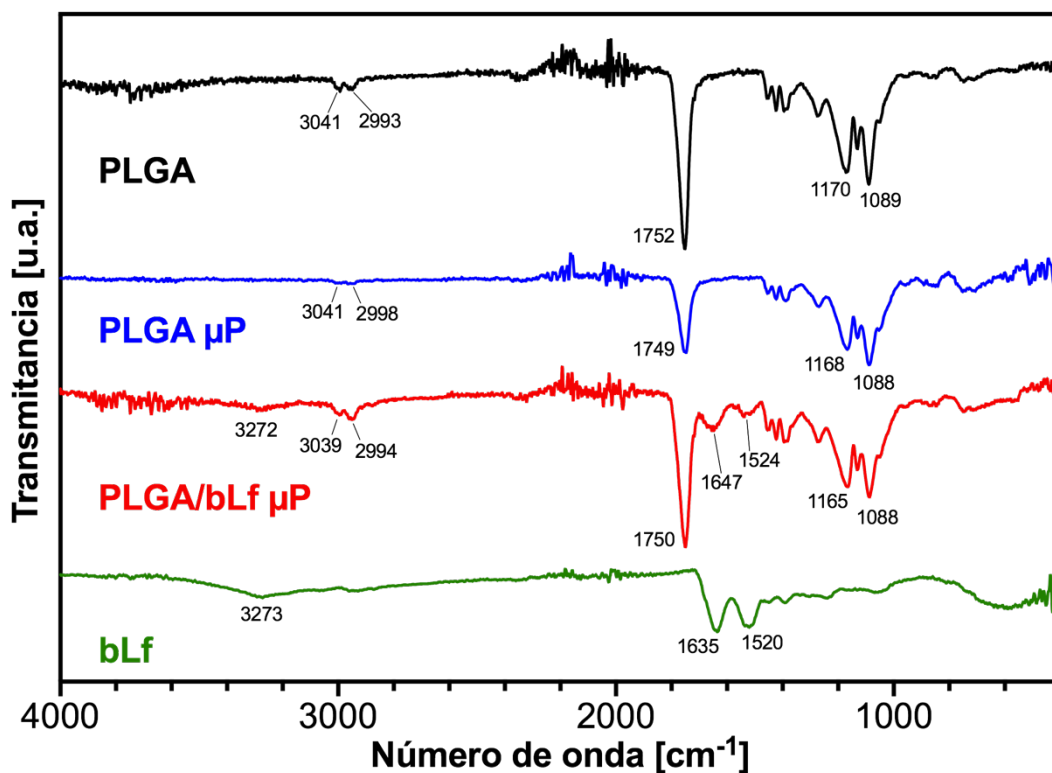


Figura 6.4 Espectros ATR-FTIR de micropartículas (μP) de PLGA y PLGA/bLf, así como de PLGA y bLf sin tratamiento previo. Las partículas cargadas presentan señales de absorción atribuidas a PLGA y bLf, lo cual evidencia la encapsulación de lactoferrina.

Tabla 6.1 Asignación de señales de absorción en los espectros ATR-FTIR de micropartículas de PLGA y PLGA/bLf, así como PLGA y bLf sin tratamiento previo.

Muestra	Ubicación de señal [cm^{-1}]	Tipo de vibración	Grupo funcional (Referencia)
PLGA	3041	Estiramiento C–H simétrico	Alcano
PLGA	2993	Estiramiento C–H asimétrico	Alcano
PLGA	1752 (intenso)	Estiramiento C=O	Éster
PLGA	1455, 1423, 1394	Deformación C=O	Éster
PLGA	1089, 1131, 1170	Estiramiento CO–O	Éster
PLGA	1053 (hombro)	Deformación C–O	Éster
bLf	3273 (amplio)	Estiramiento N–H	Amida A; amina secundaria (Krimm & Bandekar, 1986)
bLf	1635	Estiramiento C=O y C–N	Amida I (Krimm & Bandekar, 1986)
bLf	1520	Deformación N–H en el plano; estiramiento C–N	Amida II (Krimm & Bandekar, 1986)
bLf	1239 (débil)	Deformación N–H en el plano; estiramiento C–C	Amida III (Krimm & Bandekar, 1986)
bLf	1069 (débil)	Estiramiento N–C	Aminoácido (Krimm & Bandekar, 1986)

Por su parte, la bLf muestra una señal amplia para el estiramiento de N–H asociado a la amina A, así como señales asociadas a las amidas I, II y III y una señal débil debido al estiramiento de N–C (**Tabla 6.1**) (Krimm & Bandekar, 1986). Como se anticipaba, el sistema electrorrociado de polímero-proteína (PLGA/bLf μ P) presenta un espectro que combina todas las frecuencias vibracionales de los espectros individuales de PLGA y bLf (**Figura 6.4**). En este sistema polímero-proteína, se confirma la presencia de ambos componentes debido más evidentemente a la observación de la señal característica de estiramiento del grupo carbonilo del PLGA en 1750 cm^{-1} , junto con las señales de amida I y II en 1647 y 1524 cm^{-1} de la lactoferrina encapsulada exitosamente. Estas señales no mostraron corrimientos considerables en sus frecuencias con respecto a los materiales sin tratamiento previo, indicando de esta manera que sólo ocurrieron cambios menores.

6.4.4 Caracterización térmica de las micropartículas electrorrociadas de PLGA y PLGA/bLf

Se estudiaron las muestras electrorrociadas de PLGA y PLGA/bLf mediante TGA con una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ bajo atmósfera de nitrógeno. Los resultados sugieren que ambas composiciones tienen una estabilidad térmica similar. Las micropartículas de PLGA sin carga de proteína presentan una temperatura de descomposición de $330\text{ }^{\circ}\text{C}$, una pérdida de peso del 10% a $272\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un peso residuo del 7.7% a $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Figura 6.5**). En cuanto a las micropartículas cargadas con bLf, la temperatura para alcanzar una pérdida de peso del 10% es la misma; sin embargo, la temperatura de descomposición fue $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ menor, dado que la proteína se degrada a una temperatura menor que el PLGA.

Se observa una pérdida inicial de peso de aproximadamente 3% en el intervalo de 60 a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ para las partículas de PLGA y de PLGA/bLf, lo cual puede atribuirse a la evaporación de disolvente residual (**Figura 6.5**). Por esta razón, el primer barrido de calentamiento en el análisis de DSC se estableció con una temperatura máxima de $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ para asegurar una evaporación completa de trazas de disolvente en las partículas y borrar la historia térmica del material. Por último, el peso residual en el TGA fue menor (3.7%) para las partículas de PLGA/bLf que para las de PLGA. Esto indica que la proteína contribuye alrededor de 4% al total del residuo del sistema polímero/proteína. Cabe mencionar que se analizaron muestras de micropartículas cargadas y no cargadas con pesos similares para obtener termogramas comparables.

Adicionalmente se llevó a cabo un análisis de DSC para determinar si la carga de bLf tiene un efecto en las propiedades térmicas de las partículas de PLGA, como cambios en la temperatura de transición vítrea (T_g). El estudio de los cambios en las propiedades térmicas es de gran importancia, ya que tienen un gran impacto en las propiedades mecánicas y el proceso de erosión de la matriz polimérica y éstos a su vez, en la tasa de liberación de partículas cargadas con fármacos (Alexis, 2005). El primer barrido de calentamiento se realizó a una velocidad de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ para eliminar disolventes residuales y borrar la historia térmica del polímero. El segundo barrido de las partículas con y sin carga se muestra en la **Figura 6.6** y se realizó de 25 a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una velocidad de calentamiento de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

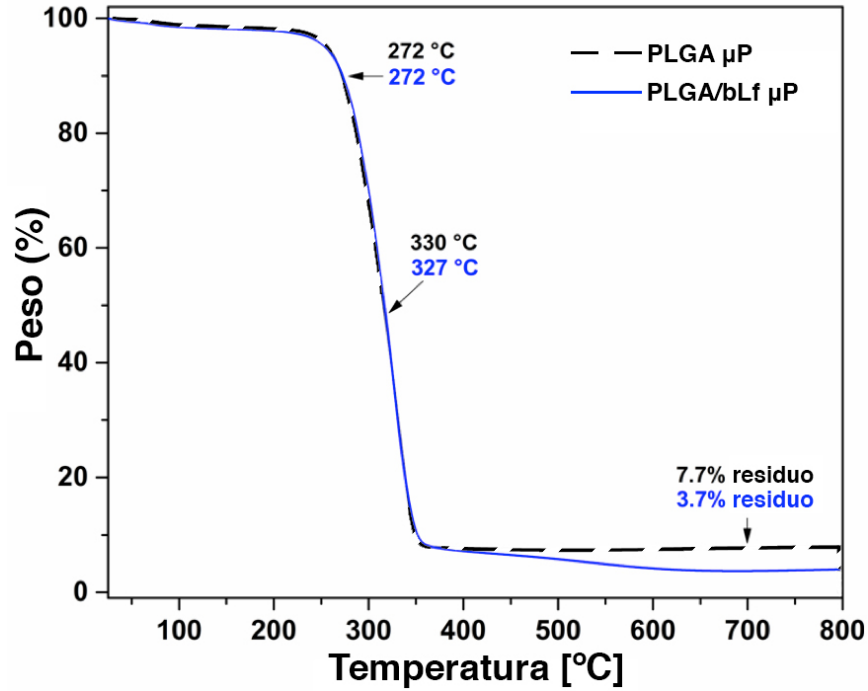


Figura 6.5 Termograma TGA de las micropartículas (μ P) electrorrociadas de PLGA y PLGA/bLf bajo atmósfera de nitrógeno, mostrando la temperatura con el 10% de pérdida de peso, la temperatura de descomposición y el porcentaje de peso residuo a 700 °C.

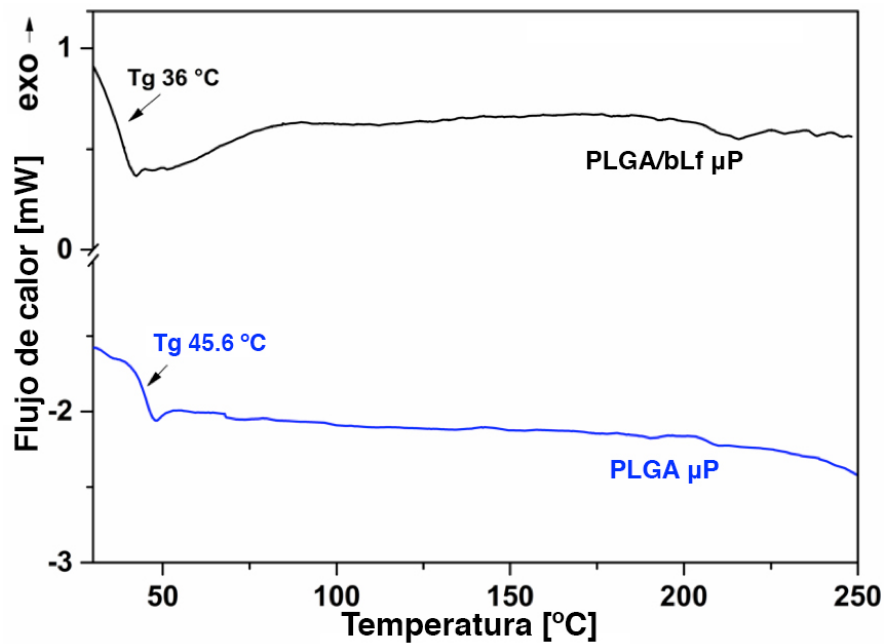


Figura 6.6 Curvas de DSC de las micropartículas (μ P) electrorrociadas de PLGA (sin carga) y de PLGA/bLf (cargadas) bajo atmósfera de nitrógeno, mostrando la temperatura de transición vítrea (Tg).

Las micropartículas de PLGA sin carga proteica muestran una Tg de 45.6 °C, lo cual es consistente con lo reportado en otros estudios (Eliaz & Kost, 2000). Por otra parte, las micropartículas cargadas con proteína presentaron un valor de Tg más bajo de 36 °C (**Figura 6.6**), indicando que la presencia de bLf redujo la Tg de las partículas de PLGA. En este sistema, la bLf actúa como un agente plastificante sobre el PLG, facilitando cambios en la conformación y la relajación de las cadenas poliméricas. Este efecto plastificante y su reducción asociada en la Tg han sido previamente reportados también en mezclas físicas de PLGA con fármacos (Blasi et al., 2007; Eliaz & Kost, 2000), principalmente debido a que pueden desestabilizar las interacciones moleculares dentro de o entre los dominios cristalinos del polímero, permitiendo el deslizamiento de cadenas en mayor grado. Además, dado que las partículas de PLGA/bLf tienen una Tg ligeramente menor que la temperatura fisiológica normal del cuerpo humano (36.5–37 °C), las cadenas de PLGA relajarán su estado rígido al ser implantadas *in vivo*, presentando una estructura más fácilmente deformable que permita una mayor tasa de liberación de la bLf. En realidad, con el simple acto de mezclar bLf y PLGA, las cadenas poliméricas comienzan a experimentar esta relajación desde los 26 °C, mientras que para las partículas de PLGA sin carga, la relajación ocurre sólo por encima de los 35 °C. Este resultado enfatiza la importancia de realizar estudios de cinética de liberación simulando la temperatura fisiológica del cuerpo humano, especialmente cuando se trabaja con sistemas basados en PLGA, en los cuales la Tg y la temperatura a la que comienza la relajación de las cadenas poliméricas están tan cercanas a la temperatura fisiológica.

6.4.5 Liberación acumulada *in vitro* y cinética de liberación de bLf

Se estudió el perfil de liberación de las micropartículas electrorrociadas de PLGA/bLf *in vitro* en condiciones fisiológicas simuladas. En este ensayo se eligió una disolución de cloruro de sodio al 0.9% como medio de liberación, puesto que su absorción en el espectro de absorción electrónica en la región UV-vis no interfiere con la señal principal de la bLf, la cual tiene un máximo de absorción en 272 nm. El perfil de liberación de las micropartículas cargadas es evidencia de una encapsulación exitosa de la bLf en el PLGA (**Figura 6.7**). Para el sistema PLGA/bLf, no se observa una liberación abrupta al inicio, la cual en cambio puede encontrarse en sistemas donde el fármaco está adsorbido en la superficie del acarreador. Por el contrario, la liberación de bLf fue gradual y controlada, evidenciando la presencia de bLf en el núcleo de la partícula, lo cual permite que la liberación ocurra debido al hinchamiento lento, la erosión y degradación del PLGA.

Las micropartículas de PLGA/bLf muestran una liberación prolongada de proteína en el transcurso de 8 h (**Figura 6.7**). Este perfil de liberación sugiere que el PLGA puede representar un agente protector adecuado para la lactoferrina, dado que el PLGA podría proteger su carga de condiciones fisiológicas degradantes por periodos más largos y mayor cantidad de proteína podría llegar a su diana con efectos farmacológicos. Posterior al análisis estadístico de los resultados de liberación y con el objetivo de dilucidar los mecanismos de liberación de proteína de las partículas electrorrociadas, se aplicaron sobre los datos experimentales los siguientes modelos matemáticos de liberación de fármaco: Higuchi, de primer orden, Korsmeyer-Peppas y Peppas-Sahlin; y se compararon para encontrar el mejor ajuste. Los parámetros estimados para cada modelo se muestran en la **Tabla 6.2**. Cabe

mencionar que estos modelos matemáticos sólo son válidos durante el primer 60% de la liberación (Peppas & Sahlin, 1989; Ritger & Peppas, 1987).

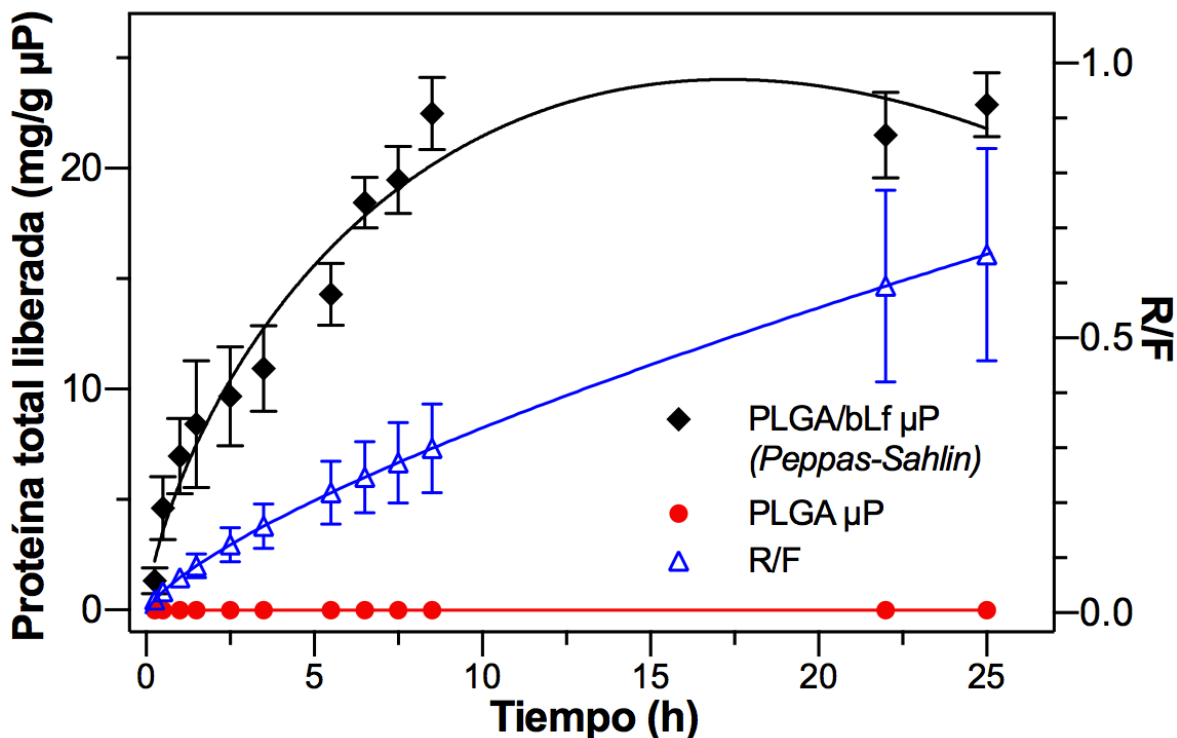


Figura 6.7 Liberación total *in vitro*, en mg de proteína por gramo de partículas, de las micropartículas (μP) electrorrociadas de PLGA/bLf a 37 °C en disolución salina isotónica (\blacklozenge ; $n = 3$), ajustada a una ecuación Peppas-Sahlin, el modelo con el menor valor de AIC_C tomado como criterio de discriminación. Se muestra también el control de partículas de PLGA sin carga (\bullet) y la razón de liberación por relajación a liberación por difusión fickiana (R/F) estimada a partir de los parámetros del modelo de Peppas-Sahlin (\blacktriangle ; **Ecuación 6.5**).

Tabla 6.2 Parámetros estimados y valores de R^2 y AIC_C obtenidos del ajuste de diferentes modelos de cinética de liberación a los datos experimentales del sistema PLGA/bLf.

Modelo	Parámetro [unidades]	Valor	SE	R^2	AIC_C
Higuchi	k_H [h^{-1}]	1.250	0.124	-0.1222	151.4
Primer orden	a	22.62	0.850	0.9145	61.08
	b [h^{-1}]	0.2462	0.0249		
Korsmeyer-Peppas	k_l [h^{-n}]	7.822	0.650	0.8365	84.43
	n	0.3634	0.0337		
Peppas-Sahlin	k_1 [h^{-m}]	6.126	0.619	0.9263	58.28
	k_2 [h^{-2m}]	-0.3905	0.0880		
	m	0.7224	0.0515		

SE: error estándar

AIC_C : criterio de información de Akaike de segundo orden

Utilizando el criterio del menor valor del AIC_c, se determinó que el perfil de liberación experimental se ajusta mejor al modelo Peppas-Sahlin (Peppas & Sahlin, 1989), el cual se define como:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \quad \text{(Ecuación 6.4)}$$

donde M_t/M_∞ es la fracción del fármaco liberado, t es el tiempo de liberación, k_1 es la constante de difusión, k_2 es la constante de relajación y m es el coeficiente de difusión puramente fickiana para un dispositivo de cualquier geometría. En este modelo, la difusión y la relajación de cadenas poliméricas son considerados como componentes aditivos: mientras que existe un componente asociado a la difusión siguiendo la ley de Fick (llamada también difusión fickiana), también contribuyen los procesos de relajación y erosión que modulan la liberación de la matriz de cadenas de PLGA. Dado que la contribución del mecanismo de difusión fickiana (k_1) es mayor que la del mecanismo de relajación de cadenas poliméricas (k_2), se puede concluir que la liberación en este sistema es de carácter fickiano predominantemente, como lo indica la razón de la contribución relajacional (R) a la fickiana (F) (Peppas & Sahlin, 1989), la cual puede estimarse en un modelo Peppas-Sahlin usando la siguiente ecuación:

$$\frac{R}{F} = \frac{k_2}{k_1} t^m \quad \text{(Ecuación 6.5)}$$

Como se observa en la **Figura 6.7**, la liberación en el sistema PLGA/bLf está asociada principalmente a la difusión de la matriz polimérica durante el primer 60% de la liberación. Además, el coeficiente de difusión estimado (m), que describe el componente puramente fickiano de la difusión, indica que la liberación de bLf en las partículas de PLGA ocurre mediante transporte anómalo (Peppas & Sahlin, 1989). En resumen, estos resultados indican que la liberación en el sistema de micropartículas de PLGA/bLf ocurre principalmente mediante difusión, la cual involucra la permeación de agua en la matriz polimérica en lugar de involucrar la degradación o relajación del polímero, lo cual está en concordancia con otros reportes previos sobre partículas de PLGA (Han et al., 2016; Kamaly et al., 2016).

6.5 Conclusiones y perspectivas

Se produjeron con éxito micropartículas de PLGA/bLf mediante electrorrociado de disoluciones no emulsificadas a partir de una suspensión de bLf en una disolución de PLGA en una fase orgánica. Al encapsular lactoferrina en PLGA, se redujo notablemente la temperatura de transición vítrea de las micropartículas de 45.6 a 36.5 °C, lo cual sugiere que la bLf tiene un efecto plastificante en las cadenas poliméricas a temperaturas mayores de 26 °C. El análisis por DLS reveló que la técnica de electrorrociado de disoluciones no emulsificadas generó principalmente partículas de PLGA/bLf altamente monodispersas con diámetros entre 105 y 255 nm, aunque se observó también un pequeño número de partículas más grandes. Además, las micropartículas cargadas con proteína presentaron un perfil de liberación prolongada, lográndose una desorción y liberación completas después de aproximadamente 8 horas bajo agitación constante en condiciones fisiológicas simuladas. La liberación de proteína ocurrió sin ninguna evidencia de liberación abrupta por erosión de

PLGA. El modelado matemático del perfil de liberación permitió establecer un fundamento cuantitativo para empezar a dilucidar los mecanismos de transporte de masa involucrados en la liberación controlada del sistema PLGA/bLf. En este caso, se determinó que el modelo Peppas-Sahlin ajustó de mejor manera el perfil de liberación, incluyendo que la liberación se debió a un mayor grado de difusión y transporte anómalo en lugar de procesos de degradación y relajación, lo cual concuerda con otros estudios previos.

El periodo de liberación reportado en este capítulo puede ser prolongado mediante la utilización de otros polímeros biocompatibles para la encapsulación que tengan menores tasas de degradación y menor permeabilidad al agua, como PLGA de mayor peso molecular o mayor proporción de ácido láctico. Aún se necesitan estudios posteriores para determinar los cambios en la estabilidad y actividad de la proteína encapsulada durante el proceso de electrorrociado y de degradación de PLGA. En su conjunto, estos resultados permiten calificar a este sistema de encapsulación como viable para la liberación de biomoléculas con propiedades similares a las de bLf, sugiriendo así que el electrorrociado de disoluciones no emulsificadas es un método factible para la formulación de partículas poliméricas altamente monodispersas cargadas con proteínas y con propiedades de liberación prolongada.

6.6 Bibliografía de capítulo

- Abbott, N. J. (2013). Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(3), 437–449. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9608-0>
- Alexis, F. (2005). Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)]. *Polymer International*, 54(1), 36–46. <https://doi.org/10.1002/pi.1697>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Blasi, P., Schoubben, A., Giovagnoli, S., Perioli, L., Ricci, M., & Rossi, C. (2007). Ketoprofen poly(lactide-co-glycolide) physical interaction. *AAPS PharmSciTech*, 8(2), 1–8. <https://doi.org/10.1208/pt0802037>
- Burnham, K. P., & Anderson, D. R. (2002). Statistical Theory and Numerical Results. En *Model Selection and Multimodel Inference* (pp. 352–436). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-22456-5_7
- Eliasz, R. E., & Kost, J. (2000). Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins. *Journal of Biomedical Materials Research*, 50(3), 9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(20000605\)50:3<388::AID-JBM13>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(20000605)50:3<388::AID-JBM13>3.0.CO;2-F)

- Ensign, L. M., Cone, R., & Hanes, J. (2012). Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(6), 557–570. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.009>
- Fang, G., Zhou, J., Qian, Y., Gou, J., Yang, X., & Tang, B. (2018). Development and evaluation of thermo-sensitive hydrogel system with nanocomplexes for prolonged subcutaneous delivery of enoxaparin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *48*, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.09.004>
- Flores-Rojas, G. G., López-Saucedo, F., Vázquez, E., Hernández-Mecinas, E., Huerta, L., Cedillo, G., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., & Bucio, E. (2020). Synthesis of polyamide-6@cellulose microfilms grafted with N-vinylcaprolactam using gamma-rays and loading of antimicrobial drugs. *Cellulose*, *27*(5), 2785–2801. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-02986-1>
- Han, F. Y., Thurecht, K. J., Whittaker, A. K., & Smith, M. T. (2016). Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading. *Frontiers in Pharmacology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00185>
- Houchin, M. L., & Topp, E. M. (2008). Chemical Degradation of Peptides and Proteins in PLGA: A Review of Reactions and Mechanisms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *97*(7), 2395–2404. <https://doi.org/10.1002/jps.21176>
- Huang, W., & Zhang, C. (2018). Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation. *Biotechnology Journal*, *13*(1), 1700203. <https://doi.org/10.1002/biot.201700203>
- Jenssen, H., & Hancock, R. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*, *91*(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.015>
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical Reviews*, *116*(4), 2602–2663. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>
- Krimm, S., & Bandekar, J. (1986). Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins. En *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 38, pp. 181–364). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60528-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60528-8)
- Lakkakula, J. R., & Maçedo Krause, R. W. (2014). A vision for cyclodextrin nanoparticles in drug delivery systems and pharmaceutical applications. *Nanomedicine*, *9*(6), 877–894. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.41>
- Lee, Y. H., Mei, F., Bai, M. Y., Zhao, S., & Chen, D. R. (2010). Release profile characteristics of biodegradable-polymer-coated drug particles fabricated by dual-

- capillary electrospray. *Journal of Controlled Release*, 145(1), 58–65.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.03.014>
- Nalam, P. C., Lee, H.-S., Bhatt, N., Carpick, R. W., Eckmann, D. M., & Composto, R. J. (2017). Nanomechanics of pH-Responsive, Drug-Loaded, Bilayered Polymer Grafts. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(15), 12936–12948.
<https://doi.org/10.1021/acsami.6b14116>
- Park, T. G. (1995). Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: Effect of copolymer composition. *Biomaterials*, 16(15), 1123–1130.
[https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)93575-X](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)93575-X)
- Peña-Juárez, Ma. C., Campos-Rodríguez, R., Godínez-Victoria, M., Cruz-Hernández, T. R., Reyna-Garfias, H., Barbosa-Cabrera, R. E., & Drago-Serrano, M. E. (2016). Effect of Bovine Lactoferrin Treatment Followed by Acute Stress on the IgA-Response in Small Intestine of BALB/c Mice. *Immunological Investigations*, 45(7), 652–667.
<https://doi.org/10.1080/08820139.2016.1202959>
- Peppas, N. A., & Sahlin, J. J. (1989). A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*, 57(2), 169–172. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90306-2)
- Perdijk, O., van Neerven, R., van den Brink, E., Savelkoul, H., & Brugman, S. (2018). Bovine Lactoferrin Modulates Dendritic Cell Differentiation and Function. *Nutrients*, 10(7), 848. <https://doi.org/10.3390/nu10070848>
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887–913.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>
- Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 23–36.
[https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4)
- Rodríguez-Zamora, P., Peña-Juárez, Ma. C., Cedillo-Servín, G., Paloalto-Landon, A., Ortega-García, I., Maaza, M., & Vera-Graziano, R. (2019). Characterization of mechanically reinforced electrospun dextrin-polyethylene oxide sub-microfiber mats. *Polymer Engineering & Science*, 59(9), 1778–1786.
<https://doi.org/10.1002/pen.25177>
- Rösler, A., Vandermeulen, G. W. M., & Klok, H.-A. (2001). Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53(1), 95–108. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00222-8](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00222-8)
- Serra, L., Doménech, J., & Peppas, N. A. (2006). Drug transport mechanisms and release kinetics from molecularly designed poly(acrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels.

- Biomaterials*, 27(31), 5440–5451.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.011>
- Sreedhara, A., Flengsrud, R., Langsrud, T., Kaul, P., Prakash, V., & Vegarud, G. E. (2010). Structural characteristic, pH and thermal stabilities of apo and holo forms of caprine and bovine lactoferrins. *BioMetals*, 23(6), 1159–1170.
<https://doi.org/10.1007/s10534-010-9366-5>
- Torres-Martinez, E. J., Pérez-González, G. L., Serrano-Medina, A., Grande, D., Vera-Graziano, R., Cornejo-Bravo, J. M., & Villarreal-Gómez, L. J. (2019). Drugs Loaded into Electrospun Polymeric Nanofibers for Delivery. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 22, 313–331. <https://doi.org/10.18433/jpps29674>
- Tucker, N., Stanger, J. J., Staiger, M. P., Razzaq, H., & Hofman, K. (2012). The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 7(2_suppl), 155892501200702.
<https://doi.org/10.1177/155892501200702S10>
- Villarreal-Gómez, L. J., Cornejo-Bravo, J. M., Vera-Graziano, R., & Grande, D. (2016). Electrospinning as a powerful technique for biomedical applications: A critically selected survey. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27(2), 157–176.
<https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1116885>
- Wang, Y., Yang, X., Liu, W., Zhang, F., Cai, Q., & Deng, X. (2013). Controlled release behaviour of protein-loaded microparticles prepared via coaxial or emulsion electrospray. *Journal of Microencapsulation*, 30(5), 490–497.
<https://doi.org/10.3109/02652048.2012.752537>
- Xie, J., & Wang, C.-H. (2007). Encapsulation of proteins in biodegradable polymeric microparticles using electrospray in the Taylor cone-jet mode. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(5), 1278–1290. <https://doi.org/10.1002/bit.21334>
- Yamaoka, K., Nakagawa, T., & Uno, T. (1978). Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 6(2), 165–175.
<https://doi.org/10.1007/BF01117450>

Capítulo 7

Conclusiones y perspectivas generales

7.1 Conclusiones generales

Se validó el amplio potencial del electrohilado para la fabricación de fibras con diámetros micrométricos a partir de polímeros hidrosolubles, tanto naturales como artificiales, y el potencial del electrorrociado como una técnica de fácil acceso para producir micropartículas poliméricas, incluso a base de polímeros con diferentes tipos de afinidad. Mediante las técnicas de electrohilado de mezclas y electrorrociado de disoluciones no emulsificadas se obtuvieron mallas fibrilares de DEX/PEO y PEO con diámetros en el intervalo de 150–600 nm, partículas de PCL-PEG sintetizado por catálisis enzimática en el intervalo de 5–10 μm y partículas de PLGA/bLf en el intervalo de 100–250 nm.

Las mallas electrohiladas de DEX/PEO a partes iguales soportaron mayor resistencia a la tensión y mayor elongación con un módulo elástico alto. Además, resultaron tener mayor resistencia a la ruptura, incluso más que las fibras de PEO puro. Los estudios de espectroscopía confirmaron la formación de enlaces por puente de hidrógeno entre la dextrina y PEO, sugiriendo que la dextrina como una fuente de enredamiento molecular que genera un refuerzo mecánico en las fibras electrohiladas.

El perfil de liberación de las partículas electrorrociadas de PLGA/bLf fue ajustado a un modelo Peppas-Sahlin, lo cual reveló que las partículas de PLGA modulan la liberación de bLf principalmente mediante difusión no fickiana, logrando una desorción y liberación completas después de aproximadamente 8 horas bajo agitación constante en condiciones fisiológicas simuladas. El análisis térmico de estas partículas sugiere que la proteína tiene un efecto plastificante sobre el PLGA, al reducir su temperatura de transición vítrea.

7.2 Propuesta: Parche a base de fibras electrohiladas de poli(óxido de etileno) cargadas con partículas electrorrociadas de ácido poli(láctico-co-glicólico) con lactoferrina bovina encapsulada

Con base en los resultados experimentales del presente trabajo reportados en el **Capítulo 4** (*Fabricación y caracterización de mallas electrohiladas reforzadas mecánicamente a base de poli(óxido de etileno) y dextrina cíclica altamente ramificada*) y el **Capítulo 6** (*Encapsulación de lactoferrina bovina en micropartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) mediante electrorrociado de disoluciones no emulsificadas y su caracterización como sistemas de liberación controlada*), se propone el desarrollo de un parche o apósito para la liberación tópica de bLf encapsulada en micropartículas electrorrociadas de PLGA cargadas en fibras electrohiladas de PEO. El primer paso propuesto consiste en la encapsulación de bLf en micropartículas de PLGA mediante el electrorrociado de una dispersión no emulsificada de bLf en una disolución de PLGA. Posteriormente se propone la dispersión de las partículas de PLGA/bLf en agua, la disolución de PEO en esta dispersión y el electrohilado de la disolución resultante para producir fibras de PEO cargadas con partículas de PLGA/bLf. Esta propuesta para apósitos poliméricos

microestructurados para la liberación de bLf en heridas cutáneas se fundamenta en las siguientes ventajas previstas:

1) El procesamiento del PEO mediante electrohilado permitirá su rápida disolución con la humedad intrínseca de la herida cutánea crónica, gracias a la alta relación área superficial-volumen de las microfibras poliméricas. Esto evitará la potencial acumulación de humedad que ocurre con otros tratamientos actuales cuyo enfoque es la formación de una barrera mecánica sobre la herida.

2) Es posible generar apósitos con una liberación dual de bLf, incorporando la proteína no sólo dentro de las micropartículas de PLGA, sino también en la disolución precursora de las fibras electrohiladas de PEO. Esto permitiría una primera etapa de liberación rápida debido a la disolución del PEO en el medio húmedo de la herida y una segunda etapa de liberación paulatina debida a la difusión de proteína y degradación de PLGA en las partículas electrorrociadas liberadas por las fibras.

3) En las fibras electrohiladas de PEO es posible cargar fácilmente bactericidas y agentes adicionales que coadyuven a la prevención de infecciones, por ejemplo, derivados de plata (sulfadiazina de plata, plata iónica, sulfato de plata, entre otros) y partículas de óxido de zinc, los cuales tienen actividad antimicrobiana.

4) El apósito microestructurado de PEO/PLGA/bLf aquí propuesto representa un método terapéutico complementario que no se contrapone a los tratamientos actuales para heridas cutáneas, principalmente gracias a la rápida disolución de las fibras poliméricas. En otras palabras, el apósito propuesto podría aplicarse en la herida y liberar las partículas cargadas con bLf sin afectar negativamente la aplicación de cualquier otro tratamiento posterior, como apósitos de hidrogeles, pomadas bactericidas y gasas de protección.

5) Dado que el apósito propuesto podría disolverse en un corto tiempo en contacto con la humedad de la herida, no representa un riesgo para heridas con infecciones severas o con conato de infección. Esto se debe a que este apósito no cambiaría de manera sustancial la humedad local, a diferencia de otros apósitos que forman barreras y conservan o aumentan la humedad.

7.3 Perspectivas generales

Todavía se requieren estudios adicionales para evaluar la capacidad de encapsulación y la cinética de liberación *in vitro* e *in vivo* de apósitos poliméricos tipo fibra/partícula/fármaco a base de PEO/PLGA/bLf. Esto permitirá ajustar la cantidad de proteína encapsulada y la cantidad de partículas cargadas en las fibras, de acuerdo con la dosis liberada óptima. Para lograr esto último, también son necesarios estudios de dosis-respuesta de bLf aplicada directamente en modelos murinos de heridas cutáneas, potencialmente con procesos inflamatorios anómalos, con el fin de conocer la correlación entre la dosis de bLf con sus propiedades inmunomodulatorias y promotoras de la regeneración.

Asimismo, es importante determinar los cambios en la estabilidad de la bLf encapsulada en partículas, tanto durante el proceso de electrorrociado como durante la degradación de PLGA, esto con el objetivo de corroborar que la actividad de la proteína se mantenga en una proporción suficiente para justificar esta elección de vehículo y método de encapsulación. Se propone comparar además la morfología fibrilar, velocidad de disolución y cinética de liberación de fármaco de mallas electrohiladas producidas a partir de PEO en comparación con otros polímeros biocompatibles hidrosolubles como la poli(vinilpirrolidona).

Para trabajos futuros, se plantea la posibilidad de estudiar vehículos termosensibles basados en copolímeros anfifílicos como el copolímero PCL-PEG400 aquí reportado, ya que debido a su potencial capacidad de autoensamblaje y/o entrecruzamiento físico, podría representar una alternativa para la formulación de un gel para la administración tópica de proteínas. En este sentido, sería importante analizar el efecto de la composición y concentración del copolímero en las propiedades reológicas del gel resultante y su cinética de liberación.