



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES.
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN “LUIS GUILLERMO IBARRA
IBARRA”.**

**“Desarrollo y caracterización de materiales compuestos basados en
polímeros biocompatibles y nanopartículas de óxido de Zinc (ZnO)
fabricados mediante la técnica de electrohilado, para potenciales
aplicaciones en el tratamiento de quemaduras”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES.

PRESENTA:

M. en C. GINA PRADO PRONE.

TUTOR PRINCIPAL:

**DRA. MARÍA CRISTINA VELASQUILO MARTÍNEZ.
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN “LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA”.**

COMITÉ TUTOR:

**DR. ALFREDO FRANCO PÉREZ.
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA FIDEL VELÁZQUEZ.
DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES.**

CIUDAD DE MÉXICO, JULIO, 2018.



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.

Of.PCeIM/510/18

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE.
DIRECTORA GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E

At'n. C.P. Agustín Mercado.

Me permito informarle que después de analizar la situación académica de la alumna **Prado Prone Gina** con número de cuenta **301048897**, el 30 de mayo de 2018, el Comité Académico de este Posgrado ha tenido a bien designar el siguiente sínodo a fin de dictaminar si el trabajo desarrollado, **"Desarrollo y caracterización de materiales compuestos basados en polímeros biocompatibles y nanopartículas de óxido de Zinc (ZnO) fabricados mediante la técnica de electrohilado, para potenciales aplicaciones en el tratamiento de quemaduras"** reúne los méritos para obtener el grado de Doctora en Ciencia e Ingeniería de Materiales.

CARGO	NOMBRE	ADSCRIPCION
Presidente	Dr. Jorge Alfonso García Macedo	Instituto de Física.
Primer Vocal	Dra. María Cristina Velasquillo Martínez	Instituto Nacional de Rehabilitación.
Segundo Vocal	Dr. David Garcíadiago Cázares	Instituto Nacional de Rehabilitación.
Tercer Vocal	Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina	Instituto de Investigaciones Biomédicas.
Secretario	Dra. Argelia Almaguer Flores	Facultad de Odontología.

Sin otro particular por el momento aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial

Atentamente.
 Cd. Universitaria Cd.Mx., a 4 de junio de 2018.
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"


 DR. LUIS ENRIQUE SANSORES CUEVAS.
 COORDINADOR

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca nacional (Número de beca 443935) y por la beca mixta (Número de beca 443935) otorgada para la realización de mis estudios de doctorado y estancia doctoral. También, agradezco al apoyo económico otorgado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) 2015, 2016 y 2017 para la compra de reactivos, y para la asistencia a cursos y congresos que fortalecieron mi formación académica.

Este proyecto fue principalmente realizado en el Laboratorio de Biomateriales, en la Unidad de Ingeniería de Tejidos y Terapia Celular (UITTC) y en el Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados (CENIAQ) del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” (INR-LGII); y fue parcialmente realizado con el apoyo académico y técnico del Dr. Jorge A. García Macedo del Instituto de Física (IF) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); de la Dra. Argelia Almaguer Flores y del Dr. Víctor García Pérez de la Facultad de Odontología (FO), UNAM; de la Dra. Sandra E. Rodil Posada del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM), UNAM; y de las Dras. Masoomeh Bazzar y Maria Letizia Focarete del Departamento de Química de la Universidad de Bologna (UNIBO).

Agradezco el apoyo técnico de Roberto Hernández, Samuel Tehuacanero y Diego Quiterio (TEM y SEM) del IF, UNAM; de Miguel A. Canseco (FT-IR), Adriana Tejeda (XRD) y Omar Novelo (SEM) del IIM, UNAM; de A. D. Hernández (TEM caracterización de nanopartículas de Zn) del INR-LGII.

Agradezco a mi comité tutor: Dra. María Cristina Velasquillo Martínez, Dr. Alfredo Franco Pérez y Dra. María Cristina Piña Barba por el apoyo que me brindaron durante mis estudios de doctorado. Gracias también a los miembros del jurado evaluador: Dr. Jorge A. García Macedo, Dr. David Garcíadiago Cázares, Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina y Dra. Argelia Almaguer Flores por enriquecer el contenido de este trabajo.

Un especial agradecimiento a la Dra. Pheadra S. Silva Bermúdez por el apoyo académico, técnico y personal que me brindó durante la realización de este proyecto.

Le doy las gracias a mi mamá por su incondicional apoyo, por su bondad, su paciencia, su esfuerzo y por la confianza que siempre deposita en mí. Gracias a mi papá por todo lo que me enseñó y amó a lo largo de su vida. Gracias a mis hermanos, Claudia, Javier y Geovanna por apoyarme, cuidarme y quererme desde el día en que nací. Gracias a Carlos por su amor, paciencia y apoyo técnico y personal; te amo. Finalmente, gracias a Alejandra y Yeradith por enseñarme el significado y el valor de la amistad.

CONTENIDO

RESUMEN	4
1. MOTIVACIÓN.....	6
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1. Alternativas en el mercado para el tratamiento de quemaduras.....	11
2.2. Materiales en desarrollo.....	13
2.2.1. Apósito antibacteriano.....	14
2.2.2. Andamio celular.....	17
3. PROPUESTA	24
4. HIPÓTESIS.....	25
4.1. Diseño del apósito antibacteriano.....	25
4.2. Diseño del andamio celular	26
5. OBJETIVO.....	28
5.1. Objetivos Específicos	28
5.1.1. Apósito antibacteriano.....	28
5.1.2. Andamio celular.....	29
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	30
6.1. Apósito antibacteriano; nanopartículas basadas en Zn embebidas en la coraza externa de fibras de policaprolactona (Zn-nps/PCL).....	30
6.1.1. Caracterización de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO).	30
6.1.1.1. Difracción de rayos X (XRD).....	30
6.1.1.2. Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	30
6.1.1.3. Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis).....	30
6.1.2. Fabricación del apósito antibacteriano de Zn-nps/PCL. Técnica de electrohilado uniaxial y coaxial.	31
6.1.3. Caracterización físico-química de los apósitos de Zn-nps/PCL.....	33
6.1.3.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	33
6.1.3.2. Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) general y mapeo.	33
6.1.3.3. Microscopia electrónica de transmisión (TEM).	34
6.1.3.4. Espectroscopia Infrarroja (FT-IR).....	34
6.1.3.5. Difracción de Rayos X (XRD).	34
6.1.3.6. Ángulo de contacto al agua (WCA).....	34
6.1.3.7. Pérdida de masa.....	35

6.1.4.	Evaluación de la actividad antibacteriana de los apósitos de Zn-nps/PCL	35
6.1.4.1.	Ensayo antibacteriano por Turbidimetría.....	35
6.1.4.2.	Ensayo antibacteriano por MTT.....	36
6.2.	Andamio celular; fibras de gelatina y policaprolactona (Gel/PCL)	37
6.2.1.	Fabricación del andamio de Gel/PCL. Técnica de electrohilado convencional	37
6.2.2.	Caracterización físico-química de los andamios de Gel/PCL	37
6.2.2.1.	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	37
6.2.2.2.	Espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X (EDS).....	38
6.2.2.3.	Espectroscopia infrarroja (FT-IR).....	38
6.2.2.4.	Difracción de Rayos X (XRD).....	38
6.2.2.5.	Ángulo de contacto al agua (WCA).....	38
6.2.2.6.	Análisis termogravimétrico (TGA).....	38
6.2.2.7.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	38
6.2.2.8.	Propiedades mecánicas; pruebas de tensión uniaxial.....	39
6.2.2.9.	Ensayo de biuret.....	39
6.2.2.10.	Pérdida de masa.....	40
6.2.3.	Evaluación in vitro de los andamios de Gel/PCL	40
6.2.3.1.	Viabilidad celular por ensayo de calceína/homodímero de etidio.....	41
6.2.3.2.	Metabolismo celular por MTT.....	42
6.3.	Análisis estadístico	42
7.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	43
7.1.	Apósito antibacteriano; nanopartículas basadas en Zn embebidas en la coraza externa de fibras de policaprolactona (Zn-nps/PCL)	43
7.1.1.	Caracterización de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO)	43
7.1.1.0.	Difracción de rayos X (XRD).....	43
7.1.1.1.	Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	43
7.1.1.2.	Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis).....	44
7.1.2.	Caracterización físico-química de los apósitos de Zn-nps/PCL	45
7.1.2.1.	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	45
7.1.2.2.	Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) general y mapeo.....	47
7.1.2.3.	Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	50
7.1.2.4.	Espectroscopia infrarroja (FT-IR).....	51
7.1.2.5.	Difracción de Rayos X (XRD).....	52

7.1.2.6.	Ángulo de contacto al agua (WCA).....	53
7.1.2.7.	Pérdida de masa.....	55
7.1.3.	Evaluación de la actividad antibacteriana de los apósitos de Zn-nps/PCL.....	56
7.1.3.1.	Ensayo antibacteriano por Turbidimetría.....	56
7.1.3.2.	Ensayo antibacteriano por MTT.....	59
7.2.	Andamio celular; fibras electrohiladas de gelatina (Gel) y policaprolactona (PCL).	62
7.2.1.	Caracterización físico-química de los andamios de Gel/PCL.....	62
7.2.1.1.	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	62
7.2.1.2.	Ángulo de contacto al agua (WCA).....	64
7.2.1.3.	Espectroscopia infrarroja (FT-IR).....	65
7.2.1.4.	Difracción de rayos X (XRD).....	67
7.2.1.5.	Propiedades mecánicas; pruebas de tensión uniaxial.....	68
7.2.1.6.	Análisis termogravimétrico (TGA).....	71
7.2.1.7.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	73
7.2.1.8.	Ensayo de biuret.....	76
7.2.1.9.	Pérdida de masa.....	78
7.2.2.	Evaluación in vitro de los andamios de Gel/PCL.....	79
7.2.2.1.	Viabilidad celular por ensayo de calceína/homodímero de etidio.....	79
7.2.2.2.	Metabolismo celular por MTT.....	82
8.	CONCLUSIONES.....	84
8.1.	Conclusión general.....	84
8.2.	Conclusiones particulares.....	84
8.2.1.	Apósito antibacteriano.....	84
8.2.2.	Andamio celular.....	85
9.	PERSPECTIVAS.....	86
10.	PRODUCTOS ACADÉMICOS.....	88
10.1.	Presentaciones en congresos.....	88
10.2.	Artículos y memorias de congresos.....	88
11.	REFERENCIAS.....	89

RESUMEN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las quemaduras constituyen un problema de salud mundial no sólo por el número de muertes originadas a partir de estas lesiones sino también por sus secuelas sociales y económicas debido a la falta de funcionalidad de la zona afectada y a la aparición de cicatrices. En general, el tratamiento de las quemaduras de espesor profundo consiste en controlar la pérdida de fluidos, prevenir o tratar infecciones generadas por microorganismos patógenos y/o oportunistas, y promover el proceso de cicatrización de la herida para finalmente reparar el tejido. El éxito del tratamiento depende íntegramente de la efectividad de los métodos empleados en cada una de las etapas. Actualmente existen diferentes alternativas terapéuticas en el mercado que facilitan el proceso de curación; sin embargo, a pesar de que los avances científicos y tecnológicos han permitido desarrollar nuevos materiales que contribuyen al tratamiento de lesiones por quemaduras de espesor profundo, éstos aún no han permitido superar satisfactoriamente algunos obstáculos tales como: 1) la recuperación de la funcionalidad del tejido debido al inadecuado proceso de cicatrización (en gran medida por el desarrollo de infecciones y la poca población celular en el lecho de la herida); 2) la falta de disponibilidad de sustitutos dérmicos para cubrir grandes extensiones; y 3) el rechazo inmune generado principalmente por el uso de sustitutos alogénicos (derivados de individuos diferentes de la misma especie) o xenogénicos (derivados de otra especie). Es por ello, que es necesario el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento que ayuden a prevenir las infecciones y que promuevan el proceso de reparación de la piel con una mayor efectividad; y que a su vez, disminuyan el rechazo inmune. En esta investigación se desarrollaron dos materiales fibrilares compuestos, que ofrecen una nueva alternativa para el tratamiento integral de quemaduras de espesor profundo. En la elaboración de estos materiales se empleó la técnica de electrohilado, y se usaron tanto nanopartículas de óxido de zinc (ZnO nps) como los polímeros biocompatibles policaprolactona (PCL) y gelatina (Gel). Los dos diferentes materiales que se desarrollaron tienen características complementarias, uno de ellos posee la propiedad de inhibir la adhesión y el crecimiento planctónico de bacterias, mientras que el otro posee propiedades altamente favorables para el cultivo celular *in vitro*. Se espera que el primer material fibrilar, compuesto de nanopartículas a base de Zn y PCL (Zn/PCL), se desempeñe como un apósito antibacteriano; el cual estaría expuesto al ambiente, brindando la posibilidad de prevenir infecciones generadas por bacterias externas durante el tratamiento de la lesión. El segundo material fibrilar, compuesto de Gel y PCL (Gel/PCL), se espera que funcione como un andamio promotor del restablecimiento del tejido; el cual estaría en contacto con la lesión y se desempeñaría como un acarreador celular, transportando a la lesión células dérmicas autólogas (derivadas del propio paciente) cultivadas *in vitro*, lo que incentivaría la migración de células nativas de una zona sana de la piel a la zona lesionada y disminuiría el rechazo inmune en comparación con el posible rechazo generado por células no autólogas.

El desarrollo de ambos materiales fibrilares compuestos se basó en el análisis de su micro-morfología a partir de microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM),

y en el estudio de su estructura y composición química mediante espectroscopias infrarroja (FT-IR) y de fotoelectrones emitidos por rayos X (EDS). También se recurrió a la identificación de las estructuras cristalinas presentes en los materiales fibrilares compuestos por medio de difracción de Rayos X (XRD), y al estudio del carácter hidrofílico o hidrofóbico de la superficie de los materiales por medio de la determinación de su ángulo de contacto al agua (WCA).

En el caso específico del material Zn/PCL, se evaluó la inhibición del crecimiento bacteriano planctónico en el medio líquido circundante y la inhibición de la adhesión de bacterias en la superficie del material, para ello se realizaron pruebas en contra de las cepas Gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) y Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) mediante los métodos de turbidimetría y MTT, respectivamente; estos resultados mostraron que el material tiene la capacidad de inhibir simultáneamente el crecimiento planctónico bacteriano y la formación de biopelícula en su superficie lo que le brindaría una mayor protección a la lesión ya que evitaría la penetración de bacterias externas y al mismo tiempo desinfectaría el lecho de la herida. El método MTT también se utilizó para evaluar su biocompatibilidad, a partir del estudio de la actividad metabólica de células dérmicas humanas expuestas a medio condicionado (suplementado con las partículas liberadas por el material Zn/PCL); los resultados indicaron que en presencia del medio condicionado, las células disminuyeron su actividad metabólica pero la recuperaron al retirar el medio, lo que indicó que la citotoxicidad del material es parcial y podría ser apto para su uso en tratamientos clínicos.

En el caso específico del material Gel/PCL, se analizaron sus propiedades mecánicas mediante ensayos de esfuerzo-deformación por tensión uniaxial, y sus propiedades térmicas mediante análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se estimó el porcentaje de Gel liberada de las fibras de Gel/PCL en un medio acuoso, a través del método de biuret. Estos resultados indicaron que hay una buena miscibilidad entre el polímero natural y sintético lo que le confiere al material propiedades mecánicas y biológicas favorables para su uso como andamio celular. También, se evaluaron tanto la viabilidad como la actividad metabólica de células dérmicas humanas cultivadas sobre el material Gel/PCL, mediante ensayos de calceína/homodímero de etidio (LIVE/DEAD) y MTT, respectivamente; los resultados mostraron que la Gel liberada en el microambiente celular y la Gel en la superficie del material incentivó el crecimiento y proliferación de las células dérmicas y favoreció la distribución celular en el material.

Los resultados de esta investigación indicaron que los materiales fibrilares Zn/PCL y Gel/PCL poseen propiedades adecuadas para ser utilizados como un apósito antibacteriano y andamio celular, respectivamente, lo que representa una nueva alternativa a los materiales empleados en el tratamiento integral de quemaduras de espesor profundo. Esta investigación doctoral ha dado lugar al desarrollo de dos nuevos materiales con el potencial de ser usados en el tratamiento de quemaduras, estableciendo los fundamentos necesarios para realizar pruebas *in vivo* en modelos animales y evaluar la posible incorporación de dichos materiales en futuros tratamientos clínicos integrales de quemaduras de espesor profundo.

1. MOTIVACIÓN.

Para hacer frente al enorme reto de reparar un tejido dañado nace la ingeniería de tejidos (IT), que es un campo multidisciplinario de la medicina regenerativa que combina la ciencia e ingeniería de materiales (biomateriales), el conocimiento y la tecnología del cultivo celular y factores bioquímicos para generar estructuras que restauren o regeneren tejidos u órganos dañados (1). En general, la IT involucra el aislamiento de células del paciente a partir de tejido obtenido mediante una biopsia, la expansión *in vitro* de las células aisladas, y el posterior cultivo de las células sobre un andamio (biomaterial). Las células cultivadas recubren el andamio y forman un constructo que será implantado en el cuerpo del paciente para incentivar la restauración del tejido u órgano dañado.

Una de las aplicaciones de la IT es en el tratamiento de lesiones dermoepidérmicas como las quemaduras. Las quemaduras son lesiones en los tejidos del cuerpo causadas por calor, sustancias químicas, electricidad, radiaciones y/o fricción (2). Las quemaduras de espesor profundo (segundo grado profundo y tercer grado) constituyen un problema de salud mundial no sólo por el número de muertes, gastos prehospitales y hospitalarios que originan, sino sus secuelas sociales y laborales debido a la aparición de cicatrices y principalmente a la falta de funcionalidad del tejido tratado. El Repositorio Global de Datos del Observatorio de la Salud de la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que en el año 2012 murieron aproximadamente 55.84 millones de personas en el mundo, de las cuales 14 millones (25.07%) fueron debidas a lesiones. Del total de muertes por lesiones, 267,885 (1.91%) fueron debido a quemaduras por fuego, calor y sustancias calientes, ocupando el séptimo lugar en la lista, después de las lesiones intencionadas (36.7%), las lesiones no intencionadas (33.19), los accidentes de tráfico (8.95), las autolesiones (5.74%), las caídas (4.94%) y el ahogamiento (2.65%) (3). Es importante resaltar que el número total de muertes por quemadura es superior al reportado pues en los grupos que se consideran en la estadística, las quemaduras por fricción, sustancias corrosivas, electricidad y por radiación se toman en cuenta dentro de las primeras tres causas de muerte por lesiones. La mayor prevalencia de lesiones por quemaduras se presenta en países de medio y bajo ingreso, especialmente en la población con menor nivel socioeconómico. Según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) de la Secretaría de Salud de México, en el año 2011 se registraron 129,779 casos por quemaduras, ocupando el séptimo lugar de las veinte principales causas de enfermedades no transmisibles en el país. Las entidades federativas que presentaron mayor número de lesiones por quemaduras fueron la Ciudad de México (11.2%) y Jalisco (9.4%), y las que menos lo hicieron fueron Tlaxcala (0.6%) y Baja California Sur (0.7%) (4). Además, los gastos pre-hospitalarios y hospitalarios (incluyendo la tecnología consumible, estudios clínicos, medicamentos, nutrición, etc.) de los tratamientos por quemaduras son altamente costosos, se estima que los costos por paciente varían de treinta mil a quinientos mil pesos en casos de severidad leve (sin disfunción orgánica), de quinientos mil a cinco millones de pesos en casos de severidad moderada (con falla orgánica) y de cinco a cuarenta millones de pesos en casos severos (con o sin falla

orgánica múltiple) (5). Dado que los costos no pueden ser solventados de forma exclusiva por los pacientes, son generalmente las instituciones de salud pública las que absorben la mayoría de estos gastos.

Las quemaduras de espesor profundo requieren de tratamientos especializados que por un lado prevengan y/o traten infecciones generadas por microorganismos patógenos y/o oportunistas, y por otro promuevan el proceso de reparación del tejido. Las alternativas tecnológicas disponibles todavía no han logrado superar algunos obstáculos tales como los costos elevados, la falta de efectividad (costo-beneficio), la capacidad para tratar lesiones de gran extensión, la recuperación de la funcionalidad total del tejido y el rechazo inmune. Adicionalmente, la mayoría de los dispositivos tecnológicos empleados en México para el tratamiento de quemaduras son importados; esto se debe, en parte, a que en México no se producen comercialmente apósitos antibacterianos y sustitutos dérmicos (celular o acelular) para el tratamiento de quemaduras de segundo grado profundo lo que contribuye a incrementar los costos de los tratamientos.

Por todo lo anterior, en este trabajo doctoral se diseñaron, fabricaron y estudiaron dos diferentes materiales con propiedades complementarias que al ser empleados en conjunto ofrezcan una alternativa para tratamiento integral de lesiones por quemaduras de espesor profundo. El primer material tiene como objetivo desempeñarse como un apósito antibacteriano que proteja a la lesión de infecciones mientras que el segundo material busca desempeñarse como un promotor del restablecimiento del tejido desde un enfoque de IT.

El primer material (Zn/PCL), se fabricó a partir nanopartículas (nps) a base de Zn (ZnO y acetato de Zn) con propiedades antibacterianas. Estos dos compuestos de Zn poseen diferentes mecanismos antibacterianos lo que permite, simultáneamente, inhibir el crecimiento bacteriano planctónico en un medio acuoso y la adhesión bacteriana en su superficie. Las nps a base de Zn fueron embebidas homogéneamente en la superficie de una matriz micro-fibrilar polimérica compuesta de policaprolactona (PCL), lo que controla la liberación de las nps al mismo tiempo que se obtiene una superficie de contacto (nps-medio) adecuada para conservar las propiedades antibacterianas de los compuestos.

El segundo material (Gel/PCL), es un material micro-fibrilar fabricado a partir de una mezcla homogénea de dos polímeros biocompatibles, uno natural (gelatina; Gel) y otro sintético (PCL), que combina sus propiedades estructurales y biológicas para ser empleado como un andamio celular (desde un enfoque de IT), de manera que transporte a la lesión células dérmicas autólogas (fibroblastos derivados del propio paciente), después de ser cultivadas *in vitro* sobre el andamio, se espera que estas células cultivadas sinteticen los factores de crecimiento necesarios para incentivar la migración de células nativas de la zona sana de la piel a la zona lesionada y con esto se promueva la reparación adecuada del tejido. Además, se espera que al usar células autólogas se disminuya el rechazo inmune.

Los resultados de esta investigación indicaron que los dos materiales fibrilares, Zn/PCL y Gel/PCL, poseen propiedades apropiadas para ser utilizados como un apósito antibacteriano y andamio celular (células dérmicas, fibroblastos), respectivamente, lo que representa una

nueva alternativa a los materiales empleados en el tratamiento integral de quemaduras de espesor profundo, dando lugar al desarrollo de dos nuevos materiales con el potencial de ser usados en el tratamiento de quemaduras, estableciendo los fundamentos necesarios para realizar pruebas *in vivo* en modelos animales y evaluar la posible incorporación de dichos materiales en futuros tratamientos clínicos integrales de quemaduras de espesor profundo.

Las actividades de investigación asociadas a este trabajo se desarrollaron parcialmente en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados (CENIAQ) del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” (INR-LGII, México). El CENIAQ se inauguró el año 2011 a partir de la creciente necesidad de crear centros especializados en investigación básica, clínica y tecnológica para prevenir, tratar y rehabilitar las lesiones por quemaduras. Un potencial tratamiento integral de quemaduras de espesor profundo como el desarrollado en esta investigación, en particular en el CENIAQ del INR-LGII, permitiría en el mediano plazo un beneficio directo para los pacientes y para el sector salud, ya que se disminuiría la necesidad de utilizar injertos de piel (autólogos, alogénicos y/o xenogénicos) que son poco disponibles o que pueden generar rechazo inmune; y sustitutos dérmicos importados con tecnología inactual con problemas de costo-efectividad. Con los dos materiales desarrollados en este trabajo de investigación doctoral se busca, en un mediano plazo, aumentar la disponibilidad y la eficacia de los materiales empleados en el tratamiento de quemaduras de espesor profundo. Adicionalmente, debido a que los materiales y técnicas empleadas para el desarrollo de este potencial tratamiento tienen un costo moderado y una capacidad de producción a gran escala, se esperaría disminuir los costos del tratamiento beneficiando tanto a los pacientes como al sector salud.

2. INTRODUCCIÓN.

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, representa el 15% del peso corporal y en el adulto promedio cubre aproximadamente 1,7 m² de la superficie total de su cuerpo (6); realiza importantes funciones como la regulación de la temperatura corporal, el control de la evaporación del sudor, la síntesis de vitamina D a través de la exposición de luz UV del sol, la síntesis de melanina, mantiene el balance de fluidos y protege al cuerpo de efectos dañinos del ambiente como cambios de temperatura, impactos mecánicos y microorganismos patógenos y/o oportunistas (7). La piel está compuesta principalmente por tres capas: *epidermis*, *dermis* e *hipodermis* (Figura 1).

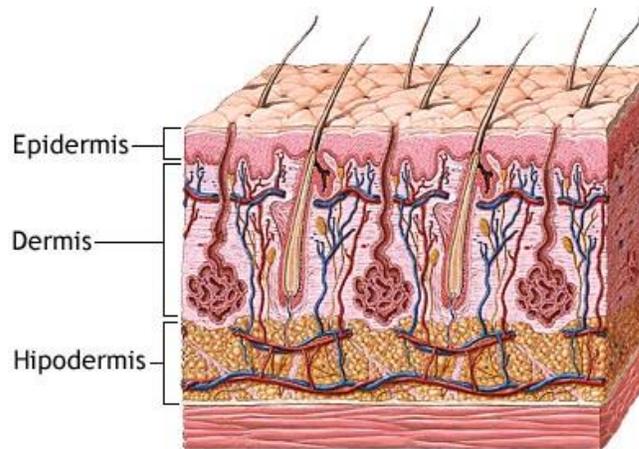


Figura 1. Imagen que muestra las tres capas de la piel.

La *epidermis* es la capa más superficial y delgada de la piel, se nutre a partir de la dermis y funciona como barrera permeable ayudando a mantener la integridad estructural del tejido, las células que constituyen el 90% de la epidermis son los queratinocitos (8). La *dermis* es generalmente la capa más gruesa y confiere a la piel resistencia, elasticidad y flexibilidad (9). Consta de dos subcapas: la papilar, que es la subcapa más superficial y la reticular, que es la más interna. Los fibroblastos son el principal tipo de célula dentro de las dos regiones, pero mayoritariamente de la dermis papilar y son los encargados de sintetizar los factores de crecimiento implicados en la señalización celular durante los procesos de reparación (6), así como de la síntesis, organización y mantenimiento de la matriz extracelular (MEC) que se encuentra principalmente en la capa reticular. La MEC es un conjunto de macromoléculas complejas y altamente organizadas; está constituida por agua, proteínas y polisacáridos. La MEC le brinda soporte a las células, mantiene la integridad del tejido, transmite nutrientes, elimina productos de desecho y participa de manera activa en los procesos de señalización (10). Finalmente, la *hipodermis* es la capa subyacente rica en tejido adiposo que proporciona energía y brinda soporte a los vasos sanguíneos y nervios que pasan desde los tejidos subyacentes hacia la dermis y la epidermis. Dado que la grasa es un aislante térmico, esta capa aísla el cuerpo de las bajas temperaturas y ofrece la absorción de impactos (8). La piel tiene la

propiedad intrínseca de auto-reparación; sin embargo, cuando ocurre una extensa pérdida o un daño profundo de tejido la piel no puede auto-repararse y se requieren tratamientos clínicos especializados para incentivar la reparación de la lesión y evitar la pérdida de funcionalidad (6). Uno de los tipos de lesiones más prevalentes que involucran daño en las dos primeras capas de la piel (lesiones dermo-epidérmicas) son las quemaduras. Como es mencionado anteriormente, las quemaduras son lesiones en los tejidos del cuerpo causadas por calor, sustancias químicas, electricidad, radiaciones y/o fricción (2) y se clasifican principalmente en tres tipos: 1) Primer grado, que afectan sólo la epidermis; 2) Segundo grado, que a su vez se clasifican en segundo grado superficial donde existe un daño en la epidermis y la capa superficial de la dermis (papilar); y segundo grado profundo, que afectan la epidermis y ambas capas de la dermis (papilar y reticular); y 3) Tercer grado, que afectan todas las capas de la piel (11). En general, el tratamiento de quemaduras de segundo grado profundo consiste en controlar la pérdida de fluidos, prevenir o tratar infecciones generadas por microorganismos patógenos como bacterias, promover el proceso de cicatrización de la herida y finalmente, reparar el tejido. Existen diferentes alternativas en el mercado para prevenir o tratar infecciones en este tipo de lesiones, como antibióticos, geles, cremas y apósitos antibacterianos. En cuanto a las alternativas empleadas para incentivar la reparación del tejido, los médicos especialistas cubren la lesión con injertos de piel autólogos (del propio paciente), injertos homólogos o alogénicos (generalmente de piel cadavérica); y/o injertos heterólogos o xenogénicos (derivados de otra especie). También se emplean sustitutos dérmicos y/o epidérmicos compuestos de biomateriales sintéticos y/o naturales, los cuales pueden estar cultivados *in vitro* con células (sustitutos celulares) o no (sustitutos acelulares) como alternativa terapéutica basada en Ingeniería de Tejidos (IT). El éxito del tratamiento de quemaduras de segundo grado depende íntegramente de la efectividad de los métodos empleados en cada una de las etapas. A pesar de que el avance médico, científico y tecnológico en trasplantes, injertos, fármacos, biomateriales y biología celular ha permitido la producción de diversos métodos terapéuticos que contribuyen al tratamiento de lesiones por quemaduras, los diferentes recursos todavía no han logrado superar algunos obstáculos tales como los costos elevados, la disponibilidad, la capacidad para tratar lesiones de gran extensión, la recuperación de la funcionalidad total del tejido y el rechazo inmune. Por lo tanto, es necesario continuar la investigación en esa dirección para generar nuevas tecnologías que optimicen el tratamiento de quemaduras.

Como se mencionó anteriormente, durante el tratamiento de quemaduras es fundamental evitar infecciones generadas por microorganismos patógenos y/o oportunistas; para ello, se emplean diferentes alternativas como cremas, geles y apósitos antibacterianos; sin embargo, son los apósitos los que poseen una acción antibacteriana de mayor duración en comparación con geles o cremas antibacterianas. Los apósitos antibacterianos además de servir como protectores farmacológicos temporales también sirven como protectores físicos en contra de microorganismos como bacterias.

2.1. Alternativas en el mercado para el tratamiento de quemaduras.

Actualmente, entre los apósitos antibacterianos más representativos en el mercado nacional y/o internacional se encuentran los siguientes:

- **Mepilex Tranfer Ag®**, USA. Espuma de poliuretano con sulfato de plata. No se puede aplicar a personas con sensibilidad a la plata. El efecto de la plata dura máximo siete días. Su precio es de \approx MNX\$59.00 por cm^2 (12).
- **TheraBond®**, USA. Tela de nylon con plata enchapada. No tiene una textura suave, no puede aplicarse a personas con sensibilidad a la plata y requiere de un apósito absorbente adicional. Provee una barrera contra bacterias hasta por catorce días. Su precio es de \approx MNX\$24.00 por cm^2 (13).
- **Acticoat Flex 3®**, USA. Es una capa de poliéster flexible poco adherente recubierta de plata nano-cristalina. Su efectividad se conserva durante tres días y su precio es de \approx MNX\$20.00 por cm^2 (14).
- **Puracol Plus Ag+®**, USA. Matriz estéril de colágena bovina y cloruro de plata. Se debe cubrir con otro apósito después de ser aplicado para su protección, cuando se retira se encuentra en forma de gel. Tiene un efecto máximo de siete días. Su precio es de \approx MNX\$396.00 por cm^2 (15).
- **Aquacel™ Extra Ag™**. Membrana compuesta por fibras de carboximetilcelulosa sódica con plata iónica y se requiere de un apósito secundario que mantenga el apósito adherido a la lesión. Su precio es de \approx MNX\$3.26 por cm^2 . El apósito puede permanecer aplicado sobre la lesión hasta por siete días (16).

La gran mayoría de los apósitos antibacterianos están hechos a base de plata (Ag); la Ag se encuentra en los apósitos de varias formas y su cantidad total varía considerablemente; sin embargo, su mecanismo de acción antibacteriano es el mismo independientemente de su forma de presentación (17). En forma elemental la plata no es reactiva; para ser bactericida los átomos de Ag deben oxidarse y convertirse en iones con carga positiva (Ag^+) (17,18). La plata elemental se ioniza al exponerse al aire pero lo hace con más facilidad cuando se expone a un medio acuoso como agua (H_2O) o el exudado de una herida. En el caso de los compuestos de Ag que contienen iones Ag^+ unidos a iones o moléculas con carga negativa, cuando se exponen a medios acuosos los iones de plata se separan del compuesto. Los iones de Ag^+ se unen electrostáticamente a las membranas celulares que se encuentran cargadas negativamente; los iones de plata alteran la función celular al unirse a proteínas interfiriendo en la producción de energía, la función enzimática y la replicación celular lo que desestabiliza la pared de la célula y causa fuga celular. Los iones de plata son activos contra una gran variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (19–22). Al ser absorbida por el cuerpo, la Ag se elimina principalmente por vía biliar en las heces y también por la orina. La plata en los apósitos genera la liberación continua de los iones del metal durante un período de tiempo, y cuando una cantidad excesiva de plata se aplica a través de los medicamentos utilizados por vía tópica, el resultado puede ser una coloración grisácea en la piel conocida como argiria o argirosis (17), i.e. intoxicación producida por la ingestión o contacto con plata debido a la acumulación de

depósitos de plata en los tejidos que deriva, principalmente, en la coloración grisácea del tejido (23). Un estudio realizado en quemaduras tratadas con un apósito con plata nano-cristalina mostró que después de cinco días, su uso causó argiria y una elevación significativa en las concentraciones de plata en la sangre (107 ng/g) y en la orina (28 ng/g); cuando el uso fue suspendido las concentraciones de plata en la sangre regresaron a la normalidad dentro de los siguientes 90 días. Se desconoce la cantidad total de plata necesaria para producir argiria o argiriosis, pero se ha propuesto un contenido corporal total de entre 3.8 g y 6.4 g. Los factores que influyen en la capacidad del apósito para destruir bacterias son el contenido de plata, su disponibilidad, su distribución en el apósito y la capacidad del apósito de establecer un firme contacto con la superficie de la herida (conformación del apósito) (18). En los últimos años, se ha cuestionado el uso de los apósitos con plata en el cuidado de las heridas por una falta percibida de costo-efectividad, y dudas sobre su seguridad. En algunos ámbitos sanitarios, esto ha llevado a reducir el uso de los apósitos de plata o a retirarlos por completo (18).

Por otro lado, y con relación a los métodos basados en IT para promover la reparación del tejido dañado durante el tratamiento de quemaduras, existen diversos sustitutos dérmicos y/o epidérmicos comerciales (no todos se encuentran disponibles en México), estos pueden estar constituidos de células, biomateriales naturales y/o sintéticos o de la combinación de ellos; los ejemplos más representativos son:

- **Epicel®.** Monocapa cultivada *in vitro* de queratinocitos autólogos. Es utilizado como cobertura permanente de la herida, presenta un riesgo mínimo de infección y de rechazo inmune. Sin embargo, requiere de 3 a 4 semanas de cultivo, son difíciles de manipular (frágiles) y tienen poca estabilidad mecánica; además, el costo puede variar entre MNX\$ 11,000 y MNX\$ 200,000 por 1% de la superficie total del cuerpo.
- **Integra®.** Material bicapa, una capa desechable compuesta de silicona como una epidermis artificial enlazada a colágena de bovino porosa entrecruzada con glutaraldehído y una segunda capa compuesta de condroitina de tiburón como una capa dérmica. A pesar de que se asemeja a muchas características de la piel humana, el riesgo de infección y proceso de dos tiempos (debido a la sustitución de la capa de silicona por autoinjerto de espesor parcial) restringe el uso de este sustituto. Su precio era de MNX\$112.0 por cm² en 2012 (24).
- **Alloderm®.** Se compone de piel cadavérica humana descelularizada. Tiene una limitación importante debido a la posibilidad de transmisión de enfermedades. Su precio era de MNX\$124.0 por cm² en 2002 (25).
- **Epifast®.** Sustituto epidérmico creado y distribuido por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), en México (en el año 1999). Son aloinjertos cultivados *in vitro* de queratinocitos derivados de prepucio de neonato crio-preservados (-70 °C). El cultivo está cubierto por una capa de grasa vaselinizada estéril que protege al epitelio y permite su fácil manipulación.
- **TransCyte®.** Es una silicona unida a nylon y colágena de porcino que contiene fibroblastos alogénicos de prepucio de neonato. Este tipo de sustitutos ha sido evaluado

para tratar quemaduras de segundo grado; sin embargo, deben ser retirados después de 7 a 14 días puesto que se fabrican con material sintético no biodegradable. Su precio era de MNX\$165.30 por cm² en 2002 (25).

- **Apligraf®.** Queratinocitos alogénicos cultivados sobre una matriz de colágena bovina tipo I y fibroblastos dérmicos también alogénicos. Es considerado como el mejor equivalente de piel en el mercado ya que ha mostrado la capacidad de estimular los factores de crecimiento y citocinas similares a la piel humana a través de las células cultivadas (26). Sin embargo, las principales limitaciones de este injerto son su costo elevado, rechazo inmune y vida útil limitada. Su precio era de MNX\$298.20 por cm² en 2002 (25).

A pesar de que el progreso en ciencia y tecnología de biomateriales, y en el cultivo celular ha permitido la producción de sustitutos de piel que contribuyen al tratamiento de lesiones por quemaduras; aún es necesario continuar la investigación en esa dirección para lograr una mejor funcionalidad del tejido reparado en menos tiempo, aumentar la disponibilidad para cubrir áreas extensas, disminuir los costos de obtención-fabricación y disminuir el rechazo inmune.

2.2. Materiales en desarrollo.

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes alternativas terapéuticas que facilitan el proceso de curación de lesiones por quemadura tales como injertos autólogos, injertos homólogos o alogénicos, injertos heterólogos o xenogénicos, sustitutos dérmicos y/o epidérmicos acelulares o celulares; así como geles, cremas y apósitos antibacterianos (cuyo agente antibacteriano es comúnmente plata). Sin embargo, las diferentes soluciones todavía no han logrado superar algunos obstáculos tales como la escasez de los sitios donantes, la capacidad para tratar lesiones de gran extensión, la recuperación de la funcionalidad del tejido, el rechazo inmune y los costos elevados de producción y comercialización. Por lo tanto, se continúan investigando nuevas alternativas para desarrollar tecnologías dirigidas al tratamiento de lesiones dermo-epidérmicas por quemadura que traten y/o prevengan infecciones en la lesión mientras que permitan reparar el tejido y recuperar la funcionalidad de la piel con una mayor efectividad.

Debido a que es biológicamente complejo obtener un material que promueva la adhesión, proliferación y diferenciación de fibroblastos y que al mismo tiempo conserve la propiedad de inhibir la adhesión y proliferación bacteriana, en este trabajo se fabricaron dos diferentes materiales para ser colocados en capas sobre la lesión como un tratamiento integral de quemaduras de segundo grado profundo, en el que la capa externa (expuesta al ambiente) funcione como una barrera contra bacterias para evitar infecciones en la lesión y en el que la capa interna (en contacto con la lesión) funcione como andamio celular que después de ser cultivado *in vitro* con células dérmicas (fibroblastos) sea colocado en el lecho de la herida para promover la reparación del tejido; por lo tanto, este andamio se desempeñaría como un acarreador celular.

Idealmente, un apósito antibacteriano (capa externa expuesta al ambiente) debería proteger a la lesión de posibles infecciones y/o tratar infecciones en la lesión, no generar un daño irreversible al tejido, debería tener la capacidad de cubrir grandes extensiones, tener una buena conformación a la herida, esterilizarse mediante un proceso sencillo y tener un costo de fabricación moderado. Por otra parte, un andamio celular dérmico (capa interna en contacto con la lesión) no debería generar daño a las células (i.e. no ser citotóxico), ni generar rechazo inmune significativo, debería promover la adhesión, proliferación y diferenciación de fibroblastos, poseer una estabilidad estructural para el adecuado manejo quirúrgico durante la colocación en la herida, tener una buena conformación a la herida, requerir un proceso de esterilización sencillo y tener costo de fabricación moderado. Para hacer frente a los requerimientos que deben cumplir el apósito antibacteriano y el andamio celular, ambos materiales se desarrollaron combinando diferentes compuestos pues de esta manera se tiene la posibilidad de obtener un material con características y propiedades específicas que no tienen los compuestos individuales, a este tipo de materiales se les denomina *compositos* (9).

Las dos capas (apósito antibacteriano y andamio celular) fueron fabricadas mediante la técnica de electrohilado, la cual permite generar materiales a base de polímeros de gran extensión con estructura macro-métrica plana (de espesores $\approx 0.05 - 3.0$ mm) y con una estructura micro-métrica de fibras entrecruzadas con diámetros que van desde unos cuantos micrómetros hasta escalas nanométricas; el electrohilado ha cobrado interés tanto en la academia como en la industria debido a la gran variedad de fibras poliméricas entrecruzadas que se pueden obtener manipulando las variables del sistema y a la posibilidad de producción a gran escala (27). Las fibras formadas mediante electrohilado poseen características muy atractivas para el desarrollo de andamios celulares, principalmente para el tratamiento de heridas de piel, ya que permiten producir materiales macroscópicamente planos como la piel y con características micro-morfológicas similares a las de la MEC nativa de la dermis (26). Además, esta micro-morfología fibrilar también es ventajosa para el apósito antibacteriano ya que las nano- y micro-fibras tienen una superficie de contacto superior al material en bulto (28). Adicionalmente, los materiales poliméricos electrohilados son flexibles y ofrecen una excelente capacidad de conformación a superficies discontinuas lo que mejoraría el contacto de los materiales con las lesiones con formas irregulares; por lo tanto, la protección de la lesión se incrementaría (26).

2.2.1. Apósito antibacteriano.

Uno de los mayores desafíos que enfrentan los tratamientos de lesiones de la piel son las infecciones bacterianas ya que se han vuelto cada vez más difíciles de tratar debido a la rápida aparición de bacterias resistentes a los antibióticos (29–34). Recientemente, el uso de nanopartículas (nps) ha surgido como una estrategia novedosa para enfrentar este desafío, ya que las nps generalmente exhiben una actividad antibacteriana mejorada en comparación con los materiales antibacterianos en bulto (35). Diferentes compuestos de zinc han manifestado propiedades antibacterianas; particularmente, las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO nps)

han mostrado ser efectivas contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas tales como *Escherichia coli* (*E. coli*) (31–33,36,37), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (31,33,36,37), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) (33,37), *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (33,38), *Campylobacter jejuni* (39), *Candida albicans* (*C. albicans*) (40), etc. Es importante mencionar que durante el tratamiento de quemaduras las bacterias *S. aureus* y *E. coli* se encuentran entre los focos de infección más prevalentes (21). Además, el ZnO es considerado como un material generalmente seguro (GRAS) por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA, Food and Drug Administration; 21CFR182.8991), es químicamente estable y un material semiconductor con alta eficiencia fotocatalítica que absorbe un amplio espectro de radiación ultravioleta (UV) (31,36,37,41,42). El ZnO es utilizado comúnmente como aditivo para la conservación de alimentos, pomadas antisépticas, cosméticos y bloqueadores solares (36,41,42). Adicionalmente, el zinc ocupa el séptimo lugar en la producción minera del país (43), lo que lo hace un material disponible y de costo moderado.

El efecto antibacteriano de las ZnO nps se atribuye principalmente a tres mecanismos (31–33,36–40): 1) actividad fotocatalítica debido a que es un material semiconductor, cuando las ZnO nps son iluminadas con una energía mayor a la de su brecha prohibida (E_g), se generan pares electrón-hueco y en presencia de moléculas de agua (H_2O) los huecos en la banda de valencia separan a las moléculas de H_2O en radicales hidroxilos (OH^\cdot) y cationes hidrógeno o protones (H^+). Por otra parte, los electrones de la banda de conducción ionizan a las moléculas de oxígeno generando radicales anión superóxido (O_2^\cdot). Posteriormente, el radical O_2^\cdot y el H^+ reaccionan generando al radical peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (este proceso se ilustra en el esquema de la Figura 2); estos radicales libres altamente reactivos (O_2^\cdot , H_2O_2 y OH^\cdot), que son especies reactivas de oxígeno (ROS), ocasionan una fuga de contenido intracelular debido al daño oxidativo que le generan a la membrana celular bacteriana, conllevando a una eventual muerte celular. La fotocatalisis, en general, es un fenómeno superficial en el que las reacciones ocurren en la superficie del fotocatalizador (en este caso en la superficie de las ZnO nps); por lo tanto, cuanto más grande sea la superficie expuesta, la reacción será más eficiente (44); 2) daños mecánicos a las membranas bacterianas debido a la superficie abrasiva de las nps también han sido reportados, lo que genera fuga del contenido intracelular y la muerte bacteriana; y 3) la presencia de iones Zn^{2+} que al interactuar electrostáticamente con la membrana celular, cargada negativamente, la desestabiliza y causa fuga del contenido intracelular derivando en la muerte de la bacteria. Sin embargo, se ha reportado que la citotoxicidad (hacia células eucariotas humanas) de los iones Zn^{2+} formados en las ZnO nps no es significativa debido a que las ZnO nps no liberan gran cantidad de los mismos y, además, a bajas concentraciones los iones Zn^{2+} son metabolizados por vías naturales dado que este es un ion metálico esencial en todo organismo (45).

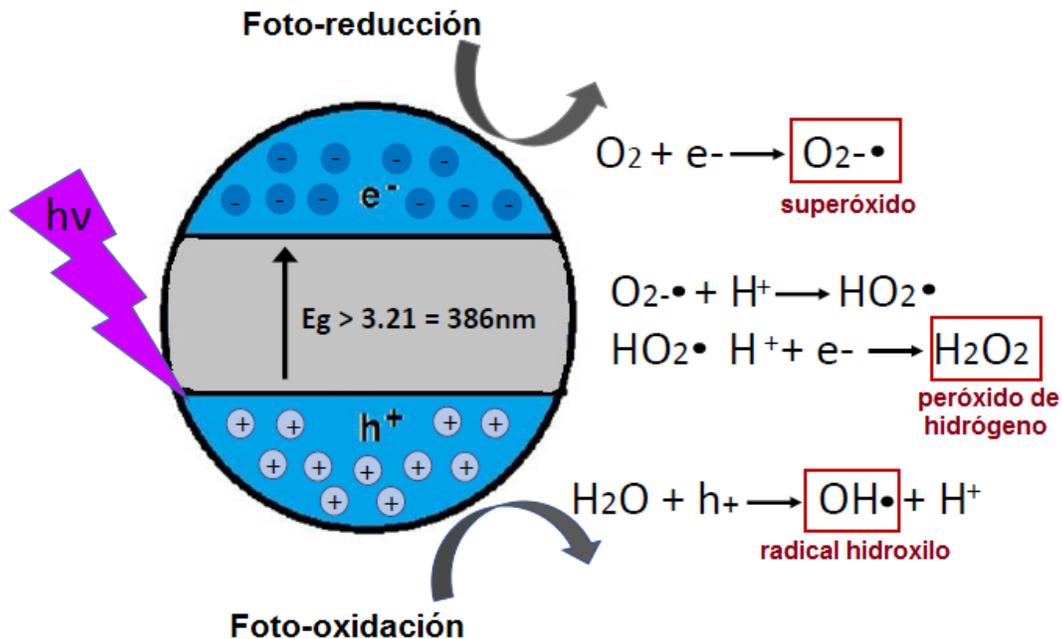


Figura 2. Esquema de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante fotocatalisis por las nanopartículas de ZnO.

Uno de los retos en el uso de nps como agente antibacteriano es evitar su aglomeración ya que disminuye su área superficial de contacto y con ello su eficiencia (34). Además, aunque las nps han ganado popularidad como agentes antimicrobianos, no existen datos suficientes que demuestren que la liberación incontrolada de las nps en el organismo no genera efectos secundarios nocivos a largo plazo (46). Un método para restringir la liberación de nps y resguardar la seguridad de los tejidos es embeberlas (fijarlas) en matrices poliméricas biocompatibles, como una matriz de policaprolactona (PCL); (47). Es por ello, que el apósito antibacteriano fue fabricado embebiendo ZnO nps en una matriz fibrilar electrohilada de PCL; de esta manera se limita la liberación de las nps y se conserva su actividad, al mismo tiempo que las nps se mantienen dispersas pero inmóviles en las fibras. La PCL es un polímero sintético semi-cristalino aprobado por la Agencia de Administración de Drogas y Alimentos de USA (FDA, Food and Drug Administration) (47); es ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas incluyendo material de sutura, andamios para ingeniería de tejidos, apósitos para heridas y hemostáticos (36), debido a sus propiedades físico-químicas tales como su bajo punto de fusión (48), estabilidad estructural (49), resistencia a la tracción (48), plasticidad, tasa lenta de biodegradación comparada con los polímeros naturales (50) y alta capacidad de electrohilado (47–50). A pesar de que ya se ha reportado el uso de ZnO nps en fibras electrohiladas para aplicaciones antibacterianas por ejemplo: fibras de ZnO nps/PCL (36), ZnO nps/acetato de celulosa (51), ZnO nps/quitosano/polivinil alcohol (40), ZnO nps/PCL/Gelatina (52), y alginato de sodio/PVA/ZnO nps (53); en estos estudios las nps se han dispersado a través de toda la fibra (o sea, dispersas en fibras convencionales con estructura uniaxial), lo que deriva en una reducción del área de contacto entre las nps y el medio (en este caso entre las nps y las

bacterias) debido a que algunas nps quedan atrapadas en el centro/núcleo de las fibras. Dado que el efecto antibacteriano de las nps depende principalmente de su contacto con las bacterias, al tener las nps dispersas a lo largo de toda la fibra, y no sólo en la superficie, no se espera que las nps que se encuentran en el centro de las fibras contribuyan de manera significativa a la actividad antibacteriana lo que implica aumentar la concentración de las nps para aumentar el número de ellas en la superficie (52). Para contrarrestar esta desventaja, en este trabajo las nps se embebieron principalmente en el exterior de las fibras de PCL lo que aumenta el área de contacto y con ello, la eficiencia antibacteriana del apósito antibacteriano (i.e. misma actividad antibacteriana con una concentración de nps menor). Para lograrlo, se fabricaron fibras con estructura coaxial (estructura núcleo-coraza) modificando la configuración del sistema de electrohilado convencional. El electrohilado coaxial permitió electrohilar simultáneamente dos diferentes soluciones dentro de una sola estructura fibrilar formada por un núcleo y una coraza; así, el apósito antibacteriano fue fabricado de fibras con estructura coaxial electrohilando simultáneamente soluciones de PCL (para el núcleo-centro de las fibras) y de PCL con ZnO nps (para la coraza-superficie de las fibras). Para llevar a cabo el proceso de electrohilado es necesario partir de una disolución polimérica (polímero disuelto en un disolvente); entonces, para fabricar las fibras con estructura coaxial de PCL en el centro y PCL con ZnO nps en el exterior, las disoluciones poliméricas se obtuvieron usando ácido acético (AcAc) como disolvente el cual es considerado un “green-solvent”, es decir un disolvente potencialmente menos tóxico que otros disolventes comúnmente usados para electrohilar fibras de PCL (54,55). Es importante considerar que de las especies naturalmente ionizadas del AcAc (ion hidronio y ion acetato), el ion acetato (CH_3COO^-) puede reaccionar con el ion Zn^{2+} del ZnO y formar acetato de zinc ($\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$); sin embargo, el acetato de zinc es una sal que también posee propiedades antibacterianas principalmente por medio de la liberación de iones de Zn a partir de su disolución y se ha reportado que es una de las sales de Zn antibacterianas menos citotóxicas (a células mamíferas) (56–59). En resumen, se obtuvo un apósito con propiedades antibacterianas a partir de nps a base de zinc (óxido de zinc y acetato de zinc) embebidas en la superficie de una matriz fibrilar de PCL fabricada mediante la técnica de electrohilado coaxial.

2.2.2. Andamio celular.

La IT involucra el uso de células de origen autólogo, alogénico o xenogénico que son sembradas *in vitro* en andamios compuestos de materiales biocompatibles para formar un constructo que finalmente sea implantado en el cuerpo del paciente para incentivar la restauración del tejido u órgano dañado. Al emplear células autólogas para llevar a cabo este procedimiento se disminuiría drásticamente el rechazo inmune ya que las moléculas de histocompatibilidad (HLA) de las células del constructo serían compatibles con las de las células del organismo receptor (60). Por su parte, la ciencia y la ingeniería de materiales es la encargada del diseño y fabricación del andamio que es una estructura o soporte temporal que permite la adhesión, proliferación y diferenciación celular, así como la síntesis de matriz extracelular (MEC); este andamio provee de integridad estructural al tejido en formación (61).

Como ya se mencionó, los sustitutos dérmicos en el mercado restauran las funciones de la piel con éxito limitado principalmente porque no logran imitar la morfología y la composición química de la MEC nativa (26). La MEC nativa de la dérmis es sintetizada y mantenida por los fibroblastos, y tiene diversas funciones tales como brindar soporte a las células, transmitir nutrientes y eliminar productos de desecho; está constituida por material micro-fibrilar altamente poroso y estos poros se encuentran interconectados; el material fibrilar está formado principalmente por tres componentes: colágena, elastina y fibrina. La colágena es la principal componente de la MEC y puede formarse en 27 tipos moleculares diferentes (colágena I a XXVII), las más frecuentes en la piel son las de tipo I y III. Las fibras de colágena se constituyen en haces entrecruzadas de longitudes variables; y sus moléculas se caracterizan por una composición poco frecuente de aminoácidos específicos: glicina, prolina, hidroxiprolina y arginina. Estos aminoácidos tienen un arreglo regular en cada una de las tres cadenas de estas subunidades de colágena. Las células se adhieren a las moléculas de colágena mediante diversas proteínas de adhesión como las integrinas. El material fibrilar elástico está constituido por microfibrillas de fibrina y elastina amorfa y podrían ser alargadas hasta un 150% en relación con su longitud de reposo. Los espacios entre las fibras y las células están constituidos principalmente por glucosaminoglicanos (GAGs) que son moléculas de polisacáridos largos sin ramificaciones que contienen repeticiones de una unidad de disacáridos y funcionan como medio a través del cual las células pueden migrar, difundir las sustancias nutritivas y sus productos de desecho (10,47). En la Figura 3 se ilustra de manera simplificada la morfología de la MEC. Al diseñar un andamio celular para la restauración de una herida dermoepidérmica como estrategia de ingeniería de tejidos, se tiene el enorme reto de diseñar un andamio que imite la MEC en su morfología y composición; sin embargo, aún no se ha logrado desarrollar un andamio con tales características.

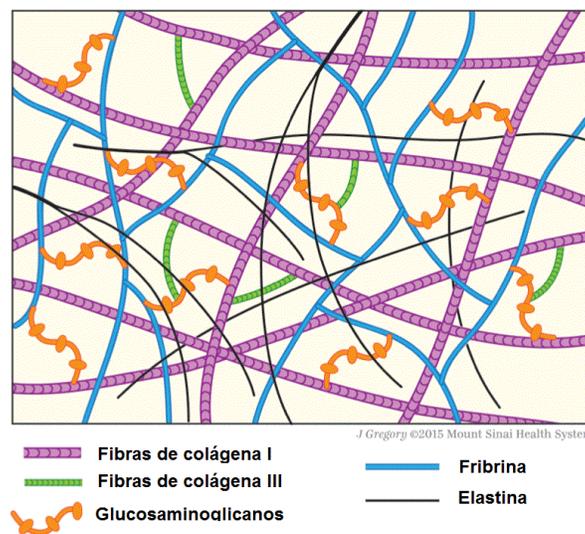


Figura 3. Imagen que ilustra de manera simplificada la morfología de la matriz extracelular MEC nativa; imagen modificada (J. Gregory 2015 Mount Sinai Health System).

En este trabajo, la técnica de electrohilado también se utilizó para fabricar el andamio ya que las membranas electrohiladas poseen una estructura fibrilar, porosa y con poros interconectados que se asemeja a la morfología de la MEC nativa. Como ya se mencionó, esta técnica nos permite obtener fibras con espesores nano- y micrométricos, similares a las fibras de la MEC y con un área superficial de contacto superior a la del material en bulto. En la Figura 4, se muestra el área superficial de las fibras en función a su diámetro y la relación que tienen con el tamaño del diámetro de las fibras de la MEC que se encuentra entre 50-500 nm y la relación con el tamaño de la mayoría de las células humanas que es de $\leq 9 \mu\text{m}$ (26,62). Las fibras electrohiladas son estructuras altamente porosas, con poros interconectados, lo que les ofrece a las células la posibilidad de migrar, transportar nutrientes y desechos. Además, la estructura porosa de estos materiales es particularmente importante en el control de la pérdida de agua por evaporación, permitiendo la permeabilidad de oxígeno y promoviendo la capacidad de drenaje de líquidos en el tratamiento de heridas por quemaduras (63).

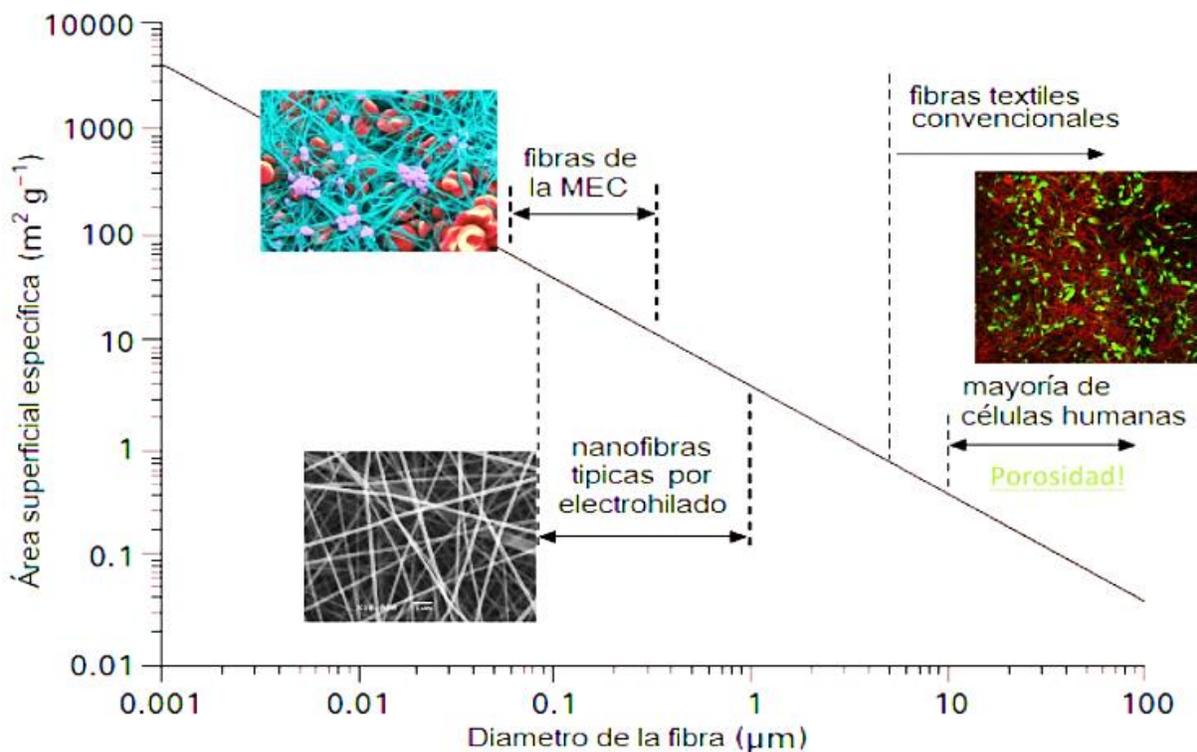


Figura 4. Efecto del área superficial en función del diámetro de las fibras fabricadas por la técnica de electrohilado así como su relación con el tamaño de las fibras presentes en la MEC y con el tamaño de las células humanas; imagen modificada (26).

El diámetro de las fibras debería ser menor que el tamaño de la célula para permitirle formarse alrededor de ella y facilitar su adhesión (26). En un andamio para células dérmicas se busca que los poros de las fibras sean mayores o iguales al tamaño de los fibroblastos ($\approx 10 \mu\text{m}$) para permitir la posible migración (movilidad) de los fibroblastos a través de él. Además, es

importante que el andamio sea biocompatible, degradable, que promueva la adhesión, proliferación y diferenciación de los fibroblastos que serán cultivados, que sea estructuralmente estable para su adecuado manejo durante el tratamiento y que tenga un proceso de esterilización sencillo. Conseguir todas estas propiedades de un solo polímero es muy complejo; por lo que actualmente se emplean mezclas de polímeros de origen natural y sintético en trabajos experimentales en el campo de la IT. De esta manera, se busca obtener materiales biodegradables con propiedades mecánicas adecuadas para su uso en tratamientos clínicos y con una composición química favorable para el cultivo celular *in vitro*.

Las propiedades físico-químicas del material que servirá como andamio, tales como la micro-estructura, mojabilidad y presencia de grupos funcionales tienen una fuerte influencia en la interacción célula-material (64–66). En consecuencia, se ha demostrado que la interacción célula-material puede ser mejorada mediante modificaciones físico-químicas del andamio mediante su funcionalización con la introducción de grupos químicos como grupos amino, hidroxilo y carboxilo (67,68). En este trabajo, el andamio fibrilar electrohilado (capa interna, en contacto con la lesión) fue fabricado de un material compuesto (o composito), combinando el polímero natural gelatina (Gel) y el polímero sintético policaprolactona (PCL). La Gel es un polímero natural obtenido a partir de la hidrólisis parcial de la colágena (47) que tiene cadenas peptídicas α -helicoidales, por lo tanto la Gel está compuesta principalmente de los aminoácidos que constituyen la colágena; además, su baja inmunogenicidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad, mojabilidad (superficie hidrofílica) y su capacidad de formar fibras por electrohilado la hace potencialmente útil como material para andamios celulares (50,71,72). Debido a que la MEC está parcialmente compuesta de proteínas de la familia de la colágena, la Gel se ha estudiado y utilizado ampliamente como apósito para curación de heridas y como andamio dérmico en el campo de la ingeniería de tejidos (50,62,71). La Gel es comúnmente usada para revestir superficies de materiales poliméricos hidrofóbicos para aumentar su hidrofiliidad y así mejorar la interacción material-célula (50). Los andamios de Gel por electrohilado probados *in vitro* para estudiar la adhesión y proliferación de fibroblastos fetales revelaron una alta viabilidad y organización celular (50); debido a que conserva grupos funcionales presentes en la MEC, aumentando la mimeticidad de su composición (47). Sin embargo, a pesar de sus propiedades biológicas favorables y de que la Gel puede ser electrohilada, las propiedades mecánicas de las fibras electrohiladas de Gel son muy débiles lo que limita su aplicación como andamios celulares (47). Además, las fibras de Gel experimentan una rápida degradación y por ello, usualmente se emplean entrecruzantes para prevenirla; sin embargo, la mayoría de los entrecruzantes empleados para modificar químicamente la Gel tales como glutaraldehído, genipina y carbodiimida tienen asociados riesgos de residuos citotóxicos (73–75).

Por otro lado, el uso de PCL en aplicaciones biológicas como tal, está limitado por su alta hidrofobicidad y su baja bioactividad por la escasez de grupos funcionales. No obstante, es posible reducir estas desventajas combinando la PCL con otro material que tenga las características deseadas como la Gel (48,49). Igualmente, la incorporación de un polímero

sintético como la PCL, que ha mostrado no inducir inflamación y ayudar en el tratamiento de heridas de espesor parcial y profundo (76), podría incrementar las propiedades mecánicas de la Gel y con esto, su uso como andamio. Como las fibras de PCL presentan una superficie hidrofóbica, lo que reduce la adhesión y proliferación celular, la combinación Gel/PCL podría disminuir su hidrofobicidad y con ello mejorar la adhesión y proliferación celular en su superficie.

En estudios comparativos *in vitro* (usando fibroblastos fetales) e *in vivo* (empleando ratas de la cepa wistar) entre fibras fabricadas por electrohilado de PCL y Gel (50), se concluyó que las fibras de PCL mostraron una adhesión y proliferación celular pobre, pero funcionó como una barrera física para evitar la contracción de la herida (lo que forma cicatrices), mientras que las fibras de Gel mostraron excelente adhesión y proliferación *in vitro* pero poca estabilidad estructural. Como se mencionó anteriormente, los andamios compuestos de mezclas de polímeros sintéticos y naturales (como la PCL y la Gel) han ganado interés debido a sus propiedades biológicas y mecánicas favorables para aplicaciones en ingeniería de tejidos; sin embargo, la separación de fases o falta de miscibilidad entre polímeros naturales y sintéticos, debido a sus propiedades fisicoquímicas muy distintas (p. ej., solubilidad e hidrofiliidad), tiene un impacto negativo importante en el proceso de fabricación de andamios y, eventualmente, en la adhesión y proliferación celular (77). Particularmente, la separación de fases en una disolución polimérica natural/sintética tiene efectos significativamente negativos en la fabricación de andamios por electrohilado ya que esto limita el tiempo de electrohilado (solo se puede electrohilar de manera efectiva el tiempo que la disolución se mantenga bien mezclada) y genera fibras con estructuras no homogéneas y segregadas por fases como resultado de la falta de interacciones moleculares entre los constituyentes.

La gelatina (Gel) es una proteína típica que contiene grupos amino y carboxilo, y tiene la capacidad de responder al estímulo ambiental; se puede disolver en un gran número de disolventes para formar una disolución exponiendo grupos próticos en la superficie y protegiendo grupos apróticos apolares en el interior de la proteína. Sin embargo, cuando las soluciones de Gel se mezclan con la PCL las moléculas de Gel son forzadas a retroceder, debido a su exposición a la PCL que es altamente hidrofóbica, a una conformación compacta desde su estado expandido envolviendo los grupos hidrofílicos internos y exponiendo sus grupos hidrofóbicos para interactuar con las moléculas de PCL. Las moléculas de Gel compactadas pueden adherirse entre ellas y formar agregados de tamaños aumentados, que pueden ser lo suficientemente grandes y pesados para precipitarse en el fondo del recipiente si se dejan reposar durante un período de tiempo (ver esquema de la Figura 5).

Por todo lo anterior, es fundamental proponer alternativas para la producción efectiva de andamios híbridos natural/sintético (como Gel/PCL) restringiendo la separación de fases en las soluciones poliméricas para electrohilado.

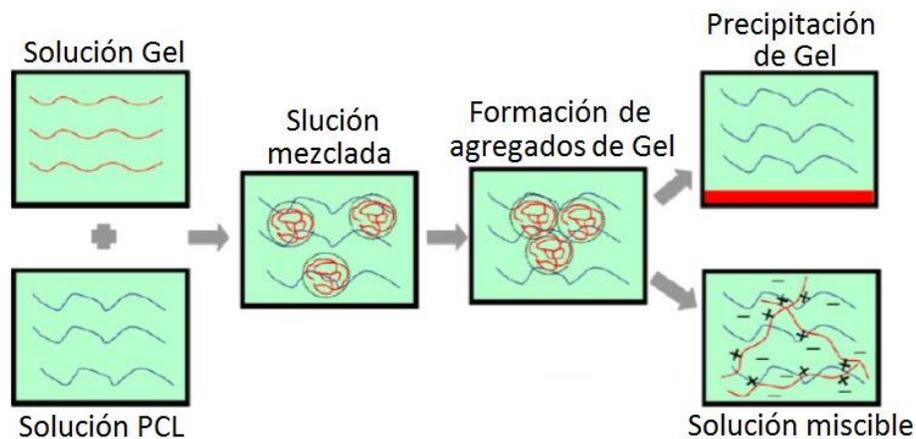


Figura 5. Esquema del posible mecanismo de separación de fases entre gelatina (Gel) y policaprolactona (PCL) en una disolución mezclada; imagen modificada (78).

Se ha identificado el fenómeno de separación de fases en soluciones de Gel y PCL para electrohilado cuando la cantidad de Gel en la disolución se incrementa hasta 20-30 wt.% respecto al peso total polimérico (79,80); y que una separación de fases severa toma lugar cuando los componentes son mezclados casi en partes iguales (79). Por el contrario, las respuestas celulares como adhesión y proliferación se han mostrado maximizadas en andamios de Gel/PCL que contienen más de 30 wt.% de Gel (77,81,82). Recientemente, Bei Feng et al. reportaron un incremento en la miscibilidad de una disolución polimérica de Gel y PCL empleando un cosolvente de hexafluoroisopropanol (TFE) con tres diferentes cantidades de ácido acético (de 10 a 30 μ L de AcAc en 10 mL de TFE) en la disolución para electrohilado, los resultados indicaron que entre mayor fue la cantidad de AcAc en el cosolvente, la conductividad de la disolución fue mayor, mientras que su tensión superficial y su viscosidad disminuyeron, este cambio de propiedades de la disolución facilitaron el proceso de electrohilado e incrementaron la miscibilidad de la disolución polimérica de ambos polímeros (78); se propuso que este resultado se debió al potencial que tiene la molécula de Gel de responder al estímulo ambiental; cuando el valor de pH de la disolución es inferior a su punto isoeléctrico (IP = 6.14; (78)), las moléculas de Gel se cargan positivamente mediante la protonación de grupos amino y se vuelven mutuamente excluyentes, de manera que las moléculas de Gel se expanden y permanecen solubles penetrando en la fase de PCL formando una disolución un más miscible.

Con base en lo reportado y en nuestro trabajo previo (dónde se empleó el AcAc como disolvente para electrohilar fibras de PCL), el andamio fibrilar de Gel/PCL fue electrohilado empleando AcAc como único disolvente para disolver ambos polímeros juntos (Gel y PCL) y obtener las soluciones poliméricas de electrohilado; se buscó que la acidez del AcAc protonara los grupos amino y los grupos carboxilo de las moléculas de Gel (83,84) lo que estiraría sus cadenas moleculares ayudando a que se mantengan disueltas en la disolución polimérica y penetren más fácilmente en las cadenas poliméricas de la PCL; de esta manera se logró obtener un andamio híbrido natural/sintético de Gel/PCL con una buena miscibilidad entre ambos

polímeros mezclados. Asimismo, el uso de un único disolvente que además de incrementar la miscibilidad entre ambos polímeros facilite de manera efectiva el proceso de electrohilado, es ventajoso para mantener las propiedades del material homogéneas y estables durante su uso. Además, como ya se mencionó, el AcAc es menos tóxico que otros disolventes comúnmente usados para electrohilar fibras de PCL y de Gel/PCL (como el TFE y Trifluoroetanol, (85–90)); así que, este procedimiento también disminuiría la toxicidad del proceso de fabricación. En nuestro conocimiento, este sería el primer reporte del uso de un único disolvente (usando AcAc) para la preparación en un solo paso de soluciones de electrohilado para la fabricación de andamios de Gel/PCL.

En resumen, en este trabajo se desarrollaron dos diferentes materiales que en conjunto se espera que sean empleados como un tratamiento integral para quemaduras de segundo grado profundo (heridas dermoepidérmicas). Este tratamiento estaría integrado por; 1) un apósito antibacteriano (expuesto al ambiente) para proteger a la lesión de microorganismos patógenos y/o oportunistas, particularmente bacterias, compuesto de nps basadas en Zn (Zn-nps) embebidas en la superficie de fibras electrohiladas de PCL y; 2) un andamio cultivado *in vitro* con fibroblastos (en contacto con la herida) compuesto de fibras electrohiladas de una mezcla homogénea de Gel y PCL, empleando ácido acético como disolvente, que incentive la cicatrización y reparación del tejido dañado al ser colocado en el lecho de la herida.

3. PROPUESTA

Desarrollar materiales con el potencial de ser empleados como tratamiento integral de lesiones dermoepidérmicas por quemaduras (segundo grado profundo). Se espera que este tratamiento brinde la posibilidad de proteger a la lesión de bacterias externas y que a su vez, a partir de un enfoque de IT, se tenga un andamio que al ser cultivado *in vitro* con fibroblastos (células dérmicas), éstos promuevan mediante la síntesis de factores de crecimiento la migración de fibroblastos nativos de la zona sana a la zona dañada después de ser colocado en el paciente; y así repoblar la herida y promover el restablecimiento de la dermis y posteriormente de la epidermis. Debido a la dificultad biológica de obtener un material que promueva la adhesión, proliferación y diferenciación de fibroblastos y que al mismo tiempo posea la propiedad de inhibir la adhesión y proliferación de bacterias, se desarrollaron dos diferentes materiales con propiedades complementarias para ser empleados como un tratamiento integral al colocarlos en capas sobre la lesión. La primera capa o capa externa (expuesta al ambiente) actuaría como apósito antibacteriano para prevenir infecciones; y la segunda capa o capa interna (en contacto con la lesión) operaría como andamio cultivado con células dérmicas (fibroblastos) que al ser colocada en la lesión (con las células en contacto directo con la herida) para incentivar la reparación del tejido como se muestra en la Figura 6.

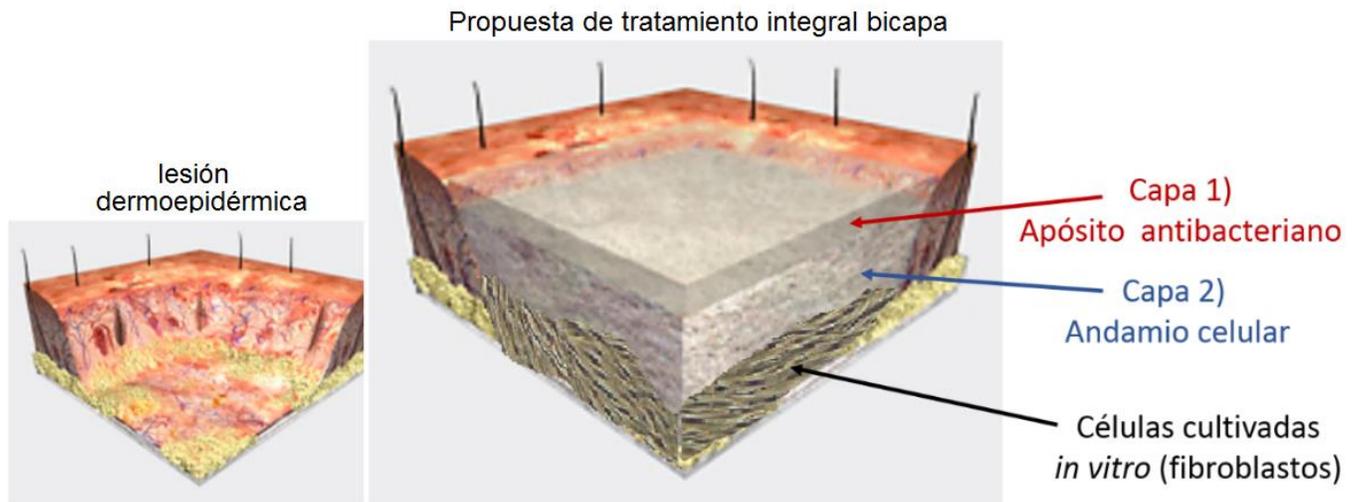


Figura 6. Imagen que ilustra el modo de empleo propuesto de los dos materiales fibrilares desarrollados en este trabajo para el potencial tratamiento integral bicapa de lesiones dermoepidérmicas, principalmente de lesiones causadas por quemaduras de segundo grado profundo; la primera capa o capa 1) estaría expuesta al ambiente y actuaría como un apósito antibacteriano para proteger a la lesión de posibles infecciones, y la segunda capa o capa 2) que estaría en contacto con la lesión, se desempeñaría como andamio celular cultivado *in vitro* con células dérmicas (fibroblastos) para incentivar la reparación del tejido. (La imagen fue obtenida y modificada de <http://www.ilstraining.com>).

4. HIPÓTESIS

Los dos materiales desarrollados durante esta investigación para el tratamiento integral bicapa de lesiones por quemadura de espesor profundo deben desempeñar funciones diferentes, o sea, la primera capa (expuesta al ambiente) debe tener propiedades antibacterianas para desempeñarse como un apósito antibacteriano y la segunda capa (en contacto que la lesión) debe tener propiedades favorables para el cultivo celular para desempeñarse como un andamio celular; es por eso que los dos materiales (las dos capas) se fabricaron, estudiaron y reportaron por separado. Ambos materiales, tanto el apósito antibacteriano como el andamio celular, fueron fabricados usando la técnica de electrohilado, lo que permitió obtener materiales fibrilares planos; uno de ellos con base polimérica (PCL) y nanopartículas antibacterianas basadas en Zn y el otro a partir de una mezcla homogénea de polímeros natural y sintético, Gel y PCL, empleando AcAc; ambos materiales tienen una estabilidad estructural adecuada para su apropiado manejo terapéutico y una excelente conformación para cubrir efectivamente lesiones irregulares.

4.1. Diseño del apósito antibacteriano.

El apósito antibacteriano está formado por fibras de PCL con estructura coaxial, de manera que las nanopartículas a base de Zn, ZnO y acetato de zinc (Zn-nps), con propiedades antibacterianas y con mecanismos antibacterianos diferentes (fotogeneración de ROS y liberación de iones de Zn^{2+}) se encuentran dispersas y embebidas en la superficie de las fibras de PCL y cuyo interior está compuesto únicamente de PCL, como se muestra en el esquema de la Figura 7.

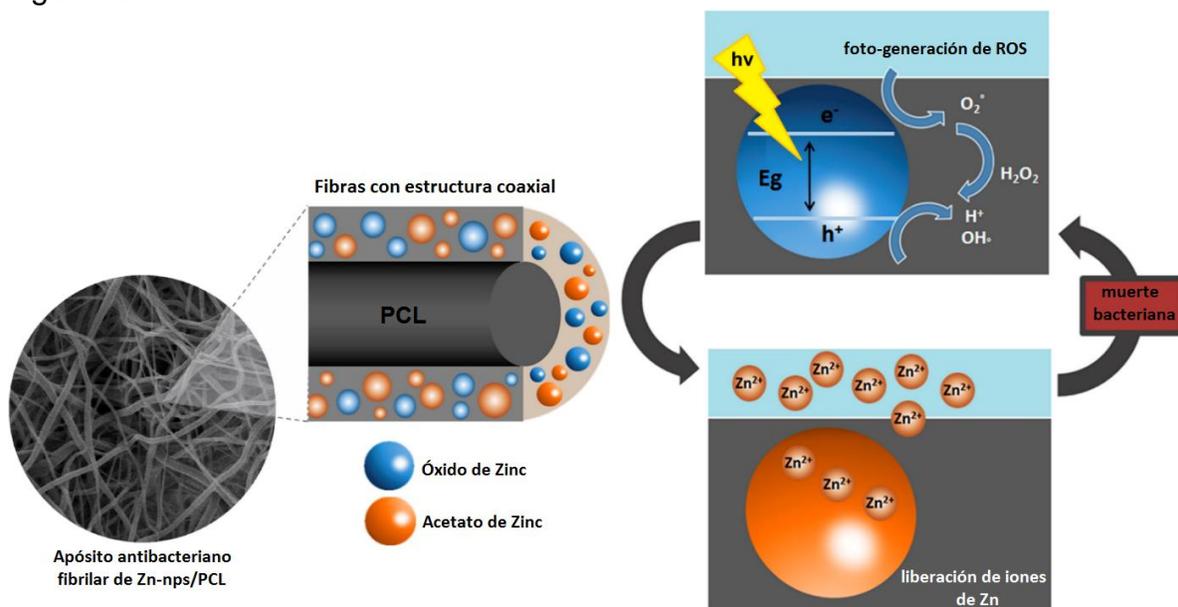


Figura 7. Esquema del apósito antibacteriano compuesto de fibras electrohiladas con estructura coaxial con nanopartículas antibacterianas a base de Zn (ZnO y acetato de Zn) embebidas en su coraza externa (superficie).

Con este diseño, se aprovechan los diferentes mecanismos antibacterianos de las ZnO nps (principalmente la fotogeneración de ROS) y del acetato de Zn (liberación de iones de Zn^{2+}) para mejorar las capacidades antibacterianas del apósito y al estar estas Zn-nps embebidas mayoritariamente en la superficie de las fibras de PCL se incrementa el área de contacto entre las nps y el medio, y se evita desaprovechar las nps que se quedarían atrapadas en el centro de fibras con estructura uniaxial convencional. Al dispersar las nps y fijarlas únicamente en la superficie de las fibras de PCL (fibras con estructura coaxial) se evita que las nps se aglomeren y que disminuya su área de contacto, también se disminuye la posibilidad de que sean liberadas incontroladamente en el organismo receptor, y al mantener las nps antibacterianas embebidas en las fibras se lograría alargar la vida útil de apósito. Con este diseño se busca salvaguardar al tejido sin sacrificar drásticamente las propiedades antibacterianas de las Zn-nps.

4.2. Diseño del andamio celular

Por otro lado, al fabricar un andamio mediante la técnica de electrohilado, se obtiene un material con morfología similar a la de la MEC nativa de la dermis. Esta morfología fibrilar, con fibras orientadas aleatoriamente, con estructura porosa y con poros interconectados les brindaría soporte a los fibroblastos y por medio de sus poros interconectados se esperaría que las células logren migrar, difundir nutrientes y eliminar sus productos de desecho. Al fabricar este andamio a partir de un material compuesto de una mezcla del polímero natural Gel y del polímero sintético PCL con buena miscibilidad entre ambos polímeros como se muestra en la Figura 8. se obtuvo un material compuesto que tiene las propiedades necesarias para ser un material biocompatible, estructuralmente estable, biodegradable y que promueve la adhesión y proliferación de los fibroblastos cultivados *in vitro* sobre él. Estos polímeros han sido frecuentemente utilizados en la obtención y estudio de andamios para sustitutos dérmicos; sin embargo, cada uno de ellos ha mostrado pros y contras en su uso como andamio. La Gel está formada por aminoácidos similares a los presentes en la MEC nativa, por lo tanto, las fibras compuestas de estos polímeros aumentan la mimeticidad de su composición, pero sus propiedades mecánicas son demasiado débiles. Con la incorporación de la Gel a la matriz fibrilar de PCL, la cual ha mostrado no inducir inflamación y ayudar en el tratamiento de heridas de espesor parcial y profundo al evitar la contracción de la lesión (disminución de cicatrices), se esperó incrementar las propiedades mecánicas de la Gel y con esto, su uso como andamio. Por otro lado, las fibras de PCL tienen muy poca mojabilidad (por su carácter hidrofílico) lo que reduce la adhesión y proliferación celular, pero con la incorporación de la Gel se buscó compensar esta limitante. Si bien es cierto que ya se ha reportado el uso de esta mezcla de polímeros para fabricar fibras mediante electrohilado para su uso como andamio, éste ha sido fabricado a partir del uso de disolventes y cosolventes muy tóxicos; y de mezclas por separado de soluciones poliméricas de ambos polímeros que se unen minutos antes de electrohilarse complicando el procedimiento. Por lo tanto, el uso de AcAc como único disolvente, considerado "green solvent", para obtener la disolución polimérica Gel/PCL para electrohilado en un solo paso (es decir, mezclando ambos polímeros en el disolvente al mismo tiempo), y que además

este disolvente aumente la miscibilidad entre ambos polímeros es una aportación que mejora significativamente el proceso que comúnmente se lleva a cabo en la obtención de este tipo de andamios, ya que lo hace más sencillo y efectivo.

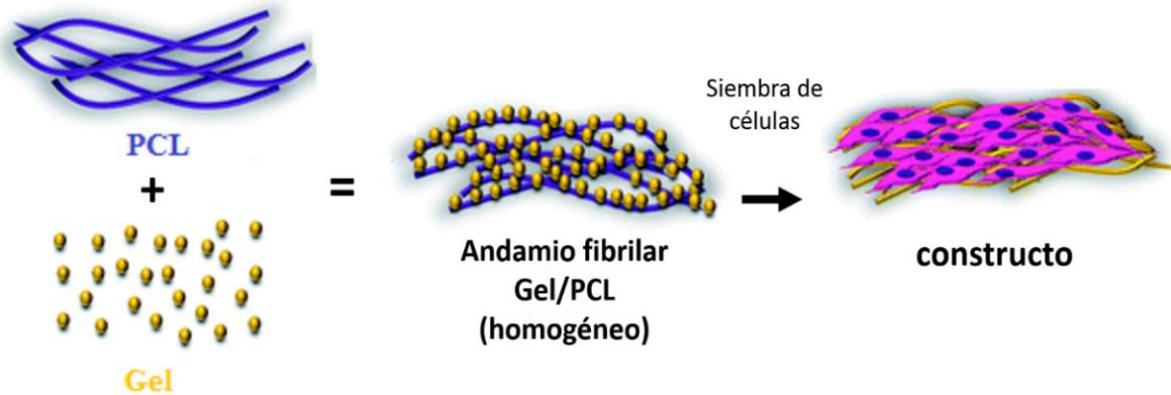


Figura 8. Esquema del diseño del andamio fibrilar compuesto de una mezcla homogénea de los polímeros natural y sintético, gelatina y policaprolactona (Gel/PCL), favorable para el cultivo *in vitro* de células dérmicas (fibroblastos).

Finalmente, es conveniente recordar que los dos polímeros natural y sintético (Gel y PCL) y los dos nanocompuestos de Zn (ZnO y acetato de zinc) que se emplearon en el desarrollo de estos dos materiales fibrilares para el posible tratamiento integral bicapa de quemaduras de segundo grado, son materiales altamente disponibles, que tienen un precio moderado y un proceso de esterilización sencillo.

5. OBJETIVO

Desarrollar a través de la técnica de electrohilado dos materiales fibrilares con propiedades complementarias para ser potencialmente empleados como un tratamiento integral bicapa de quemaduras de espesor profundo. Se fabricarán dos diferentes materiales cuyas funciones sean las de 1) un apósito antibacteriano compuesto de nanopartículas antibacterianas a base de Zn embebidas en la superficie de microfibras de policaprolactona (PCL), y 2) un andamio celular (para células dérmicas, fibroblastos) compuesto de microfibras de una mezcla homogénea de gelatina (Gel) y PCL, usando ácido acético; se espera que estos materiales, en conjunto, conformen un tratamiento bifuncional de lesiones dermoepidérmicas evitando infecciones en la lesión mientras que promueva la reparación del tejido.

5.1. Objetivos Específicos

5.1.1. *Apósito antibacteriano.*

- Caracterizar las ZnO nps comerciales usadas para obtener las soluciones de electrohilado en su tamaño y morfología mediante difracción de rayos X (XRD) y microscopia electrónica de transmisión (TEM). Al mismo tiempo, estimar su E_g a partir de su espectro de absorción Ultravioleta-Visible (UV-Visible).
- Fabricar membranas fibrilares mediante la técnica de electrohilado convencional (cuyas fibras posean una estructura uniaxial) a partir de diferentes soluciones poliméricas de PCL con ZnO nps (cuatro diferentes concentraciones de ZnO nps) empleando ácido acético (AcAc) como disolvente. También, electrohilar una membrana con fibras de estructura uniaxial compuestas únicamente PCL para ser usada como control.
- Fabricar membranas fibrilares mediante la técnica de electrohilado coaxial cuyas fibras tengan una estructura coaxial (con centro/núcleo compuesto únicamente de PCL y con superficie/coraza compuesta de PCL y nps a base de zinc) a partir de diferentes soluciones poliméricas de PCL y de PCL con ZnO nps (las mismas cuatro diferentes concentraciones de ZnO nps empleadas para fabricar las fibras con estructura uniaxial) empleando ácido acético (AcAc) como disolvente.
- Estudiar la microestructura de las membranas fibrilares de Zn/PCL con estructura uniaxial y coaxial mediante Microscopia Electrónica de Barrido (EDS), así como su composición elemental empleando el aditamento de Espectroscopía Energía Dispersiva (EDS).
- Confirmar la microestructura uniaxial o coaxial de las fibras de las membranas de Zn/PCL a través de Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).
- Identificar los grupos funcionales presentes en las membranas fibrilares de Zn/PCL con estructura uniaxial y coaxial por medio de Espectroscopia Infrarroja (FT-IR).
- Identificar la estructura atómica de las membranas fibrilares de Zn/PCL con estructura uniaxial y coaxial a partir de los difractogramas XRD.
- Determinar el carácter hidrofóbico/hidrofílico de las superficies de las membranas de

Zn/PCL a partir de las mediciones del ángulo de contacto al agua (WCA).

- Determinar la pérdida de masa de las membranas de Zn/PCL inmersas en un medio ácido simulando el microambiente de inflamación de una herida.
- Estudiar la capacidad de las membranas fibrilares de Zn/PCL con fibras uniaxiales o coaxiales de inhibir el crecimiento bacteriano planctónico de *E. coli* (Gram-negativa) y *S. aureus* (Gram-positiva).
- Estudiar la capacidad de las membranas fibrilares de Zn/PCL con fibras uniaxiales o coaxiales de prevenir la formación de biopelícula de *E. coli* (Gram-negativa) y *S. aureus* (Gram-positiva).

5.1.2. Andamio celular.

- Fabricar membranas fibrilares mediante la técnica de electrohilado convencional (cuyas fibras posean una estructura uniaxial) a partir de soluciones poliméricas de PCL con Gel empleando ácido acético (AcAc) como disolvente. Además, electrohilar una membrana compuesta sólo PCL para ser usada como control.
- Estudiar la microestructura de las membranas fibrilares de Gel/PCL mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
- Identificar los grupos funcionales presentes en las membranas fibrilares de Gel/PCL por medio de Espectroscopía Infrarroja (FT-IR).
- Identificar la estructura atómica de las membranas fibrilares de Gel/PCL a partir de los difractogramas (XRD).
- Determinar el carácter hidrofóbico/hidrofílico de las superficies de las membranas de Gel/PCL a partir de las mediciones del ángulo de contacto al agua (WCA).
- Examinar el comportamiento de descomposición de las membranas de Gel/PCL en función de la temperatura mediante la obtención de termogramas por análisis termogravimétrico (TGA).
- Analizar el comportamiento térmico (temperatura de cristalización, temperatura de fusión y entalpía de formación) a partir de curvas de calentamiento y enfriamiento por calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- Evaluar los parámetros mecánicos de las membranas Gel/PCL a partir de las curvas de esfuerzo-deformación obtenidas mediante ensayos de tensión uniaxial.
- Estimar la cantidad de Gel liberada de las fibras de Gel/PCL en un medio acuoso.
- Determinar la pérdida de masa de las membranas de Gel/PCL inmersas en un medio acuoso.
- Determinar la viabilidad celular de fibroblastos sembrados y cultivados en la superficie de las membranas fibrilares de Gel/PCL mediante el ensayo de calceína/homodímero de etidio (LIVE/DEAD).
- Estimar el porcentaje del número de fibroblastos metabólicamente activos sembrados y cultivados en la superficie de las membranas fibrilares de Gel/PCL en relación con la membrana de PCL mediante el ensayo de de MTT-Formazán.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

6.1. Apósito antibacteriano; nanopartículas basadas en Zn embebidas en la coraza externa de fibras de policaprolactona (Zn-nps/PCL).

6.1.1. Caracterización de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO).

Las nanopartículas de ZnO (ZnO nps) comerciales (Sigma-Aldrich) empleadas en el desarrollo de la capa fibrilar antibacteriana fueron caracterizadas antes de ser utilizadas en las soluciones poliméricas de electrohilado para confirmar sus propiedades físico-químicas.

6.1.1.1. Difracción de rayos X (XRD).

La estructura cristalina de las ZnO nps fue determinada mediante el análisis de difracción de Rayos X (XRD). El patrón de difracción de las ZnO nps en polvo se obtuvo en un intervalo 2θ de 20° a 80° usando un difractómetro Bruker D8 XRD con radiación $\text{CuK}\alpha$ del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Además, se estimó el tamaño de cristal promedio (D) usando la ecuación de Sherrer:

$$D = \frac{K\lambda}{B\cos\theta} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde K es el factor de forma del cristal, λ es la longitud de onda de la radiación incidente ($\text{CuK}\alpha = 1.54 \text{ \AA}$), θ es la posición del pico de difracción y B es el ancho de la altura media del pico de difracción en radianes. El patrón de difracción fue analizado empleando el software OriginPro 9.0.

6.1.1.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La morfología de las ZnO nps fue observada por microscopía electrónica de transmisión (TEM) empleando un microscopio Phillips FEI TECNAI10 operando a 80 kV del INR. Para su observación, una gota de 0.5 mL de disolución ZnO nps disueltas en etanol (EtOH) fue depositada en una rejilla de carbón recubierta con formvar. Las micrografías TEM, fueron analizadas usando el software DigitalMicrograph (Gatan Inc.)

6.1.1.3. Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis).

La energía prohibida (E_g) de las ZnO nps fue estimada a partir del espectro de absorción UV-Visible de las nps disueltas en EtOH (90%); adquirido con un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys2 con una precisión de $\pm 1 \text{ nm}$ en un intervalo λ de 300 a 900 nm situado en el Instituto de Física (IF), UNAM. La E_g de las ZnO nps fue estimada empleando la relación de Tauc para semiconductores con banda prohibida directa empleando el método de reflectancia difusa Kubelka Munk (91):

$$(\alpha h\nu)^2 = C (h\nu - E_g) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde α es el coeficiente de absorción, $h\nu$ es la energía del fotón, E_g es la energía prohibida y C depende de la movilidad electrón-hueco.

6.1.2. Fabricación del apósito antibacteriano de Zn-nps/PCL. Técnica de electrohilado uniaxial y coaxial.

El apósito antibacteriano de nanopartículas a base de Zn (Zn-nps) embebidas en la coraza externa de fibras de PCL fue fabricado mediante la técnica de electrohilado coaxial. El proceso de electrohilado fue llevado a cabo usando un equipo de configuración horizontal (Figura 9) ensamblado en el laboratorio de biomateriales del INR. Este dispositivo consiste en una fuente de alto voltaje (EH60P1.5 GLASSMAN HIGH VOLTAGE Inc.) con un intervalo de 0-60 kV, una bomba inyectora de doble canal (NE-4000 2-channel, Pump Systems Inc) con un intervalo de trabajo de 0.001 μ L/hr a 7630 mL/hr y una placa de aluminio estática como colector. En general, en esta técnica se aplica alta tensión entre el sistema de inyección y la placa metálica para crear una carga eléctrica que atraiga a las partículas del fluido polimérico desde el tubo inyector (jeringa) hasta la superficie colectora, durante este trayecto el disolvente se evapora y la fibra se solidifica en el colector para dejar un polímero fibrilar entrelazado aleatoriamente.

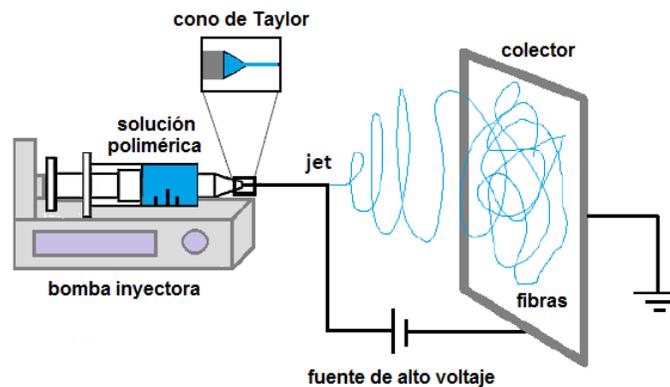


Figura 9. Esquema de la configuración del dispositivo para electrohilado empleado para fabricar el apósito de fibras de Zn-nps/PCL uniaxiales y coaxiales.

La técnica de electrohilado coaxial es una modificación de la técnica convencional; para llevar a cabo el electrohilado coaxial se utilizó el mismo dispositivo (fuente de alto voltaje, bomba inyectora y colector metálico), pero empleando una aguja coaxial (una aguja de menor calibre dentro de una de mayor calibre) en vez de una aguja uniaxial, lo que permitió electrohilar simultáneamente dos diferentes soluciones dentro de una estructura fibrilar formada por un núcleo interno y una corteza externa, posibilitando la obtención de fibras con compuestos de diferente naturaleza. Para el material que se emplearía como apósito antibacteriano, se obtuvieron las fibras con estructura coaxial de PCL en el núcleo y Zn-nps/PCL en la corteza usando una aguja coaxial (Ramè-Hart) con una disolución únicamente de PCL (disuelta en AcAc) inyectada por la bomba a través del canal interno de la aguja (núcleo de la fibra) y soluciones de PCL con diferentes concentraciones de ZnO nps (también disueltos en AcAc)

en el canal externo (coraza de la fibra) como se ilustra en la Figura 10. Para estudiar las posibles ventajas en las propiedades antibacterianas del diseño coaxial sobre las fibras uniaxiales convencionales, también se fabricaron fibras uniaxiales empleando una aguja uniaxial para inyectar la disolución y usando únicamente las diferentes soluciones de ZnO nps con PCL. De esta manera, se obtuvieron fibras con nps dispersas en toda la fibra con las mismas concentraciones de nps que contiene la coraza externa de las fibras coaxiales.

Se prepararon cuatro diferentes soluciones de ZnO nps con PCL (ZnO nps-PCL) variando únicamente las concentraciones de ZnO nps. Se agregaron 9 wt.%, 12 wt.%, 15 wt.% y 25 wt.% de ZnO nps, respecto al peso total del polímero, a cuatro soluciones individuales de PCL (peso molecular $M_n = 80\ 000$ Sigma-Aldrich) disueltas en ácido acético glacial (AcAc, J.T Baker) a 19 wt/v%. Las soluciones fueron agitadas a ≈ 300 rpm durante 72 h a temperatura ambiente antes de ser electrohiladas. De la misma manera, se prepararon soluciones únicamente de PCL en AcAc a 19 wt/v% para rellenar el núcleo interno de las fibras coaxiales y para fabricar las fibras uniaxiales de PCL empleadas como control negativo durante los experimentos antibacterianos. Para electrohilar las fibras uniaxiales se emplearon los siguientes parámetros de electrohilado: el voltaje se fijó en 17 kV, la distancia aguja-colector se mantuvo en 18 cm y las diferentes soluciones de ZnO nps-PCL fueron inyectadas a través de una aguja metálica (calibre 21) a un caudal de 1 mL/h.

Para electrohilar las fibras coaxiales, los canales de inyección interno (calibre 20) y externo (calibre 26) de la aguja coaxial fueron conectados a los sistemas independientes de bombeo con las soluciones de PCL y ZnO nps-PCL, respectivamente. Ambas soluciones poliméricas fueron simultáneamente bombeadas a un caudal de 0.38 mL/h para tener una velocidad de flujo similar a la que se empleó para electrohilar las fibras uniaxiales. Después del proceso de electrohilado, las fibras obtenidas fueron removidas del colector de aluminio, lavadas dos veces con EtOH (70%) y agua ultra pura mili-Q ($18\ M\Omega\cdot\text{cm}$ at 25°C) y secadas en un horno a 36°C durante 24 h para eliminar cualquier disolvente residual.

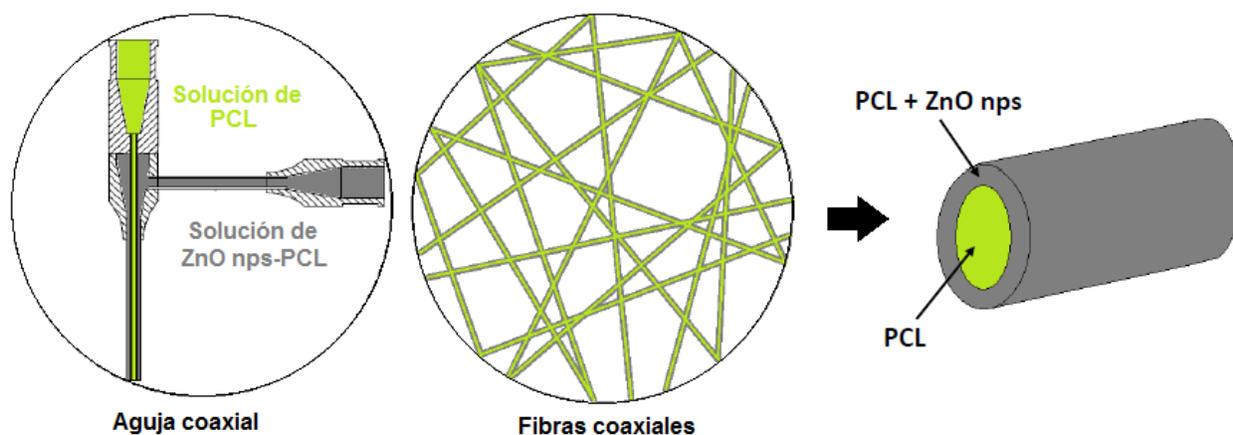


Figura 10. Esquema de la aguja coaxial empleada en el proceso de electrohilado que permitió fabricar fibras con una estructura formada por un núcleo de PCL y una corteza de Zn-nps embebidas en PCL.

Las fibras obtenidas fueron nombradas de acuerdo a las concentraciones de ZnO nps usadas en las soluciones de ZnO nps-PCL empleadas para electrohilar toda la fibra en el caso de las fibras uniaxiales y sólo la coraza externa en el caso de las fibras coaxiales; además, se agregó la letra “u” o “c” de acuerdo a su estructura uniaxial o coaxial. Tabla 1.

Tabla 1. Fibras fabricadas para la obtención del apósito antibacteriano mediante la técnica de electrohilado.

Fibras electrohiladas	Composición de las soluciones para el proceso de electrohilado.	
Fibras uniaxiales	ZnO nps (wt.%)	PCL (wt.%)
PCL	0	100
9Zn/PCL-u	9	91
12Zn/PCL-u	12	88
15Zn/PCL-u	15	85
25Zn/PCL-u	25	75
Fibras coaxiales	Coraza externa ZnO nps (wt.%) / PCL (wt.%)	Núcleo interno PCL (wt.%)
9Zn/PCL-c	9 / 91	100
12Zn/PCL-c	12 / 88	100
15Zn/PCL-c	15 / 85	100
25Zn/PCL-c	25 / 75	100

6.1.3. Caracterización físico-química de los apósitos de Zn-nps/PCL.

6.1.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La micro-morfología de los apósitos electrohilados de Zn-nps/PCL se observó por medio de un microscopio electrónico de barrido (SEM) de ultra alta resolución JSM-7800F (JEOL) con una resolución de -1nm a un voltaje de trabajo de 15 kV del Laboratorio Central de Microscopía del Instituto de Física (LCM, IF) de la UNAM. Para su observación, cada una de las fibras fue previamente recubierta con Oro mediante “sputtering”. El diámetro promedio de las fibras fue calculado a partir de las micrográficas midiendo el diámetro de al menos 80 fibras en tres áreas seleccionadas aleatoriamente usando el software AxioVision (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Se reportaron el diámetro promedio y la desviación estándar.

6.1.3.2. Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) general y mapeo.

La composición química elemental y la distribución de los elementos presentes en la superficie de las fibras fue analizada mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X (EDS) general y por mapeo, respectivamente, usando el microscopio electrónico de barrido de Ultra

Alta Resolución JSM-7800F (JEOL) del LCM, IF de la UNAM. Los espectros (EDS general) y las imágenes (EDS mapeo) fueron obtenidos durante la adquisición de las micrografías SEM y analizadas con el Software AztecEnergy (Oxford Instruments).

6.1.3.3. *Microscopia electrónica de transmisión (TEM).*

Las estructuras uniaxiales y coaxiales de las fibras electrohiladas fueron corroboradas por Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) empleando un microscopio TEM JEM2010 FEG (JEOL) del LCM, IF de la UNAM; con una resolución de punto a punto de 0.25 nm. Para su observación, las fibras fueron montadas en rejillas de cobre y recubiertas con carbón mediante “sputtering”.

6.1.3.4. *Espectroscopia Infrarroja (FT-IR).*

Los grupos químicos presentes en cada uno de los apósitos de fibras, uniaxiales y coaxiales, de Zn-nps/PCL fueron determinados mediante espectroscopia infrarroja (FT-IR). Para ello, primero se identificaron los modos vibracionales presentes en los espectros FT-IR de los compuestos individuales contenidos en las fibras; i.e, PCL, ZnO nps y ZnO nps disueltas en AcAc después de su evaporación (ZnO-AcAc). Posteriormente se estudiaron los enlaces generados en los diferentes apósitos compuestos, al analizar los espectros FT-IR de cada uno de ellos. Para obtener los espectros FTIR de las ZnO nps y de las ZnO-AcAc, ~ 3wt.% de las muestras en polvo fueron mezcladas individualmente con bromuro de potasio (KBr) utilizando un mortero y mediante presión se obtuvieron pastillas sólidas de ~1 cm de diámetro antes de la medición. Para las muestras, cada uno de los apósitos (compuestos de fibras uniaxiales y coaxiales) fue colocado en el aditamento ATR (Reflexión Total Atenuada) y sujetado bajo presión durante la medición. Los espectros FT-IR de cada una de las muestras se obtuvieron a temperatura ambiente con un espectrofotómetro Nicolet 6706/Smart Orbit ATR optics situado en el IIM, UNAM. En un intervalo de 4000 - 400 cm^{-1} con 32 scans a una resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros fueron analizados con el software Origin 9.0.

6.1.3.5. *Difracción de Rayos X (XRD).*

La estructura cristalina presente en los diferentes apósitos fabricados de fibras uniaxiales y coaxiales electrohiladas a partir de las soluciones de ZnO nps-PCL y/o de PCL, fueron determinadas a partir de los difractogramas de difracción de rayos X (XRD) usando un sistema Bruker D8 XRD con radiación $\text{CuK}\alpha$ en un intervalo 2θ de 15° a 70° situado en el IIM, UNAM. Los difractogramas de cada una de las muestras fueron obtenidos directamente de cada muestra sin preparación adicional y los espectros fueron analizados con el software OriginPro 9.0.

6.1.3.6. *Ángulo de contacto al agua (WCA).*

La mojabilidad al agua de los apósitos fue evaluada midiendo el ángulo de contacto de una gota de agua colocada en la superficie de los diferentes apósitos electrohilados, con esto se definió

si la superficie presenta un comportamiento hidrofílico o hidrofóbico. El ángulo de contacto sobre la superficie de las muestras fue medido empleando un goniómetro Rame-Hart instrument so. Automated Dispensing System® del IIM, UNAM a través de una gota sésil estática, usando 4 µL de agua desionizada. Las gotas de agua fueron colocadas en dos diferentes zonas de dos diferentes muestras de a cada uno de los tipos de apósitos hechos de fibras coaxiales y uniaxiales. Los ángulos de contacto fueron medidos utilizando el software Drop Snake (Image J® software). El promedio y la desviación estándar fueron reportados.

6.1.3.7. Pérdida de masa.

Para evaluar la pérdida de masa de los apósitos inmersos en medio ligeramente ácido en el tiempo simulando las condiciones de pH de inflamación de una herida, se midió la masa de muestras secas de 8 mm de diámetro (masa inicial, W_0). Cada una de las muestras fue sumergida en 1 mL de medio ácido (buffer pH = 4.01, Merck) e incubada a 37°C y 100 rpm; el medio ácido se cambió cada 2 días. Después de 1, 2, 3, 6, 14 y 21 días de incubación, las muestras fueron lavadas con agua Milli-Q, secadas y nuevamente se midió su masa (W_1). Los experimentos fueron llevados a cabo de manera individual por triplicado. El porcentaje de pérdida de masa fue calculado como:

$$W_{loss}[\%] = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

6.1.4. Evaluación de la actividad antibacteriana de los apósitos de Zn-nps/PCL.

Las propiedades antibacterianas de los diferentes apósitos fabricados mediante las técnicas de electrohilado uniaxial y coaxial a partir de las soluciones de ZnO nps-PCL y PCL fueron evaluadas por medio de los ensayos de turbidimetría y MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]; Sigma-Aldrich) contra las cepas Gram-negativa y Gram-positiva, *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), respectivamente. Todos los experimentos para la evaluación de la actividad antibacteriana se realizaron en la Facultad de Odontología de la UNAM. Para esto, los apósitos Zn-nps/PCL previamente lavados fueron esterilizados mediante exposición a radiación ultravioleta (254 nm) 24 h antes de realizar los ensayos. Todos los experimentos antibacterianos fueron realizados por duplicado.

6.1.4.1. Ensayo antibacteriano por Turbidimetría.

Para evaluar el crecimiento de la población bacteriana en presencia de los apósitos electrohilados, se recolectaron cultivos puros de cada una de las cepas bacterianas (*E. coli* y *S. aureus*) de platos de agar y se re-suspendieron en medio soya tripticasa (TSB, BD Bioxon) enriquecido con menadiona (Sigma-Aldrich) al 1 v/v% y hemina (Sigma-Aldrich) al 1 v/v%. Las soluciones bacterianas fueron ajustadas a una densidad óptica (O.D.) de 1 a una longitud de onda de 600 nm (Eppendorf BioPhotometer D30). Después, 300 µL de cada una de las soluciones bacterianas (O.D. = 1) fueron diluidas, independientemente, en 29.7 mL de TBS enriquecido para obtener una concentración de $\approx 1 \times 10^7$ células/mL (solución bacteriana). Posteriormente, muestras circulares (8 mm de diámetro) de cada uno de los diferentes apósitos electrohilados (uniaxiales y coaxiales) esterilizados fueron colocados individualmente, por

triplicado, en una caja de cultivo de 48 pozos (Corning Costar). Se prepararon dos grupos de muestras iguales, cada una conteniendo todos los diferentes apósitos de fibras uniaxiales y coaxiales. A cada uno de los pozos de ambos grupos que contenían los apósitos y a tres pozos adicionales (control negativo) se les agregaron 100 mL de TSB enriquecido. Después de 20 min, uno de los grupos (grupo 1) se expuso a radiación UVA con una lámpara Entela UVP/UVGL-25 durante 15 min, mientras que el otro grupo (grupo 2) permaneció en oscuridad. Finalmente, se agregaron 900 µL de la solución bacteriana a cada uno de los pozos de ambos grupos y posteriormente se incubaron a 35°C bajo condiciones aeróbicas en un agitador orbital (CSL-NHYBRIDORB, Cleaver Scientific Ltd). Después de 24 h de incubación, el efecto de inhibición en el crecimiento bacteriano debido a la presencia de las nps en los diferentes apósitos de PCL fue estimado a partir de la medición de la O.D. a 595 nm (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) de alícuotas de 100 µL de medio de incubación de cada uno de los pozos sembrados con bacterias que fueron transferidas individualmente a cajas nuevas de 96 pozos. El porcentaje de viabilidad bacteriana (VB) fue calculado conforme a la siguiente ecuación:

$$VB (\%) = \left(\frac{O.D. \text{ muestra}}{O.D. \text{ control}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Dónde *O.D. muestra* corresponde a la absorbancia de las alícuotas de las soluciones bacterianas incubadas en presencia de los diferentes apósitos, y *O.D. control* corresponde a la absorbancia de las alícuotas de las soluciones bacterianas incubadas sin apósitos presentes.

6.1.4.2. Ensayo antibacteriano por MTT.

Para evaluar la capacidad de cada uno de los apósitos electrohilados de inhibir el crecimiento bacteriano en su superficie, cada muestra de cada apósito incubado con bacterias (24 h) fue lavada dos veces con TSB enriquecido y trasladada individualmente en pozos de nuevas cajas de cultivo de 48 pozos. Se agregaron 300 µL de solución MTT:TSB enriquecido (1:10) a cada uno de los pozos y se incubaron durante 3 h a 35°C bajo condiciones aeróbicas en un agitador orbital (CSL-NHYBRIDORB, Cleaver Scientific Ltd). Después de la incubación, se removió la solución MTT:TSB enriquecido de cada uno de los pozos y cada uno de los apósitos fue lavado con 200 µL de TSB enriquecido. Finalmente, los cristales de formazán formados debido a la actividad metabólica de las bacterias fueron disueltos en 300 µL de solución *2-propanol:dimetil sulfóxido* (ISO: DMSO, 1:1; Sigma-Aldrich), se tomaron alícuotas de 100 µL que fueron transferidas individualmente a cajas nuevas de 96 pozos y se midió su O.D. a 620 nm (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader). El porcentaje de viabilidad bacteriana (VB) también fue calculado conforme a la ecuación 4 pero la *O.D. muestra* correspondió a la absorbancia de las alícuotas de las soluciones de formazán:ISO:DMSO incubadas en presencia de los apósitos de fibras uniaxiales y coaxiales electrohiladas a partir de las soluciones ZnO nps-PCL, y *O.D. control* corresponde a la absorbancia de las alícuotas de las soluciones de formazán:ISO:DMSO incubadas con las fibras electrohiladas a partir de la solución únicamente de PCL.

6.2. Andamio celular; fibras de gelatina y policaprolactona (Gel/PCL).

6.2.1. Fabricación del andamio de Gel/PCL. Técnica de electrohilado convencional.

Para fabricar el andamio celular (para fibrobrastos), se electrohilieron fibras de gelatina (Gel) y policaprolactona (PCL) empleando el mismo equipo de configuración horizontal ensamblado en el laboratorio de biomateriales del INR que se usó para electrohilar los apósitos de fibras uniaxiales y coaxiales de Zn-nps/PCL, pero utilizando únicamente la aguja uniaxial. Los parámetros de electrohilado fueron los siguientes: se aplicó un voltaje de 14 kV, la velocidad de flujo fue fijada en 1 mL/h y la distancia aguja-colector fue de 14 cm. Se prepararon dos soluciones de Gel con PCL variando únicamente las concentraciones de Gel. Se agregaron 30 wt.% y 45 wt.% de Gel (tipo B derivada de piel de bovino, J.T Baker) respecto al peso polimérico total (Gel+PCL) a dos diferentes soluciones de PCL disuelta en AcAc (98%) a 19 wt.%, para finalmente obtener fibras de Gel:PCL con proporciones másicas de 30:70 y 45:55. Las fibras fueron nombradas de acuerdo a la concentración de Gelatina presente en cada andamio, Tabla 2. 2. Las soluciones poliméricas fueron agitadas a ~300 rpm durante 48 h a temperatura ambiente antes de ser electrohiladas. De la misma manera, se prepararon soluciones de únicamente PCL en AcAc (19 wt/v%) para fabricar fibras únicamente de PCL y ser usadas como control durante los experimentos de viabilidad celular. Después del proceso de electrohilado, las fibras obtenidas fueron removidas del colector de aluminio, lavadas dos veces con EtOH (70%) y agua ultra pura mili-Q (18 MΩ.cm at 25°C) y secadas a temperatura ambiente durante 24 h para eliminar cualquier disolvente residual.

Tabla 2. Composición de los andamios fibrilares de Gel/PCL.

Fibras electrohiladas	Gelatina (wt.%)	PCL (wt.%)
PCL	0	100
30Gel/PCL	30	70
45Gel/PCL	45	55

6.2.2. Caracterización físico-química de los andamios de Gel/PCL.

6.2.2.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM).

La morfología local de los andamios se observó por medio de un microscopio electrónico de barrido (SEM) 7600 (JEOL) del IIM, UNAM. Para su observación, cada uno de los andamios electrohilados fueron previamente recubiertos con carbono mediante “sputtering” por el técnico especialista. El diámetro promedio de las fibras que componen los andamios fue calculado a partir de las micrografías midiendo el diámetro de al menos 80 fibras en tres áreas elegidas aleatoriamente usando el software AxioVision Release 4.9.1 SE64. Se reportaron el diámetro promedio y la desviación estándar.

6.2.2.2. *Espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X (EDS).*

La composición elemental de la superficie de los andamios de Gel/PCL fue analizada mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X (EDS) durante la adquisición de las micrografías SEM, usando el microscopio electrónico de barrido SEM 7600 (JEOL) del IIM, UNAM.

6.2.2.3. *Espectroscopia infrarroja (FT-IR).*

Para determinar los enlaces químicos presentes en los andamios compuestos de fibras de Gel/PCL y PCL electrohiladas se analizaron los espectros FT-IR de cada uno de los andamios, los cuales fueron obtenidos a temperatura ambiente con un espectrofotómetro Nicolet 380 FT-IR situado en el departamento de química “Giacomo Ciamician” (CHIM) en la Universidad de Bologna (UNIBO) en un intervalo de 4000 - 400 cm^{-1} con 32 scans a una resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros fueron analizados con el software OriginPro 9.0.

6.2.2.4. *Difracción de Rayos X (XRD).*

La estructura cristalina presente en los diferentes andamios de Gel/PCL y PCL fue determinada a partir de los difractogramas de rayos X (XRD) usando un difractómetro PANalytical X'Celerator con radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.54 \text{ \AA}$) en un intervalo 2θ de 10° a 60° situado en CHIM, UNIBO. Los difractogramas de cada una de las muestras fueron analizados con el software OriginPro 9.0.

6.2.2.5. *Ángulo de contacto al agua (WCA).*

La mojabilidad al agua de la superficie de los diferentes andamios fue evaluada con el mismo procedimiento empleado para evaluar la mojabilidad de la superficie de los apósitos de Zn-nps/PCL. Sin embargo, debido a que los andamios compuestos de fibras de Gel/PCL presentaron una superficie altamente hidrofílica, los ángulos de contacto (AC) fueron estimados a tres diferentes tiempos 1 s, 3 s y 5 s utilizando el software Drop Snake (Image J® software). El promedio y la desviación estándar del AC en cada uno de los tiempos fueron reportados.

6.2.2.6. *Análisis termogravimétrico (TGA).*

El proceso de pérdida de masa en función de la temperatura de los andamios de Gel/PCL y PCL fue examinado empleando un analizador termogravimétrico (TGA) modelo TGA2950 (TA Instruments) situado en CHIM, UNIBO; a un intervalo de temperatura de 23°C a 700°C con una rapidez de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ utilizando Nitrógeno como agente inherente. Para la obtención de los termogramas, se colocaron $3 \pm 0.5 \text{ mg}$ de cada uno de los andamios en charolas de platino de manera independiente.

6.2.2.7. *Calorimetría diferencial de barrido (DSC).*

Para determinar la temperatura de fusión (T_m), la temperatura de cristalización (T_c) y el porcentaje de cristalinidad (X_c) de las fibras de Gel/PCL, se obtuvieron las curvas calorimétricas generadas por los andamios empleando un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Q2000 (TA

Instruments) sujetas a un ciclo de enfriamiento (-90°C) - calentamiento (150°C) - enfriamiento (-90°C) a una rapidez de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ utilizando Nitrógeno como agente inherente. Las muestras fibrilares de entre 3.87 ± 0.57 gr se colocaron en charolas de aluminio para su análisis.

6.2.2.8. *Propiedades mecánicas; pruebas de tensión uniaxial.*

Para evaluar las propiedades mecánicas de los andamios de Gel/PCL, las muestras fueron individualmente sujetas a una tensión uniaxial empleando un analizador mecánico-dinámico INSTRON 4465 a una velocidad de ensayo de $5 \text{ mm}/\text{min}$ con una carga de 100 N . Posteriormente, se obtuvieron las curvas de esfuerzo-deformación de cada una de las muestras ensayadas, y a partir de ellas se calculó el módulo elástico (E), la resistencia a la tracción (σ_b) y la elongación (ϵ_b). Se analizaron 5 muestras ($2 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$) de cada uno de los diferentes andamios y se reportaron el promedio y la desviación estándar de cada constante calculada.

6.2.2.9. *Ensayo de biuret.*

Para medir el porcentaje de gelatina que fue liberado de las fibras de Gel/PCL en un medio acuoso a temperatura corporal después de 24 y 72 h, se utilizó el ensayo biuret. Para preparar el reactivo biuret, 0.25 gr de CuSO_4 (Sulfato de Cobre (II) pentahidratado, Sigma-Aldrich) y 1.126 gr de tartrato de Potasio y Sodio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) se añadieron a 66.6 mL de H_2O destilada (DI H_2O). Por otro, se diluyeron 7 gr de NaOH (Sigma-Aldrich) en 66.6 mL de DI H_2O . En un nuevo recipiente se mezclaron ambas soluciones y se agregaron 34.6 mL de DI H_2O , el recipiente se cubrió con una hoja de aluminio y se mantuvo a $2-8^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Para determinar la concentración de gelatina liberada por las fibras en Buffer Fosfato Salino (PBS, $\text{pH} = 7.4$) a 37°C después de 24 h y 72 h, primero se construyó una curva de calibración que permitió correlacionar la O.D. a 560 nm de la reacción biuret con la concentración de gelatina presente en PBS. Para esto, se preparó una solución (solución madre) agregando 200 gr de la gelatina usada en las soluciones electrohiladas en 20 mL de PBS. A partir de la solución madre se prepararon siete soluciones (2 mL) de PBS con diferentes concentraciones de gelatina ($5, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5$ y $0.25 \text{ mg}/\text{mL}$). Se tomaron 0.5 mL de cada solución y se mezclaron individualmente con 2.5 mL del reactivo de biuret. Las mezclas se mantuvieron a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente se trasladaron individualmente a cubetas de cuarzo para medir la absorbancia en 560 nm de cada una de las soluciones para construir la curva de calibración (Figura 11). Las lecturas de absorbancia fueron medidas con espectrofotómetro Cary 1E (Varian) situado en el CHIM, UNIBO.

Para determinar la cantidad de Gel liberada de los andamios de Gel/PCL en PBS, dos muestras de $20 \pm 0.94 \text{ gr}$ de cada una de las diferentes fibras de Gel/PCL fueron sumergidas en 2 mL de PBS y colocadas en un baño de agua con agitación orbital (Julaba SW22) a 37°C . De manera análoga a la obtención de la curva de calibración, después 24 y 72 h después de incubación se midió la absorbancia de 2.5 mL de reactivo biuret mezclado con 0.5 mL de las

diferentes soluciones de PBS después de remover los andamios. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

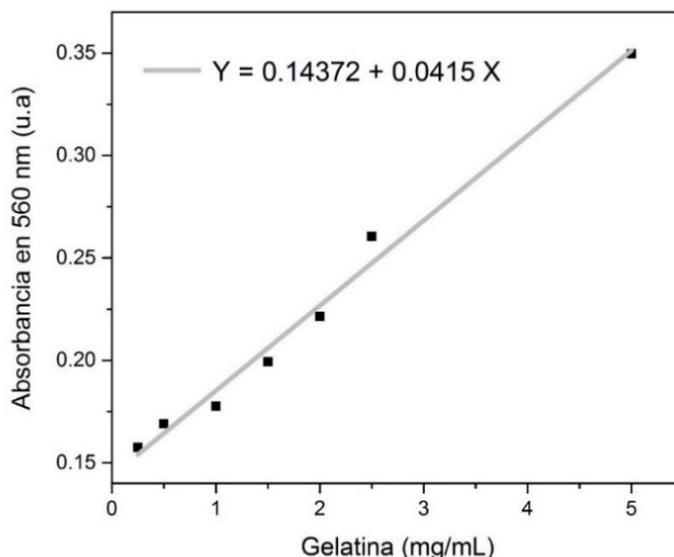


Figura 11. Curva de calibración del ensayo de biuret para estimar la concentración de gelatina.

6.2.2.10. Pérdida de masa.

Para evaluar la pérdida de masa de los andamios de Gel/PCL en un medio acuoso en el tiempo, se midió la masa de muestras secas de 2 cm de diámetro (masa inicial, W_0). Cada una de las muestras fue sumergida en 1 mL de PBS (pH = 7.4) e incubada a 37°C y 80 rpm; el PBS fue sustituido, diariamente, por un mL de PBS nuevo. Después de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 17 días de incubación, las muestras se lavaron con agua Milli-Q, se removió el agua residual y nuevamente se midió su masa (W_1). Los experimentos fueron llevados a cabo de manera individual por triplicado. El porcentaje de pérdida de masa fue calculado empleando la Ecuación 3.

6.2.3. Evaluación *in vitro* de los andamios de Gel/PCL.

Para determinar el potencial de las fibras electrohiladas de Gel/PCL para ser usadas como andamios celulares dérmicos, se evaluó la viabilidad de fibroblastos derivados de prepucio de neonato (donados por el Hospital infantil de México “Federico Gómez”) sembrados sobre las fibras por medio de los ensayos de calceína/homodímero de etidio y MTT.

Para llevar a cabo los ensayos de viabilidad celular, las fibras previamente lavadas fueron esterilizadas mediante exposición a radiación ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) 24 h antes de realizar los ensayos. Posteriormente, las muestras circulares (8 mm de diámetro) de cada una de las fibras de Gel/PCL y de las fibras de PCL fueron colocadas individualmente, por triplicado, en una caja de cultivo de 24 pozos (Corning Costar).

Para sembrar con células sobre los diferentes andamios, las células en cultivo primario crio-preservadas en nitrógeno y SBF:DMSO (90:10), fueron descongeladas sumergiéndolas lentamente en un baño de agua a 37°C. Posteriormente, se les agregó 1 mL de Medio de Cultivo

Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM F:12, GIBCO) suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF, GIBCO) al 10% y antibiótico al 1% para neutralizar la solución de SBF:DMSO y el contenido se transfirió a un tubo de ensayo con 5 mL de DMEM complementado y centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente (5810R, eppendorf). Después de la precipitación de los fibroblastos, se removió el sobrenadante y el precipitado celular fue re-suspendido en 2 mL de medio DMEM complementado (solución celular). Para contar manualmente el número total de células, se mezclaron 10 µL de la solución celular y 10 µL del colorante azul tripano (0.4%, GIBCO) para después colocar 10 µL de la mezcla en cada una de las cuadrículas de una Cámara de Neubauer de doble cuadrícula. El número de células por cuadrante fue observado a través de un microscopio óptico (Axiovert 40CFL, ZEISS) y se calculó el número total de células usando la ecuación 3 y multiplicando el resultado por dos:

$$\frac{\# \text{ células}}{\text{mL}} = \left[\frac{\# \text{ total de células vivas}}{\# \text{ de cuadrantes contados}} (2) \right] (10\ 000) \quad (\text{Ecuación 5})$$

Después, se sembraron 200 000 células en dos cajas de cultivo de 25 cm² de superficie con 5 mL de DMEM complementado y se incubaron a 37°C en un ambiente húmedo conteniendo 95% de aire y 5% de CO₂, se realizó el cambio del medio (DMEM complementado) cada 48 horas. Al tener una confluencia celular de ~ 80%, el DMEM complementado fue removido de las cajas y la superficie del cultivo fue lavada dos veces con PBS (pH= 7.4). Para despegar las células de la superficie se agregaron 2 mL de una solución 1:4 de Trispisna-EDTA (0.25%, GIBCO): PBS a cada una de las cajas y se incubaron a 37°C por ~ 8 min. El contenido de ambas cajas se diluyó en 4 mL de DMEM complementado y se transfirió a un tubo de ensayo que se centrifugó por 10 minutos. Después de la precipitación de los fibroblastos, se siguió el procedimiento mencionado anteriormente para calcular el número de células usando la cámara de Neubauer de doble cuadrícula. Después, se sembraron 50 000 células (disueltas en gotas 20 µL de DMEM complementado) sobre cada una de las fibras y se colocaron 40 µL de DMEM en la orilla de cada pozo. Las fibras sembradas se incubaron por 1.5 h a 37°C (5% de CO₂); finalmente, se agregaron 200 µL de DMEM complementado a cada pozo y se incubaron a 37 °C (5% de CO₂) y se realizó el cambio del medio de cultivo a las 24 h. Los procedimientos que involucraron el manejo del cultivo celular se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar (1300 Series A2, Thermo Scientific) en condiciones estériles. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

6.2.3.1. Viabilidad celular por ensayo de calceína/homodímero de etidio.

Para determinar simultáneamente las células vivas o muertas y su morfología en la superficie de las fibras, se realizó un ensayo de viabilidad celular de calceína/homodímero de etidio.

Después de 24 h y 72 h de incubación, tomando dos muestras de cada fibra por cada tiempo, el DMEM complementado fue removido de cada uno de los pozos con las fibras previamente sembradas y cada pozo fue lavado dos veces con 150 µL de PBS. Se agregaron 150 µL de solución salina de Hank (HBSS, GIBCO) con 0.1% de homodímero de etidio (HE,

Invitrogen™)) 0.05% de Calceína AM (Cal, Invitrogen™) a cada uno de los pozos y se incubaron durante 40 min a 35°C (5% de CO₂). Posteriormente, se removió la solución HBSS:HE:Cal de cada uno de los pozos y cada una de las fibras fue lavada con 150 µL de PBS. Finalmente, las fibras fueron trasladadas individualmente a una caja de cultivo de 24 pozos y se les agregó 150 µL de DMEM complementado a cada uno de los pozos. La caja fue envuelta en papel aluminio y cada una de las muestras fue montada en un portaobjetos y cubierta con un cubreobjetos para su observación en el microscopio Axio Imager Z2 (ZEISS) en su modalidad de fluorescencia de luz reflejada empleando el filtro verde (495-515 nm) para detectar la señal de calceína y el rojo (495-635 nm) para detectar la señal de homodímero de etidio. Las imágenes fueron analizadas con el software axiovision (ZEISS).

6.2.3.2. *Metabolismo celular por MTT.*

El efecto que tienen las fibras en la proliferación de fibroblastos fue determinado por medio del ensayo de MTT. Después de 24 h y 72 h de incubación, tomando tres muestras de cada fibra, el DMEM complementado fue removido de cada uno de los pozos con las fibras previamente sembradas y cada pozo fue lavado dos veces con 150 µL de DMEM complementado. Se agregaron 150 µL de solución MTT:DMEM (1:10) a cada uno de los pozos y se incubaron durante 3 h a 35°C (5% de CO₂). Posteriormente, se removió la solución MTT:DMEM de cada uno de los pozos y cada una de las fibras fue lavada dos veces con 150 µL de PBS. Finalmente, los cristales de formazán formados fueron disueltos en 150 µL de solución ISO:DMSO y se midió la O.D. a 620 nm de alícuotas de 100 µL de cada solución. El porcentaje de viabilidad celular (VC) fue calculado usando a la Ecuación 3 pero la *O.D. muestra* corresponde a la absorbancia de las soluciones de Formazán:ISO:DMSO incubadas en presencia de las fibras de Gel/PCL y *O.D control* corresponde a la absorbancia de las soluciones de Formazán:ISO:DMSO incubadas con las fibras de PCL.

6.3. Análisis estadístico.

Los datos de las pruebas antibacterianas de las fibras de Zn/PCL (turbidimetría y MTT) y de viabilidad celular de las fibras Gel/PCL (MTT) se analizaron con software GraphPad Prism 5.1 utilizando un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para comparar los grupos de pares; considerando valores estadísticamente significativos (p) menores a 0.05 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

7.1. Apósito antibacteriano; nanopartículas basadas en Zn embebidas en la coraza externa de fibras de policaprolactona (Zn-nps/PCL).

7.1.1. Caracterización de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO).

7.1.1.0. Difracción de rayos X (XRD).

El difractograma de rayos-X de las nanopartículas de ZnO (Figura 12) mostró picos de difracción en $2\theta = 31.8^\circ, 34.5^\circ, 36.3^\circ, 47.6^\circ, 56.6^\circ, 62.9^\circ, 66.4^\circ, 68^\circ, 69.1^\circ, 72.7^\circ$ y 76.9° correspondientes a las reflexiones de los planos cristalinos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (004) y (202), respectivamente, de la estructura hexagonal wurtzita del ZnO (zincite, JCPDS 05-0664). El tamaño de cristal promedio fue calculado en ≈ 22.86 nm usando la ecuación de Sherrer (Ecuación 1).

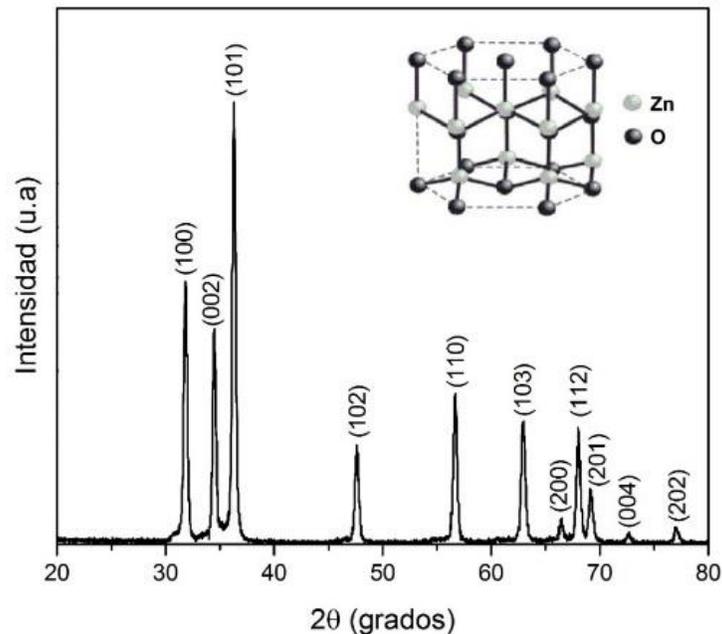


Figura 12. Difractograma de rayos X (XRD) de las nanopartículas de ZnO empleadas para preparar las soluciones ZnO nps-PCL-AcAc para el proceso de electrohilado indicando su estructura cristalina wurtzita (hexagonal).

7.1.1.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

El tamaño y estructura de las ZnO nps observados a través de las micrografías TEM se muestran en la Figura 13. El tamaño promedio de las nanopartículas medido a partir de las micrografías fue de ≈ 24.33 nm; además, se observó que las nanopartículas mostraron formas de rodillo hexagonal. En este caso, el tamaño promedio de las nanopartículas y su forma correspondieron al tamaño promedio y estructura de cristal determinados a partir del difractograma XRD.

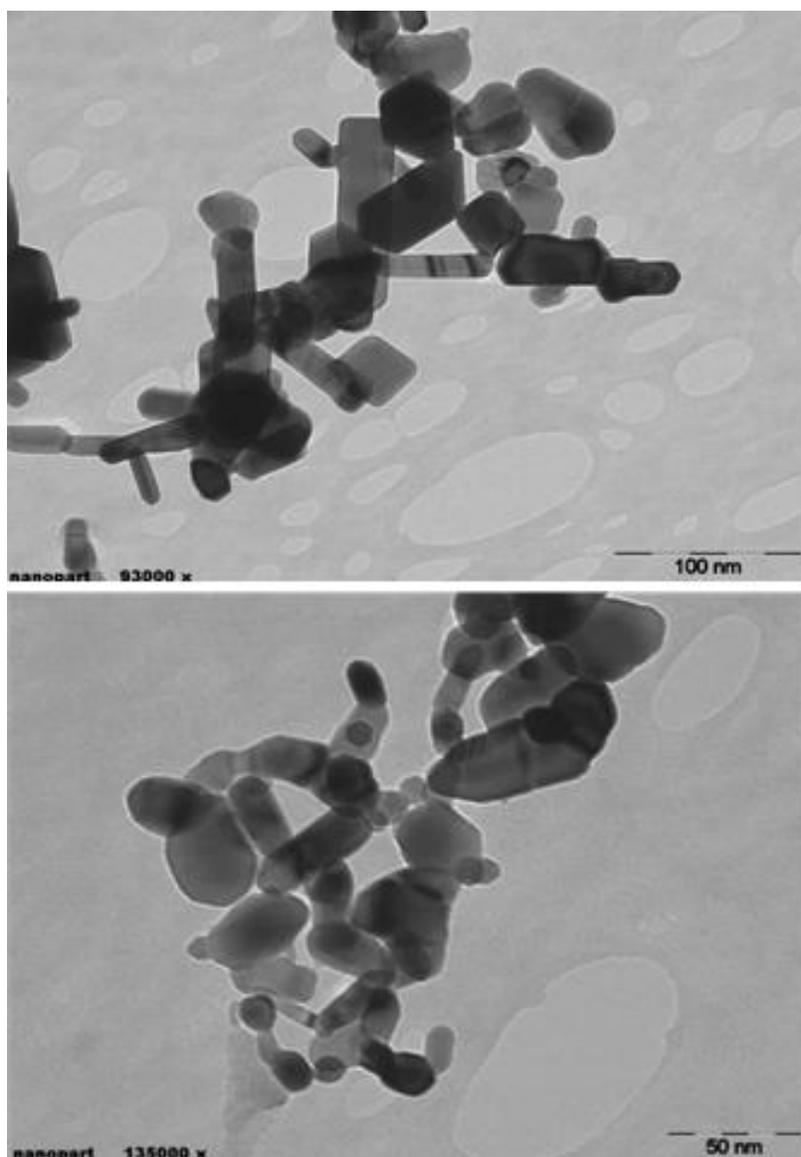


Figura 13. Micrografías por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas de ZnO empleadas para preparar las soluciones ZnO nps-PCL-AcAc para electrohilar los diferentes apósitos fibrilares antibacterianos.

7.1.1.2. *Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis).*

Dado que el principal mecanismo antibacteriano de las ZnO nps se atribuye su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante fotocatalisis en un medio acuoso, la energía prohibida (E_g) de las ZnO nps fue estimada en 3.21 eV (386 nm) a partir de su espectro de absorción UV-Visible (Figura 14) y graficando la tangente de la curva de Tauc (recuadro de la Figura 13, línea sólida negra) obtenida por el método de reflectancia difusa de Kubelka Munk.

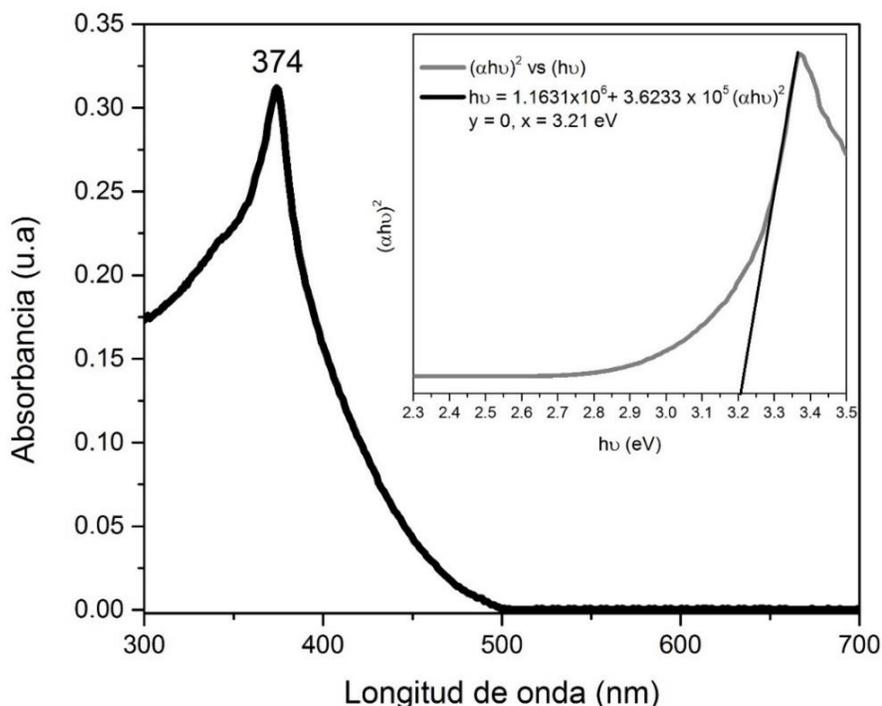


Figura 14. Espectro de absorción UV-Visible de las nanopartículas de ZnO presentando su máximo de absorción en 374 nm y la curva de Tauc (recuadro) usada para determinar su E_g (3.21 eV = 386 nm) a partir de la línea tangente (línea negra sólida) a la curva.

Este resultado nos indica que las ROS podrían ser generadas por las ZnO nps en un medio acuoso bajo iluminación ultravioleta (UV) de longitud de onda larga (UVA, 400-320 nm). La radiación UV emitida por el Sol es de 150 a 400 nm, en las formas UVA, UVB y UVC, pero a causa de la absorción por parte de la atmósfera terrestre el 95% de los rayos UV que llegan a la superficie terrestre son del tipo UVA (92). Por lo tanto, se hipotetiza que estas ROS podrían ser generadas por las ZnO nps al exponerlas a la luz solar.

7.1.2. Caracterización físico-química de los apósitos de Zn-nps/PCL.

7.1.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La Figura 15 muestra las micrografías representativas por SEM de los diferentes apósitos electrohilados de PCL y Zn/PCL con estructura fibrilar uniaxial y coaxial (Tabla 1), así como el diámetro promedio de las fibras. En general, las fibras exhibieron porosidad interconectada, ausencia de defectos (“beads”) y orientación aleatoria. La Figura 16 muestra gráficamente el diámetro promedio de las fibras que componen los diferentes apósitos; se observa que las fibras presentaron un diámetro promedio (d) de entre 1.019 - 0.512 μm y que el diámetro de las fibras de PCL tendió a decrecer en función del incremento de la concentración de ZnO nps en la disolución ZnO nps-PCL empleada para electrohilar las fibras uniaxiales y la coraza externa de las fibras coaxiales. Este decremento puede ser atribuido al incremento de cargas positivas en

la disolución polimérica debido a la presencia de las ZnO nps; resultando en una mayor densidad de carga en la superficie del jet durante el proceso de electrohilado; así, las cargas llevadas por el jet incrementan con la concentración de nps en la disolución y con esto, las fuerzas de elongación bajo la presencia del campo eléctrico se reducen resultando en diámetros de fibras menores (36).

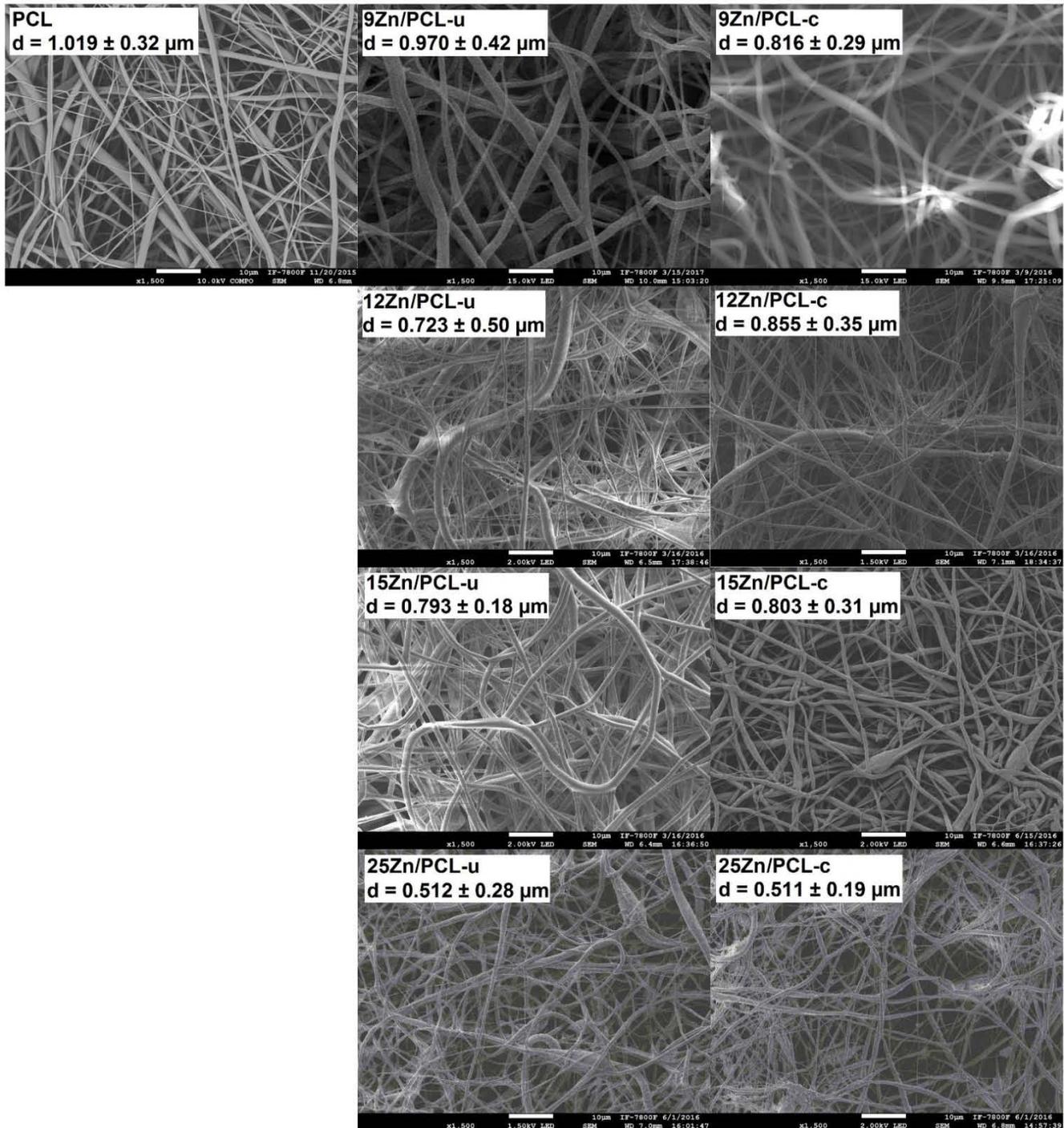


Figura 15. Micrografías por microscopia electrónica de barrido (SEM) de los apósitos fibrilares electrohilados de Zn-nps/PCL uniaxiales y coaxiales.

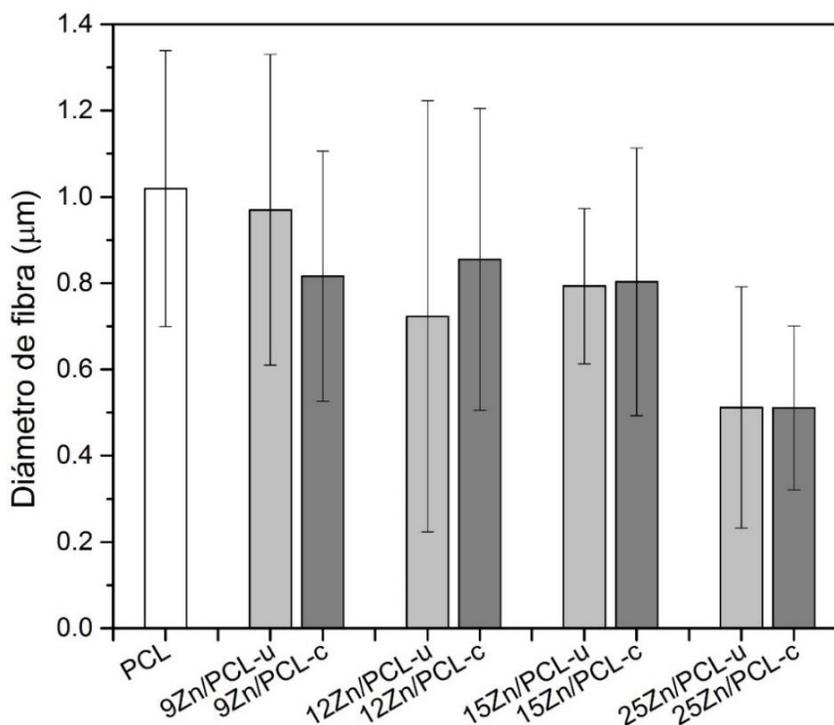


Figura 16. Diámetro promedio de las fibras electrohiladas de PCL (barra color blanco sólido) y de las diferentes fibras compuestas de Zn-nps/PCL con estructura uniaxial (barras color gris claro sólido) y con estructura coaxial (barras color gris oscuro sólido).

7.1.2.2. Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) general y mapeo.

El análisis por EDS general mostró que las fibras electrohiladas únicamente con la disolución de PCL se componen principalmente de carbono (C) y de oxígeno (O), esto era lo esperado ya que la PCL está compuesta de C, O e hidrógeno (H); sin embargo, el H no se observó debido a que no puede ser detectado con esta técnica.

Los resultados por EDS general mostraron que los diferentes apósitos electrohilados a partir de las disoluciones de ZnO nps-PCL, se componen principalmente de C (debido a la PCL), O (por la PCL y por las ZnO nps) y zinc (Zn), confirmando la presencia de Zn debido a las ZnO nps. La cantidad de C, O y Zn (wt.%) presente en la superficie de cada uno de los apósitos electrohilados se muestra en la Tabla 3.

El porcentaje en peso (wt.%) de Zn presente en las diferentes fibras corroboró que los apósitos compuestos de fibras coaxiales tienen una concentración menor de Zn (en función del peso total de las fibras) que los correspondientes apósitos compuestos de fibras uniaxiales; es decir, comparando las fibras uniaxiales que fueron electrohiladas usando la misma disolución ZnO nps-PCL que se usó para la coraza externa de las fibras coaxiales. La mayor concentración de Zn en las fibras con estructura uniaxial era esperado ya que las fibras con estructura coaxial poseen PCL adicional en comparación con las de estructura uniaxial, pues el núcleo-interno de

estas fibras coaxiales está compuesto únicamente de PCL lo que disminuye la razón wt.% general Zn:C (i.e, las fibras con estructura coaxial contienen más policaprolactona que las fibras con estructura uniaxial). Estos resultados corroboraron que la cantidad de compuestos a base de Zn presente en los apósitos compuestos de fibras con estructura uniaxial y de fibras con estructura coaxial está presente en función de la concentración de ZnO nps en las soluciones de electrohilado. Es claro que entre mayor concentración de ZnO nps fue agregada a las soluciones poliméricas de electrohilado, mayor fue la cantidad de Zn (wt.%) presente en la muestra.

Tabla 3. Composición química elemental de la superficie de los diferentes apósitos fibrilares de Zn/PCL evaluada por EDS.

Fibras electrohiladas	Composición elemental por EDS (wt.%)		
	C	O	Zn
PCL	87.19	12.81	0
9Zn/PCL-u	76.76	21.76	1.48
12Zn/PCL-u	78.86	19.31	1.83
15Zn/PCL-u	68.85	28.98	3.07
25Zn/PCL-u	83.41	9.39	7.19
9Zn/PCL-c	83.23	15.84	0.94
12Zn/PCL-c	74.21	24.4	1.39
15Zn/PCL-c	74.06	23.77	2.17
25Zn/PCL-c	85.95	8.07	5.99

Asimismo, los resultados de EDS mapeo que se muestran en la Figura 17 expusieron que el Zn se encontró embebido homogéneamente a través de las diferentes fibras (tanto las que poseen una estructura uniaxial como las que poseen una estructura coaxial) que componen los apósitos antibacterianos. Además, se puede observar que el Zn se encuentra co-localizado homogéneamente entre las zonas donde se encuentran el C y el O, lo que sugiere que las nps fueron bien dispersadas a través de las fibras de PCL, y por lo tanto, a través de los diferentes apósitos Zn/PCL (compuestos tanto de fibras con estructura uniaxial como de fibras con estructura coaxial); esto indicó que las propiedades antibacterianas que los compuestos de Zn le confieren a las fibras electrohiladas de PCL, donde fueron embebidas, permanecerán homogéneas en los apósitos.

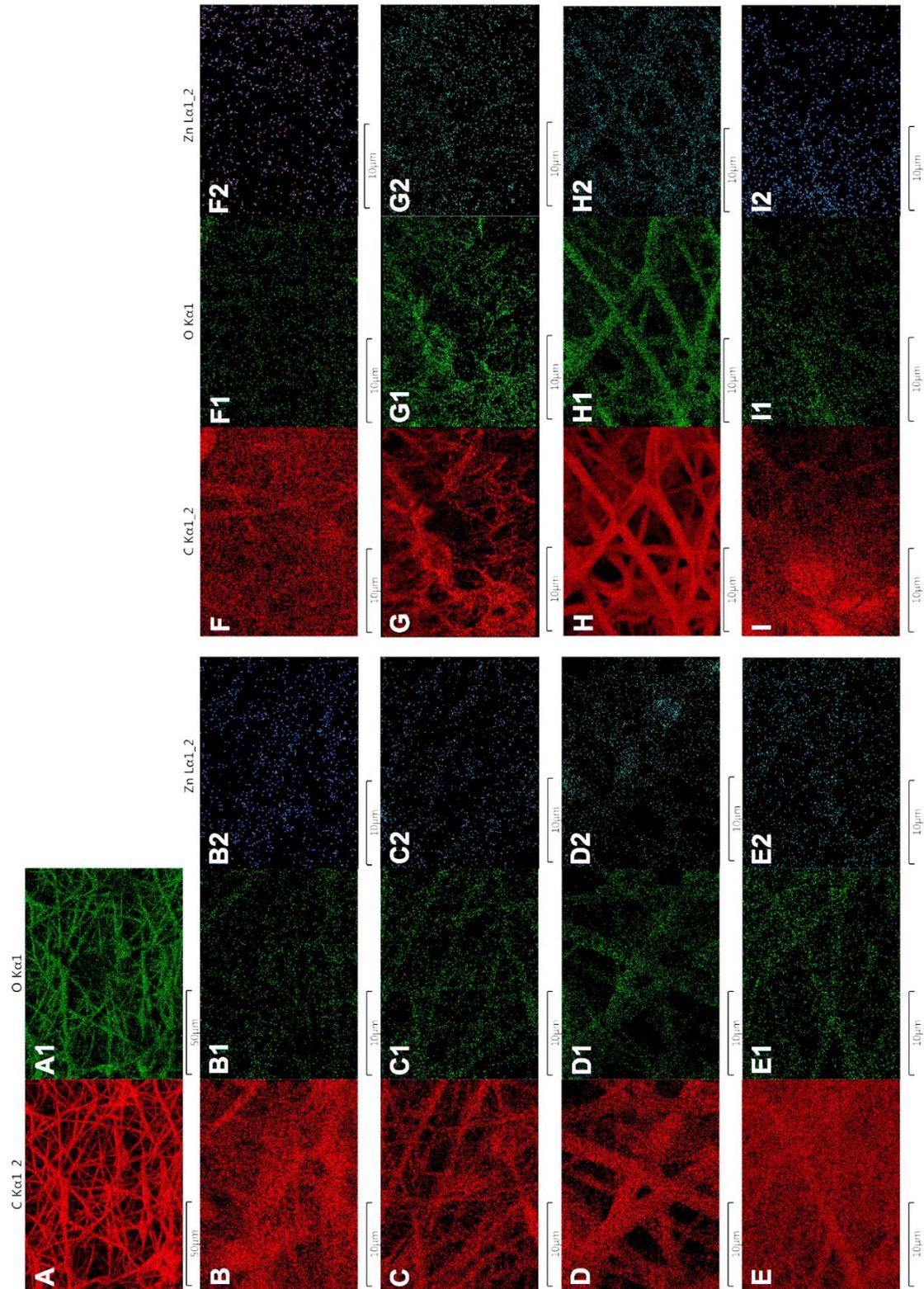


Figura 17. Mapeo de la composición química elemental evaluada por EDS de la superficie de las fibras A-A1) PCL, B-B2) 9Zn/PCL-u, C-C2) 12Zn/PCL-u, D-D2) 15Zn/PCL-u, E-E2) 25Zn/PCL-u, F-F2) 9Zn/PCL-c, G-G2) 12Zn/PCL-c, H-H2) 15Zn/PCL-c, I-I2) 25Zn/PCL-c.

7.1.2.3. Microscopia electrónica de transmisión (TEM).

La estructura coaxial (núcleo-coraza) de las fibras electrohiladas coaxialmente a partir de las soluciones de PCL-AcAc (para el núcleo interno de las fibras) y de ZnO nps-PCL-AcAc (para la coraza externa) fue confirmada por las micrografías TEM que se muestran en la Figura 18. Las micrografías corroboraron la presencia de nanopartículas de $\approx 20-40$ nm con un peso atómico notablemente superior al del carbono (C) y al del oxígeno (O) embebidas en las fibras de PCL (estructuras brillantes en las micrografías), las cuales pueden ser adscritas a nanocompuestos de Zn (con base en los resultados por EDS).

A pesar de la reacción química entre el AcAc y las ZnO nps durante la preparación de la solución polimérica, el tamaño promedio de las partículas presentes en las fibras permaneció de dimensiones nanométricas; probablemente porque las partículas fueron contenidas dentro de las cadenas poliméricas de la PCL que actuaron como un controlador de tamaño, manteniendo a las nuevas partículas formadas (acetato de Zn) en una dimensión nanométrica. En apoyo a esto, Mater *et al.* fabricaron matrices de fibras poliméricas por electrohilado usando un polímero de bajo peso molecular como controlador de tamaño de nanopartículas y agente limitante para diferentes precursores de sales, incluyendo acetato de Zn (93).

Por otro lado, en las micrografías TEM se observó que las nanopartículas tendieron a dispersarse predominantemente en el centro de las fibras uniaxiales (“-u”) de manera alineada, particularmente en aquellas que fueron electrohiladas a partir de las soluciones poliméricas con una cantidad mayor de ZnO nps (i.e. 15 Zn/PCL-u y 25Zn/PCL-u); y se observó que en las fibras con estructura coaxial (“-c”) las nanopartículas permanecieron en la coraza externa. Este fenómeno podría deberse a las interacciones electrostáticas entre los nanocompuestos de zinc cargados positivamente y la polarización de las moléculas de PCL. Durante el proceso de electrohilado, las moléculas de PCL son polarizadas y alineadas perpendicularmente al campo eléctrico; de esta manera la superficie del jet está cargado positivamente y el centro negativamente; debido a esto, los nanocompuestos de Zn que están cargados positivamente son fácilmente atraídos hacia el centro de las fibras. En el caso de las fibras con estructura coaxial, el campo eléctrico es generado principalmente entre la aguja externa y el colector; por lo tanto, las moléculas de PCL en la disolución inyectada a través de la aguja interna están menos polarizadas que las moléculas de PCL en la disolución bombeada por la aguja externa. Puesto que el núcleo interno de las fibras coaxiales está electrostáticamente menos organizado, los nanocompuestos de Zn permanecieron principalmente en la coraza externa de las fibras, lo cual es ventajoso ya que la actividad antibacteriana de las nps depende en gran medida de la superficie de contacto que tengan con las bacterias.

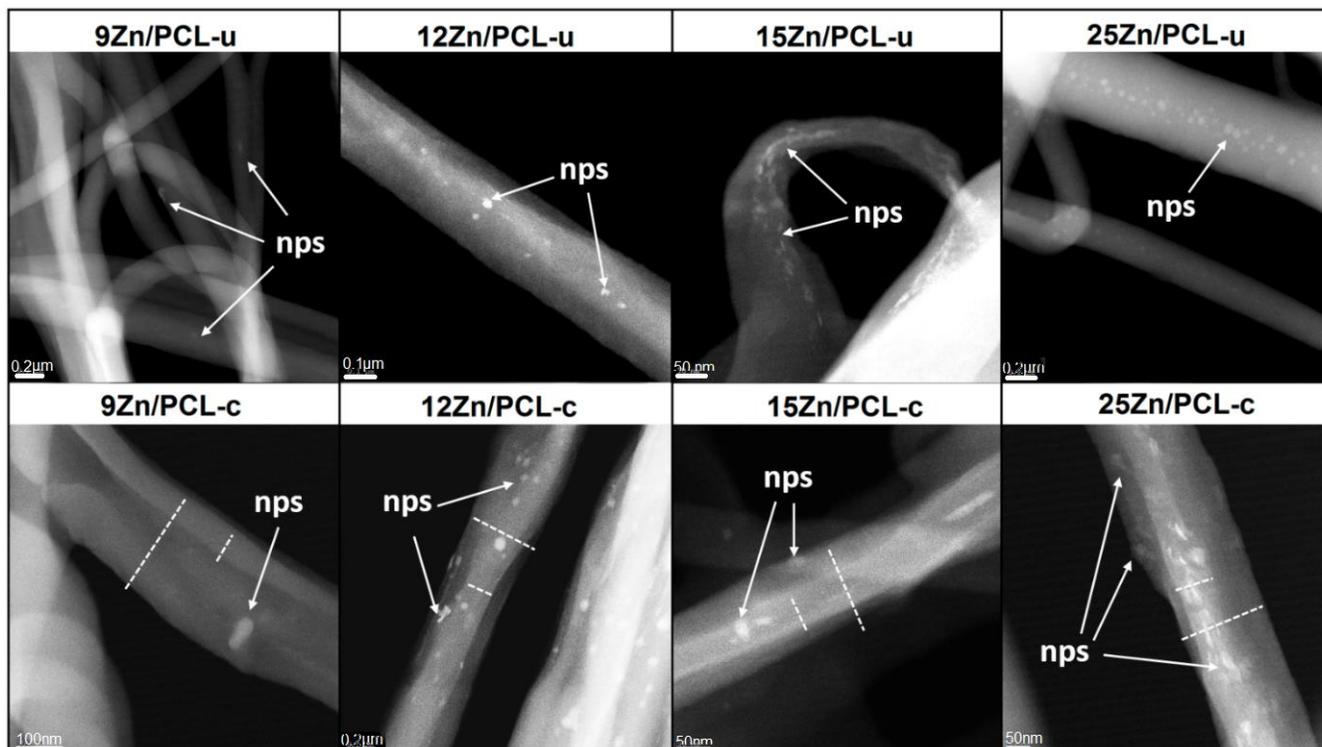


Figura 18. Micrografías representativas por TEM de los apósitos electrohilados de Zn-nps/PCL hechos de fibras con estructura uniaxial (-u) o coaxial (-c) mostrando la presencia de nanopartículas a base de Zn (zonas brillantes).

7.1.2.4. Espectroscopia infrarroja (FT-IR).

Los espectros FT-IR de los apósitos de PCL y nano-compuestos de Zn/PCL mostraron los picos de absorción característicos de los modos vibracionales presentes en la PCL en 2950 cm^{-1} (estiramiento asimétrico CH_2), 2865 cm^{-1} (estiramiento simétrico CH_2), 1729 cm^{-1} (estiramiento del grupo carbonilo, $\text{C}=\text{O}$), 1294 cm^{-1} (estiramiento $\text{C}-\text{C}$ y $\text{C}-\text{O}$) y 1240 cm^{-1} (estiramiento asimétrico $\text{C}-\text{O}-\text{C}$) (48). Los espectros de las fibras nano-compuestas no mostraron ninguna banda evidente que corresponda al ZnO, probablemente porque se espera que estas bandas aparezcan con baja intensidad (debido a las pequeñas concentraciones presentes en las fibras poliméricas) y que se encuentren en alrededor de 435 cm^{-1} (espectro ZnO nps de las Figuras 19A y B); por lo tanto, pueden ser fácilmente enmascaradas por las intensas bandas correspondientes a los modos vibracionales de la PCL que se encuentran presentes en esas frecuencias. Sin embargo, se observó una banda débil en 1549 cm^{-1} que puede asignarse al estiramiento COO^- del acetato de Zn (líneas negras punteadas en las Figuras 19A y B), indicando que se formaron especies de acetato de Zn debido a la reacción entre el AcAc y las ZnO nps en las soluciones de electrohilado (94). Como se mencionó anteriormente, el acetato de Zn es una sal que también posee propiedades antibacterianas principalmente atribuidas a la liberación de iones de Zn^{+2} debido a su disolución por hidrólisis; además, ha sido reportado

como una de las sales de Zn con propiedades antibacterianas más biocompatibles a células mamíferas (56–59).

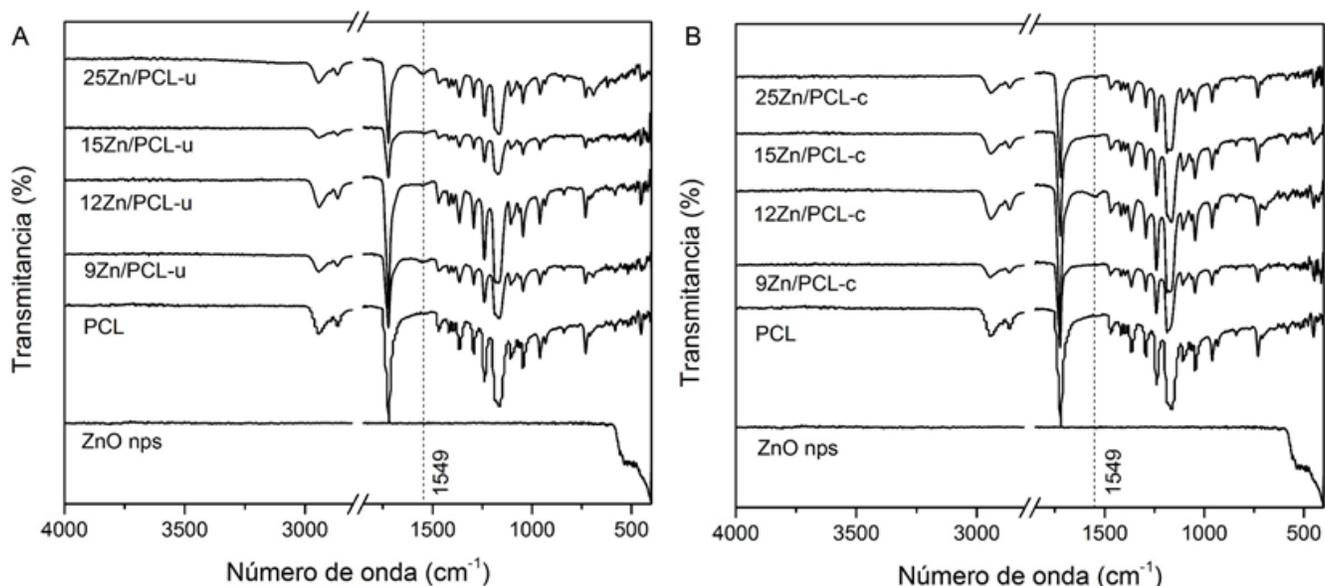


Figura 19. Espectros FTIR de los apósitos de Zn-nps/PCL hechos de A) fibras con estructura uniaxial y de B) fibras con estructura coaxial. La banda correspondiente al acetato de Zn está marcada con una línea negra punteada. El espectro de las ZnO nps se muestra en ambas figuras como referencia.

7.1.2.5. Difracción de Rayos X (XRD).

Los difractogramas de rayos X de los apósitos de PCL y de nano-compuestos de Zn con PCL (de fibras con estructura uniaxial y coaxial) se muestran en la Figura 20.; todos ellos exhibieron dos picos predominantes de difracción en 22.54° y 24.73° , los cuales se corresponden a los planos (110) y (200) de la estructura semi-cristalina de la PCL (55). Por otro lado, en los difractogramas de las fibras nano-compuestas (Zn-nps/PCL) se observaron picos de menor intensidad en 31.67° , 34.19° , 35.59° que fueron atribuidos a los planos cristalinos (113), (002) y (101) de la estructura cristalina zincita (hexagonal) del ZnO (JCPDS 05-0664); además, se observaron los picos 20.96° , 23.88° , 28.51° , 40.31° , 41.57° y 43.00° que fueron asignados a los planos cristalinos (111), (-112), (312), (-513), (512) de la fase monoclinica del acetato de Zn (JCPDS 14-902). La intensidad de los picos de difracción correspondientes a las fases hexagonal y monoclinica de los dos compuestos de Zn (ZnO y acetato de Zn) incrementaron de manera proporcional a la concentración de Zn en las fibras (análisis por EDS) y a la concentración inicial de ZnO nps en las soluciones ZnO nps-PCL usadas para electrohilar las fibras. El tamaño promedio de los cristales de ZnO y acetato de Zn fueron estimados en 25.21 nm y 27.21 nm, respectivamente, usando la ecuación de Sherrer (Ecuación 1). El tamaño de estos cristales, en este caso, corresponde a los tamaños de las nanopartículas observadas en las fibras a través de las micrografías por TEM (estructuras brillantes de las micrografías de la Figura 18).

Los resultados de XRD confirmaron la presencia de una mezcla de nano-cristales de ZnO y acetato de Zn embebidas en las fibras de Zn/PCL (uniaxiales y coaxiales) indicando que una porción de las ZnO nps que se añadieron a la soluciones de electrohilado reaccionó con el AcAc y formaron acetato de Zn, de manera que los apósitos electrohilados poseen ambos nano-compuestos de Zn, los cuales se revelaron embebidos a lo largo de las fibras uniaxiales y en la coraza externa de las fibras coaxiales por medio de las micrografías TEM (Figura 18).

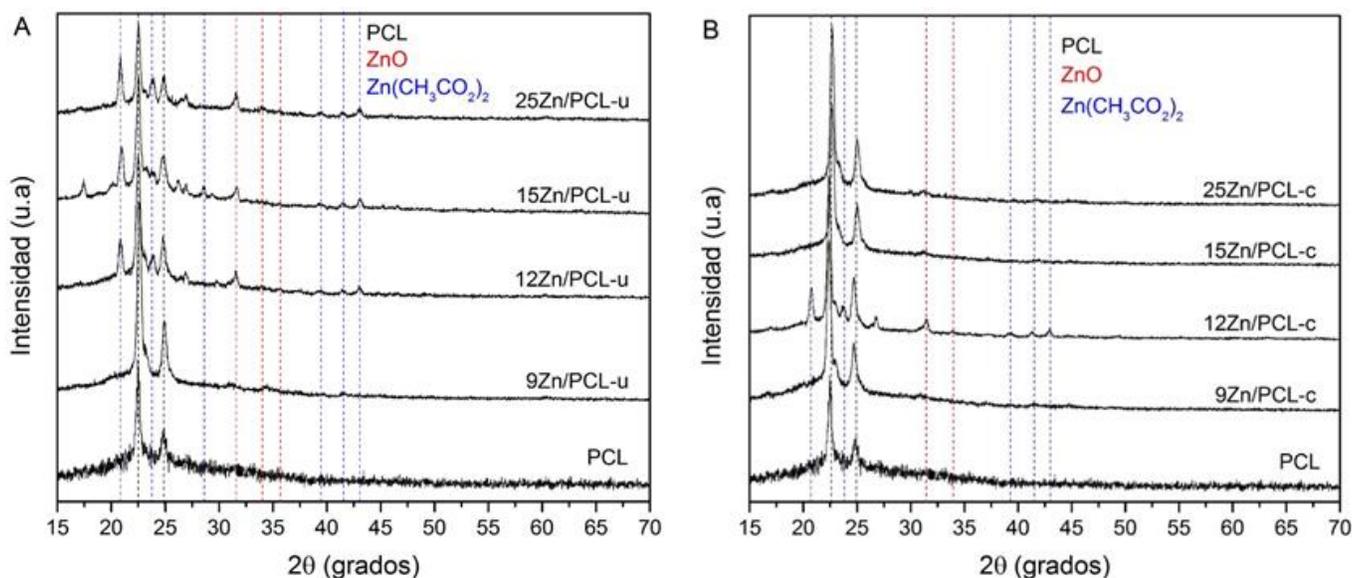


Figura 20. Patrones de XRD de los apósitos de Zn-nps/PCL hechos de A) fibras con estructura uniaxial y de B) fibras con estructura coaxial. Los picos de difracción correspondientes a las estructuras semi-cristalina de la PCL, hexagonal del ZnO y monoclinica de acetato de Zn se encuentran marcadas con líneas punteadas negra, roja y azul, respectivamente.

7.1.2.6. Ángulo de contacto al agua (WCA).

El carácter hidrofílico o hidrofóbico de la superficie de las fibras uniaxiales y coaxiales de Zn-nps/PCL electrohiladas fue evaluado midiendo el ángulo de contacto (H_2O DI). En la Figura 21 se observa que todas las fibras, tanto la compuesta únicamente de PCL como las compuestas de Zn nps/PCL (uniaxiales y coaxiales) mostraron un carácter hidrofóbico ($\Theta > 90^\circ$).

Sin embargo, se observa claramente que el ángulo de contacto de las fibras que contienen nanocompuestos de Zn ($\Theta \approx 130.6 - 101.4$, Tabla 4) es menor que el de las fibras compuestas únicamente de PCL ($\Theta = 134.5$, Tabla 4); así, claramente la presencia de nanocompuestos de Zn en los apósitos de PCL generaron una disminución de hidrofobicidad en la superficie de las fibras.

La naturaleza polar de las moléculas que componen los nanocompuestos de Zn embebidos en las fibras aumentó la afinidad de la superficie de los apósitos con el agua ya que se favoreció la interacción dipolo-dipolo entre las moléculas de los nanocompuestos de Zn y las de agua; consecuentemente, la hidrofobicidad de las fibras decreció conforme la concentración de nano-compuestos de Zn en las fibras aumentó. Además, la disminución de hidrofobicidad

fue ligeramente mayor en la superficie de los apósitos de fibras coaxiales (Zn/PCL-c) que en los apósitos correspondientes de fibras uniaxiales (Zn/PCL-u). En los apósitos de fibras coaxiales los nanocompuestos de Zn están expuestos mayoritariamente en la superficie de las fibras (coraza externa) lo que genera un menor ángulo de contacto que en las fibras uniaxiales en donde los nanocompuestos de Zn se encuentran dispersos en toda la fibra (principalmente en su eje axial, centro de las fibras).

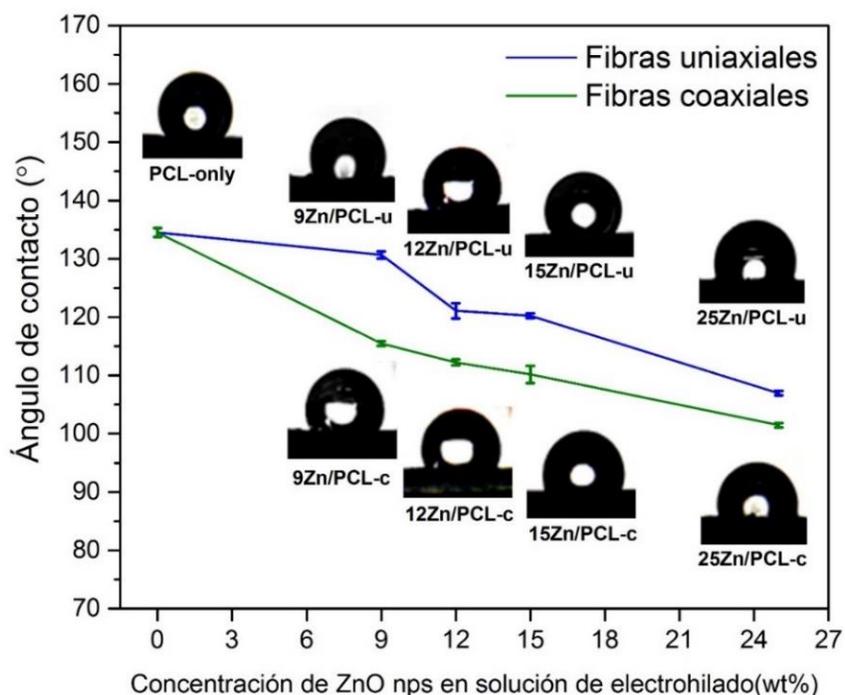


Figura 21. Ángulos de contacto promedio \pm DE medidos entre la gota de agua y la superficie de las diferentes fibras electrohiladas uniaxialmente (línea sólida azul) y coaxialmente (línea sólida verde).

Tabla 4. Ángulos de contacto, promedio \pm DE, medidos entre la gota de agua y la superficie de las diferentes fibras electrohiladas.

Fibras electrohiladas	Ángulo de contacto (°)
PCL	134.5 \pm 0.7
9Zn/PCL-u	130.6 \pm 0.6
12Zn/PCL-u	121.0 \pm 1.3
15Zn/PCL-u	120.2 \pm 0.4
25Zn/PCL-u	106.9 \pm 0.4
9Zn/PCL-c	115.5 \pm 0.4
12Zn/PCL-c	112.2 \pm 0.5
15Zn/PCL-c	110.1 \pm 1.5
25Zn/PCL-c	101.4 \pm 0.4

7.1.2.7. Pérdida de masa.

La pérdida de masa de los diferentes apósitos antibacterianos que contenían Zn-nps en un medio ácido (pH = 4.01) resultó significativamente mayor en comparación con las fibras de PCL que no contenían nps como se observa en la gráfica de la Figura 22. La tasa de pérdida de masa más alta se produjo durante los primeros 3 días, dando lugar a una pérdida de masa de 43-55% en las fibras con Zn-nps y estructura uniaxial, una pérdida de masa (Wloss) de 40-50% en las fibras con Zn-nps y fibras con estructura coaxial y una Wloss de 11% para las fibras de PCL (Figura 22). Después del día 3, la tasa de pérdida de masa disminuyó; la Wloss en el día 21 fue similar para todos los apósitos de fibras con nps independientemente de la concentración de Zn-nps (55 - 68%) y para las fibras de PCL la Wloss fue de 28%. Claramente, la pérdida de masa de los apósitos Zn-nps/PCL fue significativamente mayor en comparación con PCL, probablemente debido a un efecto sinérgico entre el proceso de degradación de la PCL y de las propiedades de las Zn-nps. La degradación de la PCL ocurre por hidrólisis (95) y la polaridad de las nps de ZnO y acetato de Zn disminuyó la hidrofobicidad de los apósitos facilitando interacción superficial con el agua contribuyendo a aumentar la degradación. Se produjeron altas tasas de degradación durante los primeros días de incubación (Wloss = 45%, día 3) y luego, las tasas de degradación disminuyeron (Wloss = 65%, día 6) hasta que no se produjeron incrementos significativos de Wloss. Este patrón de degradación puede explicarse para la primera etapa que implica la degradación rápida de la fase amorfa de PCL y la segunda que implica la degradación lenta de la fase cristalina de la PCL (95,96); las Zn-nps disminuyeron la cristalinidad de PCL, lo que también contribuye a aumentar la pérdida de masa de los apósitos de Zn-nps/PCL en comparación con PCL.

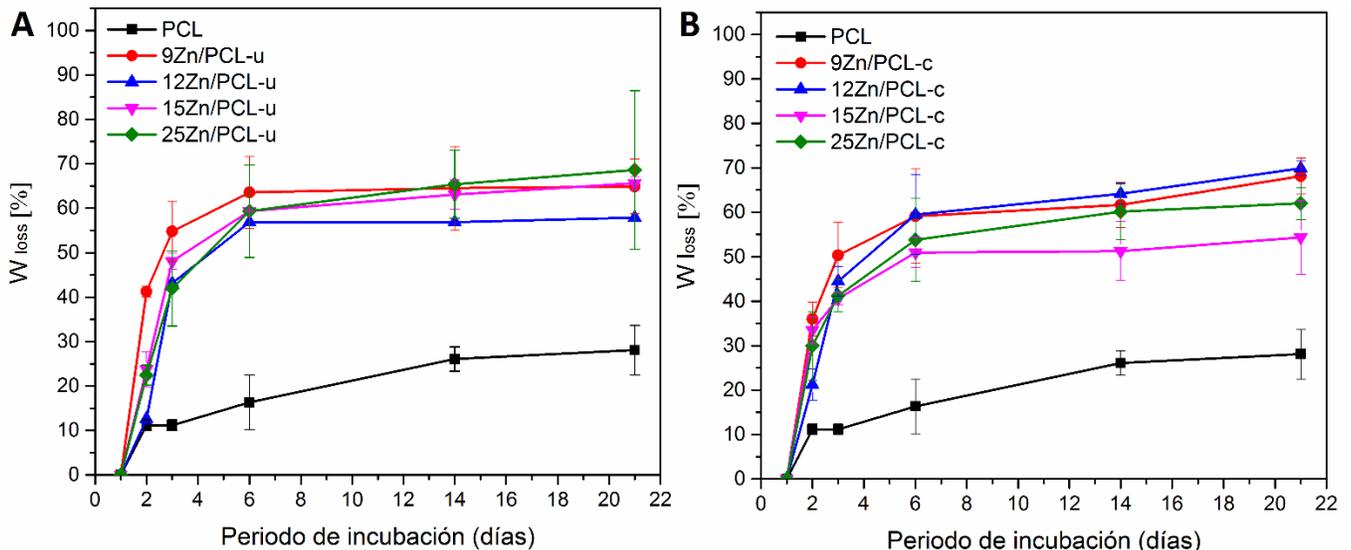


Figura 22. Pérdida de masa de los apósitos antibacterianos de Zn-nps/PCL conformados de fibras con estructura uniaxial (A) y de fibras con estructura coaxial (B) inmersas en medio ácido en función del tiempo.

7.1.3. Evaluación de la actividad antibacteriana de los apósitos de Zn-nps/PCL.

La capacidad de las fibras de inhibir el crecimiento bacteriano en el medio de cultivo circundante (crecimiento bacteriano planctónico en un medio líquido) y de prevenir la adhesión de bacterias en la superficie de las fibras (y con ello prevenir la formación de biopelícula) fue estimada mediante los ensayos de turbidimetría y de MTT, respectivamente, en contra de las cepas bacterianas *E. coli* (Gram-negativa) y *S. aureus* (Gram-positiva).

7.1.3.1. Ensayo antibacteriano por Turbidimetría.

Los resultados del ensayo de turbidimetría después de 24 h de incubación de las dos diferentes cepas bacterianas en presencia de las diferentes fibras electrohiladas (Figura 23) indicaron que todas las fibras de PCL que contienen nanocompuestos de Zn inhibieron significativamente el crecimiento bacteriano planctónico en el medio líquido en comparación con las fibras compuestas únicamente de PCL (fibras control). El crecimiento bacteriano fue reducido $\approx 50\%$ en presencia de la mayoría de las fibras de PCL que contenían nano-compuestos de Zn respecto a la fibra control de PCL; sin embargo, esta inhibición fue ligeramente mayor en contra de *S. aureus* que en contra de *E. coli* lo que está de acuerdo con reportes previos en los cuales se usaron nanopartículas de ZnO y nps de acetato de Zn como agentes antibacterianos en contra de estas dos cepas (35,58,94,97,98). Este fenómeno ha sido comúnmente atribuido a la diferente constitución de la pared celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas; la pared celular de las bacterias Gram-negativas (como *E. coli*) presenta dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram-positivas (como *S. aureus*) sólo poseen una membrana lipídica interna bajo una gruesa pared de peptidoglicano lo que incrementa su susceptibilidad a los compuestos antibacterianos como ZnO y acetato de Zn. La pared celular de *S. aureus*, compuesta por peptidoglicanos (aminoácidos), está expuesta directamente al medio circundante y es posible que el carácter polar de estas moléculas le haya permitido interactuar más fácilmente con los iones de Zn^{2+} generados por las Zn-nps embebidas en las fibras lo que, posiblemente, resultó en una mayor respuesta antibacteriana. Por otro lado, la gruesa pared celular de *E. coli*, también compuesta por peptidoglicanos, está protegida del medio circundante por su membrana lipídica externa y es posible que la baja polaridad de estas moléculas, hayan limitado su interacción con los iones de Zn^{2+} generados por las Zn-nps embebidas en las fibras causando una menor respuesta antibacteriana.

La actividad antibacteriana planctónica de las fibras no pareció haberse incrementado con el aumento de la concentración de ZnO nps en las soluciones de electrohilado; las fibras 9Zn/PCL-u y 9Zn/PCL-c disminuyeron el crecimiento bacteriano planctónico $\approx 50 - 60\%$ y $\approx 40 - 50\%$, respectivamente para *S. aureus* y *E. coli*; sin embargo, no se observó un aumento significativo en la actividad antibacteriana en el resto de las fibras electrohiladas con las soluciones con mayores concentraciones de ZnO nps soluciones (i.e. 12Zn/PCL-u, 12Zn/PCL-c, 15Zn/PCL-u, 15Zn/PCL-c, 25Zn/PCL-u y 25Zn/PCL-c). El ácido acético (AcAc) empleado para preparar las soluciones de electrohilado es un ácido débil con un porcentaje de ionización

de $\approx 8.6\%$ a temperatura ambiente, lo que indica que de las especies en equilibrio presentes en la disolución (CH_3COOH , CH_3COO^- y H_3O^+) solo el 8.6% se encuentran ionizados (CH_3COO^- y H_3O^+); por lo tanto, la reacción entre el AcAc y las ZnO nps que forma el acetato de Zn está limitada por la cantidad de especies CH_3COO^- presentes en el disolvente y no por la cantidad de ZnO nps. Como el acetato de Zn presente en las fibras es el principal liberador de iones de Zn^{2+} en el medio líquido, la inhibición del crecimiento bacteriano planctónico que generan las diferentes fibras con nanocompuestos de Zn es similar.

En términos del efecto en la actividad antibacteriana planctónica de las dos diferentes condiciones de iluminación antes de la inoculación bacteriana de las fibras (i.e. oscuridad y pre-iluminación con radiación UVA, Figuras 23A vs 23B y Figuras 23C vs 23D); se observó que las fibras que fueron pre-iluminadas con radiación UVA inhibieron el crecimiento bacteriano planctónico ligeramente más que lo que lo hicieron las fibras que permanecieron en oscuridad, esto sucedió para ambas cepas bacterianas; sin embargo, la reducción del crecimiento bacteriano únicamente fue significativa para la mayoría de las fibras ensayadas con *E. coli* (Figura 23B; + p de fibras "X" no iluminadas vs p de las mismas fibras "X" previamente iluminadas con luz UVA) y no lo fue para las ensayadas con *S. aureus*. Por otro lado, bajo la misma condición de iluminación previa a la inoculación bacteriana, las fibras uniaxiales que contienen nano-compuestos de Zn indujeron una inhibición significativamente mayor en el crecimiento bacteriano planctónico que sus correspondientes fibras coaxiales en contra de *E. coli*, pero para *S. aureus* sólo se observaron diferencias significativas en la inhibición del crecimiento planctónico entre las fibras uniaxiales 9Zn/PCL-u y su contraparte coaxial 9Zn/PCL-c que no fueron previamente iluminadas con radiación UVA.

Una vez que los apósitos fueron colocados en el medio de cultivo (líquido), la superficie de todas las micro-fibras del apósito se encontraban en contacto directo con el medio de cultivo debido a su alta porosidad y al tamaño de las fibras (gran superficie de contacto), de esta manera principalmente las nanopartículas de acetato de Zn embebidas en las fibras se disociaron lentamente liberando iones de Zn^{2+} en el medio de cultivo (93) lo que inhibió el crecimiento bacteriano en él. En grandes organismos, los iones de Zn^{2+} se unen a proteínas celulares sesgando selectivamente la cantidad apropiada de iones; así, cantidades adecuadas de iones de Zn^{2+} pueden ser metabolizadas por vías naturales (99). En consecuencia, se espera que una liberación estable de iones de Zn^{2+} en el organismo receptor del tratamiento (ya sea en animales en estudios *in vivo* o en pacientes en estudios preclínicos) no represente un factor tóxico relevante. Sin embargo, para organismos unicelulares (como las bacterias) la homeostasis puede ser fácilmente comprometida ya que los iones de Zn^{2+} podrían unirse indiscriminadamente con las proteínas creando una acumulación intracelular y generando una disfunción celular que deriva en el envenenamiento y muerte de las bacterias (100). Como las fibras uniaxiales tuvieron mayores concentraciones de Zn (en forma de nps de ZnO y de acetato de Zn) que sus correspondientes fibras con estructura coaxial; entonces, mayores cantidades de Zn^{2+} pudieron ser liberadas de las fibras uniaxiales que de las fibras coaxiales, causando

una mayor desestabilización en la homeostasis bacteriana e incrementando la inhibición del crecimiento planctónico bacteriano en el medio líquido

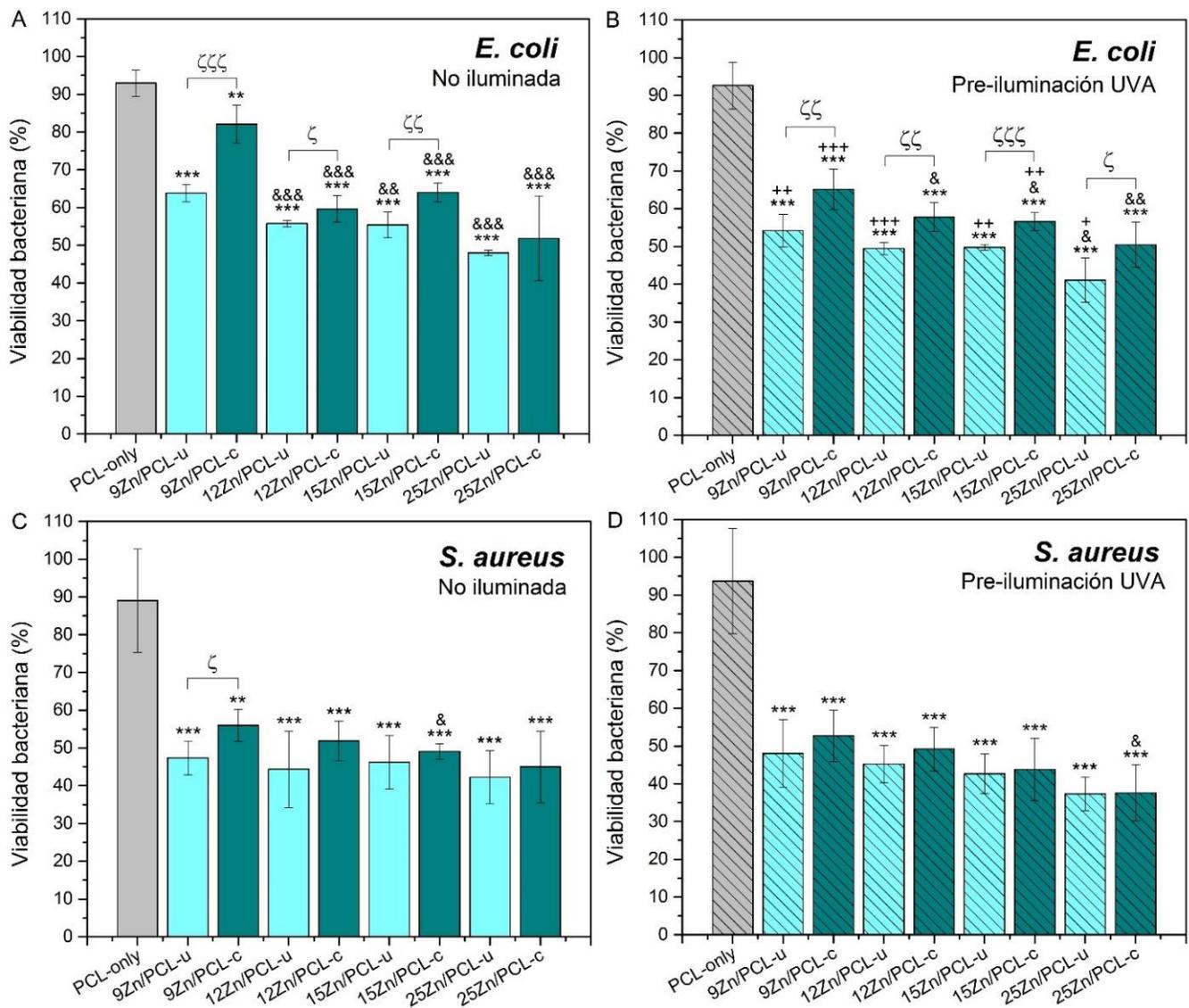


Figura 23. Proliferación bacteriana (%) estimada a partir de la turbidez del medio de cultivo inoculado después de 24 h de incubación con A-B) *E. coli* y C-D) *S. aureus* en presencia de las fibras de PCL (barras color gris), fibras-uniaxiales 9Zn/PCL-u, 12Zn/PCL-u, 15Zn/PCL-u y 25Zn/PCL-u (barras color azul claro), o fibras-coaxiales 9Zn/PCL-c, 12Zn/PCL-c, 15Zn/PCL-c y 25Zn/PCL-c (barras color azul oscuro), que no fueron iluminadas (barras color sólido) o que fueron iluminadas con radiación UVA (barras rayadas) previamente a la inoculación bacteriana. Los valores se expresan como la media \pm DE (n=6) y considerando *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001). Los símbolos sobre las barras indican: *, p de fibras "X" vs. p de fibras de PCL bajo las mismas condiciones de iluminación previa a la inoculación bacteriana; &, p de fibras "X" vs. p de fibras con la menor concentración de nanocompuestos de Zn bajo la misma condición de

pre-iluminación (i.e. 9Zn/PCL-u o vs 9Zn/PCL-c, respectivamente para fibras-uniaxiales o coaxiales); +, p de fibras “X” no iluminadas vs p de las mismas fibras “X” previamente iluminadas con luz UVA; ζ, p de fibras-uniaxiales vs. p de fibras-coaxiales correspondientes.

7.1.3.2. Ensayo antibacteriano por MTT.

La Figura 24 muestra el porcentaje de bacterias viables adheridas (formación inicial de biopelícula) a la superficie de las diferentes fibras electrohiladas compuestas de PCL y nanocompuestos de Zn respecto de las fibras electrohiladas compuestas únicamente de PCL (fibras control), estimado a partir del ensayo MTT después de 24 h de incubación bacteriana. Todas las fibras de PCL que contienen nanocompuestos de Zn inhibieron significativamente la adhesión de ambas cepas bacterianas en su superficie (i.e., el crecimiento inicial de la biopelícula) en comparación con las fibras compuestas únicamente de PCL (fibras control) para las dos condiciones de iluminación previas a la inoculación de las bacterias (oscuridad o iluminación con luz UVA). Este efecto antibacteriano en la superficie de las fibras podría ser asignado, principalmente, a la generación de ROS debido a la acción fotocatalítica de las nanopartículas de ZnO ya que se observó una mayor inhibición en la formación inicial de biopelícula en las fibras que fueron iluminadas con radiación UVA (lo que equivale a una energía $>E_g$ de las ZnO nps) antes de la inoculación bacteriana (Figura 24B y Figura 24D).

En general, se observó que las fibras que contenían nanocompuestos de Zn y que fueron iluminadas con radiación UVA previamente a la inoculación de las bacterias, produjeron una mayor disminución en la adhesión de ambas cepas bacterianas en comparación con las fibras que permanecieron en oscuridad antes de la inoculación de las bacterias. Se observaron diferencias significativas en la disminución de la adhesión de bacterias *E. coli* entre las fibras 15Zn/PCL-u, 25Zn/PCL-u, 9Zn/PCL-c y 25Zn/PCL-c que fueron previamente iluminadas con radiación UVA y las fibras correspondientes que no lo fueron (Figuras 24A vs 24B; +, p de fibras “X” no iluminadas vs p de las mismas fibras “X” previamente iluminadas con luz UVA). Asimismo, la disminución en la adhesión de las bacterias *S. aureus* fue significativa entre las fibras 12Zn/PCL-u, 9Zn/PCL-c, 12Zn/PCL-c y 25Zn/PCL-c que fueron previamente iluminadas con radiación UVA y las fibras correspondientes que no lo fueron (Figuras 24C vs 24D; +, p de fibras “X” no iluminadas vs p de las mismas fibras “X” previamente iluminadas con luz UVA). Este efecto también podría ser atribuido al mecanismo antibacteriano fotocatalítico incrementado bajo la previa iluminación artificial con radiación UVA. Como ya se mencionó anteriormente, el ZnO es un semiconductor con una $E_g \approx 3.21$ eV (386 nm) que puede generar ROS en un medio acuoso por fotocatalisis; si la producción de ROS se incrementa a un nivel que excede la capacidad de defensa antioxidante de las bacterias induciría estrés oxidativo, resultando en un daño en los lípidos, las proteínas y el ADN de las bacterias (101).

Es importante resaltar que el incremento en la actividad antibacteriana de las fibras que fueron iluminadas por 30 min con luz UVA antes de la inoculación bacteriana, implicaría que al exponer las fibras con nanocompuestos de Zn a la radiación solar (tomando en cuenta que de 95% de la radiación UV que llega a la superficie terrestre del sol es radiación UVA) se podría incrementar su actividad antibacteriana; de manera que la exposición a la luz solar del apósito

antibacteriano podría ser empleada como una estrategia segura para que los pacientes o los médicos incrementen y/o reactiven las propiedades antibacterianas de estos apósitos, aumentando su eficacia y su vida útil.

En contraste con los resultados del crecimiento bacteriano planctónico en un medio líquido (ensayo de turbidimetría) descritos anteriormente, la concentración de Zn presente en las fibras (estimada por el análisis EDS general) expuso una clara correlación con la reducción de la adhesión bacteriana en la superficie de las fibras (formación inicial de biopelícula) tanto de *E. coli* y como de *S. aureus* en ambas condiciones de pre-iluminación (oscuridad o iluminación con luz UVA); la tendencia general indicó que la adhesión bacteriana en la superficie de las fibras se redujo a medida que la concentración de Zn en las fibras fue mayor. Esto se podría atribuir a que, en las soluciones preparadas para el proceso de electrohilado, sólo una cantidad restringida de ZnO nps pudo haber reaccionado con el AcAc formando acetato de Zn y el resto de las nps se mantuvo como ZnO mostrando así, una tendencia en el efecto antibacteriano en función de la concentración de Zn presente en las fibras. Además, se debe considerar que al mismo tiempo que se generan las ROS debido al efecto fotocatalítico en la superficie de las ZnO nps, las nps podrían estar ionizándose positivamente en el medio de cultivo; y dado que el ZnO no es un compuesto que se disuelve fácilmente, las cargas positivas tienden a permanecer embebidas en la superficie de las fibras interactuando de manera destructiva con la pared celular de las bacterias cargadas negativamente.

Por otro lado, bajo la misma condición de iluminación previa a la inoculación (i.e. oscuridad o iluminación con luz UVA) se observó que la adhesión bacteriana en la superficie de las fibras con estructura coaxial fue significativamente menor que la adhesión bacteriana en la superficie de las fibras correspondientes con estructura uniaxial. Así, en términos del efecto antibacteriano que produce la estructura de las fibras (uniaxial o coaxial), la capacidad de las fibras de inhibir la adhesión bacteriana y de prevenir la formación de biopelícula fue significativamente mayor en las fibras con estructura coaxial que en sus correspondientes fibras con estructura uniaxial (p.ej., 9Zn/PCL-u vs 9Zn/PCL-c), a pesar de que la concentración total de nanocompuestos de Zn respecto a PCL fue mayor en las fibras con estructura uniaxial que en las fibras con estructura coaxial (resultados del análisis EDS general). Una mayor superficie de contacto de las ZnO nps con el medio circundante puede fácilmente resultar en un incremento en la producción fotocatalítica de las ROS y en un aumento de la interacción con sus especies iónicas, lo que explica una mayor inhibición de la adhesión bacteriana a la superficie de las fibras implicando que las fibras de Zn/PCL con estructura coaxial inhibirían la formación de biopelícula en su superficie de manera más efectiva que lo que lo harían las fibras correspondientes con estructura uniaxial. Por lo tanto, el diseño de fibras coaxiales compuestas de nanopartículas antibacterianas base Zn embebidas en la superficie de fibras de PCL propuesto en esta investigación, ha resultado en un material con propiedades antibacterianas mejoras en comparación con las fibras uniaxiales convencionales.

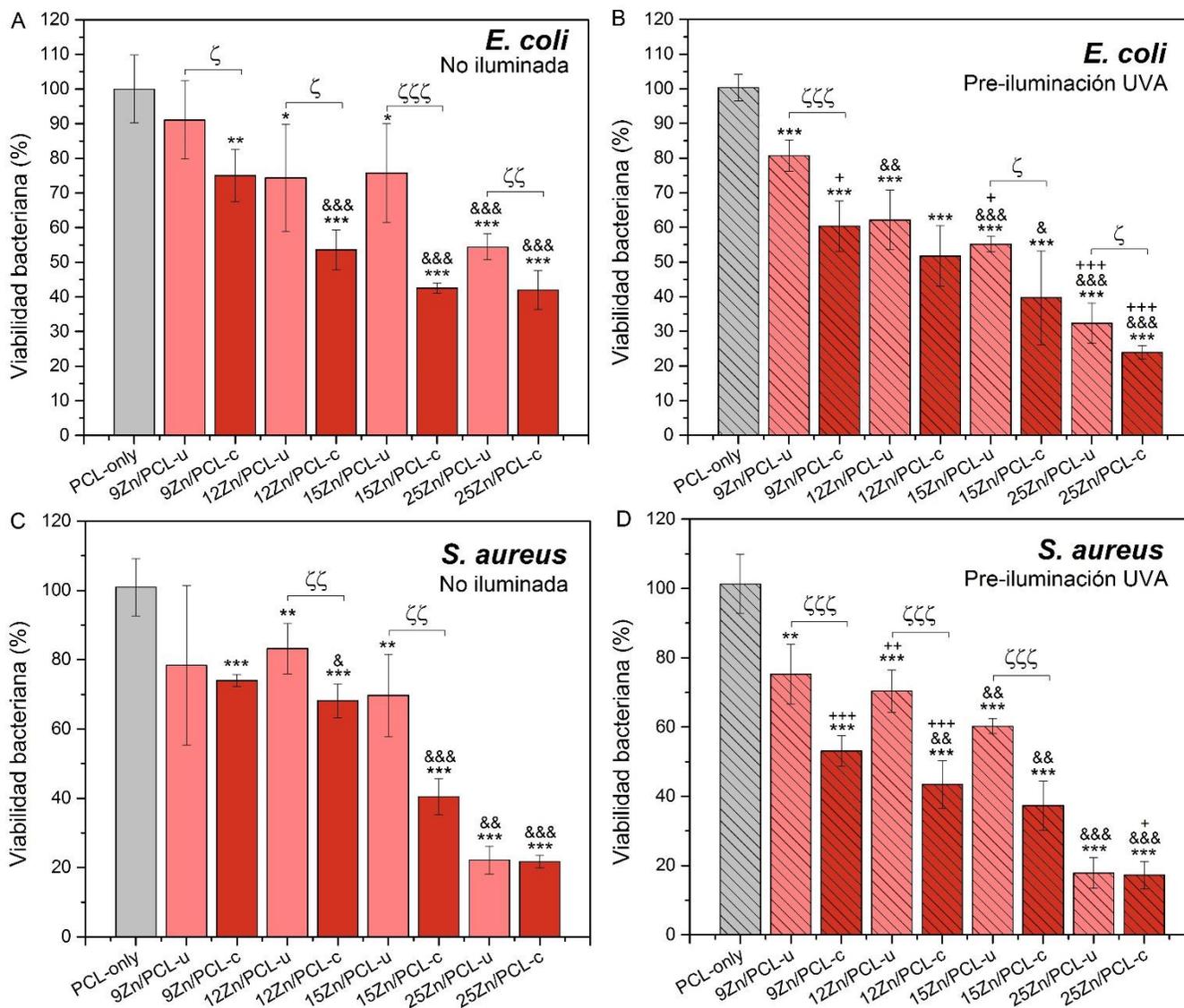


Figure 24. Bacterias adheridas (%) a la superficie de las fibras, estimado a partir de los ensayos de MTT después de 24 h de incubación con A-B) *E. coli* y C-D) *S. aureus* en presencia de las fibras de PCL (barras color gris), fibras-uniaxiales 9Zn/PCL-u, 12Zn/PCL-u, 15Zn/PCL-u y 25Zn/PCL-u (barras color anaranjado claro), o fibras-coaxiales 9Zn/PCL-c, 12Zn/PCL-c, 15Zn/PCL-c y 25Zn/PCL-c (barras color anaranjado oscuro), que no fueron iluminadas (barras color sólido) o que fueron iluminadas con radiación UVA (barras rayadas) previamente a la inoculación bacteriana. Los valores se expresan como la media \pm DE (n=6) y considerando *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001). Los símbolos sobre las barras indican: *, p de fibras “X” vs. p de fibras de PCL bajo las mismas condiciones de iluminación previa a la inoculación bacteriana; &, p de fibras “X” vs. p de fibras con la menor concentración de nanocompuestos de Zn bajo la misma condición de pre-iluminación (i.e., vs 9Zn/PCL-u o vs 9Zn/PCL-c, respectivamente para fibras-uniaxiales o -coaxiales); +, p de fibras “X” no iluminadas vs p de las mismas fibras “X”

previamente iluminadas con luz UVA; ζ , p de fibras-uniaxiales vs. fibras-coaxiales correspondientes.

7.2. Andamio celular; fibras electrohiladas de gelatina (Gel) y policaprolactona (PCL).

7.2.1. Caracterización físico-química de los andamios de Gel/PCL.

7.2.1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

En la Figura 25 se observan las micrográficas por SEM representativas de la microestructura de los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL y los respectivos histogramas de frecuencia del diámetro de las fibras. Los andamios electrohilados mostraron una morfología fibrilar con fibras que se encuentran orientadas aleatoriamente y con una porosidad interconectada; esta morfología es similar a la morfología de la matriz extracelular (MEC) de la dermis. Los diámetros promedio de las fibras fueron estimados en 2.152 μm , 0.752 μm y 0.708 μm para los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL, respectivamente. Los diámetros de las fibras de los andamios que contenían PCL y Gel fueron notablemente menores que los diámetros de las fibras compuestas de PCL; el diámetro promedio de las fibras con mayor contenido de Gel (45 wt.% respecto wt.% total, i.e. Gel + PCL) resultó ligeramente menor que el de las fibras que contenían 30 wt.% de Gel. El histograma de frecuencia de las fibras de PCL (Figura 25D) muestra que los diámetros de estas fibras se encuentran en un intervalo de 0 - 4 μm , mientras que los histogramas de los diámetros de las fibras de 30Gel/PCL (Figura 25E) y 45Gel/PCL (Figura 25F) se encuentran en un intervalo de 0 - 1.6 μm y 0 - 1.4 μm , respectivamente. Por lo tanto, las fibras de Gel/PCL tuvieron un diámetro más uniforme que las fibras de PCL lo que indica una morfología más homogénea. Se observó que el diámetro promedio y el intervalo del diámetro de las fibras fue menor en los andamios compuestos de Gel/PCL que en los compuestos de PCL; por lo tanto, la adición de Gel a las soluciones de PCL facilitó la generación de fibras más delgadas y morfológicamente más homogéneas. Una solución con una separación de fases importante generaría una morfología altamente discontinua de las fibras, por lo que el intervalo angosto del diámetro de las fibras en los histogramas de los andamios compuestos por Gel/PCL comparado con el del histograma de los andamios de PCL indica que la PCL y la Gel formaron una solución polimérica homogénea. La clara disminución en el diámetro de las fibras de Gel/PCL comparado con el de las fibras de PCL puede ser atribuida al incremento de la densidad de carga en las soluciones poliméricas debido a la presencia de la Gel. La PCL es un polímero sintético no iónico que no se espera que produzca una significativa cantidad de cargas en la solución; sin embargo, las moléculas de Gel están formadas de grupos amino y carboxilo que en un medio ácido como el AcAc (pH 2.4) pueden ser fácilmente protonados produciendo cargas positivas (82,83), lo cual incrementa la densidad de carga y la conductividad de la solución; de manera que los diámetros de las fibras disminuyeron en los andamios que contenían gelatina debido a un aumento en las fuerzas de elongación en el jet de solución polimérica expulsado durante el proceso de electrohilado (102).

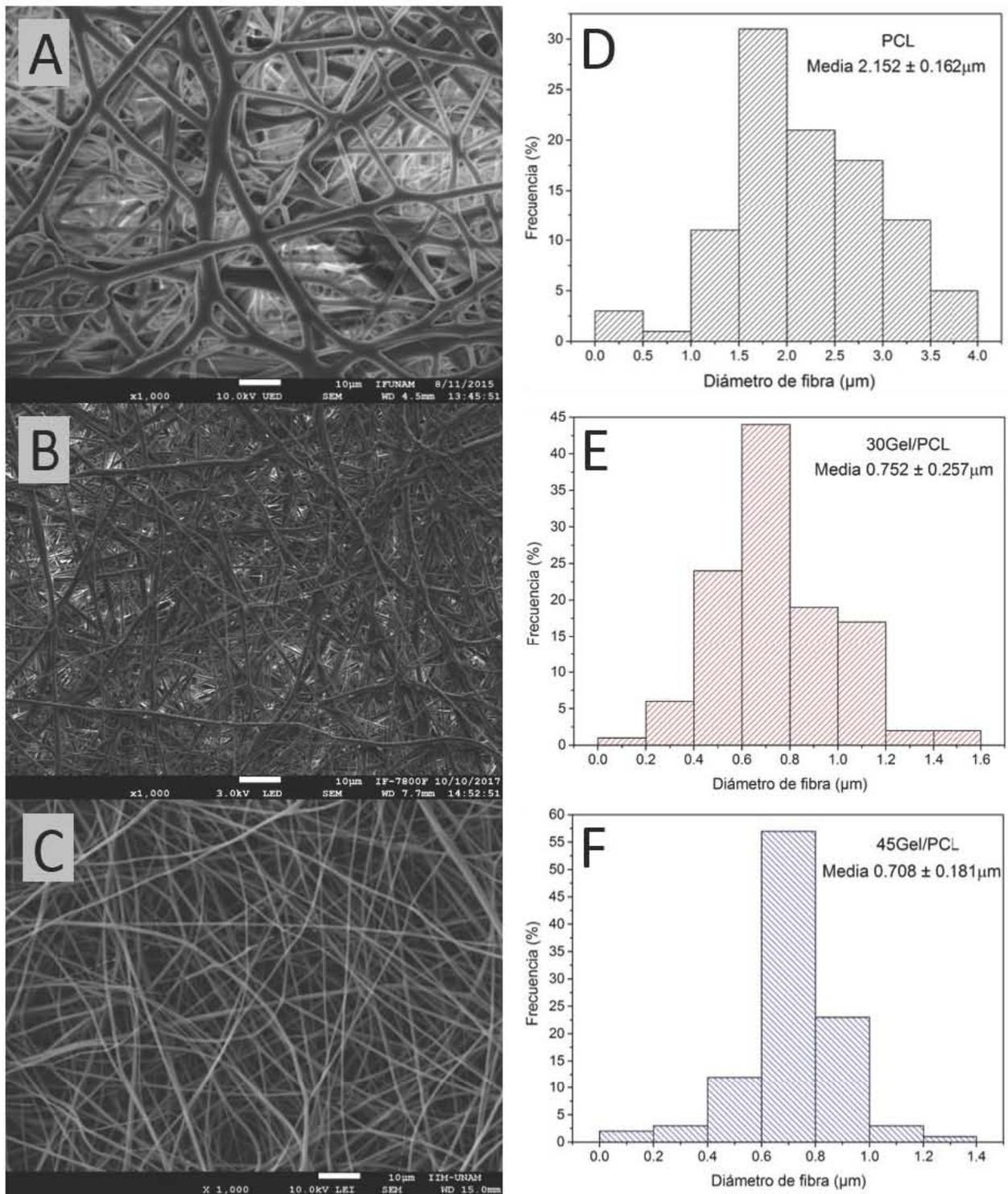


Figura 25. Micrografías de SEM representativas de los andamios (A) PCL, (B) 30Gel/PCL y (C) 45Gel/PCL y los respectivos histogramas de frecuencia del diámetro de fibras (PCL; barras con líneas negras, 30Gel/PCL; barras con líneas rojas y 45Gel/PCL; barras con líneas azules).

7.2.1.2. Ángulo de contacto al agua (WCA).

Los ángulos de contacto (Θ) medidos para los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL después de 1 s, 3 s y 5 s de depositar la gota de agua en la superficie de los andamios se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Mediciones del ángulo de contacto; media \pm DE, para los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL después de 1 s, 3 s y 5 s de haber depositado la gota de agua en la superficie.

Andamio	Ángulo de contacto (°)		
	1 s	3 s	5 s
PCL	132.86 \pm 2.44	130.99 \pm 2.57	130.51 \pm 2.62
30Gel/PCL	66.57 \pm 1.71	41.04 \pm 0.85	31.83 \pm 0.16
45Gel/PCL	56.93 \pm 7.31	19.43 \pm 1.94	14.84 \pm 0.29

En la Figura 26. se puede observar que después de 5 s de colocar la gota de agua en la superficie de los andamios compuestos únicamente de PCL, la gota de agua mantuvo su forma esférica y el ángulo de contacto se mantuvo mayor a 90° ($\Theta = 130.51^\circ$, Figura 26) indicando que los andamios de PCL poseen una superficie hidrofóbica (i.e. $\Theta > 90^\circ$). En contraste, después de 1 s de haber depositado la gota de agua en la superficie de los andamios que contienen 30 wt.% (30Gel/PCL) y 45 wt.% (45Gel/PCL) de gelatina (respecto al peso total del andamio), la gota de agua fue parcialmente absorbida y los ángulos de contacto fueron $\Theta = 66.57^\circ$ y 56.93° , respectivamente (Figura 26); después de 5 s de haber depositado la gota de agua, los ángulos de contacto disminuyeron rápidamente a 31.83° en la superficie del andamio 30Gel/PCL y a 14.85° en la del andamio de 45Gel/PCL indicando que poseen una superficie hidrofílica (i.e. $\Theta < 90^\circ$). El andamio de 45Gel/PCL el cual contenía una mayor cantidad de gelatina tuvo una superficie más hidrofílica (mayor mojabilidad al agua) que el andamio de 30Gel/PCL que contenía menor cantidad de gelatina; esto ocurrió para todos los tiempos de observación (1 s, 3 s y 5 s después de haber depositado la gota de agua en la superficie). Por lo tanto, el incremento en la mojabilidad al agua de los andamios de Gel/PCL respecto al andamio de PCL fue claramente incrementada por la adición de la gelatina. La naturaleza polar de la Gel incrementó la mojabilidad al agua de las superficies de los andamios compuestos de Gel/PCL sobre la del andamio de PCL; esto es importante porque los andamios con buena mojabilidad al agua (con superficie hidrofílica) tienen una influencia benéfica para la adhesión y la proliferación celular, y mejoran el proceso de cicatrización de heridas (103,104). Además, las células sembradas *in vitro* sobre un andamio con una superficie hidrofílica permanecerían adheridas al andamio mientras el constructo (células sembradas en el andamio) se transfiere de la caja de cultivo a la lesión, lo que favorecería el uso de este material como una estrategia para el tratamiento de heridas dermo-epidérmicas por ingeniería de tejidos.

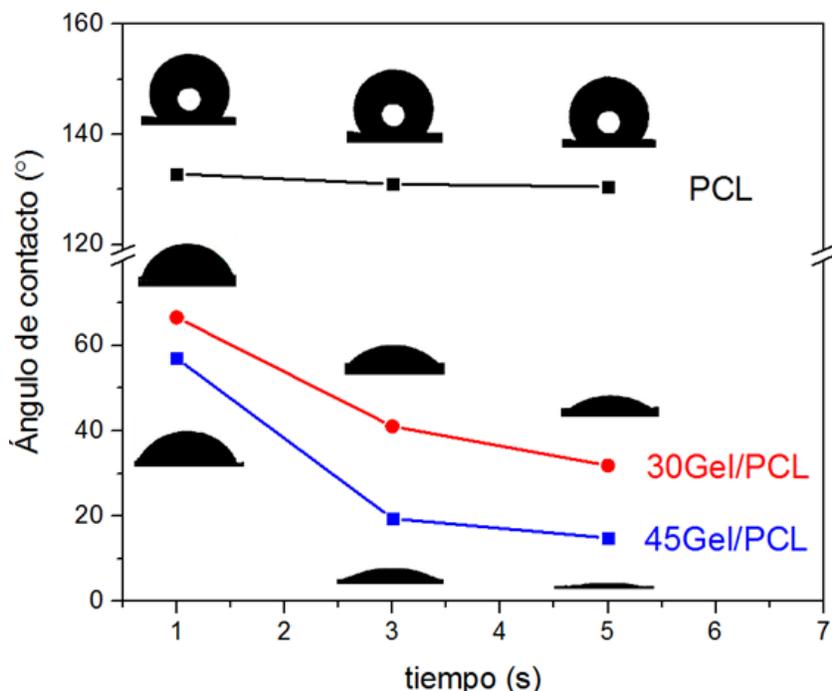


Figura 26. Gráfica comparativa de los ángulos de contacto en la superficie los andamios de PCL (línea sólida negra), 30Gel/PCL (línea sólida roja) y 45Gel/PCL (línea sólida azul) después de 1 s, 3 s y 5 s de haber depositado la gota de agua.

7.2.1.3. Espectroscopia infrarroja (FT-IR).

Los espectros FT-IR de los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL se muestran en la Figura 27. El espectro del andamio de PCL (Figura 27B) presentó los picos correspondientes a los modos vibracionales de estiramiento asimétrico y simétrico del grupo CH_2 (2945 cm^{-1} y 2859 cm^{-1} , respectivamente), estiramiento del grupo $-\text{COO}$ (1731 cm^{-1}), estiramiento del grupo C-C (1294 cm^{-1}), estiramiento asimétrico y simétrico del grupo C-O-C (1240 cm^{-1} y 1175 cm^{-1} , respectivamente) y estiramiento del grupo C-O (1045 cm^{-1}), todos ellos propios de la policaprolactona.

Los espectros FT-IR de los andamios de 30Gel/PCL (Figura 27C) y 45Gel/PCL (Figura 27D), además de mostrar las bandas correspondientes a la PCL exhibieron la presencia de los picos en 1651 cm^{-1} y 1538 cm^{-1} correspondientes a los grupos amida I y amida II, respectivamente; estos grupos son característicos de la gelatina y confirman la presencia de Gel en los andamios de PCL (Figura 27, líneas verdes punteadas). Por otro lado, los espectros FT-IR de la Gel (Figura 27A) y de la PCL (Figura 27B) mostraron bandas en 3438 cm^{-1} y 3488 cm^{-1} , respectivamente, las cuales corresponden al estiramiento del grupo N-H de la Gel y grupos O-H de la PCL; mientras que los espectros FT-IR de andamios de Gel/PCL revelaron una banda ancha centrada en 3296 cm^{-1} (Figura 27C y 27D, línea negra punteada), la cual puede ser atribuida a un traslape de los grupos O-H de la PCL y N-H de la Gel (105). El desplazamiento de estas bandas a menores números de onda indica interacciones moleculares por medio de puentes de hidrógeno entre las moléculas de Gel y las de PCL (87,88,106). Las asignaciones

correspondientes de las bandas presentes en los espectros FT-IR de Gel y de los andamios de PCL y Gel/PCL se muestran en la Tabla 4. 2.

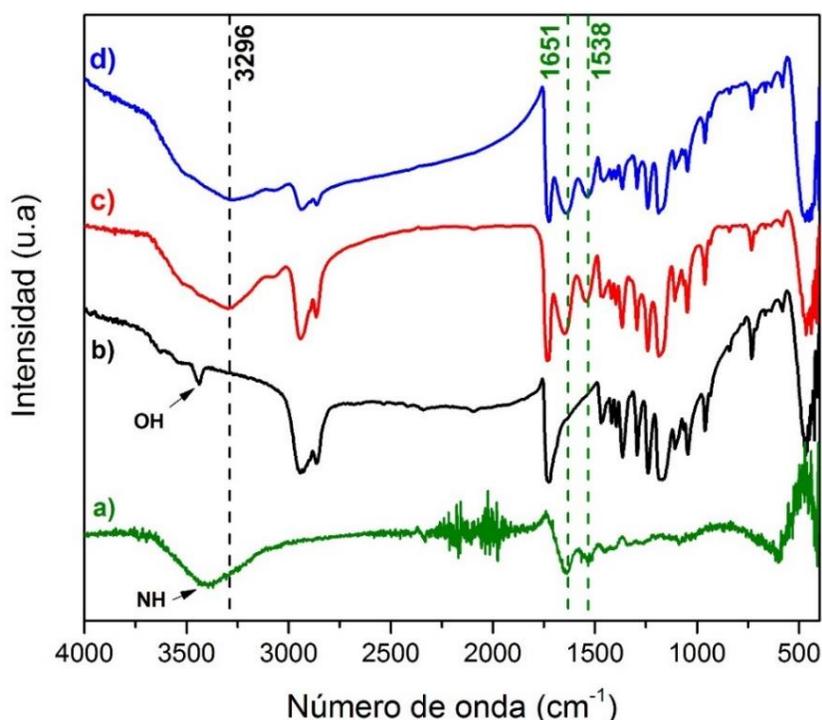


Figura 27. Espectros FT-IR de (a) Gel y de los andamios de (b) PCL, (c) 30Gel/PCL y (d) 45Gel/PCL.

Tabla 6. Números de onda correspondientes a los espectros FT-IR de la Gel y de los andamios de PCL y Gel/PCL (30Gel/PCL y 45Gel/PCL) y sus asignaciones.

Número de onda (cm ⁻¹)				
PCL	Gel	Gel/PCL	Asignación	Referencia
3488			grupos O-H	(107)
	3438		estiramiento N-H asociado con el grupo	(79,108)
		3296	traslape de grupos O-H y estiramiento N-H	(105)
2945		2945	estiramiento asimétrico CH ₂	(49,108)
2859		2859	estiramiento simétrico CH ₂	(3,6)
1731		1731	estiramiento carbonilo (-COO)	(3,6)
	1651	1651	estiramiento C=O, amida I	(108–110)
	1538	1538	flexión N-H, amida II	(108–110)
1294		1294	estiramiento C-C	(49,108)
1240		1240	estiramiento asimétrico C-O-C	(49,108)
1175		1175	estiramiento simétrico C-O-C	(108)
1045		1045	estiramiento C-O	(6)

Es posible que la fuerte acidez del AcAc ($\text{pH} \approx 2.3$) empleado para obtener las soluciones de electrohilado haya favorecido la formación de grupos O-H a partir de los grupos carbonilos en la PCL debido a una ligera degradación (111) incrementando la susceptibilidad de las moléculas de PCL para formar puentes de hidrógeno con los grupos N-H de las moléculas de Gel; incrementando la miscibilidad de los andamios compuestos (30Gel/PCL y 45Gel/PCL).

7.2.1.4. Difracción de rayos X (XRD).

Los difractogramas de rayos X adquiridos de los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL se muestran en la Figura 28. El difractograma del andamio compuesto únicamente de PCL exhibió dos principales picos de difracción en $2\theta = 21.11^\circ$ y 23.39° los cuales corresponden a los planos (100) y (200) de la estructura semi-cristalina de la PCL (112).

Los difractogramas adquiridos de los andamios compuestos de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL también presentaron estos dos principales picos de difracción correspondientes a la estructura semi-cristalina de la PCL; la ausencia de picos correspondientes a la Gel se debe a que la Gel es un polímero que tiene una estructura amorfa (Figura 28A).

En los difractogramas de los andamios compuestos de gelatina y policaprolactona, la intensidad del pico principal ($2\theta = 21.11^\circ$) disminuyó $\approx 15.46\%$ en el difractograma del andamio de 30Gel/PCL (Figura 28B, línea sólida roja) y $\approx 38.75\%$ en el del andamio de 45Gel/PCL (Figura 28B, línea sólida azul); asimismo, la intensidad del pico secundario ($2\theta = 23.39^\circ$) disminuyó $\approx 16.12\%$ en el difractograma del andamio de 30Gel/PCL y disminuyó $\approx 25.8\%$ en el de 45Gel/PCL, respecto de las intensidades de los picos en el difractograma de PCL tomadas como el 100% (Figura 28B, línea sólida negra). La disminución en la intensidad de los picos de difracción en los difractogramas de los andamios que contienen Gel (30Gel/PCL y 45Gel/PCL) respecto a la intensidad de los picos en el difractograma del andamio de PCL indica una reducción en el porcentaje de cristalinidad de la PCL (113). Por lo tanto, el porcentaje de cristalinidad de la PCL en los andamios de Gel/PCL disminuyó debido a la cantidad de Gel contenida en el andamio.

Se ha reportado que una disminución en la cristalinidad de un material fibrilar compuesto indica un incremento en la miscibilidad de sus componentes (78,114,115); entonces, la disminución del porcentaje de cristalización de la PCL en los andamios de Gel/PCL sugiere una buena interacción intermolecular entre la Gel (con estructura amorfa) y la PCL (con estructura semi-cristalina) resultando en un aumento de enredos entre las cadenas de ambos polímeros que consecuentemente distorsiona las cadenas moleculares dispuestas ordenadamente (zonas cristalinas) de la PCL (78,115,116).

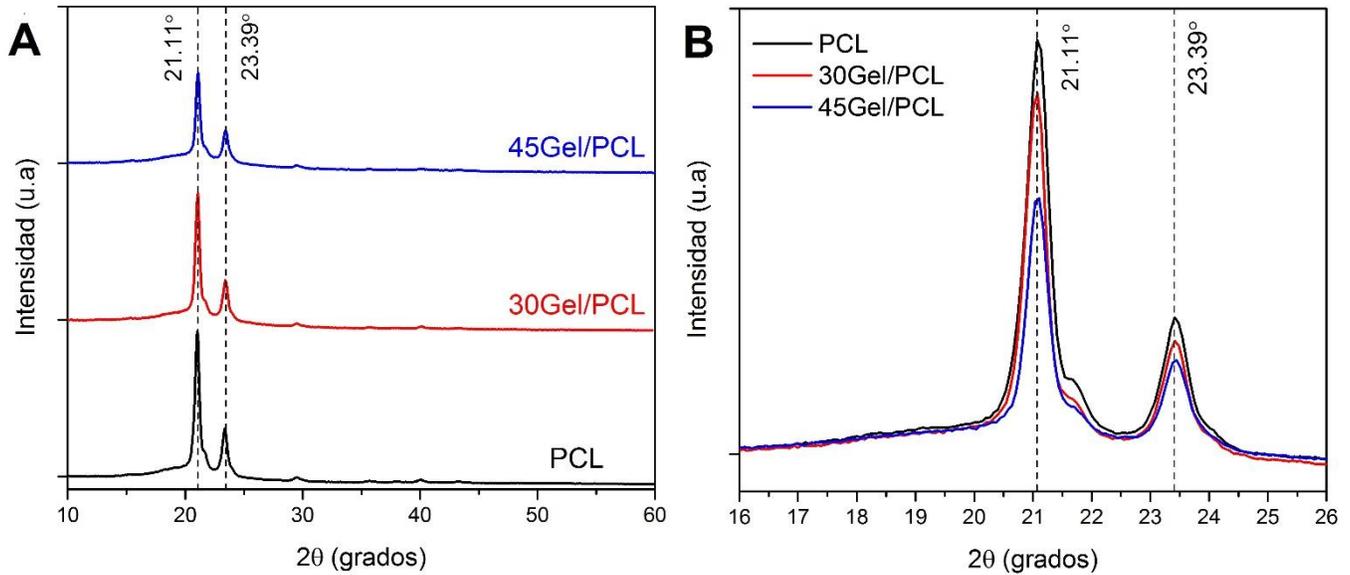


Figura 28. (A) Difractogramas de rayos-X de los andamios de PCL (línea sólida negra), 30Gel/PCL (línea sólida roja) y 45Gel/PCL (línea sólida azul) donde se observan dos principales picos correspondientes a la estructura semi-cristalina de la PCL. (B) Disminución de la intensidad de los picos de difracción en los andamios de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL respecto a la intensidad de los picos en el andamio de PCL.

7.2.1.5. Propiedades mecánicas; pruebas de tensión uniaxial.

Las curvas de esfuerzo-deformación obtenidas a partir del ensayo de tensión uniaxial para los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL se muestran en la Figura 29. Se observó que a pesar de que se ensayaron cuatro diferentes especímenes de cada uno de los tres diferentes tipos de andamios (PCL, 30Gel/PCL o 45Gel/PCL) con las mismas dimensiones superficiales (2 cm x 0.5 cm) y bajo las mismas condiciones de tensión (velocidad de deformación y carga), se obtuvieron diferentes resultados (Figura 29. pruebas 1, 2, 3 y 4); esto se debe a que las membranas fibrilares obtenidas mediante la técnica de electrohilado son materiales altamente porosos, con fibras de diámetro variable y con orientación aleatoria, por lo que poseen una morfología no homogénea que resulta en propiedades mecánicas no uniformes.

Las curvas esfuerzo-deformación obtenidas para los andamios de PCL y 30Gel/PCL (Figuras 29A y 29B, respectivamente) muestran que al iniciarse la prueba de tensión la relación esfuerzo-deformación es lineal (obedece la ley de Hooke); por lo tanto, los andamios se deformaron elásticamente (i.e. que si la carga se elimina, la muestra recupera su longitud original). Después de la deformación elástica inicial los andamios de PCL y 30Gel/PCL se deformaron plásticamente (i.e. que el material no recupera su longitud inicial si se elimina la carga aplicada). El comportamiento mecánico de los andamios de PCL y 30Gel/PCL corresponde al de un polímero plástico; sin embargo, el módulo elástico del andamio de 30Gel/PCL fue dos veces mayor que el del andamio de PCL y tanto el esfuerzo máximo (o resistencia máxima a la tensión) como el porcentaje de elongación a la rotura fueron menores

para el andamio de 30Gel/PCL que para el de PCL (ver Tabla 7) lo que indica que el andamio que contiene Gel es más frágil que el andamio compuesto únicamente de PCL. Por otro lado, las curvas esfuerzo-deformación obtenidas para el andamio de 45Gel/PCL (Figura 29C) representa el comportamiento de un polímero frágil, ya que se rompe mientras se deforma elásticamente (i.e. la relación esfuerzo-deformación es lineal). Los parámetros mecánicos de los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL estimados a partir de las curvas esfuerzo-deformación se enlistan en la Tabla 7 y se muestran gráficamente en la Figura 30.

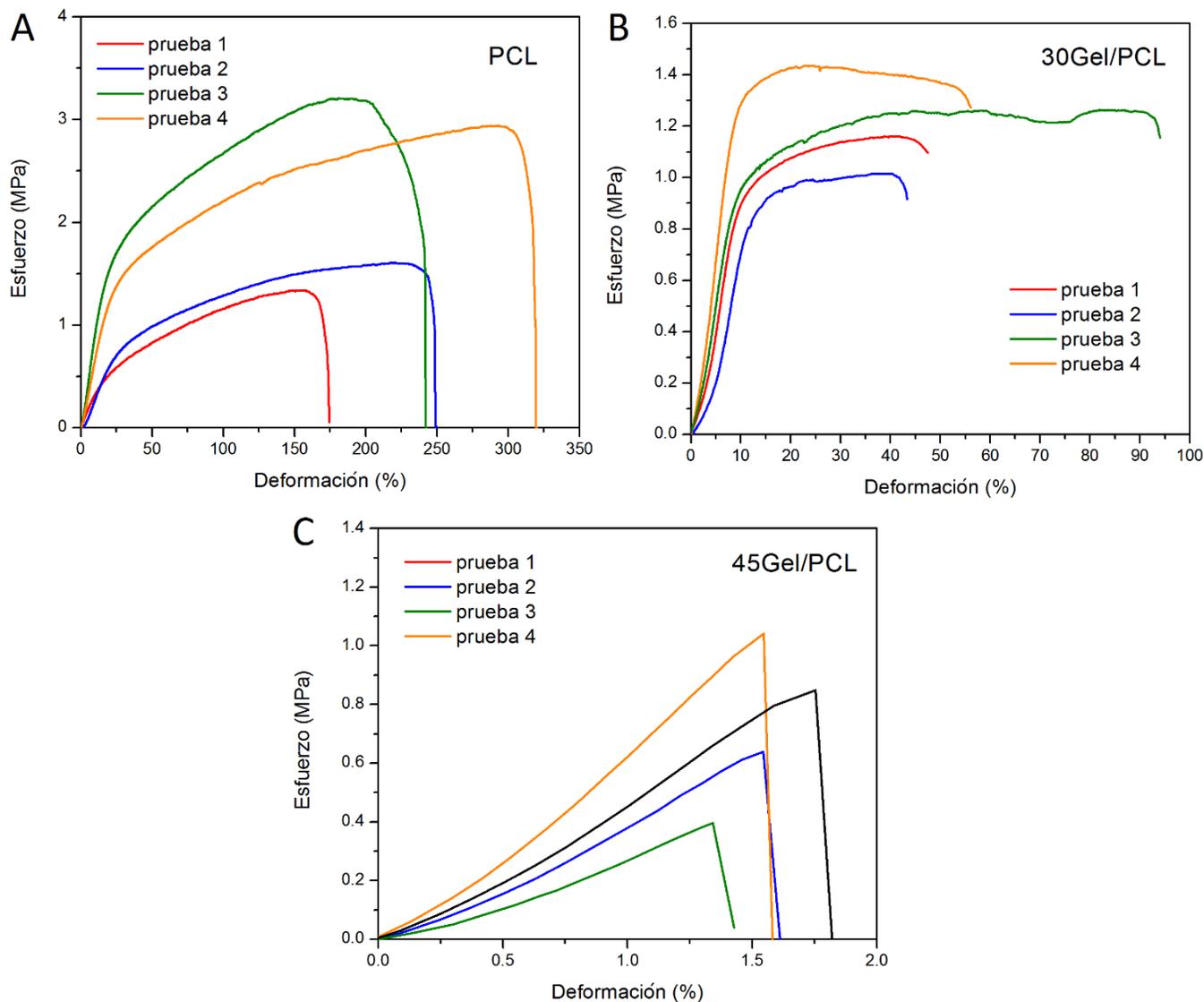


Figura 29. Curvas esfuerzo-deformación obtenidas mediante la prueba de tensión uniaxial para los andamios de (A) PCL, (B) 30Gel/PCL y (C) 45Gel/PCL.

Tabla 7. Parámetros mecánicos de los diferentes andamios.

Andamio fibrilar	E (MPa)	σ_{max} (MPa)	ϵ (%)
PCL	6.09 \pm 3.10	2.27 \pm 0.94	238.25 \pm 59.12
30Gel/PCL	12.66 \pm 2.63	1.23 \pm 0.15	56.05 \pm 20.54
45Gel/PCL	49.57 \pm 20.72	0.66 \pm 0.29	1.53 \pm 0.15

Se observó que el módulo elástico (o módulo de Young) de los andamios se incrementó con la adición de gelatina (Figura 30A), es decir que disminuyó su elasticidad. Por el contrario, el contenido de gelatina claramente disminuyó el esfuerzo máximo o resistencia máxima a la tensión (Figura 30B) y el porcentaje de elongación a la rotura (Figura 30C) de los andamios de Gel/PCL en comparación con el andamio de PCL. Claramente, la gelatina contenida en los andamios de Gel/PCL tuvo una influencia en las propiedades mecánicas en relación con el andamio de PCL ya que, con el incremento de Gel, los andamios compuestos tendieron a fragilizarse.

En resumen, con el aumento de cantidad de Gel en los andamios de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL (30 wt.% y 45 wt.% respecto a la masa total del andamio) se incrementó el módulo elástico y se disminuyeron el esfuerzo máximo y la elongación a la rotura en comparación con el andamio de PCL (i.e. que la Gel debilitó mecánicamente a los andamios). Este comportamiento podría explicarse en términos de la disminución del porcentaje de cristalinidad de la PCL y de la longitud de las cadenas poliméricas en los andamios de Gel/PCL.

Un polímero semi-cristalino está estructuralmente conformado por numerosas laminillas de átomos ordenados (regiones cristalinas) separadas por zonas de átomos desordenados (regiones amorfas). La deformación elástica se debe principalmente al movimiento de las largas cadenas poliméricas en las regiones amorfas (capaces de restablecer su posición inicial) como respuesta al esfuerzo aplicado y la deformación plástica se debe a la respuesta de las interacciones en las cadenas poliméricas de las regiones cristalinas (altamente ordenadas) con las regiones amorfas (donde toda posterior deformación queda limitada dentro de la región deformada); (117). Así una disminución en el porcentaje de cristalinidad de los andamios de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL (resultados por XRD y DSC) disminuyó el esfuerzo máximo y la elongación a la rotura en comparación con el andamio de PCL. Como resultado de la disminución de la región cristalina en los andamios de Gel/PCL aumentó la región amorfa. Como se mencionó anteriormente la elasticidad de un polímero está directamente relacionada con el desdoblamiento de las cadenas poliméricas de la región amorfa del polímero como respuesta al esfuerzo aplicado; sin embargo, a pesar de que la región amorfa de los andamios de Gel/PCL aumentó, el módulo elástico también aumentó (i.e. que la elasticidad de los andamios disminuyó). Esto significa que la longitud de las cadenas poliméricas fue afectada con la adición de la Gel, o sea, que el tamaño de las cadenas poliméricas disminuyó debilitando mecánicamente a los andamios de Gel/PCL (118). Posiblemente, la disminución del tamaño de las cadenas poliméricas en los andamios de Gel/PCL se deba a la baja regularidad

estructural (diferencias en el tamaño y composición de las moléculas) propia de la mezcla de polímeros.

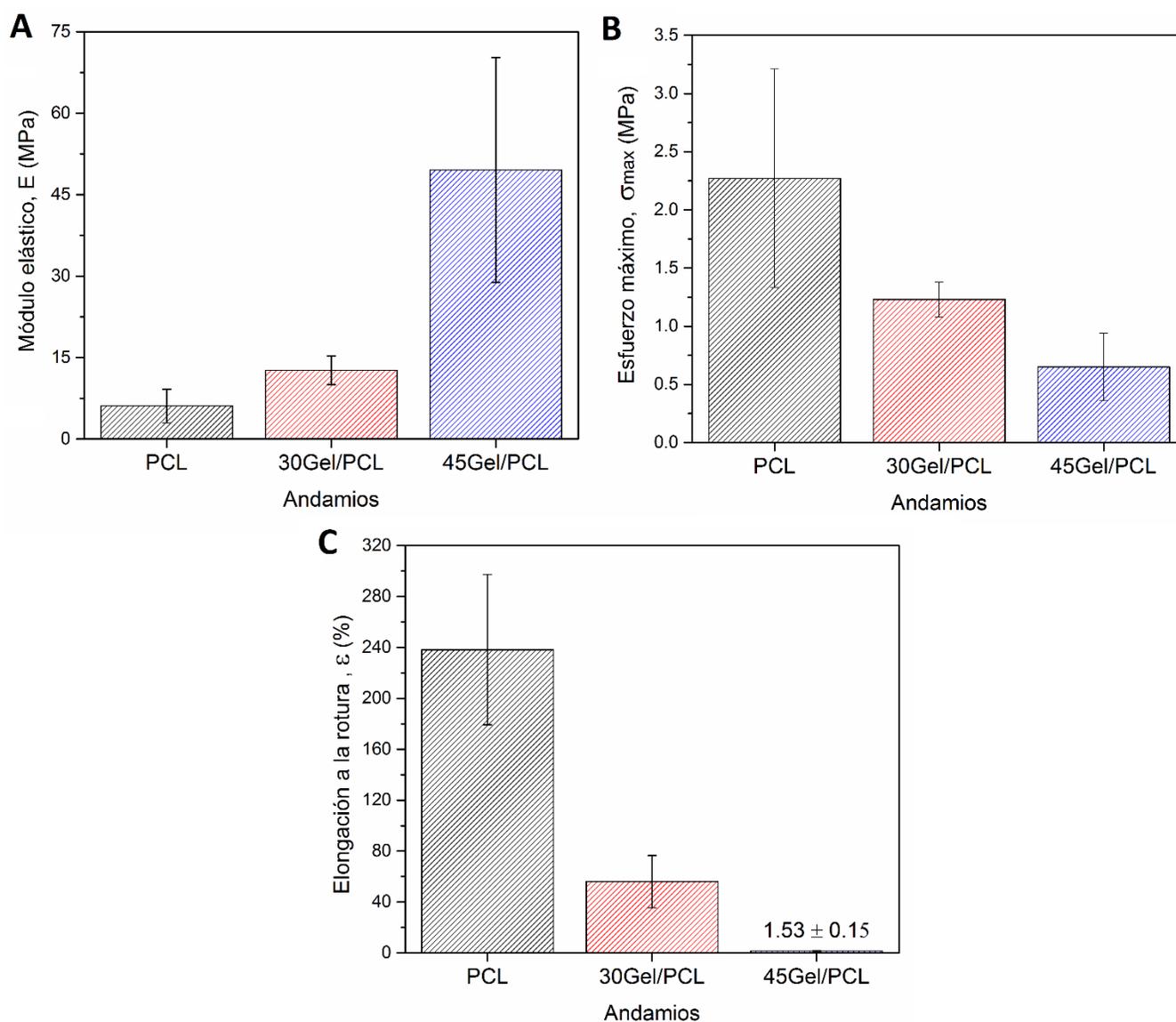


Figura 30. Valores de (A) Módulo elástico (o módulo de Young), (B) Esfuerzo máximo (o resistencia máxima a la tensión) y (C) Elongación a la rotura estimados para los andamios de PCL (barra con líneas negras), 30Gel/PCL (barra con líneas rojas) y 45Gel/PCL (barra con líneas azules) a partir de las curvas esfuerzo-deformación.

7.2.1.6. Análisis termogravimétrico (TGA).

Las curvas termogravimétricas o termogramas por TGA de la Gel (polvo) y de los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL (líneas sólidas verde, negra, roja y azul, respectivamente) así como las curvas derivadas correspondientes a la velocidad de la variación de masa (líneas punteadas) se muestran en la Figura 31.

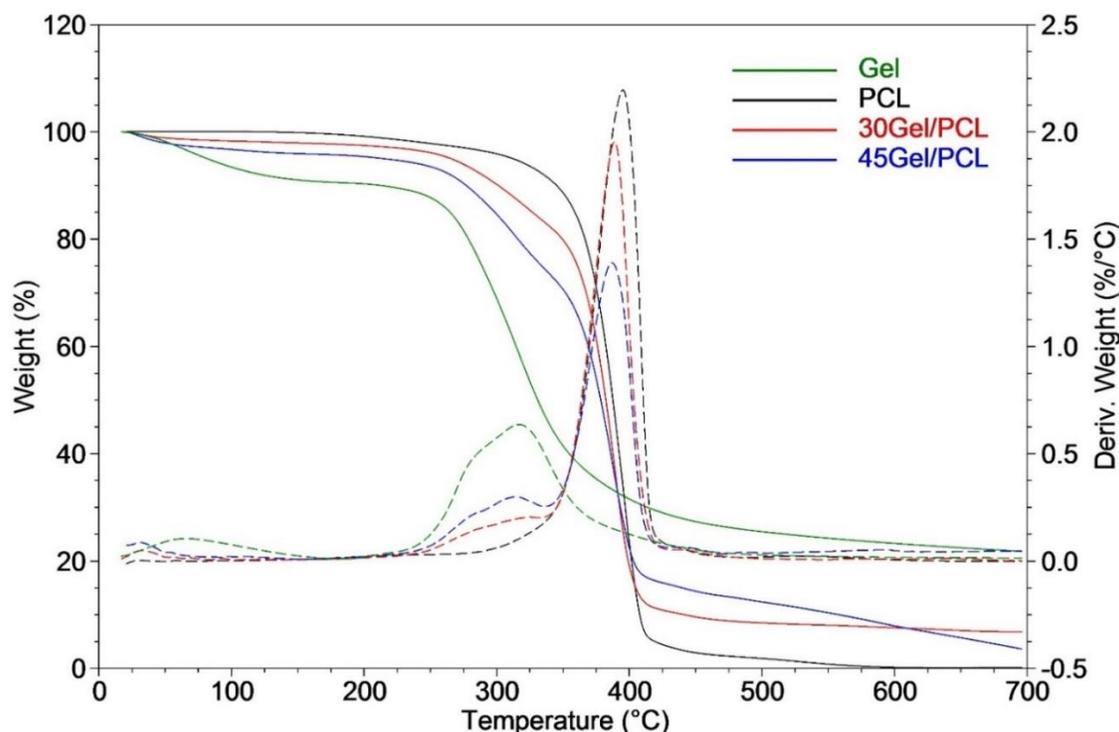


Figura 31. Termograma por TGA de Gel (línea sólida verde) y de los andamios de PCL (línea sólida negra), 30Gel/PCL (línea sólida roja) y 45Gel/PCL (línea sólida azul). Y curva correspondiente a la velocidad de la variación de la masa en función de la temperatura (Deriv. Weight) de Gel (línea punteada verde) y de los andamios de PCL (línea punteada negra), 30Gel/PCL (línea punteada roja) y 45Gel/PCL (línea punteada azul).

El termograma por TGA del andamio de PCL mostró solo un intervalo de temperatura de degradación que comenzó en 299°C y finalizó 463°C, dónde el andamio perdió el 97.48% de su masa total y la temperatura en la que la velocidad de degradación fue mayor (T_{max1}) fue de 394.13°C (i.e. la máxima intensidad del pico de la curva derivada). La pérdida de masa de la Gel se observó en dos intervalos temperatura, el primer intervalo (de $\approx 20^\circ\text{C}$ a $\approx 160^\circ\text{C}$) corresponde a la pérdida del agua absorbida por la Gel (119) mientras que el segundo intervalo de temperaturas (de 196°C a 495°C con una $T_{max1} = 319.03^\circ\text{C}$) corresponde propiamente a una degradación de la Gel en la cual perdió 75.48% de su masa debido a un proceso de ruptura de los enlaces peptídicos y de las cadenas de proteína (119,120).

Los termogramas de los andamios de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL mostraron una sutil pérdida de masa de $\approx 3\%$ y 5% respecto a su masa total, respectivamente, en un intervalo de temperatura entre $\approx 50^\circ\text{C}$ y $\approx 80^\circ\text{C}$ que corresponde a la evaporación del agua absorbida por la Gel contenida en los andamios. La pérdida de masa por degradación térmica de los andamios de Gel/PCL ocurrió en un intervalo de temperaturas con dos temperatura máximas en las que la velocidad de degradación térmica fue mayor (T_{max1} y T_{max2} ; donde $T_{max1} > T_{max2}$) y que reflejan el efecto de cada uno de los polímeros (Gel y PCL) en la degradación térmica del andamio

compuesto; aparentemente, la T_{max1} de los andamios de Gel/PCL corresponde principalmente a la descomposición de la PCL y la T_{max2} corresponde principalmente a la descomposición de la Gel. El intervalo de temperaturas de máxima degradación que se observó para el andamio de 30Gel/PCL comenzó en 249°C y terminó en 475°C donde el andamio perdió el 91.29% de su masa total con la $T_{max1} = 389.49^\circ\text{C}$ y la $T_{max2} = 324.45^\circ\text{C}$. Para el andamio de 45Gel/PCL el intervalo de temperaturas de máxima degradación térmica inició en 238°C y finalizó en 474°C en el cual el andamio experimentó una pérdida de masa total de 94.91% con una $T_{max1} = 387.50^\circ\text{C}$ y una $T_{max2} = 318.12^\circ\text{C}$. El comportamiento térmico de la Gel (polvo) y de los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL se enlistan en la Tabla 8.

Table 8. Comportamiento térmico de Gel (polvo) y andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL.

Muestra	Principal región	Perdida de	T_{max1} (°C)	T_{max2} (°C)
Gel	196 - 495	75.48	317.03	-
PCL	299 - 463	97.48	394.13	-
PCL 30Gel	249 - 475	91.29	389.49	324.45
PCL 45Gel	238 - 473	94.91	387.50	318.12

Los termogramas de los andamios de Gel/PCL mostraron que la T_{max2} (i.e. la menor T_{max} que corresponde a la degradación de la Gel) sufrió un ligero corrimiento hacia temperaturas mayores en comparación con la T_{max} de la Gel (317.03°C); ya que la T_{max2} del andamio 30Gel/PCL fue de 318.12°C y la T_{max2} del andamio 45Gel/PCL fue de 324.45°C . Lewandowska et. al. reportaron que un corrimiento a mayores temperaturas de la T_{max} del componente con la T_{max} menor indica un incremento en la estabilidad térmica de un material polimérico compuesto debido a algunas interacciones entre los dos componentes poliméricos de un material compuesto (121). Por lo tanto, el corrimiento de la T_{max} de la Gel a mayores temperaturas en los andamios de Gel/PCL indican un incremento en la estabilidad térmica de los andamios debido a algunas interacciones entre las moléculas de Gel y PCL, como enlaces de tipo Van der Waals y/o puentes de hidrógeno (121). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por FT-IR, ensayo de tensión uniaxial, DSC y ensayo biuret.

7.2.1.7. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los termogramas DSC que indican el flujo de calor en función del calentamiento y enfriamiento de los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL se muestran en la Figura 32. Las temperaturas en los puntos más bajos de los picos endotérmicos en las curvas de calentamiento corresponden a las temperaturas de fusión (T_m) de los andamios (Figura 32A); y las temperaturas en los puntos más altos de los picos exotérmicos de las curvas de enfriamiento corresponden a las temperaturas de cristalización (T_m) de los andamios (Figura 32B). Se observó claramente que los tres diferentes andamios poseen temperaturas de fusión (T_m) y de cristalización (T_c) las cuales corresponden a las fases atómicas cristalinas y amorfas,

respectivamente, lo que indica que los tres andamios poliméricos poseen una estructura atómica semi-cristalina.

Las temperaturas de fusión (T_f) de los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL fueron de 54.83°C, 56.16°C y 56.39°C, respectivamente (Figura 32A). Esto significa que a esta temperatura (T_m) que las cadenas poliméricas ordenadas (zonas cristalinas) absorben la energía suficiente para romper un gran número de enlaces secundarios y generar una estructura molecular altamente desordenada (o amorfa). El ligero incremento de 1.33 °C y 1.56 °C en las T_f s de las fibras de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL respecto de las fibras de PCL sugiere que las moléculas de Gel interactúan íntimamente con las moléculas de PCL lo que afecta la movilidad de las cadenas poliméricas ordenadas de la PCL (78,114,122). Se sabe que la T_f de un polímero aumenta a medida que crece el número de enlaces de tipo van der Waals y puentes de hidrógeno entre sus moléculas ya que a pesar de que estos enlaces secundarios son relativamente débiles, incrementan la cohesión entre las moléculas del polímero cuando actúan en conjunto (118). Por lo tanto, el ligero incremento en la T_f en los andamios de Gel/PCL respecto al andamio de PCL muy probablemente se debe a la formación de enlaces intermoleculares de tipo Van der Waals y puentes de hidrógeno entre las moléculas de Gel y las de PCL. Estos resultados se correlacionan con los análisis de FT-IR, TGA, ensayos de tensión uniaxial y biuret.

En consecuencia, los resultados indicaron que la incorporación de la Gel incrementó la entalpía de fusión (ΔH_f) de los andamios Gel/PCL respecto a la del andamio de PCL; lo que indica que el porcentaje de cristalinidad de la PCL contenida en los andamios de Gel/PCL fue reducido conforme aumentó el contenido de Gel (confirmando los resultados por XRD y los parámetros mecánicos obtenidos a partir del ensayo de tensión uniaxial). El porcentaje de cristalinidad del andamio de PCL fue calculado en 45.04% y el de los andamios de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL en 33.49% y 29.17%, respectivamente. Se ha reportado que una disminución en el porcentaje de cristalinidad de fibras compuestas indica una mejora de la miscibilidad entre sus componentes (78,114,115).

Por otra parte, las curvas de enfriamiento (Figura 32B) mostraron que las temperaturas de cristalización (T_c s) de los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL fueron 27.97°C, 33.08°C y 34.63°C, respectivamente. La T_c del andamio de 30Gel/PCL incrementó 5.11°C con respecto a la T_c del andamio compuesto únicamente de PCL, mientras que el incremento en la T_c del andamio de 45Gel/PCL fue de 6.66°C. El aumento de las T_c s de los andamios de Gel/PCL indican que la flexibilidad de sus cadenas poliméricas (i.e. su capacidad para moverse y rotar) disminuyó en comparación con la flexibilidad de las del andamio de PCL y, por lo tanto, la energía que requiere para experimentar movimientos también aumentó. Quizás, el aumento de las T_c s de los andamios de Gel/PCL se deba a un aumento en la restricción de la rotación molecular de las cadenas de PCL debido a la introducción de las moléculas de Gel que interfieren en el proceso de cristalización. Además, un entrecruzamiento no covalente (mediante enlaces secundarios) entre las cadenas de ambos polímeros también contribuiría en la

restricción de la movilidad molecular (118). Los parámetros obtenidos a partir de los análisis de las curvas DSC se enlistan en la Tabla 9.

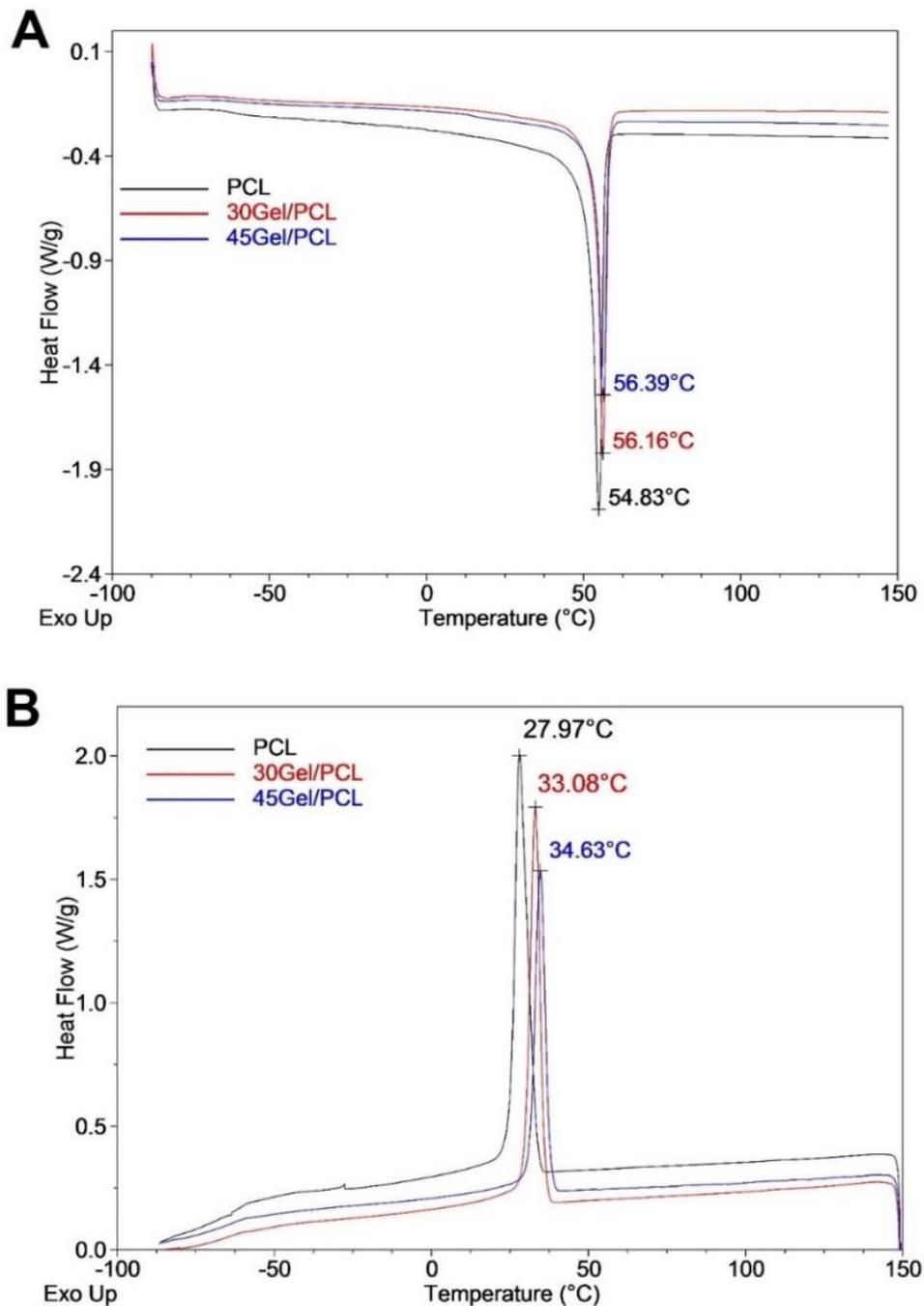


Figura 32. Termogramas por DSC de las fibras PCL (línea sólida negra), 30Gel/PCL (línea sólida roja) y 45Gel/PCL (línea sólida azul); dónde en (A) las curvas de calentamiento se observan las temperaturas de fusión (T_f) y en (B) las curvas de enfriamiento se observan las temperaturas de cristalización (T_c).

Tabla 9. Resultados del análisis térmico por DSC de los andamios electrohilados.

Andamio fibrilar	Tc (°C)	Tf (°C)	ΔH_f (J/g)	% Cristalinidad
PCL	27.97	54.83	63.96	45.04
30Gel/PCL	33.08	56.16	47.56	33.49
45Gel/PCL	34.63	56.39	41.42	29.17

7.2.1.8. Ensayo de biuret.

El porcentaje de liberación de la gelatina contenida en andamios de Gel/PCL fue estimado mediante el ensayo biuret. Los andamios de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL fueron sumergidos en Buffer Fosfato Salino (PBS, pH=7.4) e incubados a 37° y 80 rpm; y se estimó la cantidad de gelatina disuelta en el PBS en el cual estaban sumergidos los andamios después de 24 h, 48 h y 72 h de incubación. En la Figura 33 se muestra el porcentaje de Gel liberado por los andamios respecto al porcentaje teórico total de Gel contenido en ellos (de acuerdo con el 30% su masa para el andamio de 30Gel/PCL y el 45% para el de 45Gel/PCL). Se observó que después de 24 h de inmersión, el andamio de 30Gel/PCL liberó 66.6% de su contenido total de Gel y el de 45Gel/PCL liberó 75% de su contenido total de Gel. Posteriormente, después de 48 h de inmersión los andamios de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL habían liberado el 80% y 88% de su contenido de Gel total. Finalmente, a las de 72 h de incubación el andamio de 30Gel/PCL liberó el 86.3% de su contenido total de Gel mientras que el andamio de 45Gel/PCL había liberado el 95% de su contenido total.

La Gel es una proteína soluble en agua, y usualmente los andamios de Gel requieren ser entrecruzados para prevenir su rápida disolución; sin embargo, la mayoría de las técnicas comúnmente empleadas para entrecruzar gelatina (por ejemplo, glutaraldehído) tienen asociados riesgos de residuos citotóxicos (73–75). Puesto que es indispensable que un material que será empleado como andamio celular sea bicompatible, en este trabajo no fue usado ningún agente entrecruzador para evitar el uso de agentes citotóxicos. A partir de los resultados del ensayo biuret se observó que la cantidad de Gel que liberaron (o se disolvió en PBS) los andamios de Gel/PCL fue menor que la cantidad reportada para fibras electrohiladas de gelatina las cuales se disolvieron totalmente después de 1 h sumergidas en agua destilada a 37°C (123). Papa. et al. obtuvieron fibras electrohiladas de Gel entrecruzadas con 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDGE) con \approx 20% de grado de entrecruzamiento las cuales se disolvieron completamente después de \approx 4 h de incubación en agua desionizada (a 37°C); también, entrecruzaron fibras electrohiladas de Gel con 1,4- glutaraldehído (GC) obteniendo un grado de entrecruzamiento de \approx 28% las cuales liberaron el 45% de su contenido total en agua desionizada (a 37°C) después de 72 h de incubación (124). Por otra parte, Kishan et. al. reportaron que fibras de Gel electrohiladas y entrecruzadas con diisocianato (con un grado de entrecruzamiento de 32%), perdieron \approx 56% de su masa después de 1 día de inmersión en solución enzimática de PBS-colagenasa (a 37°C con agitación) y después de 3 días de inmersión las fibras habían perdido el \approx 76% de su masa (125). Por lo cual, los resultados del ensayo biuret sugieren que el uso del AcAc en la preparación de las soluciones usadas para electrohilar los andamios de Gel/PCL influyó en la velocidad de disolución de la Gel la cual

fue menor que la velocidad de disolución de fibras de Gel electrohiladas sin entrecruzamiento y comparable con aquellas fibras electrohiladas de Gel con un grado de entrecruzamiento mayor a $\approx 20\%$. Estos resultados indican que las moléculas de gelatina están interactuando fuertemente con las moléculas de PCL y que esta interacción redujo la velocidad de disolución de la Gel en el PBS incluso en condiciones de agitación y a 37°C . Es muy probable que el uso del ácido acético y el proceso de electrohilado resultara en un entrecruzamiento no covalente de las moléculas de Gel y las de PCL; esto es, que las fuerzas cohesivas que unen a las moléculas de Gel y PCL en los andamios podrían ser fuerzas intermoleculares de tipo Van der Waals y puentes de hidrógeno (resultados FT-IR y DSC). Puesto que el AcAc empleado en la preparación de la solución de electrohilado pudo haber protonado a las moléculas de Gel (grupos $-\text{NH}$ y $-\text{COOH}$) debido a su acidez ($\text{pH } 2.3$) y haber degradado ligeramente a las moléculas de PCL favoreciendo la formación de grupos $-\text{OH}$, la incrementada densidad electrónica en las soluciones y su interacción con el campo eléctrico durante el proceso de electrohilado debió incrementar las fuerzas de atracción que involucran a las interacciones dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido y de dispersión (enlaces Van der Waals) entre las moléculas de Gel y PCL lo que incrementó las fuerzas de cohesión de los andamios (entrecruzamiento no iónico); igualmente, la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas de Gel y PCL se vió favorecida y en consecuencia la velocidad de disolución de la Gel contenida en los andamios fue notablemente disminuida. Así pues, estos resultados sugieren que la estabilidad química de los andamios de Gel/PCL fue incrementada a causa del AcAc usado como disolvente en la preparación de las soluciones de electrohilado.

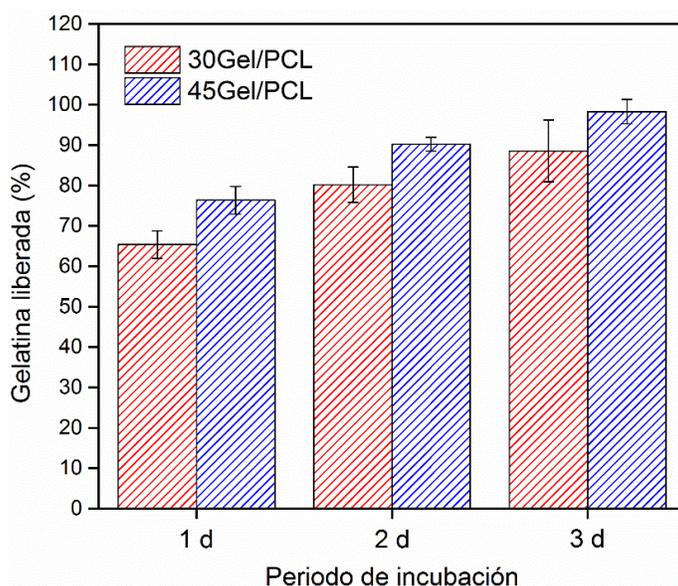


Figura 33. Porcentaje total de gelatina liberada en PBS ($\text{pH}=7.4$; 37°C y ≈ 80 rpm) después de 24 h, 48 h y 72 h de inmersión de los andamios de 30Gel/PCL (barras con líneas rojas) y 45Gel/PCL (barras con líneas azules). El porcentaje de gelatina liberada se estimó tomando como el 100% el contenido total de gelatina en los andamios.

7.2.1.9. Pérdida de masa.

La degradación de los andamios de Gel/PCL y PCL en términos del porcentaje de pérdida de masa (Wloss) en función del tiempo después de la incubación en PBS (pH 7,4, 37°C y 80 rpm) se muestra en la Figura 34. Claramente, las películas de PCL no mostraron una Wloss significativa (< 4%) después de 17 días de incubación. Sin embargo, después de 3 días de incubación, los andamios de Gel/PCL mostraron una Wloss de $\approx 25.89\%$ (30Gel/PCL) y $\approx 42.7\%$ (45Gel/PCL). Después de 17 días de incubación, los andamios 30Gel/PCL y 45Gel/PCL perdieron $\approx 27.82\%$ y $\approx 43.89\%$ de su peso, respectivamente. Los andamios de Gel/PCL experimentaron una Wloss significativamente mayor que la del andamio de PCL durante los primeros 3 días (Wloss de 30Gel/PCL $\approx 25\%$, Wloss de 45Gel / PCL $\approx 43\%$, Wloss de PCL $\approx 4\%$). La Wloss fue claramente mayor en los andamios que contenían Gel y la cantidad de masa perdida fue equivalente a la cantidad de Gel liberada (estimada por ensayo de biuret), lo que indica que Wloss se debió principalmente al efecto de disolución del Gel. Además, las moléculas de Gel polar disminuyeron la hidrofobicidad de los andamios de Gel/PCL en comparación con el andamio de PCL, lo que facilita la absorción de agua y aumenta la velocidad de degradación de PCL que se produce por hidrólisis (95). La mayor tasa de degradación que experimentó el andamio de PCL también ocurrió durante los primeros 3 días de incubación, posiblemente porque la primera etapa de degradación de la PCL implica la degradación de las zonas amorfas. Sin embargo, no se produjeron incrementos de Wloss después de 3 días, probablemente porque la naturaleza hidrofóbica de la PCL evita el contacto entre las moléculas de agua y las de la PCL retardando la degradación hidrolítica del material.

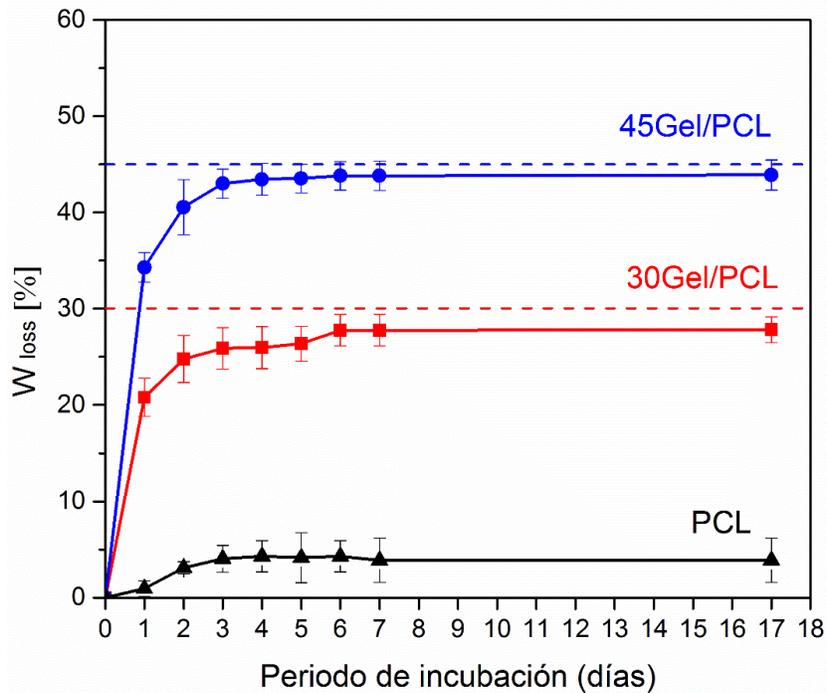


Figura 34. Degradación de los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL sumergidos en PBS (pH 7.4) en función del tiempo.

7.2.2. Evaluación in vitro de los andamios de Gel/PCL.

7.2.2.1. Viabilidad celular por ensayo de calceína/homodímero de etidio.

Las imágenes de fluorescencia capturadas a partir del ensayo de calceína/homodímero de etidio (LIVE/DEAD) para los fibroblastos humanos sembrados sobre los andamios compuestos de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL después de 24 h y de 72 h de cultivo, se muestran en las Figuras 35 y 36, respectivamente; las micrografías fueron capturadas en dos áreas representativas de los andamios: en la zona central y en la orilla del andamio para mostrar la distribución de los fibroblastos sobre los andamios.

En las micrografías se observó que la mayoría de las células sembradas sobre los andamios se encontraron viables (células de color verde intenso, Figuras 35 y 36) y que muy pocas células murieron (núcleos celulares de color rojo, Figuras 35 y 36), lo que indica que los andamios compuestos de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL no indujeron ningún efecto citotóxico en fibroblastos humanos después de 24 h (Figura 35) y de 72 h (Figura 36) de cultivo demostrando que los tres andamios fibrilares son biocompatibles.

Se observó que la morfología de espiga característica de los fibroblastos se preservó mejor en los andamios que contienen Gel que en los andamios compuestos únicamente de PCL (andamios control).

Por otro lado, en los andamios compuestos de Gel y PCL (30Gel/PCL y 45Gel/PCL) los fibroblastos se encontraban en el centro y en las orillas de la superficie de los andamios (i.e. las células estaban homogéneamente dispersas en la superficie de los andamios); mientras que los fibroblastos que fueron sembrados en los andamios compuestos únicamente de PCL se observaron principalmente agrupados en el centro del andamio como se puede observar en la fotografía mostrada en la imagen de la Figura 37 (zonas teñidas de color morado). Este comportamiento de aglomeración celular en la superficie de los andamios compuestos de PCL se debe a que cuando las células fueron sembradas sobre ellos, la gota de medio de cultivo con células que fue colocada sobre el andamio mantuvo su forma esférica de modo que las células fueron depositadas únicamente en esa área (centro del andamio); confirmando que la superficie hidrofóbica de los andamios de PCL no es favorable para el cultivo celular ya que no incentiva una dispersión inicial de células sobre su superficie. En contraste, en los andamios compuestos de Gel/PCL las células se encontraron dispersas sobre toda la superficie del andamio, porque durante la siembra de los fibroblastos la gota de medio de cultivo con las células fue rápidamente absorbida y extendida por el andamio de manera que las células fueron distribuidas homogéneamente en la superficie del andamio.

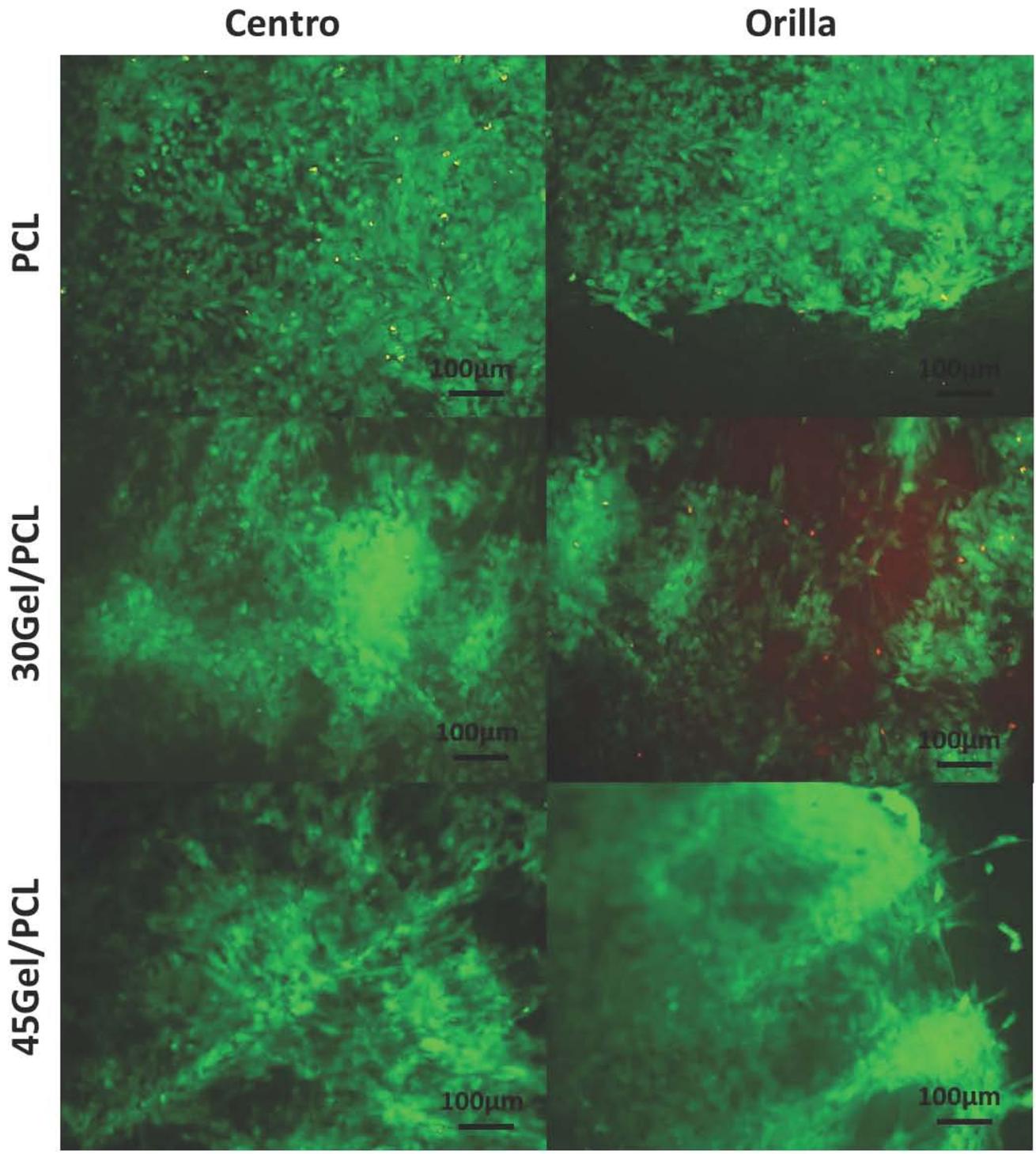


Figura 35. Microfotografías de fluorescencia de fibroblastos tras el ensayo calceína/homodímero de etidio después de 24 h de cultivo. En verde (calceína) se encuentran marcadas las células vivas y en rojo (homodímero de etidio) están marcados los núcleos de células muertas.

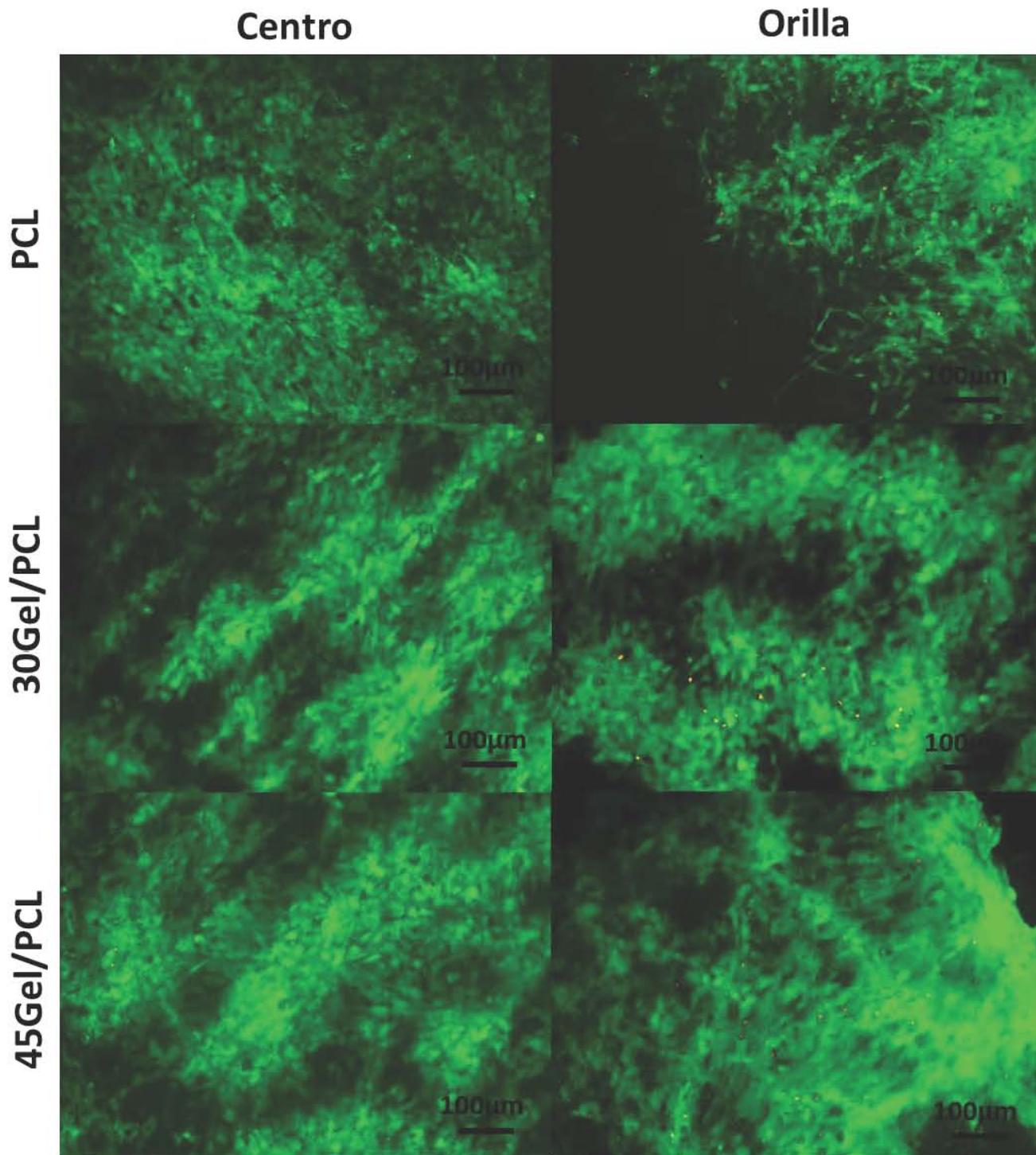


Figura 36. Microfotografías de fluorescencia de fibroblastos tras el ensayo calceína/homodímero de etidio después de 72 h de cultivo. En verde (calceína) se encuentran marcadas las células vivas, en rojo (homodímero de etidio) están marcados los núcleos de células muertas.

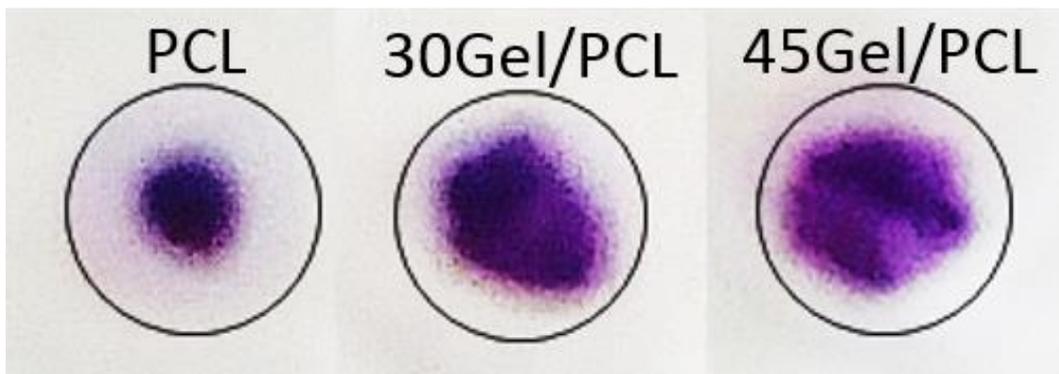


Figura 37. Distribución de los fibroblastos metabólicamente activos (tinción color morado) sobre los andamios de PCL, 30Gel/PCL y 45Gel/PCL cortados en círculos de 8 mm de diámetro (círculos marcados con una línea sólida negra) después de 24 h de cultivo; visión macroscópica. Adicionalmente se adquirieron imágenes de los cultivos después de 48 h de incubación, sin embargo, no se observó una diferencia importante en la distribución de las células sobre los andamios en comparación con las adquiridas a las 24 h de cultivo (tales imágenes no se muestran en esta tesis).

7.2.2.2. *Metabolismo celular por MTT.*

La Figura 38 muestra el porcentaje de fibroblastos metabólicamente activos en los andamios de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL respecto a los fibroblastos metabólicamente activos en los andamios de PCL (control) evaluado a partir del ensayo MTT después de 24 h y 72 h de incubación. Después de 24 h de cultivo, se observó que en comparación con el andamio compuesto únicamente de PCL, los andamios que contienen Gel (30Gel/PCL y 45Gel/PCL) incentivaron o mantuvieron un metabolismo celular adecuado, y que no hubo diferencia significativa entre el porcentaje de células metabólicamente activas en el andamio de 30Gel/PCL y en el de 45Gel/PCL (Figura 38; *, $p < 0.05$ vs. PCL 24 h; +, $p < 0.05$ andamio 30Gel/PCL 24 h vs andamio 45Gel/PCL 24 h.). Después 72 h de cultivo, el número de fibroblastos metabólicamente activos aumentó de manera significativa en los andamios de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL respecto al andamio de PCL después 24 h de incubación; mientras que en los andamios de PCL no se observó ningún incremento significativo en el metabolismo celular (%) (Figura 38; *, $p < 0.05$ vs. PCL 24 h; +, $p < 0.05$ andamio PCL 24 h vs andamio PCL 72 h). Además, comparando el porcentaje de metabolismo celular en el andamio de PCL, con el de los andamios de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL después de 72 h de cultivo, es claro que los andamios de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL mostraron un incremento significativo en el número de fibroblastos metabólicamente activos (Figura 38; &, $p < 0.05$ vs. PCL 72 h). Por otro lado, es claro que después de 72 h de incubación fue el andamio 45Gel/PCL el que mostró el mayor número de fibroblastos metabólicamente activos comparado con el andamio 30Gel/PCL (Figura 38; +, $p < 0.05$ andamio 30Gel/PCL 72 h vs andamio 45Gel/PCL 72 h).

Los resultados del ensayo MTT, muestran que los andamios de Gel/PCL claramente incrementaron el número de células metabólicamente activas en comparación con el número de células metabólicamente activas en el andamio compuesto únicamente de PCL. No se observó ninguna diferencia significativa en el metabolismo celular (%) entre los andamios de 30Gel/PCL y 45Gel/PCL después de 24 h de cultivo. Sin embargo, después de 72 h de cultivo y de haber cambiado una vez el medio de cultivo (i.e. después de haber removido la Gel liberada por los andamios de Gel/PCL en el medio de cultivo), el número de células metabólicamente activas se relacionó con la cantidad de gelatina en los andamios; o sea que fue mayor en el andamio que contenía 45 wt.% de Gel (45Gel/PCL) que en el que contenía 30 wt.% gelatina (30Gel/PCL) respecto a su masa total. El incremento del número de fibroblastos metabólicamente activos en los andamios de Gel/PCL sobre el de los andamios de PCL está directamente relacionado con la presencia de gelatina en la superficie de los andamios y con la gelatina liberada en el microambiente local (medio de cultivo); esta proteína (Gel) con grupos funcionales hidrofílicos amino y carboxilo han probado su habilidad para promover enlaces con sitios de unión de Integrinas y favorecer la diferenciación y adhesión celular (126). Estos resultados han sido establecidos por diferentes grupos de investigación, los cuales han reportado que las fibras electrohiladas compuestas de Gel y PCL promovieron la adhesión y la proliferación celular (77,81,82).

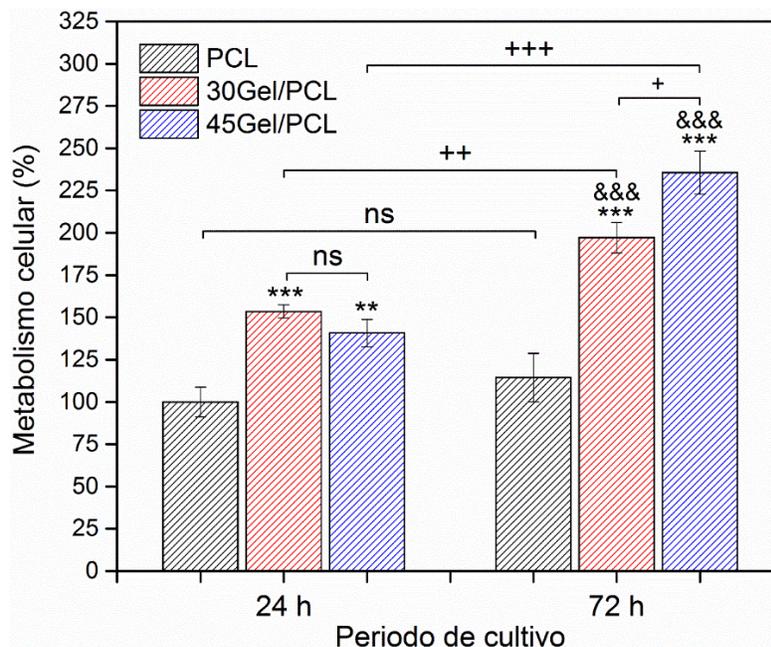


Figura 38. Porcentaje de fibroblastos metabólicamente activos en la superficie de las fibras (tomando como el 100% a los fibroblastos metabólicamente activos en el andamio de PCL después de 24 h de cultivo), estimado a partir de los ensayos de MTT después de 24 h y 72 h de incubación. Los valores se expresan como la media \pm DE (n=6) y considerando *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001). *, p< 0.05 vs. PCL después de 24 h de incubación; &, p< 0.05 vs. PCL después de 72 h de incubación; +, p< 0.05 andamio “X” 24 h vs andamio “Y” 72 h.

8. CONCLUSIONES.

8.1. Conclusión general.

Se diseñaron y fabricaron dos materiales fibrilares compuestos (compositos) usando la técnica de electrohilado para, en un futuro, ser empleados en conjunto como una nueva alternativa para el tratamiento integral de lesiones dermoepidérmicas, principalmente lesiones por quemaduras de espesor parcial. El primer material fibrilar fue diseñado para desempeñarse como un apósito antibacteriano con el objetivo de proteger a la lesión de posibles infecciones generadas por bacterias; este material se constituyó por fibras micrométricas con estructura coaxial compuestas por el polímero biocompatible policaprolactona (PCL) en el centro y por nanopartículas antibacterianas a base de Zn (Zn-nps; i.e. ZnO y acetato de Zn) embebidas en PCL en la superficie. El segundo material fibrilar se fabricó a partir de una mezcla homogénea de un polímero natural (gelatina, Gel) y uno sintético (PCL), empleando ácido acético (AcAc), y fue diseñado para utilizarse como un andamio para ser cultivado *in vitro* con fibroblastos (células dérmicas) y que se desempeñe como acarreador celular, transportando las células cultivadas a la lesión. Se esperaría que de esta manera fuera posible incentivar la migración de células nativas de la zona sana al lecho de la herida y así promover la reparación del tejido.

Los resultados indicaron que estos dos materiales fibrilares, el primero compuesto por Zn-nps/PCL y el segundo por Gel/PCL, poseen las características propias de un apósito antibacteriano y andamio celular, respectivamente, y podrían ser empleados, en un futuro, como un tratamiento integral (bifuncional) de quemaduras de espesor profundo en un mediano plazo. Sin embargo, aún se deben realizar pruebas *in vivo* en modelos animales para evaluar su potencial como tratamiento clínico de quemaduras.

8.2. Conclusiones particulares.

8.2.1. Apósito antibacteriano.

- Todas las fibras de PCL que contenían nanocompuestos de Zn presentaron capacidad antibacteriana en comparación con las fibras compuestas únicamente de PCL.
- Las fibras coaxiales fueron más efectivas para inhibir la adhesión bacteriana en su superficie y, por lo tanto, para inhibir el crecimiento inicial de biopelícula, en comparación con las fibras uniaxiales.
- Las fibras uniaxiales mostraron una capacidad ligeramente mayor de inhibir el crecimiento bacteriano planctónico en medio líquido en comparación con las fibras coaxiales.
- La previa iluminación con luz UVA de las fibras mejoró la inhibición de la adhesión bacteriana para las dos estructuras de fibras (uniaxial y coaxial) en comparación con las fibras que fueron mantenidas en oscuridad.
- Los resultados sugieren que la propiedad antibacteriana de los apósitos se debe principalmente a dos mecanismos: 1) liberación de iones Zn^{2+} (principalmente por el acetato de Zn) y 2) generación de ROS (por la acción fotocatalítica de ZnO nps), permitiendo que

las fibras inhibieran simultáneamente el crecimiento bacteriano planctónico y formación inicial de biopelícula.

- Los apósitos antibacterianos fueron electrohilados a partir de soluciones poliméricas preparadas empleando un “Green-solvent” (ácido acético).
- El diseño de fibras coaxiales redujo la concentración total de nanocompuestos de Zn de los andamios (en función del peso total del material) en comparación con las fibras uniaxiales convencionales.
- El diseño coaxial de los apósitos antibacterianos propuesto en este trabajo (formado por fibras con estructura coaxial compuestas de PCL en el centro y Zn-nps embebidas en PCL en la superficie) mostró ser más efectivo que el diseño convencional (uniaxial) de apósitos antibacterianos con la misma composición, lo que constituye cubiertas antibacterianas prometedoras para el tratamiento de heridas.

8.2.2. Andamio celular.

- Se fabricaron andamios fibrilares de Gel/PCL mediante la técnica de electrohilado empleando un único disolvente (AcAc considerado “Green solvent”) para obtener las soluciones poliméricas.
- Se fabricaron andamios fibrilares de Gel/PCL mediante la técnica de electrohilado a partir de soluciones poliméricas en las cuales ambos compuestos fueron simultáneamente disueltos.
- Los resultados de las pruebas físico-químicas mostraron que los andamios electrohilados de Gel/PCL poseen una buena miscibilidad entre ambos polímeros natural y sintético.
- Los andamios fibrilares de PCL y Gel/PCL poseen una estabilidad mecánica adecuada para su fácil manejo terapéutico; sin embargo, es el andamio de 30Gel/PCL el que posee las propiedades mecánicas más apropiadas.
- Los andamios electrohilados de PCL y Gel/PCL resultaron biocompatibles a células dérmicas humanas (fibroblastos).
- La actividad metabólica de los fibroblastos sembrados sobre los diferentes andamios fue mayor en los andamios de Gel/PCL que en el de PCL (control) sugiriendo que la Gel incentiva su proliferación.

9. PERSPECTIVAS.

Los resultados de esta investigación han dado lugar al desarrollo de dos nuevos materiales fibrilares, el primero compuesto de Zn-nps/PCL con propiedades antibacterianas y el segundo compuesto de Gel/PCL como un andamio favorable al cultivo celular (fibroblastos); sin embargo, los ensayos de biuret mostraron que la Gel presente en el andamio de Gel/PCL se disuelve en ≈ 5 días, por lo tanto, aún es necesario optimizar el tiempo de disolución de la Gel presente en los andamios de Gel/PCL. Para esto, ya se han llevado a cabo diferentes recubrimientos de las fibras que componen el andamio de 30Gel/PCL (que, en general, mostró propiedades más óptimas) con un polisacárido que posee una menor rapidez de disolución. Los resultados preliminares han mostrado que este recubrimiento retrasó la disolución de la Gel y mejoró ligeramente la respuesta celular. Estos resultados serán empleados para la escritura de un artículo que será enviado a una revista internacional indexada.

Adicionalmente, es deseable investigar si las células dérmicas (fibroblastos) sembradas sobre los andamios de Gel/PCL tienen la capacidad de sintetizar su propia matriz extracelular (MEC) evaluando la producción de proteínas características de la MEC como colágena I y III, y elastina mediante ensayos de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica.

La propuesta de esta investigación fue que a partir de los dos materiales desarrollados (apósito antibacteriano y andamio celular) se construya un apósito bicapa para ser empleado como un tratamiento integral bifuncional de lesiones dermoepidérmicas, principalmente de lesiones por quemaduras de espesor profundo. Se esperaría que este apósito bicapa, compuesto por una capa con propiedades antibacterianas (apósito antibacteriano) que estaría en contacto con el ambiente y una capa favorable al cultivo celular (andamio celular) que estaría en contacto con la lesión, prevenga la adhesión y crecimiento bacteriano en la superficie expuesta al ambiente y permita el cultivo, proliferación y migración de células dérmicas en la superficie en contacto con la herida. Sin embargo, los resultados de esta investigación siguieron tres posibles métodos de empleo para este tratamiento bicapa: 1) unir las dos capas, apósito antibacteriano y andamio celular, para obtener un apósito bicapa que sea empleado como un sustituto dérmico acelular en el tratamiento de lesiones de espesor parcial; 2) colocar sobre la lesión el andamio celular previamente cultivado *in vitro* con células dérmicas, para ser empleado como un sustituto dérmico celular para el tratamiento de lesiones de espesor profundo y, después, colocar encima el apósito antibacteriano. Esto, debido a la dificultad que conllevaría sembrar células *in vitro* en apósitos bicapa unidos ya que el mecanismo de acción de la capa antibacteriana de Zn/PCL podría disminuir la respuesta celular y, 3) unir las dos capas (apósito antibacteriano y andamio celular) y obtener un apósito bicapa para ser empleado como un sustituto dérmico celular, es decir, proponer y estudiar una metodología adecuada que permita el cultivo celular *in vitro* sobre el apósito bicapa.

Una vez que se logren unir los dos materiales (obtener el apósito bicapa) y se hayan estudiado las propiedades fisicoquímicas y respuestas celulares *in vitro* (bacterias y células dérmicas) del apósito bicapa, se buscaría estudiar la respuesta *in vivo* de los tres posibles

métodos de empleo de estos materiales en modelos murinos de lesiones dermoepidérmicas, que de resultar positiva se buscaría realizar pruebas pre-clínicas (previo consentimiento informado) y posteriormente evaluar la posible incorporación de dichos materiales en futuros tratamientos clínicos integrales de lesiones dermoepidérmicas principalmente de lesiones por quemaduras de espesor profundo.

10. PRODUCTOS ACADÉMICOS.

10.1. Presentaciones en congresos.

- 1) G. Prado-Prone, P. Silva-Bermudez, J.A. García-Macedo, A. Almaguer-Flores, C. Ibarra, C. Velasquillo-Martínez. *Antibacterial activity of ZnO nanoparticles embedded into coaxial polycaprolactone electrospun fibers*. MRS FALL-MEETING 2016, de 27 noviembre a 2 diciembre de 2016 en Boston, MA; USA. Póster.
- 2) G. Prado-Prone, P. Silva-Bermudez, J.A. García-Macedo, A. Almaguer-Flores, C. Ibarra, C. Velasquillo-Martínez. *Photocatalytic antibacterial effect of ZnO nanoparticles into coaxial electrospun polycaprolactone fibers to prevent infections*. SPIE Photonics West. 29 de enero de 2017. San Francisco; USA. Presentación oral.
- 3) Gina Prado-Prone, Phaedra Silva-Bermudez, A. Almaguer-Flores, Jorge Alfonso García-Macedo, Sandra E. Rodil, Clemente Ibarra, Cristina Velasquillo. *Development and in vitro evaluation of antibacterial electrospun polycaprolactone-Zinc nanocomposites*. XXVI International Materials Research Congress Cancún 2017. Presentación oral.
- 4) Gina Prado-Prone, Massoomeh Bazzar, Phaedra Silva-Bermudez, M.L. Focarete, Clemente Ibarra, Cristina Velasquillo-Martínez. *Fibrillar Polycaprolactone/Gelatin Homogeneous Composite Scaffold for Skin Tissue Engineering Applications*. MRS FALL MEETING 2017, de 26 noviembre a 1 diciembre de 2017 en Boston, MA; USA. Póster.

10.2. Artículos y memorias de congresos.

- 1) G. Prado-Prone, P. Silva-Bermudez, J.A. García-Macedo, A. Almaguer-Flores, C. Ibarra, C. Velasquillo-Martínez. *Antibacterial effect of ZnO nanoparticles into coaxial electrospun polycaprolactone fibers to prevent infections from skin injuries*. SPIE Proceedings Vol. 10066, 2017.
- 2) Gina Prado-Prone, Phaedra Silva-Bermudez, Argelia Almaguer-Flores, Jorge A. García-Macedo, Victor I. García, Sandra E. Rodil, Clemente Ibarra, Cristina Velasquillo. *Enhanced antibacterial nanocomposite mats by coaxial electrospinning of polycaprolactone fibers loaded with Zn-based nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine (2018).

11. REFERENCIAS.

1. Lanza R, Langer R, Vacanti JP. Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition. Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition. 2013. 1-1887 p.
2. U.S National Library of Medicine.
3. WHO. Global Health Observatory (GHO): Data Repository. GHO. 2015.
4. SUVE, DGE, SALUD. Morbilidad. Anu 2011 Versión ejecutiva. 2011;193.
5. Moctezuma-Paz, L. Páez-franco I, Sánchez-flores AY, Xellic N, Riva A. Epidemiología de las quemaduras en México Epidemiology of burns in Mexico. Rev Esp Méd Quir. 2015;20(20):78–82.
6. Velasquez D, Cardona M, Gomez N, Grete M, Gomez I, Wilchez D, et al. Soluciones Terapeuticas para la Reconstruccion de la Dermis y la Epidermis. Rev Ing Biomédica. 2008;2(3):77–83.
7. Velasquillo C, Galue EA, Rodriquez L, Ibarra C, Ibarra-Ibarra LG. Skin 3D Bioprinting. Applications in Cosmetology. J Cosmet Dermatological Sci Appl. 2013;03(01):85–9.
8. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. Surgery. 2011;29(10):471–4.
9. Schulz JT, Tompkins RG, Burke JF. Artificial skin. Annu Rev Med. 2000;51(3):231–44.
10. gomez de ferraris M. Histologia, Embriologia E Ingenieria Tisular Bucodental. Histol Embriol e Ing Tisular Bucodental. 2009;1–12.
11. Eisenbud D, Huang NF, Luke S, Silberklang M. Skin Substitutes and Wound Healing: Current Status and Challenge. Wounds. 2004;16(1):2–17.
12. Mepilex Tranfer Ag. Available from: <https://www.vitalitymedical.com/mepilex-transfer-ag-soft-silicone-antimicrobial-dressing.html>
13. TheraBond. Available from: <https://www.vitalitymedical.com/therabond-silver-island-dressing-advanced.html>
14. Acticoat Flex 3. Available from: <https://www.amazon.com/ACTICOAT-FLEX-DRESS-4X4-BX/dp/B00B9BTHVW>
15. Puracol Plus Ag+. Available from: <https://justwoundcare.com/puracoltm-plus-ag-collagen-dressing.html>
16. AquaceI™ Extra Ag™. Available from: <https://medimarket.mx/>
17. La plata aplicada al tratamiento de las heridas. 2004;2000–1.
18. Consenso del grupo de trabajo Wounds International. Consenso Internacional. Uso adecuado de los apósitos de plata en las heridas. Wounds Int. 2012;24. Available from: <http://www.woundsinternational.com/>
19. Velázquez-Velázquez JL, Santos-Flores A, Araujo-Meléndez J, Sánchez-Sánchez R,

- Velasquillo C, González C, et al. Anti-biofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C*. 2015;49:604–11.
20. Salem W, Leitner DR, Zingl FG, Schratte G, Prassl R, Goessler W, et al. Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*. 2015;305(1):85–95.
 21. Ip M, Lui SL, Poon VKM, Lung I, Burd A. Antimicrobial activities of silver dressings: An in vitro comparison. *J Med Microbiol*. 2006;55(1):59–63.
 22. Vimbela G V., Ngo SM, Frazee C, Yang L, Stout DA. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:3941–65.
 23. Simon AH. Elsevier's Dictionary of Medicine. 1st Editio. Elsevier Science; 2004. 772 p.
 24. Yildirimer L, Thanh NTK, Seifalian AM. Skin regeneration scaffolds: A multimodal bottom-up approach. Vol. 30, Trends in Biotechnology. 2012. p. 638–48.
 25. Jones I, Currie L, Martin R. A guide to biological skin substitutes. Vol. 55, British Journal of Plastic Surgery. 2002. p. 185–93.
 26. Bosworth LA, Downes S. Electrospinning for Tissue Regeneration. *Electrospinning for Tissue Regeneration*. 2011. 1-409 p.
 27. Li, D; Xia Y. Nanofibers : Production, Properties and Functional Applications. *Adv Mater*. 2004;287–326.
 28. Lin T. Nanofibers-production, properties and functional applications. 2011; Available from: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/23296.pdf%5Cnhttp://dro.deakin.edu.au/view/DU:30044990>
 29. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. P T A peer-reviewed J Formul Manag. 2015;40(4):277–83.
 30. Organization WH. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Who. 2014;8. Available from: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>
 31. Mujeeb Rahman P, Muraleedaran K, Mujeeb VMA. Applications of chitosan powder with in situ synthesized nano ZnO particles as an antimicrobial agent. *Int J Biol Macromol*. 2015;77:266–72.
 32. Bhadra P, Mitra MK, Das GC, Dey R, Mukherjee S. Interaction of chitosan capped ZnO nanorods with *Escherichia coli*. *Mater Sci Eng C*. 2011;31(5):929–37.
 33. Sultana S, Rafiuddin, Khan MZ, Shahadat M. Development of ZnO and ZrO₂ nanoparticles: Their photocatalytic and bactericidal activity. *J Environ Chem Eng*. 2015;3(2):886–91.
 34. Bai X, Li L, Liu H, Tan L, Liu T, Meng X. Solvothermal synthesis of ZnO nanoparticles and anti-infection application in vivo. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(2):1308–17.
 35. Pati R, Mehta RK, Mohanty S, Padhi A, Sengupta M, Vaseeharan B, et al. Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits

antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2014;10(6):1195–208.

36. Augustine R, Malik HN, Singhal DK, Mukherjee A, Malakar D, Kalarikkal N, et al. Electrospun polycaprolactone/ZnO nanocomposite membranes as biomaterials with antibacterial and cell adhesion properties. *J Polym Res.* 2014;21(3).
37. Li LH, Deng JC, Deng HR, Liu ZL, Xin L. Synthesis and characterization of chitosan/ZnO nanoparticle composite membranes. *Carbohydr Res.* 2010;345(8):994–8.
38. Lee J-H, Kim Y-G, Cho MH, Lee J. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiol Res.* 2014;169(12):888–96.
39. Xie Y, He Y, Irwin PL, Jin T, Shi X. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(7):2325–31.
40. Wang Y, Zhang Q, Zhang CL, Li P. Characterisation and cooperative antimicrobial properties of chitosan/nano-ZnO composite nanofibrous membranes. *Food Chem.* 2012;132(1):419–27.
41. Jayasuriya AC, Aryaei A, Jayatissa AH. ZnO nanoparticles induced effects on nanomechanical behavior and cell viability of chitosan films. *Mater Sci Eng C.* 2013;33(7):3688–96.
42. Alwan RM, Kadhim QA, Sahan KM, Ali RA, Mahdi RJ, Kassim NA, et al. Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles via Sol – Gel Route and Their Characterization. *Nanosci Nanotechnol.* 2015;5(1):1–6.
43. Anuario estadístico de la minería mexicana, 2015. 2016.
44. Bizarro M. Materiales para combatir la contaminación del agua. *Rev Mater Av IIM.* 2011;16:15–21.
45. Alvarado, Ricardo; Solera, Federico; Vega–Baudrit J. Síntesis Sonoquímica De Nanopartículas De Óxido De Zinc Y. *Rev Iberoam Polímeros.* 2014;15(3):134–48.
46. Sarwar S, Chakraborti S, Bera S, Sheikh IA, Hoque KM, Chakrabarti P. The antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against *Vibrio cholerae*: Variation in response depends on biotype. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2016;12(6):1499–509.
47. Qian Y, Zhang Z, Zheng L, Song R, Zhao Y. Fabrication and Characterization of Electrospun Polycaprolactone Blended with Chitosan-Gelatin Complex Nanofibrous Mats. *J Nanomater.* 2014;2014:1–7.
48. Prasad T, Shabeena EA, Vinod D, Kumary T V., Anil Kumar PR. Characterization and in vitro evaluation of electrospun chitosan/polycaprolactone blend fibrous mat for skin tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(1):1–13.
49. Zhang Q, Lv S, Lu J, Jiang S, Lin L. Characterization of polycaprolactone/collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their bioactivity. *Int J Biol Macromol [Internet].*

2015;76:94–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.063>

50. Gomes SR, Rodrigues G, Martins GG, Roberto MA, Mafra M, Henriques CMR, et al. In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study. *Mater Sci Eng C*. 2015;46:348–58.
51. Anitha S, Brabu B, Thiruvadigal DJ, Gopalakrishnan C, Natarajan TS. Optical, bactericidal and water repellent properties of electrospun nano-composite membranes of cellulose acetate and ZnO. *Carbohydr Polym*. 2012;87(2):1065–72.
52. Münchow EA, Albuquerque MTP, Zero B, Kamocki K, Piva E, Gregory RL, et al. Development and characterization of novel ZnO-loaded electrospun membranes for periodontal regeneration. *Dent Mater*. 2015;31(9):1038–51.
53. Shalumon KT, Anulekha KH, Nair S V., Nair S V., Chennazhi KP, Jayakumar R. Sodium alginate/poly(vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings. *Int J Biol Macromol*. 2011;49(3):247–54.
54. EMEA. ICH guideline Q3C (R6) on impurities: guideline for residual solvents. *Int Conf Harmon*. 2003;68(December 2016):35.
55. Ferreira JL, Gomes S, Henriques C, Borges JP, Silva JC. Electrospinning polycaprolactone dissolved in glacial acetic acid: Fiber production, nonwoven characterization, and In Vitro evaluation. *J Appl Polym Sci*. 2014;41068:37–9.
56. Chandra RGS, Ramesh TN, Veeranna VG, Maiya PS. Antimicrobial activity studies of zinc oxide , zinc acetate and layered zinc hydroxysalt. 2014;01(January 2013):524–30.
57. Burguera-Pascu M, Rodríguez-Archilla A, Baca P. Substantivity of zinc salts used as rinsing solutions and their effect on the inhibition of *Streptococcus mutans*. *J Trace Elem Med Biol*. 2007;21(2):92–101.
58. Selahattin Atmaca, Kadriil Gul RC. The effect of zinc on microbial growth. *J iMedical Sci*. 1998;28:595–7.
59. Pavlica S, Gaunitz F, Gebhardt R. Comparative in vitro toxicity of seven zinc-salts towards neuronal PC12 cells. *Toxicol Vitro*. 2009;23(4):653–9.
60. <https://www.uninet.edu/tratado/c080301.html>.
61. Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 2001;55(2):141–50.
62. Pezeshki-Modaress M, Mirzadeh H, Zandi M. Gelatin-GAG electrospun nanofibrous scaffold for skin tissue engineering: Fabrication and modeling of process parameters. *Mater Sci Eng C*. 2015;48:704–12.
63. Choi JS, Kim HS, Yoo HS. Electrospinning strategies of drug-incorporated nanofibrous mats for wound recovery. Vol. 5, *Drug Delivery and Translational Research*. 2015. p. 137–45.
64. Vladkova TG. Surface engineered polymeric biomaterials with improved biocontact properties. Vol. 2010, *International Journal of Polymer Science*. 2010.

65. Wei J, Igarashi T, Okumori N, Igarashi T, Maetani T, Liu B, et al. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomed Mater*. 2009;4(4).
66. Leal-Egaña A, Díaz-Cuenca A, Boccaccini AR. Tuning of cell-biomaterial anchorage for tissue regeneration. *Adv Mater*. 2013;25(29):4049–57.
67. Diener A, Nebe B, Lüthen F, Becker P, Beck U, Neumann HG, et al. Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. *Biomaterials*. 2005;26(4):383–92.
68. Ma Z, Kotaki M, Yong T, He W, Ramakrishna S. Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering. *Biomaterials*. 2005;26(15):2527–36.
69. Rosellini E, Cristallini C, Barbani N, Vozzi G, Giusti P. Preparation and characterization of alginate/gelatin blend films for cardiac tissue engineering. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2009;91(2):447–53.
70. Wu SC, Chang WH, Dong GC, Chen KY, Chen YS, Yao CH. Cell adhesion and proliferation enhancement by gelatin nanofiber scaffolds. *J Bioact Compat Polym*. 2011;26(6):565–77.
71. Powell HM, Boyce ST. Fiber density of electrospun gelatin scaffolds regulates morphogenesis of dermal-epidermal skin substitutes. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2008;84(4):1078–86.
72. Franco RA, Nguyen TH, Lee BT. Preparation and characterization of electrospun PCL/PLGA membranes and chitosan/gelatin hydrogels for skin bioengineering applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22(10):2207–18.
73. Yao R, He J, Meng G, Jiang B, Wu F. Electrospun PCL/Gelatin composite fibrous scaffolds: Mechanical properties and cellular responses. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2016;27(9):824–38.
74. Guarino V, Altobelli R, Cirillo V, Cummaro A, Ambrosio L. Additive electrospinning: A route to process electrospun scaffolds for controlled molecular release. Vol. 26, *Polymers for Advanced Technologies*. 2015. p. 1359–69.
75. Natu M V., de Sousa HC, Gil MH. Effects of drug solubility, state and loading on controlled release in bicomponent electrospun fibers. *Int J Pharm*. 2010;397(1–2):50–8.
76. Ng KW, Achuth HN, Mochhala S, Lim TC, Huttmacher DW. In vivo evaluation of an ultra-thin polycaprolactone film as a wound dressing. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2007;18(7):925–38.
77. Feng B, Duan H, Fu W, Cao Y, Zhang WJ, Zhang Y. Effect of inhomogeneity of the electrospun fibrous scaffolds of gelatin/polycaprolactone hybrid on cell proliferation. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2015;103(2):431–8.
78. Feng B, Tu H, Yuan H, Peng H, Zhang Y. Acetic-acid-mediated miscibility toward electrospinning homogeneous composite nanofibers of GT/PCL. *Biomacromolecules*. 2012;13(12):3917–25.

79. Gautam S, Dinda AK, Mishra NC. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Mater Sci Eng C*. 2013;33(3):1228–35.
80. Kolbuk D, Sajkiewicz P, Denis P, Choinska E. Investigations of polycaprolactone/gelatin blends in terms of their miscibility. *Bull Polish Acad Sci Tech Sci*. 2013;61(3):629–32.
81. Jiang YC, Jiang L, Huang A, Wang XF, Li Q, Turng LS. Electrospun polycaprolactone/gelatin composites with enhanced cell?matrix interactions as blood vessel endothelial layer scaffolds. *Mater Sci Eng C*. 2017;71:901–8.
82. He X, Feng B, Huang C, Wang H, Ge Y, Hu R, et al. Electrospun gelatin/polycaprolactone nanofibrous membranes combined with a coculture of bone marrow stromal cells and chondrocytes for cartilage engineering. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:2089–99.
83. Dijkstra KDB, Kipping J, Mézière N. Sixty new dragonfly and damselfly species from Africa (Odonata). Vol. 44, *Odonatologica*. 2015. 447-678 p.
84. Zhang Y, Ouyang H, Chwee TL, Ramakrishna S, Huang ZM. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2005;72(1):156–65.
85. Ferreira P, Santos P, Alves P, Carvalho MP, de Sá KD, Miguel SP, et al. Photocrosslinkable electrospun fiber meshes for tissue engineering applications. *Eur Polym J*. 2017;97(October):210–9.
86. Rong D, Chen P, Yang Y, Li Q, Wan W, Fang X, et al. Fabrication of Gelatin/PCL Electrospun Fiber Mat with Bone Powder and the Study of Its Biocompatibility. *J Funct Biomater*. 2016;7(1):6.
87. Vatankhah E, Semnani D, Prabhakaran MP, Tadayon M, Razavi S, Ramakrishna S. Artificial neural network for modeling the elastic modulus of electrospun polycaprolactone/gelatin scaffolds. *Acta Biomater*. 2014;10(2):709–21.
88. Denis P, Dulnik J, Sajkiewicz P. Electrospinning and Structure of Bicomponent Polycaprolactone/Gelatin Nanofibers Obtained Using Alternative Solvent System. *Int J Polym Mater Polym Biomater*. 2015;64(7):354–64.
89. Strobel HA, Calamari EL, Beliveau A, Jain A, Rolle MW. Fabrication and characterization of electrospun polycaprolactone and gelatin composite cuffs for tissue engineered blood vessels. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2018;106(2):817–26.
90. Xue J, Feng B, Zheng R, Lu Y, Zhou G, Liu W, et al. Engineering ear-shaped cartilage using electrospun fibrous membranes of gelatin/polycaprolactone. *Biomaterials*. 2013;34(11):2624–31.
91. Shoeb M, Singh BR, Khan JA, Khan W, Singh BN, Singh HB, et al. ROS-dependent anticandidal activity of zinc oxide nanoparticles synthesized by using egg albumen as a biotemplate. *Nat Sci Nanosci Nanotechnol*. 2013;4(January 2016):35015–11.
92. Kollias N, Ruvolo E, Sayre RM. The value of the ratio of UVA to UVB in sunlight. *Photochem Photobiol*. 2011;87(6):1474–5.

93. Mater JH, Quirós J, Borges JP, Boltjes K, Rosal R. Antimicrobial electrospun doped polyvinylpyrrolidone nanofibers. 2015;299(December):298–305.
94. Zhang Y, Zhu F, Zhang J, Xia L. Converting layered zinc acetate nanobelts to one-dimensional structured ZnO nanoparticle aggregates and their photocatalytic activity. *Nanoscale Res Lett*. 2008;3(6):201–4.
95. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci*. 2010;35(10):1217–56.
96. Augustine R, Kalarikkal N, Thomas S. Effect of zinc oxide nanoparticles on the *in vitro* degradation of electrospun polycaprolactone membranes in simulated body fluid. *Int J Polym Mater Polym Biomater*. 2016;65(1):28–37.
97. Premanathan M, Karthikeyan K, Jeyasubramanian K, Manivannan G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2011;7(2):184–92.
98. Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF, Fiévet F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett*. 2006;6(4):866–70.
99. Maret W. The metals in the biological periodic system of the elements: Concepts and conjectures. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):1–8.
100. Lemire J a, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(6):371–84.
101. Cabisco E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol*. 2011;3(1):3–8.
102. Son WK, Youk JH, Lee TS, Park WH. The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer (Guildf)*. 2004;45(9):2959–66.
103. Mikos AG, Lyman MD, Freed LE, Langer R. Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactico-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials*. 1994;15(1):55–8.
104. Sood A, Granick MS, Tomaselli NL. Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data. *Adv wound care*. 2014;3(8):511–29.
105. Yuan S, Xiong G, Roguin A, Choong C. Immobilization of gelatin onto poly(Glycidyl Methacrylate)- grafted polycaprolactone substrates for improved cell-material interactions. *Biointerphases*. 2012;7(1–4):1–12.
106. Powell HM, Boyce ST. Engineered human skin fabricated using electrospun collagen-PCL blends: morphogenesis and mechanical properties. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(8):2177–87.
107. Benkaddour A, Jradi K, Robert S, Daneault C. Grafting of Polycaprolactone on Oxidized Nanocelluloses by Click Chemistry. *Nanomaterials*. 2013;3(1):141–57.
108. Gautam S, Chou CF, Dinda AK, Potdar PD, Mishra NC. Surface modification of

nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type i grafting for skin tissue engineering. *Mater Sci Eng C*. 2014;34(1):402–9.

109. Yuan S, Xiong G, Roguin A, Choong C. Immobilization of Gelatin onto Poly(Glycidyl Methacrylate)-Grafted Polycaprolactone Substrates for Improved Cell--Material Interactions. *Biointerphases*. 2012;7(1):30.
110. Fu Y, Guan J, Guo S, Guo F, Niu X, Liu Q, et al. Human urine-derived stem cells in combination with polycaprolactone/gelatin nanofibrous membranes enhance wound healing by promoting angiogenesis. *J Transl Med*. 2014;12(1):274.
111. Hernández AR, Contreras OC, Acevedo JC, Moreno LGN. Poly(ϵ -caprolactone) degradation under acidic and alkaline conditions. *Am J Polym Sci*. 2013;3(4):70–5.
112. Abdelrazek EM, Hezma AM, El-khodary A, Elzayat AM. Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend. *Egypt J Basic Appl Sci*. 2016;3(1):10–5.
113. Martel-Estrada SA, Martínez-Pérez CA, Chacón-Nava JG, García-Casillas PE, Olivás-Armendariz I. Synthesis and thermo-physical properties of chitosan/poly(dl-lactide-co-glycolide) composites prepared by thermally induced phase separation. *Carbohydr Polym*. 2010;81(4):775–83.
114. Zhou Q, Zhang H, Zhou Y, Yu Z, Yuan H, Feng B, et al. Alkali-Mediated Miscibility of Gelatin/Polycaprolactone for Electrospinning Homogeneous Composite Nanofibers for Tissue Scaffolding. *Macromol Biosci*. 2017;1700268:1700268.
115. Nishio Y, Manley RSJ. Blends of cellulose with nylon 6 and poly(ϵ -caprolactone) prepared by a solution-coagulation method. *Polym Eng Sci*. 1990;30(2):71–82.
116. Shi R, Xue J, Wang H, Wang R, Gong M, Chen D, et al. Fabrication and evaluation of a homogeneous electrospun PCL–gelatin hybrid membrane as an anti-adhesion barrier for craniectomy. *J Mater Chem B*. 2015;3(19):4063–73.
117. Callister W, Rethwisch D. *Materials science and engineering: an introduction*. Vol. 94, *Materials Science and Engineering*. 2007. 538 p.
118. Coreño-alonso J, Teresa M. Relación estructura-propiedades de polímeros. 2010;21(4):291–9.
119. Frazier SD, Srubar W V. Evaporation-based method for preparing gelatin foams with aligned tubular pore structures. *Mater Sci Eng C*. 2016;62:467–73.
120. Li J, Ma J, Jiang T, Khan F, Wang Y, Chen Y, et al. Combined membrane emulsification with biomimetic mineralization: Designing and constructing novel organic-inorganic hybrid microspheres for enzyme immobilization. *Compos Sci Technol*. 2017;141:56–64.
121. Lewandowska K. Miscibility and thermal stability of poly(vinyl alcohol)/chitosan mixtures. *Thermochim Acta*. 2009;493(1–2):42–8.
122. Zaman HU, Beg MDH. Improvement of physico-mechanical, thermomechanical, thermal and degradation properties of PCL/gelatin biocomposites: Effect of gamma radiation. *Radiat Phys Chem*. 2015;109:73–82.

123. Torricelli P, Giofrè M, Fiorani A, Panzavolta S, Gualandi C, Fini M, et al. Co-electrospun gelatin-poly(L-lactic acid) scaffolds: Modulation of mechanical properties and chondrocyte response as a function of composition. *Mater Sci Eng C*. 2014;36(1):130–8.
124. Papa A, Guarino V, Cirillo V, Oliviero O, Ambrosio L. Optimization of Bicomponent Electrospun Fibers for Therapeutic Use: Post-Treatments to Improve Chemical and Biological Stability. *J Funct Biomater*. 2017;8(4):47.
125. Kishan AP, Nezarati RM, Radzicki CM, Renfro AL, Robinson JL, Whitely ME, et al. In situ crosslinking of electrospun gelatin for improved fiber morphology retention and tunable degradation. *J Mater Chem B*. 2015;3(40):7930–8.
126. Samson M, Porter N, Orekoya O, Hebert JR, Adams SA, Bennett CL, et al. HHS Public Access. 2017;155(1):3–12.