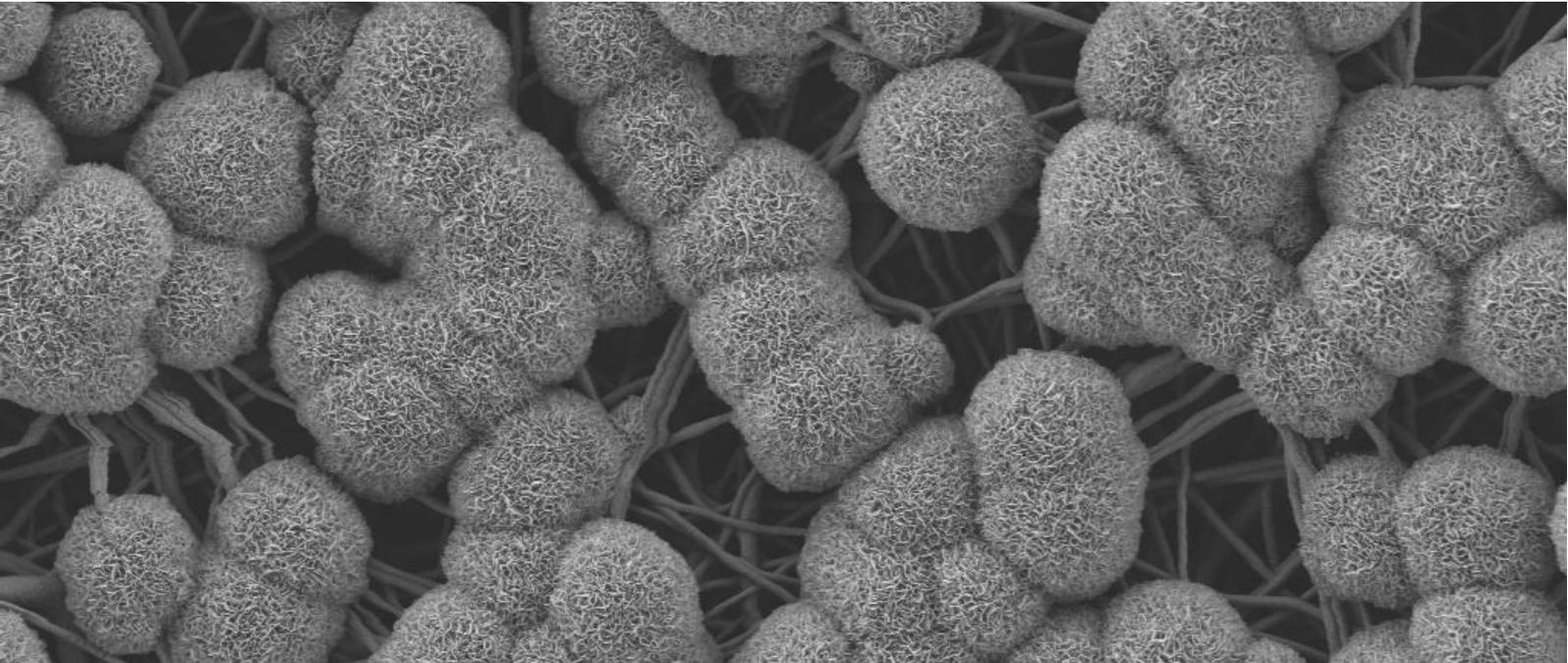


Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata
Instituto de Biomateriales, Friedrich Alexander Universität

Matrices electrohiladas híbridas de PCL/quitosano con vidrio bioactivo para ingeniería de tejidos óseos



Proyecto final presentado por Martín Leonel Melucci para obtener el
título de Ingeniero en Materiales

Directores: Dr. Gustavo A. Abraham y Dr. Aldo R. Boccaccini

Colaboradora: Irem Ünalán

Mar del Plata, diciembre de 2020



RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Agradecimientos

Quiero aprovechar este espacio para agradecerles a todas las personas que han aportado a mi desarrollo académico y personal:

- A Dr. Gustavo Abraham por recibirme en su grupo de trabajo y por su dirección que ayudaron a la finalización de este proyecto.
- A la Dra. Silvia Simison y al Dr. Aldo Boccaccini junto con el resto de personas involucradas en el programa I.DEAR que hicieron posible el intercambio con la Universidad de Erlangen y que me embarque en este proyecto.
- A Irem Ünalán por su buena predisposición y supervisión a lo largo del proyecto, sin ella este trabajo no existiría.
- A Andrea y Juan Carlos, mis padres, y a mis abuelos Raquel y Juan por apoyarme todos estos años incondicional y amorosamente.
- A Rocío por acompañarme, subirme la autoestima y hacerme mejor. A Sofía por no dejarme bajar los brazos.
- A Karina, Fernando, Alicia, Alejandro, Emiliano y Francisco por interesarse y acompañar en la distancia.
- A Camila, Pancho, Carlos, Alexis, Lucas, Cristian, Roque y Santiago por todos los buenos momentos que voy a extrañar.
- A los compañeros y profesores de la UNMdP por despertar mi interés y hacer de todos estos años una experiencia estresante y enriquecedora.

A todos muchas gracias.

Resumen

Las estrategias para el reemplazo de tejidos dañados incluyen implantes autólogos, alogénicos y xenogénicos. Estos abordajes poseen desventajas asociadas a la limitada disponibilidad de tejidos y el riesgo de transmisión de enfermedades.

El desarrollo de biomateriales que promuevan la cicatrización de heridas y permitan reemplazar o regenerar tejido dañado de manera segura y con total disponibilidad, resulta altamente necesaria. En el presente trabajo se combinó la policaprolactona (PCL) como polímero sintético y quitosano (biopolímero) con partículas de vidrio bioactivo 13-93 mediante electrohilado para obtener biomateriales compuestos. La composición y la morfología nanofibrosa de las estructuras obtenidas busca imitar características de la matriz extracelular tanto en la escala nano y micrométrica como en las propiedades mecánicas y superficiales. Las membranas nanofibrosas se obtuvieron a partir del electrohilado de soluciones poliméricas de ácido acético y ácido fórmico ambos considerados solventes de baja toxicidad (benignos).

Las propiedades morfológicas y superficiales se estudiaron a través de microscopía electrónica de barrido (SEM), ángulo de contacto y espectroscopía infrarroja (FTIR). Las fibras de PCL-quitosano presentaron un diámetro nanométrico y carácter hidrofílico. A partir de ensayos termogravimétricos se verificó que las partículas de vidrio 13-93 se incorporaron a la matriz polimérica de las fibras y se determinó la bioactividad de las mismas a partir de ensayos en fluido corporal simulado (SBF). La incorporación de quitosano en las muestras produjo una marcada disminución de las propiedades mecánicas y no aportó actividad antibacterial en bacterias Gram positivas y negativas.

Índice

1. Introducción	10
1.1. Curado de heridas	10
1.2. Ingeniería de tejidos	12
1.3. Electrohilado.....	14
1.3.1. Parámetros del electrohilado	16
1.4. Polímeros	22
1.5. Biomateriales.....	23
1.6. Solventes benignos	23
1.7. Policaprolactona.....	24
1.8. Quitosano	25
1.9. Vidrios bioactivos.....	28
2. Objetivos	31
3. Materiales	31
4. Métodos	32
4.1. Fabricación de las membranas.....	32
4.1.1. Preparación de las soluciones	33
4.1.2. Electrohilado	34
4.2. Caracterización morfológica	36
4.3. Caracterización superficial	37
4.3.1. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	37
4.3.2. Ángulo de contacto (CA).....	37
4.4. Caracterización térmica.....	38
4.4.1. Análisis termogravimétrico (TGA)	38
4.5. Caracterización mecánica	38
4.6. Evaluación de la bioactividad acelular.....	39
4.7. Evaluación de la actividad antibacterial.....	41

5. Resultados y discusión	41
5.1. Fabricación de las membranas electrohiladas	41
5.2. Caracterización morfológica	43
5.3. Caracterización superficial	49
5.3.1. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	49
5.3.2. Ángulo de contacto	51
5.4. Caracterización térmica.....	53
5.4.1. Análisis termogravimétrico (TGA)	53
5.5. Caracterización mecánica	56
5.6. Bioactividad acelular.....	58
5.7. Actividad antibacterial.....	65
6. Conclusiones	67
7. Trabajo futuro.....	68
8. Referencias.....	68

Listado de figuras

Figura 1-1. Esquema de nanofibras como apósito y propiedades relevantes para el tratamiento de la herida: adaptabilidad al contorno de la herida, administración de drogas, intercambio de gases, absorción de fluidos y funcionalización superficial [1].	11
Figura 1-2. Principios de la ingeniería de tejidos: biopsia, aislamiento celular, cultivo celular, expansión del cultivo, crecimiento celular en el sustrato junto con estímulos y la implantación. [7].....	12
Figura 1-3. Micrografía SEM de fibroblastos en tejido nativo liofilizado (izquierda). Esquemas sobre como la estructura del sustrato afecta la adhesión celular (derecha): A) soporte microporoso; B) soporte microfibrroso; C) soporte nanofibrroso [9].	14
Figura 1-4. Esquema del equipamiento necesario para el electrohilado [12].	15
Figura 1-5. Esquema de la variación de la forma de la gota de la solución con el aumento de campo electrostático y el acumulamiento de cargas (de izquierda a derecha) [3].	16
Figura 1-6. Influencia de la concentración de polímero en la viscosidad, enmarañamiento de las cadenas de polímeros y morfología de las fibras [5].	17
Figura 1-7. Imágenes digitales de tres etapas de deformación de una gota de povidona bajo la influencia de una mayor diferencia de potencia incrementando desde a) hasta c) [11].....	19
Figura 1-8. Representación de un colector plano estático (B) y de las fibras orientadas al azar obtenidas (C); un colector cilíndrico rotatorio (D) y de las fibras uniaxiales alineadas obtenidas (E) [2].	20
Figura 1-9. Esquema de: a) eyección de cono de Taylor; b) eyección dentro del capilar; c) fluido acumulado en la punta de la aguja; d) gota excedente expulsada [16].	20
Figura 1-10. Estructura química de la policaprolactona [22].	24
Figura 1-11. Esquema representando la producción de quitosano a partir de quitina de origen animal: residuos de crustáceos; lavado, secado y molienda; desmineralización; desproteínización; desacetilación [24].	26

Figura 1-12. Estructura química de la quitina (izquierda) y del quitosano (derecha) [26].	26
Figura 1-13. Etapas de la formación de hidroxiapatita carbonatada en la superficie de un vidrio bioactivo [31]......	29
Figura 4-1. Proceso de obtención de las membranas: PCL AA y PCL AA/FA.....	33
Figura 4-2. Proceso de obtención de las membranas: PCL-BG15 y PCL-BG30.....	33
Figura 4-3. Proceso de obtención de la membrana: PCL-Q.....	34
Figura 4-4. Proceso de obtención de las membranas: PCL-Q-BG15 y PCL-Q-BG30.	34
Figura 4-5. Montaje del equipo de electrohilado en funcionamiento.....	36
Figura 4-6. Medición del ángulo de contacto de PCL AA/FA.....	37
Figura 4-7. Configuración del ensayo mecánico de una a muestra de PCL AA/FA..	39
Figura 4-8. Portador y anillo (derecha) y portador con la membrana colocada (izquierda).....	40
Figura 4-9. Muestras colocadas dentro de la incubadora a 37°C.....	40
Figura 5-1. Partículas decantadas en una solución de PCL-BG30 luego de 24 horas.	42
Figura 5-2. Acumulación de material de una muestra PCL-Q durante el electrohilado.	42
Figura 5-3. Micrografías SEM de las partículas de vidrio luego de 24 inmersas en la mezcla de solventes. Se presentan con diferente magnificación: A) 2.500 X y B) 10.000 X.....	43
Figura 5-4. Distribución de tamaño de las partículas de vidrio bioactivo 13-93 utilizadas.....	44
Figura 5-5. Micrografías SEM de una membrana PCL AA (izquierda) magnificación de 2.500 X y 10.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL AA (derecha).....	44

Figura 5-6. Micrografías SEM de una membrana PCL AA/FA (izquierda) magnificación de 2.500 X y 25.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL AA/FA (derecha).	45
Figura 5-7. Micrografías SEM de una membrana PCL-BG15 (izquierda) magnificación de 2.500 X y 10.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL-BG15 (derecha).	45
Figura 5-8. Micrografías SEM de una membrana PCL-BG30 (izquierda) magnificación de 2.000 X sin deposición de oro y 10.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL-BG30 (derecha).	46
Figura 5-9. Micrografías SEM de una membrana PCL-Q (izquierda) magnificación de 10.000 X y 45.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL-Q (derecha).....	46
Figura 5-10. Micrografías SEM de una membrana PCL-Q-BG15 (izquierda) magnificación de 10.000 X y 45.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL-Q-BG15 (derecha).	47
Figura 5-11. Micrografías SEM de una membrana PCL-Q-BG30 (izquierda) magnificación de 10.000 X y 45.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL-Q-BG30 (derecha).	47
Figura 5-12. Micrografías SEM de: A) muestra de PCL-BG15 con magnificación 10.000 X y B) muestra de PCL-BG30 10.000 X.	48
Figura 5-13. Micrografías SEM: A) PCL AA/FA 1.000 X, B) PCL-BG15 1.000 X, C) PCL-Q 5.000 X y D) PCL-Q-BG15 5.000 X.	49
Figura 5-14. Espectro ATR-FTIR de las matrices estudiadas desde 4000 a 2600 cm^{-1} y desde 2000 hasta 600 cm^{-1}	50
Figura 5-15. Ángulo de contacto de las matrices electrohiladas.....	52
Figura 5-16. Evolución temporal de la medición del ángulo de contacto de una muestra PCL AA/FA y PCL-Q (izquierda). Imágenes de la gota de agua destilada al comienzo de la medición (derecha).	53
Figura 5-18. Curvas termogravimétricas de las muestras: PCL AA/FA, PCL-BG15, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30.	54

Figura 5-19. Curvas termogravimétricas de las muestras PCL-Q y PCL-Q-BG30 considerando la masa a los 100% como masa total de los polímeros.	56
Figura 5-20. Curvas tensión-deformación de las muestras: PCL AA/FA, PCL-BG30 y PCL-Q.....	57
Figura 5-21. Micrografías SEM de las matrices electrohiladas: PCLAA/FA, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30: antes de la inmersión en SBF (izquierda), 1 día (centro) y 3 días de inmersión (derecha). Las micrografías de las muestras PCL AA/FA y PCL-BG30 con una magnificación de 5.000 X y las de PCL-Q y PCL-Q-BG30 de 10.000 X.	59
Figura 5-22. Micrografías SEM de las matrices electrohiladas: PCLAA/FA, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30: 7 (izquierda), 14 (centro) y 21 días de inmersión (derecha). Las micrografías de las muestras PCL AA/FA y PCL-BG30 con una magnificación de 5.000 X y las de PCL-Q y PCL-Q-BG30 de 10.000 X.....	60
Figura 5-23. Micrografías SEM luego de 3 días de inmersión en SBF: A) PCL-BG30 magnificación de 1.000 X, B) PCL-Q-BG30 magnificación de 1.000 X.	61
Figura 5-24. Espectro ATR-FTIR de las matrices PCL AA/FA, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30 desde 2000 a 400 cm ⁻¹ antes de la inmersión en SBF y luego de 1, 3, 7, 14, y 21 días.	62
Figura 5-25. Micrografías SEM de: A) muestra de PCL AA/FA luego de 1 día de inmersión en SBF a una de magnificación 10.000 X y B) muestra de PCL-BG30 luego de 3 días de inmersión en SBF a una magnificación de 10.000 X.	63
Figura 5-26. Análisis EDS de las muestras PCL-BG30 (izquierda) y PCL-Q-BG30 (derecha) luego de 7 días de inmersión en SBF. Espectro EDS con Ca/P y micrografía con mapeo de Ca (azul) y P (violeta).	63
Figura 5-27. Análisis EDS de las muestras PCL-BG30 (izquierda) y PCL-Q-BG30 (derecha) luego de 14 días de inmersión en SBF. Espectro EDS con Ca/P y micrografía con mapeo de Ca (azul) y P (violeta).....	64
Figura 5-28. Micrografías SEM luego de 21 días de inmersión en SBF de una muestra de PCL AA/FA: A) magnificación de 45.000 X, B) magnificación de 10.000 X.....	64
Figura 5-29. Viabilidad bacteriana relativa de S. aureus (Gram positivo) y E. coli (Gram negativo) en las muestras de: PCL AA/FA, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30.	65

Listado de tablas

Tabla 1-1. Propiedades térmicas y mecánicas de la policaprolactona (Mw 44.000) [18].	25
Tabla 1-2. Composición del plasma humano y del fluido corporal simulado.	29
Tabla 1-3. Composición de los vidrios bioactivos 45S5 y 13-93.....	30
Tabla 4-1. Composición de las soluciones preparadas.	32
Tabla 4-2. Parámetros del electrohilado.....	35
Tabla 5-1. Diámetro medio de las fibras de las muestras analizadas.....	47
Tabla 5-2. Peso residual del ensayo y temperatura al 50% de degradación de las muestras.....	55
Tabla 5-3. Módulo de Young (E), resistencia a la tracción (TS) y máxima deformación de PCL AA/FA, PCL-BG30 y PCL-Q.	57

1. Introducción

Muchos pacientes de avanzada edad o que padecen enfermedades genéticas, obesidad o diabetes sufren complicaciones con el curado de sus heridas. La tardanza en la cicatrización puede ser incluso fuente de úlceras crónicas, tejidos defectuosos y lesiones precancerosas que pueden empeorar su calidad de vida tanto económica como socialmente. A pesar que los injertos son la principal forma de abordar y reparar tejidos como la piel, tienen limitada disponibilidad y pueden transmitir enfermedades entre personas.

Por estos motivos, es necesario el desarrollo de materiales que promuevan la cicatrización de heridas y permitan reemplazar o regenerar tejido dañado de manera segura y con total disponibilidad. Con este objetivo se trata de combinar la ciencia de materiales y la biología para obtener materiales que sean similares a los tejidos que buscan reemplazar tanto en la escala nano y micrométrica como en las propiedades mecánicas y superficiales [1, 2].

1.1. Curado de heridas

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y es responsable del 15% del peso de un adulto. La piel está expuesta constantemente a heridas de deshidratación, infección, radiación solar, daño mecánico y químico. Por esta razón, el curado de heridas es un proceso crítico durante el desarrollo humano, ya que problemas en la cicatrización pueden producir heridas crónicas, infecciones y amputaciones [1].

El curado de heridas es un proceso dinámico que sigue una secuencia intrincada de eventos que incluyen la homeostasis, la inflamación, proliferación y remodelado del tejido. El principal tratamiento médico de las heridas es la utilización de apósitos o elementos que cubran la zona. Estos apósitos deben ayudar en la protección de la zona afectada, la eliminación de exudados y la inhibición de la aparición de microorganismos [3].

El abordaje actual en la generación de apósitos se enfoca en la producción de nanomateriales preferentemente derivados de fuentes naturales, biocompatibles, biodegradables, que posean buenas propiedades mecánicas y no sean citotóxicos. Dentro las tecnologías más investigadas se encuentran los fullerenos, nanogeles, nanopartículas y nanofibras. Asimismo, las nanofibras son el método preferido debido

a que permite imitar la matriz extracelular (MEC) del tejido dérmico, algo que no es posible con otros materiales [1].

Las fibras naturales de la MEC presentan diámetros en el rango de 50 a 500 nanómetros y para obtener fibras en este orden de magnitud se ha recurrido a tecnologías tales como la separación de fase, el autoensamblaje molecular y el electrohilado. Este último se destaca dentro de estas tecnologías por su versatilidad y fácil implementación. Las membranas fibrosas producidas por electrohilado poseen una porosidad interconectada que permite el intercambio de gases, previene la deshidratación del tejido dañado, promueve la adsorción de exudados y funciona como una barrera física contra microorganismos [4, 1]. Algunas de sus propiedades se presentan en la Figura 1-1.

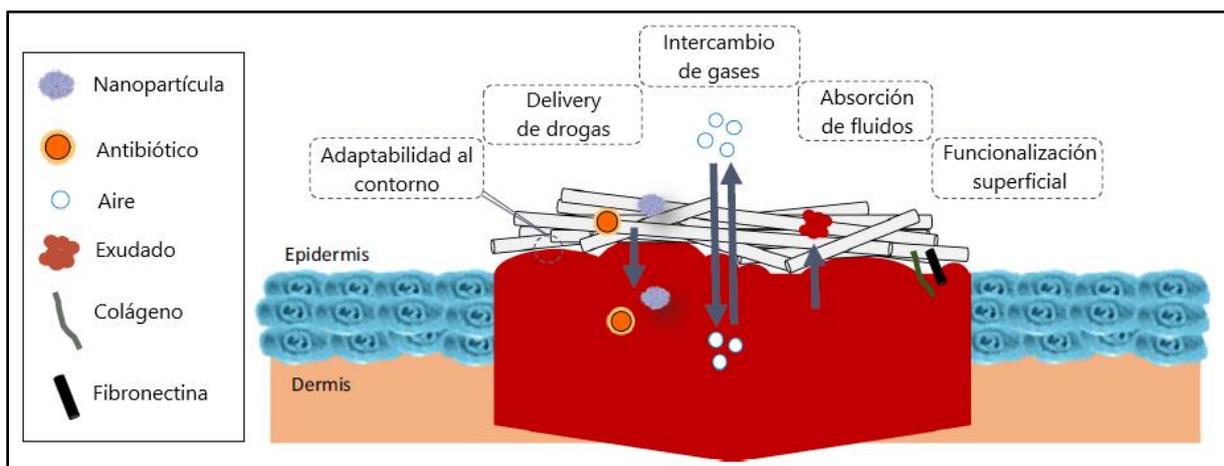


Figura 1-1. Esquema de nanofibras como apósito y propiedades relevantes para el tratamiento de la herida: adaptabilidad al contorno de la herida, administración de drogas, intercambio de gases, absorción de fluidos y funcionalización superficial [1].

Estas membranas al imitar a la MEC atraen células que pueden asistir en la regeneración de los tejidos dañados ya que se trata de diseñarlas para poseer una buena adhesión celular. Sin embargo, estos ambientes al promover el desarrollo de diversos tipos de células también pueden promover el desarrollo de bacterias. Por esta razón, se ha investigado la fabricación de membranas electrohiladas compuestas con propiedades antibacteriales de manera de evitar la colonización del apósito por bacterias [3, 5].

1.2. Ingeniería de tejidos

La regeneración de tejido dañado o enfermo es uno de los mayores problemas médicos. Se considera a los implantes y autotransplantes como el tratamiento general de esta problemática. Estos abordajes poseen las desventajas de la limitada disponibilidad y el riesgo de transmisión de enfermedades. Con el objetivo de superar estas limitaciones la ingeniería de tejidos propone diversas estrategias para la reparación de tejidos y órganos utilizando métodos de la ingeniería y la medicina mediante construcciones artificiales [6, 2].

El procedimiento más común es aislar células específicas del paciente con una pequeña biopsia y permitir su crecimiento en condiciones de cultura celular controlada sobre un sustrato (*scaffold*). Luego, el sustrato con las células (*construct*) es implantado en el sitio deseado del paciente donde se espera que se integre y genere un nuevo tejido y la estructura temporal se degrade con el tiempo hasta eliminarse completamente [6], como se esquematiza en la Figura 1-2.

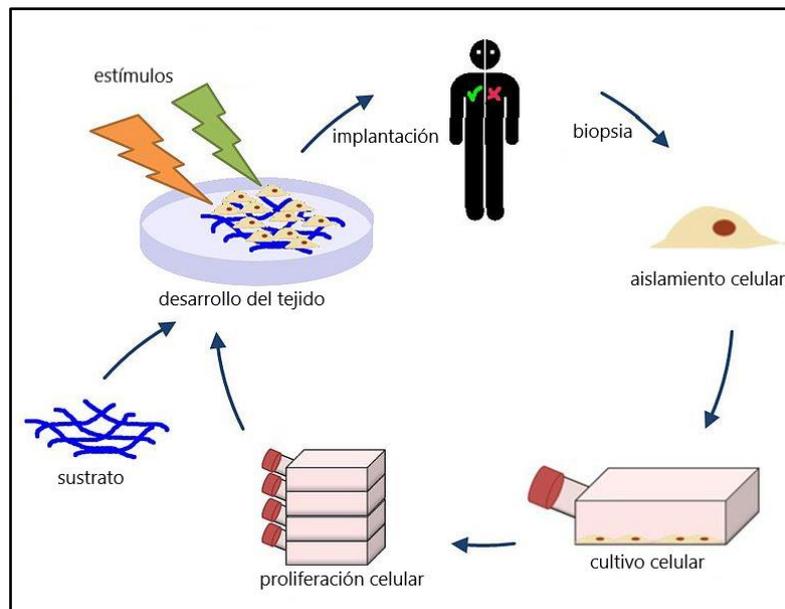


Figura 1-2. Principios de la ingeniería de tejidos: biopsia, aislamiento celular, cultivo celular, expansión del cultivo, crecimiento celular en el sustrato junto con estímulos y la implantación. [7].

Un abordaje alternativo consiste en implantar el sustrato directamente en la zona a regenerar con el objetivo de estimular el crecimiento del tejido in situ. La ventaja de

este procedimiento es la necesidad de una sola operación, que resulta en menores tiempos de recuperación del paciente [6].

Estos sustratos o matrices necesitan cumplir diversos requerimientos. Primero, deben ser biocompatibles, es decir, no deben generar una respuesta inflamatoria en el tejido huésped, no ser citotóxicos ni inmunogénicos. Asimismo, las propiedades mecánicas deben ser suficientes para permitir su manejo y soportar la sollicitación mecánica específica del tejido. Es necesario una red interconectada de poros que permita la vascularización de su interior y los sustratos deben poder esterilizarse para prevenir infecciones. Otras cualidades deseables son una buena adaptabilidad para cada paciente y la posibilidad de llevar a escala industrial el procesamiento del material de manera rentable [6].

Los materiales más usados para el desarrollo de estos sustratos son polímeros naturales y sintéticos tanto termoplásticos como hidrogeles. Otra categoría de materiales importantes en uso son los cerámicos bioactivos, como los biovidrios, que se los suelen usar junto con uno o más polímeros de manera de obtener un material compuesto con buenas propiedades mecánicas e interacción con el tejido [6].

Se han reportado diferentes métodos para obtener sustratos para la ingeniería de tejidos incluyendo separación de fase, electrospraying, electrohilado, deposición química de vapor, autoensamblaje molecular y nano-impresión. Dentro de estas se prefieren las membranas nanofibrosas debido a su capacidad de imitar la matriz extracelular (MEC) y así promover un entorno apropiado para el crecimiento celular. La MEC es una red tridimensional que rodea todas las células (presentado en Figura 1-3) del organismo que actúa como filtro, permite la nutrición, la respuesta inmune, la regeneración y cicatrización de tejidos y la transmisión de esfuerzos mecánicos [2, 3, 8].

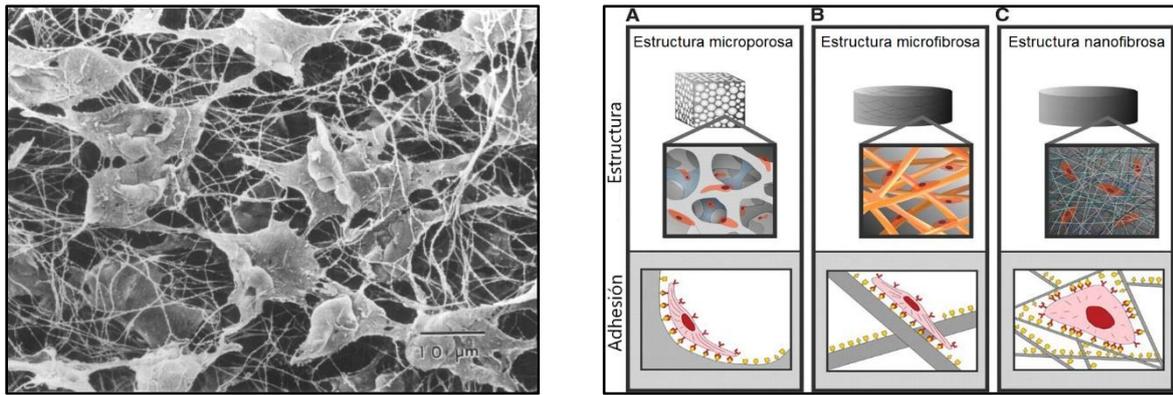


Figura 1-3. Micrografía SEM de fibroblastos en tejido nativo liofilizado (izquierda). Esquemas sobre como la estructura del sustrato afecta la adhesión celular (derecha): A) soporte microporoso; B) soporte microfibrroso; C) soporte nanofibrroso [9].

El electrohilado es el método más investigado para la obtención de membranas fibrosas debido a que permite la producción de fibras continuas nanométricas de alta relación área superficial/volumen de manera rentable. Asimismo, estas membranas presentan gran porosidad interconectada que permite el transporte de fluidos y nutrientes. Se han investigado la respuesta de diversos tipos de células sobre biomateriales fibrosos electrohilados para regenerar tejidos cardiovasculares, epiteliales, nerviosos, hepáticos, musculares, cartilaginoso, óseos y de la piel [2, 4, 10].

1.3. Electrohilado

El electrohilado (*electrospinning*) es un proceso que permite obtener fibras (micro y nanométricas) mediante la aplicación de fuerzas electroestáticas. Está íntimamente relacionado con el electropulverizado (*electrospraying*), ya que ambos utilizan fuerzas electroestáticas para formar un chorro cargado eléctricamente que es eyectado hacia un colector con la carga opuesta. El electrohilado se patentó por primera vez en 1902, sin embargo, no fue hasta la década de 1990 que el electrohilado de polímeros se volvió de gran interés en aplicaciones médicas y especialmente en el campo de la ingeniería en tejidos. Si bien el electrohilado fue desarrollado para polímeros fundidos o soluciones poliméricas se han electrohilado un amplio rango de materiales incluyendo cerámicos, metales y compuestos [2, 1, 11].

El electrohilado es una técnica atractiva para sintetizar fibras de varios polímeros biodegradables debido a la simpleza del proceso y la potencialidad de ser

implementado a escala industrial. El equipo más simple consta de una fuente de alta tensión, una jeringa, una bomba conectada a la jeringa, una aguja o capilar y un colector metálico representado en la Figura 1-4. El equipamiento puede ser instalado horizontal o verticalmente y el colector puede ser una simple placa metálica o adoptar diseños más sofisticados para evitar la formación de fibras al azar [2, 1].

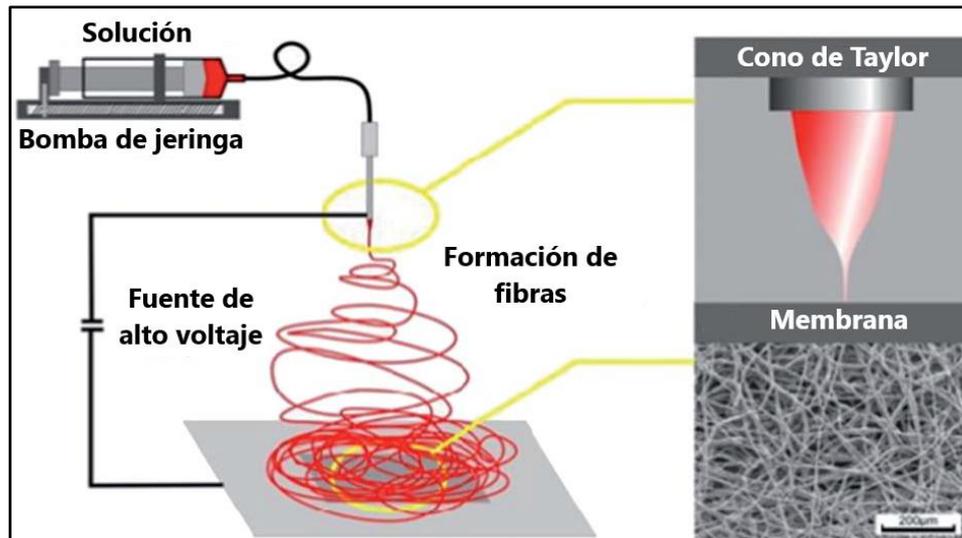


Figura 1-4. Esquema del equipamiento necesario para el electrohilado [12].

Inicialmente al bombearse la solución se produce una gota que permanece en la punta de la aguja debido a la tensión superficial. Al aplicarse una diferencia de potencial entre la aguja y el colector (en general entre 5 y 30 kV), la gota hemisférica se elonga formando una gota de forma cónica hacia el colector llamada cono de Taylor. La aplicación de este campo eléctrico produce migración de iones o cargas presentes en el polímero hacia la superficie de la gota y la repulsión entre estas cargas compite con la tensión superficial esquematizado en la Figura 1-5. Al aplicarse un potencial mayor sobre un valor crítico se provoca la eyección de un microchorro de solución desde la punta del cono de Taylor producto de la repulsión electrostática que supera la tensión superficial [2, 1].

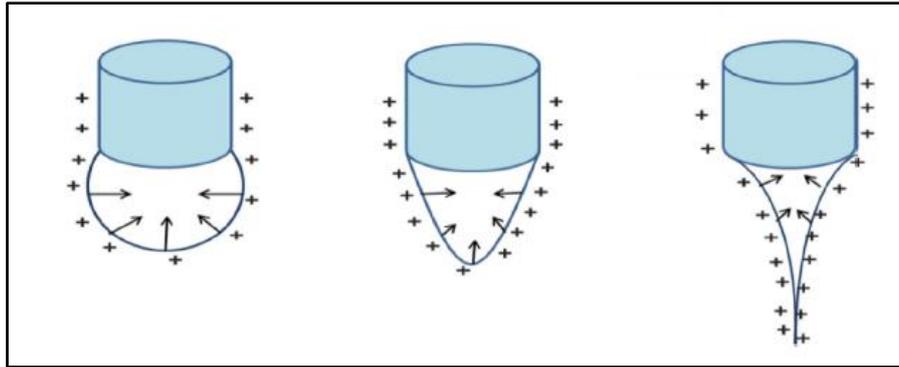


Figura 1-5. Esquema de la variación de la forma de la gota de la solución con el aumento de campo electrostático y el acumulamiento de cargas (de izquierda a derecha) [3].

El chorro eyectado se ve sujeto a inestabilidades eléctricas en su trayectoria hacia el colector y su diámetro es gradualmente reducido producto de estas inestabilidades y de la evaporación del solvente. Se ha propuesto que estas inestabilidades son producto de carga eléctrica ubicadas en el chorro fuera de una posición de equilibrio. Luego, el chorro cargado es recogido en el colector [2, 1].

1.3.1. Parámetros del electrohilado

Los factores que influyen en el proceso pueden ser organizados en tres grupos: los parámetros de la solución, del proceso de electrohilado y del ambiente. Los parámetros de la solución comprenden la concentración de polímero, la viscosidad, la conductividad de la solución y el solvente o mezclas de solventes. Los parámetros del electrohilado incluyen la diferencia de potencial aplicada entre la aguja y el colector, el tipo de colector, el flujo de solución, el diámetro de la aguja y distancia entre colector y el capilar. Los parámetros del ambiente incluyen la humedad relativa y la temperatura [3].

- *Concentración de polímero y viscosidad:* El estiramiento del microchorro, es decir el diámetro de las fibras y su morfología, es afectado significativamente por cambios en la concentración de polímero en la solución. Si la concentración de polímero es baja el campo eléctrico aplicado y la tensión superficial causan que los entrelazamientos entre las cadenas poliméricas se rompan antes de llegar al colector, o bien no se alcance una suficiente densidad de

enmarañamiento de cadenas. Estos forman gotas o no uniformidades en las fibras electrohiladas. El incremento de la concentración de polímero genera un aumento de la viscosidad producto del aumento del enmarañamiento de las cadenas de polímeros. Estos enmarañamientos superan en una concentración de polímero la tensión superficial y se obtienen fibras uniformes (presentado en la Figura 1-6 **Error! Reference source not found.**). Mayores aumentos de la concentración y viscosidad sobre el valor crítico limitan el flujo de la solución por la aguja y la solución puede secarse y bloquear el capilar [3].

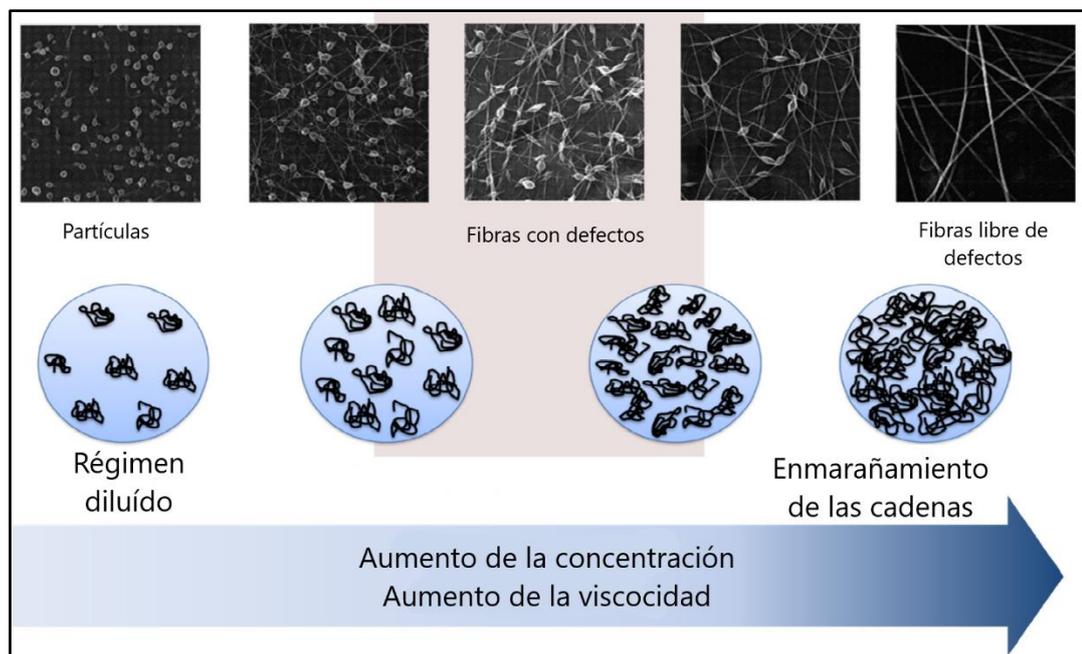


Figura 1-6. Influencia de la concentración de polímero en la viscosidad, enmarañamiento de las cadenas de polímeros y morfología de las fibras [5].

- *Conductividad de la solución:* La conductividad de la solución afecta la formación del cono de Taylor y el diámetro de las fibras. Los microchorros de soluciones con alta conductividad son sometidos a mayores fuerzas de tracción producto de la mayor movilidad de las cargas eléctricas. Esto conduce, en general, a un mayor estiramiento del microchorro, por lo que, se ha observado que mayor conductividad de la solución se obtiene menor diámetro de fibra. Un aumento de la conductividad sobre un valor crítico inhibe la formación del cono de Taylor y el electrohilado de esa solución. Por otro lado, las soluciones con baja conductividad no tienen suficientes cargas en la superficie de la gota por

lo que no se genera el cono de Taylor y el electrohilado no es posible. La conductividad de una solución polimérica puede ser controlada mediante la selección del solvente o la incorporación de líquidos iónicos o sales que agregan portadores de carga a la solución y aumentan su conductividad [3, 13].

- *Solvente:* La elección del solvente es un factor importante para obtener fibras uniformes y sin defectos. Las dos consideraciones más importantes en la elección de un solvente son su temperatura de ebullición y la completa solubilidad del polímero en el solvente. La temperatura de ebullición indica la volatilidad del solvente a la temperatura del electrohilado. En general se buscan solventes volátiles que permitan su evaporación en el trayecto desde la aguja hasta el colector, sin embargo, se evitan solventes muy volátiles debido a que pueden secar la gota de la solución en la punta de la aguja y bloquearla. Asimismo, se evita el uso de solventes pocos volátiles porque no se evaporan completamente antes de llegar al colector obteniéndose fibras defectuosas y aplanadas. Por otro lado, la selección de solventes es importante en la obtención de fibras porosas a través del uso de un sistema de dos solventes donde uno no actúa como tal. La diferencia de la velocidad de evaporación de los solventes genera una separación de fases y al evaporarse el solvente de menor volatilidad de las fibras se producen poros en su lugar [3, 13].
- *Diferencia de potencial entre la aguja y el colector.* El potencial eléctrico aplicado es crítico para el proceso de electrohilado. Se requiere un potencial mínimo para que la gota pendiente en la punta de la aguja genere un cono de Taylor y un potencial mayor para que un microchorro sea eyectado hacia el colector (ver Figura 1-7). Este valor crítico para la generación de fibras depende de cada sistema polímero/solvente y hay un rango óptimo donde se obtienen fibras sin defectos. El aumento de la diferencia de potencial sobre el valor crítico disminuye el diámetro de las fibras producto de un mayor estiramiento por un incremento de la repulsión del microchorro. Mayores aumentos pueden generar defectos e inestabilidades en las fibras [3, 13].

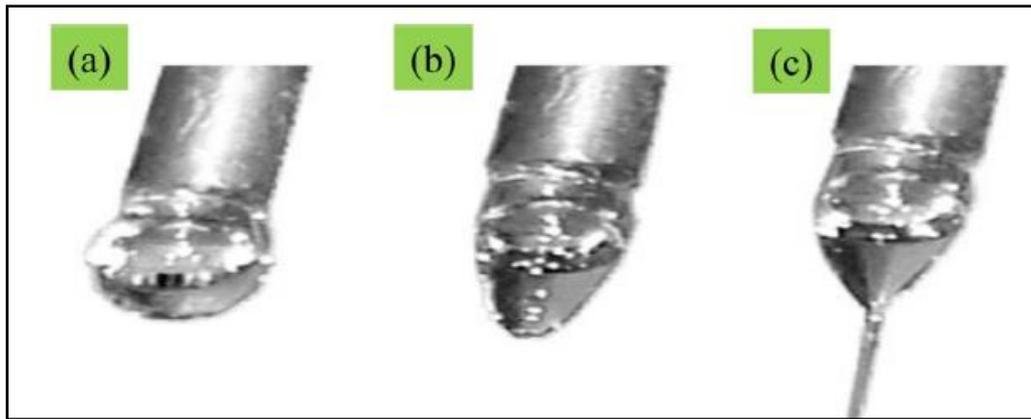


Figura 1-7. Imágenes digitales de tres etapas de deformación de una gota de povidona bajo la influencia de una mayor diferencia de potencia incrementando desde a) hasta c) [11].

- *Tipo de colector:* La mayoría de los experimentos utilizan colectores de materiales conductores (típicamente papel aluminio) que permiten disipar las cargas eléctricas y obtener fibras empaquetadas. Cuando se usan materiales no conductores las cargas se acumulan y se depositan menor cantidad de fibras con menor densidad de empaquetamiento. La naturaleza estática o dinámica y la forma de los colectores permiten alinear las fibras. En la Figura 1-8 se representan los colectores más utilizados: el plano que permite obtener fibras orientadas al azar y el colector cilíndrico rotario que permite obtener fibras alineadas. Se pueden obtener fibras alineadas de diversas maneras e incluso hay casos donde se recurre a patrones topográficos en los colectores para densificar la membrana resultante en puntos específicos o para generar macroporos [14, 15].

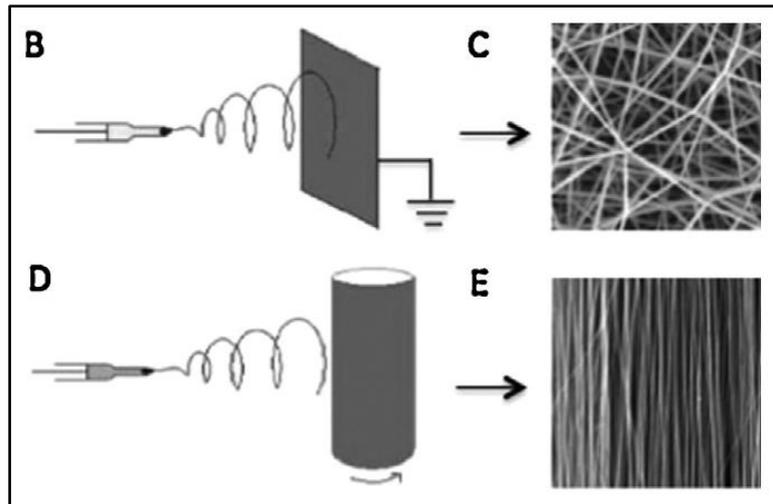


Figura 1-8. Representación de un colector plano estático (B) y de las fibras orientadas al azar obtenidas (C); un colector cilíndrico rotatorio (D) y de las fibras uniaxiales alineadas obtenidas (E) [2].

- Flujo de la solución:* Existe un mínimo flujo de solución para el cual se consigue balancear la solución que es eyectada de la aguja con la solución que la reemplaza. Menores flujos generan que el chorro de solución sea eyectado desde dentro del capilar produciendo fibras con defectos y una amplia distribución de diámetros. Por otro lado, incrementos del flujo desde el mínimo estable producen un aumento en diámetro de las fibras por el aumento de la solución polimérica disponible en el cono de Taylor. Cuando el flujo es demasiado alto el solvente en el microchorro no es capaz de evaporarse y se generan fibras defectuosas o con forma aplanada; y pueden generarse gotas de solución en exceso en la aguja que pueden ser atraídas al colector [3, 13]. Estos comportamientos se esquematizan en la Figura 1-9.

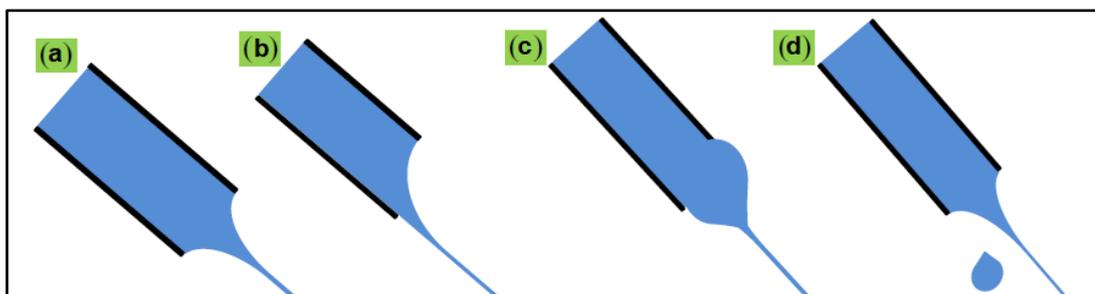


Figura 1-9. Esquema de: a) eyección de cono de Taylor; b) eyección dentro del capilar; c) fluido acumulado en la punta de la aguja; d) gota excedente expulsada [16].

- *Diámetro de la aguja:* El diámetro interno de la aguja o capilar afecta la morfología de las fibras electrohiladas. La disminución del diámetro interno de la aguja reduce la formación de defectos y el diámetro de las fibras. Al ser el diámetro interno menor se aumenta la tensión superficial de la gota y se requiere mayor fuerza eléctrica para iniciar el microchorro. Esto permite un mayor estiramiento del chorro antes de alcanzar el colector, sin embargo, si el diámetro es muy pequeño puede no ser posible extruir la gota por la aguja [14, 17].
- *Distancia entre el colector y la aguja:* Existe una distancia mínima necesaria para que el solvente pueda evaporarse antes de alcanzar el colector, menores distancias generan fibras con forma aplanada. Por otro lado, mayores distancias entre el colector y la aguja pueden disminuir el diámetro de las fibras debido al mayor tiempo de estiramiento antes del colector. Si la distancia es muy grande pueden no depositarse fibras sino pequeñas gotas (electrospray) [3, 1].
- *Temperatura:* el incremento de la temperatura produce dos efectos: aumenta la evaporación de solvente y disminuye la viscosidad de la solución. El aumento de la velocidad de evaporación de solvente produce una solidificación del microchorro más rápida de manera similar al uso de un solvente más volátil. Por otro lado, la disminución de la viscosidad disminuye el diámetro de las fibras al igual que la disminución de la viscosidad producto de una menor concentración de polímero en la solución. En la práctica el resultado de ambos efectos es la disminución del diámetro de las fibras con el aumento de la temperatura [3, 1].
- *Humedad:* La humedad puede afectar el diámetro y la morfología de las fibras al controlar el proceso de solidificación del microchorro mediante la velocidad de evaporación de solvente. Sin embargo, este fenómeno depende de la interacción molecular del sistema solvente-polímero. Se ha observado aumento y disminución del diámetro, aumento de la porosidad y fusión de las fibras en el colector por el solvente remanente de acuerdo a los diferentes sistemas [3, 1].

1.4. Polímeros

Los polímeros se pueden clasificar dependiendo su origen en polímeros naturales (biopolímeros) o sintéticos. Los polímeros naturales son producidos por microorganismos, plantas y animales [5].

Los biopolímeros son, en general, biodegradables, biocompatibles y tiene baja antigenicidad. Algunos polímeros naturales presentan acción antibacterial y antiinflamatoria y pueden contribuir a la reparación de tejidos aumentando la interacción entre las fibras y compuestos involucrados en el proceso de curado de heridas [1]. Las desventajas de estos polímeros son sus malas propiedades mecánicas, difícil procesabilidad, baja rentabilidad y debido a su complejidad molecular son difíciles de manejar [5].

La mayoría de los biopolímeros en uso como biomaterial son constituyentes de la matriz extracelular de tejidos como tendones, ligamentos, piel, vasos sanguíneos y óseos. Los biopolímeros principales son el colágeno, la gelatina, el quitosano, la fibronectina, el fibrinógeno, al ácido hialurónico, la celulosa y el alginato [1].

Estos polímeros pueden ser degradados por los organismos garantizando que los implantes sean metabolizados por mecanismos fisiológicos. Esta propiedad atenta contra la durabilidad del material, sin embargo, se ha usado como una ventaja cuando se desea una función temporaria. Asimismo, es posible controlar la velocidad de degradación del biopolímero mediante entrecruzamientos y modificaciones químicas. Algunos biopolímeros, debido a su similitud con sustancias orgánicas, pueden presentar inmunogenicidad por lo que deben ser modificados químicamente antes de su uso [18].

Una desventaja de los polímeros naturales es que se descomponen a temperaturas menores a su temperatura de fusión por lo que no son aptos para el procesamiento termoplástico. Asimismo, presentan variabilidad macromolecular producto de su origen de fuentes naturales ya que puede variar entre especies, individuos y dentro de tejidos de un mismo individuo [5].

Los polímeros sintéticos se pueden clasificar en biodegradables y no biodegradables y poseen mayor procesabilidad y mejores propiedades mecánicas comparados con los polímeros naturales. Estos polímeros pueden producirse en grandes cantidades y

las propiedades pueden controlarse de modo que no varíen con el lote de producción. Asimismo, son compatibles con un rango amplio de solventes que los hace apropiados para el electrohilado. Los más utilizados para curar heridas son: el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), óxido de polietileno (PEO), poliuretano (PU) y poliestireno (PS) [1].

Los biopolímeros son difíciles de electrohilar debido a problemas de solubilidad, en consecuencia, son típicamente mezclados en baja cantidad junto a polímeros sintéticos para obtener buena solubilidad y complementar las propiedades mecánicas y químicas [1, 5].

1.5. Biomateriales

Un biomaterial es cualquier sustancia que ha sido diseñada para interactuar con un sistema biológico en el curso de cualquier procedimiento terapéutico o diagnóstico. Se incluye cualquier material usado en dispositivos médicos para tratar, aumentar o reemplazar tejidos, órganos o funciones del cuerpo sin causar reacciones adversas en los tejidos. Asimismo, se incluyen dispositivos implantados que liberen drogas de forma controlada y construcciones de ingeniería en tejido [19].

Estos biomateriales deben ser biocompatibles, es decir, cumplir la función deseada e inducir la respuesta adecuada en el tejido huésped para la aplicación determinada sin el riesgo de rechazo del sistema inmunológico. Por lo que un material que es biocompatible para una función puede no serlo para otra [19].

1.6. Solventes benignos

El uso del término solvente benignos no está restringido al proceso de electrohilado. Se ha mencionado su uso en el diseño de producto químicos y en el procesamiento de electrónica orgánica. Se usa para identificar solventes con bajo punto de ebullición, baja presión de vapor, no tóxicos, capaz de disolver compuestos orgánicos, bajo costo y reciclables [20].

En el electrohilado los solventes benignos se pueden definir como solventes con baja o nula toxicidad, compatible con el proceso de electrohilado de polímeros y sus mezclas. Asimismo, su uso evita la desnaturalización de proteínas y que las trazas remanentes de estos solventes no afecten la biocompatibilidad de las muestras, por

esto se los ha propuesto para su uso en polímeros biomédicos. El uso de solventes benignos es amigable con el ambiente, aumenta la seguridad del trabajo en el laboratorio y permite un manejo simple de desechos [21].

1.7. Policaprolactona

La poli(ϵ -caprolactona) (PCL) es un poliéster alifático, sintético, linear, semicristalino de bajo punto de fusión (59-64 °C) y su estructura molecular se presenta en la Figura 1-10 [2]. Este polímero es biocompatible, biodegradable con buenas propiedades mecánicas y baja hidrofiliidad que limita la adhesión celular y su uso en dispositivos médicos. En la Tabla 1-1 se presentan propiedades térmicas y mecánicas de la PCL. Sin embargo, la PCL está aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) para aplicaciones médicas y se encuentra en uso clínico en Europa para su empleo como grapas para cerrar heridas [5, 21].

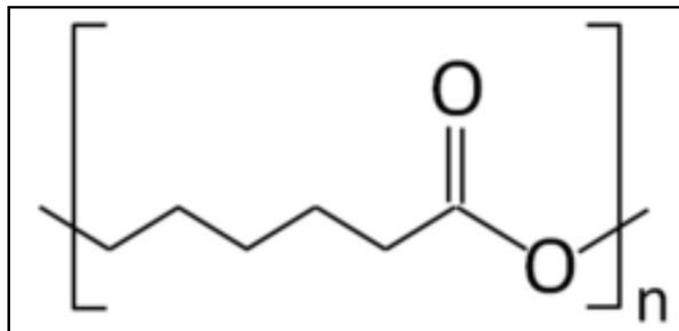


Figura 1-10. Estructura química de la policaprolactona [22].

La PCL es uno de los polímeros sintéticos más utilizados en la medicina debido a su biocompatibilidad, lenta biodegradabilidad, disponibilidad comercial y su aptitud para el procesado termoplástico. La degradación de la PCL ocurre por la rotura hidrofílica de enlaces éster y la migración fuera del seno del material de los oligómeros resultantes. La degradación de cadenas de alto peso molecular (M_n mayor a 50.000) puede extenderse hasta tres años [6, 23].

Las zonas cristalinas y los productos ácidos de la degradación son significativos durante el proceso de degradación en el organismo. Las zonas cristalinas poseen menor velocidad de degradación debido a la menor difusión en los cristales y pueden

ser encapsuladas en el cuerpo. Los productos ácidos de la degradación disminuyen el pH en las zonas cercanas al material, lo que puede provocar reacciones adversas, por lo que se ha recurrido a la incorporación de vidrio bioactivos o fosfatos de calcio que controlen la degradación del PCL y estabilicen el pH. De esta manera se pueden contrarrestar las desventajas de cada material [6, 24].

Tabla 1-1. Propiedades térmicas y mecánicas de la policaprolactona (Mw 44.000) [18].

Temperatura de Transición Vítrea (°C)	-62	Temperatura de Fusión (°C)	57
Resistencia a la Tracción (MPa)	16	Módulo de Young (MPa)	400
Módulo de Flexión (MPa)	500	Deformación a rotura (%)	80

La PCL es soluble en una amplia variedad de solventes y tiene buena miscibilidad con otros polímeros, pudiendo ser utilizado para mejorar el electrohilado de diversos biopolímeros. Se han generado fibras de PCL electrohiladas con solventes como cloroformo, diclorometano, metanol o una mezcla de estos solventes. Asimismo, se han obtenidos fibras de PCL utilizando como solventes ácido acético (AA), ácido fórmico (FA), agua y acetona considerados como solventes benignos [25].

1.8. Quitosano

El quitosano es un biopolímero lineal y semicristalino, polisacárido compuesto por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. El quitosano como tal no está presente en la naturaleza, sino que se lo obtiene por una desacetilación parcial de la quitina. Se conoce como grado de desacetilación (DD) al porcentaje de grupos amino a lo largo de la cadena sobre el total de unidades de glucosamina. Para recibir el nombre de quitosano el DD debe ser igual o mayor a 60%. La desacetilación de la quitina puede producirse por hidrólisis química o enzimática, proceso representado en la Figura 1-11 [26, 27].

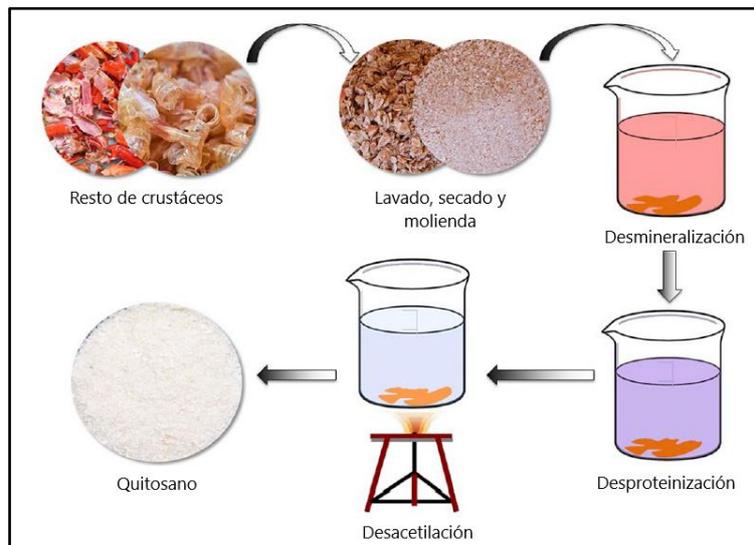


Figura 1-11. Esquema representando la producción de quitosano a partir de quitina de origen animal: residuos de crustáceos; lavado, secado y molienda; desmineralización; desproteínización; desacetilación [24].

La quitina es el segundo biopolímero más abundante, se lo encuentra en los exoesqueletos de animales invertebrados y en las paredes celulares de algunos hongos y algas. Este origen produce en el quitosano una variabilidad fisicoquímica con la fuente de obtención, en la Figura 1-12 se presentan la estructura de la quitina y el quitosano. El peso molecular del quitosano varía generalmente entre 300 y 1000 kDa y el DD varía entre 60 y 100% dependiendo de la fuente y el procesamiento [26].

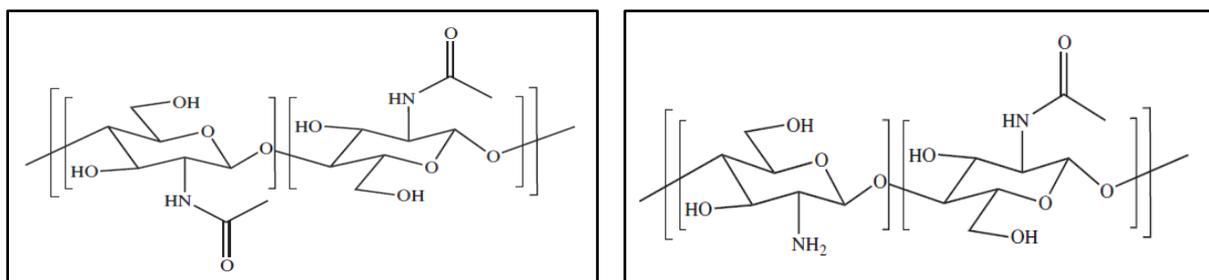


Figura 1-12. Estructura química de la quitina (izquierda) y del quitosano (derecha) [26].

La presencia de grupos amino en el quitosano, producto de la desacetilación, le confiere muchas propiedades interesantes. Estos grupos amino pueden protonarse

otorgándole solubilidad en soluciones ácidas, por esto el quitosano no es soluble en muchos solventes. Asimismo, los grupos aminos permiten al quitosano formar complejos con cationes metálicos por lo que se lo puede usar en el tratamiento de aguas residuales. Estos grupos permiten la aparición de enlaces de puente de hidrogeno entre las cadenas otorgándole gran rigidez mecánica [26, 24].

El quitosano presenta propiedades importantes para aplicaciones biomédicas como actividad antibacterial, antifúngica, mucoadhesiva, analgésica y hemostática. Asimismo, el quitosano es biodegradable en productos no tóxicos y biocompatible con medios fisiológicos. La biodegradación del quitosano se da por la rotura de enlaces glicosídicos que origina oligosacáridos incorporables al metabolismo celular [1, 26].

La actividad antibacterial y antifúngica del quitosano se explica generalmente por dos mecanismos. El primero es que las zonas cargadas positivamente del quitosano interactúan con las zonas negativamente cargadas de la membrana celular alterando su permeabilidad, evitando así que material esencial entre a las células o generando fugas de material fuera de la ellas. El segundo mecanismo involucra la inhibición de la síntesis del ARN también producto de la interacción de grupos aminos cargados positivamente [26].

Se ha investigado la aplicación del quitosano en productos farmacéuticos y biomédicos como suturas, ingeniería de diversos tejidos, implante óseo y piel artificial. En este marco el quitosano fue aprobado por la FDA para su uso en apósitos. Es beneficioso para muchas de estas aplicaciones el uso de materiales nanofibrosos que pueden imitar la MEC. El electrohilado del quitosano ha sido investigado utilizando diversos tipos de solventes, incluyendo solventes benignos como el ácido acético (AA) y fórmico (FA) [26, 28].

La naturaleza policationica del quitosano en medios ácidos complejiza el proceso de electrohilado. Las fuerzas repulsivas entre las cargas de las cadenas poliméricas restringen la formación de fibras continuas y favorecen la creación de defectos o partículas. Por lo que la forma más conveniente de electrohilar el quitosano es mezclándolo con otro polímero, como por ejemplo PEO, PVA, PET, PLA y PCL entre otros. Asimismo, se ha intentado mejorar sus propiedades mecánicas y respuesta a medios fisiológicos mediante la creación de materiales híbridos con partículas de

cerámicos bioactivos como hidroxiapatita, vidrios bioactivos y fosfatos de calcio [26, 24].

1.9. Vidrios bioactivos

Los vidrios bioactivos poseen calcio y fósforo en una proporción similar a la hidroxiapatita presente en los huesos. Tiene la habilidad de unirse a tanto a tejidos blandos como duros y se degradan en medios fisiológicos. El primer vidrio bioactivo fue inventado por Larry Hench en 1969 cuando buscaba un material capaz de unirse al tejido óseo evitando su encapsulación. Su mayor descubrimiento fue el vidrio 45S5 perteneciente al diagrama ternario del SiO_2 , CaO y Na_2O que produce una unión fuerte con el tejido óseo que solo puede ser removido rompiendo el hueso. En consecuencia, un material bioactivo se define como aquel material que estimula una respuesta beneficiosa del tejido huésped, en general una unión fuerte con el tejido circundante. Existen vidrios bioactivos de base sílice, base fosfato y de base borato y en general son obtenidos por proceso sol-gel o mediante un rápido enfriamiento de un fundido [29, 30].

El mecanismo de unión con el tejido óseo es atribuido a la formación de una capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA) superficial que ocurre luego de la disolución inicial del vidrio. Se ha propuesto un proceso de 5 etapas para la formación de esta capa de HCA desde el contacto con tejidos o su inmersión en fluido corporal simulado (SBF) que se presenta en la Figura 1-13 [29].

1. Rápido intercambio de cationes Na^+ y Ca^{2+} por H^+ de la solución, creando en la superficie del vidrio grupos silanol (Si-OH). En consecuencia, el pH de la solución aumenta.
2. El pH alto de la solución ataca la red del vidrio rompiendo los enlaces Si-O-Si formando productos solubles de silicio Si(OH)_4 y, en consecuencia, creando más grupos silanol en la superficie del vidrio.
3. Los grupos silanol en la superficie del vidrio se condensan generando una superficie rica en silicio.
4. Migración de Ca^{2+} y grupos PO_4^{3-} desde la solución a la superficie a través de la capa rica en silicio. Creando una capa de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ amorfo sobre la de Silicio.

5. Incorporación de hidroxilos y carbonatos de la solución y cristalización la superficie de Ca-P₂O₅ en HCA.

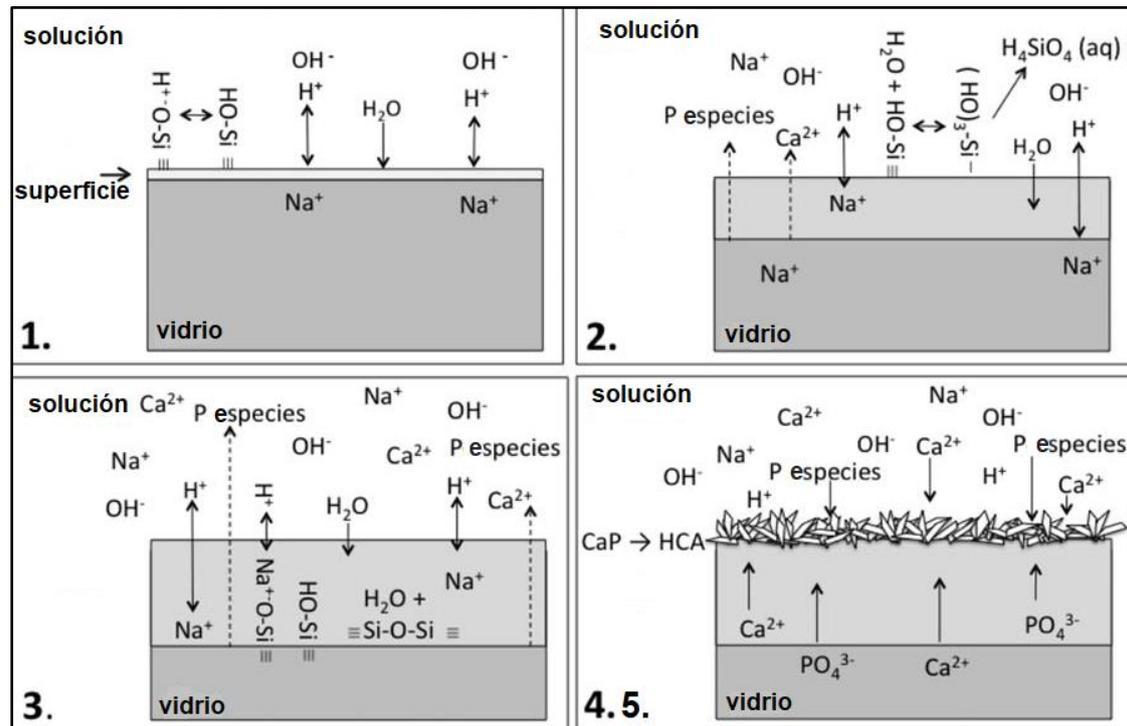


Figura 1-13. Etapas de la formación de hidroxiapatita carbonatada en la superficie de un vidrio bioactivo [31].

El fluido corporal simulado utilizado para estudiar la bioactividad de los biovidrios posee una composición similar al cuerpo humano y permite predecir la formación de apatita en contacto con tejidos corporales [32]. Su composición fue desarrollada por Kokubo et al. y se presenta en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2. Composición del plasma humano y del fluido corporal simulado.

Ion (10^{-3} molar)	Plasma	SBF
Na^+	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5
Cl^-	103,0	147,8
HCO_3^-	27,0	4,2
HPO_4^-	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	0,5

Asimismo, los vidrios bioactivos poseen actividad osteogénica usualmente atribuida los productos de su disolución como cationes de Calcio y sílice que estimulan la producción de tejido óseo por parte de las células osteogénicas. Por otro lado, estos vidrios pueden presentar propiedades antibacteriales producto de la liberación de cationes durante su disolución y el aumento local del pH. La aplicación más importante de los biovidrios es el tratamiento de defectos óseos. Sin embargo, su uso comercial más exitoso es como aditivo en pasta de dientes funcionando como agente de reparación y se ha demostrado clínicamente que reduce la sensibilidad dental [29].

Para aumentar las propiedades mecánicas o el conformado de piezas se requiere un procesamiento a alta temperatura como un sinterizado. Es posible que durante este procesamiento ocurran modificaciones de la estructura amorfa del vidrio que puede desvitrificar parcialmente en dominios cristalinos. Al tratar térmicamente el vidrio 45S5 se tienden a formar cristales que disminuyen significativamente su velocidad de disolución y la formación de HCA. Con el objetivo de obtener vidrios bioactivos tratables térmicamente sin desvitrificación se han investigado diferentes composiciones. Un ejemplo exitoso de estos es el vidrio 13-93 que ha recibido la aprobación de la FDA y es apto para uso clínico en Estados Unidos y Europa [33].

El biovidrio 13-93 fue desarrollado por Maria Brink en 1997, al introducir los óxidos KO y MgO obtuvo un vidrio con alto contenido de SiO₂ (53 %p) capaz de ser tratado térmicamente sin desvitrificar. Experimentos de cultivo celular in vitro demostraron que no hay diferencias entre la proliferación y diferenciación de osteoblastos sobre los vidrios 45S5 y 13-93. Las composiciones de estos vidrios bioactivos se presentan en Tabla 1-3 [33]. Sin embargo, como consecuencia del mayor contenido de Silicio, que reduce su disolución, el vidrio bioactivo 13-93 produce la capa de HCA más lentamente [33, 34, 30].

Tabla 1-3. Composición de los vidrios bioactivos 45S5 y 13-93.

Vidrio	SiO₂	P₂O₅	Na₂O	K₂O	CaO	MgO
45S5	45	6	24,5	-	24,5	-
13-93	53	4	6	12	20	5

Los materiales compuestos de polímeros y vidrios bioactivos se han desarrollado para su aplicación en medicina regenerativa debido a que su estructura orgánica e inorgánica permite obtener propiedades similares a la de los tejidos humanos. Sin embargo, estos materiales suelen proponerse para situaciones que no demanden altos esfuerzos mecánicos debido a su baja resistencia mecánica. Asimismo, la producción de estos materiales utilizando polímeros naturales ha permitido obtener materiales biocompatibles y que promueven la adhesión y proliferación celular [35].

Por otro lado, el uso de biovidrios juntos con poliésteres como la PCL puede disminuir la velocidad de degradación del polímero. Esto se produce por la liberación de cationes que generan un medio alcalino que contrarrestan los productos ácidos liberados durante la degradación de los poliésteres y evitando la auto aceleración de la degradación. Asimismo, esto puede evitar que el pH en la zona cercana al material alcance valores perjudiciales para los tejidos [35].

2. Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo principal obtener matrices poliméricas biocompatibles, biodegradables, bioactivas y antibacteriales para su uso en ingeniería de tejidos, en particular en tejidos óseos y cicatrización de heridas. Los objetivos específicos del trabajo son:

- Obtener matrices nanofibrosas y nanocompuestas mediante electrohilado con solventes benignos.
- Caracterizar la morfología de las matrices y sus propiedades fisicoquímicas, térmicas, mecánicas y superficiales.
- Evaluar la bioactividad in vitro y comportamiento antibacterial de las matrices preparadas.

3. Materiales

Para la obtención de membranas electrohiladas se utilizó poli(ϵ -caprolactona) (80 kDa, Sigma Aldrich, Alemania) en forma de pellets y quitosano en polvo (190-300 kDa, grado de desacetilación 75-85%, Sigma Aldrich, Alemania). Las soluciones de estos polímeros se prepararon empleando ácido acético (pureza 99-100%, Sigma Aldrich, Alemania) y ácido fórmico (pureza 99-100%, Sigma Aldrich, Alemania). Como fase

inorgánica se empleó un vidrio bioactivo 13-93 (53,0 SiO₂; 6,0 Na₂O; 12,0 K₂O; 6,0 MgO; 20,0 CaO; 4,0 P₂O₅; %p) sintetizado y molido por el Instituto de Biomateriales de FAU, Erlangen, Alemania [36].

Para el ensayo de degradación se utilizó una solución de fluido corporal simulado a 37°C de temperatura preparada en el mismo Instituto.

El ensayo de caracterización antibacterial se realizó utilizando una cepa de *Staphylococcus aureus* (ACTCC25923) y de *Escherichia coli* (ACTCC25922). El medio de cultivo agar nutritivo (Luria/Miller, X969.1) y el caldo de lisogenia (Luria/Miller, 6673.1) utilizado fueron suministrados por Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Alemania).

4. Métodos

4.1. Fabricación de las membranas

Las membranas electrohiladas se prepararon siguiendo un protocolo optimizado previamente [37, 28]. En el presente trabajo se utilizaron siete soluciones diferentes, una solución de ácido acético glacial (AA) y seis con una mezcla de ácido acético y ácido fórmico (FA) de relación 3:7 (v/v). En la Tabla 4-1 se muestra la composición de las soluciones preparadas. La concentración de quitosano se presenta como relación en peso con respecto a la cantidad de PCL mientras que, la cantidad de biovidrio agregada a la solución se expresa en relación con el peso total de los polímeros.

Tabla 4-1. Composición de las soluciones preparadas.

Código	AA/FA (v/v)	PCL (%p/v)	Q/PCL (%pPCL)	BG (%p _{pol})
PCL AA	1:0	20	0	0
PCL AA/FA	3:7	20	0	0
PCL-BG15	3:7	20	0	15
PCL-BG30	3:7	20	0	30
PCL-Q	3:7	6	20	0
PCL-Q-BG15	3:7	6	20	15
PCL-Q-BG30	3:7	6	20	30

4.1.1. Preparación de las soluciones

Las soluciones se prepararon midiendo el volumen exacto de solvente mediante pipetas y disolviendo la cantidad predeterminada de polímero en frascos de vidrio con cierre hermético.

En los casos donde se disolvió PCL se dejó la solución bajo agitación magnética durante 24 horas. Luego, se colocó la solución en un baño ultrasónico durante 1 hora y se extrajo la solución con una jeringa. Para la preparación de una membrana compuesta luego de las 24 horas de agitación se agregó la cantidad de vidrio predeterminada y se dejó la solución en agitación 10 minutos adicionales. Se colocó en un baño ultrasónico por 1 minuto y finalmente se cargó la solución en una jeringa. La Figura 4-1 y la Figura 4-2 esquematizan los procesos mencionados.

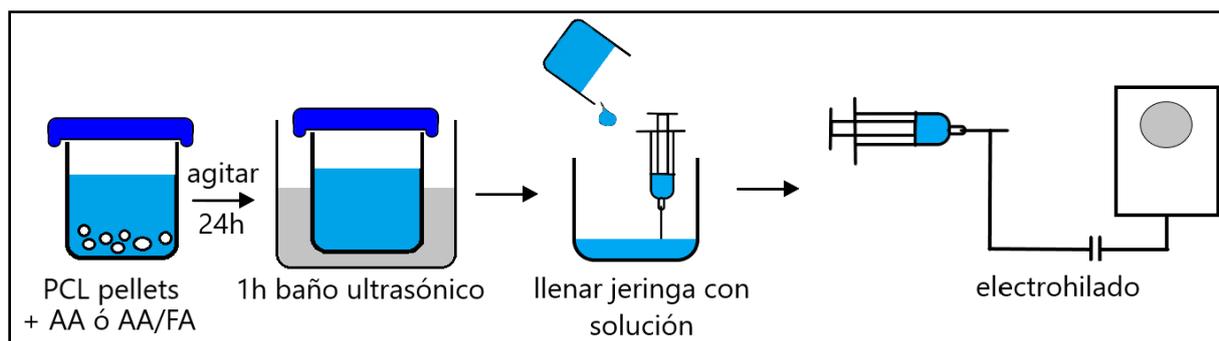


Figura 4-1. Proceso de obtención de las membranas: PCL AA y PCL AA/FA.

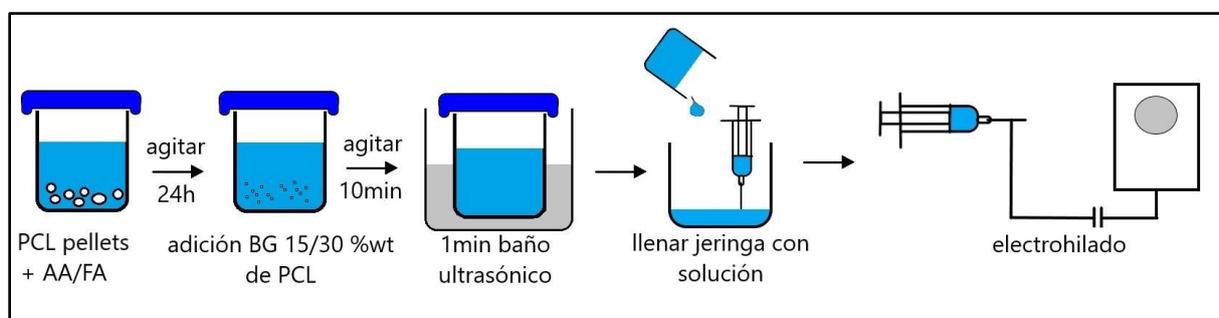


Figura 4-2. Proceso de obtención de las membranas: PCL-BG15 y PCL-BG30.

Para la mezcla de PCL y quitosano se agregó una cantidad predeterminada de este último, luego de una hora de agitación en la mezcla de solventes y PCL. Se dejó bajo agitación magnética durante 72 horas y posteriormente se sumergió la solución en un baño ultrasónico por 15 minutos antes de cargarla en una jeringa como se esquematiza en la Figura 4-3. Para el caso de la mezcla con el vidrio bioactivo 13-93, se lo adicionó luego de las 72 horas en agitación en relación 15 o 30 %p/p con la cantidad de polímero en la solución. Posteriormente, la solución se sumergió en un baño ultrasónico durante 15 minutos y se cargó en la jeringa como se ilustra en la Figura 4-4.

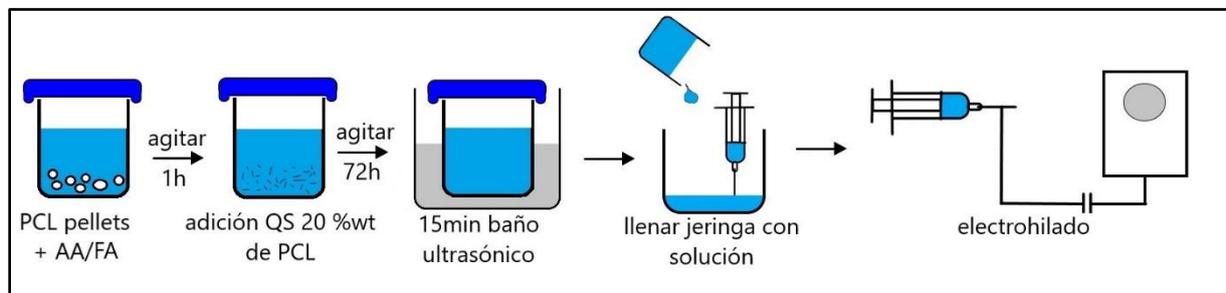


Figura 4-3. Proceso de obtención de la membrana: PCL-Q.

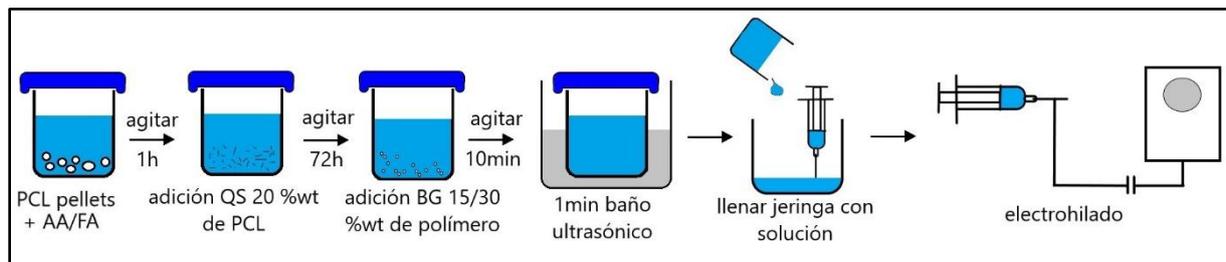


Figura 4-4. Proceso de obtención de las membranas: PCL-Q-BG15 y PCL-Q-BG30.

4.1.2. Electrohilado

Las soluciones resultantes se cargaron en jeringas de 3 ml y en sus extremos se utilizaron agujas de acero inoxidable comerciales de diámetro 21G (514 μm de diámetro interno) [38]. Los parámetros del proceso se mantuvieron constantes entre las muestras que solo poseían PCL y entre las que poseían ambos polímeros para que los resultados obtenidos sean comparables. En la Tabla 4-2 se presentan los

parámetros de electrohilado: diferencia de potencial entre la jeringa y el colector metálico; tiempo de electrohilado; diámetro de aguja; flujo de la solución; distancia de la boquilla de la aguja al colector; humedad relativa y temperatura. El proceso se llevó a cabo en un equipo de electrohilado disponible comercialmente (Starter Kit 40 KV Web, Linari .srl, Italia) y con una placa colectora estática cubierta con papel aluminio. La distancia al colector se midió desde el extremo de la aguja hasta el centro del colector y se montó el equipo como se observa en la Figura 4-5.

Tabla 4-2. Parámetros del electrohilado.

Muestras	PCL AA, PCL AA/FA, PCL-BG15, PCL- BG30	PCL-Q, PCL-Q-BG15, PCL-Q-BG30
Distancia al colector (cm)	11	12,5
Diferencia de potencial (kV)	15	20
Tipo de aguja	21G	21G
Tiempo de electrohilado (min)	30	120
Flujo de solución (ml/h)	0,4	0,3
Humedad (%)	20-50	20-50
Temperatura (°C)	23-25	23-25

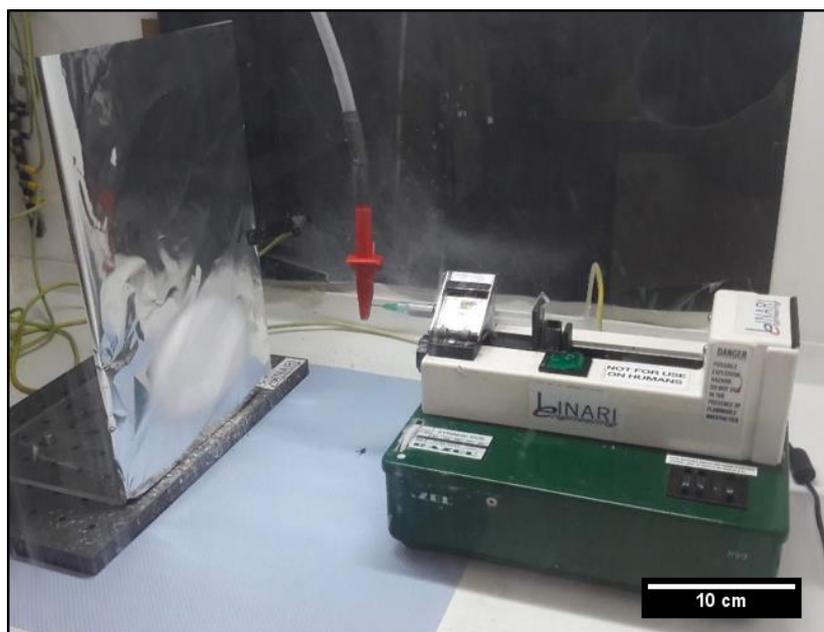


Figura 4-5. Montaje del equipo de electrohilado en funcionamiento.

4.2. Caracterización morfológica

La morfología de las partículas de vidrio bioactivo se evaluó mediante microscopía SEM luego de sumergir el polvo por 24 horas en ácido acético y fórmico en una relación 3:7 (v/v) y del secado en una campana extractora hasta la evaporación completa de los solventes. La distribución de tamaños de partículas se calculó a partir del análisis de las microscopías obtenidas a partir de 100 mediciones del tamaño de las partículas utilizando el programa de análisis de imágenes ImageJ (National Institute of Health, NIH, USA).

La evaluación de las microestructuras previamente recubiertas con oro se llevó a cabo mediante microscopía SEM empleando un microscopio Auriga 0750 ZEISS, perteneciente al IB FAU, Alemania. Las imágenes obtenidas se analizaron para determinar la distribución de diámetros de las fibras y el diámetro medio mediante el programa ImageJ. El cálculo se realizó a partir de 100 mediciones del diámetro de las fibras.

4.3. Caracterización superficial

4.3.1. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de las muestras y del polvo de vidrio 13-93 se obtuvieron utilizando un espectrómetro IRAffinity-1S Shimadzu con la técnica de espectroscopía FTIR con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR). Para el análisis se realizaron 32 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} y variando la longitud de onda en el rango de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

4.3.2. Ángulo de contacto (CA)

La determinación del ángulo de contacto de la superficie de los materiales con agua destilada se realizó con un goniómetro automático DSA30 Krüss Shape Analysis System, Alemania. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, se depositó $2\text{ }\mu\text{l}$ de agua destilada sobre la muestra y se tomaron 40 imágenes durante 4 segundos. Luego, se midió el ángulo formado a la izquierda y derecha de la gota en cada imagen y se calculó el ángulo de contacto medio con el programa DSA4, Krüss, Alemania. El análisis se replicó al menos 3 veces por muestra, las que se cortaron en tiras como se observa en la Figura 4-6. La muestra PCL-Q-BG15 no pudo analizarse debido a que no se dispuso de suficiente material.

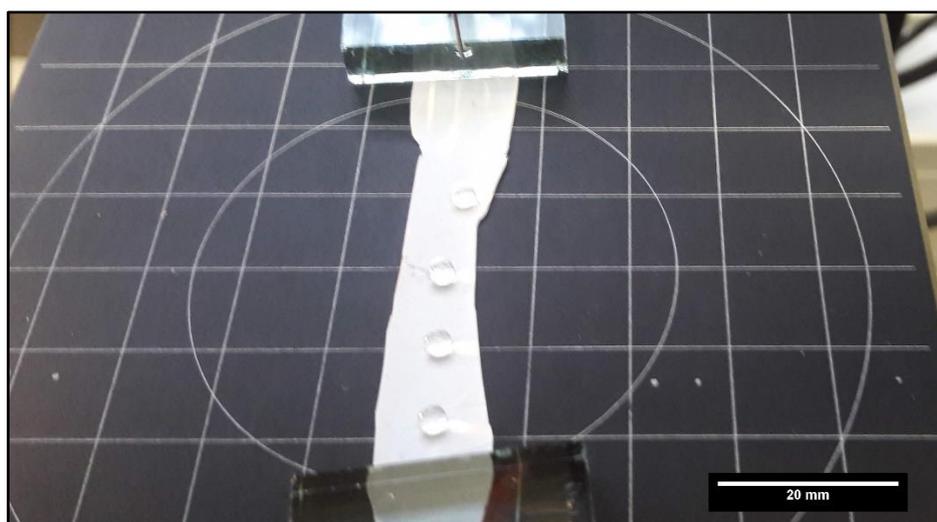


Figura 4-6. Medición del ángulo de contacto de PCL AA/FA.

4.4. Caracterización térmica

4.4.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

La degradación térmica de las membranas se midió mediante un análisis termogravimétrico y se empleó un equipo TGA Shimadzu 50. La variación de masa se analizó desde temperatura ambiente hasta 600°C a una velocidad de 10°C/min bajo una atmósfera de nitrógeno, Se analizaron las muestras de PCL AA/FA, PCL-BG15, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30.

4.5. Caracterización mecánica

La caracterización mecánica de las membranas seleccionadas (PCL AA/FA, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30) se realizó utilizando una máquina universal de ensayos Instron 5967, con sollicitación de tracción uniaxial a temperatura ambiente. Los ensayos se llevaron a cabo a una velocidad de travesa de 10 mm/min. Para facilitar el manejo de las membranas de pequeño espesor se realizaron marcos cuadrados de papel y las muestras se cortaron en tiras de 5 mm por 40 mm de largo con la longitud interna del marco de 20 mm [39]. Se registró el espesor de la muestra con un micrómetro y las muestras se pegaron al marco con cinta doble faz. Posteriormente, el conjunto se colocó en las mordazas de la máquina de ensayos y los laterales del marco se cortaron como se ilustra en la Figura 4-7. Las mediciones se replicaron 3 veces para cada muestra y se registró la fuerza en función del desplazamiento.

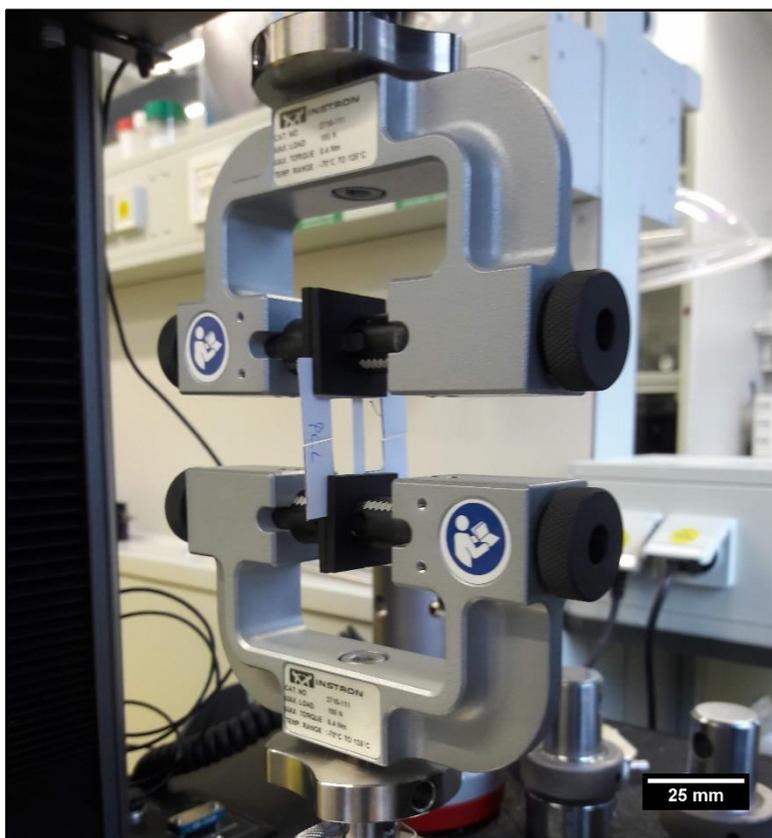


Figura 4-7. Configuración del ensayo mecánico de una a muestra de PCL AA/FA.

4.6. Evaluación de la bioactividad acelular

La bioactividad in vitro de las membranas seleccionadas (PCL AA/FA, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30) se evaluó sumergiendo las muestras en un medio fisiológico simulado (SBF). El medio se preparó en IB FAU siguiendo un protocolo existente y se almaceno bajo refrigeración hasta el momento de su uso, dejándolo alcanzar 37°C dentro de una incubadora IKA KS 4000i [32].

Las muestras se prepararon cortando las membranas y colocándolas en portadores cilíndricos fabricados en IB FAU como se muestra en la Figura 4-8. Las membranas se fijaron con el anillo encastrado y luego se registró el peso. Finalmente, se colocaron 17 ml de SBF a 37°C en tubos de centrifuga de 50 ml junto con la muestra ya en su interior.



Figura 4-8. Portador y anillo (derecha) y portador con la membrana colocada (izquierda).

Se realizaron inmersiones por 1, 3, 7, 14 y 21 días dejando las muestras en los tubos dentro de la incubadora a 37°C (Figura 4-9). El medio se renovó cada 2 días. Para cada muestra se realizaron 3 réplicas en cada periodo. Una vez cumplido el termino se retiraron, se enjuagaron con agua destilada 3 veces, se colocaron dentro de contenedores de plástico y se dejaron secar por 5 días en una incubadora a 30°C. Las muestras secas se pesaron y se observaron por microscopía SEM y EDS. Asimismo, se analizó su espectro infrarrojo para caracterizar la formación superficial de una fase de hidroxiapatita.



Figura 4-9. Muestras colocadas dentro de la incubadora a 37°C.

4.7. Evaluación de la actividad antibacterial

La actividad antibacterial de las membranas PCL AA/FA, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30 se ensayó con cepas de bacterias *S. aureus* (Gram-positiva) y *E. coli* (Gram-negativa) de forma separada. Inicialmente, se prepararon suspensiones de bacterias para ambas cepas en medio de Caldo de Lisogenia a 37°C y se las dejó por 24 horas. Luego, se fijó la densidad óptica (OD) de las bacterias a 0,015 utilizando un espectrofotómetro (600 nm, Thermo Scientific GENESYS 30, Alemania).

Las membranas, se cortaron y separaron en muestras de 3 mg y se esterilizaron con radiación UV ($\lambda = 254$ nm) durante 30 minutos. Las muestras se sumergieron en medio de Caldo de Lisogenia y se les agregó 20 μ l de la suspensión de bacterias a cada una. Finalmente, todas las muestras se incubaron a 37°C por 3, 6 y 24 horas y a cada intervalo temporal se midió la densidad óptica (600 nm). La viabilidad de las bacterias se calculó de acuerdo con la Ecuación (4-1). El medio de Caldo de Lisogenia y la suspensión de bacterias en el medio se usaron como blanco y referencia respectivamente. El experimento se repitió 3 veces.

$$Viabilidad\ relativa\ (\%) = (OD_{muestra}/OD_{referencia}) \times 100 \quad (4-1)$$

5. Resultados y discusión

5.1. Fabricación de las membranas electrohiladas

Las membranas se obtuvieron siguiendo las condiciones establecidas en la Tabla 4-2. Se observó una decantación de las partículas de vidrio en los lados de la jeringa luego de 24 horas de almacenamiento como se observa en la Figura 5-1. Por esa razón se decidió no reutilizar la solución restante en las jeringas luego de finalizada las sesiones de electrohilado, ya que la cantidad de vidrio suspendido en la solución sería menor.



Figura 5-1. Partículas decantadas en una solución de PCL-BG30 luego de 24 horas.

Otra situación observada durante el electrohilado de las soluciones que contenían quitosano fue una lenta acumulación de material en el extremo de la aguja como se ilustra en la Figura 5-2. Se consideró que este material acumulado se generó por el traslado incompleto de solución hacia el colector y la evaporación del solvente de este material restante. Por esta razón, se decidió detener el proceso de electrohilado cada 25 minutos para remover el material acumulado porque puede interferir en la homogeneidad y calidad del microchorro que se forma en la boquilla de la aguja.

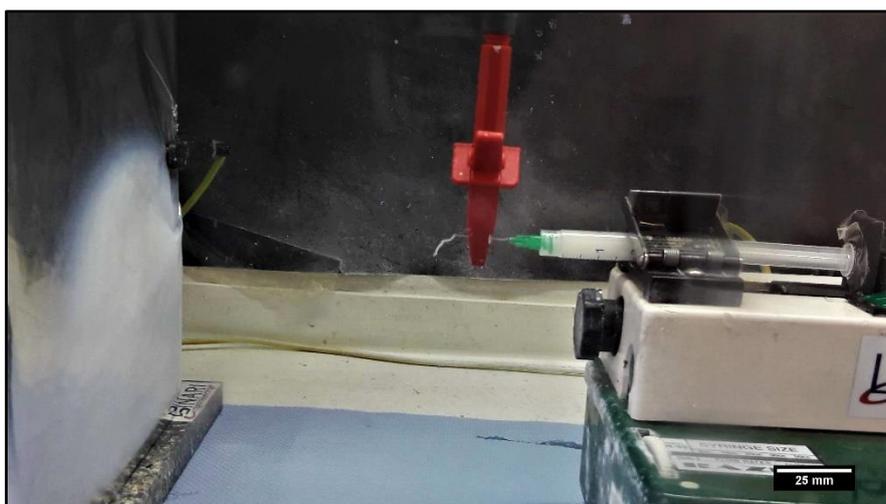


Figura 5-2. Acumulación de material de una muestra PCL-Q durante el electrohilado.

Las membranas obtenidas pudieron manipularse con facilidad, mientras que las matrices sin quitosano presentaron mayor espesor permitiendo una remoción más sencilla del papel aluminio colector. Por otro lado, las membranas que contenían quitosano presentaron, a pesar del mayor tiempo de electrohilado, menor espesor y carga electrostática lo que dificultó su manipulación. La baja cantidad de material final de estas muestras se debió al menor flujo de solución de electrohilado que no fue compensado con la cuadruplicación del tiempo de electrohilado.

5.2. Caracterización morfológica

Las micrografías de las partículas de vidrio 13-93 mostraron la presencia de agregados. Las partículas menores a un micrón se adhirieron a las partículas de mayor tamaño como se observa en la Figura 5-3 B. La formación de este tipo de arreglos también se reportó para partículas de vidrio 45S5 en condiciones similares [37]. Del mismo modo, se observó una gran dispersión de tamaños de las partículas de hasta dos órdenes de magnitud de diferencia entre los extremos de la distribución, desde 0,1 μm hasta 10 μm . En general, la distribución de tamaño de polvos granulados producidos por spray-drying y molido se representa mediante escala logarítmica [40]. En la Figura 5-4 se presenta la distribución de tamaños obtenidos de las micrografías, donde predominan las partículas menores a un micrón.

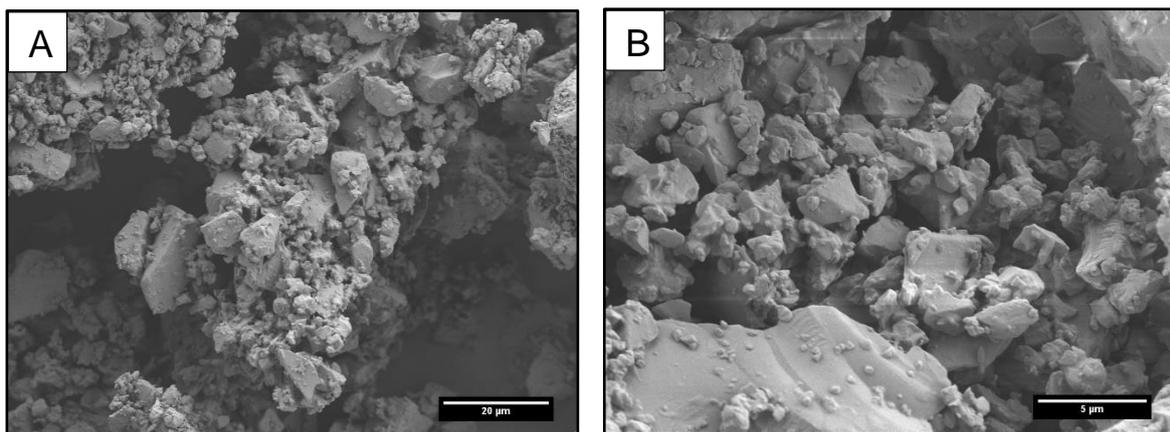


Figura 5-3. Micrografías SEM de las partículas de vidrio luego de 24 inmersas en la mezcla de solventes. Se presentan con diferente magnificación: A) 2.500 X y B) 10.000 X.

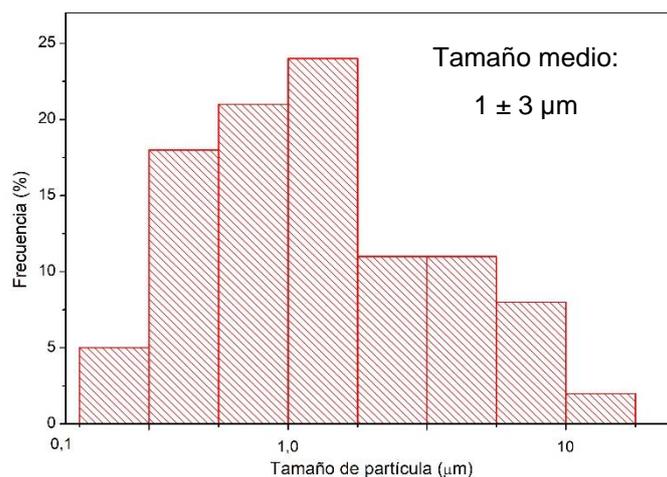


Figura 5-4. Distribución de tamaño de las partículas de vidrio bioactivo 13-93 utilizadas.

A continuación, se presentan micrografías SEM de las diferentes muestras junto con la distribución de diámetro de las fibras y el diámetro medio de las fibras.

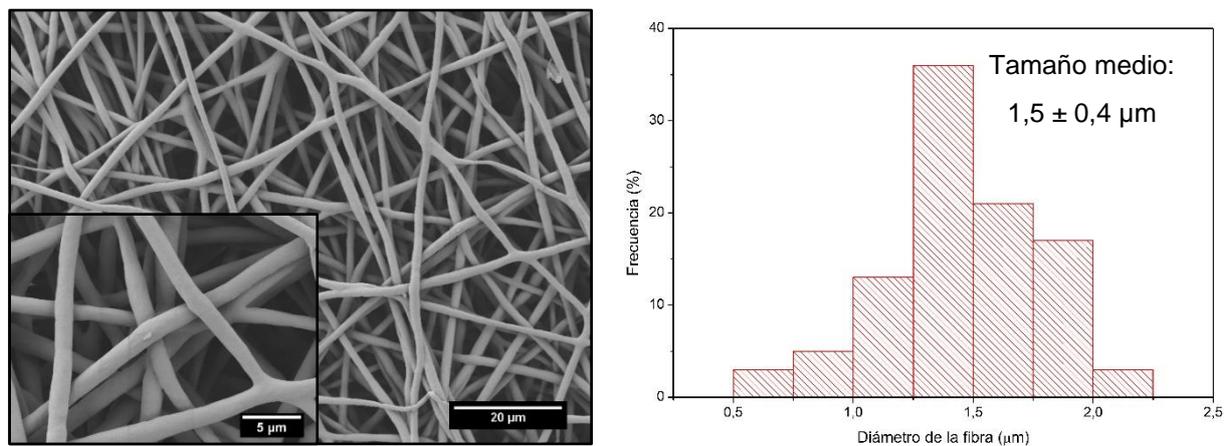


Figura 5-5. Micrografías SEM de una membrana PCL AA (izquierda) magnificación de 2.500 X y 10.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL AA (derecha).

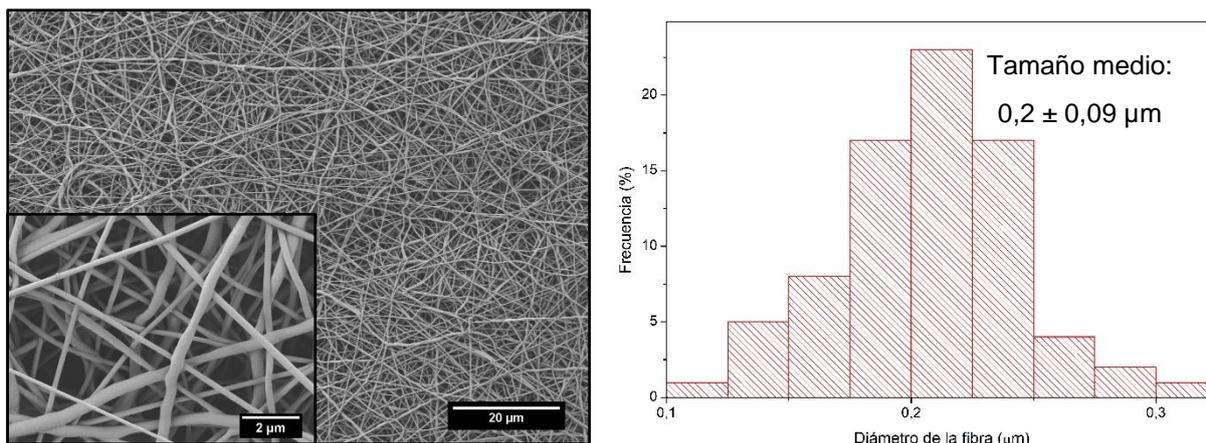


Figura 5-6. Micrografías SEM de una membrana PCL AA/FA (izquierda) magnificación de 2.500 X y 25.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL AA/FA (derecha).

El diámetro de fibra de la muestra PCL AA se encuentra en el rango de valores descrito en literatura para matrices electrohiladas en condiciones similares cuando se utiliza solo ácido acético como solvente y condujo a fibras homogéneas [15]. Al emplear AA/FA como mezcla de solventes se observa una disminución del tamaño de fibra de un orden de magnitud. Este comportamiento puede atribuirse al aumento de la conductividad de la solución, dado que la constante dieléctrica de este sistema de solventes ($\epsilon \sim 34,9$) es mucho mayor que la del ácido acético glacial ($\epsilon = 6.2$) [41, 13, 25].

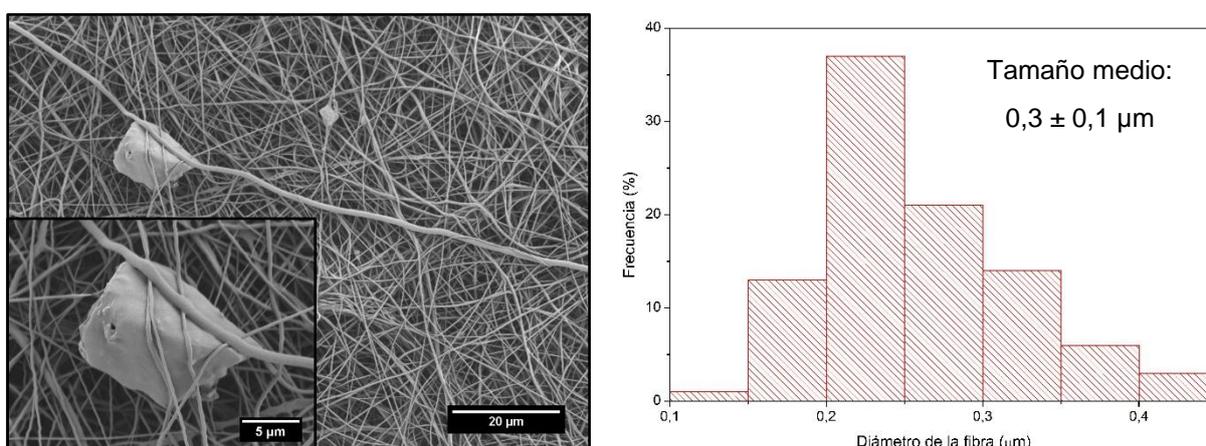


Figura 5-7. Micrografías SEM de una membrana PCL-BG15 (izquierda) magnificación de 2.500 X y 10.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL-BG15 (derecha).

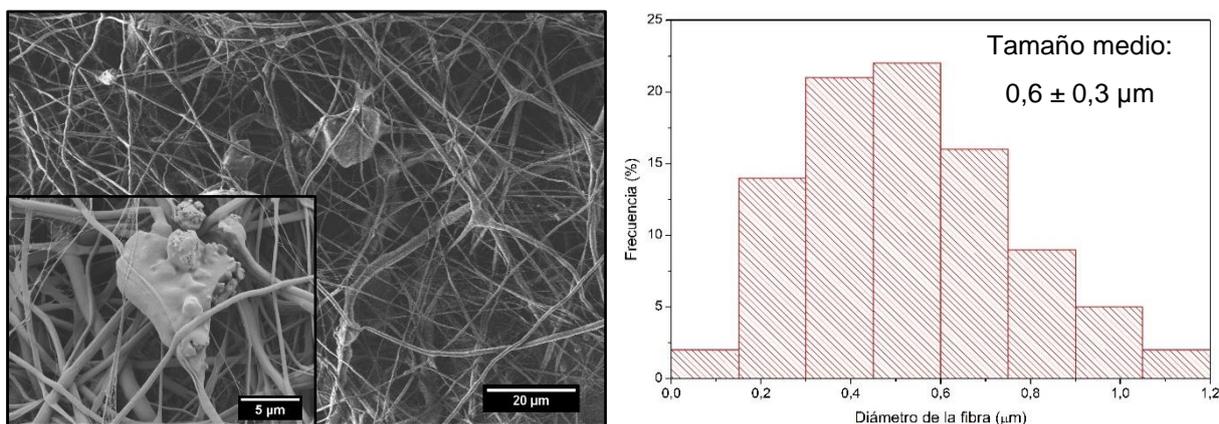


Figura 5-8. Micrografías SEM de una membrana PCL-BG30 (izquierda) magnificación de 2.000 X sin deposición de oro y 10.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL-BG30 (derecha).

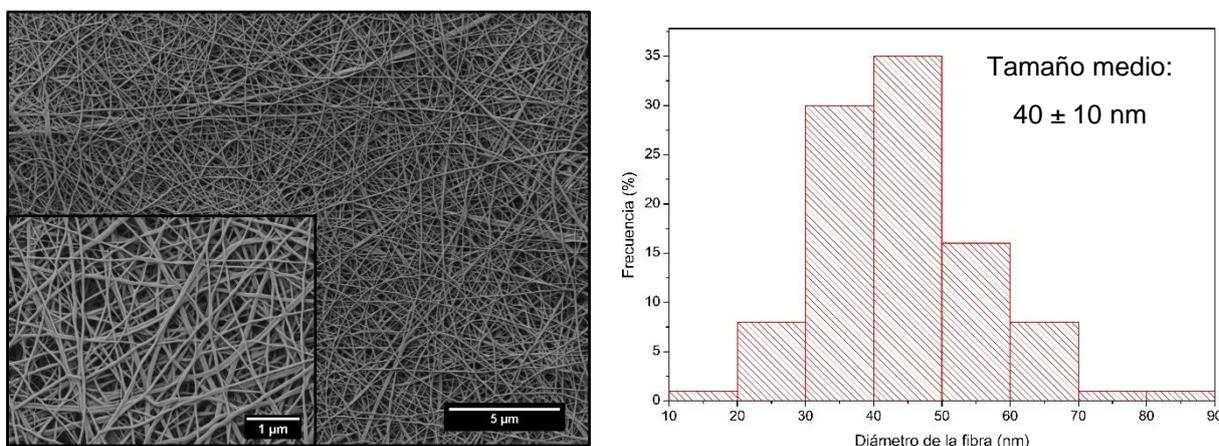


Figura 5-9. Micrografías SEM de una membrana PCL-Q (izquierda) magnificación de 10.000 X y 45.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL-Q (derecha).

Para la muestra PCL-Q se midió un diámetro de fibra del orden de 40 nm, que se encuentra en el rango presentado en literatura [37, 28]. Esta disminución de un orden del diámetro de la fibra comparando con la muestra PCL AA/FA en el rango nanométrico se debe al aumento de conductividad de la solución producto de la adición de quitosano (poli-catión) y de la mayor diferencia de potencial aplicada [28]. La conductividad de la solución se ve incrementada por la ionización de los grupos aminos del polisacárido en las condiciones ácidas de los solventes utilizados [42].

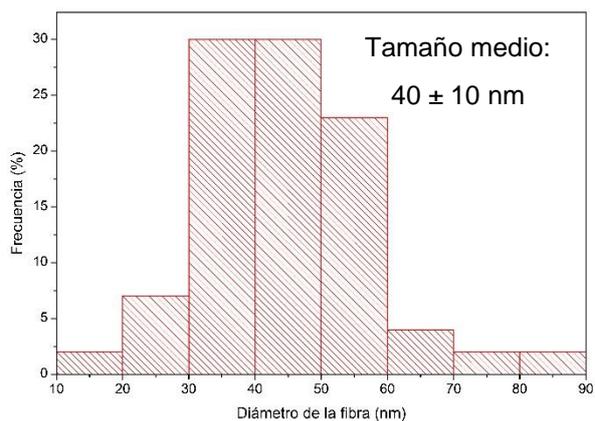
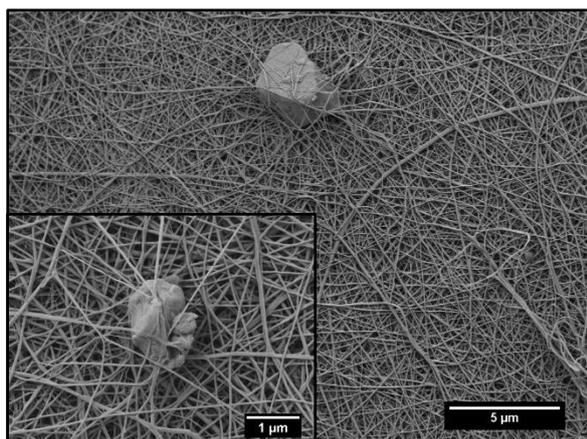


Figura 5-10. Micrografías SEM de una membrana PCL-Q-BG15 (izquierda) magnificación de 10.000 X y 45.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL-Q-BG15 (derecha).

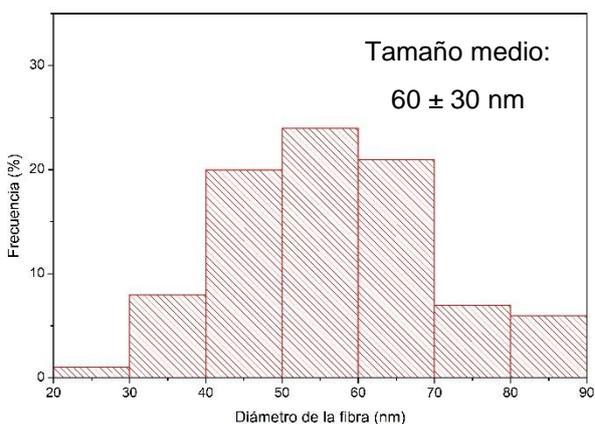
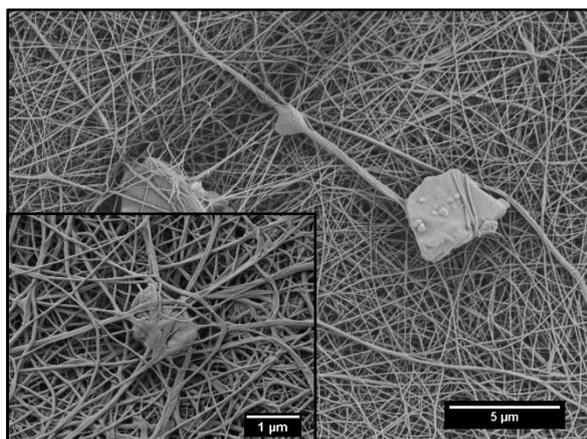


Figura 5-11. Micrografías SEM de una membrana PCL-Q-BG30 (izquierda) magnificación de 10.000 X y 45.000 X en el interior. Distribución de diámetro de fibras de las fibras de la muestra de PCL-Q-BG30 (derecha).

Tabla 5-1. Diámetro medio de las fibras de las muestras analizadas.

Muestra	Diámetro de fibra (μm)
PCL AA	1,5 ± 0,4
PCL AA/FA	0,2 ± 0,09
PCL-BG15	0,3 ± 0,1
PCL-BG30	0,6 ± 0,3
PCL-Q	0,04 ± 0,01
PCL-Q-BG15	0,04 ± 0,01
PCL-Q-BG30	0,06 ± 0,03

En la Tabla 5-1 se listan los valores de diámetro medio para las muestras compuestas con partículas de vidrio 13-93 (PCL-BG15, PCL-BG30, PCL-Q-BG15 y PCL-Q-BG30). Se observa un aumento del diámetro de las fibras con el aumento de la cantidad de vidrio en la solución. Este incremento en el diámetro de las fibras se debe al aumento de la viscosidad de la solución de electrohilado por las partículas incorporadas [13, 43, 44]. Los valores medidos se encuentran en el rango de los reportados en literatura [37].

En las micrografías SEM de la muestra de PCL-BG15 y PCL-BG30 presentadas en la Figura 5-12 se puede observar una red fina de fibras ubicada entre las principales. Estas fibras no se tuvieron en cuenta al momento de calcular el diámetro medio de fibra y es un fenómeno observado en literatura para matrices que contienen quitosano [28]. En esos casos se propone que esta red secundaria de fibras es producto de la formación de jets secundarios de fibras por el aumento de la conductividad generada por el quitosano. En este caso se observan en las matrices que no contienen quitosano, por lo que, es probable que la adición de las partículas de vidrio 13-93 genere un aumento de la conductividad local llevando a generación de los jets secundarios [37]. Esto podría explicar la ubicación de las partículas de vidrio en esta red fina (Figura 5-12 A).

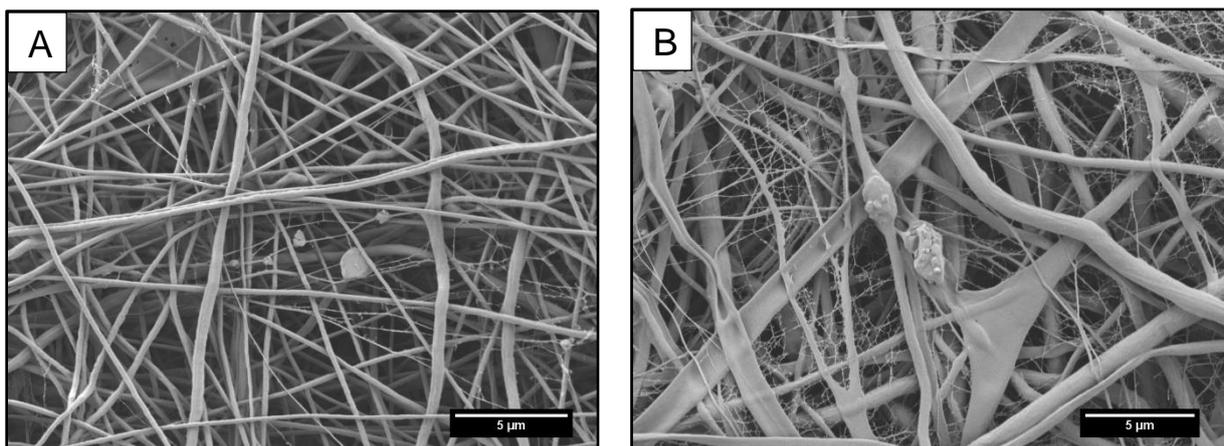


Figura 5-12. Micrografías SEM de: A) muestra de PCL-BG15 con magnificación 10.000 X y B) muestra de PCL-BG30 10.000 X.

Por otro lado, se pudo observar que las partículas de vidrio retuvieron la estructura de agregados mostrada en la Figura 5-3, tanto en las matrices compuestas solo por PCL

como en las que también contienen quitosano. En la Figura 5-13 se presentan micrografías SEM de las muestras a bajo aumento, donde se puede observar la homogeneidad de las fibras. La adición de las partículas de vidrio 13-93 generó en las muestras de PCL-BG15 zonas de mayor densidad de fibras posiblemente al aumento de la conductividad de zonas del colector con mayor cantidad de vidrio. Este fenómeno no ocurrió en la muestra PCL-Q-BG15 debido a la mayor conductividad del quitosano.

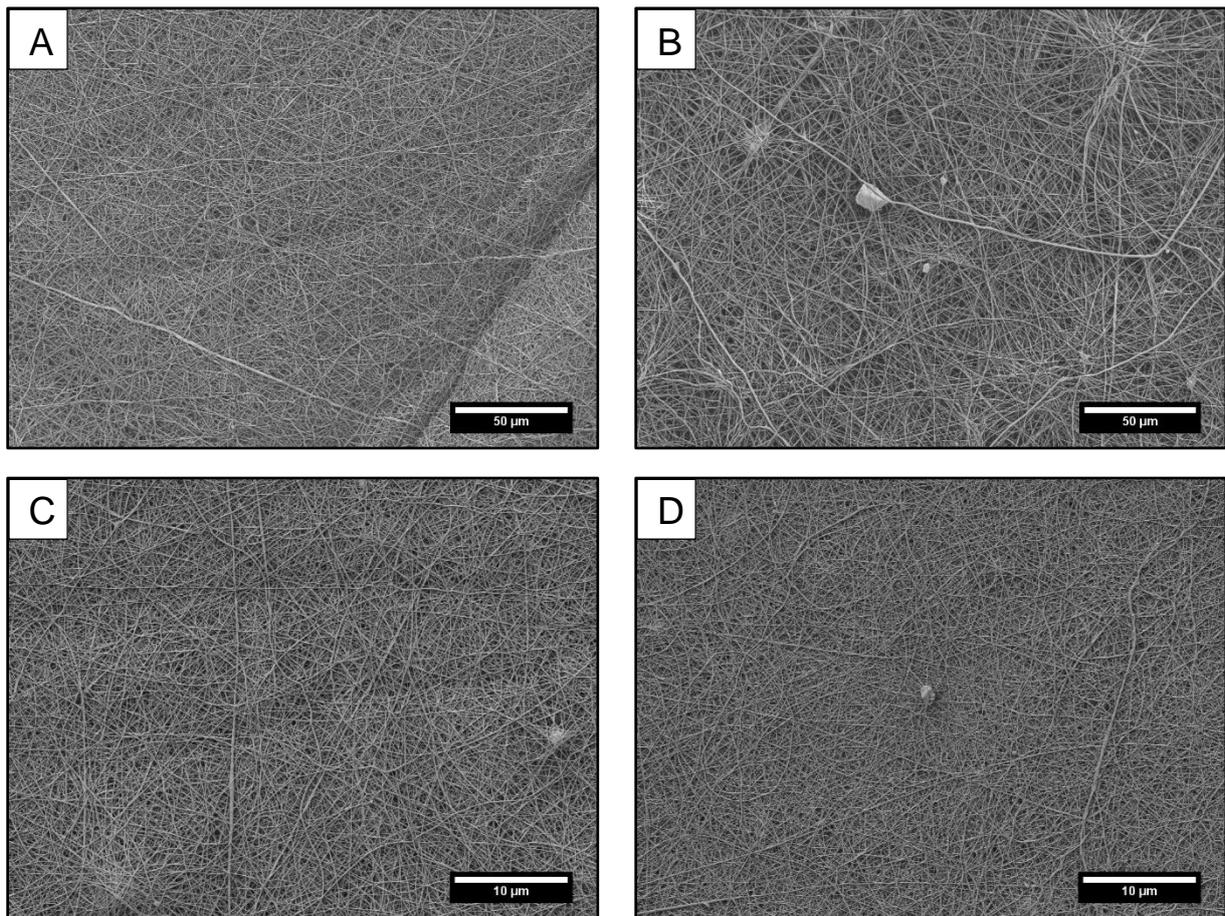


Figura 5-13. Micrografías SEM: A) PCL AA/FA 1.000 X, B) PCL-BG15 1.000 X, C) PCL-Q 5.000 X y D) PCL-Q-BG15 5.000 X.

5.3. Caracterización superficial

5.3.1. Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 5-14 se muestran los espectros infrarrojos de las muestras analizadas. Adicionalmente se presenta el espectro infrarrojo del polvo de biovidrio 13-93 utilizado.

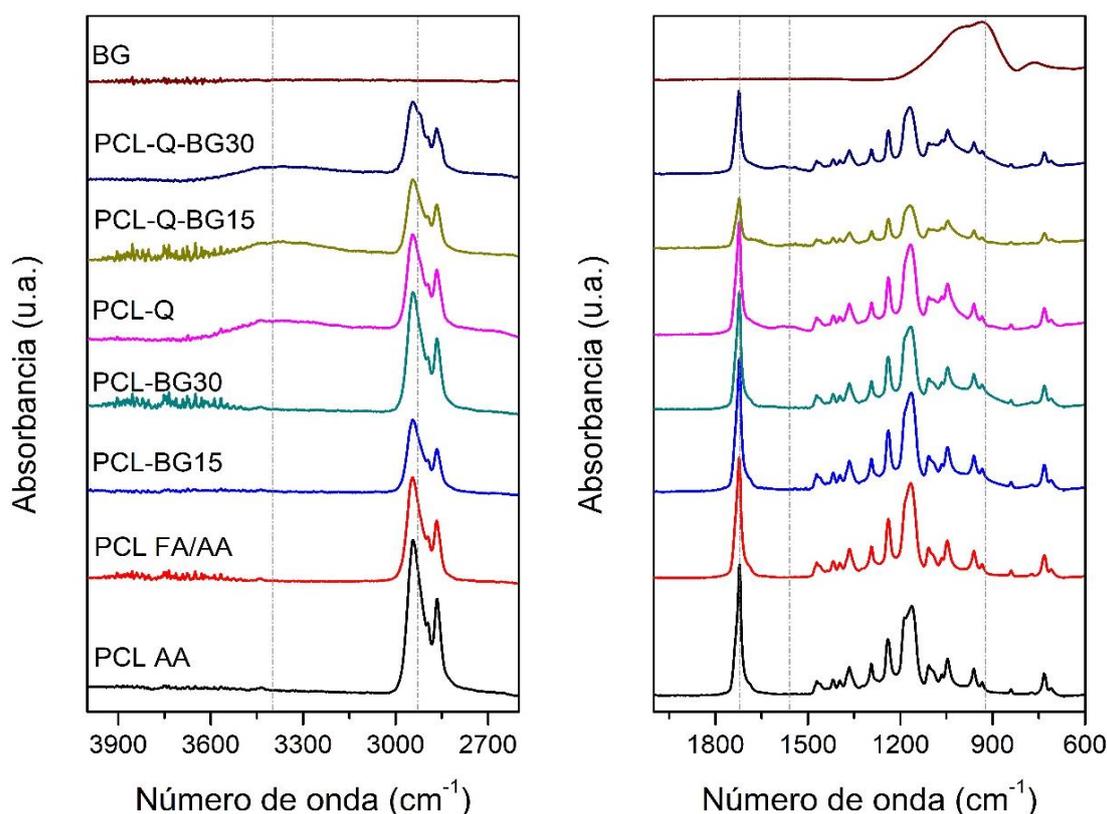


Figura 5-14. Espectro ATR-FTIR de las matrices estudiadas desde 4000 a 2600 cm^{-1} y desde 2000 hasta 600 cm^{-1} .

Todos los espectros correspondientes a las matrices evidenciaron los principales picos atribuidos a PCL: el pico centrado en 2949 cm^{-1} perteneciente al estiramiento asimétrico de los grupos CH_2 y el pico centrado en 1720 cm^{-1} atribuible al estiramiento del grupo carbonilo del éster ($\text{C}=\text{O}$) [37].

Se confirmó la presencia de quitosano en las muestras de PCL-Q, PCL-Q-BG15 y PCL-Q-BG30 por la aparición de nuevos grupos no pertenecientes al espectro que en general es similar al espectro del PCL. Se observan picos pertenecientes al espectro del quitosano en 3435 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos hidroxilo (OH) y amino (NH), y el pico centrado en 1590 cm^{-1} atribuible a la banda de amida II [28].

En el caso de la muestra de PCL-Q-BG15 se observa un nuevo pico en 1710 cm^{-1} que en los casos de las muestras PCL-Q y PCL-Q-BG30 se manifiesta como una elongación del pico correspondiente al carbonilo del espectro de la PCL. Este pico no corresponde a los espectros del quitosano y de PCL, sino que se manifiesta cuando

ambos están presentes [28]. Este pico se atribuye a la creación de puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo del PCL y los grupos oxhidrilo del quitosano [23].

La presencia de partículas de biovidrio 13-93 en las matrices no se pudo confirmar por este método. En el espectro del polvo se observa una banda entre 1000 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} que corresponde al estiramiento simétrico de los enlaces Si-O-Si que se encuentra solapada con un pico ubicado en 960 cm^{-1} atribuible al estiramiento simétrico Si-OH. Adicionalmente, se observa un pico en 800 cm^{-1} correspondiente al estiramiento asimétrico de los enlaces Si-O-Si [45]. Estos picos del espectro del biovidrio 13-93 no se manifestaron en los espectros de las muestras compuestas, solo se observa solapamiento suave en 960 cm^{-1} para las muestras con 30 % P_{pol} .

5.3.2. Ángulo de contacto

En la Figura 5-15 se muestran los valores medidos de ángulo de contacto para las muestras estudiadas. Las muestras que no contienen quitosano exhibieron un carácter marcadamente hidrofóbico. Este comportamiento está reportado en literatura para este material y matrices similares, aunque usualmente presenta valores alrededor de 120° y es independiente del diámetro de las fibras [21, 25, 46]. Asimismo, la cantidad de biovidrio 13-93 incorporado afectó las características superficiales. Se observó un leve aumento del ángulo de contacto a medida que aumenta la cantidad de biovidrio 13-93, contrariamente a lo publicado por Kim y colaboradores [47]. Si las partículas de vidrio estuvieran cubiertas por una capa de polímero durante el electrohilado el contacto del vidrio con el agua estaría impedido y de esta forma se podría explicar el aumento del ángulo de contacto y, adicionalmente, y la no detección de los grupos funcionales del biovidrio en los espectros de la Figura 5-14.

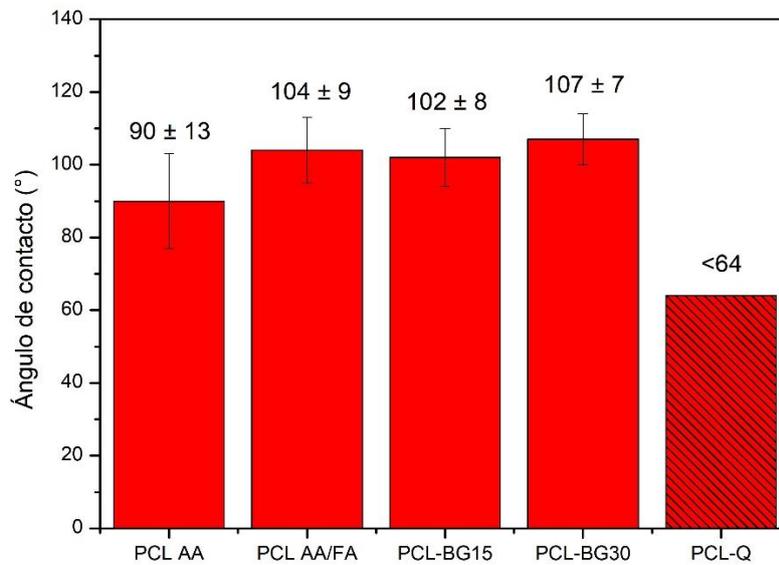


Figura 5-15. Ángulo de contacto de las matrices electrohiladas.

El ángulo de contacto de las muestras con quitosano no se pudo medir debido a que la gota depositada fue absorbida gradualmente por la membrana electrohilada hasta volverse indetectable sin alcanzar un valor de equilibrio. Este comportamiento se debe a la alta hidrofiliidad del quitosano conferida por los grupos hidroxilo y amino de su estructura [46]. La variación temporal de una de estas mediciones para una muestra de PCL-Q se presenta en la **Error! Reference source not found.** De esta forma, se presenta 64° como el último valor obtenido, aunque el valor del ángulo de contacto de equilibrio la muestra debe ser menor, este se acerca a valores de literatura donde un sistema similar presentó ángulo de contacto de 60° [48].

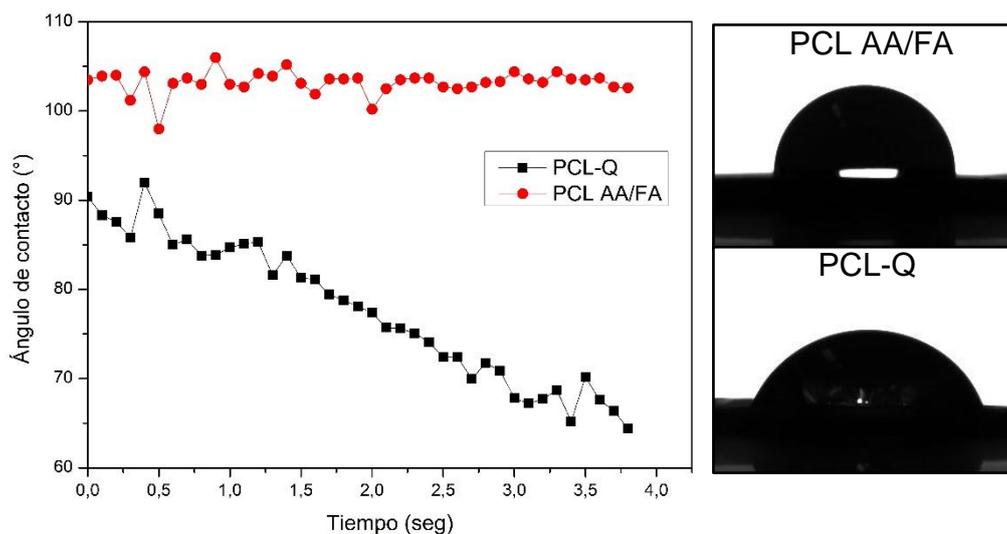


Figura 5-16. Evolución temporal de la medición del ángulo de contacto de una muestra PCL AA/FA y PCL-Q (izquierda). Imágenes de la gota de agua destilada al comienzo de la medición (derecha).

5.4. Caracterización térmica

5.4.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

En la Figura 5-17 se presentan las curvas termogravimétricas obtenidas para las muestras analizadas: PCL AA/FA, PCL-BG15, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30 y en la Tabla 5-2 detallan los valores de peso residual y temperatura al 50% de descomposición según lo sugerido por la literatura. Se observa el comportamiento de un solo escalón de degradación en la curva la muestra PCL AA/FA cercano a los 369°C [49].

Para evaluar la incorporación de las partículas de biovidrio en las membranas de PCL puro se observó el peso residual de las muestras de PCL AA/FA, PCL-BG15 y PCL-BG30. Al descomponerse la PCL completamente a los 600°C se concluye que el peso residual corresponde a la cantidad de biovidrio incorporado en las membranas. Se observa que para PCLBG15 y PCLBG30 la cantidad de vidrio 13-93 se mantiene en orden de lo colocado en la solución. Sin embargo, la incorporación de 30% en peso de biovidrio en la solución de PCL-BG30 aumentó un 4% en peso (no 15%) que muestra un límite en la cantidad de vidrio incorporable. Por otro lado, la adición de estas partículas inorgánicas no aumentó la estabilidad térmica de las matrices, ya que la temperatura a 50% de peso no tiene cambios significativos.

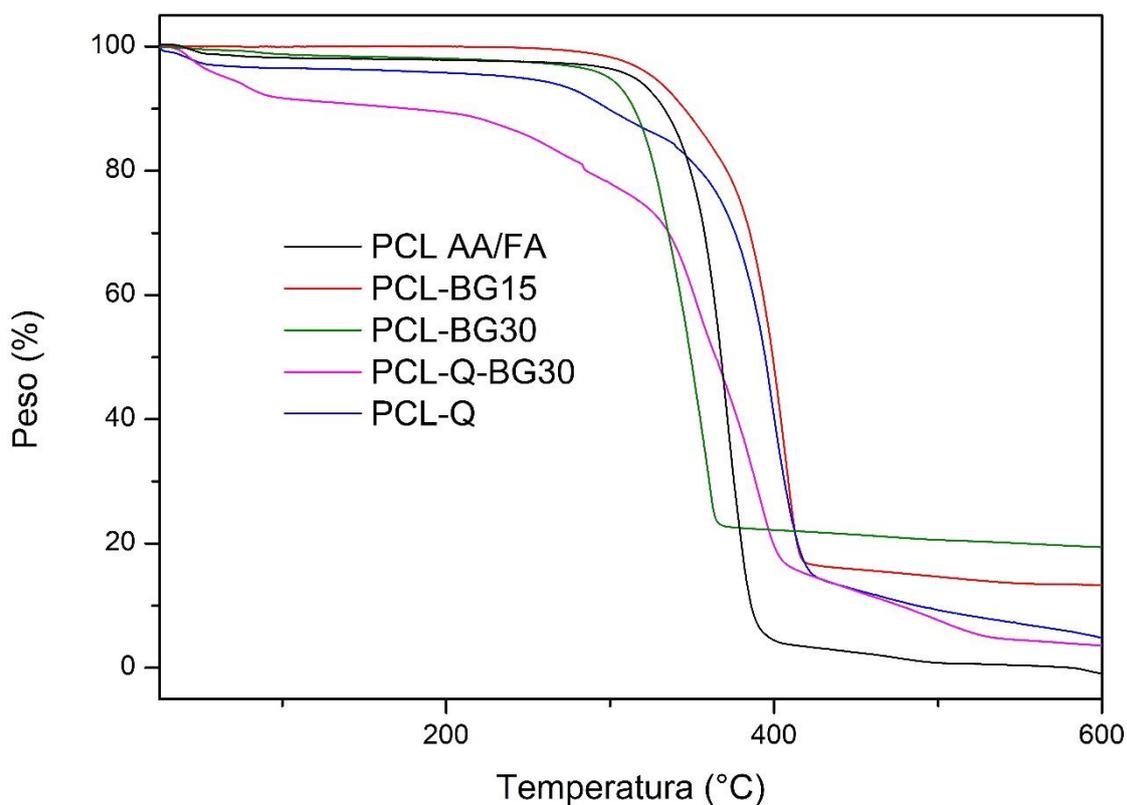


Figura 5-17. Curvas termogravimétricas de las muestras: PCL AA/FA, PCL-BG15, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30.

Las curvas obtenidas para las muestras PCL-Q y PCL-Q-BG30 presentaron el comportamiento de tres escalones observado en literatura [50]. En primer lugar, se observa la pérdida de humedad por evaporación hasta los 100°C. Luego, en temperaturas cercanas a los 250°C se inicia la descomposición quitosano por la deshidratación de los anillos sacáridos. Por último, se observa la descomposición de la PCL a temperaturas cercanas a los 350°C. Las curvas de descomposición de estas muestras resultan de la suma de las curvas de degradación del PCL y del quitosano [50].

Tabla 5-2. Peso residual del ensayo y temperatura al 50% de degradación de las muestras.

Muestra	Peso residual (%)	Temperatura 50% de peso
PCL AA/FA	0,01	368
PCL-BG15	13	399
PCL-BG30	19	349
PCL-Q	4,8	394
PCL-Q-BG30	3,6	364

Finalmente, la muestra compuesta PCL-Q-BG30 sufrió una mayor pérdida de humedad inicialmente cercana al 8% del peso de la muestra y 4% más que la muestra de PCL-Q. Por lo que, el peso real de polímero y vidrio en la muestra se encuentra subestimado en una cantidad similar a la diferencia de humedad absorbida y se debe tener en cuenta al momento de comparar la cantidad de vidrio 13-93 en esta muestra. La completa descomposición del quitosano se da a temperaturas del orden de los 700°C [49] debido a esta razón es que se observa peso residual en la muestra de PCL-Q luego del ensayo, que alcanzó hasta los 600°C realizado de acuerdo a la literatura [37]. Teniendo en cuenta la diferencia de humedad se puede determinar que la cantidad de biovidrio 13-93 en la muestra de PCL-Q-BG30 es del 3,6% que corresponde el 10% de la cantidad adicionada a la solución como se presenta en la Figura 5-18. Esta diferencia con el valor incorporado en la solución puede deberse a la decantación de vidrio bioactivo en la jeringa durante el electrohilado. Este fenómeno es más relevante en el caso de las muestras con quitosano ya que al usar menor flujo de solución el electrohilado se debió realizar durante más tiempo.

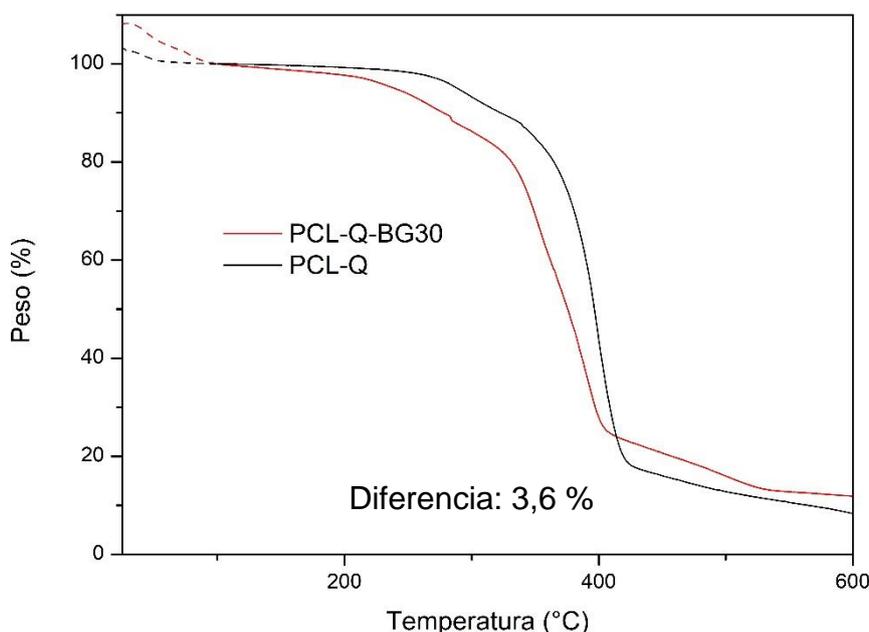


Figura 5-18. Curvas termogravimétricas de las muestras PCL-Q y PCL-Q-BG30 considerando la masa a los 100% como masa total de los polímeros.

5.5. Caracterización mecánica

En la Figura 5-19 se presentan las curvas tensión-deformación consideradas más representativas de las muestras: PCL AA/FA, PCL-BG30 y PCL-Q. En la Tabla 5-3 se muestran los valores medios calculados a partir de las mediciones realizadas del módulo de Young (E), resistencia a la tracción (TS) y deformación máxima. En las muestras PCL AA/FA y PCL-BG30 se observa un comportamiento similar a la literatura y un módulo de Young y resistencia mayores, posiblemente debido a un menor diámetro de fibra [15]. Este menor diámetro de las fibras puede dar lugar a una alineación de las partículas inorgánicas y de las macromoléculas que puede explicar los valores mayores obtenidos [48, 51].

La incorporación de vidrio 13-93 en la muestra de PCL, como se muestra en la Tabla 5-3, generó un detrimento en las propiedades mecánicas. La disminución del módulo de Young se puede atribuir a la falta de adhesión en la interface entre el polímero y el vidrio que no permite una mayor transferencia de carga, por otro lado, la disminución de la tenacidad por la menor deformabilidad y resistencia puede deberse a los defectos y rugosidades generados producto de estas partículas sólidas [37].

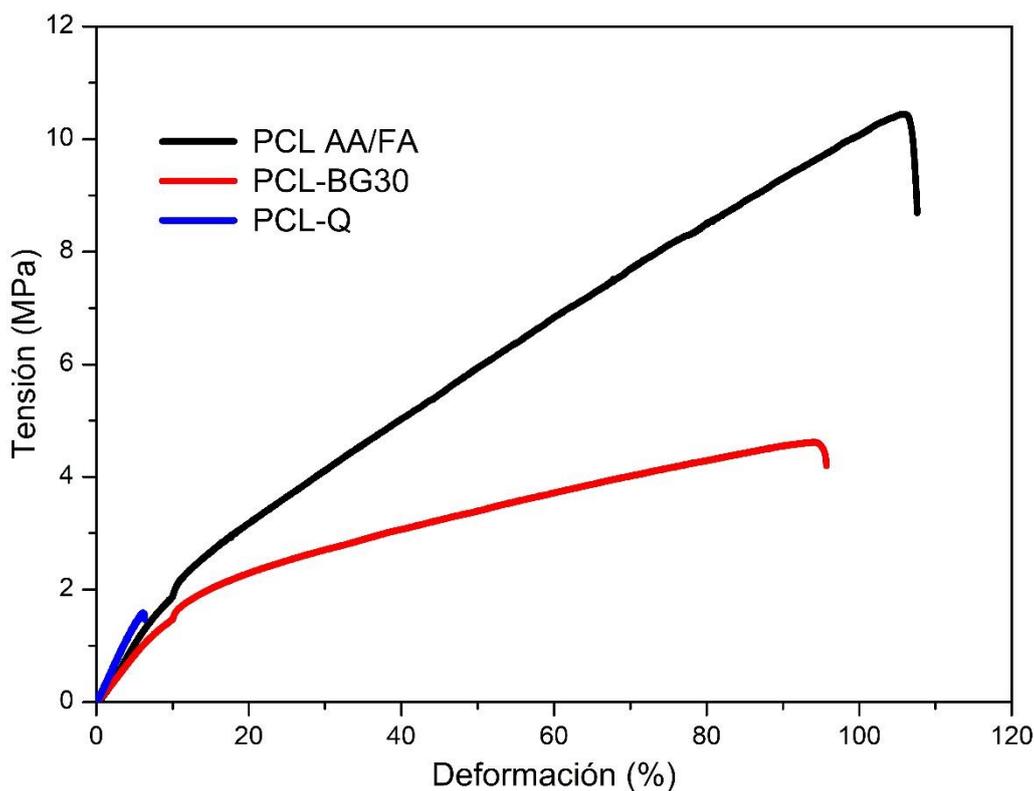


Figura 5-19. Curvas tensión-deformación de las muestras: PCL AA/FA, PCL-BG30 y PCL-Q.

La muestra que contiene quitosano PCL-Q evidencia una significativa fragilización comparando con la muestra de PCL AA/FA con una marcada disminución de la máxima deformación obtenida de un orden de magnitud menor y un aumento de la rigidez de la membrana, manifestada en el aumento del módulo de Young. Un comportamiento similar se encuentra reportado por Prasad y colaboradores y se debe a la mayor rigidez de las cadenas de quitosano por los anillos sacáridos [52].

Tabla 5-3. Módulo de Young (E), resistencia a la tracción (TS) y máxima deformación de PCL AA/FA, PCL-BG30 y PCL-Q.

Muestra	E (MPa)	TS (MPa)	Def. Max (%)
PCL AA/FA	27 ± 3	13 ± 6	110 ± 10
PCL-BG30	17 ± 3	4,5 ± 0,9	90 ± 20
PCL-Q	31 ± 3	1,6 ± 0,1	7,1 ± 0,6

5.6. Bioactividad acelular

En las Figura 5-20 y Figura 5-21 se muestran las micrografías SEM de las muestras PCL AA/FA, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30 antes de la inmersión en fluido corporal simulado (SBF) y luego de 1, 3, 7, 14 y 21 días en el medio. Además, en la Figura 5-23 se presentan los espectros FTIR de las muestras luego de cada intervalo temporal.

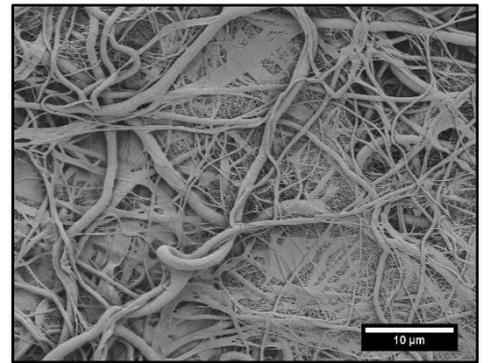
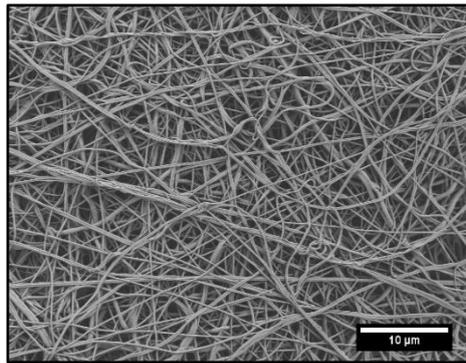
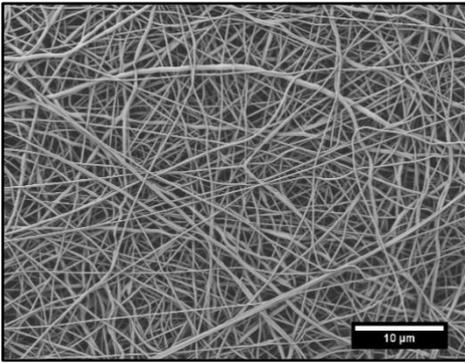
En la Figura 5-20 se observa un depósito sobre las muestras de PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30 luego de 1 día de inmersión en SBF el cual se puede deber a un mal enjuagado y secado de las muestras. Esta situación también se repitió en las micrografías de las muestras de PCL-Q a 14 y 21 días de inmersión.

Asimismo, luego de 24 horas de inmersión en SBF no se generó ningún depósito atribuible a la mineralización de la membrana por la presencia de las partículas de vidrio 13-93. En literatura se informa que en iguales condiciones precipita una fase mineral cuando se utiliza biovidrio 45S5 [37, 15]. Esto permite inferir que la menor bioactividad del vidrio 13-93 producto del mayor contenido de SiO₂ se sigue manifestando aun cuando no es el material mayoritario.

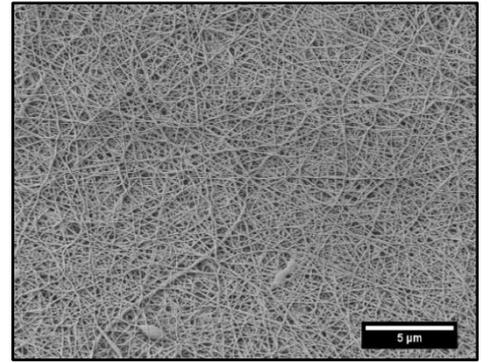
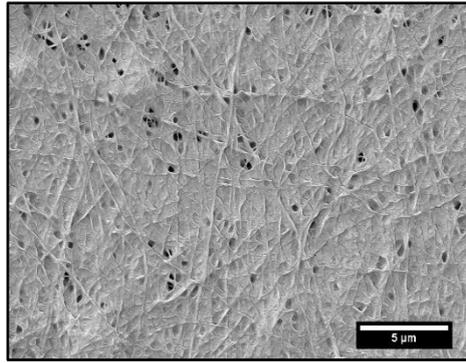
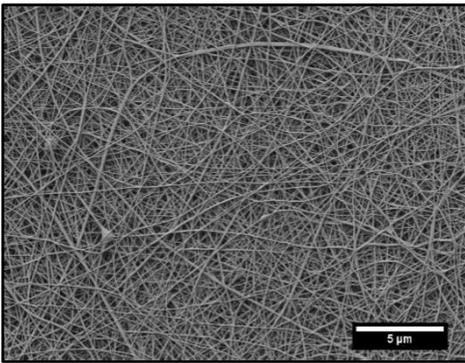
Luego de los 21 días de inmersión en SBF no se observó ningún depósito compatible con hidroxiapatita carbonatada (HCA) en las muestras PCL AA/FA y PCL-Q. Por el contrario, en las muestras que contienen vidrio 13-93 se pueden observar estructuras compatibles con HCA con morfología de tipo coliflor desde los 3 días de inmersión en el medio [37]. Estas estructuras aumentaron en cantidad y tamaño con el aumento del tiempo de inmersión en la solución. Por lo tanto, la mineralización de las muestras resultó progresiva y la bioactividad de las partículas de vidrio no se vio afectada por el procesamiento.

La estructura fibrilar de las matrices poliméricas se mantuvo estable en todas las muestras que contienen vidrio. Mientras que se observó un hinchamiento en las fibras de PCL-Q que aumentó con el tiempo de inmersión perceptible hasta los 7 días (el depósito no permite valorar este fenómeno en los siguientes tiempos de inmersión).

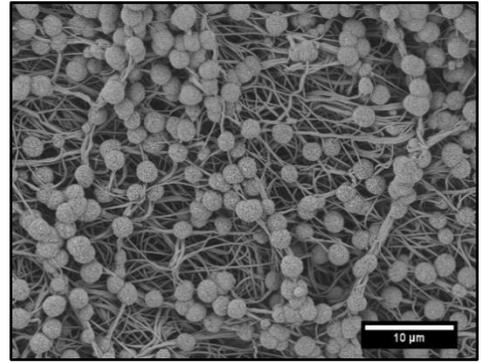
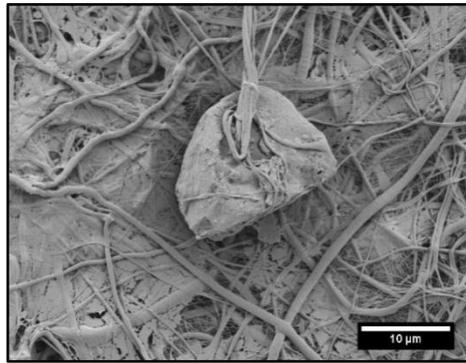
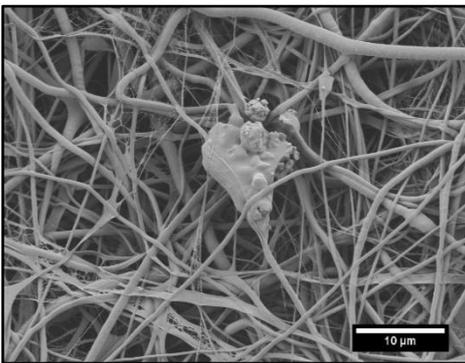
PCL AA/FA



PCL-Q



PCL-BG30



PCL-Q-BG30

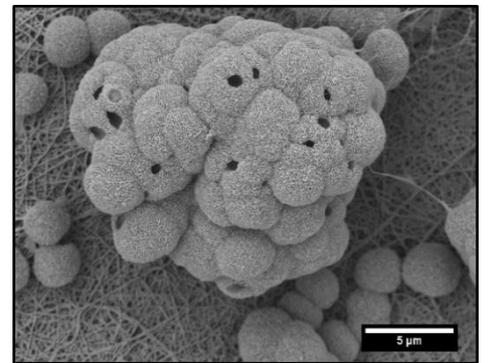
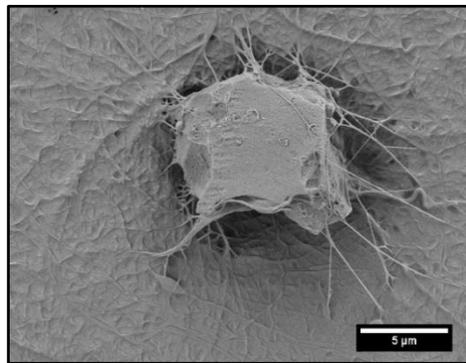
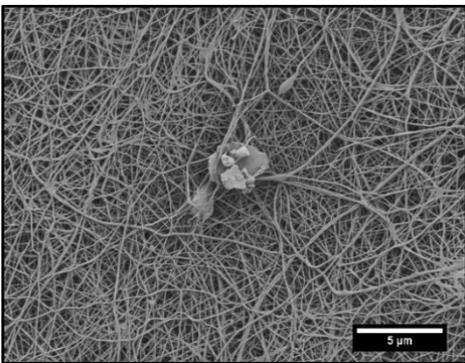
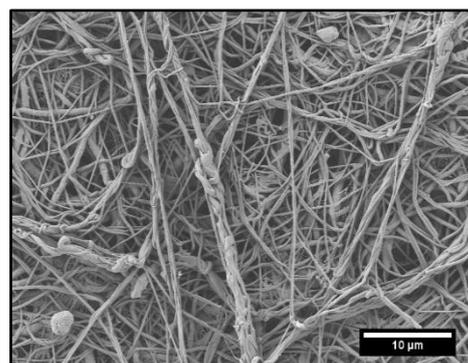
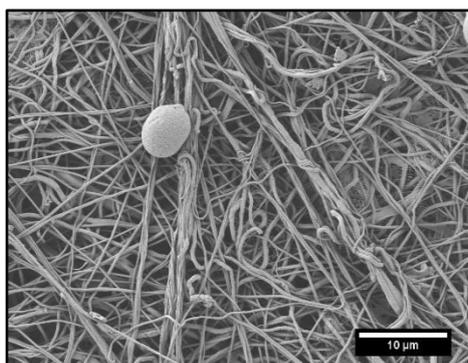
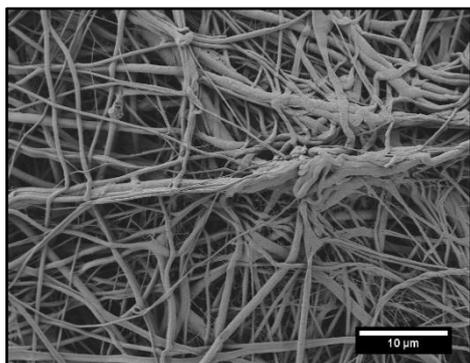
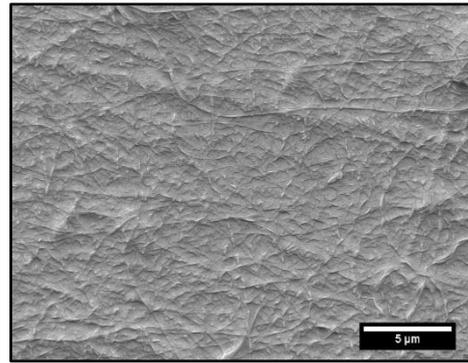
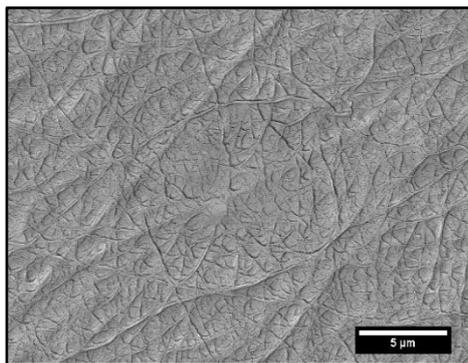
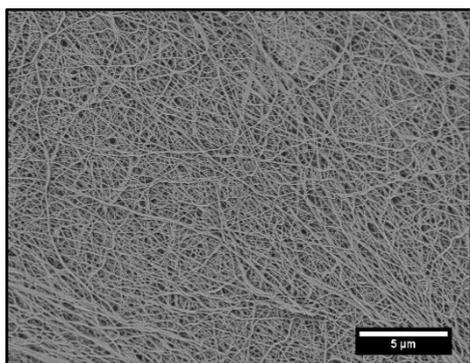


Figura 5-20. Micrografías SEM de las matrices electrohiladas: PCLAA/FA, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30: antes de la inmersión en SBF (izquierda), 1 día (centro) y 3 días de inmersión (derecha). Las micrografías de las muestras PCL AA/FA y PCL-BG30 con una magnificación de 5.000 X y las de PCL-Q y PCL-Q-BG30 de 10.000 X.

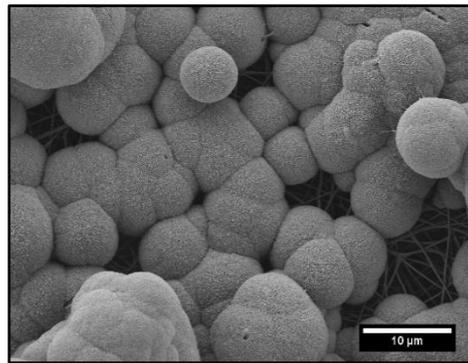
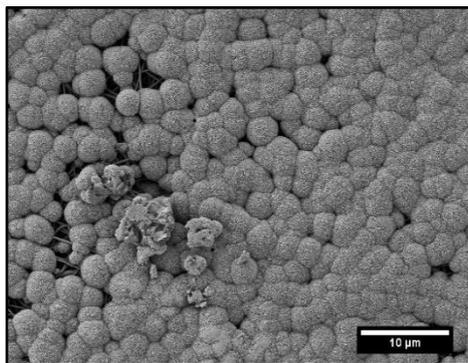
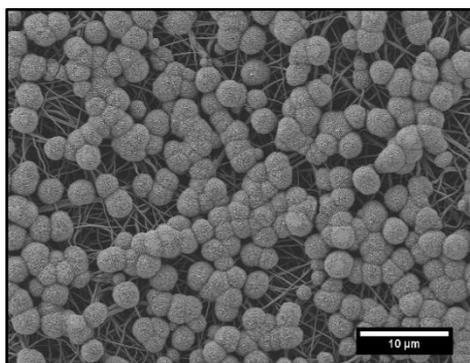
PCL AA/FA



PCL-Q



PCL-BG30



PCL-Q-BG30

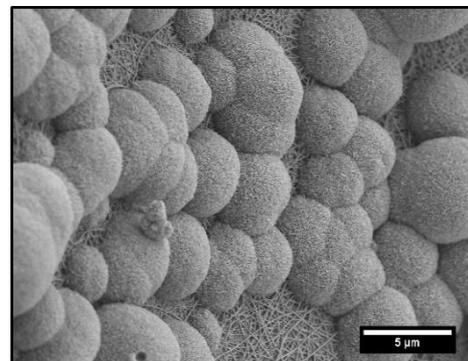
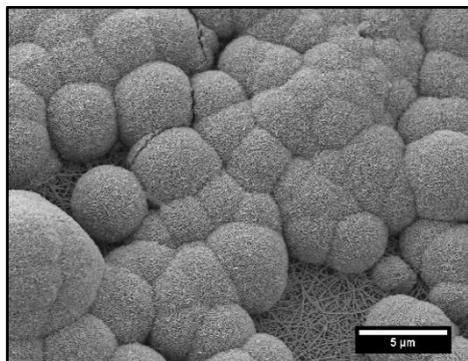
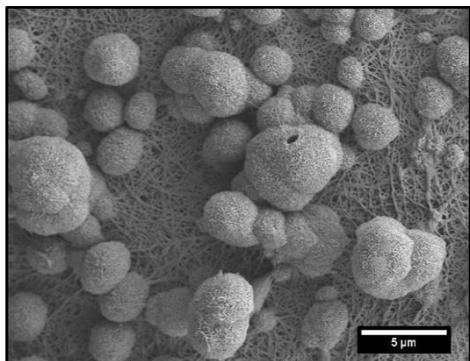


Figura 5-21. Micrografías SEM de las matrices electrohiladas: PCLAA/FA, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30: 7 (izquierda), 14 (centro) y 21 días de inmersión (derecha). Las micrografías de las muestras PCL AA/FA y PCL-BG30 con una magnificación de 5.000 X y las de PCL-Q y PCL-Q-BG30 de 10.000 X.

En la Figura 5-23 se presenta el espectro FITR de las muestras en los intervalos temporales con el objetivo de caracterizar el depósito encontrado. Los espectros de las muestras que poseen vidrio 13-93 muestran la aparición de picos a 960, 870, 590 y 560 cm^{-1} . En el caso de PCL-Q-BG30 coincide con la precipitación de las estructuras tipo coliflor con la aparición de los picos en el tercer día de inmersión en la solución. De otra manera, en los espectros de las muestras de PCL-BG30 la aparición de picos se da a los 7 días mientras que los precipitados son apreciables al tercer día en las micrografías SEM. Este comportamiento puede deberse a que los precipitados en la muestra de PCL-BG30 a tres días de inmersión son de menor tamaño que los precipitados en la muestra de PCL-Q-BG30 como se observa en la micrografía SEM a bajos aumentos (Figura 5-22).

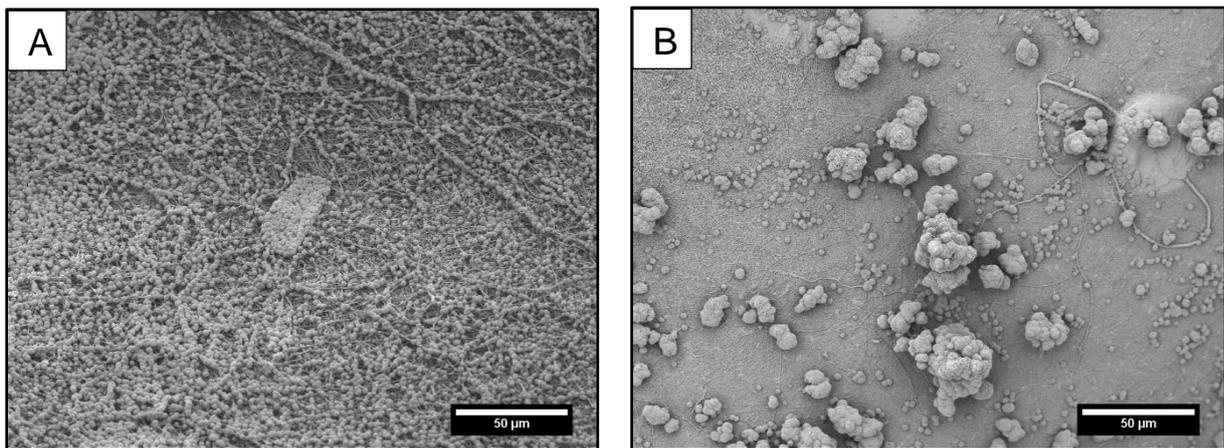


Figura 5-22. Micrografías SEM luego de 3 días de inmersión en SBF: A) PCL-BG30 magnificación de 1.000 X, B) PCL-Q-BG30 magnificación de 1.000 X.

El pico centrado en 960 cm^{-1} es atribuible a estiramiento simétrico de enlaces Si-OH producto de la disolución de la estructura vítrea de SiO_2 . Los picos en 590 y 560 cm^{-1} corresponden a la flexión asimétrica de enlaces P-O luego de la inmersión de SBF. Asimismo, el pico ubicado en 870 cm^{-1} , que puede observarse luego de los 7 días de inmersión, corresponde a la flexión de CO_3^{2-} por lo que se puede inferir que el depósito se trata de HCA [45].

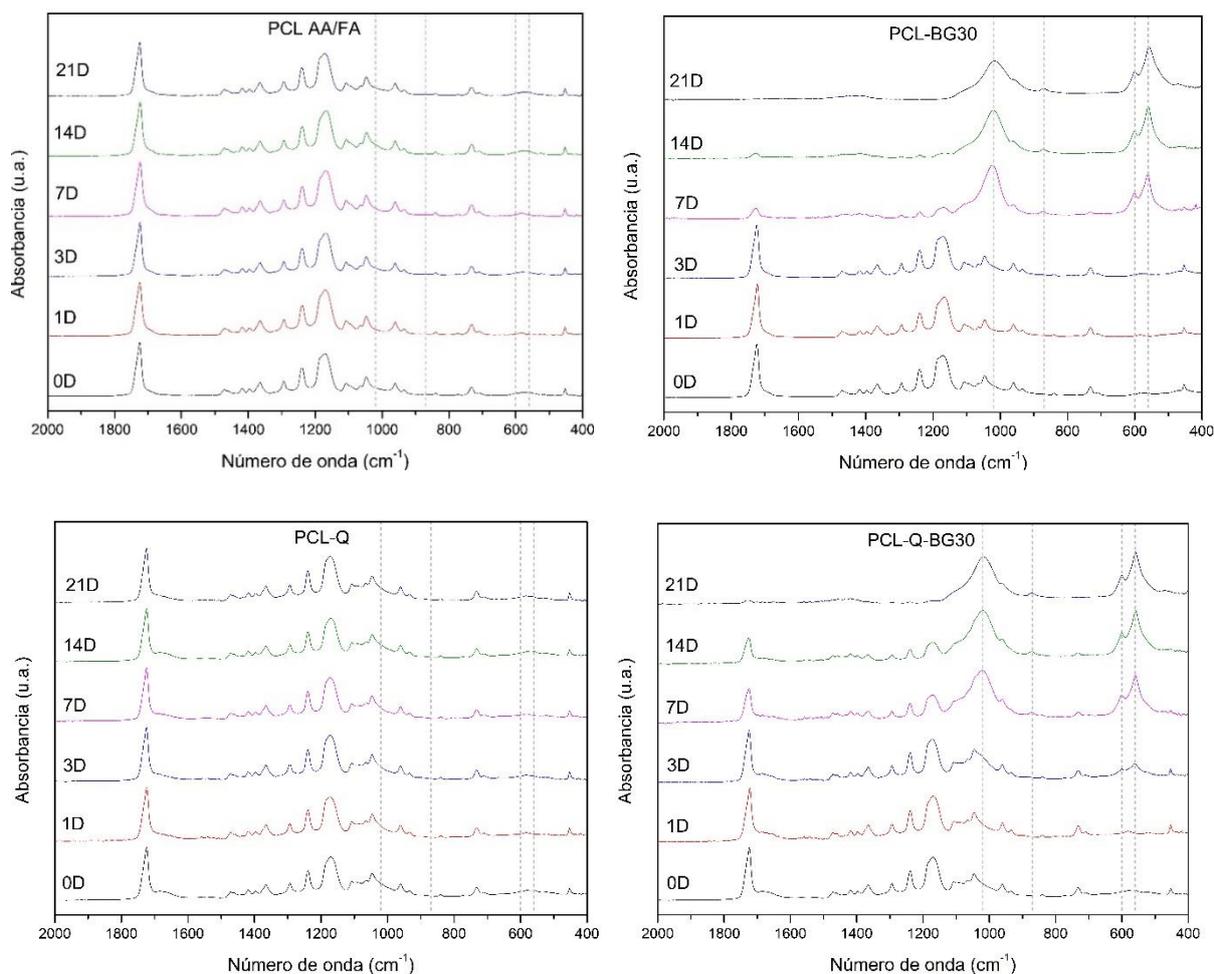


Figura 5-23. Espectro ATR-FTIR de las matrices PCL AA/FA, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30 desde 2000 a 400 cm⁻¹ antes de la inmersión en SBF y luego de 1, 3, 7, 14, y 21 días.

Las fibras de las matrices PCL AA/FA y PCL-BG30 se deformaron retorciéndose sobre sí mismas y sobre las fibras adyacentes repetitivamente. Se puede notar mayormente este comportamiento en las micrografías SEM de las muestras de PCL AA/FA y, en menor medida, en las fibras de PCL-BG30 (Figura 5-24). Este comportamiento puede deberse a carácter hidrofóbico de estas membranas donde el enrollamiento de las fibras disminuye el área del material expuesta a la solución.

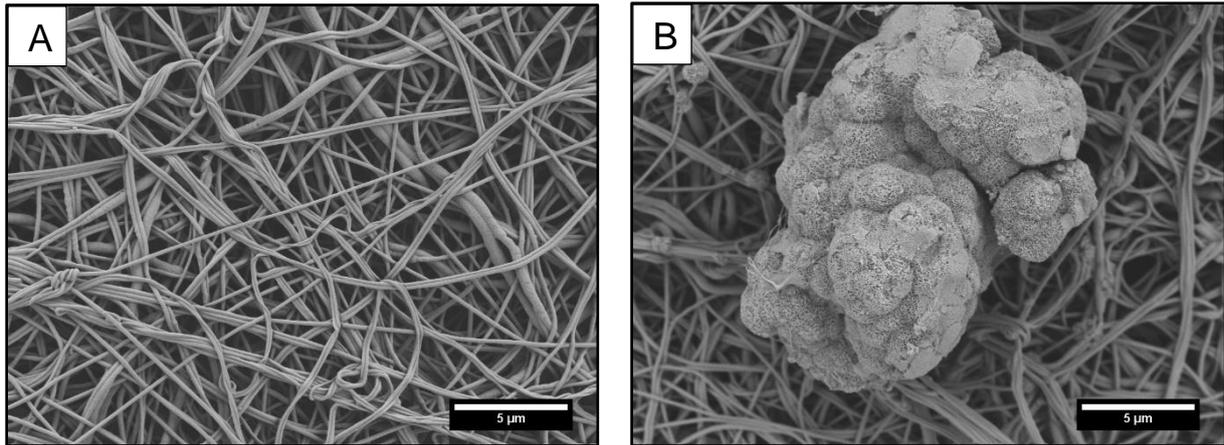


Figura 5-24. Micrografías SEM de: A) muestra de PCL AA/FA luego de 1 día de inmersión en SBF a una de magnificación 10.000 X y B) muestra de PCL-BG30 luego de 3 días de inmersión en SBF a una magnificación de 10.000 X.

La Figura 5-25 y la Figura 5-26 presentan el espectro de dispersión de energía de rayos X (EDS) de muestras de PCL-BG30 y PCL-Q-BG30 luego de 7 y 14 días de inmersión en SBF. Asimismo, se presenta un mapeo de los elementos calcio y fósforo en las muestras que permite confirmar la presencia de estos elementos es mayoritaria en los precipitados producto de la inmersión en SBF. Este tipo de análisis permite calcular la relación en peso entre estos elementos y pudo observarse que en todos los casos se acerca a 1,67 (Ca/P en la hidroxiapatita) [45].

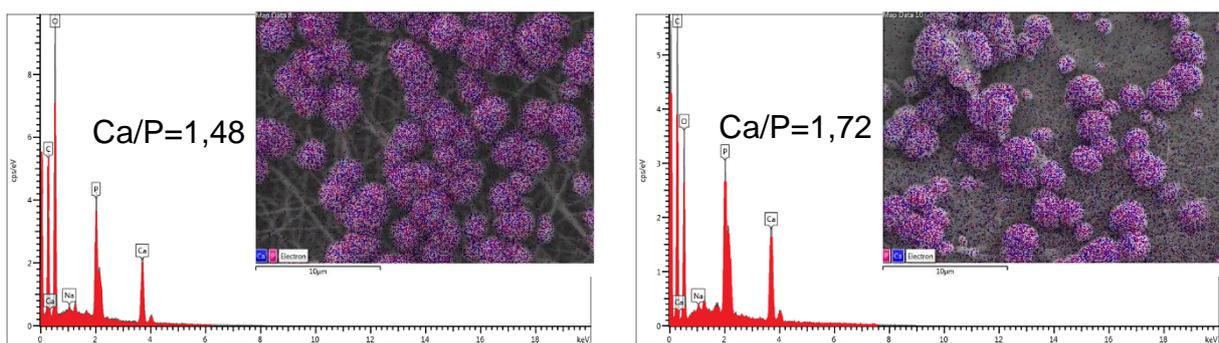


Figura 5-25. Análisis EDS de las muestras PCL-BG30 (izquierda) y PCL-Q-BG30 (derecha) luego de 7 días de inmersión en SBF. Espectro EDS con Ca/P y micrografía con mapeo de Ca (azul) y P (violeta).

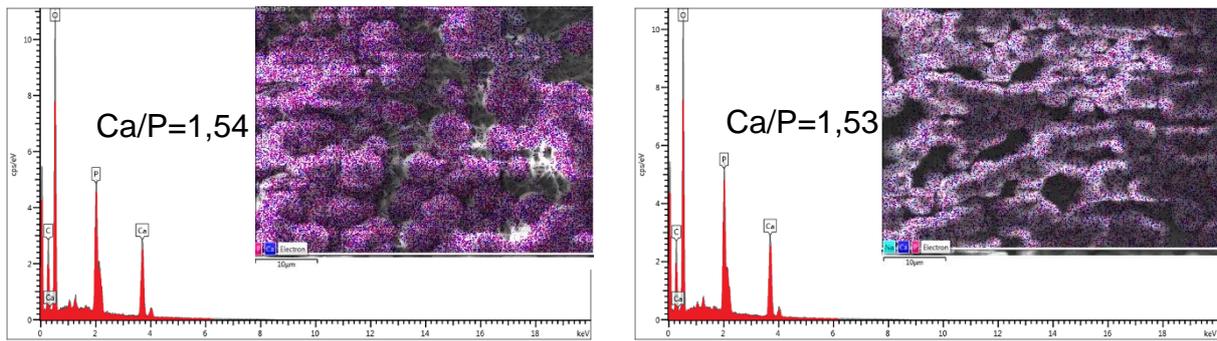


Figura 5-26. Análisis EDS de las muestras PCL-BG30 (izquierda) y PCL-Q-BG30 (derecha) luego de 14 días de inmersión en SBF. Espectro EDS con Ca/P y micrografía con mapeo de Ca (azul) y P (violeta).

A partir de las mediciones de peso de las muestras luego de la inmersión en SBF se midió un leve aumento de peso del orden de 1% del peso inicial. Esto puede deberse a difusión o absorción de agua dentro de las fibras de las membranas. En la Figura 5-27 se presentan micrografías SEM de la muestra de PCL AA/FA luego de 21 en el medio, se observan signos de degradación como rotura parcial de las fibras y agrietamiento. Asimismo, se observa pérdida de adición entre algunas fibras y que la red ultrafina aún se conserva. En las muestras de PCL-Q se observa un hinchamiento progresivo de las fibras mientras que en las muestras compuestas no puede apreciarse degradación debido a los precipitados formados.

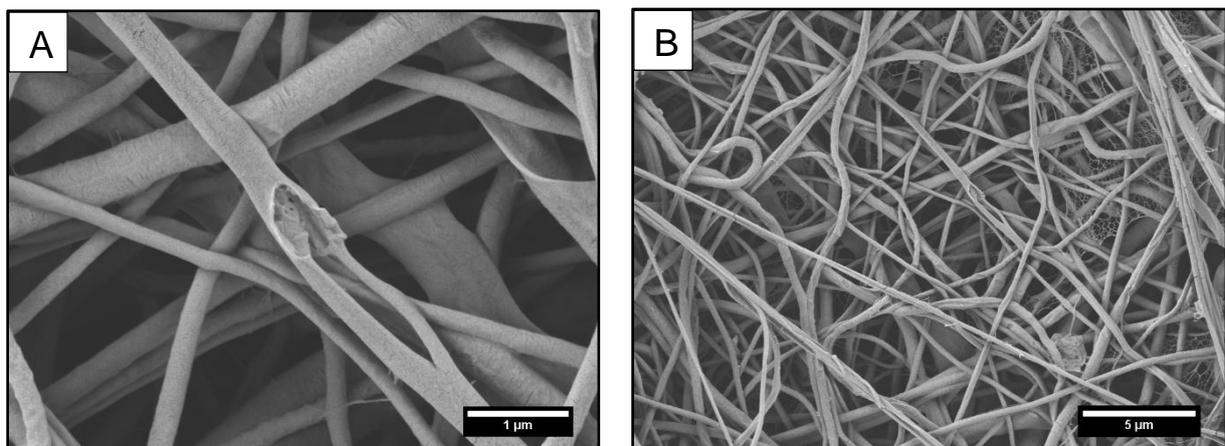


Figura 5-27. Micrografías SEM luego de 21 días de inmersión en SBF de una muestra de PCL AA/FA: A) magnificación de 45.000 X, B) magnificación de 10.000 X.

5.7. Actividad antibacterial

En la Figura 5-28 se presenta la viabilidad relativa de las bacterias *S. aureus* y *E. coli* en muestras de PCL AA/FA, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30 luego de 3, 6 y 24 horas en cultivo.

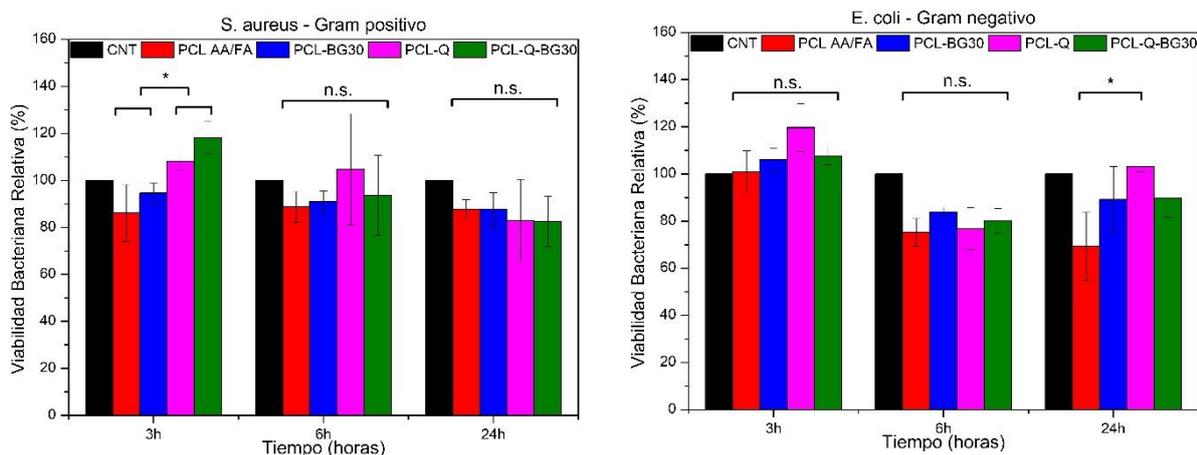


Figura 5-28. Viabilidad bacteriana relativa de *S. aureus* (Gram positivo) y *E. coli* (Gram negativo) en las muestras de: PCL AA/FA, PCL-BG30, PCL-Q y PCL-Q-BG30.

Se observó la mayor actividad antibacterial en las muestras de PCL AA/FA y PCL-BG30 que en las muestras que contienen quitosano en ambos tipos de bacterias, en las Gram positivas a las 3 horas y en las Gram negativa a las 24 horas. La mayor inhibición de desarrollo bacteriano de todas las muestras se presentó en el cultivo de *E. coli* a las 6 horas, sin embargo, no se pudieron observar diferencias entre las muestras analizadas.

Por otro lado, las muestras que contienen quitosano aumentaron la viabilidad bacteriana a las 3 horas de cultivo por encima del control (CNT) lo que significa que promovieron el crecimiento bacteriano a cortos tiempos en bacterias gram positivas. Sin embargo, en las siguientes mediciones temporales se revirtió el comportamiento y disminuyeron la viabilidad bacteriana a valores similares a las muestras de PCL mientras que, las muestras de PCL AA/FA y PCL-BG30 mantuvieron su viabilidad constante en el tiempo.

Los vidrios bioactivos pueden presentar comportamiento antibacterial debido a un aumento del pH causado por una liberación de cationes durante su disolución [29]. La

incorporación de vidrio en las muestras no afectó la viabilidad bacteriana significativamente tanto en las muestras con o sin quitosano. Esto puede deberse a una lenta disolución de las partículas de biovidrio debido a que estaban embebidos en las fibras y que el vidrio 13-93 no se encuentra dopado con ningún catión antibacterial específico para este fin.

El quitosano posee un amplio espectro de actividad antibacterial y alta tasa de eliminación de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas [53]. Sin embargo, las matrices que incorporaron quitosano presentaron menor actividad antibacterial. Este fenómeno puede deberse al aumento de la hidrofiliidad de las muestras y a la aparición de mayores sitios de adhesión celular proporcionados por el quitosano que no son contrarrestados por los modos de acción antibacterial en estas condiciones [53, 54].

La actividad bactericida del quitosano depende de múltiples factores tanto intrínsecos (el grado de desacetilación, el estado físico y la capacidad quelante) como de factores ambientales (el pH, la temperatura y la fuerza iónica del medio). La estructura policationica del quitosano es esencial para su actividad antibacterial y a mayor grado de desacetilación aumenta la densidad de carga positivas incrementando su efecto bactericida. Sin embargo, este efecto se vuelve relevante en medios ácidos porque favorecen la protonación del grupo amino. Esto puede explicar la ausencia de actividad antibacterial observada por parte del quitosano ya que el pH de los caldos para cultivo celular es inicialmente neutro resultando en una baja protonación de las cadenas [53, 55].

Las reacciones responsables de la actividad antibacterial del quitosano se producen durante el contacto de las moléculas del polímero con la membrana celular por lo que el estado físico del quitosano es otro factor determinante. En el caso de las matrices nanofibras, el quitosano en estado sólido solo puede entrar en contacto de manera superficial por lo que es deseable alta área superficial de las membranas electrohiladas que depende de morfología de las fibras [53]. De este modo puede que la interacción no sea suficiente para afectar la viabilidad de las bacterias debido a que el quitosano no es el componente mayoritario de las fibras o que el área expuesta sea insuficiente.

Por otro lado, la capacidad quelante del quitosano le otorga otro modo de acción antimicrobiano al permitirle combinarse con cationes metálicos (como Zn^{2+} , Mg^{2+} y Cu^{2+}) cruciales para la estabilidad de las membranas celulares. Asimismo, se ha reportado que este mecanismo actúa en medio ácidos y neutros [53]. Por lo que este mecanismo puede estar activo en las condiciones del ensayo, pero su efecto puede estar inhibido por los posibles cationes que pueden provenir de la disolución del vidrio bioactivo en el caso de la muestra de PCL-Q-BG30 o del propio medio.

6. Conclusiones

En este trabajo se obtuvieron exitosamente membranas nanofibrosas híbridas de polímeros sintéticos/natural y nanocompuestas con partículas cerámicas bioactivas. Las estructuras nanofibrosas se fabricaron a partir del electrohilado de soluciones utilizando solventes benignos. Sin embargo, la producción de membranas de PCL y quitosano presentó baja productividad en cuanto al material obtenido en relación con el tiempo empleado.

A partir de los estudios de sus propiedades superficiales se pudo comprobar la composición polimérica de las fibras obtenidas incorporando quitosano y PCL así como partículas de vidrio bioactivo 13-93. De este modo se pudieron obtener fibras compuestas y con comportamiento hidrofílico en el rango nanométrico, características que permiten imitar la morfología de la MEC, favoreciendo la buena adhesión celular y absorción de exudados. Por otra parte, la presencia de hasta un 19% en peso de partículas de vidrio no afectaron el comportamiento superficial de las membranas.

A partir de la evaluación de las propiedades mecánicas se observó que las matrices sin quitosano poseen buenas propiedades mecánicas que les permiten resistir a ser manipuladas. La incorporación de partículas de vidrio 13-93 produjo una disminución de la resistencia mecánica de las membranas y la adición de quitosano una marcada pérdida de la flexibilidad y resistencia. Esta fragilización de las membranas es una gran limitación a la manipulación de las membranas con quitosano durante su uso.

Las membranas obtenidas con partículas de vidrio demostraron ser bioactivas en fluido simulado lo que permite inferir una buena compatibilidad de estas membranas compuestas con tejidos, en particular los tejidos óseos. Las membranas compuestas se mineralizaron aun con 4% de vidrio bioactivo. Sin embargo, la actividad antibacterial

no fue alterada por la presencia de quitosano que incluso promovió el crecimiento de bacterias gram positivas y negativas en periodos cortos de tiempo.

En conclusión, las matrices obtenidas de PCL con quitosano y partículas de vidrio 13-93 demostraron ser bioactivas, nanofibrosas, hidrofílicas y de potencial aplicación en ingeniería de tejidos y en curado de heridas.

7. Trabajo futuro

A continuación, se presentan distintas actividades para completar el estudio del sistema:

- Realizar una evaluación térmica por calorímetros diferencial de barrido de todas las membranas obtenidas. La misma no pudo concretarse por la imposibilidad de asistir a los laboratorios debido a la pandemia COVID-19 y por el desmantelamiento del laboratorio de caracterización de polímeros por mudanza a otro edificio.
- Optimizar la cantidad de quitosano adicionado para equilibrar el aumento de la compatibilidad celular con las pérdidas de las propiedades mecánicas y mayor productividad del proceso de electrohilado.
- Investigar la utilización de partículas de vidrio bioactivo con iones metálicos que aporten mayor actividad antibacterial.
- Investigar la utilización de quitosano modificado químicamente para aumentar la actividad antibacterial de las membranas.
Realizar ensayos de citotoxicidad in vitro y de adhesión y proliferación de celular.

8. Referencias

- [1] A. D. Bombin, N. J. Dunne y H. O. McCarthy, «Electrospinning of natural polymers for the production of nanofibers for wound healing applications,» *Materials Science and Engineering C*, vol. 114, pp. 1-16, 2020.
- [2] T. Jiang, E. J. Carbone, K. W. Lo y C. T. Laurencin, «Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration,» *Progress in Polymer Science*, vol. 46, pp. 1-24, 2015.

- [3] A. Haider, S. Haider y I. Kang, «A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology,» *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 11, pp. 1165-1188, 2018.
- [4] P. A. Mouthuy y H. Ye, «5.04 - Biomaterials: Electrospinning,» *Comprehensive Biotechnology*, pp. 23-36, 2015.
- [5] H. Rodríguez-Tobías, G. Morales y D. Grande, «Comprehensive review on electrospinning techniques as versatile approaches toward antimicrobial biopolymeric composite fibers,» *Materials Science and Engineering C*, vol. 101, pp. 306-322, 2019.
- [6] K. Rezwani, Q. Z. Chen, J. J. Blaker y A. R. Boccaccini, «Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering,» *Biomaterials*, vol. 27, pp. 3413-3431, 2006.
- [7] «Wikipedia,» 2 Diciembre 2010. [En línea]. Available: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tissue_engineering_english.jpg. [Último acceso: 16 Julio 2020].
- [8] T. Álavaro Naranjo, R. Noguera-Salvá y F. Fariñas Guerrero, «La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I),» *Revista Española de Patología*, vol. 42, nº 4, pp. 249-261, 2009.
- [9] X. Xie, Y. Chen, X. Wang, X. Xu, Y. Shen, A. Khan, A. Aldalhabi, A. E. Fetz, G. L. Bowlin, M. Newehy y X. Mo, «Electrospinning nanofiber scaffolds for soft and hard tissue regeneration,» *Journal of Materials Science & Technology*, vol. 59, pp. 243-261, 2020.
- [10] S. Ö. Gönen, M. E. Taygun y S. Kücükbayrak, «Fabrication of Bioactive Glass Containing Nanocomposite Fiber Mats For Bone Tissue Engineering Applications,» *Composite Structures*, vol. 138, pp. 96-106, 2016.
- [11] M. J. Laudenslager y W. M. Sigmund, «Electrospinning,» *Encyclopedia of Nanotechnology*, Springer Publishers, pp. 769-774, 2012.
- [12] N. t. i. o. n. o. i. b. devices, «Wallace, G G; Higgings, M J; Moulton, S E; Wang, C,» *The Royal Society of Chemistry - Nanoscale*, vol. 4, pp. 4327-4347, 2012.

- [13] V. Pillay, C. Dott, Y. Choonara, C. Tyagi, L. Tomar, P. Kumar, L. du Toit y V. Ndesendo, «A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications,» *Journal of Nanomaterials*, vol. 2013, n° Article ID 789289, p. 22, 2013.
- [14] P. R. Kumar, K. N, S. Vivekanandhan, N. Satyanarayana, A. K. Mohanty y M. Misra, «Nanofibers: Effective Generation by Electrospinning and Their Applications,» *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 12, pp. 1-25, 2012.
- [15] L. Liverani y A. Boccaccini, «Versatile Production of Poly(Epsilon-Caprolactone) Fibers by Electrospinning Using Benign Solvents,» *Nanomaterials*, vol. 6, n° 4, p. 75, 2016.
- [16] S. Zargham, S. Bazgir, A. Tavakoli, A. S. Rashidi y R. Damerchely, «The Effect of Flow Rate on Morphology and Deposition Area of Electrospun Nylon 6 Nanofiber,» *Journal of engineered fibers and fabrics*, vol. 7, n° 4, pp. 42-49, 2012.
- [17] S. Zhao, X. Wu, L. Wang y Y. Huang, «Electrospinning of Ethyl-Cyanoethyl Cellulose/Tetrahydrofuran Solutions,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 91, pp. 242-246, 2004.
- [18] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen y J. E. Lemons, *An Introduction to Materials in Medicine*, San Diego: Academic Press, 1996.
- [19] L. Ghasemi-Mobarakeh, D. Kolahreez, S. Ramakrishna y D. Williams, «Key terminology in biomaterials and biocompatibility,» *Current Opinion in Biomedical Engineering*, n° 10, pp. 45-50, 2019.
- [20] L. Liverani, M. S. Killian y A. R. Boccaccini, «Fibronectin Functionalized Electrospun Fibers by Using Benign Solvents: Best Way too Achieve Effective Functionalization,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, n° 68, pp. 1-12, 2019.
- [21] L. Gritsch, L. Liverani, C. Lovell y A. R. Boccaccini, «Polycaprolactone Electrospun Fiber Mats Prepared Using Benign Solvents: Blending with Copper(II)-Chitosan Increases the Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor in a Bone Marrow Stromal Cell Line,» *Macromolecular Bioscience*, vol. 20, p. 1900355, 2020.

- [22] «Wikipedia,» [En línea]. Available: https://de.wikipedia.org/wiki/Polycaprolacton#/media/Datei:Polycaprolactone_structure.png. [Último acceso: 11 Julio 2020].
- [23] T. Senda, Y. He y Y. Inoue, «Biodegradable blends of poly(ϵ -caprolactone) with α -chitin and chitosan: specific interactions, thermal properties and crystallization behavior,» *Polymer International*, vol. 51, pp. 33-39, 2001.
- [24] M. M. Islam, M. Shahruzzaman, B. S. M. Sakib y R. T. U, «Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review,» *Bioactive Materials*, vol. 5, pp. 164-183, 2020.
- [25] S. Bongiovanni Abel, L. Liverani, A. R. Boccaccini y G. A. Abraham, «Effect of benign solvents composition on poly(ϵ -caprolactone) electrospun fiber properties,» *Materail Letters*, vol. 245, pp. 86-89, 2019.
- [26] F. Croisier y C. Jérôme, «Chitosan-based biomaterials fot tissue engineering,» *European Polymer Journal*, vol. 49, pp. 780-792, 2013.
- [27] M. Rinuado, «Chitin and chitosan: Properties and applications,» *Progress in Polymer Science*, vol. 31, pp. 603-632, 2006.
- [28] L. Van der Schueren, I. Steyaert, B. De Schoenmaker y K. De Clerck, «Polycaprolactone/chitosan blend nanofibres electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 88, nº 4, pp. 1221-1226, 2012.
- [29] J. R. Jones, «Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids,» *Acta Biomaterialia*, vol. 23, pp. s53-s82, 2012.
- [30] A. M. Deliormanli, «Investigation of In Vitro Mineralization of Silicate based 45S5 and 13-93 Bioactive Glasses in Artificial Saliva Solutions for Dental Applications,» *Ceramics International*, vol. 43, 2016.
- [31] A. R. Boccaccini, D. S. Brauer y L. Hupa, «Chapter 1 Melt-derived Bioactive Silicate Galsses,» de *Bioactive Glasses: Fundamentals, Technology and applications*, Cambridge, Royal Society of Chemistry, 2016, pp. 17-18.
- [32] T. Kokubo y H. Takadama, «How useful is SBF predicting in vivo bone bioactivity?,» *Biomaterials*, vol. 27, nº 15, pp. 2907-2915, 2006.

- [33] F. Baino, «Bioactive glasses - when glass science and technology meet regenerative medicine,» *Ceramics International*, vol. 44, nº 13, pp. 15953 - 14999, 2018.
- [34] M. Brink, «The influence of alkali and alkaline earths on the working range for bioactive glasses,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 36, nº 1, pp. 109-117, 1998.
- [35] D. Vukajlovic, J. Parker, O. Bretcanu y K. Novakovic, «Chitosan based polymer/bioglass composites for tissue engineering applications,» *Materials Science and Engineering C*, vol. 96, pp. 955-967, 2018.
- [36] M. Rahaman, D. Day, B. Sonny Bal, F. Qiang, S. Jung, L. Bonewald and A. Tomsia, «Bioactive glass in tissue engineering,» *Acta Biomaterialia*, vol. VII, no. 6, pp. 2355-2373, 2011.
- [37] L. Liverani, J. Lacina, J. Roether, E. Boccardi, M. Killian, P. Schmuki, D. Schubert y A. Boccaccini, «Incorporation of bioactive glass nanoparticles in electrospun,» *Bioactive Materials*, vol. 33, nº 1, pp. 55-63, 2018.
- [38] Sigma-Aldrich, «Syringe Needle Gauge Chart,» Sigma-Aldrich, 2020. [En línea]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/chemistry/stockroom-reagents/learning-center/technical-library/needle-gauge-chart.html>. [Último acceso: 13 Febrero 2020].
- [39] ElectrospinTech, «Tensile testing of electrospun nanofiber membrane,» 22 7 2013. [En línea]. Available: <http://electrospintech.com/SOP-ES2002.html#.XkstHmhKjIW>. [Último acceso: 17 2 2020].
- [40] J. Reed, «Particle size and shape,» de *Principles of Ceramics Processing*, Wiley-Interscience, 1995, pp. 92-113.
- [41] L. Van der Schueren, B. De Schoenmaker, Ö. Kalaoglu y K. De Clerck, «An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone,» *European Polymer Journal*, vol. 47, nº 6, pp. 1256-1263, 2011.
- [42] Y. Jia, J. Gong, X. Gu, H. Kim, J. Dong y X. Shen, «Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 67, nº 3, pp. 403-409, 2007.

- [43] A. Einstein, «Berichtigung zu meiner Arbeit: „Eine neue Bestimmung der Moleküldimensionen”,» *Annalen der Physik*, vol. 34, pp. 591-592, 1911.
- [44] P. Wutticharoenmongkol, N. Sanchavanakit, P. Pavasant y P. Supaphol, «Preparation and Characterization of Novel Bone Scaffolds Based on Electrospun Polycaprolactone Fibers Filled with Nanoparticles,» *Macromolecular Bioscience*, vol. 6, pp. 70-77, 2005.
- [45] K. Zheng, A. Solodovnyk, W. Li, O. Goudouri, C. Stähli, S. N. Nazhat y A. R. Boccaccini, «Aging Time and Temperature Effects on the Structure and Bioactivity of Gel-Derived 45S5 Glass-Ceramics,» *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 98, nº 1, pp. 30-38, 2015.
- [46] Y. Qian, Z. Zhang, L. Zheng, R. Song y Y. Zhao, «Fabrication and Characterization of Electrospun Polycaprolactone Blended with Chitosan-Gelatin Complex Nanofibrous Mats,» *Journal of Nanomaterials*, vol. 2014, pp. 1-7, 2014.
- [47] Y. Kim, J. Lim, G. Yang, J. Seo, H. Ryu y G. Kim, «3D-printed PCL/bioglass (BGS-7) composite scaffolds with high toughness and cell-responses for bone tissue regeneration,» *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 79, pp. 163-171, 2019.
- [48] O. Urbanek, P. Sajkiewicz, F. Pierini, M. Czerkies y D. Kolbuk, «Structure and properties of polycaprolactone/chitosan nonwovens,» *Biomedical Materials*, vol. 12, nº 1, 2017.
- [49] N. N. Aliah y M. N. M. Ansari, «Thermal analysis on Characterization of Polycaprolactone (PCL) – Chitosan Scaffold for Tissue Engineering,» *International Journal of Scientific Research Engineering & Technology*, vol. 6, nº 2, pp. 76-80, 2017.
- [50] Y. Wan, X. Lu, S. Dalai y J. Zhang, «Thermophysical properties of polycaprolactone/chitosan blend membranes,» *Thermochimica Acta*, vol. 487, nº 1, pp. 33-38, 2009.
- [51] D. Semnani, E. Naghashzargar, M. Hadjianfar, F. D. Manshadi, S. Mohammadi, S. Karbasi y F. Effaty, «Evaluation of PCL/chitosan electrospun nanofibers for liver

tissue engineering,» *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 66, nº 3, pp. 149-157, 2016.

- [52] T. Prasad, E. A. Shabeena, D. Vinod, T. V. Kumary y P. R. Anil Kumar, «Characterization and in vitro evaluation of electrospun chitosan/polycaprolactone blend fibrous mat for skin tissue engineering,» *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 26, nº 28, 2015.
- [53] M. Komg, X. Guang Chen, K. Xing y H. J. Park, «Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review,» *International Journal of Food Microbiology*, vol. 144, pp. 51-63, 2010.
- [54] R. A. A. Muzzarelli, F. Greco, A. Busilacchi, V. Sollazzo y A. Gigante, «Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 89, pp. 723-739, 2012.
- [55] «LB Agar (Luria/Miller), 500 g for molecular biology,» Carl Roth, [En línea]. Available: <https://www.carlroth.com/com/en/nutrient-media--molecular-biology/lb-agar-%28luria-miller%29/p/x969.1>. [Último acceso: 23 10 2020].