



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

OBTENCIÓN DE UN ANDAMIO BICAPA MEDIANTE LA  
TÉCNICA DE ELECTROHILAMIENTO PARA SU POTENCIAL  
APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS DE LA PIEL

Tesis que presenta

LUZ AMÉRICA CHI ULUAC

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS  
MATERIALES POLIMÉRICOS

Mérida, Yucatán, México,

Marzo 2015



## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Mérida, Yucatán, México a 14 de marzo del 2015

Luz América Chi Uluc





**CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE  
YUCATAN A.C.  
POSGRADO EN CIENCIAS EN MATERIALES  
POLIMÉRICOS**

## **RECONOCIMIENTO**

**Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado**

**OBTENCIÓN DE UN ANDAMIO BICAPA MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELECTROHILAMIENTO PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS DE LA PIEL**

**Pertenciente al Programa de Maestría en Ciencias (Materiales Poliméricos) del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Materiales bajo la dirección del Dr. Fernando Hernández Sánchez.**

**Atentamente,**

**Dr. Manuel Martínez Estévez**

**Director de Docencia**

**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**



Este trabajo se desarrolló en las instalaciones de la Unidad de Materiales del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. Bajo la asesoría del Dr. Fernando Hernández Sánchez.



## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos y al CONACYT, por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Fernando Hernández Sánchez, por la especial motivación transmitida a través de los cursos que nos ha proporcionado durante el posgrado. Y posteriormente, por darme la oportunidad de trabajar con él como su estudiante de tesis de maestría, brindándome en todo momento su confianza y apoyo.

Al M.C Hugo Joel Carrillo Escalante, por su importante participación como guía en la elaboración de las diversas pruebas de caracterización realizadas en el presente trabajo, por no dudar nunca en compartir sus conocimientos y experiencia y por su amable amistad y consejo.

A la Ingeniera Silvia Andrade, porque gracias a su amor y dedicación por su trabajo fue posible obtener no sólo prácticas, sino también, bellas imágenes SEM, por su paciencia, consejo y entusiasta amistad.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez, Dr. José Manuel Cervantes Uc, Dr. Raúl Rosales Ibañez y al Dr. Juan Morales Corona, por sus valiosos consejos y críticas para el mejoramiento de esta tesis.



## DEDICATORIA

Para mis amados, pacientes y luchadores  
padres: Francisco y Librada.

Para Rodolfo, Miguel, Roger, Javier y  
Carlos, mi adorable familia.



# ÍNDICE

---

Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas .....	vi
Resumen .....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Justificación .....	5
Capítulo 1. Marco teórico .....	6
1.1 Fisiología de la piel .....	6
Epidermis.....	7
La dermis.....	8
1.2 Heridas por pérdida de piel.....	9
1.3 Ingeniería de tejidos.....	10
Diseño de andamios.....	11
1.4 Equivalentes de piel.....	15
Sustituto de piel ideal.....	15
Sustitutos de piel comerciales.....	16
1.5 Técnica de electrohilamiento.....	20
Efecto de la concentración .....	24
Efecto de la masa molar de los polímeros .....	25
Efecto del disolvente .....	25
Efecto de la diferencia de potencial aplicada. ....	26
Efecto de la distancia entre el capilar y el colector.....	26
1.6 Polímeros utilizados en la elaboración del andamio .....	27
Policaprolactona .....	27
Gelatina .....	28
1.7 Estabilización de las fibras.....	32
1.8 Toxicidad del GTA .....	33

1.9	Disolventes residuales.....	34
	<b>Antecedentes.....</b>	<b>35</b>
	<b>Hipótesis .....</b>	<b>39</b>
	<b>Objetivos.....</b>	<b>39</b>
1.10	Objetivo general .....	39
1.11	Objetivos particulares.....	39
	<b>Capítulo 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>41</b>
2.1	Materiales .....	41
2.2	Metodología general.....	42
2.3	Obtención de las fibras .....	43
Fibras de PCL.....		43
Fibras de gelatina.....		45
2.4	Obtención del andamio bicapa .....	46
Método 1.- Colector plano .....		46
Método 2.- Colector cilíndrico .....		46
2.5	Insolubilización de las fibras de gelatina .....	47
2.6	Inactivación de los grupos aldehído .....	48
2.7	Eliminación del disolvente residual .....	48
2.8	Caracterizaciones .....	49
Espectroscopia de infrarrojo (FTIR-ATR) .....		49
Caracterización morfológica .....		49
Detección de flúor.....		51
Evaluación del carácter hidrofílico mediante el ángulo de contacto.....		51
Medición del grado de hinchamiento .....		52
Pruebas de pérdida de masa .....		52
Resistencia mecánica .....		53
	<b>Capítulo 3. Resultados y análisis .....</b>	<b>55</b>
3.1.	Obtención de las fibras a base de PCL. ....	55
3.2.	Obtención de las nanofibras de gelatina .....	58
3.3.	Estabilización de las nanofibras.....	60

<b>3.4. Pruebas de la capacidad de hinchamiento</b> .....	<b>63</b>
<b>3.5. Caracterización de las fibras obtenidas</b> .....	<b>66</b>
Espectroscopia de infrarrojo (FTIR-ATR) .....	66
Ángulos de contacto.....	74
<b>3.6. Andamio bicapa</b> .....	<b>77</b>
Método 1. Colector plano.....	77
Método 2. Colector cilíndrico.....	79
<b>3.7. Cuantificación de flúor</b> .....	<b>82</b>
<b>3.8. Inactivación de los grupos aldehído residuales</b> .....	<b>86</b>
<b>3.9. Propiedades mecánicas a tensión</b> .....	<b>88</b>
<b>3.10. Pruebas de pérdida de masa</b> .....	<b>92</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>100</b>
<b>Perspectivas del trabajo</b> .....	<b>102</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>103</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.1. Capas de la piel.</i> .....	6
<i>Figura 1.2. Capas celulares en que se divide la epidermis (izquierda) y principales células presentes en la epidermis (derecha): a) Queratinocito, b) Melanocito, c) Célula de Langerhans y d) Célula de Merkel</i> .....	7
<i>Figura 1.3. Principales células de las dermis: a) Histiocito, b) Mastocito y c) Fibroblasto.</i> .....	8
<i>Figura 1.4. Esquema del proceso general de la ingeniería de tejidos<sup>[10]</sup>.</i> .....	10
<i>Figura 1.5. Medición del ángulo de contacto con el método del semiángulo.</i> .....	13
<i>Figura 1.6. Representación esquemática de la técnica de electrohilamiento<sup>[26]</sup>.</i> .....	20
<i>Figura 1.7. Diagrama esquemático de la aguja del electrohilamiento con electrodo positivo y negativo: la polaridad del electrodo determina la polaridad de la acumulación de carga en la disolución.</i> .....	21
<i>Figura 1.8. Efecto de las fuerzas de un campo eléctrico aplicadas a una disolución en un capilar<sup>[28]</sup>.</i> .....	21
<i>Figura 1.9. Efecto de la concentración en la estructura de las fibras electrohiladas de D, L-PLA. A) 20 % (m/m) B) 25 % (m/m), C) 30 % (m/m) y D) 35 % (m/m) [26]. Con m = masa.</i> .....	24
<i>Figura 1.10. Estructura de la policaprolactona.</i> .....	27
<i>Figura 1.11. Formación del enlace peptídico en las proteínas.</i> .....	28
<i>Figura 1.12. Esquematización de la obtención de gelatina a partir de colágeno de un tendón<sup>[39,40]</sup>.</i> .....	29
<i>Figura 1.13. Entrecruzamiento de la gelatina mediante GTA que da como resultado la formación de nuevos enlaces imina entre cadenas.</i> .....	32
<i>Figura 2. 1. Etapas generales y secuencia de desarrollo de la parte experimental.</i> .....	42
<i>Figura 2. 2. Configuración del equipo de electrohilado situado en el laboratorio de fisicoquímica de la unidad de materiales del CICY.</i> .....	44
<i>Figura 3. 1. Fibras de PCL electrohiladas con TFE como disolvente, a concentraciones de: A) 10 % (m/v), B) 15 % (m/v) y C) 20 % (m/v). A una distancia de 15 cm, voltaje de 15 kV y 0,5 ml/h de rapidez de inyección. Imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico y 40x de ampliación.</i> .....	55
<i>Figura 3. 2. Imagen tomada con el microscopio óptico a 40x, C) Imagen SEM a 3000x y D) Figura 13. Fibras de PCL al 20 % (m/v) en TFE. 15Kv, 15 cm y 0,5 ml/h. A) Imagen SEM a 750 X, B) Histograma de distribución de diámetros.</i> .....	56
<i>Figura 3. 3. Fibras de gelatina obtenidas con diferentes concentraciones de la disolución: A) 5 % (m/v), B) 7.5 % (m/v), C) 10 % (m/v) y D) 10 % (m/v) en otra zona del andamio. Todas a 0.8 ml/h, 15 cm y 10 kV. Imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico a una magnificación de 40x.</i> .....	58
<i>Figura 3. 4. Fibras de gelatina electrohiladas con TFE al 10 % (m/v), 0,8 ml/h y 10 kV. Imágenes SEM a: A) 750x, B) 2500x, C) 6500x y D) histograma de distribución de diámetros.</i> .....	59
<i>Figura 3. 5. Membranas electrohiladas en el colector plano y el cilindro cilíndrico: A) sin entrecruzamiento y B) 48 horas de exposición al GTA.</i> .....	60
<i>Figura 3. 6. Fibras de gelatina después de 48 horas de entrecruzamiento con GTA. Imágenes SEM a diferentes ampliaciones: A) 750 x, B) 2500x, C) 6500x y D) histograma de distribución de diámetros.</i> .....	61

Figura 3. 7. Fibras de gelatina A) antes y B) después de ser sometidas a 48 horas a una atmósfera de vapor de agua, con humedad máxima de 60 %. Imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico a una magnificación de 40x. ....	62
Figura 3. 8. Fibras de gelatina sin entrecruzar (arriba) y entrecruzadas (abajo), al ser sumergidas en PBS durante 8 días. ....	62
Figura 3. 9. Curva de hinchamiento como función del tiempo, los puntos son los datos experimentales, la línea es la predicción del modelo de segundo orden de Scott, para las membranas electrohiladas y entrecruzadas de gelatina a 22° C. ....	64
Figura 3.10. Espectro IR de la PCL prístina. ....	66
Figura 3. 11. Espectro IR de la gelatina prístina tipo A. ....	67
Figura 3. 12. Espectros FTIR de la PCL; azul-PCL prístino; negro-fibras de PCL. ....	70
Figura 3. 13. Espectros FTIR de la gelatina; azul-gelatina prístino; rojo-fibras de gelatina. ....	71
Figura 3. 14. Fibras de gelatina sin entrecruzar (negro) y con entrecruzamiento de 48 horas (azul). A) Espectro completo y B) Ampliación de la zona alrededor de 1700 cm <sup>-1</sup> . ....	72
Figura 3. 15. Ángulos de contacto de la PCL y gelatina entrecruzada a través del tiempo. ....	74
Figura 3. 16. Sección transversal del andamio bicapa electrohilado en el colector plano. Antes del entrecruzamiento A)330x y B)800x, y después del entrecruzamiento C)330x y D)830x. ....	77
Figura 3. 17. Detalle del andamio bicapa a) antes (abajo) y después de entrecruzar (arriba) y b) Andamio bicapa entrecruzado con sus dos caras. ....	79
Figura 3. 18. Corte transversal del andamio bicapa cortado con un sacabocados: A) 60x, B) 200x, C) 330x y con un bisturí: D) 60x, E) 200x, F) 300x de ampliación. ....	81
Figura 3. 19. Fibras de policaprolactona electrohiladas con trifluoroetanol. Porcentaje atómico de los elementos presentes (izquierda) y espectro de los elementos presentes en las fibras (derecha). ....	82
Figura 3. 20. Fibras de gelatina electrohiladas con trifluoroetanol. Porcentaje atómico de los elementos presentes (izquierda) y espectro de los elementos presentes en las fibras (derecha). ....	82
Figura 3. 21. Fibras de gelatina electrohiladas con trifluoroetanol y tratadas con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . Porcentaje atómico de los elementos presentes (izquierda) y espectro de los elementos presentes en las fibras (derecha). ....	84
Figura 3. 22. Fibras de gelatina antes: A) 2500x, B) 750x y después: C) 2500x D) 750x del tratamiento con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> durante 3 horas. ....	85
Figura 3. 23. Fibras de gelatina sin tratamiento con glicina (negro) y con tratamiento con glicina (azul). A) Espectro completo y B) Ampliación de la zona alrededor de 1700 cm <sup>-1</sup> . ....	87
Figura 3. 24. urvas esfuerzo deformación de las nanofibras de gelatina (azul), el andamio bicapa entrecruzado y con interface (verde) y las fibras de PCL (rojo). ....	88
Figura 3. 25. Detalle del estiramiento de una muestra del andamio bicapa hidratado. ....	89

Figura 3. 26. Curvas esfuerzo deformación del andamio bicapa (negro) y el andamio bicapa después de entrecruzar e hidratar durante 2 horas en PBS (morado). .....	90
Figura 3. 27. Perfiles de pérdida de masa de los andamios electrohilados: gelatina (negro) y PCL (azul). .	93
Figura 3. 28. Mecanismo que describe la hidrólisis de un poliéster como la PCL, usualmente catalizada por un ácido o una base. Donde R y R' pueden representar el resto de la cadena polimérica. ....	94
Figura 3. 29. Espectro IR normalizado de la PCL con una ampliación en la región 1130-1310 $\text{cm}^{-1}$ . ....	95
Figura 3. 30. Imágenes SEM de las fibras de PCL sumergidas en PBS durante A) 0, B) 1, C) 2, D) 3 y E) 4 semanas. A') Ángulo de contacto antes de la inmersión en PBS y E') Después de la inmersión durante 4 semanas. ....	96
Figura 3. 31. Mecanismo de hidrólisis de los enlaces peptídicos en las proteínas. ....	97
Figura 3. 32. Espectro IR normalizado de la gelatina. ....	98
Figura 3. 33. Imágenes SEM de las fibras de gelatina sumergidas en PBS durante A) 0, B) 1, C) 2, D) 3 y E) 4 semanas. ....	99

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.- Características de sustitutos de piel comerciales según la capa que ayuda a recuperar. a Producto comercializado; n/a, no aplicable y n/e, no encontrado <sup>[19]</sup> . ....	17
Tabla 1.2. Sustitutos o equivalentes de piel bicapa que son comerciales <sup>[20]</sup> . ....	19
Tabla 1.3.- Parámetros de la disolución y sus efectos <sup>[27]</sup> . Valores altos $\uparrow$ y bajos $\downarrow$ . ....	23
Tabla 1.4. Parámetros del proceso y sus efectos <sup>[27]</sup> . Valores muy altos $\uparrow\uparrow$ y muy bajos $\downarrow\downarrow$ . ....	23
Tabla 1.5. Propiedades típicas de la policaprolactona <sup>[13]</sup> . ....	27
Tabla 1.6. Propiedades típicas de la gelatina tipo A <sup>[41,42]</sup> . ....	30
Tabla 1.7. Composición de aminoácidos del colágeno y la gelatina tipo A y B (Por cada 100 unidades monoméricas) <sup>[44]</sup> . ....	31
Tabla A. Valores del proceso de electrohilamiento reportados para la policaprolactona (PCL) en TFE. ....	37
Tabla B. Valores del proceso de electrohilamiento reportados para la gelatina. ....	38
Tabla 2. 1 Materiales utilizados durante el desarrollo experimental y sus características. ....	41
Tabla 2. 2. Parámetros utilizados en el proceso de electrohilamiento de la PCL. ....	43
Tabla 2. 3 Parámetros para el electrohilamiento de las fibras de gelatina. ....	45
Tabla 2. 4. Parámetros para la capa intermedia PCL-gelatina. ....	47
Tabla 3. 1. Principales enlaces del espectro IR para la policaprolactona (PCL). ....	66
Tabla 3. 2. Principales enlaces del espectro IR para la gelatina tipo A. ....	68
Tabla 3. 3. porcentaje atómico de los elementos presentes en cada andamio. ....	84
Tabla 3. 4. Propiedades mecánicas a tensión de diversos materiales. ....	91

## RESUMEN

---

La pérdida de piel afecta severamente la calidad de vida del ser humano y puede incluso causar la muerte. En el caso de pérdidas masivas, heridas crónicas o pérdidas de gran espesor, la piel no es capaz de regenerarse por sí misma. Los tratamientos convencionales en estas situaciones, los injertos, presentan diversas problemáticas que podrían ser solventadas mediante el uso de piel artificial, creada gracias a los principios de la ingeniería de tejidos. El elemento base de la ingeniería de tejidos, es el soporte o andamio, que imita el ambiente adecuado para el crecimiento celular. En este trabajo, se elaboró un andamio bicapa, mediante la técnica de electrohilamiento secuencial, con una capa de policaprolactona y una de gelatina tipo A. Se obtuvieron estructuras fibrosas libres de glóbulos con diámetros medios de 733 nm, a partir de disoluciones al 20 % (m/v) de PCL en TFE, a un flujo de alimentación de 0.5 ml/h, una distancia del colector a la aguja de 15 cm y un voltaje de 15 kV. Para las fibras de gelatina con diámetro medio de 1107 nm, las condiciones ideales fueron una concentración de 10 % (m/v) en TFE, a un flujo de 0.8 ml/h, distancia de 15 cm y un voltaje de 10 kV. La unión entre capas fue mejorada agregando una capa donde coexistieran fibras de gelatina y PCL, así como con la utilización de un colector cilíndrico rotatorio en lugar de uno plano y estático. Las fibras de gelatina fueron insolubilizadas en medio acuoso mediante su exposición a los vapores de glutaraldehído (GTA), durante 48 horas.

## ABSTRACT

---

The severe skin loss affects the quality of human life and could even cause death of the patient. When the affected area is too large or deep and in chronic wounds cases, the skin is not able to regenerate itself. There are conventional treatments in these situations, but it have several problems that could be solved by tissue engineering approaches. A critical issue in tissue engineering is the scaffold, wich aims mimic the suitable environment for cell growth. In this work, a bilayer scaffold for potential use in skin tissue engineering was designed. The scaffold consisted of a polycaprolactone electrospun layer and a cross-linked electrospun gelatin layer. Ideal conditions for manufacturing polycaprolactone fibrous structures were solutions at 20 % (m/v) in TFE, 0.5 ml/h feed rate, 15 cm of distance and 15 kV. For gelatin fibers, ideal conditions were solutions at 10 % (m/v) in TFE, 0.8 ml/h feed rate, 15 cm of distance and 10 kV. The union between layers was improved by adding a layer where coexist gelatin and PCL fibers; and with the use of a rotating cylindrical collector instead of a flat and static. Glutaraldehyde (GTA) vapor was used to treat the gelatin layer to improve their stability in aqueous media.

## INTRODUCCIÓN

---

La piel es un órgano vital que proporciona al organismo una barrera contra la invasión microbiana, percibe sensaciones y tiene propiedades que pueden proteger contra químicos, daño térmico y mecánico<sup>[1]</sup>. Desafortunadamente, debido a diversas causas, principalmente quemaduras, accidentes, enfermedades crónicas y una población que envejece día con día, las pérdidas de piel representan un problema importante.

En las lesiones de la piel donde son afectadas las capas dérmicas profundas, en el caso de las pérdidas masivas y de heridas crónicas, la piel no es capaz de regenerarse por si misma, por lo que se hace necesario el uso de injertos<sup>[2]</sup>. Los injertos tradicionales por excelencia son los autólogos, los cuales están basados en la extracción de la piel sana del mismo paciente, sin embargo, esto aumenta el nivel de dolor inducido en el mismo. Además, en las pérdidas de carácter masivo, no existe suficiente cantidad de piel sana para cubrir las zonas dañadas. Una alternativa son los xenoinjertos (injertos provenientes de otra especie) y los homoinjertos (misma especie pero diferente individuo), que desafortunadamente también presentan desventajas como son la posible transmisión de enfermedades y la posibilidad de una respuesta desfavorable por parte del sistema inmunológico del huésped.

Gracias al surgimiento de la ingeniería de tejidos se ha logrado tener una alternativa más viable a los injertos tradicionales. La ingeniería de tejidos se basa en 3 componentes principales: las células, el andamio y los factores de crecimiento<sup>[3]</sup>. Los andamios representan una pieza clave, cuyo estudio es de creciente interés para el área de biomateriales, en especial en el área de los biopolímeros.

Dentro de los enfoques para la construcción de andamios para la piel, uno de los más prometedores, consiste en el desarrollo de andamios biomiméticos

multicapa. Diversos productos han sido diseñados de esta manera, sin embargo, no son todavía ideales y a menudo conllevan una variedad de problemas de diseño.

Las técnicas de fabricación de andamios pueden variar dependiendo del tipo de características estructurales que se requieran. En el caso de los andamios nanofibrosos, existen tres métodos principales: el auto ensamblaje<sup>[4]</sup>, la separación de fases<sup>[5]</sup> y el electrohilamiento (*electrospinning*)<sup>[6]</sup>. De entre ellas, el electrohilamiento es el método más factible debido a que el diámetro de las fibras es fácil de controlar y es viable escalar el proceso<sup>[7]</sup>. Adicionalmente, las nanofibras obtenidas poseen características morfológicas similares a las de las fibras de la matriz extracelular (ECM) presente de forma natural en la piel.

La policaprolactona (PCL) es un polímero sintético, lineal, hidrófobo, aprobado por la agencia de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA) y que ha sido ampliamente utilizado en la ingeniería de tejidos por sus buenas propiedades mecánicas, sin embargo, muestra una pobre adhesión celular y una rapidez de degradación lenta<sup>[8]</sup>. Otro polímero ampliamente utilizado es la gelatina, que es un polímero natural, biocompatible, biodegradable, derivado del colágeno por hidrólisis. La gelatina posee excelentes propiedades de adhesión, proliferación y diferenciación celular, características de las que carece la PCL, pero muestra una baja resistencia mecánica y alta rapidez de degradación<sup>[8]</sup>. Por lo que, un andamio construido utilizando estos dos polímeros podría estar aprovechando las virtudes de ambos. En este trabajo se propone realizar un andamio bicapa mediante la técnica de electrohilamiento, con una capa inferior de fibras a base de gelatina, y una capa superior con fibras a base de policaprolactona (PCL). Se espera que los resultados de este trabajo sirvan de partida a estudios posteriores, dando lugar a un análogo dérmico poblado de fibroblastos que sea factible para aplicaciones de reconstrucción de la dermis antes de la reepitelización.

## JUSTIFICACIÓN

---

Se estima que aproximadamente el 1 % de la población mundial puede sufrir de una quemadura seria en algún momento de su vida. En Europa, anualmente, alrededor de un millón de personas recibe atención médica por quemaduras; mientras que en Estados Unidos, la incidencia de personas quemadas es de 1.5 millones al año, de las cuales entre 5,000 y 6,500 fallecen. En el caso de México, en 2011 se reportó un promedio anual de 115 mil casos de accidentes por quemaduras<sup>[9]</sup>. En comparación con el gran número de habitantes, estas cifras podrían parecer poco significativas, sin embargo, este tipo de traumas severos afecta no solo a los pacientes que sufren las quemaduras, sino a todas las familias que sufren las pérdidas humanas o los costosos tratamientos de rehabilitación. Actualmente las personas que sufren de alguna quemadura de segundo y tercer grado, son tratadas mediante el uso de injertos o mediante el implante de cultivos celulares; siendo el último uno de los procedimientos más caros que existen, pero que produce un buen resultado médico y estético; desafortunadamente, esta opción no se encuentra dentro de las posibilidades económicas de la mayoría de los pacientes<sup>[9]</sup>.

Otro de los problemas importantes que indirectamente generan pérdidas de piel, es la diabetes. La diabetes representa un alto porcentaje en las principales causas de mortalidad en México desde 1980, alcanzando un máximo en 2012 con el 14.1 %<sup>[9]</sup>. Las úlceras crónicas constituyen una de las principales complicaciones en los pacientes con diabetes, son heridas en la piel incapaces de sanar por sí mismas y expuestas a diversas infecciones, que si no son tratadas con injertos o sustitutos de piel, derivan en amputaciones de extremidades o la muerte.

En razón de lo anterior, surge la necesidad imperante de desarrollar sustitutos de piel a partir de andamios que posean propiedades físicas, químicas y biológicas adecuadas.

# Capítulo 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 FISIOLÓGÍA DE LA PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo, cubre aproximadamente 1.6 m<sup>2</sup> de área superficial y representa alrededor del 16 % de la masa corporal en un adulto. Este órgano cumple con cuatro funciones esenciales:

1. Retiene la humedad.
2. Regula la temperatura corporal.
3. Protege al cuerpo de microbios y agentes externos dañinos.
4. Función sensorial.

La piel está compuesta de dos capas principales (Figura 1.1) la epidermis y la dermis. En el límite entre la epidermis y la dermis se encuentran estructuras en forma de crestas. La porción de la epidermis que se proyecta dentro de la dermis se llama cresta epidérmica, y la parte de la dermis que se proyecta dentro de la epidermis se llama papila dérmica.

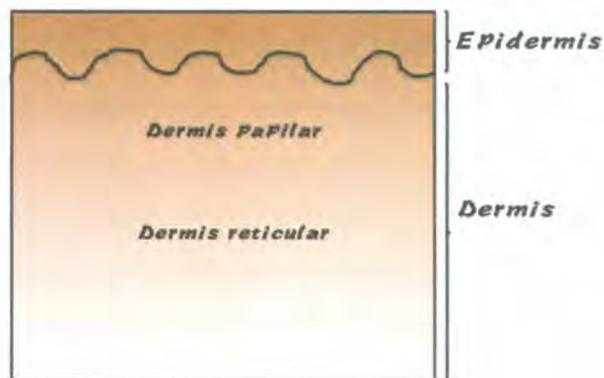


Figura 1.1. Capas de la piel.

## Epidermis

La epidermis es la capa más superficial, presenta un espesor variable, con un valor promedio de 0.1 mm, pudiendo alcanzar en zonas como las palmas de las manos y las plantas de los pies de 1 mm a 2 mm.

El 95 % de las células que componen la epidermis son los queratinocitos. Los queratinocitos en diferentes etapas de maduración están dispuestos en capas que se pueden dividir en cuatro niveles: la membrana basal, la capa de células suprabasales o capa espinosa, la capa de células granulares y la capa de células córneas (Figura 1., lado izquierdo). El período entre la producción de células hijas epidermales y su exfoliación en la superficie exterior, se llama tiempo de rotación y es de aproximadamente 28 días en la piel sana<sup>[10]</sup>. El 5 % de las células restantes son melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel (Figura 1., lado derecho); que están implicadas en la formación de melanina, la presentación de antígenos y la función sensitiva, respectivamente.



Figura 1.2. Capas celulares en que se divide la epidermis (izquierda) y principales células presentes en la epidermis (derecha): a) Queratinocito, b) Melanocito, c) Célula de Langerhans y d) Célula de Merkel.

## La dermis

La dermis es el tejido responsable de la mayoría de las funciones de soporte. Presenta un grosor de 2 mm a 5 mm y está constituida por tejido conectivo y células.

Los principales componentes celulares de la dermis se mencionan a continuación (Figura 1.):

- **Fibroblastos:** se forman a partir de células pluripotentes y producen fibras de colágeno, fibras de elastina y glucosaminoglicanos (polímeros de unidades de disacáridos repetidas).
- **Histiocitos:** son una especie de macrófagos que degradan la mayoría de las sustancias extrañas para el organismo.
- **Mastocitos:** se encuentran en la dermis, alrededor de los capilares y en la periferia de los tejidos subcutáneos. Su forma es redondeada o alargada y su diámetro es 10  $\mu\text{m}$ . El mastocito puede producir y liberar sustancias inflamatorias.

El tejido conectivo a su vez está formado por tres tipos de fibras: colágenas, elásticas y reticulares. Las fibras colágenas son las más numerosas, la disposición y el grosor de las mismas varía de acuerdo al nivel en que se encuentran: en la dermis superficial o papilar, son fibras delgadas al azar, a diferencia de la dermis media y profunda, donde son de mayor diámetro y se disponen casi paralelas a la superficie de la epidermis<sup>[10]</sup>.

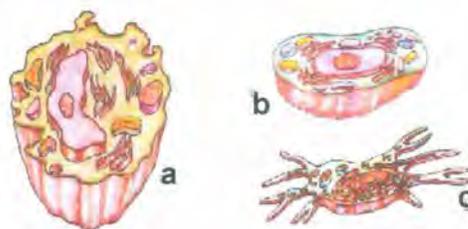


Figura 1.3. Principales células de las dermis: a) Histiocito, b) Mastocito y c) Fibroblasto.

## 1.2 HERIDAS POR PÉRDIDA DE PIEL

Este tipo de heridas se pueden dividir en epidérmica, superficial de espesor parcial, profunda de espesor parcial y de espesor total; de acuerdo a la profundidad de la lesión.

Las lesiones epidérmicas son normalmente quemaduras causadas por la radiación solar. Estas lesiones no requieren tratamiento quirúrgico específico, ya que sólo la epidermis se ve afectada y ésta se regenera rápidamente<sup>[11]</sup>.

Las heridas superficiales de espesor parcial afectan la epidermis y las partes superficiales de la dermis. Estas heridas se curan por la epitelización, donde los queratinocitos proliferan y migran hasta cubrir el área dañada. Los queratinocitos migran ya sea desde el borde de la herida, el folículo piloso o de los restos de las glándulas sudoríparas que se encuentran en la dermis profunda<sup>[11]</sup>.

Las lesiones de espesor completo y las profundas de espesor parcial, se caracterizan por la completa destrucción de los elementos epiteliales regenerativos. Este tipo de lesión se cura por contracción, dando lugar a defectos estéticos y funcionales. Inicialmente, se crea un tejido granuloso como medida defensiva contra las bacterias, posteriormente los fibroblastos proliferantes en el tejido de granulación, producen colágeno en grandes cantidades y con el tiempo se diferencian en miofibroblastos contráctiles, que empiezan a tirar de los bordes de la herida en una proximidad suficiente para que la migración de queratinocitos desde la periferia pueda epitelializar la herida<sup>[11]</sup>.

Todas las heridas de la piel, que son de espesor total de más 1 cm de diámetro requieren injerto de piel. En el caso de las lesiones por quemaduras, el tratamiento tradicional requiere una escisión temprana de la costra seca (escara) para eliminar las proteínas desnaturalizadas por calor, seguido por el cierre de la herida. Esto evita las complicaciones como la infección, disfunción múltiple de órganos, formación de una cicatriz hipertrófica y una respuesta inflamatoria<sup>[11]</sup>.

### 1.3 INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinaria que combina el conocimiento y tecnología del cultivo celular, la ingeniería de materiales y factores bioquímicos para crear órganos y tejidos artificiales o, para regenerar tejidos dañados<sup>[3]</sup>.

La idea básica de la ingeniería de tejidos (Figura 1.) consiste en sembrar células adecuadas en un andamio o soporte, cultivándolas en un bio-reactor durante un cierto período de tiempo, posteriormente se estimulan a proliferar (y diferencian en el caso de las células madre). Finalmente, este compuesto células-matriz produce un tejido nuevo que es implantado en el paciente. Con el tiempo, el andamio se degrada y es sustituido por la ECM creada por las mismas células<sup>[12]</sup>.

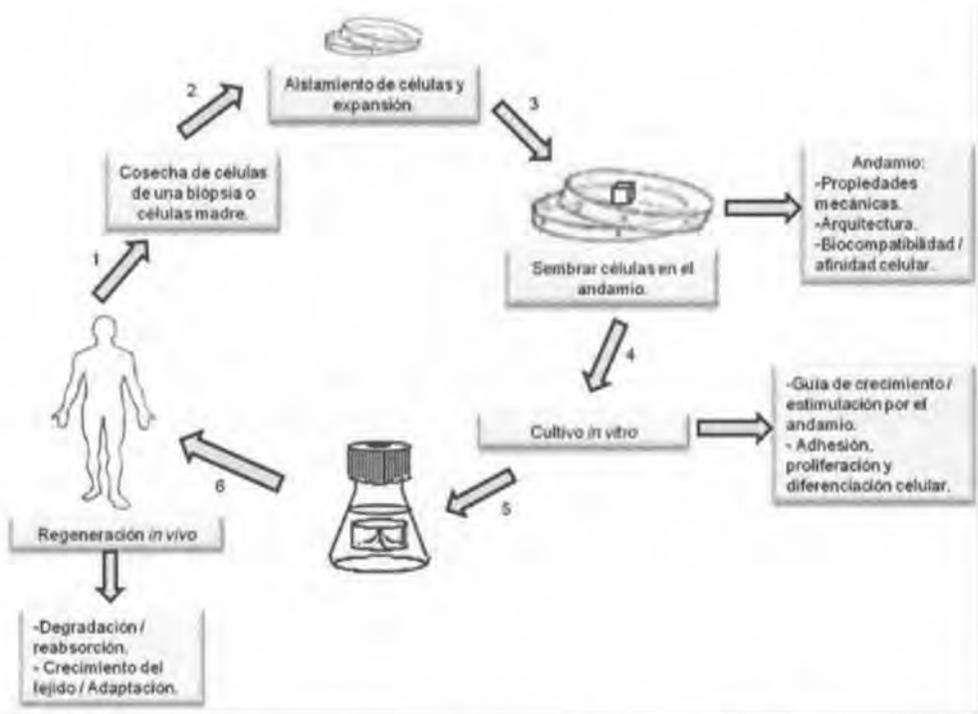


Figura 1.4. Esquema del proceso general de la ingeniería de tejidos<sup>[10]</sup>.

## **Diseño de andamios**

Las células aisladas no pueden formar nuevos tejidos por sí mismas. La mayoría de las células de los órganos primarios, son dependientes del anclaje y requieren ambientes específicos, con la presencia de un material de soporte para actuar como una plantilla para el crecimiento tridimensional<sup>[13]</sup>. Los soportes artificiales, denominados andamios, son diseñados y desarrollados tratando de imitar a la matriz extracelular del tejido original; éstos deben poseer ciertas características como: porosidad, tamaño de poro, características superficiales, biodegradabilidad y propiedades mecánicas adecuadas, para lograr una respuesta biológica favorable.

### ***Porosidad y tamaño de poro***

La estructura porosa interconectada es un factor importante para el crecimiento celular, ya que a través de ésta se difunden los nutrientes a las células, se eliminan sustancias de deshecho y permite la adecuada invasión celular hacia las capas más profundas. En cuanto al tamaño de poro mínimo necesario, un tema que se encuentra aún en debate, suele estar determinado por el diámetro de las células, el cual varía de un tipo de célula a otra. De tal manera que, si los poros son demasiado pequeños, las células podrían no infiltrarse al interior y si son demasiado grandes podrían no adherirse<sup>[13]</sup>.

En este sentido, diversos estudios proponen que el tamaño de poro óptimo para la neovascularización de un tejido es de 5  $\mu\text{m}$ . Mientras que para el crecimiento interno de fibroblastos se requiere de un tamaño de poro en el intervalo de 5  $\mu\text{m}$  a 15  $\mu\text{m}$ <sup>[13]</sup>.

### ***Características superficiales***

El tener una gran área superficial específica en el andamio es una característica deseada debido a que existe mayor área para la adhesión, crecimiento, migración y diferenciación celular<sup>[14]</sup>. Esto también implica mayor área para la adsorción de proteínas y factores de crecimiento. Las cuatro clases fundamentales de interacción en la adsorción de proteínas sobre un sustrato son: interacción electrostática, enlaces de hidrógeno, interacción hidrofóbica y las interacciones de transferencia de carga<sup>[15]</sup>.

En el caso de que el andamio sea utilizado como un sistema de liberación de fármacos, el área superficial, puede influir tanto en la etapa de carga del fármaco como en la etapa de liberación del mismo. La etapa de carga puede darse mediante dos mecanismos: incorporación del fármaco durante la elaboración de la matriz o mediante el mecanismo de adsorción posterior a la elaboración de ésta. En el primer mecanismo, se asegura que la mayor parte del fármaco estará distribuido cerca de la superficie, ya que se tiene una gran relación de superficie a volumen en la matriz, mientras que en el segundo caso, habrá una mayor área de adsorción del medicamento. Durante la fase de liberación, un gran área superficial específica, aumenta la rapidez de disolución del fármaco, resultando en un sistema de liberación más eficaz<sup>[16]</sup>.

Otro parámetro importante que caracteriza a las superficies, es su grado de hidrofilia o hidrofobia. Una manera simple y cuantitativa para definir el grado relativo de interacción entre la superficie de un líquido con un sustrato sólido, es la medición del ángulo de contacto. Cuando, el ángulo es inferior a 30°, la superficie del sustrato se designa hidrófila, ya que las fuerzas superficiales entre el líquido y el sustrato son casi iguales a las fuerzas de cohesión del agua en el "bulto"<sup>i</sup>.

---

<sup>i</sup> El "bulto" es la zona o fase de un material, que posee características uniformes y generalmente se encuentra lejos de su superficie.

Mientras que, en una superficie hidrófoba, el ángulo de contacto es mayor a  $90^\circ$ <sup>[17]</sup>.

*El método llamado de semiángulo es frecuentemente utilizado para determinar el ángulo de contacto. Este consiste en proyectar la figura de una gota colocada sobre la superficie del substrato sólido, posteriormente, se traza una línea recta desde el punto trifásico (sólido, líquido y gas) hasta el punto de máxima altura en la gota (*

Figura 1.). El ángulo formado entre la línea recta trazada y la línea que divide ambas superficies corresponde a la mitad del ángulo de contacto buscado.

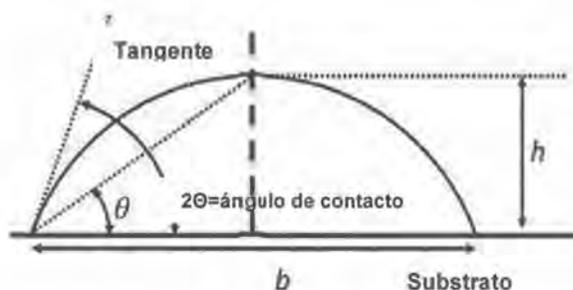


Figura 1.5. Medición del ángulo de contacto con el método del semiángulo.

La hidrofiliidad de la superficie es bien conocida como un factor clave para controlar la respuesta celular, aunque no es el único. Mientras menor sea el ángulo de contacto, más hidrofílica será la superficie. Algunos estudios han demostrado que en superficies más hidrófilas es mucho mayor la adhesión de las células. Por ejemplo, en el caso de los fibroblastos, se ha probado que poseen máxima adhesión cuando los ángulos de contacto varían entre  $60^\circ$  y  $80^\circ$ . Además, la hidrofiliidad de la superficie también está relacionada con la rapidez de propagación de las células y su capacidad de diferenciación, siendo también en las superficies hidrófilas, donde las células muestran una buena difusión, proliferación y diferenciación<sup>[18]</sup>.

### **Biodegradabilidad**

Macroscópicamente, se desearía que los andamios se degradaran por erosión de su superficie para preservar la integridad de la estructura el mayor tiempo posible, desde el momento del cultivo celular hasta que el nuevo tejido formado sustituya al soporte. La erosión superficial conduce a un perfil lineal de degradación por pérdida de masa, a la retención de propiedades mecánicas y conservación de la integridad morfológica.

La rapidez de degradación podría ser afectada por diversos parámetros: la naturaleza y cantidad de enlaces lábiles a la degradación por hidrólisis o enzimática, el grado de hidrofiliidad de la superficie, la presencia y cantidad de zonas tanto cristalinas como amorfas, entre otras<sup>[19]</sup>.

### ***Propiedades mecánicas***

El módulo de elasticidad de un andamio indica la mayor o menor deformación que experimenta éste ante la aplicación de cargas externas. La importancia de su estudio radica en que es un factor que puede afectar la morfología, adhesión y procesos de locomoción celular.

Muchas células se extienden, adhieren y sobreviven mejor en matrices rígidas, mientras que en otros casos lo hacen sobre matrices blandas ( $E < 50$  Pa). Sin embargo, no todos los tipos celulares parecen ser sensibles a la rigidez del sustrato, y no todos los tipos celulares mecano-sensitivos responden de forma similar a los cambios en la rigidez del sustrato<sup>[20]</sup>.

Estudios utilizando fibroblastos han demostrado que las células generan más fuerza de tracción y desarrollan una morfología deseable (más amplia y extendida) en sustratos rígidos que en sustratos flexibles. También se demostró que las células migran preferentemente de un sustrato flexible a un sustrato rígido ( $E > 50$  Pa)<sup>[20]</sup>.

Así como hay posturas que afirman que los andamios deben poseer características mecánicas muy similares a aquellos tejidos u órganos que van a sustituir<sup>[21]</sup>, es importante señalar que es un tema que aún se encuentra en debate.

## 1.4 EQUIVALENTES DE PIEL

### Sustituto de piel Ideal

El sustituto de piel ideal, debe cumplir con las siguientes características<sup>[22]</sup>:

- Adherencia rápida y sostenida a la superficie de la herida.
- Impermeabilidad a las bacterias exógenas.
- Permeabilidad al vapor de agua.
- Estructura interna que permita la migración, la proliferación y el crecimiento celular.
- Flexibilidad que permita un buen contorno en las superficies y suficiente elasticidad para el movimiento de los tejidos subyacentes.
- Resistencia a la fricción y a las fuerzas de tensión.
- Biodegradabilidad adecuada.
- Fácil uso.
- Bajo costo.
- Vida útil ilimitada.
- Requisitos mínimos de almacenamiento y preservación del sustituto de piel.
- Ausencia de antigenicidad.
- Ausencia de toxicidad local y sistémica.
- Capacidad de reemplazar las dos capas de la piel en un solo acto quirúrgico.

- Buenos resultados estéticos y funcionales a largo plazo.

### **Sustitutos de piel comerciales**

En los últimos 30 años, la ingeniería de tejidos ha venido desarrollando diferentes sustitutos o equivalentes cutáneos que constituyen un avance significativo en el tratamiento de los problemas de la piel.

Diversos sustitutos de piel han sido diseñados y aprobados, sin embargo, éstos todavía están lejos de ser ideales y a menudo sufren de una variedad de problemas que incluyen: contracción en la herida, formación de cicatrices queloides, incompatibilidad con el tejido huésped, costos elevados, procesos de fabricación complejos, fallas estructurales, degradación en tiempos inadecuados, falta de vascularización y falta de resistencia mecánica al ser implantados<sup>[23]</sup>.

Adicionalmente, estos productos no se encuentran disponibles para la mayoría de la población en nuestro país. Los sustitutos de piel pueden ser clasificados como constructos dérmicos, epidérmicos o dermo-epidérmicos, según la capa de la piel que se desee ayudar a regenerar y de acuerdo al número de capas del cual se compone pueden clasificarse como monocapa o multicapa (Tabla 1.1 y Tabla 1.2).

Tabla 1.1.- Características de sustitutos de piel comerciales según la capa que ayuda a recuperar. a Producto comercializado; n/a, no aplicable y n/e, no encontrado<sup>(19)</sup>.

	Dermoepidérmico		Dérmico		Epidérmico	
	Karoskin <sup>a</sup>	Apligraf <sup>a</sup>	Integra <sup>a</sup>	Dermagraft <sup>a</sup>	MySkin <sup>a</sup>	CellSpray <sup>a</sup>
Degradabilidad	Rechazo más que degradación	1-2 meses	Vida media: 30 días	Degradación por hidrólisis. 20 a 30 días	< 29 días	n/e
Duración de cobertura	Temporal	Temporal	Semi permanente	Temporal	Permanente	Permanente
Neo dermis	Dermis se revasculariza e integra al lecho de la herida. La epidermis es rechazada de 3-4 semanas posteriores a la implantación	Libera componentes de matriz extracelular, citoquinas y factores de crecimiento	Formación de neo dermis completa de 15-20 días	Re-epitelización de la herida y cierre por la migración de queratinocitos de bordes.	Sólo aplicables en injerto de espesor parcial, no en heridas de espesor total	Sólo aplicables en injerto de espesor parcial, no en heridas de espesor total
Vida útil	Ilimitada al ser liofilizada	5-10 días	2 años	Más de 6 meses	3 días	n/e
Precio (cm <sup>2</sup> ,2007, MX)	\$12.35	\$292.20	\$68.34	\$147.00	n/e	n/e

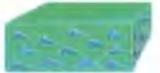
	Dermoepidérmico		Dérmico		Epidérmico	
	Karoskin <sup>a</sup>	Apligraf <sup>a</sup>	Integra <sup>a</sup>	Dermagraft <sup>a</sup>	MySkin <sup>a</sup>	CellSpray <sup>a</sup>
Estabilidad mecánica	La liofilización mejora la estabilidad	Requiere manejo delicado	Fácil manejo	Fácil manejo	Fácil manejo y aplicación debido a la capa soporte de silicón	Muy frágil y difícil de manejar
Vascularización	Vascularización inicial, sin embargo, el posterior rechazo del injerto.	16 % hasta 41 %	10-14 días	Se facilita mediante el crecimiento fibrovascular	No se puede utilizar para las heridas de espesor completo	Depende de la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular.
Etapas	Múltiple ya que requieren reemplazo	Necesidad de coinjerto autólogo con células epiteliales en quemaduras de espesor completo	2 etapas (mediante injerto de espesor parcial)	2 etapas (mediante injerto de espesor parcial)	Más de 12 aplicaciones individuales	1 etapa
Esquema						
Material	Piel humana nativa con células dérmicas y epidérmicas	Colágeno bovino	Polisiloxano, colágeno bovino y glucosaminoglicanos	Ácido poliglicólico/Ácido poliláctico	Capa base de silicón recubierta con una formulación	n/a

Tabla 1.2. Sustitutos o equivalentes de piel bicapa que son comerciales<sup>[20]</sup>.

Nombre comercial	Representación esquemática	Capas	Precio por $c^2$ (MXN)
Biobrane		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Polidimetilsiloxano (PDMS)</li> <li>2. Malla de nailon (nylon) recubierta con colágeno para mayor adherencia celular</li> </ol>	\$9.8
Transcyte		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. PDMS</li> <li>2. Malla de nailon (nylon) sembrada in vitro con fibroblastos neonatales</li> </ol>	\$160.4
Apligraf		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Queratinocitos neonatales</li> <li>2. Colágeno sembrado con fibroblastos neonatales</li> </ol>	\$289.4
Integra		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Película de PDMS</li> <li>2. Matriz porosa de colágeno y glucosaminoglicanos</li> </ol>	\$67.7

## 1.5 TÉCNICA DE ELECTROHILAMIENTO

El electrohilamiento es uno de los procesos más utilizados en la actualidad para la fabricación de nanofibras. Principalmente debido a que proporciona un método simple y una relación costo-efectividad significativa para la producción de fibras largas y uniformes de una gran variedad de polímeros y mezclas de polímeros. El interés en la obtención de nanofibras radica en que éstas proporcionan una alta relación de área superficial a volumen, alta porosidad y baja densidad, que son factores importantes en el diseño de andamios para la ingeniería de tejidos<sup>[24]</sup>.

La técnica consiste en inducir a una disolución de polímero a vencer las fuerzas de tensión superficial a la salida de un capilar. Al salir la disolución, ésta se mueve a través de un campo eléctrico, para que de acuerdo a las fuerzas externas e internas experimentadas por el chorro, éste se elongue y luego de que el disolvente sea evaporado, segmentos de fibras sean depositadas en un sustrato determinado<sup>[25]</sup> como se esquematiza en la Figura 1..



Figura 1.6. Representación esquemática de la técnica de electrohilamiento<sup>[26]</sup>.

Cuando se aplica un campo eléctrico entre la aguja y el colector, la migración de electrones desde el cátodo al ánodo provoca la acumulación de carga en la superficie de la disolución (Figura 1.). Como resultado de la repulsión de las cargas iguales en la superficie del líquido a la salida del capilar, aparecen fuerzas opuestas a las de la tensión superficial, por lo que son establecidos esfuerzos de corte en el líquido. A medida que se incrementa la intensidad del campo eléctrico, la superficie semiesférica de la disolución en la punta del capilar se alarga hasta formar un cono, conocido como el cono de Taylor. Cuando el voltaje es lo suficientemente alto de tal manera que supera un valor denominado voltaje crítico ( $V_c$ ), un chorro de la disolución cargado se expulsa desde la punta del cono de Taylor y viaja al electrodo de polaridad opuesta<sup>[27]</sup> (Figura 1.).

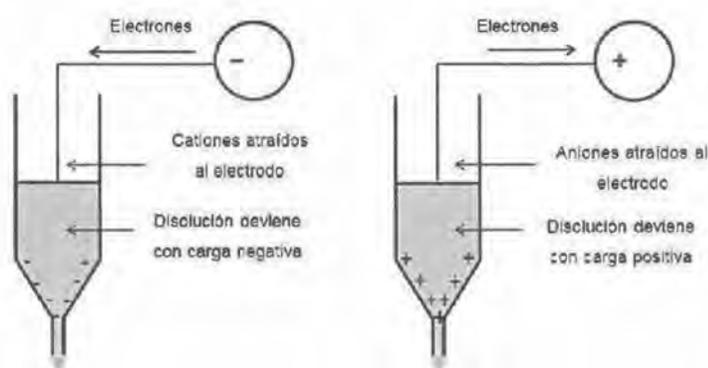


Figura 1.7. Diagrama esquemático de la aguja del electrohilamiento con electrodo positivo y negativo: la polaridad del electrodo determina la polaridad de la acumulación de carga en la disolución.

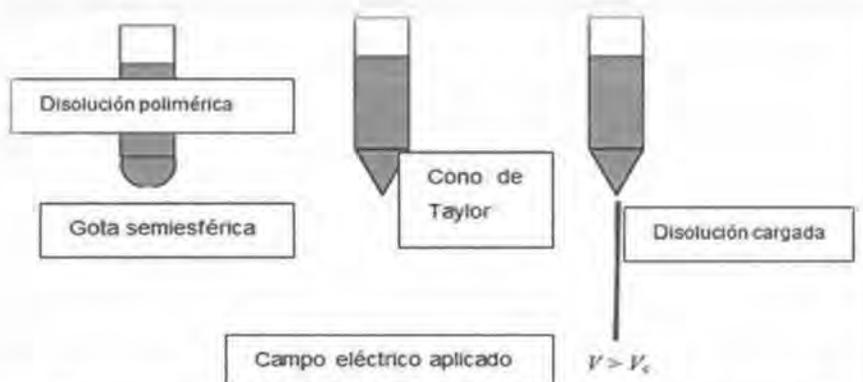


Figura 1.8. Efecto de las fuerzas de un campo eléctrico aplicadas a una disolución en un capilar.<sup>[28]</sup>

Aunque las mallas de nanofibras electrohiladas poseen alta porosidad (generalmente en un intervalo de 70 % a 90 %), el principal problema de los andamios electrohilados es su baja capacidad para formar estructuras tridimensionales y, la baja infiltración celular en las capas más profundas debido a que el tamaño de poro suele ser menor de  $10\ \mu\text{m}$ <sup>[29]</sup>. Como este valor es menor que el tamaño de los fibroblastos ( $\sim 20\ \mu\text{m}$ ), las células sembradas en la malla de nanofibras suelen crecer principalmente en la superficie de la malla, con una penetración mínima<sup>[29]</sup> en el interior<sup>ii</sup>. Recientemente se ha reportado que las células se pueden organizar y adherir bien alrededor de fibras con diámetros mucho más pequeños que el de ellas<sup>[30]</sup>.

Generalmente, el tamaño de poro en las mallas de nanofibras está directamente relacionado con el diámetro de la fibras y por lo tanto, la infiltración de células se puede regular en cierta medida aumentando el diámetro de éstas<sup>[29]</sup>. Este obstáculo también puede ser superado mediante las diversas técnicas para el incremento del tamaño de poro recientemente desarrolladas, como la aplicación de ultrasonido<sup>[31]</sup>, el electrohilado simultáneo de dos tipos de polímeros con eliminación posterior de un tipo de fibras<sup>[32]</sup>, y la utilización de colectores de diferentes morfologías<sup>[33]</sup>. A su vez, el problema del espesor, en el caso de la piel, suele ser favorable, ya que estudios realizados comparando a un producto comercial llamado "Integra" con un aloinjerto, mostró mejores resultados estéticos en "Integra" que se asume fue debido a su menor espesor<sup>[34]</sup>.

De manera general, los parámetros a tomar en cuenta en el electrohilamiento y sus principales consecuencias se resumen en la Tabla 1.3 y Tabla 1.4.

---

<sup>ii</sup> Se ha encontrado que las células pueden infiltrarse en estos andamios electrohilados hasta  $50\ \mu\text{m}$  de profundidad.

Tabla 1.3.- Parámetros de la disolución y sus efectos<sup>[27]</sup>.  $V_a$  (↑) y  $b$  (↓).

PARÁMETRO		EFEECTO
CONCENTRACIÓN	↑	Más viscosidad dificulta el paso de la solución a través del capilar.
	↓	Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al plato colector.
TENSIÓN SUPERFICIAL	↑	Aparición de defectos en forma de glóbulos o perlas (beads) en las fibras.
	↓	Obtención de fibras uniformes.
CONDUCTIVIDAD	↑	Mayor transporte de cargas, mayor estiramiento de la disolución, fibras más delgadas.
	↓	Menor transporte de cargas, menor estiramiento de la solución, fibras más gruesas.
CONSTANTE DIELECTRICA DEL DISOLVENTE	↑	Reduce la formación de glóbulos y el diámetro de las fibras resultantes.
	↓	Aumenta la formación de glóbulos y el diámetro de las fibras

Tabla 1.4. Parámetros del proceso y sus efectos<sup>[27]</sup>.  $V_m a$  (↑↑) y  $m b$  (↓↓).

PARÁMETRO		EFEECTO
VOLTAJE	↑↑	Fibras gruesas, distorsión del chorro, aparición de glóbulos.
	↓	Poco impulso para la llegada de la disolución al plato colector.
RAPIDEZ DE INYECCIÓN	↑	Fibras más gruesas, glóbulos con mayores tamaños.
	↓	Mayor tiempo para evaporación del disolvente, fibras sin defectos.
DISTANCIA AL COLECTOR	↑	Las fibras pueden romperse debido a su propio peso. Mayor estiramiento de la solución, obtención de fibras delgadas.
	↑↑	Aparición de glóbulos en las fibras al trabajar con muy altas
	↓↓	o muy bajas distancias.

A pesar de que son muchos los factores que podrían influir en la formación de las fibras, se ha reportado que los factores clave en el control del diámetro y morfología de éstas son la concentración y el disolvente utilizado. Siendo la concentración a través de la cual se controla la viscosidad y el disolvente, mediante el que es posible controlar la volatilidad, constante dieléctrica y conductividad eléctrica de la disolución<sup>[28]</sup>.

### Efecto de la concentración

Existe una concentración mínima, por debajo de la cual, la rapidez de flujo del polímero es demasiado alta para estabilizar al chorro, por lo que suelen obtenerse gránulos de polímero en lugar de fibras ( Figura 1.A). Más allá de este límite inferior, es posible obtener una combinación de glóbulos y fibras ( Figura 1.B y Figura 1.C); y a medida que la concentración se incrementa aún más, la estructura fibrosa estabilizada comienza a mostrar un aumento en el diámetro de la fibra<sup>[27]</sup> ( Figura 1.D).

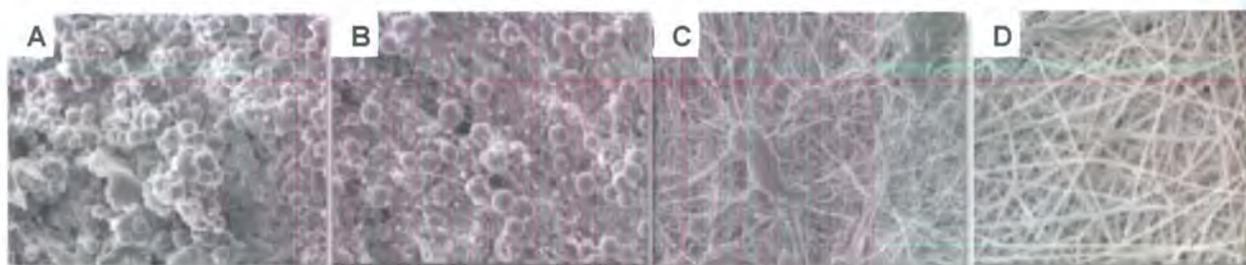


Figura 1.9. Efecto de la concentración en la estructura de las fibras electrohiladas de D, L-PLA. A) 20 % (m/m) B) 25 % (m/m), C) 30 % (m/m) y D) 35 % (m/m) [26]. Con  $m$  = masa.

Esto se explica debido a que en disoluciones más viscosas, existe un gran número de enredos por cadena polimérica lo cual es un pre-requisito para la formación de un chorro estable, y este fenómeno también compensa el efecto

perjudicial del aumento de la tensión superficial, que tiende a encoger el chorro y crear fibras con presencia de glóbulos<sup>[28]</sup>.

Para cada combinación polímero–disolvente, también hay un límite superior de la concentración, más allá del cual la gota en la punta de la aguja se seca antes de la aparición de un chorro estable. Entre estos límites inferior y superior, la morfología, el diámetro de la fibra y la separación entre fibras dependen en gran medida de la concentración de la disolución<sup>[27]</sup>.

### **Efecto de la masa molar de los polímeros**

La masa molar de los polímeros posee un efecto significativo en las propiedades de las disoluciones preparadas a partir de éstos y por lo tanto en la morfología de las fibras obtenidas en el proceso de electrohilamiento.

En la técnica de electrohilamiento, se utilizan disoluciones de polímeros con alta masa molar, ya que éstos proporcionan una viscosidad adecuada. Se ha notado que cuando se utilizan polímeros de muy baja masa molecular se suelen obtener grumos en lugar de fibras, mientras que al utilizar altas masas molares se obtienen fibras con mayores diámetros promedio. Sin embargo, el empleo de polímeros con altas masas molares no es indispensable ya que se han reportado la obtención de fibras a base de polímeros de baja masa molar<sup>[35]</sup>.

### **Efecto del disolvente**

La selección de un sistema de disolventes apropiado es crucial para el éxito del proceso de electrohilamiento. Además de su necesaria afinidad para disolver al polímero, la morfología de las nanofibras se ven significativamente afectadas por

la razón de evaporación o volatilidad del disolvente, pudiendo resultar en fibras de cilíndricas a totalmente planas o incluso llegar a la coalescencia en el plato colector, si el disolvente no se evapora adecuadamente.

También, el aumento de la conductividad eléctrica de la disolución, mediante la elección de un sistema de disolventes con conductividad eléctrica elevada, facilita la producción de fibras libres de glóbulos con estructuras uniformes debido a su mayor densidad de carga<sup>[28]</sup>. La conductividad eléctrica de las disoluciones normalmente utilizadas en el electrohilamiento tienen ordenes entre  $10^{-7} \text{ Sm}^{-1}$  y  $10^{-3} \text{ Sm}^{-1}$ <sup>[36]</sup>.

#### **Efecto de la diferencia de potencial aplicada.**

Cuando se aumenta la tensión aplicada, la disolución puede ser descargada más rápidamente. En general, el diámetro de las fibras disminuye cuando la intensidad del campo eléctrico se incrementa ya que el chorro de polímero se ramifica en chorros más pequeños durante el proceso y sufre de mayores estiramientos.

#### **Efecto de la distancia entre el capilar y el colector**

La distancia de depositación de las fibras también tiene un efecto significativo sobre la morfología de las fibras obtenidas. A distancias pequeñas de depositación, normalmente se asocian fibras húmedas que inciden en la superficie del sustrato. Este impacto puede conducir a un colapso, aplanamiento y la coalescencia de las fibras, ya que el disolvente no se evaporó por completo al momento del impacto. Mientras que a distancias mayores, el disolvente se

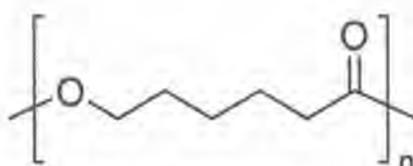
evapora de las fibras completamente y se pueden obtener estructuras fibrosas de sección transversal circular.

## 1.6 POLÍMEROS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DEL ANDAMIO

### Policaprolactona

La policaprolactona (PCL) (

*Figura 1.*) es un poliéster semicristalino, biodegradable, con temperatura de transición vítrea baja y una temperatura de fusión por arriba de la temperatura ambiente, esto le permite permanecer en estado elastomérico a temperatura



ambiente (24° C), como se observa en la Tabla 1.5.

*Figura 1.10. Estructura de la policaprolactona.*

*Tabla 1.5. Propiedades típicas de la policaprolactona<sup>[13]</sup>.*

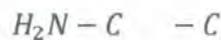
Polímero	Punto de fusión (°C)	Temperatura de transición vítrea (°C)	Temperatura de descomposición (°C)
PCL	58-63	(-65)-(-60)	>350

La PCL, se degrada por hidrólisis de sus enlaces éster en condiciones fisiológicas y ha recibido por lo tanto, una gran cantidad de atención para su uso como un biomaterial biodegradable implantable.

Aunque la adhesión celular mejora con el carácter hidrófilo, la PCL electrohilada es hidrofóbica con un ángulo de contacto de agua de aproximadamente 118°. Sin embargo, el carácter hidrofóbico puede ser mejorado al combinarla con polímeros más hidrofílicos<sup>[37]</sup>, con tratamientos por plasma o tratamientos ácidos<sup>[38]</sup>.

### Gelatina

Las proteínas, poseen una estructura molecular constituida fundamentalmente por cadenas polipeptídicas. Estas cadenas están formadas por la unión repetida de aminoácidos. Los aminoácidos tienen la siguiente forma:



Donde unos aminoácidos se diferencian de otros por el sustituyente R. Cuando los aminoácidos se unen para formar la cadena polimérica, dan lugar a enlaces peptídicos como se muestra en la Figura 1.2. El enlace peptídico es desde el punto de vista químico, una amida.

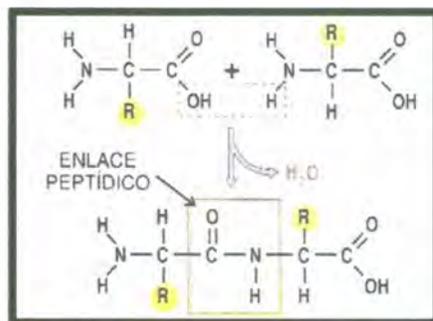


Figura 1.2. Formación del enlace peptídico en las proteínas.

El grupo peptídico, produce hasta 9 bandas características en los espectros de infrarrojo, llamadas: A, B, I, II, III, IV, V, VI y VII. Las bandas Amida I y Amida II,

son las dos principales bandas de los espectros IR de las proteínas. Las proteínas pueden adoptar también, una estructura secundaria o conformacional que puede ser: estructura de hélice  $\alpha$ , lámina  $\beta$  o de cadena al azar, dependiendo del pH y la temperatura del medio.

La gelatina es una de las proteínas más abundantes, extraída del cuerpo de animales. Se obtiene mediante la hidrólisis parcial del colágeno (en especial del colágeno tipo I), rompiendo la triple hélice de la estructura del colágeno, para obtener moléculas más simples (Figura 1.3). Es un polímero rígido y sus principales características se pueden observar en la Tabla 1.6.

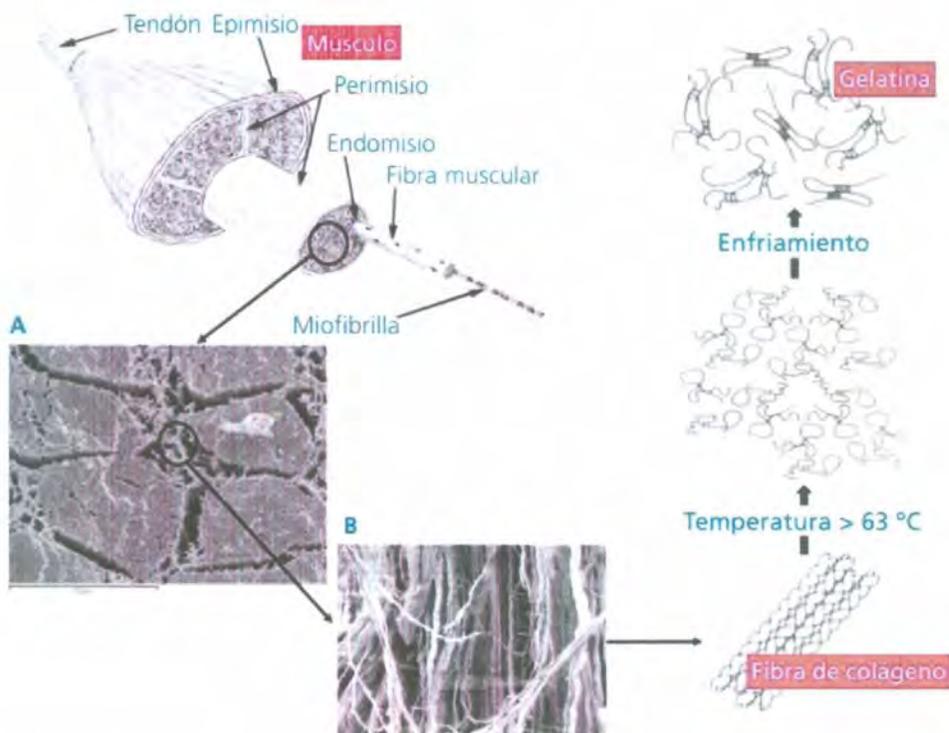


Figura 1.3. Esquematación de la obtención de gelatina a partir de colágeno de un tendón<sup>[39,40]</sup>.

Tabla 1.6. Propiedades típicas de la gelatina tipo A<sup>[41,42]</sup>.

Polímero	Temperatura de descomposición (°C)	Módulo de Young (GPa)	Elongación (%)
Gelatina	~269	0.2	20.7

Su importancia radica en las propiedades que posee tales como biodegradabilidad, biocompatibilidad, bioabsorción y no inmunogenicidad. Además, se ha demostrado que la gelatina posee un alto efecto hemostático y contiene abundantes grupos hidrofílicos amino y carboxílicos<sup>[43]</sup>.

En general, existen dos tipos de gelatina: tipo A y tipo B. La principal diferencia entre los dos tipos es el punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico (*IEP*) está definido como el pH (potencial de hidrógeno) en el cual las cargas positivas igualan a las cargas negativas.

El punto isoeléctrico es una propiedad determinada por los tratamientos de las materias primas y el tipo de proceso por el que se obtiene el polímero. Las gelatinas tipo A (se obtienen por tratamiento ácido) presentan un IEP que oscila entre 6 - 9.5. Las gelatinas tipo B (se obtienen por tratamiento alcalino) tienen un IEP que oscila entre 4.5 – 5.6.

Estructuralmente las gelatinas tipo A y B difieren en la presencia o número de ciertos aminoácidos principalmente debido a los tratamientos por los cuales son obtenidos como se observa en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7. Composición de aminoácidos del colágeno y la gelatina tipo A y B (Por cada 100 unidades monoméricas)<sup>(44)</sup>.

Aminoácido	Colágeno tipo I (bovino)	Gelatina tipo A	Gelatina tipo B
Alanina	114	112	117
Arginina	51	49	48
Asparagina	16	16	-
Ácido aspártico	29	29	46
Glutamina	48	48	-
Ácido glutámico	25	25	72
Glicina	332	330	335
Histidina	4	4	4
4-Hidroxiprolina	104	91	93
$\alpha$ -Hidroxilisina	5	6	4
Isoleucina	11	10	11
Leucina	24	24	24
Lisina	28	27	28
Metionina	6	4	4
Fenilalanina	13	14	14
Prolina	115	132	124
Serina	35	35	33
Treonina	17	18	18
Tirosina	4	3	1
Valina	22	26	22

Se puede observar de la Tabla 1.7, que la gelatina de Tipo A es la más parecida en composición al colágeno, por lo que se esperaría compartieran muchas propiedades importantes.

## 1.7 ESTABILIZACIÓN DE LAS FIBRAS

Los biopolímeros como el colágeno, la gelatina, poli (vinil alcohol), dextrano y quitosano son solubles en medios acuosos (como lo es el entorno biológico en una herida), por lo que se requiere de un tratamiento de estabilización. Una de las maneras de hacer insolubles a estos polímeros es denominado reticulación o entrecruzamiento. El entrecruzamiento es un proceso por medio del cual las cadenas de polímero quedan unidas entre sí por enlaces covalentes cruzados, generando enlaces químicos que antes no existían en el polímero. La reticulación suele realizarse con agentes de entrecruzamiento tales como glutaraldehído (GTA), acetaldehído (AA), formaldehído (FA), diglicidil metacrilato (GMA), y otros productos químicos<sup>[41]</sup>. Para el caso del entrecruzamiento con GTA, la reticulación de proteínas como colágeno y gelatina implica la reacción de los grupos amina en los aminoácidos lisina e hidroxilisina de las cadenas polipeptídicas con los grupos aldehído del GTA como se observa en la Figura 1.4.

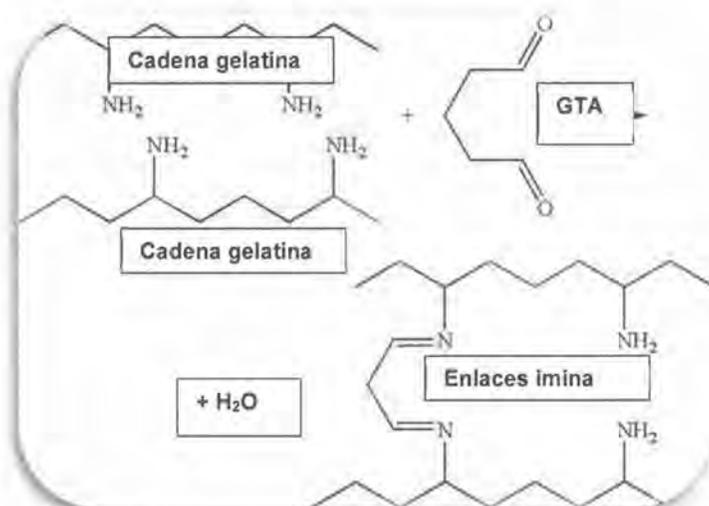


Figura 1.4. Entrecruzamiento de la gelatina mediante GTA que da como resultado la formación de nuevos enlaces imina entre cadenas.

Las aminas primarias reaccionan con los aldehídos para formar iminas, denominadas también bases de Schiff. El mecanismo de la reacción se inicia con la adición nucleofílica de la amina al grupo carbonilo. A continuación, la protonación del oxígeno, seguida de la desprotonación de la amina, conduce a un producto inestable denominado carbinolamina que se convierte finalmente en la imina por protonación seguida de pérdida de agua.

### 1.8 TOXICIDAD DEL GTA

A pesar de que el proceso de entrecruzamiento con GTA disminuye en gran medida la solubilidad en agua de polímeros como la gelatina, también ha sido relacionado con reacciones inflamatorias, citotoxicidad y calcificación<sup>[45]</sup>.

La fuente potencial de citotoxicidad de los agentes entrecruzantes como el GTA, pueden ser los grupos funcionales que permanecen activos después del proceso de entrecruzamiento, tales grupos funcionales son los grupos aldehído<sup>[46]</sup>.

Los informes de efectos citotóxicos por glutaraldehído fueron, en general, debido a la utilización de altas concentraciones (3 ppm ó 64 mg de GTA por gramo de polímero)<sup>[47,48]</sup>. Adicionalmente, en base a amplios estudios de laboratorio elaborados hasta la fecha, el glutaraldehído no se clasifica como un agente teratogénico, mutagénico "*in vivo*", o carcinógeno<sup>[49]</sup>.

En un estudio realizado en micro partículas de quitosano-PVA para aplicaciones biomédicas, a pesar del uso de glutaraldehído, los resultados no revelaron ningún efecto adverso sobre la viabilidad de las células, aún cuando no se utilizó ningún tratamiento de inactivación de los grupos aldehído residuales<sup>[50]</sup>.

Mientras que en un estudio realizado en andamios de colágeno y quitosano, para aplicaciones de ingeniería de tejidos de la piel, se determinó que los residuos del GTA (9.4 mg por gramo de polímero) pueden ser ignorados gracias a los resultados de las pruebas de cultivo celular "*in vivo*", en animales. Puntualizando

que, el secado en horno de vacío durante 5 horas, la realización de diversos lavados con agua destilada o la neutralización con glicina, son un método efectivo para remover los residuos de GTA<sup>[46]</sup>.

## 1.9 DISOLVENTES RESIDUALES

La toxicidad es una gran preocupación cuando se utilizan biomateriales para aplicaciones médicas. En los casos en los que se utilizan disolventes fluorados durante el procesamiento, es importante verificar que los residuos que pudieran resultar perjudiciales no permanezcan en los materiales.

Como un ejemplo, el colágeno tipo I, se puede disolver en hexafluoruro-2-propanol (HFP) para ser electrohilado. Recientemente, se ha determinado que las fibras resultantes pueden contener hasta 1600 ppm de HFP residual. Debido a que el HFP es un análogo fluorado del isopropanol, que es un agente esterilizante, posee el potencial de influenciar negativamente el cultivo celular. Sin embargo, un tratamiento posterior de vacío y de calentamiento puede reducir el HFP a niveles muy por debajo de las 100 ppm<sup>[51]</sup>. Si estos niveles son lo suficientemente bajos como para eliminar por completo los efectos biológicos, sin embargo, permanece incierto. Por lo que estudios más detallados de los efectos biológicos de los disolventes residuales, necesitan ser realizados.

Una manera de identificar la presencia de disolvente residual consiste en llevar a cabo un análisis elemental de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) para detectar la presencia del elemento representativo del disolvente, en este caso el flúor.

## ANTECEDENTES

---

Los injertos de piel y la cirugía plástica surgen oficialmente en el siglo VI a.C., cuando cirujanos de la India realizan la primera reconstrucción de nariz utilizando injertos. Esta técnica es posteriormente trasladada a la medicina occidental por Gaspare Tagliacozzo, un médico italiano del siglo XVI<sup>[52]</sup>.

Desde entonces, en la búsqueda de sustitutos para la piel, surgen diversos tipos de injertos, desde la utilización de injertos de la propia piel del paciente, injertos de un donante vivo de la misma especie, injertos de un cadáver e incluso injertos de la piel de otras especies. Inconvenientemente, surgieron con éstos diversas preocupaciones como la posibilidad de transmisión de infecciones, la incompatibilidad con el tejido huésped y la escasez de donantes<sup>[52]</sup>.

En la década de los ochenta, se optó por un camino diferente y se comenzó a pensar en crecer piel y otros tejidos en un laboratorio, resultando en el nacimiento de la ingeniería de tejidos<sup>[52]</sup>. Las primeras propuestas consistían en modelos multicapa a base de polímeros. Uno de los primeros trabajos, propone una membrana bicapa, mejor conocido por su nombre comercial: "Integra"<sup>[53]</sup>. Sin embargo, existen diversas desventajas en el uso de este producto ya que es relativamente caro en comparación con los aloinjertos cadavéricos de los bancos de piel, requiere de un procedimiento de varias etapas y no es cultivado con células "in vitro".

Actualmente diversos productos basados en la ingeniería de tejidos han sido aceptados por la asociación de administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos de América (FDA, por sus siglas en inglés); sin embargo, estos productos no son todavía ideales, y a menudo sufren de una variedad de problemas, incluyendo: contracción en la herida, formación de cicatrices, incompatibilidad con el tejido huésped, costos elevados, procesos de fabricación complejos, fallas estructurales, degradación en tiempos inadecuados y falta de

resistencia mecánica al ser implantados<sup>[23]</sup>. Adicionalmente, estos productos, no se encuentran disponibles para la mayoría de la población en nuestro país, por lo que se continúa en la búsqueda del sustituto de piel ideal.

La técnica de electrohilamiento ha sido ampliamente utilizada en el diseño de andamios para la ingeniería de tejidos de la piel, hueso, cartílago, nervios y tendón<sup>[54]</sup>. En el caso de ingeniería de tejidos de la piel, se han desarrollado diversos apósitos<sup>[41]</sup> y sustitutos dérmicos mediante esta técnica<sup>[55,56,57]</sup>.

En un principio, el material más idóneo que fue considerado en la fabricación de andamios fue el colágeno, gracias a que los fibroblastos cultivados en él presentan buena adherencia y a que es un material encontrado naturalmente en la piel. Sin embargo, ciertas de sus propiedades, como: la pobre estabilidad dimensional al entrar en contacto con fluidos; pobre resistencia mecánica "*in vivo*" y durante el trasplante, baja capacidad de deformación y la posibilidad de una respuesta antigénica; han influido adversamente en su uso<sup>[58]</sup>.

Por lo que se comienza a utilizar la gelatina como un derivado del colágeno que mantiene la mayoría de sus propiedades en cuanto a composición pero que era completamente no inmunogénico y mucho menos costoso.

A pesar de las mejoras, el material aun poseía baja resistencia mecánica y alta rapidez de degradación. Por lo que diversos trabajos han propuesto la adición de una capa de polímero sintético que cumpla la función de una pseudoepidermis<sup>[8, 59]</sup>, la cual proporcionaría cobertura al área de la herida para prevenir infecciones adicionales. Su estructura densa estaría diseñada para evitar que la humedad se evapore, pero con suficiente porosidad para permitir el intercambio de gases. Además, esta membrana hecha de un polímero sintético mecánicamente estable, debería suplementar la fuerza de la que carece la capa de polímeros naturales. Entre los polímeros sintéticos utilizados se encuentra la policaprolactona (PCL)<sup>[7]</sup>, el poli(ácido L-láctico)(PLLA)<sup>[60]</sup> y el poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)<sup>[7]</sup>.

Diversos polímeros sintéticos y naturales han sido utilizados para la fabricación de andamios nanofibrosos mediante electrohilamiento. Entre ellos, la gelatina<sup>[61]</sup>, la policaprolactona (PCL)<sup>[62]</sup> y sus mezclas<sup>[39,63,64]</sup>. Sin embargo, no se han encontrado reportes donde se electrohile una capa de PCL sobre una capa de fibras de gelatina. Por lo que en este trabajo se pretende combinar las ventajas de los polímeros naturales como la gelatina, con las de un polímero sintético biodegradable como la policaprolactona (PCL).

Entre los disolventes o sistemas de disolventes que han sido reportados en la literatura para la fabricación de fibras de PCL mediante electrohilamiento se encuentran el cloroformo, cloroformo/etanol, cloroformo/dimetilformamida (DMF), diclorometano (DCM), DCM/DMF, tetrahidrofurano (THF)/DCM/DMF, 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), entre otros<sup>[65,66]</sup>. La mayoría de estos disolventes y sistemas de disolventes conducen a la formación de fibras mediante electrohilamiento; sin embargo, el TFE, es uno de los pocos disolventes que se pueden utilizar sin la necesidad de un cosolvente o aditivo.

Para el caso de la gelatina, se han reportado disolventes tales como el ácido acético en agua desionizada, hexafluoruro-2-propanol (HFIP), 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) y ácido trifluoroacético (TFA)<sup>[67,68,69,70]</sup>. Siendo el TFE, uno de los disolventes de mediano costo que permite la formación de fibras adecuadas.

Las variables del proceso de electrohilamiento para la PCL y la gelatina, han sido reportadas en diversos estudios, con valores presentados en la Tabla A y Tabla B.

Tabla A. Valores del proceso de electrohilamiento reportados para la policaprolactona (PCL) en TFE.

Concentración (%) (m/v)	Masa molar (kDa)	Voltaje (kV)	Flujo (ml/h)	Distancia (cm)	D <sub>int</sub> Aguja (mm)	Ref.
12	80 000	11	2	20	18G	[65]
10	-	22	-	20	-	[71]

Tabla B. Valores del proceso de electrohilamiento reportados para la gelatina.

Concentración (%) (m/v)	Disolvente	Voltaje (kV)	Flujo (ml/h)	Distancia (cm)	D <sub>int</sub> Aguja (mm)	Ref.
Gelatina tipo A						
8	HFIP	23	0.5	10	0.9	[74]
10	TFE	10	0.8	13	1.2	[75]

A pesar de que las fibras de gelatina se pueden obtener mediante electrohilamiento, al estar constituidas por esta proteína, son total o parcialmente solubles en agua. Por lo tanto, se hace necesaria la reticulación de las cadenas poliméricas, pudiendo ser por métodos físicos, sin embargo, los métodos químicos, han demostrado ser más efectivos. Entre los diversos agentes químicos utilizados para reticular las fibras de gelatina, el del glutaraldehído (GTA) es el más adecuado ya que es económico, eficiente, entrecruza en periodos de tiempo cortos y no compromete la estructura fibrosa de la membrana.

El enfoque convencional de reticulación con GTA consiste en la inmersión de las muestras en una disolución acuosa. Desafortunadamente, esta alternativa no es factible debido a la solubilidad de la gelatina en agua, por lo que se opta por la colocación de las fibras en un desecador sellado, cuya atmósfera interior está saturada con vapor de GTA<sup>[74]</sup>.

## **HIPÓTESIS**

---

Es posible obtener un andamio bicapa, con una capa interna de gelatina tipo A y una capa externa de PCL, mediante la técnica de electrohilamiento.

El electrohilamiento simultáneo de fibras de PCL y fibras de gelatina como una capa intermedia, así como la utilización de un colector giratorio en lugar de uno estático, evitará la delaminación entre capas.

## **OBJETIVOS**

---

### **1.10 OBJETIVO GENERAL**

Obtención de un andamio bicapa a base de PCL y gelatina tipo A, mediante la técnica de electrohilamiento y su caracterización fisicoquímica.

### **1.11 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Obtención de una membrana porosa con fibras a base de policaprolactona, mediante electrohilamiento.
2. Obtención de una membrana porosa con fibras a base de gelatina tipo A, mediante electrohilamiento.
3. Estabilización (insolubilización en agua) de las nanofibras de gelatina mediante el entrecruzamiento con glutaraldehído.
4. Obtención de un andamio bicapa, mediante el electrohilamiento secuencial, de una capa de fibras de PCL y una capa de fibras de gelatina.
5. Caracterización morfológica, fisicoquímica y mecánica de las membranas electrohiladas y el andamio bicapa mediante: microscopía electrónica de

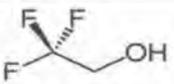
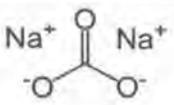
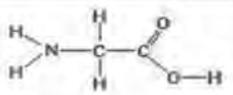
barrido (SEM), espectroscopia de infrarrojos (FTIR), pruebas de ángulo de contacto, pruebas de grado de hinchamiento, pruebas de pérdida de masa y tensión.

## Capítulo 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 2.1 MATERIALES

Los materiales utilizados durante el desarrollo experimental de este trabajo se presentan en la Tabla 2. 1.

Tabla 2. 1 Materiales utilizados durante el desarrollo experimental y sus características.

Material	Masa molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Punto ebullición (°C)	Marca	Pureza	No. Catálogo	Estructura
PCL	80,000	58-60		Perstorp		Capa™ 6800	
Gelatina tipo A	50 000-100 000			Sigma Aldrich		G2500	
Glutaraldehído	100.12		101	Sigma Aldrich	25 % en agua	G6257	
2,2,2-Trifluoroetanol	100.04		77-80	Sigma Aldrich	>99 %	T63002-500g	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	105.9		851	Sigma Aldrich	>99.5 %	S2127-500g	
Glicina	75.07			Sigma Aldrich	99%	G7126	
Fosfato buffer salino (PBS)			pH 7.4 a 24°C NaCl – 0.138 M KCl – 0.0027 M Sigma Aldrich			P3813-10pack.	

## 2.2 METODOLOGÍA GENERAL

A continuación se presenta un esquema que resume las etapas generales de este trabajo (Figura 2. 1).

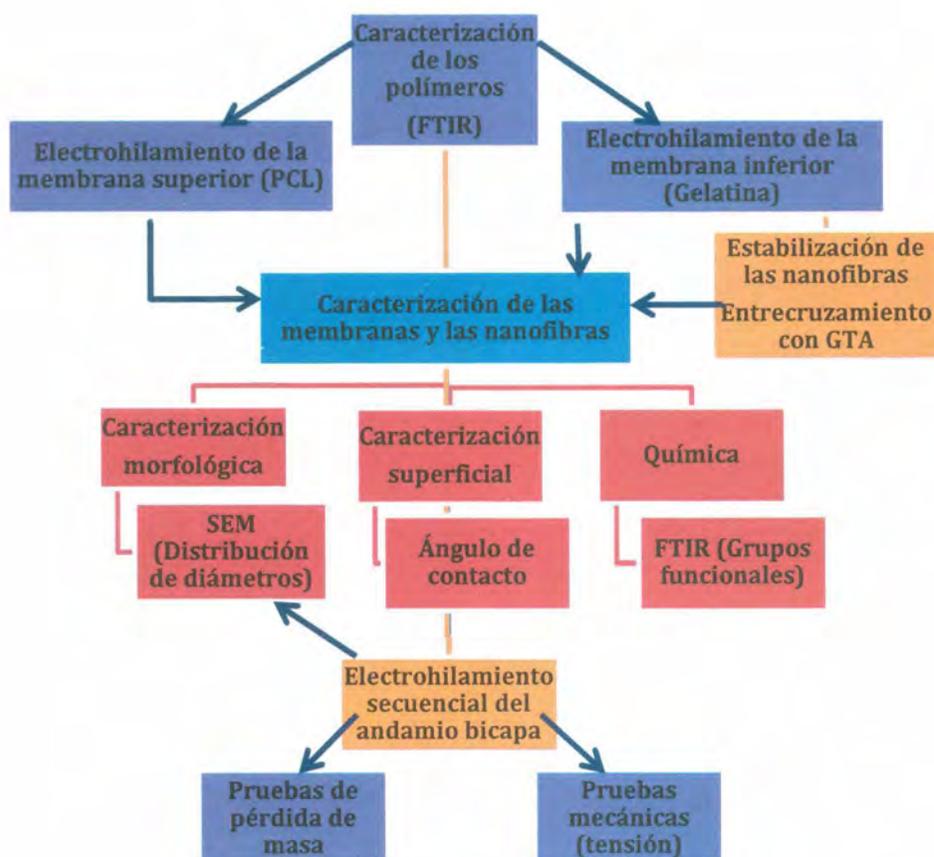


Figura 2. 1. Etapas generales y secuencia de desarrollo de la parte experimental.

## 2.3 OBTENCIÓN DE LAS FIBRAS

### Fibras de PCL

Las disoluciones de PCL se prepararon en viales a concentraciones de 10 %, 15 % y 20 % (m/v) en 2, 2, 2-trifluoroetanol (TFE); se mezclaron con agitación magnética durante 24 horas, a temperatura ambiente (24 °C) y posteriormente fueron colocadas en jeringas de 10 ml.

Posteriormente se llevó a cabo el proceso de electrohilamiento con los parámetros indicados en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

*Tabla 2. 2. Parámetros utilizados en el proceso de electrohilamiento de la PCL.*

Voltaje (kV)	Distancia al colector (cm)	Rapidez de inyección (ml/h)	Diámetro interior de la aguja (mm)
15	15	0.5	0.9

La configuración del equipo es mostrado en la Figura 2. 2:



Figura 2. 2. Configuración del equipo de electrohilado situado en el laboratorio de fisicoquímica de la unidad de materiales del CICY.

## Fibras de gelatina

Las disoluciones de gelatina en TFE, fueron preparados en viales a concentraciones de 5 %, 7.5 % y 10 % (m/v). Las disoluciones se mezclaron con agitación magnética durante 24 horas, a temperatura ambiente (24°C) y finalmente fueron colocados en jeringas de 10 ml.

A continuación se electrohiló la disolución, con los parámetros resumidos en la Tabla 2. 3.

*Tabla 2. 3 Parámetros para el electrohilamiento de las fibras de gelatina.*

Proceso			
Voltaje (kV)	Distancia al colector (cm)	Rapidez de inyección (ml/h)	Diámetro inferior de la aguja (mm)
10	15	0.8	0.9

## **2.4 OBTENCIÓN DEL ANDAMIO BICAPA**

Una vez seleccionadas las concentraciones adecuadas para las disoluciones de gelatina y PCL, se llevaron a cabo los procedimientos siguientes:

### **Método 1.- Colector plano**

1. Se electrohiló la membrana de PCL durante 4 horas.
2. A continuación se electrohiló la disolución de gelatina sobre la membrana de PCL durante 4 horas adicionales.
3. El andamio electrohilado bicapa fue sometido al proceso de entrecruzamiento con glutaraldehído.

### **Método 2.- Colector cilíndrico**

Para este método se intercambié el colector plano por un colector cilíndrico de 5mm de diámetro (recubierto con una delgada capa de poli(tetrafluoroetileno), para facilitar el desprendimiento del andamio), que se hizo girar a 240 rpm. Es importante señalar, que aunque los segmentos de piel son planos, en este trabajo se implementó el uso del colector cilíndrico rotatorio, únicamente debido a que con ello se logró evitar la separación entre capas. Por lo que, para una futura aplicación, sería interesante utilizar un colector rectangular giratorio en lugar de uno cilíndrico, ya que se tendría el mismo efecto de enredo entre fibras pero con una geometría plana.

Los pasos que se siguieron son los siguientes:

1. Se electrohiló la membrana de PCL durante 3 horas.
2. Se electrohiló simultáneamente las disoluciones de PCL y gelatina durante 2 horas. Para esta etapa se requirió de la utilización de dos bombas para mantener la rapidez de inyección de las disoluciones poliméricas por separado. Las variables del proceso se resumen en la Tabla 2. 4.

Tabla 2. 4. Parámetros para la capa intermedia PCL-gelatina.

Disoluciones		Proceso		
Concentración	Voltaje (kV)	Distancia al colector (cm)	Rapidez de inyección (ml/h)	Diámetro interior de la aguja (mm)
Gelatina	10	15	0.8	0.9
PCL	20		0.5	

3. Seguidamente se detuvo la disolución de PCL y se electrohiló la membrana de gelatina durante 3 horas adicionales.
4. El andamio electrohilado final fue sometido al proceso de entrecruzamiento con glutaraldehído.

## 2.5 INSOLUBILIZACIÓN DE LAS FIBRAS DE GELATINA

El proceso de insolubilización por entrecruzamiento se llevó a cabo de la siguiente manera<sup>[75]</sup>:

1. Se cortaron muestras electrohiladas en cuadrados de 3 cm<sup>2</sup>.
2. Las muestras fueron colocadas en un desecador, junto con un vial que contenía 10 ml de una disolución de glutaraldehído al 25 % (m/m) en agua.

3. El desecador fue sellado mediante una bomba hasta alcanzar un vacío parcial (~75 mm Hg), a temperatura ambiente (22°C).
4. Las muestras permanecieron en el desecador durante 48 horas para ser entrecruzadas con los vapores del glutaraldehído.
5. Después del tiempo de exposición, el desecador fue abierto en una campana de extracción durante dos horas para eliminar parte del exceso de GTA.
6. Posteriormente se extrajo el vial con la disolución de glutaraldehído y las muestras fueron colocadas nuevamente en el desecador para secar con vacío durante 2 horas y así remover parte del exceso de GTA presente en la muestra.
7. El mismo procedimiento se llevó a cabo para los andamios finales de mayor extensión.
8. Un blanco fue realizado aplicando un procedimiento similar pero sustituyendo el vial con GTA por uno con la misma cantidad de agua destilada.

## **2.6 INACTIVACIÓN DE LOS GRUPOS ALDEHÍDO**

Los andamios entrecruzados con GTA fueron colocados en una disolución acuosa de glicina al 0.2 M durante una hora a 24° C. Posteriormente fueron lavados con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro (pH= 7). Finalmente los andamios fueron secados en un horno de vacío durante 48 horas a 37° C.

## **2.7 ELIMINACIÓN DEL DISOLVENTE RESIDUAL**

Los andamios entrecruzados con GTA fueron colocados en una disolución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5 M, durante 3 horas a 24° C. Posteriormente, los andamios fueron lavados con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro (pH= 7).

Finalmente los andamios fueron secados en un horno de vacío durante 48 horas a 37° C. Se le realizó el mismo procedimiento a un blanco que en lugar de contener la disolución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, contenía únicamente agua destilada.

## **2.8 CARACTERIZACIONES**

### **Espectroscopia de infrarrojo (FTIR-ATR)**

Este tipo de estudio se realizó a las muestras siguientes con el fin de visualizar algún cambio químico en la estructura:

- Polímeros puros: PCL en pellets y gelatina en polvo.
- Membrana electrohilada de PCL.
- Membrana electrohilada de gelatina.
- Membrana electrohilada de gelatina y entrecruzada con GTA.
- Membranas electrohiladas después de los tiempos de inmersión en una disolución tampón fosfato salino (PBS).

Esta prueba se llevó a cabo mediante la técnica de reflexión total atenuada (ATR, Attenuated Total Reflectance). Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo (Nicolet 8700), en el cual se colocaron los andamios en un cristal seleniuro de zinc, en un intervalo de 600 cm<sup>-1</sup> a 4000 cm<sup>-1</sup>, realizando un total de 60 barridos y con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>.

### **Caracterización morfológica**

Las caracterizaciones morfológicas fueron realizadas a las siguientes muestras:

- Fibras de PCL
  - Fibras de gelatina después del electrohilado, insolubilización, eliminación del disolvente residual y neutralización de grupos aldehído.
  - Corte transversal de los andamios bicapa.
  - Membranas electrohiladas posterior a los tiempos de inmersión en PBS.
1. Previamente, las muestras fueron recubiertas, con una fina capa de partículas de oro, durante 60 segundos, para hacer a las muestras conductoras.
  2. Se tomaron las imágenes de la superficie del andamio mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM) marca JOEL JSM-6360LV, a un voltaje de aceleración de 20 kV y diversas ampliaciones de acuerdo a la escala de las fibras para lograr una mejor visualización.

### ***Distribución de diámetros***

La medición del diámetro de las fibras y su distribución, se llevó a cabo mediante un método manual<sup>[76]</sup>, utilizando el programa de análisis de imagen "ImageJ" e imágenes obtenidas por SEM, de la siguiente manera:

1. Primero, se correlacionó el valor de la barra de escala en ( $\mu\text{m}$ ) de la micrografía con el número de píxeles que detecta el programa.
2. Se trazó una rejilla para orientarse en la imagen, de  $5 \mu\text{m}^2$  por división.
3. Se convirtió la imagen a una imagen binaria, para tener mayor contraste.
4. Se realizó un aumento de entre 4000 y 5000 ampliaciones.

5. Se seleccionó una fibra dentro del primer cuadro de la rejilla y se midió la distancia entre ambos lados, perpendicular al eje de la fibra y los datos fueron guardados.
6. El paso 5, se repitió moviéndose a través de la rejilla, hasta que un total de 100 mediciones fueron obtenidas de entre al menos 3 micrografías.
7. Finalmente, el histograma de distribución de diámetros, es graficado mediante el programa "*Kaleidagraph*".

#### **Detección de flúor**

Para la cuantificación elemental de flúor, se utilizó un espectrómetro de dispersión de energía de rayos X (EDS) adaptado al SEM. Las muestras analizadas son las siguientes:

- Fibras de gelatina entrecruzadas.
- Fibras de gelatina entrecruzadas, sumergidas en agua destilada durante 3 horas y secadas en una estufa de vacío durante 48 horas (blancos).
- Fibras de gelatina entrecruzadas y tratadas con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

#### **Evaluación del carácter hidrofílico mediante el ángulo de contacto.**

Los ángulos de contacto fueron medidos a 24 °C, en un medidor de ángulo de contacto "*Tantec's Cam Plus Micro*", que utiliza la técnica del semiángulo. Las muestras analizadas fueron:

- Fibras PCL
- Fibras de gelatina entrecruzadas

Una gota de agua destilada de 5  $\mu\text{L}$ , fue aplicada mediante una microjeringa a muestras de 5  $\text{cm}^2$ . Para cada muestra, por lo menos 8 mediciones fueron realizadas en tiempos de 1 a 10 segundos posteriores a la colocación de la gota. Las fotografías y videos, fueron capturados mediante una cámara Nikon Coolpix L310.

### Medición del grado de hinchamiento

Para estas pruebas, se evaluaron únicamente a las membranas de gelatina electrohiladas y entrecruzadas.

Para ello se cortaron andamios de 1  $\text{cm}^2$ , se midió su masa y fueron sumergidos en PBS entre 1 y 50 minutos, posteriormente fueron extraídos y pesados nuevamente con al menos 4 repeticiones.

El grado de hinchamiento se calculó de la siguiente manera:

$$P \quad d \quad h_i \quad h_a \quad (\%) = \frac{(W_h - W_s) \times 100}{W_s}$$

Donde  $W_s$  es la masa inicial de la muestra y  $W_h$  la masa después de cada tiempo de observación.

### Pruebas de pérdida de masa

Las pruebas de pérdida de masa se realizaron a las siguientes muestras:

- Fibras PCL
- Fibras de gelatina

Los pasos seguidos se resumen a continuación:

1. Se cortaron muestras de andamio de aproximadamente 1 cm x 1 cm y se midió su masa inicial ( $W_0$ ) en una balanza de 5 decimales.
2. Se colocaron las muestras en un vial y se añadieron 5 ml de fosfato buffer salino (PBS) (renovado cada 8 días) a un pH de 7.4 (verificado con un medidor de pH).
3. Se colocaron los frascos en una incubadora, a 37°C. Después de 7, 14, 21 y 28 días, se retiraron las muestras de los frascos. Se lavó con agua destilada el andamio, se eliminó el agua en exceso con papel filtro y se dejaron reposar a temperatura ambiente (25°C) durante 12 horas. Posteriormente se secaron en un horno de vacío a 40°C durante 48 horas. Finalmente, se registró la masa final ( $W_t$ ). El número total de réplicas por tiempo ensayado fue de 10.

El porcentaje de pérdida de masa a un tiempo  $t$  se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$P \quad d \quad pér. \quad d \quad m \quad (\%) = \frac{(W_0 - W_t) \times 100}{W_0}$$

Donde  $W_0$ , es la masa inicial de la muestra y  $W_t$ , la masa después de cada tiempo de observación.

### Resistencia mecánica

Las propiedades mecánicas del andamio fueron determinadas de acuerdo al siguiente procedimiento:

Se utilizó una máquina de pruebas universal (Autograph AGS-X de Shimadzu) de la siguiente manera:

1. Utilizando cinta adhesiva doble cara, las membranas fibrosas fueron colocadas en soportes en forma de marco cortados de carpetas de cartón.



2. Las dimensiones de las muestras fueron de 2.00 cm de largo y 1.00 cm de ancho, medidos con un vernier digital marca y modelo MITUTOYO 500-196-20 de 0.01 mm de resolución.
3. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando una rapidez de deformación de 5 mm/min, aplicando una carga de 100 N y temperatura ambiente (25 °C). Cinco muestras se ensayaron para cada tipo de membrana electrohilada.
4. Las curvas de esfuerzo-deformación se representaron gráficamente, de las cuales, el módulo elástico se estimó mediante la determinación de la pendiente de la porción lineal de las curvas.

## Capítulo 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1. OBTENCIÓN DE LAS FIBRAS A BASE DE PCL.

La PCL fue electrohilada utilizando TFE como disolvente, a concentraciones de 10 %, 15 % y 20 % (m/v). Los resultados se exponen en la Figura 3. 1.

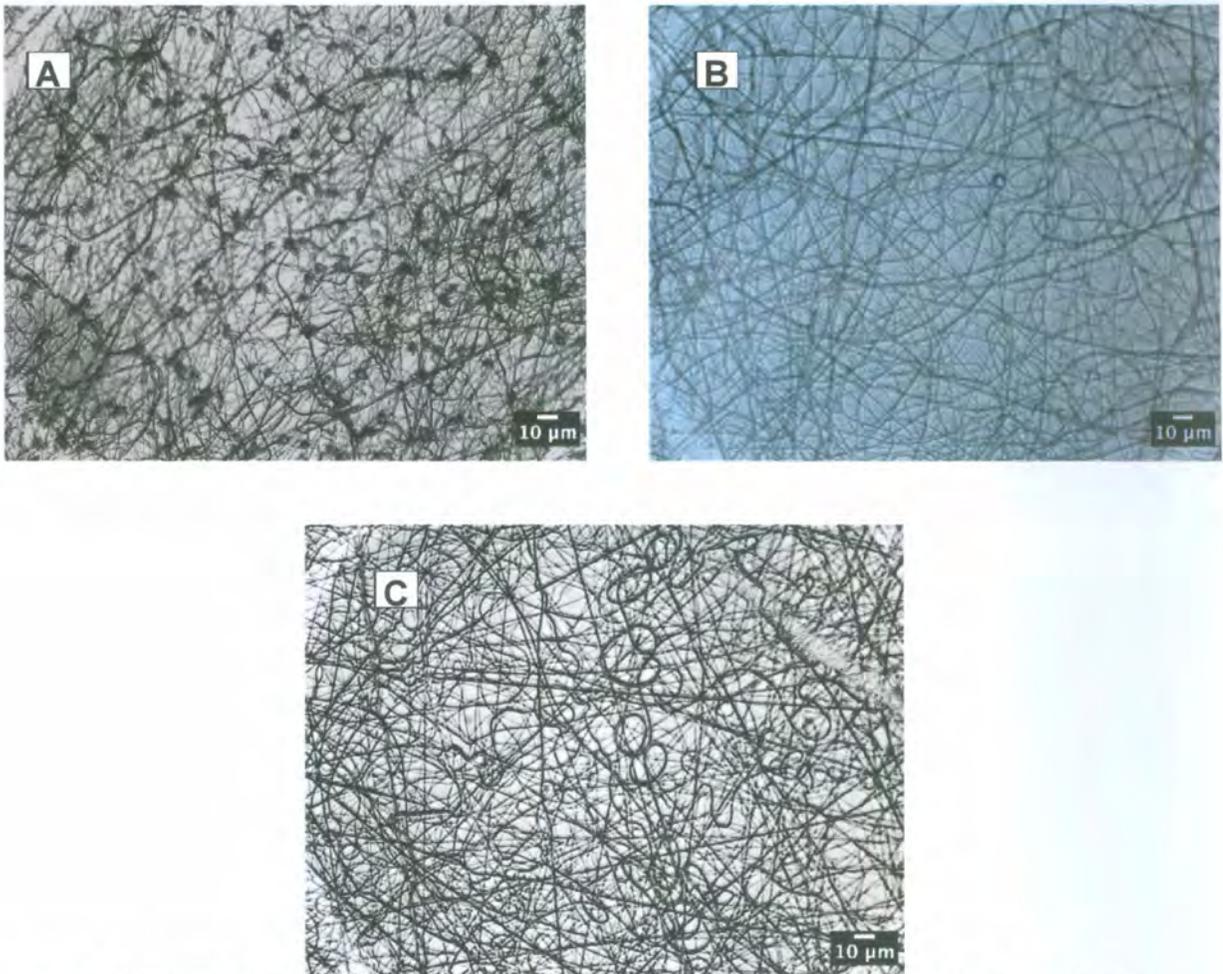


Figura 3. 1. Fibras de PCL electrohiladas con TFE como disolvente, a concentraciones de: A) 10 % (m/v), B) 15 % (m/v) y C) 20 % (m/v). A una distancia de 15 cm, voltaje de 15 kV y 0.5 ml/h de rapidez de inyección. Imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico y 40x de ampliación.

Se puede observar que para todas las concentraciones fue posible la formación de fibras (Figura 3. 1). Sin embargo, a las concentraciones de 10 % y 15 % (m/v), se observa la presencia de glóbulos entre fibras. La única concentración con la que fue posible electrohilar fibras sin presencia de glóbulos fue aquella del 20 % (m/v), probablemente debido a que, al aumentar la concentración se disminuye la tensión superficial entre la disolución y el aire, evitando así la formación de glóbulos. En la Figura 3. 2, se puede observar más a detalle la morfología de las fibras de PCL al 20 % (m/v) en TFE, y también se presenta el histograma de distribución de diámetros de las fibras.

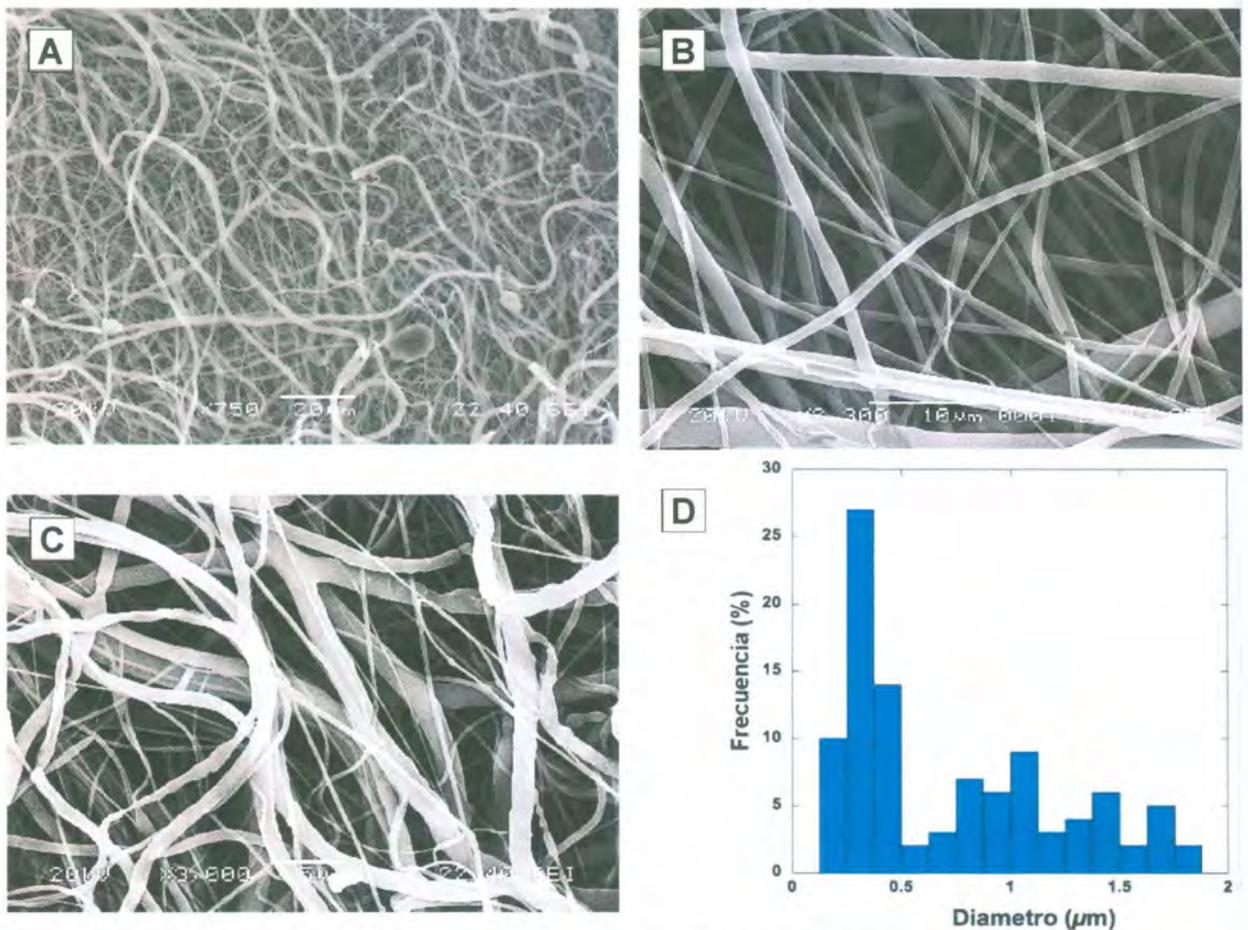


Figura 3. 2. Fibras de PCL al 20 % (m/v) en TFE. 15 Kv, 15 cm y 0.5 ml/h. A) Imagen SEM a 750 X, B) Imagen SEM a 2300x, C) Imagen SEM a 3000x y D) Histograma de distribución de diámetros.

De acuerdo a las imágenes, las fibras presentan una morfología libre de glóbulos, ligeramente aplanada. En la superficie, se pueden observar algunas zonas lisas y otras rugosas, probablemente debido a las inestabilidades del chorro sufridas durante el proceso de electrohilamiento.

De acuerdo al histograma de distribución de diámetros, los diámetros de las fibras presentan un promedio de  $0.733 \pm 0.3 \mu\text{m}$ . Sin embargo, la distribución muestra un comportamiento bimodal, con máximos alrededor de las  $0.3 \mu\text{m}$  y  $1 \mu\text{m}$ . Este comportamiento bimodal podría ser la clave para la diferenciación de las fibras de PCL de las fibras de gelatina en el andamio bicapa, ya como se verá más adelante, las fibras de gelatina presentaron una distribución de diámetros monomodal.

Cabe señalar, que para las pruebas posteriores realizadas en este trabajo, se decidió trabajar con la combinación de parámetros que en esta sección proporcionó la mejor estructura fibrosa y libre de glóbulos. Es decir, la disolución de PCL al 20 % en TFE; con parámetros del proceso de electrohilado de: 15 Kv, 15 cm y 0.5 ml/h. Por lo que de ahora en adelante, las fibras obtenidas mediante estos parámetros son llamadas simplemente "fibras de PCL".

### 3.2. OBTENCIÓN DE LAS NANOFIBRAS DE GELATINA

A continuación se presentan las fibras de gelatina obtenidas mediante el electrohilamiento de la gelatina en TFE a diferentes concentraciones: 5 %, 7.5 % y 10 % (m/v) (Figura 3. 3).

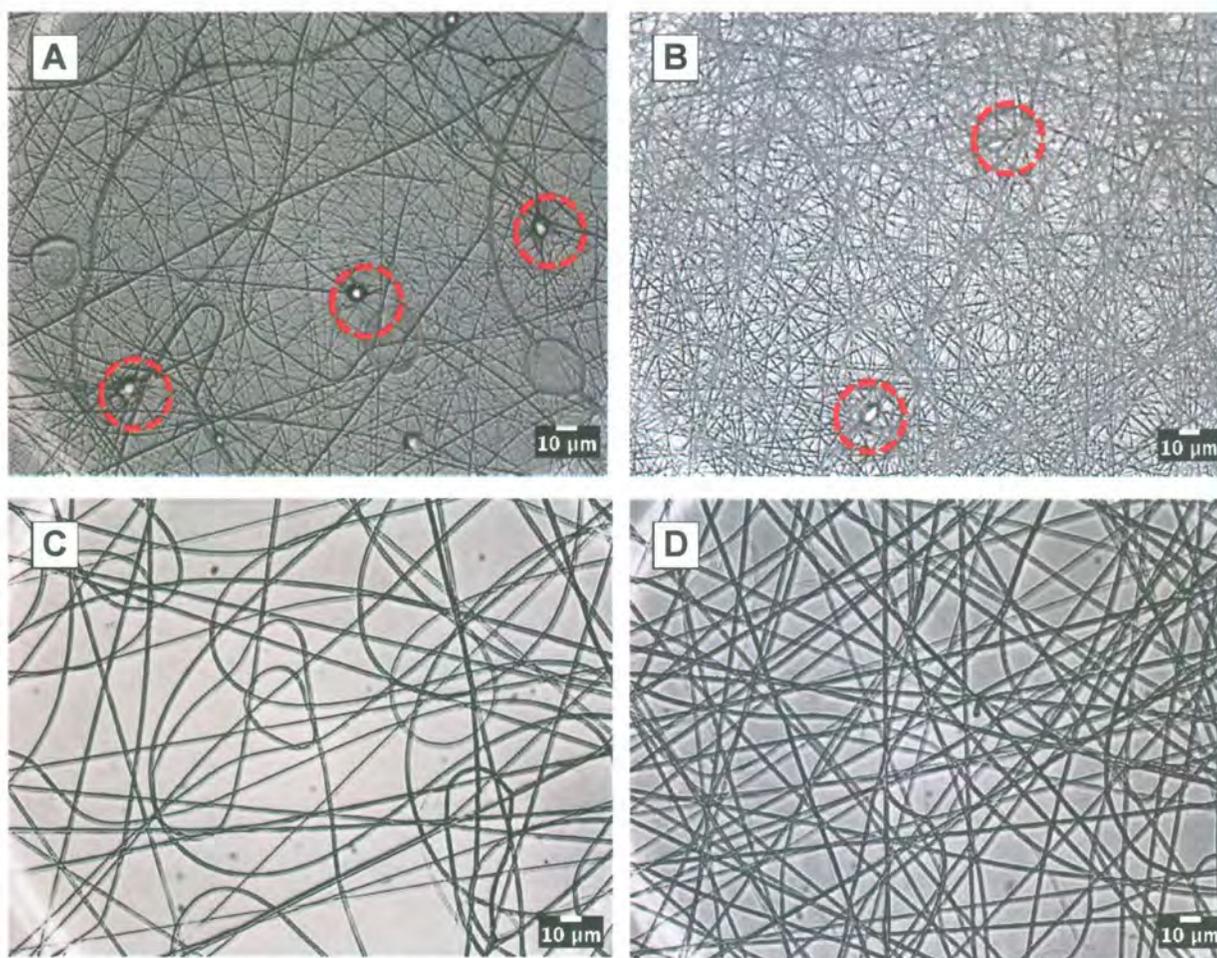


Figura 3. 3. Fibras de gelatina obtenidas con diferentes concentraciones de la disolución: A) 5 % (m/v), B) 7.5 % (m/v), C) 10 % (m/v) y D) 10 % (m/v) en otra zona del andamio. Todas a 0.8 ml/h, 15 cm y 10 kV. Imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico a una magnificación de 40x.

Se puede observar que a las concentraciones de 5 % y 7.5 % (m/v), las fibras aun presentan imperfecciones en formas de glóbulos (encerrados en rojo), pero al llegar al 10 % (m/v), estas imperfecciones desaparecen por completo.

A continuación se presentan las imágenes SEM para las fibras de gelatina al 10 % (m/v) a diversas ampliaciones y también se presenta su correspondiente histograma de distribución de diámetros (Figura 3. 4).

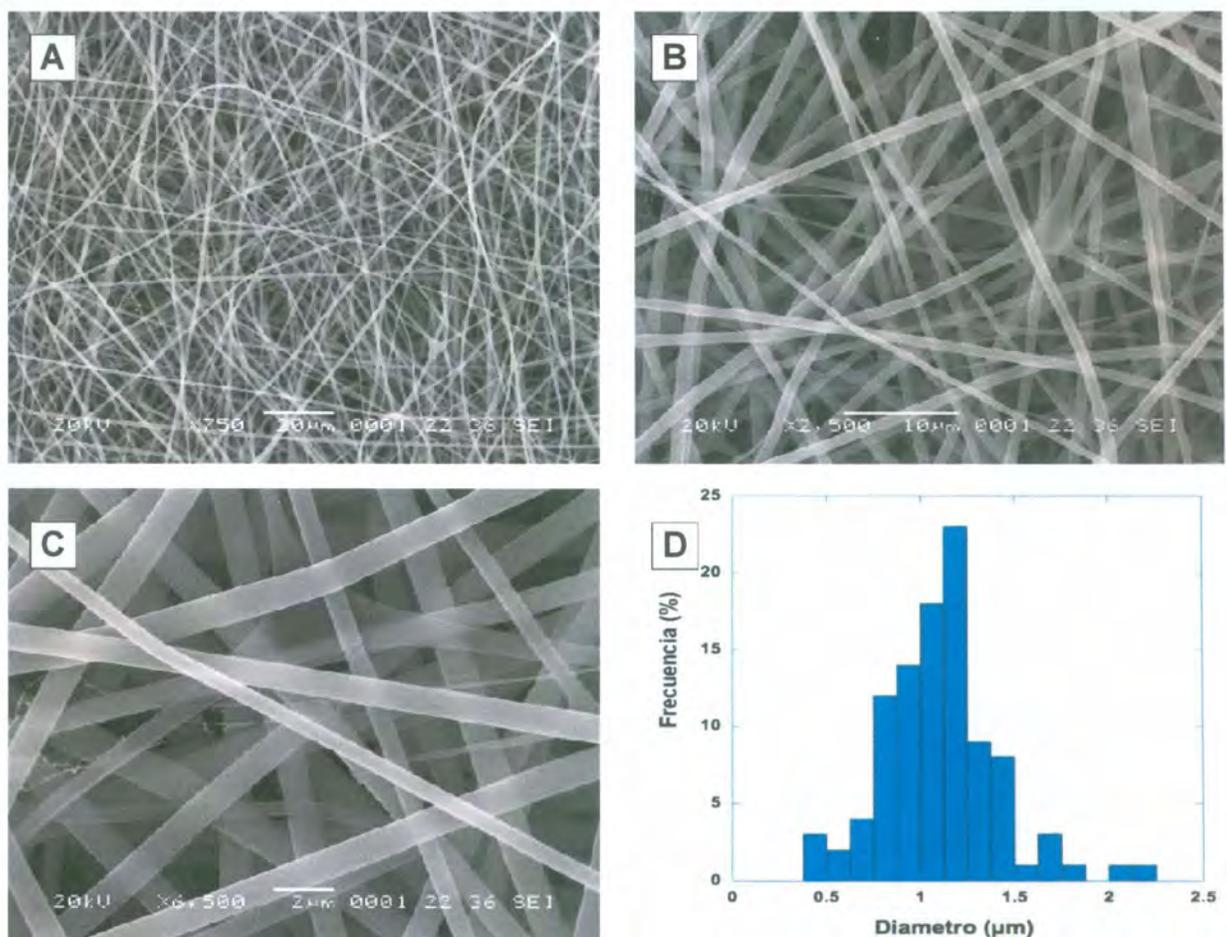


Figura 3. 4. Fibras de gelatina electrohiladas con TFE al 10 % (m/v), 0.8 ml/h y 10 kV. Imágenes SEM a: A) 750x, B) 2500x, C) 6500x y D) histograma de distribución de diámetros.

Las fibras obtenidas al 10 % (m/v) son fibras uniformes, libres de glóbulos, de apariencia cilíndrica y con superficie lisa. De acuerdo al análisis del histograma de distribución de diámetros, existen fibras con diámetros que van desde las 0.377

$\mu\text{m}$  hasta las  $2.097 \mu\text{m}$ , con un promedio de  $1.107 \pm 0.477 \mu\text{m}$ . A diferencia de la distribución bimodal de diámetros observada en las fibras de PCL, las fibras de gelatina presentan una distribución mono modal.

De ahora en adelante son denominadas “fibras de gelatina” a aquellas fibras obtenidas mediante los siguientes parámetros: disolución de gelatina al 10 % (m/v) en TFE, 10 cm, 0.8 ml/h y 10 kV.

### 3.3. ESTABILIZACIÓN DE LAS NANOFIBRAS

Macroscópicamente, se observa un cambio de color en las membranas electrohiladas posteriormente al proceso de entrecruzamiento con GTA, pasando de blanco, a un tono amarillo. También se observó una ligera contracción de las membranas (encerrada en rojo) como se observa en la Figura 3. 5B. El cambio de color, se puede atribuir a la creación de enlaces imina (CH=N), entre los grupos amina libres de la proteína y los grupos aldehído del GTA<sup>[77]</sup>.

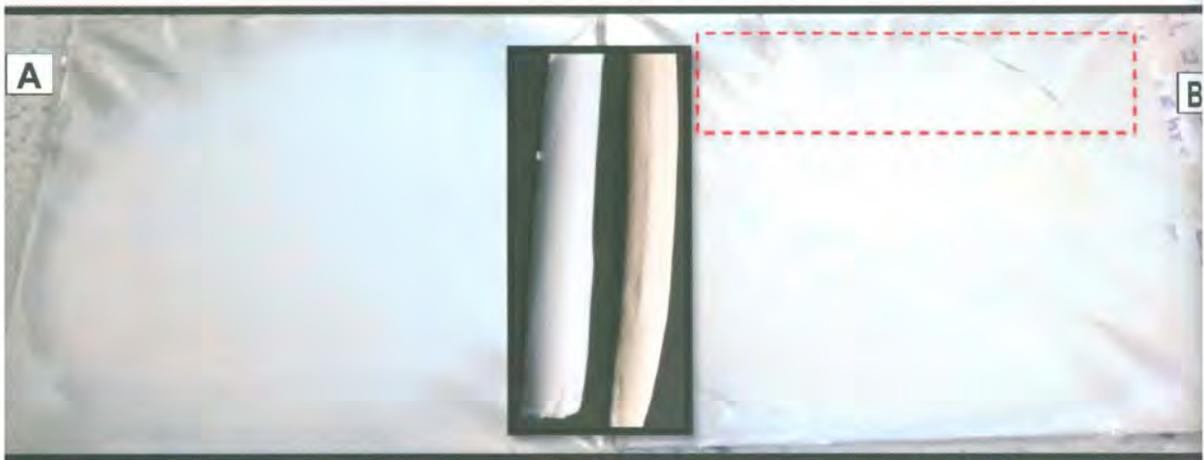


Figura 3. 5. Membranas electrohiladas en el colector plano y el cilindro cilíndrico: A) sin entrecruzamiento y B) 48 horas de exposición al GTA.

En la Figura 3. 6, a una escala más pequeña, se pueden observar las fibras de gelatina después de 48 horas de exposición al vapor del glutaraldehído.

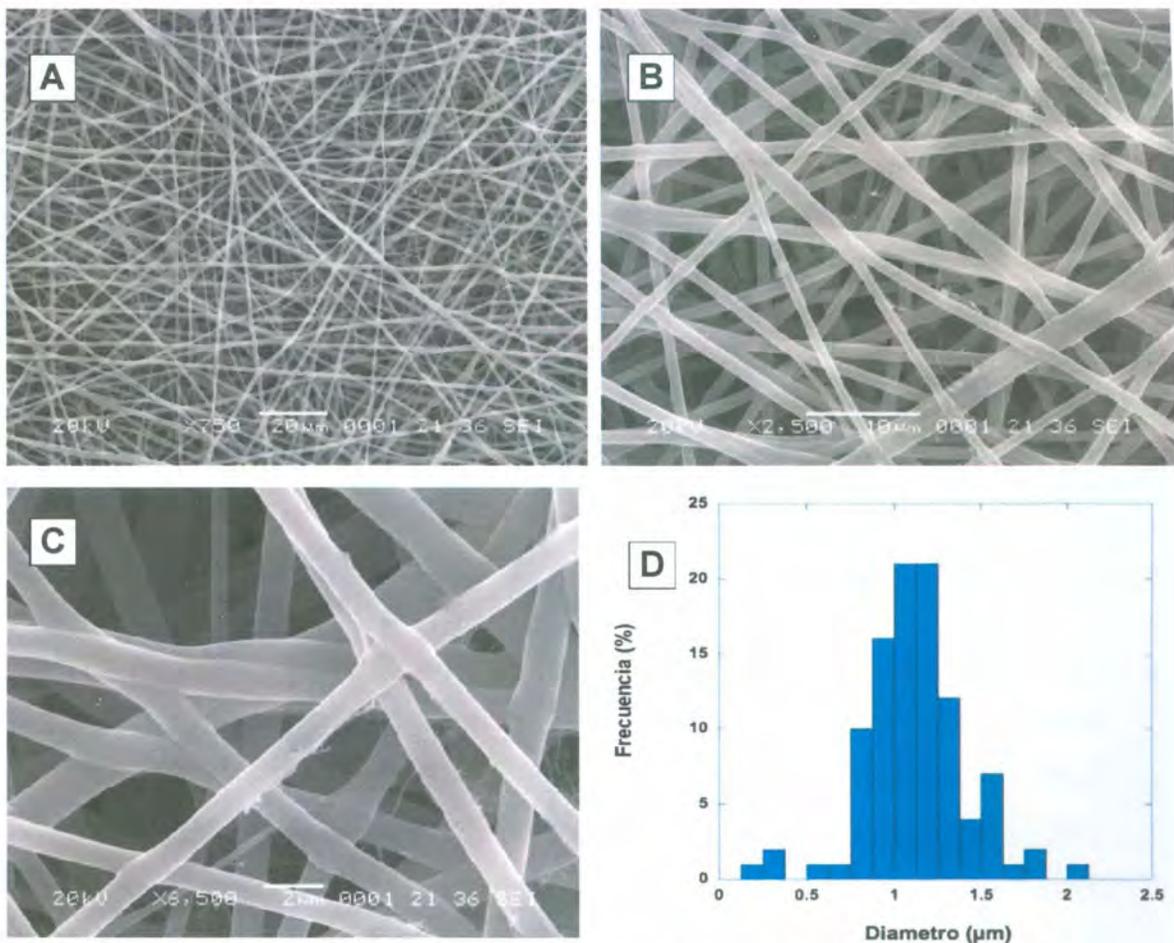


Figura 3. 6. Fibras de gelatina después de 48 horas de entrecruzamiento con GTA. Imágenes SEM a diferentes ampliaciones: A) 750 x, B) 2500x, C) 6500x y D) histograma de distribución de diámetros.

Después del proceso de entrecruzamiento, las fibras no muestran un cambio significativo en su morfología, lo cual es favorable ya que se conservan la estructura fibrosa buscada con el proceso de electrohilamiento.

Cuando las fibras fueron colocadas en una atmósfera con vapor de agua (máximo de 60% de humedad) en lugar del GTA (Figura 3. 7), durante 48 horas, se puede notar que las fibras van perdiendo su morfología indicando que comienzan a solubilizarse. Esto quiere decir que es efecto del GTA el que esta provocando la insolubilización de la gelatina y no ningún otro proceso asociado al agua.

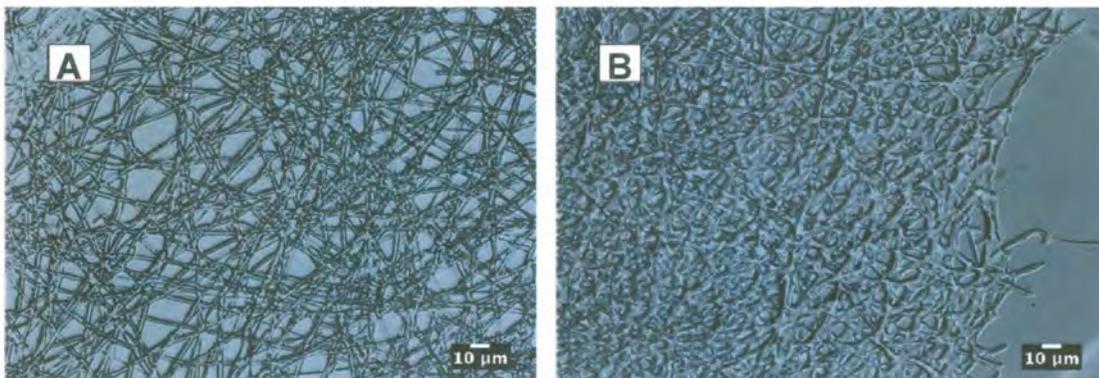


Figura 3. 7. Fibras de gelatina A) antes y B) después de ser sometidas a 48 horas a una atmósfera de vapor de agua, con humedad máxima de 60 %. Imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico a una magnificación de 40x.

Una prueba cualitativa fue realizada para asegurar que los andamios fueran insolubles en PBS después del proceso de entrecruzamiento (Figura 3. 8). Las fibras sin entrecruzar, al contacto con el fosfato búfer salino son totalmente solubilizadas, mientras que aquellas después del proceso de entrecruzamiento mantienen su macro estructura, aun después de 8 días de inmersión.



Figura 3. 8. Fibras de gelatina sin entrecruzar (arriba) y entrecruzadas (abajo), al ser sumergidas en PBS durante 8 días.

### 3.4. PRUEBAS DE LA CAPACIDAD DE HINCHAMIENTO

La capacidad de hinchamiento que exhibe un andamio juega un papel importante durante el cultivo "*in vitro*", ya que cuando el andamio es capaz de hincharse, incrementa su área superficial, facilitando la adhesión celular, mientras que, el agua adsorbida en las paredes de los poros o superficie de las fibras, podría contribuir al incremento del tamaño de poro, facilitando así la migración celular dentro de los andamios<sup>[78]</sup>.

Los hidrogeles tienen numerosas aplicaciones en la industria médica y farmacológica, específicamente para reemplazo de tejido blando, ya que al presentar la capacidad de retener agua, fluidos biológicos y proteínas bioactivas en su estructura, se asemejan a los tejidos vivos naturales más que ninguna otra clase de materiales.

Diversos estudios teóricos y experimentales<sup>[79]</sup>, indican que el grado de hinchamiento de la gelatina puede ser descrito por una ecuación de segundo orden (o cinética de difusión de segundo orden de Scott). Según este modelo, la rapidez de hinchamiento en cualquier momento es directamente proporcional al cuadrado de la capacidad de hinchamiento antes de alcanzar la máxima sorción en el equilibrio ( $W_{\infty}$ ). La capacidad de hinchamiento se define como  $W_{\infty} - W$ , donde  $W$  es el disolvente absorbido por gramo de gelatina en el tiempo  $t$ . La ecuación se puede expresar como:

$$\frac{d}{d} = K(W_{\infty} - W)^2 \text{ --- (1)}$$

donde  $K$ , es la constante de rapidez cinética de hinchamiento. Por integración y reordenamiento, la ecuación se puede escribir como:

$$\frac{t}{W} = A + B \quad \text{--- (2)}$$

Donde,  $B=1/W_{\infty}$  y  $A=1/KW_{\infty}^2$ .

La Figura 3. 9, reproduce los datos experimentales del hinchamiento del andamio de gelatina electrohilado y entrecruzado, así como el ajuste del modelo de Scott. La correlación entre los datos experimentales y el modelo de Scott es satisfactoria ( $R^2 = 0.996$ ), confirmando la validez del modelo (2).

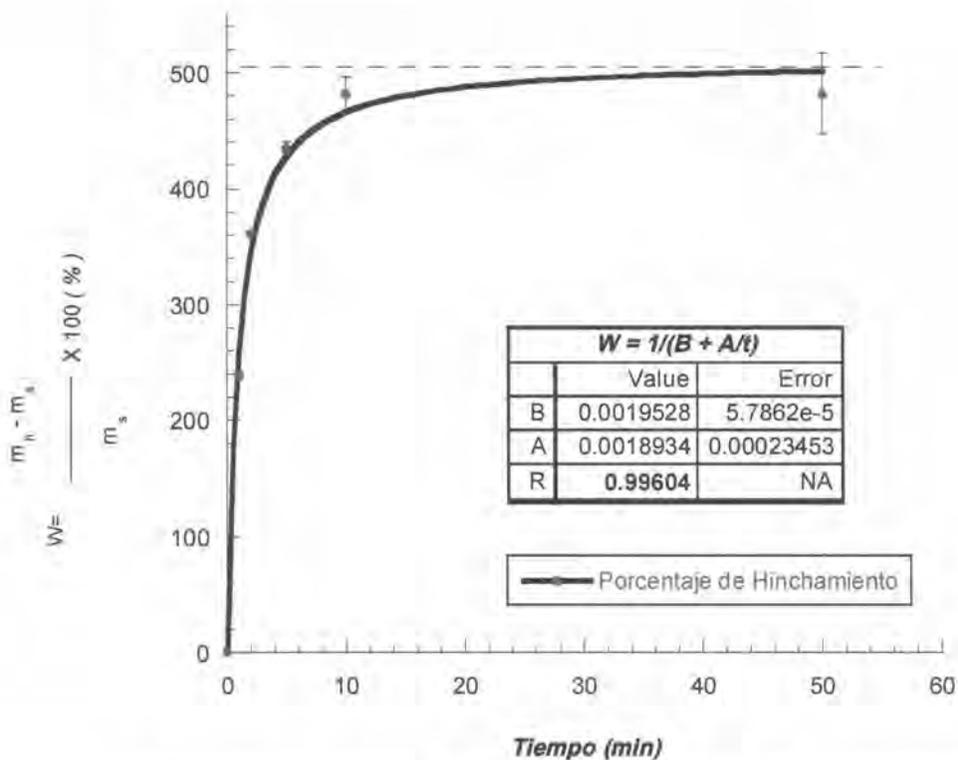


Figura 3. 9. Curva de hinchamiento como función del tiempo, los puntos son los datos experimentales, la línea es la predicción del modelo de segundo orden de Scott, para las membranas electrohiladas y entrecruzadas de gelatina a 22° C.

Mediante el ajuste de los datos experimentales al modelo, fue posible obtener el valor de la constante  $B$ , con la cual se calculó el valor de  $W_{\infty}$  ( $B=1/W_{\infty}$ ), resultando que la máxima sorción en el equilibrio tiende al valor de 512.1 %. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Wan y colaboradores<sup>[80]</sup> en el que estudiaron el comportamiento de películas de gelatina entrecruzadas con GTA durante su hinchamiento en PBS. Obteniendo que la máxima sorción en el equilibrio se encuentra próximo al 550 %.

Es importante hacer notar, que el agua no necesariamente esta absorbida entre las cadenas de gelatina sino que puede estar adsorbida en la superficie de las fibras. Por otro lado, el alcanzar un porcentaje de hinchamiento de 500 % en pocos minutos, hace que la gelatina entrecruzada, pudiera considerarse un hidrogel con gran capacidad de hinchamiento, ideal para aplicaciones en la ingeniería de tejidos de la piel.

### 3.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS FIBRAS OBTENIDAS

#### Espectroscopia de infrarrojo (FTIR-ATR)

En la Figura 3.10, se presenta el espectro infrarrojo (IR) de la policaprolactona prístina utilizada en este trabajo; posteriormente, en la Tabla 3. 1, se enlistan los principales picos presentes en el espectro comparado con aquellos encontrados por otros autores como referencia.

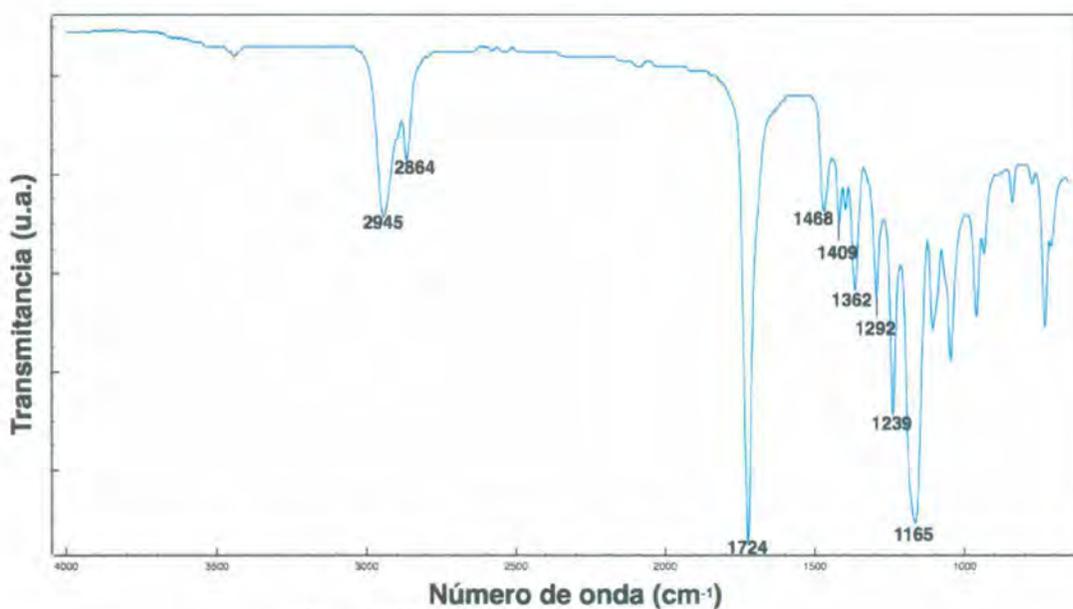


Figura 3.10. Espectro IR de la PCL prístina.

Tabla 3. 1. Principales enlaces del espectro IR para la policaprolactona (PCL).

Tipo de enlace	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		
	Experimental	[81]	[82]
Tensión asimétrico -CH <sub>2</sub>	2945	2946	2949

Tipo de enlace	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		
	Experimental	[81]	[82]
Tensión simétrico -CH <sub>2</sub>	2864	2870	2865
Tensión C=O	1724	1728	1727
Flexión CH <sub>2</sub>	1468	1465	1472
	1409	1407	-
	1362	1362	-
Tensión C-O y C-C en fase cristalina	1292	-	1293
Tensión asimétrica C-O-C	1239	1238	1240
Tensión C-O y C-C en fase amorfa	1165	-	1157

De igual modo, en la Figura 3. 11 se presenta el espectro IR de la gelatina prístina utilizada y sus principales picos se encuentran representados en la Tabla 3. 2.



Figura 3. 11. Espectro IR de la gelatina prístina tipo A.

Tabla 3. 2. Principales enlaces del espectro IR para la gelatina tipo A.

Tipo de enlace	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		
	Experimental	[83]	[78]
Tensión N-H, Tensión OH	3277	3434	3250-3500
Tensión C-H	3072	2800-3000	3000-3250
Tensión asimétrica CH <sub>2</sub>	2934	2750-2800	2750-3000
Tensión C=O (Amida I)	1627	1638	1635
Flexión N-H y Tensión C-N (Amida II)	1526	1500-1600	1535
Flexión CH <sub>2</sub>	1447	1452	1455
Deformaciones CH <sub>2</sub>	1332	1337	1338
Tensión C-N (Amida III)	1240	1234	1240
Amida	1079	1031	1000-1100

Como se puede observar, para todos los materiales utilizados en este trabajo, la mayoría de los picos del espectro IR coinciden con los valores o intervalo de valores observados en la literatura, por lo que se puede corroborar que no han sido afectados significativamente por ningún elemento externo como la humedad o impurezas.

Sin embargo, la banda Amida I en la gelatina, asociada principalmente con la vibración de tensión del enlace C=O, presenta una diferencia significativa de 1637 a 1627 cm<sup>-1</sup>.

Shanmugam y colaboradores<sup>[84]</sup>, afirman que cuando la concentración de colágeno en TFE se incrementa hasta el 90 % (v/v), se observa un cambio en la banda de la amida I, un corrimiento de 1655 a 1648 cm<sup>-1</sup>, que se atribuye al predominio de la estructura desordenada de esta proteína.

Chen y colaboradores también hallaron un corrimiento en el pico de absorción relacionado con la amida I, para las fibras de fibroína de seda, después

de un tratamiento con etanol. Este desfase que va de  $1650$  a  $1617\text{ cm}^{-1}$ , indica un cambio conformacional de la estructura secundaria de esta proteína, que va de una conformación de ovillo estadístico o estructura desordenada a una estructura más ordenada denominada de láminas  $\beta$ <sup>[85]</sup>.

Las proteínas se "desnaturalizan" cuando pierden su estructura tridimensional o "nativa". El pico relacionado con la Amida I, para las proteínas en el estado "nativo" difiere ampliamente de la que presenta en el estado "desnaturalizado"; para el estado "nativo", el pico tiene un máximo a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a estructura de hélice  $\alpha$ . En contraste la proteína desnaturalizada muestra un máximo entre  $1620$  y  $1640\text{ cm}^{-1}$ , indicando el predominio de lámina  $\beta$  y de estructura desordenada.

Sin tratar de ninguna manera, de determinar la estructura conformacional de la gelatina, lo cual implicaría la necesidad de técnicas de apoyo y un análisis más exhaustivo, es posible sospechar que la diferencia entre los valores relacionados con la amida I para los valores reportados en la literatura y aquel obtenido en este trabajo, pudiera estarse debiendo al predominio de una estructura conformacional, más que otra. Asimismo, es necesario considerar el problema de la interferencia del agua. El agua absorbe fuertemente en la región donde caen importantes grupos, incluyendo las bandas Amida I y Amida II. La banda Amida I, no solo es sensible a cambios en la conformación de la cadena, si no también a los enlaces de por puentes de hidrógeno.

Una vez identificados los espectros de los polímeros puros, se prosiguió al empleo del análisis FTIR-ATR para identificar cualquier cambio en la estructura química que podría haber ocurrido durante el proceso de electrohilamiento. A continuación se presentan los espectros de la policaprolactona pristina y electrohilada (Figura 3. 12).

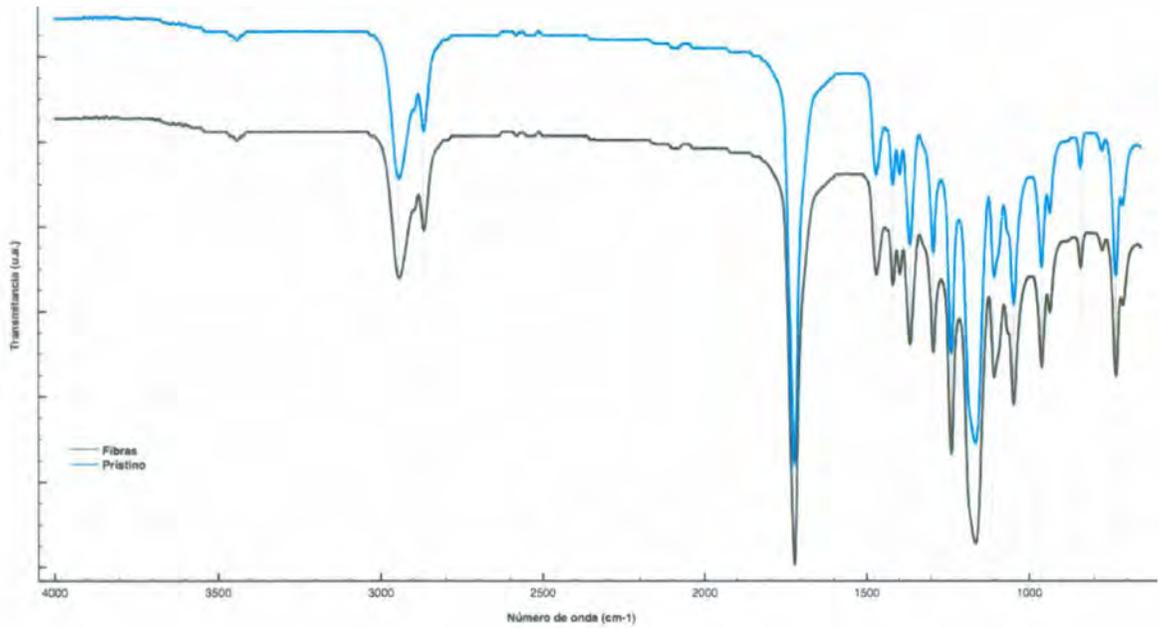


Figura 3. 12. Espectros FTIR de la PCL; azul-PCL prístino; negro-fibras de PCL.

Cuando se compara la PCL electrohilada y la PCL prístina, los espectros IR revelan que no hay ninguna diferencia en los grupos funcionales presentes después del electrohilamiento, por lo que se puede confirmar que este proceso no modifica la estructura química del material.

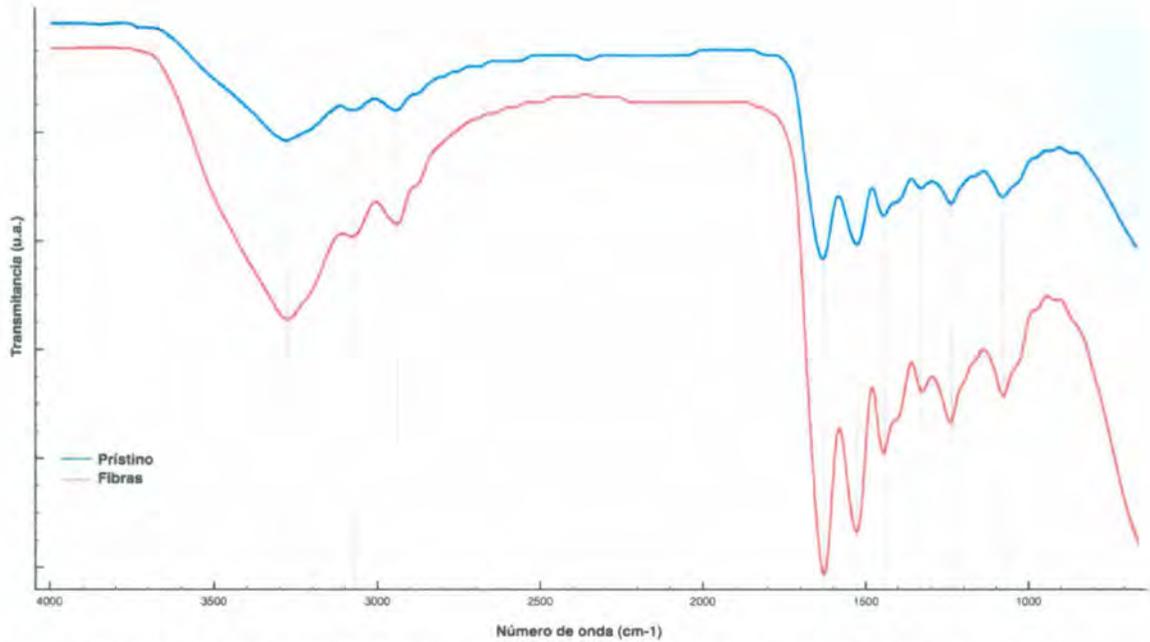


Figura 3. 13. Espectros FTIR de la gelatina; azul-gelatina prístino; rojo-fibras de gelatina.

De la misma manera que para el caso de la policaprolactona, en la Figura 3. 13, se puede observar que no ocurren cambios en la estructura de la gelatina después del proceso de electrohilamiento.

A continuación se presentan los espectros IR de las nanofibras a base de gelatina, entrecruzados mediante vapor de GTA durante 48 horas.

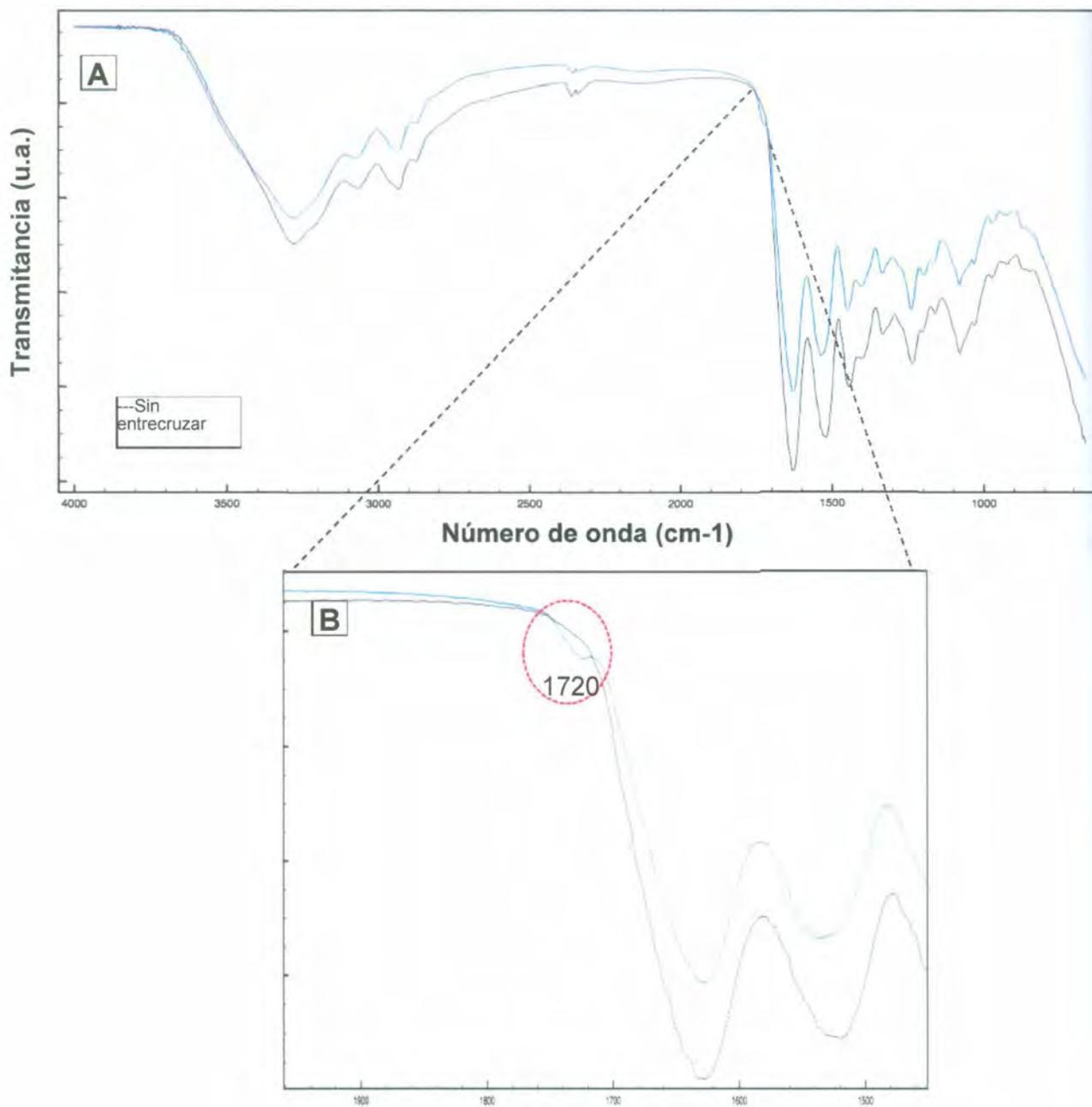


Figura 3. 14. Fibras de gelatina sin entrecruzar (negro) y con entrecruzamiento de 48 horas (azul). A) Espectro completo y B) Ampliación de la zona alrededor de  $1700\text{ cm}^{-1}$ .

La reacción de entrecruzamiento entre la gelatina y el GTA ocurre mediante la formación de enlaces covalentes imina, vía reacción de Schiff, entre los grupos aldehído del entrecruzante y amino de la gelatina. El pico relacionado con los enlaces imina debería estar presente entre  $1600\text{ cm}^{-1}$  y  $1680\text{ cm}^{-1}$ , sin embargo, en la Figura 3. 14 no se aprecia un cambio significativo en este intervalo, lo que podría estar indicando un traslape con el pico característico a  $1627\text{ cm}^{-1}$  o, que la técnica utilizada no es muy sensible a la pequeña cantidad de nuevos enlaces formados, por lo que la técnica de resonancia magnética nuclear pudiera estar ofreciendo mejores resultados.

Algunos reportes indican una banda a  $1720\text{ cm}^{-1}$  que se puede atribuir a los grupos carbonilo del glutaraldehído que no reaccionaron<sup>[86]</sup>.

## Ángulos de contacto

Los biomateriales entran en contacto con agua, sangre y otros fluidos corporales, por lo que es necesario caracterizar su capacidad de humectación. Aunque no siempre es posible evaluar el efecto de todos los fluidos con los que estará en contacto el biomaterial, una prueba con agua destilada puede proveer la información práctica del comportamiento del material. Este tipo de pruebas se realizan mediante la medición del ángulo de contacto entre el líquido y la superficie del biomaterial. Adicionalmente, la medición del ángulo de contacto permite conocer el grado de hidrofiliicidad, requisito importante para el cultivo celular.

En la Figura 3. 15, son presentados los ángulos de contacto medidos durante los primeros 5 segundos para la membrana de fibras a base de PCL y las fibras de gelatina entrecruzadas con GTA.

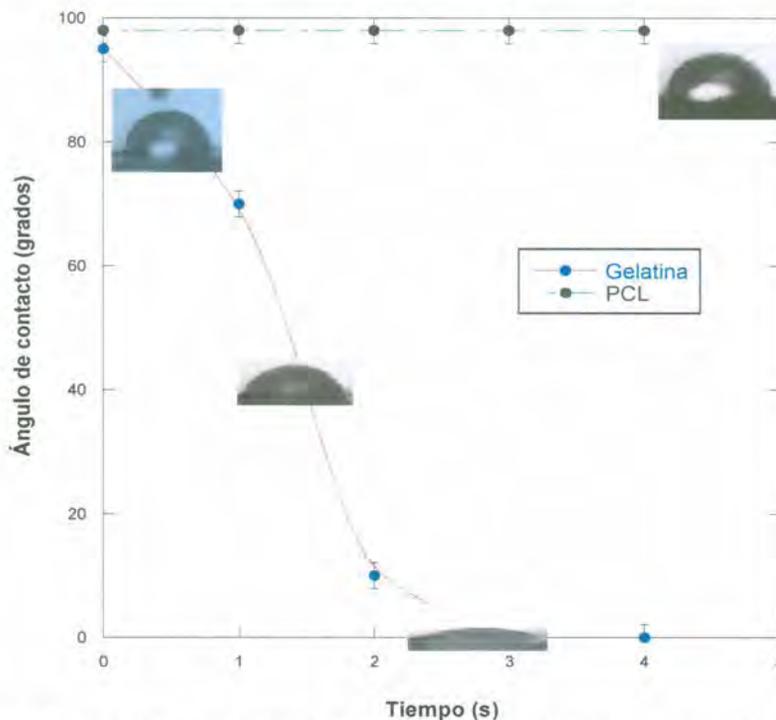


Figura 3. 15. Ángulos de contacto de la PCL y gelatina entrecruzada a través del tiempo.

Se puede verificar en la gráfica de la Figura 3. 15, el carácter hidrofóbico de la membrana electrohilada de policaprolactona, que presenta un ángulo de contacto con el agua de  $98^\circ \pm 2.1$ . Esto implica, que las fuerzas de cohesión asociadas al interior del agua, son mayores que las fuerzas asociadas entre la interacción de las moléculas de agua con la superficie del andamio de PCL.

El carácter hidrofóbico del andamio de PCL, aunque pudiera verse en primera instancia como desventaja, no debiera ser causa de preocupación, ya que ésta capa, no será cultivada con células, por lo que disminuir su hidrofobicidad no es crucial. Tal como sucede con algunos sustitutos dérmicos, entre ellos, el fabricado por Yannas y colaboradores<sup>[53]</sup>, cuya capa superior es elaborada a base de PDMS, un material hidrofóbico, cuyo ángulo de contacto se encuentra entre el intervalo de  $90^\circ$  y  $120^\circ$ <sup>[87]</sup>. Esta capa, es removida de entre 3 a 6 semanas posteriores al implante. Después de este periodo de tiempo, el PDMS ya ha provisto del cierre inmediato de la herida y del tiempo necesario para la reconstrucción de la neodermis.

El carácter hidrofílico de las nanofibras de gelatina es evidenciado al contar con un ángulo de contacto de prácticamente  $0^\circ$ , a partir del segundo 3, esto implica que las fuerzas asociadas en la interacción del agua con la superficie del andamio son mayores que las fuerzas asociadas entre las moléculas interiores del agua (enlaces de hidrógeno).

El carácter hidrofílico de la gelatina se atribuye a la gran cantidad de grupos amino y carboxílicos presentes. El grupo amino es polar, tiende a recoger un ion de hidrógeno adicional, esto hace que sea un aceptor de hidrógeno y por lo tanto que sea una fuerte influencia hidrófila. El grupo carboxilo se disocia fácilmente en medios cuyo potencial de hidrógeno (pH) supere su constante de disociación ácida ( $pK_a$ ), que normalmente se encuentra entre 1.8 y 2.5, liberando así un ion de hidrógeno, y quedando con carga negativa, esto hace que el grupo carboxilo posea una fuerza hidrófila fuerte.

Es importante señalar que el carácter hidrofílico de la capa de gelatina favorece la adhesión celular, ya que las células de mamíferos pueden adherirse a superficies hidrofílicas con más afinidad respecto a las superficies hidrofóbicas. Esto es importante, ya que se desea que ésta capa sea cultivada con células durante su potencial aplicación como sustituto dérmico.

### 3.6. ANDAMIO BICAPA

#### Método 1. Colector plano

Una vez obtenidos y caracterizadas por separado las membranas de PCL y gelatina, se llevó a cabo el electrohilamiento secuencial de una capa de PCL y sobre ésta, la de gelatina para obtener así el andamio bicapa (Figura 3. 16).

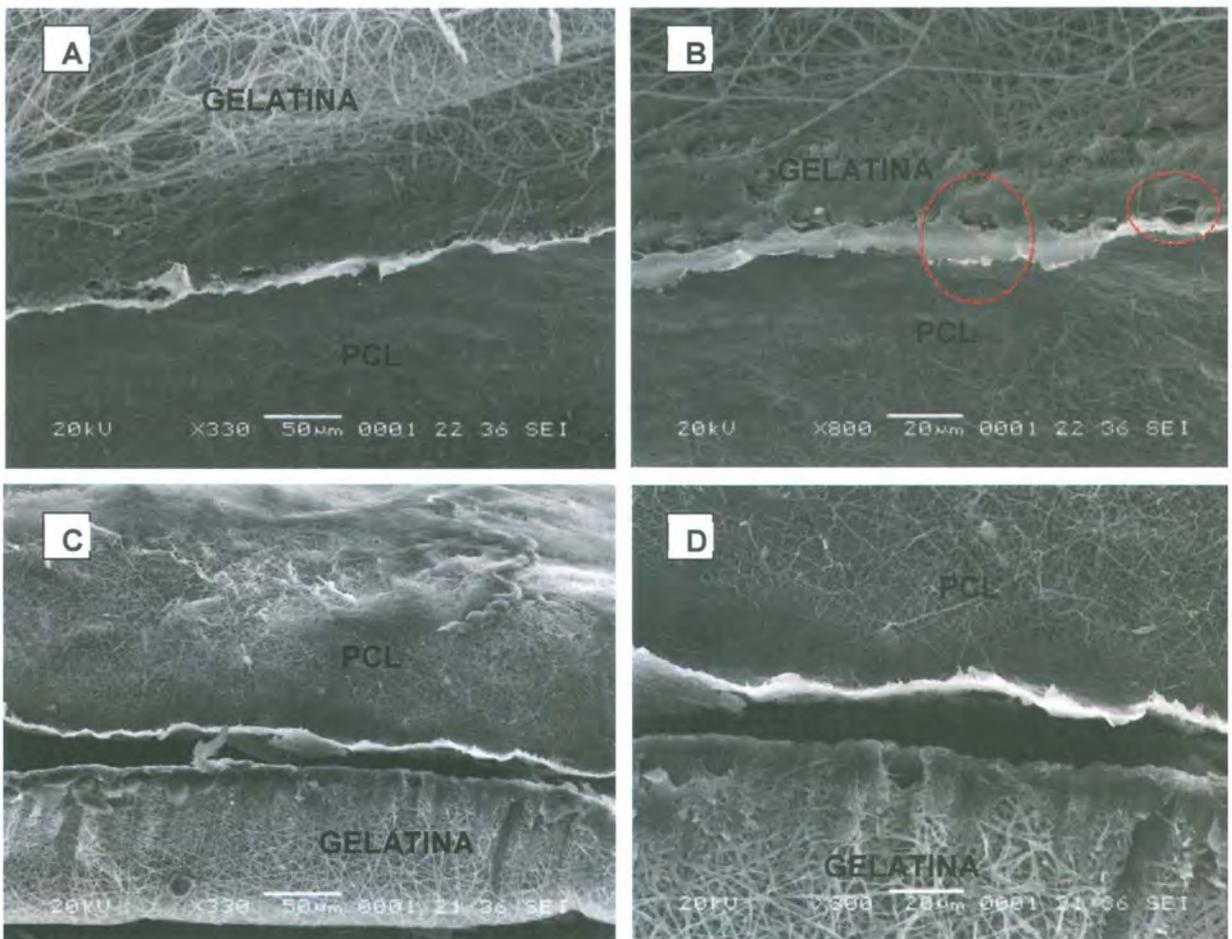


Figura 3. 16. Sección transversal del andamio bicapa electrohilado en el colector plano. Antes del entrecruzamiento A)330x y B)800x, y después del entrecruzamiento C)330x y D)830x.

Se puede observar en la Figura 3. 16A y la Figura 3. 16B, que en la zona donde se unen ambas capas no se logra una buena adherencia por lo que las membranas tienden a separarse.

Al llegar al plato colector, se considera que el disolvente se ha evaporado casi por completo, por lo que se podría considerar que son dos sólidos los que son colocados juntos. En esta situación, la rugosidad de las superficies en una escala micrométrica impide que las superficies entren en contacto, excepto en puntos aislados como se observa en la Figura 3. 16A y Figura 3. 16B.

Por otro lado, tampoco se encuentran presentes ningún otro mecanismo de adhesión como los de tipo electrostático o químico. Adicionalmente hay muchos esfuerzos internos en el material que se desarrollan durante las operaciones de desprendimiento del andamio del papel aluminio, desmontaje del plato colector, cortes y almacenamiento que afectan la resistencia aparente de la unión entre las láminas.

En la Figura 3. 16C y Figura 3. 16D se puede observar que a causa de la aparición de los grandes esfuerzos de contracción durante el proceso de entrecruzamiento, las láminas terminan separándose por completo, venciendo las débiles uniones en los pocos puntos de contacto de la interface del material.

## Método 2. Colector cilíndrico.

En la Figura 3. 17, se presentan las imágenes de los andamios bicapa electrohilados en el cilindro giratorio. Adicionalmente, se ha agregado una capa intermedia en la que se electrohilieron ambos tipos de fibras simultáneamente. Las láminas no muestran una separación en comparación con aquellas electrohiladas utilizando el método 1.

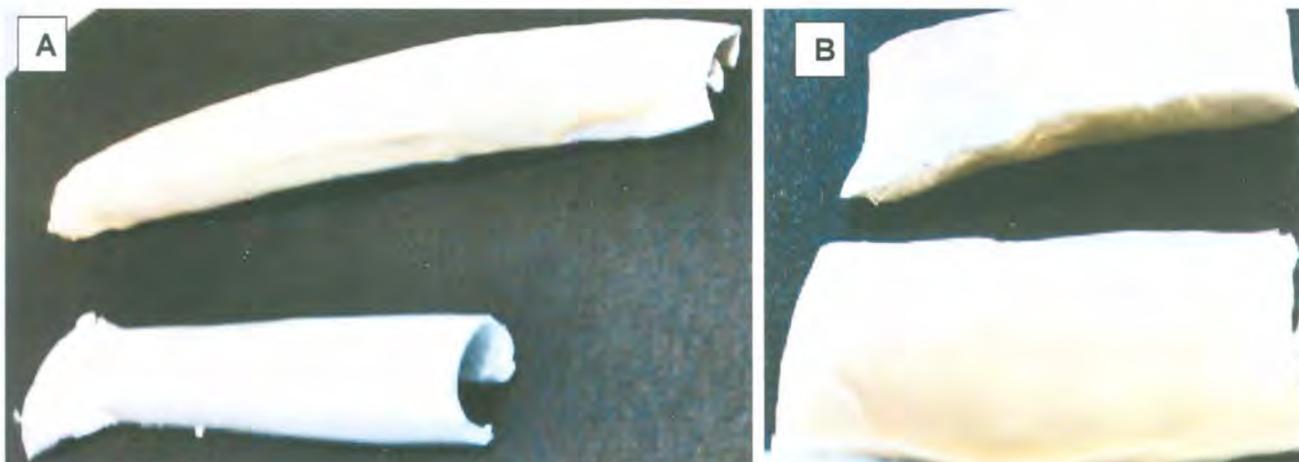


Figura 3. 17. Detalle del andamio bicapa a) antes (abajo) y después de entrecruzar (arriba) y b) Andamio bicapa entrecruzado con sus dos caras.

Macroscópicamente es posible distinguir entre ambas capas gracias a que la PCL presenta un color blanco y la gelatina entrecruzada un tono amarillo.

En la Figura 3. 18, es posible visualizar las imágenes SEM de la estructura transversal del andamio bicapa. Primero con el andamio seccionado mediante un perforador (sacabocados) y después, comparado con aquel seccionado con un bisturí. En el primer caso, se observa que las fibras son fácilmente destruidas por el método de corte, mientras que al utilizar un bisturí, las fibras conservan mucho mejor sus características.

Es posible observar la presencia de fibras de mucho menor diámetro que las demás en la zona perteneciente a la capa de PCL y en la interface, la coexistencia de fibras delgadas y gruesas en la parte media, nos indican la presencia de fibras de PCL y fibras de gelatina en la interface.

La transición a través de las capas transcurre con uniformidad sin observarse la delaminación antes presentada. Esto puede explicarse ya que al usar el cilindro giratorio, las fibras tienen mayor oportunidad de enredarse. También, gracias a la inserción de una capa afín a ambos polímeros mejora considerablemente la unión entre capas, ya que la transición entre una capa y otra no se da de manera abrupta.

Para pruebas posteriores se decidió utilizar el método 2 para la elaboración de los andamios, de tal manera que al referirse al “andamio bicapa” se habla de aquel elaborado mediante el colector cilíndrico, al cual se le ha agregado una capa intermedia con fibras de PCL y gelatina y cuya capa de gelatina ha sido tratado con los vapores del GTA para estabilizarla en medio acuoso.

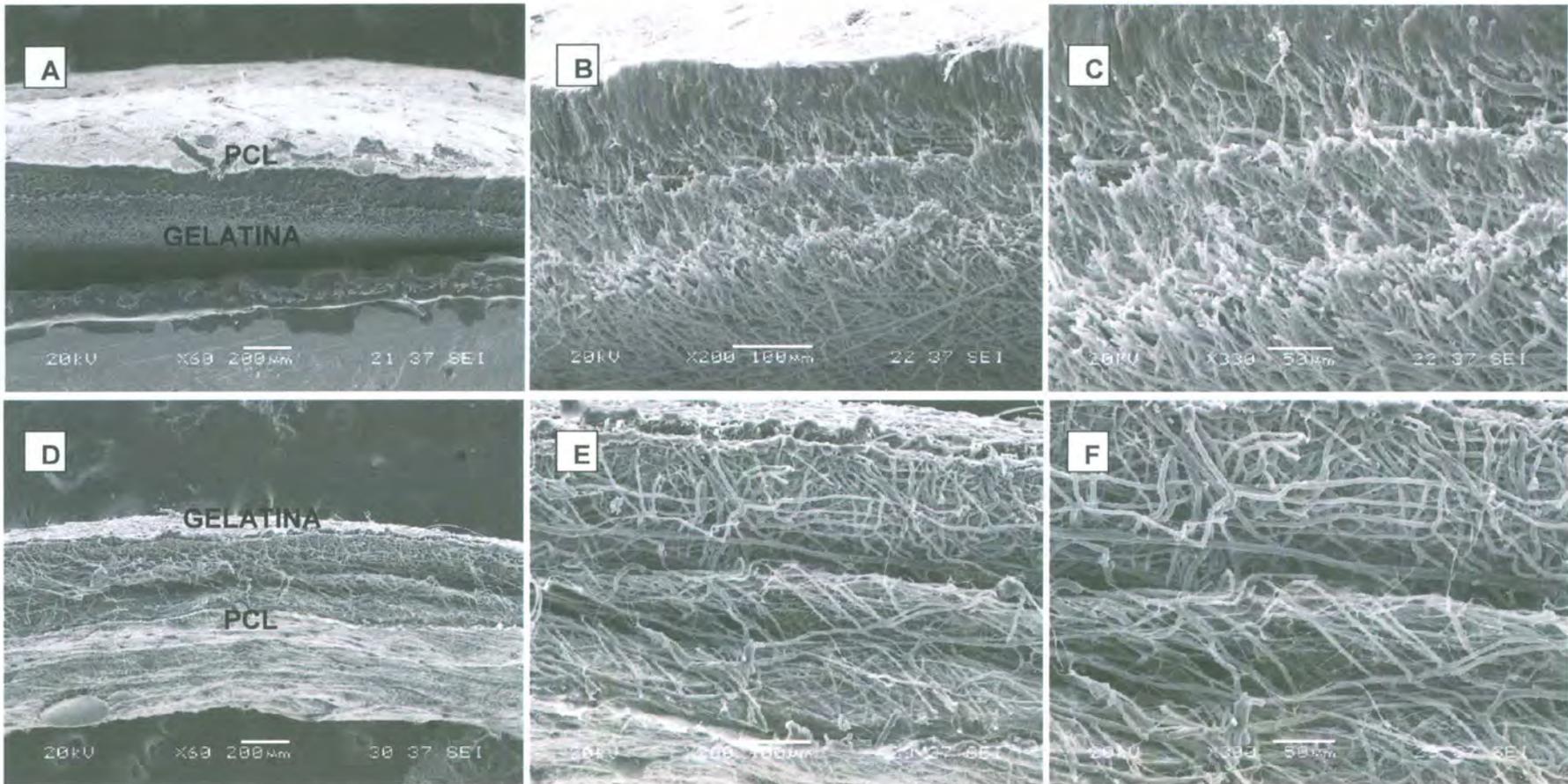


Figura 3. 18. Corte transversal del andamio bicapa cortado con un sacabocados: A) 60x, B) 200x, C) 330x y con un bisturí: D) 60x, E) 200x, F) 300x de ampliación.

### 3.7. CUANTIFICACIÓN DE FLÚOR

Los porcentajes atómicos y los espectros EDS de las fibras de policaprolactona se presentan a continuación (Figura 3. 19):

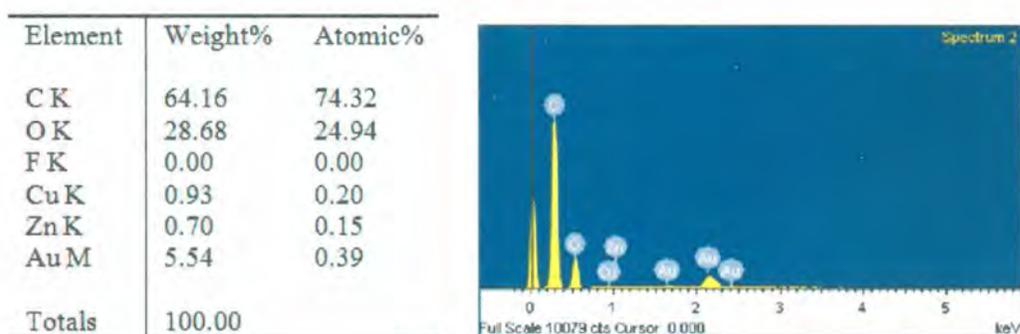


Figura 3. 19. Fibras de policaprolactona electrohiladas con trifluoroetanol. Porcentaje atómico de los elementos presentes (izquierda) y espectro de los elementos presentes en las fibras (derecha).

La ausencia del elemento flúor sugiere que las fibras de policaprolactona no retienen parte del disolvente que pudiera resultar tóxico para el ambiente biológico.

Los porcentajes atómicos y los espectros EDS de las fibras de gelatina se presentan a continuación (Figura 3. 20):

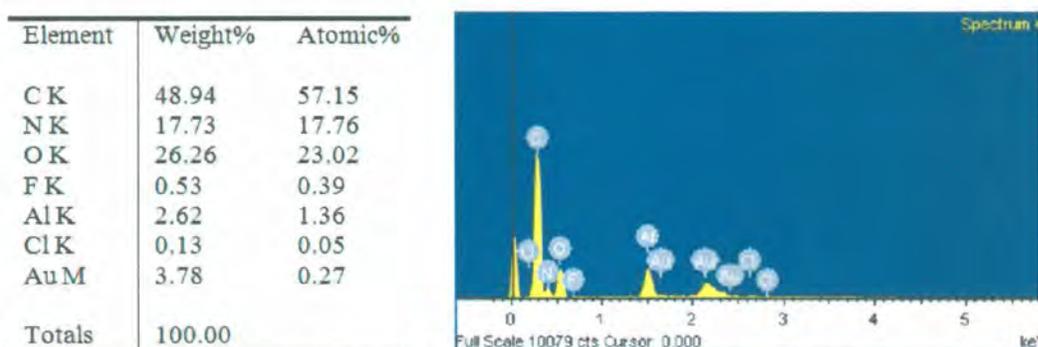


Figura 3. 20. Fibras de gelatina electrohiladas con trifluoroetanol. Porcentaje atómico de los elementos presentes (izquierda) y espectro de los elementos presentes en las fibras (derecha).

Es importante señalar, que a diferencia de lo que ocurre cuando se electrohila quitosano en ácido trifluoroacético (TFA), en la gelatina electrohilada utilizando trifluoroetanol (TFE), no se halló la formación de nuevos picos en el espectro FTIR de la Figura 3. 12, que pudieran estar evidenciando la retención de residuos de disolvente o la formación de sales.

Sangsanoh y colaboradores reportan la presencia de tres nuevos picos de absorción en el intervalo entre 840 a 720  $\text{cm}^{-1}$ . Estos picos son indicativos de la presencia de ácido trifluoroacético en las nanofibras de quitosano en forma de sales amina. Es en efecto, la formación de estas sales, es la razón por la cual el TFA es uno de los mejores disolventes del quitosano. Esto ocurre en dos pasos secuenciales: la protonación de los grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) a lo largo de las cadenas de quitosano y la interacción iónica entre el grupo amino protonado ( $\text{NH}_3^+$ ) y los aniones de trifluoroacetato<sup>[88]</sup>, lo cual destruye las interacciones moleculares existentes entre las cadenas del quitosano.

En el caso particular de la gelatina en TFE, lo que ocurre es que, para poder disolver al polímero, se forman puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo de la proteína y los grupos hidroxilo de TFE, evitando así la formación de los puentes de hidrógeno entre el grupo carbonilo y el grupo amida de la misma proteína<sup>[84]</sup>. A diferencia del TFA ( $\text{pK}_a = -0.25$ ), el TFE ( $\text{pK}_a = 12$ ) es considerado un ácido débil, por lo que es menos frecuente que se disocie y ocurra la formación de sales con la gelatina.

El flúor presente en las fibras de gelatina indican la presencia de disolvente residual. A pesar de que este porcentaje menor al 1 % no es considerable, pudiera ser fácilmente eliminado mediante un tratamiento de neutralización con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5M, como señalan Sangsanoh y colaboradores<sup>[88]</sup>.

Los porcentajes atómicos y los espectros EDS de las fibras de gelatina tratadas con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se presentan en la Figura 3. 21.

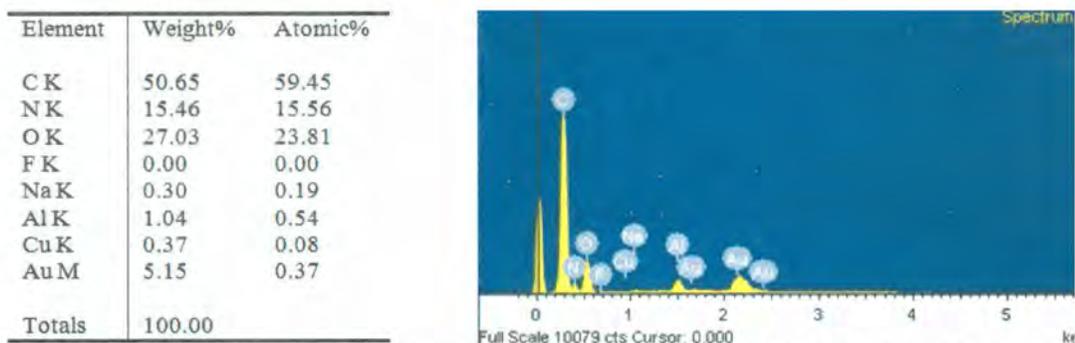


Figura 3. 21. Fibras de gelatina electrohiladas con trifluoroetanol y tratadas con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Porcentaje atómico de los elementos presentes (izquierda) y espectro de los elementos presentes en las fibras (derecha).

Se observó una disminución del porcentaje de flúor en las muestras tratadas con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , sin embargo, es posible observar esta disminución en los andamios que fueron sometidos a diversos lavados en agua destilada y posteriormente secados en horno de vacío durante 48 horas. Por lo que la inmersión en agua destilada y secado posterior, pueden ser un tratamiento efectivo y sencillo para la eliminación del disolvente residual (Tabla 3. 3)

Tabla 3. 3. Porcentaje atómico de los elementos presentes en cada andamio.

	C	N	O	F
<b>PCL<sub>FIBRAS</sub></b>	<b>74.43±0.15</b>		<b>24.94±0.01</b>	<b>0.00</b>
<b>GE<sub>FIBRAS</sub></b>	<b>56.90±0.40</b>	<b>17.99±0.32</b>	<b>24.08±1.22</b>	<b>0.29±0.02</b>
<b>GE<sub>LAVADOS/SECADO</sub></b>	<b>56.48±0.94</b>	<b>17.91±1.01</b>	<b>25.61±0.38</b>	<b>0.00</b>
<b>GE<sub>CARBONATO-SODIO</sub></b>	<b>52.62±4.63</b>	<b>22.13±5.51</b>	<b>25.20±1.01</b>	<b>0.00</b>

Se habla acerca de que este tratamiento puede modificar considerablemente la estructura de las fibras según Salihu y colaboradores<sup>[89]</sup>. En nuestro estudio, las muestras después del tratamiento fueron observadas

mediante SEM, para verificar si ocurrían cambios en la morfología que pudieran hacer que se pierda la geometría fibrosa, sin embargo, como se observa en la Figura 3. 22, ésta se mantiene en gran medida. Sin embargo, algunos cambios son observables, como la ondulación y el compactamiento de las fibras como resultado de los procesos de hidratación y deshidratación.

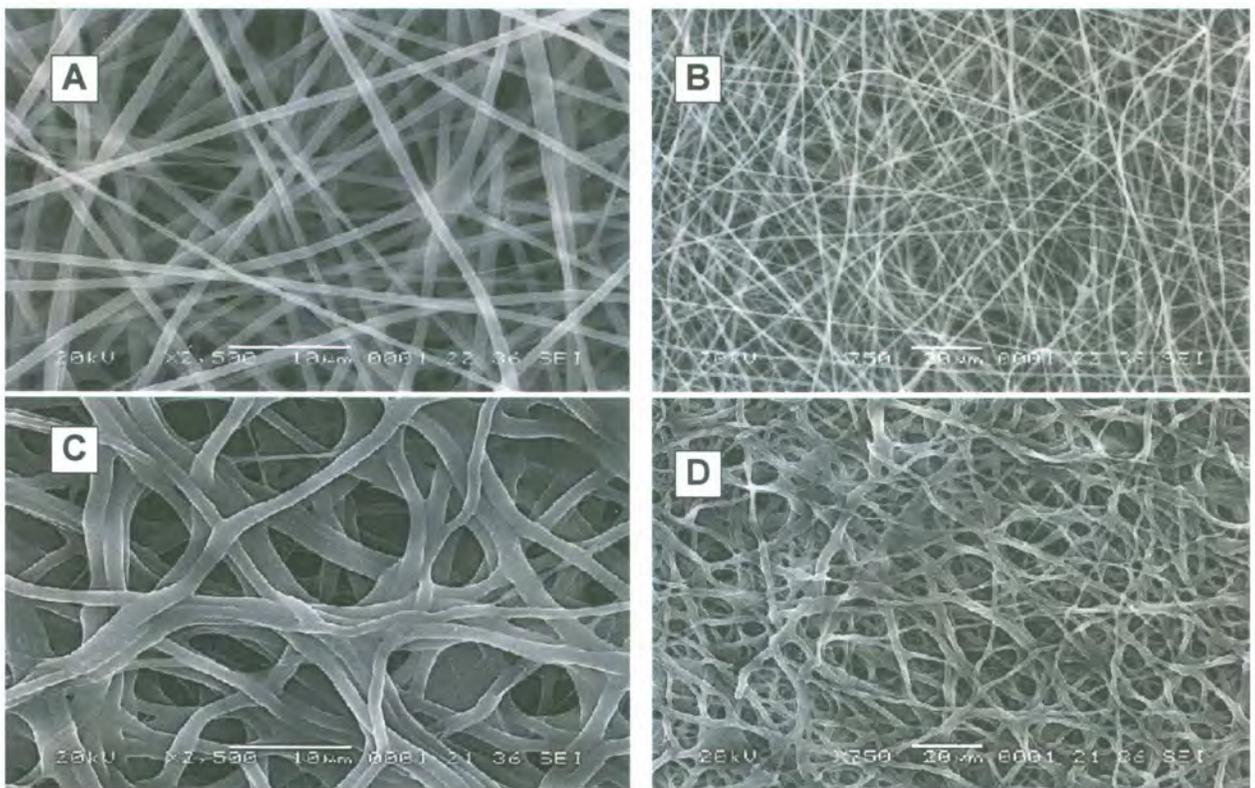


Figura 3. 22. Fibras de gelatina antes: A) 2500x, B) 750x y después: C) 2500x D) 750x del tratamiento con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  durante 3 horas.

### 3.8. INACTIVACIÓN DE LOS GRUPOS ALDEHÍDO RESIDUALES

En la Figura 5 se puede observar que este tratamiento presenta cambios en la morfología de las fibras, mostrándose más compactas y onduladas.

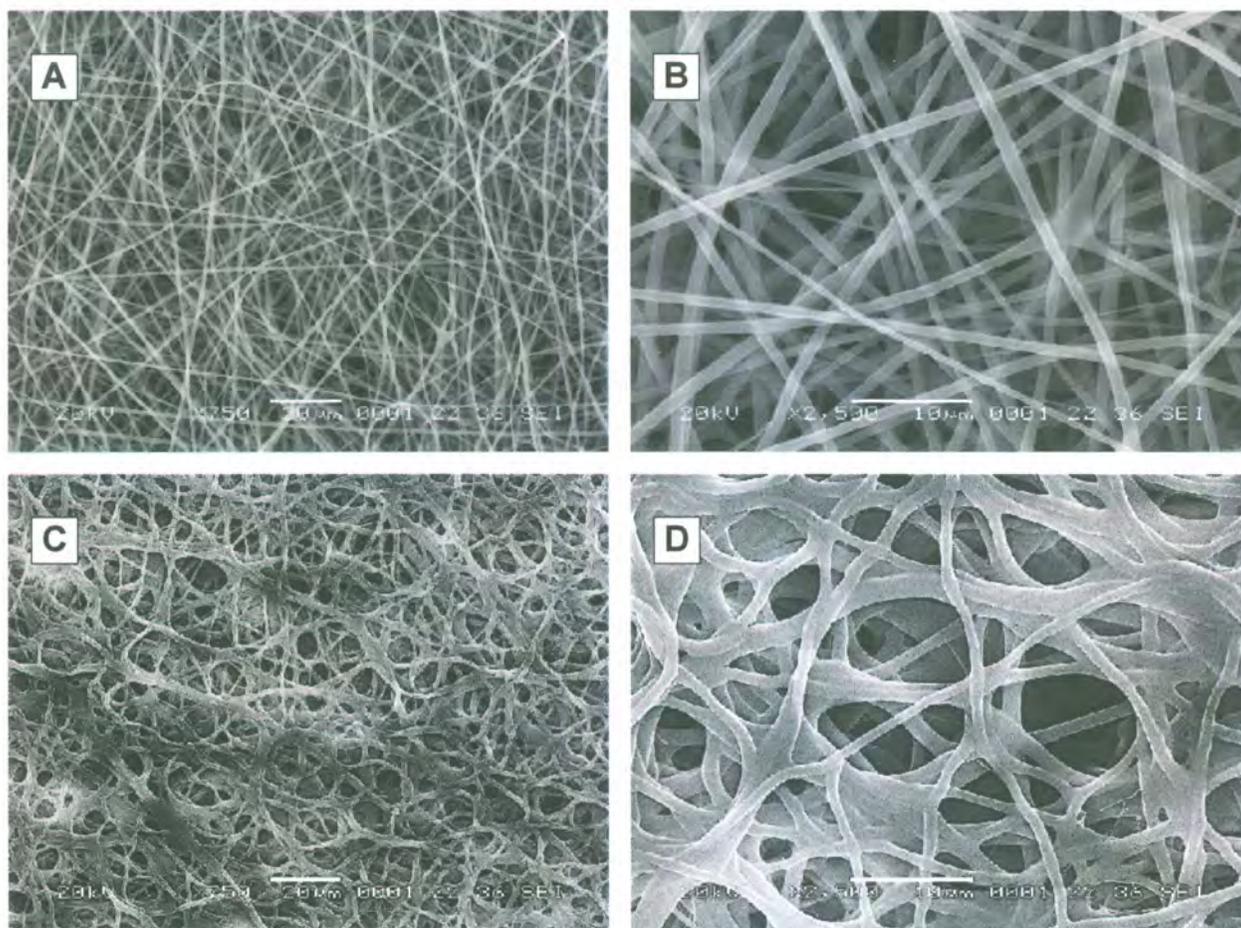


Figura 5. Morfología de las fibras de gelatina antes: A) 2500x, B) 750x y después: C) 2500x, D) 750x después del tratamiento con glicina durante una hora.

Los espectros IR de las muestras antes y después del tratamiento evidencian una disminución en el pico situado a  $1720\text{ cm}^{-1}$  relacionado con los grupos aldehído residuales (Figura 3. 23). Lo que podría estar verificando la efectividad del método de neutralización.

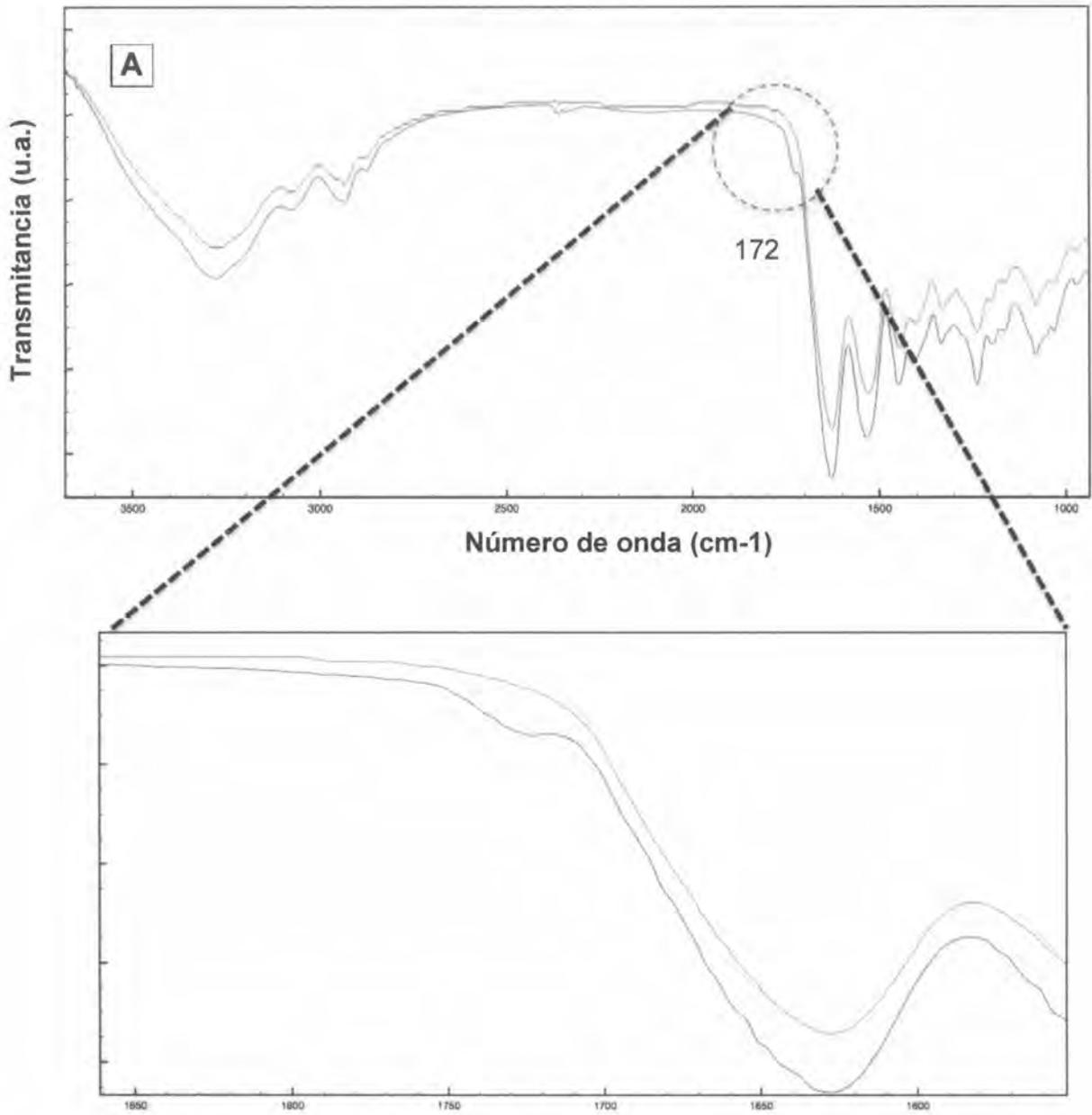


Figura 3. 23. Fibras de gelatina sin tratamiento con glicina (negro) y con tratamiento con glicina (azul). A) Espectro completo y B) Ampliación de la zona alrededor de  $1700\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.9. PROPIEDADES MECÁNICAS A TENSIÓN

En la Figura 3. 24, se presenta la curva de esfuerzo-deformación de las membranas electrohiladas de gelatina, PCL y el andamio bicapa entrecruzado.

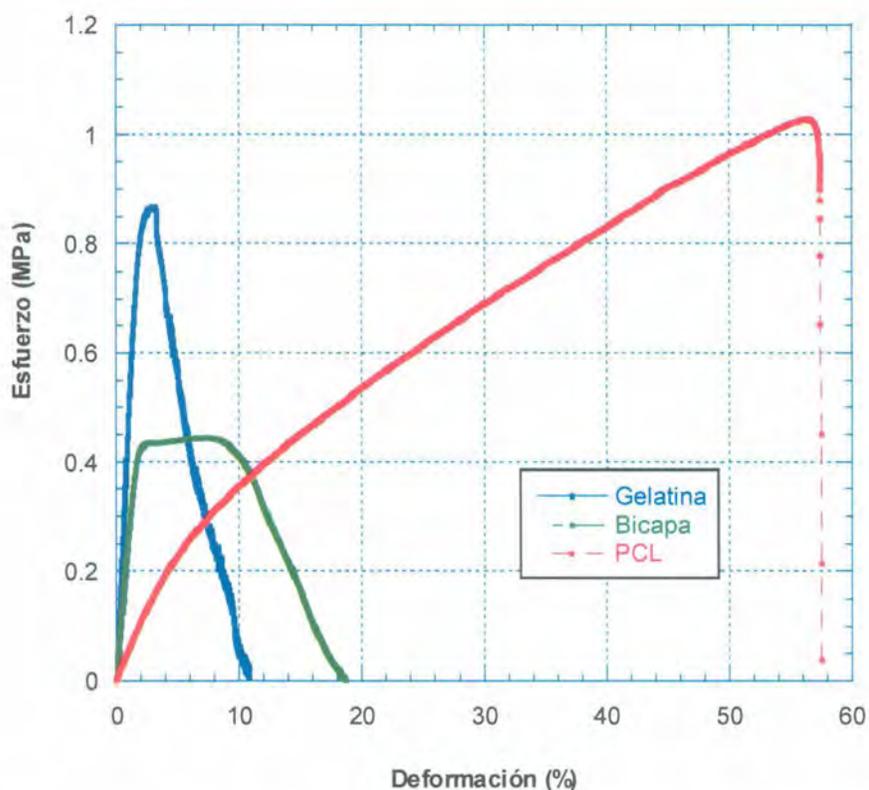


Figura 3. 24. Curvas esfuerzo deformación de las nanofibras de gelatina (azul), el andamio bicapa entrecruzado y con interface (verde) y las fibras de PCL (rojo).

A partir de estos resultados se puede ver que el andamio bicapa dio lugar a un módulo más alto en comparación con la de la membrana de PCL pura, ligeramente menor al de la gelatina pura. Es importante mencionar que también ocurre un aumento en la elongación del andamio en comparación con la

membrana electrohilada de gelatina pura. En términos de resistencia máxima, la membrana bicapa es aproximadamente la mitad que la de sus componentes, por lo que no proporcionó ninguna mejora de la resistencia.

Como se puede observar las propiedades del andamio bicapa son intermedias entre el de la PCL y la gelatina por lo que sugiere que ambos polímeros contribuyen en las propiedades mecánicas del andamio generado. Esto quiere decir que existe una buena adherencia entre las capas, de tal forma que si no fuera este el caso observaríamos que primero cede la capa de gelatina que es la más rígida y posteriormente la PCL.

El andamio final, posterior al tratamiento de insolubilización de las fibras y al ser humectado durante 2 horas en PBS (Figura 3. 25) para simular la situación real en que será utilizado, presenta las características mecánicas ilustradas en la Figura 3. 26.



*Figura 3. 25. Detalle del estiramiento de una muestra del andamio bicapa hidratado.*

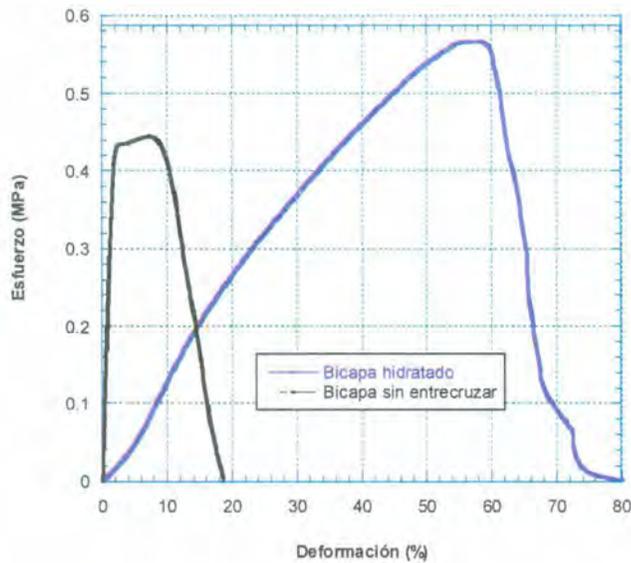


Figura 3. 26. Curvas esfuerzo deformación del andamio bicapa (negro) y el andamio bicapa después de entrecruzar e hidratar durante 2 horas en PBS (morado).

Como se puede observar el andamio bicapa final en estado hidratado presenta un módulo elástico de 2.1 MPa, una resistencia de 0.5 MPa y una deformación a la rotura de 57 % Estos resultados son comparables con aquellos reportados en la literatura para la piel y un sustituto de piel denominado StrataGraft en estado humectado como se observa en la Tabla 18.

De igual manera, Burke y colaboradores, hablan acerca de las propiedades mecánicas deseables en un sustituto dérmico. Estas propiedades son: módulo elástico comprendido entre 0.69 MPa y 6.89 MPa, esfuerzo tensil último de entre 0.69 MPa y 6.89 MPa y finalmente elongación a la rotura de entre 20 % y 100 %. Esto podría estar indicando, que el andamio bicapa hidratado elaborado en este trabajo se desempeñará adecuadamente en aplicaciones de ingeniería de tejidos de la piel<sup>[90]</sup>.

Las características mecánicas a tensión se resumen en la Figura 3. 4.

Tabla 3. 4. Propiedades mecánicas a tensión de diversos materiales.

<b>Andamio</b>	<b>Modulo elástico (MPa)</b>	<b>Resistencia (MPa)</b>	<b>Deformación (%)</b>
<b>PCL</b>	3.6±0.5	0.9±0.1	59 ± 2
<b>Bicapa</b>	33±0.5	0.6±0.1	8 ± 2
<b>Gelatina</b>	37±0.4	0.8±0.1	4 ± 1
<b>Bicapa hidratado</b>	2.1±0.6	0.5±0.1	57.4 ± 0.8
<b>Piel<sup>[91,92]</sup></b>	(0.1 – 2) Fase 1	(1-20)	(30-70)
<b>StrataGraft<sup>[93]</sup></b>	-	0.7±0.1	166 ± 0.2

### 3.10. PRUEBAS DE PÉRDIDA DE MASA

Es de vital importancia hacer alusión a la degradación polimérica, la cual hace referencia a cambios en las propiedades a causa de reacciones químicas que involucran el rompimiento de enlaces en la cadena principal de la macromolécula y/o, a causa de reacciones físicas que involucran el rompimiento de estructuras altamente ordenadas.

De acuerdo al modo de iniciación, la degradación polimérica puede clasificarse como térmica, mecánica, fotoquímica, biológica, química, etc. La degradación química se refiere a procesos inducidos bajo la influencia de químicos (ácidos, bases, disolventes, etc.). Un tipo de degradación química es la hidrolítica, en la cual una molécula de agua está implicada en el rompimiento de un enlace en la cadena principal de la macromolécula<sup>[94]</sup>.

Los cambios ocurridos en un polímero durante la degradación, pueden ser físicos o químicos. La pérdida de masa es uno de las variaciones físicas observables. Esta pérdida de masa puede deberse a que cuando las cadenas largas de los polímeros se escinden a cadenas más cortas, son lo suficientemente pequeñas para migrar fuera de la estructura del andamio, por lo que la masa original se reduce. A continuación se presentan los perfiles de pérdida de masa obtenidos para los andamios electrohilados (Figura 3. 27).

Los datos experimentales se representan por una función lineal en el caso de la gelatina y una función exponencial en el caso de la PCL. Es clara la diferencia radical entre los comportamientos de la pérdida de masa mucho más lenta en el caso de la PCL que para la gelatina. Es importante recordar que la PCL es altamente hidrofóbica, por lo que no permite fácilmente la entrada de las moléculas de agua entre sus cadenas, mientras que la gelatina es un polímero altamente hidrofílico a pesar de estar entrecruzado, como lo demuestran las

pruebas de ángulo de contacto, por lo que es más accesible para las moléculas de agua difundirse entre sus cadenas y atacar los enlaces lábiles.

A las 4 semanas de inmersión, la PCL muestra una pérdida de masa que tiende al 8 %, mientras que a gelatina ha perdido alrededor del 78 % de su masa inicial. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gupta y colaboradores en el que obtuvieron una pérdida de masa en fibras de PCL del 6 % después de 6 semanas de inmersión en PBS<sup>[95]</sup> y los estudios realizados por Correia y colaboradores donde hallaron que las nanofibras de gelatina entrecruzadas con GTA después de 15 días en PBS han perdido alrededor del 72% de su masa inicial<sup>[96]</sup>. Es importante señalar que una pérdida de masa de casi el 100 % alrededor de los 28 días es adecuada, ya que es el tiempo en el que se degradan y se integran al lecho de la herida los substitutos dérmicos comerciales mostrados en la Tabla 1.

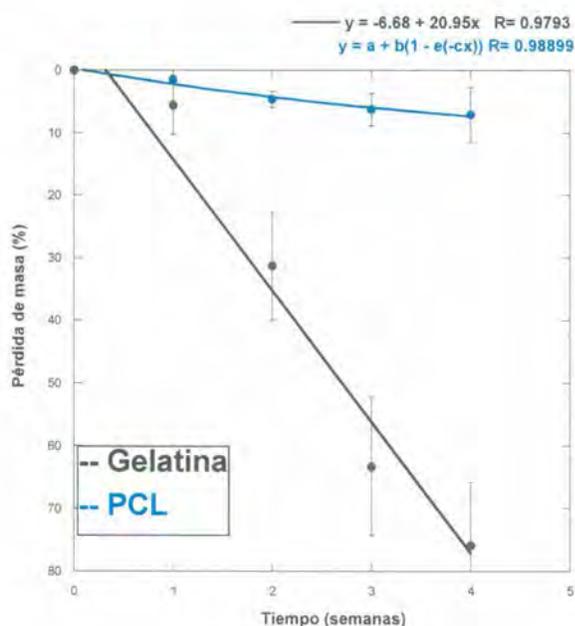


Figura 3. 27. Perfiles de pérdida de masa de los andamios electrohilados: gelatina (negro) y PCL (azul).

De acuerdo a la literatura, la policaprolactona se degrada por hidrólisis de sus enlaces éster (Figura 3. 28) y presenta una pérdida de masa total alrededor de los 24 meses. Los subproductos de la degradación no deben ser causa de preocupación, ya que los fragmentos de baja masa molecular son finalmente absorbidos por las células gigantes y macrófagos. El subproducto denominado ácido e-hidroxicaproico se metaboliza a través del ácido tricarboxílico o, es eliminado por secreción renal directa<sup>[97]</sup>.

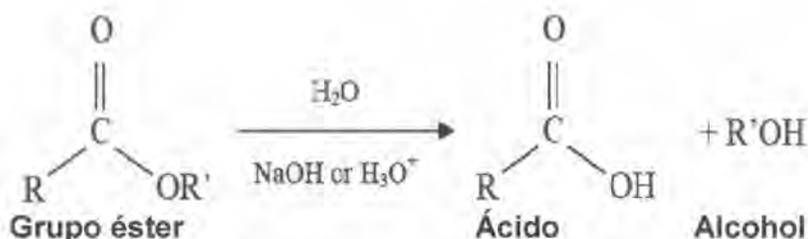


Figura 3. 28. Mecanismo que describe la hidrólisis de un poliéster como la PCL, usualmente catalizada por un ácido o una base. Donde R y R' pueden representar el resto de la cadena polimérica.

Como se puede observar en la Figura 3. 28, el número de los grupos carboxílicos y -OH terminales deben incrementarse con el tiempo de degradación. Sin embargo, debido al corto tiempo de inmersión, los cambios no fueron fácilmente observables. Por lo que se recurrió a la normalización de los espectros, tomando como referencia la banda relacionada con los enlaces de la zona cristalina ( $1293 \text{ cm}^{-1}$ ) y observando aquellos cambios con los relacionados con las bandas atribuidas a las zonas amorfas ( $1157 \text{ cm}^{-1}$ ) a través de los diferentes tiempos de inmersión en PBS.

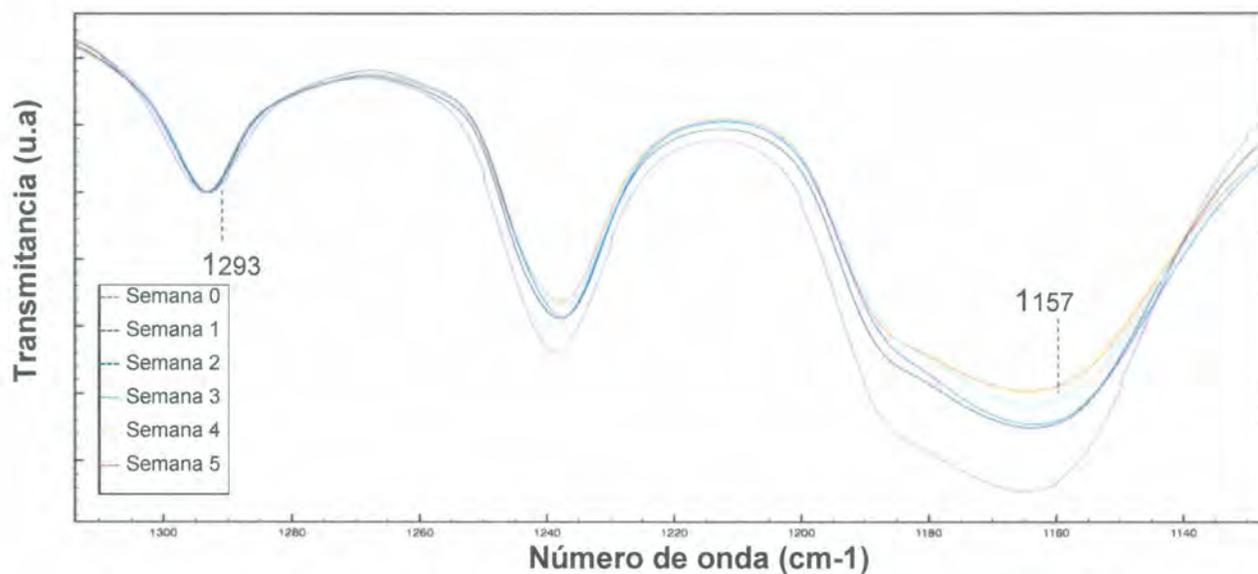


Figura 3. 29. Espectro IR normalizado de la PCL con una ampliación en la región 1130-1310  $\text{cm}^{-1}$ .

Se puede observar en la Figura 3. 29 una disminución en la banda a 1157  $\text{cm}^{-1}$ , que podrían estar indicando una disminución de los enlaces C-O y C-C, relacionadas con la zona amorfa del material, ya que son las primeras en ser afectadas durante la hidrólisis.

Finalmente se presentan las micrografías SEM de las fibras de PCL (Figura 3. 30) a diferentes tiempos de inmersión en PBS.

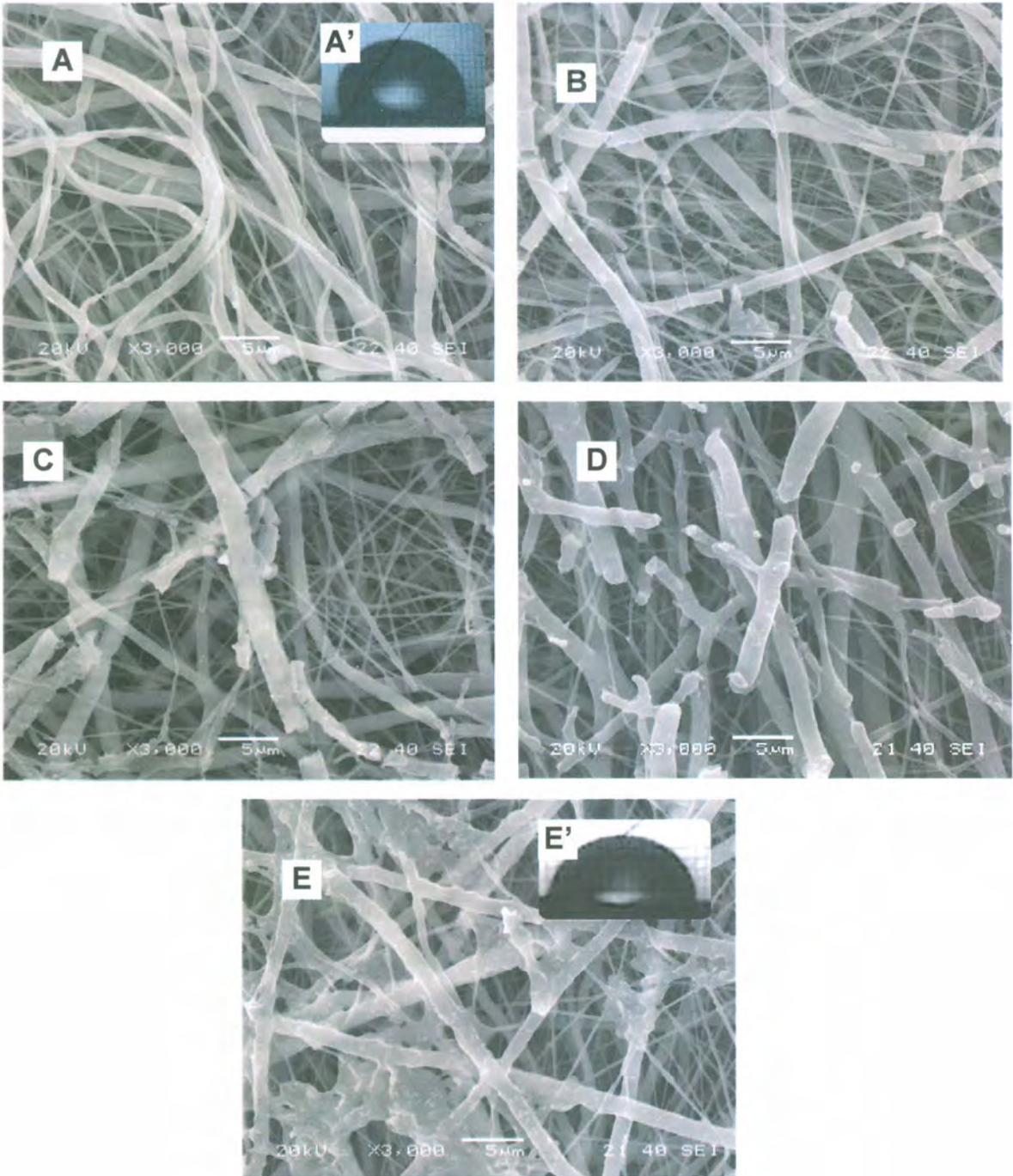


Figura 3. 30. Imágenes SEM de las fibras de PCL sumergidas en PBS durante A) 0, B) 1, C) 2, D) 3 y E) 4 semanas. A') Ángulo de contacto antes de la inmersión en PBS y E') Después de la inmersión durante 4 semanas.

Desde la primera semana se observaron microfisuras y agujeros en las fibras, sobre todo en las de mayor diámetro, finalizando con la fractura total para dar lugar a fibras más cortas. Debido a la inestabilidad sufrida durante el proceso de electrohilamiento algunos defectos pudieron haberse formado en la superficie de las fibras. Estos defectos iniciales en las fibras fueron los sitios donde las moléculas de agua penetraron más fácilmente, atacando los enlaces éster. También es importante recalcar que debido a la naturaleza semicristalina del polímero, las porciones de rápida degradación podrían corresponder a las regiones amorfas y, las porciones de degradación lenta a las regiones cristalinas, entonces la banda a 1293 no debió cambiar, como lo demuestra la Figura 3. 29. Este comportamiento podría estar indicando que la degradación de la PCL no se da por erosión de la superficie, sino por erosión en bulto. Y la causa probable de que las fibras de mayores diámetros sean las más afectadas podría estar relacionada con la relación que existe entre la cristalinidad y el diámetro de las fibras formadas, donde las fibras más delgadas suelen presentar mayores porcentajes de cristalinidad<sup>[98]</sup>. También fue posible observar una disminución en el ángulo de contacto posteriormente a la exposición al PBS durante 4 semanas, de  $98^\circ \pm 2.1$  a  $83^\circ \pm 1.8$ , observando así un aumento en la hidrofiliidad del andamio.

La degradación de la gelatina es por hidrólisis de sus enlaces peptídicos, dando lugar a grupos terminales de ácidos carboxílicos y aminas, como se observa en la Figura 3. 31.

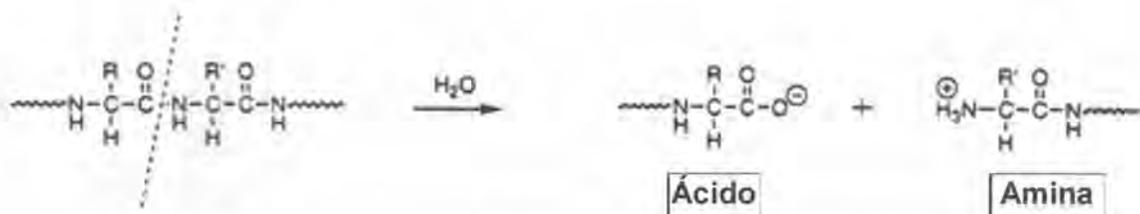


Figura 3. 31. Mecanismo de hidrólisis de los enlaces peptídicos en las proteínas.

En la Figura 3. 32 se puede observar el aumento considerable en la banda relacionada con las aminos libres en el polímero, indicando que probablemente la degradación está ocurriendo mediante el mecanismo indicado en la Figura 3. 31. Cabe señalar que las gráficas fueron normalizadas con respecto a la banda relacionada con los enlaces CH<sub>2</sub> de la gelatina.

Mediante el análisis SEM, es posible observar los cambios en la morfología de las fibras de gelatina durante el proceso de degradación, se considera que durante el proceso de adsorción de agua las fibras se hinchan considerablemente, de tal forma que al ser secadas estas tienden a contraerse y también a compactarse durante las semanas 1 y 2, por lo que se observan morfologías onduladas, mientras que para las semanas 3 y 4, ya no se observa esta contracción, sino más bien, las fibras empiezan a disolverse hasta formar una estructura similar a la de una película perdiendo completamente su estructura fibrosa a la semana 4, como se observa en Figura 3. 32.

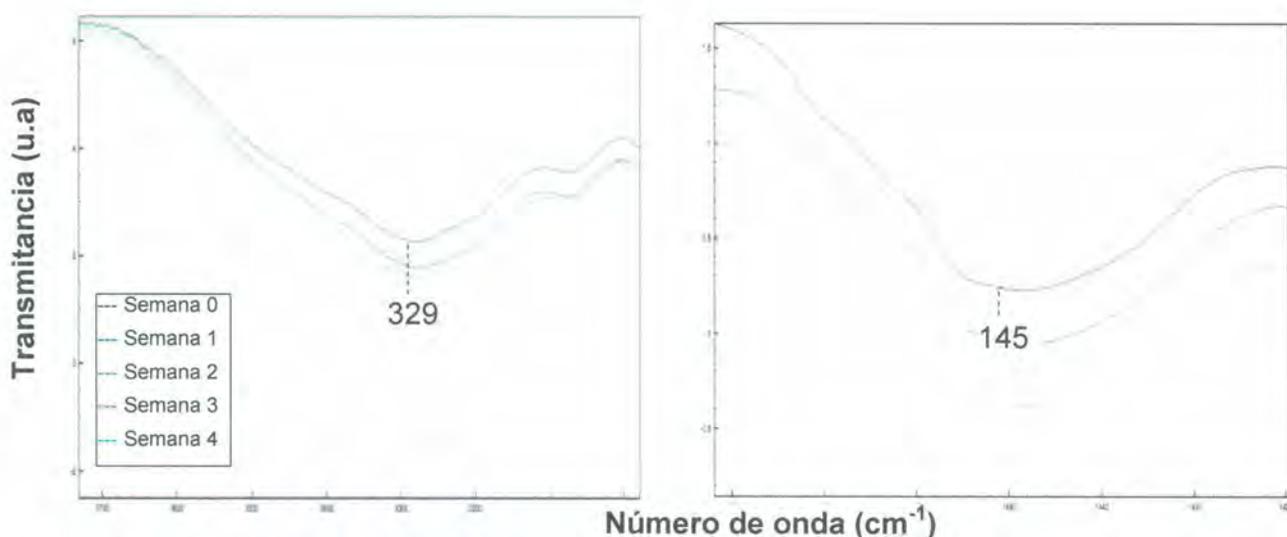


Figura 3. 32. Espectro IR normalizado de la gelatina

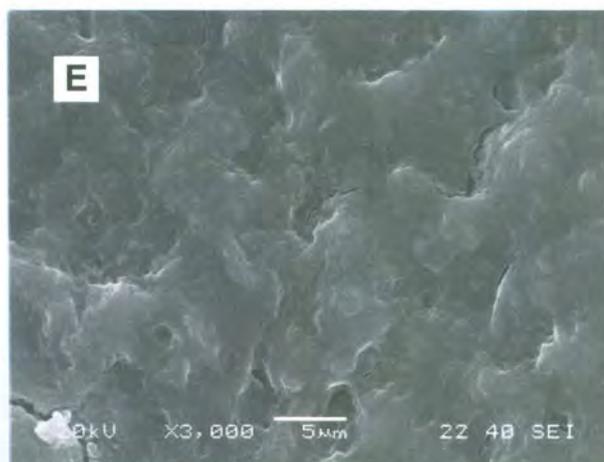
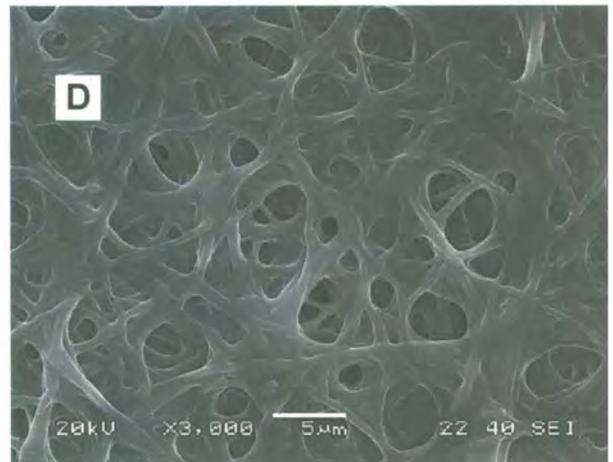
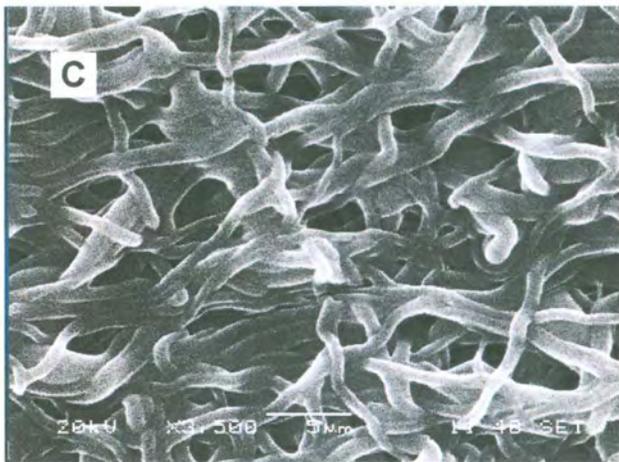
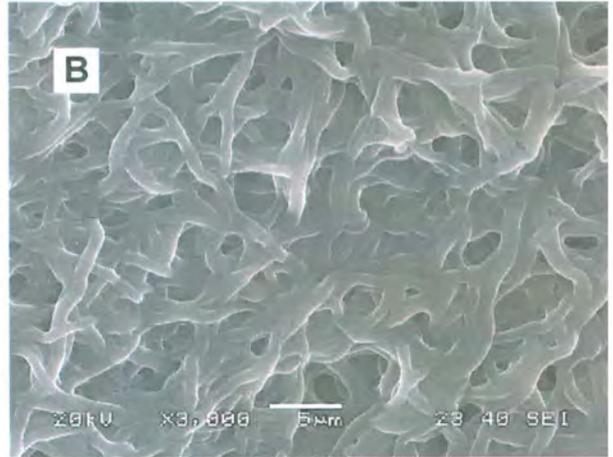
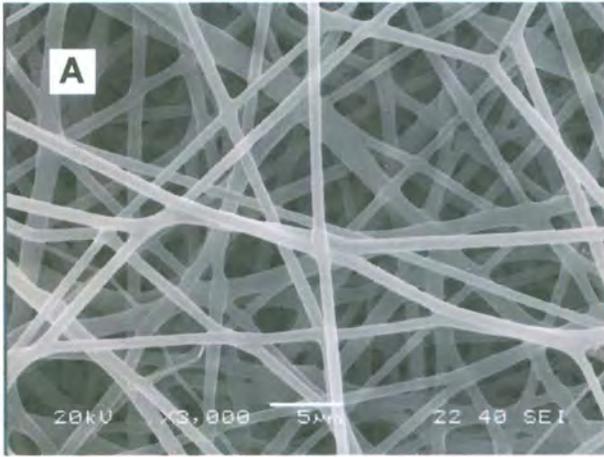


Figura 3. 33. Imágenes SEM de las fibras de gelatina sumergidas en PBS durante A) 0, B) 1, C) 2, D)3 y E) 4 semanas.

## CONCLUSIONES

---

Se obtuvieron estructuras fibrosas libres de glóbulos con diámetro medio de 733 nm, a partir de disoluciones al 20 % (m/v) de PCL en TFE, a un flujo de alimentación de 0.5 ml/h, una distancia del colector a la aguja de 15 cm y un voltaje de 15 kV.

Para las fibras de gelatina con diámetro promedio de 1107 nm, las condiciones ideales fueron una concentración de 10 % (m/v) en TFE, a un flujo de 0.8 ml/h, distancia de 15 cm y un potencial eléctrico de entre 10 kV.

Se logró obtener membranas de gelatina insolubles en agua destilada y PBS mediante la exposición de las fibras al vapor de GTA durante 48 horas. El aspecto exterior e interior de las membranas electrohiladas de gelatina evidencian un posible entrecruzamiento de las cadenas de polímero mediante el cambio de color de las membranas a un tono amarillo relacionado con la formación de enlaces imida.

El análisis IR de los polímeros prístinos y sus correspondientes fibras electrohiladas muestran que para la PCL y la gelatina no hay cambios significativos en la estructura química durante el electrohilamiento.

Los ángulos de contacto hallados para la PCL y gelatina son de 98° y 0° respectivamente, al los 3 segundos. La hidrofiliidad de la membrana de gelatina es adecuada ya que según la literatura podría propiciar el crecimiento celular, mientras que, la hidrofobicidad de la PCL, no debe afectar, ya que en esta capa no se realizará cultivo celular.

El tratamiento con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , así como el tratamiento de lavado y secado, eliminan los residuos de flúor en las membranas electrohiladas, eliminando de esta manera uno de los principales factores reportados en la literatura, de citotoxicidad en los andamios.

Los tratamientos de entrecruzamiento, eliminación de disolvente residual y neutralización con glicina no modifican significativamente la morfología de las fibras, lo que es adecuado.

El electrohilado secuencial de las capas de PCL y gelatina en un colector cilíndrico no permiten la correcta adherencia entre capas. Por lo que es necesario agregar una capa intermedia en la que se permita el electrohilado simultáneo de las dos disoluciones y utilizar un colector cilíndrico rotatorio a 240 rpm.

Las propiedades mecánicas del andamio bicapa hidratado son de  $2.1 \pm 0.6$  MPa,  $0.5 \pm 0.1$  MPa y  $57.4 \pm 0.8$  %; para el módulo elástico, la resistencia máxima y la deformación a la ruptura respectivamente. Características que se asemejan en gran medida a las propiedades de la piel.

Los perfiles de pérdida de masa correspondientes a las membranas de PCL muestran un comportamiento exponencial, mientras que el de la gelatina se asemeja a una pérdida lineal. A los 28 días de exposición al PBS bajo condiciones fisiológicas, las membranas de PCL pierden alrededor del 8 %, mientras que las membranas de gelatina pierden alrededor del 78 %. Las pérdidas de masa de casi la totalidad del andamio alrededor de los 30 días va de acuerdo con los tiempos de degradación de diversos sustitutos dérmicos comerciales. Mientras que la lenta degradación de la PCL también es adecuada ya que esta capa suele ser eliminada quirúrgicamente o rechazada por el cuerpo y no reabsorbida por el organismo.

## **PERSPECTIVAS DEL TRABAJO**

---

Entre las perspectivas a futuro para continuar mejorando el andamio obtenido se encuentran diversos estudios propuestos para desarrollar, tales como:

- Determinación del grado de entrecruzamiento de las membranas de gelatina.
- Evaluación de los efectos de la variación del tiempo de exposición a los vapores del Glutaraldehído de las membranas de gelatina en las propiedades mecánicas, de absorción de agua y de pérdida de masa.
- Pruebas biológicas de viabilidad celular con fibroblastos.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] V. Orozco; R. Altamirano; A. Magaña; A. Celis, Tendencia de mortalidad por quemaduras en México, *Gaceta Médica de México* 148, 349-357, 2012.
- [2] S. Agarwal; J. Wendorff; A. Greiner, Use of electrospinning technique for biomedical applications, *Polymer* 49(26), 5603-5621, 2008.
- [3] R. Lanza; R. Langer; J. Vacanti, *Principles of tissue engineering*, Academic press, San Diego, 2011.
- [4] J. Hartgerink; E. Beniash; S. Stupp, Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science* 294(5547), 1684-1688, 2001.
- [5] A. Moriya; T. Maruyama; Y. Ohmukai; T. Sotani; H. Matsuyama, Preparation of poly (lactic acid) hollow fiber membranes via phase separation methods, *Journal of Membrane Science* 342(1), 307-312, 2009.
- [6] Z. Huang; Y. Zhang; M. Kotaki; S. Ramakrishna, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Composites science and technology* 63(15), 2223-2253, 2003.
- [7] R. Franco; Y. Min; H. Yang; B. Lee, Fabrication and biocompatibility of novel bilayer scaffold for skin tissue engineering applications, *Journal of biomaterials applications* 27(5), 605-615, 2013.
- [8] Z. Zhou; Y. Zhou; Y. Chen; H. Nie; Y. Wang; F. Li; Y. Zheng, Bilayer porous scaffold based on poly-( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibrous membrane and gelatin sponge for favoring cell proliferation, *Applied Surface Science* 258(5), 1670-1676, 2011.
- [9] D. Puerta; C. Molina; M. Cano; N. Suarez; G. Moises; I. Gómez; C. Peláez, Soluciones terapéuticas para la reconstrucción de la dermis y la epidermis, *Oportunidades en el medio antioqueño* 2(3), 77-83, 2008.
- [10] I. Suárez, Síntesis y caracterización fisicoquímica de un andamio celular a base de quitosano biológico-químico y colágena tipo I, Tesis de Maestría, Ciencias biológicas y de la salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Itztapalapa, 2013.
- [11] R. Shevchenko; S. James; S. James, A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction, *Journal of The Royal Society Interface* 7(43), 229-258, 2010.
- [12] E. Rabkin; F. Schoen, Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovascular pathology* 11(6), 305-317, 2002.
- [13] S. Yang; K. Leong; Z. Du; C. Chua, The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors, *Tissue engineering* 7(6), 679-689, 2001.
- [14] C. Kim; M. Khil; H. Kim; H. Lee; K. Jahng, An improved hydrophilicity via electrospinning for enhanced cell attachment and proliferation, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 78(2), 283-290, 2006.

- [15] S. Ghosh; H. Bull, Adsorbed films of bovine serum albumin: Tensions at air-water surfaces and paraffin-water interfaces, *Biochimica et Biophysica Acta* 66(0), 150-157, 1963.
- [16] R. Singh; J. Lillard, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and Molecular Pathology* 86(3), 215-223, 2009.
- [17] R. Palma; S. Peeters; M. Van Bael; H. Van den Rul; K. Bonroy; W. Laureyn; G. Maes, Silane ligand exchange to make hydrophobic superparamagnetic nanoparticles water-dispersible, *Chemistry of Materials* 19(7), 1821-1831, 2007.
- [18] H. Chang; Y. Wang, *Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds*, InTech, Croacia, 2011, 569-588.
- [19] J. Burdick; R. Mauck, *Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A review and the past and future trends*, Springer Science & Business Media, Alemania, 2011.
- [20] J. Soria; J. Barcia; J. Andrades; J. Romero; M. Monleón; J. García, Uso de biomateriales en medicina regenerativa, aspectos básicos y aplicaciones en el sistema nervioso, *Trauma (Mapfre)* 20(1), 15-22, 2009.
- [21] F. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today* 14(3), 88-95, 2011.
- [22] C. Covas; W. Argüelles, *Ingeniería de tejidos aplicada a la sustitución y regeneración de piel*, Editorial Universitaria, La Habana, 2009.
- [23] A. Colorado; C. Agudelo; M. Moncada, Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: revisión, *Revista Ingeniería Biomédica* 7(14), 11-23, 2014.
- [24] S. Chew; Y. Wen; Y. Dzenis; K. Leong, The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine, *Current pharmaceutical design* 12(36), 4751, 2006.
- [25] N. Hiep; B. Lee, Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21(6), 1969-1978, 2010.
- [26] A. Greiner; J. Wendorff, Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers, *Angewandte Chemie* 46(30), 5670-5703, 2007.
- [27] C. Hsu, Electrospinning of poly( $\epsilon$ -Caprolactone), Tesis de maestría, Materials Science and Engineering, Worcester Polytechnic Institute of New England, 2003.
- [28] H. Haroosh; D. Chaudhary; Y. Dong, Effect of solution parameters on electrospun PLA/PCL fibers, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 29(3), 663-668 2011.
- [29] Y. Kolambkar, Electrospun nanofiber meshes for the functional repair of bone defects, Doctoral dissertation, Department of Biomedical Engineering, Georgia Institute of Technology, 2009.
- [30] T. Webster; M. Waid; J. McKenzie; R. Price; J. Ejiófor, Nano-biotechnology: carbon nanofibres as improved neural and orthopaedic implants, *Nanotechnology* 15(1), 48-54, 2004.
- [31] J. Lee; S. Jeong; M. Bae; D. Yang; D. Heo; C. Kim; I. Kwon, Highly porous electrospun nanofibers enhanced by ultrasonication for improved cellular infiltration, *Tissue Engineering Part A* 17(21-22), 2695-2702, 2011.

- [32] M. Skotak; J. Ragusa; D. Gonzalez; A. Subramanian, Improved cellular infiltration into nanofibrous electrospun cross-linked gelatin scaffolds templated with micrometer-sized polyethylene glycol fibers, *Biomedical Materials* 6(5), 055012, 2011.
- [33] C. Vaquette; J. Cooper-White, Increasing electrospun scaffold pore size with tailored collectors for improved cell penetration, *Acta biomaterialia* 7(6), 2544-2557, 2011.
- [34] I. Jones; L. Currie; R. Martin, A guide to biological skin substitutes, *British journal of plastic surgery* 55(3), 185-193, 2002.
- [35] F. Zizumbo, Obtención y caracterización de andamios en forma de conductos tubulares coaxiales a base de quitosano y poli (ácido láctico) mediante la técnica de electrohilado para su posible uso en la regeneración de nervios periféricos, Tesis de maestría, departamento de Materiales Poliméricos, Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2013.
- [36] D. Reneker; A. Yarin; E. Zussman; H. Xu, Electrospinning of Nanofibers from Polymer Solutions and Melts, *Advances in Applied Mechanics* 41, 43-346, 2007.
- [37] L. Ghasemi; M. Morshed; K. Karbalaie; M. Fesharaki; M. Nasr; H. Baharvand, Electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofiber mat as extracellular matrix, *Yakhteh Medical Journal* 10(3), 179-184, 2008.
- [38] W. Saltzman; T. Kyriakides, Cell interactions with polymers. En Principles of tissue engineering, *Academic press, San Diego, 2000, 280-285.*
- [39] S. Gautam; C. Chou; A. Dinda; P. Potdar; N. Mishra, Fabrication and characterization of PCL/gelatin/chitosan ternary nanofibrous composite scaffold for tissue engineering applications, *Journal of Materials Science* 49(3), 1076-1089, 2014.
- [40] S. Lee; H. Jeon; Y. Lee; Y. Lee; K. Song; M. Park; H. Ahn, Bio-artificial skin composed of gelatin and (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucan, *Biomaterials* 24(14), 2503-2511, 2003.
- [41] P. Zahedi; I. Rezaeian; S. Ranaei-Siadat; S. Jafari; P. Supaphol, A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymers for Advanced Technologies*, 21(2), 77-95, 2010.
- [42] J. Diop, Preparation and Characterization of Gelatin and Chitosan Films, Tesis de licenciatura, Ingeniería química y biológica, Universidad de Tufts, Estados Unidos, 2009.
- [43] J. Jafari; S. Emami; A. Samadikuchaksaraei; M. Bahar; F. Gorjipour, Electrospun chitosan-gelatin nanofibrous scaffold: Fabrication and in vitro evaluation, *Biomedical materials and engineering* 21(2), 99-112, 2011.
- [44] W. Babel, Gelatine – ein vielseitiges Biopolymer, *Chemie in unserer Zeit* 30(2), 86-95, 1996.
- [45] R. Zeeman, Cross-linking of collagen-based materials, Doctoral dissertation, Universiteit Twente, 1998.
- [46] Y. Liu; L. Ma; C. Gao, Facile fabrication of the glutaraldehyde cross-linked collagen/chitosan porous scaffold for skin tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C* 32(8), 2361-2366, 2012.
- [47] A. Jayakrishnan; S. Jameela, Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices, *Biomaterials* 17(5), 471-484, 1996.

- [48] D. Speer; M. Chapil; C. Eskelson; J. Ulreich, Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials, *J Biomed Mater Res*, 14(6), 753-764, 1980.
- [49] T. Neepser; B. Ballantyne, Two-generation reproduction study by dosing with glutaraldehyde in the drinking water of CD rats, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 61(2), 107-129, 2000.
- [50] E. Campos; P. Coimbra; M. Gil, An improved method for preparing glutaraldehyde cross-linked chitosan-poly(vinyl alcohol) microparticles, *Polymer Bulletin* 70(2), 549-561, 2013.
- [51] J. Lannutti; D. Reneker; T. Ma; D. Tomasko; D. Farson, Electrospinning for tissue engineering scaffolds, *Materials Science and Engineering: C* 27(3), 504-509, 2007.
- [52] E. López; M. Acosta; M. Díaz, ARTIFICIAL SKIN PIEL ARTIFICIAL, *Revista Colombiana de Tecnologías de Avanzada* 2(8), 41-47, 2006.
- [53] D. Queen; J. Evans; J. Gaylor; J. Courtney; W. Reid, Burn wound dressings—a review, *Burns* 13(3), 218-228, 1987.
- [54] X. Wang; B. Ding; B. Li, Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering, *Materials Today* 16(6), 229-241, 2013.
- [55] E. Chong; T. Phan; I. Lim; Y. Zhang; B. Bay; S. Ramakrishna; C. Lim, Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution, *Acta Biomaterialia* 3(3), 321-330, 2007.
- [56] S. Kumbar; R. James; S. Nukavarapu; C. Laurencin, Electrospun nanofiber scaffolds: engineering soft tissues, *Biomedical Materials* 3(3), 034002, 2008.
- [57] S. Zhong; Y. Zhang; C. Lim, Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2(5), 510-525, 2010.
- [58] C. Velásquez, Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos, *Revista Iberoamericana de polímeros* 4(2), 91, 2003.
- [59] L. Ma; Y. Shi; Y. Chen; H. Zhao; C. Gao; C. Han, In vitro and in vivo biological performance of collagen-chitosan/silicone membrane bilayer dermal equivalent, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18(11), 2185-2191, 2007.
- [60] M. Arnal; C. Martínez; M. Pérez; M. Monleón; A. Vallés, Electrospun adherent-antiadherent bilayered membranes based on cross-linked hyaluronic acid for advanced tissue engineering applications, *Materials Science and Engineering* 33(7), 4086-4093, 2013.
- [61] H. Chen; W. Jao; M. Yang, Characterization of gelatin nanofibers electrospun using ethanol/formic acid/water as a solvent, *Polymers for Advanced Technologies* 20(2), 98-103, 2009.
- [62] K. Lee; H. Kim; M. Khil; Y. Ra; D. Lee, Characterization of nano-structured poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning, *Polymer* 44(4), 1287-1294, 2003.
- [63] B. Dhandayuthapani; U. Krishnan; S. Sethuraman, Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 94(1), 264-272, 2010.

- [64] Y. Zhang; H. Ouyang; C. Lim; S. Ramakrishna; Z. Huang, Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 72(1), 156-165, 2005.
- [65] A. Cipitria; A. Skelton; T. Dargaville; P. Dalton; D. Hutmacher, Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review, *Journal of Materials Chemistry* 21(26), 9419-9453, 2011.
- [66] D. Han; S. Boyce; A. Steckl, Versatile core-sheath biofibers using coaxial electrospinning, *Materials Research Society Symposia Proceedings* 1094, 33-38, 2008.
- [67] R. Jayakumar; M. Prabakaran; S. Nair; H. Tamura, Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications, *Biotechnology advances* 28(1), 142-150, 2010.
- [68] Z. Huang; Y. Zhang; S. Ramakrishna; C. Lim, Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers, *Polymer* 45(15), 5361-5368, 2004.
- [69] T. Nguyen; B. Lee, Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electrospun nano-fibers, *Journal of Biomedical Science and Engineering* 3(12), 1117, 2010.
- [70] J. Song; H. Kim; H. Kim, Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19(1), 95-102, 2008.
- [71] A. Cooper; N. Bhattarai; M. Zhang, Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan–PCL fibers for nerve tissue regeneration, *Carbohydrate Polymers* 85(1), 149-156, 2011.
- [72] S. Tsai; H. Liou; C. Lin; K. Kuo; Y. Hung; R. Weng; F. Hsu, MG63 osteoblast-like cells exhibit different behavior when grown on electrospun collagen matrix versus electrospun gelatin matrix, *PLoS one* 7(2), e31200, 2012.
- [73] Y. Zhang; J. Venugopal; Z. Huang; C. Lim; S. Ramakrishna, Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers, *Polymer* 47(8), 2911-2917, 2006.
- [74] Z. Chen; P. Wang; B. Wei; X. Mo; F. Cui, Electrospun collagen–chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell, *Acta Biomaterialia* 6(2), 372-382, 2010.
- [75] Y. Qian; K. Zhang; F. Chen; Q. Ke; X. Mo X, Cross-Linking of Gelatin and Chitosan Complex Nanofibers for Tissue-Engineering Scaffolds, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 22(8), 1099-1113, 2011.
- [76] A. Haghi, *Electrospinning of Nanofibers in Textiles*, Apple Academic Press, Canada, 2011.
- [77] S. Haider; W. Al Masry; N. Bukhari; M. Javid, Preparation of the chitosan containing nanofibers by electrospinning chitosan–gelatin complexes, *Polymer Engineering y Science* 50(9), 1887-1893, 2010.
- [78] J. Ratanavaraporn; S. Damrongsakkul; N. Sanchavanakit; T. Banaprasert; S. Kanokpanont, Comparison of gelatin and collagen scaffolds for fibroblast cell culture, *Journal of Metals* 16(1), 31-36, 2006.

- [79] F. Ganji; S. Vasheghani; E. Vasheghani, Theoretical description of hydrogel swelling: a review, *Iran Polymer Journal* 19(5), 375-398, 2010.
- [80] Y. Wan; Y. Wang; K. Yao; G. Cheng, Carbon fiber-reinforced gelatin composites II. Swelling behavior, *Journal of applied polymer science* 75(8), 994-998, 2000.
- [81] V. Chakrapani; A. Gnanamani; V. Giridev; M. Madhusoothanan; G. Sekaran, Electrospinning of type I collagen and PCL nanofibers using acetic acid, *Journal of Applied Polymer Science* 125(4), 3221-3227, 2012.
- [82] T. Elzein; M. Nasser; C. Delaite; S. Bistac; P. Dumas, FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces, *Journal of colloid and interface science* 273(2), 381-387, 2004.
- [83] M. Ibrahim; A. Mahmoud; O. Osman; M. Abd El-Aal; M. Eid, Molecular spectroscopic analyses of gelatin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 81(1), 724-729, 2011.
- [84] G. Shanmugam; S. Reddy; V. Natarajan; B. Madhan, 2,2,2-Trifluoroethanol disrupts the triple helical structure and self-association of type I collagen, *International Journal of Biological Macromolecules* 54(0), 155-159, 2013.
- [85] J. Chen; S. Chen; G. Lai, Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture, *Nanoscale research letters* 7(1), 1-11, 2012.
- [86] V. Cardona; B. Padilla, Preparación y caracterización fisicoquímica y estructural de un gel conductor a base de quitosano, Tesis de licenciatura, Facultad de ingeniería, Universidad del Valle de Santiago de Cali, 2013.
- [87] D. Armani; C. Liu; N. Aluru, Re-configurable fluid circuits by PDMS elastomer micromachining, en *Twelfth IEEE International Conference of Micro Electro Mechanical Systems*, 1999, 222-227.
- [88] P. Sangsanoh; P. Supaphol, Stability improvement of electrospun chitosan nanofibrous membranes in neutral or weak basic aqueous solutions, *Biomacromolecules* 7(10), 2710-2714, 2006.
- [89] G. Salihu; P. Goswami; S. Russell, Hybrid electrospun nonwovens from chitosan/cellulose acetate, *Cellulose* 19(3), 739-749, 2012.
- [90] A. Burke; P. Gordon; C. Huang; I. Yannas, Multilayer membrane useful as synthetic skin, *U.S. Patent No. 4,060,081*. Washington DC, 1977.
- [91] A. Gallagher; A. Ní Annaidh; K. Bruyère, Dynamic tensile properties of human skin, In *Proceedings of the International Research Council on the Biomechanics of Injury conference*, 40, 494-502, 2012.
- [92] G. Holzapfel, Biomechanics of soft tissue, *The handbook of materials behavior models* 3, 1049-1063, 2001.
- [93] C. Thomas; C. Rasmussen; N. Simon; S. Sisson; S. Schlosser; M. Taylor; B. Allen-Hoffmann, *A skin substitute tissue bioengineered using a non-viral vector to express timp-1 inhibits metalloproteinase activity*, Paper presented at the wound repair and regeneration, 2009.

- [94] W. Schnabel, *Polymer degradation : principles and pract. applications*, Hanser International, Munich, 1981, 227.
- [95] K. Gupta; A. Kundan; P. Mishra; P. Srivastava; S. Mohanty; N. Singh; P. Maiti, Polycaprolactone composites with TiO<sub>2</sub> for potential nanobiomaterials: tunable properties using different phases, *Physical Chemistry Chemical Physics* 14(37), 2012.
- [96] D. Correia; J., Padrão; L. Rodrigues; F. Dourado; S. Lanceros; V. Sencadas, Thermal and hydrolytic degradation of electrospun fish gelatin membranes, *Polymer Testing* 32(5), 995-1000, 2013.
- [97] R. Sravanthi, Preparation and characterization of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) PCL scaffolds for tissue engineering applications, Master of technology, Biotechnology and medical engineering, National Institute of Technology of Rourkela, 2009.
- [98] J. Yao; C. Bastiaansen; T. Peijs, High Strength and High Modulus Electrospun Nanofibers, *Fibers* 2(2), 158-186, 2014.