

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y
Tecnología Avanzada Unidad Legaria



“NANOFIBRAS DE APLICACIÓN FARMACOLÓGICA PARA
EL TRATAMIENTO DE LESIONES CUTÁNEAS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

PRESENTA

NINGEL OMAR GAMA CASTAÑEDA

CIUDAD DE MÉXICO

JUNIO 2017

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y
Tecnología Avanzada Unidad Legaria



CICATA-LEGARIA

“NANOFIBRAS DE APLICACIÓN FARMACOLÓGICA PARA
EL TRATAMIENTO DE LESIONES CUTÁNEAS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

PRESENTA

NINGEL OMAR GAMA CASTAÑEDA

CIUDAD DE MÉXICO

JUNIO 2017



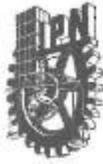
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 09 del mes de Junio del año 2017, el que suscribe **Ningel Omar Gama Castañeda** alumno del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada con número de registro **B150556**, adscrito al Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Legaria CICATA-Legaria, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de **Dr. Eduardo San Martín Martínez** y **Dra. Rocio Guadalupe Casañas Pimentel** y cede los derechos del trabajo intitulado **Nanofibras de aplicación farmacológica para el tratamiento de lesiones cutáneas**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN, Legaria 649, Colonia Irrigación, 11500 Ciudad de México, teléfono 015557296000, ext. 677609, e-mail: omarsinho_1000@hotmail.com, esanmartin@ipn.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Ningel Omar Gama Castañeda



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 09 del mes de Junio del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-Legaria para examinar la tesis titulada:
Nanofibras de aplicación farmacológica para el tratamiento de lesiones cutáneas

Presentada por el alumno:

Gama	Castañeda	Ningel Omar
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
Con registro:		
B	1	5
0	5	5
6		

aspirante de:

Maestría en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Eduardo San Martín Martínez

Dr. Rocío Guadalupe Casañas Pimentel

Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez

Dr. Mónica Rosalía Jaime Fonseca

Dra. Dalia Quintana Zavala

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Mónica Rosalía Jaime Fonseca



SEP
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
CICATA - LEGARIA

I. ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	3
CAPITULO 1	5
1. Introducción	5
CAPITULO 2	6
2. Antecedentes	6
2.1 Conceptos iniciales de la técnica de electrohilado	6
2.2 Técnica de electrohilado.....	7
2.3 Técnicas de procesamiento de nanofibras	8
2.3.1 Drawing.....	8
2.3.2 Síntesis de plantilla.....	9
2.3.3 Separación de fases	10
2.3.4 Autoensamblaje	11
2.3.5 Fundamentos de la técnica de electrohilado.....	12
2.4 Polímeros electrohilados	13
2.5 Alcohol Polivinílico (PVA).....	13
2.6 Proceso de elaboración de nanofibras en la máquina de electrohilado	14
2.7 Cono de Taylor.....	15
2.7.1 Inestabilidad de Rayleigh	16
2.8 Parámetros del proceso de electrohilado	16
2.8.1 Parámetros de la solución.....	17
2.8.1.1 Concentración.....	17
2.8.1.2 Viscosidad	17
2.8.1.3 Solvente.....	18
2.8.1.4 Conductividad	19
2.8.1.5 Tensión superficial	19
2.8.1.6 Constante dieléctrica	20
2.8.1.7 Peso molecular del polímero	20
2.8.1.8 Factores ambientales	20
2.8.2 Parámetros de la máquina de electrohilado.....	21
2.8.2.1 Tipo de colector.....	21

2.8.2.2 Material del colector.....	23
2.8.2.3 Voltaje aplicado.....	23
2.8.2.4 Velocidad de flujo	24
2.8.2.5 Punta de la jeringa, aguja o capilar.....	24
2.8.2.6 Distancia de separación (aguja – colector).....	25
2.9 Nanofibras y la medicina.....	25
2.9.1 La piel.....	25
2.9.1.1 Generalidades	25
2.9.1.2 Epidermis	26
2.9.1.3 Dermis	27
2.9.1.4 Hipodermis	27
2.9.2 Tratamiento de la curación de una herida cutánea	27
2.9.2.1 Inflamación.....	27
2.9.2.2 Formación del tejido nuevo.....	28
2.9.2.3 Reorganización del tejido.....	29
2.9.3 Microorganismos en la piel	30
2.9.4 Sistemas de administración de fármacos.....	31
2.9.5 Sistemas de liberación de fármacos mediante polímeros biodegradables	33
2.9.5.1 Carga del fármaco	35
2.9.5.2 Liberación de fármacos	35
2.9.6 Aplicaciones de las nanofibras poliméricas	37
2.10 Fármacos	38
2.10.1 AINE	38
2.10.1.1 Diclofenaco Sódico	38
2.10.2 Antibióticos	38
2.10.2.1 Gentamicina	39
2.11 Fundamentos de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	40
2.11.1 Cromatografía.....	40
2.11.2 Cromatografía líquida de alta resolución	41
2.12 Halos de inhibición.....	42
CAPITULO 3	43
3 Justificación.....	43
CAPITULO 4	45

4	Objetivos	45
4.1	Objetivo general	45
4.2	Objetivos particulares.....	45
CAPITULO 5		46
5	Materiales y Métodos	46
5.1	Partes constitutivas de la máquina de electrohilado	46
5.1.1	Depósito o jeringa	46
5.1.2	Bomba de inyección	47
5.1.3	Fuente de alto voltaje	47
5.1.4	Plato colector plano.....	47
5.1.5	Cabina protectora aislante	47
5.2	Reactivos empleados en la obtención del apósito de nanofibras de PVA	47
5.2.1	Proceso de elaboración de nanofibras	47
5.3	Reactivos utilizados en la obtención de nanofibras de PVA con fármacos (gentamicina y diclofenaco).....	48
5.3.1	Proceso de elaboración de nanofibras de PVA con fármacos (gentamicina y diclofenaco) embebidos	48
5.3.2	Implementación del diseño experimental.....	49
5.3.3	Caracterización de las nanofibras.....	50
5.4	Identificación de la presencia de los fármacos en las nanofibras mediante HPLC	50
5.5	Evaluacion bactericida de nanofibras de PVA con gentamicina y diclofenaco	51
CAPITULO 6		53
6	Resultados y discusión	53
6.1.2	Aposito de nanofibras de PVA.....	53
6.1	Diseño Experimental factorial fraccionado 2^{5-2}	54
6.1.1	Análisis del diámetro medio de las nanofibras.....	54
6.1.3	Caracterización de las nanofibras obtenidas en el diseño experimental por SEM	56
6.1.4	Experimento 1	56
6.1.5	Experimento 2	57
6.1.6	Experimento 3	58
6.1.7	Experimento 4	59
6.1.8	Experimento 5	60
6.1.9	Experimento 6	61
6.1.10	Experimento 7	62

6.1.11 Experimento 8	63
6.2 Análisis de cuantificación de gentamicina y diclofenaco mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	66
6.3. Pruebas de actividad biológica.....	69
6.3.1 Halos de inhibición del apósito de nanofibras de PVA con gentamicina y diclofenaco ..	69
6.3.1.1 <i>Bacillus subtilis</i>	69
6.3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	72
CONCLUSIONES	76
REFERENCIAS	77
ANEXO 1.....	86
Resultados del diseño experimental (Software Design-Expert 10).....	86

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Obtención de nanofibras por la técnica Drawing (Ramakrishna 2005).	9
Figura 2. Obtención de nanofibras mediante la técnica de Síntesis de plantilla (Ramakrishna 2005).	10
Figura 3. Sistema genérico de Separación de fase, para la obtención de una estructura nanofibrosa (Ramakrishna 2005).	11
Figura 4. Esquema simple de Autoensamblaje para obtener nanofibras (Hartgerink, Beniash et al. 2001).....	11
Figura 5. Efecto de la tensión superficial a partir de la aplicación de voltaje sobre una gota de solución polimérica (Yarin, Koombhongse et al. 2001).....	15
Figura 6. Configuración básica de la máquina de electrohilado (Li and Xia 2004).....	16
Figura 7. Colector rotatorio o cilíndrico (Yoo, Kim et al. 2009).	22
Figura 8. Colector plano (Subbiah, Bhat et al. 2005).....	22
Figura 9. Colector rotatorio o de disco (Theron, Zussman et al. 2001).....	23
Figura 11. Partes constitutivas de la piel (Saavedra 2000).....	26
Figura 10. Bacterias presentes en infección de la piel (Santucci, Gobara et al. 2003).....	31
Figura 12. Partes constitutivas de la máquina de electrohilado (Laboratorio de Biomateriales de CICATA – IPN, Unidad Legarí).....	46
Figura 13. Apósito de nanofibras de PVA.	53
Figura 14. Distribución del diámetro de las nanofibras de PVA.....	53
Figura 15. Tejido de nanofibras correspondiente al experimento 1.	56
Figura 16. Distribución del diámetro medio de las nanofibras correspondientes al experimento 1.....	57
Figura 17. Tejido de nanofibras correspondiente al experimento 2.	57
Figura 18. Distribución del diámetro medio de las nanofibras correspondientes al experimento 2.....	58
Figura 19. Tejido de nanofibras correspondiente al experimento 3.	58
Figura 20. Distribución del diámetro de las nanofibras correspondiente al experimento 3. .	59
Figura 21. Tejido de nanofibras correspondiente al experimento 4.	59
Figura 22. Distribución del diámetro de las nanofibras correspondiente al experimento 4. .	60
Figura 23. Tejido de nanofibras correspondiente al experimento 5.	60
Figura 24. Distribución del diámetro de las nanofibras del experimento 5.....	61

Figura 25. Tejido de nanofibras correspondiente a experimento 6.	61
Figura 26. Distribución del diámetro de las nanofibras del experimento 6.....	62
Figura 27. Tejido de nanofibras correspondiente a experimento 7.	62
Figura 28. Distribución del diámetro de las nanofibras correspondiente al experimento 7..	63
Figura 29. Tejido de nanofibras correspondiente a experimento 8.	63
Figura 30. Distribución del diámetro de las nanofibras correspondiente al experimento 8. .	64
Figura 31. Cromatograma correspondiente al diclofenaco (solución comercial).....	67
Figura 32. Cromatograma correspondiente a la gentamicina (solución comercial).	67
Figura 33. Cromatograma de la muestra de nanofibras de PVA con gentamicina y diclofenaco correspondiente al experimento 8.	68
Figura 34. Halos de inhibición con la cepa Bacillus subtilis a 24 h de incubación.....	70
Figura 35. Halos de inhibición en el cultivo de Bacillus subtilis a 72 h de incubación.	71
Figura 36. Diámetro de los halos de inhibición correspondientes a la cepa Bacillus subtilis a 24, 48 y 72 h.....	72
Figura 37. Halos de inhibición con la cepa Escherichia coli a 24 h de incubación.....	73
Figura 38. Halos de inhibición sobre la cepa Escherichia coli a 72 h de incubación.....	74
Figura 39. Diámetros del halo de inhibición de la cepa Escherichia coli a 24, 48 y 72 h.	75
Figura 40. Tabla de contribución de efectos principales e inteacciones.	86
Figura 41. Grafica de probabilidad normal.	87
Figura 42. Grafica de Pareto.	88
Figura 43. Analisis de varianza (ANOVA).....	89

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables y niveles para el diseño factorial fraccionario.....	50
Tabla 2. Experimentos desarrollados mediante el diseño fraccionario 2^{5-2}	54
Tabla 3. Análisis de varianza del modelo (ANOVA).....	55
Tabla 4. Mediciones de los halos de inhibición en la caja Petri con la cepa <i>Bacillus subtilis</i>	71
Tabla 5. Mediciones de los halos de inhibición en la caja Petri con la cepa <i>Escherichia coli</i>	74

I. RESUMEN

La piel es una barrera protectora que nos permite interactuar con el ambiente de forma controlada, cuando ésta sufre un daño, el tejido queda expuesto a diversos factores externos que pueden afectar su integridad. Los microorganismos patógenos pueden agravar las lesiones, si las infecciones en la piel no se previenen y tratan oportunamente. Dichas infecciones suelen ser tratadas mediante la administración sistémica de un antibiótico o a través de la aplicación local de cremas y ungüentos. La administración sistémica de fármacos conlleva a que éste llegue a todo el organismo y sólo una pequeña parte ataque efectivamente a la infección, mientras que se acumula preferentemente en órganos que pueden sufrir daños como el hígado y el riñón; por su parte, la aplicación de cremas y ungüentos tiene como desventaja su fácil eliminación de la superficie de la piel por lo que el control de la dosis se ve afectado, ya que el paciente puede dejar de colocarse el medicamento o colocarse un exceso de éste para subsanar ésta desventaja; adicionalmente, las cremas y ungüentos generan un microambiente húmedo que no es favorable para la cicatrización y pueden atrapar partículas del ambiente que favorezcan el crecimiento de microorganismos resistentes al antibiótico utilizado. Debido a esto, se tiene la necesidad de implementar un material que proteja a la piel e inhiba el crecimiento bacteriano sobre la lesión, además de brindar mayor confort al paciente.

Por estas razones, en el presente proyecto de investigación, se desarrolló un apósito de nanofibras poliméricas (PVA), con antibiótico (gentamicina) y analgésico (diclofenaco) embebidos. Para el desarrollo del apósito de nanofibras, se estableció un diseño experimental fraccionario 2^{5-2} . El diseño experimental permitió establecer los parámetros que afectan la morfología y diámetro de las nanofibras para la obtención del apósito. Se realizaron 8 experimentos en donde se evaluó como respuesta el diámetro medio de las nanofibras de cada experimento. Se obtuvieron nanofibras entre 80 a 210 nm de diámetro, con diversas morfologías y distribuciones.

También, se realizó una prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar, para comprobar la efectividad inhibitoria de las nanofibras conteniendo gentamicina en cultivo bacteriano (*Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*). En dicha prueba se obtuvo un halo de inhibición sensible de 32 mm a 24 h y 33 mm a 72 horas, en el cultivo de *Bacillus subtilis* para la muestra de nanofibras. Así mismo, para el cultivo de *Escherichia coli*, el halo de inhibición de las nanofibras se observó sensible con 20 mm a 24 h y 19.5 mm a 72 h de incubación. Se emplearon como controles gentamicina libre (30 µg), cloranfenicol (30 µg) y solución salina. Se encontró un efecto inhibitorio de las nanofibras con gentamicina en ambas cepas bacterianas, similar al observado en el control de gentamicina libre, al aplicar dosis menores de gentamicina en las nanofibras respecto al control. La actividad inhibitoria fue mayor para ambas cepas bacterianas con las nanofibras con gentamicina respecto al control de cloranfenicol. Los resultados sugirieron que las nanofibras obtenidas son potenciales candidatos para el desarrollo de apósitos inhibidores del crecimiento bacteriano en lesiones cutáneas.

Finalmente, se llevó a cabo una prueba de para evaluar la inclusión efectiva de los fármacos en las nanofibras, la cual se realizó mediante la técnica HPLC. La presencia de ambos fármacos fue corroborada mediante la evaluación de los tiempos de retención.

II. ABSTRACT

The skin is a protective barrier that allows us to interact with the environment in a controlled way, when it is damaged, the tissue is exposed to various external factors that can affect its integrity. Pathogenic microorganisms may aggravate the lesions if skin infections are not prevented and treated promptly. Such infections are usually treated by the systemic administration of an antibiotic or by the local application of creams and ointments. The systemic administration of drugs leads to it reaching the whole organism and only a small part effectively attacks the infection, whereas it accumulates preferentially in organs that can suffer damages like the liver and the kidney. On the other hand, the application of creams and ointments have as a disadvantage its easy elimination of the surface of the skin, so that the control of the dose is affected, since the patient can stop using the medication or placing an excess of it to remedy the disadvantage. Additionally, creams and ointments generate a moist microenvironment that is not conducive to healing and can trap particles from the environment that favor the growth of microorganisms resistant to the antibiotic used. Because of this, it is necessary to implement a material that protect the skin and inhibits bacterial growth on the lesion, in addition to providing greater comfort to the patient.

For these reasons, in the present research project, a polymeric nanofiber dressing (PVA) was developed with antibiotic (gentamicin) and analgesic (diclofenac) embedded. For the development of the nanofiber dressing, a fractional experimental design 2^{5-2} was established. The experimental design allowed to establish the parameters that affect the morphology and diameter of the nanofibres for the dressing. Eight experiments were carried out in which the mean diameter of the nanofibres of each experiment was evaluated as a response. Nanofibres were obtained between 80 and 210 nm in diameter, with different morphologies and distributions.

Also, an antimicrobial susceptibility test was carried out by agar diffusion assays to verify the inhibitory effectiveness of gentamicin-containing nanofibers in bacterial culture (*Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*). In these tests, a sensitive inhibition halo of 32 mm at 24 h and

33 mm at 72 hours was obtained in the culture of *Bacillus subtilis* for the nanofibres sample. Also, for the culture of *Escherichia coli*, the inhibition halo of the nanofibers was observed sensitive with 20 mm at 24 h and 19.5 mm after 72 h of incubation. Free gentamicin (30 µg), chloramphenicol (30 µg) and saline solution were used as controls. An inhibitory effect of nanofibers with gentamicin was found in both bacterial strains, similar to that observed in the control of free gentamicin, by applying lower doses of gentamicin in the nanofibres when compared to the control. The inhibitory activity was greater for both bacterial strains with nanofibers with gentamicin compared to the chloramphenicol control. The results suggest that the obtained nanofibers are potential candidates for the development of bacterial growth inhibiting dressings in cutaneous lesions.

Finally, a test was performed to evaluate the effective inclusion of the drugs into the nanofibers, which was performed by the HPLC technique. The presence of both drugs was corroborated through the evaluation of the retention times.

CAPITULO 1

1. Introducción

En las últimas décadas, el electrohilado ha presentado ventajas inigualables con respecto a otras técnicas de elaboración de nanofibras como el autoensamblaje o la separación de fases, esto es debido a la versatilidad en el hilado de una amplia variedad de nanofibras poliméricas tanto naturales como sintéticas, a su bajo costo de fabricación y su alta velocidad de producción. Las nanofibras obtenidas mediante la técnica de electrohilado poseen características importantes tales como, amplia área superficial, estructura altamente porosa, diversas morfologías y diámetros que les permiten ser adecuadas para contener o encapsular proteínas, antibióticos u otros compuestos, emulando el proceso de liofilización en seco. Gracias a la morfología y porosidad que presentan y a las excelentes propiedades intrínsecas, las estructuras resultan apropiadas para numerosas aplicaciones, especialmente en el área biomédica.

La implementación de fármacos embebidos en nanofibras poliméricas, es una alternativa fiable para la liberación y administración de fármacos cuyo objetivo principal, es mediante el principio activo de los fármacos, ser bactericida y disminuir la inflamación de las lesiones producidas en la piel. El propósito del desarrollo de nanofibras poliméricas con fármacos embebidos, es optimizar las propiedades terapéuticas de los medicamentos haciéndolos más seguros, eficaces y fiables.

Dadas sus características anatómicas, histológicas y fisiológicas, y al representar aproximadamente una décima parte de la masa del cuerpo, la piel es la primera capa protectora que nos permite interactuar con el ambiente de forma controlada. La piel está expuesta a una serie de agresiones que pueden alterar su integridad; el daño de la capa protectora expone el tejido subyacente a infecciones. Si las infecciones no se tratan de manera efectiva, los patógenos pueden formar biopelículas, haciéndose resistentes a diversos fármacos como son los antibióticos.

El empleo de polímeros naturales, sintéticos y artificiales para el desarrollo de nanofibras como: PLA (ácido poliláctico), PLGA (ácido poliláctico co-glicólico), PEO (óxido de polietileno), entre otros, ofrecen características biocompatibles al sistema y permite el empleo de diversos fármacos sin alterar sus propiedades químicas.

Actualmente existen diversos apósitos comerciales útiles para el tratamiento para lesiones cutáneas como: Hyalofill – f[®], Halobac[®], Aquacel[®], Nexcare[®], etc. Sin embargo este tipo de apósitos están conformados de fibras a escala micrométrica, que tienen una reducida área superficial para la transferencia de materia, respecto a las fibras nanométricas. Lo que se busca con los apósitos para la piel, es el tratamiento óptimo de las heridas cutáneas garantizando su durabilidad, elasticidad, disponibilidad y su ausencia de reacción antigénica.

En el presente proyecto de investigación, se desarrolló un apósito de nanofibras poliméricas, con fármacos (antibiótico y analgésico). Mediante una solución polimérica, se incorporaron los fármacos y se realizó el proceso de obtención del tejido de nanofibras utilizando la técnica de electrohilado. Se estableció un diseño experimental utilizando la metodología de un diseño fraccionario 2^{5-2} con el cual, se tomaron en cuenta los factores más influyentes para el desarrollo y obtención de las nanofibras con los fármacos embebidos. El tejido de nanofibras obtenido, se desarrolló en una máquina de electrohilado de diseño básico. Se analizaron las morfologías de las nanofibras obtenidas en cada experimento realizado y se determinaron los parámetros para la síntesis de nanofibras. Después de embeber el antibiótico y el analgésico en las nanofibras se evaluó su propiedad bactericida *in vitro*.

CAPITULO 2

2. Antecedentes

2.1 Conceptos iniciales de la técnica de electrohilado

La técnica encargada del proceso de hilar fibras con ayuda de fuerzas electrostáticas, se conoce como electrohilado o electrospinning (Subbiah, Bhat et al. 2005). Este término se usó aproximadamente a partir de 1994, sin embargo la idea fundamental del electrohilado, data

de hace más de 80 años (Huang, Zhang et al. 2003). (Formhals 1934) realizó la primera patente que describió la operación de la técnica de electrohilado, también reveló un equipo para producir fibras poliméricas mediante cargas electrostáticas, controlando algunas dificultades tales como el secado y la recolección de fibras de acetato de celulosa, utilizando acetona como disolvente (Li and Xia 2004). Posteriormente, Formhals, patentó otro método para producir fibras poliméricas mediante electrohilado sobre un colector en movimiento de superficie cilíndrica (Anton 1940).

2.2 Técnica de electrohilado

El electrohilado es una técnica utilizada para la obtención de nanofibras poliméricas que presenta ventajas en comparación con otras técnicas de procesamiento de nanofibras. Esta técnica tiene la habilidad de producir nanofibras de diferentes materiales y geometrías, con un bajo costo y alta velocidad de producción, a partir de un equipo de diseño simple. Los materiales electrohilados incluyen diferentes polímeros tanto naturales, como sintéticos, los cuales mediante su solubilidad y propiedades de biodegradabilidad se pueden utilizar para desarrollar fibras que van desde unos pocos nanómetros hasta algunos micrones, generando tejidos electrohilados altamente porosos (Huang, Zhang et al. 2003; Li and Xia 2004).

Una característica importante de las nanofibras resultantes, es que no requieren de una etapa extensa de purificación como por ejemplo, nanovarillas inorgánicas y los nanotubos de carbono (Ballarin, Tornello et al. 2015). (Frenot and Chronakis 2003) escribieron breves reseñas sobre el desarrollo de nanofibras por electrohilado, donde discutieron sobre la morfología, estructura y funcionalidad de las nanofibras, además mostraron estrategias y determinación de las condiciones apropiadas para el electrohilado de diversos polímeros.

A inicios de 1990, se realizaron importantes aportaciones sobre el electrohilado debido al conocimiento sobre la gran cantidad de aplicaciones que tienen las nanofibras en diferentes áreas, como biomedicina, biotecnología, ingeniería, etc. (Feng, Khulbe et al. 2010). En 1993 diversos grupos de investigación retomaron la técnica de electrohilado, entre ellos el grupo del investigador (Reneker and Yarin 2008) de la universidad de Akron, quienes realizaron una extensa investigación acerca de la morfología, densidad, parámetros y post- tratamientos

de electrohilado para la obtención de nanofibras. (Huang, Zhang et al. 2003) escribieron un artículo de nanofibras poliméricas producidas por electrohilado y sus aplicaciones en nanocompositos. (Greiner, Wendorff et al. 2006) redactaron un artículo en el cual, se mencionaron técnicas avanzadas para la preparación de nanofibras de diversas formas, como las nanofibras Core-Shell, nanofibras huecas, nanotubos de polímeros naturales y sintéticos. (Ramakrishna 2005) publicó un libro titulado “Una introducción al electrohilado y las nanofibras,” donde muestra investigación, desarrollo y métodos de obtención de nanofibras en los últimos años, así como también, sus aplicaciones en los campos de la medicina e ingeniería. (Grafe and Graham 2003) discutieron el proceso de electrohilado para crear nanofibras de polímeros sintéticos, además mostraron innovadoras ideas de aplicaciones comerciales de las nanofibras.

2.3 Técnicas de procesamiento de nanofibras

En los últimos años, se han utilizado diversas técnicas de procesamiento de nanofibras tales como: *drawing*, *síntesis de plantilla*, *separación de fase*, *autoensamblaje* y *electrohilado o electrospinning*, de donde se han obtenido fibras o membranas de tamaño nanométrico (Ramakrishna 2005).

2.3.1 Drawing

Es una técnica que consta de un proceso similar al hilado en seco, en el cual mediante una micropipeta, se hace contacto directo sobre la superficie de una gota de solución polimérica, que se encuentra depositada sobre una superficie plana.

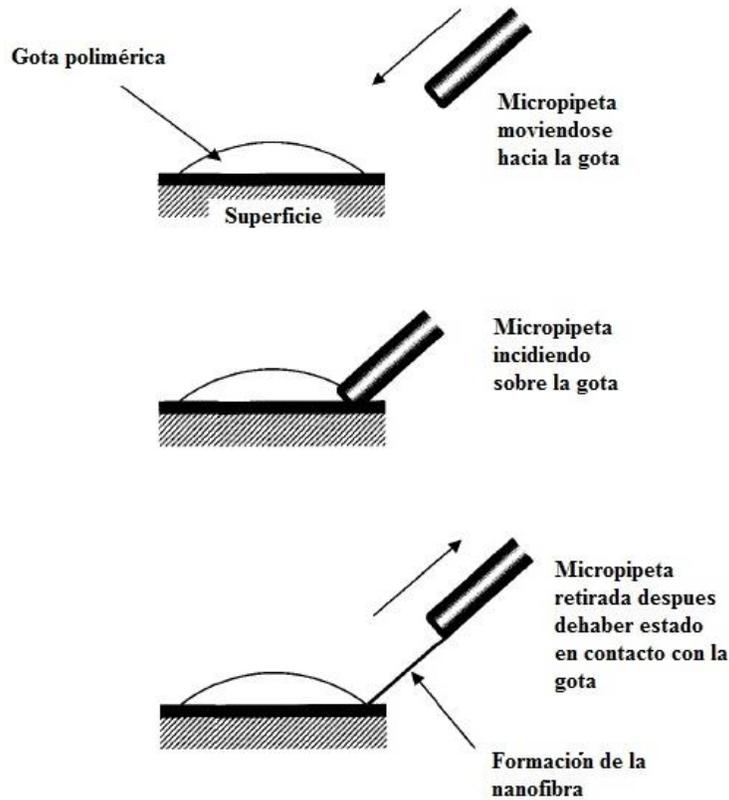


Figura 1. Obtención de nanofibras por la técnica *Drawing* (Ramakrishna 2005).

La micropipeta al ser retirada de la gota, produce un movimiento a una velocidad de aproximadamente de $1 \times 10^{-4} \text{ ms}^{-1}$, dando como resultado la formación de una fibra continua. La viscosidad del borde de la solución polimérica que conforma la gota, aumenta con la evaporación, así se esta manera la nanofibra obtenida es extraída fuera de la gota de la solución polimérica. El estiramiento de la nanofibra requiere una solución viscoelástica que pueda sufrir deformaciones fuertes mientras que también debe ser lo suficientemente cohesiva como para soportar las tensiones desarrolladas durante la tracción. Las nanofibras obtenidas por la técnica drawing son particularmente lineales y largas, sin embargo esta técnica consta de proceso un tanto lento y discontinuo donde solo se puede obtener una nanofibra a la vez (Ondarcuhu and Joachim 1998).

2.3.2 Síntesis de plantilla

Para la síntesis de plantilla se emplea una plantilla, molde o membrana para obtener nanofibras de forma sólida (fibrilada) o hueca (un túbulo) de diversos materiales (Martin

1996). Bajo la aplicación de la presión del agua en un lado y la retención de la membrana porosa, provoca la extrusión del polímero que al entrar en contacto con una solución solidificante, da lugar a las nanofibras.

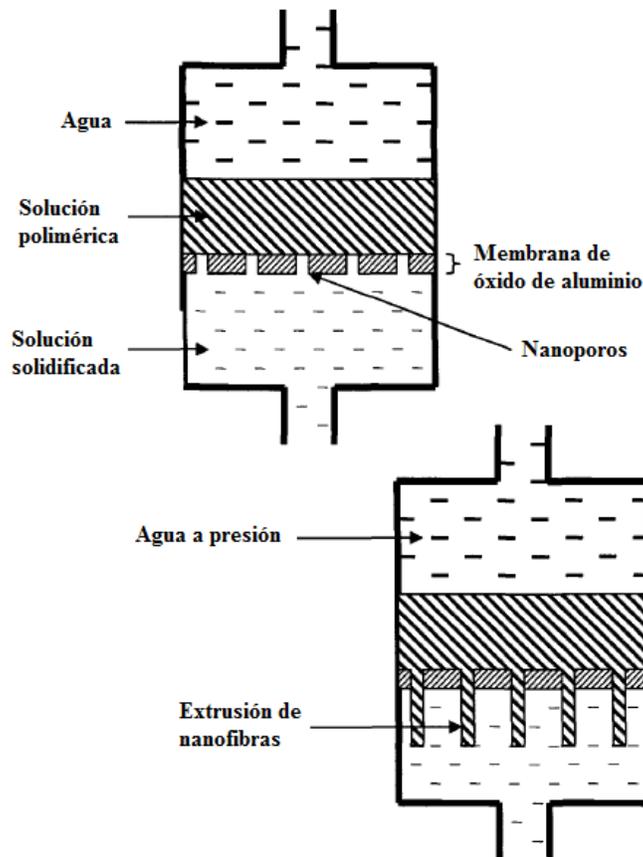


Figura 2. Obtención de nanofibras mediante la técnica de *Síntesis de plantilla* (Ramakrishna 2005).

2.3.3 Separación de fases

Para esta técnica, primero el polímero es mezclado con un solvente antes de someterse a un proceso de gelificación. El mecanismo principal en este proceso es llevar a cabo la separación de fases de los reactivos debido a la incompatibilidad física. (Ma and Zhang 1999) describieron un procedimiento detallado de separación de fase, el cual consta de 5 etapas principales: 1) disolución del polímero, 2) gelificación, 3) extracción del solvente, 4) congelación y 5) liofilización.

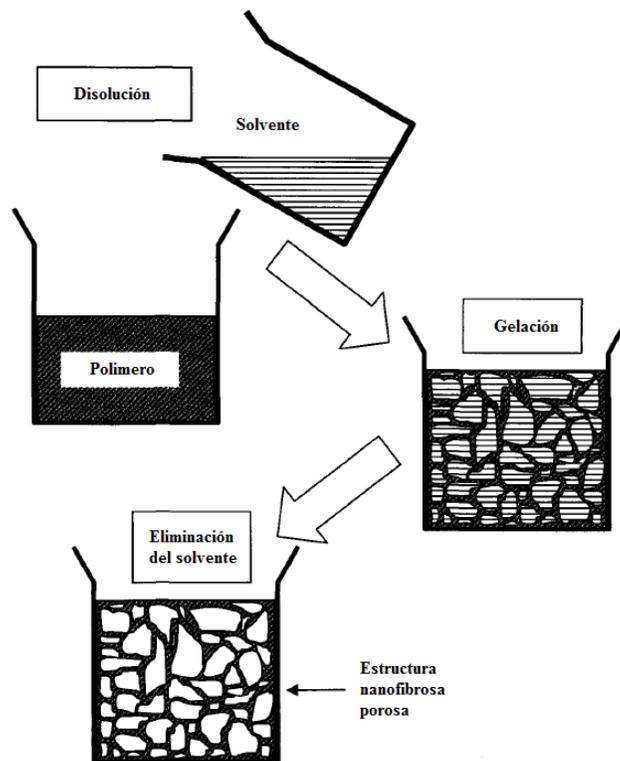


Figura 3. Sistema genérico de *Separación de fase*, para la obtención de una estructura nanofibrosa (Ramakrishna 2005).

Uno de los mayores inconvenientes del empleo de esta técnica es que el proceso toma un periodo de tiempo relativamente largo para la obtención de la estructura nanofibrosa, además, la técnica se encuentra limitada a ciertos tipos de polímeros.

2.3.4 Autoensamblaje

Esta técnica se emplea mediante la acumulación de nanofibras usando pequeñas moléculas de polímero como bloques de construcción básicos (Whitesides and Grzybowski 2002).

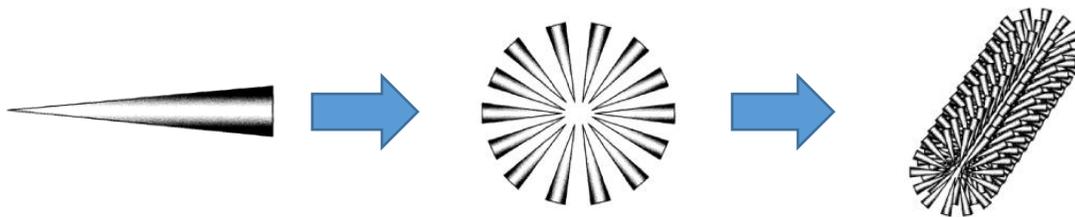


Figura 4. Esquema simple de *Autoensamblaje* para obtener nanofibras (Hartgerink, Beniash et al. 2001).

En este caso, una pequeña molécula está dispuesta de manera concéntrica de tal manera que se pueden formar enlaces entre las moléculas pequeñas. El principal mecanismo para el autoensamblaje son las fuerzas intermoleculares que unen las unidades más pequeñas de las moléculas, así como también la forma de esas unidades pequeñas de moléculas son las que determinan la sobreformación de la nanofibra macromolecular. Una de las grandes desventajas del autoensamblaje es que no se puede controlar fácilmente las dimensiones de las nanofibras, además de ser una técnica que debido a su proceso tan complejo no permite llevar a cabo su escalamiento industrial. Diversos investigadores han mostrado trabajos de investigación donde han empleado la técnica de autoensamblaje (Liu, Kim et al. 1996), (Liu, Ding et al. 1999), (Bai, Wang et al. 2001), (Hartgerink, Beniash et al. 2001), etc. Sin embargo, el proceso de electrospinning (Deitzel, Kleinmeyer et al. 2001), (Salem 2001) es uno de los métodos que puede desarrollar nanofibras de una amplia gama de polímeros, tanto naturales como sintéticos, con diferentes morfologías, a un bajo costo, conteniendo diversos materiales y reactivos, por ello es que es la técnica más empleada actualmente.

2.3.5 Fundamentos de la técnica de electrohilado

La técnica de electrohilado se lleva a cabo mediante un equipo conformado por una fuente de alto voltaje, una bomba inyectora, una jeringa, y un colector (metálico). En la jeringa se vierte la solución polimérica previamente elaborada, la jeringa se coloca en la bomba inyectora, un electrodo (positivo) saliente de la fuente de alto voltaje es colocado en la punta de la jeringa. Mediante presión, la solución es extruida, al chorro de solución polimérica saliente de la jeringa se le aplica voltaje, creándose un campo eléctrico entre el electrodo de la punta de la jeringa y el electrodo (negativo) colocado en el colector. La solución polimérica se electrifica fuertemente, generándose cargas inducidas que se distribuyen sobre la superficie de la gota de la solución (Franco, Delvasto et al. 2009). Entonces, la gota mediante diversas fuerzas (repulsión, gravitatorias, coulomb) se estira, produciendo una fibra alargada la cual se deposita sobre el colector, generando así un nanofibras poliméricas.

2.4 Polímeros electrohilados

En los últimos años, alrededor de casi cien polímeros diferentes, han sido exitosamente hilados en forma de nanofibras usando la técnica de electrohilado. Sin embargo, aunque el proceso de electrohilado ha mostrado potencial prometedor, su comprensión es todavía limitada. La mayoría de los polímeros utilizados en la metodología de obtención de nanofibras se disuelven en uno o varios solventes antes realizar el electrohilado, ya que las condiciones de procesamiento implicadas son simples y directas. Cuando el polímero sólido se disuelve completamente en una cantidad apropiada de solvente, se convierte en una forma fluida llamada “solución polimérica”. Tanto la solución polimérica como el electrohilado se elaboran esencialmente a temperatura ambiente. Sin embargo, algunos polímeros pueden emitir olores desagradables o incluso dañinos, por lo que cuando se emplean solventes tóxicos, los procesos deben llevarse a cabo dentro de cámaras aisladoras para el proceso de electrohilado (Huang, Zhang et al. 2003).

Se han empleado diversos polímeros para sintetizar nanofibras conteniendo antibióticos, dentro de los que destacan polímeros biodegradables como el ácido poliláctico (PLA), la policaprolactona (PLC), el ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), el alcohol polivinílico (PVA) y el óxido de polietileno (PEO), en éstos se han colocado antibióticos como la gentamicina (Sirc, Kubinova et al. 2012), cefazolina (Katti, Robinson et al. 2004), la vancomicina (Chen, Hsu et al. 2012), amoxicilina (Yu, Zhu et al. 2017), el clorhidrato de tetraciclina (Karuppuswamy, Venugopal et al. 2015), ciprofloxacino (Hu, Liu et al. 2014), etc. También se ha reportado la incorporación de analgésicos como el diclofenaco (Nikkola, Seppälä et al. 2006), ibuprofeno (Pawlik, Jarosz et al. 2017), naproxeno (Akduman, Özgüney et al. 2016) y ketoprofeno (Kenawy, Abdel-Hay et al. 2007) en nanofibras poliméricas.

2.5 Alcohol Polivinílico (PVA)

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero hidrófilo, producido industrialmente por la polimerización (y subsiguiente hidrólisis) del monómero de acetato de vinilo. El PVA representa un candidato potencial para el desarrollo de nanofibras poliméricas debido a que es un polímero de baja toxicidad, biodegradable, de bajo costo (Kenawy, Abdel-Hay et al. 2007) y de alta solubilidad en agua. Sus propiedades físico-químicas dependen del grado de

hidrólisis (Zhang, Yuan et al. 2005). La solubilidad del PVA en el agua aumenta mucho a medida que aumenta su grado de hidrólisis (Peppas 1986). Existen dos tipos de PVA comercialmente disponibles: el PVA completamente hidrolizado y el PVA parcialmente hidrolizado, esto es dependiente de la cantidad de grupos de acetato presentes en la estructura molecular (Zhang, Yuan et al. 2005).

La estabilidad química del PVA a temperatura ambiente, junto con sus excelentes propiedades físicas y mecánicas, han dado lugar a diversas aplicaciones prácticas. El PVA se ha utilizado principalmente en productos en forma de fibra y película durante muchos años, como recubrimiento de papel, adhesivos y estabilizador coloidal (Deitzel, Kleinmeyer et al. 2001). Sin embargo en los últimos años, se ha centrado mucha atención en aplicaciones biomédicas donde se emplea en forma de hidrogeles para lentes de contacto, poli-electrolitos, óptica y biomateriales, así como también órganos artificiales, implantes y sistemas de administración de fármacos (Razzak, Zainuddin et al. 1999; Deitzel, Kleinmeyer et al. 2001).

Las nanofibras de PVA, pueden tener aplicaciones potenciales en diversas áreas, debido a que el tipo de fibra que se obtiene empleando este polímero generalmente presenta fibras con diámetros comprendidos entre 5 nm y 500 nm, con morfología lineal y buena distribución de fibra. Por ello se considera como un polímero candidato para el desarrollo y obtención de nanofibras a escala nanométrica, empleando la técnica de electrohilado (Kenawy, Abdel-Hay et al. 2007).

2.6 Proceso de elaboración de nanofibras en la máquina de electrohilado

Una vez creada la solución polimérica, esta se vierte en una jeringa o depósito, la cual es soportada en una bomba inyectora donde mediante presión, la solución es extruida por la aguja de la jeringa, al chorro de solución polimérica expulsado se le aplica un voltaje el cual puede ir de 1 a 30 kV aproximadamente, de esta forma la solución polimérica se electrifica fuertemente, generándose cargas inducidas que se distribuyen sobre la superficie de la gota de la solución, la cual que depende de la aguja de la jeringa utilizada (Franco, Delvasto et al. 2009). La gota experimenta un conjunto de fuerzas como, la fuerza de repulsión de coulomb entre las cargas presentes, la fuerza electrostática producto del campo externo generado al

aplicar tensión, la fuerza gravitatoria, fuerzas viscoelásticas que dependen del polímero y solvente así como también, la fuerza de tensión superficial que se opone al estiramiento y afinamiento de la gota. Bajo la acción de estas interacciones, la superficie hemisférica del fluido de la punta de la jeringa se alarga para formar una geometría cónica, generándose un fenómeno conocido como cono de Taylor (Taylor 1964).

2.7 Cono de Taylor

El investigador (Taylor 1964) realizó estudios fundamentales sobre el proceso de la formación del chorro de la solución polimérica al ser extruida por la punta de la aguja de la jeringa, los estudios se basaron principalmente en la forma de la gota que se genera cuando se aplica un campo eléctrico, de esta manera se alcanza un valor crítico con el que la fuerza electrostática repulsiva supera la tensión superficial y el chorro cargado es expulsado desde la punta de la jeringa y la gota adquiere la forma de cono, a este fenómeno, diversos investigadores, lo designaron con el nombre de “cono de Taylor”. Mediante estudios en diferentes fluidos viscosos, (Taylor 1969) logro determinar que se requiere de un ángulo de 49.3° aproximadamente, para equilibrar la tensión superficial de la solución polimérica con la fuerza electrostática, y es muy importante la forma cónica del chorro debido a que define el inicio de los gradientes de velocidad extensional en el proceso de formación de nanofibras.

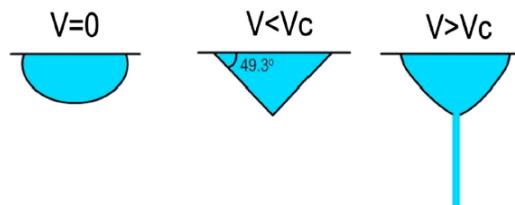


Figura 5. Efecto de la tensión superficial a partir de la aplicación de voltaje sobre una gota de solución polimérica (Yarin, Koombhongse et al. 2001).

El chorro de solución polimérica sufre un proceso de inestabilidad y alargamiento, el cual permite que el chorro se vuelva muy largo y delgado. Mientras tanto, el solvente se evapora dejando una fibra polimérica cargada. El chorro se solidifica cuando se desplaza en el aire, depositando y formando las nanofibras. El voltaje aplicado, depende de las propiedades de la solución que se requiere hilar, tales como el peso molecular y la viscosidad del polímero (Huang, Zhang et al. 2003).

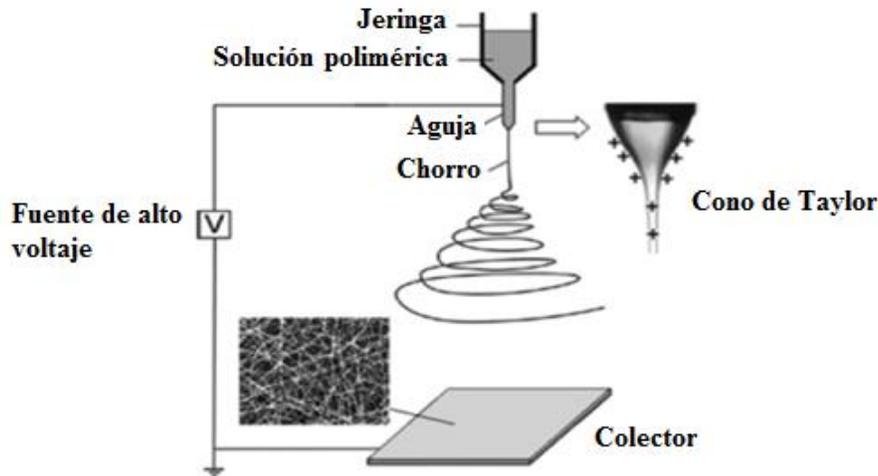


Figura 6. Configuración básica de la máquina de electrohilado (Li and Xia 2004).

2.7.1 Inestabilidad de Rayleigh

El chorro de la solución polimérica puede someterse a una división en múltiples ejes en un proceso conocido como expansión o ramificación durante el proceso de electrohilado. Esto sucede cuando se presentan cambios en la forma y carga por unidad de área del chorro, debido a la elongación de la solución y la evaporación del solvente. Esto cambia el equilibrio entre la tensión superficial y las fuerzas eléctricas volviendo inestable al chorro. La formación de ramas en el chorro de la punta de la aguja, ocurre en soluciones con mayor concentración y viscosidad, así mismo también en campos eléctricos inusualmente altos. Por otra parte, la tensión superficial tiende a reducir la superficie total del chorro, por lo tanto, se produce inestabilidad, lo que hace que el chorro forme la rama y también produzca goteo en los extremos de esas ramas, a ese efecto se le conoce como “Inestabilidad de Rayleigh” (Warner, Buer et al. 1998). Diversos trabajo de investigación han estudiado dicho fenómeno, sin embargo (Hohman, Shin et al. 2001), realizaron una rigurosa investigación sobre la caracterización experimental y la evaluación de la inestabilidad de fluidos poliméricos, en el proceso de electrohilado, dicho trabajo ayudo a entender mejor el mecanismo de formación de la inestabilidad.

2.8 Parámetros del proceso de electrohilado

La morfología de las nanofibras poliméricas obtenidas por el proceso de electrohilado se rigen por diversos parámetros, los cuales al ser controlados, dan como resultado, nanofibras

apropiadas para diversos usos. Los parámetros a controlar son: parámetros de la solución, parámetros de procesamiento y ambientales.

2.8.1 Parámetros de la solución

En base a diversas bibliografías, se ha demostrado que los parámetros de la solución como: la concentración, viscosidad, solvente, conductividad, tensión superficial y constante dieléctrica, influyen notablemente en la obtención y morfología de las nanofibras (Ramakrishna 2005), (Bosworth and Downes).

2.8.1.1 Concentración

La formación de nanofibras requiere de una solución polimérica preparada a una concentración crítica para que se formen entrecruzamientos de las cadenas poliméricas, aplicándoles campo eléctrico. Si la concentración de polímero es baja, los entrecruzamientos no alcanzan a contrarrestar las fuerzas de tensión superficial y el chorro de la solución se rompe, dando lugar a la formación de gotas. Sin embargo si la concentración de la solución es muy alta, se puede formar una morfología de gotas conectadas por nanofibras depositadas en el colector. Para la obtención de nanofibras uniformes, la concentración crítica varía según el polímero y su peso molecular (a mayor peso molecular del polímero, se obtiene una menor concentración, utilizando el mismo solvente), y la viscosidad de la solución etc. Al incrementar la concentración, se puede presentar un aumento en el diámetro medio de las nanofibras (Caracciolo, Tornello et al. 2013). (Demir, Yilgor et al. 2002), encontraron que el diámetro de las nanofibras es proporcional al cubo de la concentración de polímero. (Fong, Chun et al. 1999), mencionaron que una al establecer una concentración alta de polímero en la solución polimérica, se puede obtener una cantidad menor de cuentas, sin embargo esto queda sujeto al polímero empleado.

2.8.1.2 Viscosidad

El peso molecular del polímero disuelto en la solución polimérica y el solvente, están relacionados directamente con la viscosidad de la solución polimérica, donde la viscosidad actúa contrarrestando las fuerzas de estiramiento producidas por la repulsión electrostática del chorro cargado. La viscosidad de la solución se puede aumentar, incrementando el peso

molecular del polímero, también incrementando la concentración de la solución e incluso agregando polielectrolitos en pequeñas cantidades, donde los polielectrolitos permiten incrementar la viscosidad sin alterar la concentración. Si bien la viscosidad de la solución influye significativamente en generar fibras lisas, no necesariamente determina la concentración crítica a la cual se obtienen las nanofibras (Andrady 2008). (Simons 1966) encontró que las fibras obtenidas de soluciones de baja viscosidad tendían a ser más cortas y más finas, mientras que las nanofibras de soluciones de mayor viscosidad, mostraron fibras relativamente continuas y lisas. (Baumgarten 1971) logro determinar los parámetros de elaboración de nanofibras de una solución de poliacrilonitrilo / dimetilformamida (PAN / DMF), donde observo que el diámetro de las nanofibras presentan una dependencia específica con respecto a la viscosidad de la solución polimérica, mostrando diámetros de las nanofibras que van desde 500 a 1100 nm (Garg and Bowlin 2011).

El empleo de solución polimérica de muy alta viscosidad presenta una gran dificultad en la formación de fibras. Los grupos de Investigación (Doshi and Reneker 1995; Buchko, Chen et al. 1999), han reportado valores máximos de viscosidad en un rango de 1 a 215 poises para diferentes soluciones poliméricas. Un aumento en la viscosidad o también en la concentración de la solución puede originar un mayor y más uniforme diámetro en las fibras, dependiendo el polímero. En soluciones de baja viscosidad, la tensión superficial es el factor dominante, y en diversos casos solo es se presenta la formación de gotas o gotas incorporadas a las nanofibras; mientras que a valores por encima de una concentración crítica se obtiene una estructura fibrosa continua cuya morfología es afectada por el valor de la misma concentración. La relación entre la viscosidad y la concentración de fibras obtenidas por electrohilado, han sido estudiadas en diversos sistemas poliméricos como, ácido poliláctico co-glicólico (PLGA), alcohol polivinílico (PVA), poliestireno (PS), gelatina, entre otros.

2.8.1.3 Solvente

El empleo de solventes, tiene una gran influencia y determinación en la elaboración de nanofibras poliméricas. Inicialmente, los solventes afectan la conformación de las cadenas poliméricas en la solución, e influyen en la facilidad del transporte de la carga del chorro. El momento dipolar y la conductividad de la solución polimérica determinan la obtención y

tamaño de las nanofibras. Si el solvente presenta una polaridad mayor, se pueden obtener nanofibras poliméricas de menor diámetro. Así mismo el solvente o mezcla de solventes determinan la velocidad de solidificación del chorro de la solución. Cuanto menor es la temperatura de ebullición del solvente, mayor será la velocidad de solidificación del chorro. No obstante, en ocasiones la solidificación puede ser muy rápida produciendo una obstrucción en la aguja (Caracciolo, Tornello et al. 2013).

2.8.1.4 Conductividad

La conductividad de la solución polimérica es fundamental en la producción de nanofibras, dado que influye en la repulsión electrostática de las cargas superficiales presentes en la solución. La conductividad de una solución puede incrementarse por agregado de partículas conductoras o iones a la solución o también seleccionando un solvente con alta polaridad. El aumento de la conductividad de la solución también tiene un efecto en la disminución el diámetro medio de las nanofibras (Ramakrishna 2005). (Hayati, Bailey et al. 1987) estudiaron el efecto del campo eléctrico, las condiciones experimentales y la afectación de los factores en la estabilidad de las nanofibras. De esta manera se pudo concluir que la conductividad de la solución polimérica juega un papel importante en la disrupción electrostática en la superficie de la solución y los resultados mostraron que las soluciones altamente conductoras en conjunto con el aumento del voltaje aplicado, producían chorros con corrientes altamente inestables que se movían en diferentes direcciones. Sin embargo también se podían producir chorros relativamente estables con soluciones semiconductoras y aislantes. Los resultados mostraron que los chorros inestables producen fibras con una distribución de diámetro muy amplio (Huang, Zhang et al. 2003).

2.8.1.5 Tensión superficial

La tensión superficial es la fuerza a vencer para lograr el estiramiento del chorro y obtenerlas nanofibras poliméricas. Cuanto mayor es la tensión superficial, mayor cantidad de cargas superficiales y tensión aplicada se requerirá en el proceso. Dado que el solvente determina la tensión superficial de la solución, sería ideal emplear un solvente con baja tensión superficial. Sin embargo, la concentración y la naturaleza química del polímero también determinan la tensión superficial. En general, al aumentar la concentración polimérica de la solución, se

produce una disminución de la tensión superficial. Otra forma de disminuir la tensión superficial, es agregando surfactantes a la solución (Caracciolo, Tornello et al. 2013). (Franco, Delvasto et al. 2009) implementaron el agente surfactante no iónico tritón X - 100 en nanofibras de alcohol polivinílico (PVA), para reducir la tensión superficial de la solución y obtener nanofibras continuas y sin gotas. En este trabajo de investigación se pudo observar que gracias a la adición de un agente surfactante como lo es el tritón X – 100, se pudo reducir la tensión superficial de la solución polimérica, obteniendo nanofibras lisas y uniformes.

2.8.1.6 Constante dieléctrica

La constante dieléctrica de una solución es una medida de la capacidad, que permite mantener cargas eléctricas en la solución polimérica. Cuanto mayor es la constante dieléctrica de la solución polimérica, con más facilidad se obtendrán nanofibras uniformes y de menor diámetro medio. La constante dieléctrica de una solución polimérica se puede variar reemplazando el solvente o una fracción del mismo por uno con mayor o menor constante dieléctrica (Caracciolo, Tornello et al. 2013).

2.8.1.7 Peso molecular del polímero

El peso molecular del polímero tiene un efecto significativo en las propiedades reológicas y eléctricas tales como viscosidad, tensión superficial, conductividad y fuerza dieléctrica para el proceso de electrohilado. Al incrementar el peso molecular del polímero, se reduce el número de gotas en las nanofibras. Se ha observado que soluciones de polímeros con muy bajo peso molecular tienden a formar gotas. El peso molecular de un polímero refleja el grado de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas en una solución y por tanto, la viscosidad de la solución (Pham, Sharma et al. 2006).

2.8.1.8 Factores ambientales

El proceso de electrohilado en la mayoría de los casos se realiza a temperatura ambiente y en una atmosfera de aire, sin embargo también podría presentarse nitrógeno u otros gases que pueden modificar el proceso de secado del chorro, esto afectaría a la solución polimérica ya que podría existir perdida de cargas eléctricas superficiales al ambiente. Sin embargo también otra condición ambiental que podría afectar el secado del chorro, es la humedad. En

particular, un porcentaje alto de humedad podría generar un ambiente propicio para la ionización de partículas del polímero a electrohilar, y la reacción temprana de las soluciones, retardando de la evaporación de los solventes, produciendo goteo y mal formación de nanofibras (Ramakrishna 2005). Por ejemplo, al existir un alto porcentaje de humedad en el proceso de electrohilado, es probable que el agua se condense en la superficie de las nanofibras. Como resultado, esto puede tener una influencia negativa sobre la morfología de las nanofibras, perjudicando especialmente al polímero disuelto en solventes volátiles (Bognitzki, Czado et al. 2001; Megelski, Stephens et al. 2002). Para realizar el proceso de electrohilado es adecuado tener un porcentaje óptimo de humedad de 10 %, al 40 %.

2.8.2 Parámetros de la máquina de electrohilado

Los parámetros de procesamiento de la máquina de electrohilado poseen una notable influencia en el desarrollo y la obtención de nanofibras así como en la morfología de las mismas, debido al ajuste y funcionamiento de las partes constitutivas de la máquina. Los principales parámetros de la máquina de electrohilado a controlar son: el tipo de colector, así como el material del mismo, el voltaje, la velocidad de flujo, la punta de la jeringa, aguja o boquilla capilar, la distancia de la punta de la jeringa al colector (Doshi and Reneker 1995).

2.8.2.1 Tipo de colector

Existe una variedad de colectores empleados para la obtención de tejidos de nanofibras con una orientación determinada, sin embargo los colectores más utilizados son, el colector cilíndrico, plato colector plano y colector de disco. El colector cilíndrico es uno de los más utilizados debido a que en él se pueden depositar fibras de forma lineal a lo largo del cilindro, siguiendo una deposición espiral, sin embargo uno de los factores a controlar más comunes en la implementación de este colector, es la velocidad de rotación del cilindro, la cual debe de ir ajustada, de acuerdo a la velocidad de flujo de la solución, el voltaje y la viscosidad de la solución polimérica.

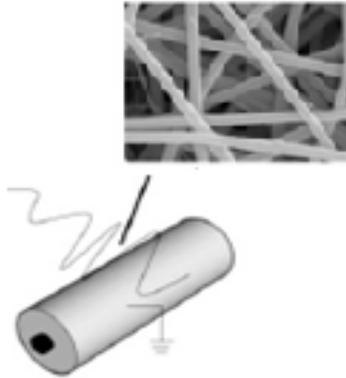


Figura 7. Colector rotatorio o cilíndrico (Yoo, Kim et al. 2009).

El plato colector plano es el más utilizado para producir un tejido de nanofibras con el cual se puede obtener un tejido de nanofibras con orientación al azar (no tejido), gracias a su superficie lisa donde las fibras depositadas, conforman un tejido en su mayoría homogéneo y de espesor abundante (Boland, Wnek et al. 2001).

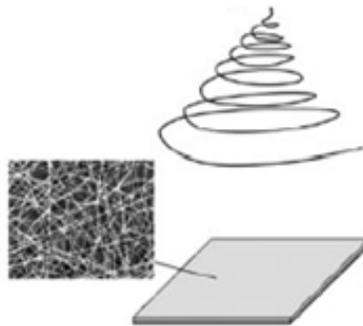


Figura 8. Colector plano (Subbiah, Bhat et al. 2005).

También existe el colector de disco el cual tiene como objetivo, obtener nanofibras con una mejor alineación, sin embargo este colector en algunas ocasiones es difícil de implementar debido al tipo de solución polimérica y parámetros a emplear, para la deposición de las nanofibras (Theron, Zussman et al. 2001).



Figura 9. Colector rotatorio o de disco (Theron, Zussman et al. 2001).

2.8.2.2 Material del colector

El material del colector influye en la estructura del tejido de nanofibras que se obtiene, debido a la conductividad eléctrica. Por lo cual en general, se utilizan colectores conductores como: acero, cobre, aluminio, etc. Dichos colectores son conectados mediante un electrodo a tierra, ya que de esta manera el exceso de carga presente en las nanofibras depositadas es eliminado permitiendo la deposición homogénea de las nanofibras en el colector (Caracciolo, Tornello et al. 2013).

2.8.2.3 Voltaje aplicado

Un factor crucial implícito en el proceso de electrohilado es la aplicación de voltaje a la solución polimérica. El voltaje aplicado induce las cargas necesarias sobre la solución y junto con el campo eléctrico externo se da inicio al proceso de electrohilado (Taylor 1964). Se ha demostrado que al aumentar el voltaje aplicado en el proceso, se producen mayores cargas superficiales, lo que favorece el afinamiento del chorro, resultando en nanofibras de menor diámetro. Sin embargo, un voltaje alto también produce la evaporación más rápida del solvente y en consecuencia puede suprimir etapas de estiramiento y disminución del diámetro del chorro, obteniéndose en algunos casos, nanofibras de mayor tamaño al esperado. También en ocasiones no se observa ninguna tendencia en el diámetro, al variar el voltaje aplicado (Gamboa, Mantilla et al. 2007; Caracciolo, Tornello et al. 2013). (Doshi and Reneker 1995) mostraron que el aumento en el voltaje aplicado, cambia la forma de la superficie de la gota desde la cual se origina el chorro y el cambio de la forma se ha correlacionado con el aumento en los defectos de las gotas presentes en las nanofibras. Sin embargo en la literatura existe un desacuerdo con respecto al efecto del voltaje aplicado en el diámetro de las nanofibras.

(Reneker and Chun 1996) demostraron que no hay muchos cambios en el diámetro de las fibras de óxido de polietileno al variar el campo eléctrico.

(Simons 1966) patentó un aparato para la producción de un tejido de nanofibras con un peso muy ligero, donde se colocaron dos electrodos, uno positivo y otro negativo. El electrodo positivo fue colocado en la punta de la jeringa cargada con la solución polimérica y el otro electrodo negativo, fue conectado a un colector donde las nanofibras fueron coleccionadas (Huang, Zhang et al. 2003). (Shin, Hohman et al. 2001) diseñaron una máquina de electrohilado con la cual pudieron controlar de manera más eficiente los parámetros experimentales para cuantificar la electrohidrodinámica del proceso de electrohilado, en la elaboración de nanofibras para la ingeniería de tejidos.

2.8.2.4 Velocidad de flujo

Para que el proceso de electrohilado sea satisfactorio, debe existir un equilibrio entre la velocidad a la cual la solución es dosificada y la velocidad de remoción de la solución por efecto del voltaje aplicado. Por lo general, la velocidad de flujo es controlada mediante una bomba, en la cual se soporta una jeringa que inyecta la solución a una velocidad constante determinada por el usuario. El mayor propósito de este parámetro, es la obtención de un chorro continuo. Dependiendo del tipo de solución polimérica y voltaje aplicado, el emplear una velocidad de flujo baja es deseable para dar tiempo suficiente al solvente para su evaporación y así también obtener nanofibras homogéneas de diámetro medio (Ramakrishna 2005).

2.8.2.5 Punta de la jeringa, aguja o capilar

El diámetro interno de la punta de la jeringa influye en el diámetro de las nanofibras, y en la velocidad de evaporación del solvente en la punta. Al disminuir el diámetro interno de la boquilla, aumenta la tensión superficial de la solución, por lo tanto a igual tensión aplicada se necesita de una mayor fuerza de Coulomb para vencerla. La aceleración del chorro disminuye y posee mayor tiempo de estiramiento y elongación antes de ser depositado en el colector, generando fibras de menor diámetro (Ramakrishna 2005).

2.8.2.6 Distancia de separación (aguja – colector)

La distancia de separación (desde el extremo de la punta capilar a la superficie del colector) define la resistencia del campo eléctrico así como el tiempo disponible para la evaporación del disolvente antes de que las nanofibras alcancen la superficie del colector. En consecuencia, variar este parámetro influye en el diámetro medio de nanofibras obtenidas y en su morfología.

El aumento de la distancia de separación, dejando otros parámetros constantes, generalmente reduce los diámetros de las fibras (Baker et al., 2006), pero dependiendo de otros parámetros puede a veces aumentar el diámetro de las fibras (Kidoaki, Kwon et al. 2006) o incluso detener el proceso de electrohilado por completo. Si la distancia es muy pequeña, la fuerza del campo eléctrico es mayor y se produce una mayor aceleración del chorro, pero como el tiempo de vuelo también disminuye, la evaporación del solvente es escasa, generando nanofibras húmedas (Ramakrishna 2005). Las nanofibras húmedas pueden fundirse en el colector (Hsu and Shivkumar 2004) (Jalili, Hosseini et al. 2005), Dependiendo de la alimentación, los campos eléctricos más altos producen nanofibras más delgadas, pero con una distancia demasiado corta disponible para el desarrollo de la inestabilidad de la solución, es más probable desarrollar un cono de Taylor inestable y formación de defectos.

2.9 Nanofibras y la medicina

2.9.1 La piel

2.9.1.1 Generalidades

La piel es un órgano que desempeña una gran variedad de funciones: protección frente agresiones externas, impermeabilización, termorregulación, producción de vitamina D, absorción de radiación ultravioleta y la detección de estímulos sensoriales (Burkitt, Young et al. 1993). La piel previene la pérdida sustancial de fluidos corporales, además, juega un papel importante en la termorregulación y defensa inmunológica. Células como los queratinocitos, melanocitos, fibroblastos y células endoteliales constituyen la epidermis, la

dermis y el tejido subcutáneo y son necesarios para garantizar la función completa de la piel (Böttcher-Haberzeth, Biedermann et al. 2010). La piel humana se encuentra constituida por tres principales capas, epidermis, dermis e hipodermis, las cuales cumplen tareas integradoras y específicas para mantener en equilibrio la constitución de la piel.

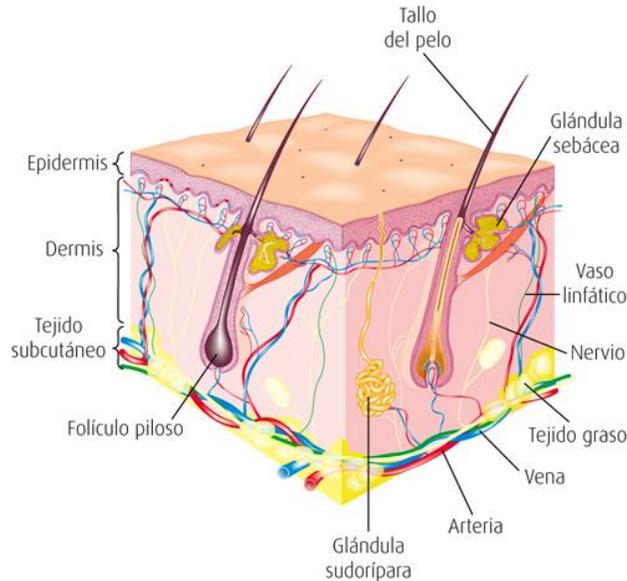


Figura 11. Partes constitutivas de la piel (Saavedra 2000).

2.9.1.2 Epidermis

La capa más externa, es la epidermis, la cual mide aproximadamente entre 0.1 a 0.2 mm. Las células de Merkel, células de Langerhans, terminaciones nerviosas, melanocitos y queratinocitos, los tipos de células prominentes de la epidermis. La epidermis es delgada y totalmente celular, pero tiene suficiente grosor para proveer la función de barrera fundamental. La epidermis mamífera y sus accesorios (cabello, uñas, glándulas sudoríparas y sebáceas) mantienen la homeostasis por el constante reciclamiento de la capa basal de células. Los queratinocitos son las células mayoritarias, germinan en estrato basal de la epidermis y van ascendiendo formando los estratos espinoso, granuloso, lúcido (solamente en palmas y plantas) y córneo, a medida que se produce este ascenso el queratinocito va aumentando su contenido en queratina hasta que la célula se aplana, muere y finalmente se desprende, este ciclo o tiempo de tránsito epidérmico dura unos 30 días (Puig Sanz 1996). La membrana basal separa físicamente la epidermis de la dermis subyacente, sin embargo, funcionalmente este conecta ambos tejidos.

2.9.1.3 Dermis

La dermis está situada justamente debajo de la epidermis y constituye la mayoría de la piel y está compuesta de colágeno, elastina, glicosaminoglicanos (GAGs) y ácido hialurónico. El tipo principal de células presente en la dermis son los fibroblastos, que son capaces de producir enzimas remodeladoras como proteasas y colagenasas, que juegan un papel importante en el proceso de curación de las lesiones cutáneas.

La dermis constituye el sostén de la epidermis. Puede dividirse en dos capas, papilar y reticular. La dermis papilar es la capa más superficial, limita superiormente con la epidermis. La dermis reticular es la capa más profunda, está formada por haces de fibras de colágeno más gruesos que los de la dermis papilar y limita inferiormente con el tejido celular subcutáneo denominado también hipodermis o panículo adiposo (Puig Sanz 1996).

2.9.1.4 Hipodermis

La hipodermis es la capa localizada debajo de la dermis y contiene una cantidad considerable de tejido adiposo que está bien vascularizado y contribuye tanto a las propiedades mecánicas como termo-reguladoras de la piel. La hipodermis consiste principalmente en tejido graso, que funciona como fuente de reserva nutricional y también tiene la función de aislamiento térmico (Rassner 1999).

2.9.2 Tratamiento de la curación de una herida cutánea

El tratamiento para la curación de una herida cutánea es un proceso dinámico y altamente organizado que envuelve tres etapas: inflamación, formación de nuevo tejido y reorganización del tejido.

2.9.2.1 Inflamación

La inflamación empieza inmediatamente después de que la herida ha ocurrido cuando los vasos sanguíneos dañados liberan plaquetas en el sitio de la herida, el cual ayuda a mantener la homeostasis por medio de la formación de un coágulo rico en fibrina. Adicionalmente, las plaquetas activadas juegan un rol vital en la etapa de inflamación por la secreción de proteínas adhesivas, factores de crecimiento (GFs), y citocinas o citoquinas, las cuales reclutan y

activan neutrófilos, monocitos y fibroblastos. Primero, los neutrófilos se infiltran en el área de la herida y remueven los contaminantes presentes.

Cuando el área está limpia de partículas ajenas, los neutrófilos secretan quimio-atrayentes que estimulan a los monocitos a invadir el espacio de la herida y unirse a las proteínas de la matriz extracelular (ECM) por medio de los receptores que integran la membrana celular. Estas interacciones célula-matriz estimulan la diferenciación de los monocitos en macrófagos, los cuales pueden entonces secretar una plétora de citocinas adicionales dentro del área de la herida, incluyendo el factor α de necrosis tumoral, el factor α de crecimiento transformante (TGF- α), TGF- β , interleucina-1, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) BB, y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Macri and Clark 2009).

2.9.2.2 Formación del tejido nuevo

Como segunda etapa del proceso de curación de la herida se lleva a cabo la formación del tejido nuevo, esta ocurre simultáneamente con la primera etapa ya que la reepitelialización comienza horas después de que la herida ha sido ocasionada. La reepitelialización está caracterizada por la migración de células epidermales de la epidermis envolvente sobre una cama de fibronectina y colágeno tipo I, por medio de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$, respectivamente. La migración es facilitada por la secreción de enzimas degradadoras de ECM, como la colagenasa, que es la responsable de limpiar la ruta entre la dermis rica de colágeno y el coágulo rico en fibrina. Uno o dos días después de la herida, las células epiteliales comienzan a proliferar, posiblemente por la escases de contactos célula – célula o la estimulación de varios GFs y citocinas en la matriz pericelular (PCM), como el factor de crecimiento semejante a la insulina, el factor de crecimiento epidermal de unión a heparina y el factor de crecimiento de queratinocitos.

El proceso de reepitelialización resulta en la producción de una membrana basal altamente ordenada, la cual inter-bloquea a las células epidermales al delineado estroma del tejido por medio de hemi-desmosomas. En respuesta a la abundancia de GFs y citoquinas presentes en el espacio de la herida unos días después de la lesión, el tejido granular comienza a formarse por el influjo de monocitos, fibroblastos y vasos sanguíneos. Esta apariencia granular resulta

de la infiltración de vasos sanguíneos. Los queratinocitos de la herida y los fibroblastos migrantes también secretan una variedad de proteasas de matriz capaces de limpiar una ruta para el movimiento.

Mientras que los fibroblastos migran, ellos reemplazan la primera “matriz provisional” compuesta del coagulo de fibrina y fibronectina. Después de que la migración está completa, los fibroblastos se convierten en “fábricas” de síntesis de colágeno y reemplazan la matriz provisional con fibras de colágeno durante los siguientes días. Los vasos sanguíneos brotan dentro de la herida concurrente con el crecimiento interno de los fibroblastos. Esta neovascularización ocurre en respuesta a factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el FGF liberados en grandes cantidades por medio de macrófagos infiltrados y células epidermales activadas (Macri and Clark 2009).

2.9.2.3 Reorganización del tejido

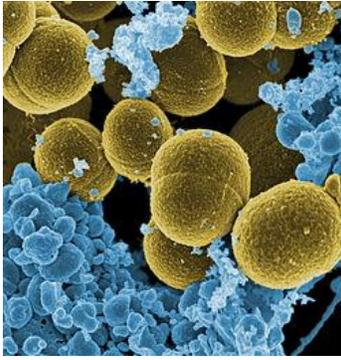
La etapa final de la curación de la herida involucra la contracción y reorganización de la matriz recién sintetizada, así como la apoptosis de los fibroblastos y los vasos sanguíneos innecesarios. La contracción de la herida ocurre dentro de la segunda y tercer semana después de haberse producido la herida y es mediada principalmente por los fibroblastos con un fenotipo miofibroblástico. Estas células contraen la herida por medio de la hinchazón de las fibras de colágeno. La futura reorganización de la matriz de colágeno es un proceso lento, este está limitado por la baja tasa de colágeno disponible, y está acompañado por el incremento del entrecruzamiento del colágeno, esto fortalece la matriz en el transcurso de 6 a 9 meses (Macri and Clark 2009).

Por los antecedentes revisados se observa de la necesidad de realizar investigación sobre el desarrollo de apósitos que cuadyuven en la cicatrización de heridas producidas en la piel, por lo que esta investigación busca resolver el problema a través del desarrollo de nanofibras de aplicación farmacológica para el tratamiento de lesiones cutáneas.

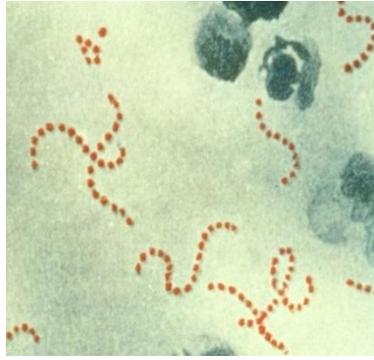
2.9.3 Microorganismos en la piel

La piel es la primera línea de defensa contra diversos microorganismos los cuales pueden causar infecciones de leves hasta moderadas. El daño a la piel debido a un traumatismo, aunque es capaz de auto-repararse, a menudo requiere intervención médica inmediata dependiendo de la gravedad (Andrady 2008). La infección de heridas presenta un problema cada vez más difícil. Con el aumento de la prevalencia y el crecimiento de bacterias resistentes a diversos fármacos, hay una creciente necesidad de reducir y eliminar las infecciones de heridas utilizando metodologías que limitan la capacidad de las bacterias para evolucionar a otras cepas resistentes a los fármacos (Mohiti-Asli, Pourdeyhimi et al. 2014). Varios organismos, incluyendo bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, etc., han sido implicados en causar severas infecciones de la piel (Church, Elsayed et al. 2006) (Vindenes and Bjerknes 1995). Algunos de los principales microorganismos que intervienen en lesiones generando infecciones en la piel se encuentran: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, etc. (Santucci, Gobara et al. 2003) (Chim, Tan et al. 2007).

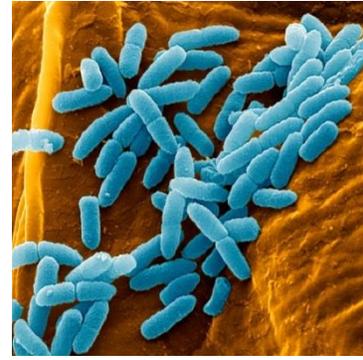
La cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*, es un importante agente causante de infecciones superficiales e invasivas de piel y tejidos blandos además es , resistente a diversos antibióticos como (vancomicina, penicilina y meticilina). La cepa *Pseudomonas aeruginosa* es un tipo de microorganismo causante de severas infecciones adquiridas principalmente en líquidos, la *P aeruginosa* presenta resistencia a antibióticos como: cefalosporinas, tetraciclinas, cloranfenicol entre otros más (Gómez Álvarez, Leal Castro et al. 2005), también microorganismos como *Escherichia coli* muestra resistencia a diversos antibióticos como ciprofloxacino, amoxicilina, así también los *Streptococcus pyogenes* presenta resistencia a eritromicina (Heunis and Dicks 2010), debido a estos patógenos, es necesario explorar alternativas para continuar tratando con éxito infecciones causadas por los diversos patógenos invasivos.



Staphylococcus aureus



Streptococcus pyogenes



Pseudomonas aeruginosa

Figura 10. Bacterias presentes en infección de la piel (Santucci, Gobara et al. 2003).

2.9.4 Sistemas de administración de fármacos

Varios tipos de microorganismos presentan resistencia a diversos antibióticos, esto representa que los sistemas de administración de fármacos implementados en tratamientos convencionales no sean eficaces para la liberación del principio activo y con ello, la infección de la lesión no logre cicatrizar de forma rápida y adecuada (Heunis and Dicks 2010).

Existen diversas desventajas asociadas al empleo de determinados fármacos. Éstos se distribuyen en el organismo según sus propiedades físicas, tales como la solubilidad, coeficiente de partición y carga. En consecuencia, los fármacos pueden alcanzar gran variedad de sitios en los cuales puede que se encuentren fuera de su intervalo terapéutico, que sean inactivos, o que su acción sea indeseada o nociva, y por tanto, con efectos secundarios negativos (Sáez, Hernández et al. 2003). Por ello existen dos métodos para mejorar la acción de los fármacos:

- *Liberación controlada*, se encarga de eliminar o reducir los efectos secundarios produciendo una concentración terapéutica estable del fármaco en el organismo. En la liberación controlada no suelen existir cambios en la concentración del fármaco en el organismo.
- *Liberación específica*, se trata de asegurar que el fármaco es liberado en el lugar requerido, y al mismo tiempo, mantener el fármaco inactivo en otro lugar del organismo.

Los sistemas de liberación controlada ofrecen un grado significativo de libertad en la elección del lugar de aplicación de los fármacos. Mientras que muchos fármacos tradicionales deben ser inyectados o ingeridos, los sistemas poliméricos de liberación controlada pueden situarse en el organismo en, o cerca de la zona enferma, donde son implantados, o adheridos externamente a la piel, gracias a ello han aparecido nuevas rutas de administración de fármacos (Sáez, Hernández et al. 2003). Se ha investigado la administración sistémica de fármacos a través de las membranas de la piel (ruta transdermal), entre otras. Las enfermedades de la piel se suelen tratar usualmente de forma tópica (cremas, geles, ungüentos, entre otros). El medicamento se aplica de forma directa sobre la piel, así de esta manera con dosis pequeñas se consigue la máxima efectividad del medicamento y mínimos efectos secundarios en el resto del organismo, pero es también de administración imprecisa (Sáez, Hernández et al. 2003).

La desventaja del empleo de tratamientos tópicos como son las cremas, geles y ungüentos es que tienen que aplicarse al menos dos veces al día. Si se incorporan en apósitos macrométricos para heridas, las vendas deben cambiarse diariamente, lo que puede exponer la herida a una infección adicional (Stefanides Sr, Copeland et al. 1976).

Las inyecciones intramusculares y subcutáneas, presentan otra vía de administración de fármacos las cuales se han utilizado desde hace mucho tiempo con una gran variedad de fármacos, sin embargo este tipo de terapia es intermitente. También, los tratamientos orales han sido utilizados durante mucho tiempo, como sistemas de administración de fármacos estables y fiables, sin embargo para el tratamiento de lesiones cutáneas, el empleo de este sistema de liberación, es de efecto retardante, pueden causar efectos secundarios debido a su liberación en todo el organismo, además de que no es posible administrarse en pacientes inconscientes (Sáez, Hernández et al. 2003).

La liberación transdermal, donde el sistema de liberación se adhiere externamente a la piel, es una de las rutas de administración de fármacos comercialmente más aceptadas (Thacharodi and Rao 1995). El uso de apósitos macro y micrométricos han sido utilizados para el tratamiento de lesiones cutáneas (Roa, Las Heras et al. 2011), (quemaduras principalmente),

sin embargo debido a que presentan una menor área de superficie de contacto en comparación a los apósitos de nanofibras, resultan ser incómodos e ineficaces.

La posibilidad de inmovilizar fármacos como los antibióticos, enzimas, péptidos antimicrobianos y hormonas de crecimiento a sistemas poliméricos como nanofibras y nanocapsulas, abre un nuevo campo de investigación en la ingeniería biomédica (Agarwal, Wendorff et al. 2008) (Kenawy, Bowlin et al. 2002).

El empleo de nanofibras para inmovilizar medicamentos en la superficie de una lesión permite:

- Liberación controlada del medicamento.
- Permite controlar la humedad en la lesión.
- Incrementa el área de superficie de contacto de las nanofibras con respecto a la zona lesionada en la piel.
- Por su morfología del apósito la cual presenta alta resistencia y flexibilidad, brinda una mayor comodidad para su uso.

Gracias a las características que presenta el apósito de nanofibras poliméricas con fármacos embebidos, se puede favorecer a la respuesta del tratamiento de lesiones cutáneas, de forma eficiente y controlada.

2.9.5 Sistemas de liberación de fármacos mediante polímeros biodegradables

En las últimas décadas, se han realizado diversos estudios los cuales han demostrado que el uso de polímeros biodegradables, son eficaces para la liberación de diversos fármacos. Los polímeros biodegradables como portadores de fármacos pueden clasificarse en cuatro categorías: a) nanopartículas, b) hidrogeles, c) micelas y d) andamios nanofibrosos. Sin embargo, los andamios poliméricos con fármacos embebidos, fabricados mediante la técnica de electrohilado, se han implementado y desarrollado para diversas aplicaciones biomédicas, tanto para fármacos hidrófilos e hidrófobos, donde mediante la adecuación de la composición, morfología y porosidad del andamio, se puede controlar la liberación de los fármacos. El empleo de andamios nanofibrosos, ofrecen la entrega específica del principio

activo de los fármacos proporcionando una eficaz liberación en el cuerpo sin ningún tipo de daño a la salud (Kim, Luu et al. 2004).

Las nanofibras elaboradas por la técnica de electrohilado son una gran promesa para el desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos debido a dos razones principales (Leung and Ko 2011). En primer lugar, las nanofibras tienen una gran relación superficie-volumen, lo cual es aún mayor considerando la porosidad que se presentan dentro de las fibras. No sólo la gran área superficial garantiza un elevado aprovechamiento terapéutico, sino que también puede reducir la restricción a la difusión de fármacos que conduce a ciertos aumentos en la fracción total de fármaco que puede ser liberado. En segundo lugar, las propiedades relevantes de las nanofibras, tales como el diámetro de la fibra, la porosidad y los mecanismos de unión a los fármacos, son ajustables a través de los parámetros de proceso, la elección del material y la velocidad de liberación del fármaco pueden adaptarse para diversas aplicaciones (Zahedi, Rezaeian et al. 2013). Para la administración de fármacos en sitios específicos, los fármacos se colocan directamente o adyacentemente en zonas afectadas, algunos ejemplos de estos sistemas incluyen ungüentos y cremas. Si bien hay investigaciones que se centran en nuevos métodos de administración de fármacos en sitios específicos, los productos disponibles en el mercado, sólo pueden llegar a los órganos que son superficiales y de fácil acceso.

La administración de fármaco por circulación está destinada a alcanzar sitios que son inaccesibles para la colocación directa, y los ejemplos incluyen la administración oral y la inyección. Sin embargo, el efecto de los fármacos administrados por la circulación tiende a ser sistémico y, por lo tanto, las áreas no enfermas pueden verse afectadas, produciendo efectos secundarios que pueden ser graves en algunos casos. Por ejemplo, los fármacos para la terapia del cáncer pueden causar pérdida de cabello y peso debido a que estos fármacos pueden matar células pero no pueden diferenciar entre células cancerosas o no cancerosas. Al respecto, el control de la dosis del fármaco es también importante, ya que es deseable aplicar la cantidad mínima de fármaco que es suficiente para tratar el área enferma pero no lo suficiente como para causar efectos secundarios adversos.

La liberación de fármacos puede mantenerse al nivel requerido durante un cierto período de tiempo, de tal manera que se puede eliminar la necesidad de múltiples aplicaciones de fármacos (Leung and Ko 2011). Los objetivos principales en el desarrollo de nuevos portadores de fármacos son dos: permitir la colocación del portador de fármaco en el sitio específico y controlar la velocidad de liberación del fármaco. Las matrices de polímeros tales como las fabricadas a partir de la técnica de electrohilado son capaces de contener agentes terapéuticos y liberarlos de una manera controlada (Leung and Ko 2011).

2.9.5.1 Carga del fármaco

Cuando se usan nanofibras como portadores de fármacos, los agentes terapéuticos deben inmovilizarse primero en la matriz polimérica para que funcionen los mecanismos de control de liberación. El método depende del polímero y el fármaco, pero la inmovilización generalmente se puede categorizar mediante atrapamiento o unión (Shuler and Kargi). El atrapamiento es un medio físico para contener fármacos o proteínas en una matriz polimérica. En portadores de nanofibras con fármacos, pueden realizarse ejemplos de atrapamiento de fármacos mediante reticulación de polímeros o atrapando el fármaco en un vehículo intermedio que a su vez contenía una matriz polimérica que forma la nanofibra (Leung and Ko 2011).

2.9.5.2 Liberación de fármacos

La liberación de fármacos a partir de nanofibras poliméricas se puede describir a través de tres mecanismos: desorción de la superficie de la fibra, difusión de estado sólido a través de fibras y degradación in vivo de la fibra. Las pruebas de liberación de fármacos a partir de nanofibras se realizan comúnmente en soluciones salinas tamponadas con fosfato (PBS). Cuando una muestra de nanofibras con fármaco se somete a PBS, las nanofibras se encuentran rodeadas por la solución. Entonces la solución también penetrará el espacio entre las nanofibras individuales. Cuando la muestra de las nanofibras se hincha por la fase acuosa, pueden liberarse fármacos o proteínas unidos a las superficies de las fibras (Leung and Ko 2011).

La liberación de fármaco a partir de la superficie de nanofibras es un mecanismo de dos etapas, comenzando desde la desorción de fármacos desde la superficie de la fibra, seguida de una rápida difusión en la fase acuosa. El mecanismo de desorción no se limita a la superficie exterior de las nanofibras sino que también incluye fármacos en las superficies de los poros dentro de las fibras. Teniendo en cuenta la escala de tamaño nanométrico de los poros internos, el área de superficie sería mucho mayor que la que se tiene en la superficie de la fibra exterior.

De acuerdo con sus argumentos, (Sridhar, Venugopal et al. 2011) encontró que al reducir la porosidad mediante el aumento de la concentración de la solución polimérica a electrohilar, la tasa de liberación puede reducirse. También menciona que si la difusión de estado sólido es el mecanismo de liberación primario, se espera un 100 % de liberación de fármacos, lo que no ocurre en casi todos los casos. La incapacidad para la liberación completa del fármaco se atribuye al atrapamiento de ciertas proporciones de fármaco dentro de regiones de polímeros de mayor concentración o de mayor peso molecular, lo que es inconsistente si se supone que la difusión en estado sólido es el mecanismo primario. El equilibrio entre el mecanismo basado en la desorción y el mecanismo de difusión en estado sólido sigue siendo ambiguo y, por lo tanto, es un área de potencial investigación futura.

La liberación de fármacos también puede conseguirse mediante la degradación de las nanofibras. Tras la degradación, los fármacos que están atrapados dentro de la matriz polimérica pueden liberarse. Este mecanismo juega un papel significativo en los polímeros de degradación rápida como el quitosano, el alginato y el PVA. El concepto de degradación de superficie y volumen es también importante para los portadores de fármacos de nanofibras, ya que las velocidades de liberación de fármaco pueden ser diferentes, especialmente cuando se comparan entre nanofibras homogéneas y nanofibras núcleo-envoltura. Existen diferentes estrategias para controlar adicionalmente la velocidad de liberación, tal como la mezcla con otros polímeros para reducir la cantidad de superficie que contiene fármaco (Leung and Ko 2011).

2.9.6 Aplicaciones de las nanofibras poliméricas

Durante los últimos años, diversas publicaciones relacionadas con las nanofibras poliméricas en el campo de las aplicaciones médicas han aparecido en la literatura. (Kumbar, Nair et al. 2006) presentaron una breve revisión que habla sobre las nanofibras poliméricas como nuevos portadores para el suministro de moléculas terapéuticas tópicas y locales, así como también su comportamiento de liberación controlada y sostenida, utilizando gases biodegradables para aplicaciones de cicatrización de heridas. Un ejemplo de estos temas vienen en el trabajo escrito por (Liang, Hsiao et al. 2007) el cual lleva como título llamado “Andamios nanofibrosos funcionales para aplicaciones biomédicas”. La ingeniería de tejidos, vendaje de heridas, inmovilización de enzimas y administración de fármacos son algunas de las aplicaciones biomédicas para implementar andamios de nanofibras. (Kenawy, Bowlin et al. 2002) examinó nanofibras de PEVA, PLA, y mezclas de los dos como portadores de clorhidrato de tetraciclina (TCH) para el tratamiento de enfermedades periodontales. Los autores compararon la liberación de las nanofibras con la de películas fundidas e informaron que la fracción total de fármaco liberado es mayor en las nanofibras, lo que es probablemente debido al aumento de la superficie de las nanofibras.

La adaptabilidad de los portadores de fármacos nanofibrosos permite que esta tecnología muestre potencial en el tratamiento de muchos tipos de enfermedades. Al igual que los ejemplos en estudios de regeneración de tejidos, el rendimiento de los portadores de fármaco en nanofibras, en términos de la cantidad total de fármaco liberado, se muestra que es mayor que en microfibras y películas de gel. Esta observación está de acuerdo con la ecuación formulada por (Sridhar, Venugopal et al. 2011). La cual muestra la ventaja potencial de usar una estructura nanométrica y fibrosa en la administración de fármacos. Por ello, el empleo de PVA como sistema de administración de fármacos es una excelente propuesta para liberar materiales biológicos y médicos de una forma controlada (Gimenez, Mantecon et al. 1996). Generalmente, los sistemas de administración de fármacos basados en matrices poliméricas se utilizan para optimizar las propiedades terapéuticas de los fármacos y hacerlos más seguros, eficaces y fiables (Peppas, Hilt et al. 2006).

2.10 Fármacos

2.10.1 AINE

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son globalmente la clase de fármacos terapéuticos más utilizados a nivel mundial y son buenos candidatos para el desarrollo de preparados de fármacos de liberación controlada utilizados en conjunto con diversos polímeros (Shen, Yu et al. 2011). También se utilizan para controlar el dolor y la inflamación en las enfermedades reumáticas (Kenawy, Abdel-Hay et al. 2007).

2.10.1.1 Diclofenaco Sódico

Diclofenaco sódico (DS), es una sal sódica de ácido amino fenil acético. Es un potente fármaco no esteroideo con pronunciadas propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas (Gohel and Amin 1998) (Sena, Chaudhry et al. 2004; Cetin, Atila et al. 2010) se utiliza comúnmente en el tratamiento de trastornos artríticos, tales como espondilitis anquilosante, artritis reumatoide y osteoartritis (Tuncay, Caliş et al. 2000). Su semivida biológica se ha reportado como 1-2 h (Todd and Sorokin 1988). Debido a la corta vida biológica y los efectos adversos asociados, se considera como un candidato ideal para el suministro controlado de fármacos (Gilman, Ralf et al. 1991).

2.10.2 Antibióticos

La presencia o fácil acceso de bacterias patógenas pueden dificultar el proceso de curación de una herida (Scales and Huffnagle 2013). Las terapias actuales para tratar la infección bacteriana se basan en la administración sistemática de antibióticos y formulaciones farmacéuticas tópicas (preparadas como líquido o en forma de pomadas y cremas) (Boateng, Matthews et al. 2008). Sin embargo, a menudo es difícil lograr la concentración local efectiva de antibióticos sin riesgo de toxicidad sistémica debido a la alta concentración de antibióticos requerida. Las formulaciones líquidas tienen tiempos de residencia cortos en el sitio de la herida (semivida 2-3 h). El problema de los ungüentos y cremas es que para las heridas muy exudativas, no son muy eficaces para permanecer en el área de la herida, ya que absorben rápidamente fluido, pierden sus características reológicas y se vuelven móviles (Hurler, Berg et al. 2012). Además, las formulaciones farmacéuticas se aplican tres o cuatro veces al día.

Además, son ineficaces una vez que las bacterias adherentes desarrollan una biocapa (Li, Liu et al. 2013). Por lo tanto, los sistemas de suministro de antibióticos controlables se han propuesto para dirigirse a diferentes aspectos del proceso de cicatrización de heridas. Los antibióticos se han combinado con vendajes de heridas para prevenir o combatir las infecciones y promover la curación con tejido cicatricial de mejor calidad (Elsner, Berdicevsky et al. 2011) (Elsner, Shefy-Peleg et al. 2010). Un apósito ideal debe promover una curación rápida con el mínimo inconveniente para el paciente y a un costo razonable (Boateng, Matthews et al. 2008).

Los apósitos con antibióticos para heridas pueden ser preferidos a los tratamientos sistémicos por varias razones: reducción de dosis de fármaco y eventualmente toxicidad sistémica; compatibilidad de tejidos; baja presencia de resistencia bacteriana y menor interferencia en el proceso de cicatrización de heridas; estabilidad química del fármaco en presencia de material biológico y liberación controlada; no hay necesidad de cambios frecuentes del apósito (Ruszczak and Friess 2003). Muchos biomateriales (alginato, aloe vera, colágeno y quitosano) con diferentes formas físicas (por ejemplo, mallas, películas, espuma, gel y nanofibras) se han propuesto como métodos válidos para producir apósitos para heridas (Ruszczak and Friess 2003) (Chong, Phan et al. 2007). La tecnología de las nanofibras ha atraído la atención de muchos investigadores como una solución potencial a los retos actuales en el campo biomédico, como el cuidado de las heridas (Leung and Ko 2011) (Kelleher and Vacanti 2010).

2.10.2.1 Gentamicina

La gentamicina es una molécula de aminoglucósido que exhibe actividad bactericida frente a un amplio espectro de microorganismos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Ruszczak and Friess 2003; Moser, Stephan et al. 2013) (Lan, Li et al. 2014). En forma de crema, la gentamicina se utiliza clínicamente en el tratamiento de infecciones cutáneas, úlceras, quemaduras, picaduras de insectos, laceraciones infectadas, etc. La resistencia bacteriana a gentamicina es menor que a otros aminoglucósidos. Su toxicidad está relacionada con su capacidad de unirse electrostáticamente con grupos

principales de fosfolípidos cargados negativamente y, una vez que ha penetrado dentro de la célula, interfiere con la síntesis de proteínas (Kovács, Savopol et al. 2012).

A menudo los pacientes sufren de molestias con la aplicación de medicamentos tópicos y un esfuerzo de enfermería sustancial es necesario para el reemplazo de vendajes en las heridas. La infección se puede reducir usando apósitos que incorporan antibióticos.(Elsner and Zilberman 2009) (Teo, Ong et al. 2011) (Elsner, Egozi et al. 2011). Los apósitos para heridas cargados con antibióticos (Zilberman and Elsner 2008) hechos de tejidos poliméricos biodegradables tienen ventajas de varias maneras. En primer lugar, los tejidos biodegradables proporcionan concentraciones bactericidas de antibióticos durante el tiempo prolongado necesario para tratar completamente la infección en particular. En segundo lugar, la biodegradabilidad variable de semanas a meses puede permitir que se traten muchos tipos de infecciones. En tercer lugar, los tejidos biodegradables se disuelven, por lo tanto no hay necesidad de eliminación; y por último, debido a que los tejidos biodegradables se disuelven lentamente, el tejido blando se llenará lentamente con tejido cutáneo, por lo que no hay necesidad de reconstrucción (Chen, Hsu et al. 2012). Los antibióticos y anestésicos locales tienen la ventaja de proporcionar altas concentraciones de fármaco en el área precisa requerida, y la dosis total de antibiótico aplicada localmente no es normalmente suficiente para producir efectos sistémicos tóxicos. Con su gran área superficial y estructura microporosa, el tejido puede iniciar rápidamente las vías de señalización y atraer a los fibroblastos a la capa de la dermis, que puede excretar importantes componentes de la matriz extracelular, como el colágeno y los factores de crecimiento para reparar el tejido dañado (Chen, Hsu et al. 2012).

2.11 Fundamentos de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

2.11.1 Cromatografía

Es difícil definir el término “cromatografía” porque el concepto se aplica a una gran variedad de sistemas y técnicas. Sin embargo, todos estos métodos tienen en común el empleo de una fase estacionaria y una fase móvil. Los componentes de una mezcla se pasan a través de una fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil y las separaciones están basadas en las

diferencias en la velocidad de migración entre los componentes de la fase móvil. La cromatografía es un método muy empleado para la separación, identificación y determinación cuantitativa de los compuestos químicos de muestras complejas (Ahuja and Rasmussen 2011).

El inicio de la cromatografía puede atribuirse al botánico ruso Mikhail Semyonovich Tswett en 1906, quien logro la separación de una mezcla de pigmentos de las plantas, como clorofilas y xantofilas; usando éter de petróleo y una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio. Tswett logro separar diversos compuestos coloreados en bandas o zonas bien definidas en la columna, demostrando que la clorofila es uno de los muchos pigmentos que se encuentran en las hojas de las plantas (Ettre and Sakodynskii 1993)

2.11.2 Cromatografía líquida de alta resolución

Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que requiere de diversos instrumentos especiales que permita trabajar con las altas presiones requeridas. La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución o en sus siglas en ingles HPLC (High Performance Liquid Chromatography), es la técnica más versátil y utilizada de todos los tipos de cromatografía por elución. Los que trabajan en el ámbito químico la utilizan para separar y determinar las especies presentes en muestras de materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos (Parajón García, Parajón Silva et al. 2011).

Existen varias razones del porque la técnica analítica de HPLC tiene gran popularidad, y estas son: sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria farmacéutica, dichas sustancias pueden ser muestras biológicas como las proteínas, oligosacáridos, triglicéridos; así como también fármacos difíciles de analizar tanto cuantitativa como cualitativamente.

La técnica se completa con una serie de detectores cuya aplicabilidad se centra en distintas familias de compuestos (detector diferencial de índice de refracción y detector de fluorescencia), además se incorporan detectores de carácter universal, como son el UV-VIS de fila de fotodiodos y el de más reciente desarrollo detector de espectrometría de masas. El proceso de separación en esta técnica depende de las interacciones que se establecen entre el analíto y la fase estacionaria y móvil respectivamente; estableciéndose diversos equilibrios químicos tales como analíto-fase estacionaria, analíto-fase móvil y fase móvil-fase estacionaria (Parajón García, Parajón Silva et al. 2011).

2.12 Halos de inhibición

El Antibiograma es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una cepa de bacterias a un determinado grupo de antibióticos. Las técnicas de antibiograma son utilizadas en el laboratorio de microbiología para estudiar la actividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos responsables de las infecciones, (Navarro Risueño, Miró Cardona et al. 2002). Uno de los métodos más utilizados y conocidos para las pruebas de sensibilidad o resistencia bacteriana es la técnica de halos de inhibición (Koneman, Allen et al. 1985).

La técnica de halos de inhibición es el método para analizar la presencia de bacterias en diferentes medios (saliva, orina, sangre, etc.), empleando discos conteniendo antibiótico. Con el paso del tiempo, diversos estudios han permitido depurar el proceso y hacerlo más determinante en cuanto a la concentración y su relación con el diámetro de los halos que se forman alrededor de los discos. Actualmente, muchos laboratorios que emplean este procedimiento miden estos halos de difusión mediante una simple inspección visual con ayuda de una escala graduada (Manzano, Landa et al.).

CAPITULO 3

3 Justificación

Existen diversos tipos de lesiones que se pueden producir en la piel tales como quemaduras, cortadas, infecciones, raspones, etc. El tratamiento de las lesiones cutáneas incluye la administración de antibióticos por vía oral, tópica y el uso de apósitos macrométricos.

La administración sistémica conlleva a que solo una pequeña parte del fármaco llegue a la zona afectada y otra cantidad del fármaco se libere por todo el organismo, en donde cierta parte del fármaco se puede acumular en órganos que pueden sufrir daños como el hígado y el riñón.

La desventaja del tratamiento tópico (cremas y ungüentos) es su fácil eliminación de la superficie de la piel alterando la dosis aplicada, ya que el paciente puede colocarse una baja o alta cantidad de medicamento para subsanar ésta desventaja, además de generar un microambiente húmedo que no es favorable para la cicatrización, así mismo, pueden adherirse a ellas algunas partículas del ambiente que conduzcan a una infección. Por su parte, los apósitos macrométricos, protegen al tejido dañado y permiten la administración del fármaco de forma directa sobre la lesión.

Actualmente existen diversos apósitos comerciales útiles para el tratamiento para lesiones cutáneas como: Hyalofill – f[®], Halobac[®], Aquacel[®], Nexcare[®], etc. Sin embargo este tipo de apósitos están conformados de fibras de tamaño micro o macrométrico, dichos apósitos también presentan una baja superficie de contacto, lo que limita la cantidad disponible y la difusión del fármaco hacia la piel.

Por otra parte, el uso de nanofibras para inmovilizar medicamentos en la superficie de una lesión muestra una estructura nanométrica, en donde se ve incrementada considerablemente la superficie de contacto, además de una liberación controlada de medicamentos en su sitio de acción (reduciendo con ello los efectos adversos), brindando una mayor comodidad al

usuario, así se puede controlar la humedad en la lesión y proteger al fármaco de la exposición al ambiente (Sáez, Hernáez et al. 2003).

Por esta razón, en el presente proyecto se ha desarrollado un tejido nanoestructurado que contiene embebidos dos fármacos: gentamicina (antibiótico de amplio espectro) y diclofenaco (analgésico y antiinflamatorio), con el fin de emplearlos como un apósito sobre la superficie dañada, para brindar protección física al tejido, prevenir agresiones externas, y al mismo tiempo, permitir el tratamiento local de las infecciones mediante la liberación controlada del antibiótico, y disminuir el dolor y la inflamación, mediante la liberación del analgésico. De esta manera, se pretende generar un microambiente favorable para la cicatrización.

CAPITULO 4

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Elaborar un apósito de nanofibras de aplicación farmacológica para el tratamiento de lesiones cutáneas.

4.2 Objetivos particulares

- Sintetizar y obtener nanofibras poliméricas estables y reproducibles, con distribución de diámetro homogénea y sin formación de cuentas.
- Desarrollar una metodología para la incorporación de los fármacos (gentamicina y diclofenaco) en nanofibras poliméricas y seleccionar las mejores condiciones de síntesis de nanofibras en cuanto a geometría, distribución y diámetro (cerca a 200 nm).
- Evaluar la incorporación de los fármacos contenidos en las nanofibras, mediante la técnica de HPLC.
- Evaluar la efectividad del antibiótico (gentamicina) en la inhibición de crecimiento bacteriano *in vitro*.

CAPITULO 5

5 Materiales y Métodos

5.1 Partes constitutivas de la máquina de electrohilado

El diseño de la máquina de electrohilado básico utilizado para el proceso de electrohilado consta de cinco componentes principales: un depósito o jeringa, donde es cargada la solución polimérica, una bomba de inyección la cual permite suministrar la solución polimérica de manera constante y controlada, una fuente de alto voltaje la cual permite crear el campo eléctrico necesario para dar formación de las nanofibras, un colector plano sobre el cual se depositan las nanofibras y una cabina aislante que mantiene las condiciones ambientales controladas para el desarrollo de las nanofibras.

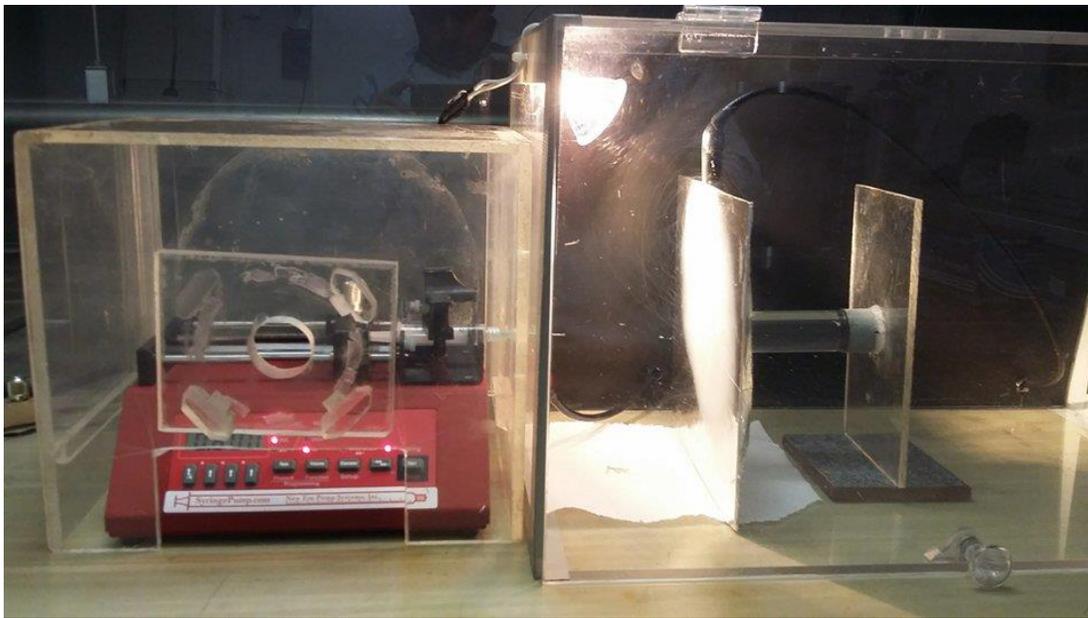


Figura 12. Partes constitutivas de la máquina de electrohilado (Laboratorio de Biomateriales de CICATA – IPN, Unidad Legaría).

5.1.1 Depósito o jeringa

Para los procesos de electrohilado, se utilizaron jeringas de plástico desechables de 5ml y agujas hipodérmicas de acero inoxidable de 21 G X 32 mm de la marca DL Medica[®], México.

5.1.2 Bomba de inyección

Para el desarrollo y obtención del tejido de nanofibras se empleó una bomba de inyección para jeringa, Modelo NE-4000 Double Syringe Pump, New Era Pump Systems, Inc, USA, la cual tiene un intervalo de velocidad de flujo de 1.459 $\mu\text{L} / \text{h}$ para una jeringa de 1 cm^3 y 6120 ml / h para una jeringa de 60 cm^3 (SyringePump, 2015).

5.1.3 Fuente de alto voltaje

Se implementó la fuente de alto voltaje SPELLMAN modelo CRT40, USA. La fuente de alto voltaje contiene una salida de voltaje variable de 0 a 40 kV. La fuente de alto voltaje contiene dos electrodos, los cuales soportan cargas eléctricas de polaridad opuesta. Uno de los dos electrodos es colocado en la punta de una aguja la cual contiene la solución polimérica y el otro electrodo es colocado en un colector metálico a cierta distancia de la punta de la aguja.

5.1.4 Plato colector plano

Se utilizó una placa cuadrada de cobre de geometría plana, la cual tiene un espesor de 2 mm y de 10 cm x 10 cm de dimensión por lado, soportado en una base de acrílico para su posicionamiento y manejo práctico.

5.1.5 Cabina protectora aislante

La cabina aislante mide 30 cm de alto, con 50 cm de largo y 30 cm de ancho, la cabina es de material acrílico transparente, con una puerta para su fácil acceso.

5.2 Reactivos empleados en la obtención del apósito de nanofibras de PVA

- **Polímero**, alcohol polivinílico (PVA), marca SIGMA ALDRICH, con peso molecular = 89,000 – 98,000. Hidrolizado al 99%, Lote # MKBS5301V.
- **Surfactante Tritón™ X-100**, marca SIGMA ALDRICH, Lote #SLBN8333V.
- **Agua desionizada** (18.2 $\text{m}\Omega$, Barnstead Easy Pure, Termo Scientific).

5.2.1 Proceso de elaboración de nanofibras

Para el proceso de obtención de nanofibras de PVA, se preparo una solución polimerica al (10% p/v) de PVA en agua desionizada, en un vaso de precipitados de 20 ml, a una

temperatura de 70 °C con agitación constante durante 1 h. En seguida, se ajusto la temperatura a 30°C y se agrego el surfactante Triton X-100 al (5% v/v), con agitación por 1 h. Transcurrido el tiempo de incorporación de la solución polimerica con el Triton X-100 Se colocaron 3 ml de solución en la jeringa para realizar el proceso de electrohilado. La maquina de electrohilado se ajusto a 12 kV y 0.8 ml/h. la distancia de la punta de la aguja al colector fue establecida a 10 cm.

5.3 Reactivos utilizados en la obtención de nanofibras de PVA con fármacos

(gentamicina y diclofenaco)

- **Polímero**, alcohol polivinílico (**PVA**), marca SIGMA ALDRICH, con peso molecular = 89,000 – 98,000. Hidrolizado al 99%, Lote # MKBS5301V.
- **Surfactante Tritón™ X-100**, marca SIGMA ALDRICH, Lote #SLBN8333V.
- **Agua desionizada** (18.2 mΩ, Barnstead Easy Pure, Termo Scientific).
- **Sulfato de gentamicina**, marca SON'S, ampolleta de solución inyectable con 160 mg / 2 ml, lote 16051211.
- **Diclofenaco sódico**, marca AMSA Laboratorios, ampolleta de solución inyectable con 75 mg / 3 ml, lote B16E146.

5.3.1 Proceso de elaboración de nanofibras de PVA con fármacos (gentamicina y diclofenaco) embebidos

Para el proceso de elaboración de nanofibras de PVA con fármacos (gentamicina y diclofenaco) embebidos, se elaboró la solución polimérica como etapa inicial.

Se utilizó un vaso de precipitados de 20 ml con agua desionizada (10 ml) calentada a 70 °C, en el vaso se elaboraron soluciones poliméricas, basándose en el diseño experimental, a dos concentraciones diferentes (8 y 12 % p/v) de PVA, dependiendo la corrida. Las soluciones se mantuvieron en agitación 1 hora. Posteriormente, se disminuyó la temperatura de la solución a 30 °C, sin dejar de agitar, se agregaron las soluciones de los fármacos (gentamicina y diclofenaco) a diversas concentraciones (Tabla 2), así como también el surfactante (tritón X-100) el cual se aplico a una concentración de 5 % v/v. Las mezclas se agitaron por 1 hora. Transcurrido el tiempo de integración de la solución polimérica con los fármacos y el

surfactante, se procedió a cargar la jeringa con la solución para llevar a cabo el proceso de electrohilado.

5.3.2 Implementación del diseño experimental

Para el desarrollo y obtención de las nanofibras poliméricas con los fármacos: antibiótico (gentamicina) y analgésico (diclofenaco), embebidos, se estableció un diseño factorial fraccionario 2^{5-2} para explorar las condiciones adecuadas en la preparación de nanofibras de PVA con diámetro medio aproximado de 200 nm, con morfología lineal y homogénea.

Existen diversos parámetros que afectan la morfología y las propiedades de las nanofibras poliméricas, algunos de estos factores son, la concentración de la solución polimérica, el voltaje aplicado, la velocidad de flujo de la bomba inyectora, la viscosidad, tensión superficial, humedad, tipo de solvente, polímero(s), distancia de la punta de la aguja al colector, tipo de aguja, etc. Sin embargo, los factores estudiados en el diseño experimental para el proyecto de investigación fueron: la concentración de la solución polimérica, la concentración del antibiótico, la concentración del analgésico, el voltaje aplicado (kV) y velocidad de flujo (ml/h) debido a que la revisión bibliográfica permitió identificar que estos parámetros han sido los más influyentes en el proceso de electrohilado de nanofibras de PVA. Para cada experimento, se dispensaron 3 ml de la solución polimérica con los fármacos (gentamicina y diclofenaco) en la jeringa colocada en la bomba de inyección. La distancia entre la punta de la jeringa al plato colector fue establecida a 10 cm.

El modelo experimental diseñado incluye 8 experimentos. Todos los experimentos se realizaron de forma aleatoria. Después se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para el modelo obtenido (Tabla 1). El diseño experimental se realizó con el software Design Expert version 10, USA, así como el análisis estadístico de los datos experimentales.

Tabla 1. Variables y niveles para el diseño factorial fraccionario.

	Nombre	Unidades	Niveles	
			Bajo	Alto
A	Concentración de la solución polimérica	% p/v	8	12
B	Concentración del antibiótico	% v/v	8	12
C	Concentración del analgésico	% v/v	5	9
D	Voltaje	kV	8	12
E	Velocidad de flujo	ml / h	0.4	0.8

5.3.3 Caracterización de las nanofibras

La morfología y el diámetro de las nanofibras electrohiladas fueron analizados por microscopia electrónica de barrido (SEM) (JSM-6390LV, JEOL, Japan). Para la obtención de las micrografías correspondientes a los experimentos realizados, se utilizó un voltaje acelerador de 20 kV, una magnificación X10,000 con spotsize de 20 y una señal de electrones secundarios (SEI) para trabajar sobre la superficie de la muestra.

La media del diámetro de las nanofibras fue determinada por el análisis de las imágenes de SEM por medio del software Scandium SEM interface Ver. 8.20 de JEOL. Con la finalidad de obtener datos confiables, se realizaron 70 mediciones en diversos puntos de cada uno de los ocho experimentos, con ello se pudo determinar el diámetro promedio de las nanofibras.

5.4 Identificación de la presencia de los fármacos en las nanofibras mediante HPLC

Con el fin de identificar la presencia de los fármacos en las nanofibras, se realizaron estudios de HPLC (cromatógrafo HPLC 1200, DAD, Agilent Technologies) a las soluciones de los fármacos (gentamicina y diclofenaco) y a las nanofibras con los fármacos embebidos, específicamente en la muestra sintetizada bajo las condiciones descritas en el experimento 8 de la Tabla 2.

Los fármacos fueron estudiados a partir de soluciones que contenían 6.25 mg/ml para el diclofenaco y 10 mg/ml para la gentamicina. Mientras que las nanofibras fueron estudiadas a partir de una solución que contenía 0.6 mg de sólidos disueltos en 1 ml de agua desionizada.

Las soluciones de los fármacos se inyectaron en un volumen de 2.0 µl, empleando una fase móvil de agua acidificada con ácido fosfórico a pH 3 y acetonitrilo en un proporción de 20:80 con un flujo de 1 ml/min a temperatura ambiente, en una columna eclipse C-18, 3.5 µm, 4.6 x 100 mm de la marca Agilent. El detector se ajustó a 280 nm para la gentamicina (Chen, Hsu et al. 2012) y a 254 nm para el diclofenaco (León-Fernández, Rieumont-Briones et al. 2014), empleando como señal de referencia 360 nm.

La muestra de nanofibras con los fármacos embebidos evaluada con un volumen de inyección de 2.0 µl, bajo las mismas condiciones implementadas para la evaluación de los fármacos, adicionalmente, se ajustó el detector para la identificación de la señal a 290 nm, correspondiente al PVA (señal de longitud de onda obtenida mediante espectro UV-bis).

5.5 Evaluación bactericida de nanofibras de PVA con gentamicina y diclofenaco

Para la evaluación bactericida de las nanofibras con gentamicina y diclofenaco embebidos, se empleó la muestra obtenida bajo las condiciones descritas en el experimento 8 de la Tabla 2, esto es: concentración de solución polimérica al 12 % p/v, concentración de gentamicina al 12 % v/v, concentración de diclofenaco al 9 % v/v, además se ajustó la máquina de electrohilado para el desarrollo del apósito a un voltaje aplicado de 12 kV y una velocidad de flujo de 0.8 ml/h.

Con esta muestra se realizó una prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar, empleando la técnica de halos de inhibición. Dicha prueba se implementó para comprobar si el apósito de nanofibras presenta efecto inhibitorio, sobre el cultivo bacteriano en las dos diferentes cepas. Las cepas utilizadas para la determinación de actividad antibacteriana fueron:

- *Bacillus subtilis*
- *Escherichia coli*

Ambas obtenidas de la ATCC. La cepa *B. subtilis* utilizada para esta prueba, es una bacteria Gram (+) y la otra bacteria es *E. coli*, una bacteria Gram (-). Las cepas fueron reactivadas en

caldo Müeller Hinton (Fluka, Suiza) y posteriormente crecidas en agar Müeller Hinton II (Fluka, Suiza). Se realizó la prueba de susceptibilidad microbiana por la técnica de difusión en agar según el protocolo de Bauer y col. (1966). El ensayo se llevó a cabo mediante la preparación de dos cajas Petri en donde se inocularon ambas cepas bacterianas, cada cepa en una caja Petri.

La metodología consistió en ajustar las cepas indicadoras en solución salina al 0.1 % (p/v) a una turbidez 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) y con ayuda de un isopo estéril se realizó la inoculación de la superficie del agar cubriendo toda la superficie de la caja Petri. Como siguiente pasó, colocaron los controles de cloranfenicol (30 μ g), gentamicina (30 μ g) y solución salina (NaCl 0.1 % p/v) en sensidiscos, en volumen de 20 μ l.

Los discos se dejaron secar en esterilidad y se colocaron en las placas de cultivo. Como controles positivos, se utilizó cloranfenicol y gentamicina así mismo, como control negativo se utilizó la solución salina. Simultáneamente, del apósito de nanofibras fue cortado al mismo tamaño de los sensidiscos control (6 mm de diámetro), consecutivamente, se colocaron los discos sobre la superficie de agar Müeller-Hinton, de cada caja Petri donde previamente se habían inoculado las bacterias y se incubaron a 35 ± 2 °C por 24 h.

Una vez pasado 24 horas de incubación de las muestras, se dispuso a medir cada uno de los halos de inhibición de cada disco, los cultivos se mantuvieron nuevamente en incubación de 24 hasta 72 h a fin de observar el efecto de las muestras a un mayor tiempo de exposición.

CAPITULO 6

6 Resultados y discusión

6.1.2 Aposito de nanofibras de PVA

Para el desarrollo del apósito de nanofibras de PVA representado en la figura 13, el cual se deposito a 12 kV, con una velocidad de flujo de 0.8 ml/h, con concentración de solución polimérica al (10% p/v), y concentración de surfactante Triton X-100 al (5% v/v). Se puede observar una morfología lineal, sin fibras rotas y nula formación de cuentas.

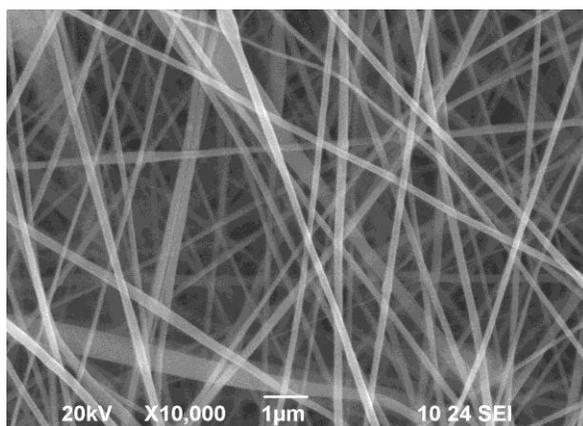


Figura 13. Apósito de nanofibras de PVA.

En la figura 14 se presenta la distribución de los diámetros de las nanofibras de PVA producidas mediante la técnica de electrohilado, los diámetros obtenidos se encuentran entre 30 a 1153 nm, con un diámetro medio de **230 nm**.

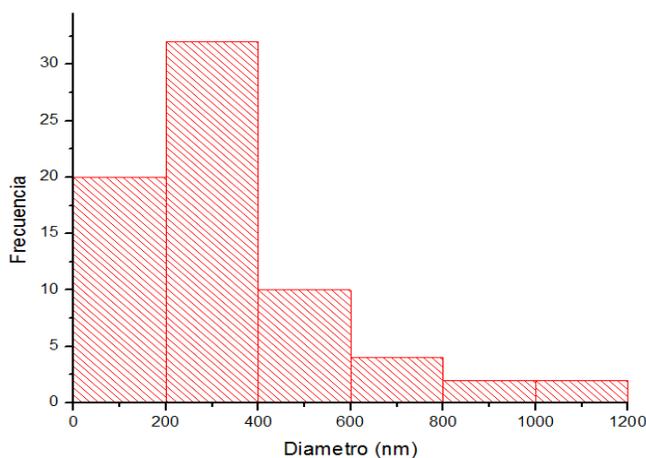


Figura 14. Distribución del diámetro de las nanofibras de PVA.

6.1 Diseño Experimental factorial fraccionado 2⁵⁻²

Una de las principales aplicaciones de los diseños factoriales fraccionados es que se emplean en los experimentos de tamizado o de exploración. Se trata de experimentos en los que se consideran varios factores y el objetivo es identificar aquellos factores (en caso de haberlos) que tienen efectos mayores. Este tipo de diseños suelen utilizarse en etapas iniciales de algún proyecto, observando que muchos de los factores considerados en un principio tengan un efecto positivo o reducido sobre la respuesta.

Para una mejor comprensión de los factores que afectan la síntesis de las nanofibras se empleó un diseño de experimentos (Tabla 2), debido a la consideración de muchos factores que intervienen en este proceso se seleccionó un diseño fraccionario 2⁵⁻². Evaluando la significancia de cada factor se seleccionaron los factores que mas influyen en el diámetro medio de las nanofibras.

Tabla 2. Experimentos desarrollados mediante el diseño fraccionario 2⁵⁻².

Experimento	Concentración de la solución polimérica % p/v	Concentración del antibiótico % v/v	Concentración del analgésico % v/v	Voltaje aplicado kV	Velocidad de flujo ml / h	Diámetro medio de las nanofibras nm
1	8	8	5	12	0.8	176
2	12	8	5	8	0.4	80
3	8	8	9	8	0.8	100
4	12	8	9	12	0.4	190
5	8	12	5	12	0.4	110
6	12	12	5	8	0.8	210
7	8	12	9	8	0.4	80
8	12	12	9	12	0.8	160

6.1.1 Análisis del diámetro medio de las nanofibras

Mediante el diseño experimental empleado para el desarrollo y obtención del apósito de nanofibras con fármacos embebidos (gentamicina y diclofenaco) se llevaron a cabo los

experimentos correspondientes, evaluando la respuesta: diámetro de las nanofibras, ajustando a un modelo polinomial apropiado.

La función polinomial típica de un diseño factorial fraccionado se representa por la siguiente ecuación:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \varepsilon$$

Donde X_1 es una variable codificada que representa la concentración de la solución polimérica, X_2 es una variable codificada que representa la concentración del analgésico, X_3 representa la concentración del antibiótico, X_4 representa el voltaje aplicado y X_5 representa la velocidad de flujo, así mismo las β son los coeficientes de regresión. ε es el termino de error aleatorio.

Los resultados del modelo apropiado en la forma de ANOVA del diseño factorial fraccionado son mostrados en la (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de varianza del modelo (ANOVA).

	Sum of Squares	Mean Square	F Value	p-value (prob>F)
Model	18482.50	3696.50	25.58	0.0380
Residual error	289.00	264.63		

Para la prueba F, la cual tiene un valor por encima del 0.0500 ($p>F=0.0380$) se demuestra que el modelo empleado, **es significativo**. El coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9846$ el cual indica que los valores experimentales se ajustan correctamente al modelo.

La implementación del diseño experimental factorial fraccionado demuestra la siguiente ecuación en términos de valores reales:

$$Y = -174.69444 + 10.87500 A + 10.37500 D + 237.54167 E + 0.43849 BxC - 17.32738 BxE$$

Donde Y es la respuesta (diámetro de las nanofibras), así también A, D, E representan los valores de los factores significativos, seleccionados de la (Tabla 1).

Los factores A (concentración de solución polimerica), D (voltaje aplicado), E (velocidad de flujo) muestran un mayor efecto en la variación del diámetro de las nanofibras, resultando ser significativos al igual que la interaccion B (concentración del analgésico) x E (velocidad de flujo). Sin embargo los efectos principales en la interacción B (concentración del analgésico) x C (concentración del antibiótico) presentan muy baja contribucion. Los parámetros que se descartaron del diseño, fueron: B (concentración del analgésico) y C (concentración del antibiótico), ambos factores no resultaron significativos para el diseño.

6.1.3 Caracterización de las nanofibras obtenidas en el diseño experimental por SEM

Con la finalidad de analizar la morfología de cada uno de los experimentos de nanofibras de PVA con fármacos embebidos (gentamicina y diclofenaco), se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM). A continuación se explican a detalle las micrografías de cada uno de los experimentos realizados:

6.1.4 Experimento 1

La Figura 15 representando al experimento 1, se muestra la morfología del tejido de nanofibras, la cual se depositó a 12 kV y 0.8 ml/h, con la concentración de la solución polimérica al (8 % p/v), concentración del antibiótico (gentamicina) al (8 % v/v) y la concentración de analgésico (diclofenaco) al (5 % v/v). En el tejido se puede observar nanofibras lineales, homogéneas y sin formación de cuentas.

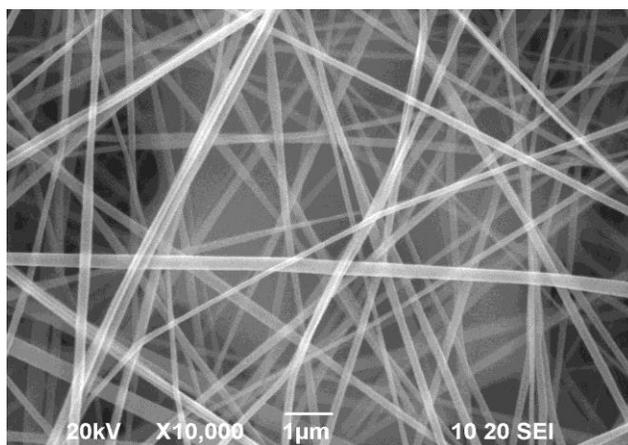


Figura 15. Tejido de nanofibras correspondiente al experimento 1.

La Figura 16 corresponde al histograma 1, el cual muestra la distribución de los diámetros de las nanofibras obtenidos en el experimento 1, los diámetros se encuentran entre los 45 a 400 nm. Con un diámetro medio aproximado de **176 nm**.

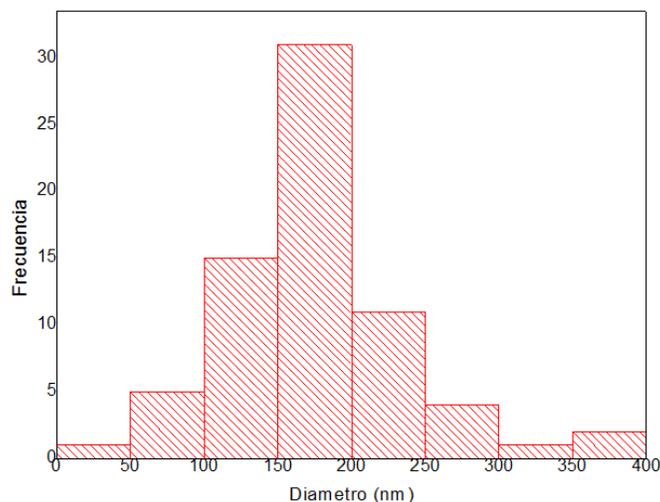


Figura 16. Distribución del diámetro medio de las nanofibras correspondientes al experimento 1.

6.1.5 Experimento 2

La Figura 17 muestra la morfología del tejido de nanofibras del experimento 2, la cual se depositó a 8 kV y 0.4 ml/h, con una concentración de la solución polimérica al (12 % v/v), concentración de gentamicina al (8 % v/v) y concentración de diclofenaco al (5 % v/v). También se pueden observar nanofibras rotas, no lineales, muy delgadas, con gran formación de cuentas, las cuales tienen un diámetro medio aproximado de **385 nm**.

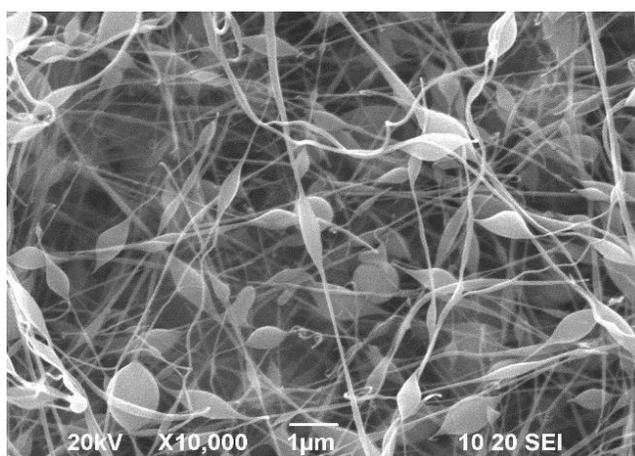


Figura 17. Tejido de nanofibras correspondiente al experimento 2.

La figura 18 corresponde al histograma 2, el cual muestra la distribución de los diámetros de las nanofibras obtenidos en el experimento 2, los cuales se encuentran entre los 43 a los 220 nm. Con un diámetro medio de **80 nm**.

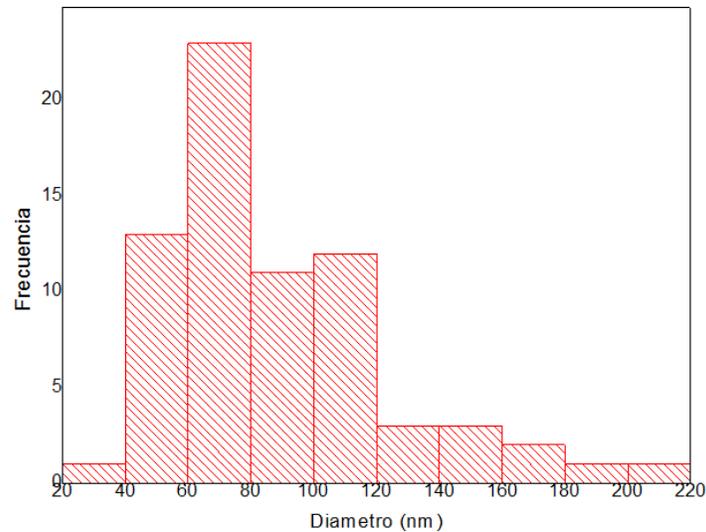


Figura 18. Distribución del diámetro medio de las nanofibras correspondientes al experimento 2.

6.1.6 Experimento 3

En la figura 19 la cual es referente al experimento 3, la cual se depositó a 8 kV y 0.8 ml/h, con la concentración de la solución polimérica al (8 % p/v), concentración de gentamicina al (8 % v/v) y concentración de diclofenaco al (9 % v/v), se puede observar que las nanofibras se muestran no lineales, delgadas y rotas en su mayoría, con formación abundante de cuentas, las cuales tienen un diámetro medio aproximado de **417 nm**.

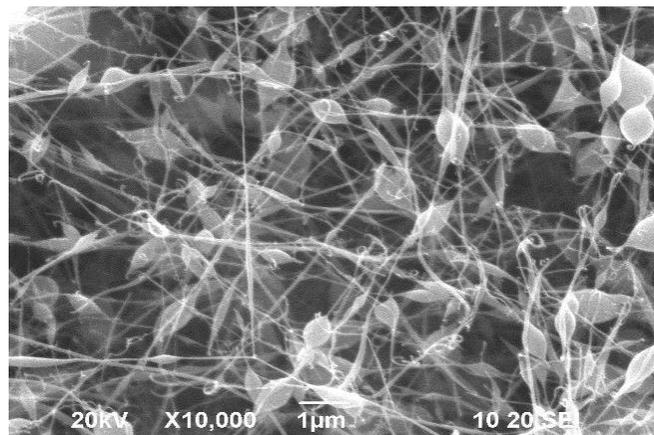


Figura 19. Tejido de nanofibras correspondiente al experimento 3.

La Figura 20, muestra la distribución de los diámetros de las nanofibras obtenidas en el experimento 3, los cuales se encuentran entre 33 a 140 nm, con diámetro medio de **100 nm**.

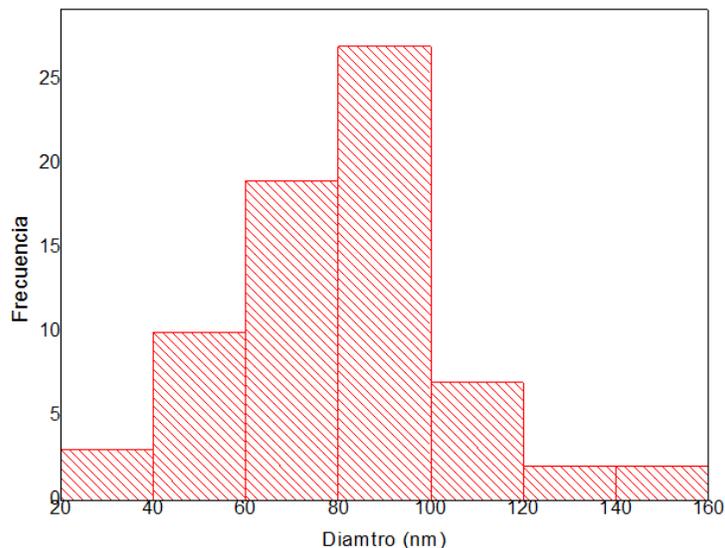


Figura 20. Distribución del diámetro de las nanofibras correspondiente al experimento 3.

6.1.7 Experimento 4

La figura 21 representa al experimento 4, la cual se deposito a 12 kV y 0.4 ml/h, con una concentración de solución polimérica al (12 % p/v), concentración de gentamicina al (8 % v/v) y concentración de diclofenaco al (9 % v/v), el tejido de nanofibras muestra una morfología lineal, con moderada formación de cuentas con un diámetro medio de **950 nm**. El tejido no presentó nanofibras rotas, tampoco goteo sobre la superficie del tejido de las nanofibras.

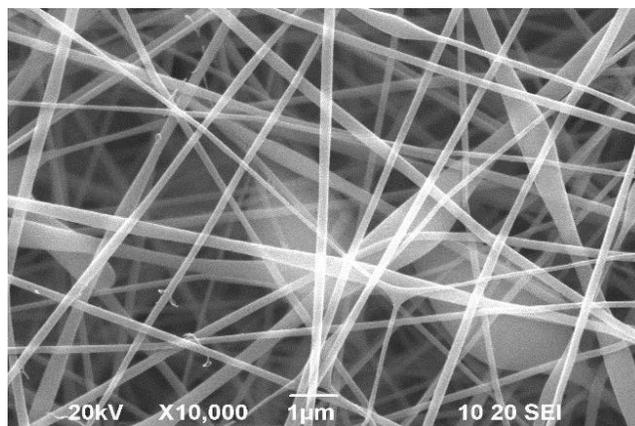


Figura 21. Tejido de nanofibras correspondiente al experimento 4.

La Figura 22, muestra la distribución de los diámetros de las nanofibras obtenidas en el experimento 4, los cuales se encuentran entre 77 a 480 nm, con diámetro medio de **190 nm**.

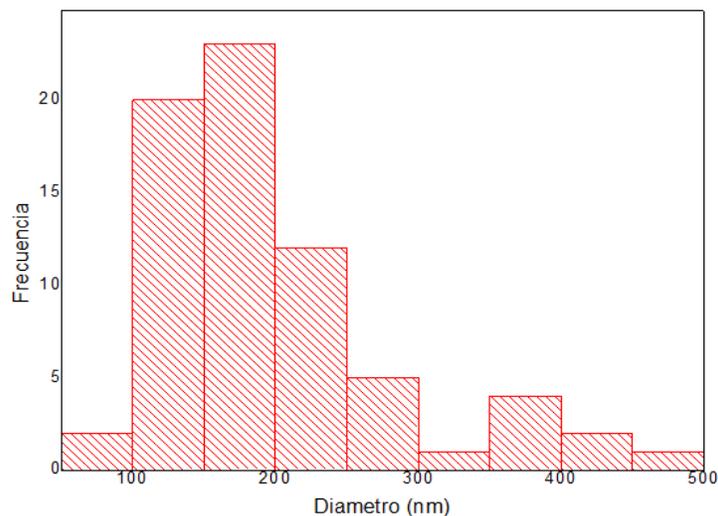


Figura 22. Distribución del diámetro de las nanofibras correspondiente al experimento 4.

6.1.8 Experimento 5

La figura 23, muestra el experimento 5 el cual se depositó a 12 kV, 0.4 ml/h, con concentración de la solución polimérica al (8 % p/v), concentración de (antibiótico) gentamicina al (12 % v/v) y concentración de (analgésico) diclofenaco al (5 % v/v). En la micrografía se puede observar muchas nanofibras rotas, con gran formación de cuentas, con diámetro medio aproximado de **364 nm**.

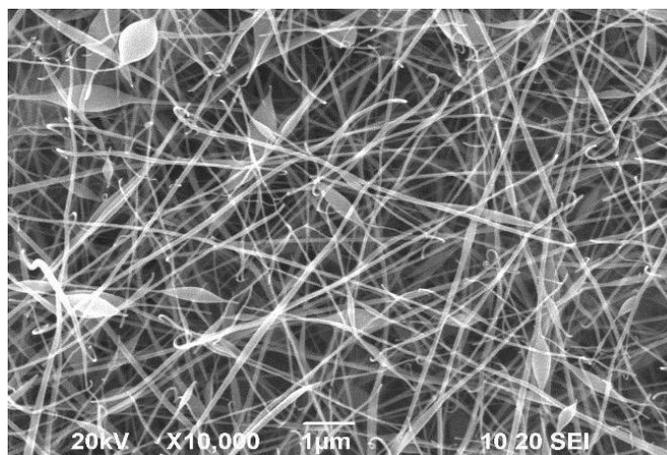


Figura 23. Tejido de nanofibras correspondiente al experimento 5.

La Figura 24, muestra la distribución de los diámetros de las nanofibras obtenidas en el experimento 5, los cuales se encuentran entre 46 a 305 nm, con diámetro medio de **110 nm**.

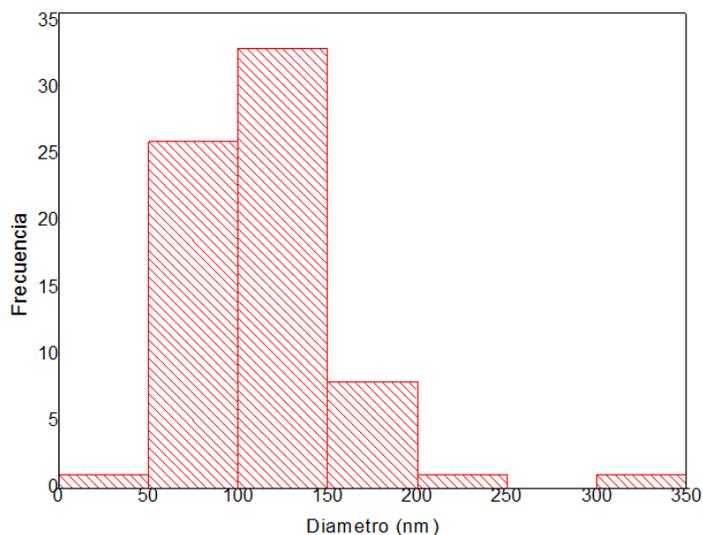


Figura 24. Distribución del diámetro de las nanofibras del experimento 5.

6.1.9 Experimento 6

Para el experimento 6 representada por la Figura 25, el cual se depositó a 8 kV y 0.8 ml / h, con una concentración de la solución polimérica al (12 % p/v), concentración de gentamicina al (12 % v/v) y concentración de diclofenaco al (5 % v/v), se puede observar nanofibras de morfología lineal con muy poca formación de cuentas. El diámetro medio de las cuentas fue de **900 nm** y no presenta nanofibras rotas.

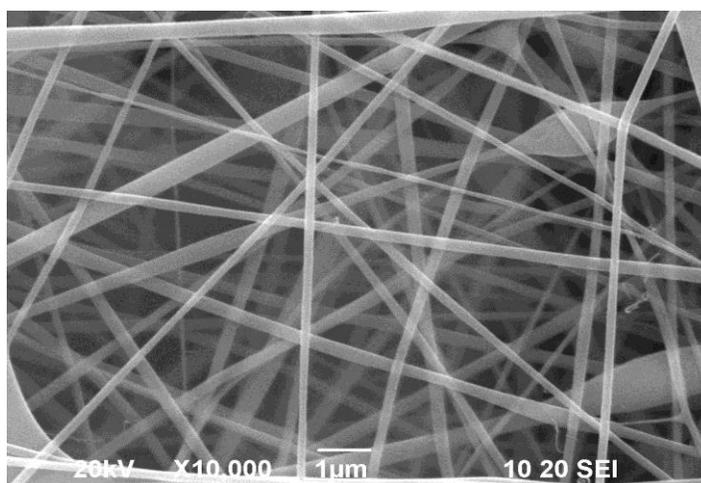


Figura 25. Tejido de nanofibras correspondiente a experimento 6.

La Figura 26, muestra la distribución de tamaño de los diámetros de las nanofibras obtenidas en el experimento 6, los cuales se encuentran entre 74 a 470 nm, con diámetro medio de **210 nm**.

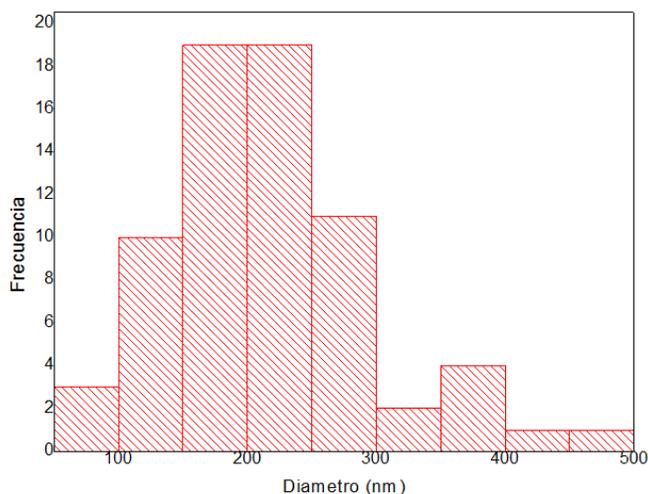


Figura 26. Distribución del diámetro de las nanofibras del experimento 6.

6.1.10 Experimento 7

La figura 27 presenta el experimento 7 el cual se depositó a 8 kV, 0.4 ml/h, concentración de la solución polimérica al (8 % p/v), concentración de gentamicina al (12 % v/v) y concentración de diclofenaco al (9% v/v). En la micrografía se observa una morfología de las nanofibras no lineal, muchas fibras rotas y gran formación de cuentas, las cuales presentan un diámetro medio de **383.5 nm**.

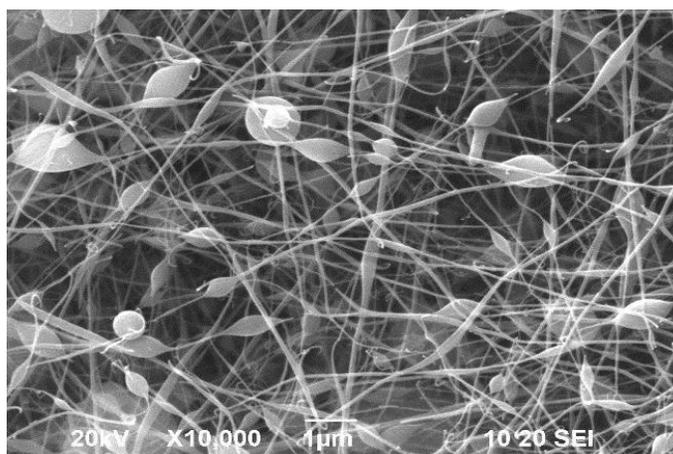


Figura 27. Tejido de nanofibras correspondiente a experimento 7.

La Figura 28, muestra la distribución de los diámetros de las nanofibras obtenidas en el experimento 7, los cuales se encuentran entre 31 a 170 nm, con diámetro medio de **80 nm**.

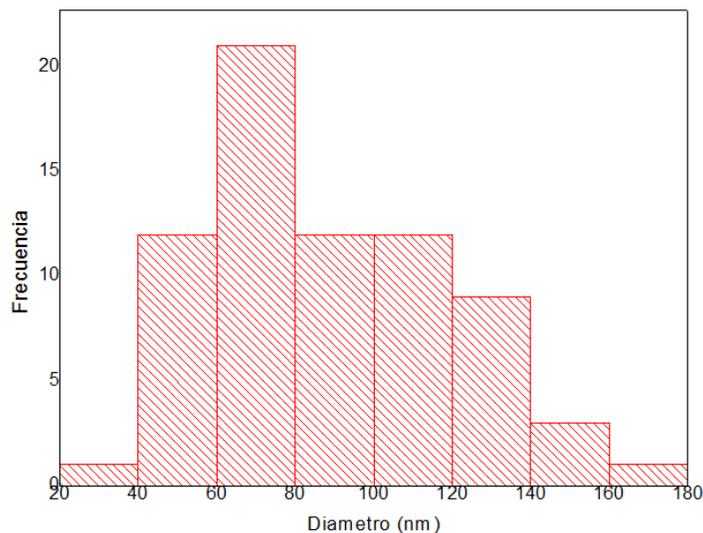


Figura 28. Distribución del diámetro de las nanofibras correspondiente al experimento 7.

6.1.11 Experimento 8

El experimento 8 representado por la Figura 29, se depositó a 12 kV, 0.8 ml/h, una concentración de solución polimérica al (12 % p/v), concentración de gentamicina al (12 % v/v) y concentración de diclofenaco al (9 % v/v). Se puede observar una morfología lineal, sin formación de cuentas y sin nanofibras rotas.

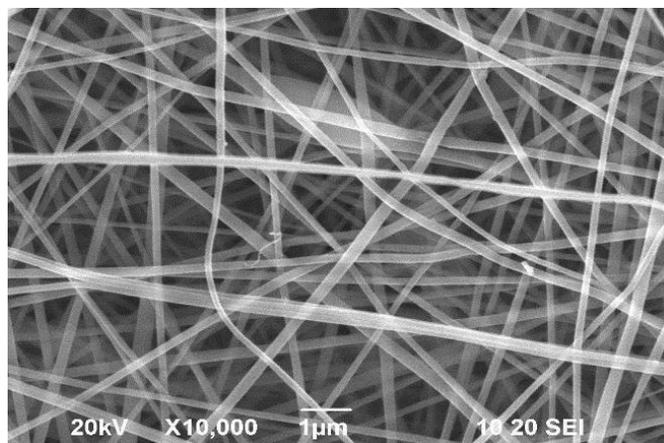


Figura 29. Tejido de nanofibras correspondiente a experimento 8.

La Figura 30, muestra la distribución de los diámetros de las nanofibras obtenidas en el experimento 8, los cuales se encuentran entre 98 a los 306 nm, con un diámetro medio de **160 nm**.

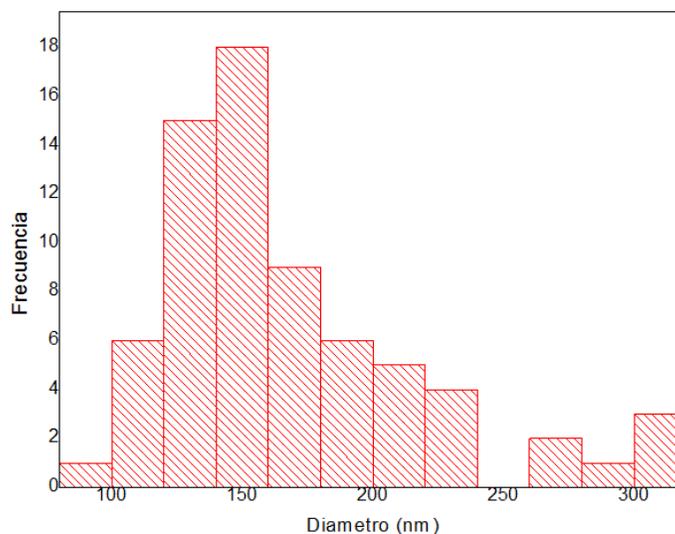


Figura 30. Distribución del diámetro de las nanofibras correspondiente al experimento 8.

Al evaluar los 8 experimentos realizados de forma conjunta, se observa que el diámetro medio menor fue de 80 nm, presentado por el experimento 2 y 7. El diámetro medio mayor fue aproximadamente de 210 nm, presentado por el experimento 6 (Tabla 2).

Al evaluar todos los experimentos, observamos que las corridas 2, 3, 4, 5, 6 y 7 formaron cuentas, sin embargo los experimentos 3 y 7 presentaron la mayor cantidad de cuentas en el apósito de nanofibras. El experimento 4, presento el mayor diámetro medio de las cuentas con 950 nm, sin embargo la cantidad de cuentas fue reducida.

La presencia de cuentas en las nanofibras es debido a la baja viscosidad del polímero empleado, esto fue determinado por (Ki, Baek et al. 2005), quien estudio el efecto de la viscosidad de la solución polimérica en la obtención de nanofibras de gelatina. Ki, (2005) menciona que a bajas concentraciones, la viscosidad de la solución polimérica también es baja, por lo cual la tensión superficial de la solución es alta.

Debido a estos efectos, se puede causar la aparición de cuentas en las nanofibras, produciendo de esta forma, un apósito no uniforme. En diversas zonas del apósito del experimento 3 se presentó goteo de solución polimérica, esto es producido principalmente por el bajo voltaje aplicado y acelerada velocidad de flujo de la solución, lo cual propició que el chorro de la solución saliente de la punta de la aguja, no formara adecuadamente el cono de Taylor, por ello no existió una evaporación correcta del solvente y se generó la precipitación de la solución al plato colector.

En los experimentos 2, 3, 5, 7 se presentan nanofibras rotas. Para los experimentos 3, 5 y 7, donde el rompimiento de las nanofibras fue en mayor cantidad, el rompimiento pudo haber sido producido principalmente por la baja concentración de la solución polimérica (8 %), en conjunto con la baja velocidad de flujo (0.4 ml/h) establecida, esto se presenta en el proceso de tensión de la punta de la aguja y conversión de la gota de solución en una nanofibra. Si la velocidad de flujo establecida, no es ajustada adecuadamente, la gota de solución al ser estirada mediante campo eléctrico aplicado, puede sufrir rompimiento del chorro, dando como resultado nanofibras rotas depositadas en el plato colector.

Para el experimento 2, donde las nanofibras rotas se presentaron en menor cantidad, el rompimiento pudo ser producido por la implementación de alta concentración de solución polimérica, la cual aportó la viscosidad necesaria para que el chorro de solución no se rompiera.

Los experimentos 1 y 8 muestran una morfología similar, sin cuentas, ni nanofibras rotas. Esto puede ser obtenido debido a que se implementó la misma velocidad de flujo (0.8 ml / h) y voltaje aplicado (12 kV), y los otros factores seleccionados fueron bajos para el experimento 1 y altos para el experimento 8, es decir que en esas condiciones se logran obtener nanofibras con distribución homogénea y continuas, sin formación de cuentas.

Los tejidos obtenidos de ambos experimentos presentan un diámetro medio similar y físicamente, el tejido de ambos tienen morfología semejante, formando un entramado alineado y uniforme.

En el experimento 4 se puede apreciar una morfología similar a los experimentos 1 y 8, sin embargo en este sí se presenta formación de nanofibras rotas y otras más con pocas cuentas, esto es debido a que se estableció una concentración de solución polimérica alta (12 %) y una baja velocidad de flujo (0.4 ml/h), lo cual es corroborado en investigaciones realizadas por el grupo de Ki et al, (2005). (Ki, Baek et al. 2005).

De los histogramas de frecuencias analizados previamente, se puede deducir que muestran uniformidad en los diámetros medio obtenidos. Para los experimentos donde se implementó una concentración alta (12 %) se obtuvieron diámetros medio cercanos a los 200 nm y para los experimentos de concentración baja, se obtuvieron diámetros medio aproximados a los 100 nm.

Con este resultado podemos corroborar que la concentración de la solución polimérica está relacionada directamente a la uniformidad y el diámetro de las nanofibras obtenidas. Así mismo, fue posible observar que tanto la velocidad de flujo como el voltaje tienen un efecto importante en la formación de las nanofibras.

6.2 Análisis de cuantificación de gentamicina y diclofenaco mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes a las soluciones comerciales de los fármacos, para la identificación de diclofenaco se estableció una longitud de onda de 254 nm.

El cromatograma (Figura 31) permitió observar la presencia de 4 señales, con tiempos de retención de 5.122, 5.762, 6.569 y 8.139 min, la presencia de estas 4 señales se deriva de que la solución comercial no sólo tiene al fármaco, sino que también incluye una solución inyectable de formulación desconocida. La identificación del pico correspondiente al diclofenaco deberá realizarse con un estándar en pruebas futuras.

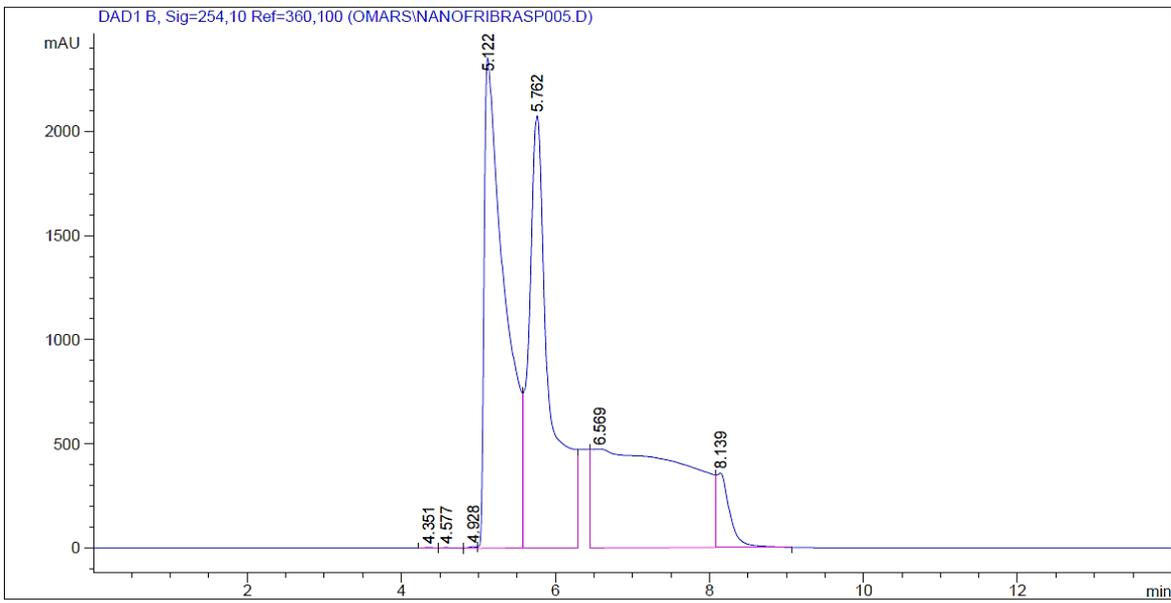


Figura 31. Cromatograma correspondiente al diclofenaco (solución comercial).

Por su parte, la gentamicina fue estudiada a una longitud de onda de 280 nm, el cromatograma obtenido presentó una señal principal con un tiempo de retención de 2.170 min, la cuál se consideró correspondiente al fármaco, sin embargo, deberá corroborarse en pruebas futuras con un estándar.

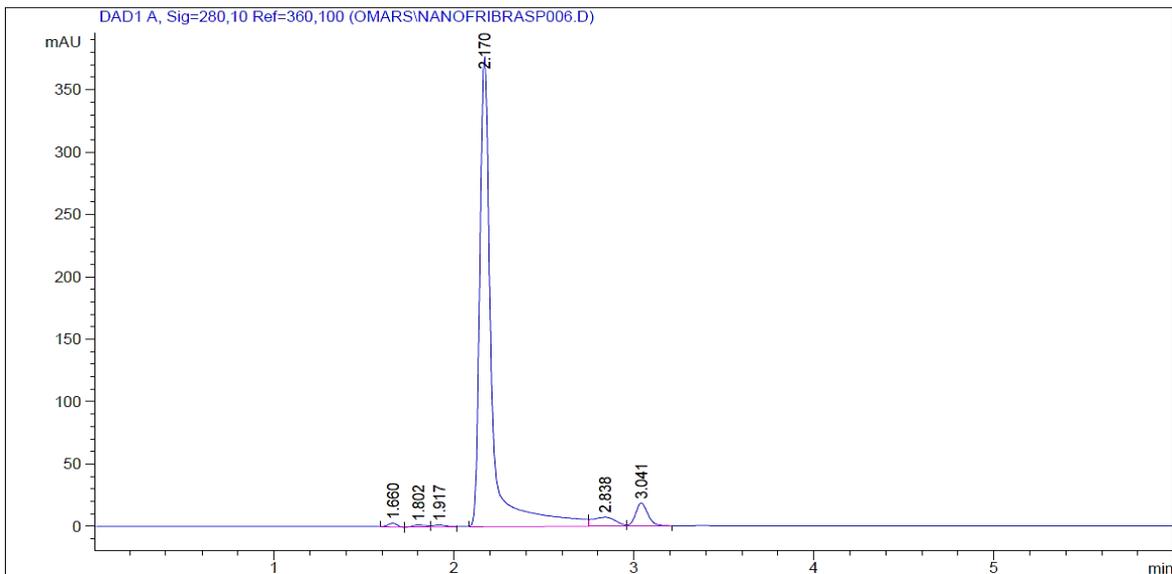


Figura 32. Cromatograma correspondiente a la gentamicina (solución comercial).

Las nanofibras obtenidas bajo las condiciones descritas en el experimento 8 de la tabla 2, fueron estudiadas por HPLC, se obtuvieron los cromatogramas a longitudes de onda de 254, 280 y 290 nm, para diclofenaco, gentamicina y PVA, respectivamente. Los tres componentes principales de las nanofibras presentaron un tiempo de retención igual a 3.106 min, lo que indica que dichos componentes están interactuando conjuntamente, por lo que se desplazaron en la columna al mismo tiempo, fenómeno evidenciado por la modificación de los tiempos de retención obtenidos para los fármacos solos. Con estos resultados fue posible corroborar la incorporación de los fármacos en las nanofibras.

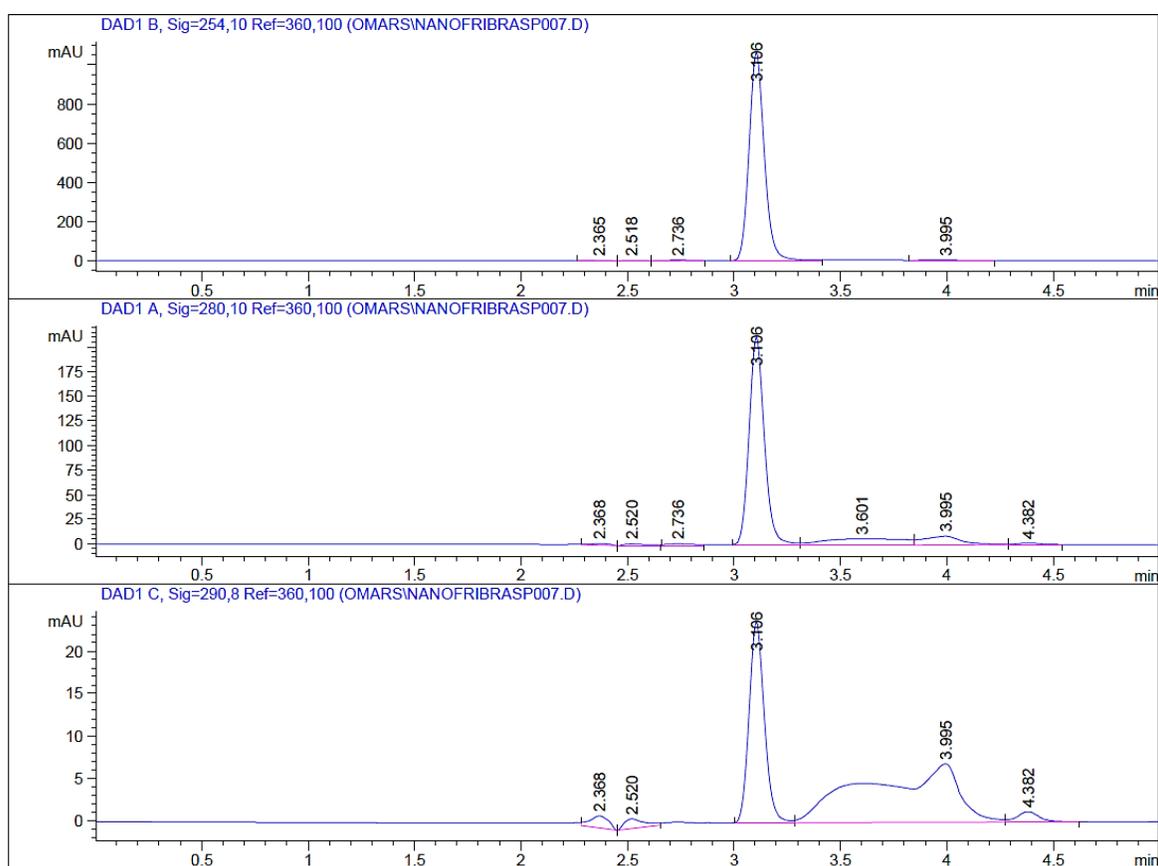


Figura 33. Cromatograma de la muestra de nanofibras de PVA con gentamicina y diclofenaco correspondiente al experimento 8.

6.3. Pruebas de actividad biológica

6.3.1 Halos de inhibición del apósito de nanofibras de PVA con gentamicina y diclofenaco

La muestra obtenida bajo las condiciones establecidas en el diseño experimental para el experimento 8 (ver tabla 2) fue evaluada para determinar su actividad antimicrobiana *in vitro* mediante una prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar, utilizando para ello dos cepas microbianas: *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, se emplearon tres controles, dos positivos (cloranfenicol 30 µg y gentamicina 30 µg) y uno negativo (solución salina). La prueba se mantuvo durante 24, 48 y 72 h, transcurrido el tiempo, se determinó el diámetro de los halos de inhibición obtenidos en cada prueba.

6.3.1.1 *Bacillus subtilis*

El ensayo en *Bacillus subtilis* a 24 h de incubación (Figura 34) permitió observar que la prueba con solución salina no presentó inhibición del crecimiento bacteriano, mientras que el control de cloranfenicol mostró un halo de inhibición intermedio, sin embargo se observa que existe población bacteriana moderada sobre el halo, por lo cuál, la inhibición no fue completamente efectiva.

Por su parte, el control de gentamicina presentó un halo sensible de inhibición con una circunferencia bien delimitada con respecto al cultivo bacteriano, siendo más efectiva para inhibir el crecimiento bacteriano, en comparación con el cloranfenicol.

Finalmente, la muestra de nanofibras con gentamicina y diclofenaco embebidos presentó un halo de inhibición sensible bien delimitado, con un diámetro ligeramente menor al obtenido para la prueba de gentamicina, sin embargo, el contenido de gentamicina en la muestra de la nanofibra (4.75 µg) fue aproximadamente 6 veces menor que la dosis presente en el sensidisco de gentamicina (30 µg) utilizado como control.

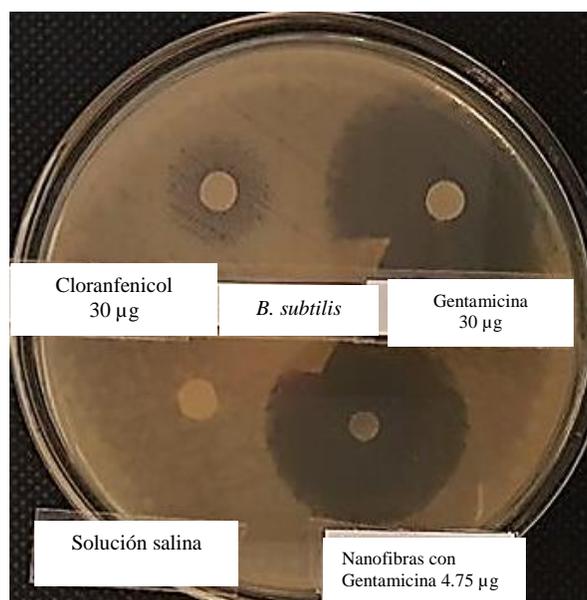


Figura 34. Halos de inhibición con la cepa *Bacillus subtilis* a 24 h de incubación.

El cultivo bacteriano de *B. subtilis* obtenido a 72 h de incubación (Figura 35), presenta los sensibilizados con los halos de inhibición de los controles (cloranfenicol (30µg), gentamicina (30µg) y solución salina), así como el disco de la muestra de nanofibras con gentamicina y diclofenaco. El halo de inhibición correspondiente a cloranfenicol se presenta intermedio, con colonias bacterianas dentro del halo de inhibición, además como se puede observar en la tabla 4, el halo de inhibición se redujo considerablemente, esto quiere decir, que la cepa bacteriana presenta resistencia al fármaco (cloranfenicol).

El halo de inhibición presentado por el control de gentamicina, se muestra sensible. También, dentro del borde que delimita el halo y el cultivo bacteriano, se observan colonias de bacterias a las 72 h, sin embargo, el halo de inhibición aumentó en diámetro, al ser comparado con el mismo halo, a 24 h de incubación. Esto quiere decir que el fármaco, transcurrido un tiempo estimado de 72 horas después de haber sido colocado en el cultivo bacteriano, presenta una adecuada efectividad, frente a la cepa bacteriana.

El control de solución salina, continuó sin presencia de inhibición del crecimiento bacteriano, mientras que el halo de inhibición generado por la muestra de las nanofibras de PVA con

gentamicina y diclofenaco, presenta una respuesta de inhibición sensible, debido a que existe un aumento en el diámetro del halo generado a 72 h de incubación, lo que indica que la gentamicina existente en las nanofibras, presenta una adecuada efectividad frente al cultivo bacteriano, a las 72 h de incubación. Al igual que en el disco de gentamicina, cerca del borde del halo se observan zonas con crecimiento de colonias bacterias.

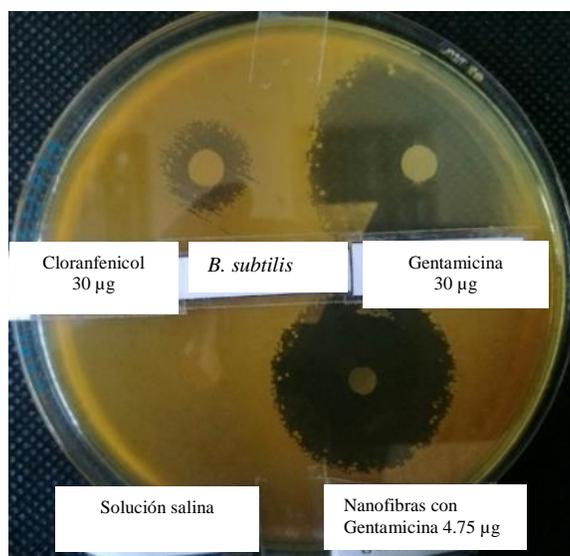


Figura 35. Halos de inhibición en el cultivo de *Bacillus subtilis* a 72 h de incubación.

La tabla 4, presenta los diámetros de los halos de inhibición del cultivo de *Bacillus subtilis* a 24, 48 y 72 horas de incubación.

Tabla 4. Mediciones de los halos de inhibición en la caja Petri con la cepa *bacillus subtilis*.

	Horas	Cloranfenicol (30 ug/mm ²)	Gentamicina (30 ug)	Solución Salina	Nanofibras (4.75 ug gentamicina)
<i>Bacillus subtilis</i>	24	20 mm	34 mm	0 mm	32 mm
	48	19 mm	44.6 mm	0 mm	36 mm
	72	16.4 mm	42.1 mm	0 mm	33 mm

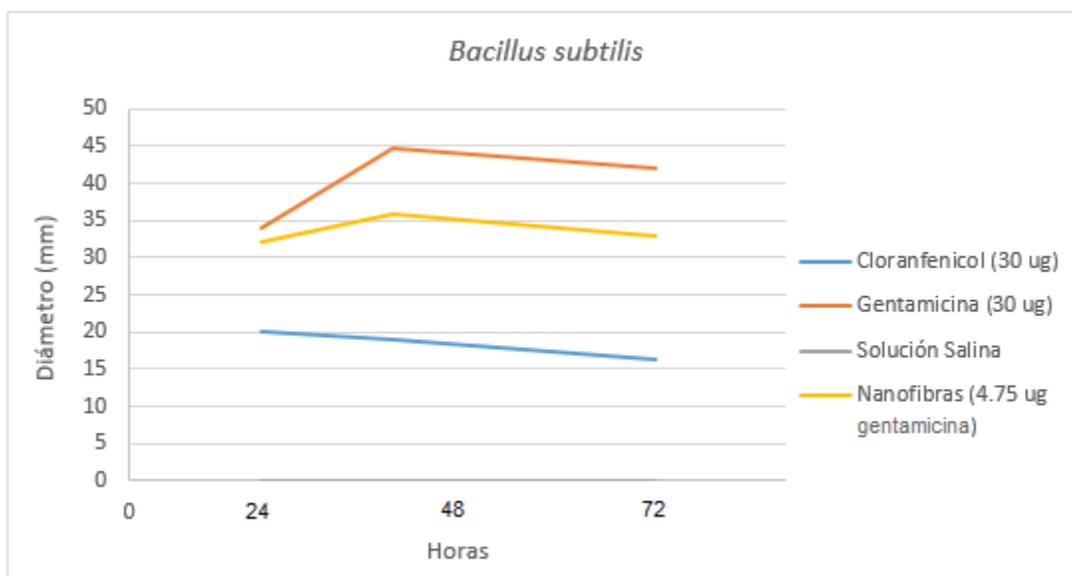


Figura 36. Diámetro de los halos de inhibición correspondientes a la cepa *Bacillus subtilis* a 24, 48 y 72 h.

En la Figura 36 se observan los halos de inhibición, a 24, 48 y 72 h, de la muestra de nanofibras de PVA con gentamicina y diclofenaco, así como los halos de inhibición de cloranfenicol y gentamicina en *B. subtilis*. Se puede observar que para el control de gentamicina y la muestra de nanofibras con gentamicina se presenta un diámetro máximo en ambos halos a 48 horas de inhibición. El halo del control gentamicina y de las nanofibras con gentamicina y diclofenaco, muestran diferentes diámetros, sin embargo, se comportan de la misma forma, incrementando el halo de inhibición a 48 horas y después reduciendo moderadamente el halo a 72 horas, es importante destacar que la dosis de gentamicina aplicada en las nanofibras fue de aproximadamente 1/6, en relación con su control de gentamicina aplicada en el sensidisco.

6.3.1.2 *Escherichia coli*

Para el ensayo en *Escherichia coli* a 24 h de incubación (Figura 37) se puede observar que los discos de cloranfenicol y solución salina no presentaron inhibición del crecimiento bacteriano. El disco de gentamicina presentó un halo de inhibición sensible, el cual tiene una circunferencia bien delimitada con respecto a la cepa bacteriana.

El halo de la gentamicina muestra mayor efectividad para inhibir el crecimiento bacteriano, en comparación con la muestra de las nanofibras con gentamicina y diclofenaco, de acuerdo al halo de inhibición obtenido, sin embargo, la dosis de gentamicina aplicada en las nanofibras fue de aproximadamente $\frac{1}{4}$, respecto a su control de gentamicina aplicada en el sensidisco (8.55 μg y 30 μg , respectivamente), la muestra de nanofibras con gentamicina y diclofenaco embebidos presentó un halo de inhibición sensible bien delimitado.

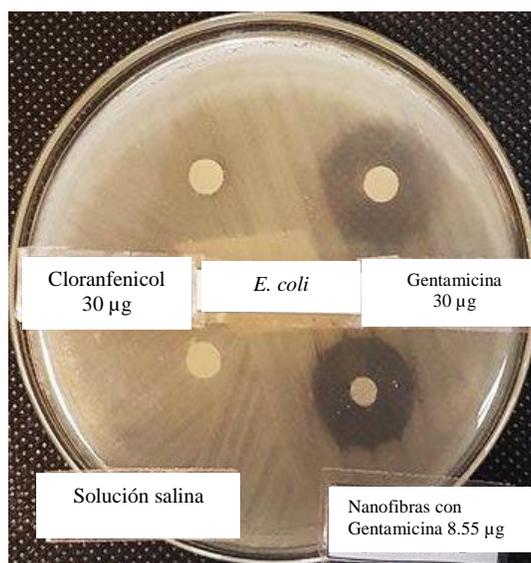


Figura 37. Halos de inhibición con la cepa *Escherichia coli* a 24 h de incubación.

El cultivo bacteriano de *E. coli* a 72 h de incubación (Figura 37), presenta los sensidiscos con los halos de inhibición de los controles (cloranfenicol (30 μg), gentamicina (30 μg) y solución salina) y el disco de las nanofibras con gentamicina (8.55 μg) y diclofenaco.

El disco de gentamicina presenta un halo de inhibición reducido (Tabla 5) en comparación con el halo obtenido a 24 h de incubación, sin embargo, permaneció siendo sensible, con poca formación de colonias de bacterias sobre el borde del halo de inhibición.

La muestra de las nanofibras con gentamicina y diclofenaco presenta un diámetro ligeramente menor a 72 h, con respecto al halo de inhibición a 24 h. Sin embargo, el halo de las nanofibras, obtenido a 72 h, se presenta sensible.

Los sensidiscos de los controles (cloranfenicol y solución salina) no presentaron efectividad inhibitoria en el cultivo bacteriano (*E. coli*) a 72 h.

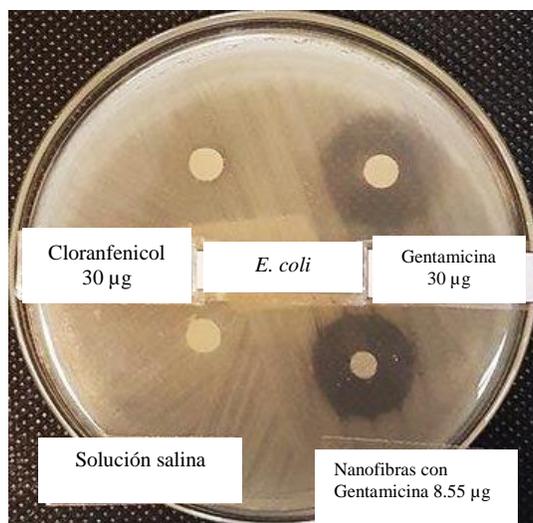


Figura 38. Halos de inhibición sobre la cepa *Escherichia coli* a 72 h de incubación.

En la Tabla 5, se muestran los diámetros de los halos de inhibición en el cultivo bacteriano de *E.coli* representado a 24, 48 y 72 horas de incubación.

Tabla 5. Mediciones de los halos de inhibición en la caja Petri con la cepa *Escherichia coli*.

	Horas	Cloranfenicol (30 ug)	Gentamicina (30 ug)	Solución Salina	Nanofibras (8.55 ug gentamicina)
<i>Escherichia coli</i>	24	0 mm	22 mm	0 mm	20 mm
	48	0 mm	23.6 mm	0 mm	20.2 mm
	72	0 mm	22.6 mm	0 mm	19.5 mm

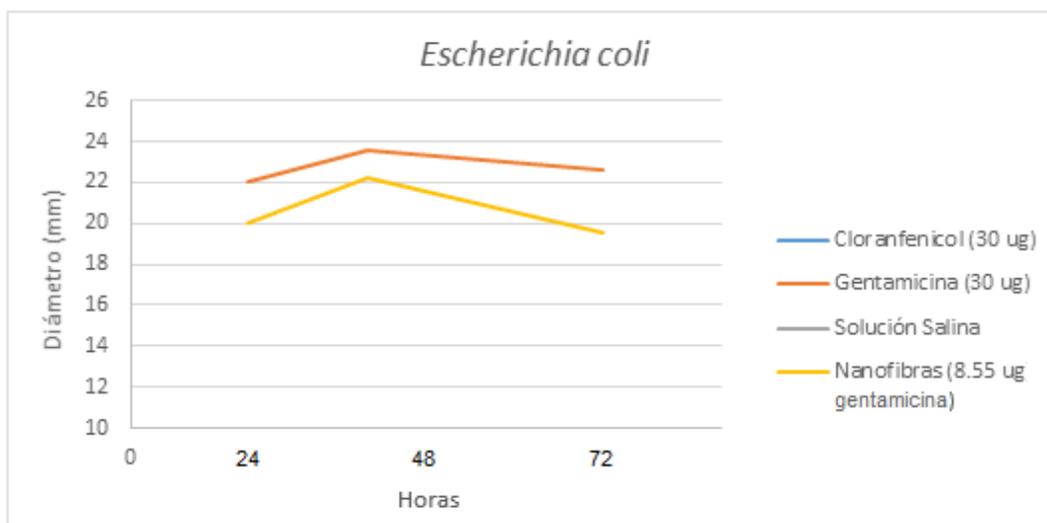


Figura 39. Diámetros del halo de inhibición de la cepa *Escherichia coli* a 24, 48 y 72 h.

En la Figura 39 se observa un incremento de diámetro para los discos de gentamicina y de la muestra de nanofibras con gentamicina y diclofenaco a 40 horas de incubación aproximadamente, sin embargo el halo de mayor diámetro fue el presentado por el disco con el control gentamicina. La cantidad de gentamicina contenida en el sensidisco fue de (30 μg) y la cantidad de gentamicina presente en las nanofibras fue de (8.55 μg). Con ello se puede hacer una comparación en la cual, se empleó una cantidad de fármaco 4 veces mayor, en el disco del control gentamicina que en la muestra de las nanofibras, por lo que la diferencia en el diámetro del halo de inhibición no significa una mejor actividad del fármaco libre.

En la tabla 5 se puede observar que el diámetro del halo de inhibición correspondiente al control gentamicina, no varió en gran proporción de 24 h con respecto a 72 h de incubación. Lo mismo sucede en el halo formado por la muestra de nanofibras de gentamicina y diclofenaco.

CONCLUSIONES

Para el desarrollo del apósito de nanofibras de PVA, se obtuvieron fibras lineales, con un diámetro medio de 230 nm.

El apósito, no presentó fibras rotas, además gracias a la adición de un agente surfactante, se pudieron obtener nanofibras lisas y un tejido uniforme.

El diseño experimental factorial fraccionado 2^{5-2} , muestra que se obtuvieron tres factores significativos para determinar el diámetro de las nanofibras, los cuales fueron: concentración de la solución polimérica, voltaje aplicado y velocidad de flujo y la interacción de la concentración de diclofenaco y gentamicina, así como la interacción de la concentración de diclofenaco con la velocidad de flujo aplicada.

Los factores concentración del analgésico y concentración del antibiótico no presentaron significancia sobre la respuesta.

Los experimentos obtenidos por el diseño mostraron apósitos de nanofibras con diámetros que van desde de 80 a 210 nm.

Los ensayos de HPLC mostraron que los tres componentes principales de las nanofibras (gentamicina, diclofenaco y PVA) interactúan estrechamente en las nanofibras, al presentar un tiempo de retención igual a 3.106 min, para los tres casos.

Las nanofibras con los fármacos embebidos indujeron inhibición del crecimiento bacteriano en el ensayo de difusión en agar a 24, 48 y 72 h en cultivos de *B. subtilis* y *E. coli*, lo que indica que el apósito obtenido es un candidato para el tratamiento de infecciones generadas en lesiones cutáneas.

REFERENCIAS

- Agarwal, S., J. H. Wendorff, et al. (2008). "Use of electrospinning technique for biomedical applications." Polymer **49**(26): 5603-5621.
- Ahuja, S. and H. Rasmussen (2011). HPLC method development for pharmaceuticals, Academic Press.
- Akduman, C., I. Özgüney, et al. (2016). "Preparation and characterization of naproxen-loaded electrospun thermoplastic polyurethane nanofibers as a drug delivery system." Materials Science and Engineering: C **64**: 383-390.
- Andrady, A. L. (2008). Science and technology of polymer nanofibers, John Wiley & Sons.
- Anton, F. (1940). Artificial thread and method of producing same, Google Patents.
- Bai, G., J. Wang, et al. (2001). "Thermodynamics of molecular self-assembly of cationic gemini and related double chain surfactants in aqueous solution." The Journal of Physical Chemistry B **105**(15): 3105-3108.
- Ballarin, F. M., P. R. C. Tornello, et al. (2015). "Nanofibras electrohiladas para usos terapéuticos." Parte: <http://hdl.handle.net/10316.2/36860>.
- Baumgarten, P. K. (1971). "Electrostatic spinning of acrylic microfibers." Journal of colloid and interface science **36**(1): 71-79.
- Boateng, J. S., K. H. Matthews, et al. (2008). "Wound healing dressings and drug delivery systems: a review." Journal of pharmaceutical sciences **97**(8): 2892-2923.
- Bognitzki, M., W. Czado, et al. (2001). "Nanostructured fibers via electrospinning." Advanced Materials **13**(1): 70-72.
- Boland, E. D., G. E. Wnek, et al. (2001). "Tailoring tissue engineering scaffolds using electrostatic processing techniques: a study of poly (glycolic acid) electrospinning." Journal of Macromolecular Science, Part A **38**(12): 1231-1243.
- Bosworth, L. and S. Downes Electrospinning for Tissue Regeneration. 2011, Cambridge: Woodhead Publishing.
- Böttcher-Haberzeth, S., T. Biedermann, et al. (2010). "Tissue engineering of skin." Burns **36**(4): 450-460.
- Buchko, C. J., L. C. Chen, et al. (1999). "Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films." Polymer **40**(26): 7397-7407.

Burkitt, H., B. Young, et al. (1993). *Histología Funcional. Texto y Atlas en color*, WHEATER). Editorial Churchill Livingstone.

Caracciolo, P. C., P. C. R. Tornello, et al. (2013). "Development of electrospun nanofibers for biomedical applications: state of the art in Latin America." Journal of Biomaterials and Tissue Engineering **3**(1): 39-60.

Cetin, M., A. Atila, et al. (2010). "Formulation and in vitro characterization of Eudragit® L100 and Eudragit® L100-PLGA nanoparticles containing diclofenac sodium." Aaps Pharmscitech **11**(3): 1250-1256.

Chen, D. W., Y.-H. Hsu, et al. (2012). "Sustainable release of vancomycin, gentamicin and lidocaine from novel electrospun sandwich-structured PLGA/collagen nanofibrous membranes." International journal of pharmaceutics **430**(1): 335-341.

Chim, H., B. H. Tan, et al. (2007). "Five-year review of infections in a burn intensive care unit: high incidence of *Acinetobacter baumannii* in a tropical climate." Burns **33**(8): 1008-1014.

Chong, E., T. Phan, et al. (2007). "Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution." Acta biomaterialia **3**(3): 321-330.

Church, D., S. Elsayed, et al. (2006). "Burn wound infections." Clinical microbiology reviews **19**(2): 403-434.

Deitzel, J., J. Kleinmeyer, et al. (2001). "Controlled deposition of electrospun poly (ethylene oxide) fibers." Polymer **42**(19): 8163-8170.

Deitzel, J. M., J. Kleinmeyer, et al. (2001). "The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles." Polymer **42**(1): 261-272.

Demir, M. M., I. Yilgor, et al. (2002). "Electrospinning of polyurethane fibers." Polymer **43**(11): 3303-3309.

Doshi, J. and D. H. Reneker (1995). "Electrospinning process and applications of electrospun fibers." Journal of electrostatics **35**(2-3): 151-160.

Elsner, J. J., I. Berdicevsky, et al. (2011). "In vitro microbial inhibition and cellular response to novel biodegradable composite wound dressings with controlled release of antibiotics." Acta biomaterialia **7**(1): 325-336.

Elsner, J. J., D. Egozi, et al. (2011). "Novel biodegradable composite wound dressings with controlled release of antibiotics: Results in a guinea pig burn model." Burns **37**(5): 896-904.

Elsner, J. J., A. Shefy-Peleg, et al. (2010). "Novel biodegradable composite wound dressings with controlled release of antibiotics: microstructure, mechanical and physical properties." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **93**(2): 425-435.

Elsner, J. J. and M. Zilberman (2009). "Antibiotic-eluting bioresorbable composite fibers for wound healing applications: microstructure, drug delivery and mechanical properties." Acta biomaterialia **5**(8): 2872-2883.

Ettre, L. and K. Sakodinskii (1993). "MS Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899–1903)." Chromatographia **35**(3): 223-231.

Feng, C., K. Khulbe, et al. (2010). "Recent progress in the preparation, characterization, and applications of nanofibers and nanofiber membranes via electrospinning/interfacial polymerization." Journal of Applied Polymer Science **115**(2): 756-776.

Fong, H., I. Chun, et al. (1999). "Beaded nanofibers formed during electrospinning." Polymer **40**(16): 4585-4592.

Formhals, A. (1934). "US Patent 1975504." US Pat **1975504**.

Franco, E., S. Delvasto, et al. (2009). "Caracterización del haz proyectado en el proceso de electrohilado de PVA." Suplemento de la Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, S1 **3**: 1097-1103.

Frenot, A. and I. S. Chronakis (2003). "Polymer nanofibers assembled by electrospinning." Current opinion in colloid & interface science **8**(1): 64-75.

Gamboa, W., O. Mantilla, et al. (2007). PRODUCCIÓN DE MICRO Y NANO FIBRAS A PARTIR DE LA TÉCNICA "ELECTROSPINNING" PARA APLICACIONES FARMACOLÓGICAS. Memorias del VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería.

Garg, K. and G. L. Bowlin (2011). "Electrospinning jets and nanofibrous structures." Biomicrofluidics **5**(1): 013403.

Gilman, A., T. Ralf, et al. (1991). "The pharmacological basis of therapeutics: Volume IB." Maxwell Publishing Corporation **669**: b15.

Gimenez, V., A. Mantecon, et al. (1996). "Modification of poly (vinyl alcohol) with acid chlorides and crosslinking with difunctional hardeners." Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry **34**(6): 925-934.

Gohel, M. and A. F. Amin (1998). "Formulation optimization of controlled release diclofenac sodium microspheres using factorial design." Journal of Controlled Release **51**(2): 115-122.

Gómez Álvarez, C. A., A. L. Leal Castro, et al. (2005). "Mecanismos de resistencia en Pseudomonas aeruginosa: entendiendo a un peligroso enemigo." Revista de la Facultad de Medicina **53**(1): 27-34.

Grafe, T. and K. Graham (2003). "Polymeric nanofibers and nanofiber webs: a new class of nonwovens." Nonwoven Technol Rev **12**: 51-55.

Greiner, A., J. Wendorff, et al. (2006). "Biohybrid nanosystems with polymer nanofibers and nanotubes." Applied microbiology and biotechnology **71**(4): 387-393.

Hartgerink, J. D., E. Beniash, et al. (2001). "Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers." Science **294**(5547): 1684-1688.

Hayati, I., A. Bailey, et al. (1987). "Investigations into the mechanisms of electrohydrodynamic spraying of liquids: I. Effect of electric field and the environment on pendant drops and factors affecting the formation of stable jets and atomization." Journal of colloid and interface science **117**(1): 205-221.

Heunis, T. and L. Dicks (2010). "Nanofibers offer alternative ways to the treatment of skin infections." BioMed Research International **2010**.

Hohman, M. M., M. Shin, et al. (2001). "Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory." Physics of fluids **13**(8): 2201-2220.

Hsu, C. M. and S. Shivkumar (2004). "N, N-Dimethylformamide Additions to the Solution for the Electrospinning of Poly (ϵ -caprolactone) Nanofibers." Macromolecular Materials and Engineering **289**(4): 334-340.

Hu, X., S. Liu, et al. (2014). "Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications." Journal of Controlled Release **185**: 12-21.

Huang, Z.-M., Y.-Z. Zhang, et al. (2003). "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites." Composites science and technology **63**(15): 2223-2253.

Hurler, J., O. A. Berg, et al. (2012). "Improved burns therapy: Liposomes-in-hydrogel delivery system for mupirocin." Journal of pharmaceutical sciences **101**(10): 3906-3915.

Jalili, R., S. A. Hosseini, et al. (2005). "The effects of operating parameters on the morphology of electrospun polyacrylonitrile nanofibres." Iranian Polymer Journal **14**(12): 1074.

Karuppuswamy, P., J. R. Venugopal, et al. (2015). "Polycaprolactone nanofibers for the controlled release of tetracycline hydrochloride." Materials Letters **141**: 180-186.

Katti, D. S., K. W. Robinson, et al. (2004). "Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **70**(2): 286-296.

Kelleher, C. M. and J. P. Vacanti (2010). "Engineering extracellular matrix through nanotechnology." Journal of The Royal Society Interface: rsif20100345.

Kenawy, E.-R., F. I. Abdel-Hay, et al. (2007). "Controlled release of ketoprofen from electrospun poly (vinyl alcohol) nanofibers." Materials Science and Engineering: A **459**(1): 390-396.

Kenawy, E.-R., G. L. Bowlin, et al. (2002). "Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly (ethylene-co-vinylacetate), poly (lactic acid), and a blend." Journal of Controlled Release **81**(1): 57-64.

Ki, C. S., D. H. Baek, et al. (2005). "Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution." Polymer **46**(14): 5094-5102.

Kidoaki, S., I. K. Kwon, et al. (2006). "Structural features and mechanical properties of in situ-bonded meshes of segmented polyurethane electrospun from mixed solvents." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **76**(1): 219-229.

Kim, K., Y. K. Luu, et al. (2004). "Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly (lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds." Journal of Controlled Release **98**(1): 47-56.

Koneman, E. W., S. D. Allen, et al. (1985). "Diagnostic microbiology." Ed. Médica Panamericana, Mexico.

Kovács, E., T. Savopol, et al. (2012). "Interaction of gentamicin polycation with model and cell membranes." Bioelectrochemistry **87**: 230-235.

Kumbar, S. G., L. S. Nair, et al. (2006). "Polymeric nanofibers as novel carriers for the delivery of therapeutic molecules." Journal of nanoscience and nanotechnology **6**(9-1): 2591-2607.

Lan, Y., W. Li, et al. (2014). "Therapeutic efficacy of antibiotic-loaded gelatin microsphere/silk fibroin scaffolds in infected full-thickness burns." Acta biomaterialia **10**(7): 3167-3176.

León-Fernández, V., J. Rieumont-Briones, et al. (2014). "Mecanismo de liberación de diclofenaco a partir de un copolímero entérico base celulosa." Revista CENIC Ciencias Químicas **45**: 90-95.

Leung, V. and F. Ko (2011). "Biomedical applications of nanofibers." Polymers for Advanced Technologies **22**(3): 350-365.

Li, D. and Y. Xia (2004). "Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel?" Advanced materials **16**(14): 1151-1170.

Li, Y., Y.-Z. Liu, et al. (2013). "Mesoporous bioactive glass as a drug delivery system: fabrication, bactericidal properties and biocompatibility." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **24**(8): 1951-1961.

Liang, D., B. S. Hsiao, et al. (2007). "Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications." Advanced drug delivery reviews **59**(14): 1392-1412.

Liu, G., J. Ding, et al. (1999). "Polystyrene-block-poly (2-cinnamoyl ethyl methacrylate) Nanofibers—Preparation, Characterization, and Liquid Crystalline Properties." Chemistry—A European Journal **5**(9): 2740-2749.

Liu, J., A. Kim, et al. (1996). "Self-assembly in the synthesis of ceramic materials and composites." Advances in colloid and interface science **69**(1-3): 131-180.

Ma, P. X. and R. Zhang (1999). "Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix."

Macri, L. and R. Clark (2009). "Tissue engineering for cutaneous wounds: selecting the proper time and space for growth factors, cells and the extracellular matrix." Skin pharmacology and physiology **22**(2): 83-93.

Manzano, C., A. Landa, et al. "UN MÉTODO SIMPLE PARA LA MEDIDA DE HALOS DE DIFUSIÓN EN CULTIVOS BIOLÓGICOS."

Martin, C. R. (1996). "Membrane-based synthesis of nanomaterials." Chemistry of Materials **8**(8): 1739-1746.

Megelski, S., J. S. Stephens, et al. (2002). "Micro-and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers." Macromolecules **35**(22): 8456-8466.

Mohiti-Asli, M., B. Pourdeyhimi, et al. (2014). "Skin tissue engineering for the infected wound site: biodegradable PLA nanofibers and a novel approach for silver ion release evaluated in a 3D coculture system of keratinocytes and Staphylococcus aureus." Tissue Engineering Part C: Methods **20**(10): 790-797.

Moser, A., R. Stephan, et al. (2013). "Resistance profiles and genetic diversity of Escherichia coli strains isolated from acute bovine mastitis." Schweiz. Arch. Tierheilkd. **155**: 351-357.

Navarro Risueño, F., E. Miró Cardona, et al. (2002). "Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias." Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica **20**(5): 225-234.

Nikkola, L., J. Seppälä, et al. (2006). "Electrospun multifunctional diclofenac sodium releasing nanoscaffold." Journal of nanoscience and nanotechnology **6**(9-1): 3290-3295.

Ondarcuhu, T. and C. Joachim (1998). "Drawing a single nanofibre over hundreds of microns." EPL (Europhysics Letters) **42**(2): 215.

Parajón García, E. A., C. E. Parajón Silva, et al. (2011). Validación de la metodología analítica en la cuantificación de un paraaminofenol (Acetaminofen); en solución oral por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC o CLAR).

- Pawlik, A., M. Jarosz, et al. (2017). "Co-delivery of ibuprofen and gentamicin from nanoporous anodic titanium dioxide layers." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.
- Peppas, N. (1986). "Hydrogels of poly (vinyl alcohol) and its copolymers." Hydrogels in medicine and pharmacy **2**: 1-48.
- Peppas, N. A., J. Z. Hilt, et al. (2006). "Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology." Advanced materials **18**(11): 1345-1360.
- Pham, Q. P., U. Sharma, et al. (2006). "Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review." Tissue engineering **12**(5): 1197-1211.
- Puig Sanz, L. G. (1996). "En: Ferrándiz Foraster C, ed." Dermatología clínica. Madrid, Mosby/Doyma Libros: 225-232.
- Ramakrishna, S. (2005). An introduction to electrospinning and nanofibers, World Scientific.
- Rassner, G. (1999). Manual y atlas de dermatología, Elsevier España.
- Razzak, M., M. Zainuddin, et al. (1999). "RADIATION PREPARED HYDROGELS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS-The characterization of dressing component materials and radiation formation of PVA-PVP hydrogel." Radiation Physics and Chemistry **55**(2): 153-166.
- Reneker, D. H. and I. Chun (1996). "Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning." Nanotechnology **7**(3): 216.
- Reneker, D. H. and A. L. Yarin (2008). "Electrospinning jets and polymer nanofibers." Polymer **49**(10): 2387-2425.
- Roa, R., F. Las Heras, et al. (2011). "Contractura axilar por quemadura tratada con Integra®." Revista chilena de cirugía **63**(3): 276-279.
- Ruszczak, Z. and W. Friess (2003). "Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs." Advanced drug delivery reviews **55**(12): 1679-1698.
- Saavedra, J. S. (2000). Texto atlas de histología: biología celular y tisular, McGraw-Hill Interamericana.
- Sáez, V., E. Hernández, et al. (2003). "Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas." Revista Iberoamericana de Polímeros **4**(2): 111-122.
- Salem, D. (2001). In Structure Formation in Polymeric Fibers: Chapter: 6, Electrospinning and Formation of Nanofibers, Hanser Gardner Publications, Carl Hanser Verlag.
- Santucci, S., S. Gobara, et al. (2003). "Infections in a burn intensive care unit: experience of seven years." Journal of Hospital Infection **53**(1): 6-13.

Scales, B. S. and G. B. Huffnagle (2013). "The microbiome in wound repair and tissue fibrosis." The Journal of pathology **229**(2): 323-331.

Sena, M. M., Z. F. Chaudhry, et al. (2004). "Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression." Journal of pharmaceutical and biomedical analysis **36**(4): 743-749.

Shen, X., D. Yu, et al. (2011). "Electrospun diclofenac sodium loaded Eudragit® L 100-55 nanofibers for colon-targeted drug delivery." International journal of pharmaceutics **408**(1): 200-207.

Shin, Y., M. Hohman, et al. (2001). "Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities." Polymer **42**(25): 09955-09967.

Shuler, M. L. and F. Kargi *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, 2001, Prentice Hall.

Simons, H. L. (1966). *Process and apparatus for producing patterned non-woven fabrics*, Google Patents.

Sirc, J., S. Kubinova, et al. (2012). "Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous structures of various thicknesses." International journal of nanomedicine **7**: 5315-5325.

Sridhar, R., J. Venugopal, et al. (2011). "Electrospun nanofibers for pharmaceutical and medical applications." Journal of Drug Delivery Science and Technology **21**(6): 451-468.

Stefanides Sr, M., C. E. Copeland, et al. (1976). "In vitro penetration of topical antiseptics through eschar of burn patients." Annals of Surgery **183**(4): 358.

Subbiah, T., G. Bhat, et al. (2005). "Electrospinning of nanofibers." Journal of Applied Polymer Science **96**(2): 557-569.

Taylor, G. (1964). Disintegration of water drops in an electric field. Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, The Royal Society.

Taylor, G. (1969). Electrically driven jets. Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, The Royal Society.

Teo, E. Y., S.-Y. Ong, et al. (2011). "Polycaprolactone-based fused deposition modeled mesh for delivery of antibacterial agents to infected wounds." Biomaterials **32**(1): 279-287.

Thacharodi, D. and K. P. Rao (1995). "Development and in vitro evaluation of chitosan-based transdermal drug delivery systems for the controlled delivery of propranolol hydrochloride." Biomaterials **16**(2): 145-148.

Theron, A., E. Zussman, et al. (2001). "Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibres." Nanotechnology **12**(3): 384.

Todd, P. A. and E. M. Sorkin (1988). "Diclofenac sodium." Drugs **35**(3): 244-285.

Tuncay, M., S. Caliş, et al. (2000). "Diclofenac sodium incorporated PLGA (50: 50) microspheres: formulation considerations and in vitro/in vivo evaluation." International journal of pharmaceutics **195**(1): 179-188.

Vindenes, H. and R. Bjerknes (1995). "Microbial colonization of large wounds." Burns **21**(8): 575-579.

Warner, S. B., A. Buer, et al. (1998). "A fundamental investigation of the formation and properties of electrospun fibers." National textile center annual report: 83-90.

Whitesides, G. M. and B. Grzybowski (2002). "Self-assembly at all scales." Science **295**(5564): 2418-2421.

Yarin, A. L., S. Koombhongse, et al. (2001). "Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers." Journal of applied physics **90**(9): 4836-4846.

Yoo, H. S., T. G. Kim, et al. (2009). "Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery." Advanced drug delivery reviews **61**(12): 1033-1042.

Yu, K., T. Zhu, et al. (2017). "Incorporation of amoxicillin-loaded organic montmorillonite into poly (ester-urethane) urea nanofibers as a functional tissue engineering scaffold." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **151**: 314-323.

Zahedi, P., I. Rezaeian, et al. (2013). "Preparation and release properties of electrospun poly (vinyl alcohol)/poly (ϵ -caprolactone) hybrid nanofibers: Optimization of process parameters via D-optimal design method." Macromolecular Research **21**(6): 649-659.

Zhang, C., X. Yuan, et al. (2005). "Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats." European polymer journal **41**(3): 423-432.

Zilberman, M. and J. J. Elsner (2008). "Antibiotic-eluting medical devices for various applications." Journal of Controlled Release **130**(3): 202-215.

ANEXO 1

Resultados del diseño experimental (Software Design-Expert 10)

En este apartado se muestran los resultados del diseño experimental 2^{5-2} establecido para el desarrollo y obtención de nanofibras de PVA con gentamicina y diclofenaco embebidos. Las condiciones de implementación para la realización del diseño experimental, se puede observar en la tabla 2.

Term	Aliases	Stdized Effect	Sum of Squares	% Contribution
Intercept	ABD ACE			
A-Con. sol. polimérica	BD CE	43.50	3784.50	20.16
B-Con. analgésico	AD CDE	-11.50	264.50	1.41
C-Con. antibiótico	AE BDE	3.50	24.50	0.13
D-Voltaje	AB BCE	41.50	3444.50	18.35
E-Vel. flujo	AC BCD	46.50	4324.50	23.04
AB			Aliased	
AC			Aliased	
AD			Aliased	
AE			Aliased	
BC	DE ABE ACD	-28.50	1624.50	8.65
BD			Aliased	
BE	CD ABC ADE	-51.50	5304.50	28.26

Figura 40. Tabla de contribución de efectos principales e inteacciones.

En la Figura 40, se observa la contribución de los efectos principales, así como de las interacciones de dos factores. Se puede destacar la que los efectos principales que presentan mayor contribución son: la concentración de la solución polimérica, el voltaje aplicado y la velocidad de flujo, así como las interacciones de BxC y BxE.

También se puede observar que los efectos principales que no presentan una relevante contribución son: la concentración del analgésico (diclofenaco) y la concentración del antibiótico (gentamicina) por sí mismos.

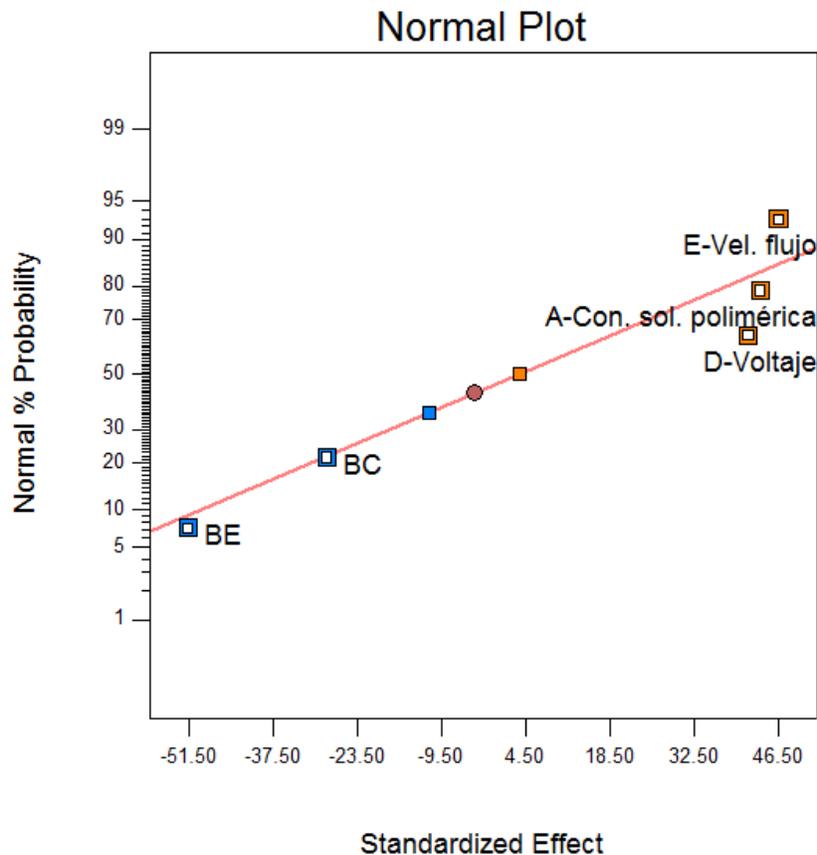


Figura 41. Grafica de probabilidad normal.

En la Figura 41 se puede observar la distribución de los efectos principales (concentración de la solución polimérica, voltaje y velocidad de flujo), los cuales se presentan fuera de la línea ajustada. En ésta gráfica se pueden comparar la magnitud y significancia estadística de los efectos principales y de interacción del diseño experimental. La línea ajustada indica donde se esperaría que se situaran los puntos si los efectos fueran cero.

La gráfica de probabilidad normal muestra los efectos negativos en el lado izquierdo de la gráfica y los efectos positivos en el lado derecho de la gráfica. En este caso, la gráfica de probabilidad normal muestra los efectos que tienen un efecto positivo significativo y que otros presentan efectos negativos significativos.

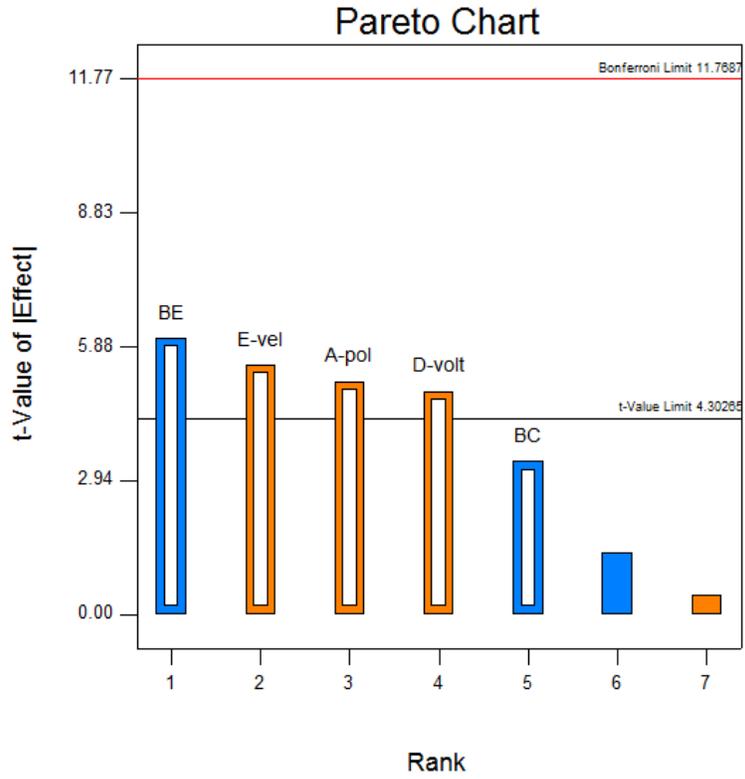


Figura 42. Grafica de Pareto.

El diagrama muestra el valor absoluto de los efectos y traza una línea de referencia en la gráfica. En la grafica podemos observar los efectos principales y las interacciones que muestran significancia.

Response	1	diametro				
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	18482.50	5	3696.50	25.58	0.0380	significant
<i>A-pol</i>	3784.50	1	3784.50	26.19	0.0361	
<i>D-volt</i>	3444.50	1	3444.50	23.84	0.0395	
<i>E-vel</i>	4324.50	1	4324.50	29.93	0.0318	
<i>BC</i>	1624.50	1	1624.50	11.24	0.0786	
<i>BE</i>	5304.50	1	5304.50	36.71	0.0262	
Residual	289.00	2	144.50			
Cor Total	18771.50	7				
Std. Dev.	12.02		R-Squared	0.9846		
Mean	138.25		Adj R-Squared	0.9461		
C.V. %	8.69		Pred R-Square	0.7537		
PRESS	4624.00		Adeq Precisor	12.151		
-2 Log Likelihood	51.40		BIC	63.88		
			AICc	147.40		

Figura 43. Analisis de varianza (ANOVA).

En la tabla del análisis de varianza, podemos observar que el modelo obtenido se presenta significativo.

Tambien muestra que los factores seleccionados en el diseño (A, D y E) y la interaccion BE presentan significancia, sin embargo, el valor de la interaccion BC, no presenta significancia.

Tambien se puede observar que el valor de R^2 es de 98%, eso quiere decir que los datos se ajustan adecuadamente al modelo.