



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“OBTENCIÓN DE NANOFIBRAS AXIALMENTE ORIENTADAS
PVA-TETRACICLINA MEDIANTE ELECTROHILADO *AIR GAP*
Y ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA MICROESTRUCTURA
EN LA LIBERACIÓN *IN VITRO*”

TESIS

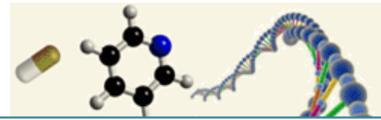
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:
JORGE ANDRÉS ORNELAS GUILLÉN

ASESORA DE TESIS:
DRA. JANETT BETZABE GONZÁLEZ CAMPOS

COASESORA:
DRA. ALEJANDRA PEREZ NAVA

MORELIA, MICHOCAN FEBRERO DEL 2022

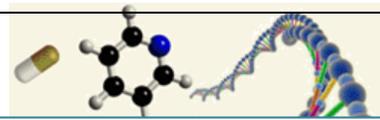


***“El pájaro rompe el cascarón.
El cascarón es el mundo.
Quien quiera nacer tiene que destruir un mundo”***

Hermann Hesse

***“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,
Y pensar lo que nadie más ha pensado.”***

Albert Szant-Gyorgyi



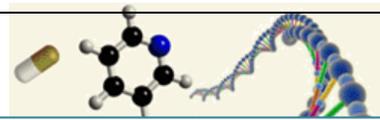
RESUMEN

Los nanomateriales han adquirido mucha atención para el desarrollo de sistemas novedosos de liberación de fármacos. Las nanofibras poseen características únicas, como alta flexibilidad, baja densidad y enorme porosidad, lo que puede superar la limitación de la dosificación convencional y representan una alternativa para desarrollar fórmulas farmacéuticas efectivas. El electrohilado es la técnica más utilizada y se ha demostrado que las nanofibras alineadas muestran una liberación más sostenida en comparación con las nanofibras aleatorias, lo que favorecería al desarrollo de fórmulas farmacéuticas de liberación prolongada y a disminuir los efectos secundarios relacionados.

Por otro lado, el alcohol polivinílico (PVA), es un polímero altamente electrohilable, biocompatible y biodegradable, por lo que las colecciones electrohiladas de PVA poseen características adecuadas para su uso como agente de liberación de fármacos. En el presente trabajo de tesis, se presenta la obtención de nanoestructuras conjugadas PVA-tetraciclina orientadas axialmente mediante el proceso de electrohilado *air gap*. Se estudia la influencia de la variación de los diferentes parámetros del electrohilado sobre la estructura generada y su calidad.

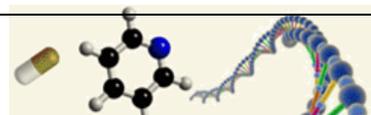
Se analiza la incorporación de tetraciclina a la mezcla a electrohilar, favoreciéndose con el uso de cosolventes. Este resulta también de gran relevancia para la obtención de nanofibras alineadas de PVA de buena calidad, para su estudio de la cinética de liberación del mismo, analizando la influencia e interrelación de la orientación de las nanofibras, monitoreada mediante espectroscopia UV-Vis.

También se analiza la influencia de la orientación de las nanofibras cargadas con tetraciclina sobre la inhibición del crecimiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, resultando ser un andamio adecuado.



La caracterización de las nanofibras PVA-tetraciclina incluye el análisis estructural y del grado de orientación mediante imágenes obtenidas por microscopia SEM, auxiliándose del software imageJ para determinar el grado de orientación, datos estadísticos y mapas de color por gradiente.

Palabras clave: Electrospinning; nanofibras poliméricas; andamios celulares, liberación de fármacos; air gap.



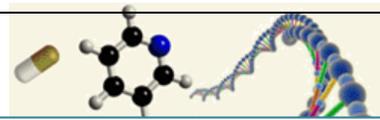
ABSTRACT

Nanomaterials have gained much attention for the development of novel drug delivery systems. Nanofibers possess unique characteristics, such as high flexibility, low density and enormous porosity, which can overcome the limitation of conventional dosing and represent an alternative to develop effective pharmaceutical formulations. Electrospinning is the most widely used technique and it has been shown that aligned nanofibers show more sustained release compared to random nanofibers, which would favor the development of extended release pharmaceutical formulations and decrease related side effects.

On the other hand, polyvinyl alcohol (PVA), is a highly electrospinnable, biocompatible and biodegradable polymer, so electrospun PVA collections possess suitable characteristics for use as a drug release agent. In the present thesis work, the obtaining of axially oriented PVA-tetracycline conjugated nanostructures by air gap electrospinning process is presented. The influence of the variation of the different electrospinning parameters on the generated structure and its quality is studied.

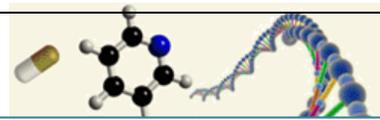
The incorporation of tetracycline to the electrospinning mixture, favored by the use of cosolvents, is analyzed. This is also of great relevance for obtaining good quality PVA aligned nanofibers, for its study of the release kinetics of the same, analyzing the influence and interrelation of the nanofibers orientation, monitored by UV-Vis spectroscopy.

The influence of the orientation of the tetracycline-loaded nanofibers on the growth inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains is also analyzed, proving to be a suitable scaffold.



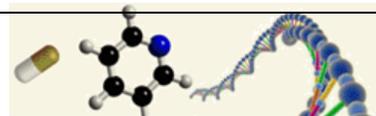
The characterization of the PVA-tetracycline nanofibers includes structural analysis and the degree of orientation by SEM microscopy images, using imageJ software to determine the degree of orientation, statistical data and gradient color maps.

Keywords: Electrospinning; polymeric nanofibers; cellular scaffolding; drug release; air gap.



La presente Tesis de Licenciatura fue realizada en el Laboratorio de Polímeros y Materiales del IIQB-UMSNH, con el beneficio de la beca No. 31206 del proyecto CONACyT-Ciencia Básica con clave A1-21845.

Los resultados de éste proyecto de investigación, fueron presentados en el 16° Congreso Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación el 22 de octubre del 2021.



AGRADECIMIENTOS

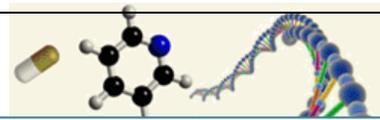
En primer lugar, agradezco a mi madre, gracias por toda la ayuda, en todas las formas y por todo el amor que me han entregado incondicionalmente. Por su infinito amor, cariño y confianza que me ha dado ánimo y fuerzas para levantarme una y otra vez, por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades y permitirme llegar a esta instancia el día de hoy. Gracias.

A mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

Agradecer a mis grandes amigos que conocí en la Universidad. Gracias por todo el apoyo que me dieron siempre y por acompañarme en todos los momentos de alegría y penas que hemos compartido; de los cuales he aprendido bastante y admiro su forma de ser. Gracias por su amistad, consejos y ayuda que de alguna manera me servirán en el presente y futuro. Todos ustedes son increíbles personas que hicieron de mi paso por la Universidad, una espléndida etapa de mi vida.

A la Dra. Alejandra Perez Nava, por tener la paciencia y disponibilidad, para impartir su conocimiento, por tantas horas de trabajo y sobre todo, por su dirección. Gracias por las numerosas sugerencias, por compartir su sabiduría, por su lectura crítica y constructiva del trabajo.

Un especial reconocimiento a la Dra. Janett Betzabe González Campos quien fue la persona que me dio un lugar en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas para elaborar este proyecto, que siempre me apoyó, me impulsó y me proporcionó las herramientas durante mi estancia en el Instituto, siempre buscando los recursos humanos y materiales necesarios y haciendo más de lo posible por este proyecto. No hay palabras suficientes para demostrar la gratitud que tengo hacia ella. Gracias por todo. Gracias siempre.

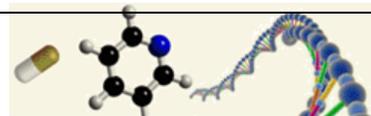


A mis sinodales, la D.C. Judith Araceli Aviña Verduzco, el D.C. Zurisaddai Hernández Gallegos, el M.C. Gabino Estevez Delgado, la M.C. Lorena Cabrera Navarro y la E.B.C. Virginia Campos Cabrera, por sus observaciones, por compartir su sabiduría y por su lectura crítica; sus excelentes aportaciones y críticas constructivas han contribuido de forma significativa a mejorar esta tesis.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, investigadores y personal no docente, por haber dispuesto sus instalaciones, apoyo y enseñanzas que siempre serán fructíferas. Gracias.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo con la beca otorgada para el desarrollo de esta tesis a través del proyecto A1-21845 “Producción De Nanofibras Compuestas De Biopolímeros Poco Electrohilables Empleando Disolventes No Convencionales” como soporte económico para la ejecución de este proyecto de investigación .

Agradezco de todo corazón a todas las personas que se cruzaron en este camino.



DEDICATORIA

Dedico esta tesis a toda mi familia. Por toda la ayuda, en todas las formas y por todo el amor que me han entregado incondicionalmente

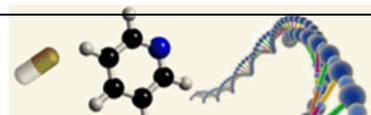
A mi madre, por sus sacrificios, comprensión y ayuda en momentos malos y buenos. Me ha enseñado a superar las adversidades sin perder nunca la motivación ni desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio. Por ser el pilar más importante.

A los Profesores, que me brindaron sus conocimientos y enseñanza a lo largo de mi vida académica. Sus lecciones de vida han sido muy valiosas en mi formación.

A mi pareja, a ella especialmente le dedico esta Tesis. Por su paciencia, por su comprensión, por su empeño, por su fuerza, por su amor, por ser tal y como es... porque la quiero. Es la persona que más directamente ha tenido las consecuencias del trabajo realizado. Realmente ella me llena por dentro para conseguir un equilibrio que me permita dar el máximo de mí. Nunca le podré estar suficientemente agradecido.

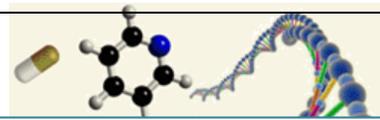
A mi segunda familia del Laboratorio San Jerónimo, sobre todo al Químico Jorge y a la química Sergia quienes me apoyaron cuando más lo necesitaba; por la oportunidad que me brindaron al incorporarme a su equipo de trabajo, inicialmente en prácticas profesionales y en lo posterior al trabajo diario. Todos me han guiado en estos años en mi aprendizaje personal y profesional. Porque en este proceso me han permitido estar en un sitio privilegiado donde he podido aprender y crecer profesionalmente.

A todos los que me hicieron posible llegar hasta aquí.

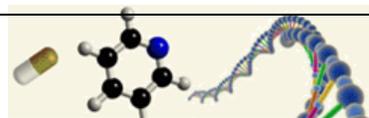


ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	4
ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1 LIBERACIÓN DE FÁRMACOS	9
2.2. ANTIBIÓTICOS.....	10
2.2.1 TETRACICLINAS.....	12
2.3 MICROESTRUCTURAS POLIMERICAS PARA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS	16
2.3.1 HIDROGELES	16
2.3.2 NANOFIBRAS.....	17
2.4 ELECTROHILADO.....	19
2.4.1 PARÁMETROS DE LA SOLUCIÓN DEL POLÍMERO.....	21
2.4.2 PARÁMETROS RELACIONADOS AL PROCESAMIENTO	24
2.4.3 APLICACIONES DE LAS NANOFIBRAS EN LA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS	28
2.4.4 ELECTROHILADO AIR GAP.....	32
2.5 ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA): CARACTERÍSTICAS, PROPIEDADES Y COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS EN FORMA DE NANOFIBRAS.....	34
3. JUSTIFICACIÓN.....	38
4. OBJETIVOS	39
5. HIPÓTESIS	40
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
6.1 MATERIALES E INSTRUMENTAL.....	41
6.2 METODOLOGÍA.....	45
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
7.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO POR EMISIÓN DE CAMPO.	50
7.2 CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE LA TTC.....	62
7.3 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	66
8. CONCLUSIONES	71

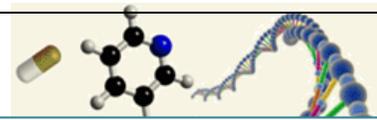


9. RECOMENDACIONES	73
10. BIBLIOGRAFÍA	74



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1.1. Clasificación de antibióticos según su mecanismo de acción. Modificado de [1].	12
Figura 1.2. Esquema del proceso de electrohilado.	20
Figura 1.3. Efecto de la viscosidad de las disoluciones poliméricas sobre la morfología de la nanofibras. Tomado de [30]	22
Figura 1.4. Morfología de las fibras con gotas en función de la viscosidad, para el PEO. a) 13 cp. b) 160 cp. c) 527 cp. d) 1835 cp. Tomado de [31]	23
Figura 1.5 Regímenes para varias morfologías observadas en el PVA. I) Gotas. II) Nanofibras con perlas. III) Nanofibras. IV) Listones. Tomado de [32]	23
Figura 1.6. Efecto de la velocidad de alimentación en la morfología de las nanofibras de policaprolactona. a) 0.5 ml/h. b) 2 ml/h. Tomada de [25]	25
Figura 1.7. Nanofibras de Nylon 6,6 a a) 2 cm de distancia. b) 0.5 cm de distancia. Tomada de [25].	25
Figura 1.8. Aplicaciones potenciales de las nanofibras de polímeros generadas por electrospinning.	28
Figura 1.9 A. Disposición de electrodos paralelos. B. Disposición del campo eléctrico. Tomada de [46] C. Colector air gap empleado en este trabajo.	33
Figura 1.10. Preparación por hidrolisis parcial o total de acetato de polivinilo para eliminar los grupos acetato y producir PVA.	34
Figura 6.1. Equipo de electrohilado Naobond Technologies®.	42
Figura 6.2. a) Fuente de tensión de alto voltaje vista anterior y b) Bomba de inyección	42
Figura 6.3. Jeringas utilizadas de acuerdo a su capacidad.	43
Figura 6.4. Mangueras de plástico a) portaflujo y b) cubierta.c) Aguja simple.	43



9. Figura 7.1. Colección de nanofibras de PVA e histograma de distribución de diámetro.	50
Figura 7.2. Microestructura de las nanofibras producidas mediante electrohilado convencional de disoluciones acuosas de PVA 10% p/v/CSS en proporción 1:6 para A) Acetona B) Metanol, C) Isopropanol y D) Etanol.	52
Figura 7.3. Distribución del diámetro de las nanofibras empleando los diferentes co-disolventes. Nota: el disolvente se indica en la leyenda del gráfico.	54
Figura 7.4. Colección de nanofibras de PVA, PVAEtOH y del material PVA-TTC 10:2.	56
Figura 7.5. Análisis del grado de orientación de las nanofibras PVAEtOH y PVAEtOH-TTC 10:2.	57
Figura 7.6. Colecciones de nanofibras PVA-ETOH-TTC 10:2 a 13 cm, 10.4 kV, 0.3 mL/h y 10 °C : A) FESEM, A1) 1 h de proceso, A2) 6 h de proceso.	59
Figura 7.7. Colecciones de nanofibras PVA-ETOH-TTC 10:2 a 14 cm, 13.4 kV, 0.3 mL/h y 22°C : A) FESEM, A1) 1 h de proceso, A2) 6 h de proceso.	60
Figura 7.8. Histogramas de orientación y mapas de colores de las nanofibras PVA-ETOH-TTC 10:2 A) Obtenidas a 10 °C B) Obtenidas a 22 °C.....	61
Figura 7.9. Bandas de UV visible características de la TTC.	62
Figura 7.10. A) Bandas de UV visible características de la TTC. B) Influencia de la concentración de la TTC en la absorbancia.	63
Figura 7.11. Espectros de absorción UV-vis de liberación en medio acuoso de la TTC a partir de las colecciones de nanofibras PVA-TTC.	63
Figura 7.12. A) Bandas de UV visible de liberación de TTC de las nanofibras alineadas.....	64
Figura 7.13. A) Bandas de UV visible de liberación de TTC de las nanofibras aleatorias.....	64
Figura 7.14. A) Bandas de UV visible de liberación de TTC de las nanofibras aleatorias.....	65

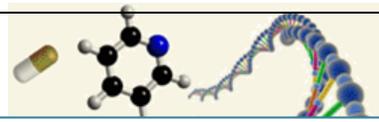
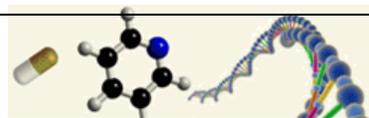


Figura 7.15. Test de zona de inhibición de *Staphylococcus aureus* en agar EMB. 67

Figura 7.16. Test de zona de inhibición de *Klebsiella pneumoniae* en agar EMB. 67

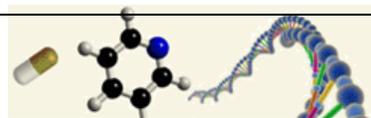
Figura 7.17. Test de zona de inhibición de *Streptococcus* sp en agar sangre de carnero..... 748

Figura 7.18. Espectro FT-IR de las nanofibras de PVA y PVA-TTC alineada y aleatoria..... 749



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Ejemplos y principales características de las Formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM).	8
Tabla 1.2. Comparación de los métodos de procesamiento para la obtención de nanofibras [25]...17	
Tabla 1.3. Ventajas y desventajas de los métodos de procesamiento de nanofibras [25].	17
Tabla1.4. Efecto de las variables y condiciones de procesamiento en la morfología de las nanofibras.....	25
Tabla 6.1. Parámetros de electrohilado con los diferentes solventes utilizados... 47	



ABREVIATURAS

PVA Alcohol Polivinílico

TTC tetraciclina

EtOH Etanol

Cm centímetros

g gramos

mg miligramos

nm nanómetros

mL mililitros

mL/h mililitros por hora

kV kilovolts

min minutos

h horas

% v/v Porcentaje volumen/volumen

% p/p Porcentaje peso/peso

Cps centipoise

°C grados Celsius

μS/cm microSiemens por centímetros

g/mL gramos por mililitros

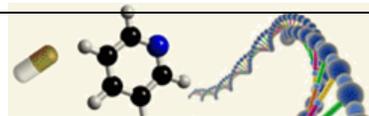
pH Potencial de Hidrógeno

CFU Concentración mínima inhibitoria

UV-Vis ultravioleta-visible

SEM microscopía electrónica de barrido

FE-SEM microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

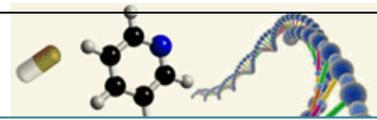


1. INTRODUCCIÓN

El diseño y aplicación de sistemas de liberación controlada de fármacos es un aspecto que ha cobrado gran relevancia en las últimas décadas, y la utilización de materiales poliméricos como soportes de fármacos para regular y dosificar su liberación es una perspectiva de gran interés. En particular, la preparación de membranas porosas bioabsorbibles basadas en polímeros o mezclas de ellos, que permitan la liberación controlada fármacos y vitaminas, es un área que ha aportado importantes investigaciones.

Particularmente, la técnica de electrohilado es una metodología versátil y sencilla con un gran potencial para la producción de éste tipo de membranas, ya que es posible producir colecciones de nanofibras de manera sencilla, las cuales resultan ser membranas porosas con una alta relación superficie/volumen, que al fabricarse a partir de polímeros biocompatibles y biodegradables son soportes ideales para los fármacos. Esta técnica también ha sido empleada para la generación de biomateriales para éste tipo de aplicaciones, y de manera muy particular en la ingeniería de tejidos, cuyo objetivo es crear estructuras biodegradables y biocompatibles con propiedades mecánicas y biológicas similares a la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) [2].

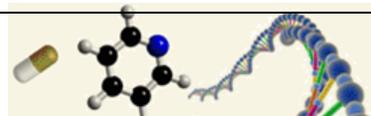
Bajo éste enfoque, se ha reportado el uso de la técnica de electrohilado para la producción de membranas de policaprolactona y quitosano para la liberación de clorhidrato de tiamina como un modelo para la liberación de vitamina *B1*, logrando liberar hasta un 85% en un periodo de 60 h [3]. Recientemente, otros autores evaluaron cómo entregar nanovacunas de ADN y un coadyuvante inmunológico para la inmunización ante COVID-19 mediante un parche de microagujas separable de alcohol polivinílico (PVA), el cual se puede almacenar hasta por 30 días a temperatura ambiente [4] y bajo un enfoque de producción a gran escala, se analizó la producción de nanofibras electrohiladas a partir de povidona (polivinilpirrolidona, PVP; un polímero de uso comercial para la liberación de fármacos), para la liberación de un antibiótico [5].



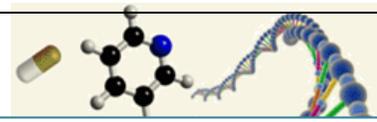
En este sentido, los sustratos integrados por nanofibras electrohiladas de PVA, son una opción viable para la integración de un fármaco en su estructura y su posterior liberación controlada. Esto debido a que el PVA es un polímero altamente electrohilable, además de ser biocompatible y biodegradable. Especialmente, las características intrínsecas a la microestructura compuesta por las colecciones de nanofibras, que incluyen una alta porosidad, interconectividad, alta relación área superficial/volumen y orientación (aleatoria o alineada), repercuten significativamente en la liberación del agente terapéutico. Debido a que el PVA es un polímero altamente electrohilable, es posible obtener colecciones de nanofibras de PVA tanto alineadas como dispuestas aleatoriamente, lo que permite el estudio de la influencia de éste parámetro en la cinética de liberación.

Por otra parte, la resistencia a los antibióticos ocurre cuando las bacterias cambian y se vuelven tolerantes a los antibióticos empleados comúnmente para tratar las infecciones que estas causan, y por lo general es a consecuencia del consumo de cualquier fármaco antimicrobiano, la que se ve exacerbada por su uso inadecuado; esto ha comprometido la capacidad para tratar las enfermedades infecciosas, socavando muchos avances en la medicina. Actualmente, existe una resistencia bacteriana ligada a la tetraciclina (TTC) debido a su constante uso clínico, esto debido a que es un antibiótico de amplio espectro. No obstante, presenta efectos secundarios significativos por su ingesta debido a la supresión de la microbiota intestinal [5-6], por lo que se requiere de estrategias de liberación controlada mediante el diseño de algún material para su suministro eficiente en aras de minimizar los efectos secundarios.

Es por ello que se pueden crear plataformas cuyo propósito sea la liberación farmacológica y de esta manera permitan evitar el efecto de primer paso por el hígado que implica una primera metabolización del fármaco con la consecuente disminución de su biodisponibilidad. Además de aumentar la biodisponibilidad del fármaco íntegro es importante manejar con cuidado los antibióticos para que sigan siendo eficaces por el mayor tiempo posible.



Por todo lo anterior, este trabajo de Tesis propone la fabricación de materiales nanoestructurados constituidos por colecciones de nanofibras basados en PVA, un polímero altamente electrohilable, de tal forma que puedan ser utilizados como sistemas de liberación farmacológica. La relevancia de esta propuesta radica en implementar la técnica de obtención de nanofibras uniformes y altamente alineadas, a escala nanométrica, mediante electrohilado *air gap*, ya que la disposición de estos materiales en nanofibras alineadas, potencialmente ofrece mayor control en el suministro del agente terapéutico. Dichas microestructuras bioactivas podrían ser una base y antecedente ideal para la farmacéutica moderna.



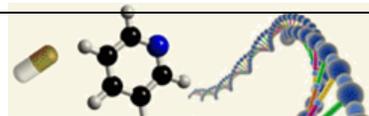
2. MARCO TEÓRICO

2.1 LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

La liberación es un proceso mediante el cual un principio activo presente en una forma de dosificación llega a estar disponible para su absorción. Teniendo en cuenta que la absorción de un fármaco, desde una forma de dosificación sólida luego de la administración oral, depende de la liberación de la sustancia activa, su disolución o solubilidad bajo condiciones fisiológicas, y la permeabilidad de la forma farmacéutica. Debido a la naturaleza crítica de estos parámetros, el tipo de liberación se hace relevante para los estudios de equivalencia y bioequivalencia [8]. Existen numerosas clasificaciones basadas en la forma de liberar el fármaco o bien en los mecanismos que gobiernan dicha liberación (ver tabla 1.1).

Tabla 1.1. Ejemplos y principales características de las Formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM).

Tipo de sistema de FFLM	Características principales	Ejemplo de medicamento comercializado de FFLM
Sistemas de liberación acelerada	<ul style="list-style-type: none"> • Disolución rápida del fármaco sin necesidad de administración de líquidos. • No prolongan el efecto terapéutico. 	<ul style="list-style-type: none"> • Efferalgan Odis® (comprimidos budispersables de paracetamol). • Zofran Zydis® (ondansetron).
Sistemas de liberación diferida	<ul style="list-style-type: none"> • Retardadas: diseñadas para salvar el pH gástrico o para evitar gastrolesividad del fármaco. • No prolongan el efecto terapéutico. • Pulsátil: liberación secuencial del medicamento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Omeprazol 20mg Belmac EFG (cápsulas duras gastroresistentes). • Moxatag® (amoxicilina PULSYS®, sistema pulsátil)
Sistemas de liberación prolongada	<ul style="list-style-type: none"> • Diseñados para prolongar la concentración plasmática (Cp) del fármaco o para mejorar las características farmacéuticas del medicamento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adalat Oros®, Adalat retard® (nifedipino). • MST Continus® (morfina). • Omnic OCAS® (tamsulosina)
Sistemas flotantes y bioadhesivos	<ul style="list-style-type: none"> • Diseñados para aumentar el período de residencia gástrico 	<ul style="list-style-type: none"> • Madopar® Retard (levodopa + benserazida).



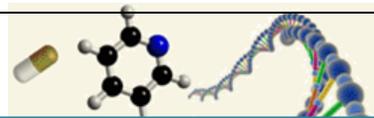
Actualmente existen dos métodos para mejorar la acción de los fármacos:

1. Liberación controlada, que trata de eliminar o reducir los efectos secundarios produciendo una concentración terapéutica del fármaco que sea estable en el organismo. Se trata de alcanzar una cinética de liberación de orden cero y no suelen existir cambios en la concentración del fármaco en el organismo (comparándolo con los cambios intermitentes de concentración en las dosificaciones convencionales), y
2. Liberación dirigida hacia lugares específicos, que trata de asegurar que el fármaco es liberado en el lugar requerido, y al mismo tiempo mantiene el fármaco inactivo en cualquier otro lugar del organismo [9].

2.2. ANTIBIÓTICOS

Dos descubrimientos importantes señalaron el comienzo de una nueva era en la quimioterapia y revolucionaron el tratamiento de las enfermedades infecciosas. El primero fue el descubrimiento, en 1935, de los efectos curativos del colorante rojo de Prontosil en las infecciones por estreptococos; este fue el precursor de las sulfonamidas. El segundo, fue el que dio inicio a la edad de oro de la antibioticoterapia, la penicilina. Ésta fue descubierta por Fleming en 1929 y en 1940 Florey, Chain y colaboradores, demostraron y publicaron un informe acerca de su enorme potencia y la posibilidad de su extracción de los sobrenadantes del cultivo del hongo *Penicillium notatum*.

El conocimiento actual sobre fisiología, metabolismo y genética bacteriana, así como los recursos disponibles sobre modelación e interacción de moléculas hace esperar que cada vez más los nuevos antimicrobianos sean sustancias puramente sintéticas con gran especificidad por un sitio de acción previamente elegido, y con capacidad de sortear los mecanismos de resistencia antibiótica [10].



Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo. El objetivo de la antibioticoterapia es controlar y disminuir el número de microorganismos viables, colaborando con el sistema inmunológico en la eliminación de los mismos.

Existen distintas clasificaciones para agrupar a estas moléculas:

I. DE ACUERDO A LA INTERACCIÓN GERMEN-ANTIBIÓTICO:

- **Bactericidas:** su acción es letal, llevando a la lisis bacteriana.
- **Bacteriostáticos:** a las concentraciones que alcanzan en el suero o tejidos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, pero sin llegar a destruirlas.

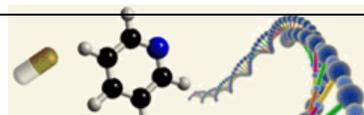
II. SEGÚN EL ESPECTRO DE ACCIÓN:

- **Antibióticos de espectro amplio,** como aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes (aminoglucósidos y carbapenemes).
- **Antibióticos de espectro reducido,** antibióticos solo activos sobre un grupo reducido de especies (penicilinas).

III. SEGÚN EL MECANISMO DE ACCIÓN:

El mecanismo de acción es el proceso por el cual un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana. Tomando en cuenta lo anterior, los antibióticos se dividen en:

- **Inhibidores de la formación de la pared bacteriana,**
- **Inhibidores de la síntesis proteica**
- **Inhibidores de la duplicación del DNA**
- **Inhibidores de la membrana citoplasmática**
- **Inhibidores de vías metabólicas.**



Esta clasificación se muestra de manera esquemática en la Figura 1.1.

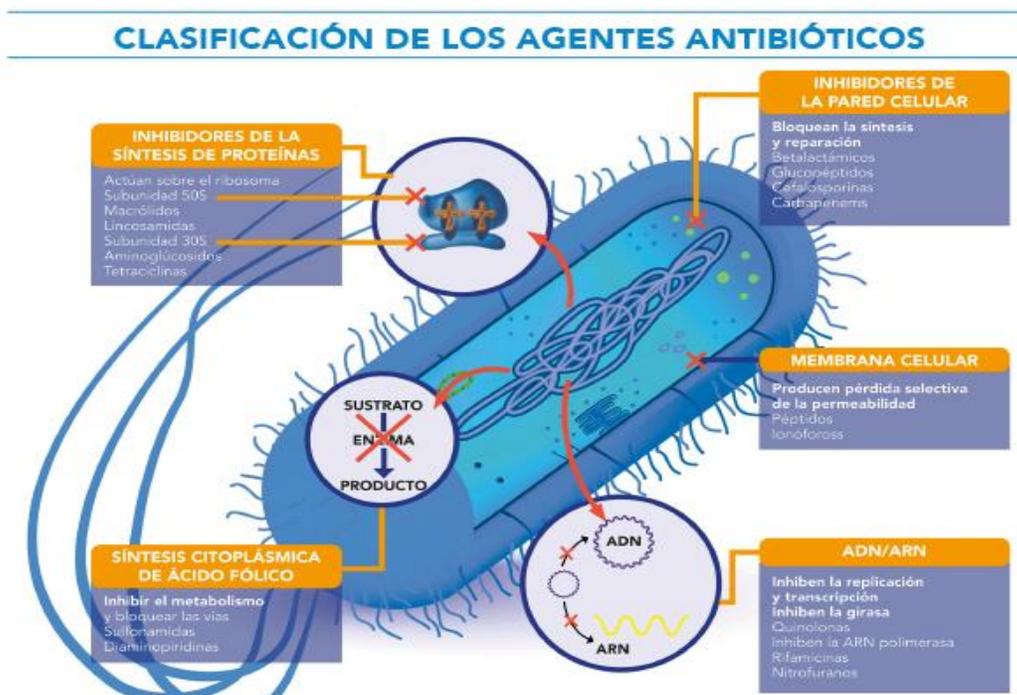
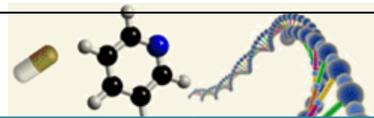


Figura. 1.1 Clasificación de antibióticos según su mecanismo de acción. Modificado de [1].

2.2.1 TETRACICLINAS

Son un grupo de antibióticos de amplio espectro antibacteriano y de segunda elección; no obstante, en algunos procesos infecciosos tales como el acné, la rosácea, la uretritis no gonocócica y la enfermedad de Lyme, son medicamentos de primera elección. Tienen en común la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas a nivel de los ribosomas de las bacterias susceptibles; la selectividad de su acción depende de las diferencias en las características moleculares de los ribosomas bacterianos y las de los ribosomas de las células de mamíferos[7].

Farmacodinamia y espectro de actividad antibacteriana. Para que las tetraciclinas ejerzan su acción a nivel del ribosoma de las bacterias gramnegativas, se requiere que penetren a la célula del microorganismo por mecanismos de difusión facilitada a través de los canales hidrófilos (porinas) y por procesos de transporte activo dependiente de la energía. Lo anterior determina que la concentración intracelular sea mayor que la extracelular. Se conocen con menos

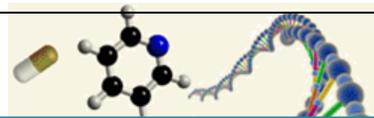


detalle los mecanismos de penetración de las tetraciclinas a las bacterias grampositivas. Una vez dentro de la célula, las tetraciclinas se unen de manera reversible a sus sitios receptores en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano y de esta manera bloquear la fijación del aminoacil-tRNA al sitio aceptor en el complejo mRNA-ribosoma, esto evita la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento, inhibiendo la síntesis de proteínas.

La selectividad de las tetraciclinas para inhibir la síntesis de proteínas en las bacterias, radica en el hecho de que las células de mamífero carecen del sistema de transporte activo y, además, las características del ribosoma bacteriano son diferentes a las del ribosoma de mamíferos.

Espectro de actividad antibacteriana. Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro. Eficaces contra microorganismos grampositivos y gramnegativos, aerobios y anaerobios. Son también activos contra gérmenes resistentes a los antibióticos beta lactámicos como la *Rickettsia* (fiebre manchada de las montañas rocosas, tifo murino, tifo epidémico y tifo tropical), *Coxiella burnetti* (tifo vesicular y fiebre Q), *Mycoplasma pneumoniae*, especies de *Chlamydia psittaci* (psitacosis y ornitosis) y *trachomatis* (linfogranuloma venéreo); *Calymmatobacterium granulomatis* (granuloma inguinal) y *Legionella pneumophila* (enfermedad de los legionarios), *Pseudomonas pseudomallei* (melioidosis). También son muy sensibles diversas cepas de *Brucella*, el *Haemophilus ducreyi* (chancroide), *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia pestis* (peste), *Francisella tularensis* (tularemia) y *Pasteurella multocida*. Son activas contra diversos microorganismos anaerobios como el *Bacteroides fragilis*, *Propionibacterium* y *Peptococcus*. A nivel intestinal alteran la microbiota normal, lo que da lugar a la proliferación de oportunistas como *Candida*, enterococos y la producción de colitis pseudomembranosa por la toxina del *Clostridium difficile*.

Se consideran bacterias sensibles a las tetraciclinas, aquéllas cuya concentración mínima inhibitoria (CMI) es de 4 mg/mL, no obstante el *Haemophilus influenzae* y el *Streptococcus pneumoniae*, son sensibles a concentraciones



menores de 2 mg/mL y la *Neisseria gonorrhoea* a concentraciones menores de 0.25 mg/mL.

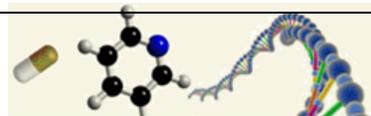
Farmacocinética. La absorción de las tetraciclinas es variable por vía oral, para la clortetraciclina es del 30% (baja), del 60 al 80% (intermedia) para la oxitetraciclina, demeclociclina y tetraciclina, y del 95 al 100% (alta) para la doxiciclina y minociclina. La absorción es mayor en ayuno y disminuye por la ingestión concomitante de productos lácteos, geles de hidróxido de aluminio, sales de calcio, magnesio, hierro o cinc y subsalicilato de bismuto. El mecanismo que explica esta menor absorción se debe a la quelación de cationes di y trivalentes.

Las tetraciclinas se distribuyen ampliamente en el organismo, en secreciones incluida la orina y líquido prostático. Se acumulan en células reticuloendoteliales de hígado, bazo, y médula ósea; en hueso, dentina y esmalte de dientes que no han brotado. Se logran concentraciones apropiadas en líquido cefalorraquídeo y sinovial, así como en lágrimas, saliva y leche materna.

Cruzan la barrera placentaria, llegan al tejido fetal y al líquido amniótico. Se unen en un 40 a 80% a las proteínas del plasma. Se eliminan principalmente por vía renal y por la bilis, aunque algunas son reabsorbidas por la circulación enterohepática. La oxitetraciclina y tetraciclina tienen una vida media de 6 a 12 h, la de demeclociclina es de 16 h y es más larga para la doxiciclina y minociclina (16 a 18 h).

Mecanismo de resistencia. Las bacterias que desarrollan resistencia a una tetraciclina, habitualmente la presentan cruzada con otras. La resistencia es adquirida por plásmidos y es un rasgo inducible. Los tres mecanismos que dan lugar a este fenómeno son:

- 1) pérdida o disminución de la permeabilidad bacteriana para el antibiótico o la adquisición de una vía de salida dependiente de energía;
- 2) menor acceso de la tetraciclina al ribosoma bacteriano, y
- 3) expresión de enzimas bacterianas que metabolizan al antibiótico.[7]



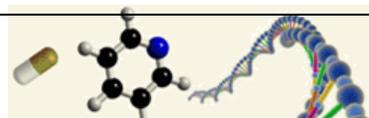
Reacciones adversas. Todas las tetraciclinas son irritantes para la mucosa gastrointestinal en mayor o menor grado, y se manifiesta como ardor y molestias epigástricas, náusea, vómito y diarrea. La diarrea puede ser consecuencia de la supresión de la microbiota normal y la proliferación por bacterias y hongos resistentes a las tetraciclinas como *pseudomonas*, *proteus*, *estafilococos*, coliformes, *clostridios* y *candida*. Lo anterior puede dar lugar a un trastorno funcional intestinal, prurito anal, candidiasis vaginal u oral, incluso enterocolitis con choque y muerte.

Es muy importante detectar oportunamente la enterocolitis pseudomembranosa provocada por *Clostridium difficile* o por *Staphylococcus*, y tratarse con vancomicina. Se han reportado casos de esofagitis y úlceras esofágicas. Ocurre fotosensibilidad con la demeclociclina, doxiciclina y en menor grado con otras tetraciclinas. Puede ocurrir simultáneamente hiperpigmentación de las uñas.

Las tetraciclinas se fijan a los depósitos de calcio en los huesos y los dientes de neonatos y en la primera dentición, lo que provoca manchas permanentes en la dentina y el esmalte. El depósito en los huesos puede originar deformidad e inhibición en el desarrollo óseo.

Indicaciones, vía de administración y dosis. Tratamiento de linfogranuloma venéreo, granuloma inguinal, fiebre manchada de las Montañas Rocosas, tifo epidémico, tifo murino, tifo tropical, tifo vesicular, fiebre Q, tracoma, conjuntivitis de inclusión, brucelosis, cólera, psitacosis y en otras infecciones provocadas por bacterias gramnegativas susceptibles. Acné grave, bronquitis crónica, tratamiento de la gonorrea y de la sífilis. Junto con otros fármacos para la erradicación del *Helicobacter pylori*. La demeclociclina inhibe la acción de la hormona antidiurética (ADH) por lo que se ha usado como diurético, en el síndrome de secreción inapropiada de ADH. Las tetraciclinas se distribuyen en diversas formulaciones para administración oral, parenteral y local.

Es por todo lo anterior que la liberación controlada de fármacos, ayuda a eliminar o disminuir los efectos secundarios, produciendo una concentración terapéutica del fármaco que sea estable en el organismo[11]-[12]-[13].



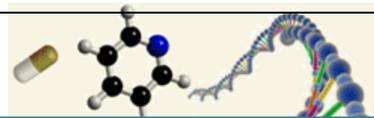
2.3 MICROESTRUCTURAS POLIMERICAS PARA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

2.3.1 HIDROGELES

Los hidrogeles son sistemas tridimensionales poliméricos formados con materiales de origen natural o sintético capaces de retener una gran cantidad de agua u otros fluidos biológicos, se caracterizan por poseer una viscoelasticidad similar a la del tejido humano [14], lo que hace que sean sustancias ideales para múltiples aplicaciones [15]. Su conformación tridimensional ocurre en disoluciones acuosas concentradas cuando el polímero inicial es capaz de gelificar, con la consecuente formación de redes espaciales no covalentes [16]. El carácter hidrófilo se debe a la presencia de grupos funcionales hidrófilos como son: OH, COOH, CONH, entre otros [17]. Los hidrogeles son materiales muy apropiados para aplicaciones en medicina dada su buena interacción con los tejidos vivos [18], ya que muestran buenas propiedades de biocompatibilidad, debido principalmente a su consistencia blanda, elástica y contenido de agua [19].

Otra de las características destacables de estos sistemas es que permiten incorporar otras sustancias, en este caso fármacos, para su posterior liberación. Todo ello hace que sea posible crear hidrogeles inteligentes, es decir, hidrogeles capaces de reaccionar frente algún tipo de estímulo como por ejemplo el pH, la luz, la temperatura, radiación o el reconocimiento molecular entre otros [14]. De esta forma la variación de las propiedades fisicoquímicas del medio en el que se encuentre el hidrogel, puede suponer cambios en el tamaño de poro, el volumen o la integridad estructural del polímero que dan lugar a la liberación del fármaco [20].

En la aplicación como liberadores de medicamentos, los hidrogeles han sido ampliamente usados como portadores inteligentes de sustancias activas [21] como la liberación de hidrocortisona desde hidrogeles de polihidroxietil metacrilato (PHEMA) a través de implantes en embriones de pollo, estudios de liberación en implantes subcutáneos en ratas [22] y varios antitumorales (*cisplatino*, 5-fluorouracilo, por ejemplo) [23].

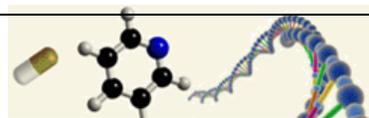


2.3.2 NANOFIBRAS

La tecnología de las nanofibras es una rama de la nanotecnología en la que su principal objetivo es la preparación de nanoestructuras en forma de fibras. La combinación única de una gran área superficial y flexibilidad que proporcionan las nanofibras, las hacen preferidas para aplicaciones donde se desea un alto nivel de porosidad. Dichas aplicaciones van desde su utilización en la industria textil (medios de filtración, vendajes para heridas, entre otras) hasta el reforzamiento de estructuras aeroespaciales. Una de las características más significativas de las nanofibras, es la enorme disponibilidad de área superficial por unidad másica. Por ejemplo, para las nanofibras que poseen un diámetro entre 5 - 500 nm, les corresponde un área superficial entre 10,000 a 1,000,000 m² /kg.

Además del tamaño, se caracterizan por ser ultrafinas debido a las técnicas especializadas empleadas para obtenerlas. Pueden poseer distintas propiedades, lo que le otorga diversos usos. Otra de las ventajas es que, a pesar del pequeño tamaño, el área superficial es grande, haciendo que el espacio de contacto sea más amplio, y debido a su naturaleza polimérica, modificar las nanofibras es prácticamente sencillo.

Las nanofibras producidas por electrohilado, están siendo introducidas en diversas áreas de aplicación tales como en el área médica, defensa, ingeniería ambiental, biotecnología y energía. Por citar un ejemplo: Corning Incorporated, Corning New York fabrica cajas Petri *Ultra-web™ polyamine synthetic surface*, las cuales son utilizadas para el cultivo de células humanas; estas cajas de poliestireno poseen en su fondo una capa de nanofibras de poliaminas las cuales son cargadas positivamente para lograr un anclaje celular o uniones de enlaces covalentes con biomoléculas [24].



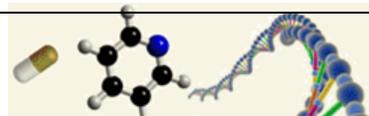
Una comparación sobre ciertos aspectos relacionados con la factibilidad del proceso, así como las ventajas y desventajas de estas para la preparación de nanofibras mediante diversas técnicas, son mostradas en las Tablas 1.2 y 1.3, respectivamente [25].

Tabla 1.2. Comparación de los métodos de procesamiento para la obtención de nanofibras [25].

Método	Ventajas tecnológicas	Escalamiento del método	Reproducibilidad	Control en las dimensiones de las nanofibras
Dibujo	Laboratorio	No	Si	No
Síntesis en plantillas	Laboratorio	No	Si	Sí
Separación de fases	Laboratorio	No	Si	No
Auto-ensamblado	Laboratorio	No	Si	No
Electrohilado	Laboratorio (con potencial para el procesamiento Industrial)	Si	Si	Si

Tabla 1.3. Ventajas y desventajas de los métodos de procesamiento de nanofibras [25].

Método	Ventajas	Desventajas
Dibujo	Equipamiento mínimo requerido.	Proceso no continuo
Síntesis en plantillas	Fibras de diferentes diámetros pueden ser preparadas por el uso de diferentes plantillas.	
Separación de fases	Mínimo equipamiento requerido. Se puede fabricar directamente una matriz nanofibrosa.	Limitado a ciertos polímeros
Auto-ensamblado	Bueno para la obtención de nanofibras muy pequeñas.	Proceso complejo
Electrohilado	Bajo costo, Proceso continuo.	Inestabilidad del jet

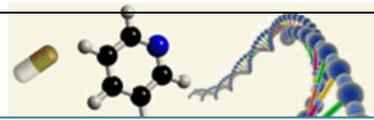


2.4 ELECTROHILADO

El proceso de electrohilado fue primeramente patentado por James Morton en los Estados Unidos en 1902 [26]; sin embargo, el proceso fue por mucho tiempo ignorado, hasta los años 90s, donde el interés en el área de la nanociencia y nanotecnología, llevó a muchos investigadores al uso del electrohilado para la producción de nanofibras [27].

El proceso de electrohilado consiste en establecer una diferencia de potencial electrostática para inducir la formación de fibras con diámetros en la escala de micras a nanómetros. El equipo de electrospinning cuenta con un sistema de inyección compuesto por una bomba de infusión la cual se encarga de empujar la solución polimérica hacia la aguja con una velocidad determinada. En la bomba de infusión se coloca una jeringa de plástico que sirve como reservorio de la solución y una aguja que funciona como electrodo positivo; con la bomba de infusión se controla la velocidad de desplazamiento permitiendo así que el flujo de inyección sea constante durante el depósito. La generación de alto voltaje la proporciona una fuente de poder con un rango de operación de 0-30 kV, de esta fuente salen dos polaridades, una positiva que va conectada a una aguja que funciona como un capilar en la que a través de esta el líquido es inyectado para ser electrodepositado, y la polaridad negativa va conectada al sustrato colector donde se deposita el producto hilado. Dicho colector básicamente consiste una placa metálica conductora (de acero inoxidable, se recubren con papel aluminio para evitar el deterioro). El sistema está compuesto de los siguientes componentes (Figura 1.2):

- Una jeringa equipada con una aguja, la cual contiene una solución polimérica.
- Una bomba de inyección, la cual permite tener un flujo constante de solución hacia la punta de la aguja.



- Un colector metálico, en el cual se depositan las nanofibras.
- Una fuente de voltaje, la cual provee un flujo constante de corriente positiva hacia la solución polimérica, por medio de un electrodo que sale de la fuente y termina en una conexión en la punta de la aguja. Al mismo tiempo, un electrodo de polo negativo que sale de la fuente, se conecta al colector.

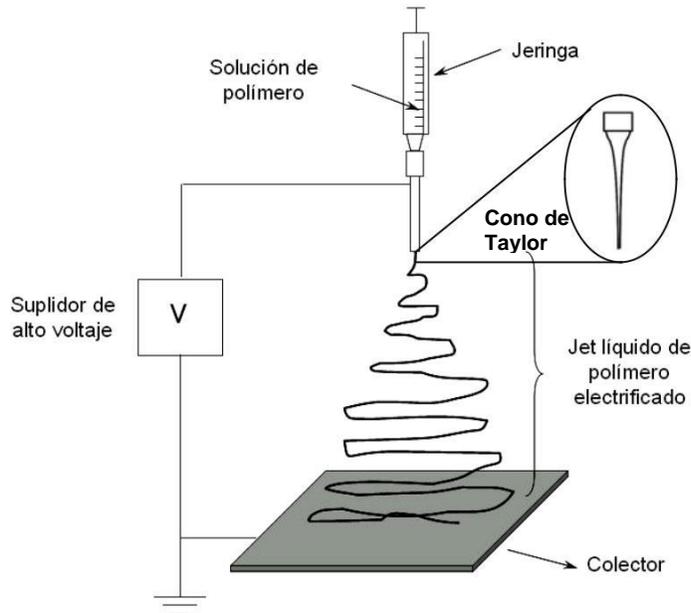
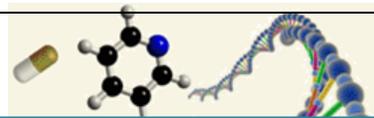


Figura 1.2. Esquema del proceso de electrohilado.

Durante el proceso, una gota de la solución polimérica es suspendida en la punta de la aguja debido a la tensión superficial de la solución polimérica. Un incremento en el voltaje aplicado causa una acumulación de la carga en la superficie de la gota, provocando una deformación en la gota en forma cónica, la cual es referida como cono de Taylor (ver Figura 1.2) [28]. Dicha acumulación de carga alcanza un valor crítico suficiente para sobrepasar la tensión superficial, produciéndose así un chorro de solución polimérica que viaja hasta el colector. Durante la trayectoria caótica que recorre el chorro de solución, se produce la evaporación del solvente, formándose así las nanofibras de polímero seco las cuales son depositadas en el colector. Para disoluciones poco viscosas, el chorro se rompe en pequeñas gotas, produciéndose un “electroatomizado”, mientras que para disoluciones de alta viscosidad éste viaja hasta el colector [25].



2.4.1 PARÁMETROS DE LA SOLUCIÓN DEL POLÍMERO

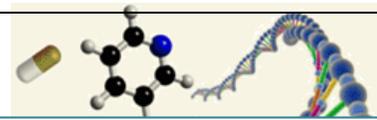
Existen variables asociadas con la solución, los cuales tienen una significativa influencia en la morfología de las nanofibras, estos parámetros son:

- Peso molecular y viscosidad de la solución.
- Tensión superficial.
- Conductividad de la solución.

Peso molecular y viscosidad de la solución. Una de las condiciones que se requieren para la síntesis de nanofibras es que la solución debe estar provista de un polímero con peso molecular tal que proporcione una viscosidad adecuada para el proceso. Generalmente, cuando un polímero de alto peso molecular es disuelto en un solvente, su viscosidad será más alta que la de la solución del mismo polímero pero de un peso molecular más bajo. El peso molecular del polímero representa la longitud de la cadena del polímero, la cual tiene efecto sobre la viscosidad de la solución debido a que la longitud del polímero determina la cantidad de interacciones del polímero en el solvente.

Por otro lado, la concentración del polímero determinará la electrohilabilidad de la solución, es decir, determina si se forman o no las nanofibras debido a que si la solución presenta baja viscosidad las nanofibras se rompen en gotas antes de alcanzar el colector, por el contrario, si la solución es demasiado concentrada las nanofibras no pueden ser formadas debido a su alta viscosidad, la cual dificulta el paso a través del capilar [29].

Doshi y Reneker (1995) [27], encontraron que en disoluciones de diferentes concentraciones PEO/agua (óxido de polietileno/agua) con viscosidades menores a 800 cps la nanofibras se rompen en gotas, mientras que con viscosidades mayores 4000 cps la solución es demasiado viscosa para su electrodeposición, es por ello que se debe contar con un rango óptimo de concentraciones del polímero para que pueda formar colecciones de nanofibras cuando todos los parámetros se mantengan constantes.



Por otra parte, se ha reportado que a baja viscosidad, se pueden formar nanofibras con “perlas” a lo largo de la nanofibra, mientras que cuando incrementa la viscosidad hay un cambio gradual en la forma de las “perlas”, de esféricas a forma de listón hasta que se forman nanofibras largas y finas (Figura 1.3)[30]. Con el incremento de la viscosidad, el diámetro de la nanofibra también incrementa esto puede ser debido a que la solución presenta una resistencia a las cargas para ser alargada, así mismo cuando la viscosidad incrementa significa que existe una cantidad más alta de interacciones de las cadenas entre los polímeros que componen la solución, y las cargas sobre el flujo hacen que la solución sea completamente alargada con las moléculas del solvente distribuidas entre la cadena del polímero. Al incrementar la viscosidad, el diámetro de la nanofibra también incrementa, esto probablemente sea debido a la gran resistencia de la solución para ser alargada por el efecto de las cargas sobre el flujo[30]

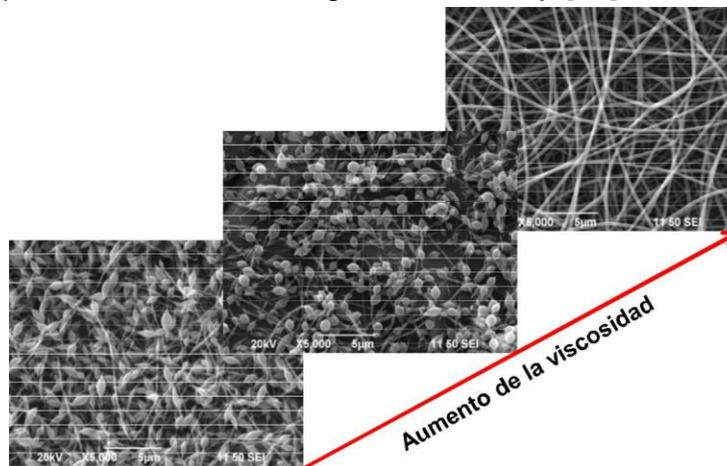
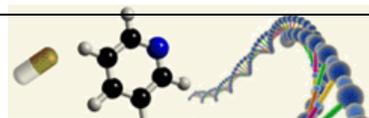


Figura 1.3. Efecto de la viscosidad de las disoluciones poliméricas sobre la morfología de las nanofibras. Tomado de [30]

A viscosidades bajas, es común encontrar una morfología de gotas o “perlas” a lo largo de las nanofibras depositadas en el colector [31]. Cuando la viscosidad se incrementa, existe un cambio gradual en la morfología de las gotas, pasando de esféricas a elípticas hasta obtener nanofibras cilíndricas y lisas. Por otro lado, un incremento en la viscosidad, provoca un aumento en el diámetro de la nanofibra, probablemente debido a la resistencia de la solución a ser estirada completamente. En la Figura 1.4 se muestra la evolución en la morfología de las nanofibras de PEO, en función de la viscosidad de la solución para un determinado peso molecular[31].



Recientemente se han publicado una serie de trabajos en los que se ha determinado la viscosidad mínima requerida de una solución polimérica, para la producción de nanofibras sin morfología de gotas [32]. En la Figura 1.5 se muestra un diagrama en el que se trazan cuatro regiones correspondientes a las diferentes morfologías obtenidas para el PVA, en función del peso molecular y la concentración de polímero.

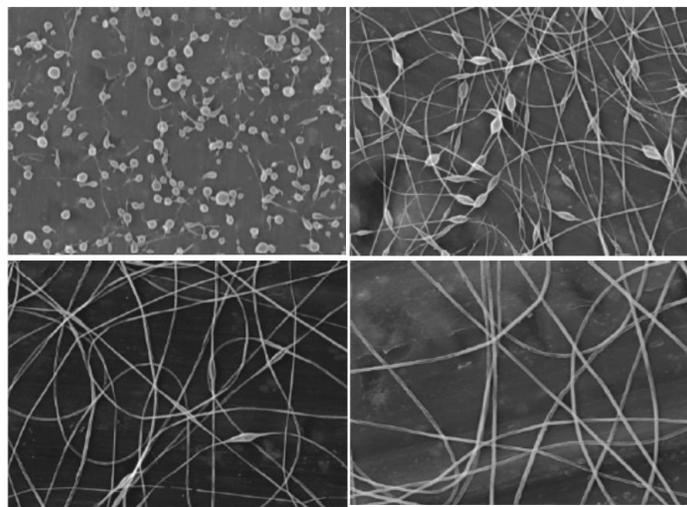


Figura 1.4. Morfología de las nanofibras con gotas en función de la viscosidad, para el PEO. a) 13 cp. b) 160 cp. c) 527 cp. d) 1835 cp. Tomado de [31]

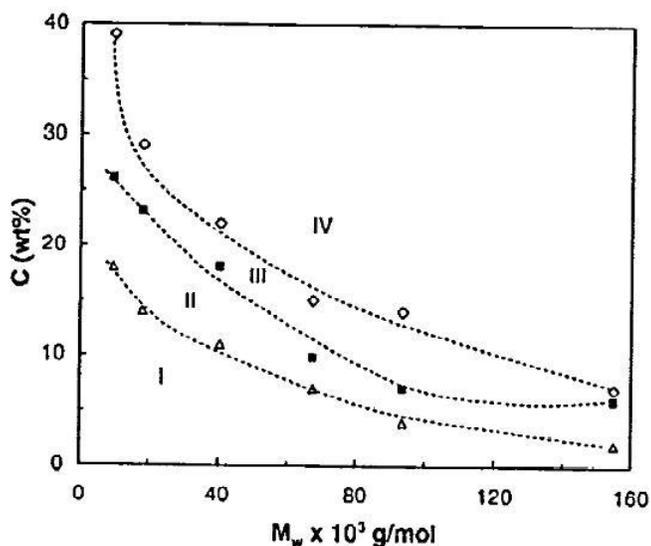
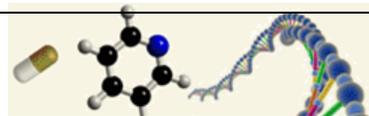


Figura 1.5 Regímenes para varias morfologías observadas en el PVA. I) Gotas. II) Nanofibras con perlas. III) Nanofibras. IV) Listones. Tomado de [32]



2.4.2 PARÁMETROS RELACIONADOS AL PROCESAMIENTO

Voltaje. Un elemento crucial en el proceso de electrohilado, es la aplicación de alto voltaje a la solución, el cual inducirá las cargas necesarias en esta para sobrepasar su tensión superficial y así iniciar el proceso de electrohilado. Por lo general, un voltaje aplicado de 6 kV es suficiente para provocar una distorsión en la gota de solución y así se forme el cono de Taylor [28]. Dependiendo de la velocidad de alimentación de la solución, se requiere un cierto valor de voltaje para mantener un cono de Taylor estable; si el voltaje es muy grande, la gran cantidad de carga en la solución, provocará una mayor aceleración del chorro de solución y por consecuencia una mayor demanda de solución desde la punta de la aguja, resultando nanofibras muy finas pero con un cono de Taylor muy inestable [33].

El efecto del alto voltaje no solamente tiene que ver con la apariencia de las nanofibras, sino también con la cristalinidad de las nanofibras del polímero, pues el campo eléctrico y el estiramiento de la solución, causa un ordenamiento de las cadenas del polímero induciéndolas a formar cristales [34].

Por otro lado, si se aplica un bajo voltaje, existe una menor aceleración del chorro de solución y por lo tanto un mayor tiempo de vuelo, el cual permitirá un mayor estiramiento del chorro y una completa evaporación del solvente.

Velocidad de alimentación. La velocidad de alimentación, determinará la cantidad de solución disponible para el proceso de electrohilado. Para un voltaje dado, hay una velocidad de alimentación adecuada para mantener un cono de Taylor estable. Cuando se trabaja con una alta velocidad de alimentación, hay una gran cantidad de solución que sale de la punta de la aguja, lo cual ocasiona un incremento en el diámetro y en el tamaño de las gotas en la nanofibra (Figura 1.6), además de una incompleta evaporación del solvente, causando que las nanofibras se unan y formen membranas o películas. Por lo que una baja velocidad de alimentación es más deseable para que el solvente tenga más tiempo para evaporarse.

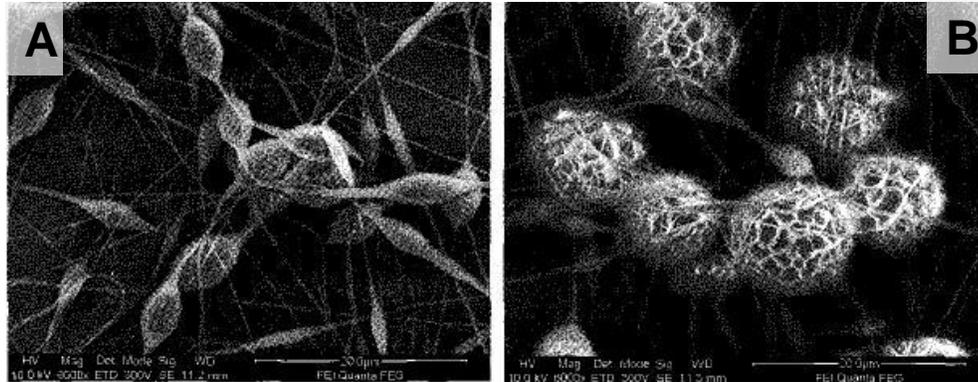
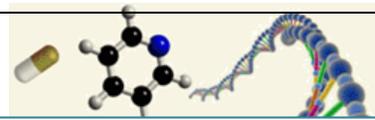


Figura 1.6. Efecto de la velocidad de alimentación en la morfología de las nanofibras de policaprolactona. a) 0.5 ml/h. b) 2 ml/h. Tomada de [25]

Distancia entre el colector y la aguja. La variación en la distancia entre el colector y la aguja tiene una directa influencia sobre el tiempo de vuelo así como la fuerza del campo eléctrico, los cuales a su vez tienen una influencia directa en la morfología de las nanofibras obtenidas. Cuando la distancia entre el colector y la aguja se reduce, el chorro de solución tiene que viajar una distancia más corta antes de que este alcance el colector, además de que la fuerza del campo eléctrico incrementa la aceleración del chorro hacia el colector. Como resultado de esto, no hay suficiente tiempo para la evaporación del solvente, lo cual causa que las nanofibras se unan y formen membranas (Figura 1.7) [25].

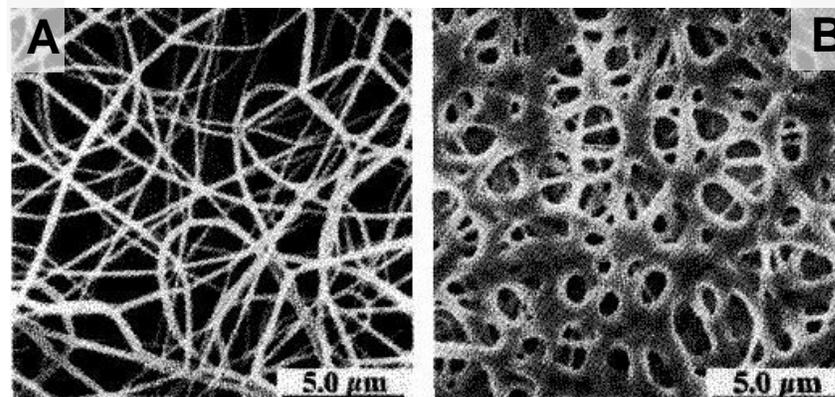
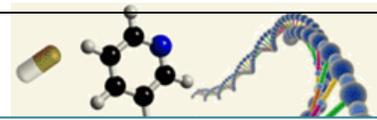


Figura 1.7. Nanofibras de Nylon 6,6 a) 2 cm de distancia. b) 0.5 cm de distancia. Tomada de [25].



Dependiendo de las propiedades de la solución, el efecto de la variación de la distancia puede o no tener un efecto significativo en la morfología de las nanofibras. Cuando la distancia es muy corta pueden producirse gotas al no dar tiempo para que se genere el cono de Taylor, la reducción en la distancia entre el colector y la aguja, tiene el mismo efecto en la morfología de las nanofibras que si se aumentara el voltaje y la velocidad de alimentación.

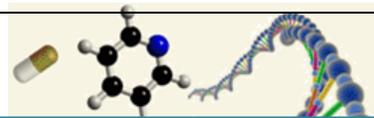
Retomando lo expuesto anteriormente, la Tabla 1.4 muestra un resumen sobre el efecto de los parámetros de la solución y las condiciones de procesamiento sobre la morfología de las nanofibras [30].

Tabla 1.4. Efecto de las variables y condiciones de procesamiento en la morfología de las nanofibras.

Efecto		Fibras finas	Completa evaporación Del solvente	Inestabilidad de la fibra	Vencimiento de la tensión Superficial	Baja tensión superficial	Gotas en la fibra
Variable							
Voltaje	A	Si	No	Si	Si		Si
	D		Si				
Velocidad de alimentación	A	No	No				Si
	D	Si	Si				No
Viscosidad	A	No				Si	No
	D	Si				No	Si
Distancia entre colector y aguja	A	No	No		Si		Si
	D	Si	Si		No		No

A: Aumento. D: Disminución.

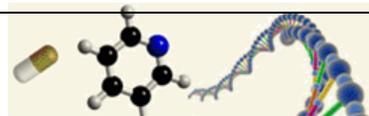
Diámetro de la aguja de la jeringa. El diámetro interno de la aguja de la jeringa también tiene cierto efecto sobre el proceso de electrohilado, un diámetro interno más pequeño disminuye el diámetro de las fibras y se reduce el atascamiento debido a que se expone menor cantidad de solución en la punta de la aguja, pero si es demasiado pequeño el diámetro, no puede ser posible la extrusión de la gota de la solución en el orificio de la aguja. Cuando el tamaño de la gota es disminuido, la tensión superficial de la gota incrementa y cuando se aplica un mismo voltaje se requiere una gran fuerza Coulombica para que el jet inicie y como resultado la aceleración del flujo disminuye permitiendo más tiempo para que la solución sea alargada y elongada antes de que llegue al colector [30].



Parámetros ambientales. Además de los parámetros de procesamiento y de solución también hay parámetros ambientales que influyen en la formación de las nanofibras, dentro de los cuales destacan: la humedad y temperatura. Generalmente, el electrohilado se lleva a cabo a temperatura ambiente pero cuando la temperatura ambiental aumenta la conductividad de la solución incrementa, mientras que la viscosidad y la tensión superficial disminuyen.

La temperatura de las disoluciones para el electrohilado también tiene efectos sobre la morfología de las nanofibras, por ejemplo, a altas temperaturas la viscosidad disminuye por lo que aumenta la movilidad de las moléculas del polímero debido al incremento de temperatura, además las fuerzas Coulombicas pueden ejercer una gran fuerza de estiramiento en la solución, resultando nanofibra de diámetro más pequeño, sin embargo se ha reportado que una alta temperatura provoca la formación de poros sobre la superficie de las nanofibras [25].

Por otro lado, cuando las disoluciones son preparadas con polímeros solubles en agua y solventes miscibles, el vapor de agua aumenta e incrementa la humedad relativa provocando la formación de “perlas”, y en algunos casos las nanofibras se adhieren entre sí debido al solvente residual. Así también el diámetro medio de la nanofibra aumenta al incrementar la concentración de la solución y la distancia de trabajo [5].



2.4.3 APLICACIONES DE LAS NANOFIBRAS EN LA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

En la Figura 1.8 se presenta un esquema de las diferentes aplicaciones que pueden presentar las nanofibras, como se observa sus aplicaciones son muy amplias, no obstante, este apartado se centrará en su aplicación en el área biomédica, y en particular en la liberación de fármacos [35].

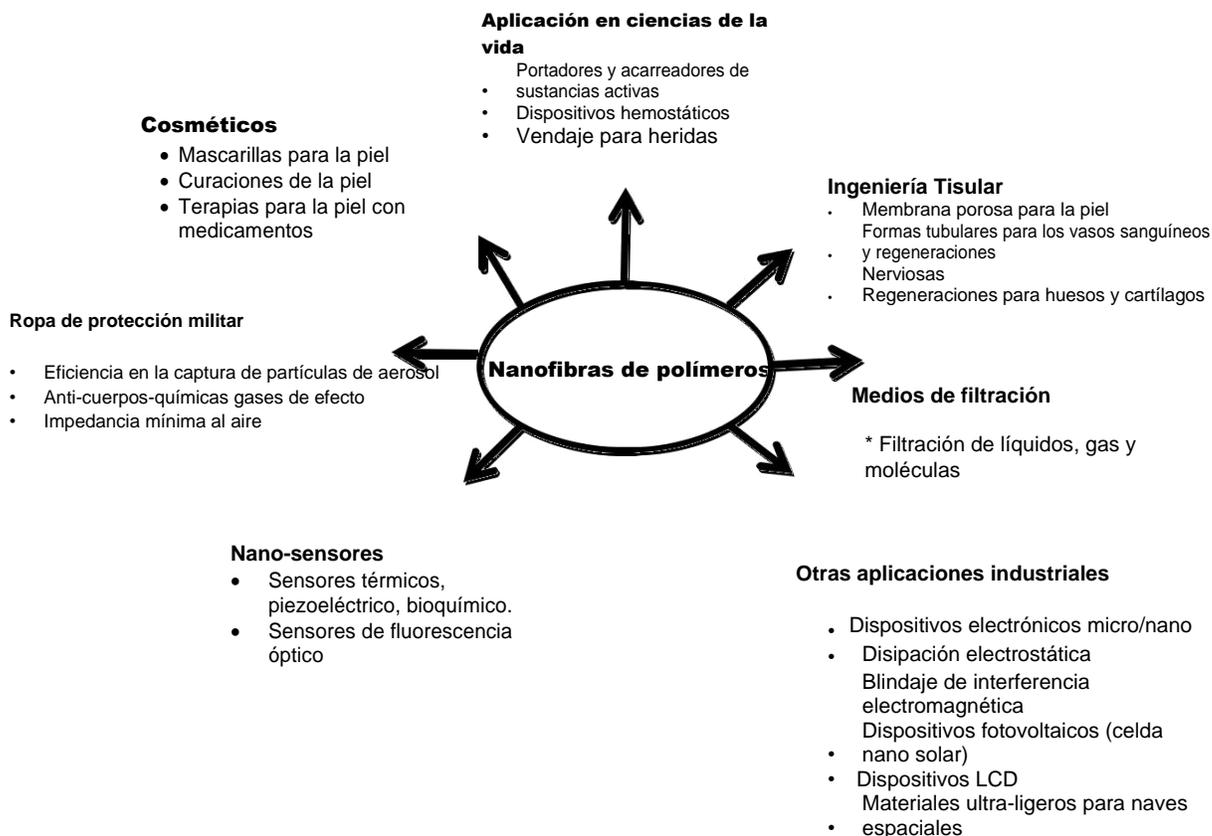
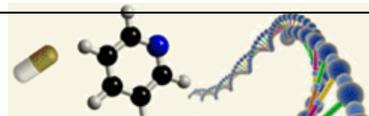


Figura 1.8. Aplicaciones potenciales de las nanofibras de polímeros generadas por electrospinning.

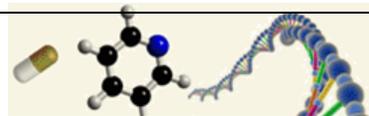
Aplicaciones biomédicas. Desde el punto de vista biológico, casi todos los tejidos y órganos humanos se depositan en forma de nanofibras o estructuras fibrosas, por ejemplo los huesos, dentina, colágeno, cartílago y piel, todos ellos se caracterizan por sus estructuras bien organizadas realineados en escala nanométrica.



La investigación en lo referente a nanofibras de polímeros mediante electrohilado se ha enfocado principalmente en la bioingeniería debido a que tiene un gran potencial para ser aplicadas en diversas áreas biomédicas como prótesis médicas, ya que las nanofibras pueden ser depositada como una película porosa delgada sobre un tejido duro prostético que funciona como una interfase entre la prótesis y los tejidos del huésped. Así mismo las nanofibras también se pueden utilizar para el tratamiento de heridas o quemaduras de la piel humana. Con la ayuda del campo eléctrico las nanofibras de polímeros biodegradables pueden ser pulverizados o hilados directamente sobre la herida de la piel para formar un apósito lo cual puede permitir que las heridas se curen mediante el crecimiento normal de la piel y eliminar la formación de tejido cicatrizante que se produce con el tratamiento tradicional [35].

La ingeniería de tejidos también ha prestado gran interés en la elaboración de soportes con biopolímeros sintéticos y/o nanofibras de polímeros biodegradables que puedan imitar la estructura y funciones biológicas de la matriz extracelular. Su principal reto es la creación de soportes tridimensionales reproducibles y biocompatibles para el crecimiento celular interno para la reparación de tejidos [36].

Liberación de fármacos. Para lograr un efecto terapéutico deseado, un fármaco requiere de un sistema adecuado de administración de fármacos para asegurar su perfil de liberación específico. La locación, el tiempo y la velocidad de liberación de un fármaco deben ajustarse lo más posible a la diana terapéutica del fármaco. Sin embargo, esto puede ser un gran desafío en el diseño de sistemas de administración de fármacos. Entre los potenciales sistemas de administración de fármacos, las nanofibras ofrecen una solución prometedora. La liberación de fármacos con nanofibras se basa en el principio de que la velocidad de disolución de una partícula incrementa con el incremento del área superficial, tanto del fármaco como del portador. Se ha reportado que las nanofibras poliméricas electrodepositadas destinadas para composiciones farmacéuticas pueden ser diseñadas para proporcionar una disolución rápida, inmediata, retardada o

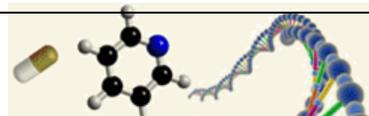


modificada. Cuando se mezcla el fármaco con el material portador para el electrohilado los probables productos nanoestructurados serán:

- a) El fármaco como partículas adheridas a la superficie de soporte, es decir, colecciones de nanofibras,
- b) El fármaco y el portador forman fibras, así que el producto final será de dos clases de nanofibras entrelazados entre sí,
- c) La mezcla del material acarreador y el fármaco integrado en una clase se fibras conteniendo ambos componentes y
- d) El material electrodepositado es de forma tubular en la que las partículas del fármaco se encapsulan.

Las nanofibras como sistema de liberación de fármacos pueden emplearse en diferentes rutas de administración incluyendo la oral, tópica, transdérmica y transmucosa [37]. Adicionalmente, las nanofibras pueden proteger al fármaco de la descomposición en el cuerpo antes de llegar al objetivo requerido, y tanto la liberación inmediata como la modificada del fármaco se pueden lograr utilizando nanofibras. El electrohilado es la metodología más utilizada de preparación de nanofibras cargadas con fármacos. La gran ventaja de las nanofibras es que sus características se pueden adaptar variando los parámetros de la solución polimérica, de las condiciones ambientales y los parámetros del proceso. Las nanofibras ofrecen así muchas opciones para lograr atributos definidos para el producto final, y en consecuencia, para las propiedades de liberación del fármaco.

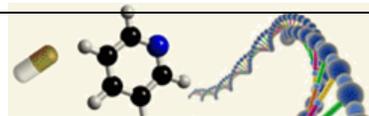
Las características principales que hacen que las nanofibras sean candidatas tan prometedoras para lograr la liberación inmediata de fármacos incluyen la alta relación superficie-volumen, que proporciona una gran área de contacto para la disolución, la alta porosidad de la malla de nanofibras y la potencial transformación de un fármaco cristalino en un estado amorfo. De hecho, si se utiliza un polímero soluble en agua adecuado para la incorporación de un fármaco en nanofibras, esto



puede mejorar la velocidad de disolución y la solubilidad del fármaco, y por lo tanto también su biodisponibilidad, tal es el caso del PVA [37].

Son muchos los factores que influyen en la liberación de fármacos a partir de nanofibras, incluidos el tipo de polímero utilizado, el diámetro, la porosidad, la geometría, la morfología de las nanofibras y su arreglo, ya sea aleatorio o alineado [38]. Sin embargo, los estudios que se centran en el efecto de la alineación de nanofibras sobre la liberación de fármacos a partir de nanofibras son limitados. Eslamian y col. [39] compararon la liberación de un fármaco hidrofóbico, la dexametasona, a partir de nanofibras hidrofóbicas de poli(lactida-coglicolida) orientadas al azar y alineadas. Encontraron una liberación inicial del fármaco en ráfaga en las primeras 24 h seguido de una liberación sostenida durante los siguientes 24 días. Las nanofibras alineadas tuvieron una menor liberación de ráfaga y liberación más sostenida en comparación con las aleatorias. Por su parte, Meng y col. [40] evaluaron la liberación de fenbufen (un compuesto poco soluble en agua) de nanofibras PLGA, PLGA/gelatina y PLGA/quitosano. Revelaron que la tasa de liberación del fármaco desde nanofibras alineadas fue menor que la de las nanofibras orientadas aleatoriamente, ya que las nanofibras alineadas habían aumentado la densidad y disminuido el tamaño de poro de los andamios en comparación con las orientadas al azar.

Como se puede observar, la producción de nanofibras alineadas para su uso como agente de liberación de fármacos, conlleva un beneficio importante en la tasa de liberación, lo que a su vez, puede repercutir de manera importante en la disminución de los efectos secundarios producidos por estos. Para cumplir con este cometido, es necesario contar con una técnica sencilla y versátil para producir colecciones de nanofibras alineadas, tal es el caso del electrohilado *air gap*.

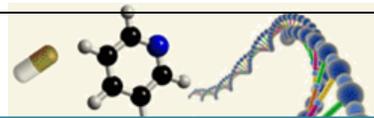


2.4.4 ELECTROHILADO AIR GAP

El electrohilado es una técnica poderosa para la producción de fibras a nano/microescala que son de gran interés científico, militar y comercial. En las últimas dos décadas, las colecciones de nanofibras electrohiladas se han investigado ampliamente y se han realizado una amplia gama de aplicaciones, como en el almacenamiento de energía, cuidado de la salud, ingeniería ambiental, defensa y seguridad. Las micro y nanofibras producidas a partir del proceso de electrohilado convencional suelen estar orientadas al azar, no obstante, como ya se mencionó, las colecciones de nanofibras alineadas presentan varias ventajas respecto de las depositadas aleatoriamente.

Se han reportado de varios métodos para producir nanofibras alineadas mediante el empleo de un sistema colector especial, como un mandril giratorio de alta velocidad [41], una sugerencia de escaneo, un espacio inclinado, electrodos conductores paralelos, y un cilindro hueco. Entre ellos, el uso de un par de electrodos conductores paralelos [42] y/o una configuración de mandril giratorio son la forma más común de alineación de nanofibras. Con el empleo de un mandril giratorio se pueden generar nanofibras alineadas uniaxialmente si la velocidad de rotación del mandril está bien controlada. Sin embargo, a menudo es muy difícil alinear nanofibras de 200 nm independientemente de la velocidad de rotación, y las nanofibras depositadas en el mandril normalmente son difíciles de transferir a otras estructuras. Estas desventajas podrían eliminarse utilizando electrodos conductores paralelos, este método (electrohilado por hueco) tiene un gran potencial para producir nanofibras largas alineadas, que pueden procesarse más para formar diferentes estructuras para fines específicos.

Por su parte, el electrohilado *air gap* fue introducido por primera vez por Li *et al.* en 2003 como un enfoque exitoso para producir nanofibras alineadas uniaxialmente de hasta varios centímetros de longitud [42]. Desde entonces, se ha dedicado mucho esfuerzo a aumentar la longitud de las nanofibras alineadas. Sin embargo, la longitud en la actualidad todavía se limita normalmente a 10 cm [43][44].



El electrohilado *air gap* a diferencia del electrohilado con la configuración estándar confiere a las nanofibras mejores propiedades mecánicas. La producción de entramados de nanofibras cuya disposición tenga un patrón de alineamiento, aporta importantes propiedades a los biomateriales en campos como la ingeniería de tejidos, donde las bioestructuras con matriz extracelular presentes de forma natural, tienen de forma inherente estos patrones anisotrópicos, como son los tejidos nerviosos, cardíacos, tendones, vasos sanguíneos, musculares o cartilagosos. Por tanto, una correcta arquitectura de los tejidos biopoliméricos es necesaria para imitar correctamente las propiedades de la matriz extracelular [45].

Este método consiste en la disposición de dos electrodos longitudinalmente paralelos, conectados a tierra. Las líneas de campo electrostático de este modo, se disponen como se muestra en la Figura 1.9 b [46], las nanofibras cargadas con polaridad opuesta a los electrodos, al llegar al hueco entre ambos, no tienen una dirección preferencial para disponerse, ya que la distribución de campo ejerce igual fuerza de un lado a otro en la dirección perpendicular a los electrodos. Por tanto, las nanofibras en esta zona quedan dispuestas según esa dirección perpendicular. Por otro lado, las nanofibras depositadas mantienen la carga y por ello repelen a nanofibras nuevas que llegan al colector, por lo que no son de gran espesor.

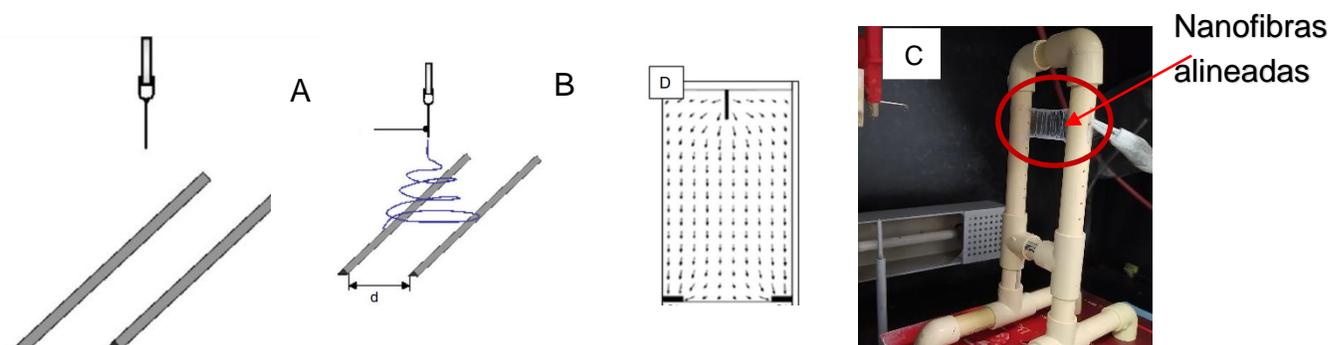
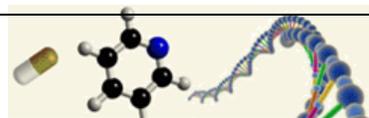


Figura 1.9 A. Disposición de electrodos paralelos. B. Disposición del campo eléctrico. Tomada de [46] C. Colector *air gap* empleado en este trabajo.

En el colector *air gap* utilizado en este trabajo de investigación es mostrado en la Figura 1.9 C, se aprecia un soporte sobre el cual se colocan alambres de cobre ajustables a la distancia de *gap* que se desee; estos se conectan a tierra mediante un caimán actuando como electrodos, sobre los que se depositarán las nanofibras.



2.5 ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA): CARACTERÍSTICAS, PROPIEDADES Y COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS EN FORMA DE NANOFIBRAS

CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DEL PVA

El alcohol de polivinilo (PVA) es un polímero sintético lineal producido a través de la hidrólisis parcial o total de acetato de polivinilo para eliminar el grupo acetato. Figura 1.10 La cantidad de hidroxilación determina las características físicas y químicas, así como las propiedades mecánicas del polímero [47].

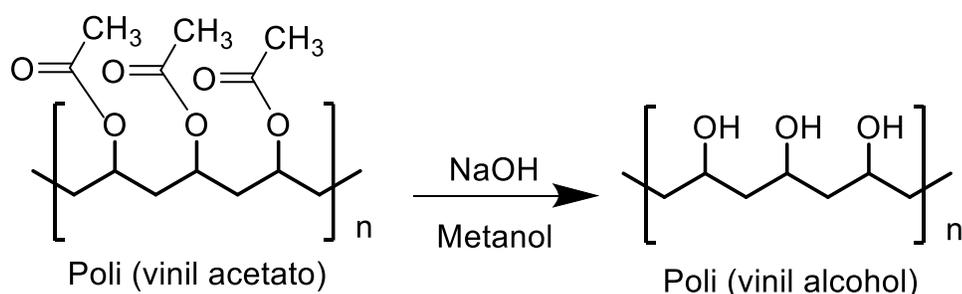
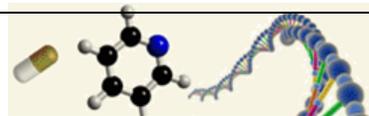


Figura 1.10. Preparación por hidrólisis parcial o total de acetato de polivinilo para eliminar los grupos acetato y producir PVA.

Esta ruta química da como resultado un producto altamente soluble en agua, pero insoluble a la mayoría de los disolventes orgánicos. Cuanto mayor sea el grado de hidroxilación y de polimerización, menor es la solubilidad en agua y más difícil de cristalizar [48]. Debido a su solubilidad en agua, PVA necesita ser reticulado para formar hidrogeles [49]. Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales capaces de absorber grandes cantidades de líquidos, sin disolverse en ellos y con el tiempo liberarlos [50]. Esta característica junto con su biocompatibilidad con los tejidos humanos, permeabilidad y bajo coeficiente de fricción, los han hecho aptos para ser usados en aplicaciones médicas [51].

Estas redes tridimensionales están compuestas de una fase sólida, fluido intersticial y especies iónicas; se les ha considerado materiales biointeligentes ya que responden variando su volumen, a estímulos del medio ambiente, tales como:

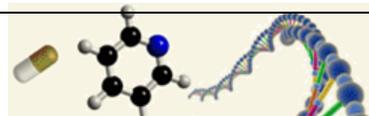


cambios de pH, temperatura, concentración de especies, biomoléculas (glucosa y proteínas), radiaciones y campo eléctrico [52].

Las propiedades del PVA se encuentran fuertemente influenciadas por el método de síntesis empleado. El grado de polimerización, las condiciones de hidrólisis y la etapa de secado afectan las propiedades finales del producto [53]. Las propiedades físicas y químicas del PVA dependen en primer lugar del peso molecular y en segundo lugar del contenido de grupos acetil o grado de hidrólisis. La solubilidad del PVA va a estar en función del peso molecular y del grado de polimerización, de forma que cuanto mayor es el peso molecular, más insoluble en agua es el polímero. El polímero totalmente hidrolizado es insoluble en agua a temperatura ambiente, sin embargo se solubiliza perfectamente por encima de los 85°C [54]. La presencia de grupos hidroxilo aumentan las interacciones por puente de hidrógeno, tanto intramolecular como intermolecularmente, disminuyendo la solubilidad en agua, mientras que la presencia residual de grupos acetil disminuye el número de interacciones por puente de hidrógeno, permitiendo la solubilidad en agua del polímero a temperaturas más bajas.

Otras propiedades físicas que lo hacen interesante, es que el PVA es parcialmente cristalino, mientras que la mayoría de los compuestos de polivinilo como el poliestireno o el acetato de polivinilo son amorfos. El PVA también se caracteriza por su buena resistencia química a compuestos del tipo hidrocarburo, hidrocarburos halogenados, ésteres de ácidos carboxílicos, grasas y aceites vegetales o animales. La resistencia a disolventes orgánicos aumenta con el grado de hidrolisis [54]. Cuando el PVA se calienta gradualmente sin disolverse durante un largo periodo, se produce su descomposición gaseosa alrededor de los 110°C, dependiendo de la intensidad y la duración del proceso de calentamiento [55].

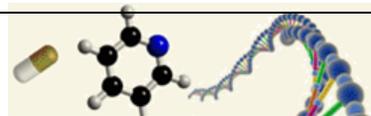
Una propiedad destacable del PVA es su biodegradabilidad, ya que es uno de los pocos polímeros sintéticos realmente degradables, obteniéndose como productos de degradación de agua y dióxido de carbono [56]. Al menos 55 especies o variedades de microorganismos muestran procesos de degradación de este polímero en diferentes entornos como son los fangos activados, digestores



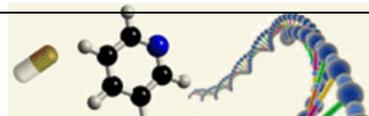
anaerobios, sistemas sépticos, compostaje, sistemas acuáticos y lagunaje. El PVA es rápidamente biodegradado mediante el proceso de fangos activados, si la biomasa está acostumbrada a la aportación regular de este polímero [57]. Es importante característica, además de su alta electrohilabilidad es lo que lo hace un polímero ideal para la generación de sistemas de liberación de fármacos.

SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS BASADOS EN NANOFIBRAS DE PVA

El PVA es un polímero con características ideales para generar colecciones de nanofibras para ser empleadas como agente de liberación de fármacos, debido a que es un polímero soluble en agua, biodegradable, biocompatible y muy fácil de electrohilar. Se ha reportado el electrohilado de este polímero entrecruzado con colágeno para la producción de nanofibras cargadas con ácido salicílico como un modelo de liberación de fármacos. Los autores reportan que los estudios *in vitro* mostraron una liberación adecuada, no obstante, la liberación no fue completa debido a que el fármaco presenta interacción molecular con los grupos funcionales del PVA y del colágeno [58]. Asimismo, a partir del electrohilado de disoluciones de PVA/gelatina, y PVA/alginato cargadas de ácido fólico, se han producido colecciones de nanofibras como agente de liberación. La cinética de liberación mostró una rápida liberación del fármaco en un periodo de 8 h, registrándose una mayor porcentaje de liberación del fármaco en la combinación PVA/gelatina, el cual no se ligó químicamente a los polímeros [59]. Otro estudio ha reportado la fabricación de nanofibras entrecruzadas PVA/alginato de sodio cargadas con naftalina, las cuales presentan un porcentaje de liberación del fármaco de 64% en 8 h [60]. En la combinación PVA/quitosano como agente de liberación de ofloxacino, el estudio *in vivo* insertando este material en el ojo de conejos, mostró un patrón de liberación sostenida arriba de 96 h, mientras que estudios *in vitro* mostraron que es un material no citotóxico con buena biocompatibilidad, además de ser un agente antibacterial efectivo contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* [61].



Estos estudios demuestran la efectividad del uso de colecciones de nanofibras basadas en PVA como un agente efectivo para la liberación de fármacos. No obstante, todos ellos incluyen la fabricación de colecciones de nanofibras dispuestas aleatoriamente, y dado que se ha reportado la mayor efectividad de estos agentes cuando las colecciones de nanofibras se encuentran alineadas [59], el estudio del efecto de éste parámetro sobre la cinética de liberación de fármacos, es de gran importancia en el área.



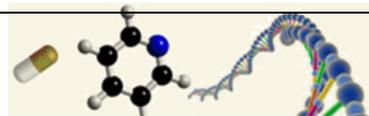
3. JUSTIFICACIÓN

Las matrices electrohiladas han mostrado un gran potencial como construcciones para proporcionar una liberación controlada de una serie de fármacos, incluidos los antibióticos. Debido a sus características estructurales que incluyen una alta área superficial, porosidad y resistencia mecánica adecuada, es posible favorecer altas cargas de fármaco, y la capacidad de superar las limitaciones de transferencia de masa asociada con otros sistemas poliméricos, las matrices electrohiladas pueden cumplir tanto con los requisitos de función de barrera como de administración de fármacos necesarios para algún tratamiento.

Por su parte, se ha reportado que las colecciones de nanofibras alineadas presentan una tasa de liberación más eficiente respecto de las colecciones de nanofibras dispuestas aleatoriamente. En este sentido, el alcohol polivinílico posee características idóneas para la elaboración de nanofibras alineadas y con ello poder obtenerlas con organización alineada y de esta manera lograr favorecer el suministro prolongado y eficiente del antibiótico evitando muchos de los efectos secundarios a nivel intestinal y hepático.

Por tanto, la producción de estos biomateriales representa una alternativa de carga más eficiente y liberación controlada de una gran cantidad de fármacos, para los que aún no se dispone de un sistema de administración más eficaz.

Por estas razones, el presente trabajo de tesis presenta la obtención de un biomaterial basado en PVA en forma de colecciones de nanofibras alineadas cargado con tetraciclina, para su estudio como modelo de liberación de fármacos. La tetraciclina es un antibiótico de amplio espectro que ha sido uno de los más utilizados y por lo tanto los que han presentado mayor predisposición a desarrollar resistencia, por lo que se requiere buscar la manera de suministrarla de manera más eficiente y con las mínimas reacciones adversas.



4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

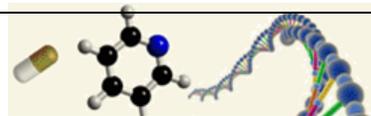
Obtener colecciones de nanofibras con alto grado de orientación inducida por el método de electrohilado *air gap* de disoluciones compuestas PVA-Tetraciclina para la evaluación de la influencia de la microestructura en la cinética de liberación del antibiótico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Fabricar colecciones de nanofibras poliméricas, con distribuciones de diámetro homogéneas y libres de defectos.

Estudiar la influencia de la microarquitectura axialmente alineada, mediante el electrohilado *air gap*, en la cinética de liberación de tetraciclina monitoreada mediante espectroscopia UV-Vis.

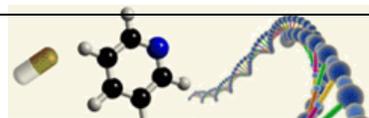
Realizar la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.



5. HIPÓTESIS

Las microestructuras conformadas por colecciones de nanofibras axialmente orientadas serán más eficientes, respecto a microestructuras aleatorias, en la liberación controlada de fármacos.

La presencia de grupos polares en la estructura de antibióticos como la tetraciclina facilitará la electrohilabilidad y la tendencia a la deposición alineada durante el procesamiento en electrohilado *air gap*.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES E INSTRUMENTAL

REACTIVOS

Para la preparación de las disoluciones de PVA y PVA cargado de tetraciclina (TTC), se utilizaron PVA de peso molecular 89,000 – 98,000, y tetraciclina (98 – 102.0%), ambos de la marca Sigma Aldrich®.

DISOLVENTES

Los disolventes empleados fueron agua destilada (densidad: 0,997 - 1,002 g/mL, índice de refracción: aprox. 1,3330. pH: 7.0, conductividad: < 4,3 μ S/cm), alcohol etílico absoluto (MW: 46,07 g/mol, punto de ebullición: 78,3 °C, punto de fusión: -117 °C, densidad: 0,7895 g/mL (20 °C), pH: 7.0), acetona (MW: 58.08 g/mol, pH: 5 a 6, punto de ebullición: 56 °C, punto de fusión: -94 °C, conductividad: 0.01 μ S/cm), metanol (punto de fusión: -97.8 °C, punto de ebullición: 64.7 °C, conductividad: \leq 1 μ S/cm, densidad: 0,79 g/mL, pH: \geq 7.0), e isopropanol (MW: 60,10, densidad: 0,785 g/mL, punto de fusión: -89.5 °C, punto de ebullición: 82 °C, conductividad: 0.01 μ S/cm, pH: 7.0), todos ellos de la marca J. T. Baker®.

EQUIPO DE ELECTROHILADO

Para el electrohilado de las disoluciones de PVA, se utilizó un equipo de electrohilado Marca Nabond Technologies® mostrado en la Figura 6.1. Dicho equipo requiere de los siguientes componentes mostrados en la Figura 6.2:

- Bomba de inyección con regulación de velocidad de flujo modelo -LEGATO 2000 Programmable kdScientific (Holliston, Estados Unidos).
- Fuente de tensión de alto voltaje, con acondicionador automático de tensión Vogar. LAN-13; 24 A fases-1F 3 Hilos; Frecuencia 58.8 Hz – 61.2 Hz. (Querétaro, México).

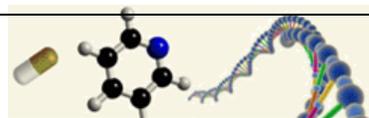


Fig 6.1. Equipo de electrohilado Naobond Technologies®.

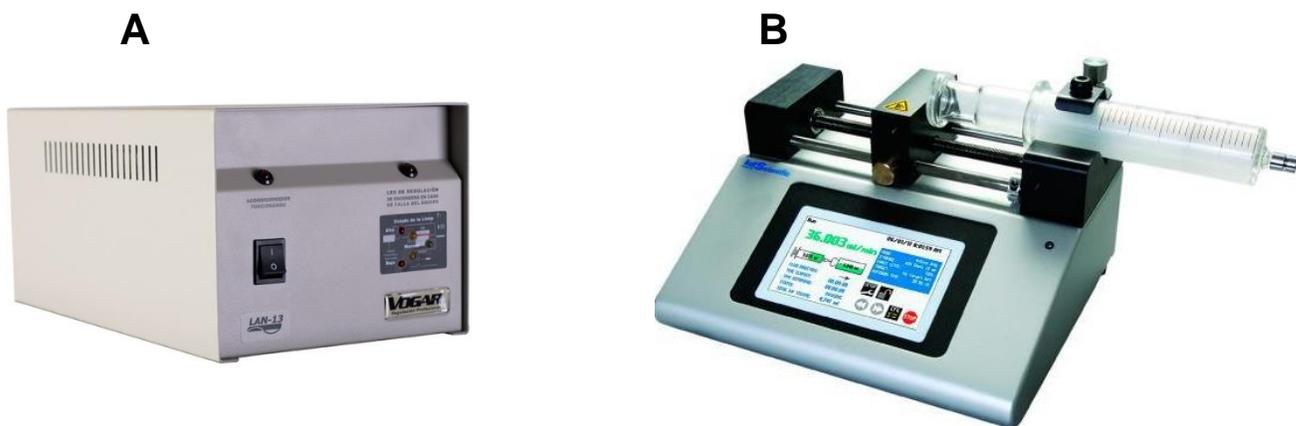
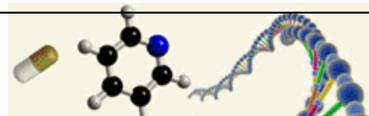


Fig 6.2. a) Fuente de tensión de alto voltaje vista anterior y b) Bomba de inyección.



- Jeringas y mangueras (figura 6.3):

Jeringas de plástico, estériles y desechables marca comercial. Figura 6.3.

1 ml: calibre 20G x 32 mm

5 ml: calibre 22G x 32 mm

10 ml: calibre 21G x 30 mm



Figura 6.3. Jeringas utilizadas de acuerdo a su capacidad.

- Manguera de teflón, estéril y desechable marca comercial. Figura 6.4

Manguera KVS para solventes

Cubierta: 1.5 m x 1 cm.

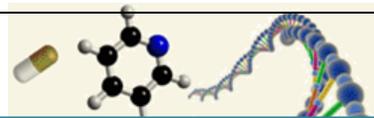
Recubre la manguera de portaflujo para reducir el voltaje en la misma.

Portaflujo: 1 m x 0.4 mm.

Contiene la solución polimérica y conectan directamente la jeringuilla con la aguja:

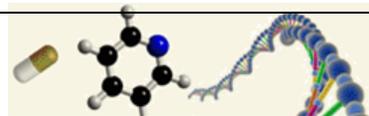


Figura 6.4. Mangueras de plástico a) portaflujo y b) cubierta. c) Aguja simple.



- Aguja de Electrohilado

Esta aguja va insertada en el puente interior e interconectada a la manguera portaflujo, y es justamente donde sale la solución polimérica. La aguja utilizada fue de calibre #6 (23G, diámetro interno 0.33 mm) Figura 6.4.



6.2 METODOLOGÍA

DISOLUCIÓN DE PVA:

El PVA se disolvió en agua destilada para obtener una disolución al 10% p/v, la mezcla se mantuvo a 90 °C en estufa durante 8 h.

ISOLUCIÓN DE COSOLVENTES:

Con la disolución de PVA 10% p/v se realizaron mezclas utilizando alcohol etílico absoluto, acetona, metanol e isopropanol:

- Solución de acetona disuelta en PVA en proporción 1:6.
- Solución de metanol disuelto en PVA en proporción 1:6.
- Solución de isopropanol disuelto en PVA en proporción 1:6.
- Solución de alcohol etílico absoluto disuelto en PVA en proporción 1:6.

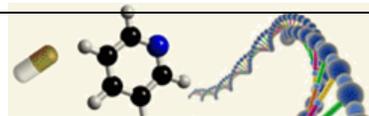
Preparadas a temperatura ambiente y con agitación constante hasta su completa homogenización.

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE TTC:

Se utilizaron alcohol etílico absoluto (ETOH) y tetraciclina (TTC) para la obtención de la solución de TTC:ETOH en proporción 2% p/v. Para tal fin, ambos componentes se mezclaron a temperatura ambiente y se mantuvieron en agitación constante durante 12 h.

DISOLUCIÓN DE PVA/TTC:

Se mezclaron las disoluciones de PVA y TTC:ETOH en proporción 10:2 v/v, preparadas a temperatura ambiente y con agitación constante hasta su completa homogenización.



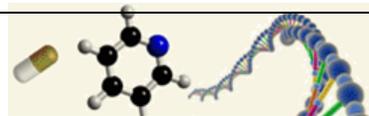
ELECTROHILADO:

Las disoluciones de base PVA se cargaron en una jeringa interconectada a una manguera de teflón y a una aguja de electrohilado #6 (23G, diámetro interno 0.33 mm). La aguja del sistema de suministro se conectó mediante una pinza caimán al electrodo positivo del equipo. Mediante una bomba de infusión se suministró un flujo de alimentación de 0.3 mL/h. La producción de colecciones de nanofibras alineadas fue analizada variando parámetros de operación como el voltaje y la distancia de trabajo aguja –colector a temperatura ambiente.

Se obtuvieron colecciones de nanofibras dispuestas aleatoriamente empleando la configuración de electrohilado convencional empleando un colector de placa fijo cubierto de aluminio, y colecciones de nanofibras alineadas empleando la configuración de electrohilado *air gap* que incluye un *air gap* colector diseñado en el laboratorio conformado por un par de alambres de cobre dispuestos en paralelo y conectados a tierra.

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ORIENTACIÓN:

Los datos estadísticos, mapas de color e histogramas de orientación fueron obtenidos mediante el análisis de imágenes de microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM), obtenidas en un microscopio de alta resolución (1 nm), equipado con haz atenuante (gentle beam) especial para muestras no conductoras y haciendo uso de espectroscopia EDS Bruker; modelo: Jeol JSM 7600F. Dichas imágenes fueron codificadas en el software ImageJ. A través de las herramientas Directionality y OrientationJ se realizó la determinación de grado de orientación, ángulo promedio, mapas de color y tamaño de diámetro promedio nanofibras.



CINÉTICAS DE LIBERACIÓN:

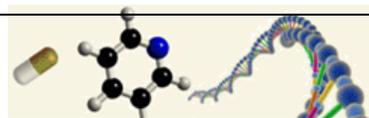
Se elaboró una solución 1:40 de TTC en etanol. Posteriormente, se realizaron disoluciones sucesivas 1:2, 1:4, 1:8 1:10 para construir la curva de calibración, para la determinación de la concentración a partir de dicha curva. Después de la inmersión de las nanofibras de PVA-TTC en 20 ml de alcohol etílico absoluto, se realizaron las lecturas de la liberación del fármaco, tomando mediciones de absorbancia cada 5, 10, 20, 40, 60 y 120 min y 4, 12, 24 y 48 h empleando un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis de Thermo Scientific y procesados en software de Excel 2010.

PRUEBAS DE SUCEPTIBILIDAD ANTIBACTERIANA:

Se realizaron ensayos de inhibición bacteriana en cepas *E. coli*, *S. aureous*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, y *G. Vaginalis* grado clínico y grado reactivo. Las cepas fueron cultivadas en agar EMB, sangre de carnero y MacConkey. Se sembró en estría masiva para antibiograma utilizando sensidiscos de TTC grado comercial y las nanofibras PVA-TTC, determinando los halos de inhibición a las 48 horas.

Técnica de preparación de las membranas de PVA/CSS

Para la fabricación de las membranas se usó un equipo de electrohilado conectado a una fuente de voltaje de alta tensión Vogar LAN-13 de 24 fases, una bomba de inyección marca KD Scientific, y un colector tipo *air gap* fabricado en el Laboratorio de Polímeros y Materiales. La solución se cargó en una jeringa con una aguja de acero inoxidable calibre 9 G, como capilar. Se probaron velocidades de inyección de la solución polimérica de 0.05 a 0.4 ml/h. El voltaje aplicado entre la aguja y el colector fue de 8.5 hasta 18 kV y la distancia entre la punta de la agua y el colector varió entre 8 y 15 cm. El electrohilado se llevó a cabo a temperatura ambiente, y empleando una separación de los electrodos (*gap*) de 2 cm en el caso de la configuración *air gap*.



En la Tabla 6.1 se presentan los diferentes solventes empleados y los parámetros del equipo de electrohilado que se usaron para el electrohilado de las disoluciones PVA/cosolvente (PVA-CSS) a diferentes concentraciones, sin adicionar la TTC.

Es de suma importancia determinar los parámetros adecuados para lograr la obtención de nanofibras de buena calidad, con la menor cantidad de defectos y homogéneas para la correcta distribución de antibiótico.

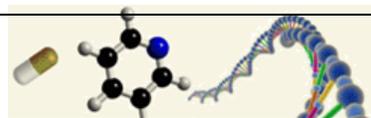
Tabla 6.1. *Parámetros de electrohilado con los diferentes solventes utilizados.*

COSOLVENTE	Parámetros de Electrohilado			
	GAP (cm)	VOLTAJE (kV)	FLUJO (ml/h)	DISTANCIA (cm)
Agua	2 cm	10.1	0.4	12
Acetona	2 cm	8.5	0.2	11
Etanol	2 cm	8.5	0.3	13
Metanol	2 cm	8.4	0.3	14
Isopropanol	2 cm	9.1	0.3	13.5

Preparación de la disolución de PVA-ETOH-TTC

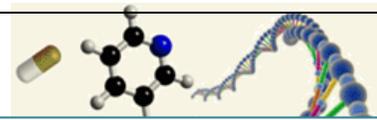
Para esta disolución primero se prepara un vial con 2 ml de alcohol etílico absoluto y se añadieron 0.03 g de TTC previamente pesados. Se debe proteger de la luz en todo momento con papel aluminio y mantener en agitación magnética constante durante 12 h hasta que la solución de TTC sea completamente homogénea.

En un vial colocó un volumen de 10 ml de PVA 8%p/v, se mantuvo a 60 °C, y posteriormente se adicionó la disolución de TTC-ETOH; se colocó en agitación magnética constante hasta obtener una mezcla homogénea (30 min). Las disoluciones compuestas PVA-ETOH-TTC se utilizaron en fresco, a temperatura ambiente.



ESPECTROSCOPIA INFRARROJO (FTIR):

La estructura química de las nanofibras obtenidas, se determinaron mediante Espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier usando la técnica de Reflectancia Total Atenuada en un espectrofotómetro Nicolet iS10 de Thermo Scientific



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO POR EMISIÓN DE CAMPO.

SISTEMAS DE DISOLVENTES CON PVA

El PVA es un polímero altamente electrohilable, a partir de sus disoluciones acuosas es posible la obtención de colecciones de nanofibras de alta calidad, en términos de uniformidad y distribución de diámetro. En la Figura 7.1 se presenta la microestructura de las nanofibras de PVA obtenidas mediante el procesamiento de disoluciones acuosas de PVA 10% p/v empleando la configuración de electrohilado convencional. Se observan colecciones de nanofibras depositadas de forma aleatoria y de alta calidad, sin la presencia de los defectos característicos denominados “perlas”. De acuerdo al histograma mostrado en la Figura 7.1, la distribución de tamaño de diámetros no es muy amplia, variando desde 90 nm hasta 140 nm, con diámetro promedio de 112 nm. Estas nanofibras se obtuvieron empleando los siguientes parámetros del equipo: voltaje de 10.1 kV, a una distancia de trabajo de 13 cm y una velocidad de flujo de 3.0 mL/h; con una apertura del *gap* de 2 cm a temperatura ambiente.

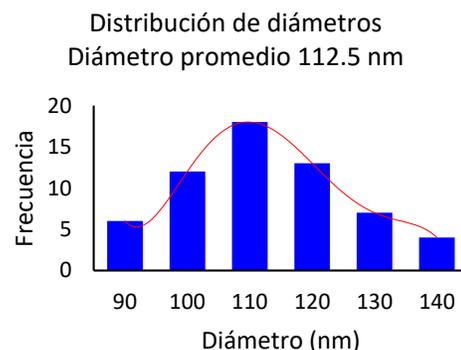
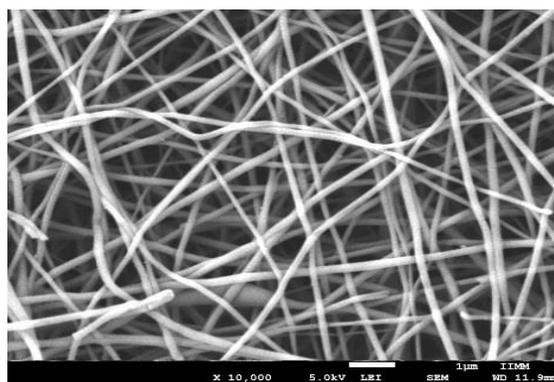
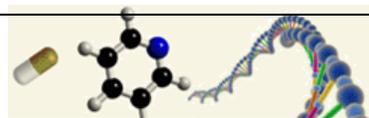


Figura 7.1. Colección de nanofibras de PVA e histograma de distribución de diámetro.



Debido a la limitada solubilidad de la TTC, para la incorporación del antibiótico a las disoluciones a electrohilar para la obtención de nanofibras de PVA cargadas con TCC (PVA-TTC), se emplearon volúmenes discretos de disolventes (en proporción 1:6 respecto al volumen de PVA acuoso), tales como: etanol, metanol, acetona e isopropanol; los cuales, además de proveer un adecuado entorno dieléctrico y presentar alta velocidad de evaporación, facilitan la solubilidad del antibiótico. Por lo anterior, se estudió la influencia de los co-disolventes en la electrohilabilidad del PVA. En la Figura 7.2 se observan las microarquitecturas de PVA obtenidas a partir de las diversas mezclas de codisolventes. En las imágenes se puede observar que el uso de etanol promueve la obtención de colecciones de nanofibras de mejor calidad respecto a los demás disolventes empleados.

Este resultado, marcó la pauta para el estudio del procesamiento mediante electrohilado *air gap* para la obtención de las colecciones de nanofibras alineadas PVA-TTC. Así pues, se prepararon disoluciones de TTC (0.03 g) en 2 mL de etanol que posteriormente fueron adicionadas a disoluciones acuosas de PVA (10% p/v).

En la Figura 7.2 A, se muestra la microestructura de las nanofibras de PVA-acetona, la cual se generó empleando los siguientes parámetros de electrohilado: 8.5 kV, 0.3 ml/h de velocidad de inyección, una distancia de trabajo de 11 cm, temperatura ambiente y empleando una solución polimérica de PVA al 10% p/v en una relación 1:6 de acetona. Se pueden observar muchas nanofibras rotas y de diámetro variable, con escasa formación de defectos (“perlas”), disposición aleatoria, y por lo tanto muy baja alineación. Estos defectos pueden deberse al bajo peso molecular/concentración del polímero, baja viscosidad, y alta tensión superficial o baja densidad de carga [62]. Se puede concluir que, a bajas concentraciones y alta la fuerza eléctrica generada, el polímero solidifica de manera muy rápida y se acumula en forma de perlas o gotas dispersas a una de las nanofibras esencialmente libre de gotas. Esto ocurre debido a un insuficiente enmarañamiento de cadenas en la solución, donde la concentración crítica inicial está por debajo en la concentración [25].

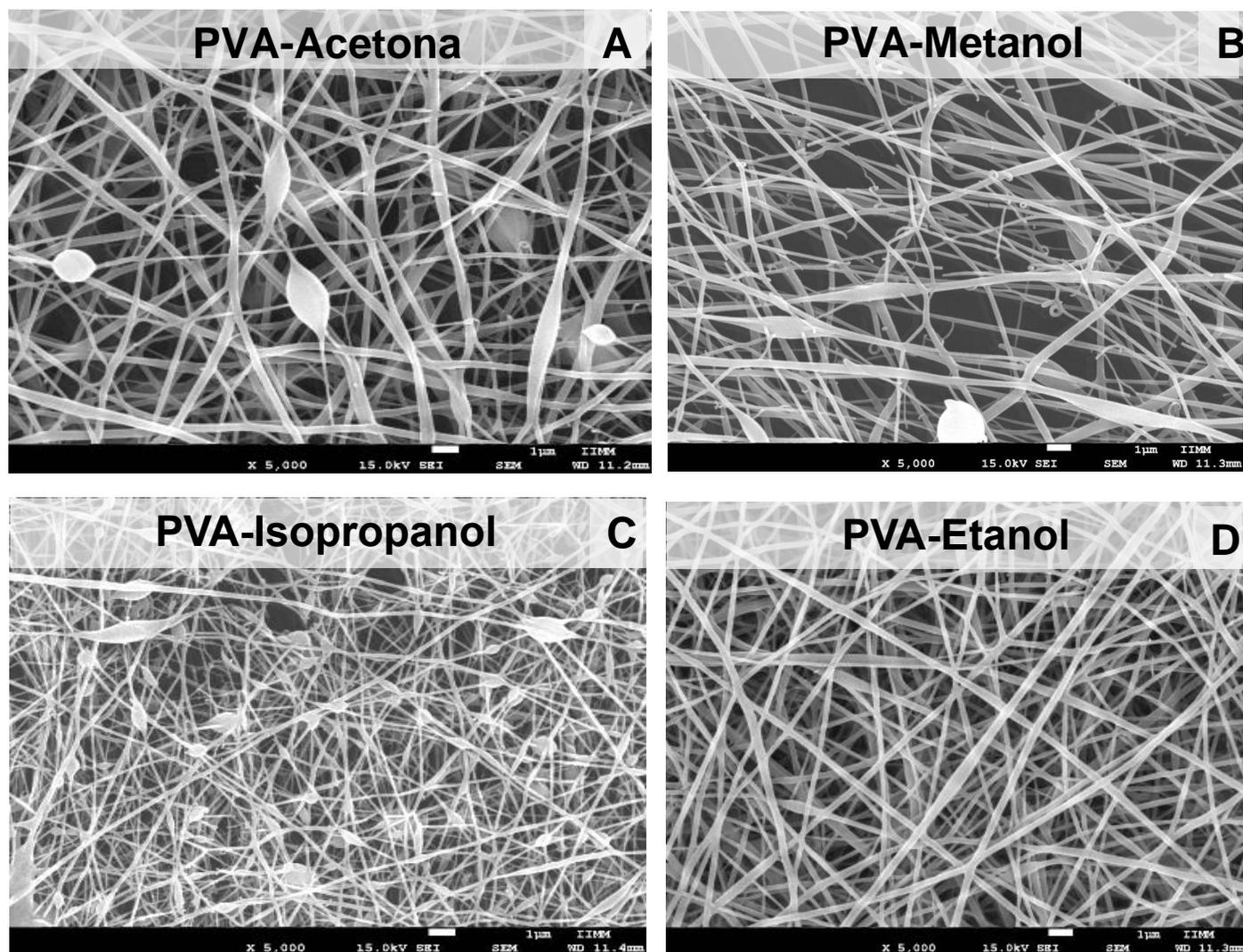
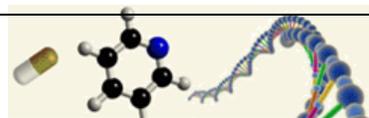
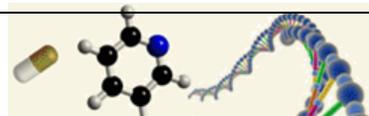


Figura 7.2. Microestructura de las nanofibras producidas mediante electrohilado convencional de disoluciones acuosas de PVA 10% p/v/CSS en proporción 1:6 para A) Acetona B) Metanol, C) Isopropanol y D) Etanol.

Del análisis de la Figura 7.2 B, con la adición de metanol se observa una estructura de nanofibras interconectadas más homogéneas debido a que se incrementó la distancia de trabajo a 14 cm, la cual influye directamente en la morfología de las mismas. De esta manera la solución se depositó a 9 kV, 0.3 ml/h, empleando la solución polimérica de PVA al 10% p/v en relación 1:6 de metanol. Se pueden observar muchas nanofibras rotas con algunas imperfecciones en su estructura, sin llegar a formar defectos en forma de perlas, esto debido al balance

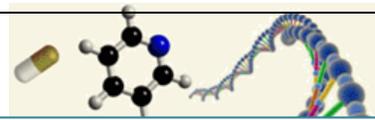


adecuado entre las fuerzas electrostáticas y la tensión superficial de la solución del polímero que causa interacciones entre los chorros primarios, y las nanofibras se forman antes de llegar al colector. Sin embargo, también se puede notar una mejor alineación con respecto a la estructura de las nanofibras obtenidas empleando acetona, indicando con esto que las nanofibras depositadas en el colector contienen menor humedad a comparación con la anterior, esto debido a que la distancia aumenta entre aguja y colector y que la solución posee mayor constante dieléctrica ya que valores elevados de esta, reduce la posibilidad de generar gotas en las nanofibras [63].

Con el empleo de isopropanol (ver Figura 7.2 C) se genera una microestructura con algunos defectos evidentes. Esta colección se obtuvo empleando una solución de PVA al 10% p/v en una relación 1:6 respecto del isopropanol, se depositó a 9 kV, 0.3 ml/h y una distancia de trabajo de 13.5 cm. Se pueden observar abundantes nanofibras rotas de diámetro similar, con prevalencia aleatoria y por lo tanto muy poca alineación. Sin embargo, a simple vista es posible notar que la distancia de trabajo cumple un papel muy importante en la morfología de las nanofibras debido a la incompleta evaporación del solvente. En este caso, el aumento en el voltaje y la viscosidad de la disolución mejora significativamente la morfología de las nanofibras.

Finalmente, para la disolución de PVA- etanol se decidió aumentar el voltaje a 9.7 kV, manteniendo la velocidad de inyección en 0.3 ml/h y una distancia de trabajo de 13 cm, con la concentración de la solución polimérica de PVA al 10% p/v en una relación 1:6 respecto del metanol. En general, se aprecian nanofibras lineales, homogéneas, interconectadas y delgadas, no se observan defectos, y los diámetros son uniformes tal y como se aprecia en la imagen 7.2 D.

Los histogramas que muestra la distribución de diámetros de las nanofibras obtenidas empleando los diferentes disolventes se muestran en la Figura 7.3. Se observa que con el empleo de acetona, los diámetros se encuentran entre 120 a 220 nm, con diámetro promedio de 150 ± 30 nm (Figura 7.3 A). Con el empleo de



metanol la distribución de los diámetros presenta mejores características, ya que poseen diámetros menores (entre 40 y 110 nm, con un diámetro promedio de 78 ± 18 nm), como se aprecia en la Figura 7.3 B.

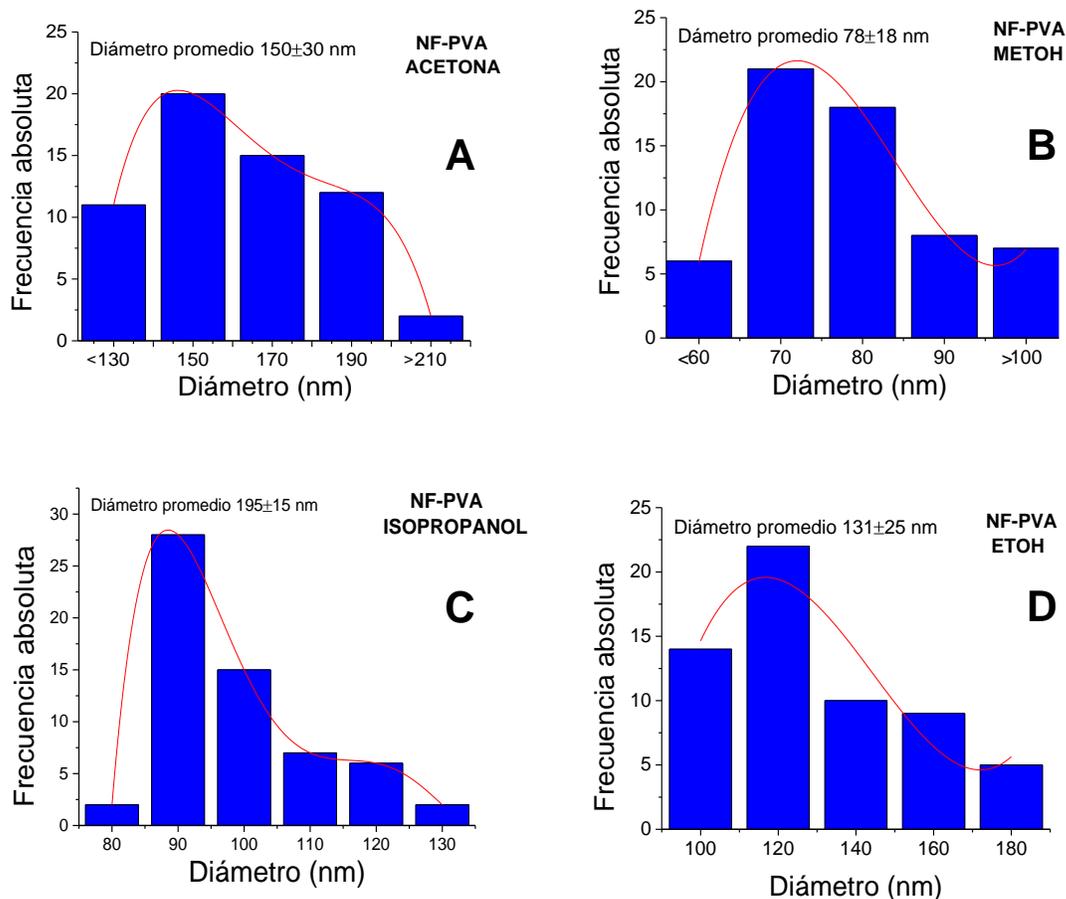
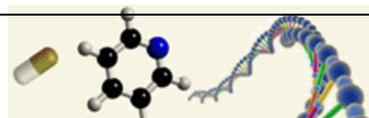


Figura 7.3. Distribución del diámetro de las nanofibras empleando los diferentes co-disolventes.

Nota: el disolvente se indica en la leyenda del gráfico.

Por su parte, el empleo de isopropanol genera nanofibras con diámetros entre 70 a 130 nm, con un diámetro medio de 95 ± 15 nm, como se observa en la Figura 7.3 C. Las nanofibras son más delgadas debido a la baja concentración y viscosidad de la solución, sin embargo, presentan mayor distribución de diámetro promedio. Finalmente, la distribución de los diámetros de las nanofibras empleando metanol se encuentran entre 100 y 190 nm, con diámetro medio de 131 ± 25 nm tal como se presenta en la Figura 7.3 D.



La alta concentración del PVA (10 %p/v) permite obtener diámetros promedio aceptables. Con este resultado es posible 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 ejercen un efecto importante en la formación de las nanofibras.

A partir del análisis microestructural y de los parámetros de electrohilado de las nanofibras obtenidas a partir de las disoluciones 1:6 de PVA (10% p/v):codisolvente, sin ser cargadas con la TTC, se observó que el etanol es el codisolvente que genera las nanofibras de mayor calidad, por lo que se procedió al electrohilado de disoluciones de PVA acuoso, PVA:etanol (PVA_{EtOH}) 10:2 v/v y PVA:etanol cargadas con TTC (PVA_{EtOH}-TTC) disolviendo la TTC en etanol y posteriormente agregando esta disolución al PVA tal como se describió en el apartado 6.2; empleando la configuración *air gap* para el análisis de la influencia de los parámetros, tanto de la disolución como de los parámetros del proceso, para la generación de colecciones de nanofibras alineadas y cargadas con el antibiótico.

Las disoluciones fueron electrohiladas utilizando una distancia de trabajo 11 cm, apertura del *gap* de 2 cm, velocidad de flujo 0.3 ml/h y operando a temperatura ambiente. Las microestructuras obtenidas se muestran en la Figura 7.4, se aprecian atributos comparables al control de PVA puro (procesado sin codisolvente) entre las muestras PVA_{EtOH} y PVA_{EtOH}-TTC, en términos de interconectividad, porosidad, uniformidad de diámetro y ausencia de defectos. En los tres casos, las colecciones poseen una calidad sobresaliente.

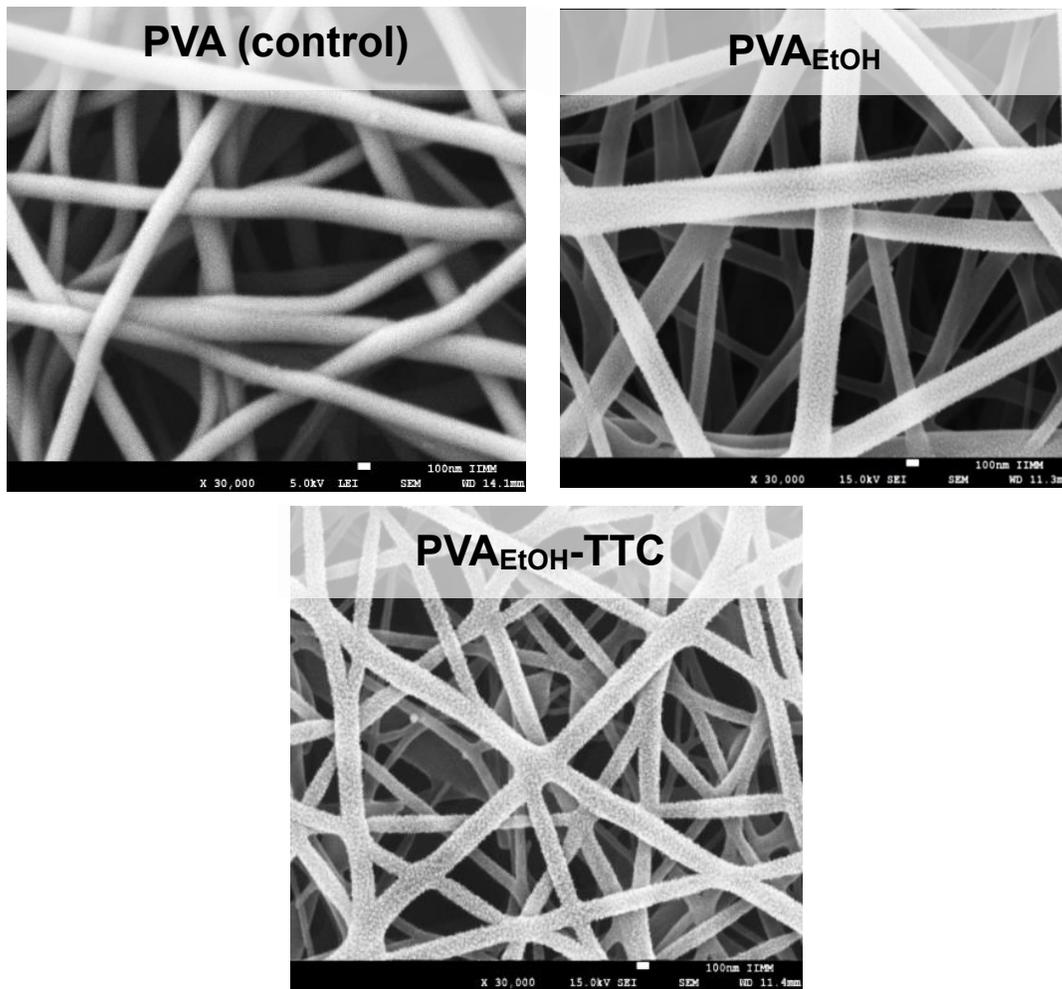
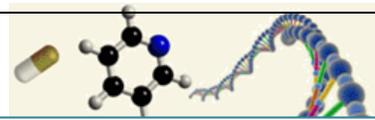
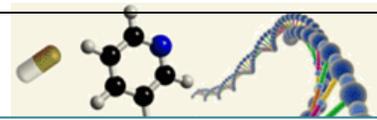


Figura 7.4. Colección de nanofibras de PVA, PVA_{EtOH} y del material PVA-TTC 10:2.

La determinación del grado de orientación suele basarse en el compendio de información cualitativa y cuantitativa que deriva del análisis de las microestructuras. Así, la información generada del estudio mediante FESEM es útil para calcular los porcentajes de alineación axial a partir de herramientas digitales. Para tales determinaciones, se emplearon las herramientas OrientationJ y Directionality del software ImageJ, el cual permite también la generación de mapas de distribución de intensidad mediante la transformada de Fourier rápida, o mapas FFT por sus siglas en inglés (Fast Fourier Transform). Los patrones de FFT de muestras con disposición aleatoria suelen presentar distribución circular, mientras que la distribución de intensidad de las muestras alineadas comúnmente es en forma



elíptica [64]. A partir de las imágenes de FE-SEM correspondientes a las muestras obtenidas mediante electrohialdo *air gap* se realizó el análisis de orientación, como se muestra en la Figura 7.5. Al momento, los mayores grados de orientación obtenidos son 45% y 33% para la colección de PVA_{EtOH} y $PVA_{EtOH-TTC}$, respectivamente. En ambos casos, los diagramas FFT presentan una distribución circular, tal y como se observa en la Figura 7.5.

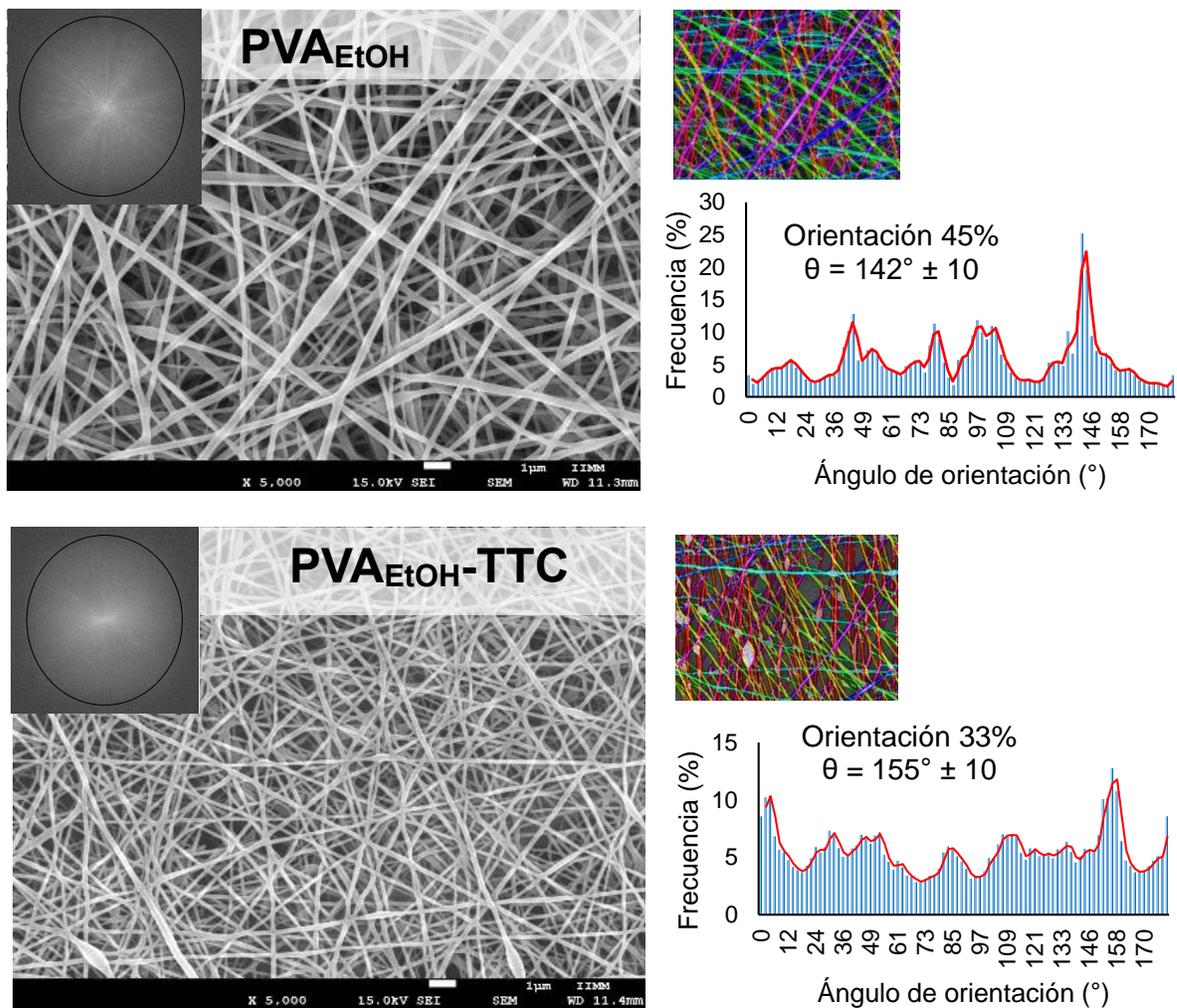
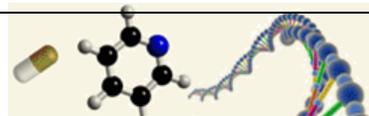


Figura 7.5. Análisis del grado de orientación de las nanofibras PVA_{EtOH} y $PVA_{EtOH-TTC}$ 10:2.



En las imágenes de FESEM de ambas muestras en de la Figura 7.5, se observan colecciones de nanofibras libres de defectos, sin embargo el histograma de orientación exhibe valores muy bajos. Del 45% y 33% respectivamente debido a las condiciones del electrohilado.

Analizando más a detalle la morfología de las colecciones de nanofibras de la disolución de PVA-ETOH-TTC, esta colección muestra nanofibras más homogéneas y con mayor interconectividad, esto se atribuye al incremento tanto la distancia de trabajo a 13 cm como el voltaje a 10.4 kV, esto empleando una velocidad de inyección de 0.3 ml/h, con la concentración de la solución polimérica de PVA al (10% p/v) en proporción 1:6 respecto del etanol conteniendo 0.03 g de TTC.

En la imagen 7.6 A, se puede observar que algunas zonas de esta colección exhibe una cantidad considerable de defectos; lo anterior es debido a la inestabilidad del jet polimérico como consecuencia de factores ambientales, temperatura y humedad (8-15°C, Hr= 60%), que repercuten directamente en la morfología de las nanofibras.

Sin embargo, también es posible notar la disposición con una mayor tendencia a la alineación, sobre todo en escala macroscópica después de 1 y 6 h de tiempo de trabajo, lo que se muestra en las Figuras 7.6 A2 y A3, respectivamente.

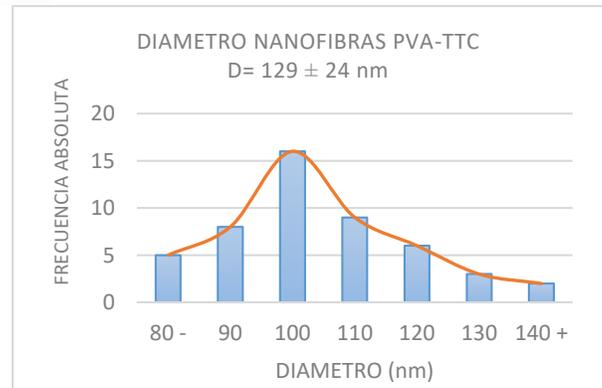
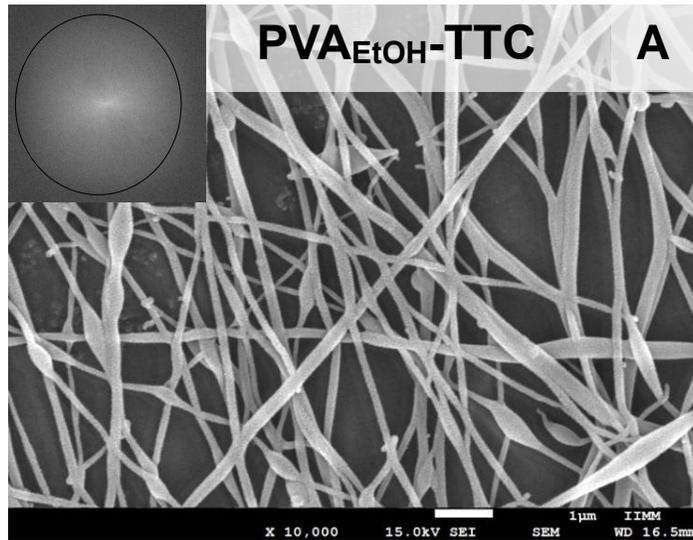
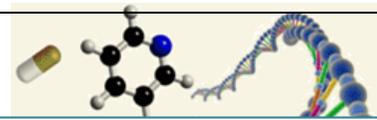
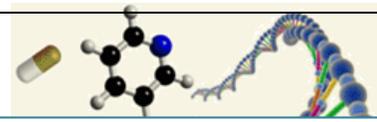


Figura 7.6. Colecciones de nanofibras PVA-ETOH-TTC 10:2 a 13 cm, 10.4 kV, 0.3 mL/h y 10 °C :
A) FESEM, A1) 1 h de proceso, A2) 6 h de proceso.

No obstante, al incrementar tanto el voltaje a 13.4 kV y la distancia de trabajo a 14 cm, con 0.3 ml/h de velocidad de inyección, y empleando la solución polimérica de PVA al 10% p/v en una relación 1:6 respecto del etanol cargado con TTC, se obtiene una microestructura más homogénea (Figura 7.7 A), esto fue posible debido a que la eyección de gotículas se minimizó. Adicionalmente, las condiciones ambientales de temperatura y humedad: 20-24°C; Hr=16.7%, favorecen la evaporación del disolvente, minimizando así la formación de defectos, incluso a



nivel macroscópico (Figura 7.7 A2). A su vez, el electrohilado bajo estas condiciones ambientales también influye en el grado de alineación, siendo inversamente proporcional al diámetro de las nanofibras.

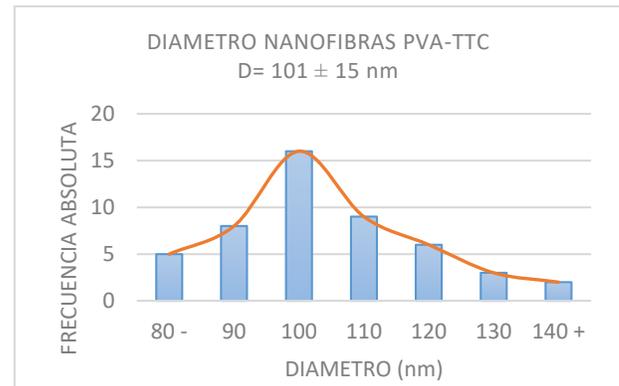
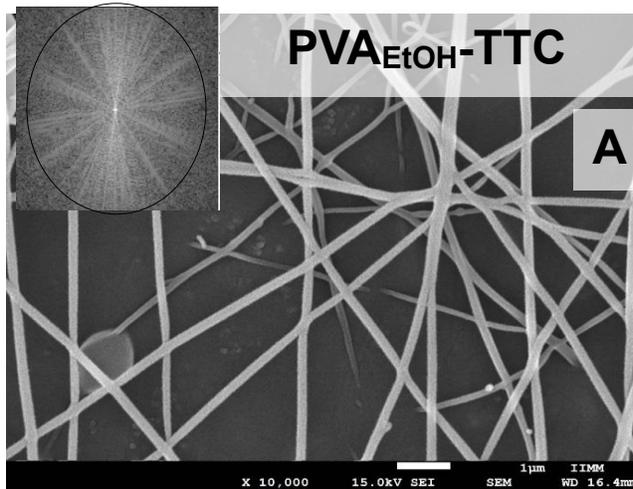


Figura 7.7. Colecciones de nanofibras PVA-ETOH-TTC 10:2 a 14 cm, 13.4 kV, 0.3 mL/h y 22°C :
A) FESEM, A1) 1 h de proceso, A2) 6 h de proceso.

Con respecto a la orientación, en la imagen 7.8 A se puede apreciar que las nanofibras alineadas de PVA-TTC electrohiladas a 10 C° presentaron una orientación del 91 %, con un ángulo de 103° y una desviación estandar de 23°. Por otro lado, al aumentar la temperatura del ambiente a 22 °C (aproximadamente) se obtienen mejores características, obteniendo el 88% de las nanofibras con un grado de alineación de 94° y disminuyendo la desviación estandar a 16° de acuerdo a la

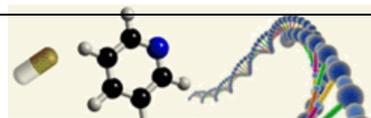


imagen 7.8 B en concordancia con los mapas de color que muestran gradientes de orientación predominante hacia 100° y 95° , respectivamente.

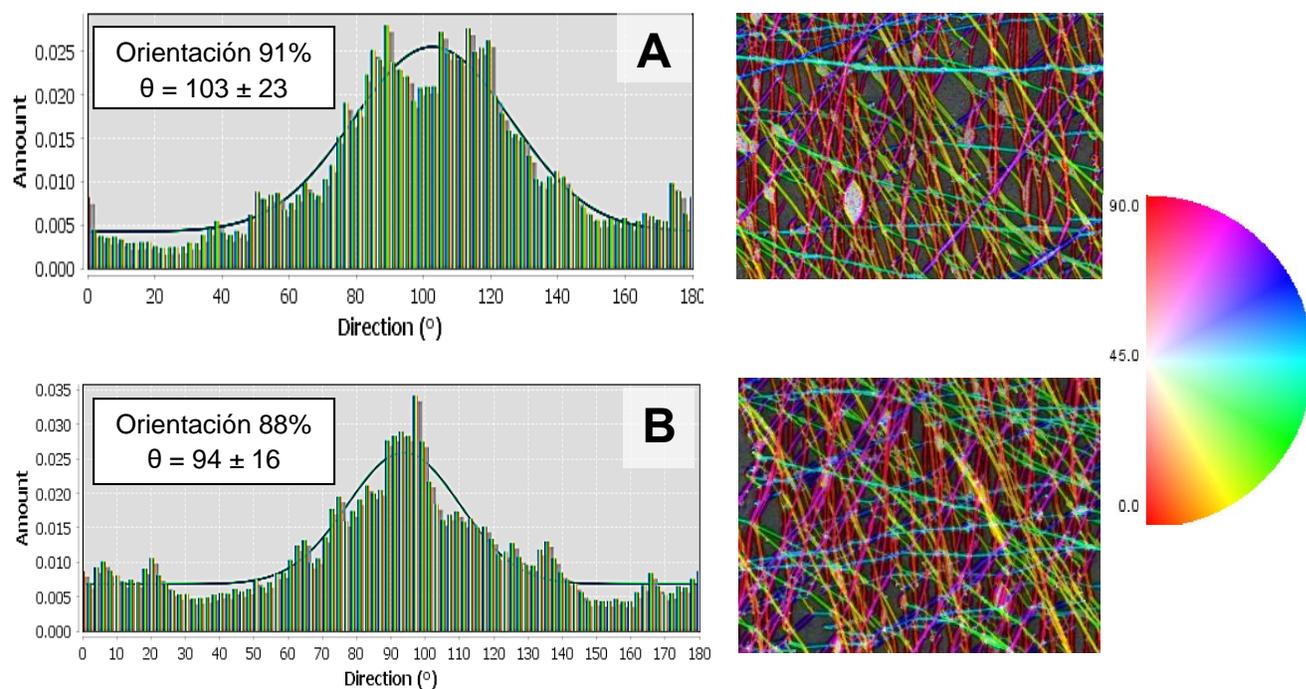
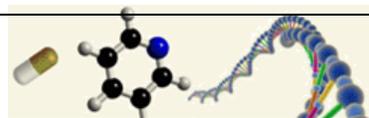


Figura 7.8. Histogramas de orientación y mapas de colores de las nanofibras PVA-ETOH-TTC 10:2
A) Obtenidas a 10 °C B) Obtenidas a 22 °C



7.2 CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE LA TTC

Generalmente, los sistemas de liberación controlada de drogas presentan un mecanismo de dosificación basado en la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica. La mayoría de formulaciones farmacéuticas se basan en este mecanismo para determinar la cinética de liberación de la droga, la cual podría presentar una combinación con otros mecanismos, como la degradación y/o erosión de la matriz polimérica.

El espectro de absorción UV-vis de TTC a pH 3 presenta tres bandas: a 220 nm (banda 1) asignada al sistema aromático D de la molécula, a 270 nm (banda 2) asignada al cromóforo del anillo A y a 357 nm (banda 3) correspondiente al cromóforo BCD (Figura 7.9). Este último cromóforo contribuye a los tres máximos de absorción [65].

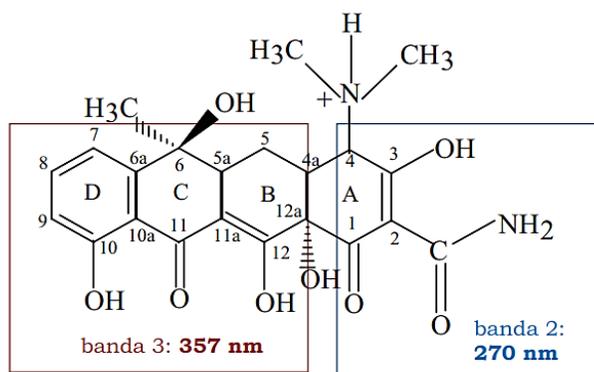


Figura 7.9. Bandas de UV visible características de la TTC.

En la Figura 7.10 A se presenta el espectro UV-vis de la solución de TTC-ETOH, el cual despliega las bandas características de TTC a 270 nm, correspondiente al sistema tricarbónico A y a 357 nm del cromóforo BCD [65]. Mientras que en el espectro de la Figura 7.10 B, se muestra un efecto directamente proporcional en el máximo de la banda de absorbancia respecto de la concentración de TTC.

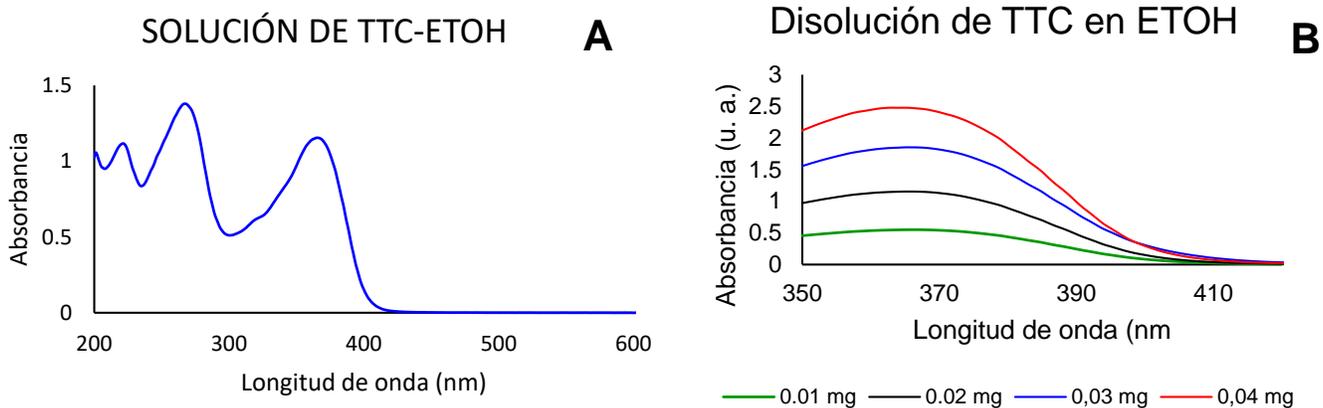
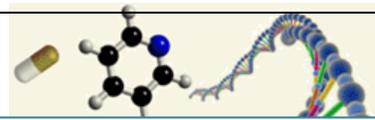


Figura 7.10. A) Bandas de UV visible características de la TTC. B) Influencia de la concentración de la TTC en la absorbancia.

El registro de la cinética de liberación, se llevó a cabo como se describe a continuación; se colocaron en inmersión las nanofibras de PVA-TTC aleatoria y alineada durante 48 h, cada una en un vial de 20 ml de etanol, tomando las lecturas de absorbancia mediante una alícuota de la solución de 20 mL, a los 5, 10, 20, 40, 60 y 120 min y 4, 12, 24 y 48 h. En lo que respecta a las nanofibras alineadas se puede observar en la Figura 7.11 un desplazamiento batocrómico de la banda 3 debida a la deprotonación de los grupos $-OH$ 11 y 12 a valores de pH superiores al pK_{a2} (7,7), pasando de 357 a 367 nm.

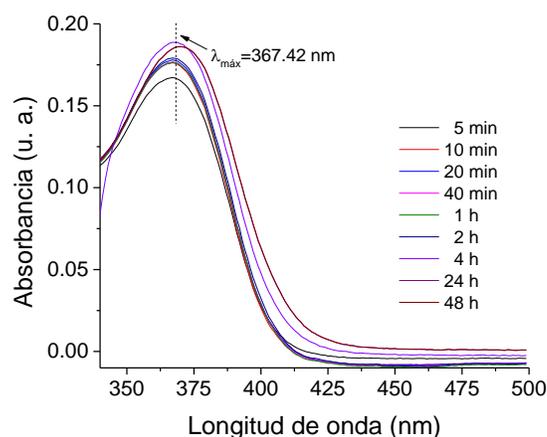
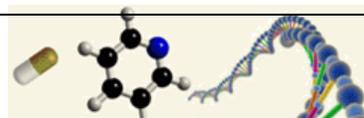


Figura 7.11. Espectros de absorción UV-vis de liberación en medio acuoso de la TTC a partir de las colecciones de nanofibras PVA-TTC.



En la Figura 7.12 se puede observar que la liberación de la TTC es constante en todo el proceso, siendo más rápida en las primeras 4 horas y posteriormente presenta una tasa de dosificación sostenida. La cinética de liberación en estos andamios es lenta debido a la configuración estructural de las nanofibras, la alineación permite un mayor control en la liberación de la TTC a través de la matriz polimérica.

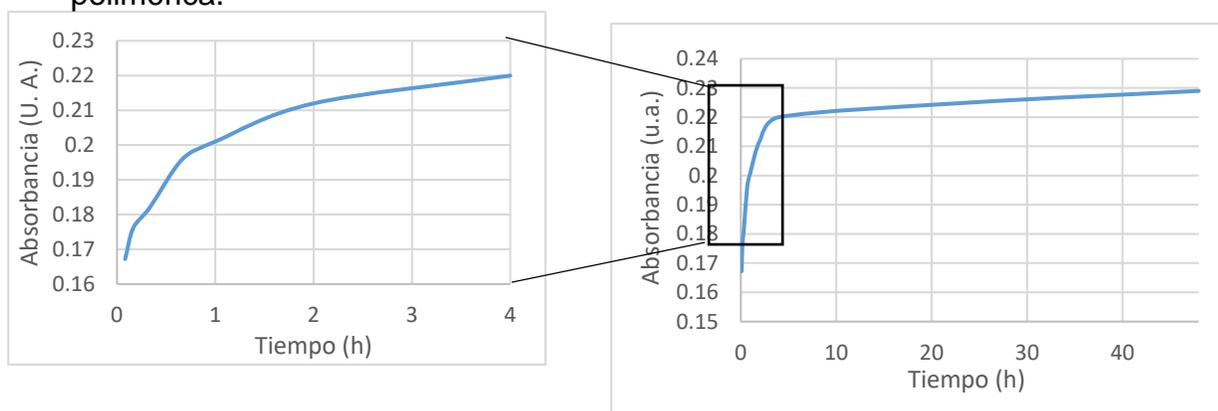


Figura 7.12. Bandas de UV visible de liberación de TTC de las nanofibras alineadas.

A diferencia de las nanofibras alineadas, las dispuestas aleatoriamente presentan una liberación constante pero más rápida hasta las 24 horas. Posteriormente, la concentración del fármaco logra mantenerse estable como se observa en la Figura 7.13. Esto sucede debido a la menor densidad y un tamaño de poro aumentado a comparación de las nanofibras alineadas [40].

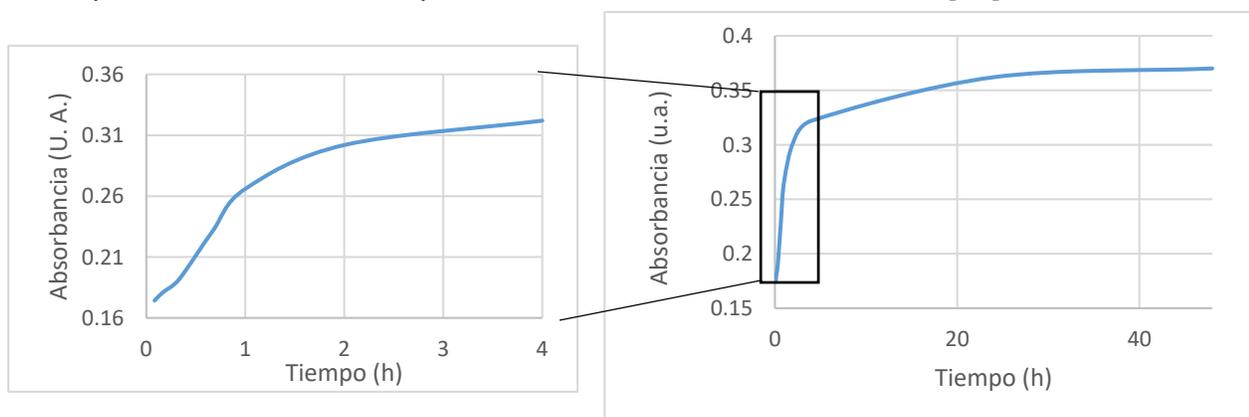
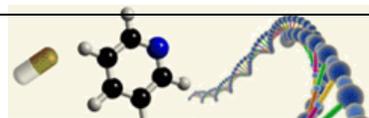


Figura 7.13. Bandas de UV visible de liberación de TTC de las nanofibras aleatorias.



Finalmente, se puede concluir que el perfil de liberación de las nanofibras aleatorias presenta una tasa de dosificación mayor, lo que se atribuye a que la TTC se encuentra presente de manera superficial en la nanofibras. Mientras para las nanofibras alineadas la distribución es más homogénea y la dosificación más sostenida. La cinética de liberación de la TTC es similar en ambos casos; a las primeras horas se alcanza una liberación rápida de la TTC, y a partir de ahí comienza a mantenerse estable. Sin embargo, las nanofibras aleatorias liberan mayor cantidad del fármaco, mientras que en las nanofibras alineadas se libera más lento (Figura 7.14).

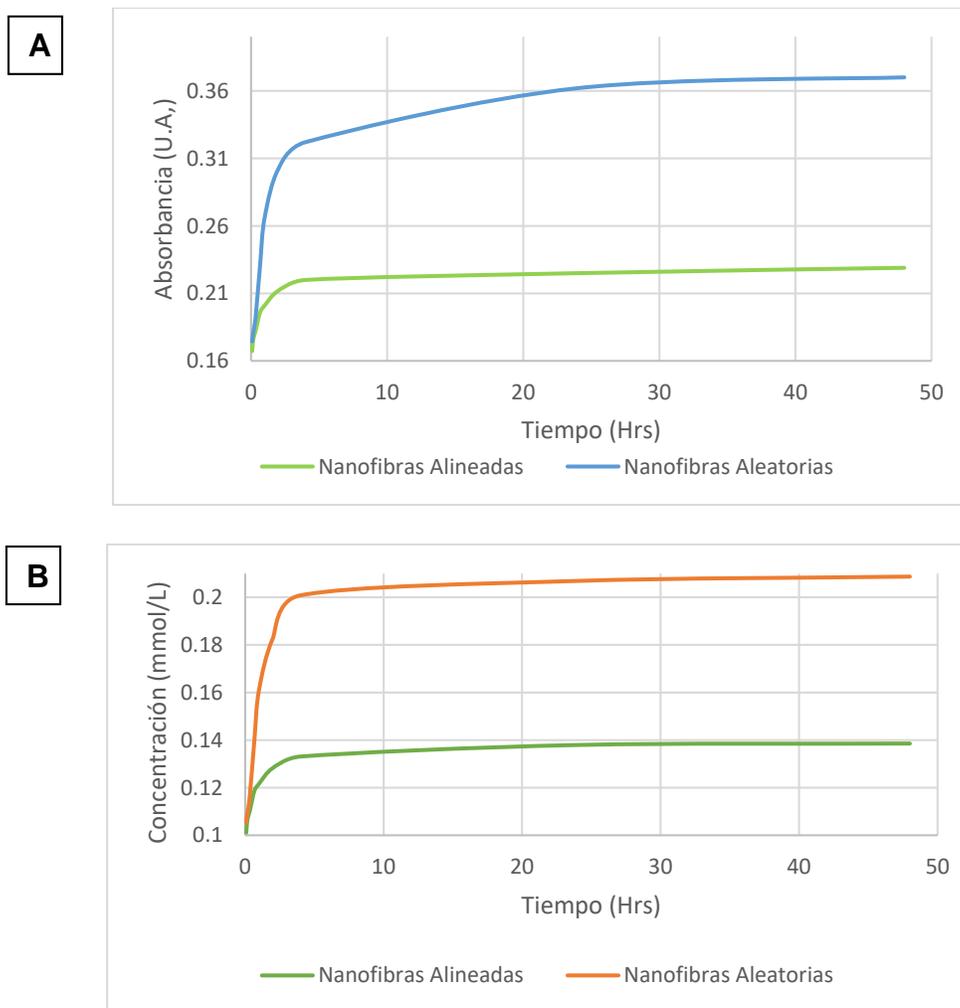
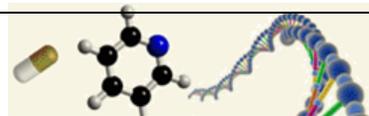


Figura 7.14. Bandas de UV visible de liberación de TTC de las nanofibras alineadas y aleatorias en referencia a A) Absorbancia B) Concentración



7.3 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

Se ha observado en la literatura que los sistemas de transporte de fármacos con base en nanotecnología, son más eficaces que los sistemas convencionales[66][67]. Uno de los aspectos más importantes de las técnicas de procesamiento para la obtención de materiales en forma de nanofibras, es que el polímero contenga el fármaco, pero además que mantenga su bioactividad

Las nanofibras de PVA-TTC-ETOH fueron evaluadas para determinar su actividad antimicrobiana *in vitro* mediante una prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar, utilizando para ello cepas microbianas: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus sp*; se emplearon dos controles, uno positivo (sensidiscos comerciales de TTC) y uno negativo (nanofibras de PVA sin TTC). La prueba se mantuvo durante 24, y 48 h, transcurrido el tiempo, se determinó el diámetro de los halos de inhibición.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Staphylococcus aureus

El ensayo en *Staphylococcus aureus* a 48 h de incubación (Figura 7.15) permitió observar que la prueba con las nanofibras de PVA alineadas o aleatorias sin TTC no presentaron inhibición del crecimiento bacteriano, mientras que el control del sensidisco de TTC mostró un halo de inhibición de 23 milímetros, mientras que las nanofibras alineadas de TTC presentaron un halo sensible de inhibición de 25 mm. Esto evidencia ésta cepa es sensible al antibiótico al tener la Concentración mínima inhibitoria ($\leq 4 \mu\text{g/mL}$ o $\geq 19 \text{ mm}$, de acuerdo a las guías CLSI) necesaria, siendo ambas efectivas para inhibir el crecimiento bacteriano.

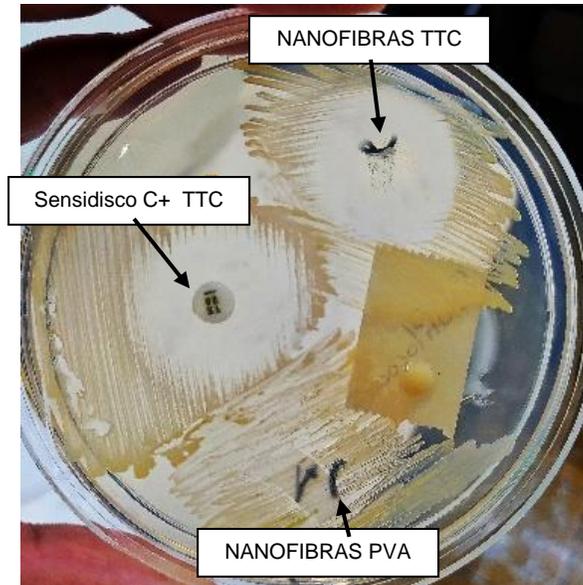
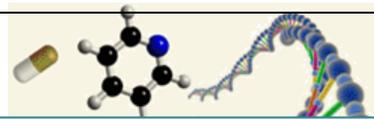


Figura 7.15. Test de zona de inhibición de *Staphylococcus aureus* en agar EMB.

Klebsiella pneumoniae

Para el ensayo con *Klebsiella pneumoniae* a 24 h de incubación (Figura 7.16), se puede observar que las nanofibras de aleatorias de PVA-TTC la inhibición pequeño (10 mm) por lo que presentan resistencia. Por su parte, tanto el sensidisco de TTC como las nanofibras alineadas de PVA cargadas con TTC presentaron un halo de inhibición sensible, el cual tiene una circunferencia bien delimitada similar de 15.5 cm respecto a la cepa bacteriana, por lo que ambos son sensibles ($\leq 3 \mu\text{g/mL}$ o ≥ 14 mm).

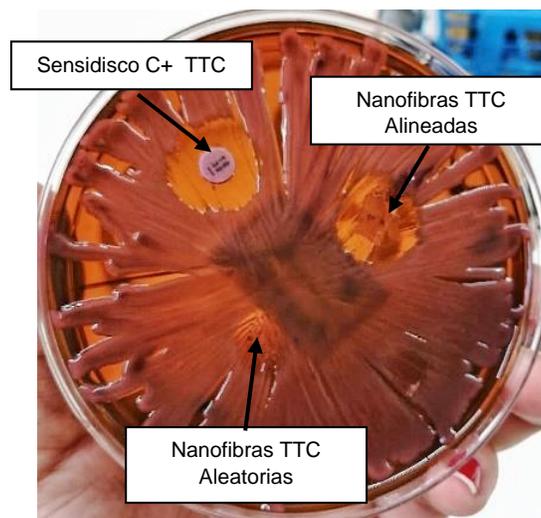
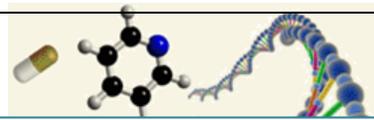


Figura 7.16. Test de zona de inhibición de *Klebsiella pneumoniae* en agar EMB.



Streptococcus sp

El ensayo con Streptococcus sp a 72 h de incubación (Figura 7.17) permitió observar que tanto el sensidisco de TTC (control positivo), las nanofibras aleatorias de PVA y el control negativo no presentaron inhibición del crecimiento bacteriano, mientras que las nanofibras alineadas presentan un halo de inhibición muy pequeño de 7 mm. Aun así la cepa es resistente a no tener la distancia de inhibición suficiente. ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$ o $\geq 23 \text{ mm}$).

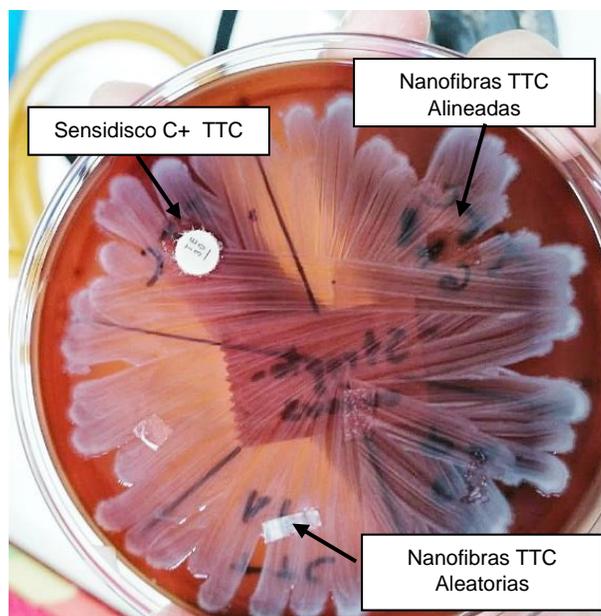
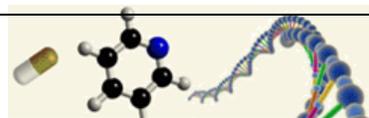


Figura 7.17. Test de zona de inhibición de Streptococcus sp en agar sangre de carnero.



7.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJO (FT-IR)

Se realizó el análisis mediante espectroscopia FT-IR para determinar la incorporación de TTC cargada en las nanofibras. En la figura 7.18 se presentan los resultados:

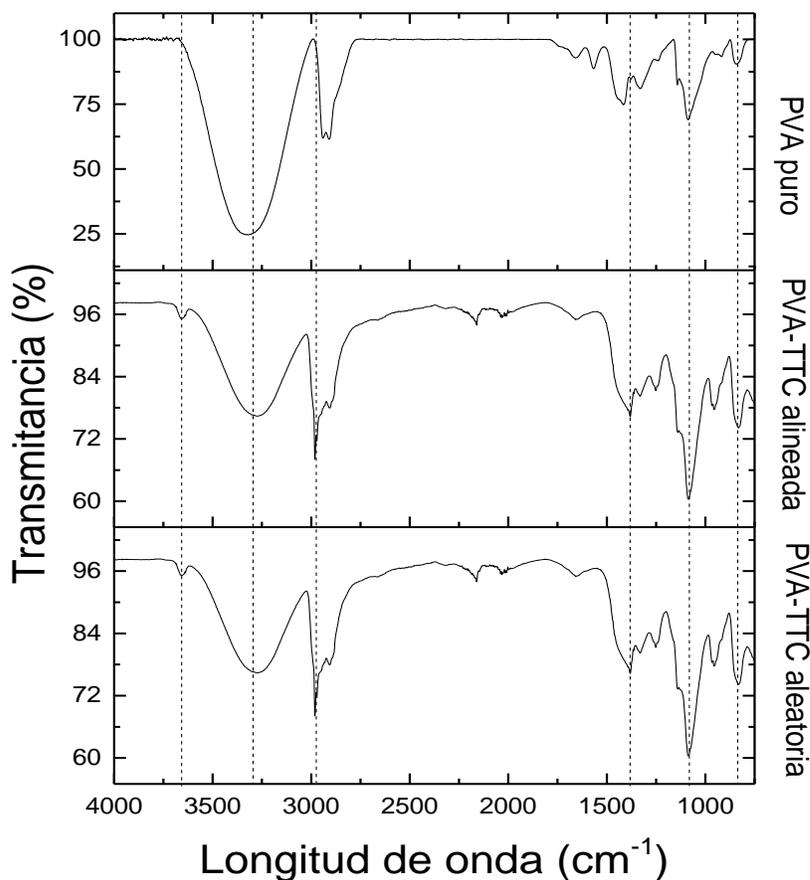
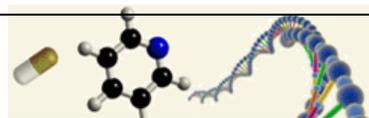
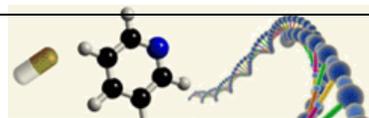


Figura 7.18. Espectro FT-IR de las nanofibras de PVA y PVA-TTC alineada y aleatoria.

El espectro FT-IR típico de PVA presenta las vibraciones características del grupo -OH entre 3674 y 2995 cm^{-1} , en 2927 cm^{-1} la vibración del estiramiento asimétrico del enlace C-H y simétrico en 2877 cm^{-1} , en 1070 cm^{-1} aparece la vibración de estiramiento del enlace C-O , y en 848 cm^{-1} la vibración fuera del plano del grupo O-H [68,69].



En cuanto a las nanofibras, el espectro es similar dado que ambas contienen TTC; la muestra alineada no presenta alguna diferencia respecto a la aleatoria debido a que sólo se está haciendo un cambio de organización del material, no un cambio en la composición química. Los espectros son divididos en tres regiones para su descripción: la región por arriba de 3000 cm^{-1} incluyen bandas relacionadas con grupos hidroxilos y amino, la región dividida entre 3000 y 1500 cm^{-1} incluyen vibraciones de extensión grupos acilo, carbonilos y alquenos; la región por debajo de 1500 cm^{-1} se caracteriza principalmente por regiones de extensión de grupos acilo y diversos grupos funcionales, la región por debajo de 1500 cm^{-1} como región de la huella digital porque es específica para un compuesto. Presenta las vibraciones de extensión características del grupo -OH entre 3674 y 2995 cm^{-1} [70]. La vibración del estiramiento asimétrico del enlace C-H y simétrico en 2900 cm^{-1} , en 1400 cm^{-1} vibración de extensión del enlace C-O, en 950 cm^{-1} vibración de flexión del enlace C-O-H y en 1050 cm^{-1} y 850 aparece la vibración de flexión fuera del plano del enlace C=C-H. Ello de acuerdo a las señales correspondientes a la tetraciclina incorporada [70-71].



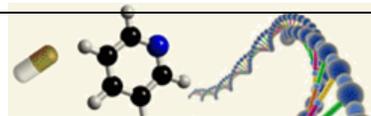
8. CONCLUSIONES

Se establecieron los parámetros óptimos para la obtención de nanofibras alineadas de PVA-TTC-ETOH mediante la técnica de electrohilado *air gap*. Estas colecciones de nanofibras son efectivas y altamente reproducibles. El uso de cosolventes permitió disolver la tetraciclina al ser poco miscible en agua, lo cual favoreció el proceso de electrohilado de una mezcla homogénea de los componentes. Del análisis de los parámetros de electrohilado, se observó que tres de ellos son de gran relevancia para la obtención de nanofibras de buena calidad; la concentración de la solución polimérica, voltaje aplicado y distancia de trabajo, además de la interacción de la TTC con los cosolventes.

A partir del análisis de la estructura mediante FESEM se observó que el disolvente que promueve la obtención de nanofibras de mayor calidad es el etanol, de tal forma que las nanofibras alineadas de PVA-TTC-ETOH poseen una estructura homogénea con una superficie lisa, orientación alineada y tamaños promedio de diámetros de 101 nm, a diferencia de las nanofibras aleatorias, las cuales tienen diámetros y orientación irregulares. Además se obtuvieron 88% de las nanofibras con un grado de alineación de 94 ± 16 .

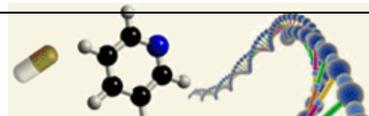
La cinética de liberación mostró que una tasa de liberación más lenta en las nanofibras alineadas de PVA cargadas con TTC, con un máximo de liberación a las 4 h, manteniendo una liberación eficaz y sostenida. A diferencia de las nanofibras aleatorias las cuales presentan una velocidad de liberación alta en los primeros minutos.

Tras realizar el ensayo del análisis del efecto antimicrobiano, se puede concluir que las nanofibras alineadas son activas sobre las cepas que indica la bibliografía, aunque esto depende de los factores de resistencia que presenten las bacterias. Las nanofibras alineadas con la TTC indujeron inhibición del crecimiento bacteriano en el ensayo de difusión en agar a 48 h en cultivos de *Klebsiella pneumoniae* y



Staphylococcus aureus superando el desempeño de las colecciones de nanofibras aleatorias; en *Streptococcus sp* no se presentó sensibilidad, esto puede deberse a que sea una especie resistente al antibiótico; lo que indica que los andamios de nanofibras de PVA alineadas, son candidatos para el tratamiento contra bacterias de amplio espectro, y de acuerdo a la dosificación, reducir el consumo de estos en un periodo de tiempo más extenso.

Finalmente, se han conseguido elaborar nanofibras alineadas y cargadas con un antibiótico, las cuales resultan novedosas como medio de liberación farmacológica. Esto representa una buena alternativa para conseguir una tasa de dosificación más sostenida, y por lo tanto disminuir algunos de los efectos adversos que pueden presentar al ingerir los fármacos habituales.



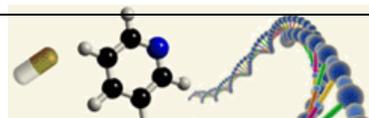
9. RECOMENDACIONES

Esta investigación deja en claro que los estudios con biomateriales deben de continuar, con el objetivo de encontrar nuevas alternativas a las ya existentes; o bien, mejorar y modificar técnicas que permitan coadyuvar a la mejora tecnológica en cualquier ámbito. Los resultados propuestos son muy prometedores ya que permiten introducirse más profundamente en investigaciones del desarrollo de andamios y/o sistemas de liberación para su aplicación en biomedicina.

Usar cosolventes con mayor constante dieléctrica que aquí empleados, con la intención de favorecer aún más el proceso de electrohilado y para reducir el diámetro de las nanofibras que constituyen al andamio. También, probar con diversos fármacos para una mayor aplicación en otras áreas de esta técnica.

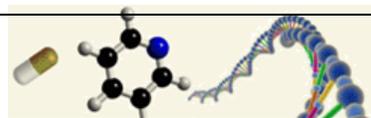
Se podría buscar un segundo polímero e implementar un electrohilado coaxial, cuya función sea proteger el fármaco de la degradación y de esta manera hacerlos más estables.

Es necesario estudiar más a detalle la cinética de liberación realizando el ajuste matemático para las nanofibras con el modelo Korsmeyer-Peppas ya que tiene en cuenta el fenómeno de difusión tipo Fickiano y el fenómeno de relajación de las cadenas poliméricas, esto nos permitirá calcular e interpretar las diferentes variables o constantes que describe o para analizar si podría estar involucrada más de un tipo de liberación en el sistema.

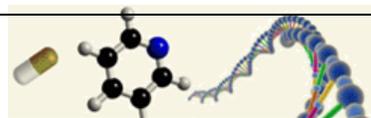


10. BIBLIOGRAFÍA

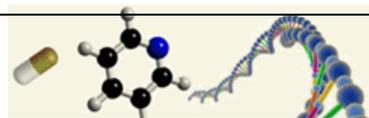
- [1] G.F. Brooks, K.C. Carroll, J.S. Butel, Jawetz, Melnick y Adelberg: microbiología médica ., McGraw-Hill Interamericana, 2014.
- [2] J.O. Zoppe, M.S. Peresin, Y. Habibi, R.A. Venditti, O.J. Rojas, Reinforcing poly (ϵ -caprolactone) nanofibers with cellulose nanocrystals, ACS Appl. Mater. Interfaces. 1 (2009) 1996–2004.
- [3] Á.P. Sánchez Cepeda, R. Vera-Graziano, E. de J. Muñoz-Prieto, E.Y. Gómez-Pachón, M.J. Bernad-Bernad, A. Maciel-Cerda, Preparación y caracterización de membranas poliméricas electrohiladas de policaprolactona y quitosano para la liberación controlada de clorhidrato de tiamina, Cienc. En Desarro. 7 (2016) 133–151.
- [4] Y. Yin, W. Su, J. Zhang, W. Huang, X. Li, H. Ma, M. Tan, H. Song, G. Cao, S. Yu, Separable Microneedle Patch to Protect and Deliver DNA Nanovaccines Against COVID-19, ACS Nano. 15 (2021) 14347–14359.
- [5] L. Wang, M.-W. Chang, Z. Ahmad, H. Zheng, J.-S. Li, Mass and controlled fabrication of aligned PVP fibers for matrix type antibiotic drug delivery systems, Chem. Eng. J. 307 (2017) 661–669.
- [6] G.C. Wood, S.D. Hanes, B.A. Boucher, M.A. Croce, T.C. Fabian, Tetracyclines for treating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia, Intensive Care Med. 29 (2003) 2072–2076.
- [7] N. Mendoza Patiño, A. Campos Sepúlveda, Actualidades farmacológicas-Tetraciclinas, Rev Fac Med UNAM. 51 (2008) 29–32.
- [8] V. Saez, E. Hernández, L. López, Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas, Rev. Iberoam. Polímeros. 4 (2003).
- [9] J.L.L. Garcia, Nuevos sistemas orales de liberación modificada, Schironia. 1 (2002) 63–71.



- [10] R. Taroco, V. Seija, R. Vignoli, TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica, n.d.
- [11] R. Langer, L.G. Cima, J.A. Tamada, E. Wintermantel, Future directions in biomaterials, *Biomaterials*. 11 (1990) 738–745.
- [12] R. Langer, N. Peppas, Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: a review, *J. Macromol. Sci. Macromol. Chem. Phys.* 23 (1983) 61–126.
- [13] V. Sáez, E.H. Laviña, L.J.S. Angulo, Sistemas de liberación controlada de medicamentos, *Rev. Iberoam. Polímeros*. 3 (2003) 16–35.
- [14] B. Soontornworajit, J. Zhou, M.P. Snipes, M.R. Battig, Y. Wang, Affinity hydrogels for controlled protein release using nucleic acid aptamers and complementary oligonucleotides., *Biomaterials*. 32 (2011) 6839–6849. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.074>.
- [15] Z. Wang, J. Xia, F. Cai, F. Zhang, M. Yang, S. Bi, R. Gui, Y. Li, Y. Xia, Aptamer-functionalized hydrogel as effective anti-cancer drugs delivery agents, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 134 (2015) 40–46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.06.031>.
- [16] V.I. Lozinsky, F.M. Plieva, Poly (vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments, *Enzyme Microb. Technol.* 23 (1998) 227–242.
- [17] N.C. Greenham, S.C. Moratti, D.D.C. Bradley, R.H. Friend, A.B. Holmes, Efficient light-emitting diodes based on polymers with high electron affinities, *Nature*. 365 (1993) 628–630.
- [18] A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 18–23.
- [19] K. Smetana Jr, J. Šulc, Z. Krčová, Physicochemical aspects of the giant multinucleate cell formation, *Exp. Mol. Pathol.* 47 (1987) 271–278.

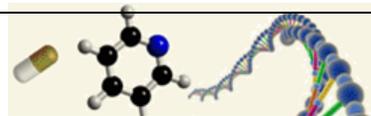


- [20] M.R. Battig, B. Soontornworajit, Y. Wang, Programmable release of multiple protein drugs from aptamer-functionalized hydrogels via nucleic acid hybridization, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 12410–12413.
- [21] N.A. Peppas, P. Bures, W.S. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 27–46.
- [22] A. Arredondo Peñaranda, M.E. Londoño López, HIDROGELES: POTENCIALES BIOMATERIALES PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE MEDICAMENTOS , *Rev. Ing. Biomédica* . 3 (2009) 83–94.
- [23] M.D. Blanco, O. García, R. Olmo, J. Teijón, I. Katime, Release of 5-fluorouracil from poly (acrylamide-co-monopropyl itaconate) hydrogels, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 680 (1996) 243–253.
- [24] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T. Yong, Z. Ma, R. Ramaseshan, Electrospun nanofibers: solving global issues, *Mater. Today.* 9 (2006) 40–50.
- [25] S. Ramakrishna, An introduction to electrospinning and nanofibers, World Scientific, 2005.
- [26] W.J. Morton, Method of dispersing fluids., (1902).
- [27] J. Doshi, D.H. Reneker, Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *J. Electrostat.* 35 (1995) 151–160.
- [28] G.I. Taylor, Disintegration of water drops in an electric field, *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.* 280 (1964) 383–397.
- [29] T.J. Sill, H.A. von Recum, Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering., *Biomaterials.* 29 (2008) 1989–2006. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.011>.
- [30] N. Bhardwaj, S.C. Kundu, Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique., *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 325–347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>.
- [31] H. Fong, I. Chun, D.H. Reneker, Beaded nanofibers formed during

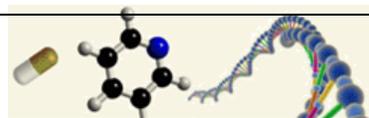


electrospinning, *Polymer (Guildf)*. 40 (1999) 4585–4592.

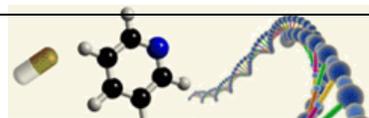
- [32] J. Tao, S. Shivkumar, Molecular weight dependent structural regimes during the electrospinning of PVA, *Mater. Lett.* 61 (2007) 2325–2328.
- [33] Y.M. Shin, M.M. Hohman, M.P. Brenner, G.C. Rutledge, Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities, *Polymer (Guildf)*. 42 (2001) 9955–9967.
- [34] A. Greiner, J.H. Wendorff, Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers, *Angew. Chemie Int. Ed.* 46 (2007) 5670–5703.
- [35] Z.-M. Huang, Y.Z. Zhang, S. Ramakrishna, C.T. Lim, Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers, *Polymer (Guildf)*. 45 (2004) 5361–5368.
- [36] J. Venugopal, S. Ramakrishna, Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 125 (2005) 147–157.
- [37] S. Kajdič, O. Planinšek, M. Gašperlin, P. Kocbek, Electrospun nanofibers for customized drug-delivery systems, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 51 (2019) 672–681.
- [38] P. Patrojanasophon, S. Tidjarat, P. Opanasopit, T. Ngawhirunpat, T. Rojanarata, Influence of nanofiber alignment on the release of a water-soluble drug from cellulose acetate nanofibers, *Saudi Pharm. J.* 28 (2020) 1210–1216.
- [39] M. Eslamian, M. Khorrami, N. Yi, S. Majd, M.R. Abidian, Electrospinning of highly aligned fibers for drug delivery applications, *J. Mater. Chem. B.* 7 (2019) 224–232.
- [40] Z.X. Meng, X.X. Xu, W. Zheng, H.M. Zhou, L. Li, Y.F. Zheng, X. Lou, Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 84 (2011) 97–102.



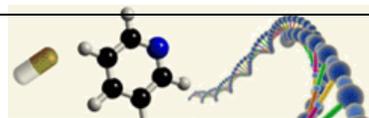
- [41] T. Lei, L. Yu, G. Zheng, L. Wang, D. Wu, D. Sun, Electrospinning-induced preferred dipole orientation in PVDF fibers, *J. Mater. Sci.* 50 (2015) 4342–4347. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-8986-0>.
- [42] D. Li, Y. Wang, Y. Xia, Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays, *Nano Lett.* 3 (2003) 1167–1171.
- [43] W.E. Teo, S. Ramakrishna, Electrospun fibre bundle made of aligned nanofibres over two fixed points, *Nanotechnology.* 16 (2005) 1878.
- [44] H. Yan, L. Liu, Z. Zhang, Alignment of electrospun nanofibers using dielectric materials, *Appl. Phys. Lett.* 95 (2009) 143114.
- [45] X. Wang, B. Ding, B. Li, Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering., *Mater. Today (Kidlington).* 16 (2013) 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.06.005>.
- [46] W.E. Teo, S. Ramakrishna, A review on electrospinning design and nanofibre assemblies, *Nanotechnology.* 17 (2006) R89.
- [47] M.I. Baker, S.P. Walsh, Z. Schwartz, B.D. Boyan, A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 100 (2012) 1451–1457.
- [48] J.I. Jones, *Polyvinyl alcohol. Properties and applications.* Edited by CA Finch. John Wiley, Chichester. 1973. Pp. xviii+ 622. Price:£ 14.00, (1973).
- [49] M.E. Londoño López, Principio fenomenológico del comportamiento dieléctrico de un hidrogel de alcohol polivinílico-Phenomenological principle dielectrical behaviour of poly (vinyl alcohol) hidrogel, *Esc. Ing. Mater.* (n.d.).
- [50] V.I. Lozinsky, A.L. Zubov, E.F. Titova, Poly (vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 2. Entrapped cells resemble porous fillers in their effects on the properties of PVA-cryogel carrier, *Enzyme Microb. Technol.* 20 (1997) 182–190.
- [51] A.A. Konsta, D. Daoukaki, P. Pissis, K. Vartzeli, Hydration and conductivity



- studies of polymer–water interactions in polyacrylamide hydrogels, *Solid State Ionics*. 125 (1999) 235–241.
- [52] N. Yui, R.J. Mersny, K. Park, *Reflexive polymers and hydrogels: understanding and designing fast responsive polymeric systems*, CRC press, 2004.
- [53] C. Shao, H.-Y. Kim, J. Gong, B. Ding, D.-R. Lee, S.-J. Park, Fiber mats of poly (vinyl alcohol)/silica composite via electrospinning, *Mater. Lett.* 57 (2003) 1579–1584.
- [54] M. Krumova, D. Lopez, R. Benavente, C. Mijangos, J.M. Perena, Effect of crosslinking on the mechanical and thermal properties of poly (vinyl alcohol), *Polymer (Guildf)*. 41 (2000) 9265–9272.
- [55] N.A. Peppas, E.W. Merrill, Differential scanning calorimetry of crystallized PVA hydrogels, *J. Appl. Polym. Sci.* 20 (1976) 1457–1465.
- [56] H.L. Abd El-Mohdy, S. Ghanem, Biodegradability, antimicrobial activity and properties of PVA/PVP hydrogels prepared by γ -irradiation, *J. Polym. Res.* 16 (2009) 1–10.
- [57] S. Matsumura, H. Kurita, H. Shimokobe, Anaerobic biodegradability of polyvinyl alcohol, *Biotechnol. Lett.* 15 (1993) 749–754.
- [58] X. Zhang, K. Tang, X. Zheng, Electrospinning and crosslinking of COL/PVA nanofiber-microsphere containing salicylic acid for drug delivery, *J. Bionic Eng.* 13 (2016) 143–149.
- [59] F.N. Parin, Ç.İ. Aydemir, G. Taner, K. Yıldırım, Co-electrospun-electrosprayed PVA/folic acid nanofibers for transdermal drug delivery: Preparation, characterization, and in vitro cytocompatibility, *J. Ind. Text.* (2021) 1528083721997185.
- [60] İ. Esentürk, T. Balkan, S. Güngör, S. Saraç, M.S. Erdal, Preparation and characterization of naftifine-loaded poly (vinyl alcohol)/sodium alginate electrospun nanofibers, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 56 (2021).



- [61] S. Mirzaeei, S. Taghe, K. Asare-Addo, A. Nokhodchi, Polyvinyl Alcohol/Chitosan Single-Layered and Polyvinyl Alcohol/Chitosan/Eudragit RL100 Multi-layered Electrospun Nanofibers as an Ocular Matrix for the Controlled Release of Ofloxacin: an In Vitro and In Vivo Evaluation, *AAPS PharmSciTech.* 22 (2021) 1–13.
- [62] Z. Li, C. Wang, Effects of working parameters on electrospinning, in: *One-Dimensional Nanostructures*, Springer, 2013: pp. 15–28.
- [63] L.M.D. Sánchez, L. Rodriguez, M. López, Electrospinning: la era de las nanofibras, *Rev. Iberoam. Polímeros.* 14 (2013) 10–27.
- [64] T.D. Clemons, M. Bradshaw, P. Toshniwal, N. Chaudhari, A.W. Stevenson, J. Lynch, M.W. Fear, F.M. Wood, K.S. Iyer, Coherency image analysis to quantify collagen architecture: Implications in scar assessment, *RSC Adv.* 8 (2018) 9661–9669.
- [65] L.A. Mitscher, B. Slater-Eng, T.D. Sokoloski, Circular dichroism measurements of the tetracyclines IV. 5-Hydroxylated derivatives, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2 (1972) 66–72.
- [66] Y. Rojas-Aguirre, K. Aguado-Castrejón, I. González-Méndez, La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿ la (r) evolución de la terapia contra el cáncer?, *Educ. Química.* 27 (2016) 286–291.
- [67] M. Vilela Vázquez, *Sistemas de transporte de fármacos: pasado, presente y futuro*, (2019).
- [68] J.B. Pérez-Nava, A., Mota-Morales, J. D., García-Carvajal, Z. Y., Herrera-Rodríguez, S. E., Arrevillaga-Boni, G., Azanza-Ricardo, C. L., Vázquez-Lepe M. O. & González-Campos, Eco-friendly Production of Metallic Nanoparticles in Polymeric Solutions and Their Processing into Biocompatible Composites. *Fibers and Polymers*, 19(1) (2018) 156–169.
- [69] E. de Souza Costa-Júnior, M.M. Pereira, H.S. Mansur, Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and



chemically crosslinked, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20 (2009) 553–561.

[70] J. Coates, *Interpretation of infrared spectra, a practical approach*, (2000).

[71] S.. Ali, *Tetracycline*, Academic Press, New York, 1984.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ardp.19743070901>.