



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

“FABRICACIÓN DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS
BASADOS EN PVA MEDIANTE ELECTROHILADO *AIR GAP*
ASISTIDO POR DES”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:
QFB JORGE ANDRÉS ORNELAS GUILLÉN

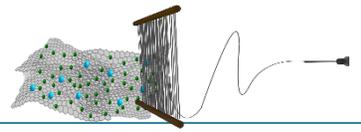
ASESORA DE TESIS:
Dra. JANETT BETZABE GONZÁLEZ CAMPOS

COASESORA:
Dra. ALEJANDRA PÉREZ NAVA

MORELIA, MICHOACAN; FEBRERO DE 2024



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UMSNH

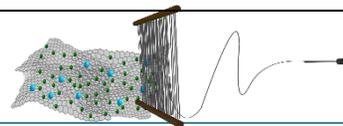


***“Cuando buscamos el tesoro,
nos damos cuenta de que el camino es el propio tesoro”***

Paulo Coelho

***“Debes hacer las cosas
que crees que no puedes hacer.”***

Eleanor Roosevelt



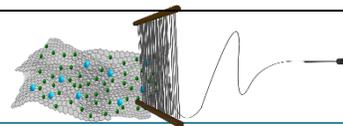
RESUMEN

El electrohilado es una de las técnicas más populares para la producción de vehículos de liberación basados en polímeros biocompatibles y biodegradables como soportes ideales para fármacos, debido a la similitud entre su microarquitectura y la matriz extracelular; caracterizada por una alta relación superficie/volumen y porosidad. Los sistemas de liberación basados en nanofibras alineadas pueden potencializar la eficacia de los compósitos como plataformas de liberación del fármaco. De este modo, la configuración de electrohilado *air gap* sobresale como una de las variantes más confiables y asequibles para producir nanofibras con alto grado de orientación.

El presente trabajo de Tesis aborda la obtención de nanoestructuras compuestas de alcohol polivinílico (PVA)-tetraciclina (TTC) orientadas axialmente, empleando un disolvente eutéctico (DES) como aditivo para el electrohilado *air gap*. Se analiza la influencia de la variación de los parámetros de electrohilado sobre la estructura y calidad generada, y la influencia de la adición del DES cloruro de colina:urea (ChCl:U) en la orientación y estructura de las nanofibras compuestas PVA-TTC; obteniendo nanofibras de buena calidad y alto nivel de orientación. La cinética de liberación del fármaco fue monitoreada mediante espectroscopia UV-Vis, logrando la liberación de manera más eficaz y sostenida, misma que converge con el modelo de teórico de Peppas-Sahlin, que describe la liberación de fármacos de una matriz polimérica través de una combinación de difusión y erosión. La influencia de la orientación de la nanofibras cargadas con TTC se analiza en función de la inhibición del crecimiento de cepas de interés clínico como: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

La caracterización de las nanofibras de PVA-TTC incluye el análisis estructural y del grado de orientación, determinado mediante microscopia electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM), el análisis de las micrografías con el software imageJ para determinar el grado de orientación, datos estadísticos y mapas de color por gradiente. Así como el análisis mediante espectroscopia de infrarrojo (FTIR) y el análisis térmico (TGA/DSC) para la verificación de la incorporación del antibiótico a las nanofibras.

Palabras clave: Electrospinning; biopolímeros; andamios celulares; liberación de fármacos; *air gap*.



ABSTRACT

Electrospinning is one of the most popular techniques to produce release vehicles based on biocompatible and biodegradable polymers as ideal drug carriers, due to the similarity between their microarchitecture and the extracellular matrix; characterized by a high surface-to-volume ratio and porosity. Delivery systems based on aligned nanofibres can enhance the efficacy of composites as drug delivery platforms. Thus, the *air gap* electrospinning configuration stands out as one of the most reliable and affordable variants to produce highly oriented nanofibers.

The present thesis work proposes the production of axially oriented polyvinyl alcohol (PVA)-tetracycline (TTC) composite nanostructures, using a eutectic solvent (DES) as an additive for air gap electrospinning. The influence of the variation of the electrospinning parameters on the structure and quality generated, and the influence of the addition of the DES choline chloride:urea (ChCl:U) on the orientation and structure of the PVA-TTC composite nanofibers is analyzed; obtaining nanofibres of good quality and high level of orientation. The kinetics of drug release of aligned nanofibers was monitored by UV-Vis spectroscopy, achieving a more efficient and sustained release, which converges with the Peppas-Sahlin theoretical model, that describes the drugs release from a polymeric matrix through a combination of diffusion and erosion. The influence of the orientation of the TTC-loaded nanofibers is analyzed in terms of growth inhibition of strains of clinical interest such as: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

The characterization of the PVA-TTC nanofibers includes the structural analysis and degree of orientation, determined by field emission scanning electron microscopy (FESEM), and the analysis of the micrographs with imageJ software to determine the degree of orientation, statistical data and gradient color maps. Infrared spectroscopy (FTIR) and thermal analysis (TGA/DSC) were used to verify the successful incorporation of the antibiotic into the nanofibers.

Keywords: Electrospinning; biopolymers; cellular scaffolds; drug release; air gap.



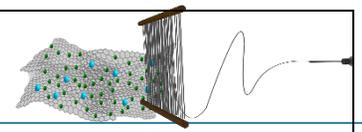
El presente proyecto de investigación fue realizado en el Laboratorio de Polímeros y Materiales del IIQB-UMSNH, con recursos otorgados por el CONAHCYT al proyecto CB-2017-2018-A1-S-21845, mediante la asignación de la beca para Estudios de Posgrado (CVU No. 1187100).

Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana fueron realizados en el Laboratorio de Especialidades Médicas “San Jerónimo”. Las pruebas de citocompatibilidad fueron realizados en el “Laboratorio de Biología Molecular y del Desarrollo” de la UAEMéx.



Los resultados de este proyecto de investigación fueron presentados en los siguientes eventos:

- **2022** I Congreso Estatal de Profesionales Químicos y EXPOCOMPQUIM 2022 “MAH. Sandra María Suarez Moreno”, siendo merecedor del **2° Lugar** en el Concurso de Carteles.
- **2022** III LatinXChem Twitter Conference.
- **2022** XLIII encuentro nacional y X congreso internacional de la AMIDIQ.
- **2023** XLIV encuentro nacional y XI congreso internacional de la AMIDIQ.
- **2023** XVIII Congreso Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán.
- **2023** I Congreso Nacional y II Congreso Estatal de Profesionales Químicos y EXPOCOMPQUIM 2023 “QFB. América Alfaro Valle”.



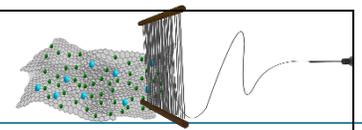
AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicarle este espacio especial a mi mamá por su amor, apoyo y sacrificio siempre, a lo largo de mi trayecto hacia la culminación de mi tesis de maestría. Su presencia constante, su aliento y su inquebrantable fe en mí han sido mi fuerza detrás de cada paso que he dado en este viaje académico. Sus palabras de ánimo, sus abrazos reconfortantes y su amor infinito han sido mi refugio en los momentos de desafío y duda. Sus sacrificios, valentía y compromiso con mi educación han sido la luz que me guió a través de los desafíos y obstáculos que encontré en el camino. Gracias por tu paciencia infinita, por escucharme y por celebrar conmigo cada pequeño avance y logro. Con todo mi amor y gratitud.

A mi familia porque cada palabra de ánimo, apoyo y cada muestra de cariño han sido invaluable para mi determinación y perseverancia. Este logro no solo es mío; cada paso que he dado, cada página que he escrito ha sido posible gracias al amor y al respaldo que me han brindado.

Agradecer a los amigos que conocí en estos años de posgrado por formar parte de mi vida durante este importante trayecto académico y personal. Su amistad ha sido un regalo inestimable que ha fortalecido mi camino. Su presencia, risas y palabras de aliento compartidas han sido un bálsamo en los días difíciles y una fuente constante de alegría e inspiración. Agradecer especialmente a aquellos que conocí dentro de las aulas, gracias por compartir conmigo el viaje del aprendizaje y la exploración intelectual, porque han enriquecido mi experiencia académica de formas que nunca podré olvidar.

A mi coasesora, la Dra. Alejandra Pérez Nava, a quien me ha acompañado en este camino de la investigación. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento por su invaluable contribución como coasesora de mi tesis. Su guía, apoyo y compromiso han sido esenciales en el desarrollo y culminación de este trabajo académico. A lo largo de este proceso, valoré enormemente su claridad de pensamiento, perspicacia, capacidad para ofrecer retroalimentación constructiva y sobre todo la confianza generada. Sus sugerencias y comentarios han enriquecido significativamente mi investigación y han elevado la calidad de mi trabajo. Admiro profundamente su dedicación a la excelencia académica y pasión por el aprendizaje. Su compromiso con mi crecimiento y desarrollo

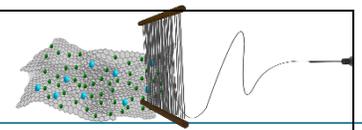


como estudiante ha sido evidente en cada interacción y en cada revisión de mi trabajo. Agradezco por su paciencia, disposición para responder mis preguntas y por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo. Su mentoría ha sido un regalo invaluable que ha dejado una huella perdurable en mi formación académica.

Un especial reconocimiento a la Dra. Janett Betzabe González Campos quien, como asesora, me brindo su invaluable orientación, apoyo y dedicación durante el proceso de investigación. Su compromiso con mi crecimiento académico y profesional ha sido una fuente constante de inspiración y motivación para mí. A lo largo de este arduo camino, ha sido mucho más que una asesora. Ha sido una mentora comprensiva, una guía experta y una defensora apasionada de mi trabajo. Sus comentarios y su claridad de pensamiento han fortalecido mis ideas y han enriquecido enormemente mi investigación. Valoraré siempre su disposición para escuchar, su paciencia para cada revisión y su compromiso inquebrantable con mi éxito. Su influencia perdurará más allá de las páginas de esta tesis, moldeando mi perspectiva y mi enfoque hacia la investigación y el aprendizaje. Esta tesis no habría sido posible sin su orientación experta y su compromiso con mi éxito. Aprecio sinceramente su contribución y me siento honrado de haber tenido la oportunidad de trabajar con usted en este proyecto.

A mis sinodales, la D.C. Judith Araceli Aviña Verduzco, el D.C. Pedro Navarro Santos y el doctor Manuel Arroyo Albiter, por su tiempo y compromiso al evaluar mi tesis de maestría. Su dedicación y experiencia como académicos han enriquecido enormemente mi proceso de investigación. En cada seminario sus críticas constructivas, sugerencias y orientación han fortalecido mi comprensión del tema y enriquecido la calidad de mi trabajo. Su sabiduría y rigor académico han desafiado mis ideas y me han ayudado a crecer como investigador y como persona. Estoy profundamente agradecido por la oportunidad de aprender de ustedes y por el impacto que han tenido en mi desarrollo académico.

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, agradezco a la institución por proporcionar un ambiente propicio para el aprendizaje, y el crecimiento académico. Agradezco especialmente a los investigadores y personal administrativo por su tiempo y compromiso. Sus enseñanzas,



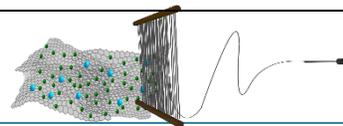
orientación y apoyo constante han esenciales en mi formación. Cada uno de ustedes ha dejado una marca significativa en mi viaje académico, y estoy agradecido por el impacto positivo que han tenido en mi aprendizaje. Además, quiero expresar mi gratitud a todo el personal del instituto: de biblioteca, laboratorios y demás instalaciones, cuyo esfuerzo y servicio han facilitado mi acceso a recursos y herramientas para mi investigación.

Un especial agradecimiento a la Dra. Carla García Morales. Por su ayuda y colaboración durante el proceso de pruebas de citocompatibilidad realizadas en su laboratorio. Su disposición para facilitar los recursos y el equipo necesarios, así como su orientación experta en la interpretación de los resultados, han sido de un valor incalculable para mi proyecto. Agradezco especialmente su paciencia y disposición para invitarme a su laboratorio y responder mis dudas a lo largo del proceso. Su profesionalismo y compromiso con la excelencia académica fueron ejemplares e inspiran confianza. El conocimiento adquirido no solo ha enriquecido mi investigación, sino que también ha fortalecido mi formación académica y profesional.

A la QFB. Fernanda y a la TLC. Eva del laboratorio San Jerónimo. Con profundo agradecimiento, deseo dedicar este logro a ustedes, su conocimiento y apoyo han sido esenciales durante mi investigación en las pruebas antimicrobianas. A través de su orientación y dedicación, he aprendido bastante: Cada conversación, cada consejo, ha sido una oportunidad para crecer y para comprender más profundamente la microbiología.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo con la beca otorgada para el desarrollo de esta tesis. He tenido la posibilidad de perseguir mis metas académicas y alcanzar nuevos horizontes en mi campo de estudio. Esta oportunidad ha representado mucho más que un respaldo financiero; ha sido un símbolo de confianza en mis capacidades y un estímulo para alcanzar la excelencia en mi formación. Esta beca no solo me ha brindado los recursos necesarios para avanzar en mi educación, sino que también ha abierto puertas a oportunidades de aprendizaje, colaboración y crecimiento personal y profesional.

Agradezco de todo corazón a todas las personas que han aportado su compañía invaluable en este camino.



DEDICATORIA

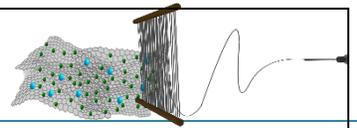
Esta tesis es un tributo a la familia que me ha moldeado, me ha nutrido y me ha enseñado el verdadero significado del amor y la unidad. Cada página escrita lleva el sello de su influencia y su apoyo. A mis abuelos, por ser la raíz de nuestra familia, por transmitirnos su sabiduría y por inspirarnos con su ejemplo de generosidad y amor incondicional. A todos mis familiares, por su constante apoyo, por sus palabras de ánimo y por ser parte de mi viaje hacia la realización de este sueño.

A mi madre, su inquebrantable apoyo, por enseñarme el valor del trabajo arduo y la perseverancia, y por ser el pilar de mi fortaleza en todo momento. Quien con su cariño ha moldeado mi carácter y ha guiado cada uno de mis pasos en este camino hacia la realización personal y académica. A través de esta tesis, quiero expresar mi más profunda gratitud por todo lo que ha hecho por mí.

A los investigadores que me impartieron cursos, porque me brindaron sus conocimientos y enseñanza en este trayecto académico; su entusiasmo al compartir sus conocimientos y su disposición para desafiarnos a pensar de manera crítica y creativa. Su sabiduría y experiencias han sido muy valiosas en mi formación.

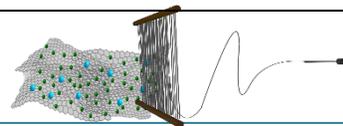
A mi pareja, con quien he compartido cada momento; dedicar estas palabras es una manera de apreciar el valor que tu presencia ha traído a mi vida. A través de cada paso, cada desafío y cada triunfo, tu amor ha sido mi refugio y mi inspiración. En este viaje académico, tu apoyo siempre ha estado presente. Tus palabras de aliento, tus abrazos y confianza en mí me han permitido completar lo que me propongo; cada desafío logrado es un tributo a nuestro amor, nuestra complicidad y nuestra fortaleza como pareja. Gracias por ser mi inspiración, mi confidente y mi mejor amiga.

Un importante reconocimiento a mis amigos y segunda familia del Laboratorio San Jerónimo, quienes me han visto crecer personal y profesionalmente gracias al apoyo y cariño que siempre me brindan. Desde el primer día en que me uní a este equipo, ustedes me han inspirado con su dedicación, liderazgo y sabiduría. Especialmente quiero dedicar esta tesis al químico, Jorge y a su esposa, Tere: esta tesis no solo es un reflejo de mis



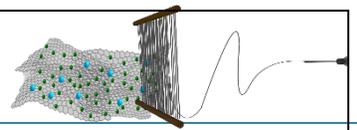
esfuerzos académicos, sino también de la confianza y el apoyo que ustedes han depositado en mí a lo largo de este viaje. A través de su confianza en mí, he encontrado la fuerza para enfrentar los desafíos y perseverar en la búsqueda de la excelencia. Su apoyo y su fe en mis habilidades han sido un regalo invaluable que nunca olvidaré. Sus palabras de aliento y sus consejos han sido faros de luz en los momentos de duda y desafío, impulsándome a superar mis límites y alcanzar nuevas metas. Con profunda gratitud y aprecio, quiero dedicar este logro a ustedes, quienes, han sido mentores, guías y amigos.

A todos los que han dejado una huella imborrable en mi camino.

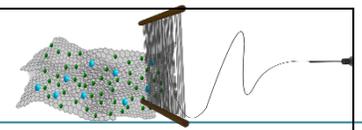


ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	3
ABREVIATURAS.....	4
1. INTRODUCCIÓN	5
2. JUSTIFICACIÓN.....	9
3. HIPÓTESIS.....	10
4. OBJETIVOS.....	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
5.1 MATERIALES.....	12
5.2 METODOLOGÍA.....	13
6. MARCO TEÓRICO	18
6.1 LIBERACIÓN DE FÁRMACOS	18
6.2 SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS BASADOS EN NANOFIBRAS ...	20
6.3 ELECTROHILADO.....	22
6.3.1 PROPIEDADES DE LA DISOLUCIÓN POLIMÉRICA.....	24
6.3.2 PARÁMETROS RELACIONADOS AL PROCESAMIENTO	26
6.4 ELECTROHILADO AIR GAP.....	28
6.5 ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA)	29
6.6 SISTEMA DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS BASADOS EN PVA	31
6.7 ANTIBIÓTICOS	32
6.8 RESISTENCIA BACTERIANA (RA)	34
6.9 TETRACICLINAS.....	35
6.10 DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES).....	37
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
7.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO POR EMISIÓN DE CAMPO.....	40
7.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	51
7.3 ANÁLISIS TÉRMICO (TGA Y DSC).....	53
7.4 ÍNDICE DE HINCHAMIENTO.....	55



7.5 PROPIEDADES MECÁNICAS	56
7.6 ESTUDIOS DE LIBERACIÓN	59
7.6.1 ANÁLISIS DEL MECÁNISMO DE LIBERACIÓN.....	62
7.7 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	66
7.8 ESTADÍSTICA DE INHIBICIÓN BACTERIANA (T de student).	76
7.9 VIABILIDAD CELULAR.....	79
8. CONCLUSIONES	81
9. ANEXOS.....	84
A. ANÁLISIS DEL MECÁNISMO DE LIBERACIÓN	84
B. ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	88
C. ENSAYO DE CITOCOMPATIBILIDAD EN FIBROBLASTOS	89
10. REFERENCIAS	92



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 5.1 Equipo de electrohilado NaBond Technologies Co.® TL-01.....	13
Figura 5.2. Colector air gap utilizado en este proyecto.....	14
Figura 6.1. Clasificación de las nanofibras para la liberación de fármacos con base en su estructura interna (Adaptado de [24]).....	21
Figura 6.2. a) Morfología representativa de las colecciones aleatorias de nanofibras de PVA y b) diagrama de la configuración de electrohilado convencional.....	23
Figura 6.3. Esquema de parámetros que influyen en la obtención de nanofibras poliméricas por medio de electrohilado.....	24
Figura 6.4. Preparación por alcoholólisis parcial o total de acetato de polivinilo para eliminar los grupos acetato y producir PVA.....	30
Figura 6.5. Clasificación de antibióticos según su mecanismo de acción [71].....	34
Figura 6.6. Estructura de la tetraciclina (TTC) [5].	36
Figura 7.1. a) Colección de nanofibras de PVA y b) histograma de distribución de diámetro. ..	40
Figura 7.2. a) Colección de nanofibras de PVA-DES y b) histograma de distribución de diámetro.	41
Figura 7.3. Histograma de diámetro y colecciones de nanofibras PVA-TTC, obtenidas a una distancia de trabajo de 14 cm, 14.5 kV, 0.3 mL/h, 26 °C y Hr > 40: A) histograma de distribución de diámetros de nanofibras, B) imagen FESEM, C1) 1 h de proceso, C2) 3 h de proceso.....	43
Figura 7.4. A) histograma de distribución de diámetros de nanofibras PVA-TTC, obtenidas a una distancia de trabajo de 14 cm, 14.7 kV, 0.3 mL/h, 30 °C y Hr < 30: B) imagen FESEM, C1) 1 h de proceso, C2) 3 h de proceso.....	44
Figura 7.5. A) Histograma de diámetro y colecciones de nanofibras PVA-TTC a 10 cm, 16.7 kV, 0.6 mL/h, 26 °C y Hr < 20: B) FE-SEM, C1) 15 min de proceso, C2) 1 h de proceso.....	46
Figura 7.6. A) Histograma de diámetro y colecciones de nanofibras PVA-TTC-DES a 10 cm, 16.3 kV, 0.6 mL/h, 26 °C y Hr < 20: b) FE-SEM, C1) 30 min de proceso, C2) 2 h de proceso.....	47
Figura 7.7. Diagrama FFT de las colecciones de nanofibras de PVA puro a) aleatorias y b) alineadas.....	48
Figura 7.8. Micrografías FE-SEM de los mapas de color de las nanofibras alineadas a) PVA-TTC y b) PVA-TTC-DES e histogramas de orientación (a1 y b1).	49
Figura 7.9. Umbrales de porosidad de las micrografías de nanofibras alineadas.	50
Figura 7.10. Espectro FTIR de las nanofibras alineadas de PVA, PVA-TTC y PVA-TTC-DES.	52

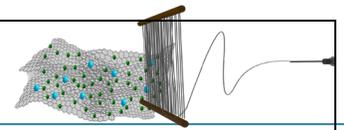
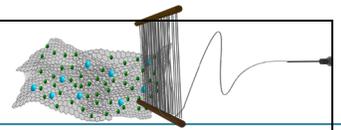
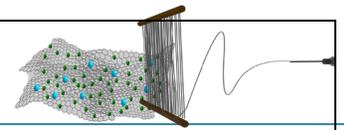


Figura 7.11. Termogramas A) TGA y B) DSC de las nanofibras alineadas de PVA, PVA-TTC y PVA-TTC-DES.....	53
Figura 7.12. Porcentaje del grado de hinchamiento de las colecciones de nanofibras alineadas en disolución salina (pH: 7.5) a diferentes intervalos de tiempo.....	55
Figura 7.13. Curvas de tensión – deformación de los materiales obtenidos a partir de electrohilado	58
Figura 7.14. Bandas de UV-Visible características de la TTC.....	59
Figura 7.15. Espectros de absorción UV-Vis de liberación en medio acuoso de la TTC a partir de las colecciones de nanofibras alineadas A) PVA-TTC y B) PVA-TTC-DES.....	59
Figura 7.16. Espectros de absorción UV-Vis de liberación de TTC de las nanofibras alineadas de PVA-TTC y PVA-TTC-DES. (Ensayo continuo).....	60
Figura 7.17. Espectros de absorción UV-Vis de liberación de TTC de las nanofibras aleatorias de PVA-TTC y alineadas de PVA-TTC y PVA-TTC-DES (Ensayo acumulado).....	61
Figura 7.19. Test de zona de inhibición de <i>S. aureus</i> en agar Mueller-Hinton (concentración de nanofibras:11.9 μg , Sensidisco: 30 μg).....	68
Figura 7.20. Test de zona de inhibición de <i>S. aureus</i> en agar Mueller-Hinton (concentración de nanofibras:23.5 μg , Sensidisco: 30 μg).....	69
Figura 7.21. Test de zona de inhibición de <i>Streptococcus pyogenes</i> en agar Sangre de carnero (concentración de nanofibras:23.5 μg , Sensidisco: 30 μg).....	71
Figura 7.22. Test de zona de inhibición de <i>K. pneumoniae</i> en agar Mac Conkey (concentración de nanofibras:23.5 μg , Sensidisco: 30 μg).....	72
Figura 7.23. Test de zona de inhibición de <i>K. pneumoniae</i> en agar Muller-Hinton (concentración de nanofibras: 23.5 μg , Sensidisco comercial: 30 μg).....	73
Figura 7.24. Test de zona de inhibición de <i>E. coli</i> en agar Mueller-Hinton (concentración de nanofibras:23.5 μg , Sensidisco: 30 μg).....	74
Figura 7.25. Valores obtenidos de la Prueba T de student para la cepa de <i>S. aureus</i> en nanofibras alineadas de PVA-TTC y alineadas de PVA-TTC-DES.....	77
Figura 7.26. Valores obtenidos de la Prueba T de student para la cepa de <i>S. aureus</i> en nanofibras alineadas de PVA-TTC y alineadas de PVA-TTC-DES.....	78
Figura 7.27. Análisis de viabilidad celular en las colecciones de nanofibras alineadas de PVA, PVA-TTC y PVA-TTC-DES.....	80



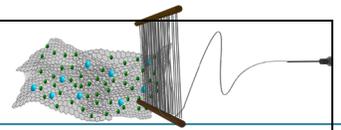
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 6.1. Ejemplos y principales características de las Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada (FFLM).	18
Tabla 7.1. Propiedades mecánicas de los materiales obtenidos basados en colecciones NF PVA.....	58
Tabla 7.2. Resultados del ajuste a los modelos teóricos de la liberación de TTC de las nanofibras alineadas de PVA-TTC y PVA-TTC-DES.....	64
Tabla 7.3. Resultados del ajuste del modelo de Kopcha en el perfil de liberación de TTC en las colecciones de nanofibras alineadas de PVA-TTC y PVA-TTC-DES.	65
Tabla 7.4. Halos de inhibición de las nanofibras alineadas y aleatorias y el sensidisco comercial control positivo de TTC en las cepas ATCC empleadas.....	67
Tabla 7.5. Valores estadísticos de los halos de inhibición en cepas bacterianas ATCC en las colecciones alineadas y aleatorias de PVA, PVA-TTC y PVA-TTC-DES.	76
Tabla 9.1. Valores del exponente de difusión (m) del modelo de Korsmeyer-peppas y los mecanismos de liberación característicos de los materiales.	85



ABREVIATURAS

% v/v	Porcentaje volumen/volumen	$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima
% p/p	Porcentaje peso/peso	mg	Miligramos
°C	Grados Celsius	min	Minutos
µg	Microgramos	mL	Mililitros
µm	Micrómetros	mL/h	Mililitros por hora
ADN	Ácido desoxirribonucleico	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
ChCl:U	Cloruro de colina y urea	NF	Nanofibras
cm	Centímetros	nm	Nanómetros
cm⁻¹	Centímetros recíprocos	pH	Potencial de hidrógeno
CMI	Concentración mínima inhibitoria	PVA	Alcohol polivinílico
DES	Disolventes eutécticos profundos	rpm	Revoluciones por minuto
DSC	Calorimetría diferencial de barrido	R²	Coefficiente de determinación
EtOH	Etanol	T_g	Temperatura de transición vítrea
FE-SEM	Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo	TGA	Análisis termogravimétrico
FFLM	Formas farmacéuticas de liberación modificada	tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
FFT	Trasformada de Fourier rápida	TTC	Tetraciclina
FT-IR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	TTC	Clorhidrato de tetraciclina
g	Gramos	UV-Vis	Ultravioleta-Visible
g/mL	Gramos por mililitro		
h	Horas		
H₀	Hipótesis nula		
H_a	Hipótesis alternativa		
Hr	Humedad relativa		
Kg	Kilogramo		
kV	Kilovoltios		



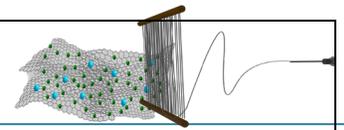
1. INTRODUCCIÓN

La tecnología de administración controlada de fármacos a partir de nanomateriales representa una de las áreas científicas de gran interés en la actualidad, debido a su significativa contribución en el cuidado de la salud humana. Estos sistemas de administración de fármacos ofrecen numerosas ventajas en comparación con las formas de dosificación convencionales, entre las que se incluyen la mejora de la eficacia en las pautas posológicas y en el perfil farmacocinético, así como en la reducción de la toxicidad e incluso de los efectos secundarios. Estos sistemas suelen utilizar polímeros de origen natural o sintético como portadores de los fármacos [1].

En sistemas biológicos, las moléculas o iones bioactivos suelen liberarse en condiciones controladas, en un lugar específico y durante un lapso determinado. Para tal fin, las colecciones de nanofibras han cobrado un interés considerable, ya que las moléculas terapéuticas pueden ser integradas en estas nanoestructuras, presentando un mayor control de la liberación del fármaco. En este sentido, las colecciones de nanofibras pueden ofrecer rendimientos y propiedades que no se presentan en otros materiales, como alta área superficial, tamaño nanométrico, alta resistencia mecánica, superficie modificable, entre otras. Los sistemas de administración de fármacos basados en nanofibras que responden al entorno son relativamente nuevos, pero poseen ventajas incomparables debido a su mayor permeabilidad, permitiendo un tiempo de respuesta más corto y un control más preciso de la tasa de liberación [2-3]. [2-3].

El electrohilado es una de las técnicas más populares para la producción de este tipo de microarquitecturas basadas en nanofibras, ya que es un técnica sencilla, versátil y robusta que produce fibras de diámetros que van desde varios nanómetros hasta decenas de micrómetros. En comparación con otras técnicas de fabricación de micro y nanofibras, este método requiere aparatos más sencillos para su funcionamiento, además de producir grandes cantidades de productos y permitir el procesamiento de una amplia variedad de polímeros y sus compósitos [4].

Los sistemas de liberación controlada basados en microestructuras tienen como finalidad mejorar la eficacia del tratamiento farmacológico. Esta mejora puede consistir

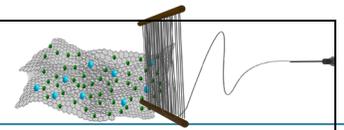


en aumentar la actividad terapéutica en comparación con la intensidad de los efectos secundarios, reduciendo el número de dosis de fármacos durante el tratamiento, o eliminando la necesidad de la ingesta de más fármaco mediante dosis repetidas.

Por otra parte, en la actualidad, la resistencia a los antibióticos es uno de los problemas clínicos de mayor alcance, ya que las bacterias han desarrollado mecanismos de tolerancia a los antibióticos a través de variaciones genéticas; como consecuencia de su consumo indiscriminado. Este hecho compromete la profilaxis de las enfermedades infecciosas, socavando muchos avances en la medicina y desencadenando un grave problema de salud pública [5]. Por lo anterior, es imperativo el desarrollo de estrategias de liberación controlada mediante el diseño de nuevos sistemas de dosificación para el suministro eficiente de antibióticos, permitiendo además minimizar los efectos secundarios asociados con los métodos de administración tradicional.

Se ha demostrado que el control del tamaño, la forma y la orientación espacial de las nanofibras electrohiladas es crucial para su uso en sistemas de liberación de fármacos e ingeniería de tejidos. La liberación de fármacos a partir de sistemas de nanofibras altamente alineadas presentan una menor liberación de ráfaga y una liberación más sostenida comparado con nanofibras orientadas aleatoriamente [6]. Esto debido a que las nanofibras alineadas pueden bloquear los componentes del fármaco en la superficie y en el interior de las nanofibras en el proceso de preparación, mientras que las colecciones de nanofibras aleatorias tienen una mayor liberación del fármaco, por lo tanto, las nanofibras alineadas como transportadores de fármacos ofrecen mayor ventaja en la liberación controlada y la liberación sostenida [7].

En este sentido, en el grupo de trabajo de Polímeros y Materiales (IIQB-UMSNH), se ha logrado la obtención de nanofibras alineadas basadas en la mezcla alcohol polivinílico/tetraciclina (PVA/TTC) mediante el método de electrohilado *air gap*, con atributos deseables como alta porosidad, interconectividad, alta relación área superficial/volumen y grado de orientación de 88% y ángulo de $94^\circ \pm 16^\circ$ [8]. Tales nanomateriales compuestos presentaron potencial en la dosificación sostenida del agente terapéutico TTC. No obstante, mejorar el grado de alineación y la disminución de defectos en las nanoestructuras son metas que prometen potencializar la

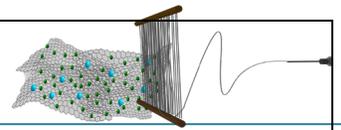


farmacocinética y farmacodinamia del principio activo embebido en las nanofibras. Para tal propósito, en el presente proyecto se plantea la adición de la mezcla eutéctica cloruro de ChCl:U, la cual ha demostrado promover la inducción de la orientación axial de las nanofibras generadas durante el electrohilado *air gap* de PVA puro [9].

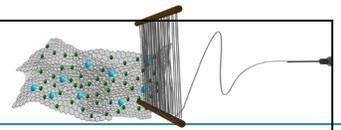
Se ha demostrado que el control del tamaño, la forma y la orientación espacial de las nanofibras electrohiladas es crucial para su uso en sistemas de liberación de fármacos e ingeniería de tejidos. La liberación de fármacos a partir de sistemas de nanofibras altamente alineadas presentan una menor liberación de ráfaga y una liberación más sostenida comparado con nanofibras orientadas aleatoriamente [6]. Esto debido a que las nanofibras alineadas pueden bloquear los componentes del fármaco en la superficie y en el interior de las nanofibras en el proceso de preparación, mientras que las nanofibras desordenadas tienen una mayor liberación del fármaco, por lo tanto, las nanofibras alineadas como transportadores de fármacos tienen más ventajas en la liberación controlada y sostenida [7].

Por otro lado, los disolventes eutécticos profundos (DES) han cobrado mayor importancia en el procesamiento de polímeros, permitiendo la fabricación de microestructuras porosas [10]. Los DES son disolventes de bajo costo, fáciles de preparar, biodegradables, no tóxicos y de naturaleza renovable, y experimentalmente, en el grupo de trabajo se ha observado que la incorporación del DES ChCl:U como aditivo de electrohilado, permite obtener nanofibras con grado de alineación superior al proveer un mejor entorno dieléctrico y acentuar el carácter viscoelástico del PVA. La adición de DES a disoluciones para electrohilado es recientemente explorada. Mukesh et al. produjeron nanofibras de quitina usando un DES basado en ChCl y tiourea [11]; Sousaa et al. reportaron la electrohilabilidad mejorada del agar con DES a base de colina [12]; Zhang et al. fabricaron nanofibras de PVA utilizando un DES natural para la disolución rápida de fármacos, denominándola como una metodología “verde” por el uso de un DES natural [13]. No obstante, la influencia de la adición de los DES en la inducción de la orientación axial es un aspecto sin precedentes.

Bajo las premisas anteriormente expuestas, este trabajo de investigación aborda la fabricación de colecciones de nanofibras compuestas PVA/TTC con orientación axial



inducida mediante electrohilado *air gap*. En dicho proceso, se infiere que la adición del DES ChCl:U (2:1) favorece la solubilidad del antibiótico y mejorara la electrohilabilidad de la mezcla PVA/TTC. Como resultado, se discute la obtención de nuevos sistemas de administración de fármacos; la relevancia de esta propuesta radica en la obtención de nanofibras con grado de orientación axial de $86\% \pm 5\%$ y diámetros uniformes de $158 \text{ nm} \pm 34 \text{ nm}$, mediante la variante de electrohilado *air gap*, ya que la disposición alineada de las nanofibras ofrece un mayor control en el suministro del agente terapéutico [6].



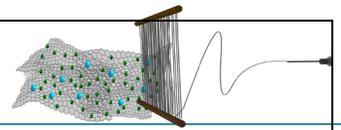
2. JUSTIFICACIÓN

El uso indiscriminado de antibióticos ha derivado en la resistencia bacteriana, constituyendo un problema de salud pública a nivel global. Por ello, la aplicación de nuevas tecnologías para el desarrollo de sistemas de liberación de mayor control y eficacia es apremiante.

A partir de tecnologías como el electrohilado, es posible atender esta problemática al permitir la obtención de colecciones de nanofibras de polímeros biocompatibles cargados con agentes farmacológicos. Las colecciones de nanofibras electrohiladas poseen atributos que favorecen la adecuada farmacodinámica y farmacocinética, como elevada superficie de contacto, alta porosidad e interconectividad.

Adicionalmente, el equipo de electrohilado permite variaciones en la configuración que permiten inducir la organización de las colecciones de nanofibras, como lo es la variante *air gap*. El protocolo de electrohilado *air gap* representa la estrategia más asequible para la obtención de colecciones de nanofibras con grado de orientación hasta el 90%. En términos de liberación de fármacos, las colecciones de nanofibras altamente alineadas son deseables por el mimetismo que mantienen con los sistemas biológicos tanto estructural como mecánicamente, y adicional a ello, llevan a cabo la liberación de agentes terapéuticos de manera más eficaz como resultado de su alto nivel organizacional.

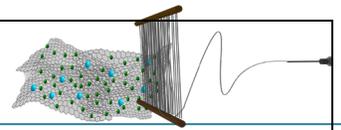
Por ello, el presente proyecto plantea la obtención de un biomaterial conformado por nanofibras alineadas compuestas PVA/TTC que efectúe el suministro eficiente del antibiótico. Aunado a ello, la adición de DES para el electrohilado de la mezcla es propuesta para coadyuvar el incremento de la orientación axial en las nanofibras, tal disposición espacial busca mejorar potencialmente la dosificación del fármaco.



3. HIPÓTESIS

La obtención de colecciones de nanofibras compuestas PVA/TTC con orientación axial será posible empleando la configuración *air gap*. Dicho proceso será favorecido adicionando volúmenes discretos de la mezcla eutéctica ChCl:U que actuará como coadyuvante de electrohilado favoreciendo el entorno dieléctrico de la disolución PVA/TTC y, simultáneamente, facilitando la solubilidad del antibiótico TTC.

Las microestructuras conformadas por colecciones de nanofibras axialmente orientadas de PVA/TTC serán más eficientes en la dosificación farmacológica respecto a colecciones PVA/TTC con organización aleatoria.



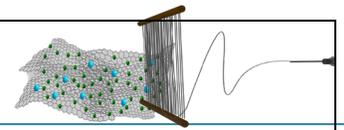
4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener colecciones de nanofibras compuestas PVA/TTC con alto grado de orientación inducida mediante el método de electrohilado *air gap*, empleando el DES ChCl:U como aditivo de electrohilado, para la evaluación de la influencia de la microestructura en la cinética de liberación del antibiótico TTC.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fabricar colecciones de nanofibras PVA/TTC libres de defectos y con estrecha distribución de diámetro promedio.
- Estudiar la influencia del DES ChCl:U en la inducción de alineación axial, mediante el electrohilado *air gap*.
- Comparar la influencia de disposición espacial de las colecciones de nanofibras en la cinética de liberación de TTC monitoreada mediante espectroscopia de absorción UV-Vis.
- Realizar la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana en cepas bacterianas ATCC.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

REACTIVOS

Para la preparación de las disoluciones de PVA puro y PVA/TTC, se utilizó PVA de peso molecular 89,000 – 98,000, y tetraciclina (Grado de desacetilación: 98%, pureza: 98 – 102.0% HPLC, CAS No: 60-50-8), ambos de la marca Sigma Aldrich[®].

Para la preparación del DES ChCl:U 2:1 se empleó cloruro de colina y urea de Sigma Aldrich[®]. Todos los reactivos se adquirieron del mayor grado de pureza disponible y fueron empleados sin tratamiento previo.

DISOLVENTES

Los disolventes requeridos para la parte experimental 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); y 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).

EQUIPO DE ELECTROHILADO

Para el electrohilado de las disoluciones de PVA, se utilizó un equipo de electrohilado marca Nabond Technologies Co.[®] TL-01 mostrado en la Figura 5.1. Dicho equipo requiere de los siguientes componentes:

- 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).

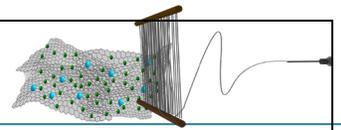
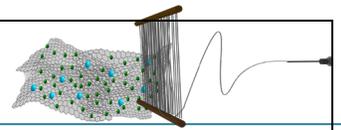


Figura 5.1. Equipo de electrohilado NaBond Technologies Co.® TL-01.

5.2 METODOLOGÍA

PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES:

- **DISOLUCIÓN DE PVA:** Las disoluciones de PVA se prepararon disolviendo al polímero en agua destilada, adicionando la cantidad correspondiente de PVA en polvo para obtener concentraciones del 10% p/v, la disolución fue preparada a 90 °C en estufa durante 8 h.
- **PREPARACIÓN DEL DES:** La mezcla eutéctica ChCl:U se preparó mezclando los componentes en proporción molar 1:2. Para tal fin, ambos componentes se llevaron a sequedad por separado en estufa a 90 °C durante 24 h; transcurrido este lapso se mezclaron los sólidos y se mantuvieron en la estufa a 80 °C durante 24 h, hasta obtener una disolución transparente.
- **PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE TTC:** La cantidad correspondiente de tetraciclina se disolvió en etanol (EtOH) para la obtención de una disolución de 3% p/v. Para tal fin, ambos componentes se mezclaron a temperatura ambiente con agitación constante durante 12 h.
- **DISOLUCIÓN DE PVA/TTC ENRIQUECIDA CON DES:** Se realizó la adición de volúmenes discretos del DES ChCl:U, representando un 1%v/v a la disolución de



PVA. La incorporación del DES se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación hasta su completa homogenización.

- Posteriormente, se realizó la adición de la TTC (disuelta en etanol) en proporción 10:2 v/v respecto a la disolución de PVA. La mezcla fue preparada a temperatura ambiente y con agitación constante hasta su completa homogenización.

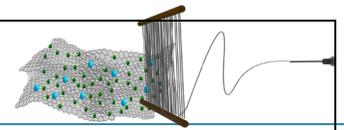
ELECTROHILADO:

Las disoluciones de base PVA fueron cargadas en una jeringa conectada a una manguera de teflón con aguja de electrohilado #9 (20G, diámetro interno 0.60 mm). La aguja del sistema de suministro se conectó mediante una pinza caimán al electrodo positivo del equipo. La jeringa fue conectada a una bomba de infusión para el control del flujo de alimentación a una velocidad de 0.3 mL/h. La producción de colecciones de nanofibras alineadas se realizó variando parámetros de operación como el voltaje y la distancia de trabajo aguja –colector a temperatura y humedad ambientales.

A manera de control, se obtuvieron colecciones de nanofibras dispuestas aleatoriamente bajo condiciones establecidas anteriormente [14], empleando la configuración de electrohilado convencional y un colector de placa fijo cubierto de aluminio. Las colecciones de nanofibras alineadas se obtuvieron empleando el sistema colector para electrohilado *air gap* diseñado en el laboratorio (Figura 5.2) el cual está conformado por un par de electrodos de cobre dispuestos en paralelo con una apertura de gap de 2cm.

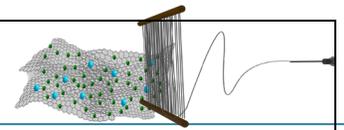


Figura 5.2. Colector air gap utilizado en este proyecto.

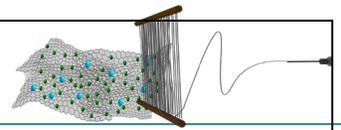


CARACTERIZACIÓN:

- **MORFOLOGÍA:** El análisis de la morfología de los materiales obtenidos se realizó mediante imágenes de microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FE-SEM), obtenidas en un microscopio de alta resolución (1 nm) modelo JEOL JSM 7600F con filamento de tungsteno. Para la adquisición de las imágenes, las muestras fueron recubiertas con cobre mediante la técnica de *sputtering*.
- **DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ORIENTACIÓN:** Los datos estadísticos, mapas de color e histogramas de orientación se obtuvieron mediante el análisis de las micrográficas obtenidas mediante FE-SEM a través del software ImageJ. Para ello, se hizo uso de las herramientas *Directionality* y *OrientationJ* para determinar el grado de orientación, ángulo promedio, mapas de color, tamaño de diámetro promedio y porosidad de las colecciones de nanofibras.
- **DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE POROSIDAD:** Para estimar el grado de porosidad, se generaron colecciones nanofibras de 1 mm de espesor. Los materiales generados fueron analizados mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM), obtenidas en un microscopio de alta resolución (1 nm) modelo JEOL JSM 7600F. Mediante este instrumento se obtuvieron micrográficas de 10,000 X. A partir del software ImageJ se estimó el porcentaje de porosidad (n=3) empleando la herramienta Threshold.
- **ESPECTROSCOPIA INFRARROJO (FT-IR):** El análisis de posibles interacciones químicas entre las nanofibras obtenidas y el antibiótico, se realizó mediante Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier, usando la técnica de Reflectancia Total Atenuada en un espectrofotómetro Nicolet iS10 de Thermo Scientific.
- **ANÁLISIS TÉRMICO (DSC/TGA):** El comportamiento térmico de los materiales se evaluó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). Los termogramas fueron obtenidos en el rango de 25°C a 500°C, con una velocidad de calentamiento de 5°C/min bajo atmósfera dinámica de N₂ (50 mL/min) en un analizador termogravimétrico modelo TGA/DSC 2 simultáneo de Mettler Toledo.

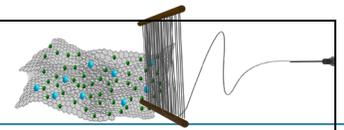


- **ANÁLISIS MECÁNICO:** La caracterización de las propiedades mecánicas se llevó a cabo utilizando un analizador AGS-X Series (Shimadzu), equipado con celda de 500 N. Las muestras fueron cortadas en probetas de dimensión total de 38 mm x 15 mm, siendo el área de medición de 22 mm x 5 mm (n=5), posteriormente fueron sometidas al estudio de tracción uniaxial de acuerdo al procedimiento estandarizado en la ASTM D1708. Los análisis de tracción se realizaron en condiciones ambientales estándar a velocidad de avance de 1 mm/min. Previamente se registró el grosor promedio de cada muestra, medido con un calibrador digital Mitutoyo. Parámetros como esfuerzo último a la tracción, elongación de rotura, esfuerzo de tracción en la rotura y el módulo de Young se obtuvieron a partir de las curvas de esfuerzo-deformación.
- **CINÉTICAS DE LIBERACIÓN:** La liberación del antibiótico TTC fue monitoreada mediante espectroscopía UV-Vis empleando un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis de Thermo Scientific. La concentración liberada de antibiótico se determinó mediante la curva de calibración correspondiente de la TTC construida a partir de concentraciones conocidas. Los datos experimentales fueron ajustados a los modelos de liberación simulados utilizando el software DDSOLVER, con el fin de establecer el mecanismo de liberación asociado a los materiales generados [15]. El registro de la cinética de liberación se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente metodología: se colocaron en inmersión las nanofibras alineadas de PVA-TTC y PVA-TTC-DES durante 10 días, cada una en un vial con 2 mL de disolución de pH=7; tomando las lecturas de absorbancia mediante una alícuota de dicha disolución duplicando el tiempo de muestreo: cada 5, 10, 20, 40, min y 4, 12, 24 h, consecutivamente hasta las 230 h.
- **PRUEBAS DE SUCEPTIBILIDAD ANTIBACTERIANA:** Se realizaron ensayos de inhibición bacteriana en cepas bacterianas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Los experimentos fueron realizados de acuerdo con el protocolo de antibiograma, utilizando sensidiscos de TTC grado comercial como control y las nanofibras PVA-TTC alineadas y aleatorias. La determinación de halos de inhibición se realizó a las 48 h de incubación. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Origin Pro 9.0 2021, donde se realizaron



las pruebas estadísticas de T-Student y Análisis de Varianza (ANOVA) para la comparación significativa de grupos con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$) y $n=3$.

- **ÍNDICE DE HINCHAMIENTO.** Las colecciones de nanofibras se cortaron en círculos de 0.5 de diámetro y se sumergieron en 5 mL de solución salina (pH 7.5). A determinados intervalos, se sacaron las membranas y se secaron en un trozo de papel para eliminar el agua adherida a la superficie de las membranas antes de ser pesadas. Los resultados se calcularon como relación de hinchamiento (SR%). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.
- **ENSAYOS DE VIABILIDAD/CITOTOXICIDAD:** Se realizaron ensayos de citotoxicidad/viabilidad frente a la línea celular L929 de fibroblastos de ratón. Bajo las directrices de la ISO 10993-1:2010, se realizó la incubación de concentraciones de 100% (50,000 células) y 50% (25,000 células) de células por pozo, la incubación sobre los compósitos de base PVA se mantuvo a 37° C bajo atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 h. De acuerdo con los estatutos de la norma, posterior a 24 h de incubación se realizó el ensayo de viabilidad celular MTT, para ello, se adicionó el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT y se procedió a incubar durante 1 h bajo las condiciones estándar previamente puntualizadas. Los experimentos se realizaron por triplicado con un $n=3$ cada uno de ellos. Los valores de citotoxicidad/viabilidad celular fueron obtenidos mediante la lectura de las placas en espectrofotómetro de UV-Vis para placa multipozo en el rango de $\lambda_{\text{máx}}=500$ a 600 nm.



6. MARCO TEÓRICO

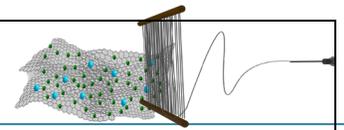
6.1 LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

La liberación de un fármaco es el proceso en el que un medicamento entra al cuerpo y suministra el principio activo para su posterior absorción. Dicha absorción depende de sus propiedades fisicoquímicas, su formulación y su vía de administración. Las formas farmacéuticas están compuestas por el fármaco y otros ingredientes, y se formulan de manera que puedan ser administradas por diversas vías [16].

De acuerdo con la COFEPRIS, las formas farmacéuticas de liberación modificada son formulaciones en las que la velocidad y/o el sitio de liberación del fármaco, difiere de la forma de liberación inmediata administrada por la misma vía. Existen numerosas clasificaciones basadas en la forma de liberar el fármaco o bien en los mecanismos que gobiernan dicha liberación (Tabla 6.1) [16].

Tabla 6.1. Ejemplos y principales características de las Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada (FFLM).

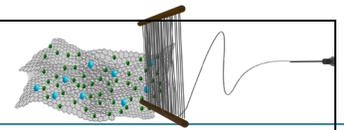
TIPO DE SISTEMA DE FFLM	CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES	EJEMPLO DE MEDICAMENTO COMERCIALIZADO DE FFLM
Sistemas de liberación acelerada	<ul style="list-style-type: none"> • Disolución rápida del fármaco sin necesidad de administración de líquidos. • No prolongan el efecto terapéutico. 	<ul style="list-style-type: none"> • Efferalgan Odis® (comprimidos budisperables de paracetamol). • Zofran Zydys® (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 20 mg Belmac EFG (cápsulas duras gastrorresistentes). • 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).



El objetivo principal de la liberación controlada es simple: conseguir la cantidad correcta del agente activo, en el momento adecuado y en el lugar preciso. Este método de liberación se usa habitualmente para prolongar el tiempo que la dosis terapéutica está presente de forma efectiva, utilizando una única dosis a fin de minimizar las concentraciones que exceden los requerimientos terapéuticos. En un sistema de liberación controlada, el agente bioactivo es incorporado a un soporte que generalmente es un material polimérico o una combinación de varios polímeros. Las principales ventajas de los sistemas poliméricos de liberación controlada, considerados desde el punto de vista farmacológico son [17]:

1. Los niveles de fármaco en plasma se mantienen de forma continua en el intervalo terapéutico deseado, pudiendo también ampliarse este período en el cuál la terapia es efectiva para disminuir así el número de dosis.
2. Los efectos no deseables, derivados de un metabolismo rápido o de una dosis excesiva, pueden reducirse e incluso eliminarse mediante una administración local a partir de un sistema polímero/fármaco.
3. Los fármacos que presentan tiempos de vida cortos *in vivo* pueden protegerse de la degradación. También pueden protegerse los tejidos corporales sensibles a determinados medicamentos, haciendo a la administración del fármaco menos invasiva.
4. El aprovechamiento del fármaco es más eficaz y, por tanto, con un coste inferior. Se puede disminuir la dosis necesaria cuando se trata de un agente activo de alto precio.

La eficacia de un fármaco en una aplicación específica requiere la utilización de concentraciones adecuadas del mismo en dosis diarias lo menos frecuentes posibles. Sin embargo, las técnicas convencionales utilizadas generalmente, proporcionan un control muy pobre de las concentraciones de la sustancia en plasma, y el tiempo de residencia solo se puede aumentar si se hace lo mismo con la cantidad o la frecuencia de las dosis; ninguno de estos caminos es conveniente porque se puede superar el nivel mínimo de toxicidad, ocasionando con ello efectos nocivos para el organismo [18]. Los



sistemas convencionales de dosificación pueden dar lugar a períodos alternativos de ineficacia o de toxicidad, hecho particularmente problemático si ambos niveles mínimos están muy próximos [19]. En el caso ideal, el objetivo es conducir a la existencia de una concentración uniforme de fármaco, a la utilización de dosis más pequeñas y a lograr la ausencia de efectos secundarios, o mejor dicho, adversos.

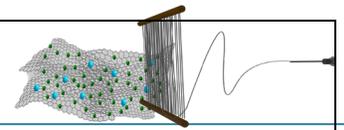
6.2 SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS BASADOS EN NANOFIBRAS

Las nanofibras poliméricas (NFP) con diámetros del orden de nanómetros, constituyen una nueva clase de materiales particularmente interesantes y versátiles. La flexibilidad de las nanofibras es comparable con otros nanomateriales altamente flexibles, así como películas sólidas y líquidas de espesor nanométrico [20].

Las NFP poseen propiedades únicas que las distinguen de otras fibras no tejidas, como una superficie extraordinariamente alta por unidad de masa, alta porosidad, bajo espesor, alta permeabilidad, bajo peso, rentabilidad, resistencia direccional superior, entre otras.

Las propiedades únicas de las nanofibras las convierten en materiales prometedores para una gran variedad de aplicaciones, desde productos médicos hasta productos de consumo, pasando por aplicaciones industriales y de alta tecnología. Pueden utilizarse en varios campos, como el aeroespacial, los condensadores, los transistores, los sistemas de administración de fármacos, separadores de baterías, almacenamiento de energía, pilas de combustible, tecnología de la información y aplicaciones médicas, cosméticas y alimentarias [21].

En las últimas décadas, han sido el foco de atención como sistemas nanotecnológicos para la liberación de fármacos. En comparación con otras nanoestructuras, estos sistemas tienen una gran presencia en la literatura, con potenciales aplicaciones en el campo de la nanomedicina para combatir el cáncer debido a sus múltiples ventajas y su formulación a partir de matrices poliméricas sintéticas o naturales [22].



Las moléculas del fármaco pueden incorporarse a la matriz polimérica por tres vías principales: i) por retención, ii) por adsorción física o iii) por adición química. Aparte de estas estrategias de incorporación, los objetivos principales en el diseño de NFP como sistemas de liberación son: el control del tamaño o diámetro de las nanofibras, las propiedades superficiales, forma, capacidad de carga del fármaco y propiedades de liberación controlada, los cuales hacen de estos sistemas nanoestructuras ideales para su uso como agentes terapéuticos [23].

Las dimensiones entre estas nanoestructuras también es un parámetro fundamental que establece prácticamente cómo será la vía de administración del fármaco en el sistema inmunológico. En este caso, las NFP pueden variar solo una de sus dimensiones: su diámetro promedio, el cual varía desde 100 nm o menos, hasta valores cercanos a una micra. Su longitud usualmente es de cientos de micras, por lo cual no pueden ser utilizadas para tratamientos vía intravenosa. Por consiguiente, se han desarrollado diversas estrategias, en relación con el diseño y configuración, para prolongar la liberación del fármaco de forma eficiente. En este contexto, Kajdič et al. establecieron una clasificación de las nanofibras con base en la estructura interna y el arreglo de las matrices poliméricas con el propósito de prolongar la liberación del fármaco [24], como se observa en la Figura 6.1.

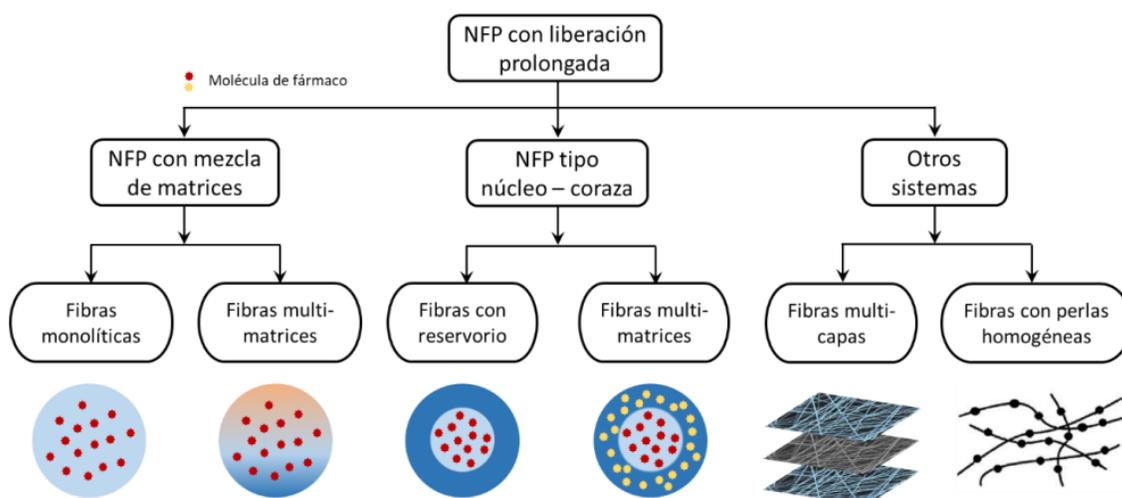
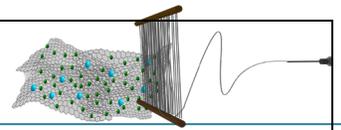


Figura 6.1. Clasificación de las nanofibras para la liberación de fármacos con base en su estructura interna (Adaptado de [24]).



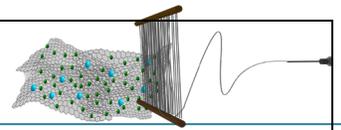
Dentro de todas las aplicaciones biomédicas existentes, la administración y transporte de fármacos es una de las áreas más prometedoras para emplear este tipo de materiales, siendo las ventajas de las nanofibras electrohiladas la posibilidad de alcanzar un alto contenido de carga (por arriba del 60%) y eficiencia (hasta un 100%) [25], además de poder emplear una amplia diversidad de polímeros compatibles cargados con distintos agentes fisicoquímicos, la habilidad para modular la liberación y la simplicidad del proceso de liberación [26].

En general, las colecciones de nanofibras presentan propiedades únicas que las distinguen de las fibras convencionales. Poseen una enorme relación superficie/volumen, baja densidad y alta porosidad con una estructura interna muy interconectada. Entre las propiedades más importantes de las nanofibras destaca el comportamiento mecánico, como el módulo elástico y la resistencia.

Si bien existen varias metodologías de obtención de nanofibras, la técnica de electrohilado se distingue por la versatilidad que ofrece para la obtención de nanofibras con buenos atributos y la variabilidad estructural de los microambientes generados.

6.3 ELECTROHILADO

El proceso de electrohilado (*electrospinning* en inglés) permite obtener nanofibras por medio de inducción electrostática a partir de disoluciones poliméricas viscoelásticas [20]. Estas fibras poseen diámetros que van de las micras a los nanómetros, rangos en los que es posible encontrar características únicas, entre las que se encuentra: un área superficial elevada, en relación al volumen esta relación puede ser aproximadamente 103 veces más alta que la de las microfibras, [25] flexibilidad en la superficie, alta porosidad, porosidad interconectada, y un rendimiento mecánico superior comparado con otras formas ya conocidas del material. Estas características hacen que las nanofibras sean candidatas óptimas para una variedad de aplicaciones, entre ellas: como andamios celulares en ingeniería de tejidos, en textiles, elementos para cubrir heridas, medios de filtración, membranas especiales y diversas aplicaciones médicas tales como



reemplazo de huesos, implantes dentales, sistemas de liberación de fármacos, injertos vasculares, vasos sanguíneos artificiales, entre otros [26].

La técnica consiste en hacer fluir disoluciones del polímero a través de campos eléctricos generados por alto voltaje. Al aplicar fuerzas eléctricas que superen las fuerzas de la tensión superficial en la disolución de polímero cargado, se genera la expulsión de finos *jets* poliméricos. Subsecuentemente, estos *jets* son atraídos hasta un electrodo metálico denominado colector. Durante el trayecto al colector, el *jet* se mueve en la dirección del campo eléctrico, elongándose a consecuencia de las repulsiones electrostáticas externas e internas. El disolvente se evapora en el trayecto que recorre la solución desde la punta de la aguja hacia el colector, y los segmentos de nanofibras secas son depositados en un colector (Figura 6.2).

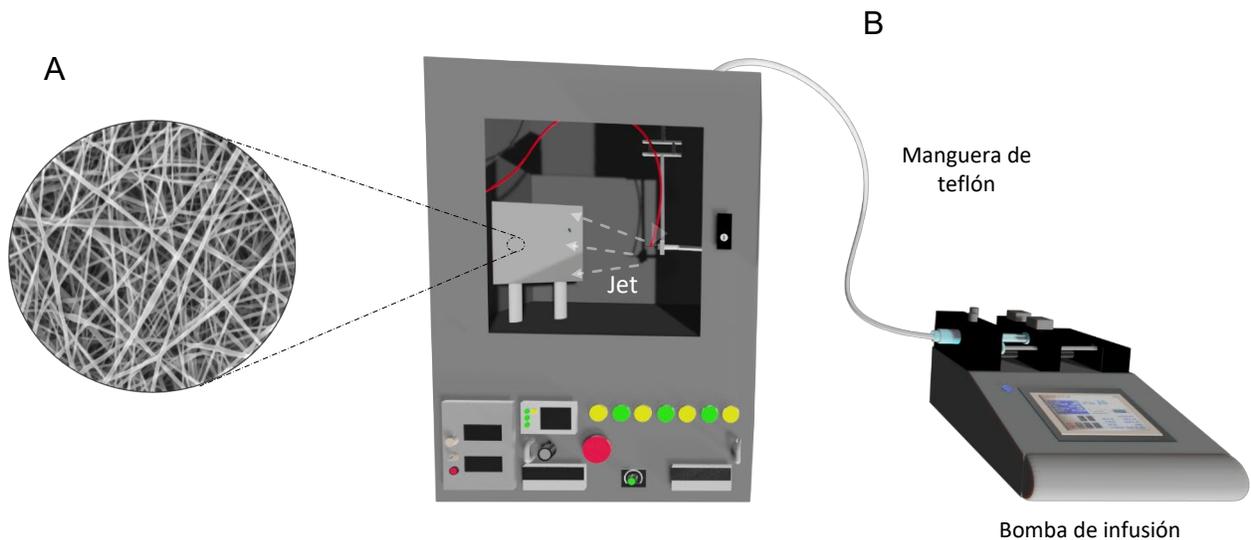


Figura 6.2. a) Morfología representativa de las colecciones aleatorias de nanofibras de PVA y b) diagrama de la configuración de electrohilado convencional.

Para obtener una morfología adecuada de nanofibras se deben considerar una serie de parámetros, los cuales se pueden dividir en tres categorías [27], como se aprecia en la Figura 6.3.

A estos parámetros podría adicionarse el efecto de las condiciones ambientales sobre la producción de las nanofibras, donde la humedad, la temperatura y el flujo del aire pueden afectar considerablemente la morfología de las fibras durante la eyección del polímero.

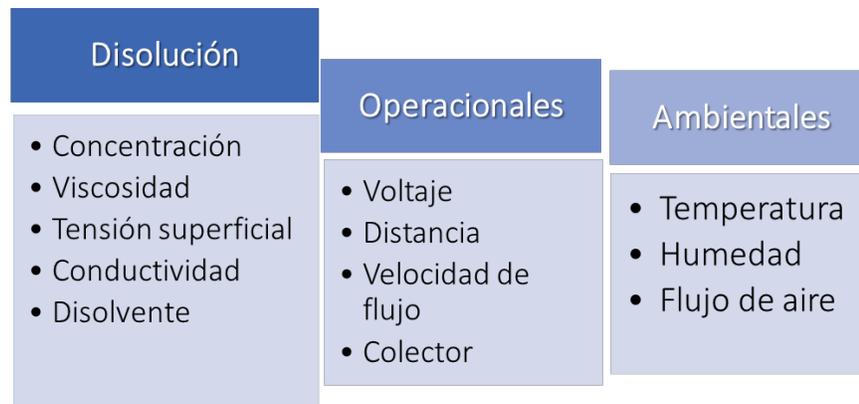
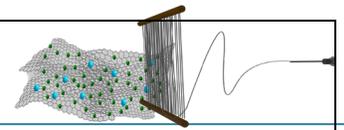
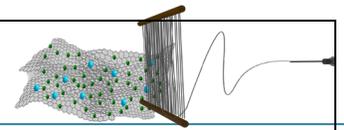


Figura 6.3. Esquema de parámetros que influyen en la obtención de nanofibras poliméricas por medio de electrohilado.

6.3.1 PROPIEDADES DE LA DISOLUCIÓN POLIMÉRICA

De acuerdo a la Figura 6.3, se ha determinado que los parámetros de la disolución polimérica a electrohilar inciden notablemente en el proceso para la obtención de nanofibras [28]:

Disolvente. El primer y más importante de los pasos en el proceso de electrohilado es la etapa de disolución del polímero en un disolvente apropiado. El disolvente debe mostrar, entre otras características, volatilidad y propiedades dieléctricas adecuadas. [29]. Un buen disolvente debe presentar una rápida evaporación y una mínima separación de fases dentro de la disolución que forme [30]. Atendiendo a las propiedades de los disolventes, éstas tienen un efecto acentuado sobre el diámetro de las nanofibras, ya que, propiedades tales como la constante dieléctrica, punto de ebullición, densidad, o la tensión superficial, influyen de manera considerable en el proceso. Se atribuyen dos claras funciones al disolvente: por un lado, se encarga de disolver al polímero para dar lugar a la formación de *jet*, y por otra parte, sirve como vehículo del propio polímero disuelto hacia el colector [31]. El conocimiento del disolvente puede proveer previamente de información útil que ayude a prever ciertos efectos o comportamientos durante el proceso [32].

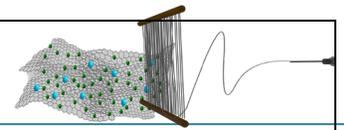


Viscosidad. Para disoluciones de polímeros muy viscosas se suelen dar largos tiempos de relajación de esfuerzos y tensiones, lo cual podría evitar o ralentizar la rotura del cono que forma el *jet* emitido desde el sistema de suministro. El aumento en la viscosidad o en la concentración de la disolución da pie a la formación de diámetros de nanofibras mayores y más uniformes [33]. Por el contrario, para bajas viscosidades, la tensión superficial es el factor dominante, formándose defectos o nanofibras con zonas fusionadas por la deposición de gotículas, por encima de la concentración crítica [34].

Peso molecular del polímero. El peso molecular tiene efectos en las propiedades reológicas y eléctricas, tales como la viscosidad, la tensión superficial, la conductividad y el esfuerzo dieléctrico [35]. Se trata de un parámetro que influye también en la morfología de las nanofibras, se ha establecido que bajos valores de dicha magnitud conducen a la formación de gotas en lugar de nanofibras, mientras que elevados valores provocan la obtención de fibras con diámetros grandes. [43-44]. Se ha podido demostrar que a valores mayores de peso molecular la cantidad de gotas y defectos es menor.

Conductividad. Otra vía interesante enfocada al control del diámetro de las nanofibras consiste en tratar de estirar el rango de concentración del polímero hacia valores más pequeños y, por consiguiente, a diámetros más pequeños de nanofibras por adición de componentes que varíen la conductividad eléctrica del disolvente. Un aumento de la conductividad tiende a provocar un incremento de la densidad de carga en la superficie del *jet*, minimizando así la posibilidad de formación de gotas durante el electrohilado.

Tensión superficial. Este parámetro depende de la composición del disolvente y determinará barreras e impedimentos más severos o más suaves al proceso de atracción electrostática, si el resto de las variables se mantienen constantes [38]. Generalmente, una elevada tensión superficial inhibe el electrohilado debido a la inestabilidad del *jet* y a la proyección de gotas, mientras que cuando tiende a la baja, favorece que el proceso tenga lugar con un campo eléctrico pequeño. Sin embargo, valores bajos no tienen por qué ser siempre apropiados para el proceso [35].



6.3.2 PARÁMETROS RELACIONADOS AL PROCESAMIENTO

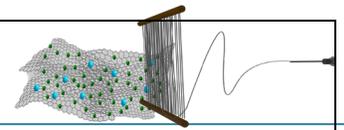
Se sabe que los polímeros son dieléctricos, que en presencia de un campo eléctrico se pueden considerar un arreglo de dipolos eléctricos microscópicos que va a tener tanto cargas positivas como negativas, cuyos centros no van a coincidir de manera perfecta, manteniéndose en su lugar por acción de las fuerzas atómicas y moleculares. Para poder cambiar dicha posición se debe someter a fuertes campos eléctricos externos, con lo que se explica por qué ocurre el alargamiento de la disolución cuando da inicio el proceso de electrohilado.

Para poder mejorar las propiedades dieléctricas que posee la disolución, se utilizan disolventes que tengan altas constantes dieléctricas, teniendo un mejor resultado en la formación de nanofibras, disminuyendo la aparición de estructuras defectuosas, como perlas [39].

En relación con las variables del proceso de electrohilado, se deben tener en cuenta tres:

Voltaje. El voltaje es uno de los parámetros más importantes dentro del proceso. Algunos autores afirman que aplicar voltajes altos hace que más fluido se transporte en el *jet*, lo que resulta en nanofibras con mayores diámetros, otros afirman que un incremento en la aplicación del voltaje decrece el diámetro de las nanofibras y aumenta la probabilidad de obtener estructuras con defectos (perlas)[40][41]; lo cierto es que en la mayoría de los casos un voltaje alto permite un mayor estiramiento de la disolución debido a la presencia de mayor fuerza de coulomb en el *jet* y un fuerte campo eléctrico, todos estos factores promueven una reducción en el diámetro de las nanofibras. La influencia del voltaje depende además de las propiedades viscoelásticas del material base, por ello es importante analizar el comportamiento para cada polímero con su respectivo disolvente [42].

La aplicación del voltaje adecuado permite la elongación de la gota polimérica que se suministra, formando la estructura conocida como cono de Taylor; la importancia de esta estructura radica en la adecuada formación de los *jets* poliméricos que dan lugar a las nanofibras. 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 disolución provocará



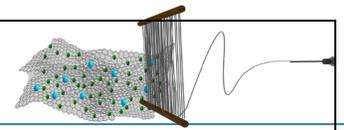
una mayor aceleración del *jet* de disolución, y por consecuencia una mayor demanda de disolución desde la punta de la aguja, resultando nanofibras muy finas, pero con un cono de Taylor inestable [43].

Flujo de inyección. Un flujo de inyección reducido podría ser benéfico ya que el disolvente tendría más tiempo para evaporarse evitando la formación de defectos en las nanofibras [44]. Cuando el flujo de salida se incrementa ocurre un incremento en el diámetro de las nanofibras y posiblemente en el tamaño de los defectos. Un mínimo valor de volumen de disolución a la salida de la jeringa de suministro debe ser mantenido para obtener un cono de Taylor estable, el flujo de salida determina la cantidad de disolución disponible para el proceso de electrohilado [42].

Distancia de trabajo: aguja - electrodo colector. Dependiendo de las propiedades de la disolución, el efecto de la variación de la distancia entre la punta de la aguja y el colector puede o no tener efecto en la morfología de las nanofibras. Al trabajar con distancias de trabajo muy amplias las nanofibras electrohiladas podrían romperse debido a su propio peso, especialmente si éstas son de diámetro pequeño. Una distancia mínima es requerida para dar a las nanofibras el tiempo suficiente para que el disolvente se evapore antes de alcanzar el colector. En ambos casos, tanto a distancias de trabajo muy grandes como demasiado pequeñas puede ocurrir la formación de defectos o la deposición de nanofibras húmedas [42].

La distancia entre el extremo de la aguja y el colector se emplea para influir sobre el diámetro de las nanofibras, pues se requiere una separación mínima para conceder tiempo suficiente para la evaporación del disolvente antes de fijarse al colector [35]. Generalmente, distancias de trabajo pequeñas se traducen en nanofibras húmedas, mientras que distancias largas dan lugar a nanofibras de diámetro más reducido [32].

Así pues, el adecuado control de dichos parámetros es crucial para la obtención de colecciones de nanofibras con características deseables. El empleo de NFP en el campo de la medicina ha tomado relevancia por su diversidad y potencial en otras aplicaciones biológicas o terapéuticas, tales como: ingeniería de tejidos, bio-sensores, filtros, materiales para curación de heridas, entre otros, principalmente por la semejanza que mantienen con las matrices celulares en términos de estructura y biomecánica [45].



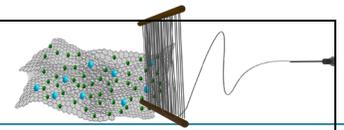
Comúnmente, las nanofibras producidas a partir del proceso de electrohilado convencional suelen estar orientadas al azar, sin embargo, existen reportes que indican que las colecciones de nanofibras ofrecen mejores propiedades de interacción con el tejido cuando conforman colecciones axialmente orientadas. En términos de aplicaciones farmacéuticas, como la dosificación de agentes terapéuticos, es de gran interés la generación de sistemas de liberación de fármacos basados en nanofibras alineadas dado que presentan mayor tiempo de vida útil y generan cinéticas de liberación con mayor control [12-42]. En este sentido, se han reportado varios métodos para producir nanofibras alineadas, todos ellos enfocados a modificaciones en el sistema colector. Los métodos más comunes para fabricar colecciones de nanofibras alineadas son la inducción mecánica [46], provocada mediante colectores giratorios operados a altas velocidades de rotación (~4000 rpm), y el electrohilado *air gap* que emplea electrodos conductores paralelos [47].

6.4 ELECTROHILADO AIR GAP

El electrohilado *air gap* fue introducido por primera vez por Li et al. en 2003, como un enfoque exitoso para producir nanofibras de hasta varios centímetros de longitud alineadas axialmente [47], posicionando al electrohilado *air gap* como un método simple y versátil para generar nanofibras como matrices alineadas sobre grandes áreas por medio de una interacción electrostática entre el campo electrostático y las nanofibras cargadas [56-57]. Con esta metodología, la longitud de las fibras obtenidas puede ser de diversos tamaños dependiendo del colector, desde pocos milímetros hasta mayores a 100 cm [50].

Bajo este enfoque, se han empleado como sistema colector, electrodos metálicos dispuestos en paralelo, para generar matrices paralelas de fibras ultrafinas electrohiladas de policaprolactona (PCL) [51].

El método de electrohilado *air gap* comparte el fundamento con el electrohilado convencional, siendo la única variación el uso de un sistema colector que consta de dos sustratos eléctricamente conductores separados por un espacio vacío (*gap*). El ancho de



este espacio puede variar desde algunos milímetros hasta varios centímetros. Las líneas de campo eléctrico en la vecindad de los colectores se dividen en dos fracciones apuntando y tirando de los dos extremos de las nanofibras hacia los dos colectores y, consecuentemente, ocasionando el estiramiento individual de las nanofibras a través del espacio. Este proceso es repetitivo y promueve la recolección de matrices de nanofibras alineadas uniaxialmente en áreas de hasta 50 cm. El grado de alineación de las nanofibras aumenta con el tiempo de recolección, pero los efectos del ancho del *gap* y el voltaje aplicado no han sido estudiados cuantitativamente [52].

La técnica de electrohilado *air gap* permite obtener nanofibras con alto grado de orientación inducida mediante el uso de un sistema colector constituido por dos barras metálicas paralelas, donde las nanofibras electrohiladas son recolectadas por dos electrodos conectados a potencial negativo o a tierra, separados por el espacio vacío denominado *gap*. Además, las interacciones electrostáticas de las nanofibras recolectadas coadyuvan al estiramiento de las nanofibras subsecuentes guiando el acomodo ordenado a través del *gap* y formando una matriz paralela [53].

Es de gran interés en este trabajo de investigación el uso del alcohol polivinílico para la obtención de sistemas de liberación de fármacos, sin embargo aunque es un polímero de gran interés tecnológico y biomédico, y ha sido ampliamente utilizado para la generación de colecciones de nanofibras, existen pocos reportes que aborden su procesamiento para la obtención de colecciones axialmente orientadas, tal es el caso de la producción de nanofibras alineadas de carboximetilcelulosa y PVA cargadas con ácido flufenámico mediante electrohilado *air gap* [54], y la fabricación de nanofibras ultrafinas de PVA altamente alineadas mediante electrohilado centrífugo [55], ambos orientados en la liberación farmacológica.

6.5 ALCOHOL POLIVINÍLICO (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 6.4). La cantidad de hidroxilación determina las características físicas y químicas, así como las propiedades mecánicas del polímero [56].

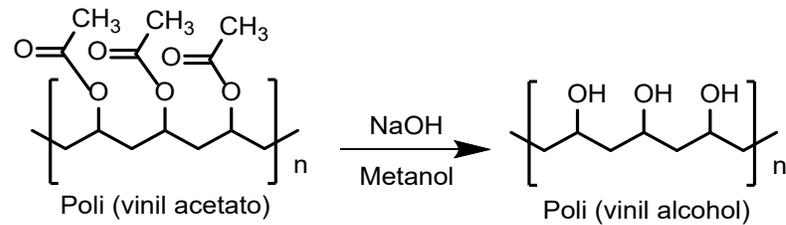
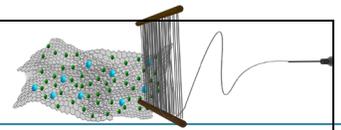


Figura 6.4. Preparación por alcoholisis parcial o total de acetato de polivinilo para eliminar los grupos acetato y producir PVA.

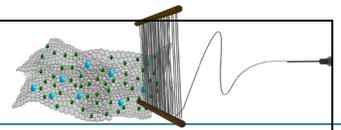
Esta ruta química da como resultado un producto altamente hidrosoluble, pero resistente a la mayoría de los disolventes orgánicos. Dada su biocompatibilidad con los tejidos humanos, permeabilidad y bajo coeficiente de fricción, es apto para ser usado en aplicaciones médicas y ha sido aprobado por la FDA para su aplicación en diversas formas farmacéuticas [57].

El polímero totalmente hidrolizado es insoluble en agua a temperatura ambiente, sin embargo, se solubiliza perfectamente a temperaturas superiores a los 85°C [58]. La presencia de grupos hidroxilo (-OH) aumentan las interacciones por puente de hidrógeno, tanto intramolecular como intermolecularmente, disminuyendo la solubilidad en agua, mientras que la presencia residual de grupos acetilo 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 hidrólisis [58]. Además, es una excelente barrera al oxígeno gaseoso en bajas condiciones humedad, disminuyendo esta propiedad con el aumento de humedad relativa.

Su carácter biodegradable es un aspecto destacable, ya que es uno de los pocos polímeros sintéticos realmente degradables, obteniéndose como productos de

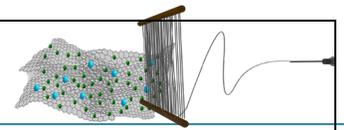


degradación de agua y dióxido de carbono [59]. Al menos 55 especies o variedades de microorganismos muestran procesos de degradación de este polímero en diferentes entornos como son los fangos activados, digestores anaerobios, sistemas sépticos, compostaje, sistemas acuáticos y lagunaje. El tiempo de degradación del PVA por la acción de los microorganismos depende de sus propiedades físicas [60].

El PVA es empleado frecuentemente para aplicaciones biomédicas, como administración de fármacos e ingeniería de tejidos, debido a su alta citocompatibilidad [47-56]. Aunado a ello, su valor tecnológico se ve aumentado debido a la alta electrohilabilidad que presentan sus disoluciones acuosas [57-58].

6.6 SISTEMA DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS BASADOS EN PVA

En el contexto de aplicaciones farmacéuticas, se ha reportado el electrohilado de PVA 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 [64]. Asimismo, a partir del electrohilado de disoluciones de PVA/gelatina, y PVA/alginate 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 un mayor porcentaje de liberación del fármaco en la combinación PVA/gelatina, el cual no se ligó químicamente a los polímeros [62]. Otro estudio ha reportado la fabricación de nanofibras entrecruzadas PVA/alginate de sodio cargadas con naftalina, las cuales presentan un porcentaje de liberación del fármaco de 64% en 8 h [65]. 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* [66].



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 [62], el estudio del efecto de éste parámetro sobre la cinética de liberación de fármacos, es de gran importancia en el área.

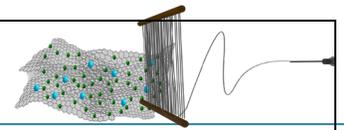
Recientemente, en el grupo de trabajo de Polímeros y Materiales del IIQB se establecieron condiciones operacionales para la obtención de nanofibras alineadas de PVA-TTC mediante electrohilado *air gap*; esta configuración es adecuada para la inducción de orientación axial. Se obtuvieron diámetros de 101 nm, 88% de las nanofibras con un grado de alineación de $94\pm 16^\circ$ y con potencial efecto bactericida frente a cepas clínicas [6].

Aun cuando se ha demostrado que las colecciones de nanofibras con organización inducida presentan atributos superiores para enfoques biomédicos, respecto a las colecciones de nanofibras aleatorias [61], son pocos los estudios que toman en cuenta este hecho para el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos.

6.7 ANTIBIÓTICOS

En términos de aplicaciones farmacológicas, la administración efectiva de antibióticos con plataformas micro y nanoestructuradas es una alternativa para combatir la resistencia antimicrobiana.

En principio, un antibiótico es un fármaco que elimina y/o inhibe el crecimiento de las bacterias. Cada tipo de antibiótico presenta un mecanismo de acción particular para inhibir la reproducción de las células bacterianas o causar la muerte del microorganismo. Algunos antibióticos pueden utilizarse para tratar una amplia gama de infecciones y se conocen como antibióticos de **amplio espectro**. Otros sólo son eficaces contra unos pocos tipos de bacterias y se denominan antibióticos de **espectro reducido** [67].



Para que los antimicrobianos alcancen su diana deben atravesar la cubierta bacteriana, salvo cuando la diana es la propia envoltura externa de los gramnegativos. Las bacterias gramnegativas ofrecen mayor resistencia, respecto a las grampositivas, a la entrada de antimicrobianos, pues poseen una membrana celular externa, que rodea la capa de peptidoglicano [68].

Los antibióticos suelen clasificarse en dos grupos:

- **Según el efecto de su acción:** se clasifican en bacteriostáticos y bactericidas, y dependiendo si la acción consiste en inhibir el crecimiento o lisar la bacteria, respectivamente [69].
- **Según su mecanismo de acción:** El mecanismo de acción se refiere al proceso mediante el que un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana (Figura 6.5). A su vez, esta categoría se subdivide en:
 - Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, afectando la formación del polímero peptidoglicano que conforma la estructura de la pared bacteriana.
 - Agentes que afectan la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, entre los cuales se encuentran los que actúan sobre la subunidad 30s y 50s.
 - Agentes que afectan el metabolismo de los ácidos.
 - Agentes antimetabolitos que antagonizan los pasos metabólicos en la síntesis de ácido fólico.
 - Agentes que actúan en forma directa sobre la membrana celular del microorganismo [13-14].

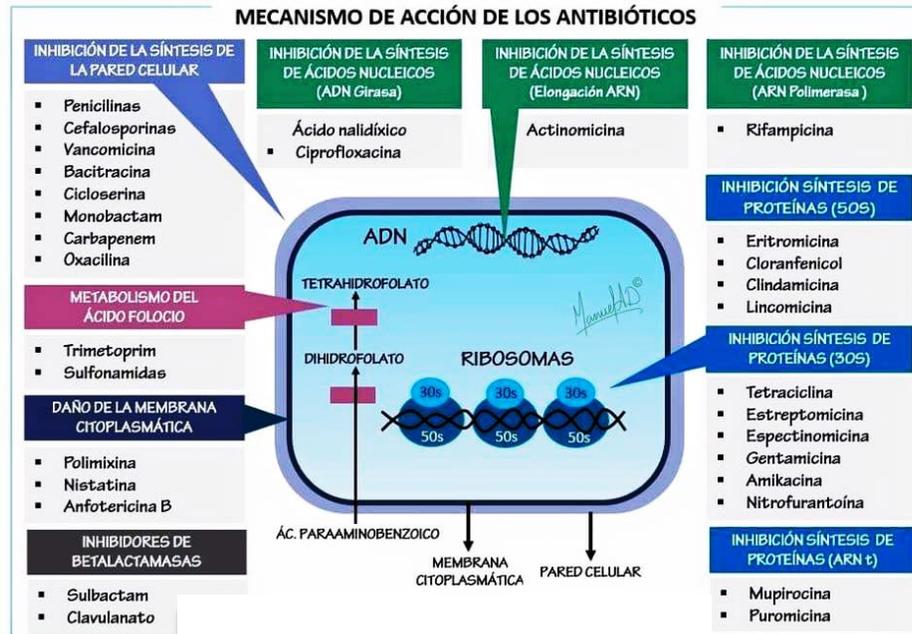
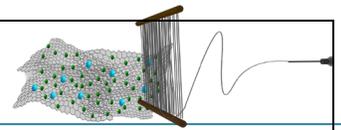
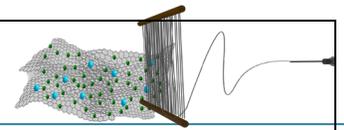


Figura. 6.5. Clasificación de antibióticos según su mecanismo de acción [71].

6.8 RESISTENCIA BACTERIANA (RA)

Se define como la capacidad que tiene una bacteria para sobrevivir a concentraciones de antibiótico que inhiben o matan a otras de la misma especie. Como resultado, estas bacterias que son capaces de sobrevivir se multiplican y se diseminan, debido a la falta de competencia por parte de otras cepas sensibles al mismo fármaco. Esto ha llevado a la aparición de las llamadas «superbacterias», por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), o *Neisseria gonorrhoeae*, que son difíciles de tratar con los antibióticos disponibles [12-16]. El desarrollo de resistencias es un fenómeno natural que ha sido observado desde el descubrimiento de los primeros antibióticos [17]. Es la forma que tienen las bacterias de sobrevivir ante la exposición a un medio hostil.

El principal causante de la RA es el uso indebido y excesivo de los antibióticos en los seres humanos y los animales, así como en la agricultura. Las bacterias han demostrado tener gran adaptabilidad a los fármacos introducidos, observándose siempre resistencias a los pocos años de introducir un nuevo antibiótico. La magnitud del impacto



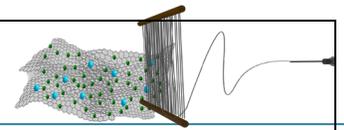
de la RA es ahora bien reconocida y los avances médicos modernos, que dependen de los antibióticos, pueden verse comprometidos si esta situación no es abordada.

Actualmente las bacterias resistentes se han extendido al ámbito comunitario, dificultando todavía más su control y posterior erradicación. Son pocas las opciones terapéuticas que quedan disponibles para tratar las infecciones causadas por los microorganismos multirresistentes, y muchas veces no son óptimas, puesto que presentan mayor toxicidad, menor eficacia, escasa biodisponibilidad y en algunos casos un precio más alto. Estas infecciones además están asociadas a alta mortalidad, estancia hospitalaria prolongada y elevado coste económico.

Como se ha mencionado anteriormente, los sistemas de liberación de fármacos nanoestructurados ofrecen como principal ventaja la optimización del potencial farmacológico a dosis reducidas, en comparación a las formulaciones comercialmente disponibles. Partiendo de esta premisa, el desarrollo de sistemas de liberación controlada de antibióticos es una alternativa que permite combatir la resistencia bacteriana. Por ello, el presente trabajo propone integrar un agente antibiótico, TTC, a colecciones de nanofibras de PVA.

6.9 TETRACICLINAS

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro que pertenecen a un grupo de antibióticos con una estructura tetracíclica básica: núcleo naftacen-carboxamídico con carácter anfótero. Su nombre se origina por tener en su estructura 4 anillos bencénicos fusionados. Los diferentes representantes de este grupo se diferencian entre sí por los radicales que contiene el grupo químico básico, como se muestra en la Figura 6.6, y actividad biológica común. En su mayoría, actúan como bacteriostáticos, aunque pueden llegar a ser bactericidas en altas concentraciones. Acceden al interior celular por un doble mecanismo de difusión pasiva y transporte activo. Tienen una amplia gama de actividad contra diversos microorganismos y siguen siendo los antibióticos de elección para algunas enfermedades. Sin embargo, debido a sus efectos secundarios, el aumento de



la resistencia y los antibióticos alternativos ahora disponibles, su utilidad clínica es limitada [72].

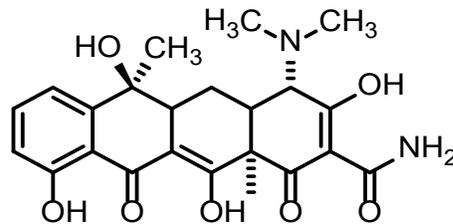
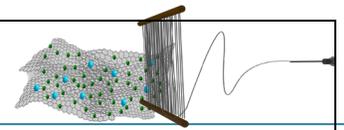


Figura 6.6. Estructura de la tetraciclina (TTC) [5].

La liberación farmacológica área de la tetraciclina cargada en nanofibras ha sido poco estudiada, Los reportes existentes se abocan al estudio de las nanofibras aleatorias. Ejemplo de ello es que se ha incursionado en la síntesis de nanofibras que contienen antibióticos en implantes dentales de titanio, donde se investigó la capacidad *in vitro* de las nanofibras poliméricas que contienen clorhidrato de tetraciclina (TTCH) para inhibir el crecimiento de bacterias asociadas a la periimplantitis [73].

Como ya se ha mencionado, los andamios construidos a partir de nanofibras poliméricas tienen además de las ventajas de una morfología fibrosa que imita la matriz extracelular para la proliferación celular, una alta porosidad y una gran relación superficie-volumen; favorable para la liberación del fármaco. Esto se ha podido comprobar en varias investigaciones, una de ellas fue orientada a la creación de andamios de nanofibras electrohiladas cargadas con TTCH a base de PVA y quitosano para vendaje de heridas; dando como resultado la liberación explosiva inicial de TTCH debido a una rápida difusión desde las nanofibras, predominantemente las moléculas de fármaco absorbidas (disponibles) en la superficie de las nanofibras; transcurridas 2 h, la cantidad de TTCH liberada aumenta lentamente tendiendo a un nivel de saturación. Por ello, mantuvieron el efecto de inhibición sobre algunas de las especies bacterianas utilizadas, además, no se registró toxicidad, indicando que este vendaje antibacteriano puede usarse para heridas y promover la cicatrización [74].

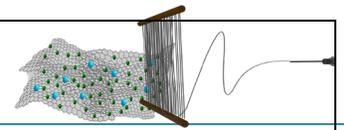


En el área farmacéutica, las nanofibras tienen importantes aplicaciones, una de ellas es en la administración de fármacos mucoadhesivos que tiene el potencial de optimizar la administración localizada de fármaco [75]. Bajo este enfoque, se ha demostrado la utilidad del quitosano tiolado y óxido de polietileno como matrices transportadoras para la liberación controlada de TTC. Con respecto al modelo de liberación, se encontró que la característica de liberación prolongada se ajustaba bien al modelo de raíz cuadrada de Higuchi, lo que indica que el perfil de liberación del fármaco desde estos sistemas de matriz está controlado por difusión; demostrando una liberación sostenida de ambos fármacos continua hasta 48 h. El estudio antibacteriano demostró que los diámetros de zona de inhibición del crecimiento bacteriano aumentaron con concentraciones crecientes del fármaco en nanofibras. De este modo, el sistema de administración representó una herramienta novedosa para mejorar la eficacia terapéutica de fármacos de baja absorción en el tracto gastrointestinal.

Con anterioridad, en el Laboratorio de Polímeros y Materiales se ha obtenido un material conformado por nanofibras de PVA, cuya orientación inducida favorece la liberación prolongada de TTC, manteniendo una liberación sostenida. Asimismo, las nanofibras alineadas PVA-TTC indujeron inhibición del crecimiento bacteriano en el ensayo de difusión en agar a 48 h en cultivos de cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* [8]. No obstante, en aras de mejorar la calidad de las microestructuras bioactivas PVA-TTC es necesaria la incorporación de coadyuvantes que además de promover el grado de orientación y que a su vez permitan la incorporación homogénea de la TTC en la disolución de electrohilado. En este sentido, la adición de DES en volúmenes discretos puede coadyuvar a la obtención de nanofibras de PVA/TTC con grado de orientación axial superior al 88% y disminuir la presencia de defectos en la microarquitectura final.

6.10 DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES)

Los disolventes eutécticos profundos (DES) son mezclas de dos sustancias con puntos de fusión elevados capaces de asociarse; generalmente una sal de amonio cuaternaria y un agente complejante neutro. [76]. El término 'disolventes de punto



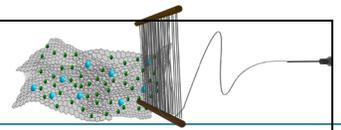
eutéctico profundo' proviene de la baja temperatura de transición vítrea en una relación molar específica de sal a especies donadoras de protón (HBD, por sus siglas en inglés) [77].

Son fáciles de preparar en estado puro. No reaccionan con el agua, muchos son biodegradables y las propiedades toxicológicas de los componentes están bien caracterizadas [78].

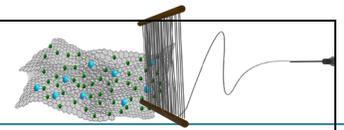
El DES más estudiado hasta la fecha es el conformado por cloruro de colina-urea (ChCl:U). Un disolvente de diseño biodegradable, bactericida y no citotóxico [76-12]. Una correlación significativa entre la molécula donadora de enlaces de hidrógeno, la urea, y el anión cloruro, como se había demostrado previamente mediante experimentos de RMN, se muestra como una fuerte interacción de enlaces de hidrógeno. Es importante destacar que también se ha encontrado que la colina interactúa muy fuertemente con el cloruro mediante enlaces de hidrógeno [80].

En términos de procesamiento de materiales poliméricos, se ha utilizado el DES ChCl:U como agente porógeno en el procesamiento de quitosano, mediante una metodología fácil y ecológica para obtener estructuras porosas 3D a base de quitosano puro en forma de monolitos y películas. Se basa en un proceso modificado de separación de fases inducido por evaporación en una disolución precursora de quitosano. En este enfoque, se utiliza un disolvente eutéctico profundo (DES) como sistema no disolvente y un alternativa ecológica, rentable, sencilla y versátil para la producción de materiales de quitosano altamente estructurados [10]. En la producción de nanofibras, se ha utilizado en el electrohilado convencional con PVA, miel y ácido acetilsalicílico para la administración de fármacos de rápida disolución [13] y en *air gap* de PVA, donde la adición de DES ChCl:U al 0.5% (1:2) favorece el grado de orientación de las nanofibras en 75% respecto del sistema de PVA puro. Produciendo nanofibras de PVA de alta calidad con un diámetro promedio de 180 ± 44 nm y con rugosidad inducida por efecto del DES [9].

En este contexto, se proyecta la obtención de nanofibras compuestas PVA/TTC con alto grado de orientación inducida mediante electrohilado *air gap*. Donde el uso del DES ChCl:U como aditivo de electrohilado facilitará la obtención de nanofibras compuestas



PVA/TTC libres de defectos y promoverá el alto grado de orientación, al mejorar el entorno dieléctrico de la disolución. De manera simultánea, la adición de la mezcla eutéctica ChCl:U servirá como coadyuvante en la disolución de la TTC. La contribución de la presente propuesta plantea el estudio *in vitro* de la liberación del antibiótico TTC en función de la organización de las microestructuras (alineadas y aleatorias) frente a bacterias referenciadas; así como el estudio de la cinética de liberación.



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

El PVA ha sido uno de los polímeros más estudiados debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, y no toxicidad; estas características lo hacen altamente valorado en la liberación de fármacos, en especial en forma de nanofibras debido a que es altamente electrohilable [59]. Para visualizar los aspectos morfológicos de los materiales híbridos se efectuó el proceso de electrohilado a condiciones óptimas de operación

Inicialmente se electrohiló una solución de PVA, obtenidas a manera de control mediante el procesamiento de disoluciones acuosas de PVA 10% p/v empleando la configuración de electrohilado *air gap*. En la Figura 7.1 a se presenta la microestructura de las nanofibras de PVA donde se observan colecciones de nanofibras de alta calidad, con ausencia de defectos y una baja distribución de tamaño de diámetros, dado que varía desde 80 nm hasta 120 nm, con un diámetro promedio de 91 ± 18 nm, de acuerdo con el histograma mostrado en la Figura 7.1 b. Estas nanofibras se obtuvieron empleando los siguientes parámetros de electrohilado: voltaje de 13.3 kV, a una distancia de trabajo de 13 cm, velocidad de flujo de 0.6 mL/h y temperatura de 21 °C; con una apertura del *gap* de 2 cm y a humedad relativa de 42%.

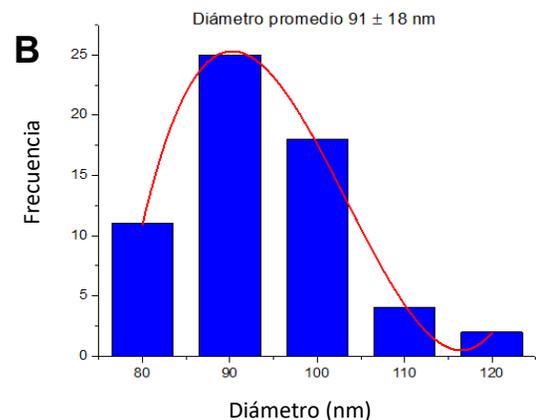
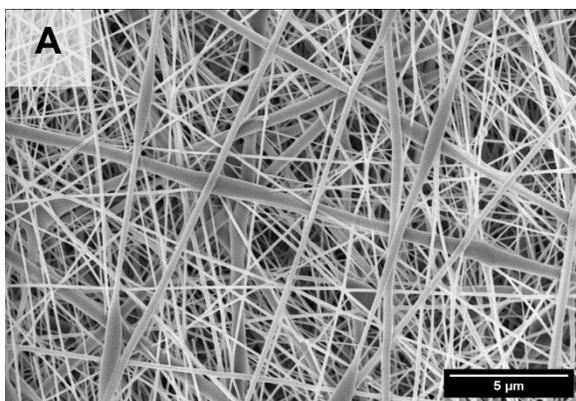
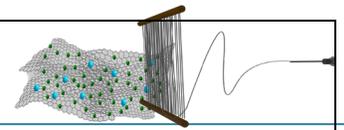


Figura 7.1. a) Colección de nanofibras de PVA y b) histograma de distribución de diámetro.



Se ha estudiado que al adicionar la mezcla eutéctica de ChCl:U al PVA para su electrohilado, las características del material difieren de manera considerable, por ello se decidió utilizar a una concentración de 0.5 %v/v de DES en la solución de PVA a electrohilar, de manera que permita mejorar la microestructura y no se comprometa la electrohilabilidad del mismo [81]. En la microestructura de las nanofibras de PVA-DES obtenidas (Figura 7.2 a) se observan algunos defectos en forma de perlas debido a la corta distancia de trabajo (10 cm) y la alta viscosidad de la disolución, no obstante son nanofibras de buena calidad, con diámetros uniformes y cuya distribución de diámetros se encuentran entre 80 y 200 nm (figura 7.2 b), con diámetro medio de 126 ± 22 nm; como parámetros de electrohilado, se aplicó un voltaje de 14.8 kV, velocidad de flujo de 0.5 mL/h y temperatura de 21 °C; operando a humedad relativa de 22%.

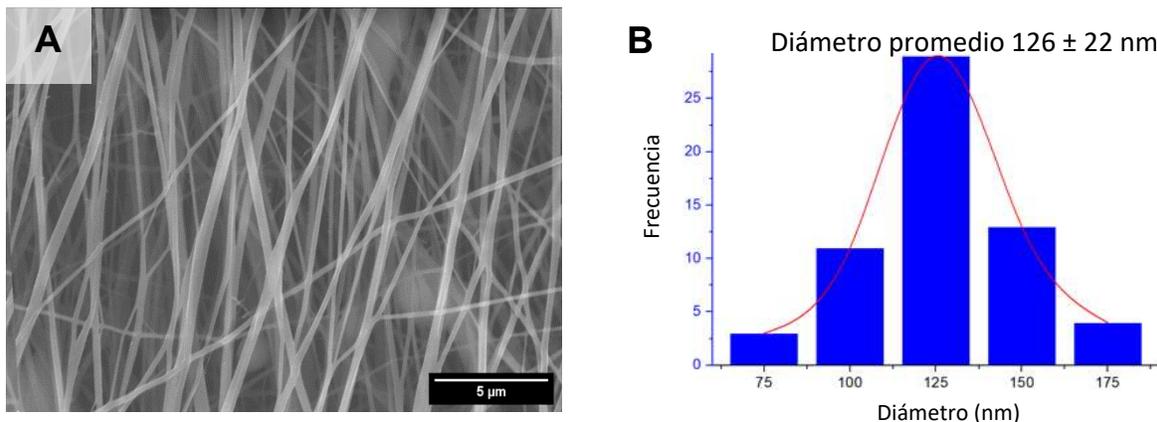
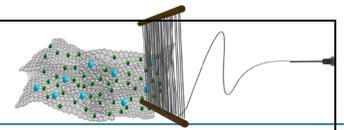


Figura 7.2. a) Colección de nanofibras de PVA-DES y b) histograma de distribución de diámetro.

La incorporación de la TTC, a la disolución de electrohilado, se realizó empleando una disolución hidroalcohólica, debido a la limitada solubilidad que presenta el antibiótico en medio acuoso. Además, este medio favorece el entorno dieléctrico y contribuye a aumentar la velocidad de evaporación.

La concentración utilizada del PVA coadyuva a la obtención de diámetros promedio aceptables, de tal modo que repercute con la uniformidad y el diámetro de las nanofibras obtenidas. Del mismo modo, la velocidad de flujo y el voltaje también repercuten en la formación y calidad de las nanofibras.



Del análisis microestructural y de los parámetros de electrohilado de las nanofibras obtenidas a partir de las disoluciones de PVA puro y PVA-DES, se observa que ambas generan nanofibras de buena calidad, por lo que se procedió al electrohilado *air gap* de disoluciones cargadas con TTC, disolviendo la TTC en etanol y posteriormente agregando esta disolución al PVA, para el caso de la disolución PVA-TTC, y por otro lado, disolviendo el DES en PVA y posteriormente agregando a esta disolución la TTC disuelta en etanol, para el caso de la disolución PVA-TTC-DES, tal como se describió en el apartado 5.2. En este caso, ambas soluciones fueron electrohiladas para el análisis de la influencia de los parámetros en la generación de colecciones de nanofibras alineadas y cargadas con el antibiótico.

Las colecciones de nanofibras generadas a partir de la disolución de PVA-TTC, presentan una alta alineación y ausencia de defectos (Figura 7.3 B). Además, se observan diámetros uniformes, cuya distribución se encuentran entre 80 y 200 nm, con diámetro medio de 148 ± 29 nm (Figura 7.3 A); para ello se requirió de un voltaje de 14.7 kV, a una distancia de trabajo de 14 cm, una velocidad de flujo de 0.4 mL/h y temperatura de 21 °C; operando a humedad relativa de 30%. Esta orientación y calidad se atribuyen al incremento tanto la distancia de trabajo, el voltaje y la reducción de la velocidad de inyección de 0.3 mL/h. No obstante, uno de los parámetros que influyen en la electrohilabilidad es la temperatura y la humedad relativa. Esto debido a que se ha observado que, a mayor humedad relativa, decrece la alineación, mismo que se traduce en mayores defectos en las nanofibras.

En la imagen 7.3 B, se puede observar que algunas zonas de esta colección exhiben algunos defectos y poca alineación; lo que se atribuye a la inestabilidad del *jet* polimérico, como consecuencia de la humedad (21 °C, Hr= 42%), repercutiendo directamente en la morfología de las nanofibras al retardar la velocidad de evaporación del disolvente de electrohilado. También es posible notar que la deposición se ve afectada, incrementando lentamente el espesor con defectos a lo largo del tiempo de trabajo, mismo que se muestra en la morfología macroscópica de las Figuras 7.3 C1 y C2, respectivamente.

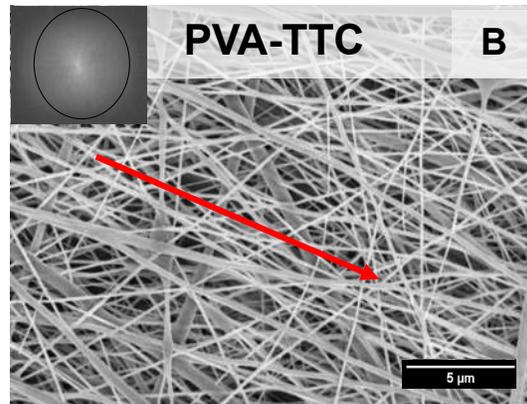
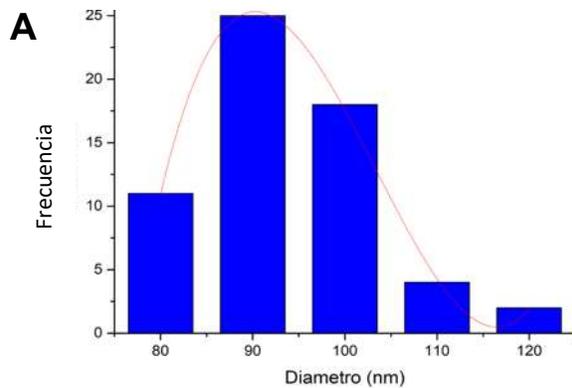


Figura 7.3. Histograma de diámetro y colecciones de nanofibras PVA-TTC, obtenidas a una distancia de trabajo de 14 cm, 14.5 kV, 0.3 mL/h, 26 °C y Hr > 40: A) histograma de distribución de diámetros de nanofibras, B) imagen FESEM, C1) 1 h de proceso, C2) 3 h de proceso.

El incremento la temperatura del equipo a 30 °C favorece la obtención de nanofibras más uniformes (Figura 7.4 B). Esto fue posible debido a que las condiciones ambientales y de trabajo beneficiaron la electrohilabilidad, en este caso por el aumento de temperatura y disminución de humedad: 30 °C; Hr = 28%, los cuales permiten la evaporación eficiente del disolvente, minimizando así la formación de defectos, incluso a nivel macroscópico (Figura 7.4 C1 Y C2). A su vez, el electrohilado bajo estas condiciones ambientales también influye en el grado de alineación, siendo inversamente proporcional al diámetro de las nanofibras, mismos que presentan una distribución entre 120 y 200 nm, con diámetro promedio de 148 ± 29 nm.

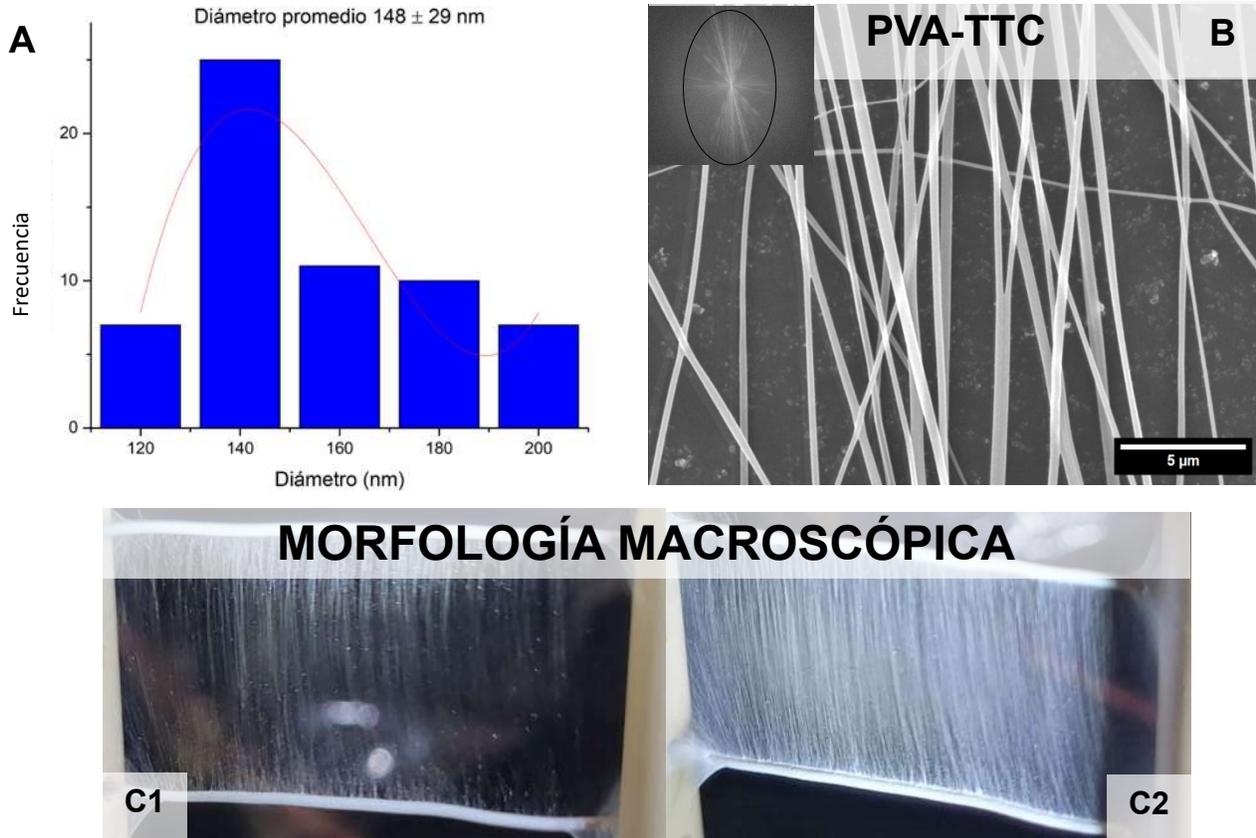
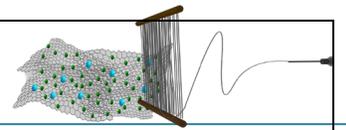
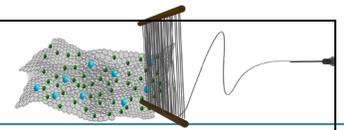


Figura 7.4. A) histograma de distribución de diámetros de nanofibras PVA-TTC, obtenidas a una distancia de trabajo de 14 cm, 14.7 kV, 0.3 mL/h, 30 °C y Hr < 30: B) imagen FESEM, C1) 1 h de proceso, C2) 3 h de proceso

El incremento de la temperatura en la cámara de electrohilado propició la reducción de la humedad del ambiente, de manera que se obtuvieron las colecciones deseadas en un lapso de trabajo aceptable favoreciendo la electrohilabilidad. En el caso del DES, por si solo es altamente conductor y el factor de la temperatura lo propicia aún más [82].

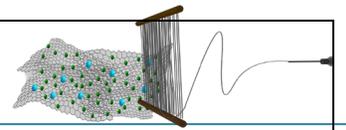
La humedad del ambiente es uno de los parámetros que más influyen en el electrohilado. El agua condensada en la superficie de las fibras, al trabajar con un alto porcentaje humedad relativa, puede tener influencia en la morfología y alineación de las colecciones, especialmente cuando se trabaja con disolventes volátiles [27-31]; por ello se llevaron a cabo una serie de experimentos para optimizar la producción de nanofibras.



Para la producción de nanofibras alineadas de PVA-TTC se aumentó el voltaje de 14.7 a 16.5 kV, mientras que la concentración de la disolución polimérica y el *gap* se mantuvieron constantes en un 10% p/v y 2 cm, respectivamente; la velocidad de inyección fue de 0.6 mL/h y la distancia aguja colector de 10 cm. La formación del *jet* de electrohilado comenzó a partir de 8.5 kV, pero las fuerzas electrostáticas no eran lo suficientemente fuertes para propiciar la eyección continua del *jet* polimérico desde la punta de la aguja de la jeringa. El electrohilado se realizó a partir de 13 kV, aumentando poco a poco hasta 16.5 kV, voltaje en el cual el *jet* se formó correctamente y se mantuvo continuo y estable. De esta manera se logró aumentar la tasa de deposición de las nanofibras generadas, obteniendo colecciones de espesor aceptable a partir de 1 hora de trabajo (Figura 7.4 C1).

Los parámetros ambientales que influyen en la formación de nanofibras son la humedad y la temperatura. Cuando aumenta la temperatura ambiente, aumenta la conductividad de la solución, mientras que disminuyen la viscosidad y la tensión superficial. La humedad ambiental es uno de los parámetros más influyentes en el electrospinning. El agua condensada en la superficie de las fibras, cuando se trabaja con una humedad relativa elevada, puede influir en la morfología y la alineación de los acopios, especialmente cuando se trabaja con disolventes volátiles [27][31]. La temperatura de las soluciones de electrospinning también tiene un efecto sobre la morfología de las nanofibras, por ejemplo, a altas temperaturas, la viscosidad disminuye por lo que la movilidad de las moléculas de polímero aumenta debido al aumento de la temperatura, además las fuerzas coulómbicas pueden ejercer una gran fuerza de estiramiento sobre la solución, dando lugar a nanofibras de menor diámetro [52].

Cuando la humedad relativa se mantuvo en 15% y se aumentó la temperatura a 40 °C, las nanofibras de PVA-TTC presentaban una calidad microestructural sobresaliente, se observan nanofibras PVA-TTC lisas y altamente alineadas que destacan por la ausencia de defectos con diámetros entre 40 y 120 nm (Figura 7.5 B), y un diámetro promedio de 77 ± 14 nm; para ello se requirió de un voltaje de 16.7 kV, a una distancia de trabajo de 10 cm, una velocidad de flujo de 0.6 mL/h y temperatura ambiente de 26 °C; operando a una humedad relativa de 15%. Del mismo modo la



temperatura influye en el tiempo de proceso dado que si las condiciones ambientales son bajas ($Hr < 15\%$ y $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$) se pudo disminuir el tiempo de proceso de 1 hora a 15 minutos, esto se evidencia en las fotografías macroscópicas (Figura 7.4 y 7.5 C). Con estos resultados, comparados con los resultados obtenidos anteriormente, se verifica que la temperatura y humedad relativa ambiente influyen de manera significativa en la electrohilabilidad, de manera que, con valores inferiores a 22% de humedad relativa, se incrementó la formación de nanofibras en el colector, y esto también repercute en la disminución de defectos. Los parámetros ambientales y del equipo favorecen la evaporación del disolvente, minimizando así la formación de defectos, incluso a nivel macroscópico (Figura 7.5 C2).

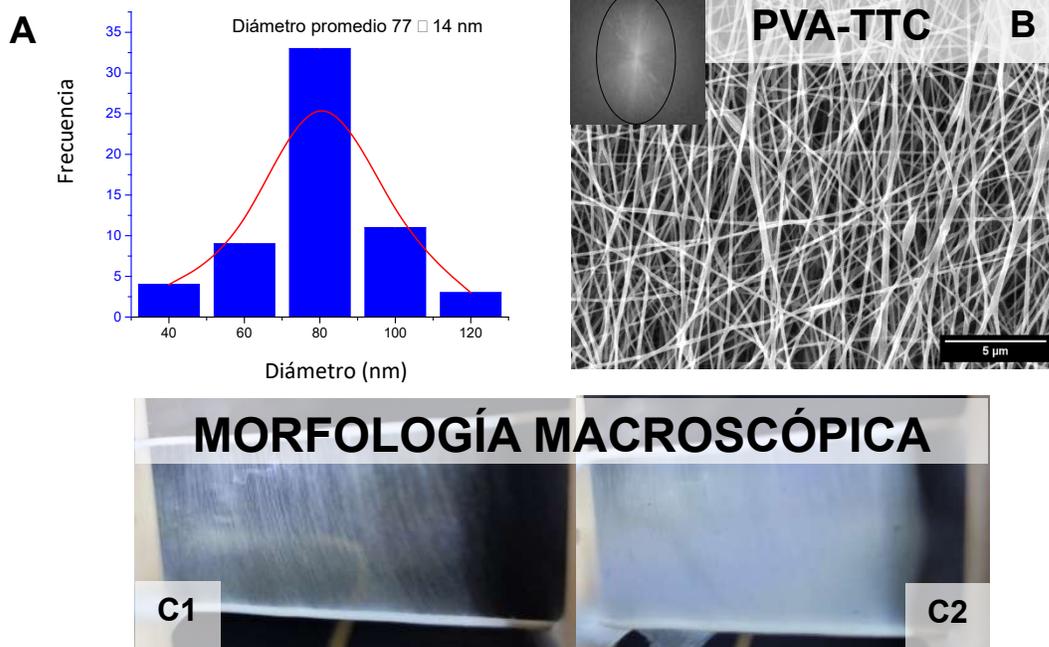
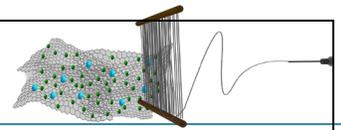


Figura 7.5. A) Histograma de diámetro y colecciones de nanofibras PVA-TTC a 10 cm, 16.7 kV, 0.6 mL/h, 26 °C y Hr < 20; B) FE-SEM, C1) 15 min de proceso, C2) 1 h de proceso.

Respecto a las nanofibras de PVA-TTC-DES, en la Figura 7.6, se observan nanofibras altamente alineadas y con muy pocos defectos en forma de pequeñas perlas, con diámetros uniformes, cuya distribución se encuentra entre 90 y 240 nm, y un diámetro promedio de 158 ± 34 nm; para ello se requirió de un voltaje de 16.3 kV, a una distancia de trabajo de 10 cm, una velocidad de flujo de 0.6 mL/h y temperatura de 26



°C; operando a humedad relativa de 18%. Además, se puede observar en la Figura 7.6 C que las nanofibras que contienen DES, se depositan uniformemente en el colector y la orientación se conserva a comparación de las nanofibras de PVA-TTC donde la orientación es inversamente proporcional a la deposición de nanofibras.

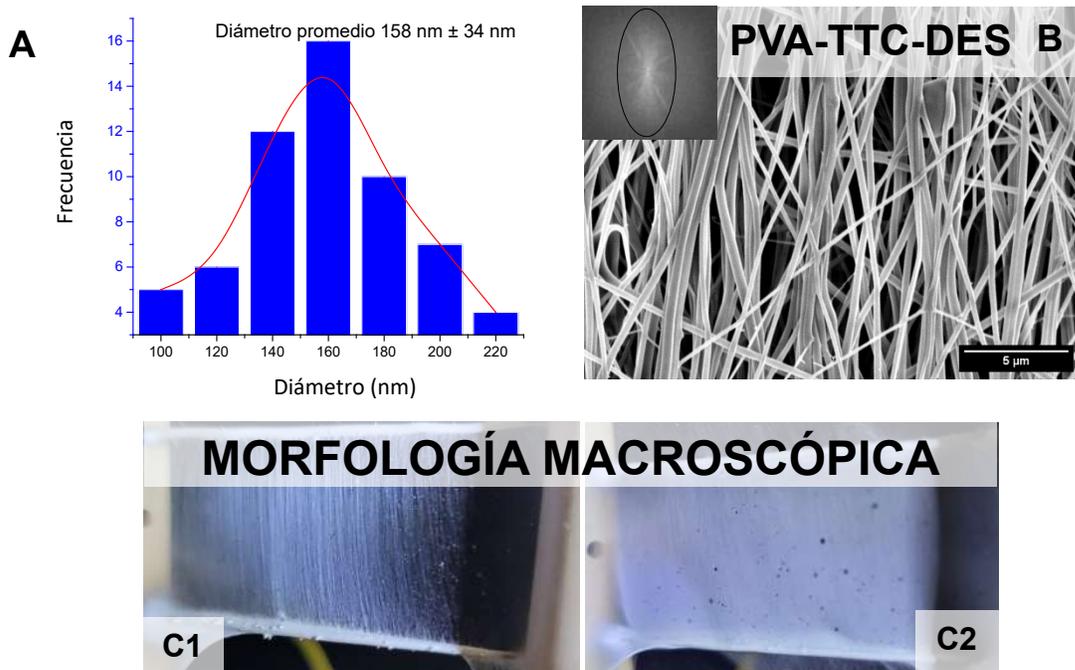
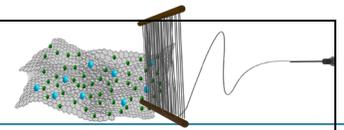


Figura 7.6. A) Histograma de diámetro y colecciones de nanofibras PVA-TTC-DES a 10 cm, 16.3 kV, 0.6 mL/h, 26 °C y Hr < 20; b) FE-SEM, C1) 30 min de proceso, C2) 2 h de proceso.

Es importante mencionar que, el utilizar un voltaje más alto para la producción de las colecciones de PVA-TTC, permite un mayor estiramiento de la disolución debido a la presencia de mayor fuerza de coulomb en el *jet* ocasionada por un fuerte campo eléctrico, estos factores promueven una reducción en el diámetro de las fibras [84]; además, se redujo la distancia de trabajo, este parámetro repercute en la reducción del tiempo de vuelo, incrementando la fuerza del campo que aumenta la aceleración del *jet* hacia el colector, lo que influye en la evaporación del disolvente [20]. De este modo, se observa que el DES tiene relación con la viscosidad y la densidad de carga en la superficie del *jet* expulsado.

La determinación del grado de orientación es una herramienta muy importante en la nanometrología debido a que se basa en el compendio de información cualitativa y



cuantitativa que deriva del análisis de las microestructuras, de modo que podamos calcular los porcentajes de alineación axial a partir de herramientas digitales y coadyuve a la caracterización de nanomateriales. Para ello se emplean softwares para procesar y analizar imágenes científicas; en este caso se utilizaron herramientas del software ImageJ: OrientationJ y Directionality. Estos complementos permiten obtener mapas de distribución de intensidad mediante la transformada de Fourier rápida, los cuales reflejan el grado de orientación de las colecciones de fibras electrohiladas presentes en una imagen de SEM: en muestras aleatorias, el patrón de distribución suele presentar distribución circular definida, mientras que en muestras alineadas presentan forma elíptica (Figura 7.7) [85].

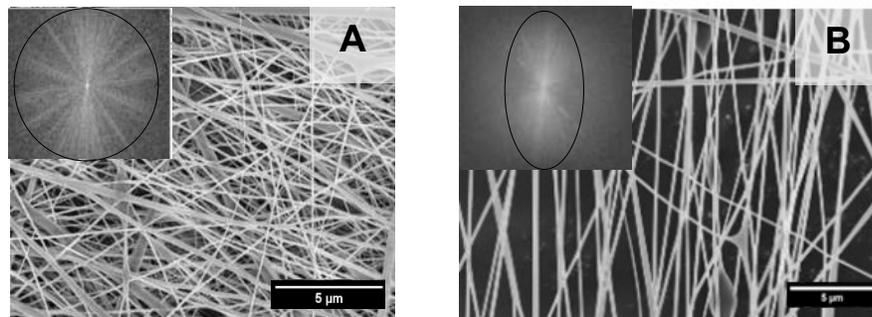
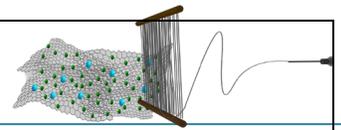


Figura 7.7. Diagrama FFT de las colecciones de nanofibras de PVA puro a) aleatorias y b) alineadas.

Dentro de los materiales generados en esta investigación, destacan por presentar un mayor porcentaje de nanofibras orientadas respecto al ángulo principal, en comparación con las nanofibras de PVA-TTC (ver Figura 7.8). No obstante, las nanofibras de PVA-TTC presentan una menor desviación estándar, indicando que los valores están más cercanos entre sí y, por lo tanto, más cerca del ángulo de referencia ($\theta = 90^\circ$). Comparando las desviaciones estándar de los dos conjuntos de datos, se puede sugerir que las nanofibras de PVA-TTC presentan gradientes más consistentes y se acercan más a la referencia de 90° en términos de dispersión de los datos [86-35].

De igual manera, al comparar los coeficientes de variación (CV), se observa que las nanofibras de PVA-TTC tienen un CV más bajo (16.07%) en comparación con las de PVA-TTC-DES (17.24%). Sin embargo, al comparar las diferencias absolutas, se



consideran con mayor grado de alineación las nanofibras de PVA-TTC-DES, ya que se encuentran más cerca de la referencia de $\theta=90^\circ$.

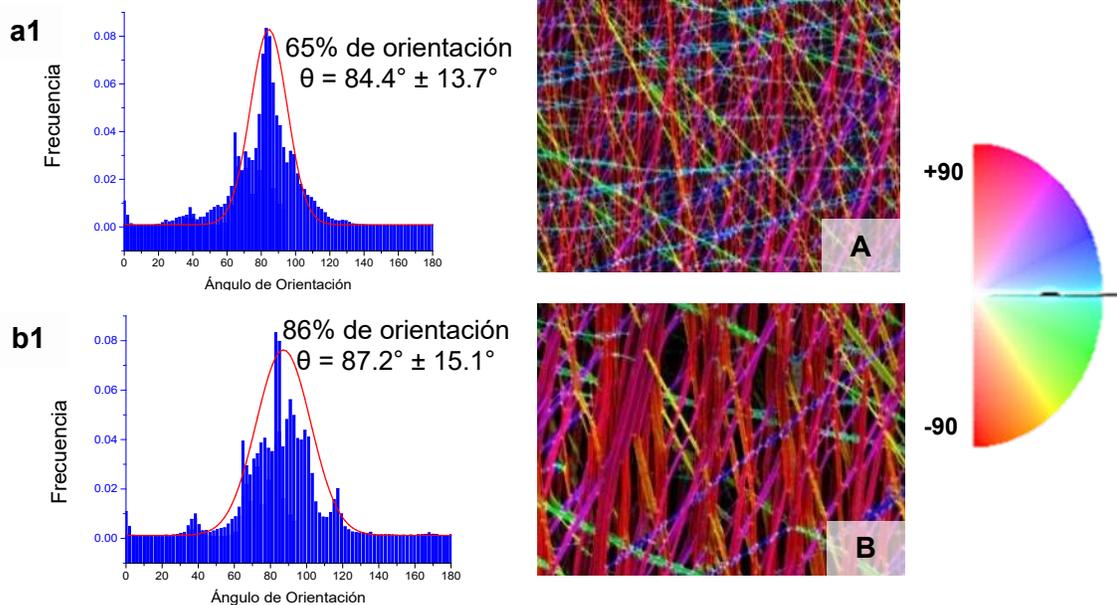
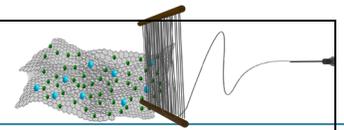


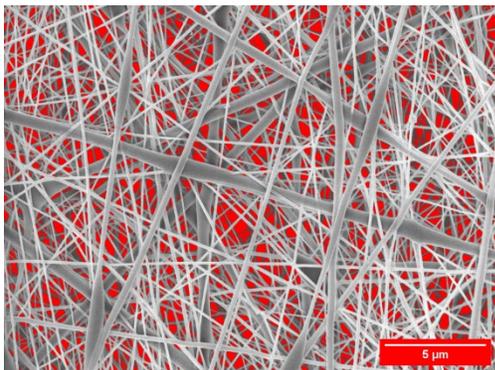
Figura 7.8. Micrografías FE-SEM de los mapas de color de las nanofibras alineadas a) PVA-TTC y b) PVA-TTC-DES e histogramas de orientación (a1 y b1).

Otro de los parámetros importantes de los nanomateriales es su porosidad. Ya se ha comentado que la morfología superficial de las nanofibras electrohiladas se pueden variar alterando las propiedades de la disolución y los parámetros de procesamiento [88]. El pequeño diámetro de fibra y la estructura porosa de la malla de nanofibras dan lugar a una gran superficie específica. La porosidad adecuada y el área superficial son ampliamente reconocidos como parámetros importantes en el diseño de andamios para la ingeniería de tejidos y liberación farmacológica [45] [89].

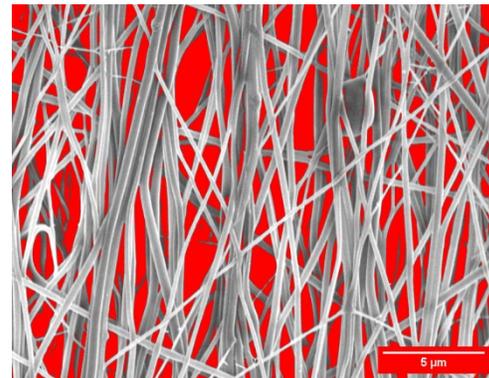
La determinación porcentual de la porosidad de manera indirecta suele basarse en el procesamiento de nivel de escala de grises basado en la estructura de la imagen. Se puede utilizar para caracterizar las micrografías SEM, usando uno o diferentes umbrales de superficie. Para tales determinaciones, las micrografías SEM se convierten a binario, de manera que pueda ser procesada, y posteriormente, empleando la herramienta Threshold del software ImageJ se analiza la porosidad de la colección [90].



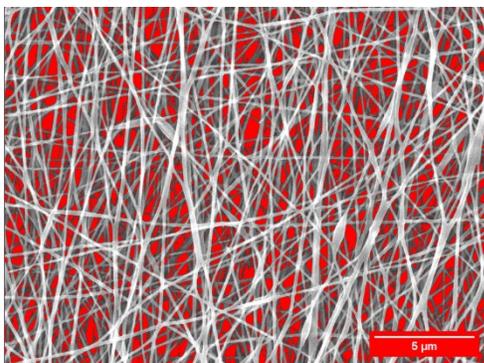
En la Figura 7.9 se observan los umbrales de porosidad de las micrografías de FE-SEM obtenidas, en las que podemos notar que la porosidad media de las nanofibras de PVA puro es de 14.3% de manera que al adicionar la TTC y el DES, favorecen la porosidad de las nanofibras obteniendo valores promedios de 17.8% y 20.3% respectivamente. A su vez, en la disolución de PVA-DES-TTC se obtienen los mayores porcentajes (23.7%) por lo que se puede mencionar que además de que el DES coadyuva a la deposición de las nanofibras, también se ve incrementada la porosidad de estas.



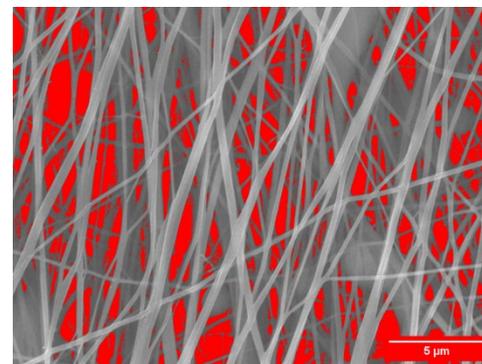
PVA ALINEADA	% de porosidad	\bar{x}	σ
1	13.23	14.343	0.816
2	15.17		
3	14.62		



PVA TTC DES ALINEADA	% de porosidad	\bar{x}	Σ
1	25.64	23.744	2.123
2	24.81		
3	20.78		

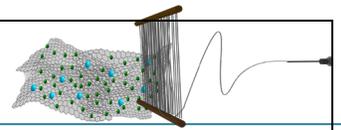


PVA DES ALINEADA	% de porosidad	\bar{x}	σ
1	21.44	20.296	0.911
2	19.21		
3	20.24		



PVA TTC ALINEADA	% de porosidad	\bar{x}	σ
1	16.42	17.866	1.045
2	18.33		
3	18.85		

Figura 7.9. Umbrales de porosidad de las micrografías de nanofibras alineadas.



7.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

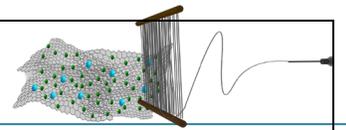
Debido al comportamiento intrínseco de las soluciones de PVA durante el electrohilado y sus cambios morfológicos al generar nanofibras, es importante evidenciar la correcta incorporación de la TTC y DES. Para ello, se llevó a cabo el análisis de espectroscopia FTIR de las muestras que se muestra en la Figura 7.10. El espectro FTIR del PVA puro evidencia vibraciones características del PVA; la vibración de estiramiento de $-OH$ en 3300 cm^{-1} , la vibración del estiramiento asimétrico del enlace $C-H$ en 2900 cm^{-1} y la vibración fuera del plano del grupo $O-H$ 800 cm^{-1} . Siendo de particular importancia las vibraciones en la región cristalina: de torsión tijera de metileno en 1450 cm^{-1} , las vibraciones de balanceo con flexión del CH (δ (OH)) en 1325 cm^{-1} , la vibración de estiramiento del enlace $C-O$ en 1100 cm^{-1} y las vibraciones de balanceo del metileno en 900 cm^{-1} [91].

En cuanto a la tetraciclina, debido a la complejidad estructural se puede dividir en tres regiones:

- 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.

De este modo, en el espectro se observan principalmente las vibraciones de estiramiento características del grupo $-OH$ en 3300 cm^{-1} , del estiramiento simétrico del enlace $C-H$ en 3050 cm^{-1} , de estiramiento del enlace $C-O$, en 1400 cm^{-1} , de torsión del enlace OH , en 1500 cm^{-1} y de torsión en el plano NH en 1600 cm^{-1} . También es importante mencionar que, en la región de huella dactilar se presentan vibraciones características tales como la vibración de flexión fuera del plano del enlace $C=C-H$ en 1050 y 850 cm^{-1} y la vibración de flexión del enlace $C-OH$ y en 950 cm^{-1} [92].

Es importante mencionar que el DES $ChCl:U$ posee algunas vibraciones que pueden eclipsarse con las del PVA, tales como vibraciones de estiramiento de $-OH$ en



3400 cm^{-1} las frecuencias de estiramiento asimétrico del grupo CH_3 en 3000 cm^{-1} , y señales que indican la presencia de un grupo de compuestos de amonio cuaternario en el rango de 900 - 980 cm^{-1} , la vibración de tensión del C-O en 1100 cm^{-1} y la vibración de torsión tijera del CH_2 en 1470 cm^{-1} [90-13].

De esta manera, en los materiales híbridos PVA-DES y PVA-DES-TTC se pueden observar vibraciones similares a las del espectro de PVA puro, esto debido a la alta concentración de PVA respecto de la concentración de TTC y del DES; a su vez las vibraciones de estos suelen ser similares; sin embargo, se observa la vibración torsional en el plano del NH_2 en 1624 cm^{-1} y señales de amonio cuaternario en 959 cm^{-1} característico del DES. En las nanofibras PVA-TTC se observan dos vibraciones adicionales en 2941 y 2910 cm^{-1} pertenecientes al estiramiento simétrico y asimétrico del enlace C-H (dobles enlaces de anillos) respectivamente, así como bandas de sobretonos del anillo aromático trisustituido; demostrando la presencia de TTC en la disolución.

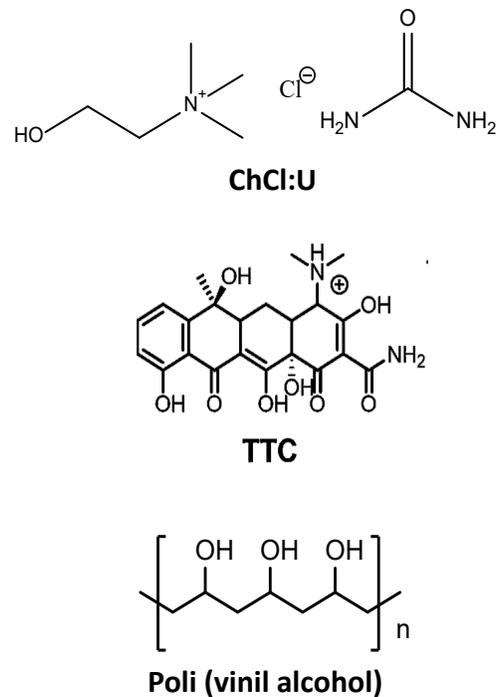
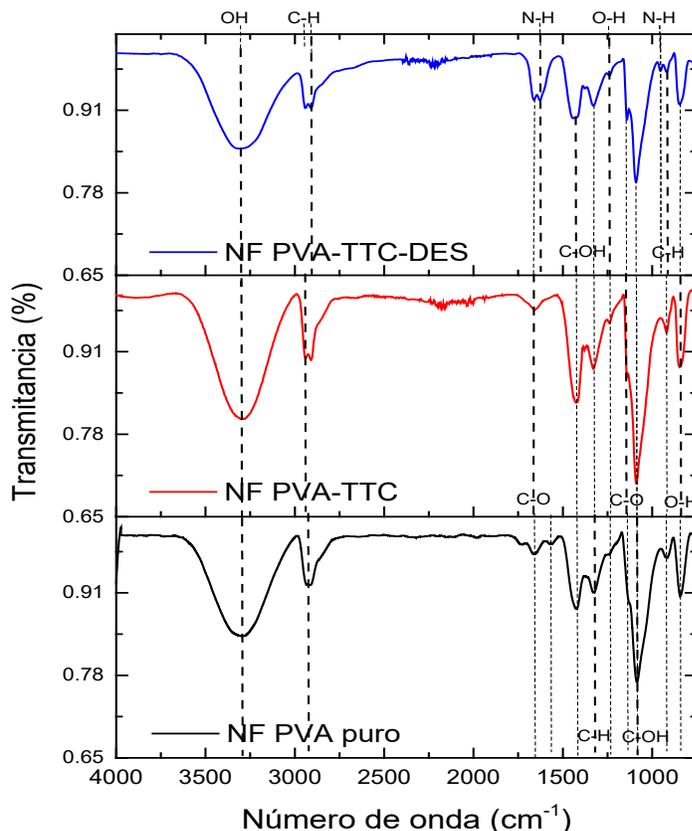
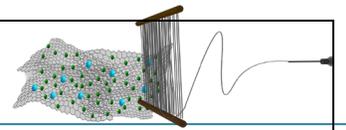


Figura 7.10. Espectro FTIR de las nanofibras alineadas de PVA, PVA-TTC y PVA-TTC-DES.



7.3 ANÁLISIS TÉRMICO (TGA Y DSC)

El análisis termogravimétrico del PVA puro, PVA-DES y PVA-TTC-DES se muestra en la Figura 7.11A. Es evidente la diferencia en el comportamiento térmico de las nanofibras de PVA puro. La curva TGA de la NF-PVA puro presenta una pérdida de peso del 5% respecto de la masa total entre 60 y 103 °C, la cual es atribuida a la pérdida de humedad, relacionada a agua ligada, debido a que el PVA es higroscópico; una segunda pérdida de peso del 68% respecto de la masa total, sucede entre 245 y 358 °C, la cual está relacionada con la despolimerización del PVA, mientras que la pirolisis tiene lugar arriba de 330 °C [94].

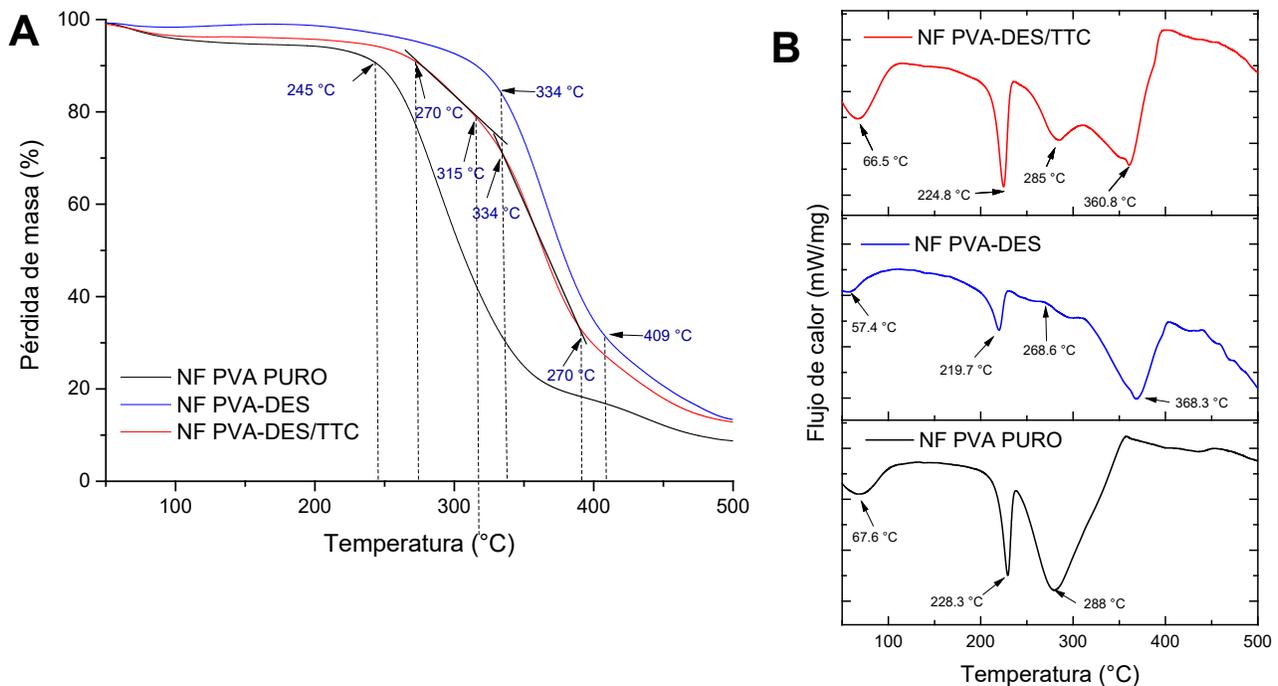
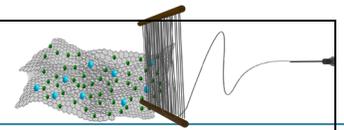


Figura 7.11. Termogramas A) TGA y B) DSC de las nanofibras alineadas de PVA, PVA-TTC y PVA-TTC-DES.

En la curva TGA de las nanofibras de PVA-DES se observa que el porcentaje de agua ligada es mucho menor respecto de las nanofibras de PVA puro; dicho evento térmico se presenta entre 58 y 76 °C y corresponde al 1.5% del peso total, mientras que la descomposición térmica del PVA y DES se presenta entre 409 y 334 °C que representa el 53% del peso total, lo que sugiere un aumento de la resistencia térmica del PVA al incorporar el DES.

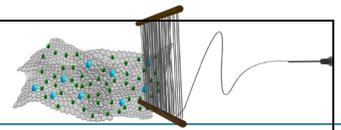


Por su parte, las nanofibras que contienen PVA-TTC-DES presentan características intermedias: en esta curva de TGA, la pérdida de agua ligada se observa entre 57 y 102 °C que corresponde al 3% del peso total. Posteriormente, se observa un evento térmico entre 270 y 329 °C atribuido a una primera etapa de la descomposición del DES, ya que, de acuerdo a estudios previos el DES descompone en dos etapas, siendo su primer producto de descomposición el cloruro de colina y posteriormente la urea [95], representando un 18% de la masa total. Otro evento térmico entre 334 y 395 °C puede atribuirse a la descomposición del PVA y la TTC, misma que representa el 40% de la masa total.

Estos resultados son congruentes con los eventos térmicos observados en los termogramas DSC de la Figura 7.11B. Tras el enfriamiento y recalentamiento, la curva DSC del PVA muestra los eventos térmicos característicos: la endoterma en 228.3 °C asociada a la fusión de los dominios cristalinos, y el evento endotérmico a 288 °C relacionado con la degradación térmica [96].

La curva DSC del material PVA-DES muestra la presencia del pico endotérmico relacionado con la fusión de zonas cristalinas a una temperatura menor respecto de las NF de PVA puro (en 219.7 °C, respecto de las NF-PVA puro en 228.3 °C), esto es evidencia de la miscibilidad entre los componentes a través de interacciones intermoleculares [97]. La degradación térmica del material compuesto se presenta a partir de 368.3 °C, al menos 80 °C arriba respecto al PVA puro. Adicionalmente, se observan dos endotermas asociadas a la descomposición, comenzando a menor temperatura, estimada en 268.6 °C, que se atribuye a la descomposición de la urea, seguida de ChCl.

El termograma DSC de las nanofibras de PVA-TTC-DES muestra que la temperatura de fusión de la región cristalina del PVA disminuye al añadir la TTC con DES; el evento endotérmico observado en 224.8 °C, otro evento endotérmico debido a la posible descomposición del DES, se aprecia en 285. Finalmente, la descomposición del compuesto procede a 360.8 °C.



7.4 ÍNDICE DE HINCHAMIENTO

Para esta prueba, las colecciones de nanofibras de PVA-TTC y PVA-TTC-DES alineadas se cortaron en piezas circulares y se pesaron cada una en seco. Se procedió a colocar las piezas en un vial con agua destilada durante 1, 2, 12, 24, 48 y 72 h, a temperatura ambiente, posteriormente se extrajo la colección de nanofibras a los tiempos mencionados y se retiró el agua en la superficie para volver a pesarlas; el análisis se realizó por triplicado de acuerdo con la siguiente ecuación [98]:

$$SR(\%) = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100$$

En esta ecuación, SR es el índice de hinchamiento, W_w es el peso de la muestra después del hinchamiento y W_d representa el peso seco de la muestra. De este modo se obtiene la Figura 7.12, donde se observa que tanto en las nanofibras de PVA-TTC-DES como en las nanofibras alineadas de PVA-TTC el porcentaje de hinchamiento decrece.

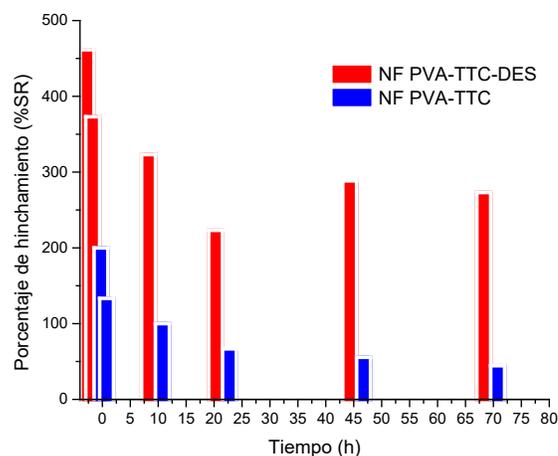
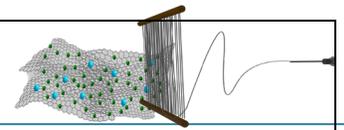


Figura 7.12. Porcentaje del grado de hinchamiento de las colecciones de nanofibras alineadas en disolución salina (pH: 7.5) a diferentes intervalos de tiempo.

Los resultados obtenidos muestran que en las nanofibras de PVA-TTC se presenta una absorción inicial considerable de disolución llegando a tener un hinchamiento del 200%, sin embargo, este valor decrece de forma rápida, de manera que a las 72 h la capacidad de hinchamiento decae hasta el 44.4%.



Por otro lado, las nanofibras alineadas de PVA-TTC-DES mantiene mayores niveles de hinchamiento con valores más constantes. Sin embargo, existe una variación a las 24 h, donde decrece este echamiento y a las 48 h vuelve a incrementar.

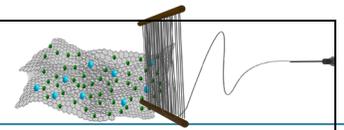
La variación en el índice de hinchamiento a lo largo del tiempo sugiere que las propiedades físicas y químicas de las nanofibras, y su interacción con el medio circundante pueden cambiar. Un aumento inicial en el índice de hinchamiento puede estar asociado con la absorción de líquido, lo que lleva a la expansión de la estructura de las nanofibras. Esto puede ser influenciado por la presencia de DES y su capacidad para interactuar con el material polimérico. Por otro lado, la disminución posterior en el índice de hinchamiento podría indicar cambios en la estructura interna de las nanofibras, como una mayor compactación o cambios en la porosidad [97].

En ambas colecciones alineadas, la disminución en el índice de hinchamiento puede sugerir cambios en la porosidad, estructura o interacción molecular de las nanofibras con el tiempo. La matriz polimérica puede volverse menos permeable al agua con el tiempo, afectando tanto la cinética de liberación como la capacidad de las nanofibras para retener el medio fisiológico [97].

7.5 PROPIEDADES MECÁNICAS

Las curvas de tensión-deformación, resultantes de la prueba de tracción de los materiales basados en colecciones alineadas de NF PVA-DES, PVA-TTC y NF PVA-TTC-DES, muestran en la Figura 7.13. A partir de la prueba de tracción se reporta el comportamiento mecánico de los materiales, en términos de módulo de Young, elongación de rotura, tensión de rotura y esfuerzo último de rotura, los cuales se detallan en la Tabla 7.1.

Se ha reportado que los DES, sobre todo el de CHCl:U aporta conductividad en solución [99][100] y es plastificante [101], estas propiedades son importante dado que se ha demostrado que las nanofibras hiladas con mayor conductividad de la solución exhiben mejores propiedades mecánicas y mayor resistencia a la tracción [102].



De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible apreciar que en presencia del DES se generan colecciones de nanofibras con mayor grado de elasticidad, siendo el compuesto NF PVA-DES el material que presenta un mejor desempeño mecánico, lo cual se refleja como valores altos de módulo de Young, tensión de rotura y esfuerzo último de tensión. Las nanofibras hiladas con mayor conductividad de la solución exhibieron una mayor resistencia a la tracción. Estos patrones de curvas fueron similares a los reportados en nanofibras de PVA y el DES de cloruro de colina y manosa [13].

El compuesto bioactivo NF PVA-TTC-DES presenta una pequeña reducción del rendimiento mecánico que puede atribuirse a las interacciones con el antibiótico TTC debido al aumento de fuerzas intermoleculares, por lo tanto, aumentó la dureza de la muestra, lo que a su vez resultó en una mayor dureza y resistencia del material [103].

De acuerdo a investigaciones previas, las nanofibras de PVA aleatorias presentan un momento elástico mayor y una adhesión menor a comparación con las nanofibras de PVA alineadas, donde el momento elástico es directamente proporcional al diámetro de las nanofibras [103]. Sin embargo, se utilizan nanofibras de diámetros 5 veces mayores (>500 nm) a las obtenidas (<130 nm). Otras investigaciones aluden a que la resistencia de las fibras aumenta a medida que disminuye su diámetro [104] y que la alineación de las nanofibras incrementa el módulo de Young [105].

De acuerdo con los materiales obtenidos, en comparación de los ensambles de nanofibras aleatorias (NF PVA aleatoria), la deposición de nanofibras con orientación axial (NF PVA alineada) incrementa 2.9 veces el comportamiento elástico. Particularmente, el módulo de Young de 82.6 y 242.8 MPa de las nanofibras aleatorias y alineadas de PVA puro respectivamente son valores superiores a los reportados para nanofibras de PVA al 10% obtenidos mediante electrohilado [103][106]. Este incremento en el comportamiento elástico de nanofibras alineadas puede atribuirse a que estas nanofibras poseen una estructura altamente ordenada y orientada en una dirección específica. La alineación estructural puede aumentar la rigidez del material, lo que se refleja en un módulo de Young más alto. Sin embargo, la orientación unidireccional puede limitar la capacidad del material para deformarse antes de la fractura, lo que resulta en un menor porcentaje de elongación de fractura [105].

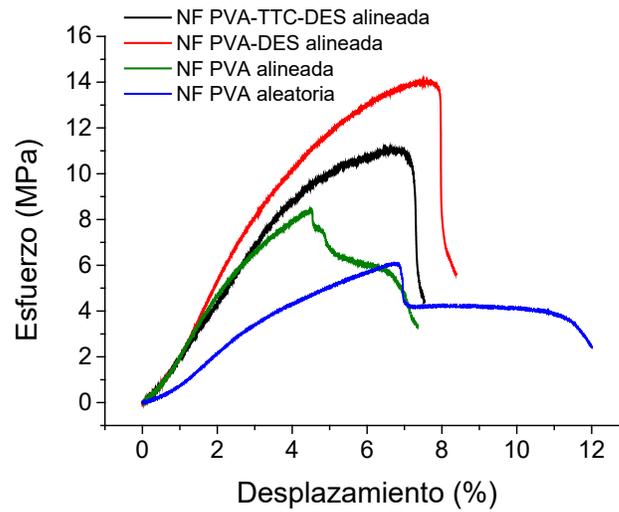
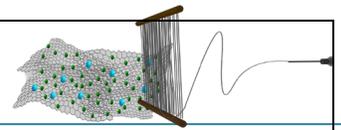
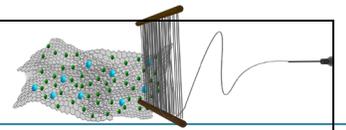


Figura 7.13. Curvas de tensión – deformación de los materiales obtenidos a partir de electrohilado.

Tabla 7.1. Propiedades mecánicas de los materiales obtenidos basados en colecciones NF PVA.

	NF PVA-TTC-DES alineada	NF PVA-DES alineada	NF PVA Alineada	NF PVA aleatoria
Módulo de Young (MPa)	241.6 ± 39.8	336.3 ± 44.7	242.8 ± 28.1	82.6 ± 14.7
Último esfuerzo de tensión (MPa)	11.9 ± 4.2	14.2 ± 3.9	8.7 ± 2.6	6.0 ± 1.4
Tensión de rotura (MPa)	5.5 ± 1.3	7.1 ± 0.5	4.8 ± 1.3	3.2 ± 0.8
Elongación de fractura (%)	7.3 ± 1.2	8.1 ± 0.7	7.1 ± 0.8	11.7 ± 1.9



7.6 ESTUDIOS DE LIBERACIÓN

El espectro de absorción UV-vis de la TTC presenta tres bandas: a $\lambda_{\text{máx}} = 220$ nm (banda 1), que corresponde al sistema aromático D de la molécula, a $\lambda_{\text{máx}} = 270$ nm (banda 2), relacionada al cromóforo del anillo A y a $\lambda_{\text{máx}} = 357$ nm (banda 3) correspondiente al cromóforo BCD (Figura 7.14). Este último contribuye a los tres máximos de absorción [107].

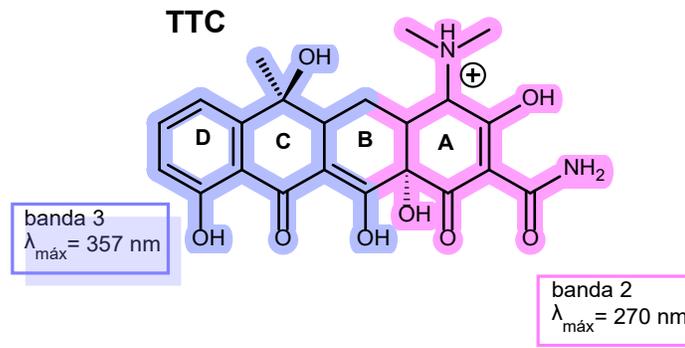


Figura 7.14. Bandas de UV-Visible características de la TTC.

De acuerdo con las cinéticas realizadas, en los espectros UV-Vis de las nanofibras de PVA-TTC y PVA-TTC-DES, mostrados en la Figura 7.15, se despliega la banda de absorción correspondiente al anillo D (banda 3) en $\lambda_{\text{máx}} = 365$ nm. Debido a que el DES genera dos bandas de absorción, una en $\lambda_{\text{máx}} = 215$ y otra en 300 nm, se tomó como referencia la banda en 365 nm, de manera que dicho espectro no interfiera con el del DES.

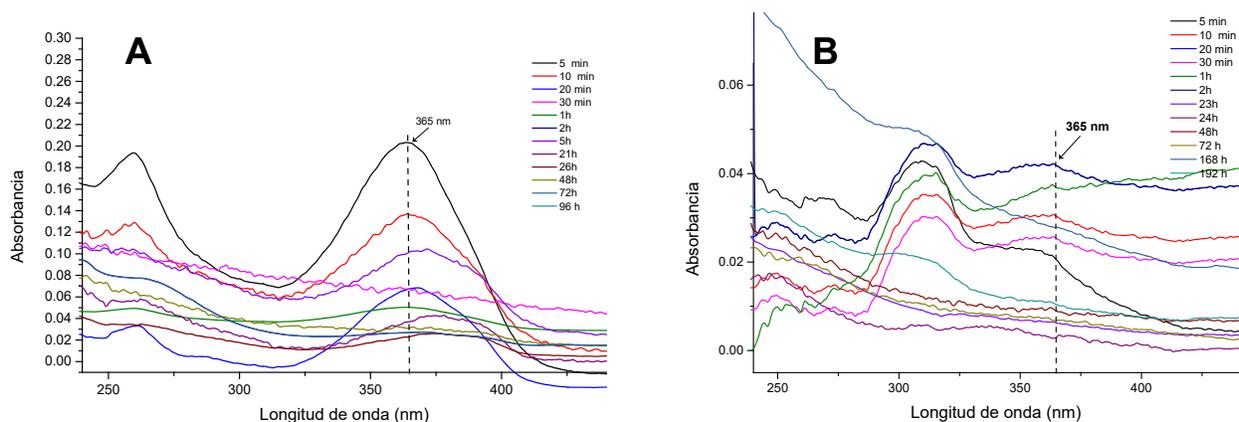
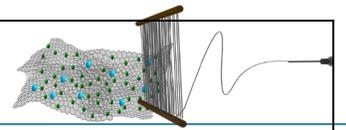


Figura 7.15. Espectros de absorción UV-Vis de liberación en medio acuoso de la TTC a partir de las colecciones de nanofibras alineadas A) PVA-TTC y B) PVA-TTC-DES.



Se ha demostrado que las nanofibras alineadas ofrecen un mejor control en la liberación del principio activo a través del polímero [108]. Por ello, se realizaron dos tipos de ensayos: teniendo en cuenta la concentración liberada por hora, y la concentración total acumulada por hora. En el primer ensayo, se toma en cuenta la concentración que se libera por muestreo; dado que no se extrae la alícuota de la disolución, dicho monitoreo se muestra en la Figura 7.16. Se observa la liberación rápida en ambas matrices durante las primeras 5 h, posterior a ello se despliega una liberación sostenida en el tiempo de estudio; no obstante, las nanofibras de PVA-TTC tienen un segundo aumento de la concentración a partir de las 80 h y continúa incrementando con el tiempo. Caso contrario con las nanofibras que contienen el DES, que mantiene la dosificación durante todo el tiempo de medición.

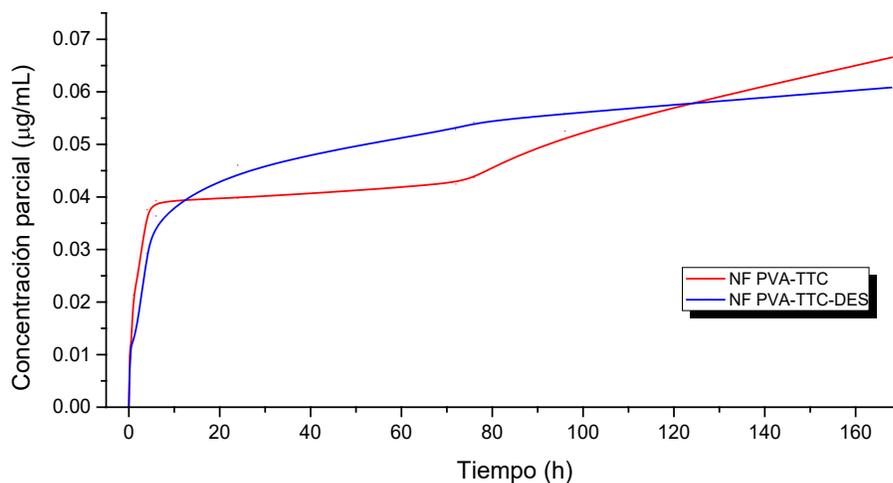
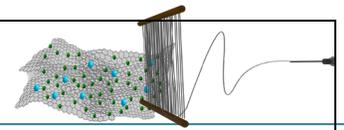


Figura 7.16. Espectros de absorción UV-Vis de liberación de TTC de las nanofibras alineadas de PVA-TTC y PVA-TTC-DES. (Ensayo continuo).

El ensayo por concentración acumulada toma en cuenta las concentraciones iniciales y se van sumando con las obtenidas en mediciones subsecuentes, este gráfico se presenta en la Figura 7.17, donde se puede observar que las nanofibras de PVA-TTC y PVA-TTC-DES mostraron en general una liberación lenta. Existe una liberación rápida del fármaco en las primeras horas del estudio: alrededor del 8.06% en nanofibras de PVA-TTC aleatorias, 4.03% en nanofibras de PVA-TTC alineadas y 3.14% en nanofibras de PVA-TTC-DES alineadas, y posteriormente todas presentan una tasa de dosificación



sostenida. Las nanofibras de PVA-TTC-DES muestran una velocidad de liberación más rápida en los primeros minutos de liberación. Sin embargo, alcanzan la estabilidad tras 2 h de inmersión. Por otra parte, las nanofibras de PVA-TTC, presentan una velocidad inicial de liberación menor, aunque conforme transcurre el tiempo, la liberación de la TTC aumenta, sobrepasando a las nanofibras con DES, hasta mantener la dosificación estable después de las 4 h. La cinética de liberación en ambos andamios es lenta debido a la configuración estructural de las nanofibras, y la alineación permite un mayor control en la liberación respecto a nanofibras aleatorias de la TTC a través de la matriz polimérica.

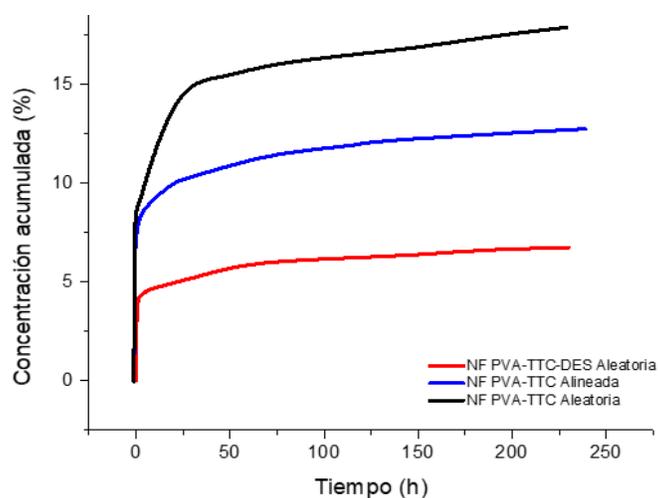
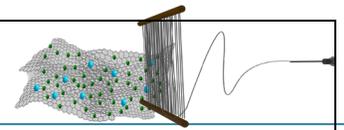


Figura 7.17. Espectros de absorción UV-Vis de liberación de TTC de las nanofibras aleatorias de PVA-TTC y alineadas de PVA-TTC y PVA-TTC-DES (Ensayo acumulado).

De acuerdo con estos resultados, la presencia del DES en las nanofibras de PVA en conjunto con la TTC puede alterar las propiedades físicas del sistema de liberación, afectar las interacciones entre los componentes y modificar la cinética de liberación del fármaco. Todo esto contribuye a una liberación más lenta de la tetraciclina en comparación con las nanofibras de PVA-TTC sin DES. Cuando se incorporan en conjunto el DES y la tetraciclina a las colecciones de nanofibras de PVA, pueden ocurrir varios fenómenos que afectan la liberación del fármaco: I) incremento de la viscosidad, la presencia del DES puede aumentar la viscosidad del medio de liberación [109], lo que puede dificultar la difusión de la tetraciclina fuera de las nanofibras. Esto conduce a una liberación más lenta del fármaco. II) Interacción con el PVA: el DES puede interactuar con el PVA y formar una matriz más densa y compacta, lo que restringe la difusión de la

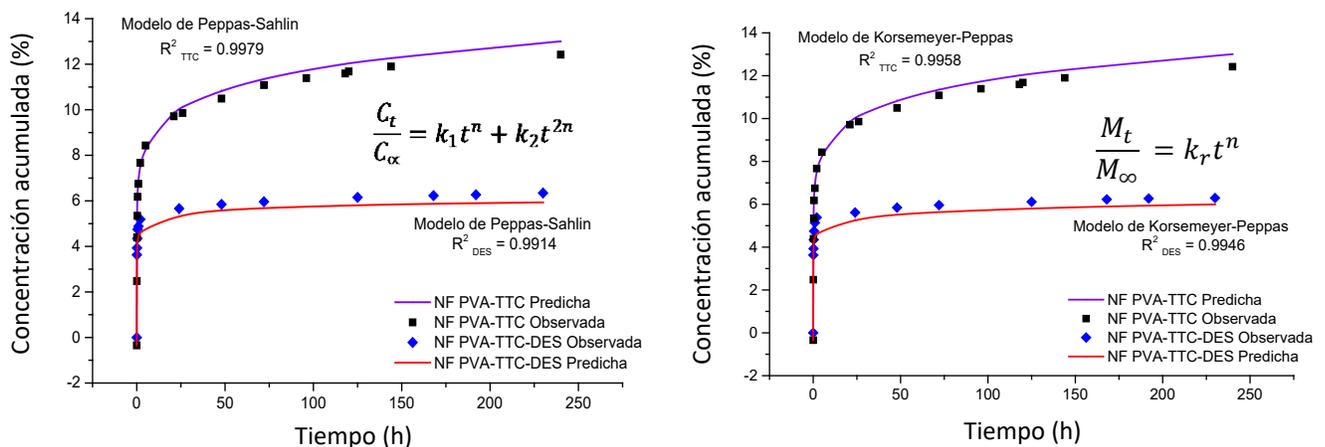


tetraciclina y disminuye velocidad de liberación. III) Efecto de *salting-out*: la presencia del DES puede modificar las interacciones entre los componentes y contribuir al efecto *salting out* en la TTC [110], lo que reduce su solubilidad en el medio de liberación y ralentiza su liberación.

7.6.1 ANÁLISIS DEL MECANISMO DE LIBERACIÓN

El ajuste de las cinéticas de liberación a modelos teóricos ayuda a comprender y predecir la cinética de liberación del fármaco a partir de las diversas nanoestructuras [111]. Además, permite obtener resultados de convergencia que se aproximan a la realidad, también contribuyen a la modificación y mejora del diseño de los sistemas de entrega y a la simplificación de la complejidad biológica [112]. Los métodos basados en modelos teóricos describen el mecanismo de la liberación en la vía de disolución; se trata de un proceso en que la materia sólida se solvata en un disolvente, y puede llevarse a cabo la transferencia la masa de la fase sólida a la fase líquida. Ejemplos de modelos que liberan el fármaco por digestión son los modelos de orden cero, Hixson-Crowell y Korsmeyer-Peppas [113].

Las cinéticas de liberación de TTC en los nanomateriales se examinaron mediante su ajuste a los modelos de orden cero, primer orden, Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Hixon-Crowell, Makoid-Banakar y Peppas-Sahlin; estos tienen en cuenta el tiempo de retardo (*Tlag*). El ajuste de los datos experimentales se muestra en la Figura 7.18, y la descripción de cada uno de los modelos se encuentra detallada en el Anexo A.



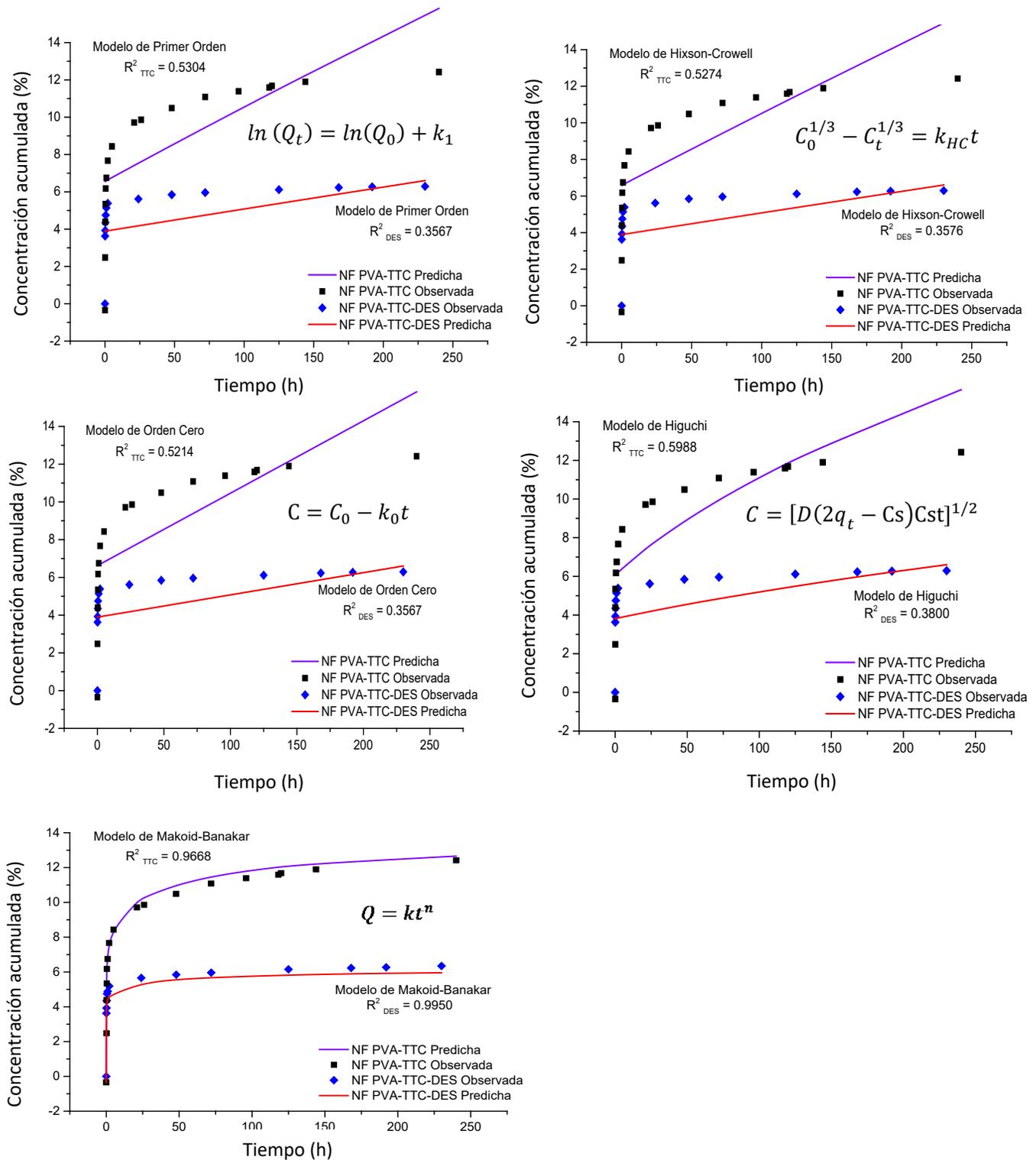
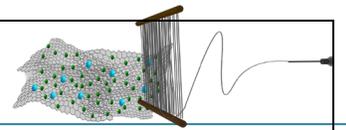
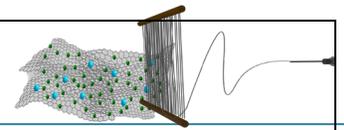


Figura 7.18. Cinéticas de liberación ajustadas a los distintos modelos matemáticos del perfil de liberación de TTC en nanofibras alineadas de PVA-TTC y PVA-TTC-DES.



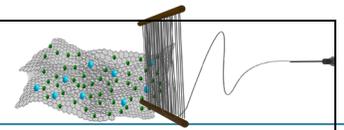
Los parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales a los modelos teóricos se muestran en la Tabla 7.2:

Tabla 7.2. Resultados del ajuste a los modelos teóricos de la liberación de TTC de las nanofibras alineadas de PVA-TTC y PVA-TTC-DES.

	Peppas-Sahlin			Orden Zero		Primer orden		Higuchi		Hixson-Crowell		Korsmeyer-peppas			Makoid-Banakar			
	R ²	K ₂	n	R ²	K ₀	R ²	K ₁	R ²	K _H	R ²	K _{HC}	R ²	R ² Adj	n	R ²	R ² Adj	M	C
PVA-TTC	0.9919	-1.24	0.156	0.5214	0.038	0.5304	0	0.5988	0.932	0.5274	0	0.9958	0.9952	0.112	0.9668	0.9961	0.119	0
PVA-TTC-DES	0.9961	-1.587	0.093	0.3567	0.012	0.358	0	0.38	0.373	0.3576	0	0.9946	0.9937	0.052	0.995	0.9935	0.055	0

El ajuste de los datos a los modelos cinéticos antes descritos se realizó bajo condiciones analíticas a pH fisiológico, con el objetivo de determinar el modelo que mejor describe el mecanismo de liberación *in vitro* de TTC de las nanofibras. El propósito de utilizar estos modelos para ajustar los datos de disolución es que facilitan el análisis y la interpretación del rendimiento de la liberación en función de unos pocos parámetros que pueden compararse estadísticamente [114]. De acuerdo con los modelos ajustados (Figura 7.18), el modelo que mejor describe la liberación del fármaco en las nanofibras de PVA-TTC es el de Korsmeyer-Peppas; dado que a partir de su ajuste se obtuvo con el mayor valor de $R^2 = 0.9958$. Para explicar el mecanismo de liberación se tiene en cuenta que se obtuvo un valor de n de 0.012, lo que sugiere una liberación de tipo Fickiana, de modo que la liberación sigue una cinética controlada principalmente por la difusión del fármaco desde el sistema de liberación hacia el medio circundante [115].

En lo que respecta a las nanofibras de PVA-TTC-DES la cinética de liberación se ajustó al modelo Peppas-Sahlin con valores de R^2 superiores a 0.99, así mismo, el valor de n es menor a 0.5; de este modo, el mecanismo que se propone es que la liberación de la TTC desde la matriz polimérica sigue un mecanismo de liberación anómala o subcaseosa, y está influenciada por diferentes fenómenos de difusión e hinchamiento de la matriz polimérica: el sistema polimérico absorbe y retiene una cantidad significativa de disolvente en su estructura, lo que provoca un aumento en su volumen y tamaño en el medio acuoso donde ocurre la liberación y en presencia del DES, dado que este último es un tipo de disolvente que involucra el hinchamiento de ciertos polímeros.



Sin embargo, este modelo presenta un valor negativo de la constante de relajación (K_2), lo cual es indicativo de la contribución relajante ausente y, por lo tanto, el fenómeno de difusión es predominante en la liberación de la TTC, siguiendo una difusión Fickiana [116]. En este sentido, el ajuste al modelo de Makoid-Banakar también es aceptable dado que posee el segundo valor más alto de $R^2=0.9950$; no obstante, de acuerdo con la literatura, cuando el parámetro “C” del modelo Makoid-Banakar es igual a cero, este modelo se convierte en la ley de potencia de Korsmeyer-Peppas ($e^{-0t}= 1$) [117], y por lo que se observa en la Tabla 7.2, el ajuste también presenta dicha correlación a cero, por lo que es posible inferir que el mecanismo de liberación de esta colección se rige por difusión.

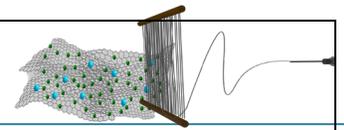
Finalmente, cuando las nanofibras contienen el DES, el exponente de liberación de Korsmeyer-Peppas, n , es de 0.05, lo que confirma que la difusión es el mecanismo de la liberación del fármaco. Esto se comprobó con la relación de los exponentes **A/B** derivada del modelo de Kopcha, la cual es mayor que 1; este modelo puede utilizarse fácilmente para cuantificar la contribución de la difusión y la relajación del polímero, dado que, para que la liberación de fármaco **A** esté dominada por la difusión, **A** debe ser mucho mayor que **B** [117]. Como se observa en los datos de la Tabla 7.3, el valor de **A** es mucho mayor que el valor de **B**, lo que confirma que la liberación del fármaco se produjo principalmente como resultado de la difusión Fickiana.

Tabla 7.3. Resultados del ajuste del modelo de Kopcha en el perfil de liberación de TTC en las colecciones de nanofibras alineadas de PVA-TTC y PVA-TTC-DES.

	Kopcha			
	A	B	R ²	A/B
PVA-TTC	0.9474	0.1406	0.982	6.74
PVA-TTC-DES	0.6307	0.271	0.9405	2.33

A = constante de difusión y **B** = constante de erosión

Las cinéticas de liberación de las nanofibras de PVA-TTC, como las de PVA-TTC-DES, al tener un valor de n menor a 0.5, pueden ser descritas por el modelo Fickiano, donde la liberación del fármaco es gobernada por fenómenos de difusión. La velocidad de transporte o difusión del disolvente es mucho mayor que el proceso de relajación de



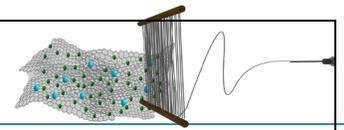
la cadena polimérica. El equilibrio de absorción en la superficie expuesta del sistema polimérico tiene lugar rápidamente, lo que conduce a condiciones de enlaces dependientes del tiempo, y la cinética de este fenómeno se caracteriza por la difusividad [48-49].

La difusión Fickiana generalmente ocurre en matrices poliméricas en las que el valor de la temperatura de transición vítrea del polímero (T_g) es menor que la temperatura del ambiente. Cuando el polímero está en estado viscoelástico, las cadenas poliméricas tienen una gran movilidad, lo que permite una fácil penetración del disolvente. Sin embargo, la difusión Fickiana se caracteriza por una alta velocidad de difusión del disolvente hacia el interior de la matriz y una baja velocidad de relajación polimérica. Este comportamiento induce la formación de un gradiente de penetración del disolvente. La concentración de disolvente decrece exponencialmente desde la región totalmente hinchada hacia el centro de la matriz. La distancia de difusión es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo.

Se ha reportado que la T_g del PVA se encuentra alrededor de 76 °C [119][120], sin embargo, es posible observar la difusión Fickiana en polímeros con T_g superior a la temperatura ambiente cuando se añade un plastificante al sistema, tal es el caso de la adición del DES [101] en nuestro caso de estudio.

7.7 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Las pruebas de susceptibilidad bacteriana son una herramienta esencial para el manejo adecuado de las infecciones bacterianas y la lucha contra la resistencia antimicrobiana [121]. Se ha demostrado que los sistemas de transporte de fármacos utilizando nanotecnología tienen mayor eficacia en comparación con los sistemas convencionales [122]. En el campo de la fabricación de materiales en forma de nanofibras, es crucial que el polímero utilizado no solo pueda contener el medicamento, sino también preservar su actividad biológica y combatir la resistencia bacteriana, lo cual es un aspecto de gran importancia en las técnicas de procesamiento [123].



El efecto antibacterial de las colecciones de nanofibras de PVA-TTC y PVA-TTC-DES alineadas se evaluaron mediante el método de difusión en disco para determinar su actividad bactericida o bacteriostática *in vitro*, utilizando para ello las cepas microbianas ATCC: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* y la cepa clínica de *Streptococcus pyogenes*, el método se describe a detalle en el Anexo B. Se prepararon cinco muestras de las nanofibras en forma de sensidiscos, I) una de ellas solo contenía PVA puro, como control negativo, las otras previamente cargadas con tetraciclina mediante el electrohilado: II) PVA-TTC aleatoria, III) PVA-TTC alineada, IV) PVA-TTC-DES y V) PVA-TTC-EDES. A esta última se le removió el DES con metanol (etiquetada entonces como: PVA-TTC-EDES). Se usó además un sensidisco comercial como control positivo con una concentración de TTC de 30 µg. Los sensidiscos se colocaron en placas de agar Mueller-Hinton, MacConkey y sangre de carnero inoculadas con una colonia bacteriana, respectivamente. Las placas se incubaron a una temperatura adecuada durante 24 horas para permitir el crecimiento bacteriano y la difusión del antibiótico. Tras la incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición formados alrededor de los sensidiscos, con luz transmitida, utilizando un calibrador [124]. El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 7.4.

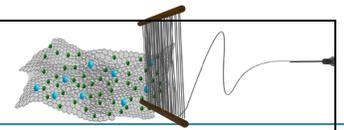
Tabla 7.4. Halos de inhibición de las nanofibras alineadas y aleatorias y el sensidisco comercial control positivo de TTC en las cepas ATCC empleadas.

Sensidiscos	Cepa bacteriana	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
	ATCC 29213	ATCC 13883	ATCC 25922	
Sensidisco comercial control + (TTC)	18 mm	19 mm	18 mm	
Sensidisco control - (PVA)	-	Sin inhibición	Sin inhibición	
Sensidisco NF PVA-TTC aleatoria	18 mm	14 mm	-	
Sensidisco NF PVA-TTC alineada	20 mm	19 mm	18 mm	
Sensidisco NF PVA-TTC-DES alineada	16 mm	-	-	

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus es una bacteria que causa infecciones tanto en entornos hospitalarios como en la comunidad, y su presencia supone una carga considerable para



el sistema de salud [125]. La capacidad de formar una biopelícula es un factor determinante de virulencia importante para la persistencia de infecciones crónicas asociadas con *S. aureus* [126].

Se realizaron dos ensayos bacterianos a distintas concentraciones de TTC, el primero corresponde a una concentración teórica de TTC de 11.9 y 23.5 μg respectivamente, mientras que el sensidisco control positivo (comercial) mantuvo los 30 μg , con el fin de evaluar su efecto en el crecimiento bacteriano y determinar la sensibilidad de la bacteria al antibiótico. Realizar dos ensayos a diferentes concentraciones permite observar cómo responde la bacteria a diferentes niveles de exposición al antibiótico. Esto ayuda a determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la concentración más baja de TTC que inhibe el crecimiento bacteriano [124].

Los resultados de la prueba de sensibilidad correspondiente al primer ensayo se muestran en la Figura 7.19, donde se puede apreciar que sólo el sensidisco control positivo de TTC presenta un halo de inhibición uniforme de 14 mm, mientras que, las nanofibras, tanto alineadas como aleatorias, que contienen TTC presentan un pseudo halo o hetero-resistencia ya que se observa el halo de inhibición parcial. El control negativo de las nanofibras de PVA no presenta inhibición.

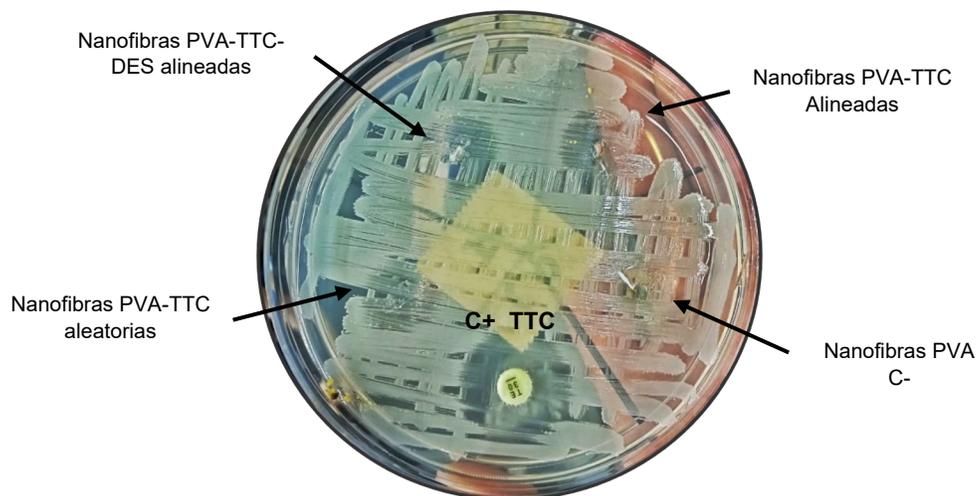
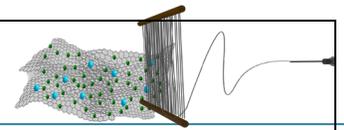


Figura 7.19. Test de zona de inhibición de *S. aureus* en agar Mueller-Hinton (concentración de nanofibras: 11.9 μg , Sensidisco: 30 μg).



Esta hetero-resistencia se refiere a la presencia de una pequeña proporción de bacterias dentro de una población total que muestra resistencia a un antibiótico específico, a pesar de que la mayoría de las bacterias son sensibles al mismo. En casos particulares, como la respuesta observada con los biomateriales PVA-TTC, cuando se utiliza una concentración baja de antibiótico en el sensidisco, es posible que solo las subpoblaciones resistentes dentro de una cepa bacteriana puedan sobrevivir y crecer alrededor del disco, mientras que las subpoblaciones sensibles son inhibidas y no forman halos de inhibición claros [127].

Por otro lado, los resultados de la prueba de sensibilidad correspondiente al segundo ensayo, con una mayor concentración de TTC (tabla 7.4) mostraron los siguientes diámetros de halos de inhibición alrededor de los sensidiscos (Figura 7.20):

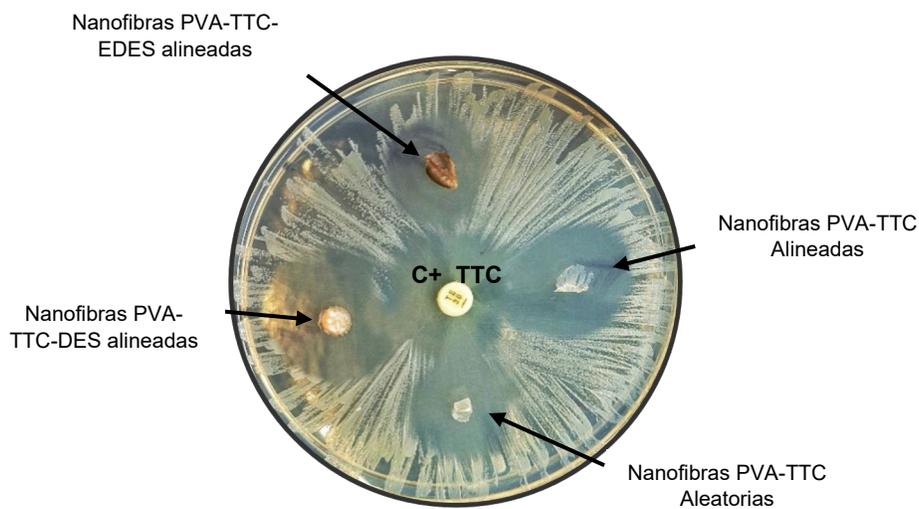
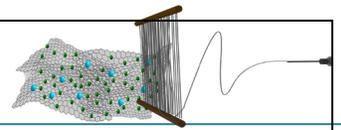


Figura 7.20. Test de zona de inhibición de *S. aureus* en agar Mueller-Hinton (concentración de nanofibras: 23.5 μg , Sensidisco: 30 μg).

De acuerdo con los criterios establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), los resultados indican diferentes grados de sensibilidad de *Staphylococcus aureus* a la tetraciclina.



- Sensidiscos NF PVA-TTC alineadas, PVA-TTC-DES alineadas y PVA-TTC aleatorias: *Staphylococcus aureus* es sensible a la tetraciclina, ya que presenta un halo de inhibición ≥ 17 mm.

- Sensidisco NF PVA-TTC-EDES alineadas: *Staphylococcus aureus* muestra sensibilidad intermedia a la tetraciclina, ya que el halo de inhibición está dentro de dicho rango (15 a 16 mm).

Con base a los resultados obtenidos, las nanofibras alineadas y aleatorias de TTC en la cepa ATCC 29213 de *Staphylococcus aureus* presentan una variabilidad en su sensibilidad a la tetraciclina, de igual manera, en presencia o con la extracción DES, mostrando diferentes grados de respuesta antimicrobiana; las nanofibras alineadas de PVA-TTC-DES presentan un ligero incremento en el halo de inhibición respecto a las aleatorias de PVA TTC; no obstante el proceso de remoción del DES con metanol, se puede originar la descomposición de la tetraciclina, lo que explica la reducción en el halo de inhibición [128].

Streptococcus pyogenes

Algunas especies de *Streptococcus pyogenes* son parte de la microbiota normal del cuerpo humano y comúnmente no causan enfermedades, mientras que otras pueden ser patógenas y provocar diversas infecciones. Por ello, es de suma importancia prevenir complicaciones potenciales, por lo que la investigación y el estudio continuo de estas bacterias son cruciales para comprender mejor su biología, virulencia y resistencia a los antibióticos, con el objetivo de mejorar las estrategias de prevención y tratamiento [129].

Los resultados de la prueba de sensibilidad mostraron los siguientes diámetros de halos de inhibición alrededor de los sensidiscos (Figura 7.21):

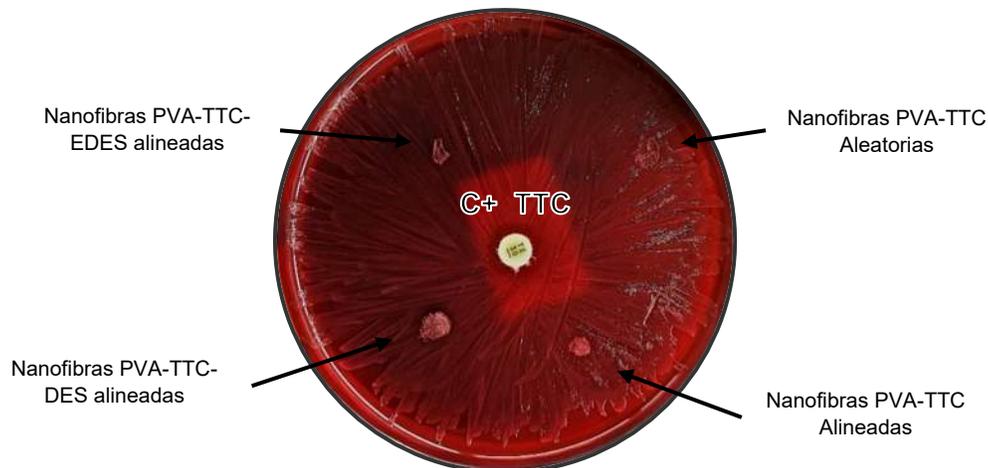
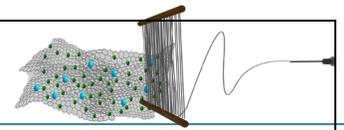
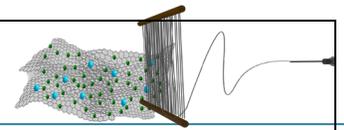


Figura 7.21. Test de zona de inhibición de *Streptococcus pyogenes* en agar Sangre de carnero (concentración de nanofibras: 23.5 μg , Sensidisco: 30 μg).

- Sensidisco NF PVA-TTC alineadas, NF PVA-TTC-DES alineadas, Control: Halo de inhibición de 6 mm.
- Sensidisco PVA-TTC-EDES alineadas y NF PVA-TTC Aleatorias: Halo de inhibición ausente. Inhibición en área de sensidisco.

Los resultados obtenidos en esta prueba de sensidiscos revelaron que los halos de inhibición alrededor de los tres sensidiscos impregnados con tetraciclina fueron casi imperceptibles (6 mm), y en las nanofibras que no contienen DES no se observa, solo en el área donde se colocó. De acuerdo con los criterios de interpretación establecidos, esta medida indica resistencia a la tetraciclina por parte de *S. pyogenes*.

La resistencia a la tetraciclina en *S. pyogenes* puede surgir debido a diversos mecanismos, como la producción de enzimas que inactivan el antibiótico o la alteración de los sitios de unión de la tetraciclina en la bacteria. Esta resistencia puede ser adquirida a través de la transferencia de genes de resistencia o debido a mutaciones genéticas. La presencia de halos de inhibición de 6 mm en esta prueba indica que la concentración de tetraciclina utilizada no fue suficiente para inhibir el crecimiento de *S. pyogenes*, confirmando la resistencia del microorganismo a este antibiótico [130].



Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae es una bacteria patógena oportunista que puede causar infecciones en mamíferos. Es una de las principales causas de infecciones nosocomiales. Debido a su resistencia a los antibióticos y su capacidad para formar biopelículas en superficies médicas, puede propagarse fácilmente y causar infecciones graves en pacientes con sistemas inmunitarios debilitados [131].

Para la prueba de inhibición, se prepararon los sensidiscos con nanofibras alineadas y nanofibras aleatorias impregnados con TTC que fueron colocados en una placa de agar MacConkey y Mueller-Hinton inoculada con la cepa de *Klebsiella pneumoniae* por estría masiva. Se incubaron las placas a 37°C durante 18-24 h. Luego, se midieron los halos de inhibición generados alrededor de cada sensidisco.

Los resultados de la prueba de sensibilidad mostraron los siguientes diámetros de halos de inhibición alrededor de los sensidiscos (Figura 7.22):

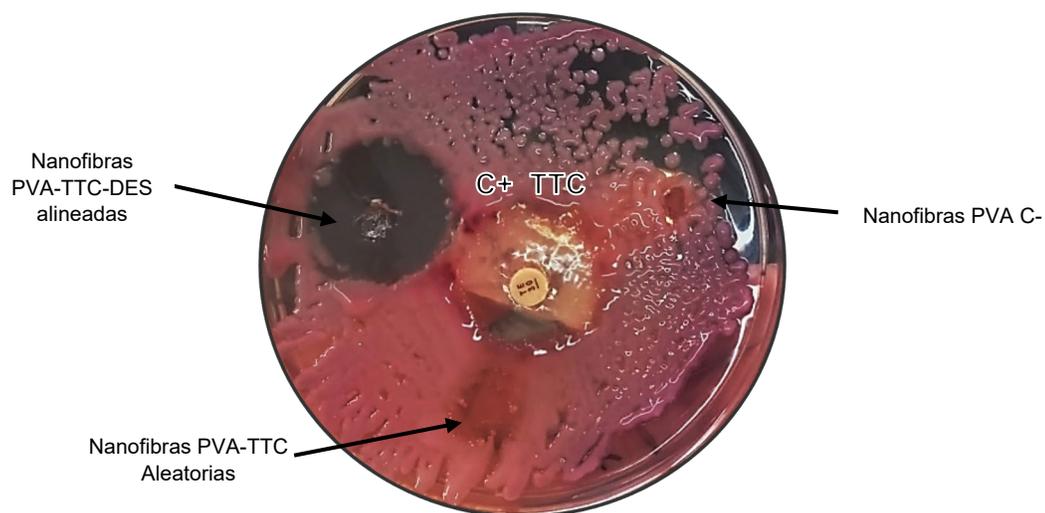
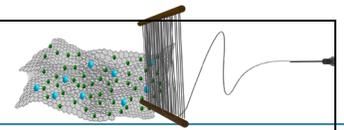


Figura 7.22. Test de zona de inhibición de *K. pneumoniae* en agar Mac Conkey (concentración de nanofibras: 23.5 μg , Sensidisco: 30 μg).

- Sensidisco PVA-TTC-DES alineadas y sensidisco control TTC: Halo de inhibición de 21 mm.
- Sensidisco PVA-TTC Aleatorias: Halo de inhibición de 10 mm.
- Sensidisco PVA control negativo: No presenta inhibición.



Sin embargo, de acuerdo con las guías CLSI y estudios *in vitro* con enterobacterias [132], el medio estándar para estudios de inhibición debe ser Mueller Hinton, por lo que esta prueba no es idónea, ya que el MacConkey contiene inhibidores y selectores que pueden afectar los resultados de la prueba en condiciones puntuales [132]. Con respecto a la prueba realizada en Mueller-Hinton se obtuvieron los halos de inhibición de la Tabla 7.4, mismos que se observan en la Figura 7. 23:

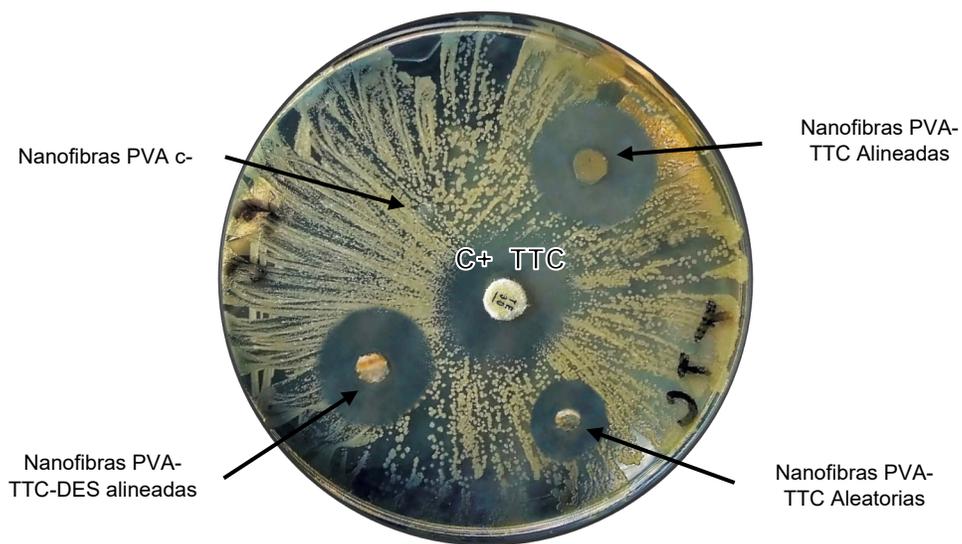
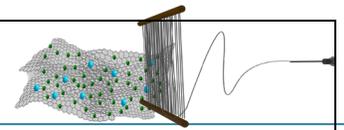


Figura 7.23. Test de zona de inhibición de *K. pneumoniae* en agar Muller-Hinton (concentración de nanofibras: 23.5 μg , Sensidisco comercial: 30 μg).

De acuerdo con las guías CLSI, los resultados de la prueba de sensibilidad muestran que el sensidisco de nanofibras alineadas con TTC generó un halo de inhibición mayor a 18 mm, lo que indica que la cepa de *Klebsiella pneumoniae* es sensible a la tetraciclina presente en estas nanofibras. Por otro lado, el sensidisco de nanofibras aleatorias con TTC produjo un halo de inhibición más pequeño (de 14 y 10 mm), lo que indica que la configuración de nanofibras alineadas es más eficiente en la inhibición bacteriana, proporcionando una mayor superficie de contacto entre la tetraciclina y la bacteria, lo que facilita una mayor liberación del fármaco y una mejor interacción con la cepa, aumentando así la efectividad del tratamiento antibiótico.



Escherichia coli

Escherichia coli, un bacilo Gram negativo, ha sido objeto de investigación constante debido a su ubicuidad y su papel en diversos contextos, desde la microbiología ambiental hasta la epidemiología clínica. Dada su prevalencia en entornos naturales y su papel dual como componente normal del microbioma y patógeno oportunista, el estudio estas cepas es esencial para comprender su variabilidad genética, su comportamiento antimicrobiano y su impacto en la salud humana y ambiental.

Los resultados de la prueba de sensibilidad mostraron diámetros similares (Tabla 7.4) estos halos de inhibición se muestran en la Figura 7.24.

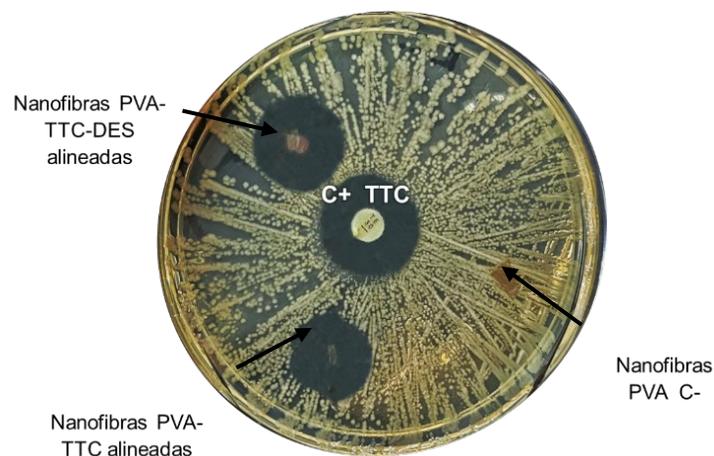
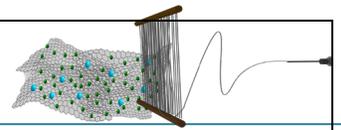


Figura 7.24. Test de zona de inhibición de *E. coli* en agar Mueller-Hinton (concentración de nanofibras: 23.5 μg , Sensidisco: 30 μg).

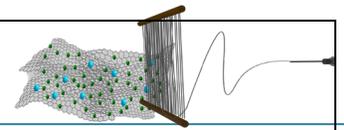
Los resultados muestran que, tanto las nanofibras alineadas como aquellas cargadas con DES y TTC generaron halos de inhibición con un diámetro de 18 mm, al igual que el control positivo de TTC. Esto indica que ambas formulaciones de nanofibras son efectivas para inhibir el crecimiento de la cepa en condiciones de laboratorio. Además, la igualdad de los resultados entre las nanofibras alineadas y las tratadas con DES sugiere que la adición de DES no afectó negativamente la actividad antibacteriana.

Según los estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), la sensibilidad de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 se considera dentro del rango de 18 mm a 25 mm. En este caso, los halos de inhibición observados (18 mm) podrían interpretarse como una baja sensibilidad a las nanofibras de TTC. Sin embargo, es importante



considerar que el valor de corte establecido por el CLSI se basa en antibióticos convencionales y no necesariamente se aplica directamente a nanomateriales [132].

Como se ha detallado, el presente trabajo de tesis cubrió la fabricación de sistemas nanoestructurados de base NF-PVA para la liberación del antibiótico TTC a partir de microentornos de morfología variable; se demostró la capacidad de liberación *in vitro* y el ajuste con los modelos cinéticos teóricos asocian el comportamiento de los perfiles de liberación con el mecanismo de difusión. Finalmente, la aplicación práctica de los materiales diseñados ha sido demostrada con excelentes resultados en las cepas ATCC *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. La inhibición resulta superior cuando se emplean los compósitos constituidos por nanofibras alineadas, confirmando así la hipótesis planteada y poniendo de manifiesto la eficiencia de la variante de electrohilado *air gap* en aplicaciones médicas.



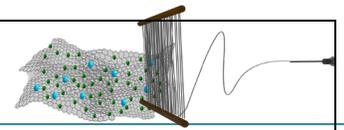
7.8 ESTADÍSTICA DE INHIBICIÓN BACTERIANA (T de student).

Se empleó la prueba estadística de T-Student, comparando el efecto antibacterial *in vitro* de las nanofibras alineadas de PVA, PVA-TTC y PVA-TTC-DES, así como la disposición alineada y aleatoria de las colecciones en las cepas bacterianas ATCC que se muestran en la Tabla 7.5.

Tabla 7.5. Valores estadísticos de los halos de inhibición en cepas bacterianas ATCC en las colecciones alineadas y aleatorias de PVA, PVA-TTC y PVA-TTC-DES.

Muestra	Cepa	Replica 1 (mm)	Replica 2 (mm)	Replica 3 (mm)	Promedio (mm)	S ²	σ
Control +	<i>S. aureus</i>	20	19	20	19.67	0.22	0.58
	<i>K. pneumoniae</i>	21	20	19	20.00	0.67	1.00
	<i>E. coli</i>	18	17	17	17.33	0.22	0.58
NF PVA-TTC Alineadas	<i>S. aureus</i>	22	21	21	21.33	0.22	0.58
	<i>K. pneumoniae</i>	21	20	19	20.00	0.67	1.00
	<i>E. coli</i>	18	18	17	17.67	0.22	0.58
NF PVA-TTC Aleatorias	<i>S. aureus</i>	18	19	20	19.00	0.67	1.00
	<i>K. pneumoniae</i>	10	14	14	12.67	3.56	2.31
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-
NF PVA-TTC-DES Alineadas	<i>S. aureus</i>	22	22	21	21.67	0.22	0.58
	<i>K. pneumoniae</i>	21	20	19	20.00	0.67	1.00
	<i>E. coli</i>	18	18	18	18.00	0.00	0.00

Se realizó un estudio T de student homo y heterocedástico de una cola, dado que son muestras pequeñas y de varianza distinta dependiente de grupos. Se propusieron las hipótesis nulas y alternas de acuerdo con el grupo de estudio y se realizaron los cálculos en concordancia a la Prueba T con cada una de las cepas. Los valores obtenidos de la Prueba T de student para todas las cepas fueron similares, de manera representativa el caso de *S. aureus* en nanofibras aleatorias y alineadas de PVA-TTC se muestran en la Figura 7.25.



T STUDENT

Staphylococcus aureus alin vs aleat

Significancia (α) = 0.05

P<0.05

F2= 5.533985905

Rechazar hipótesis nula 1

Prueba T (Heterocedastica) = **0.017826331**

Figura 7.25. Valores obtenidos de la Prueba T de student para la cepa de *S. aureus* en nanofibras alineadas de PVA-TTC y alineadas de PVA-TTC-DES.

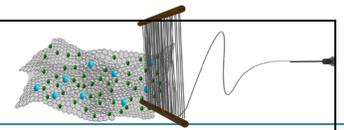
Para el primer grupo de nanofibras aleatorias de PVA-TTC y alineadas de PVA-TTC, se propusieron las siguientes hipótesis, correlacionando la actividad bacteriana con la orientación de las nanofibras:

H₀₁ = No hay diferencia significativa en la inhibición bacteriana entre las nanofibras alineadas y aleatorias frente a las cepas bacterianas.

H_{a1} = Existe una diferencia significativa en la inhibición bacteriana entre las nanofibras alineadas y aleatorias frente a las cepas bacterianas.

En este primer caso, se compararon los grupos de nanofibras aleatorias de PVA-TTC y alineadas de PVA-TTC, en la cual se presentó una significancia menor ($p < 0.05$), por tanto, se asume que, **sí** existe una diferencia estadísticamente significativa en la inhibición que presentan las nanofibras aleatorias y alineadas, siendo favorecido en las nanofibras alineadas, aceptándose la hipótesis alternativa y negando la hipótesis nula.

En el segundo caso, los valores obtenidos de la Prueba T de student se muestran en la Figura 7.26 considerando como ejemplo representativo los valores de inhibición de a la cepa *S. aureus* empleando las nanofibras alineadas de TTC y alineadas de TTC-DES.



T STUDENT

Staphylococcus aureus alin vs alin con DES

Significancia (α) = 0.05

P>0.05

F2= 1.118033989

Aceptar hipótesis nula 2

Prueba T (Homocedastica) = **0.211324865**

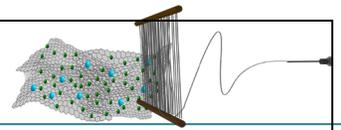
Figura 7.26. Valores obtenidos de la Prueba T de student para la cepa de *S. aureus* en nanofibras alineadas de PVA-TTC y alineadas de PVA-TTC-DES.

Las hipótesis propuestas correlacionaron la actividad bacteriana de acuerdo con el uso de DES en las colecciones:

H₀₁ = No hay diferencia significativa en la inhibición bacteriana entre las nanofibras alineadas con TTC y alineadas que contienen DES y TTC frente a las cepas bacterianas.

H_{a1} = Existe una diferencia significativa en la inhibición bacteriana entre las nanofibras alineadas con TTC y alineadas que contienen DES y TTC frente a las cepas bacterianas.

Se compararon los grupos de nanofibras alineadas de PVA-TTC y PVA-TTC-DES, en la cual se presentó una significancia mayor ($p>0.05$), por tanto, se asume que las nanofibras que contienen DES **no** presentan una diferencia estadísticamente significativa, aceptándose así la hipótesis alternativa y negando la hipótesis nula.



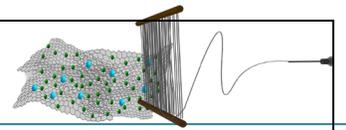
7.9 VIABILIDAD CELULAR

Se analizó la citotoxicidad/viabilidad de las colecciones de nanofibras alineadas NF PVA-TTC y NF PVA-TTC-DES, debido a que la cuantificación del grado de viabilidad celular de los fibroblastos es un aspecto crucial para la aplicación planteada. Se empleó como control interno la colección de nanofibras alineadas NF PVA generada sin DES.

Desde el punto de vista del diseño de dispositivos implantables para la liberación de agentes terapéuticos, garantizar la inocuidad de los materiales es un prerrequisito. Para ello, la Norma ISO 10993-1, refiere que todo sistema de dosificación de fármacos diseñado para ser implantado debe presentar un porcentaje de citotoxicidad menor al 30%, por ende, la viabilidad celular al menos debe ser 70%, empleando como referencia la línea celular de fibroblastos de ratón L929 [133].

En el marco de la Norma antes citada, el porcentaje de viabilidad celular debe estimarse de manera indirecta a partir del ensayo MTT. Dicho protocolo, establecido por Mossmann et al. [134], determina la viabilidad en función de la actividad metabólica del cultivo celular, siendo un ensayo colorimétrico que basa su respuesta en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, color amarillo) a formazán (color morado, $\lambda_{\text{máx}} = 500\text{--}600\text{ nm}$). La metodología aplicada para la evaluación de la citotoxicidad se detalla en el Anexo C.

Los resultados del ensayo MTT, empleando las colecciones NF PVA-TTC y NF PVA-TTC-DES se muestran en la Figura 7.27. Derivado de la Norma ISO 10993-1, se realizó la incubación de poblaciones celulares al 100% (50 000 células por pozo) y 50% (25 000 células por pozo) en contacto directo con las colecciones de nanofibras a base de PVA. Como control positivo, se incubó una población equivalente en ausencia del compuesto; mientras que, como control negativo se emplea solo el medio de cultivo DMEM.



La gráfica de la Figura 7.27 permite apreciar que todos los materiales, incluso las NF PVA empleadas como control, presentan valores de viabilidad superiores al 100%. A partir de estos resultados se pone de manifiesto que los dispositivos de liberación de TTC basados en colecciones de NF PVA no presentan toxicidad en fibroblastos.

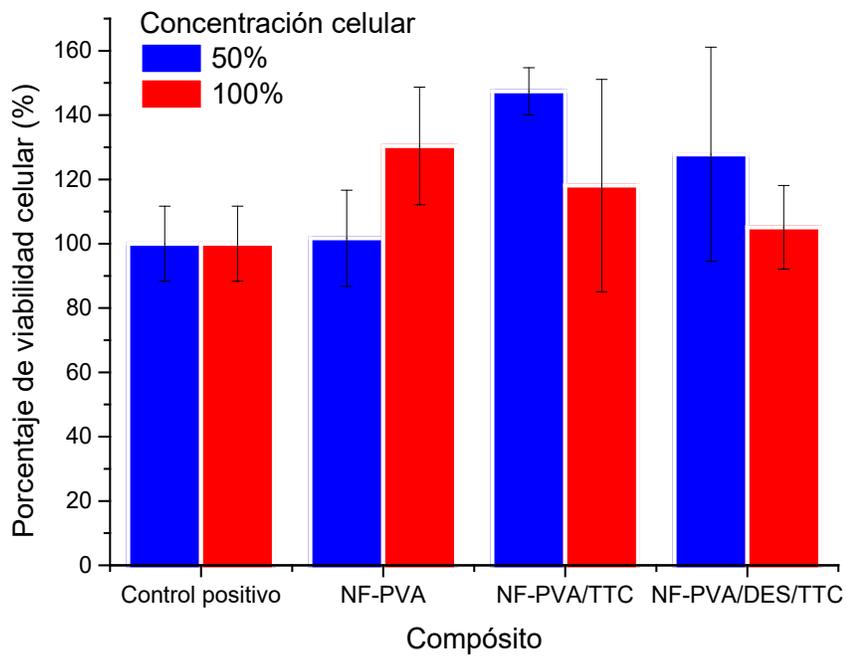
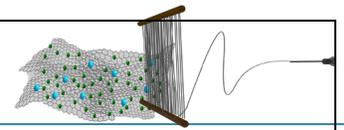


Figura 7.27. Análisis de viabilidad celular en las colecciones de nanofibras alineadas de PVA, PVA-TTC y PVA-TTC-DES



8. CONCLUSIONES

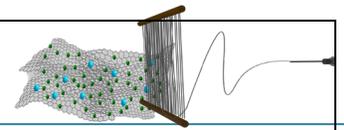
Se establecieron los parámetros óptimos para la obtención de nanofibras alineadas de PVA-TTC y PVA-TTC empleando el DES ChCl:U como aditivo de electrohilado. Estas colecciones de nanofibras son efectivas como sistemas de liberación de fármacos debido a su alta área superficial, capacidad de liberación controlada, efecto de barrera y mejora de la estabilidad, y su obtención es altamente reproducible.

A partir del análisis de la estructura mediante FESEM se observó que ambas colecciones de nanofibras alineadas (PVA-TTC y PVA-TTC DES), son de buena calidad y poseen una estructura uniforme, de superficie lisa y orientación alineada. Los tamaños promedio de diámetros de las nanofibras alineadas de PVA-TTC fueron de $77 \text{ nm} \pm 14 \text{ nm}$, con grado de orientación axial de $65\% \pm 4\%$ respecto a $84^\circ \pm 14^\circ$; a diferencia de las nanofibras alineadas del compuesto PVA-TTC-DES que presentaron diámetro promedio de $158 \text{ nm} \pm 34 \text{ nm}$ y $86\% \pm 5\%$ como grado de orientación respecto del ángulo $87^\circ \pm 15^\circ$, lo que evidencia el efecto positivo de la presencia del DES sobre la inducción de la orientación de las nanofibras.

La presencia de la TTC en las nanofibras se verificó mediante espectroscopia de infrarrojo; observando las vibraciones características del PVA y la TTC. La detección del DES en las colecciones de nanofibras mediante FTIR es complicada debido a que se encuentra en una muy baja concentración respecto de los otros componentes y la mayoría de sus vibraciones características se traslapan con las del PVA. La presencia del DES fue posible verificarla mediante los análisis térmicos de TGA y DSC.

En términos de la aplicación, la cinética de liberación mostró una tasa de liberación más lenta en las nanofibras alineadas de PVA-TTC-DES, con un máximo de liberación a las 2 h; manteniendo una liberación eficaz y sostenida hasta por 368 h. A diferencia de las nanofibras alineadas de PVA-TTC, las cuales presentan la máxima liberación a las 4 h mediante una cinética sostenida. Ambas son excelentes matrices de liberación dependiendo el sitio anatómico de aplicación.

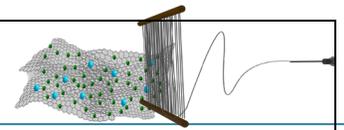
Se evaluaron varios modelos cinéticos para determinar los mecanismos de liberación del fármaco. Para las nanofibras de PVA-TTC, el modelo que mejor se ajustó



a los datos experimentales fue el modelo de Korsmeyer-Peppas, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9958 y un valor del exponente (n) de 0.112. Estos resultados indican que la liberación del fármaco sigue un mecanismo de difusión controlada por la raíz cuadrada del tiempo, lo que implica una liberación lenta y controlada. En el caso de las nanofibras de PVA-TTC-DES, se encontró que tres modelos se ajustaron bien a los datos experimentales: el modelo de Peppas-Sahlin, el modelo de Makoid-Banakar y el modelo de Korsmeyer-Peppas. Los tres modelos describen la difusión Fickiana, regida por fenómenos de difusión e hinchamiento. Ambas matrices, constituidas por nanofibras, confirman dichos fenómenos, al compararlos con el modelo de Kopcha, ya que se obtuvieron valores mayores a 1, lo cual indica la prevalencia de la difusión.

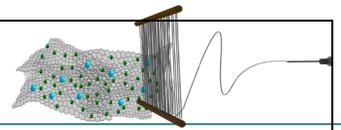
Las nanofibras de PVA-TTC y PVA-TTC-DES muestran un hinchamiento inicial rápido de líquido seguida de una estabilización a lo largo del tiempo. No obstante, el uso de DES indica una capacidad de retención de líquidos más prolongada en comparación con las nanofibras PVA-TTC.

Por su parte, la inhibición bacteriana es dependiente de la concentración del fármaco y de la genética de la cepa. Las nanofibras alineadas en general son activas sobre las cepas que indica la bibliografía, siempre que mantengan sus genes de sensibilidad, y que al retirar el DES el principio activo mantenga su naturaleza química. Tanto las nanofibras alineadas de PVA-TTC como las nanofibras alineadas de PVA-TTC-DES indujeron inhibición del crecimiento bacteriano en el ensayo de difusión en agar a 48 h en cultivos de ATCC de *Staphylococcus aureus*, superando el desempeño de las colecciones de nanofibras aleatorias de PVA-TTC en dicho estudio. En la cepa *Streptococcus pyogenes* no es posible discutir sensibilidad, esto puede deberse a que sea una especie altamente resistente al antibiótico. En *Klebsiella pneumoniae* destaca la inhibición de las nanofibras alineadas de PVA-TTC-DES, mientras que en las nanofibras aleatorias de PVA-TTC es deficiente al generar un halo mínimo de inhibición. Del mismo modo analizando la inhibición producida por estas cepas se afirma que existe una diferencia estadísticamente significativa en la inhibición que presentan las nanofibras aleatorias y alineadas, siendo favorecido en las nanofibras alineadas; mientras que por otro lado, la inhibición de las nanofibras de PVA-TTC-DES es similar a las nanofibras alineadas DE PVA-TTC.



Estos resultados indican que los andamios de nanofibras de TTC alineadas, además de ser excelentes candidatos para el tratamiento contra bacterias de amplio espectro, podrían reducir el consumo de antibióticos de manera prolongada ya que estos materiales tienen una liberación sostenida en el tiempo y no se requieren tantas dosis.

Es así que, se han logrado fabricar nanofibras alineadas de PVA-TTC-DES, lo cual constituye un innovador sistema de liberación farmacológica, verificándose la influencia de la alineación de las nanofibras, ya que las nanofibras alineadas presentan una mejor dosificación que las nanofibras aleatorias de PVA-TTC. Esta propuesta ofrece una valiosa alternativa para lograr una dosificación sostenida y efectiva, pudiendo impactar en la reducción de algunos de los efectos adversos que suelen acompañar al consumo de fármacos convencionales. Donde, la alta citocompatibilidad de las matrices PVA-TTC soporta la aplicación propuesta, en apego a la ISO-10993-1 referente a dispositivos médicos implantables.



9. ANEXOS

A. ANÁLISIS DEL MECÁNISMO DE LIBERACIÓN

Los datos experimentales obtenidos mediante el monitoreo por UV-Vis de las cinéticas de liberación, se ajustaron mediante regresión lineal de suma de cuadrados a siete modelos empíricos/semiempíricos:

Orden zero: Este modelo se utiliza para describir fármacos que se liberan lentamente con una concentración constante que puede caracterizarse como modelo cinético ideal, en el que se mantienen los niveles de fármaco constantes durante el proceso de liberación en el plasma sanguíneo, porque la tasa de liberación del fármaco no depende de su concentración [135]. La ecuación que emplea es la siguiente:

$$C = C_0 - k_0 t$$

Donde: C es la cantidad de fármaco liberado o disuelto, C_0 es la cantidad inicial de fármaco en la solución (normalmente es cero), k_0 la constante de velocidad de orden cero y t el tiempo

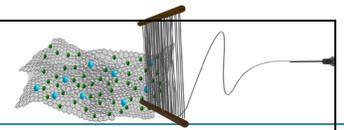
Primer orden: La cinética de liberación de primer orden establece que la variación en la concentración con respecto del tiempo depende solamente de la concentración del agente activo remanente en el dispositivo:

$$\ln(Q_t) = \ln(Q_0) + k_1 t$$

Donde: Q_t es el porcentaje de fármaco liberado después del tiempo t , Q_0 es el porcentaje inicial de fármaco liberado (usualmente 0), k_1 la constante de velocidad para la cinética de primer orden y t es el tiempo.

Korsmeyer-Peppas: Este modelo describe el mecanismo de liberación del fármaco a partir del sistema de nanopartículas poliméricas considerando un mecanismo no Fickiano, que se derivó como una relación simple para detectar estos mecanismos [136],

$$\ln(Q_t) = \ln(k_{KP}) + n \ln(t)$$



Donde: Q_t es el porcentaje de liberación del fármaco después del tiempo t , k_{KP} es la constante de nanopartículas que incorpora las características geométricas, n es el exponente de liberación (relacionado al mecanismo de liberación del fármaco) y t es el tiempo.

El modelo de Korsmeyer-Peppas tiene un valor del exponente de difusión (m) que se ajusta y utiliza para distinguir entre los mecanismos de liberación de fármacos de varias geometrías de nanopartículas, así como ilustrar los valores bajos y altos de liberación como se indica en la siguiente tabla:

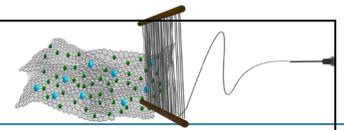
Tabla 9.1. Valores del exponente de difusión (m) del modelo de Korsmeyer-peppas y los mecanismos de liberación característicos de los materiales.

Exponente de difusión (m)			Mecanismo
Film	Cilindro	Esfera	
0.5	0.45	0.43	Difusión Fickiana
$0.50 < m < 1.00$	$0.45 < m < 0.89$	$0.43 < m < 0.85$	Transporte Anomalo
1	0.89	0.85	
1	0.89	0.85	Transporte Caso-II

Higuchi: Es un modelo de solubilidad en agua y baja solubilidad en la matriz sólida y semisólida [137]. Este modelo suele caracterizarse por el uso de agua. En estos sistemas hay dos mecanismos responsables de controlar la velocidad de la velocidad de liberación del fármaco: el hinchamiento y la erosión/degradación, dando lugar a una capa en la superficie del fármaco y así, impedir la entrada de más agua y evitar la liberación de más fármaco, resultando en la disminución del fármaco con el tiempo [138].

$$C = [D(2q_t - C_s)Cst]^{1/2}$$

Donde C es la cantidad total de liberación del fármaco por unidad de superficie de la matriz, D es el coeficiente de difusión del fármaco en la matriz, q_t la cantidad total de fármaco en una unidad de volumen de matriz, C_s =solubilidad dimensional del fármaco en la matriz polimérica y t el tiempo.



Hixson-Crowell: Este modelo tiene en cuenta que la superficie de la partícula es uniforme en tamaño y corresponde a su raíz cuboide [139]. Cuando se liberan nanopartículas, se produce un cambio en el diámetro y la superficie de estas partículas. Esta forma se aplica en forma de dosis como comprimidos, donde la descomposición es paralela a la superficie del fármaco [140].

$$C_0^{1/3} - C_t^{1/3} = k_{HC}t$$

Donde, C_t es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo t . C_0 la cantidad inicial de fármaco en el comprimido, k_{HC} la constante de velocidad de la ecuación de Hixson-Crowell.

Peppas-Sahlin: es conocido como "difusión no-Fickiana" o "anómala". Esto significa que la tasa de liberación de fármaco no sigue una cinética de difusión lineal clásica, sino que está influenciada por fenómenos como hinchamiento del polímero, degradación del material y otros mecanismos complejos [141]. Esta dada por:

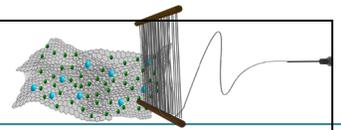
$$\frac{C_t}{C_\infty} = k_1 t^n + k_2 t^{2n}$$

Donde C representa la cantidad de fármaco liberado en un tiempo t , k_1 y k_2 son las constantes de liberación del modelo, $\frac{C_t}{C_\infty}$ es la fracción de fármaco liberado en un tiempo "t" dividido por la cantidad total de fármaco liberado (liberación acumulada) en un tiempo infinito, n es el exponente que caracteriza el mecanismo de liberación.

El primer término del lado derecho representa la "contribución difusional Fickiana, f , mientras que el término del lado izquierdo la caso II -contribución de relajación "R".

Makoid-Banakar: se basa en la hipótesis de que la liberación del fármaco ocurre a través de una combinación de difusión y desintegración de la matriz. La ecuación del modelo es la siguiente:

$$Q = kt^n$$

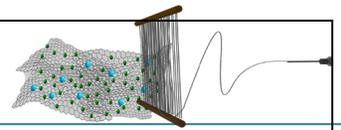


Donde: Q es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo t , k es una constante de velocidad de liberación, n es un exponente que puede tener diferentes valores dependiendo del mecanismo de liberación.

Kopcha: El principal mecanismo de liberación está relacionado con la relación A/B . Si A/B es superior a 1, el principal mecanismo de liberación está controlado por la difusión (relacionado con la velocidad a la que el fármaco se mueve a través de la matriz polimérica.) y si es inferior a 1, está controlado por la erosión (la velocidad a la que el polímero se degrada o se disuelve en el medio). En el caso de ser igual a 1, tanto la difusión y la erosión son importantes para el mecanismo de liberación [142].

$$M_t = At^{0.5} + Bt$$

Donde A y B son la velocidad de difusión y las constantes de velocidad de erosión, respectivamente, t es el tiempo de liberación y M_t Representa la cantidad acumulada de fármaco liberado en el tiempo t .



B. ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Etapa 1. Preparación de cepas bacterianas y disolución de McFarland:

1. Cultivar las cepas ATCC en agar Müller-Hinton durante 24 horas a 37°C.
2. Recolectar las células bacterianas del cultivo en tubos y hacer lavados mediante la centrifugación a 2500 rpm por 3 minutos.
3. Re-suspender las células en solución salina estéril (0.85% de NaCl) hasta obtener una suspensión homogénea.
4. Ajustar la turbidez visualmente con una solución estándar de sulfato de bario al 0.5 en la escala McFarland, añadiendo más solución salina o más células para alcanzar una absorbancia de 0.5 en la escala McFarland. Si se usa un espectrofotómetro medir la longitud de onda a 625 nm.

Etapa 2. Ensayo de sensibilidad antibacteriana:

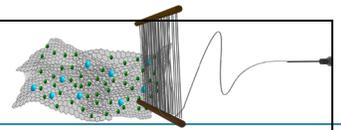
1. Preparar una suspensión bacteriana con una concentración de 0.5 en la escala McFarland.
2. Sembrar uniformemente la suspensión bacteriana en placas de agar Müller-Hinton.
3. Colocar los sensidiscos en las placas de agar, asegurándose de espaciarlos uniformemente.
4. Incubar las placas a 37°C durante 24 horas.

Etapa 3. Evaluación de resultados:

1. Medir los halos de inhibición alrededor de cada sensidisco en luz indirecta con un calibrador.
2. Registrar los diámetros de inhibición y compararlos entre los diferentes tipos de nanofibras y controles.

Notas Adicionales:

- Todas las manipulaciones deben realizarse en condiciones estériles.
- Repetir el experimento al menos tres veces para obtener resultados más robustos.



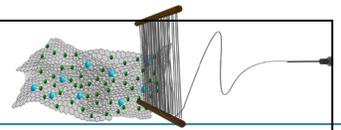
C. ENSAYO DE CITOCOMPATIBILIDAD EN FIBROBLASTOS

Protocolo 1: Preparación de los materiales

1. Los materiales son cortados con un bisturí circular en discos de 6 mm de diámetro.
2. Posteriormente se procede a realizar la esterilización de los materiales mediante exposición a radiación UV durante 20 min, 10 min por cada lado.
3. Dentro de la campana de flujo laminar, los materiales se colocan en frascos herméticos y se mantienen sellados hasta su uso.

Protocolo 2: Conteo de células en cámara Neubauer y cultivo primario

1. A los cultivos iniciales, incubados en botellas matraz T-25, se les retira el medio de crecimiento.
2. Se realizan tres lavados con DMEM: F-12, empleando 5 mL para cada lavado.
3. El proceso de tripsinación se realiza adicionando entre 2 y 3 mL de disolución de Tripsina 0.25%-EDTA 1 mM, una vez tapada la botella de cultivo se lleva a incubación por 5 min a 37 °C y en atmósfera de 5% de CO₂.
4. Se agita la botella suavemente durante 20 s en vórtex y se vierte el contenido a frascos Corning para centrifuga.
5. Se centrifuga durante 6 min a 1200 rpm con el correspondiente contrapeso, el sobre sobrenadante se desecha.
6. A las células sedimentadas se le adiciona el medio de crecimiento completo y se homogeniza en vórtex por 30 s.
7. Se extraen 100 µL de la suspensión de células con micropipeta y se agrega un volumen igual de azul tripán al 0.4 % p/v preparado en PBS.
8. Se prepara la cámara de Neubauer, colocando el portaobjetos sobre la cámara y se adiciona una gota de la mezcla de suspensión de células/azul tripán en cada uno de los extremos de la cámara.
10. Se realiza el conteo de células por cuadrante en microscopio invertido y con el promedio del conteo obtenido se calcula el número de células/mL.



Cálculos:

$$\text{Promedio de células} = \frac{\# \text{ de células contadas}}{4}$$

$$\text{Células/mL} = \frac{\text{promedio de células contadas}}{1 \times 10}$$

$$\text{Volúmen de suspensión} \frac{\text{celular}}{\text{pozo}} = \frac{\# \text{ de células requeridas por pozo}}{\# \text{ de células contadas/mL}}$$

11. Bajo campana de flujo laminar, se adiciona con micropipeta el volumen de la suspensión de células correspondiente al número de células requerido para el análisis respectivo.
12. El cultivo primario se realiza por triplicado, con un n=3 en cada placa.
13. Una vez completo el set, se procede a la incubación a 37 °C bajo a atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 h.

Protocolo 3: Ensayo de citotoxicidad por MTT

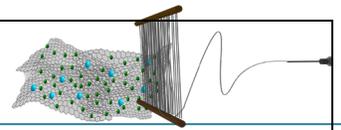
El experimento se realiza por triplicado con:

Control positivo: medio de crecimiento completo y células.

Control negativo: medio de crecimiento completo sin células.

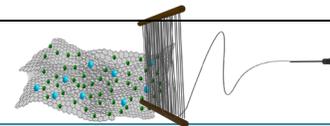
Control interno: medio de crecimiento completo, células y material.

1. Se preparan placas de 96 pozos con los materiales correspondientes a analizar, previamente esterilizados.
2. Se adiciona en cada pozo el volumen necesario de la suspensión de células para el cultivo de 50,000 y 25,500 células/pozo siguiendo el protocolo 2.
3. Se incuba la placa a 37 °C y atmósfera de CO₂ al 5% por 24 h.
4. Se observa confluencia en microscopio invertido.



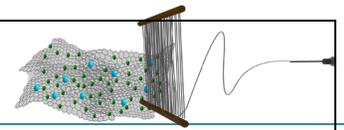
5. Se adiciona a cada pozo el reactivo del kit MTT en volumen igual al 10% respecto al volumen inicial (volumen inicial= 100 μ L, por tanto, el volumen de reactivo MTT= 10 μ L).
6. Se incuba durante 4 h a condiciones estándar (37 °C y CO₂ 5%).
7. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procede a leer la absorbancia de las placas en espectrofotómetro de UV-Vis para placa multipozo en el rango de $\lambda_{\text{máx}}$ =500 a 600 nm.
8. Los valores de viabilidad se estiman a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Viabilidad celular} = \frac{\text{Densidad óptica de la muestra}}{\text{Densidad óptica del control}} \times 100$$

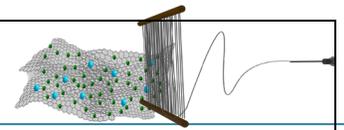


10. REFERENCIAS

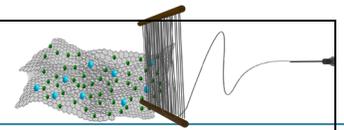
- [1] J. Brouwers, Advanced and controlled drug delivery systems in clinical disease management, *Pharm. World Sci.* 18 (1996) 153–162.
- [2] A. Greiner, J.H. Wendorff, Cover picture: electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers (*Angew. Chem. Int. Ed.* 30/2007), *Angew. Chemie Int. Ed.* 46 (2007) 5633.
- [3] K. Tuzlakoglu, M.I. Santos, N. Neves, R.L. Reis, Design of nano-and microfiber combined scaffolds by electrospinning of collagen onto starch-based fiber meshes: a man-made equivalent of natural extracellular matrix, *Tissue Eng. Part A.* 17 (2011) 463–473.
- [4] Z.-M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Compos. Sci. Technol.* 63 (2003) 2223–2253.
- [5] N. Mendoza Patiño, A. Campos Sepúlveda, Actualidades farmacológicas-Tetraciclinas, *Rev Fac Med UNAM.* 51 (2008) 29–32.
- [6] M. Eslamian, M. Khorrani, N. Yi, S. Majd, M.R. Abidian, Electrospinning of highly aligned fibers for drug delivery applications, *J. Mater. Chem. B.* 7 (2019) 224–232.
- [7] W.-H. Han, M.-Q. Wang, J.-X. Yuan, C.-C. Hao, C.-J. Li, Y.-Z. Long, S. Ramakrishna, Electrospun aligned nanofibers: A review, *Arab. J. Chem.* 15 (2022) 104193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104193>.
- [8] J. Ornelas, J. Pérez, A. González, OBTENCIÓN DE NANOFIBRAS AXIALMENTE ORIENTADAS PVA-TETRACICLINA MEDIANTE ELECTROHILADO AIR GAP Y ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA MICROESTRUCTURA EN LA LIBERACIÓN IN VITRO, (2022) 93.
- [9] J. Orozco, Y., Pérez, A. González, Implementación del Sistema Colector air gap para la Obtención de Nanofibras con Orientación Axial Inducida Mediante Electrohilado, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2021.
- [10] L.H. Delgado-Rangel, A. Huerta-Saquero, N. Eufrazio-García, A. Meza-Villezcás, J.D. Mota-Morales, J.B. González-Campos, Deep eutectic solvent-assisted phase separation in chitosan solutions for the production of 3D monoliths and films with tailored porosities, *Int. J. Biol. Macromol.* 164 (2020) 4084–4094.
- [11] M. Zdanowicz, K. Wilpiszewska, T. Szychaj, Deep eutectic solvents for polysaccharides processing. A review, *Carbohydr. Polym.* 200 (2018) 361–380.
- [12] A.M.M. Sousa, H.K.S. Souza, J. Uknalis, S.-C. Liu, M.P. Gonçalves, L. Liu, Improving agar electrospinnability with choline-based deep eutectic solvents, *Int. J. Biol. Macromol.* 80 (2015) 139–148.
- [13] Q. Zhang, Z. Lin, W. Zhang, T. Huang, J. Jiang, Y. Ren, R. Zhang, W. Li, X. Zhang, Q. Tu, Fabrication of green poly (vinyl alcohol) nanofibers using natural deep eutectic solvent for fast-dissolving drug delivery, *RSC Adv.* 11 (2021) 1012–1021.
- [14] A. Ornelas, J. Andrés; González, J. Betzabé; Pérez, Obtención de nanofibras axialmente orientadas PVA-Tetraciclina mediante electrohilado air gap y estudio de la influencia de la microestructura en la liberación in vitro, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2022.
- [15] Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, A. Zou, W. Li, C. Yao, S. Xie, DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles., *AAPS J.* 12 (2010) 263–271. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>.
- [16] V. Saez, E. Hernández, L. López, Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas, *Rev. Iberoam. Polímeros.* 4 (2003).



- [17] 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.
- [18] S. Dumitriu, V. Popa, *Polymeric Biomaterials: Medicinal and Pharmaceutical Applications, Volume 2*, CRC Press, 2013.
- [19] M. Vert, Polyvalent polymeric drug carriers., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2 (1986) 291–327.
- [20] S. Ramakrishna, *An introduction to electrospinning and nanofibers*, World Scientific, 2005.
- [21] J. Fang, H. Niu, T. Lin, X. Wang, *Applications of electrospun nanofibers*, *Chinese Sci. Bull.* 53 (2008) 2265–2286.
- [22] J. Safari, Z. Zarnegar, *Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review*, *J. Saudi Chem. Soc.* 18 (2014) 85–99.
- [23] Y. Zhang, H.F. Chan, K.W. Leong, *Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 104–120.
- [24] S. Kajdič, O. Planinšek, M. Gašperlin, P. Kocbek, *Electrospun nanofibers for customized drug-delivery systems*, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 51 (2019) 672–681.
- [25] C. Ball, K.A. Woodrow, *Electrospun solid dispersions of maraviroc for rapid intravaginal preexposure prophylaxis of HIV*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 4855–4865.
- [26] E.J. Falde, J.D. Freedman, V.L.M. Herrera, S.T. Yohe, Y.L. Colson, M.W. Grinstaff, *Layered superhydrophobic meshes for controlled drug release*, *J. Control. Release.* 214 (2015) 23–29.
- [27] A. Rogina, *Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery*, *Appl. Surf. Sci.* 296 (2014) 221–230.
- [28] F.M. Ballarin, P.R.C. Tornello, G.A. Abraham, *Nanofibras electrohiladas para usos terapéuticos.*, Parte: [Http://Hdl. Handle. Net/10316.2/36860](http://hdl.handle.net/10316.2/36860). (2015).
- [29] Y.Z. Zhang, X. Wang, Y. Feng, J. Li, C.T. Lim, S. Ramakrishna, *Coaxial electrospinning of (fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin)-encapsulated poly (ϵ -caprolactone) nanofibers for sustained release*, *Biomacromolecules.* 7 (2006) 1049–1057.
- [30] Lord Rayleigh, XX. *On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity*, London, Edinburgh, Dublin *Philos. Mag. J. Sci.* 14 (1882) 184–186.
- [31] Y. Zhang, J. Qian, Z. Ke, X. Zhu, H. Bi, K. Nie, *Viscometric study of poly (vinyl chloride)/poly (vinyl acetate) blends in various solvents*, *Eur. Polym. J.* 38 (2002) 333–337.
- [32] W.K. Son, J.H. Youk, T.S. Lee, W.H. Park, *Electrospinning of ultrafine cellulose acetate fibers: studies of a new solvent system and deacetylation of ultrafine cellulose acetate fibers*, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 42 (2004) 5–11.
- [33] M.M. Demir, I. Yilgor, E.E.A. Yilgor, B. Erman, *Electrospinning of polyurethane fibers*, *Polymer (Guildf).* 43 (2002) 3303–3309.
- [34] C.S. Ki, D.H. Baek, K.D. Gang, K.H. Lee, I.C. Um, Y.H. Park, *Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution*, *Polymer (Guildf).* 46 (2005) 5094–5102.
- [35] H. Liu, Y. Hsieh, *Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate*, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 40 (2002) 2119–2129.
- [36] J. Doshi, D.H. Reneker, *Electrospinning process and applications of electrospun fibers*, *J. Electrostat.* 35 (1995) 151–160.
- [37] J.M. Deitzel, W. Kosik, S.H. McKnight, N.C.B. Tan, J.M. DeSimone, S. Crette, *Electrospinning of polymer nanofibers with specific surface chemistry*, *Polymer (Guildf).* 43 (2002) 1025–1029.

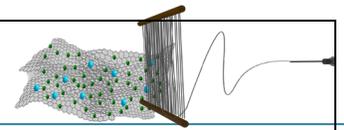


- [38] H. Fong, D.H. Reneker, Elastomeric nanofibers of styrene–butadiene–styrene triblock copolymer, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 37 (1999) 3488–3493.
- [39] A. Calzón Gutiérrez, Desarrollo de un equipo de electrospinning para obtención de nanofibras alineadas de recombinaómeros tipo elastina, (2016).
- [40] H. Matsumoto, A. Tanioka, Functionality in Electrospun Nanofibrous Membranes Based on Fiber's Size, Surface Area, and Molecular Orientation, *Membranes (Basel)*. 1 (2011) 249–264. <https://doi.org/10.3390/membranes1030249>.
- [41] S. V. Fridrikh, J.H. Yu, M.P. Brenner, G.C. Rutledge, Controlling the fiber diameter during electrospinning., *Phys. Rev. Lett.* 90 (2003) 144502. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.90.144502>.
- [42] L.M.D. Sánchez, L. Rodriguez, M. López, Electrospinning: la era de las nanofibras, *Rev. Iberoam. Polímeros*. 14 (2013) 10–27.
- [43] 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.
- [44] D.H. Reneker, I. Chun, Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning, *Nanotechnology*. 7 (1996) 216.
- [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] 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>.
- [47] D. Li, Y. Wang, Y. Xia, Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays, *Nano Lett.* 3 (2003) 1167–1171.
- [48] W.E. Teo, S. Ramakrishna, Electrospun fibre bundle made of aligned nanofibres over two fixed points, *Nanotechnology*. 16 (2005) 1878.
- [49] H. Yan, L. Liu, Z. Zhang, Alignment of electrospun nanofibers using dielectric materials, *Appl. Phys. Lett.* 95 (2009) 143114.
- [50] T. Lei, Z. Xu, X. Cai, L. Xu, D. Sun, New Insight into Gap Electrospinning: Toward Meter-long Aligned Nanofibers, *Langmuir*. 34 (2018) 13788–13793. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03114>.
- [51] E.P.S. Tan, S.Y. Ng, C.T. Lim, Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber, *Biomaterials*. 26 (2005) 1453–1456.
- [52] D. Li, Y. Wang, Y. Xia, Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films, *Adv. Mater.* 16 (2004) 361–366.
- [53] A.J. Robinson, A. Pérez-Nava, S.C. Ali, J.B. González-Campos, J.L. Holloway, E.M. Cosgriff-Hernandez, Comparative analysis of fiber alignment methods in electrospinning, *Matter*. 4 (2021) 821–844.
- [54] A. Allafchian, H. Hosseini, S.M. Ghoreishi, Electrospinning of PVA-carboxymethyl cellulose nanofibers for flufenamic acid drug delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 163 (2020) 1780–1786. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.129>.
- [55] J.H. Yeum, Fabrication of Highly Aligned Poly(Vinyl Alcohol) Nanofibers and its Yarn by Electrospinning, in: S.B. Yang (Ed.), *IntechOpen, Rijeka*, 2016: p. Ch. 3. <https://doi.org/10.5772/65940>.
- [56] 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)

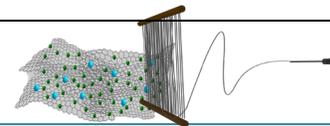


1451–1457.

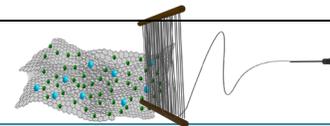
- [57] A.A. Konsta, D. Daoukaki, P. Pissis, K. Vartzeli, Hydration and conductivity studies of polymer–water interactions in polyacrylamide hydrogels, *Solid State Ionics*. 125 (1999) 235–241.
- [58] M. Krumova, D. Lopez, R. Benavente, C. Mijangos, J.M. Perena, Effect of crosslinking on the mechanical and thermal properties of poly (vinyl alcohol), *Polymer (Guildf)*. 41 (2000) 9265–9272.
- [59] 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.
- [60] S. Matsumura, H. Kurita, H. Shimokobe, Anaerobic biodegradability of polyvinyl alcohol, *Biotechnol. Lett.* 15 (1993) 749–754.
- [61] C.M. Hassan, N.A. Peppas, Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods, *Biopolym. PVA Hydrogels, Anionic Polym. Nanocomposites*. (2000) 37–65.
- [62] 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.
- [63] A. Koski, K. Yim, S. Shivkumar, Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning, *Mater. Lett.* 58 (2004) 493–497.
- [64] 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.
- [65] 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).
- [66] 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.
- [67] Y. Bayarski, Antibiotics and Their Types, Uses and Side Effects, Retrieved from [Http//Ezinearticles.Com](http://Ezinearticles.Com). (2006).
- [68] H. Nikaido, Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2003) 593–656.
- [69] T.P. Goodman A, Rall TW, Nies AS, Las bases farmacológicas de la terapéutica., 8a ed., 1993.
- [70] A.E. Jawetz E, Melnick JL, Manual de Microbiología Médica, 12a ed., México, DF, 1988.
- [71] D.M. Arrelucea, Mecanismo de accion de los antibióticos, 2019. https://m.facebook.com/photo.php?fbid=336227993702337&id=126204628038009&set=a.127168221274983&refid=13&__tn__=%2B%3E.
- [72] A.P. Pallett, E.G. Smyth, Clinicians' guide to antibiotics. Tetracycline., *Br. J. Hosp. Med.* 40 (1988) 385–390.
- [73] R. Shahi, M.T. Albuquerque, E. Münchow, S. Blanchard, R. Gregory, M. Bottino, Novel bioactive tetracycline-containing electrospun polymer fibers as a potential antibacterial dental implant coating, *Odontology*. 105 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10266-016-0268-z>.
- [74] A.C. Alavarse, F.W. de Oliveira Silva, J.T. Colque, V.M. da Silva, T. Prieto, E.C. Venancio, J.-J. Bonvent, Tetracycline hydrochloride-loaded electrospun nanofibers mats based on PVA and chitosan for wound dressing, *Mater. Sci. Eng. C.* 77 (2017) 271–281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.199>.



- [75] T. Potrč, S. Baumgartner, R. Roškar, O. Planinšek, Z. Lavrič, J. Kristl, P. Kocbek, Electrospun polycaprolactone nanofibers as a potential oromucosal delivery system for poorly water-soluble drugs, *Eur. J. Pharm. Sci.* 75 (2015) 101–113.
- [76] C.R. Ashworth, R.P. Matthews, T. Welton, P.A. Hunt, Doubly ionic hydrogen bond interactions within the choline chloride–urea deep eutectic solvent, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 18145–18160.
- [77] H.G. Morrison, C.C. Sun, S. Neervannan, Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles, *Int. J. Pharm.* 378 (2009) 136–139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.039>.
- [78] M. Gambino, J.P. Bros, Capacite calorifique de l'uree et de quelques melanges eutectiques a base d'uree entre 30 et 140 C, *Thermochim. Acta.* 127 (1988) 223–236.
- [79] Q. Wen, J.-X. Chen, Y.-L. Tang, J. Wang, Z. Yang, Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents, *Chemosphere.* 132 (2015) 63–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.061>.
- [80] O.S. Hammond, D.T. Bowron, K.J. Edler, Liquid structure of the choline chloride-urea deep eutectic solvent (reline) from neutron diffraction and atomistic modelling, *Green Chem.* 18 (2016) 2736–2744. <https://doi.org/10.1039/C5GC02914G>.
- [81] A. Orozco Alcaraz, Y. González Campos, J. Pérez Nava, Implementación del Sistema Colector air gap para la Obtención de Nanofibras con Orientación Axial Inducida Mediante Electrohilado, 2021.
- [82] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures, *Chem. Commun.* (2003) 70–71. <https://doi.org/10.1039/B210714G>.
- [83] S. Megelski, J.S. Stephens, D.B. Chase, J.F. Rabolt, Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers, *Macromolecules.* 35 (2002) 8456–8466. <https://doi.org/10.1021/ma020444a>.
- [84] K. Garg, G.L. Bowlin, Electrospinning jets and nanofibrous structures., *Biomicrofluidics.* 5 (2011) 13403. <https://doi.org/10.1063/1.3567097>.
- [85] 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.
- [86] C. Andrade, Understanding the Difference Between Standard Deviation and Standard Error of the Mean, and Knowing When to Use Which, *Indian J. Psychol. Med.* 42 (2020) 409–410. <https://doi.org/10.1177/0253717620933419>.
- [87] P. Macaskill, Standard deviation and standard error: interpretation, usage and reporting., *Med. J. Aust.* 208 (2018) 63–64. <https://doi.org/10.5694/mja17.00633>.
- [88] F. Yang, C.Y. Xu, M. Kotaki, S. Wang, S. Ramakrishna, Characterization of neural stem cells on electrospun poly(L-lactic acid) nanofibrous scaffold, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15 (2004) 1483–1497. <https://doi.org/10.1163/1568562042459733>.
- [89] M.E. Gomes, H.L. Holtorf, R.L. Reis, A.G. Mikos, Influence of the porosity of starch-based fiber mesh scaffolds on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured in a flow perfusion bioreactor., *Tissue Eng.* 12 (2006) 801–809. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.801>.
- [90] A. Nozariasbmarz, L. Tayebi, D. Vashae, M. Mozafari, Current Opinion in Tissue Engineering Microscopy Techniques, in: 2012.
- [91] A.S. Asran, K. Razghandi, N. Aggarwal, G.H. Michler, T. Groth, Nanofibers from blends of polyvinyl alcohol and polyhydroxy butyrate as potential scaffold material for tissue engineering of skin., *Biomacromolecules.* 11 (2010) 3413–3421. <https://doi.org/10.1021/bm100912v>.

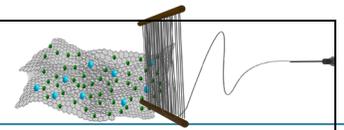


- [92] M. Trivedi, S. Patil, H. Shettigar, K. Bairwa, S. Jana, Spectroscopic Characterization of Chloramphenicol and Tetracycline: An Impact of Biofield Treatment, *Pharm. Anal. Acta.* 6 (2015). <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000395>.
- [93] K. Mulia, E. Krisanti, F. Terahadi, S. Putri, Selected Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of α -Mangostin from Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Pericarp, *Int. J. Technol.* Vol 6, No 7. (2015). <http://ijtech.eng.ui.ac.id/old/index.php/journal/article/view/1984>.
- [94] E.A. Bursali, S. Coskun, M. Kizil, M. Yurdakoc, Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activities of boron/starch/polyvinyl alcohol hydrogels, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 1377–1383. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.056>.
- [95] N. Delgado-Mellado, M. Larriba, P. Navarro, V. Rigual, M. Ayuso, J. García, F. Rodríguez, Thermal stability of choline chloride deep eutectic solvents by TGA/FTIR-ATR analysis, *J. Mol. Liq.* 260 (2018) 37–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.076>.
- [96] R. Geethanjali, S. Subhashini, Functionalization of PVA to synthesize p-vinyl benzene sulfonate terpolymers – a comparative study of anticorrosion, adsorption and activation properties of the terpolymers on mild steel in 1 M HCl, *RSC Adv.* 6 (2016) 100748–100758. <https://doi.org/10.1039/C6RA19336F>.
- [97] S.W. Kuo, F.C. Chang, Miscibility and Hydrogen Bonding in Blends of Poly(vinylphenol-co-methyl methacrylate) with Poly(ethylene oxide), *Macromolecules.* 34 (2001) 4089–4097. <https://doi.org/10.1021/ma010047k>.
- [98] X. Li, C. Wang, S. Yang, P. Liu, B. Zhang, Electrospun PCL/mupirocin and chitosan/lidocaine hydrochloride multifunctional double layer nanofibrous scaffolds for wound dressing applications., *Int. J. Nanomedicine.* 13 (2018) 5287–5299. <https://doi.org/10.2147/IJN.S177256>.
- [99] B.B. Hansen, S. Spittle, B. Chen, D. Poe, Y. Zhang, J.M. Klein, A. Horton, L. Adhikari, T. Zelovich, B.W. Doherty, B. Gurkan, E.J. Maginn, A. Ragauskas, M. Dadmun, T.A. Zawodzinski, G.A. Baker, M.E. Tuckerman, R.F. Savinell, J.R. Sangoro, Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications., *Chem. Rev.* 121 (2021) 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>.
- [100] L. Gontrani, M. Bonomo, N. V Plechkova, D. Dini, R. Caminiti, X-Ray structure and ionic conductivity studies of anhydrous and hydrated choline chloride and oxalic acid deep eutectic solvents, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20 (2018) 30120–30124. <https://doi.org/10.1039/C8CP06728G>.
- [101] C.M. Klech, A.P. Simonelli, Examination of the moving boundaries associated with non-fickian water swelling of glassy gelatin beads: Effect of solution pH, *J. Memb. Sci.* 43 (1989) 87–101. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)82355-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)82355-8).
- [102] H. Itoh, Y. Li, K.H.K. Chan, M. Kotaki, Morphology and mechanical properties of PVA nanofibers spun by free surface electrospinning, *Polym. Bull.* 73 (2016) 2761–2777. <https://doi.org/10.1007/s00289-016-1620-8>.
- [103] I. Rezaei, A. Sadeghi, Investigating the Mechanical Properties of Polyvinyl Alcohol Nanofibers Based on Aligned and Random Orientations, *Arab. J. Sci. Eng.* 46 (2021) 12479–12486. <https://doi.org/10.1007/s13369-021-06016-5>.
- [104] E. Uslu, M. Gavgali, M.O. Erdal, Ş. Yazman, L. Gemi, Determination of mechanical properties of polymer matrix composites reinforced with electrospinning N66, PAN, PVA and PVC nanofibers: A comparative study, *Mater. Today Commun.* 26 (2021) 101939. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101939>.
- [105] J. Yao, C.W.M. Bastiaansen, T. Peijs, High Strength and High Modulus Electrospun Nanofibers, *Fibers.* 2 (2014) 158–186. <https://doi.org/10.3390/fib2020158>.
- [106] N.H.A. Ngadiman, N. Mohd Yusof, A. Idris, A. Shakir, D. Kurniawan, Influence of Polyvinyl Alcohol Molecular Weight on the Electrospun Nanofiber Mechanical Properties, *Procedia Manuf.* 2 (2015)

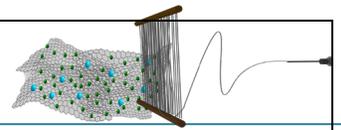


568–572. <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2015.07.098>.

- [107] 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.
- [108] 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.
- [109] N.F. Gajardo-Parra, V.P. Cotroneo-Figueroa, P. Aravena, V. Vesovic, R.I. Canales, Viscosity of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents: Experiments and Modeling, *J. Chem. Eng. Data.* 65 (2020) 5581–5592. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.0c00715>.
- [110] W. Deng, X. Mei, Z. Cheng, T. gan, X. Tian, J. Hu, C. Zang, B. Sun, J. Wu, Y. Deng, R.A. Ghiladi, G.H. Lorimer, G. Keceli, J. Wang, Extraction of weak hydrophobic sulforaphane from broccoli by salting-out assisted hydrophobic deep eutectic solvent extraction, *Food Chem.* 405 (2023) 134817. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134817>.
- [111] S. Sundaresan, C.K. Hall, Mathematical modelling of diffusion and reaction in blocked zeolite catalysts, *Chem. Eng. Sci.* 41 (1986) 1631–1645. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-2509\(86\)85242-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-2509(86)85242-3).
- [112] M. Jafari, B. Kaffashi, Mathematical Kinetic Modeling on Isoniazid Release from Dex-HEMA-PNIPAAm Nanogels, in: 2016.
- [113] S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems., *Acta Pol. Pharm.* 67 (2010) 217–223.
- [114] E. Adams, D. Coomans, J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart, Non-linear mixed effects models for the evaluation of dissolution profiles., *Int. J. Pharm.* 240 (2002) 37–53. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00127-8](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00127-8).
- [115] L. Ahmed, R. Atif, T. Eldeen, I. Yahya, A. Omara, M. Eltayeb, Study the Using of Nanoparticles as Drug Delivery System Based on Mathematical Models for Controlled Release, 8 (2019) 52–56.
- [116] R.B. Baggi, N.B. Kilaru, Calculation of Predominant Drug Release Mechanism Using Peppas-Sahlin Model, Part-I (Substitution Method): A Linear Regression Approach, *Asian J. Pharm. Technol.* 6 (2016) 223–230.
- [117] S. Khamanga, N. Paterson, T. Nyamuzhiwa, H. Haidula, R. Walker, The Evaluation of Eudragit Microcapsules Manufactured by Solvent Evaporation Using USP Apparatus 1, *Dissolution Technol.* 16 (2009). <https://doi.org/10.14227/DT160109P15>.
- [118] N.A. Peppas, Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers., *Pharm. Acta Helv.* 60 (1985) 110–111.
- [119] T.F. Freire, T. Quinaz, A. Fertuzinhos, N.T. Quyen, M.F.S.M. de Moura, M. Martins, A. Zille, N. Dourado, Thermal, Mechanical and Chemical Analysis of Poly(vinyl alcohol) Multifilament and Braided Yarns., *Polymers (Basel).* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13213644>.
- [120] C. Tsiptsias, D. Fardis, X. Ntampou, I. Tsvintzelis, C. Panayiotou, Thermal Behavior of Poly(vinyl alcohol) in the Form of Physically Crosslinked Film., *Polymers (Basel).* 15 (2023). <https://doi.org/10.3390/polym15081843>.
- [121] E. cercenado, J. Saavedra-Lozano, El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I), *An. Pediatría Contin.* 7 (2009) 214–217. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(09\)71927-4](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(09)71927-4).
- [122] 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.



- [123] A. Sharma, D. Kumar Arya, M. Dua, G.S. Chhatwal, A.K. Johri, Nano-technology for targeted drug delivery to combat antibiotic resistance., *Expert Opin. Drug Deliv.* 9 (2012) 1325–1332. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.717927>.
- [124] Stephen, J.C. . . [et Al.], *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*, 2005. <https://paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>.
- [125] H.F.L. Wertheim, M.C. Vos, A. Ott, A. van Belkum, A. Voss, J.A.J.W. Kluytmans, P.H.J. van Keulen, C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, M.H.M. Meester, H.A. Verbrugh, Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers, *Lancet.* 364 (2004) 703–705. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16897-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16897-9).
- [126] J.L. Lister, A.R. Horswill, *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal., *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4 (2014) 178. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00178>.
- [127] O.M. El-Halfawy, M.A. Valvano, Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity., *Clin. Microbiol. Rev.* 28 (2015) 191–207. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-14>.
- [128] Y. Liang, M.B. Denton, R.B. Bates, Stability studies of tetracycline in methanol solution, *J. Chromatogr. A.* 827 (1998) 45–55. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00755-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00755-9).
- [129] E. Arroyave, J. Uribe-BuriticÃ', S. Granados-Acevedo, L.A. Gutierrez, L.M. Arismendi, J.L.V. Arboleda, A.F. LondoÃ'pmo, Aislamiento e identificaciÃ'\textthreesuperiorn de bacterias con potencial nosocomial procedentes de ambientes y superficies de una clÃ'\nica veterinaria Universitaria del Ã'rea Metropolitana del Valle de AburrÃ', Antioquia-Colombia, *Infectio.* 23 (2019) 227–233. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922019000300227&nrm=iso.
- [130] R.N. Jones, M.G. Stilwell, M.L. Wilson, R.E. Mendes, Contemporary tetracycline susceptibility testing: doxycycline MIC methods and interpretive criteria (CLSI and EUCAST) performance when testing Gram-positive pathogens., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76 (2013) 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.023>.
- [131] A.C. González, B. Nieves, M. Solórzano, J. Cruz, J. Puig, M. Moreno, Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos , *Rev. Chil. Infectología .* 30 (2013) 374–380.
- [132] J. Rodríguez, García, R. Cantón, E. García, Sánchez, Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, Madrid, 2000. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>.
- [133] UNE-EN ISO 10993-1:2021. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 1: Evaluación y ensayos mediante un proceso de gestión del riesgo. (ISO 10993-1:2018, incluyendo versión corregida 2018-10)., (2021). <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0067302>.
- [134] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [135] H.K. Shaikh, R. Kshirsagar, S.G. Patil, MATHEMATICAL MODELS FOR DRUG RELEASE CHARACTERIZATION: A REVIEW, in: 2015.
- [136] E. Brunner, Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen, *47U* (1904) 56–102. <https://doi.org/doi:10.1515/zpch-1904-4705>.
- [137] T. Higuchi, Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *J. Pharm. Sci.* 52 (1963) 1145–1149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.2600521210>.



- [138] J. Siepmann, N.A. Peppas, Mathematical modeling of controlled drug delivery., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48 (2001) 137–138. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00111-9](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00111-9).
- [139] A.W. Hixson, J.H. Crowell, Dependence of Reaction Velocity upon Surface and Agitation, *Ind. Eng. Chem.* 23 (1931) 1160–1168. <https://doi.org/10.1021/ie50262a025>.
- [140] S. Chen, J. Zhu, J. Cheng, Preparation and in vitro evaluation of a novel combined multiparticulate delayed-onset sustained-release formulation of diltiazem hydrochloride., *Pharmazie.* 62 (2007) 907–913.
- [141] N.A. Peppas, J.J. Sahlin, A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation, *Int. J. Pharm.* 57 (1989) 169–172. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90306-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90306-2).
- [142] M. Kopcha, N.G. Lordi, K.J. Tojo, Evaluation of release from selected thermosoftening vehicles., *J. Pharm. Pharmacol.* 43 (1991) 382–387. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb03493.x>.