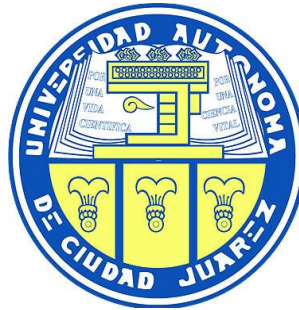


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ
INSTITUTO DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FÍSICA Y MATEMÁTICA



**“DESARROLLO DE UN BIOMATERIAL A BASE DE
NANOFIBRAS DE PCL CON MICROESFERAS DE PCL/PVA
PARA LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS POR LA TÉCNICA DEL
ELECTROHILADO”**

TESIS

**Para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS MATERIALES**

Presenta:

L.Q. RENÉ GERARDO ESCOBEDO GONZÁLEZ

Cd. Juárez, Chih., México

Octubre 2012

18 de Octubre del 2012

DR. JOSÉ TRINIDAD ELIZALDE GALINDO
COORDINADOR DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LOS MATERIALES
PRESENTE.-

Los que suscribimos, integrantes del Comité Tutorial nombrado para dar seguimiento y examinar el manuscrito de la Tesis titulada:

“Desarrollo de un biomaterial a base de nanofibras de PCL con microesferas de PCL/PVA para la liberación de proteína por la técnica de electrohilado”

que presenta el (la) candidato(a) al Grado de Maestro en Ciencias de los Materiales,

L.Q. René Gerardo Escobedo González

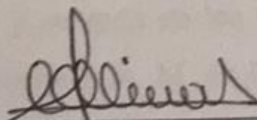
reunidos para tal efecto, después de intercambiar opiniones manifestamos nuestra aceptación a dicho trabajo en virtud de que satisface los requerimientos necesarios para su presentación y defensa, ya que se han realizado las correcciones que cada uno en particular consideró pertinentes.

Atentamente

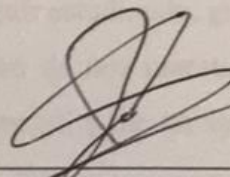
“EL COMITE TUTORIAL DE TESIS”



Dr. Perla E. García Casillas
Presidente



Dr. Imelda Olivas Armendariz
Secretario



Dr. Javier Castro Carmona
Vocal

c.c. Jefe del departamento de Física y Matemáticas

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a Dios por permitirme concluir este trabajo y etapa de mi formación académica, así como todas las experiencias que me permitió tener durante este tiempo que muchas todavía no entiendo, pero que me han ayudado a crecer.

De igual forma quiero agradecer a mi esposa Teresa Cordero y a mi hija Paloma Ximena por el esfuerzo desmedido así como el sacrificio que para ellas conllevo el estar conmigo durante los dos años de formación en la maestría, tolerar el tiempo que no les dedique así como las cosas que deje de hacer para terminar este trabajo. Agradezco también a mis suegros el señor Rosalio Cordero Hernández y la Señora María Guadalupe Cisneros que estuvieron pendientes de nuestra familia durante estos dos años de trabajo. Finalmente de mi familia quiero agradecer a mis abuelos que siempre han sido un pilar muy importante en mi vida y a los cuales les debo en gran medida lo que soy. Así también agradecer a mis padres por el apoyo que en sus respectivos momentos me dieron y que me permitieron seguir adelante preparándome y que me han servido en diversas ocasiones.

En el ámbito académico quiero agradecer a todas las personas que han colaborado en mi formación, que me han compartido sus conocimientos y experiencias, a todo el cuerpo académico de la maestría en ciencias de los materiales, en especial a mi asesor el Dr. Carlos Martínez por permitirme trabajar con él, brindarme su apoyo y libertad para poder desarrollar el proyecto. También, al Dr. Emilio Álvarez Parrilla y la Dra. Laura De la Rosa que desde la licenciatura han estado apoyándome cuando lo he necesitado, y que han sido una parte muy importante e mi desarrollo profesional. Además de las personas antes citadas quisiera agradecer también al Ing. Carlos Villar Nava por que gracias a él me encause en el área de las ciencias química y que siempre me ha motivo a seguir estudiando, gracias por su cariño y su guía en los momentos difíciles. Finalmente dentro de mis maestros quisiera agradecerle a la M. en C. Katya Carrasco porque ha creído en mí y me ha ayudado en la medida de lo posible.

Por ultimo quisiera agradecer a mis amigos que están ahí cuando se requiere.

Gracias de antemano a todos.

RESUMEN

La policaprolactona (PCL) es un polímero sintético alifático semicristalino, que posee una alta biocompatibilidad, una lenta biodegradabilidad, alta permeación de fármacos y propiedades mecánicas aplicables a los diferentes tejidos del organismo. Estas razones le han llevado a ser un polímero empleado en distintas formulaciones tanto para liberación controlada de fármacos así como ingeniería de tejidos. Dos de las aplicaciones que posee este material es la generación de microesferas con capacidad de liberación de fármacos así como la generación de fibras para soportes celulares por la técnica de electrohilado.

El presente trabajo tiene como finalidad el combinar la capacidad de liberación de proteínas y el uso como soporte celular al realizar electrohilado de soluciones de PCL, mezcladas con microesferas de Insulina recubiertas con PCL y alcohol polivinílico. Los resultados de la síntesis de las microesferas permitieron obtener una eficiencia de síntesis del 80% y una eficacia de encapsulación del 45.9%. El proceso de electrohilado de la PCL con las microesferas se realizó en concentraciones de 0,1,2 y 5% de microesferas, obteniéndose los siguientes diámetros promedio de fibras de 578 ± 252.8 nm, 583.3 ± 279 nm y 719.1 ± 184 nm respectivamente para cada concentración usando como solvente una solución acuosa de ácido acético al 90%.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
CAPITULO I.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	7
1.3 Justificación	7
1.4 Objetivo general.....	8
3.1.2. 1.4.1 Objetivos específicos.....	9
1.5 Metas y Actividades.....	9
1.6 Hipótesis	9
CAPITULO II. Marco teórico	10
2.1 Ingeniería de tejidos y los soportes celulares.....	10
2.2. La Poli(ε-caprolactona)	12
2.3. Microesferas como sistemas de liberación controlada de fármacos en base a la Poli-ε-caprolactona.....	12
2.4. Electro hilado como técnica de preparación de nanoestructuras de una dimensión	
CAPITULO III. Metodología.....	16
3.1. Preparación del biomaterial.	16
3.1.1 Determinación de las condiciones óptimas del electrohilado.....	16
3.1.3. Síntesis de las microesferas cargadas con proteínas por emulsión W/O/W ...	17
3.1.3 Eficiencia de encapsulación.....	17
3.1.4. Preparación de las soluciones de electrohilado y su procesamiento.	18
3.2. Caracterización del material	18
3.2.1. Espectroscopia de FTIR.....	18
3.2.2. Caracterización morfológica	18
3.2.3. Caracterización térmica	19
3.3. Estudios de liberación de las microesferas y de las fibras cargadas con Proteína. 19	
CAPITULO IV. Resultados y Discusión.....	20
4.1 Preparación y caracterización del material	20
4.1.1 Determinación de las condiciones óptimas para el electrohilado.....	20

4.1.2.	Síntesis de las microesferas cargadas con proteínas.....	23
4.1.3.	Eficiencia de encapsulamiento	28
4.1.4.	Soluciones de electrohilado y su procesamiento.	29
4.1.5.	Caracterización térmica	34
4.2	Estudios de liberación controlada de una proteína.	38
CAPITULO V. Conclusiones y recomendaciones		42
5.1	Conclusiones	42
5.2	Recomendaciones	43
REFERENCIAS		44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Proceso de optimización del electrohilado. En la tabla se muestran los parámetros variados, los tamaños de fibra y el material no fibroso obtenido.	20
Tabla 4.2. Análisis de varianza del tamaño de fibras	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Estructura de la ϵ -caprolactona y la pol- ϵ -caprolactona	12
Figura 4.1. Micrografía del material depositado PCL 12%, 10kV y 8cm.	23
Figura 4.2. Espectros de absorción en el infrarrojo: Policaprolactona, alcohol Polivinilico y las micro partículas resultantes.	24
Figura 4.3. Micrografías del microscopio electrónico de barrido tomadas a las micropartículas obtenidas. En la parte superior se muestran una vista a 350X de las muestras analizadas. En la parte inferior se muestran las morfologías de las esferas.	25
Figura 4.6. Curva de calibración. Esta curva fue utilizada para la determinación del porcentaje de encapsulamiento.	28
Figura 4.7 Espectros IR de las fibras. Se muestran los espectros de los materiales obtenidos con 0, 1, 2 y 5% de microesferas.	29
Figura 4.8. Micrografía electrónica a 1000x de las fibras de policaprolactona 12% con: a) 0% b) 1% , c) 2% , d) 5% de micropartículas en la solución de electrohilado.	30
Figura 4.9. Micrografías a 7000 x y distribución de tamaño de fibras para las muestras: a) 0%, b) 1%, c) 2% y d) 5% microesferas (4000x).	32
Figura 4.11. Análisis termogravimétrico de las muestras: micropartículas (mm), Fibras sin micropartículas (m0%), Fibras con 1% de micropartículas (m1%), Fibras con 2% de micropartículas (m2%).	34
Figura 4.12. Análisis de primera derivada. En la grafica se pueden apreciar los resultados de la derivación de las curvas termogravimétrico de los diferentes tratamientos.	35
Figura 4.13. Termograma DSC para los materiales obtenidos: microesferas (me), Fibras de policaprolactona (0%), Fibras con 1% de microesferas (1%) y fibras de policaprolactona (2%)	37
Figura 4.14. Estudio cinético de la liberación de proteína apartar de las microesferas	39
Figura 4.15. Perfiles de liberación de proteína para las fibras con 1,2 y 5% de microesferas respectivamente	40

CAPITULO I.

1.1 Antecedentes

La ingeniería tisular es una ciencia que se ha desarrollado recientemente y cuya finalidad es llevar a cabo el reemplazo y/o regeneración de un tejido dañado en un organismo vivo por un tejido nuevo generado en el mismo. Para que la regeneración se lleve a cabo es necesario que las células del tejido a regenerar se encuentren en un medio mimético al que de manera normal se encuentran, es decir, requieren de moléculas señalizadoras además de una matriz extracelular (EMC) en la cual desarrollarse, organizarse y crecer (Jayakumar R. y col., 2011) (Kim B. y Col., 2010).

Las matrices extracelulares utilizadas en la regeneración de tejido pueden ser de dos tipos, el primer tipo consiste en sustancias poliméricas de origen natural; tales como la gelatina, la quitina, el ácido hialurónico. El segundo grupo está conformado por polímeros sintéticos como el nylon, el poliestireno, etc. (Kim B., Park I., Jiang H., Choi Y., & Akaike T., 2010). En el caso de la reconstrucción de tejido epitelial dentro de los polímeros naturales se ha recurrido comúnmente al uso de colágeno y glucosaminoglucanos (Jayakumar R. y Col., 2011).

La policaprolactona es un poliéster sintético biodegradable usado comúnmente en un gran número de aplicaciones biomédicas (Wang Y., y Col., 2005); dentro de las cuales destacan la generación de nanopartículas, microesferas, implantes, películas, nanofibras, compositos hidrogel, miscelas y finalmente como soportes celulares (Dash K.P., Badireenath Konkimalla V., 2012).

Las aplicaciones de la policaprolactona en el campo de la ingeniería tisular y de la biomedicina se deben a sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, además de no ser tóxica y resultar citocompatible con una gran variedad de tejidos corporales, aunado además a sus excelentes propiedades mecánicas (Dash K.P., Badireenath Konkimalla V., 2012). Otra propiedad importante que atrae la atención de los investigadores hacia este polímero es su compatibilidad y permeabilidad hacia un gran número de fármacos y moléculas activas (Mukerjee A., Sinha V.R., Pruthi V., 2007).

La policaprolactona en su forma natural (Williamson M.R, Coombes A.G., 2004), modificada químicamente (Ghasemi-Mobarakeha L., 2010) o mediante su uso en compositos (She H., Xiao

X., Liu R., 2007), ha sido altamente utilizada para el desarrollo de diversos biomateriales así como matriz extracelular artificial (o scaffold, término utilizado en el idioma inglés para describir materiales que son utilizados como soporte para desarrollo celular) (Dash K.P, Badireenath Konkimalla V., 2012), sin embargo la necesidad de que esta matriz no solo brinde soporte sino que proporcione actividad biológica, ha conllevado a que a la ϵ -policaprolactona se le adicionen agentes antimicrobianos (Ragaseema V., Rosemary M., Nandkumar M., Krishnan K., & Krishnan L.K., 2009), moléculas de reconocimiento (Andukuri A., Kushwaha M., Tambralli A., Anderson J.M., & Dean D., 2011), factores de crecimiento entre otras (Kim M.S., Lee J.H., Joo Kim S., & Shin H., 2011).

Williamson M. y Combees A. en el 2004 hicieron uso de la policaprolactona sin modificar para obtener materiales fibrilares que pudiesen servir para la ingeniería de tejidos. La producción de estos materiales fue mediante una técnica conocida como hilado a gravedad. En este trabajo pudieron observar que la resistencia a la deformación, así como la rigidez de las fibras obtenidas dependía de manera proporcional de la concentración de la solución empleada en su preparación .

La aplicación de un esfuerzo de deformación del 500% en frío, permitió darle al material una mayor resistencia y rigidez. La topografía del material fue modificada dándole una direccionalidad a las fibras así como un patrón ranurado. Al material se le hicieron pruebas de adhesión in vitro para lo cual se incubó este en presencia de mioblastos y fibroblastos, comparándolo con un material plástico para cultivo tisular (TCP) como control. Los resultados mostraron que a los 5 días existía de 1.5 a 2 veces más fibroblastos en el TCP que en la policaprolactona mientras que la relación en los mioblastos fue de 1.5 veces (Williamson M.R, Coombes A.G., 2004).

En el 2007 Heng S. y colaboradores llevaron a cabo la preparación de un soporte celular poroso de policaprolactona con la finalidad de evaluar el efecto que tenía el tamaño de poro sobre las células y las interacciones de este con el tejido. El soporte se preparó mediante la centrifugación axial a 3000 rpm de fibras de policaprolactona en un molde cilíndrico y posteriormente un tratamiento térmico para lograr el conformado final. Los resultados de sus estudios mostraron un incremento en el tamaño de poro (de 88 a 405 μm) y a su vez de la porosidad (de 80 hasta 90%). La evaluación de la proliferación celular y la interacción con el tejido mostraron que el tamaño

de poro podía favorecer el desarrollo de un tipo específico y que además tenía una buena interacción con el tejido formado (Heang Oha S., Kyu Parka Il., Man Kimb J., & Ho Lee J., 2007).

Otro trabajo en el cual la policaprolactona ha sido usada para la preparación de matrices extracelulares sintéticas fue el trabajo realizado por Geun Hyung Kim and Joon Gon Son en el 2009 en el cual utilizando un bioplotter (biomaquinador) tridimensional efectuaron la preparación de un soporte celular con propiedades mecánicas y porosidad mimético a lo de los órganos humanos usando un piezoeléctrico como fuente de vibración eléctrica. Los resultados demostraron que el material preparado por acción del piezoeléctrico exhibió mayor interacción celular que la presentada por materiales preparados mediante el método tradicional (Hyung Kim G. & Gon Son J., 2009).

En la actualidad existen diversas técnicas para la preparación del soporte celular, las cuales generan diferentes morfologías así como tamaños y grados de porosidad. Sin embargo algunas de ellas presentan la dificultad de poder controlar, desde los parámetros de operación. Las características del soporte. El electrohilado tiene la ventaja sobre otros métodos que la composición de los materiales, el proceso de fabricación, el diámetro de las fibras, la morfología y la porosidad pueden ser manipulados desde los parámetros de operación (Liang D., Hsiao B.S ,Chu B., 2007) .

El electrohilado ha sido una técnica recurrente para la conformación de policaprolactona, tal como es el caso del trabajo publicado por Pant H. y colaboradores en el 2011, los cuales llevaron acabo la preparación de fibras altamente porosas de policaprolactona y de metoxipolietilenglicol (MPEG), así como la mezcla de las dos, a partir de una variante de la técnica de electrohilado usando un baño de agua. Los resultados mostraron que el tamaño de la fibra variaban según la relación de los dos polímeros en la mezcla, además de mantenerse la cristalinidad de la policaprolactona.

Los estudios referentes a la citotoxicidad mostraron la presencia de trazas de policarbonato, aunque este no es tóxico. La viabilidad celular en presencia de osteoblastos mostraron que las células sembradas en el material poroso poseían mayor viabilidad que las células sembradas en un material no poroso (Panta H., et al., 2011).

La policaprolactona ha sido mezclada, conjugada y modificada químicamente con diversos polímeros y moléculas de señalización para mejorar sus propiedades de biodegradación, así como para brindarle bioactividad. Un ejemplo de los trabajos realizados de mezclas de policaprolactona con otros polímeros es el realizado por Houde She y colaboradores en el 2007, los cuales mezclaron la poli (ϵ -caprolactona) (PCL) con quitosana (Cs) para la preparación de un soporte poroso a partir del método freeze-drying, con un contenido de quitosana de 5, 10, 15 y 20%. Los resultados de la caracterización fisicoquímica mostraron una completa unión entre los dos componentes de la mezcla, en la cual la cristalinidad de la PCL no se vio afectada, sin mostrar indicios de una separación de fase y una sola morfología. Además de que, la porosidad fue proporcional al contenido de quitosana, teniendo un valor de 92% cuando la quitosana se encontraba con una concentración del 20% (Houde S., Xiufeng X., & Rongfang L., 2007).

La técnica de electrohilado ha servido para generar soportes celulares fibrosos con bioactividad a partir de la policaprolactona, la mezcla con otros polímeros y sus conjugados. En 2011 M. Zhang y colaboradores realizaron la preparación de un material fibroso a partir de una solución al 10% de PCL utilizando como solvente diclorometano/N,N-Dimetilformamida (80:20) por la técnica de electrohilado realizándolo con el método de conformado el electrohilado; obteniendo como resultados fibras que van desde los 500 a los 1500 nm. Dicho material se incubó en presencia de la proteína hidrofóbica con la finalidad que esta se adsorbiera en la superficie y modificar el carácter hidrófobo de la misma. El grupo de trabajo evaluó la citocompatibilidad y la hemotoxicidad observando una buena citocompatibilidad así como ausencia de trombosis, hiperplasia. La parte final del trabajo conllevó la adsorción del anticuerpo antiCD31 logrando así la adhesión de células endoteliales (Zhang M., et al., 2011).

El electrohilado ha permitido a la vez generar materiales útiles en el área de los injertos vasculares, un trabajo relacionado a este tema es el de Wise S. y colaboradores en el 2011, en este trabajo efectuaron la preparación de injertos vasculares sintéticos con diámetros pequeños a partir de tropoelastina humana recombinante y policaprolactona. Como resultado se observó un aumento en la adhesión celular y la proliferación de células endoteliales de un $54.7 \pm 1.1\%$ en tres días con respecto al control, además de un leve efecto trombogénico cuando la tropoelastina es entrecruzada (Wise S., et al., 2011).

El estudio de los soportes celulares con actividad biológica no solo se ha limitado a la conjugación con biomoléculas como se ha mencionado anteriormente; sino que también se ha buscado que los materiales utilizados como soporte tengan capacidad de liberación controlada de fármacos (Prabharana M., Jayakumar R., 2009).

Gyoung Kim T y colaboradores en el 2007, llevaron acabo la preparación de un material fibroso con la capacidad de liberación controlada de proteínas. En dicho trabajo se efectuó el electrohilado de una mezcla de policaprolactona/ oxido de polietileno (PEO)/ lisozima con la finalidad de obtener un material fibroso con capacidad de liberar de manera controlada la proteína. En este mismo estudio se probaron además polímeros como el ácido poliláctico (PLLA) y el acido polilactil-co-glicoilico (PLGA) en lugar de la policaprolactona. Como resultado se obtuvieron fibras con tamaño promedio de 1.43 μm para la mezcla PEO/PLLA, 1.02 μm para la mezcla PO/PCL y 0.99 μm para la mezcla PEO/PLGA. De las fibras obtenidas la que mejor morfología y estabilidad presentó al ser incubada fue la PCL/PEO, además de que presento la liberación controlada de la lisozima, alcanzando en una semana el 40% de proteína liberada manteniendo un 90% de actividad catalítica (Gyoung Kim T., Sung Lee D., & Gwan Park T., 2007).

Luong-Van E. y colaboradores en el 2006 prepararon por el método del electrohilado un material fibroso de policaprolactona (8% en diclorometano/metanol 70:30) cargado con heparina en proporciones de 0.5 y 0.05%. Los resultados del trabajo mostraron que las fibras obtenidas tuvieron una morfología homogénea, sin la presencia de material nodular que no formara fibras, observándose además que el tamaño de las fibras decrecía al aumentar la concentración de heparina en el material. La distribución de la heparina fue determinada por marcaje fluorescente mostrando una distribución homogénea de la misma en todo el material.

Los ensayos de liberación de la heparina presente en el material mostraron que aproximadamente la mitad de la heparina presente en el material se difundió en un tiempo aproximado a 14 días, mostrando ser útil como un sistema de liberación controlada. Los ensayos celulares in vitro revelaron que las fibras no generaron respuesta inflamatoria por parte de los macrófagos, además de que la liberación de heparina sirvió como inhibidor de la proliferación de células de músculo liso (Luong-Vana E., et al., 2006).

La policaprolactona tiene la característica de poseer una alta permeabilidad ante los fármacos y otras moléculas activas, siendo por lo tanto, no solo utilizado para la preparación de soportes, sino que también es utilizado en diversas formulaciones como agente de liberación de fármacos a través de nano y microsferas (Dash K.P, Badireenath Konkimalla V., 2012).

Las nano y microsferas han sido altamente estudiadas como sistema de acarreamiento de fármacos y aplicada en una serie de formulaciones farmacéuticas parenteral. Entre los trabajos desarrollados se destaca, el presentado por Christiane Damgé, Philippe Maincent y Nathalie Ubrich en el 2007, el cual consistió en la elaboración de un sistema oral de liberación de insulina a base de nanopartículas constituidas de policaprolactona, el polímero aniónico Eudragit y alcohol polivinílico (Dangé C., Maincent P., & Ubrich N., 2007). Los resultados obtenidos mostraron nanopartículas con un tamaño promedio de 358 nm y una eficiencia de encapsulamiento de 96%. En los estudios in vivo con ratas, se pudo apreciar una disminución de la glicemia proporcional a la aplicación (25, 50 y 100 U/kg), esto aunado a un aumento en el contenido de insulina en el suero por un periodo de tiempo prolongado. Además se observó un efecto de mucoadhesión a nivel intestinal de las micropartículas.

El uso de microsferas de policaprolactona como sistema de acarreamiento de sustancias activas también han sido altamente estudiadas. Mukerjee A. y colaboradores en el 2007, en este trabajo se efectuó la síntesis de microsferas compuestas de policaprolactona y recubiertas con alcohol polivinílico (PVA) o hidroxil propilmetil celulosa (HPMC), usando para su preparación un sistema Agua-aceite-Agua. Como resultados se obtuvieron para la fase de hidroxil propilmetil celulosa microsferas de tamaños promedios entre 28 y 43 mm, rendimientos alrededor del 90% y un porcentaje de encapsulamiento que va del 30 al 50%. En el caso en el que la fase externa era alcohol polivinílico se obtuvieron partículas con tamaños desde los 30 a los 40 micrometros, rendimientos de 80 a 90% y una eficiencia en el encapsulamiento del 40%.

La morfología de las microsferas resulto diferente según la capa externa. En las partículas que tenían HPCM la superficie se presento homogénea, mientras con el PVA se presentaron algunas irregularidades e incluso falta de polímero. Los perfiles de liberación realizados a las macropartículas mostraron que a las 12 horas todas las muestras alcanzaron aproximadamente el 60% de proteína liberada (Mukerjee A., Sinha V.R., & Pruthi V., 2007).

Las microesferas producidas a partir de policaprolactona también han sido utilizadas para el desarrollo de soportes celulares, mediante procesos bottom-up. Luciani A. y colaboradores en el 2008 llevaron a cabo la preparación de un soporte celular tridimensional a partir de microesferas de policaprolactona cargadas con Albumina bovina serica (BSA por sus siglas en inglés).

La preparación consistió en la formación en primer lugar de las microesferas cargadas, y posteriormente mediante un tratamiento térmico de sinterizado para lograr la difusión del material. Este tratamiento térmico permite la unión de las microesferas y controla según el tiempo o la temperatura el tamaño de los poros obtenidos en el soporte. Los resultados mostraron la formación de microesferas con diámetros de 300 a 500 μm , y con eficacias de encapsulamiento que varían desde el 30 hasta el 62%, siendo controlados estos valores a partir de las relaciones entre los polímeros. Después del proceso de sinterizado se observó la fusión de las microesferas y un rango de porosidad de 30 a 40%, con diámetros de poro que oscila entre los 50 así como los 300 μm .

Los estudios de liberación de proteína mostraron que el material presentó un perfil dependiente de la concentración del PVA, así como, que se logra la zona asintótica a partir del día 10 manteniéndose la concentración de proteína liberada alrededor del 40% (Luciani A., Coccoli V., Orsi S., Ambrosio L., & Netti P., 2008).

1.2 Planteamiento del problema

La ingeniería tisular se encuentra en la búsqueda de materiales que puedan servir como matrices extracelulares sintéticas que emulen las características de las matrices extracelulares naturales. Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado encontrar un material que cubra por completo las expectativas, lo que hace necesario seguir investigando y desarrollando nuevos materiales. La Policaprolactona por sus propiedades ha sido altamente utilizada en el desarrollo de soportes celulares, sin embargo aun se busca mejorar las propiedades de esta mediante la incorporación de moléculas de señalización para favorecer la adhesión, proliferación y diferenciación celular.

1.3 Justificación

En la actualidad el campo de la ingeniería tisular representa una gran alternativa para reparar o regenerar daños en tejidos; para lo cual se requiere realizar un cultivo celular sobre un soporte (también conocidos como matriz extracelular sintética o soporte celular por su terminología en

inglés) que permita el crecimiento, diferenciación y proliferación celular. En respuesta a la necesidad de que el soporte no solo sirva como estructura de crecimiento sino que sea bioactivo, en los últimos años ha llamado la atención la generación de soportes que favorezcan la proliferación celular, funcionando algunos, como un sistema de liberación de moléculas tales como fármacos, antitumorales, antibióticos y factores de crecimiento.

En base a la necesidad de desarrollar soportes celulares con las características anteriormente señaladas; se sugiere en este proyecto probar la preparación de un biomaterial compuesto a partir de microesferas cargadas con proteínas y policaprolactona (PCL), conformado por el método del electrohilado. Una variante que se pretende integrar al sistema es el uso de un solvente poco convencional para la PCL, una mezcla de ácido acético-agua al 90%.

La propuesta de combinar estos dos materiales se ha hecho con el fin de combinar dos aplicaciones de un mismo polímero, así como las propiedades de ambos para desarrollar un material que pueda ser bioactivo. Por un lado el polímero conformado de manera fibrilar conservando sus características propias y que ha sido ampliamente utilizado como soporte para tejidos de piel y hueso; mientras que, las microesferas que ha sido ampliamente utilizado como sistema de liberación controlada de moléculas activas para protegerlas de una degradación temprana por acción de medios agresivos.

La mezcla pretende que las propiedades de ambas moléculas puedan ser utilizadas en conjunto. La obtención de este compuesto permitirá al material que la liberación de moléculas activas sea en una localización específica deseada, además de prolongar el tiempo de residencia del estímulo en la zona deseada.

1.4 Objetivo general

Desarrollar un biomaterial a partir de policaprolactona/ microesferas por la técnica de electrohilado con capacidad de liberación controlada de proteínas para su uso potencial como soporte celular.

3.1.2. 1.4.1 Objetivos específicos

Determinar las condiciones óptimas para el proceso de electrohilado de la policaprolactona usando como solvente ácido acético al 90%.

Sintetizar y caracterizar las microesferas de policaprolactona-alcoholpolivinílico.

Evaluar la eficiencia de carga de las microesferas.

Preparar y caracterizar el material compuesto de fibras/ microesferas.

Evaluar la liberación de proteína a partir de las microesferas y del material compuesto.

1.5 Metas y Actividades

1.- Evaluar la morfología de los materiales obtenidos al variar el voltaje, la distancia y la concentración.

2.-Determinar los parámetros que permitan obtener el material con mejor morfología.

3.-Estandarizar el proceso de síntesis de microesferas determinando sus rendimientos, eficiencia de encapsulamiento y la morfología.

4.- Caracterizar los materiales de manera individual y en conjunto.

5.- Determinar el perfil de liberación de proteína a partir de las microesferas y el material fibrilar por espectroscopia UV.

1.6 Hipótesis

El material obtenido de la combinación microesferas/ fibras podrá ser obtenido usando ácido acético al 90% como solvente mediante la técnica del electro hilado y tendrá la capacidad de liberación controlada de proteína.

CAPITULO II. Marco teórico

2.1 Ingeniería de tejidos y los soportes celulares

La ingeniería de tejidos es una ciencia que se encarga de estudiar el conjunto de herramientas que se poseen tanto en las ciencias biomédicas como en la ingeniería para llevar a cabo una regeneración de tejido. En este aspecto se busca llevar a cabo el uso de células vivas del tejido o atraer células endógenas al tejido dañado con el fin de obtener un beneficio terapéutico o de diagnóstico (Hoerstrup S y col., 2004).

La ingeniería tisular ha permitido el desarrollo de un gran número de biomateriales a través de los años; Dichos materiales pueden ser clasificados según la época de desarrollo y las características que tienen en primera, segunda y tercera generación. La primera generación inicio su desarrollo a partir de 1960 y consistía en materiales de uso común en la industria que fueran bioinertes (que generaran la mínima respuesta adversa en el organismo). La segunda generación inicio en la década de 1980, consistiendo en materiales que además de emular las propiedades de un tejido, poseían cierta bioactividad, es decir, presentaron alguna ventaja terapéutica, en algunos casos la liberación localizada de fármacos, hormonas, entre otras. La tercera generación esta en pleno desarrollo y consiste en buscar alta especificidad en las reacciones presentadas entre proteínas y células a nivel molecular. La transición entre la segunda y tercera generación aun se encuentra en proceso, haciéndose más notoria en los avances que se han realizado sobre los sistemas de liberación de fármacos y la posibilidad de usar los sistemas microelectromecánicos para controlar el desarrollo celular mediante modificaciones químicas en la superficie de las mismas (Hoerstrup S. y col., 2004).

La regeneración del tejido mediante el uso de los materiales desarrollados por la ingeniería tisular se propone mediante la siembra de células diferenciadas o no, sobre un soporte celular (denominado “Scaffold” por su nombre en inglés) o también llamados Matriz extracelular artificial. En este material se llevan acabo la proliferación celular y la maduración *in vitro* del tejido. una vez concluida esta etapa, es implantado en la región donde se desea la regeneración como si fuese una prótesis (Hoerstrup S. y Col., 2004).

Los soportes celulares son estructuras basadas en polímeros naturales o sintéticos que pueden ser implantados para permitir la regeneración de un tejido, siendo estas estructuras las que

determinan en gran medida la unión de las células, la proliferación y diferenciación para llevar a cabo la reconstrucción del tejido (Kim B. y Col., 2010); Por lo cual, estos materiales deben contar con ciertas propiedades para su uso en seres vivos, como son la biocompatibilidad del material con el tejido en el que será implantado, una velocidad de degradación similar a la velocidad de regeneración del tejido, no debe generar respuesta inmune o ser tóxico. También, es importante que el material tenga las propiedades mecánicas necesarias para el tejido donde se van a encontrar, así como, poseer una morfología que permita el transporte entre célula-célula, célula-ambiente y soporte-ambiente de gases, metabolitos, moléculas señalizadoras, etc. (Kim I. y Col., 2008).

El desarrollo de los soportes celulares con mejores propiedades ha ido de la mano con la investigación en el campo de los biomateriales funcionales, permitiendo que una gran variedad de polímeros biodegradables sean probados para su posible uso en ingeniería de tejidos. Dentro de los polímeros sintéticos que han sido usados se encuentran la ϵ -caprolactona, el ácido poliláctico-co-glicólico, polietilenglicol, alcohol polivinílico, así como el poliuretano. En el caso de los polímeros de origen natural se han utilizado el alginato, la gelatina, el colágeno, el almidón, la quitina y la quitosana (Kim I y Col., 2008).

Los polímeros de origen natural, en su uso como soporte, tienen algunas ventajas sobre los sintéticos, pues al encontrarse ya en tejidos de organismos vivos, presentan excelentes propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, adhesión celular y propiedades mecánicas similares a las que poseen los tejidos en los que se encuentran (Kim B. y Col., 2010). En base a estas características, además de su bajo costo y su gran disponibilidad tanto la quitina como su derivado la quitosana han sido altamente utilizados en la fabricación de soportes celulares (Kim I. y Col., 2008).

Los polímeros sintéticos también presentan grandes ventajas para su uso como soportes celulares; por ejemplo, a diferencia de los polímeros naturales pueden ser producidos a condiciones controladas y por lo tanto exhiben propiedades como comportamientos completamente predecibles así como reproducibles. En el caso de ingeniería de tejido para huesos y piel, uno de los polímeros comúnmente utilizado por sus propiedades es la ϵ -policaprolactona (Kim B., Park I., Jiang H., Choi Y., & Akaike T., 2010).

2.2. La Poli(ϵ -caprolactona)

El polímero de la ϵ -caprolactona o mejor conocido como poli- ϵ -caprolactona (PCL) que se muestra en la figura 2.1 es un material sintético con grupos ésteres y cuya estructura es de tipo alifático, lo que le confiere características peculiares como la facilidad de procesamiento, biocompatibilidad y biodegradación con productos no tóxicos para la interacción con matrices biológicas; la cual puede llegar a requerir hasta varios meses. La PCL también es un polímero semicristalino lineal con un bajo punto de fusión a los 60°C., siendo compatible con tejido blando y duro (Johari, Fathi, & Golozar, 2012)..

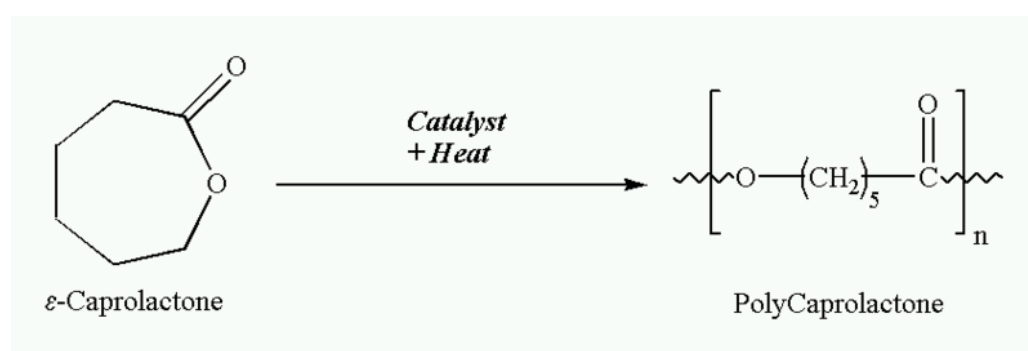


Figura 2.1 Estructura de la ϵ -caprolactona y la pol- ϵ -caprolactona

Las propiedades mecánicas, su biocompatibilidad y biodegradabilidad permiten que la PCL pueda ser utilizada para la preparación de una gran diversidad de biomateriales, resaltando su uso en sistemas de liberación controlada de fármacos así como de regeneración de tejidos.

2.3. Microesferas como sistemas de liberación controlada de fármacos en base a la Poli- ϵ -caprolactona

La policaprolactona por su estructura alifática suele ser compatible con una amplia variedad de fármacos disponibles, generando matrices con una distribución homogénea y una velocidad de liberación que permite la dosificación por periodos de meses. Otra propiedad importante que permite modificar la afinidad hacia los fármacos así como su velocidad de liberación es la versatilidad del polímero para poder ser copolimerizado o mezclado con una gran cantidad de compuestos poliméricos (Bautista Chávez L., 2009).

Entre los principales sistemas que se pueden generar a partir de la policaprolactona y sus copolímeros son las micelas, hidrogeles, dendrímeros, micropartículas (microesferas), nano partículas; siendo las microesferas el sistema en el cual nos centraremos.

Las microesferas son estructuras esféricas que van desde algunos micrómetros hasta 2 mm, las cuales contienen encapsulado en su interior algún fármaco, las cuales tienen como ventaja una gran área superficial en relación al volumen que poseen así como una estructura rígida.

La síntesis de las microesferas puede efectuarse por diversos métodos dependiendo de las características del fármaco que se desea encapsular, y de las propiedades fisicoquímicas del polímero a utilizar. Los métodos convencionales de obtención de microesferas consisten en la generación de emulsiones para posteriormente separar las micropartículas obtenidas. El método más simple de obtención de microesferas y que es aplicable para fármacos hidrofóbicos es la evaporación de solventes en una emulsión agua/aceite (w/o por sus siglas en inglés). En el caso de fármacos de tipo hidrofílicos se utiliza un método de doble emulsión agua/aceite/agua (w/o/w) y una posterior eliminación del solvente (Dash K.P, Badireenath Konkimalla V., 2012).

Existen métodos que son aplicables para fármacos hidrofílicos solos y en combinación con otros fármacos de tipo hidrofóbicos tal como es el caso de la emulsión en dos fases orgánicas (o/o) y la doble emulsión agua-orgánico-orgánico (w/o/o). Sin embargo estos métodos presentan como desventaja la presencia residual de los solventes orgánicos usados en la preparación.

2.4. Electro hilado como técnica de preparación de nanoestructuras de una dimensión

El electro hilado (mejor conocido como electrospinning por su nombre en inglés) es una técnica de obtención de nanoestructuras unidimensionales (Cao G., 2004) y que en los recientes años ha sido aplicada en la elaboración de fibras con diferentes propósitos, entre los que destacan la nanocatálisis, soportes celulares para ingeniería de tejidos, revestimientos protectores, filtración, biomedicina, farmacéutica, electrónica óptica, cuidado de la salud, biotecnología, etc. (Bhardwaj N., Kundu S.C., 2010).

La técnica consiste en aplicar un potencial eléctrico a un polímero fundido o en solución que se encuentra siendo inyectado en forma de gota mediante un sistema de inyección. El potencial eléctrico logra cargar al polímero, siendo igual la carga en todas las moléculas de esté. La

igualdad de cargas genera fuerzas de repulsión y tensiones dentro de la solución, generando la expulsión de material; Sin embargo, la forma definida de la gota se mantiene gracias a las propiedades de tensión superficial y viscosidad (Zhang X., Reagan M.R., Kaplan D.L., 2009). Al aumentar el voltaje hasta un nivel crítico, las fuerzas eléctricas logra superar la tensión superficial del líquido (Cao G., 2004) y causando que se forme en vez de una gota, un cono del cual será inyectada la fibra y acelerada hacia el colector conectado a tierra.

El electrohilado ha sido utilizado en un gran número de polímeros naturales y sintéticos obteniéndose fibras que van desde los 2 nm hasta algunos micrómetros (Bhardwaj N., Kundu S.C., 2010). Esta técnica ha tenido la ventaja sobre otras de poder controlar las características de las estructuras obtenidas, desde su morfología, la porosidad y su composición (Cao G., 2004). Los parámetros que gobiernan las características de las fibras pueden ser clasificados en tres grupos: los parámetros de la solución, los parámetros de operación y finalmente se encuentran los parámetros ambientales.

Los parámetros de la solución engloban los parámetros de concentración, peso molecular del polímero, viscosidad de la solución, tensión superficial así como la conductividad o también denominada densidad de carga superficial. La concentración de la solución es un parámetro muy importante al utilizar la técnica de electrohilado; ya que, a concentraciones bajas se puede observar la formación de pequeñas cuentas como las de un rosario mezclado con una pequeña cantidad de fibras. Al ir aumentando la concentración, esas cuentas aumentan su diámetro y se convierten en fibras; sin embargo cuando la concentración es muy elevada la formación de fibras continuas resulta muy difícil como consecuencia de la dificultad de mantener el flujo continuo (Bhardwaj N., Kundu S.C., 2010).

El peso molecular del polímero es otro parámetro importante ya que esté afecta a las propiedades reológicas y dieléctricas del material. Las sustancias de bajo peso molecular tenderán a formar más fácilmente cuentas que fibras, situación contraria en el caso de aquellos que tienen alto peso molecular. Otro aspecto en el que se reflejan las diferencias en el peso molecular es el grado en el que se enredan las fibras. En el caso de muestras con baja concentración pero alto peso molecular puede mantenerse un entrelazado de las cadenas suficiente como para aplicarlo en las fibras (Bhardwaj N., Kundu S.C., 2010). Otro parámetro correlacionado con el peso molecular es la viscosidad; la cual, juega un rol importante ya que afecta significativamente a la morfología

y el tamaño de las fibras. Se ha encontrado que en muestras cuya viscosidad es muy baja se tienden a formar pequeñas perlas de material más que las fibras; sin embargo, al aumentar demasiado la viscosidad se observa, al igual que a concentraciones altas, una dificultad para fluir de la solución. Estas observaciones conllevan la necesidad de buscar la viscosidad ideal de la solución para su aplicación en el electrohilado.

La conductividad eléctrica de la solución es otro de los parámetros importantes para lograr que el electrohilado se lleve a cabo. En general los polímeros tienden a ser conductores, sin embargo sus propiedades de conducción dependerán del tipo de polímero, el solvente usado y la disponibilidad de sales ionizables. En el caso de las soluciones con alta conductividad se ha observado que el diámetro de las fibras es menor que otras soluciones del mismo polímero pero con menor conductividad; Sin embargo, la reducción drástica en la conductividad de la solución conlleva a una elongación insuficiente de la fibra (Kumbar S.G y col., 2008).

Los parámetros de operación para la técnica de electrohilado son aquellos que dependen del equipo y las condiciones bajo las cuales va a ser utilizado, entre estos destacan: el voltaje aplicado, la velocidad de inyección, el tipo de colector a usar y la distancia entre la punta del sistema de inyección y el colector (Kumbar S.G. y Col., 2008).

El voltaje aplicado a la solución es el responsable de que está adquiera carga eléctrica y por lo tanto se dé el flujo de la misma por fuerzas atractivas y reactivas; Aunque el efecto del voltaje eléctrico no está esclarecido, se ha observado que un alto voltaje eléctrico genera una gran repulsión y por lo tanto fibras de menor diámetro. La velocidad de inyección de la muestra es otro de los parámetros importantes en la operación del electrohilado, el cual no tiene efecto significativo sobre el diámetro de las fibras; sin embargo una velocidad rápida de inyección conlleva a una disminución en el tiempo de evaporación de solvente y una mayor producción de cuentas de polímero y no de fibras (Bhardwaj N., Kundu S.C., 2010).

El tipo de colector es un parámetro de operación que determina la orientación de las fibras obtenidas así como el tiempo de secado de las mismas. Finalmente, la distancia entre el sistema de inyección y el colector es un parámetro que afecta tanto a la morfología como al diámetro de las fibras, aunque su efecto no están significativo como el de otros parámetros. Este parámetro favorece la evaporación del solvente cuando la distancia no es muy corta permitiendo la generación de la fibra y no su dispersión en forma de gotas (Bhardwaj N., Kundu S.C., 2010).

CAPITULO III. Metodología

3.1. Preparación del biomaterial.

La estrategia seguida para la preparación del biomaterial consistió en primer lugar en determinar los parámetros óptimos para lograr obtener un material fibrilar homogéneo, posteriormente se realizó la preparación de las microesferas cargadas con la proteína, teniendo estas la finalidad de proteger el metabolito de las condiciones del electrohilado. Las microesferas y el material después de ser evaluados así como caracterizados de manera independiente, fueron combinados para preparar el material final.

3.1.1 Determinación de las condiciones óptimas del electrohilado.

Buscando condiciones en las cuales tanto las microesferas como la matriz fibrosa pudieran estar presentes sin sufrir alguna modificación antes del electrohilado, se decidió emplear como solvente el sistema propuesto por She Houde y colaboradores en el 2007, en el cual se disolvió la policaprolactona en una mezcla ácido acético-agua al 90% (Houde S., Xiufeng X., & Rongfang L., 2007). Siendo este solvente un sistema poco estudiado en el electrospinning y que puede permitir incorporar las microesferas en el agua adicionada a la policaprolactona.

Los parámetros a variar para encontrar las condiciones optimas de electrohilado fueron la concentración del polímero, el voltaje aplicado y la distancia de la jeringa de extrusión al colector.

Las concentraciones empleadas y los parámetros de electrohilado estudiados fueron aquellos que resultaron más frecuentes en los artículos consultados. Las concentraciones de polímero empleadas fueron 8 % (Luong-Vana E., et al., 2006), 10% (Williamson M.R & Coombes A.G, 2004) y 12% (Ribeiro Neto W.A., et al., 2012). Los voltajes aplicados a la solución fueron de 10 kV; voltaje en el cual se forma el cono del polímero en la jeringa de extrusión, y 14 kV. (Van der Schueren L., De Schoenmaker B., Kalaoglu O., & De Clerck K., 2011), Finalmente se varió la distancia entre el colector y la jeringa de extrusión utilizando valores de 8 cm (Shalumon K.T., et al., 2010), 12 cm (Neamnark A., Sanchavanakit N., Pavasant P., Rujiravanit R., & Supaphol P., 2008) y 17 cm (Hartman O., et al., 2010).

La velocidad de extrusión del polímero y la velocidad del colector se mantuvieron constantes durante todos los experimentos, siendo estas de 1 mL/hr y 220 rpm respectivamente.

3.1.3. Síntesis de las microesferas cargadas con proteínas por emulsión W/O/W

La síntesis de las microesferas cargadas con proteínas se llevo a cabo según el procedimiento descrito por Mukerjee y colaboradores en el 2007. En el cual 1 mL de solución acuosa de proteína con una concentración de 3.5 mg/mL, en este caso insulina como molécula modelo, fue colocada en 10 mL de una solución al 1% de PCL en diclorometano, agitando hasta formar una emulsión agua-aceite por 2 minutos. Una vez formada la emulsión W/O, se adicionó la fase externa mediante 30 mL de una solución al 1% de alcohol polivinílico y se agitó la mezcla durante 2.5 horas (Mukerjee A., Sinha V.R., & Pruthi V., 2007).

Transcurrido el tiempo se formó una emulsión agua-aceite-agua (W/O/W) y se evaporó el solvente mediante agitación durante cinco horas a temperatura ambiente. Finalmente las microesferas sintetizadas fueron aisladas por centrifugación a 10,000 rpm durante 20 minutos. El producto obtenido fue lavado en 3 ocasiones con agua destilada y secado a temperatura ambiente (Damgé C., Maincent P., & Ubrich N., 2007).

En cada preparación de microesferas se corrió un blanco sin polímero con la finalidad de descartar disminución de concentración debido a efectos del medio. Para cada lote (4 lotes en total) preparado se determinó el rendimiento de la preparación, así como la eficiencia en la encapsulación de la proteína (Damgé C., Maincent P., & Ubrich N., 2007).

3.1.3 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación de las microesferas fue determinada recuperando la solución proteica sobrenadante después de la etapa final de centrifugación, así como la del blanco preparado y cuantificando su contenido mediante espectroscopia de absorción en la región ultravioleta a 280nm. Se realizó previamente una curva de calibración de la proteína en un rango de 0 a 4.5 mg/ mL (Mukerjee A., Sinha V.R., Pruthi V., 2007). La cantidad de proteína encapsulada y la eficiencia de encapsulación fueron determinadas según las siguientes ecuaciones:

$$Proteína_{encapsulada} = Proteína_{inicial} - Proteína_{sobrenadante}$$

$$Eficiencia\ de\ Encapsulamiento = \frac{Proteína_{encapsulada}}{Proteína_{inicial}} \times 100$$

3.1.4. Preparación de las soluciones de electrohilado y su procesamiento.

La preparación del material compuesto se efectuó disolviendo en ácido acético glacial la policaprolactona a fin de tener una concentración de 13.33%. La mezcla se agitó por 24 hrs y posteriormente se adicionaron en suspensión acuosa, las cantidades necesarias de microesferas para lograr una concentración final de 1, 2 y 5%; así como una concentración final de policaprolactona del 12%. La solución resultante fue agitada por 30 minutos.

El electrohilado del material se efectuó usando los parámetros obtenidos durante el proceso de optimización (sección 3.1.1) y dejando la deposición del material en un tiempo aproximado de 2 hrs.

3.2. Caracterización del material

3.2.1. Espectroscopia de FTIR

La caracterización de los materiales preparados, microesferas y nanofibras de PCL, se llevo a cabo según la metodología propuesta por Sajomsang W. y colaboradores en el 2011, en la cual se realizó el espectro de todos los reactivos usando pastillas de bromuro de potasio a temperatura ambiente 25°C. Las condiciones utilizadas fueron de 32 barridos con una resolución de 4 cm⁻¹ (Sajomsang W., 2011).

En el caso de las fibras obtenidas, estas no requirieron la preparación de la pastilla de bromuro de potasio por lo cual fueron analizadas directamente.

3.2.2. Caracterización morfológica

La morfología del material preparado se determinó mediante microscopia electrónica de barrido, para lo cual fue necesario llevar a cabo un recubrimiento con plata para aumentar la conducción del material. El recubrimiento se realizó mediante una deposición con plasma durante 40 segundos, utilizando una corriente de 20 mA. Las condiciones de operación utilizadas en el microscopio fueron un voltaje de aceleración entre 1-15 kV, con magnificaciones de 1000 a 7000 X, usando como señal electrones secundarios, con la finalidad de determinar los tamaños de partículas y de fibras (Luciani A., Coccoli V., Orsi S., Ambrosio L., & Netti P., 2008).

3.2.3. Caracterización térmica

El comportamiento térmico del material fue estudiado mediante Análisis Termogravimétrico y Calorimetría diferencial de barrido. Estos análisis fueron realizados según las metodologías propuestas por Mohamed A y Colaboradores en 2008, así como Ribeiro Neto W. y colaboradores en el 2012 (Ribeiro Neto W.A., et al., 2012). En los estudios fueron colocadas muestras de 7 a 12 mg de los materiales preparados, utilizando una velocidad de calentamiento de 20 C por minuto en un rango de temperaturas de 27 a 800 C en un equipo TGA-DSC. (Mohamed A., et al., 2008).

3.3. Estudios de liberación de las microesferas y de las fibras cargadas con Proteína

El estudio de la liberación de la proteína en las microesferas como en el material fibroso se realizó según las metodologías propuestas de Sajeesh P. y colaboradores en 2006, así como Gyoung Kima y colaboradores en el 2007. Una muestra de 20 mg de cada material fue puesto en 2 mL de solución de buffer de fosfatos a pH de 7.4 (0.01M) e incubadas a 37 C por intervalos de tiempo de 30 minutos; se tomaron alícuotas del sobrenadante y la proteína presente se cuantifico mediante espectroscopia de absorción en el ultravioleta-visible absorbiendo a 280nm. (Gyoung Kima T., Sung Lee D., & Park T., 2007). El volumen tomado es reemplazado con buffer nuevo para mantener el volumen total sin cambio (Luong-Vana E., et al., 2006)

CAPITULO IV. Resultados y Discusión

4.1 Preparación y caracterización del material

4.1.1 Determinación de las condiciones óptimas para el electrohilado.

La primera fase del proceso experimental fue encontrar las condiciones adecuadas para poder llevar a cabo la preparación de las nanofibras de policaprolactona (PCL). En el proceso de optimización se prepararon fibras a partir de soluciones de policaprolactona 8, 10 y 12% usando como solvente una solución acuosa de ácido acético al 90%.

Tabla 4.1. Proceso de optimización del electrohilado. En la tabla se muestran los parámetros variados, los tamaños de fibra y el material no fibroso obtenido.

Concentración	Voltaje	Distancia	Tamaño de fibra (nm)	Material no fibroso (mm)
PCL 8%	10 kv	8 cm	148.63 ±35.75	1.12 ± 0.548
		12 cm	130.25 ±28.36	1.32 ± 0.387
		17 cm	163.13 ±34.14	1.54 ± 0.528
	14 kv	8 cm	125.11 ±26.97	1.62 ± 0.412
		12 cm	124.44 ±24.40	1.32 ± 0.387
		17 cm	130.40 ± 30.75	1.36 ± 0.413
PCL 10%	10 kv	8 cm	154.79 ± 37.06	1.24± 0.457
		12 cm	155.46 ±29.65	1.23± 0.433
		17 cm	167.90 ±33.96	1.32± 0.408
	14 kv	8 cm	183.84 ±44.57	1.51± 0.438
		12 cm	211.98 ±46.80	1.35± 0.484
		17 cm	171.71 ±3 0.29	1.30 ± 0.469

El material depositado a través del electrohilado fue caracterizado morfológicamente por microscopia electrónica de barrido, con las imágenes obtenidas se determinaron las distribución de los tamaños de las fibras, así como las generalidades de la morfología del material. Los resultados obtenidos a partir de las soluciones de 10 y 8% se muestran en la tabla 4.1.

En la tabla se pueden observar los tamaños de fibras obtenidos al electrohilar soluciones de 8 y 10% de policaprolactona variando las condiciones de operación. Los valores mostraron que en

todos los casos las fibras se encontraron en el rango de los nanómetros, oscilando sus tamaños entre 100 y 200 nm. Otro aspecto importante a destacar es el hecho que bajo estas condiciones el material depositado presentó grandes cantidades de nódulos, material que no se encontraba en forma de fibras, y cuyas dimensiones variaron entre 1 y 2 micrómetros.

Tabla 4.2. Análisis de varianza del tamaño de fibras

Fuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	Cuadrados medios	F0
Concentración de PCL	12624.45	1	12624.45	96.43 ^a
Voltaje de operación	245.97	1	245.97	1.88
Distancia de operación	149.62	2	74.81	0.57
Relación Concentración/voltaje	5915.87	1	5915.87	45.18 ^a
Relación concentración/distancia	1715.33	2	857.68	6.55 ^a
Relación Distancia /Voltaje	2396.68	1	2396.68	18.30 ^a
Relación Concentración/voltaje/distancia	269.82	2	134.91	1.03
Error	3142.19	24	130.92	
Total	26459.94	35	755.998	

a: significativos al 99%

Según los resultados aparentemente en este método de preparación la concentración fue la única variable que modificó de manera significativa el tamaño de fibra. En base a esta suposición se realizó un análisis de varianza para este modelo factorial considerando las repeticiones realizadas, y cuyos parámetros se muestran en la tabla 4.2

El análisis de varianza realizado al 1%, confirmó la suposición realizada, en la cual únicamente la concentración del polímero influyó de manera significativa sobre el tamaño de las fibras, mientras que la distancia y el voltaje no lo hicieron de forma significativa. La tabla 4.2 muestra además una interacción significativa cuando se presentan solo dos de las variables, mientras que

la interacción de las tres variables no resultó significativa para la definición del tamaño de fibra (Montgomery C., 1991).

Además de tamaños de la fibra, la morfología del material se vio afectada por las variaciones de concentración, ya que se observó que conforme la concentración de polímero aumentaba el material en forma de nódulos desaparecía y se presentaban únicamente fibras continuas. Los parámetros tanto de operación como de la solución pueden jugar un papel importante en la morfología. Sin embargo, ya ha sido señalado en la literatura que la concentración varía de manera inversamente proporcional al tamaño de los nódulos formados (Bhardwaj N., Kundu S.C., 2010). Además, Ki y colaboradores en el 2005, encontraron que las variaciones del tamaño de fibra son proporcionales al incremento en la concentración (Ki C., et al., 2005).

Los cambios en parámetros de operación empleados en este estudio, voltaje y distancia, mostraron ser no significativos para el cambio de tamaño, esto concuerda con lo expuesto por Bhardwaj N. y Kundu S. en 2010, los cuales señalan que la distancia no suele tener un efecto tan significativo como lo presentan otros parámetros. Además, mencionan que el nivel de significancia del voltaje puede variar con respecto a la variación de los otros dos, concordando así con la significancia presentada cuando estos parámetros son evaluados con respecto a otro (Bhardwaj N., Kundu S.C., 2010).

Los materiales depositados en el proceso de optimización de los parámetros de electrospinning, presentaron morfología y tamaño de fibra similar a los obtenidos por Gholipour Kanani A y Hajir Bahrami S, en el 2011. En este estudio a concentraciones menores o iguales a 10 % obtienen material con gran cantidad de nódulos así como tamaños de fibras entre 100 y 200 nm.

En base a estos resultados se realizó la deposición de una solución de PCL al 12%, usando como condiciones de operación 10 kV y 8cm de distancia. Este material presentó una morfología completamente fibrilar (Figura 4.1), es decir, a diferencia del material depositado anteriormente, la solución de 12% no presentó nódulos ni material depositado diferente a fibras.

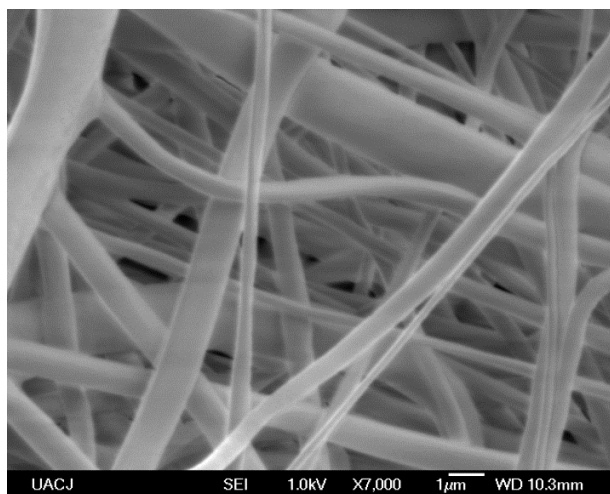


Figura 4.1. Micrografía del material depositado PCL 12%, 10kV y 8cm.

La morfología del material cumplió con las expectativas planteadas, sin embargo como se mencionó anteriormente, la concentración es un factor que afecta de manera significativa el tamaño de las fibras, como consecuencia, los tamaños obtenidos fueron mayores a los de las otras dos concentraciones, teniendo en promedio diámetros de fibras de $577.98 \text{ nm} \pm 252 \text{ nm}$. Teniendo en cuenta que los cambios en los valores de distancia (8,12 y 17 cm) y voltaje (10 y 14 kV) empleados no afectaron significativamente las dimensiones del material, se seleccionaron estas condiciones como las óptimas para el desarrollo de los experimentos posteriores.

4.1.2. Síntesis de las microesferas cargadas con proteínas

En la preparación de las microesferas se efectuó mediante el método de emulsificación agua/aceite/agua utilizando como fase acuosa 1 mL de solución de insulina con una concentración de 3.49 mg/mL. El sólido purificado correspondió a las microesferas cargadas con proteína, en promedio las masas obtenidas de las distintas síntesis correspondió al $80\% \pm 7.9\%$ de rendimiento durante la síntesis

Las microesferas secas resultantes fueron analizadas en primera instancia por espectroscopia molecular en la región del infrarrojo con la finalidad de analizar si ambos polímeros así como la proteína se encontraban incorporados al material obtenido. La figura 4.2 muestra los espectros correspondientes a las microesferas así como a los polímeros que les dieron origen.

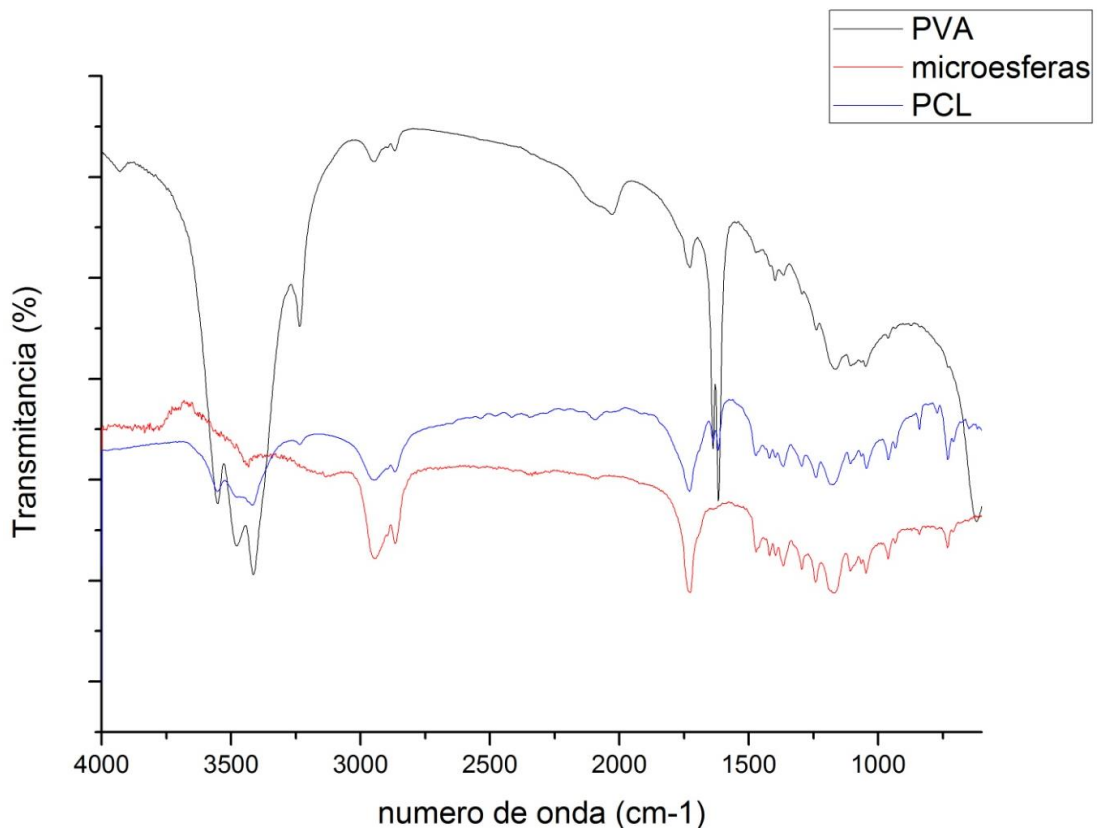


Figura 4.2. Espectros de absorción en el infrarrojo: Policaprolactona, alcohol Polivinílico y las micro partículas resultantes.

En el espectro correspondiente a las microsferas se puede observar en primer lugar una pequeña banda definida sobre 3400 cm^{-1} atribuida al estiramiento del enlace N-H presentes en el enlace peptídico. La región de $3000\text{ a }3250\text{ cm}^{-1}$ presenta una banda ancha que puede ser atribuida a los hidroxilos de alcohol polivinílico, los cuales pueden encontrarse formando puentes de hidrógenos y por lo tanto cambian el ancho de la banda. Las bandas situadas entre $2750\text{ y }3000\text{ cm}^{-1}$ son adjudicadas al estiramiento de los enlaces C-H alifáticos presentes en las cadenas poliméricas, finalmente se observa una señal aparentemente acoplada con otras alrededor de 1750 cm^{-1} , zona correspondiente a las tensiones del grupo carbonilo del grupo éster de la policaprolactona.

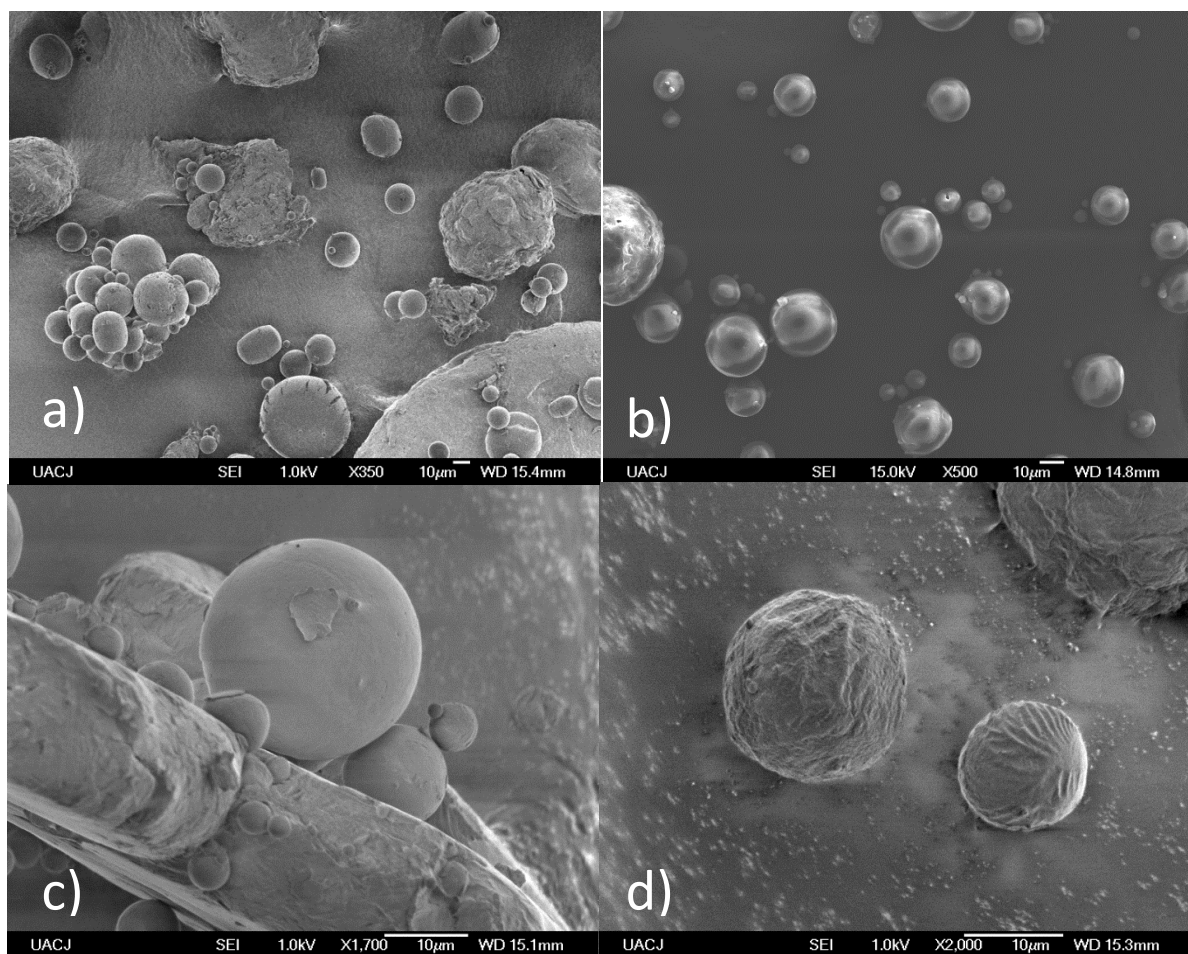


Figura 4.3. Micrografías del microscopio electrónico de barrido tomadas a las micropartículas obtenidas: a) microesferas vistas a una magnificación de 350x sin recubrimiento. b) microesferas recubiertas vistas a 500 x. c) microesferas de morfología lisa vista a 1700 x d) microesferas de morfología rugosa vistas a 2000x.

Por otro lado, la morfología de las microesferas, así como la distribución del tamaño de partículas fueron determinados mediante microscopía electrónica de barrido. En la figura 4.3 a y b se pueden observar en la parte superior dos micrografías que presentan las microesferas obtenidas, en ellas se puede observar la forma circular preferencial que toman las partículas, además se puede observar que se forman aglomerados y presentan una distribución de tamaño en el rango de 5 a 40 μm .

En el análisis se logró detectar la presencia de partículas con dos morfologías diferentes en la fase exterior, dichas esferas pueden observarse en la figura 4.3 c y d. En las cuales, por una parte en la figura 4.3 c se pueden observar una morfología en la fase exterior lisa, mientras que en la

figura 4.3 d un segundo conjunto de microesferas presentaron una morfología superficial rugosa con variaciones en el material depositado en la fase exterior. La diferencia en esta capa externa ha sido reportadas por Mukerjee y colaboradores en el 2007, los cuales señalaron que cuando se usa alcohol polivinílico existen variaciones en la fase exterior señalando incluso la existencia de regiones sin polímero (Mukerjee A., Sinha V.R., Pruthi V., 2007).

En base a las micrografías se efectuó el análisis de distribución de tamaño de partícula, el cual se muestra en la figura 4.4, en la cual se observa que los tamaños oscilaron desde 5 hasta 40 micrones. El valor promedio del tamaño de las esferas fue de $18.94 \pm 8.107 \mu\text{m}$.

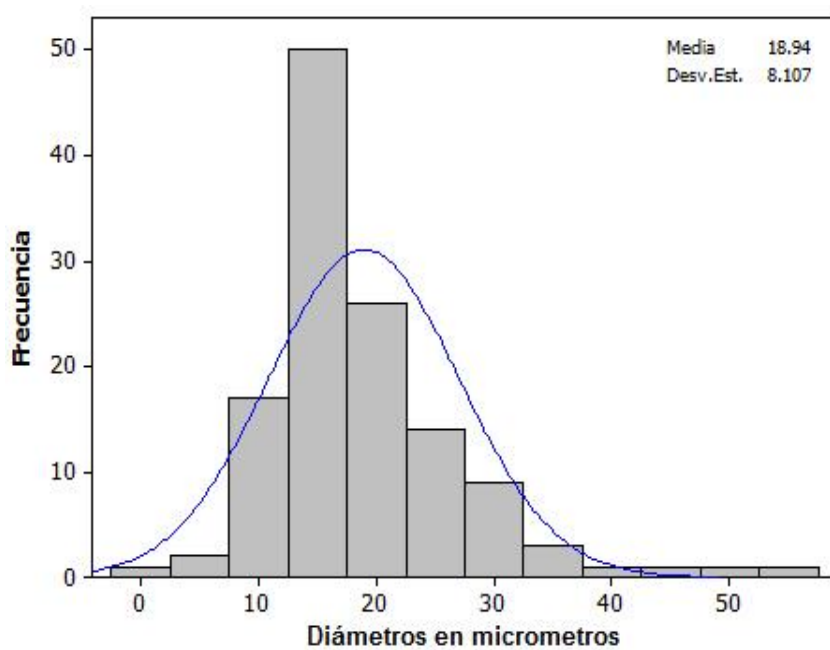


Figure 4.4. Grafica de distribución de tamaños de partículas para las microesferas

Los valores obtenidos tanto de tamaño y rendimiento de las microesferas fueron ligeramente inferiores a los reportados en la literatura para el mismo método (Bautista Chávez L., 2009). Las variaciones presentadas con respecto a trabajos como los de Bautista Chávez en el 2009 o Mukerjee A y colaboradores en 2004 pueden deberse a una posible diferencia de presión en el momento de la evaporación del solvente así como cambios en las velocidades de adición de la segunda fase acuosa sobre la muestra (Sáez V., Hernández E., Angulo L., & Katime I., 2004).

La estabilidad de las microesferas en el medio de electrohilado fue analizada; para lo cual se procedió a preparar una suspensión de las microesferas en el solvente del electrohilado y

posteriormente fueron vistas en un microscopio óptico, para corroborar la existencia de las esferas en el medio ácido.

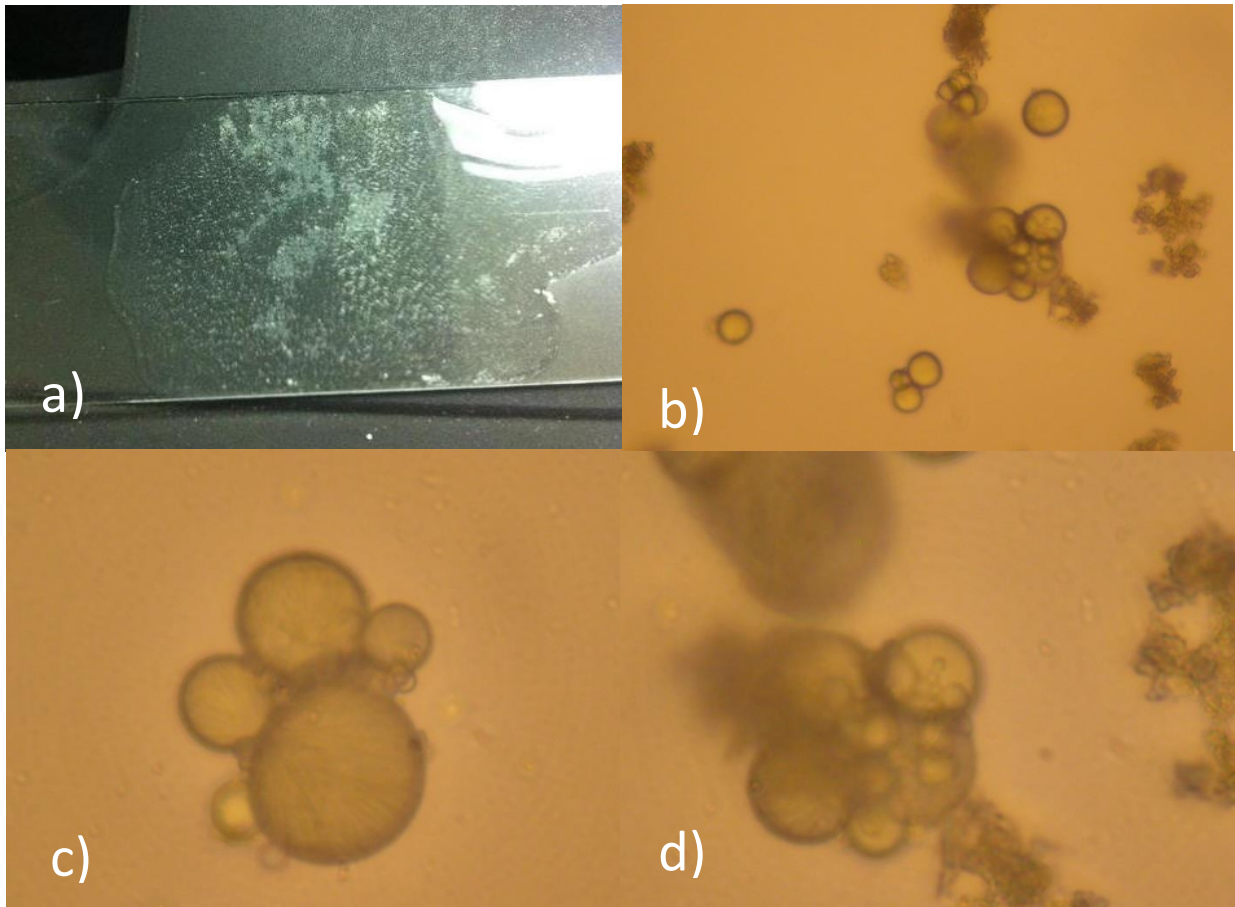


Figure 4.5. Micrografías ópticas de las microsferas. La figura a) suspensión de microsferas sobre el portaobjetos. b) suspensión de microsferas vistas a 10X. c) y d) microsferas suspendidas vistas a 20X.

En las figura 4.5 se pueden observar como las microsferas mantienen su estructura esférica al ser colocadas en el solvente usado para el electro hilado (ácido acético al 90%), además de que no muestran disolución o degradación. Esta estabilidad concuerda con lo señalado en la literatura (Bautista Chávez L., 2009), en el cual se destaca que las microsferas permiten proteger a las moléculas activas que envuelven de medios agresivos como son el ácido estomacal o enzimas de degradación.

4.1.3. Eficiencia de encapsulamiento

La cantidad de proteína encapsulada en la microesfera se determinó mediante espectroscopia en la región ultravioleta, considerando la absorción de las proteínas a 280 nm. La determinación de la cantidad encapsulada requirió de la elaboración de una curva de calibración, la cual se muestra en la figura 4.6. La absorción de los sobrenadantes de los distintos lotes de microesferas se midió y en base a ello se determinó el encapsulamiento.

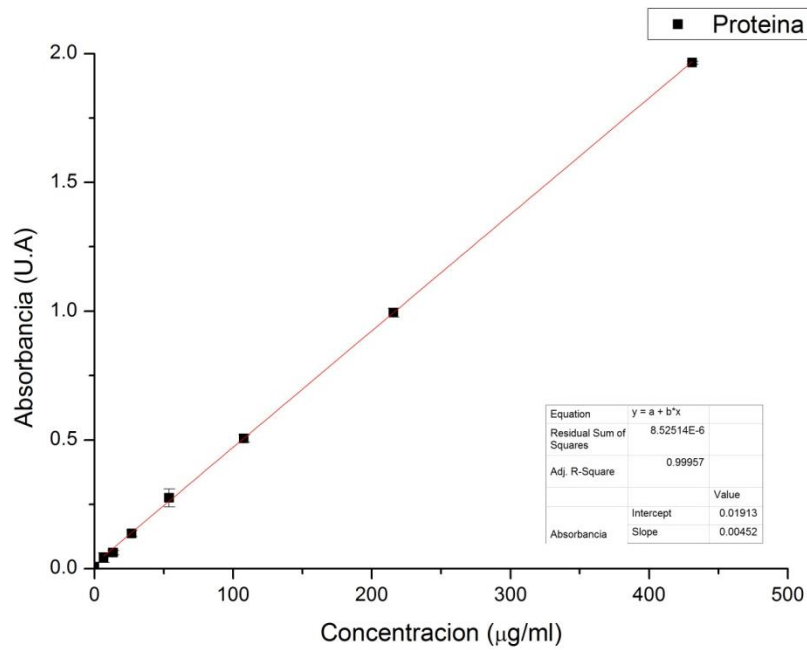


Figura 4.6. Curva de calibración. Esta curva fue utilizada para la determinación del porcentaje de encapsulamiento

La cuantificación de la cantidad de proteína arrojada, dio como resultado una eficiencia de encapsulamiento promedio de 45.98%. Este valor resulta ser muy similar al obtenido por Mukerjee A y colaboradores, los cuales obtuvieron una eficiencia de encapsulación del 46.3% para sus micropartículas. Sin embargo resulta menor a los de otros autores tales como Bautista en el 2009, que obtuvo un 92% de eficiencia (Mukerjee A., Sinha V.R., Pruthi V., 2007). Estas variaciones se deben en gran medida al método de preparación ya que en el caso de Bautista utiliza como estrategia para la emulsificación el ultrasonido. En este trabajo no se recurrió al uso

del ultrasonido ya que este puede afectar la integridad de las macromoléculas tales como las proteínas (Bautista Chávez L., 2009).

4.1.4. Soluciones de electrohilado y su procesamiento.

Las soluciones para el electrohilado fueron preparadas al 12% de policaprolactona de peso molecular de 70,000 Da, y se les adicionó una suspensión en agua de las microesferas previamente preparadas para lograr concentraciones de 0%, 1%, 2% y 5%. Las soluciones fueron electrohiladas en un periodo de 2 hr bajo los parámetros óptimos determinados y descritos previamente.

Las fibras obtenidas fueron caracterizadas en primer lugar mediante espectroscopia FTIR, verificando en este análisis que el polímero se mantuviese integró después de la disolución en el medio ácido y la aplicación del voltaje.

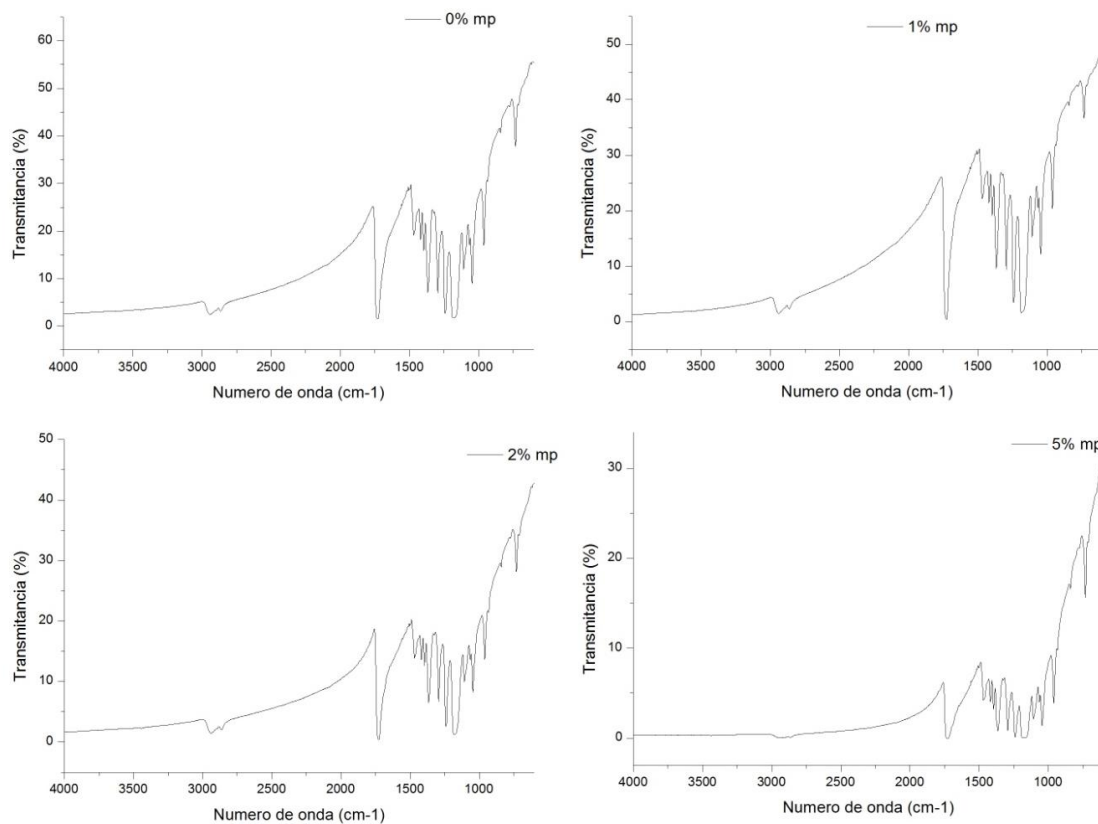


Figura 4.7 Espectros FT- IR de las fibras. Se muestran los espectros de los materiales obtenidos con 0, 1, 2 y 5% de microesferas.

La figura 4.7 muestra los espectros infrarrojos en modo de transmisión de las fibras preparadas. En las graficas se pueden observar que en el rango de 4000 a 3000 cm^{-1} no se presentan bandas de absorción, por lo que se corrobora que bajo estas condiciones no existe degradación hidrolítica del material durante la preparación de las soluciones ni durante el electrohilado. Las bandas presentes entre 2700 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} , corresponde a la absorción por los grupos metilenos de la cadena de la policaprolactona. Finalmente se muestra sobre 1700 cm^{-1} la banda de absorción consecuencia de la vibración del grupo carbonilo y por debajo de 1500 cm^{-1} la zona de la huella digital.

En los espectros se denota también la ausencia de alguna señal que muestre la presencia de las microesferas, esto puede deberse a la similitud de los espectros de las microesferas y la policaprolactona sola, así como a la baja concentración de las mismas.

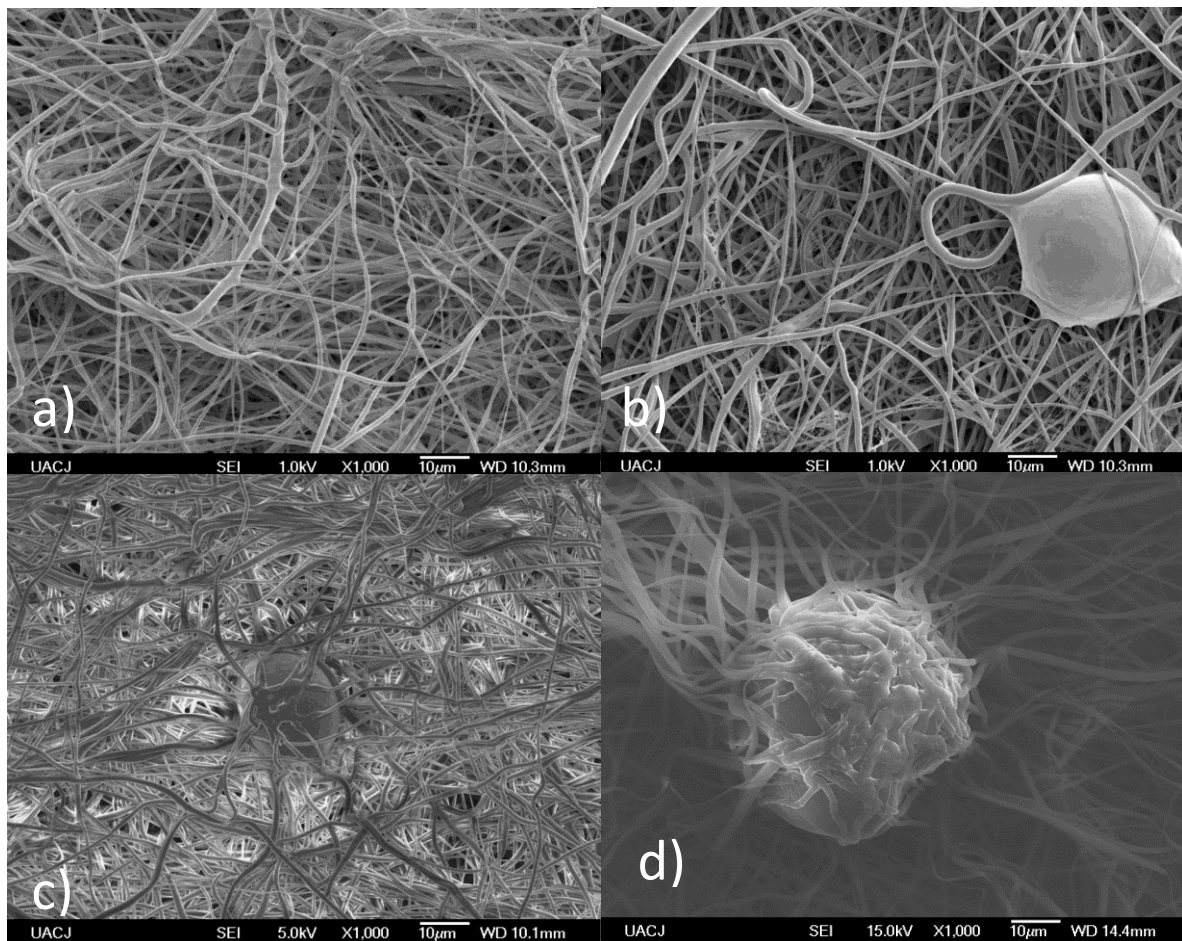


Figura 4.8. Micrografía electrónica a 1000x de las fibras de policaprolactona a 12% con: a) 0% b) 1% , c) 2% , d) 5% de micropartículas en la solución de electrohilado.

El material depositado después del electrohilado se caracterizó morfológicamente mediante microscopia electrónica de barrido (Figura 4.8). En estas micrografías se puede apreciar que en todos los casos el material posee fibras homogéneas y continuas no alineadas, las cuales resultan ser bastante similares entre ellas, aunque se observó un incremento en el tamaño de las fibras conforme se aumentaba la concentración de microesferas en el material.,

El análisis morfológico de las fibras a una magnificación de 1000x mostró que, aquellas en las cuales se les adicionó microesferas presentaban estructuras esféricas embebidas dentro de la matriz fibrosa. Estas estructuras son asociadas al electrohilado de las microesferas junto con la policaprolactona, en la cual la matriz polimérica envolvió a la microesfera adicionada en una fibra. Este tipo de estructuras se han presentado en otros trabajos, como es el de Hong S. y Kim G. en el 2011 en el cual se electrohiló PCL con polvo de quitosana presentando en sus fibras estructuras esféricas de quitosana embebida en la matriz fibrosa (Hong S. & Kim G., 2011).

El tamaño de las estructuras encontradas en las fibras correspondió al rango de tamaños en los cuales se encontraban las microesferas, no encontrándose en los análisis estructuras menores a 10 micrómetros, y encontrándose el valor promedio sobre 20 micrómetros.

En base a esta primera evidencia se puede corroborar la presencia de las microesferas dentro del material fibrilar. Además de esto, se analizó la morfología de las fibras a una magnificación de 7000 x, micrografías que se pueden observar en la figura 4.9 junto con sus histogramas de distribución de tamaño. Las fibras de PCL al 12% sin microesferas tuvieron un tamaño promedio de 578 ± 252.8 nm, como se puede apreciar en la micrografía las fibras continuas, no alineadas y que además no muestran características de porosidad dentro de las mismas.

Los materiales que presentaron las microesferas presentaron un ligero incremento gradual en el tamaño promedio de las microesferas, observándose que las fibras con 1% de microesferas median en promedio 583 nm, la de 2% 719 nm y finalmente las del 5% prácticamente un micrómetro.

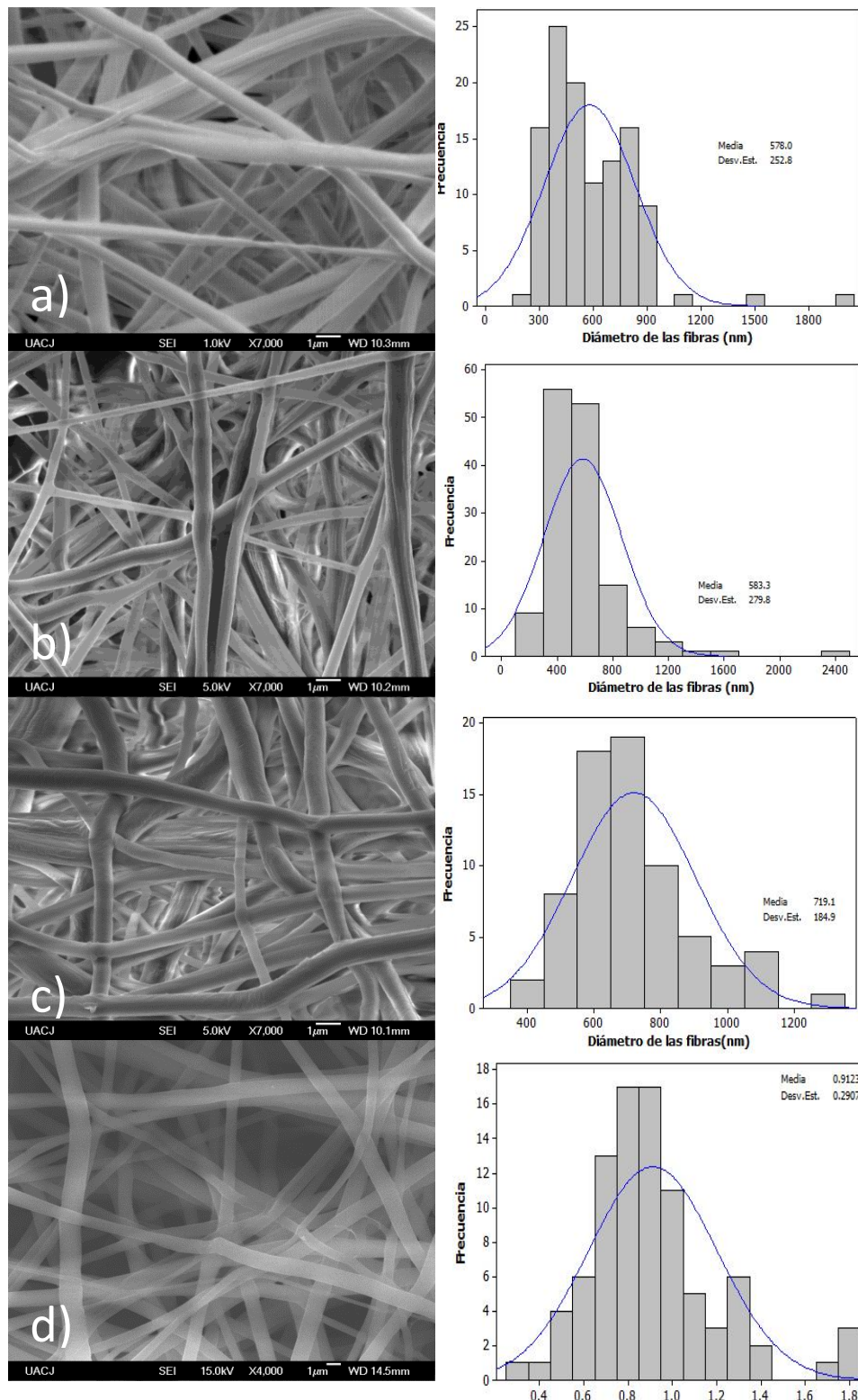


Figura 4.9. Micrografías a 7000 x y distribución de tamaño de fibras para las muestras: a) 0%, b) 1%, c) 2% y d) 5% microsferas (4000x).

Este efecto en la modificación de los tamaños de fibras al formarse un compuesto, ha sido reportados en varios entre ellos el de Hong S. y Kim G. en 2011, en el cual al agregar quitosana a la policaprolactona se observó una disminución en el tamaño de fibra, siendo resultado del aumento de la conductividad debido al polielectrolito (Hong S. & Kim G., 2011).

Un trabajo adicional que muestra el efecto en el tamaño de fibra al adicionar sustancias que modifiquen la conductividad es el de Nagarajan, Drew y Mello en el 2007. En ese estudio se observó que al adicionar micelas a una solución y efectuar el electrohilado se presentaban variaciones en el tamaño de las fibras obtenidas correspondientes al cambio en la conductividad, viscosidad y tensión superficial (Nagarajan R., Drew C., & Mello C.M., 2007).

Estos trabajos nos llevan a proponer que las variaciones de tamaño observadas en los materiales preparados en el presente estudio, se debe a una modificación en las propiedades de la solución como consecuencia de la adición de las microesferas las cuales poseen como fase externa alcohol polivinílico a la solución de policaprolactona.

Para corroborar que estas estructuras esféricas no correspondieran a situaciones aisladas dentro del material, se realizó un análisis morfológico a magnificaciones menores para la muestra con una concentración de 5%. Las micrografías pueden observarse en la figura 4.10.

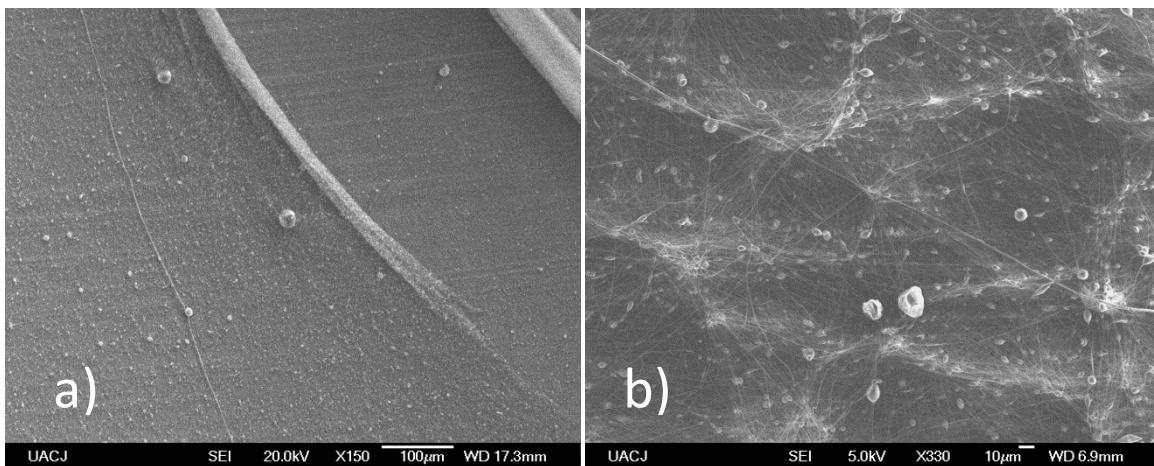


Figura 4.10 Micrografías electrónica de la muestra a 5%. a) 150x, b) 330x

4.1.5. Caracterización térmica

Un estudio adicional que se realizó para confirmar la presencia las fases presentes en las microesferas, así como la incorporación de estas en las fibras a analizar fueron la calorimetría de diferencial de barrido y el análisis termo gravimétrico.

El análisis termogravimétrico realizado a las muestras puede observarse en la figura 4.11 en la cual se compararon los perfiles de degradación. En este caso podemos observar que la muestra de microesferas (mm) presenta una primera pérdida de peso entre 250-350 °C, una segunda pérdida de peso a partir de 400 a 450°C, posteriormente se presenta una pequeña pérdida de peso entre 450 y 550 °C , para finalmente sufrir una última degradación entre 550 a 600 °C.

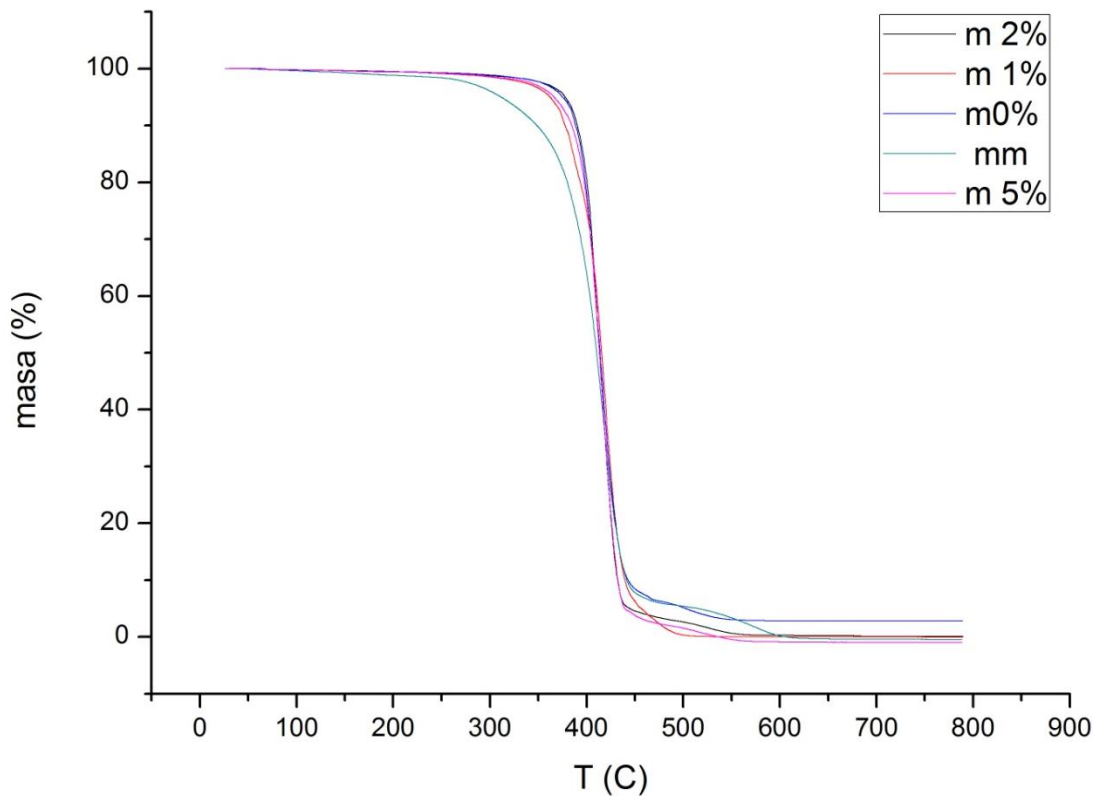


Figura 4.11. Análisis termogravimétrico de las muestras: micropartículas (mm), Fibras sin micropartículas (m0%), Fibras con 1% de micropartículas (m1%), Fibras con 2% de micropartículas (m2%).

Las fibras elaboradas únicamente de policaprolactona (m0%) presentaron un comportamiento diferente, en el cual se presentan únicamente dos pérdidas de peso, la primera de ellas inicia sobre los 400 °C y termina alrededor de los 470°C, mientras que la

segunda empieza en los 470°C y finaliza sobre los 550 °C. La fibra que contenía el 1% (m1%) de microesferas presento un comportamiento de degradación muy similar al presentado por la policaprolactona sola.

La última muestra analizada, las fibras de PCL con 2% de microesferas (m2%) presentó un comportamiento combinado entre la degradación de las microesferas solas y la policaprolactona sin microesferas. Este perfil presento 4 perdidas de peso, la primera entre 325 a 375 ° C, una segunda sobre 375 a 455 °C, una tercera zona sobre 450 a 550°C y finalmente la última de 550 hasta los 600 °C.

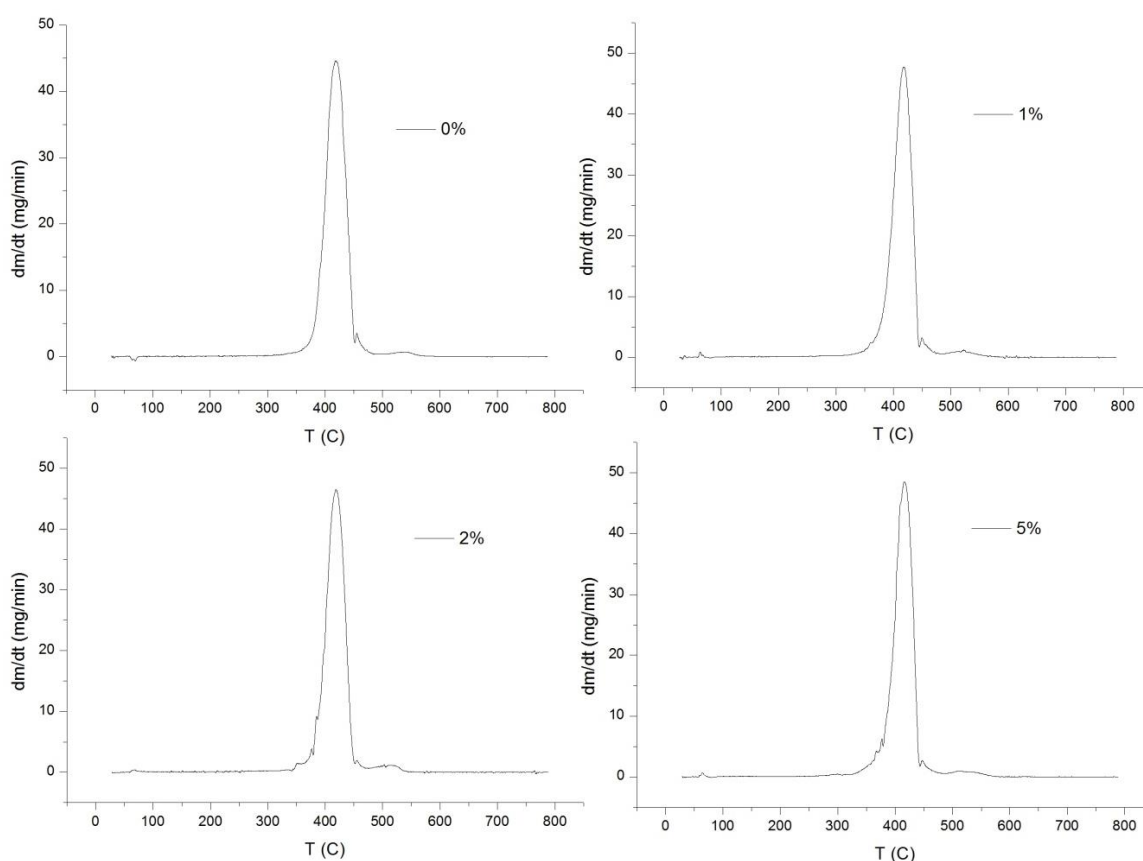


Figura 4.12. Análisis de primera derivada. En la grafica se pueden apreciar los resultados de la derivación de las curvas termogravimétrico de los diferentes tratamientos.

La presencia de estas etapas fueron verificadas mediante un análisis de primera derivada (figura 4.12) del termo grama obtenido del análisis termogravimétrico, en el cual fue

posible observar señales positivas en las temperaturas en las cuales existió cambio en la pendiente de la curva.

En este análisis se pudo observar que para el caso de la muestra que posee únicamente fibras de policaprolactona se observa solo una pérdida de peso bastante significativa a 400 °C como consecuencia de la degradación, y la combustión de los productos restantes sobre 550°C. En los demás procesos se pudo confirmar las pérdidas de peso propuestas, mostrándose mayor definición en la muestra que tenía mayor contenido de microesferas.

El análisis termogravimétrico de las muestras se complementa con el análisis de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de las mismas, con la intención de confirmar las fases presentes en cada uno de los materiales preparados.

En el termograma obtenido a partir del análisis de DSC se pudo observar cuantos procesos se presentaron en la descomposición térmica, además de que permitió determinar si los procesos absorbieron o liberaron energía (Figura 4.13).

En el caso de la descomposición de las micropartículas se observó en primer lugar un proceso endotérmico sobre 74 °C, asociado al proceso de fusión de la policaprolactona que conforma la fase a polar de las microesferas (Yuan W., Tang X., Huang X., & Zheng S., 2005). Posteriormente se observó otro proceso de tipo endotérmico sobre 180 °C que puede ser asociado a la fusión del alcohol polivinílico y cuya diferencia con el reportado puede deberse a su mezcla con la policaprolactona (De Kesela C., Lefevrea C., Nagy J.B., & David C., 1999). Posteriormente se observan dos procesos exotérmicos entre 250-350 °C, los cuales corresponden en primer lugar a la deshidratación del alcohol polivinílico para generar polienos así como la ruptura de cadenas insaturadas generadas de la etapa anterior. Alrededor de 350 °C y por arriba de esta temperatura los polienos generados se ciclan por un proceso Diels-Alder para formar cicloalquenos, los cuales se deshidrogenan (proceso endotérmico) generando compuestos aromáticos conjugados con cadenas insaturadas. Finalmente sobre 400 °C, los residuos polienicos restantes reaccionan con los radicales libres restantes y se saturan. Posteriormente a temperaturas mayores de 400 °C se presenta la combustión de los mismos (Gilman J.W., VanderHart D.L., & Kashiwagi T., 1994).

El proceso endotérmico que se pudo apreciar sobre 400 °C se puede asociar a la degradación de la PCL a ácidos carboxílicos de cadena corta, insaturados, esteres más cortos además de compuesto homo y heterociclos (Jun Y., Lingling H., & Baojing Y., 2011). La señal exotérmica encontrada por arriba de 500 °C también corresponde a la combustión de los residuos de la degradación (Su T., Jiang H., & Gong H., 2008).

En el termograma de las fibras sin microesferas se pudieron apreciar solamente 3 procesos. El primero correspondiente a la fusión del polímero a 74 °C, el segundo fue a 400 °C y de naturaleza endotérmica, el cual como ya se menciono corresponde a la degradación del poliéster en dióxido de carbono, ácidos de cadena corta, insaturados, esteres de cadena más pequeño entre otros. Finalmente, se presento señal exotérmica a 520 °C que conlleva la combustión de estos productos, siendo estos dos últimos procesos los responsables de las pérdidas de peso presentadas.

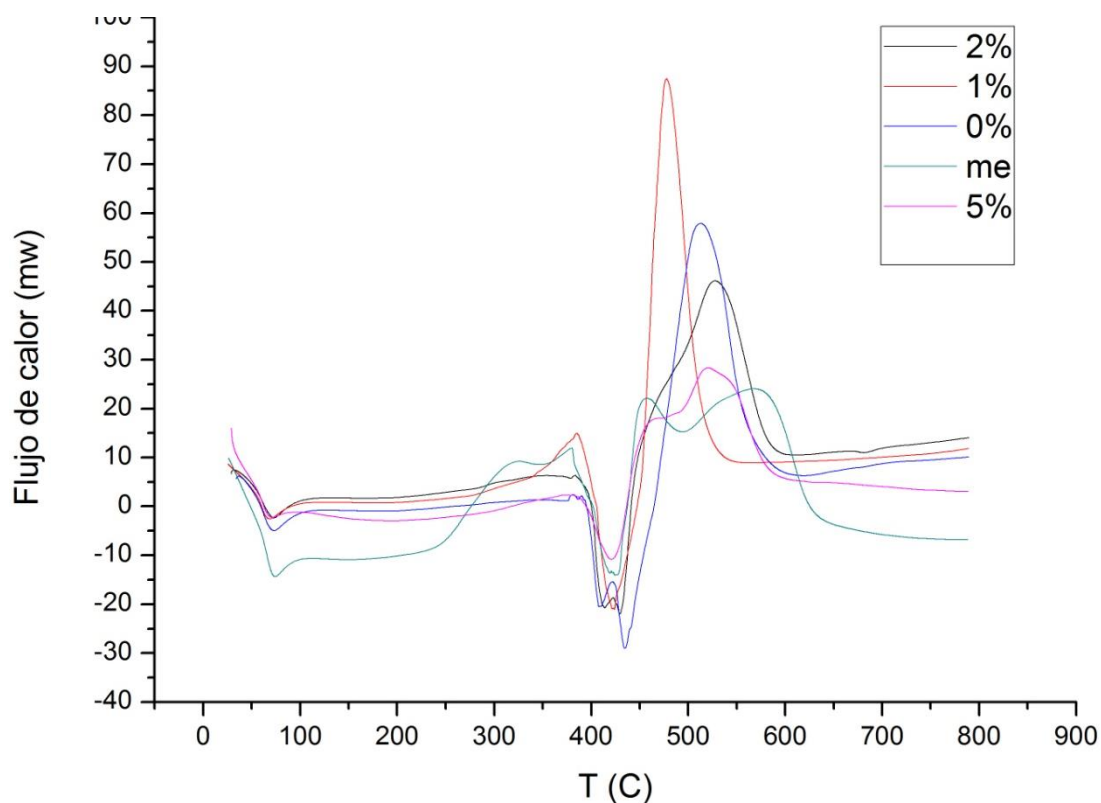


Figura 4.13. Termograma DSC para los materiales obtenidos: microesferas (me), Fibras de policaprolactona (0%), Fibras con 1% de microesferas (1%) y fibras de policaprolactona (2%)

Las fibras con 1% de microesferas mostraron al igual que en caso anterior 3 señales, correspondientes a los mismos procesos. Sin embargo la temperatura de fusión presentó un ligero desplazamiento a una temperatura más baja (72 °C), el proceso de degradación se mantiene a la misma temperatura, sin embargo la temperatura de la combustión se desplaza a un punto intermedio entre la degradación del alcohol polivinílico y la combustión de los subproductos de la degradación de la PCL.

El comportamiento de las fibras al 1% de microesferas puede explicarse al considerarse un comportamiento similar al de una solución ideal (diluida), por lo que la adición de un soluto (microesferas) a un medio (Policaprolactona) disminuye la temperatura de fusión, así como la temperatura de combustión.

Las muestra con el 2% de microesferas presentó 5 señales correspondientes a los procesos combinados de las microesferas y la policaprolactona, La primer señal correspondió a la fusión de la policaprolactona, este punto de fusión se desplazo hacia temperaturas más bajas (65 °C). Un segundo proceso fue presentado a 350 °C que correspondió a las degradaciones de polienos y su condensación por la reacción de Diels-Alder.

El tercer proceso que se observó en el termograma fue la degradación de la PCL y PVA a 400 °C, el proceso fue endotérmico. Las siguientes dos señales no se encuentran resueltas en el termograma, estas señales corresponden a la última etapa de degradación del alcohol polivinílico seguida del proceso de combustión de los residuos. Estas evidencias permitieron comprobar la presencia de cada una de las fases en los distintos materiales, así como su comportamiento térmico.

4.2 Estudios de liberación controlada de una proteína.

La parte final del trabajo fue el estudio de liberación de la proteína a partir del material fibrilar preparado. La liberación de la proteína fue evaluada en primer lugar utilizando únicamente las microesferas sintetizadas, para posteriormente evaluar la liberación de la proteína desde el material combinado.

En la figura 4.14 se presenta la grafica de liberación de la proteína a partir de las microesferas preparadas. En ella se puedo observar que desde los primeros minutos la

liberación de la proteína se fue presentando, logrando un acercamiento asintótico alrededor de los 300 minutos (5 horas) logrando liberar hasta ese momento el 45% de la proteína encapsulada.

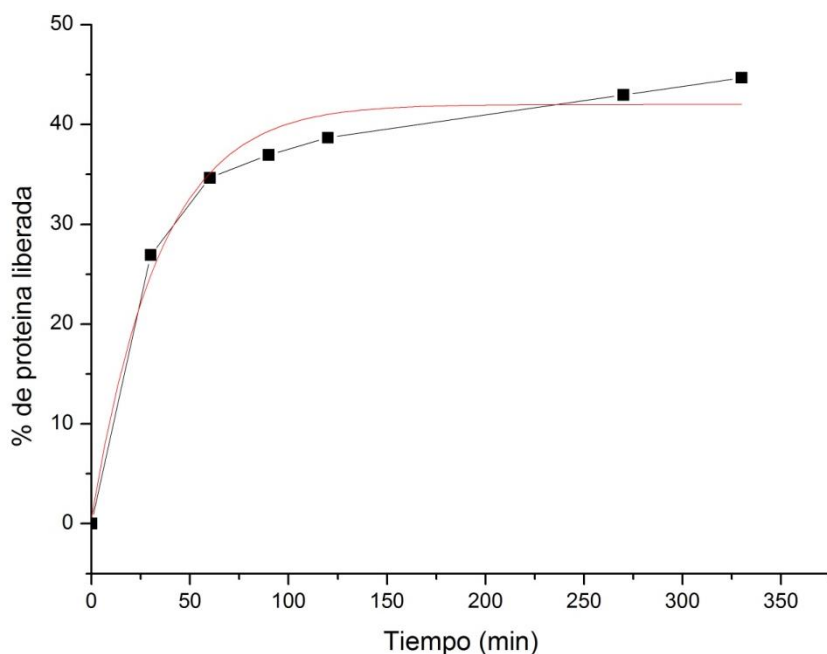


Figura 4.14. Estudio cinético de la liberación de proteína a partir de las microesferas

La cinética de liberación de la proteica obtenida con las microesferas concuerda con la obtenida por Mukerjee y colaboradores en el 2007, los cuales observaron también una liberación aproximada del 40% a las 6 horas de colocadas las microesferas en la solución de fosfatos. (Mukerjee A., Sinha V.R., & Pruthi V., 2007). Además, en base al perfil de liberación obtenida se pudo determinar que el mecanismo seguido por este proceso es la difusión, el cual es el mecanismo preferente en estos procesos (Bautista Chávez L., 2009).

Una vez analizado el perfil de liberación de las microesferas solas se procedió a analizar la liberación de las fibras cargadas con las microesferas. Este análisis se muestra en la figura 4.15.

En estos perfiles de liberación se puede observar que el comportamiento de material, en este caso las fibras con 1% de microesferas, más que ser asintótico resultó tener tendencias

sigmoidea. En el perfil de esta muestra (1% microesferas) se pudo observar que dentro de las primeras 24 horas de incubación no se detecto proteína liberada en el medio. Posteriormente de las 48 a las 96 horas mostro una liberación pequeña del contenido proteico y finalmente sufre un aumento en la liberación hacia los días 6 y 8, llegando a una liberación de casi el 70% del contenido proteico.

En el caso de las muestras con 2 y 5% de microesferas no fue posible durante el tiempo de este análisis verificar el tiempo al cual se logra la zona asintótica. Sin embargo, se observó dentro del análisis un comportamiento similar al presentado por las fibras con 1% de microesferas. En las primeras 24 horas las fibras no presentaron liberación, posteriormente de las 48 a las 96 horas presentaron una pequeña liberación (menor al 10%), para posteriormente aumentar la cantidad de proteína liberada (44% las fibras con 2% de microesferas, y 28% las fibras con 5% de microesferas), en este caso se puede observar que el material con mayor cantidad de microesferas fue el que menor liberación presentó y aquel que aparentemente dosificara por mayor tiempo la proteína.

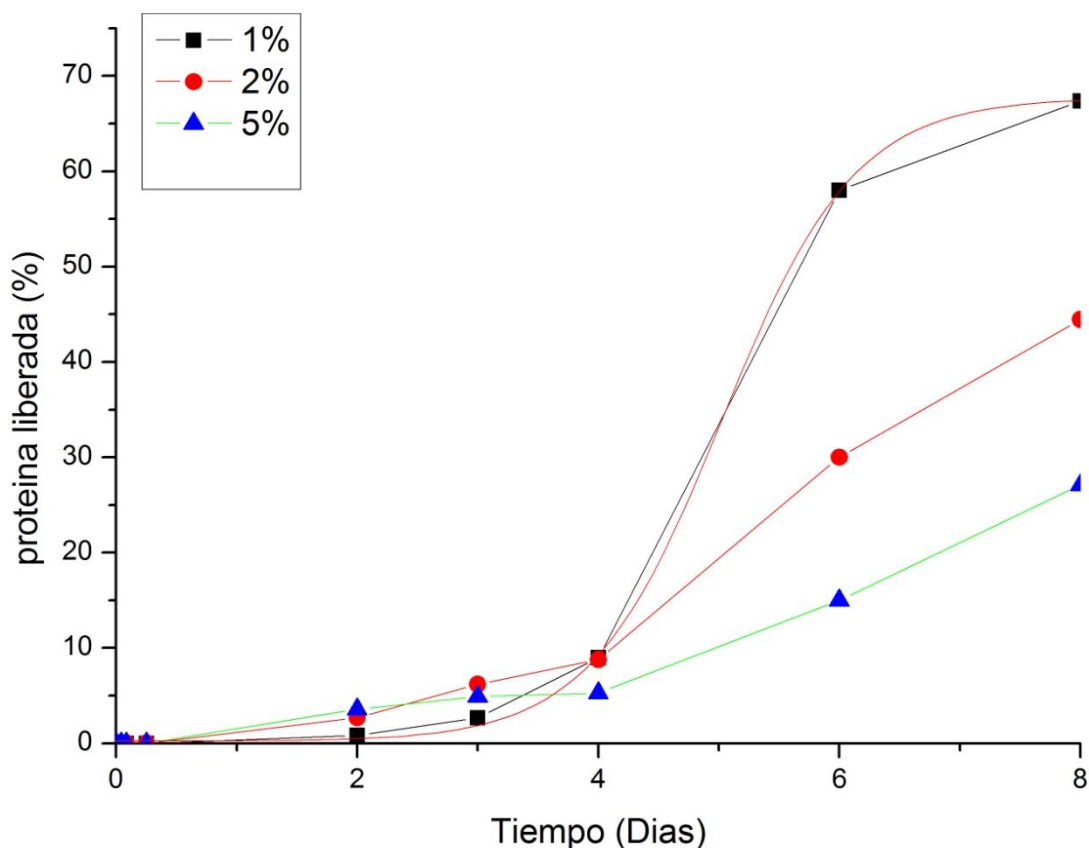


Figura 4.15. Perfiles de liberación de proteína para las fibras con 1,2 y 5% de microesferas respectivamente

Este comportamiento observado en los perfiles obtenidos puede atribuirse en primer lugar al mecanismo de liberación, el cual aparentemente resulta ser un caso II del mecanismo de ley de potencia. Este mecanismo se efectúa mediante la difusión, por lo que en primer lugar el solvente debe penetrar, relajar la matriz y efectuar un ligero hinchamiento del material para posteriormente comenzar a difundirse. Sin embargo la salida de la proteína puede modificar la morfología de las microesferas, y como consecuencia la del material fibroso, lo que conlleva una menor restricción para la difusión al modificar la porosidad y por lo tanto facilita la salida de la misma (Andreetta H., 2003).

La diferencia en los porcentajes de proteínas liberados a los 8 días entre las fibras con 2 y 5% puede atribuirse al tamaño de las mismas y por ende a variaciones en el tiempo que tarda el solvente (agua) en penetrar para permitir la difusión, así como la dificultad que puede presentar la proteína para la migración hacia la superficie (Dash K.P, Badireenath Konkimalla V., 2012).

CAPITULO V. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones.

Fue posible llevar a cabo el electrohilado de la policaprolactona usando como solvente una solución de ácido acético en agua al 90%.

Se determinó que el factor principal que modifica el tamaño de las fibras es la concentración,

Se determinó que las soluciones de PCL al 12% dieron como resultado un material completamente fibroso, sin presencia de nódulos,

Las condiciones ideales para el electrohilado fueron una distancia de 8 cm, un voltaje de 10 kV, una velocidad de extrusión de 1 mL/hr y una concentración de 12%.

Se lograron preparar micropartículas cargadas con proteína mediante el método de fibras por doble emulsión W/O/W, teniendo estas un tamaño promedio de partícula de 18 μm .

Las microesferas obtenidas tuvieron un rendimiento de síntesis del 80% y una eficacia en el encapsulamiento del 46%.

Fue posible preparar un material fibrilar con tamaños en el orden de los 500 a 700 nm, y que tenían embebidas las microesferas cargadas con proteínas.

La policaprolactona utilizada para preparar las fibras no sufrió degradación como consecuencia del uso de un medio ácido.

Las microesferas pudieron liberar el 45% de la proteína cargada en el lapso de 5 horas; mientras que las fibras presentaron un mayor tiempo de liberación.

En el caso de las fibras con 1% de microesferas se liberó el 68% en 8 días llegando a la zona asintótica, en tanto que, las de 2% y 5% presentaron una liberación del 45% y el 25% respectivamente en el mismo periodo.

El perfil de liberación de las fibras fue clasificado como caso II del mecanismo de ley potencial.

5.2 Recomendaciones

En base a los resultados obtenidos y las conclusiones a las que se llegaron en el presente trabajo se recomienda para futuros trabajos las siguientes líneas de investigación.

Aumentar la concentración de microesferas y evaluar su efecto sobre las propiedades del material y perfil de liberación.

Determinar las propiedades mecánicas del material para ver su compatibilidad con la piel.

Efectuar los estudios de biodegradación del material generado no solo para determinar la velocidad de degradación del mismo, sino también para verificar las variaciones en la morfología del material conforme pasa el tiempo.

Realizar el cultivo de células epiteliales con las microesferas cargadas de factor de crecimiento epitelial sobre el biomaterial generado para determinar si es posible que se use como soporte celular.

REFERENCIAS

- Adekogbe I., Ghanem A., (2005). Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 26, 7241–7250.
- Alonso M., Krauland A. (2007). Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 340, 134-142.
- Alvarez Parrilla E. (2000). *ESTRUCTURAS SUPRAMOLECULARES GENERADAS POR CICLODEXTRINAS*. Lugo, España: Universidad de Santiago de compostela.
- Alvarez Parrilla E., Al-Soufi W., Ramos Cabrera P., Novo M. and Vazquez- Tato J., (2001). Resolution of the Association Equilibria of 2-(p-Toluidinyl) naphthalene-6-sulfonate(TNS) with β -Cyclodextrin and a Charged Derivative. *J.Phys. Chem.B*, 105, 5994-6003.
- Andreetta H. (2003). Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de Distintos Modelos. *Lat. Am. J. Pharm.*, 22, 355-64.
- Andukuri A., Kushwaha M., Tambralli A., Anderson J.M., & Dean D. (2011). A hybrid biomimetic nanomatrix composed of electrospun polycaprolactone and bioactive peptide amphiphiles for cardiovascular implants. *Acta Biomaterialia*, 7, 225-233.
- Bautista Chávez L. (2009). *biopolímeros útiles, factores tecnológicos y de formulación y su aplicación en un fármaco hidrosoluble*. FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA. Lima-Peru: UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.
- Bhardwaj N., Kundu S.C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 325-347.
- Cao G. (2004). *Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties & applications*. London: Imperial College Press.
- Chalewler S., Nuchuchua O., Saesoo., Gonil P., Rungsardthong U., Sajomsang W., Pimpha N., (2011). Effect of citrate spacer on mucoadhesive properties of novel water-soluble cationic β -Cyclodextrin-conjugated chitosan. *Carbohydrate Polymers*(84), 186-194.

- Chen H., Huang J., Yua J., Liuc S., Gud P.,. (2011). Electrospun chitosan-graft-poly (ε-caprolactone)/poly (ε-caprolactone) cationic nanofibrous mats as potential scaffolds for skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13-19.
- Damgé C., Maincent P., & Ubrich N. (2007). Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *Journal of Controlled Release*, 117, 163-170.
- Damgé C., Maincent P., & Ubrich N. (2007). Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *Journal of Controlled Release*, 117, 163-170.
- Dash K.P., Badireenath Konkimalla V. (2012). Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*.
- Dasha M., Chiellini F., Ottenbriteb R.M, Chiellini E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 981-1014.
- De Kesela C., Lefe`vrea C., Nagyb J.B., & David C. (1999). Blends of polycaprolactone with polyvinylalcohol: a DSC, optical microscopy and solid state NMR study. *Polymer*, 40, 1969–1978.
- Dodziuk H. (2006). *Cyclodextrins and their complex: Chemistry, Analytical methods, applications*. Wiley-Vch.
- Easton C.J., Lincoln S.F.,. (1999). *Modified Cyclodextrins: scaffolds and templates for supramolecular chemistry*. Farrer Road, Singapore: Imperial College Press.
- Fröming K.H., Szejtli J. (1994). *Cyclodextrins in pharmacy*. Dordrecht, The Netherland: Kluwer Academic Publisher.
- Ghasemi-Mobarakeha L., P. M. (2010). Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 30(8), 1129-1136.
- Gilmanl J.W., VanderHart D.L., & Kashiwagi T. (1994). Thermal Decomposition Chemistry of Poly(vinyl alcohol) Characterization and Reactions with Bismaleimides. En A. S. 599, *ire and PoLymers II: Materials and Test for Hazard Prevention* (págs. 161-185). Washington, DC: American Chemical Society.

Gyoung Kim T., Sung Lee D., & Gwan Park T. (2007). Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene oxide). *International Journal of Pharmaceutics*, 338, 276-283.

Gyoung Kima T., Sung Lee D., & Park T. (2007). Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly(caprolactone) and poly(ethylene oxide). *International Journal of Pharmaceutics*, 338, 276-286.

Han J., Li X. (2011). Chemoenzymatic Syntheses of sialyl Lewis X-Chitosan conjugates as potential anti-inflammatory agent. *Carbohydrate Polymers*(83), 137-143.

Hartman O., Zhang C., Adams E., Farach-Carson M., Petrelli N., Chase B., & Rabolt J. (2010). Biofunctionalization of electrospun PCL-based scaffolds with perlecan domain IV peptide to create a 3-D pharmacokinetic cancer model. *Biomaterials*, 31, 5700-5718.

Heang Oha S., Kyu Parka Il., Man Kimb J., & Ho Lee J. (2007). In vitro and in vivo characteristics of PCLscaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials*, 28, 1664-1671.

Hoerstrup S., Lu L., Lysaght M., Mikos A., Rein D., Schoen F., Temenoff J., Tessmar J. and Vacanti J.P. (2004). Tissue Engineering. En H. A. Ratner B., *BIOMATERIALS SCIENCE: An Introduction to Materials in Medicine* (págs. 709-711). San Diego, California: Elsevier inc.

Hong S., & Kim G. (2011). Fabrication of electrospun polycaprolactone biocomposites reinforced with chitosan for the proliferation of mesenchymal stem cells. *Carbohydrate Polymers*, 83, 940-946.

Houde S., Xiufeng X., & Rongfang L. (2007). Preparation and characterization of polycaprolactone-chitosan composites for tissue engineering applications. *Journal of material science*, 42, 8113-8118.

Hozumi K., Otagiri D., Yamada Y., Sasaki A., Fujimori C., Wakai Y., Uchida T., Katagiri F., Kikkawa Y., Nomizu M. (2010). Cell surface receptor-specific scaffold requirements for adhesion to laminin-derived peptide–chitosan membranes. *Biomaterials*, 31, 3237-3243.

Huanga C., Chena R., Kea Q., Morsic Y., Zhanga K., Moa X. (2011). Electrospun collagen–chitosan–TPU nanofibrous scaffolds for tissue engineered tubular grafts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 307-315.

Hyung Kim G., & Gon Son J. (2009). 3D polycaprolactone (PCL) scaffold with hierarchical structure fabricated by a piezoelectric transducer (PZT)-assisted bioplotter. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 4, 781-785.

Jayakumar R., Prabakaran M., Sudheesh P.T., Nair S.V., Tamura H. (2011). Biomaterial based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 10.1016.

Jayakumara R., Menona D., Manzoora K., Naira S.V, Tamurab H. (2010). Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate Polymers*, 227-232.

Jiankang H., Dichen L., Yaxiong L., Bo Y., Hanxiang Z., (2009). Preparation of chitosan–gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 5, 453-461.

Jun Y., Lingling H., & Baojing Y. (2011). Thermal Degradation Mechanism and Pyrolysis of the Polycaprolactone. *Science and Technology Review*, 29 (07), 58-61.

Ki C., Lee, I., U., Y., P., K., B., & Gang, K. (2005). Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. *Polymer*, 46, 94–102.

Kim B., Park I., Jiang H., Choi Y., Akaike T.,. (2010). Design of Artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 10.1016.

Kim I., Seo S, Moon H.S., Yoo M.K., Park I.Y., Kim B.S., Cho C.S. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26, 1-21.

Kim M.S., Lee J.H., Joo Kim S., & Shin H. (2011). Composite fibrous matrices prepared by electrospinning with various volumes to control the amount of immobilized basic fibroblast growth factors and its in vitro bioactivity. *Journal of Controlled Release*, 149-151.

- Kumbar S.G, James R., Nukavarapu S.P., Laurencin C.T., (2008). Electrospun nanofiber scaffolds:engineering soft tissues. *Biomedical Materials*, 1-15.
- Liang D., Hsiao B.S ,Chu B.,. (2007). Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical application. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1392-1412.
- Longxiao L., Suyan Z. (2007). A study on the supramolecular structure of inclusion complex. *Carbohydrate Polymers*, 472-476.
- Luciani A., Coccoli V., Orsi S., Ambrosio L., & Netti P. (2008). PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles. *Biomaterials*, 29 , 4800–4807.
- Luong-Vana E., Grøndahla L., Ngiap Chuad K., Leong K., Nurcombe V., & Cool S. (2006). Controlled release of heparin from poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers. *Biomaterials*, 27, 2042-2050.
- Mohamed A., Sherald V., Gordon F., Biresaw G., Debra P., & Rayas-Duarte P. (2008). Thermal Properties of PCL/Gluten Bioblends Characterized by TGA, DSC, SEM, and Infrared-PAS. *Journal of Applied Polymer Science*, 110, 3256-3266.
- Montgomery C. (1991). *Diseno y Analisis de experimentos*. Belmont, California: Wadsworth international/ iberoamerica.
- Mukerjee A., Sinha V.R., & Pruthi V. (2007). Preparation and Characterization of Poly- ϵ -caprolactone Particles for Controlled Insulin Delivery. *Journal of Biomedical & Pharmaceutical Engineering*, 1, 40-44.
- Mukerjee A., Sinha V.R., Pruthi V. (2007). Preparation and Characterization of Poly- ϵ -caprolactone Particles for Controlled Insulin Delivery. *Journal of Biomedical & Pharmaceutical Engineering*, 40-44.
- Nagarajan R., Drew C., & Mello C.M. (2007). Polymer–Micelle Complex as an Aid to Electrospinning Nanofibers from Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem. C*, 111 (44), 16105–16108.

Neamnark A., Sanchavanakit N., Pavasant P., Rujiravanit R., & Supaphol P. (2008). In vitro biocompatibility of electrospun hexanoyl chitosan fibrous scaffolds towards human keratinocytes and fibroblasts. *European Polymer Journal*, 44, 2060-2067.

Panta H., Neupane M., Panta B., Panthia G., Ohd H., Leec M.H., & Kim H.Y. (2011). Fabrication of highly porous poly (ε-caprolactone) fibers for novel tissue scaffold via water-bath electrospinning. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88, 587-592.

Pattarapond Gonil, Warayuth Sajomsanga, Uracha Rungsardthong Ruktanonchai, Nuttaporn Pimpha, Issara Sramal, Onanong Nuchuchu, Somsak Saeso, Saowaluk Chaleawlerumpon, Satit Puttipipatkachorn. (2011). Novel quaternized chitosan containing B-cyclodextrin moiety: Synthesis, characterization and antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 905-913.

Prabaharan M., Gong S. (2008). Novel thiolated carboxymethyl chitosan-g-b-cyclodextrin as mucoadhesive hydrophobic drug delivery carriers. *Carbohydrate Polymers*, 73, 117-125.

Prabaharana M., Jayakumarb R. (2009). Chitosan-graft-B-cyclodextrin scaffolds with controlled drug release capability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44, 320-325.

Ragaseema V., Rosemary M., Nandkumar M., Krishnan K., & Krishnan L.K. (2009). Silver nanoparticle impregnated polycaprolactone scaffolds: optimization of antimicrobial and non-cytotoxic concentrations. *Tissue Engineering Part A*, 1-27.

Raj Panta H., Prasad Neupane M., Panta ., Panthia G., & Ju Ohd H. (s.f.).

Ribeiro Neto W.A., Pereira H., Ayres E., de Paula A., Averous L., Góes A., . . . R.S., S. B. (2012). Influence of the microstructure and mechanical strength of nanofibers of biodegradable polymers with hydroxyapatite in stem cells growth. Electrospinning, characterization and cell viability. *Polymer Degradation and Stability*, 48, 1-15.

Sáez V., Hernáez E., Angulo L., & Katime I. (2004). LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS. MICROPARTÍCULAS. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 88-101.

- Sajeesh S., Sharma C. (2006). Cyclodextrin–insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 325, 147-154.
- Sajomsang W. (2011). Self-aggregates formation and mucoadhesive property of water-soluble B-cyclodextrin grafted with chitosan. *Biological Macromolecules*.
- Sashiwa H., Aiba S. (2004). Chemically modified chitin and chitosan as biomaterial. *Progress in polymer science*, 29, 887-908.
- SedaTigli R., Gümüderelioglu M. (2008). Evaluation of RGD- or EGF-immobilized chitosan scaffolds for chondrogenic activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 121-128.
- Shalumon K.T., Anulekha K.H., Girish C.M., Prasanth R., Nair S.V., & Jayakuma R. (2010). Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture. *Carbohydrate Polymers*, 80, 413-419.
- She H., Xiao X., Liu R. (2007). Preparation and characterization of polycaprolactone-chitosan composites for tissue engineering applications. *Journal of Material Science*, 42, 8113-8119.
- Sona W.K., Youk J.H., Leec T., & Park W. (2004). The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*, 45, 2959-2966.
- Su T., Jiang H., & Gong H. (2008). Thermal Stabilities and the Thermal Degradation Kinetics of Poly(ϵ -Caprolactone). *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 47:4, 398-403.
- Suh J.K., Matthew H. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21, 2589-2598.
- Tafazzoli M., Ghiasi M. (2009). Structure and conformation of a-, b- and c-cyclodextrin in solution: Theoretical approaches and experimental validation. *Carbohydrate Polymers*.

Teng M., Li F., Zhang B.,Taha A.,. (2011). Electrospun cyclodextrin-functionalized mesoporous polyvinyl alcohol/SiO₂ nanofiber membranes as a highly efficient adsorbent for indigo carmine dye. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 229-234.

Terrazas Reza R., Martínez Pérez C.A, Rodríguez González C.A., Monreal Romero C., García Casillas P.E.,. (2010). Effect of the polymeric coating over Fe₃O₄ particles used for magnetic separation. *Central European Journal of Chemistry*, 1041-1046.

Van der Schueren L., De Schoenmaker B., Kalaoglu O., & De Clerck K. (2011). An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone. *European Polymer Journal*, 47, 1256-1263.

Wang, Y., Rodriguez-Perez, M. A., Reis, R., & Mano, J. (2005). Thermal and Thermomechanical Behaviour of Polycaprolactone and Starch/Polycaprolactone Blends for Biomedical Applications. *Macromolecular Materials and Engennering*, 792-800.

Williamson M.R, & Coombes A.G. (2004). Gravity spinning of polycaprolactone fibres for applications in tissue engineering. *Biomaterials*, 25, 459-465.

Wise S., Byrom M., Waterhouse A., Bannon P., Ng M., & Weiss A. (2011). A multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft with tailored mechanical properties. *Acta Biomaterialia*, 7, 295-303.

Yuan W., Tang X., Huang X., & Zheng S. (2005). Synthesis, characterization and thermal properties of hexaarmed star-shaped poly(3-caprolactone)-b-poly(D,L-lactide-co-glycolide) initiated with hydroxyl-terminated cyclotriphosphazene. *Polymer*, 46, 1701–1707.

Zhang C., Wen X.,Vyavahare N.,Boland T.,. (2008). Synthesis and characterization of biodegradable elastomeric polyurethane scaffolds fabricated by the inkjet technique. *Biomaterials*, 3781-3791.

Zhang J.,Ellsworth K., Ma P.X. (2010). Hydrophobic pharmaceuticals mediated self-assembly of β -cyclodextrin containing hydrophilic copolymers: Novel chemical responsive nano-vehicles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 116-123.

Zhang M., Wangb Z., Wang Z., Feng S., Xub H., Zhao Q., . . . Kong D. (2011). Immobilization of anti-CD31 antibody on electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffolds through hydrophobins for specific adhesion of endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85, 32-39.

Zhang X., Reagan M.R.,Kaplan D.L. (2009). Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 988-1006.

Zhang X., Zhan X., Wub Z., Gao X., Cheng C., Wang Z., Li C. (2011). A hydrotropic β -cyclodextrin grafted hyperbranched polyglycerol co-polymer for hydrophobic drug delivery. *Acta Biomaterialia*, 7, 585-592.

