Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias Marinas

Estudio de Nanofibras de Gelatina/Colágeno con Potenciales Aplicaciones Médicas y Biotecnológicas

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

DANIELLA ALEJANDRA POMPA MONROY

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO, 21 JULIO 2017

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR y BIOTECNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

Estudio de Nanofibras de Gelatina/Colágeno con Potenciales Aplicaciones Médicas y Biotecnológicas

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

DANIELLA ALEJANDRA POMPA MONROY

Aprobada por:

_____	_____
Dra. Irma Esthela Soria Mercado Co-directora de tesis	Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez Co-director de tesis
_____	_____
Dra. Ana Leticia Iglesias Sinodal	Dra. Amelia Portillo López Sinodal

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR y BIOTECNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

Estudio de Nanofibras de Gelatina/Colágeno con Potenciales Aplicaciones Médicas y Biotecnológicas

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

DANIELLA ALEJANDRA POMPA MONROY

Aprobada por:

Dra. Irma Esthela Soria Mercado
Co-directora de tesis

Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez
Co-director de tesis

Dra. Ana Leticia Iglesias
Sinodal

Dra. Amelia Portillo López
Sinodal

Agradecimientos

Le doy gracias a mis padres, por su paciencia y amor incansables, por permitirme soñar y realizar mis sueños, por alentarme cuando los creía inalcanzables; a mi Lola, por decirme desde siempre que era única y diferente, por nunca dejarme compararme con nadie más y a mi pá, por sus palabras de aliento, por siempre estar dispuesto a ayudarme, aunque eso implicará manejar horas y horas para llevarme a casa. Ustedes son la base de todo lo que soy, de nuevo. Gracias.

A mis hermanos Jorge y Lizett, por todos los momentos de compartimos y ser mis compañeros de vida, por darme unos sobrinos bien lindos y enfadosos y hasta por reírse de mi por ser la nerd de la familia. Gracias.

A Irvin, porque no importa a donde vayamos o los obstáculos que se presenten en el camino, durante todo este tiempo me has demostrado que cuando se quiere se puede, por dejarme volar tan alto como he deseado y siempre estar para mí cuando vuelvo, por escuchar todas esas cosas raras que probablemente no entiendes, pero amablemente me dices que sí, gracias.

A mis amigas Estephanie, Ana e Imer porque, aunque no nos veamos tanto y las circunstancias nos separan, siempre habrá un lazo que nos une. Por las comidas, los tragos y sobre todo las risas, por entenderme. Gracias.

A mis directores de tesis, Dr. Luis Villarreal por confiar en mí para ser su primera alumna de maestría, por su apoyo y su trabajo, por tener paciencia con la revisión de tesis y comprender siempre que algo ocurría. Por todo el aprendizaje conjunto, y por más que otra cosa ser un amigo siempre dispuesto a

dar un consejo, porque en este laboratorio tenemos la filosofía del ¡Y! no del ¡O!; Dra. Irma Soria, por su amabilidad indiscutible, por abrirme las puertas de su laboratorio y por supuesto del posgrado, porque gracias a usted y sus alumnos Fátima y Héctor a los que también agradezco por su paciencia y consejos, aprendí a realizar nuevos procedimientos que me han hecho crecer mucho. Por su calidad humana a ambos Muchas Gracias.

A mis sinodales. Dra. Ana Iglesias y Dra. Amelia Portillo, por su disponibilidad y su tiempo, Muchas Gracias.

A la Universidad Autónoma de Baja California, por hacerme sentir orgullosa de ser una estudiante Cimarrón y brindarme la oportunidad de realizar este posgrado.

Al Instituto de Investigación en Materiales, en especial al Dr. Ricardo Vera por acogerme como una alumna más durante mi estancia y optimizar los recursos de manera que se pudieran obtener los mayores resultados en la menor cantidad de tiempo, también agradezco a la Dra. Eriseth Morales y Dr. Omar Novelo por su ayuda en el desarrollo de los análisis de caracterización.

Por último, al CONACyT, porque sin el apoyo económico de esta institución esto no podría haberse realizado.

Por qué este trabajo es la suma acumulada de muchos esfuerzos, a todos ¡Muchas Gracias!

Tabla de Contenidos

Preliminares

Lista de Figuras 1

Lista de Tablas 3

Lista de Abreviaturas 4

Capitulo I. Introducción General

Resumen 5

I. Introducción 7

II. Estado del Arte 11

II.1. Quemaduras 11

II.2. Tratamientos 13

II.3. Biomateriales y Biopolímeros 14

II.3.1. Colágeno (COL) 15

II.3.2. Gelatina (GEL) 16

II.4. Electrohilado 18

II.4.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) 19

II.4.2. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) 20

II.4.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) 20

II.4.4. Análisis Termogravimétrico (TGA) 21

II.5. Cultivo Celular 21

II.5.1. Fibroblastos Humanos (HFF-1) 222

III. Antecedentes 23

III.1. Electrohilado de GEL 25

III.2. Electrohilado con COL 39

III.3. Electrohilado Polimérico con el sistema GEL/COL 46

IV. Hipótesis 49

V. Objetivo General 49

V.1. Objetivos Específicos 49

Capítulo II. Síntesis de Andamios Electrohilados de Gelatina y Colágeno

VI. Metodología 50

VI.1. Preparación de Mezclas Poliméricas 50

VI.2. Electrohilado 51

VI.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) 52

VI.4. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) 52

VI.5. Análisis Termogravimétrico (TGA) 53

VI.6. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) 53

VI.7 Proliferación Celular en Fibroblastos Humanos (HFF-1) 54

Capítulo III. Resultados y Discusión General

VII. Resultados 55

VII.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) 55

VII.2. Análisis Termogravimétrico (TGA) 60

VII.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) 62

VII.4. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) 63
VII.7. Proliferación Celular en Fibroblastos Humanos (HFF-1) 65
VIII. Discusión 68
VIII.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) 68
VIII.2. Análisis Termogravimétrico (TGA) 70
VIII.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) 71
VIII.4. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) 72
VIII.4.1. Ácido acético 72
VIII.4.2. Amida A 73
VIII.4.3. Amida B 74
VIII.4.4. Amida I 74
VIII.4.5. Amida II 75
VIII.4.6. Amida III 75
VIII.5. Proliferación Celular en Fibroblastos Humanos 76
IX. Conclusiones 78
X. Recomendaciones 79
XI. Trabajo a Futuro 80
XII. Literatura Citada 81

Lista de figuras

Figura 1. Esquema de electrohilado/electroespray con soluciones poliméricas. 9

Figura 2. Modelo de apósito cutáneo explosionado con sus partes creadas en SolidWorks. 10

Figura 3. Tipos de Quemaduras. 12

Figura 4. Estructura de una hebra de Colágeno e imagen 3D. 16

Figura 5. Estructura del GEL con aminoácidos cargados a pH 4.8 (ácido acético). 18

Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología 50

Figura 7. Micrografías con SEM de la muestra GEL15 a 25, 000 x, 10, 000 x y 5000x. 55

Figura 8. Micrografías con SEM de la muestra GEL/COL1 a 25, 000 x, 10, 000 x y 5000x. 56

Figura 9. Micrografías con SEM de la muestra GEL/COL5 a 25, 000 x, 10, 000 x y 5000x. 57

Figura 10. Micrografías con SEM de la muestra GEL/COL10 a 25, 000 x, 10, 000 x y 5000x. 58

Figura 11. Porcentaje y desviación estándar del diámetro de porosidad de las fibras hechas con GEL y COL. 59

Figura 12. Porcentaje y desviación estándar de la porosidad de las fibras construidas con GEL y COL. 60

Figura 13. Análisis termogravimétrico en relación al porcentaje de peso de los diferentes GEL y COL. 61

Figura 14. Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido con las diferentes mezclas de GEL y COL. 62

Figura 15. Análisis comparativo de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de las diferentes mezclas electrohiladas de GEL y COL. 64

Figura 16. Disposición de muestras en placa de 96 pocillos antes de agregar MTT. 66

Figura 17. Revelado de las muestras a los 2 días de incubación. 66

Figura 18. Porcentaje de proliferación celular con fibroblastos humanos a los dos y cinco días con diferentes porcentajes de GEL-COL. 66

Lista de Tablas

Capítulo I. Introducción General

Tabla I. *Uso de gelatina y colágeno en aplicaciones biomédicas.* 48

Tabla II. *Grupos funcionales apreciables en FTIR.* 63

Lista de Abreviaturas

GEL	Gelatina
COL	Colágeno
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido SEM (por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscope*)
FTIR	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (por sus siglas en inglés *Fourier transform infrared spectroscopy*)
TGA	Análisis Termogravimétrico (por sus siglas en inglés *Thermogravimetric analysis*)
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido (por sus siglas en inglés *Differential scanning calorimetry*)
kV	Kilovoltio
DMSO	Dimetil Sulfóxido
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
Pa	Pascales
p/p	Peso sobre peso
p/v	Peso sobre volumen
v/v	Volumen sobre volumen
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
HEC	Hidroxietilcelulosa
PVAL	Poli (vinil alcohol)
PBS	Buffer Fosfato Salino (por sus siglas en inglés *phosphate buffered saline*)
DMEM	Medio Eagles Modificado de Dulbecco (por sus siglas en inglés *Dulbecco´s Modified Eagles Medium*)

Introducción general

RESUMEN

Una de las principales complicaciones que puede presentar una persona con quemaduras de segundo y tercer grado es la posibilidad de infectarse por bacterias o virus oportunistas que se encuentran en el ambiente. En la actualidad la mayoría de los siniestros por quemaduras son tratados con gasas convencionales lo que involucra una alta probabilidad de infección y dolor para el paciente que es tratado con este método. Con el propósito de obtener andamios de bajo costo se utilizaron polímeros que son abundantes, como lo son la gelatina (GEL) y el colágeno (COL). La GEL funciona como un andamio base; estable y flexible que presenta biocompatibilidad por tratarse de un subproducto de la hidrólisis parcial del COL, este último es un componente indispensable para la estabilidad de la membrana celular y está presente en gran medida en el epitelio humano. Las soluciones poliméricas fueron electrohiladas con diversas mezclas de GEL y COL, y posteriormente se realizó una caracterización química de las membranas producidas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Análisis Termogravimétrico (TGA). Para finalizar se realizó un ensayo de proliferación celular en fibroblastos humanos HFF-1. Se obtuvieron nanofibras de diámetros menores a los 250 nm, sin defectos y estables a temperatura ambiente y corporales pues se encontró que su temperatura de degradación es mayor a los 350°C para todas las muestras, aunado a esto no se encontraron cambios en la composición química de los

polímeros, por lo que podemos decir que el proceso de electrohilado no interfiere con las propiedades de estos, los cambios mínimos de amplitud de la absorbancia arrojados por el ensayo FTIR, podrían ser debido a un cambio en la estructura tridimensional de las proteínas por la utilización de un solvente ácido. Por otro lado, el ensayo de proliferación celular en fibroblastos arrojó que la proliferación celular aumenta conforme pasan los días, de 50% para dos días y de casi un 75% para los cinco días, sin diferencias significativas para ninguna de las muestras. Los resultados de esta investigación dieron lugar a nanofibras sin defectos estables químicamente a altas temperaturas que en un futuro podrían tener aplicaciones en el campo de la biotecnología y medicina.

Palabras Clave: Apósitos cutáneos, electrohilado polimérico, gelatina, colágeno, bioactividad.

I. INTRODUCCIÓN

Las personas con quemaduras de segundo y tercer grado, así como las que sufren de ulceraciones cutáneas, sufren de infecciones bacterianas puesto que la piel y mucosas son la primera defensa del cuerpo a agentes extraños, y en estos casos se encuentra disminuida. Al perderse la flora normal en el área que sufrió el siniestro la colonización por bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus, Pseudomona aeruginosa* y *Baumannii acinetobacter* se vuelve más probable, puesto que el exudado de la herida es rico en proteínas y metabolitos que constituyen un cultivo ideal para dichos microorganismos; también es importante mencionar que este tipo de bacterias han generado resistencia a antibióticos. Aunado a esto la llegada de las defensas del cuerpo y antibióticos sistémicos también se ve disminuida (Bahemia *et al.*, 2015).

Las heridas por quemaduras o laceraciones comúnmente son tratadas con apósitos cutáneos, con el propósito de minimizar el contacto del medio ambiente con el epitelio del paciente. Entre ellos tenemos a los apósitos hidrocoloides que por su estructura gelatinosa permiten conservar la humedad necesaria para una cicatrización adecuada; así como la prevención del paso de bacterias, contaminantes y agua del ambiente. Sin embargo, cuando un paciente posee alguna infección estos apósitos son contraindicados, pues la infección puede proliferar y tener repercusiones en la salud del paciente, incluso provocando sepsis que causa el 47 % de las muertes por quemaduras (Moctezuma-Paz *et al.*, *2015).* Por lo tanto, en este trabajo se generó un apósito cutáneo con

propiedades antibacterianas que fue efectivo incluso cuando se presentó una infección por bacterias patógenas resistentes a antibióticos.

El *electrohilado* es una técnica utilizada para la producción de fibras a escala nanométrica, que se ha utilizado con anterioridad para la producción de apósitos cutáneos y gran variedad de andamios con interés biomédico que consiste en la inyección de una solución polimérica debidamente homogeneizada en un solvente de preferencia polar, sobre una base de un material conductor aplicando una corriente del orden de los kilovoltios (kV) de manera que se forme un cono de Taylor que permita la formación de fibras; Otra técnica muy utilizada es el *electroespray* que parte del mismo principio del electrohilado pero utilizando una solución que permita la formación de nanopartículas suspendidas en el solvente, de manera que estas queden depositadas sobre el colector (figura 1) (Velázquez-Barraza *et al.*, 2016).

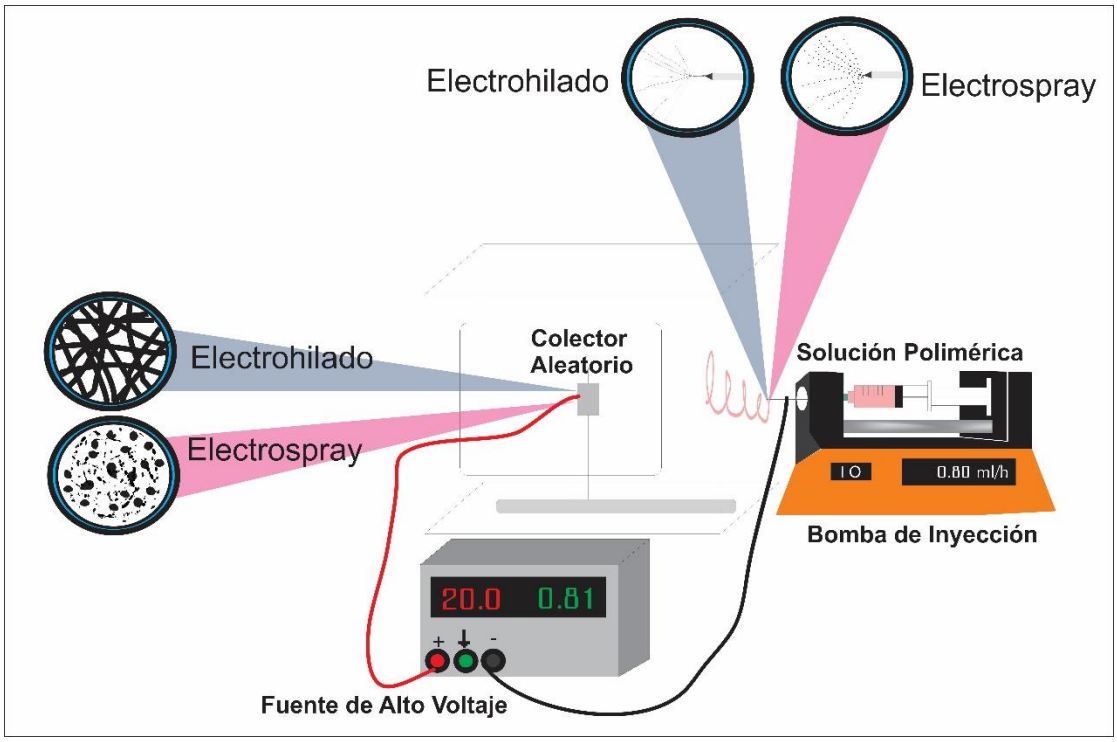

Figura 1. Esquema de electrohilado/electroespray con soluciones poliméricas.

Generalmente los polímeros utilizados en el electrohilado para aplicaciones biomédicas son biodegradables y biocompatibles de manera que puedan estar en contacto con medio fisiológico sin generar reacciones no deseadas. Entre ellos está el GEL, que es un polímero natural que se obtiene del colágeno (COL) que es una proteína obtenida del tejido conectivo de animales al ser hervido en agua, este polímero es de gran utilidad en el electrohilado por su facilidad para producir fibras de escala nanométrica independientemente de los cambios en la temperatura y humedad del ambiente, por este motivo se utilizó como base para la formación de membranas electrohiladas bioactivas.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue generar andamios electrohilados de COL y GEL. Estas membranas formaran parte de un modelo de apósito cutáneo bioactivo, que estará compuesto de una parte expuesta al ambiente con propiedades de permeabilidad al agua y agentes externos, con un componente que funcionara como absorbente del exudado de la herida y finalmente con varias capas de las membranas electrohiladas que sirvieron como andamio para la regeneración celular y contaron con COL disponible que funcionó como precursor del mismo desarrollo celular por ser parte indispensable para la estabilidad y flexibilidad de la membrana celular (figura 2).

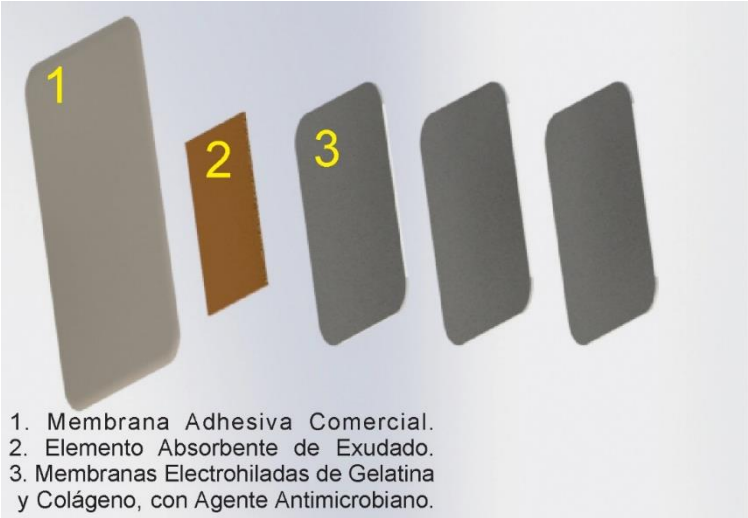

Figura 2. Modelo de apósito cutáneo explosionado con sus partes creado en SolidWorks.

II. ESTADO DEL ARTE

II.1. Quemaduras

Las quemaduras son un problema de salud muy importante, principalmente en países en vías de desarrollo; ocurren por contacto directo o indirecto con calor, corriente eléctrica, radiación o agentes químicos. Debido a sus consecuencias los individuos que sufren de estos siniestros pueden estar incapacitados por un periodo extendido de tiempo, además de esto las posibilidades de infección en una zona expuesta es un factor latente que debe considerarse. Existen tres niveles de quemaduras (figura 3): las quemaduras de primer grado, son aquellas en las que solamente se lastima la capa externa de la piel causando dolor, enrojecimiento e hinchazón; las de segundo grado, afectan la capa externa e interna, además de los síntomas de las quemaduras de primer grado se presenten ámpulas; y por último, las quemaduras de tercer grado, que llegan hasta las capas más profundas de la piel, en las que comúnmente no se experimenta dolor, sin embargo; la piel se llega ver blanquecina u oscura (Bope y Kellerman, 2016).

Figura 3. Tipos de Quemaduras.

El tratamiento médico de quemaduras de segundo y tercer grado es bastante caro, adicionalmente a este costo se suma el costo de rehabilitación y las pérdidas económicas de la persona afectada, pues la persona deja de laborar durante el proceso. Aunado a esto el 95 % de las quemaduras ocurren en países de bajos recursos y muchas de estas ocurren en niños, causando sufrimiento, discapacidad de por vida y muerte (Moctezuma-Páz *et al.,* 2015).

La muerte y discapacidad de por vida surgen debido a la incorrecta resucitación, infección del tejido y las contracturas de las quemaduras, estas pueden ser evitadas mediante tratamientos seguros, baratos y efectivos como los injertos de piel, antisepsia o el uso de una gran variedad de apósitos cutáneos (Sadideen *et al.*, 2017).

II.2. Tratamientos

Los tratamientos para las quemaduras de segundo y tercer grado son variados, desde el cubrimiento con gasas convencionales de algodón a membranas más especializadas como Biobrane (membrana de nylon, recubierta de una membrana impermeable) (Schiefer *et al.*, 2017). Generalmente se aplica un agente antimicrobiano tópico en la herida después de una limpieza exhaustiva de esta, seguido de la colocación de un apósito estéril seco, de tratarse de heridas que tienen gran cantidad de exudado se aplican apósitos hidrocoloides (gelificantes) que sean capaces de absorber el desecho.

El uso de agentes antimicrobianos es común en el tratamiento de quemaduras, para evitar la septicemia causada por bacterias que comúnmente se encuentran sobre la piel y en el ambiente. El reciente aumento en la bioingeniería ha resultado en el desarrollo de nuevos productos particularmente útiles en el tratamiento de las quemaduras de espesor parcial, dejando de lado los aloinjertos que se utilizaban con anterioridad los cuales tenían el inconveniente de ser rechazados por el paciente o los autoinjertos que requieren dos cirugías una para obtener un injerto de piel de una parte sana del paciente y otra para su colocación, sumando así al tiempo de recuperación y a la comodidad del afectado.

Los nuevos apósitos cutáneos que hacen uso de la biotecnología son una opción prometedora para acelerar la cicatrización, presentar propiedades antimicrobianas, reducir el dolor, etc. Ejemplos de esto son los apósitos de Aquace-CinvaTec/Bristol-Myers, que tienen una hidrofibra de carboximetil-

celulosa, que puede usarse en el tratamiento de heridas parciales, también existen matrices de COL y beta-glucano que ofrecen una cobertura temporal de las heridas, matrices de péptidos de ácido aspártico-glicina-arginina que promueve la cicatrización de la dermis, pues provoca un andamio para el crecimiento de las células y una proliferación celular normal, otra opción es el uso de apósitos típicos con miel y plata, como opción antibacteriana en el tratamiento de quemaduras, sin embargo; existen algunas dudas sobre el uso de plata como agente antibacteriano pues también esta reportado que este retrasa la cicatrización de la herida (Aziz y Razol, 2017, Atiyeh *et al.*, 2005).

II.3. Biomateriales y Biopolímeros

Un biomaterial es cualquier sustancia ya sea natural o sintética que al estar presente con un sistema biológico cubre funciones que se realizan normalmente en el sistema, presenta biocompatibilidad y en la mayoría de los casos es biodegradable. Estos se pueden clasificar según su composición química, en biometales, biopolímeros, biocerámicos, biocompuestos y semiconductores; en este trabajo se enfocó a los biopolímeros (Place *et al.*, 2008, Lutolf y Hubbell, 2005).

Los polímeros biocompatibles (o sea que presentan actividad biológica), se pueden obtener de fuentes naturales o sintéticas y al ser introducidos en un sistema biológico se consideran biopolímeros. Estos pueden ser polímeros naturales (celulosa, COL, etc.) o polímeros sintéticos (PVC, nylon, etc.). A lo largo del tiempo los biopolímeros han extendido su campo de acción entrando al ámbito

de la salud en áreas como: sistemas terapéuticos farmacéuticos (liberación de fármacos, enzimas, etc.) y en dispositivos biomédicos (stents, microdispositivos, músculos bioartificiales, electrodos, etc.). Por sus propiedades los biopolímeros son perfectos candidatos para la regeneración celular (Rojas-Cortés *et al.*, 2008).

II.3.1. Colágeno (COL)

El COL es una familia de proteínas fibrosas que se encuentran en todos los animales multicelulares. Está ampliamente distribuido en casi todos los órganos vertebrados y es el principal elemento estructural de la piel, los huesos, los tendones, el cartílago, los vasos sanguíneos, los dientes y la córnea. Tiene excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad y antigenicidad débil. Por lo tanto, tienen una amplia gama de aplicaciones tales como películas biodegradables, apósitos cutáneos, implantes, en la industria cosmética, alimenticia, farmacéutica, entre otras (Gelse *et al.*, 2003).

Tradicionalmente el COL ha sido extraído de fuentes como tendones, ligamentos y piel de animales como el cerdo, bovino, rata, conejo o hueso descalcificado, sin embargo; muchos de estos son portadores de enfermedades que se pueden transmitir al humano o no ser sociablemente aceptables, por esta razón se han buscado nuevas alternativas para su extracción, una de estas es la extracción del COL de piel y huesos de pescado (Zhang *et al.*, 2016, Kuttappan *et al.*, 2016).

Al ser una proteína natural el COL de pescado está compuesto por aminoácidos, con una gran proporción de glicina de hasta un 33 %, también

posee una gran cantidad de diversos aminoácidos hidroxilados como lo son hidroxiserina, hidroxilisina y treonina, en comparación con el COL extraído del cerdo, el COL de pescado tiene un contenido mayor de metionina, pero conserva una baja cantidad de tirosina e histidina (Parenteau-Bareil *et al.*, 2010).

El COL posee una estructura tridimensional formado por una alfa hélice con alrededor de 3 residuos entre cada giro y al unirse tres hélices se forma una estructura superenrollada que le da rigidez y estabilidad (figura 4). Se ha reportado el electrohilado de este polímero siempre con la ayuda de un polímero base, pues al saturar el sistema de COL hidrolizado, las membranas se vuelven quebradizas pues este pierde sus propiedades de flexibilidad.

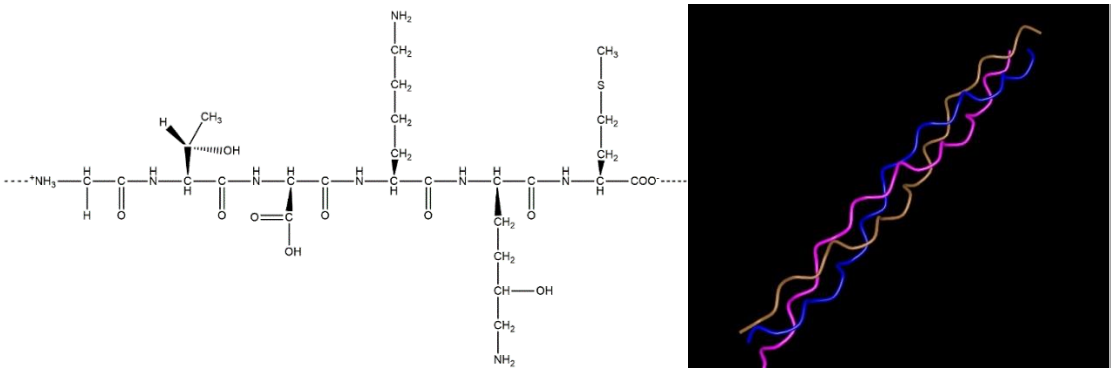

Figura 4. Estructura parcial de una hebra de Colágeno e imagen 3D de un péptido de Colágeno

(Extraído de: Motooka *et al.*, 2012)

II.3.2. Gelatina (GEL)

La GEL es producida mediante la hidrólisis parcial del COL obtenido de la piel de cerdo (50 % de la producción mundial) mediante un proceso de baños

ácidos y tratamientos térmicos (50-90°C). A menudo, se añaden agentes blanqueadores tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para aclarar la GEL que se vuelve amarilla o marrón durante la etapa de extracción. Los azúcares y otras moléculas como los lípidos pueden extraerse al mismo tiempo que el COL y por lo tanto pueden reaccionar con los aminoácidos a través de la reacción de Maillard. Aunque este biopolímero ha sido objeto de numerosas publicaciones, su estructura y composición no está bien definida. De hecho, existen controversias en la literatura (Duconseille *et al.*, 2017, Duconseille *et al.*, 2015).

Entre sus características biológicas podemos encontrar la biodegradabilidad, la no toxicidad, la biocompatibilidad y la no antigenicidad en condiciones fisiológicas. Por otra parte, la GEL tiene muchos sitios de unión de integrina que facilitan la adhesión y la diferenciación de las células vivas. Por estas razones, la GEL se ha utilizado como un biopolímero seguro y económico en la preparación y desarrollo de diversos productos biomédicos utilizados para la ingeniería de tejidos, el vendaje de heridas y la administración de fármacos. Hoy en día, las nanofibras de GEL por electrohilado pueden fabricarse económicamente como estructuras porosas tridimensionales que exhiben buenas propiedades estructurales y químicas que imitan a las de la matriz extracelular (Morsy *et al.*, 2017).

La naturaleza macromolecular de la GEL produce viscosidad en solución. La viscosidad de este biopolímero cambia debido al peso molecular, el aumento de concentración o la disminución de la temperatura. Este biopolímero es soluble en agua caliente (arriba de 40 °C), ácido acético y solventes fluorados, sin

embargo, no tiene una buena solubilidad en agua fría o etanol ni tampoco en la mayoría de los solventes orgánicos. Esta solubilidad cambiará entonces dependiendo de la temperatura, el tamaño de partícula y su concentración. El GEL se compone de aproximadamente 85 % de residuos aminoácidos (Figura 5).

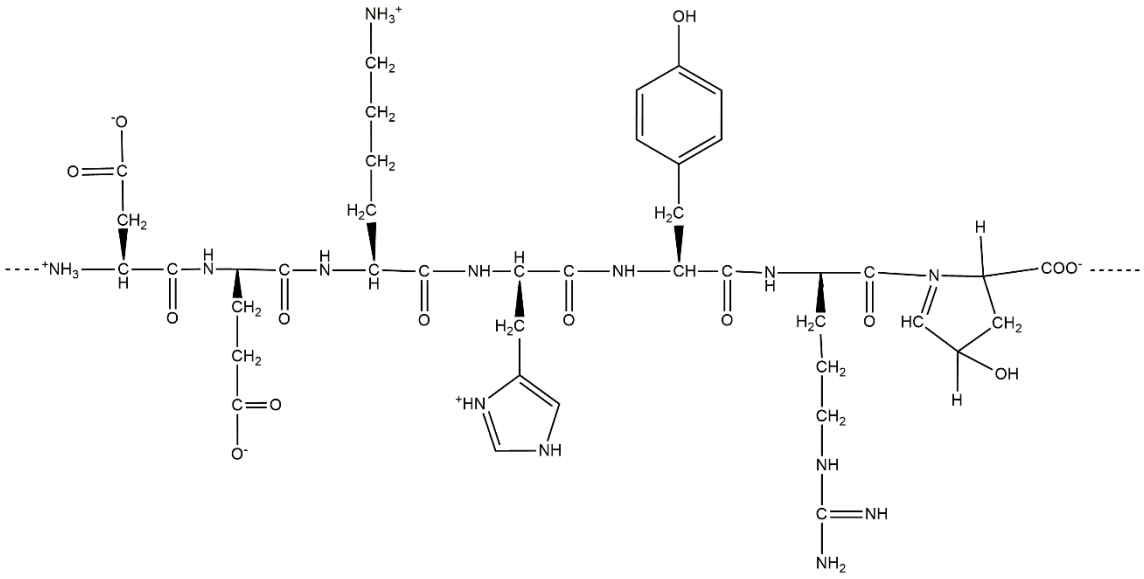

Figura 5. Estructura del GEL con aminoácidos cargados a pH 4.8 (ácido acético).

II.4. Electrohilado

El electrohilado es una técnica utilizada desde la década de los ochenta en la industria textil, esta permite obtener fibras muy delgadas de un amplio rango de materiales biopoliméricos. Esta técnica consiste en utilizar una fuente de alto voltaje con el fin de producir un campo electroestático que cambie la polaridad de una solución polimérica, induciendo de esta forma la eyección del líquido mediante un cono que llega al otro lado del campo electroestático y se deposita

en un colector en forma de fibras extremadamente delgadas del orden de los micrómetros e incluso nanómetros. La solución polimérica generalmente es mezclada con un solvente que al momento que es expulsada esta se evapora, dejando que el polímero se solidifique sobre el colector. Las soluciones utilizadas pueden tener distintos componentes además del solvente y el polímero, dependiendo de la aplicación para la cual la fibra se utilizará, como fármacos, precursores, enzimas, etc. (Mendes *et al.*, 2017, Haider *et al.*, 2015, Ahmed *et al.*, 2015).

Para evaluar la calidad de las fibras se utilizan diversos estudios de caracterización química y biológica, los utilizados en este estudio se describen a continuación.

II.4.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscope*), es capaz de ofrecer al usuario imágenes detalladas de la estructura y morfología de la superficie de las muestras. Funciona a partir de un haz de electrones que bombardea a la muestra en forma de barrido, para poder visualizar las muestras orgánicas o bien biológicas, se requiere del uso de un recubrimiento de un material conductor, comúnmente de oro; ya que el choque de los electrones en el material conductor es lo que detecta el microscopio y se procesa por medio de un programa informático.

II.4.2. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja por la transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés, *Fourier Transform infrared spectroscopy*) permite conocer la composición de sólidos, líquidos y gases. Se utiliza principalmente para la identificación de materiales y la confirmación de la síntesis de materiales desconocidos. La información se despliega en forma de picos de absorbancia en contra de la longitud de onda, estos picos son específicos para cada interacción química entre elementos, lo que permite la discriminación entre materiales. Esta espectroscopia es ampliamente utilizada en aplicaciones químicas, como lo son la identificación de polímeros y compuestos orgánicos (Cesteros-Iturbe, 2005).

II.4.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC por sus siglas en inglés *Differential Scanning Calorimetry*) nos permite conocer el calor especifico a presión constante de las sustancias, los cambios de fase, así como la temperatura de transición vítrea T_g. En las pruebas DSC se necesita una retención especial de las velocidades de calefacción/enfriamiento seleccionadas ya que diferentes velocidades de calentamiento producen resultados diferentes para el flujo de calor y las temperaturas de cambio de fase, generalmente utilizando velocidades de calentamiento de 5-10 °C/min, en una atmósfera controlada (Itel *et al.*, 2017).

II.4.4. Análisis Termogravimétrico (TGA)

El Análisis Termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés *termogravimetric analysis)* permite comparar la pérdida de peso de una muestra salida y compararla con el tiempo y/o la temperatura. Se utiliza para caracterizar la pérdida de humedad y el contenido volátil de las muestras a analizar, también ha sido utilizado para obtener datos de descomposición térmica para extraer la cinética de pirólisis/desvolatilización (reacciones). La pirólisis es la descomposición térmica de carbón cuando el material volátil presente en el carbón se libera en forma gaseosa como CO, CO_2, CH_4, NH_3, H_2S y alquitrán. Dependiendo de temperatura y velocidad de calentamiento experimentada por la partícula, los productos de desvolatilización y su rendimiento puede variar (Jain *et al.*, 2017; Rodríguez y Villegas, 2012).

II.5. Cultivo Celular

Los estudios de cultivos celulares se realizan en superficies bidimensionales (2D) tales como placas de micro pocillos, matraces de cultivo de tejidos y placas de Petri debido a la facilidad, conveniencia y alta viabilidad celular del cultivo 2D. Estos sistemas de cultivo de células 2D convencionales han mejorado notablemente la comprensión de la biología celular básica, entre sus desventajas está el uso de un sustrato 2D. En el cuerpo, casi todas las células del tejido residen en una matriz extracelular que consiste en una membrana fibrosa tridimensional compleja con una amplia distribución de fibras y lagunas que proporcionan complejas señales bioquímicas y físicas, esto puede ser

fácilmente mimetizado por las fibras poliméricas utilizadas como andamios para la regeneración de tejido conectivo (fibroblastos) y epitelial (queratinocitos) de una herida por quemadura (Lee *et al.*, 2008).

II.5.1. Fibroblastos Humanos (HFF-1)

La línea celular de fibroblastos HFF-1 se estableció por la ATCC (American Type Culture Collection) en 2003 a partir del prepucio humano normal. El medio de base de esta línea celular es Medio Modificado Eagle de Dulbecco (DMEM). Para hacer el medio de crecimiento completo, se le añaden los siguientes componentes, suero fetal bovino a una concentración final de 15 %, bicarbonato de sodio, antibiótico y L-glutamina. Las células crecen en un ambiente húmedo y en presencia de 5 % de dióxido de carbono y a una temperatura de 37 °C (Freshney, 2016).

III. ANTECEDENTES

Las heridas de la piel son un importante problema de salud con altos costos. Sin embargo, los tratamientos actuales no son óptimos. La comprensión de la naturaleza de la comunicación intercelular ha estimulado a los científicos a investigar los factores de crecimiento o la incorporación de células madre a los los tejidos en las heridas en un intento para acelerar la curación (Yildirimer *et al.*, 2012).

La ingeniería de tejidos implica el uso de principios de ingeniería en el desarrollo de tejidos u órganos injertos. El concepto fundamental en la ingeniería de tejidos es combinar una matriz de soporte con células vivas y/o moléculas biológicamente activas para formar una construcción de tejidos que promueva la reparación y/o regeneración de tejidos. Las células aisladas necesitan algún tipo de estructura de soporte para crecer y formar nuevos tejidos. Las estructuras de soporte se denominan a menudo "andamios", en las que se utilizan biomateriales para imitar un microambiente específico. En este sentido, los andamios juegan un papel clave en acomodar a las células y dirigir su crecimiento en tejidos específicos. Se espera que el andamio desempeñe diversas funciones, incluyendo el soporte de colonización celular, migración, crecimiento y diferenciación. Por lo tanto, el desarrollo de una base de soporte adecuada para aplicaciones *in vitro* e *in vivo* de implantes es el punto clave para una terapia de trasplante de células exitosa, haciendo hincapié en la importancia de los andamios en la ingeniería de tejidos (Rana *et al.*, 2014).

Los apósitos terapéuticos avanzados que forman parte activa en la cicatrización de heridas crónicas para lograr una curación rápida y completa es un tema de investigación de gran interés en la actualidad. Existe un deseo de implementar estrategias novedosas para lograr una cicatrización rápida de las heridas debido al enorme gasto ecónomico que representa. Su importancia principal es por el uso que se le dará en el tratamiento de heridas crónicas incluyendo amputaciones, úlceras diabéticas y de piernas, úlceras de presión y heridas quirúrgicas y traumáticas (por ejemplo, accidentes y quemaduras) donde la inmunidad del paciente es baja y el riesgo de infecciones y complicaciones son altos. Los apósitos principales incluyen apósitos húmedos medicinales, substitutos de ingeniería tisular, apósitos biológicos basados en biomateriales, apósitos biológicos y derivados de origen natural, suturas medicadas y diversas combinaciones de las clases anteriores (Boateng y Catanzano, 2015).

Recientemente se ha estudiado ampliamente el electrohilado, por ser una técnica bien conocida para la fabricación de fibras a nanoescala, debido a sus diversas ventajas, tales como alta relación superficie-volumen, porosidad ajustable y facilidad de funcionalización de la superficie. Las fibras resultantes son extremadamente útiles para aplicaciones en los campos de ingeniería de tejidos, administración de fármacos y vendaje de heridas. Dado que la fibra de electrohilada imita la matriz extracelular de tejido en términos de escala y morfología, su potencial para ser utilizada como andamio es explorado continuamente por los investigadores, especialmente en el campo de la

ingeniería de tejido vascular, nervioso, óseo y tendón-ligamento. Además de las propiedades morfológicas, físicas y químicas, los andamios electrohilados se evalúan a menudo a través de diversos estudios celulares. Los investigadores han adoptado enfoques como la modificación de la superficie y la carga del fármaco para mejorar la propiedad y la función del andamio (Goh *et al.*, 2013).

Como se ha mencionado, la técnica de electrohilado ha sido usada como un método eficiente y accesible para la fabricación de nanofibras con una gran variedad de aplicaciones en los campos de la farmacéutica y medicina. Entre las aplicaciones más destacadas podemos observar los apósitos para heridas, sistemas de administración de fármacos o andamios de ingeniería de tejidos (Sajeev, *et al.*, 2008), en donde los polisacáridos animales como el quitosano, ácido hialurónico, heparina y colágeno, han sido estudiadas con esta técnica, estos compuestos son biopolímeros naturales con numerosas ventajas para aplicaciones biomédicas, tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, no antigenicidad y no toxicidad (Zhao *et al.*, 2014).

III.1. Electrohilado de GEL

En la ingeniería de tejidos, los materiales utilizados para la fabricación de andamios proporcionan un soporte estructural eficaz para promover la reparación de tejidos u órganos dañados a través de la simulación de los microambientes de matriz extracelular en las células madre. Un estudio planteó la hipótesis de que la simulación de los microambientes de matriz celular del periodoncio y los

complejos de la pulpa dental/dentina contribuirían a la regeneración de la raíz del diente. En este sentido, se fabricaron y se combinaron membranas electrohiladas de PLGA/GEL, con una matriz de dentina tratada y una matriz extracelular de pulpa dental GEL para regeneración del periodoncio y de la pulpa dental. Este estudio examinó en primer lugar las propiedades fisicoquímicas y biocompatibles tanto de las membranas GEL como de la matriz extracelular de pulpa dental *in vitro*, e investigó además la degradación de las membranas de GEL y la revascularización de la matriz extracelular de la pulpa dental *in vivo*. A continuación, se evaluó GEL el potencial de las membranas en la inducción odontogénica mediante co-cultivo con células madre dentales. Finalmente, se verificó la regeneración del periodonto y la regeneración de la pulpa dental/ dentina en la mandíbula de un cerdo en miniatura. Los resultados mostraron que los andamios de PLGA/ GEL poseen orientación de fibra alineada que guio a la proliferación celular mientras que la matriz extracelular de la pulpa dental preservó la estructura de fibra intrínseca y proteínas de la matriz extracelular. Es importante destacar que las membranas de GEL facilitaron la diferenciación odontogénica de células madre dentales *in vitro*. Al ser sembrados con células madre, los compuestos de sándwich (membranas de PLGA/GEL/matriz de dentina tratada/matriz extracelular de pulpa dental) generaron tejidos similares a raíces de dientes después de ser trasplantados en mandíbulas porcinas durante 12 semanas. En los tejidos tipo complejo de pulpa dental/dentina, la capa parecida a los odontoblastos columnares dispuestas a lo largo de la interfase entre la matriz predentina recién formada y los tejidos parecidos a la pulpa dental

en los que podían encontrarse vasos sanguíneos; En los tejidos parecidos a complejos de periodoncio, se generaron tejidos parecidos al cemento celular y ligamento periodontal en la superficie de matriz de dentina tratada. Por lo tanto, los resultados anteriores sugieren que dichos sistemas presentan propiedades fisicoquímicas adecuadas y biocompatibles que, junto con matriz de dentina tratada, estos podrían constituir un microambiente de la matriz extracelular para la regeneración de la raíz del diente, y también ofrece una estrategia para la regeneración de tejidos u o órganos complejos (Chen *et al.*, 2005).

Las nanofibras de GEL se han preparado utilizando un proceso de electrohilado en estudios previos. Con el fin de mejorar su capacidad resistente al agua y el rendimiento termo mecánico para aplicaciones biomédicas potenciales, en este estudio, las nanofibras de GEL se reticularon con vapor saturado de glutaraldehído a temperatura ambiente. La exposición de este material nanofibroso en el vapor de glutaraldehído se realizó durante 3 días generando una extensión de reticulación suficiente para preservar la morfología fibrosa ensayada por inmersión a 37°C de agua tibia. Por otra parte, la reticulación también condujo a una termoestabilidad mejorada y a una mejora substancial en las propiedades mecánicas. La temperatura de desnaturalización correspondiente a la transición de la hélice a la estructura enrollada de las muestras secadas al aire aumentó alrededor de 11ºC y la resistencia a la tracción y el módulo fueron casi 10 veces superiores a las de las fibras de GEL electrohilada. Además, se evaluó la citotoxicidad basándose en un estudio de proliferación celular cultivando fibroblastos dérmicos humanos en los andamios

fibrosos de GEL reticulada durante 1, 3, 5 y 7 días. Se encontró que la expansión celular tuvo lugar y aumentó casi linealmente durante el transcurso de todo el período del cultivo celular. La inhibición inicial de la expansión celular sobre el sustrato fibroso reticulado de GEL sugirió algún efecto citotóxico del glutaraldehído residual en las células (Zhang *et al.*, 2006).

Se electrohiló la GEL con éxito mediante la utilización de un solvente a base de acetato de etilo, ácido acético y agua. Dado que los polímeros naturales incluyendo la GEL presentan una solubilidad limitada en agua, normalmente se usan disolventes tóxicos o muy ácidos para disolverlos para electrohilado. En lugar de utilizar esos disolventes, se utilizó acetato de etilo con ácido acético en agua, se investigó el efecto beneficioso de su uso en términos de la capacidad de hilado de la nanofibra y la acidez del disolvente. Se observó que la sustitución del ácido acético con acetato de etilo mejoraba la capacidad de hilado de la nanofibra reduciendo la tensión superficial de la solución, así como aumentar el pH del disolvente significativamente. Se encontró que la composición óptima del co-disolvente correspondía a una relación de acetato de etilo a ácido acético en una proporción de 2:3. Bajo esta condición de disolvente, la GEL podría disolverse a concentraciones de hasta un 11% en peso y electrohilar con éxito para producir nanofibras con varios diámetros (47-145 nm en promedio) dependiendo de la concentración de GEL. El método co-disolvente basado en agua propuesto aquí puede ser útil para generar otros polímeros naturales nanofibrosos, así como ser aplicable en sistemas de suministro para moléculas bioactivas dentro de las matrices de nanofibras (Song *et al.*, 2007).

En otro estudio, se realizó el electrohilado en solución acuosa de GEL, aumentando la temperatura de hilado. Para mejorar la estabilidad y las propiedades mecánicas en estado húmedo, la membrana nanofibrosa de GEL se retículo químicamente mediante clorhidrato de 1-etil-3-dimetil-aminopropil-carbodiimida y N-hidroxil-succinimida. La concentración de reticulante se optimizó midiendo el grado de hinchamiento y la pérdida de peso. La estructura nanofibrosa de la membrana se mantuvo después de la liofilización, aunque las fibras se rizaron y conglutinaron. El ensayo de tracción reveló que la membrana hidratada se vuelve flexible y proporciona propiedades mecánicas predeterminadas. Las células del ligamento periodontal cultivadas en la membrana *in vitro* mostraron buena unión celular, crecimiento y proliferación. La membrana nanofibrosa de GEL puede ser uno de los biomateriales prometedores para la regeneración de los tejidos periodontales dañados (Zhang *et al.*, 2008).

Por otro lado, se estudió la creación de un andamio de ingeniería tisular a través de electrohilado que presentaron toxicidad mínima y que utilizaron un sistema disolvente con baja toxicidad y diferentes agentes de reticulación. En primer lugar, se evaluó un sistema disolvente de ácido acético/acetato de etilo/agua (50:30:20) con GEL como soluto. El sistema óptimo para electrohilar un andamio con las propiedades deseadas resultó de una concentración de GEL de 10 % en peso. Se utilizaron varios métodos diferentes para reticular las fibras de GEL electrohilada, incluyendo glutaraldehído en fase vapor, genipina en fase acuosa y gliceraldehído, así como especies reactivas de oxígeno de un limpiador de plasma. Debido a que el glutaraldehído a altas concentraciones ha

demostrado ser tóxico, se exploraron otros métodos de entrecruzamiento. El uso de especies reactivas de oxígeno de un limpiador de plasma es una alternativa fácil, sin embargo, la reacción de degradación dominó la reacción de reticulación y los andamios se degradaron después de sólo unas pocas horas en medio acuoso a 37ºC. El gliceraldehído y la genipina se establecieron como buenas opciones para agentes reticulantes debido a la baja toxicidad de estos reticulantes y la resistencia a la disolución de las fibras reticuladas en medio de cultivo celular a 37ºC. Otro estudio donde se crecieron células osteoblásticas MG63 en andamios reticulados, demostróque la proliferación celular creció bien o mejor en los andamios reticulados que en el poliestireno bidimensional tradicional (Sisson *et al.*, 2009).

Además, se han desarrollado e investigado nuevas membranas de micro-nano estructura poliméricas como sustituto de los vasos sanguíneos como una solución potencial a la falta de prótesis vascular sintética. En otro estudio, un poliuretano elastomérico comercial (Tecoflex EG-80A) y un biopolímero natural (GEL) fueron co-electrohilados exitosamente de diferentes hileras en un colector giratorio para obtener membranas compuestas que se beneficiaron de las características mecánicas del poliuretano y la biocompatibilidad del polímero natural. El análisis morfológico mostró una integración uniforme de fibras micrométricas (Tecoflex) y nanométricas (GELs). Para ello se llevó a cabo la exposición de las membranas compuestas a vapores de solución acuosa de glutaraldehído, para estabilizar las fibras de GEL en un medio acuoso. Las pruebas de tracción uniaxial en condiciones húmedas demostraron que los

especímenes de Tecoflex-GEL analizados poseían una mayor extensibilidad y un menor módulo de elasticidad que los injertos sintéticos convencionales, proporcionando una aproximación más estrecha a los vasos sanguíneos nativos. La evaluación biológica puso de relieve que, en comparación con las membranas hiladas a partir de Tecolex sola, las construcciones compuestas de electrohilado aumentaron la adhesión y proliferación de las células endoteliales, tanto en términos del número de células como de su morfología. Los resultados sugieren que las membranas compuestas de Tecoflex-GEL podrían ser alternativas prometedoras a los injertos vasculares convencionales, merecedor de estudios adicionales tanto en su comportamiento mecánico como en la compatibilidad de las células del músculo liso (Detta *et al.*, 2010).

El electrohilado de nanofibras poliméricas naturales útiles para aplicaciones biomédicas requiere a menudo del uso de disolventes orgánicos citotóxicos. En un estudio, las nanofibras de GEL fueron electrohiladas en mezclas binarias de solución tampón fosfato-salina y etanol como disolvente benigno a temperatura ambiente. Se analizaron las influencias de la fuerza iónica, la concentración de etanol y la concentración de GEL en la electrospinabilidad de las soluciones de GEL y las micro arquitecturas de las fibras. Los andamios de electrohilado conservaron sus morfologías durante la reticulación en fase de vapor con glutaraldehído en etanol y la subsiguiente eliminación de sales contenidas en las nanofibras por lavado con agua. Cuando estaban totalmente hidratados, los andamiajes pre-acondicionados mecánicamente presentaron un módulo de Young de 25.5 ± 5.3 kPa, resistencia a la tracción de 55.5 ± 13.9 kPa,

deformabilidad de 160 ± 15 % y elasticidad de 89.9 ± 1.8 %. Cuando se cultivaron en los andamiajes de GEL, los fibroblastos 3T3 presentaron una morfología semejante a la morfología normal de la célula en una matriz extracelular 3D (Zha *et al.*, 2012).

Por otro lado, en otro estudio se reportó la fabricación de nanofibras basadas en electrohilado de mezclas de GEL y GEL-dendrímero conjugados. El dendrímero G3.5 de poli (amido amina) en forma de estrella altamente ramificada se conjugó covalentemente al GEL vía química. Las mezclas de GEL y conjugados de GEL-dendrímero mezclados con diversos niveles de carga de acetato de plata (0, 0.83, 1.65 y 3.30 % p/p) se electrohilaron con éxito en construcciones de nanofibras. Las nanofibras se convirtieron además en redes semipenetrantes con di acrilato de poli etilen glicol foto reactivo (575 g mol^{-1}). Las nanofibras semipenetrantes resultantes conservaron la morfología de las nanofibras, resultando en diámetros de fibra similares a los nanofibras de contrapartida y presentaron estabilidad estructural mejorada. Los nanofibras semipenetrantes también mostraron una buena capacidad de hinchamiento debido a estructuras porosas, resultando permeables a soluciones acuosas. Las nanofibras semi-penetrantes que contenían plata permitieron la liberación sostenida de plata y mostraron actividad antimicrobiana contra dos tipos comunes de patógenos, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. La incorporación de dendrímeros en las nanofibras de GEL a través de la conjugación covalente no sólo aumentó la capacidad de carga de fármacos de las construcciones de nanofibras, sino que también proporcionó una tremenda

flexibilidad para el desarrollo de materiales de recubrimiento de electrohilado multifuncional (Dongargaonkar *et al.*, 2013).

Se puede afirmar, que el electrohilado ha sido uno de los procesos más simples, versátiles y prometedores para producir nanofibras continuas. En el caso de la GEL, este polímero se ha usado ampliamente en alimentos para fines de espesamiento y estabilización. A escala nanométrica, las nanofibras de GEL por electrohilado se pueden utilizar en los alimentos para los mismos fines en cantidades más pequeñas que dan resultados más eficientes. Un estudio investigó la influencia de los parámetros que afectaron durante el electrohilado en las propiedades de la GEL electrohilada. Las concentraciones de GEL a 7 y 20 % (p/v) se electrohilaron bajo 28 o 35 kV de voltaje aplicado. La velocidad de alimentación fue de 1 ó 0.1 ml/ h. Antes del electrohilado, se determinaron la conductividad eléctrica, tensión superficial y las propiedades reológicas de las soluciones de alimentación. El análisis morfológico mostró que sólo la solución de GEL al 20 % produjo nanofibras. La conductividad eléctrica, la tensión superficial, el índice de consistencia y comportamiento de fluidez de la solución de GEL al 20 % fueron 4.77 mS/cm, 34.91 mN/m, 1.37 Pa y 0.93 s^n respectivamente. La gama de diámetros de nanofibras aumentó con el voltaje aplicado. Se determinaron el potencial zeta y los coeficientes de difusión de dispersiones que contiene la GEL y la GEL electrohilada. Ambos valores fueron más altos para las dispersiones que contienen GEL electrohilada que para dispersiones con GEL a la misma concentración. Los valores de potencial zeta y de difusión de los coeficientes de dispersiones que contienen GEL electrohilada

disminuyeron a medida que la tensión aplicada durante el electrohilado aumentaba. La baja tensión aplicada dio lugar a mayores valores del coeficiente de difusión y potenciales zeta para dispersiones que contienen nanofibras de GEL electrohilada, que pueden indicar que estas nanofibras se pueden utilizar para la estabilización de emulsiones de alimentos, en comparación con la morfología de nanofibras suave sin formación de perlas obtenida en la tensión más alta (Okutan *et al.*, 2014).

Por otro lado, el electrohilado es una técnica muy útil para producir nanofibras poliméricas mediante la aplicación de fuerzas electrostáticas. Se ha reportado que, el modelado y la optimización del proceso de electrohilado de GEL/quitosano, Donde se investigaron los efectos de interacción de la relación de mezcla de GEL/quitosano (50/50, 60/40 y 70/30), la tensión aplicada (20, 25 y 30 kV) y la velocidad de alimentación (0.2, 0.4 y 0.6 ml/ h) sobre el diámetro de fibra óptica y la desviación estándar del diámetro de fibra mediante microscopía electrónica de barrido. Para fabricar la mezcla de nanofibras de GEL/quitosano, se seleccionó ácido trifluoroacético/diclorometano como sistema de disolvente. El modelo obtenido para el diámetro de bisagra tiene una relación cuadrática con la tensión aplicada y la velocidad de alimentación. La interacción entre el voltaje aplicado y el caudal se encontró significativa, pero las interacciones de la relación de mezcla y el caudal y también la relación de mezcla y el voltaje aplicado fueron insignificantes. Las micrografías electrónicas de barrido de células fibroblásticas dérmicas humanas en la estructura de las nanofibras con gel/quitosano muestran acoplamiento y proliferación en la superficie de los andamios fabricados. Estas

microfibras tienen un gran potencial para ser utilizadas como andamiaje para la ingeniería de tejidos cutáneos (Pezeshki-Modaress *et al.*, 2014).

En otro estudio, se fabricaron materiales laminares nanofibrosos de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y PLGA/GEL embebidos con nanopartículas de sílice meso-porosas utilizando un método de electrohilado. Los diámetros medios de las nanofibras fueron de 641 ± 24 nm para los andamios PLGA puros frente a 418 ± 85 nm y 267 ± 58 nm para los andamios de PLGA /nanopartículas de sílice al 10% p/p y PLGA/GEL/nanopartículas de sílice al 10% p/p respectivamente. Los resultados de la medición del ángulo de contacto (102◦ ± 6.7 para el andamio PLGA puro frente a 81◦ ± 6.8 y 18◦ ± 8.7 para PLGA/nanopartículas de sílice y los andamios PLGA/GEL/nanopartículas de sílice revelaron hidrofobicidad mejorada de los andamios por incorporación de GEL y nanopartículas de sílice. Además, la incorporación de los andamios con nanopartículas de sílice dió como resultado mejores propiedades mecánicas de tracción. El cultivo de células PC12 en los andamios demostró que la introducción de nanopartículas de sílice en las matrices de PLGA y PLGA/GEL conduce a la unión celular mejorada y a la proliferación. Los resultados de tinción con DAPI indicaron que las proliferaciones de células en las matrices PLGA/nanopartículas de sílice y PLGA/GEL/nanopartículas de sílice eran sorprendentemente (casi 2.5 y 3 veces, respectivamente) más altas que en los andamios PLGA puros alineados. Estos resultados sugieren propiedades superiores de las nanopartículas de sílice incorporadas a andamios electrohilados de PLGA/GEL

para el cultivo de células madre y aplicaciones de ingeniería de tejidos (Me hasa *et al.*, 2015).

Por otro lado, se estudió la producción masiva de nanofibras de GEL por electrohilado espiral y se investigó el rendimiento de diferentes métodos de reticulación tales como vapor de glutaraldehído y reticulación en fase líquida. En comparación con el electrohilado de aguja única convencional, las nanofibras producidas por electrohilado de espiral fueron más finas, en donde se obtuvo un aumento de más de 1000 veces sobre la productividad de nanofibras obtenidas tradicionalmente. Los ensayos mecánicos mostraron que la resistencia a la tracción de las membranas de nanofibras aumentó de 1.33 a 2.60 MPa después de la reticulación del vapor de glutaraldehído y de 1.33 a 5.08 MPa después de la reticulación en fase líquida. Además, el análisis SEM y FTIR indicó que la membrana de nanofibras obtenida por reticulación en fase líquida presentó mejores propiedades, resultando en un material ideal para aplicaciones de vendaje de heridas (Wu *et al.*, 2015).

Un estudio donde se prepararon andamiajes de GEL por electrohilado y utilizando ácido acético acuoso y reticulado térmicamente con glucosa, mostró el efecto de la cantidad de glucosa utilizada como agente de reticulación sobre las propiedades mecánicas de las fibras de GEL y se encontró que la reticulación con glucosa aumenta el módulo elástico de las fibras de GEL de 0.3 GPa a 0 % de contenido de glucosa a 1.1 GPa con 15 % de glucosa. Esto hace que los andamios de GEL fibrosa reticulados por la glucosa sean un material prometedor para aplicaciones biomédicas (Siimon *et al.*, 2015).

En otro estudio, se prepararon nanofibras de GEL a partir de mezclas ternarias de GEL/ácido acético/agua con el objetivo de estudiar la factibilidad de fabricar membranas de nanofibras de GEL a temperatura ambiente usando un disolvente benigno alternativo reduciendo significativamente la concentración de ácido acético. Los resultados mostraron que las nanofibras de GEL pueden ser óptimamente electrohiladas con una concentración baja de ácido acético (25 %, v/v) combinada con concentraciones de GEL superiores a 300 mg/ml. Las esterillas de GEL fabricadas a partir de soluciones con bajo contenido de ácido acético presentaron algunas ventajas como el mantenimiento de la temperatura de descomposición de la GEL pura (230 °C) y la reducción del contenido de ácido en las esterillas de electrohilado, lo que permitió alcanzar una viabilidad celular superior al 90 % (Erencia *et al.*, 2015).

La fabricación de nanofibras de fibroína/GEL de seda cargada con ceftazidima sin la pérdida de estructura y bioactividad del fármaco se demostró utilizando el método de electrohilado. Los resultados muestran que el diámetro promedio de las nanofibras cargadas con fármaco en la proporción óptima de polímero a fármaco (10:1) fue de 276.55 ± 35.8 nm, mientras que el aumento de la relación de alimentación a 1:1 aumenta el diámetro medio a 825.02 ± 70.3 nm. En análisis FTIR de fármaco cargado en las nanofibras reveló que el fármaco ceftazidima se encapsuló con éxito en las nanofibras mientras que el estudio de viabilidad aprobó la citocompatibilidad del sistema. El fármaco se liberó de las nanofibras durante 6 h, y la formación de la zona de inhibición en la prueba de difusión demostró el efecto antibacteriano de las nanofibras cargadas con

fármaco. En conjunto, el sistema de nanofibras fibroína/GEL/ceftizidima pueden mejorar la efectividad del fármaco particularmente en la prevención de adherencias posquirúrgicas e infecciones para el vendaje de heridas (Safdari *et al.*, 2016)**.**

Dado que la GEL sufre un proceso de gelificación, Furuike *et al.* (año), utilizaron un nuevo procedimiento de hilado en seco para el GEel. En este caso, las telas no tejidas de GEL fueron electrohiladas aplicando los principios del hilado en seco. El diámetro de las fibras, la viscosidad y velocidad de flujo de la solución dependían directamente de la concentración de GEL. Las telas no tejidas hiladas con una concentración de GEL al 25 % (p/p) exhibieron un diámetro a nanoescala. Con el fin de mejorar las propiedades de los tejidos no tejidos, se reticularon con vapor de glutaraldehído después del hilado mediante la adición de N-acetil-d-glucosamina a la solución de GEL antes del hilado seguido del calentamiento de estas fibras. Las telas no tejidas reticuladas por el vapor de glutaraldehído exhibieron propiedades mecánicas mejoradas en comparación con aquellas sin reticulación o con reticulación de N-acetil-d-glucosamina. La hinchazón y la capacidad de absorción de agua no produjeron cambios morfológicos en las fibras con reticulación de glutaraldehído. El termograma TGA no confirmó ningún cambio de fase en la estructura compuesta. Además, los estudios de citocompatibilidad *in vitro* utilizando células madre mesenquimales humanas mostraron la naturaleza compatible de las fibras no tejidas desarrolladas, donde demostraron que estas fibras no tejidas podrían ser útiles en la atención médica (Furuike *et al.*, 2016).

El suministro de fármaco hidrófobo dentro de la matriz de polímero hidrófilo como vehículo es usualmente un desafío. Es por ello que, en un estudio, se presentó la síntesis de nanofibras de GEL por electrohilado, los cuales fueron evaluados como un potencial portador para el sistema de administración oral de fármacos hidrofóbicos, la piperina. Las nanofibras de GEL se reticularon exponiendo a vapor saturado de glutaraldehído, para mejorar sus propiedades resistivas al agua. Una exposición de sólo 6 min no sólo fue adecuada para controlar la degradación temprana con la morfología de la fibra intacta, sino que también significativamente marginó cualquier efecto adverso asociado con el uso del glutaraldehído. Los resultados ilustraron una buena compatibilidad del fármaco hidrófobo en nanofibras de GEL con patrones prometedores de liberación controlada de fármacos variando el tiempo de reticulación y el pH del medio de liberación (Laha *et al.*, 2016).

III.2. Electrohilado con COL

El colágeno o COL es la clase de proteínas más ampliamente distribuida en el cuerpo humano. El uso de biomateriales basados en COL en el campo de las aplicaciones de ingeniería de tejidos ha estado creciendo intensamente durante las últimas décadas. Es por ello que se han investigado múltiples métodos de reticulación y se han explorarado diferentes combinaciones con otros biopolímeros para mejorar la función tisular. El COL posee una gran ventaja pues es biodegradable, biocompatible, fácilmente disponible y altamente versátil. Sin

embargo, puesto que el COL es una proteína, sigue siendo difícil esterilizar sin alteraciones en su estructura (Parenteau-Bareil *et al.*, 2010).

Se ha investigado la posibilidad de preparar nanofibras inspiradas en el COL por electrohilado de suspensión acuosa de moléculas de COL libres de telopéptido evitando disolventes orgánicos y mezclas con polímeros sintéticos y naturales. Los resultados subrayaron la necesidad de una atmósfera básica entre la aguja y el colector de tierra con el fin de aumentar el pH del ambiente durante el auto-ensamblaje de moléculas de COL a lo largo de las líneas de fuerza electrostáticas con el fin de preparar un componente biomimético ideal de refuerzo de nuevos biomateriales de uso médicó y quirúrgicó (Foltran *et al.*, 2008).

Se ha reportado, el diseñó un sistema duradero de preparación de heridas tipo sándwich con alta absorción de líquidos, biocompatible y con propiedades antibacterianas. Para ello se utilizaron diversas relaciones en peso de la solución de COL a quitosano para inmovilizar sobre la tela no tejida de poli propileno, que se pre-injertó con ácido acrílico o N-isopropil acrilamida para construir una membrana duradera de revestimiento tipo sándwich de heridas con alta absorción de agua, de fácil eliminación y actividad antibacteriana en un modelo de piel animal. Los resultados indicaron que el tejido inmovilizado con N-isopropil acrilamida y COL/quitosano/PP /N-isopropil acrilamida –COL/quitosano) mostró un efecto de curación mejor que el tejido de poli propileno inmovilizado con COL/ quitosano. La herida tratada con poli (propileno)/N-isopropil acrilamida/COL/quitosano demostró un excelente efecto de remodelado en el

examen histológico con respecto a la construcción de la vena, la epidermis y la dermis a los 21 días después de la lesión cutánea. Los valores de absorción de agua y coeficiente de difusión de agua para poli propileno/N-isopropil acrilamida/COL/quitosano fueron mayores que los de poli propileno /ácido acrílico/COL/quitosano bajo una relación de peso-volumen de COL/quitosano. Tanto el poli propileno/N-isopropil acrilamida/COL/quitosano como el poli (propileno)/ácido acrílico/COL/quitosano demostraron actividad antibacteriana (Wang *et al.*, 2008).

El electrohilado es un proceso que se utiliza para crear nanofibras, que tienen el potencial de ser utilizado en muchas aplicaciones médicas e industriales. La estructura molecular de la materia prima es un factor importante para determinar la estructura y la calidad de las fibras electrohiladas. Se ha extraído COL de una especie de pez hoki de agua fría (*Macruronus novaezelandiae*), y este se preparó en varios formatos moleculares diferentes (COL helicoidal triple, cadenas enteras desnaturalizadas, cadenas de atelocolágeno desnaturalizadas y GEL) para el electrohilado. Cuando se usaron cadenas de COL desnaturalizadas, el ácido acético al 10 % resultó ser un disolvente acuoso eficaz para producir fibras uniformes. Esta información es útil para el desarrollo de un sistema de disolvente acuoso, no tóxico, adecuado para la ampliación industrial del proceso de electrohilado (Hofman *et al.*, 2011).

La ingeniería del tejido nervioso es uno de los métodos más prometedores en la regeneración del tejido nervioso. El desarrollo de andamios combinados de COL y glucosaminoglicanos pueden potencialmente ser utilizados en muchas

aplicaciones de ingeniería de tejidos blandos. En un estudio realizado por Timnak *et al.* (2011), desarrollaron dos tipos de electrohilado aleatorio y alineado. Sus pruebas celulares mostraron que el andamio actuó como un factor positivo para apoyar el crecimiento de células de tejido conectivo Estos resultados sugirieron que el andamiaje de COL-glucosaminoglicanos poroso nanoestructurado es un potencial portador de células en la ingeniería de tejidos nerviosos.

Por otro lado, el COL y el ácido hialurónico son los principales componentes de la matriz extracelular de forma natural y se han utilizado con éxito en el electrohilado. En este caso, una solución de polímero de COL/ácido hialurónico fue electrohilado creando un andamio para pacientes con osteoporosis que tienen una resistencia ósea reducida. Las membranas fueron reticuladas para hacerlas insolubles y se conjugaron con nanopartículas de oro para promover la biocompatibilidad. Sus resultados mostraron que los andamios de COL/ácido hialurónico fueron insolubles en soluciones acuosas y promovieron la fijación celular que podría usarse como un armazón de ingeniería tisular para promover el crecimiento celular (Fischer *et al.*, 2012).

Zulkifli *et al.* (2014), se centraron en el comportamiento de degradación de los andamios nanofibrosos compuestos de HEC/PVAL (alcohol hidroxietil celulosa/poli (vinil alcohol)) y HEC/PVAL/COL, como sustratos potenciales para la ingeniería de tejidos cutáneos en dos medios biológicamente relacionados: para ello utilizaron una solución tampón de fosfatos salino (PBS) y el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) por un periodo de 12 semanas de incubación. Una vez caracterizados los andamios se encontró que los andamios de

HEC/PVA/COL exhibieron una velocidad de degradación más lenta en ambos medios en comparación con las nanofibras de mezcla HEC/PVA. Todas las fibras mostraron superficies irregulares y rugosas hacia la semana final de incubación en solución de PBS y DMEM. A medida que aumentaba el tiempo de degradación, había pocos cambios en la estructura química determinada por los espectros FTIR, mientras que los estudios térmicos revelaron que las temperaturas de fusión y cristalinidad de los andamios se desplazaban ligeramente a un valor inferior. Tanto las fibras de HEC/PVA y HEC/PVA /COL mostraron una disminución significativa en el módulo de Young y tensión de tracción durante las 12 semanas de degradación. Sus resultados demuestran que estos andamios nanofibrosos mostraron un comportamiento de degradación que cumple con los requisitos como potencial biomaterial degradable para el reemplazo dérmico.

El desarrollo de biomateriales con la capacidad de inducir la cicatrización de las heridas cutáneas es un gran reto en la biomedicina. En un estudio se desarrollaron esponjas de COL a partir de la piel de tilapia y nanofibras de electrohilado para el vendaje de heridas. Se encontró que las nanofibras podían promover de forma significativa la proliferación de queratinocitos humanos y estimular la diferenciación epidérmica a través de la expresión de genes regulados involucrados, filagrina y transglutaminasa de tipo I en queratinocitos humanos. Además, las nanofibras de COL también podían facilitar la regeneración de la piel de rata, en un estudio, se prepararon nanofibras electrohiladas de COL a partir de piel de tilapia biomimética y se demostró que

tenían una buena bioactividad y podían acelerar la cicatrización de heridas de rata rápida y eficazmente. Estos efectos biológicos pueden atribuirse a la estructura de la matriz extracelular biomimética y a los múltiples aminoácidos de las nanofibras de COL. Por lo tanto, las nanofibras de COL de tilapia podrían ser utilizadas como nuevo vendaje de la herida, evitando con eficacia el riesgo de transmitir enfermedades en la aplicación clínica futura (Zhou *et al.*, 2016).

Otro estudio que utilizó la técnica de electrohilado de doble extrusión preparada con andamios 3D multicapa apilando membranas microfibras de poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA) de manera alterna a membranas fibrosas micro/nano mixtas de PLGA y COL. La densidad de las fibras de COL en andamios multicapa obtenidas logró controlar la adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica de células MC3T3-E1. Demostrando que la dispersión homogénea de nanopartículas de hidroxiapatita modificada con ácido glutámico (nHA-GA) en la solución de COL mejoró las propiedades osteogénicas de los andamios de múltiples capas fabricados. Además, encontró que los andamios micro-nano fibrosos PLGA-COL-HA eran altamente bioactivos en comparación con PLGA microfibroso prístino y plataformas fibrosas PLGA y COL micro/nano mixtas (Kwak *et al.*, 2016).

El desarrollo de andamios biomiméticos representa una dirección prometedora en la ingeniería del tejido óseo. Esto lo demostró Ma *et al.* (2016), cuando diseñaron un proceso de dos pasos para preparar un tipo de hidrogeles híbridos biomiméticos que estuvieron compuestos de COL, hidroxiapatita y alendronato, este último como fármaco anti-osteoporosis. Estos hidrogeles

híbridos de colágeno, hidroxiapatita y alendronato exhibieron propiedades mecánicas notablemente mejoradas (módulo de almacenamiento G: 38-187 kPa), mayores contenidos de gel y menores proporciones de hinchamiento en comparación con los hidrogeles preparados a partir de COL solo en condiciones similares. Además, mostraron comportamientos de degradación sintonizables contra la colagenasa. Los hidrogeles híbridos de COL - hidroxiapatita - alendronato soportaron bien la adhesión y el crecimiento de células osteoblásticas MC3T3-E1. Dichos hidrogeles híbridos resistentes, pero enzimáticamente degradables sostienen el potencial como andamios para la ingeniería del tejido óseo.

Las construcciones híbridas a partir de material de organismos marinos para andamios porosos de COL, ejemplo el de medusas fibriladas y de hidrogel de alginato imitan a los dos componentes principales del cartílago, siendo así un enfoque prometedor como modelo para la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales humanas. Es por ello que Pustlauk *et al.* (2016) investigaron su potencial para la reparación del cartílago articular, Para ello estudiaron la expresión del gen COL 2 y encontraron que su expresión fue comparable en todos los tipos de andamio examinados. Sin embargo, la relación COL 2/COL 1 fue mayor para los discos de alginato puro y andamios de suspensión de alginato-célula en comparación con las células madre incrustadas en alginato. Además, encontraron que la secreción de glucosaminoglicanos sulfatados fue comparable en la suspensión de células de alginato y células embebidas en andamios de alginato. Ellos concluyen que las construcciones

híbridas de COL de medusas y alginato apoyan a la diferenciación condrogénica de las células madre y proporcionan construcciones más estables comparadas con los hidrogeles puros.

III.3. Electrohilado Polimérico con el sistema GEL/COL

Angarano y colaboradores (2013) sintetizaron fibras reticuladas de GEL y COL mediante la técnica de electrohilado reactivo mediante el uso de una mezcla de solventes no tóxicos: ácido acético, acetato de etilo y agua (5:3:2 p/p/p), eliminando los solventes fluorados, que requieren post-tratamiento y purificación mediante la implementación de glioxal, representado un procedimiento fácil, versátil y de un solo paso. Permitiendo la ampliación y fabricación de tejidos sintéticos de COL basados en nanofibras de GEL reticulada *in situ*. Esta reticulación *in situ* hace que las fibras de GEL solubles en agua sean resistentes al agua sin afectar adversamente la hidrofilicidad, la excelente humectación de las fibras, la compatibilidad celular, la reabsorción, la adhesión y proliferación celular típicas de las nanofibras no tejidas de COL reticuladas.

Tylingo *et al.* (2016) prepararon y caracterizaron nuevos andamios porosos compuestos de quitosano, COL y GEL para la preparación de andamios GEL y COL aislados de la piel de peces con diversas propiedades fisicoquímicas. Todos los biomateriales obtenidos mostraron una porosidad homogénea. El tipo de polímero de proteína determinó la reología y las propiedades mecánicas de la obtención de los preparados. El uso de polímeros proteínicos disminuyó la capacidad de hinchamiento de los materiales aproximadamente un 30 % en

comparación con los materiales obtenidos a partir de quitosano. Los materiales que contienen GEL mostraron la mayor solubilidad (aproximadamente 30 %). Los andamios obtenidos en el 100 % de quitosano resultaron ser más duros que los materiales de COL en un promedio del 30% y menos flexibles más de dos veces. Además, los materiales que contenían polímeros proteínicos mostraron buenas propiedades antioxidantes.

En la tabla I, se resumen otros estudios con la técnica de electrohilado.

Tabla I. *Uso de gelatina y colágeno en aplicaciones biomédicas.*

Polímeros	Aplicación	Características	Referencia
GEL (bovino tipo B)	Industria alimentaria	Nanofibras suaves sin formación de perlas	Okutan *et al.*, 2014
GEL (bovino tipo B)	Ingeniería de tejidos regeneración celular en fibroblastos (BJ-5ta) y células de riñón embrionario humano (HEK 293T)	Nanofibras con proliferación celular de hasta 90 %,	Erencia *et al.*, 2015
GEL (porcino tipo A)	Ingeniería de tejidos Regeneración celular en fibroblastos (3T3)	Nanofibras reticuladas en glutaraldehído.	Zha *et al.*, 2012
GEL ((25.43 kDa)	Regeneración de tejidos Periodontales.	Membrana reticulada, hidratada y flexible.	Zhang *et al.*, 2008
GEL (bovino Tipo B)	Sistema de suministro para moléculas bioactivas en matrices de nanofibras	Nanofibras de entre 47-147 nm.	Song *et al.*, 2007
GEL	Andamios para regeneración celular en queratinocitos gingivales humanos y fibroblastos gingivales humanos.	Nanofibras reticuladas con glioxal resistentes al agua.	Angarano *et al.*, 2012
GEL/fibroína	Ingeniería de tejidos Regeneración celular en fibroblastos humanos.	Nanofibras cargadas con ceftazidima como agente antimicrobiano.	Safdari *et al.*, 2016
COL (tipo I) /poli (ácido láctico-co-glicólico) / hidroxiapatita	Ingeniería de tejidos Diferenciación osteogénica de células MC3T3-E1	Micro/nano andamios bioactivos	Kwak *et al.* 2016
COL/ácido hialurónico	Ingeniería de tejidos Regeneración de tejidos Óseos en fibroblastos murinos (L - 929)	Fibras insolubles en soluciones acuosas que promueven la fijación celular.	Fischer *et al.*, 2012
COL libre de telopéptido tipo I (tendón equino)	Biomédicas y quirúrgicas	Conjunto molecular simple de tamaño nanométrico	Foltran *et al.*, 2008

IV. HIPÓTESIS

Los andamios electrohilados poliméricos sintetizados con GEL y COL son utilizados para la fabricación de apósitos cutáneos.

V. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar andamios electrohilados de COL y GEL sin imperfecciones, que sean biocompatibles.

V.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar andamios electrohilados de GEL y COL y evaluar sus propiedades químicas.
2. Evaluar lo proliferación celular de los andamios en fibroblastos humanos HFF-1.

Síntesis de andamios electrohilados de gelatina y colágeno

VI. METODOLOGÍA

Se prepararon electrohilados a partir de gelatina extra pura (VWR, HIMEDIA Laboratories), colágeno de pescado tipo I (ARIBUN) y ácido acético glacial (Jalmek), en la figura 6 se describe un diagrama de flujo de la elaboración.

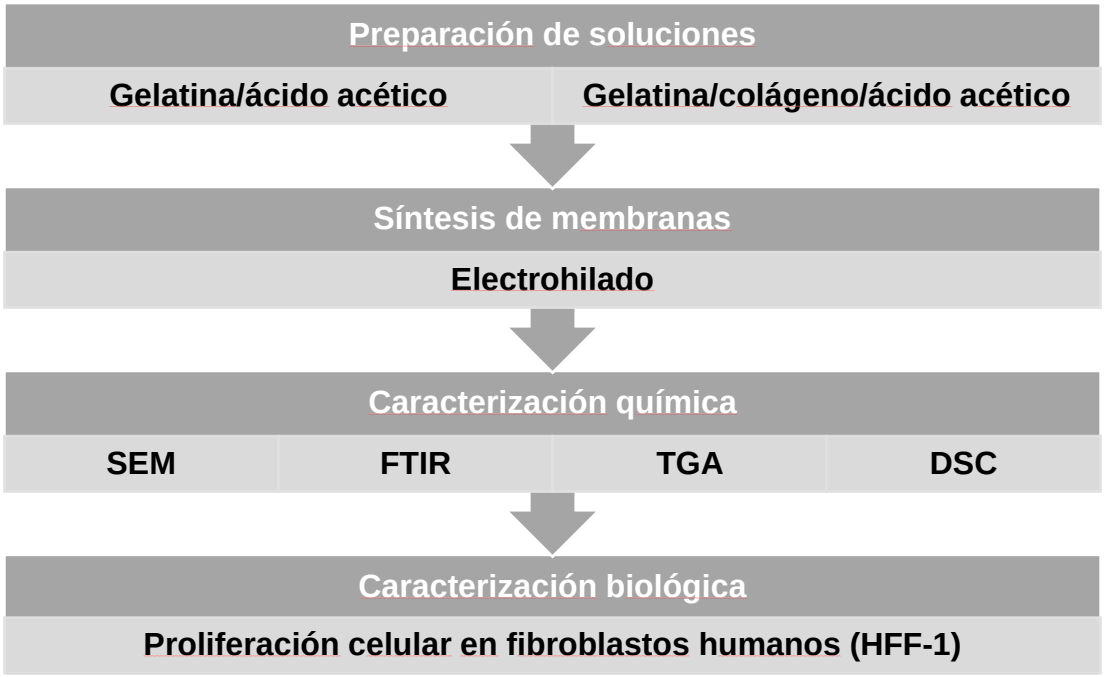

Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología

VI.1. Preparación de Mezclas Poliméricas

Se realizaron diversas pruebas para encontrar la concentración adecuada del GEL que resultó favorable para el electrohilado, por lo que se prepararon soluciones de GEL al 10 %, 15 %, 20 % y 25 %, con respecto al solvente ácido acético glacial. Las mezclas se prepararon en viales de borosilicato para

solvente, adicionando la cantidad correspondiente de GEL para 5 ml de solvente, se taparon y se incubaron por 4 h a 35 °C, con agitación periódica. Después de disolver la mezcla se procedió a electrohilar a no más de 14 días de preparada la muestra. Analizando las propiedades físicas de las fibras y las condiciones ambientales se decidió elegir como control la solución de GEL al 15 % (GEL15).

Posteriormente, se realizaron nuevas mezclas con COL. Se pesaron las cantidades necesarias de COL de manera que se obtuvieran soluciones de 1 %, 5 % y 10 % con respecto al solvente y se agregaron 5 ml de ácido acético, se disolvió el COL mediante agitación y posteriormente se agregó la cantidad adecuada de GEL para tener soluciones con GEL al 15 %. Las soluciones fueron etiquetadas como sigue: GEL/COL1, GEL/COL5 y GEL/COL10.

VI.2. Electrohilado

Se utilizó un sistema de electrohilado con un colector aleatorio, utilizando una jeringa plástica (con una aguja de calibre 21G x 40 mm) cargada con 1 mL de la solución a probar removiendo todas las burbujas formadas durante la carga de la jeringa. La prueba se condujo a 15 cm de separación entre el colector y la aguja, 20 kV, 0.80 ml/ h, en un rango de temperatura del 20-32 °C y uno de humedad relativa del 20-40 %. Durante el tiempo de electrohilado se examinó constantemente la formación de gotas en la punta de la aguja.

VI.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología y diámetro de las fibras poliméricas se determinó por SEM, una pequeña sección del material fibroso se colocó en un microscopio de emisión de campo JEOL JSM 7600F. Las muestras fueron preparadas previamente, cortando aleatoriamente trozos de alrededor de 5 x 5 mm y colocándolas de manera individual sobre una base de aluminio con cinta magnética, de manera que la muestra estuviera fija en la superficie, este sistema fue tratado por pulverización catódica con oro, ya que el sistema GEL/COL no es conductor, condición necesaria para poder visualizar la morfología en la microscopía SEM. Para obtener las imágenes se empleó un voltaje acelerado de 20 kV.

El diámetro de las fibras se calculó mediante el programa ImageJ en su opción MultiMeasure, se realizaron 30 mediciones de al menos dos imágenes diferentes de cada muestra, posteriormente se calculó el promedio y desviación estándar mediante la opción Summarize. De igual manera la porosidad de las muestras se calculó con el mismo programa bajo su opción Threshold. Los datos obtenidos fueron graficados mediante Minitab17.

VI.4. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Para determinar los espectros de infrarrojo por la transformada de Fourier por reflectancia total atenuada se empleó un equipo ATR-Thermo Scientific Nicolet 6700. Los espectros se obtuvieron en el intervalo de 4000-400 cm^{-1}. Primero se obtuvo un espectro de referencia, simplemente descubriendo el lente y captando luz del medio ambiente. Después de esto, se colocó una pequeña

cantidad de muestra y se presionó contra la lente con una prensa. Esta técnica se empleó para obtener los grupos funcionales presentes en las muestras.

Los espectros encontrados se analizaron en el Software OMNIC, donde se observaron los picos del porcentaje de transmitancia.

VI.5. Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se realizó para determinar la pérdida de masa del polímero de selección en función de la temperatura, para observar su proceso de descomposición. Se realizó un estudio en un equipo TGA Q5500 (TA Instruments), con una velocidad de calentamiento de 10 °C por min, a partir de temperatura ambiente hasta 700 ˚C, en una atmósfera de nitrógeno, sobre una bandeja de platino sin sellar, el termograma se analizó por el software TA Universal Analysis.

Esta técnica permite determinar la temperatura a la cual la degradación térmica inicia (T_{onset}) y el cambio en la masa en función al aumento de temperatura. Se realizarán curvas termogravimetricas ($_{Dr}TG$) para identificar la temperatura de degradación máxima (T_{degmax}).

VI.6. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Este análisis nos permitió determinar la temperatura de transición vítrea (T_m) y la temperatura de degradación (T_d). Las muestras fueron evaluadas en el

equipo TA Instruments DSC Q5000, en bandejas no selladas de aluminio, con una velocidad de calentamiento de 10˚C por min, con un intervalo de temperatura ambiente hasta los 300˚C y en una atmósfera de nitrógeno. El termograma se analizó por el software TA Universal Analysis.

VI.7. Proliferación Celular en Fibroblastos Humanos (HFF-1)

Con el fin de verificar la biocompatibilidad y proliferación celular en fibroblastos se realizó un ensayo de 2 y 5 días en fibroblastos humanos HFF-1, en placas de 96 pocillos. Los fibroblastos crecieron en medio Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM) adicionandole, 15 % suero fetal bovino, 1 % penicilina y estreptomicina, 1 % L-glutamina y 0.1% bicarbonato de sodio. A las 24 h se le agregó dimetil sulfóxido al control negativo y para el control positivo se utilizó la suspensión celular sin alterar. Al finalizar el tiempo de incubación se agregó bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y medio de cultivo plano. Se incubó por 4 h y al finalizar se disolvieron los cristales formados con isopropanol; posteriormente, se reveló incubando a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 min, los resultados se leyeron en un lector de multiplaca (ThermoFischer) a 570 nm y 690 nm. Todas las muestras se realizaron por triplicado. Con los resultados se calculó el porcentaje de proliferación para cada muestra y se realizó un análisis ANOVA para posteriormente graficarse en el programa Minitab17.

VII. RESULTADOS

VII.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En la muestra de GEL15 (figura 7) puede apreciarse la formación de fibras sin defectos ni entrecruzamiento de las mismas. El diámetro promedio fue de 169 ± 30 nm, con un porcentaje de porosidad de 50.04 ± 1.52 %.

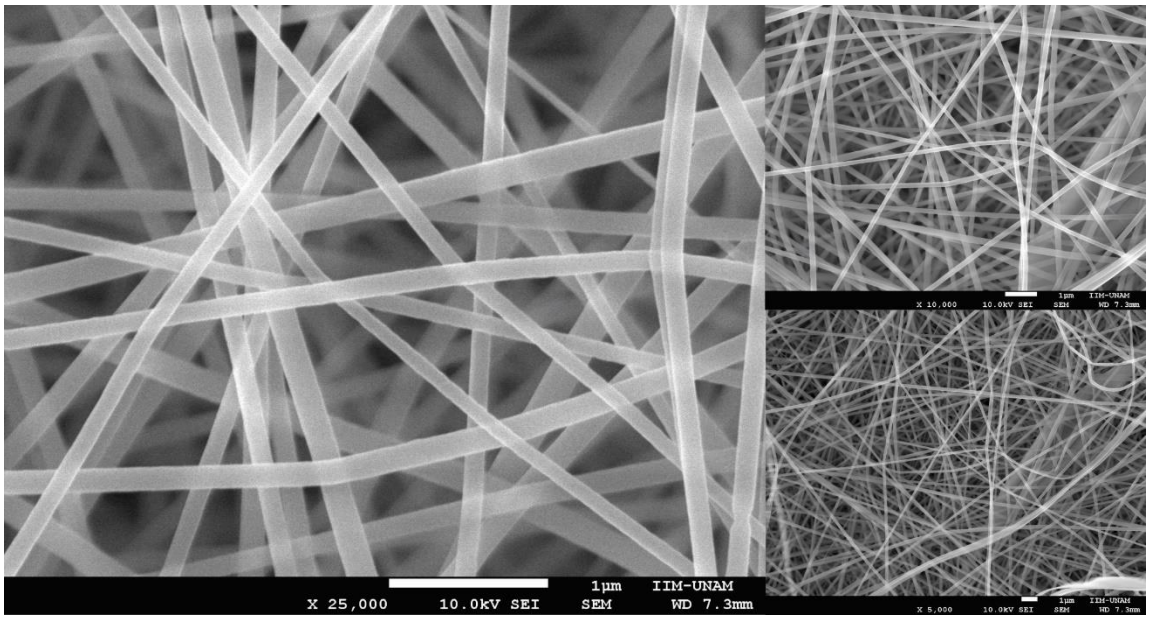

Figura 7. Micrografías con SEM de la muestra GEL15 a 25, 000 x, 10, 000 x y 5000x.

En la muestra GEL/COL1 (Figura 8) puede apreciarse la formación de fibras sin defectos ni entrecruzamiento de las mismas. El diámetro promedio fué de 179 ± 30 nm, con un porcentaje de porosidad de 44.11 ± 9.28 %.

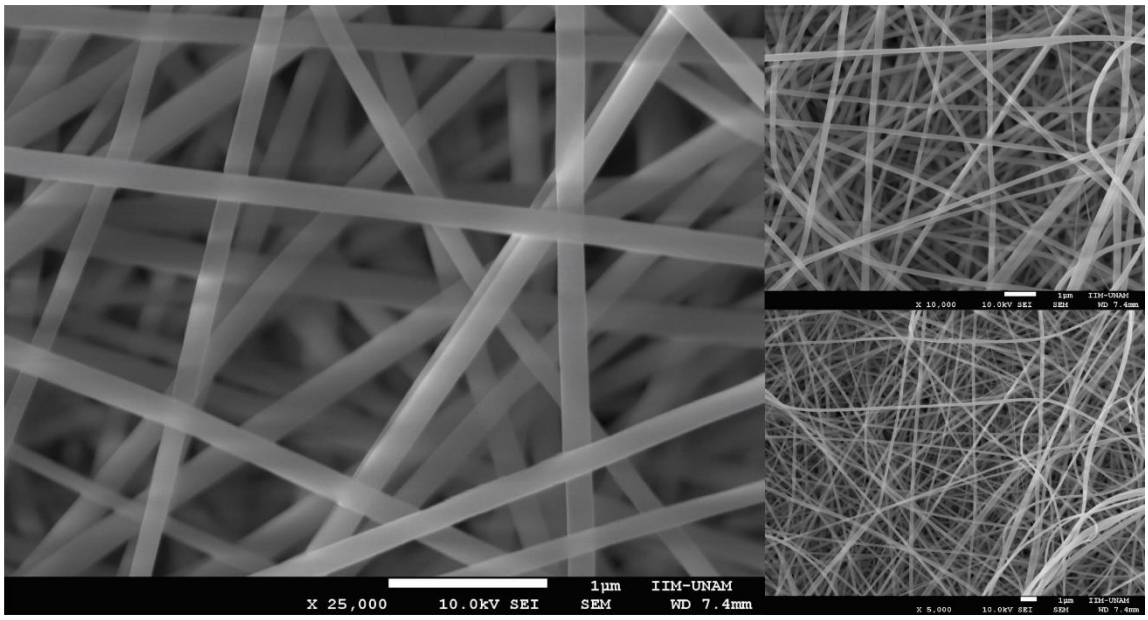

Figura 8. Micrografías con SEM de la Muestra GEL/COL1 a 25, 000 x, 10, 000 x y 5, 000 x.

En la muestra de GEL/COL5 (Figura 9) puede apreciarse la formación de fibras sin defectos ni entrecruzamiento de las mismas. El diámetro promedio fué de 211 ± 49 nm, con un porcentaje de porosidad de 53.52 ± 13.39 %.

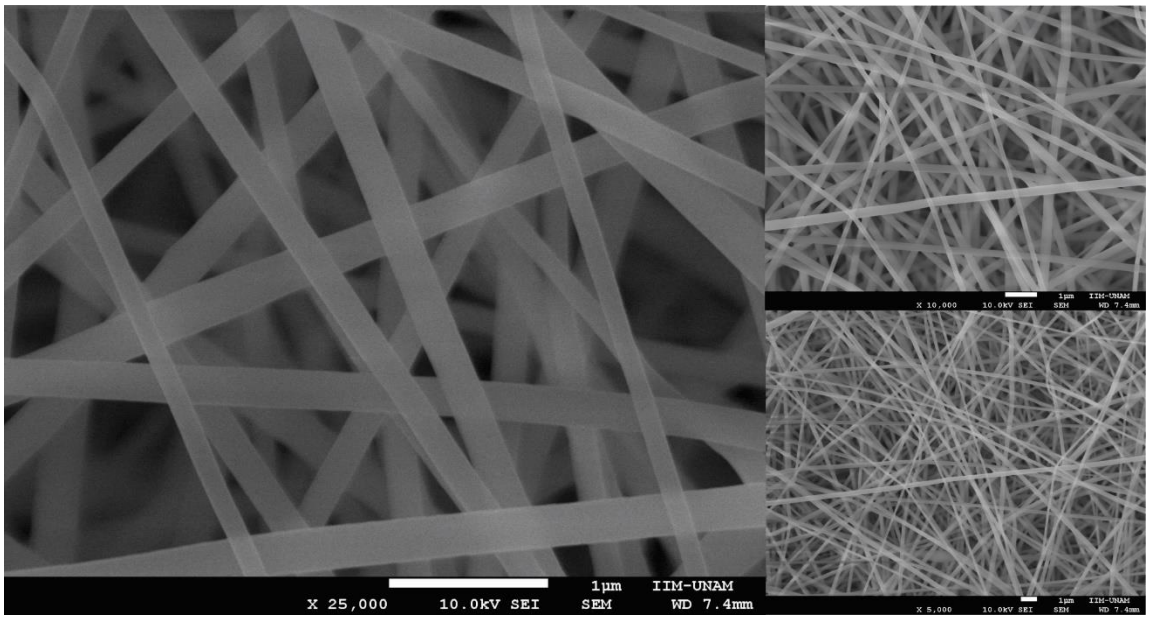

Figura 9. Micrografías con SEM de la Muestra GEL/COL5 a 25, 000 x, 10, 000 x y 5, 000 x.

En la muestra de GEL/COL5 (figura 10) puede apreciarse la formación de fibras con algunos defectos, como fibras que presentan quebraduras. El diámetro promedio medido fue de 235 ± 40 nm, con un porcentaje de porosidad aproximado del 36.38 ± 8.14 %.

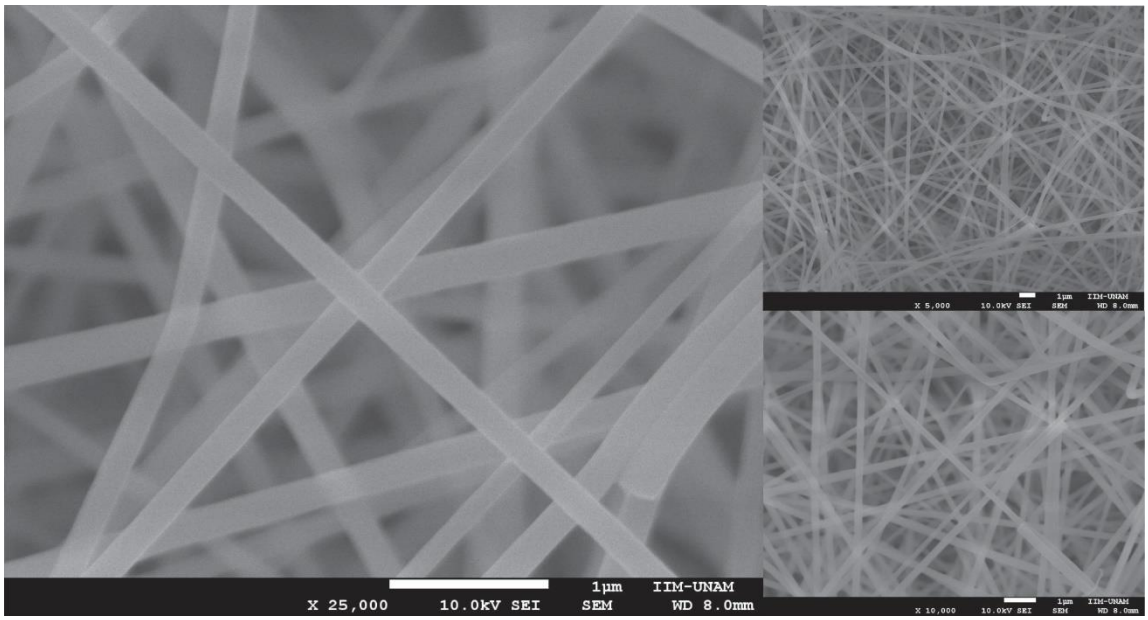

Figura 10. Micrografías con SEM de la Muestra GEL/COL10 a 25, 000 x, 10, 000 x y 5, 000 x.

En la figura 11, se observa el porcentaje de porosidad de cada muestra, con su desviación estándar como podemos observar la porosidad aumenta con el aumento de la concentración de COL hasta llegar a la muestra con COL al 10%, en esta la porosidad disminuye drásticamente.

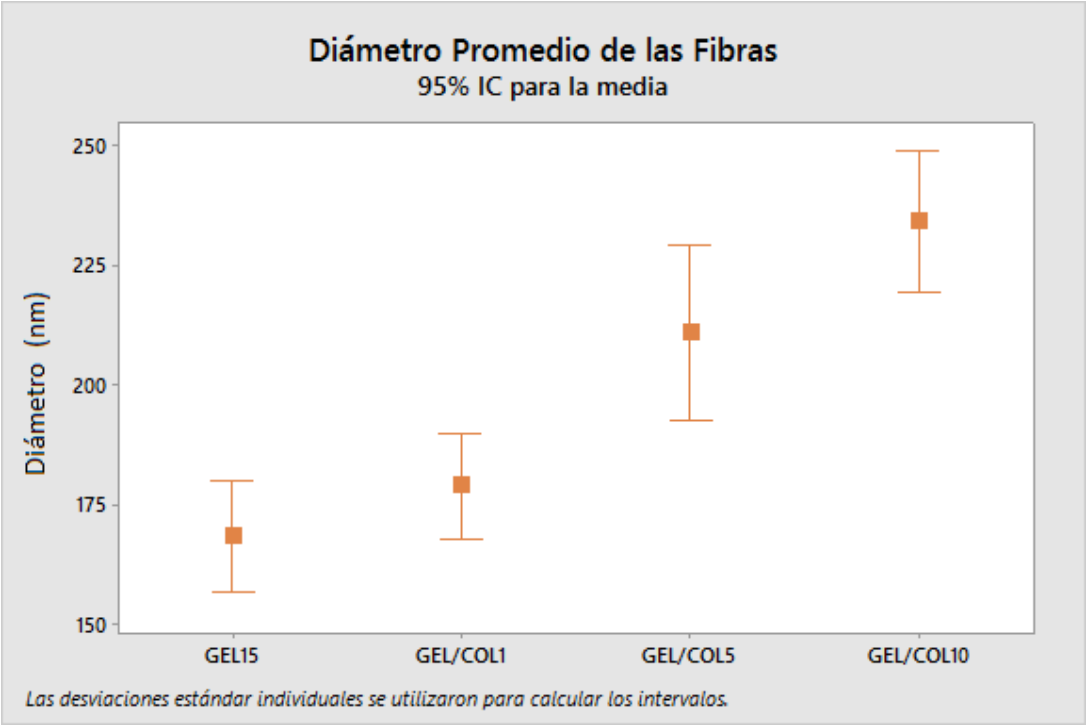

Figura 11. Porcentaje y desviación estándar del diámetro de porosidad de las fibras hechas con GEL y COL.

En la figura 12, observamos el diámetro promedio de las muestras con su desviación estándar que se mantuvo entre 30 y 49 nm, se puede observar el incremento del diámetro de las fibras conforme se aumentó la concentración de COL.

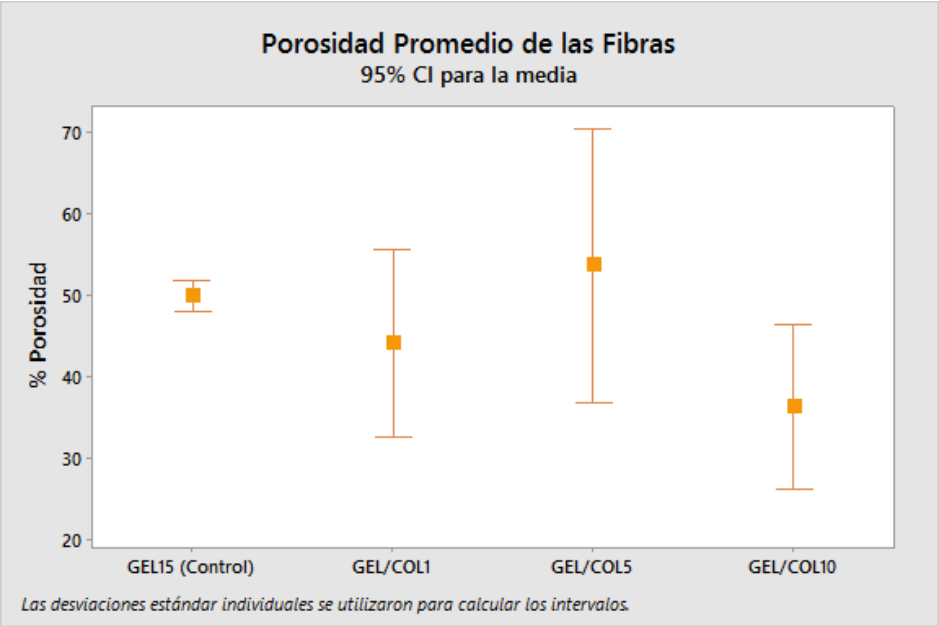

Figura 12. Porcentaje y desviación estándar de la porosidad de las fibras construidas con GEL y COL.

VII.2. Análisis Termogravimétrico (TGA)

En la figura 13, se muestra el análisis termogravimétrico de distintas conformaciones de membranas realizadas GEL15, GEL/COL1, GEL/COL5 y GEL/COL10, así como un control de COL en polvo (COL control). La curva de descomposición de las muestras nos dice que ocurrió una descomposición térmica con la formación de productos gaseosos en la reacción.

Se puede observar que la membrana GEL/COL10 supera incluso al control COL, perdiendo el 5 % de su peso hacia los 98.39 °C. Mientras que, con menos CO, la membrana pierde el mismo peso, pero mucho antes entre los 45.62 y 50.41 °C. Así mismo, se realizó la medición para la descomposición del 90 % del material y se encontró que para GEL15 esto ocurre a los 256.37 °C, para las muestras GEL/COL1, GEL/COL5 y GEL/COL10, se encontraron las temperaturas

189.90 °C, 155.24 °C y 234.35 °C respectivamente. Por último, la medición para el control de colágeno (COL) arrojó una temperatura de 249.68 °C. La pérdida de peso entre el 5 y 10 %, se debe a la evaporación del solvente, ya que tiene un punto de ebullición de 118 °C y a la humedad contenida en la muestra.

Posteriormente, se realizó la medición de la pérdida de 50 % de la masa, se encontró para GEL15, 368.03 °C; GEL/COL1, 361.07 °C; GEL/COL5, 355.84 °C; GEL/COL10, 366.70 °C y COL 362.42 °C. Todas las muestras se condujeron hasta una temperatura de 700 °C donde la mayor parte de las muestras pierden entre el 3.83 % al 16.90 %, mientras que los controles aún conservan aproximadamente el 17.6 % de su masa.

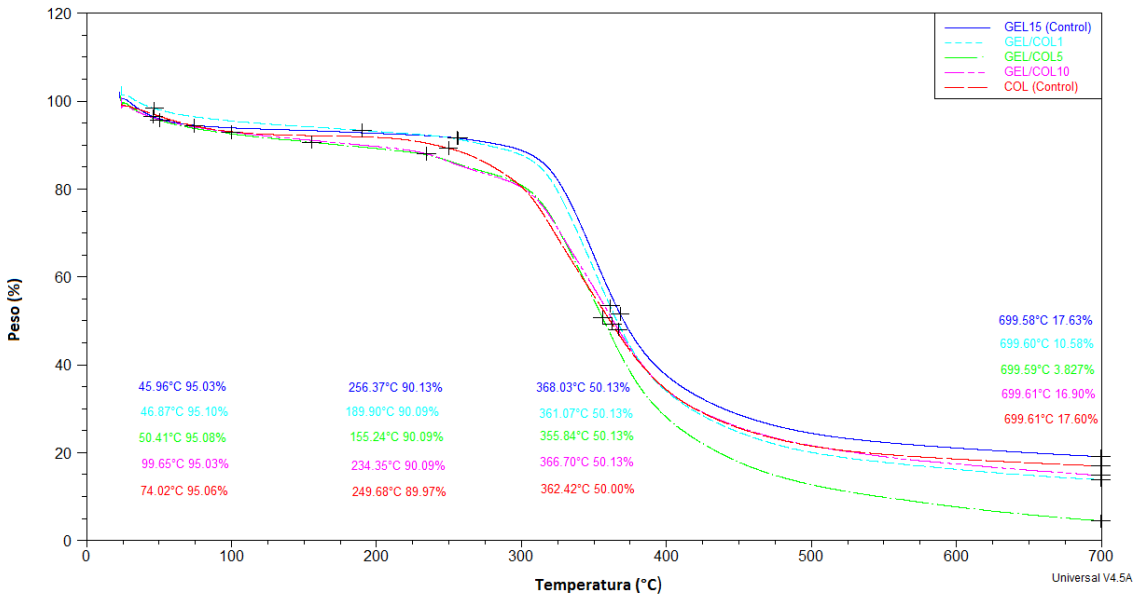

Figura 13. Análisis termogravimétrico en relación al porcentaje de peso de los diferentes GEL y COL.

VII.3. Calorimetría Diferencial de Barrido DSC

El análisis de calorimetría diferencial de barrido (figura 14) nos muestra el comportamiento de las combinaciones antes mencionadas. Lo que se puede apreciar es que alrededor de los 73°C – 88°C ocurre una evaporación, que puede atribuirse el fenómeno a la humedad del ambiente absorbida por la fibra. En el caso de las temperaturas de transición, todas fueron consistentes, encontrándose entre 182 - 197°C, 207 - 212°C y 258 - 270°C. Para la muestra GEL/COL1, se puede apreciar una interrupción por cargas que se atribuye a una falla en el sistema. Por otro lado, el GEL15 tiene un comportamiento diferente a las muestras que presentaban COL, esta muestra una ligera deshidratación a los 36°C, no muy notable debido al comportamiento de la muestra, y transiciones a los 125°C, 280°C, 212°C y 259°C.

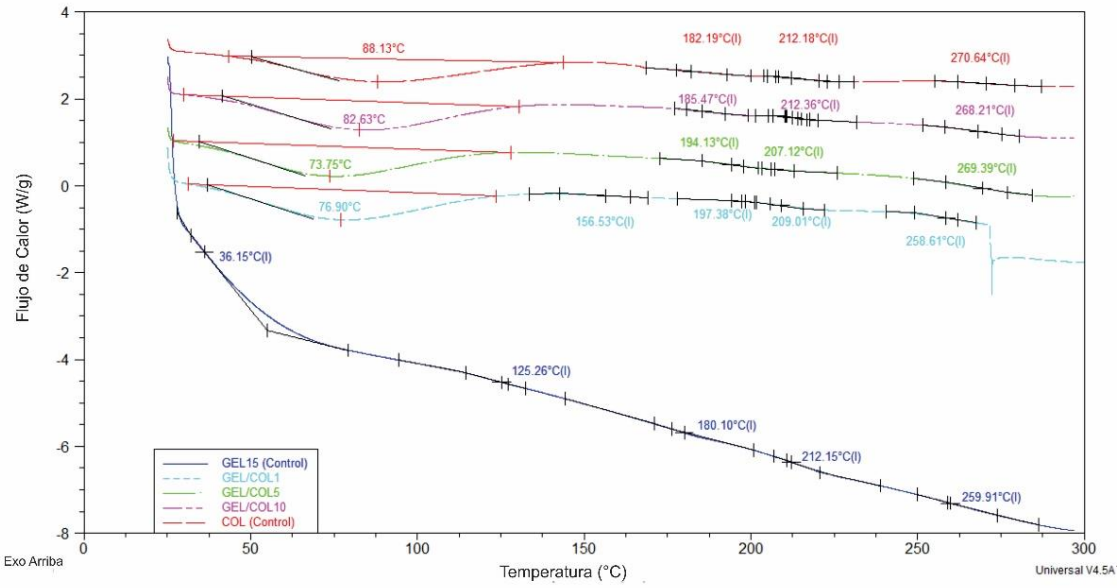

Figura 14. Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido con las diferentes mezclas de GEL y COL.

VII. 4. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de FTIR de las muestras (figura 12), no tienen diferencias significativas entre las diversas conformaciones estudiadas. Los picos en 3302 cm^{-1} y aquellos entre 1300 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} (tabla II) corresponden al grupo funcional del alcohol, presente a lo largo de la cadena aminoacídica de ambas estructuras proteicas, de igual manera aparecen los grupos cetona (C=O en 1742.27 cm^{-1}) de los ácidos carboxílicos (1235.98 cm^{-1} y 1235.98 cm^{-1}). Por otro lado, el grupo amino ($-NH_2$) es apreciable en 1633.36 cm^{-1} y 1542.11 cm^{-1}, este grupo es abundante en la cadena aminoacídica del COL y la GEL pues el aminoácido Lisina es uno de sus componentes principales, y está encargado de crear la estructura en forma de fibras del COL. Por último, se observa la presencia de enlaces tipo C-O presentes en alcoholes secundarios en picos cercanos al 1100 cm^{-1}.

Tabla II. *Grupos funcionales apreciables en FTIR.*

Grupo Funcional	**Longitud de Onda (cm^{-1})**
O-H (grupo alcohol)	3650-2300, 1500-1300
C=O (ácido carboxílico)	1725-1750
$-NH_2$ (amina)	1560-1640
-COOH	1300-1200
C-O (alcoholes secundarios)	≈ 1100

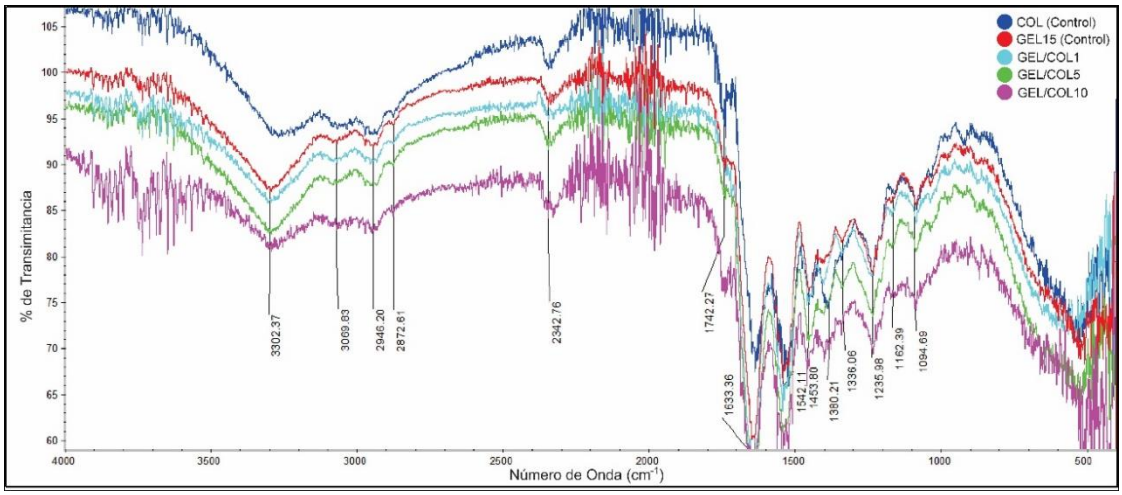

Figura 15. Análisis comparativo de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de las diferentes mezclas electrohiladas de GEL y COL.

VII.5. Proliferación celular en fibroblastos HFF-1

Se condujo un ensayo de proliferación celular en fibroblastos humanos HFF-1 a 2 y 5 días, mediante el uso de MTT (figura 16 y 17). En la figura 18, se observan los porcentajes de proliferación de las diversas muestras, primeramente, se analizaron las muestras a los 2 días (color naranja) y se encontró que el control positivo (suspensión celular) nos dá un porcentaje de 100 ± 2.19 %; el control negativo (DMSO) obtuvo un 3.41 ± 1.79 %. Las muestras por otro lado obtuvieron los siguientes porcentajes: GEL15, 63.61 ± 0.88 %; GEL/COL1, 57.40 ± 14.83 %; GEL/COL5, 56.02 ± 10.15 %; GEL/COL10, 72.23 ± 12.41 %. Se puede observar que la muestra GEL/COL10 que corresponde a una concentración de GEL al 15 % y COL al 10 % tiene una proliferación celular más grande que las demás muestras, sin embargo, mediante un análisis ANOVA, no se obtuvieron diferencias significativas entre ninguna de las muestras a los 2 y 5 días. A los 5 días (color azul en figura 18.) nuevamente se realizó una medición y se encontró que el control positivo tuvo un porcentaje de proliferación de 100 ± 5.93 %, mientras que el control negativo presentó un porcentaje de 1.68 ± 0.16 %, también se pudo observar que el control de GEL (GEL15) obtuvo un porcentaje de proliferación considerablemente menor que las muestras con 61.1 ± 17.74 %. Las muestras con COL presentaron actividad de la siguiente manera: GEL/COL1, 75.44 ± 3.4 %; GEL/COL5, 73.13 ± 4.90 %; GEL/COL10, 74.00 ± 17.49 %. Por lo que se puede ver que, sin importar la concentración de COL en las membranas, la proliferación en fibroblastos se mantiene constante, sin

embargo, la última muestra posee una desviación estándar mucho más elevada que las muestras con menores cantidades de COL.

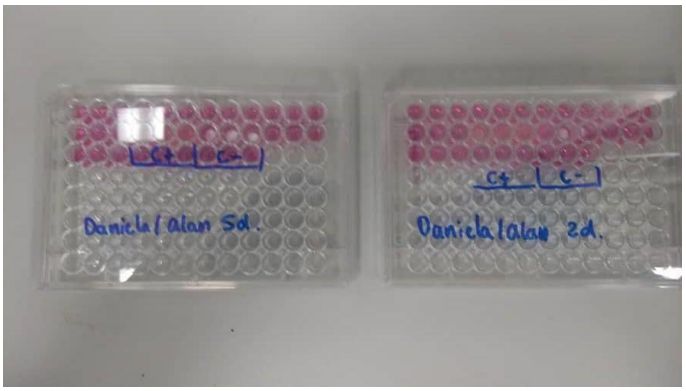

Figura 16. Disposición de muestras en placa de 96 pocillos antes de agregar MTT.

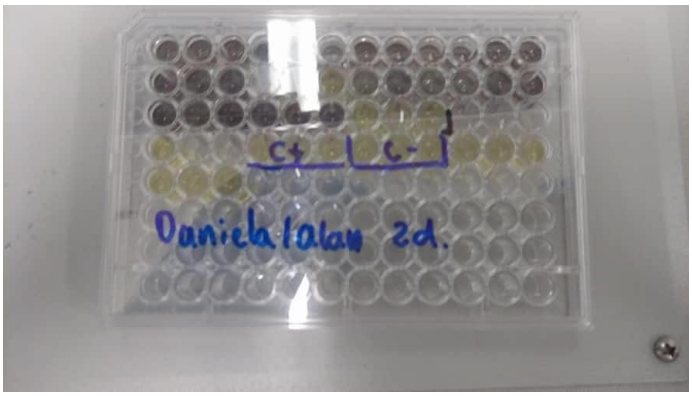

Figura 17. Revelado de las muestras a los 2 días de incubación.

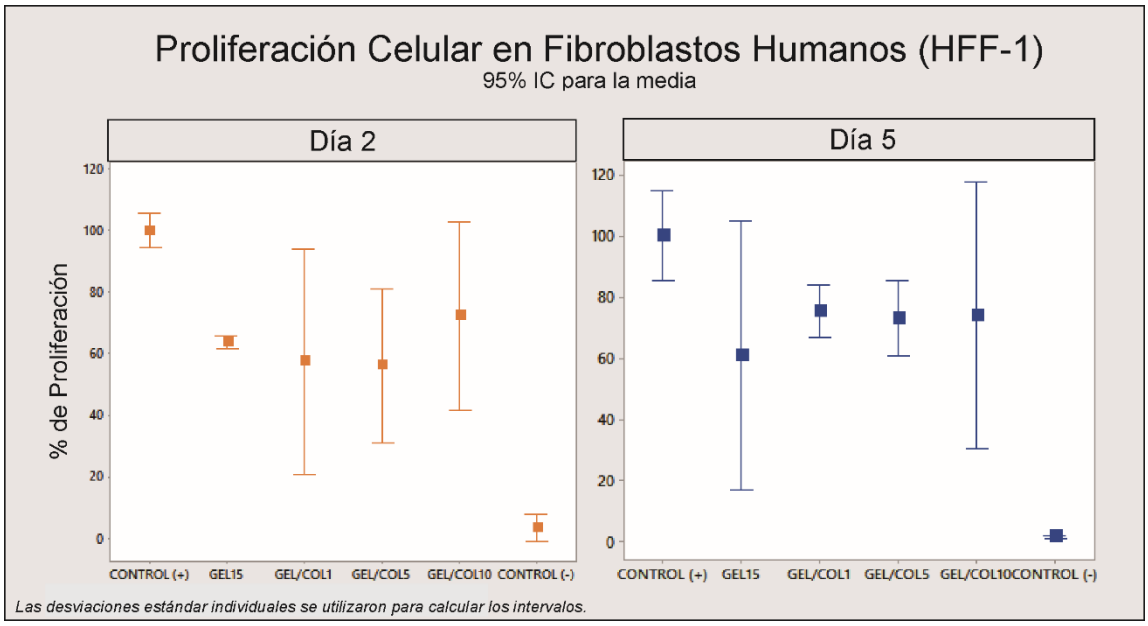

Figura 18. Porcentaje de proliferación celular con fibroblastos humanos a los dos y cinco días con diferentes porcentajes de GEL-COL.

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1. Microscopia Electrónica de Barrido

Existen numerosos estudios del electrohilado de membranas mediante el uso de GEL, generalmente el diámetro de las fibras se puede modificar cambiando la concentración y por ende la viscosidad de las soluciones que se electrohilarán, otro aspecto importante es el tipo de solvente en el que se disuelven los polímeros, generalmente los solventes utilizados para disolver el GEL van desde el etanol, ácido acético, HFIP (solvente fluorado), etc. Esta viscosidad puede cambiar con el tiempo debido al uso del solvente, Erencia *et al.*, (2015) por ejemplo, cuando utiliza ácido acético la viscosidad se mantiene constante y por consiguiente el tamaño de las fibras. El GEL permite obtener fibras desde unas cuentas decenas de nanómetros (40-50 nm) hasta fibras del orden de las micras (2-3µm). cuando se utilizan soluciones desde 8 % hasta el 30 % p/v. (Jalaja *et al.*, 2016; Safdari *et al.*, 2016; Laha et al., 2016; Furuike *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2015; Angarano *et al.*, 2013; Zha *et al.*, 2012; Detta *et al.*, 2010; Sell *et al.*, 2009; Sisson *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2008;). Las fibras electrohiladas de GEL obtenidas en nuestro proyecto fueron pequeñas de 169 ± 30 nm, uno de los datos más interesantes es que las fibras no presentaron defectos, como la formación de cuentas, aunque la concentración de GEL fué un poco más alta (15 %) que en otros trabajos reportados.

Por otro lado, el COL no ha sido ampliamente utilizado en electrohilado de polímeros, algunos autores que lo han manejado con solventes fluorados como el HFIP en concentraciones muy bajas de COL. Zhou *et al.* (2016) electrohilaron

COL de tilapia obteniendo fibras de 310 ± 117 nm, con una desviación estándar muy alta. Timnak *et al.* (2011), electrohilaron COL con sulfato de condroitina con este mismo solvente, obteniendo fibras de 50 hasta 350 nm. Otros autores han explorado la posibilidad de electrohilar este polímero, con solventes menos agresivos como lo es el ácido acético, por ejemplo, Fisher *et al.* (2012) realizaron diversas mezclas de COL con ácido hialurónico, obteniendo fibras de menos de 200 nm en soluciones de 5% p/v y de menos de 300 nm con soluciones de 7.5 % p/v. Por otro lado, Foltran et al (2008), electrohilaron COL tipo A del tendón de Aquiles de un equino, en soluciones de 1 % p/p obteniendo fibras de 100 µm, y un par de micrómetros de diámetro. Por nuestra parte no se pudieron realizar muestras de nanofibras solamente con ácido acético, pues no se alcanzaba la viscosidad adecuada.

Por último, Hofman *et al.* (2012), electrohilaron muestras de COL y GEL utilizando ácido acético como el solvente del GEL y HFIP para la parte de COL, obteniendo fibras desde 100 a 200 nm. Este dato es consistente con nuestras muestras que van de los 179 ± 30 nm para la muestra con 1 % p/v de COL, 211 ± 49 nm para la de 5 % y 235 ± 40 nm para la de mayor concentración de COL sin embargo, en este procedimiento no se utilizaron solvente fluorados pues ambos polímeros se disolvieron en ácido acético, con desviaciones estándar pequeñas, además se observó que la tendencia del diámetro de las fibras aumenta conforme aumenta la concentración de COL sin embargo, al llegar a la última concentración se comenzaron a visualizar defectos, como el rompimiento

de las fibras, quizá debido a la estructura de alfa hélice del COL y las altas concentraciones de los polímeros.

VIII.2. Análisis Termogravimétrico

El análisis termogravimétrico nos muestra que la pérdida del 10 % del material que se atribuye a la pérdida de peso por agua a los 256 °C para GEL15 y 249 °C para COL. Las muestras por otro lado, pierden el 10 % de su peso un poco antes entre los 155 °C y 234 °C. Sin embargo, al percibirse este cambio a tan altas temperaturas podría beneficiar que las membranas sean estables para futuras aplicaciones biomédicas, como lo señalan otros trabajos (Zhou *et al.*, 2016, Laha *et al.*, 2016). León-Mancilla *et al.* (2016) proponen que hay tres pérdidas importantes de peso para muestras de COL; la del agua, la combustión del COL alcanzando su temperatura máxima a 311.63 °C y una tercera de 450 °C a 700 °C, donde solo queda el residuo de la combustión alrededor del 25 % sin embargo, Zhou *et al.* (2016) observaron que la combustion del COL era a los 190 °C a los 600 °C. Mientras que el control COL, muestra que llega a su temperatura de degradacion máxima a los 324 °C según la derivada del peso con respecto a la temperatura (León-Mancilla *et al.*, 2016).

Ahora bien para las muestras con GEL, Mukherjee y Rosolen (2013), observaron que los compuestos volatiles debidos a la combustion de la GEL comienzan por debajo de los 200 °C, mientras que para Laha *et al.* (2016) mencionan que la descomposición tiene su pico a los 291 °C y a los 500 °C, ya que se encuentra solo un 24 % del peso como residuo sin embargo, nuestra GEL

resultó ser mucho mas estable, obteniendose un pico alrededor de los 350 °C, pero con un residuo de 22 % a los 500 °C.

VIII.3. Calorimetría Diferencial de Barrido

León-Mancilla *et al.* (2016), al analizar su muestra de COL encontraron tres picos, el primer pico fue endotérmico entre los 85 y 90 °C, mientras que Foltran *et al.* (2008) lo encontraron antes a los 76 °C y con un desplazamiento a los 112 °C cuando la muestra se encontraba seca, en nuestro caso la degradación endotérmica debido al desprendimiento del agua ocurrió entre los 76 °C y 88 °C, aumentando conforme aumenta la cantidad de COL. La segunda transición es otro pico endotérmico entre los 275 °C y 325 °C, correspondiente a la pérdida de los puentes de hidrógeno de la proteína debido a la desnaturalización de ésta (pérdida de la estructura terciaria). Bozec y Odlyna (2011) mediante análisis microtermal TMA, observaron que dicha transición se encontraba en los 305 ± 10 °C y los 345 ± 10 °C, sin embargo, aunque se observa ligeramente un decaimiento en nuestro gráfico no se alcanza a observar el pico de la degradación. La ultima degradación fué un pico exotérmico debido a la combustión del COL entre los 350 °C y 425 °C, éste tampoco se pudo apreciar debido a que el análisis terminó a los 300 °C, sin embargo, mediante nuestra temperatura de degradación máxima en el TGA estas temperaturas se cumplieron.

Por otro lado, para las muestras con GEL, Song *et al.* (2008) encontraron un pico de deshidratación a los 80 °C y un pico de degradación a los 225°C a

230°C, Asimismo Erencia *et al.* (2015), señalan que este último pico de degradación puede deberse a cambios en la estructura terciaria del GEL, pero no ha cambios en su composición química. Safdari *et al.* (2016) encontraron este pico entre los 223 °C y 278 °C. Bozec y Odlyha (2011) mediante análisis microtermal encontraron dicha transición en los 290 ± 10 °C y 420 ± 10 °C. Aunque algunas de estas transiciones pueden ser observadas en las muestras que contienen COL y GEL, el control de GEL no muestra consistencias con las demás muestras. Por lo que es recomendable realizar de nuevo este análisis para la muestra de GEL, y extender la temperatura de la prueba para poder visualizar correctamente los dos últimos picos uno debido a cambios en la estructura terciaria y un último por la combustión de los polímeros.

VIII.4. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Según la literatura, el COL y la GEL tienen ciertos grupos específicos en su estructura, la amida A, B, I, II y III, que serán discutidas por separado para su mejor entendimiento, así como las vibraciones del solvente para saber si se encuentran rastros de este en las fibras electrohiladas.

VIII.4.1. Ácido acético

El ácido acético tiene una formula molecular CH_3-COOH ($C_2H_4O_2$), Erencia *et al.* (2015), reportan un pico en 1706 cm^{-1} correspondiente al enlace C=O, un pico en 1271 cm^{-1} debido al enlace C-O, un pico en 1388 cm^{-1} para el enlace C-

H_2, y en 3020 cm^{-1} para el estiramiento asimétrico del enlace C-H. Sin embargo, en el FTIR de las muestras no se aprecian dichos picos, por lo que podemos decir que las muestras están libres de residuos del ácido acético.

VIII.4.2. Amida A

León-Mancilla *et al.* (2016), reportan en su investigación un pico de amida A en 3285 cm^{-1} utilizando COL, correspondiente al enlace N-H, mientras que Moyunga *et al.* (2004), reportan en GEL, que esta amida obtuvo un pico de absorbancia más amplio en comparación con el COL, también encontraron un pico en 2930 cm^{-1} cuando existen asociaciones diméricas estables en grupos de ácidos carboxílicos. En COL, se encontró un pico en 3500-3000 cm^{-1} y en 1100-1000 cm^{-1} correspondiente a la reacción de glucosilación (reacción de Maillard), que se dá por la presencia de carbohidratos que reaccionan con el grupo amino terminal de la cadena polipeptídica, pues en la extracción del COL comúnmente las azucares no son discriminados. Por otro lado, Zha *et al.* (2012) reportan un pico entre 3290-3306 cm^{-1} para esta Amida, así como Sisson *et al.* (2009), en los 3300 cm^{-1}. En nuestro estudio pudimos observar que obtuvimos un pico pronunciado en 3302 cm^{-1} correspondiente a esta amida, que se movió ligeramente a la derecha conforme la cantidad de COL se fue incrementando, también encontramos un pico en 1083 cm^{-1}, que según Muyonga *et al.* (2004), puede corresponder a los carbohidratos presentes en el COL y que reaccionaron con esté en el proceso de glucosilación , este pico no es apreciable en la muestra de GEL. Cabe mencionar que el proceso de glucosilación pudo haber ocurrido

durante la preparación de las muestras que contenían COL y mediante el campo electrostático durante el proceso de electrohilado.

VIII.4.3. Amida B

León-Mancilla *et al.* (2016) encontraron una vibración por esta amida por sus grupos CH_3 y CH_2 entre los 2917-2935 cm^{-1}, los cuales son visibles en aquellas muestras con COL debido al estiramiento simétrico del enlace, pero no en las muestras con alto contenido de GEL. Sin embargo, Zha *et al.* (2012) encontraron un pico en 2935-2875 cm^{-1} el cual fue visible en las muestras de GEL; y visibles en nuestro espectro para todas las muestras, incluyendo el control de COL.

VIII.4.4. Amida I

Consistentemente con lo reportado , tanto las muestras con GEL y las de COL presentaron un poco de amida I, alrededor de los 1600-1660 cm^{-1} (León-Mancilla *et al.*, 2016; Safdari *et al.*, 2016; , Laha *et al.*, 2016; Jalaja *et al.*, 2016; Siimon *et al.*, 2015; Erencia *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2015; Zha *et al.*, 2012; Foltran *et al.*, 2008; entre otros) debido al estiramiento de los enlaces de C=O y C-N, cabe señalar que las muestras aquí reportadas estuvieron en un rango entre 1633 (COL control) y 1646 cm^{-1} para la muestra con la más alta concentración de COL, esta última muestra supera a ambos controles, que pudieran ser atribuidos a cambios en la estructura β de la proteína, sin embargo, el cambio no es tan pronunciado (Muyonga *et al.*, 2004).

VIII.4.5. Amida II

Esta amida esta reportada en un rango de los 1560-1535 cm^{-1}, debida a las interacciones entre el nitrógeno e hidrógeno, así como del carbono e hidrógeno (León-Mancilla *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2016; Safdari *et al.*, 2016; Jalaja *et al.*, 2016; Laha *et al.*, 2016; Erencia *et al.*, 2015; Foltran *et al.*, 2008; Sisson *et al.*, 2009; entre otros), en las muestras de GEL-COL con y sin electrohilar de nuestro estudio este pico fué visible alrededor de los 1536 cm^{-1}.

VIII.4.6. Amida III

Varios trabajos mencionan que la posición de esta Amida se puede encontrar entre los 1235-1240 cm^{-1}, esto concuerda para nuestras muestras, ya que se localizó alrededor de los 1236 cm^{-1} en todas ellas (León-Mancilla *et al.,* 2016; Jalaja *et al.,* 2016; Laha *et al.,* 2016; Erencia *et al*., 2015; Sisson *et al.,* 2009; Foltran *et al.,* 2008)

En este estudio se encontró que las diferencias entre las muestras y controles de GEL y COL son mínimas, ya que no existieron cambios estructurales observables al someter estos polímeros naturales a las condiciones de electrohilado, y que la posición de las amidas nos corroboró que la estructura de estos polímeros fué conservada, aunque se trató con diferentes fuentes de extracción.

VIII.5. Proliferación celular en fibroblastos HFF-1

La proliferación celular de nuestras muestras para el segundo día de ensayo llegó a un máximo de 72 % para la muestra con COL al 10 % y un mínimo de 56 % para la muestra que contiene solo 56 %, con respecto al control de suspensión celular, sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas en estas muestras, por lo que podemos decir que no importa el contenido de COL contenido en la muestra, las células tienen la misma proliferación. Al quinto día la proliferación celular se encontró más constante entre las muestras, con una proliferación máxima de 75.44 ± 3.4 % para la muestra con una concentración de COL del 1 %, aún sin mayor significancia. Otros autores han optado por hacer estudios de proliferación celular en diversas muestras conteniendo GEL y COL, como fue Timnak y colaboradores (2011), quienes evaluaron el cultivo celular de neuroblastoma y fibroblastos humanos, donde después de tres días encontraron una proliferación mayor, pero sin exceder el control, ésta se atribuyó a la reticulación de las fibras que funcionaron como un mejor andamio que simulaba las condiciones de la matriz extracelular. Kwak *et al.* (2016), realizaron un estudio con osteoblastos MC3T3-E1 y encontraron que la concentración de COL aumentaba la proliferación celular de dicha línea celular. Por otro lado, Datta *et al.* (2010), realizaron el ensayo con células de endotelio de la vena umbilical humana (HUVECS) y estas al ponerse en una maya comercial recubierta por nanofibras de GEL mejoraron su proliferación celular del 20 al 70 % con respecto a la membrana sin recubrir. Angarano et al (2013), logró confluencia en fibroblastos gingivales humanos, al segundo día del ensayo, mediante la

reticulación de nanofibras de GEL con glioxal sin embargo, no logró la misma confluencia utilizando queratinocitos gingivales humanos, solo se observó adherencia. Erencia *et al.* (2015) lograron una viabilidad del 90 % en fibroblastos humanos dérmicos mediante el uso de bajas concentraciones de ácido acético. Zha *et al.* (2012), utilizaron fibroblastos 3T3 y pudieron observar adhesión celular mediante el uso de microscopia electrónica de barrido, no obstante, se observó decrecimiento en la proliferación celular al séptimo día, que se atribuyó al uso de sales en el proceso de electrohilado. Safdari *et al.* (2016), obtuvieron una proliferación del 85 % en fibroblastos humanos en fibras de GEL/fibroína. Furuike *et al.* (2016), lograron obtener una proliferación del 80 % a las 24 y 48 h de ensayo, utilizando fibras de GEL electrohilada y reticulada con glutaraldehído. Ma *et al.* (2016) lograron una viabilidad del 95 % en muestras de COL con hidrogel. Zhou *et al.* (2016), la proliferaron células al 100 % con queratinocitos humanos, además de la diferenciación de dichas células. Aunque no se logró una proliferación mayor al control (100 %), se espera que con el uso de solventes menos ácidos y el uso de reticulantes la proliferación de las nanofibras GEL/COL (75.44 %) aumente.

IX. CONCLUSIONES

Se logró realizar el electrohilado de membranas de GEL de uso bacteriológico y COL de uso cosmético bajo los parámetros de distancia de 15 cm, flujo 0.80 ml/h, con un rango de temperatura de 20-32 °C, humedad del ambiente entre 20 y 40 %. Con este procedimiento se obtuvieron nanofibras delgadas visualizadas bajo imágenes de SEM y con solubilidad, sin defectos mediante una disolución en ácido acético glacial.

El análisis de espectroscopia FTIR mostró que no existen diferencias en la estructura química de los polímeros naturales que pudieran significar alguna reacción, por lo que se esperaría que las cadenas aminoacídicas conservaran su estructura original.

Por otro lado, los análisis de sus propiedades térmicas (DSC y TGA), mostraron que las membranas GEL/COL conservaban de igual manera sus propiedades solamente con ligeros cambios dependiendo de la concentración de COL en cada muestra, por lo que es posible que a temperaturas corporales estás conservaran su forma y estructura.

El análisis de proliferación celular en fibroblastos HFF-1, mostró una proliferación celular mayor al 50 % al segundo día de ensayo, y una proliferación mayor al 70 % durante el quinto día de ensayo. El sistema de nanofibras electrohiladas de GEL y COL mostró biocompatibilidad al no encontrarse indicios de apoptosis celular.

X. RECOMENDACIONES

Realizar un perfil de aminoácidos de ambos componentes (GEL y COL) y de las membranas electrohiladas para obtener la conformación de ambos materiales, de manera que se corrobore la información obtenida en el análisis FTIR.

Realizar un post-tratamiento para la eliminación de residuos ácidos del solvente, siendo esta una posible causa por la cual no se obtuvieron resultados de proliferación celular mayor y el uso de reticulantes que disminuyan la solubilidad de las nanofibras, para garantizar una óptima proliferación celular.

XI. TRABAJO A FUTURO

En la fase dos de esta investigación se pretende incorporar un agente antimicrobiano, así como trabajar sobre la degradación del sistema GEL/COL mediante un sistema de reticulación que promueva de mejor manera la proliferación celular y la eliminación de residuos del solvente y reticulante, que pudieran ser tóxicos para las células.

Por último, en la fase tres, trabajar sobre un sistema completo de apósito cutáneo tipo sándwich con propiedades impermeables, absorbentes, y que promueva la proliferación celular, tenga efectos antibacterianos y sea de bajo costo.

XII. LITERATURA CITADA

Ahmed, F. E., B.S. Lalia y R. Hashaikeh, 2015. A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. Desalination. 356:15–30.

Angarano M., S. Schulz, M. Fabritius, R. Vogt, T. Steinberg, P. Tomakidi, C. Friedrich, R. Mülhaupt, 2013. Layered gradient nonwovens of in situ crosslinked electrospun collagenous nanofibers used as modular scaffold systems for soft tissue regeneration. Advanced Functional Materials. 23(26):3277–3285.

Atiyeh, B. S., S. W. Gunn y S. N. Hayek, 2005. Scientific Review State of the Art in Burn Treatment. World Journal of Surgery. 148:131–148.

Aziz, Z., B. Abdul, y R. Hassan, 2017. The effects of honey compared to silver sulfadiazine for the treatment of burns: A systematic review of randomized controlled trials. Burns. 43(1):50–57.

Bahemia, I. A., A. Muganza, R. Moore, F. Sahid y C. N. Menezes, 2015. Microbiology and antibiotic resistance in severe burns patients: A 5-year review in an adult burns unit. Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries. 41(7):1536–1542.

Boateng, J. y O. Catanzano, 2015. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing. Journal of Pharmaceutical Sciences. 104(11):3653–3680.

Bope E.T. y R. D. Kellerman. 2016. Physical, and chemical injuries. In: Bope E. T, R. D. Kellerman (1). Conn's Current Therapy. Elsevier. Philadelphia, PA; 21.

Bozec, L., y M. Odlyha, 2011. Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy. Biophysical Journal. 101(1):228–236.

Cesteros-Iturbe, L. C. 2004. Aplicaciones de la FTIR al estudio de las Interacciones Polímero-Polímero. Revista Iberoamericana de Polímeros, 5(3): 111–132.

Chen, G., J. Chen, B. Yang, L. Li, X. Luo, X. Zhang, L. Feng, Z. Jiang, M. Yu, W. Guo, W. Tian, 2015. Combination of aligned PLGA/Gelatin electrospun sheets, native dental pulp extracellular matrix and treated dentin matrix as substrates for tooth root regeneration. Biomaterials. 52(1): 56–70.

Detta, N., C. Errico, D. Dinucci, D. Puppi, D. A. Clarke, G.C. Reilly, y F. Chiellini, 2010. Novel electrospun polyurethane/gelatin composite meshes for

vascular grafts. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 21(5):1761–1769.

Dongargaonkar, A. A., G. L. Bowlinn y H. Yang, 2013. Electrospun Blends of Gelatin and Gelatin − Dendrimer Conjugates as a Wound-Dressing and Drug-Delivery Platform. Biomacromolecules. 14:4038–4045.

Duconseille, A., T. Astruc, N. Quintana, F. Meersman y V. Santé-Lhoutellier, 2015. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: a review, Food Hydrocolloids. 43:360-376.

Duconseille, A., M. Traikia, M. Lagrée, C. Jousse, G. Pages, P. Gatellier, T. Astruc, V. Santé-Lhoutellier, 2017. Food Hydrocolloids The impact of processing and aging on the oxidative potential, molecular structure and dissolution of gelatin. Food Hydrocolloids Journal. 66:246–258.

Erencia, M., F. Cano, J. A. Tornero, M. M. Fernandes, T. Tzanov, J. Macanás, y F. Carrillo, 2015. Electrospinning of gelatin fibers using solutions with low acetic acid concentration: Effect of solvent composition on both diameter of electrospun fibers and cytotoxicity. Journal of Applied Polymer Science. 132(25):1–11.

Fischer, R. L., M. G. McCoy y S. A. Grant, 2012. Electrospinning collagen and hyaluronic acid nanofiber meshes. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 23(7):1645–1654.

Foltran, I., E. Foresti, B. Parma, P. Sabatino y N. Roveri, 2008. Novel Biologically Inspired Collagen Nanofibers Reconstituted by Electrospinning Method. Macromolecular Symposia. 269(1):111–118.

Freshney, R. I., 2016. Biology of cultured cells. IN:Freshney, R. I. (7) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Wiley Liss. New York; 19-37.

Furuike, T., T. Chaochai, T. Okubo, T. Mori y H. Tamura, 2016. Fabrication of nonwoven fabrics consisting of gelatin nanofibers cross-linked by glutaraldehyde or N-acetyl-d-glucosamine by aqueous method. International Journal of Biological Macromolecules.

Gelse, K., E. Pöschl, y T. Aigner, 2003. Collagens — structure, function, and biosynthesis. Advance Drug Delivery Reviews. 55:1531–1546.

Goh, Y. F., I. Shakir, y R. Hussain, 2013. Electrospun fibers for tissue engineering, drug delivery, and wound dressing. Journal of Materials Science. 48(8):3027–3054.

Haider, A., S. Haider, y I. Kang, 2015. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. Arabian Journal of Chemistry.

Hofman, K., N. Tucker, J. Stanger, M. Staiger, S. Marshall y B. Hall, 2012. Effects of the molecular format of collagen on characteristics of electrospun fibres. Journal of Materials Science. 47(3):1148–1155.

Iten, M., S. Liu, A. Shukla, y P. D. Silva, 2017. Investigating the impact of Cp -T values determined by DSC on the PCM-CFD model. Applied Thermal Engineering. 117:65–75.

Jain, A. A., A. Me ha, y V. V. Ranade, 2016. Processing of TGA data: Analysis of isoconversional and model fitting methods. Fuel. 165: 490–498.

Jalaja, K., D. Naskar, S. C. Kundu y N. R. James, 2016. Potential of electrospun core-shell structured gelatin-chitosan nanofibers for biomedical applications. Carbohydrate Polymers. 136: 1098–1107.

Kwak, S., A. Haider, K. C. Gupta, S. Kim y I. K. Kang, 2016. Micro/Nano Multilayered Scaffolds of PLGA and Collagen by Alternately Electrospinning for Bone Tissue Engineering. Nanoscale Research Letters. 11(1):1–16.

Kuttappan, S., D. Mathew y M. B. Nair, 2016. Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen / gelatin for bone tissue engineering. International Journal of Biological Macromolecules. 93:1390–1401.

Laha, A., S. Yadav, S. Majumdar y C. S. Sharma, 2016. In-vitro release study of hydrophobic drug using electrospun cross-linked gelatin nanofibers. Biochemical Engineering Journal. 105: 481–488.

Lee, J., M. J. Cuddihy y N. A. Kotov, 2008. T hee-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. Tissue Enginnering. 14(1).

León-Mancilla, B. H., M. A. Araiza-Téllez, J. O. Flores-Flores y M. C. Piña-Barba, 2016. Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering. Journal of Applied Research and Technology. 14(1):77–85.

Lu, W., M. Ma, H. Xu, B. Zhang, X. Cao y Y. Guo, 2015. Gelatin nanofibers prepared by spiral-electrospinning and cross-linked by vapor and liquid-phase glutaraldehyde. Materials Letters. 140:1–4.

Lutolf, M. P. y J. A. Hubbell, 2005. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. Nature Biotechnology 23(1), 47–55.

Ma, X., Z. He, F. Han, Z. Zhong, L. Chen y B. Li, 2016. Preparation of collagen/hydroxyapatite/alendronate hybrid hydrogels as potential scaffolds for bone regeneration. Colloids and Surfaces. 143:81–87.

Me hasa, M., M. A. Asadollahi, K. Ghaedi, H. Salehi, y A. Arpanaei, 2015. Electrospun aligned PLGA and PLGA/gelatin nanofibers embedded with

silica nanoparticles for tissue engineering. International Journal of Biological Macromolecules, 79:687–695.

Mendes, A. C., K. Stephansen y I. S. C honakis, 2017. Electrospinning of food proteins and polysaccharides. Food Hydrocolloids, 68:53–68.

Moctezuma-Paz, L., I. Páez-franco, A. Y. Sánchez-Flores, N. Xellic y A. Riva, 2015. Epidemiología de las quemaduras en México Epidemiology of burns in Mexico. Rev Esp Méd Quir. 20:78–82.

Morsy, R., M. Hosny, F. Reicha y T. Elnimr, 2017. Developing and physicochemical evaluation of cross-linked electrospun gelatin e glycerol nanofibrous membranes for medical applications. Journal of Molecular Structure. 1135:222–227.

Motooka D., K. Kawahara, S. Nakamura, M. Doi, Y. Nishi, Y. Nishiuchi, Y. K. Kang, T. Nakazawa, S. Uchiyama, T. Yoshida, T. Ohkubo y Y. Kobayashi, 2012. The triple helical structure and stability of collagen model peptide with 4(S)-hydroxyprolyl-Pro-Gly units. Biopolymers. 98(2):111-21.

Mukherjee, I. y M. Rosolen, 2013. Thermal transitions of gelatin evaluated using DSC sample pans of various seal integrities. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 114(3): 1161–1166.

Muyonga, J. H., C. G. B. Cole, y K. G. Duodu, 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (Lates niloticus). Food Chemistry. 86(3):325–332.

Okutan, N., P. Terzi y F. Altay, 2014. Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. Food Hydrocolloids. 39:19–26.

Parenteeau-Bareil, R., R. Gauvin y F. Berthod, 2010. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. Materials. 3(3):1863–1887.

Pezeshki-Modaress, M., M. Zandi y H. Mirzadeh, 2014. Fabrication of gelatin/chitosan nanofibrous scaffold: Process optimization and empirical modeling. Polymer International. 64(4):571–580.

Place, E. S., N. D. Evans y M. M. Stevens, 2009. Complexity in biomaterials for tissue engineering. Nature Publishing Group. 8(6):457–470.

Pustlauk, W., B. Paul, M. Gelinsky y A. Bernhardt, 2016. Jellyfish collagen and alginate: Combined marine materials for superior chondrogenesis of hMSC. Materials Science and Engineering. 64:190–198.

Rana, D., S. Arulkumar, A. Vishwakarma y M. Ramalingam, 2014. Chapter 10. Considerations on designing Scaffold for Tissue Engineering. IN: Boshwakarma, A., P. Sharpe, S. Shi y M. Ramalingam. (1) Biomaterials in Tissue Engineering. Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences. Elsevier Inc. Philadelphia, PA; 133-148.

Rodríguez, E. y E. Villegas, 2012. Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. Métodos y Materiales. 2:26–32.

Rojas-Cortés, M. G., B. M. Vallejo-Díaz y J. Ernesto-Perilla, 2008. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. Revista Ingeniería e Investigación, 28(1):57–71.

Sadideen, H., I. Goutosy R. Kneebone, 2017. Burns education: The emerging role of simulation for training healthcare professionals. Burns. 43(1):34–40.

Safdari, M., E. Shakiba, S. H. Kiaie y A. Fattahi, 2016. Preparation and characterization of Ceftazidime loaded electrospun silk fibroin/gelatin mat for wound dressing. Fibers and Polymers. 17(5):744–750.

Sajeev, U. S., K. A. Anand, D. Menon y S. Nair, 2010. Control of nanostructures in PVA, PVA/chitosan blends and PCL t hough electrospinning. Bulletin Mater Sci. 31:343-351.

Schiefer, J. L., E. Arens, P. Grigutsch, R. Rath, A. Hoffmann, P. C. Fuchs y A. Schulz, 2016. A prospective intra-individual evaluation of silk compared to Biobrane for the treatment of superficial burns of the hand and face. Burns. 43(3):539–548.

Sell, S. A., M. J. Mcclure, K. Garg, P. S. Wolfe y G. L. Bowlin, 2009. Electrospinning of collagen / biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. Advanced Drug Delivery Reviews. 61(12):1007–1019.

Siimon, K., H. Siimon y M. Järvekülg, 2015. Mechanical characterization of electrospun gelatin scaffolds cross-linked by glucose. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 26(1):1–9.

Sisson, K., C. Zhang, M. C. Farach-Carson, D. B. Chase y J. F. Rabolt, 2009. Evaluation of Cross-Linking Methods for Electrospun Gelatin on Cell Growth and Viability. Biomacromolecules. 10(7).

Song, J. H., H. E. Kim y H. W. Kim, 2008. Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 19(1):95–102.

Timnak, A., F. Yousefi-Gharebaghi, R. Pajoum-Shariati, S. H. Ba hami, S. Javadian, S. Hojjati-Emami y M. A. Shokrgozar, 2011. Fabrication of nano-

structured electrospun collagen scaffold intended for nerve tissue engineering. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 22(6):1555–1567.

Tylingo, R., G. Gorczyca, S. Mania, P. Szweda y S. Milewski, 2016. Preparation and characterization of porous scaffolds from chitosan-collagen-gelatin composite. Reactive and Functional Polymers. 103:131–140.

Velázquez-Barraza R. D., A. S. Álvarez-Suarez, L. J. Villarreal-Gómez, J. A. Páz-González y R. Vera-Graziano, 2016. Designing a Low-Cost Electrospinning Device for Practical Learning in a Bioengineering Biomaterials Course. Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica. 37(1):27–36.

Wang, C. C., C. H. Su y C. C. Chen, 2008. Water absorbing and antibacterial properties of N-isopropyl acrylamide grafted and collagen/chitosan immobilized polypropylene nonwoven fabric and its application on wound healing enhancement. Journal of Biomedical Materials Research - Part A. 84(4):1006–1017.

Yildirimer, L., N. T. K. Thanh y A. M. Seifalian, 2012. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. Trends in Biotechnology. 30(12):638–648.

Zha, Z., W. Teng, V. Markle, Z. Dai y X. Wu, 2012. Fabrication of gelatin nanofibrous scaffolds using ethanol/phosphate buffer saline as a benign solvent. Biopolymers. 97(12):1026–1036.

Zhang, Q., Q. Wang, S. Lv, J. Lu, S. Jiang, J. M. Regenstein y L. Lin, 2016. Food Bioscience Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreoc homis niloticus*) and channel cat fish (*Ictalurus punctatus*). Food Bioscience. 13:41–48.

Zhang, S., Y. Huang, X. Yang, F. Mei, Q. Ma, G. Chen, S. Ryu y X. Deng, 2008. Gelatin nanofibrous membrane fabricated by electrospinning of aqueous gelatin solution for guided tissue regeneration. Journal of Biomedical Materials Research. Part A. 90:671–679.

Zhang, Y. Z., J. Venugopal, Z. Huang, C. T. Lim y S. Ramakrishna, 2006. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. Polymer. 47:2911-2917.

Zhao, W., W. Liu, J. Li, X. Lin y Y. Wang, 2014. Preparation of animal polysaccharides nanofibers by electrospinning and their potential biomedical applications. Journal of Biomedical Materials Research - Part A. 103(2):807–818.

Zhou, T., N. Wang, Y. Xue, T. Ding, X. Liu, X. Mo y J. Sun, 2016. Electrospun tilapia collagen nanofibers accelerating wound healing via inducing

keratinocytes proliferation and differentiation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 143:415–422.

Zulkifli, F. H., F. S. Jahir-Hussain, M. S. B. Abdull-Rasad y M. Mohd-Yusoff, 2014. *In vitro* degradation study of novel HEC/PVA/collagen nanofibrous scaffold for skin tissue engineering applications. Polymer Degradation and Stability. 110:473–481.