

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS ELECTROHILADAS DE POLICAPROLACTONA Y QUITOSANO PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE CLORHIDRATO DE TIAMINA

Ángela Patricia Sánchez Cepeda ^{a,*}
Ricardo Vera-Graziano ^{b,*}
Efrén de Jesús Muñoz-Prieto ^{c,*}
Edwin Yesid Gómez-Pachón ^{d,*}
María Josefa Bernad-Bernad ^{e,*}
Alfredo Maciel-Cerda ^{f,*}

Resumen

Actualmente existen importantes investigaciones sobre la preparación de membranas porosas bioabsorbibles que permiten la liberación controlada de fármacos y vitaminas. En este estudio se propuso preparar membranas porosas a partir de policaprolactona (PCL) y quitosano (CS) bajo la técnica de electrohilado aplicando diferentes parámetros con el fin de evaluar sus características internas y propiedades para una

^aEscuela de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia-UPTC. 150002. Grupo de Investigación en Desarrollo y Aplicaciones de Nuevos Materiales-DANUM, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia-UPTC.

*angelita1125766@hotmail.com

^bInstituto de Investigaciones en Materiales-IIM, Universidad Nacional Autónoma de México-UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, Distrito Federal. 04510.

*graziano@unam.mx

^cEscuela de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia-UPTC. 150002. Grupo de Investigación en Desarrollo y Aplicaciones de Nuevos Materiales-DANUM, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia-UPTC, 150002.

*efren17@gmail.com

^dGrupo de Investigación en Desarrollo y Aplicaciones de Nuevos Materiales-DANUM, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia-UPTC, 150002. Escuela de Diseño Industrial, Facultad sede Duitama, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia-UPTC.

*edwin.gomez02@uptc.edu.co

^eDepartamento de Farmacia en la Facultad de Química-UNAM, Circuito Universitario 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, Distrito Federal. 04510.

*bernadf@comunidad.unam.mx

^fInstituto de Investigaciones en Materiales-IIM, Universidad Nacional Autónoma de México-UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, Distrito Federal. 04510.

*macielal@unam.mx

potencial aplicación como liberador del clorhidrato de tiamina (Vitamina B_1). Además se desarrolló el estudio de la cinética de liberación *In vitro* del TC con las membranas preparadas. Se obtuvo una membrana polimérica a partir de una disolución de PCL/CS w/w (8:1) y otra de PCL/CS w/w (10:1) con una carga del TC respecto a la PCL w/w (20:1) disueltos en TFA/DCM v/v (80:20), con mínimos defectos como bulbos y diámetros uniformes. Las fibras fueron caracterizadas con apoyo de técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Espectroscopia Infrarroja (FTIR), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Análisis Termogravimétrico (TGA), Difracción de Rayos X (DRX), Ángulo de contacto (Hidrofilicidad de las fibras), Ensayos mecánicos de las membranas en estudio, Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). La liberación del principio activo se realizó en una solución salina amortiguada por fosfatos (PBS buffer) a 37 °C y pH= 7.4. La cinética de liberación se analizó mediante el trazado de los datos acumulativos frente al tiempo. Este sistema fue capaz de liberar desde 65 % a 85 % de clorhidrato de tiamina en un periodo de 60 h, aproximadamente, lo cual evidencia la potencialidad de estas membranas para liberar efectivamente a la vitamina B_1 .

Palabras clave: clorhidrato de tiamina, electrohilado, liberación controlada, policaprolactona, quitosano.

Abstract

Currently there are significant research on the preparation of bioabsorbable porous membranes that allow the controlled release of drugs and vitamins. In this study it was proposed to prepare porous membranes from polycaprolactone (PCL) and chitosan (CS) under the electrospinning technique, applying different parameters in order to evaluate its internal characteristics and properties for a potential application as liberator of thiamine hydrochloride (vitamin B_1). Besides studying the *in vitro* release kinetics developed TC with membranes prepared. A polymer membrane was obtained from a solution of PCL/CS w/w (8:1) and PCL/CS w/w (10:1) with a load of TC regarding PCL w/w (20:1) dissolved in TFA/DCM v/v (80:20), with lows defects such as bulbs and uniform diameters. The fibers were characterized with support techniques of Scanning Electron Microscopy (SEM), Infrared spectroscopy (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetric Analysis (TGA), X-Ray Diffraction (XRD), contact angle (Hydrophilicity of the fibers), mechanical testing of the membranes in study, Transmission Electron Microscopy (TEM), Atomic Force Microscopy (AFM). The release of active substance is performed in a buffered saline by phosphates (PBS buffer) over 37 °C and pH = 7.4. The release kinetics was analyzed by plotting cumulative data versus time. This system was able to release from 65 % to 85 % thiamine hydrochloride in a 60 h, approximately, which shows the potential of these membranes to effectively release vitamin B_1 .

Key words: thiamin hydrochloride, electrospinning, controlled release, polycaprolactone, chitosan.

1. Introducción

La nanotecnología representa una frontera importante con potencial para avanzar significativamente en el campo de la ingeniería de tejidos [1, 2]. La preparación y uso de membranas porosas basadas en nanofibras han cobrado interés recientemente para aplicaciones biomédicas, especialmente en la ingeniería de tejidos, cuyo objetivo es crear estructuras biodegradables y biocompatibles con propiedades mecánicas y biológicas similares a la matriz extracelular (ECM), entre varias técnicas de preparación de membranas porosas se presenta el electrohilado como una técnica con gran potencial [3].

El proceso de electrohilado, permite que una amplia gama de fármacos puedan ser directamente encapsulados dentro de la fase en masa de fibras a nanoescala disueltas o dispersadas en el disolvente orgánico usado para electrohilado. La malla fibrosa resultante posee un período de tres dimensiones con una estructura porosa abierta y alta área superficial específica, proporcionando una condición ideal para la administración controlada de fármacos [4]. Hasta la fecha, el electrohilado se ha usado para la fabricación de andamios de numerosos polímeros biodegradables, tales como poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(lactida-co-glucósido) (PLGA) y poliuretano (PU). Además, las proteínas naturales también se han utilizado, incluyendo colágeno, elastina y gelatina.

Los polímeros naturales han sido de gran interés por su no toxicidad, compatibilidad con otros biopolímeros, la adhesión celular y la proliferación; como la quitina, quitosano y celulosa. Estos se mezclan a menudo con polímeros sintéticos porque poseen limitaciones como la baja estabilidad, la liberación de tóxicos y productos de degradación que pueden ser perjudiciales para las células, ya que la miscibilidad entre sus moléculas es un factor muy importante especialmente para las propiedades mecánicas de la mezcla [5].

Las fibras electrohiladas de PCL son estudiadas para la ingeniería de tejidos por ser ventajosas, ya que el tamaño del poro se puede controlar fácilmente cambiando la densidad de la fibra en la unidad de área [6].

La poli(ϵ -caprolactona) (PCL) es un polímero se-

micristalino, biodegradable con buenas propiedades mecánicas, fácil de procesar, compatible tanto con tejidos duros como blandos y aceptado por la FDA. La PCL es útil en la producción de fibras electrohiladas que simulan la matriz extracelular. Sin embargo, su hidrofobicidad limita la adhesión y proliferación celular. Con la finalidad de modificar sus propiedades superficiales se mezcla con polímeros hidrofílicos materiales naturales que facilitan la adhesión celular, el incremento en las propiedades mecánicas y térmicas de las membranas basadas en la PCL [3].

Recientes estudios indicaron el uso de la técnica de electrohilado para lograr la liberación controlada de un modelo hidrofílico de fármaco (ampicilina) presentando una baja compatibilidad con la policaprolactona (Sultanova *et al.* [7]). Otros autores evaluaron cómo las diferentes concentraciones de PCL y dipiridamo (DIP) con la técnica del electrohilado, afecta a las propiedades estructurales y físicas de las fibras (Repanas y Glasmacher [8]). De otro lado Irani *et al.* [9], evaluaron la carga y liberación de pequeñas moléculas y macromoléculas de fármacos en materiales compuestos de silicio poroso nanoestructurado y policaprolactona (PSI-PCL) prensadas, y su capacidad para soportar la unión de células de mamíferos y su crecimiento. De la misma manera otros estudios indican, que una mezcla de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y poli(óxido de etileno) (PEO) se electrohilaban para producir mallas fibrosas que podían liberar un fármaco proteico de una manera controlada. Estas mallas mostraron una buena estabilidad morfológica después de la incubación en la solución tampón, lo que resultó en la liberación controlada de lisozima durante un período prolongado con la reducción de ráfagas iniciales [4].

Varias fibras de PCL cargadas con fármaco preparadas a partir de solución, suspensión y emulsión mostraron que las fibras de PCL son una opción potencial de entrega de fármacos para cualquier tipo de medicamentos. Estas fibras también se pueden preparar después de la copolimerización con otros polímeros tales como PEG, quitosano o clorofilina [6].

El quitosano (CS) es un polisacárido, similar a la estructura de la celulosa. El grupo amino primario rinde propiedades especiales que hacen al CS muy útil en aplicaciones farmacéuticas. Comparado con muchos otros polímeros naturales, el quitosano tiene

una carga positiva y es mucoadhesivo. Por lo tanto, se utiliza ampliamente en aplicaciones de administración de fármacos. El quitosano se degrada bajo la acción de fermentos, es atóxico y fácilmente extraíble del organismo sin causar reacciones secundarias concurrentes. Posee propiedades antimicrobianas y absorbe los metales tóxicos como: mercurio, cadmio, plomo, etc. Además, tiene buena adhesión, capacidad de coagulación y actividad inmunoestimulante [10]. El quitosano es un polímero prometedor para la entrega de fármacos para el colon, ya que puede ser degradado por la flora bacteriana del colon y por su poder mucoadhesivo [11].

Varios estudios relacionados con el electrohilado de quitosano evaluaron el comportamiento de liberación de clorhidrato de tetraciclina cargado en un andamio antimicrobiano de quitosano/poli(ácido láctico) (Tet-CS/PLA) (Jiang et al. [12]). También, Rieger et al. [13], demostraron que las nanofibras de quitosano/CA/PEO pueden servir como vehículos de suministro de Cinemaldehído (CA) que potencialmente erradican las infecciones causadas por *Pseudomonas*. Song et al. [14], prepararon una membrana electrohilada de quitosano/poli(óxido de etileno) (PEO) que contenía nanopartículas de plata como un vehículo de administración implantable para la liberación dual de iones de clorhexidina y plata estudio que se realizó para prevenir las infecciones percutáneas.

En general, todos los estudios anteriores han mostrado como se lograron preparar nanofibras por electrohilado de policaprolactona (PCL) y de quitosano (CS) de manera independiente, y la forma en que cada uno de ellos logró hacer la liberación de distintos tipos de fármacos. Sin embargo, ninguno de ellos muestra haber electrohilado PCL y CS de manera conjunta para la liberación de fármaco como el clorhidrato de tiamina (TC) por medio de un soporte obtenido por la técnica de electrohilado. Por tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar la preparación de membranas a partir de diferentes concentraciones de PCL y CS con el disolvente mixto de ácido trifluoroacético/diclorometano (TFA/DCM) bajo diferentes parámetros de electrohilado, con el fin de observar las propiedades estructurales, térmicas y mecánicas de estas membranas, así como el estudio cinético de liberación del clorhidrato de tiamina, lo cual permitirá conocer la viabilidad de estas mem-

branas para usarse como vehículos de liberación de la vitamina.

2. materiales y metodos

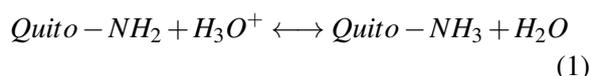
La poli(ϵ -caprolactona) (PCL, peso molecular 80,000 Da), el quitosano (CS, bajo peso molecular 50,000 a 190,000 Da, grado de desacetilación 98 %), el clorhidrato de tiamina (TC) al 99 %, los solventes para la mezcla polimérica ácido trifluoroacético (TFA) al 99 %, diclorometano (DCM) al 99.8 % se obtuvieron de Sigma Aldrich.

2.1. Preparación de la solución polimérica

La mezcla polimérica se inició con la disolución del CS en TFA que duró aproximadamente de 3 a 5 horas, posterior a ésta se agregó la PCL se electrohiló a las 16 horas cuando se encontraba totalmente disuelta la mezcla polimérica. La FASE I, se llevó a cabo con PCL/CS a una relación w/w A (8:1) y B (10:1) disueltos en TFA. La FASE II, se llevó a cabo con carga de TC al 5 % respecto a la PCL, disueltos en TFA/DCM v/v (4:1), con PCL/CS a una concentración w/w C (8:1), su viscosidad fue de 142.3 cP a una velocidad de 150 r.p.m. y D (10:1), su viscosidad fue de 75.33 cP a una velocidad de 150 r.p.m.

Para todos los tratamientos se usó el TFA teniendo en cuenta que la PCL tiene una fácil cristalización, lo que explica su limitada solubilidad en muchos disolventes que son capaces de disolver otras estructuras de poliéster amorfos. La cinética de degradación de la PCL es muy lenta, por lo que es muy conveniente para la aplicación de los sistemas de suministro de liberación lenta con cinética de largo plazo se extiende durante períodos superiores a 1 año. El TFA es un disolvente adecuado para disolver la PCL y es eficaz para la degradación de este [15, 16]. El TFA es un disolvente adecuado para electrohilar quitosano porque los grupos amino del quitosano pueden formar sales con TFA, capaz de destruir eficazmente las interacciones intermoleculares entre las moléculas de quitosano que facilitan electrohilado [17, 18]. El quitosano en su forma cristalina es normalmente insoluble en soluciones acuosas, su solubilización se alcanza debido a grupos amino libres protonables presentes en su estructura molecular, según el

siguiente equilibrio (ver Ec. (2)) [19]:



La protonación de quitosano lo transforma en un polielectrolito en soluciones ácidas. La disolución del TFA con o sin DCM y CS produce residuos de sales debido a la alta solubilidad. Este tipo de sales son $-\text{NH}_3^+\text{CF}_3\text{COO}^-$ (sales trifluoroacetato de quitosano) [20, 21].

2.2. Técnica de preparación de las membranas

Para la fabricación de las membranas se usó un equipo de electrohilado conectado a una fuente de voltaje de alta tensión Glassman EH60, una bomba de inyección marca NE-300 TM y un colector plano de aluminio [16]. La solución se depositó en una jeringa con una aguja de acero inoxidable calibre 22 G, como capilar. Se probaron caudales de la solución polimérica desde 0.05 a 0.4 ml/h. El voltaje aplicado entre la aguja y el colector fueron desde 10 hasta 15 kV y la distancia entre ellos se varió entre 8 y 15 cm. El electrohilado se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Tabla 1. Tratamientos sin Clorhidrato de Tiamina

Tipo de trat.	Concent. sln. polim. w/w	Ste.	Parámetros		
			Voltaje kV	Flujo ml/h	Distancia aguja-colector cm
A	PCL/CS (8:1)	TFA	10	0.2	8
			10	0.2	10
			13	0.1	10
B	PCL/CS (10:1)	/DCM	15	0.05	10
			15	0.2	13
			15	0.05	15

trat.: tratamiento; Concent. sln. polim.: concentración solución polimérica; ste: solvente

En la Tabla 1 se presentan los diferentes tratamientos de acuerdo a los parámetros de la técnica de electrohilado que se usaron con PCL/CS a diferentes concentraciones, sin adicionar el TC. En la Tabla 2 se puede observar los tratamientos que se usaron las mismas concentraciones de la Tabla 1, pero ahora con la adición de TC y bajo otros parámetros de electrohilado. Se realizó estos dos grupos de tratamientos con el fin de determinar a cual concentración de PCL/CS y con cuales parámetros se logra

Tabla 2. Tratamientos con Clorhidrato de Tiamina

Tipo de trat.	Concent. sln. polim. w/w	Ste.	Parámetros		
			Voltaje kV	Flujo ml/h	Distancia aguja-colector cm
C	PCL/CS (8:1)	TFA	13	0.4	10
D	PCL/CS (10:1)	/DCM	15	0.3	15

trat.: tratamiento; Concent. sln. polim.: concentración solución polimérica; ste: solvente

obtener membranas con nanofibras definidas, con la menor cantidad de defectos y homogeneidad de las fibras para la distribución de la vitamina.

2.3. Medición y caracterización

Las características morfológicas de las membranas obtenidas por electrohilado se obtuvieron con la técnica Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) de emisión de campo tipo Schottky (FE-SEM, siglas en inglés) JEOL Modelo JSM-7600F. La preparación de las muestras se realizó con un recubrimiento de una película de oro mediante pulverización catódica asistida por plasma para favorecer la conductividad de la muestra, el voltaje de operación para el haz de electrones fue de 15 kV. La distribución de diámetros, el diámetro promedio y el porcentaje de área porosa se calcularon con el software Image-J a partir de las micrografías obtenidas de 50 recuentos. El análisis químico se realizó por medio de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) un equipo FTIR-Thermo Scientific Nicolet 6700 y un sistema de reflexión total atenuada (ATR) ATR-Smart Orbit, sobre un intervalo de número de onda entre 400 y 4000 cm^{-1} . Las propiedades térmicas de las membranas se estudiaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC, siglas en inglés) en un equipo DSC Q2000 TA Instruments, entre 0 y 250 °C a una rampa de calentamiento de 10 °C/min.

El comportamiento de la degradación y estabilidad térmica de cada una de las muestras se llevó a cabo con un analizador TGA Q 5000 TG (TA Instruments). Las muestras de aproximadamente 7 mg fueron sometidas a calentamiento desde 25 a 800 °C a una rampa de 10 °C* min^{-1} bajo atmósfera de nitrógeno. Los patrones de difracción de rayos X fueron obtenidos usando el difractor SIEMENS D-500,

utilizando la radiación de Cu K α ($\lambda = 0.1542$ Å). Se empleó un goniómetro Ramé-hart, inc. Modelo 100-07-00, ajustado con un sistema óptico, para observar la interacción del agua con la superficie de las membranas de PCL/CS con carga de TC, para determinar la hidrofiliidad o hidrofobicidad de las membranas se depositó una gota de agua sobre la membrana y se tomaron imágenes durante 2:40 min, de los cuales se eligieron 3 tiempos 1, 90 y 150 segundos para medir los ángulos. Es sabido que el CS es más hidrofílico que la PCL, por lo que se consideró hacer los ensayos de ángulo de contacto con el fin de evaluar la humectabilidad en la superficie del andamio como posible resultado de la combinación de CS y PCL.. Las propiedades mecánicas de las membranas, se realizaron con el fin de determinar las propiedades estructurales a las que estará sometido un andamio en el cuerpo humano cuando está liberando la vitamina. Este estudio se realizó con una máquina universal de pruebas mecánicas Instron 5500R, con una celda de carga de 500 N y velocidad de deformación de 10 mm/min a 25 °C. Con el fin de determinar la distribución del fármaco en las nanofibras fue visto por medio de la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) con un microscopio JEOL JEM-1200EX. La topografía de la superficie de las membranas se caracterizó mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) utilizando un microscopio de sonda de barrido (SPM) JSPM-4210 (JEOL Ltd) para evaluar la distribución de los polímeros con el fármaco en la nanofibra.

2.4. Comportamiento de liberación de TC

Se utilizó una celda de Franz [22] para analizar la cinética de permeación *In vitro*, mediante la liberación del fármaco en el sistema de estudio. El estudio se realizó en un sistema de 2 celdas para cada membrana electrohilada de PCL/CS con carga de TC, cada celda consta de un compartimento superior (donador), donde se coloca la membrana con un líquido que simulan los fluidos corporales, en este caso buffer PBS 0.1 M, separados por una membrana tipo GV 0.22 μ m. El compartimento inferior posee un brazo de muestreo lateral por donde se toman alícuotas para analizar la concentración acumulada de los activos liberados. La celda posee una camisa externa que puede conectarse a un baño termostático con recirculación de manera de asegurar, una temperatura constante durante los ensayos

de liberación. Esta temperatura se mantuvo a 37 °C. La agitación fue continua a 100 r.p.m. Cada 24 h, 3 ml de sobrenadante fue tomada desde el medio de liberación y se añadió inmediatamente 3 ml de PBS fresco (pH 7.4 a 37 °C) para mantener el volumen de la celda.

La concentración de la TC liberada se monitoreó en función del tiempo, midiendo sus absorbancias en un espectrofotómetro UV-Vis marca Ocean Optics, Inc., modelo DT1000CC-130. Las curvas de las concentraciones acumuladas de TC en función del tiempo se analizaron con base a la ecuación semiempírica del tipo ley de potencia (Ec (1)), según Ritger y Peppas, 1987 [23]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (2)$$

en la ecuación, $\frac{M_t}{M_\infty}$ es el cociente de las concentraciones molares en el compartimento receptor a tiempo t e ∞ , respectivamente y representa la fracción de activo liberado al tiempo t , k es una constante que incorpora la concentración del activo así como características geométricas y estructurales del dispositivo de liberación que incluyen el tipo de membrana utilizada y n es el exponente indicativo del mecanismo de liberación.

En la ecuación Ec. (2) cuando $n = 0.5$ corresponde a la difusión fickiana (para intervalos de tiempo cortos). Valores de n superiores a 0.5 se asocian a un mecanismo de difusión anómalo (no fickiano). En particular, si $n = 1$, la ecuación que se obtiene es la de cinética de orden cero, que Peppas considera un caso límite de transporte no-fickiano, denominado "transporte de Caso II" (Langer y Peppas, 1981). Esta cinética corresponde a la obtenida a partir de matrices poliméricas en las que el frente de hinchamiento del polímero avanza de forma constante. Valores de $n > 1$ aparecen usualmente cuando el tiempo de liberación es muy elevado. Este tipo de mecanismo de difusión anómalo no fickiano lo denominan "transporte de Supercaso II". Por último, los valores de $n < 0.5$, se asocian a la presencia de poros en la matriz polimérica, y la consiguiente difusión simultánea a través de la matriz hinchada y a través de los poros llenos de medio de disolución [24].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de la distribución de diámetros en las nanofibras y porosidad

3.1.1. FASE I. Membranas electrohiladas sin carga de TC

En las Figuras 1 A, se puede observar la morfología por SEM de las membranas de nanofibras bajo diferentes tratamientos, siendo el más relevante la distancia entre la aguja-colector en el proceso de electrohilado. En la Figura 1 A (i), se observa fibras interconectadas muy heterogéneas, esto pudo ser debido a que el solvente no se evaporó en el trayecto y se depositaron las fibras húmedas en el colector, presentan un diámetro promedio de $0.295 \mu\text{m}$ y una desviación estándar de $0.127 \mu\text{m}$. El porcentaje de porosidad de la muestra cargada con fármaco se encontró que era 51.1%. En la Figura 1 A (ii), se observa una estructura de fibras homogéneas muy interconectadas, con diámetro mayores (diámetro promedio de $0.552 \mu\text{m}$ y una desviación estándar de $0.367 \mu\text{m}$, el porcentaje de porosidad de la muestra cargada con fármaco se encontró que era 69.3%), sin fusión entre las fibras, indicando con esto que las fibras se depositaron con menor humedad en el colector a comparación con la anterior, esto debido a que la distancia aumenta entre aguja y colector. En la Figura 1 A (iii) al aumentar el voltaje a 13 kV hay presencia de perlas, aguja y colector. Li y Wang [25], demostraron que la formación de perlas puede ser debido al bajo peso molecular/concentración y baja viscosidad, alta tensión superficial o baja densidad de carga. Podemos concluir que a bajas concentraciones y alta la fuerza eléctrica generada, hace que la solución solidifique el polímero de manera muy rápida y se acumule en forma de perlas o gotas dispersas a una de las fibras esencialmente libre de gotas. Esto ocurre debido a un insuficiente enmarañamiento de cadenas en la solución (entanglement) donde la concentración crítica inicial C_i está por debajo en la concentración [26].

En todas las Figuras 1 B se aumentó el voltaje a $Q=15 \text{ kV}$ respecto a los tratamientos mostrados en las Figuras 1 A; en este caso se usó una concentración a (10:1), en general se aprecian fibras interconectadas y delgadas, no se observan perlas, en este tratamiento se aumenta la distancia aguja-colector y el flujo varía con cada distancia estudiada. En la Figura 1 B (i), se

aprecian fibras fusionadas con diámetros muy delgados, esto pudo ocurrir debido a que el solvente no se evaporó completamente en el trayecto, presentan un diámetro promedio de $0.138 \mu\text{m}$ y una desviación estándar de $0.059 \mu\text{m}$. El porcentaje de porosidad de la muestra cargada con fármaco se encontró que era 57%. En la Figura 1 B (ii), con un aumento de la distancia aguja-colector a $d=13 \text{ cm}$, se aprecian fibras electrohiladas con menor fusión entre ellas, presentan un diámetro promedio de $0.130 \mu\text{m}$ y una desviación estándar de $0.046 \mu\text{m}$. El porcentaje de porosidad de la muestra cargada con fármaco se encontró que era 78.4% lo que se podría concluir que el solvente no se evapora en totalidad pero da al andamio una mayor porosidad en comparación con las membranas de las Figuras 1 B (i). Se observan mejor su homogeneidad de diámetro de las fibras. En la Figura 1 B (iii), con el aumento de la distancia a $d=15 \text{ cm}$ y con una disminución del flujo a $Q=0.05 \text{ ml/h}$, se observan fibras interconectadas, esto pudo ser debido a que el solvente no se secó en el trayecto, se observa menor porosidad en la membrana en comparación con la Figura 1 B (ii), presentan un diámetro promedio de $0.174 \mu\text{m}$ y una desviación estándar de $0.067 \mu\text{m}$. El porcentaje de porosidad de la muestra cargada con fármaco se encontró que era 56.7%.

De esta primera fase, se determinó que el aumentar la concentración de la mezcla polimérica tratamiento B, se logran obtener fibras fusionadas con mejor homogeneidad del diámetro de las mismas, se obtuvo una mayor porosidad en las membranas en comparación con las fibras obtenidas del tratamiento A. También, se determinó que el aumento de la distancia aguja-colector permite un mayor secado y solidificación de las nanofibras.

3.1.2. FASE II. Membranas electrohiladas con carga de TC

En la Figura 1 C se puede observar las fibras de PCL/CS cuando se le agregó TC respecto a 1 g de PCL concentración w/w (20:1). La PCL/CS a una concentración w/w (8:1), se puede evidenciar que las fibras son homogéneas, distribuidas al azar con muy pocos defectos lo que indicaría que es una membrana que tiene características útiles para que la distribución del fármaco esté sobre la superficie y en el interior de la fibra, presentan un diámetro promedio

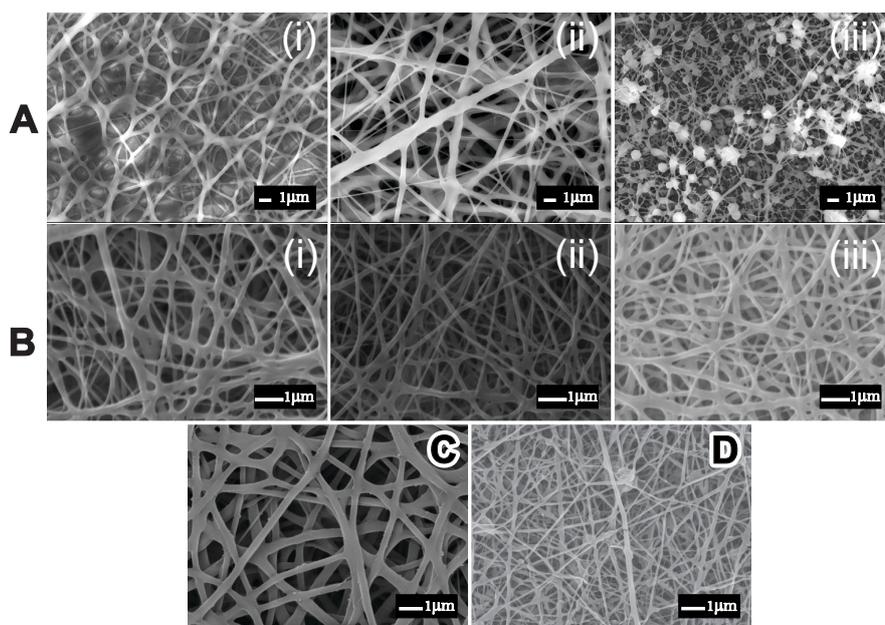


Figura 1. Micrografía SEM de electrohilado de PCL/CS disueltos en TFA, a una concentración w/w de: A (8:1) y B (10:1); PCL/CS disueltos en TFA/DCM con carga de TC, a una concentración w/w de: C (8:1) y D (10:1)

de $0.282 \mu\text{m}$ y una desviación estándar de $0.0803 \mu\text{m}$, la porosidad presentada en estas membranas fue de 66.34% .

En la Figura 1 D, se observa que las fibras están interconectadas posiblemente debido a que el solvente no se evaporó en el trayecto causando bulbos (material no electrohilado) y fusión entre ellas; presentan varios diámetros con un promedio de $0.104 \mu\text{m}$ y una desviación estándar de $0.040 \mu\text{m}$; además los beads serán una característica muy importante como soporte útil en la retención de fármacos para una liberación sostenida y controlada del principio activo en su estudio de cinética de liberación. La porosidad presentada en estas membranas fue de 83.61% .

De esta segunda fase se concluye que la membrana del tratamiento C, presenta características potenciales para la liberación de fármaco, ya que ésta puede estar distribuida uniformemente en la fibra por presentar menos defectos y el tamaño de las fibras inferiores a $0.3 \mu\text{m}$.

3.2. Análisis de grupos funcionales en materiales y andamios por ATR-FTIR

En la Figura 2, se muestran los espectros de absorción ATR-FTIR de los espectros de PCL, CS, TC puros y las membranas pre y post-tratamiento; la asignación de bandas se resume en la Tabla 3. Se identifican fácilmente bandas intensas de la PCL co-

mo el enlace carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) en modo de estiramiento a 1723 cm^{-1} . La banda a 2863 cm^{-1} corresponde a un estiramiento simétrico del metileno (CH_2) y a 2942 cm^{-1} se encuentra la banda asimétrica de estiramiento del CH_2 . La banda a 1291 cm^{-1} se asigna a los enlaces $\text{C}-\text{O}$ y $\text{C}-\text{C}$ de la fase cristalina de la cadena principal de la PCL [17, 27]. Las bandas del CS son débiles debido a su baja concentración en las membranas.

El CS presenta picos característicos correspondientes al estiramiento de los grupos amino protonados (enlace sencillo $-\text{NH}_3^+$) aproximadamente a 1644 y 1575 cm^{-1} [28]. Se hacen evidentes las bandas de los grupos OH a 3356 cm^{-1} y $\text{N}-\text{H}$ a 3288 cm^{-1} , que resultan de la desacetilación a la que fue sometida la quitina. También se aprecian las bandas del grupo $\text{C}-\text{H}$ a 2850 cm^{-1} , grupo Piranósico a 1069 cm^{-1} y grupo $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ a 1021 cm^{-1} [29, 30].

En la Figura 2(b), se observa el espectro del clorhidrato de tiamina respecto a la membrana pre y post-liberación (ver Tabla 3). El TC presenta un estiramiento del enlace $\text{C}-\text{OH}$ que se encuentra en 1039 cm^{-1} (alcohol primario). En la banda 1536 cm^{-1} se encuentra el tiazol con un doble enlace del $\text{C}=\text{N}$; en 1600 cm^{-1} se observa el enlace de la pirimidina, donde se aprecia un doble enlace entre $\text{C}=\text{C}$ y $\text{C}=\text{N}$. La banda del metilo se observa en 2942 cm^{-1} y en la banda 3429 cm^{-1} se encuentra un estiramiento

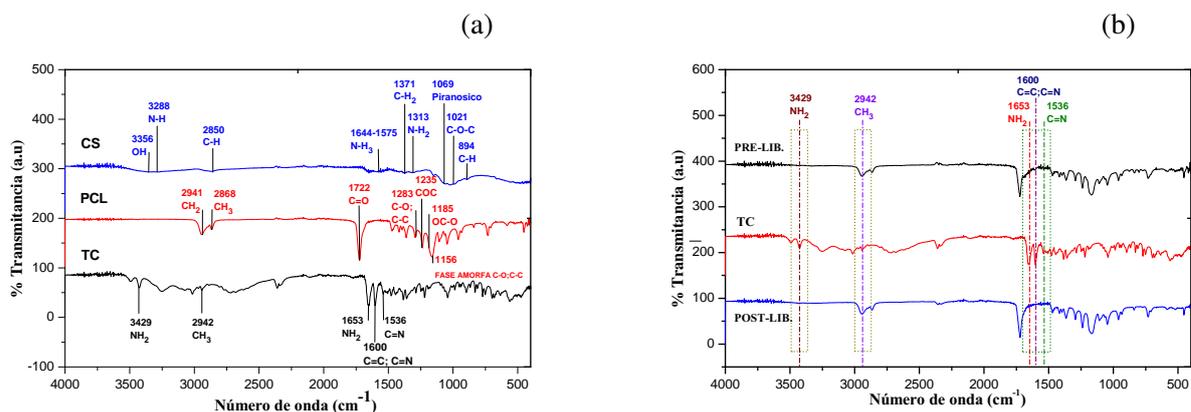


Figura 2. Espectros FTIR de: (a) reactivos puros y (b) membranas electrohiladas de PCL/CS pre y post-liberación de TC

Tabla 3. Modos vibracionales de los grupos funcionales bandas de absorción de las membranas pre y post-liberación a partir de la solución PCL/CS w/w (8:1) con carga de TC en TFA/DCM v/v (4:1)

Núm. onda [cm ⁻¹]	Grupo funcional	Muestra				
		CS	PCL	TC	Memb. pre-liber.	Memb. post-liber.
3429	Tensión NH ₂	—	—	✓	✓	—
3288	Tensión N-H	✓	—	—	✓	—
2942	Tensión CH ₃	—	—	✓	✓	—
2942	Estiramiento asimétrico CH ₂	—	✓	—	✓	✓
2863	Estiramiento simétrico CH ₂	—	✓	—	✓	✓
1723	Estiramiento carbonil C=O	—	✓	—	✓	✓
1653	Flexión N-H ₃	—	—	✓	✓	—
1600	Flexión C=O y C=C	—	—	✓	✓	—
1539	Tensión C=N	—	—	✓	✓	—
1313	Tensión N-H ₂	✓	—	—	✓	—
1163	Estiramiento COC	—	✓	—	✓	✓

Memb. pre-lib.: Membrana pre-liberación;

Memb.post-lib.: Membrana post-liberación

del NH₂ [31]. En conclusión, se observa que la intensidad de las bandas de absorción de la membrana pre-liberación confirma que la PCL es el polímero en mayor concentración y la vitamina B₁ la de menor

concentración. En la membrana post-liberación de TC, se identifica la liberación de la vitamina y se observa mayor concentración de PCL en él, lo que indica que si hubo liberación del TC. Las bandas del CS son débiles debido a su baja concentración en las membranas.

El estudio espectroscópico muestra que no hay evidencias de reacción química entre los componentes que constituyen la membrana, no se observa ningún desplazamiento de la frecuencia en las bandas de los grupos funcionales característicos respecto a los correspondientes componentes puros, no hay una interacción mutua con formación de enlaces covalentes entre las cadenas de CS y PCL. Las interacciones posibles entre los componentes poliméricos incluyen enlaces de hidrógeno intermoleculares entre el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de la PCL y el hidrógeno del grupo hidroxilo o ion amonio del CS, lo que resulta deseable en un andamio biodegradable para la liberación controlada de TC [32], porque estos materiales tienen la capacidad de ser compatibles con el tejido y de degradarse cierto tiempo después de ser implantados dando lugar a productos que no son tóxicos y pueden ser eliminados por el organismo o metabolizados por éste.

3.3. Transiciones de fase por Temperatura de Transición por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y estabilidad térmica por Análisis Termogravimétrico (TGA)

Se determinó la cristalinidad (X_c) y temperatura de fusión (T_m) de cada una de las muestras descritas en la Tabla 4. Estos análisis se obtuvieron mediante el programa TA Universal Analysis. En la Figura

3 (a), se observa las transiciones térmicas de los polímeros, la TC y las membranas de PCL/CS con carga de TC.

Tabla 4. Análisis térmico por DSC de muestras puras y cargadas con TC

Muestra	X_c (%)	T_m (°C)
Policaprolactona (PCL)	48.33*	62.08
Quitosano (CS)	—	—**
Clorhidrato de Tiamina (TC)	100	243.62
Membrana de PCL/CS con carga de TC	48.95*	62.09

* $X_c = \Delta H_m / \Delta H_m^\circ$, con $\Delta H_m^\circ = 139.5$ J/g, entalpía de fusión de la PCL 100 % cristalino [33]

** CS, evaporación de agua

La policaprolactona (PCL) muestra un solo pico endotérmico correspondiente al punto de fusión (T_m) a 62.08 °C con una entalpía de 67.85 J/g, muy cercanos a los valores reportados por Murphy *et al.* [33], el análisis de quitosano (CS) mostró un primer pico endotérmico muy amplio en 82.48 °C debido a la eliminación de agua libre (desacetilación), tiene una entalpía de 273.3 J/g, García *et al.* [34] reportan esta eliminación de agua (ver Figura 3 (c)); además, se detectó un pico exotérmico en 283.74 °C que podría ser debido a la descomposición de las cadenas de quitosano con una entalpía de 60.04 J/g.

La causa de la diferencia en la T_m de estos polímeros puede ser debido a que las propiedades térmicas de quitosano dependen del grado de acetilación, cristalinidad y peso molecular medio [35, 36]. La T_m del clorhidrato de tiamina (TC) está en 243.62 °C con una entalpía de 103.2 J/g, se observa una evaporación de agua en 82.50 °C y la membrana de PCL/CS con carga de TC presenta una T_m de 62.09 °C con una entalpía de 84.84 J/g. En conclusión, se observa el pico endotérmico de la PCL más representativo en el andamio a diferencia del CS y TC, lo que hace su punto de fusión más característico en su análisis térmico de fusión [37].

Debido a que las temperaturas de fusión de los componentes están por arriba de los 50 °C, se entiende que las membranas son dimensionalmente estables a la temperatura del cuerpo humano. las membranas también son térmicamente estables puesto que se no se degradan por efecto de la temperatura, estos se degradan por encima de los 200 °C.

En la Figura 3 (b), se presentan los termogramas

para determinar la degradación y estabilidad térmica de cada uno de los polímeros, el fármaco y la membrana de PCL/CS con carga de TC realizado entre 50 y 600 °C. Se obtuvieron análisis termogravimétrico (TGA) mediante el programa TA Universal Analysis, donde se reconoce el comportamiento térmico de descomposición mostrando la pérdida de peso y la temperatura de descomposición de cada muestra.

La pérdida de peso de la membrana de PCL/CS con carga de TC se aprecia a una temperatura de 345.7 °C con una pérdida de masa que se relacionó con un descenso del 90.39 %, esto en comparación con la PCL por presentar mayor porcentaje de polímero en la disolución y que la policaprolactona mostró un punto a 385.12 °C que corresponde al cambio relevante en la rapidez de pérdida de masa y que se relacionó con un descenso del 97.82 % en 40.21 °C, visto como una caída casi vertical en el termograma TGA desde una temperatura de 385.12 °C a 425.33 °C [36]. La pérdida de peso del quitosano (CS) se aprecia con un 56.86 % a una temperatura de 264.8 °C debido a la presencia de un grupo amino libre en su estructura. El grupo funcional amino tiene la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares debido a su menor tamaño, produciendo entrecruzamiento en las cadenas poliméricas; además, su estructura molecular es más amorfa favoreciendo este tipo de interacción [38]. En la estabilidad térmica del clorhidrato de tiamina (TC) se observa dos etapas de pérdida de peso. La primera pérdida de peso es de 45.21 % a los 207.9 °C, debido a la evaporación de agua. La segunda pérdida de peso es de 28.47 % a 246.3 °C por la descomposición térmica de la TC.

3.4. Difracción de Rayos X (DRX)

En la Figura 4 (a), se observan los patrones de difracción de rayos-X de la policaprolactona, picos que se generan a los ángulos 19.58 °, 21.22 ° y 23.68 °. Lo cual implica que el material posee una estructura semicristalina, datos coincidentes con los autores Hernández M. *et al* [39].

El quitosano Figura 4 (b) es cristalino y muestra polimorfismo, como se evidencia por sus patrones de difracción de rayos X. Su estructura es diferente de los alomorfos de la quitina y han sido refinadas las estructuras cristalinas de varias formas incluyendo formas anhidras e hidratadas, así como de varios

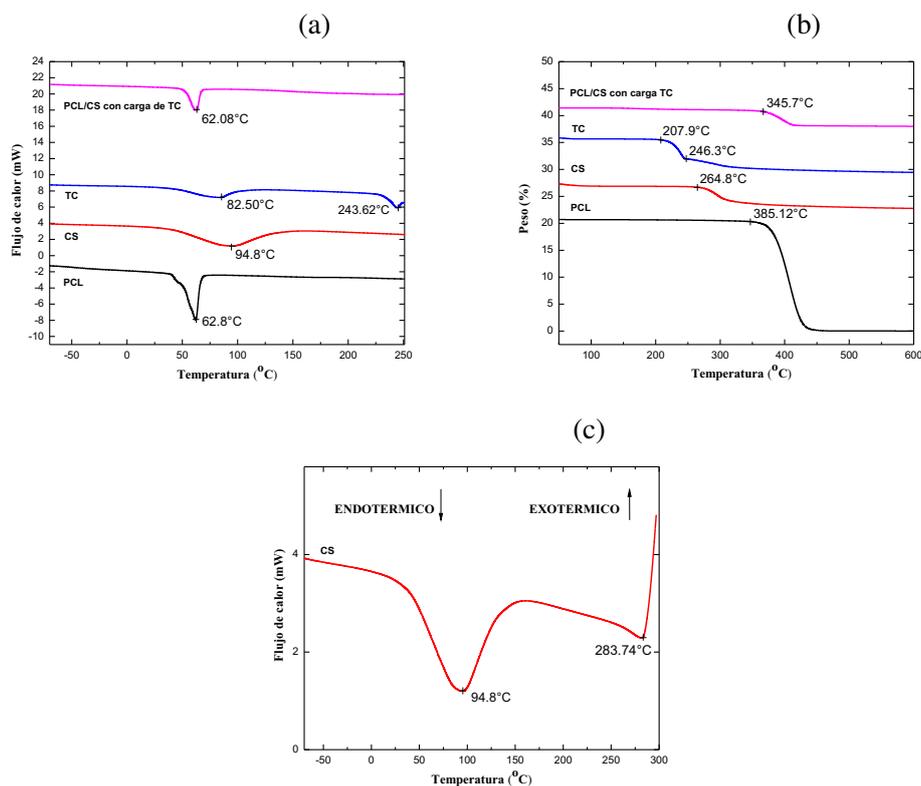


Figura 3. Termogramas de los materiales y la membrana PCL/CS w/w (8:1) con carga de TC en TFA/DCM v/v (4:1): (a) DSC, (b) TGA y (c) DSC del CS

tipos de sales. La forma hidratada del quitosano presenta dos flexiones, a 10° y aproximadamente a 20° , la forma anhidra exhibe un pico en 2θ cerca de 15° . El CS presenta una fase cristalina y amorfa, donde las moléculas en estado sólido están organizadas en regiones cristalinas y coexisten con regiones amorfas, por lo que se demuestra la estabilidad de la estructura del biopolímero como resultado del tratamiento de desacetilación heterogénea [30, 39].

En la Figura 4 (c) se observa los datos de difracción de rayos X en el clorhidrato de tiamina, presenta un pico agudo característico a $2\theta = 8^\circ, 18^\circ, 25^\circ, 26^\circ, 28^\circ, 30^\circ$ que corresponde a la reflexión plano del TC (www.rigaku.com/en/products/xrd/miniflex/app006). Además de estos 6 picos hay algunos picos no identificados que aparecen en el patrón de DRX indicando que el TC es cristalino [40].

En la Figura 4 (d) se observa las membranas electrohiladas con carga de TC presenta señales en el patrón de DRX, picos que corresponden a la PCL en $2\theta = 21^\circ$ y 23° , por ser el biopolímero utilizado en mayor concentración es el único que se observa. El patrón DRX de las membranas presentó una banda

amplia sin la presencia de señales, entre $15-50^\circ$ (2θ), lo cual está de acuerdo con la estructura semicristalina de este material. Además se observa dos leves picos entre 10 y 15° que corresponde a la forma anhidra del CS.

3.5. Ángulo de contacto (Hidrofiliidad de las fibras)

La determinación de ángulo de contacto teórico de la PCL fue de $115,64 \pm 1,26$ [3]. Para la determinación del ángulo de contacto de las membranas de PCL/CS con carga de TC se depositó una gota de agua sobre la membrana y se tomaron imágenes durante 2:40 min, de los cuales se eligieron 3 tiempos (1, 90 y 150 segundos) para medir los ángulos. El quitosano es más hidrófilo que la PCL; por lo tanto, la adición de quitosano en PCL posiblemente cambiará la humectabilidad de la superficie de las membranas.

Teniendo en cuenta este punto, en la Tabla 5 se encuentra los estudios de humectabilidad de 5 tratamientos por cada andamio de estudio donde se aprecia un incremento en la hidrofiliidad del 29.53% en el ángulo de contacto de la membrana PCL/CS

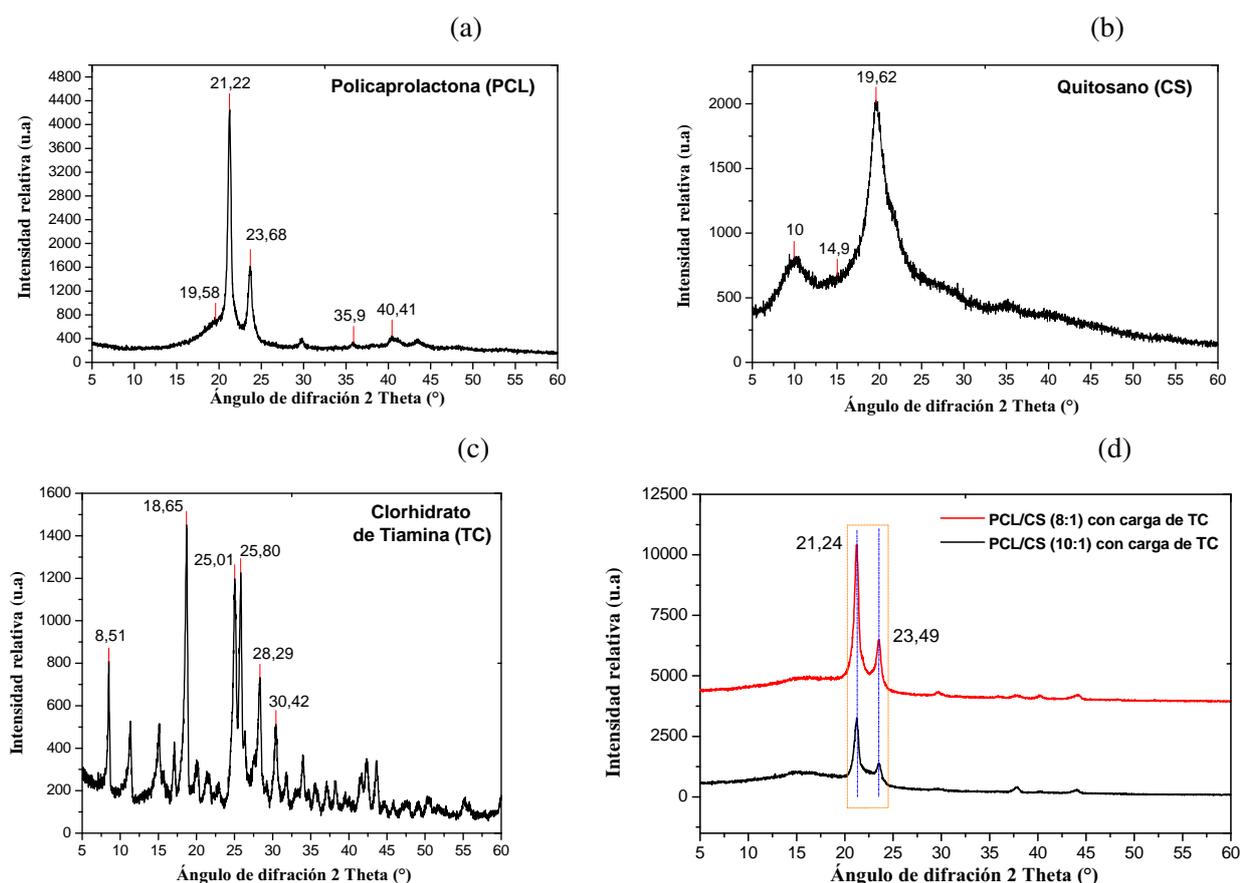


Figura 4. Difracción de rayos-X de: (a) Policaprolactona, (b) Quitosano, (c) Clorhidrato de Tiamina, (d) Membranas electrohiladas para estudios de la cinética de liberación

w/w (8:1). Al inicio se obtuvo un ángulo de $50.48^{\circ} \pm 2.02^{\circ}$, a los 90 s disminuyó a 30.76 ± 2.61 y a los 150 s, se redujo hasta $21.23^{\circ} \pm 2.69^{\circ}$, este valor se mantuvo constante después de dicho tiempo, y la gota se extendió sobre la membrana polimérica. La hidrofiliidad de la membrana polimérica permite tener una biodegradación más rápida como sistema portador de fármacos y su hidrólisis será mucho más rápida lo que indica que su eliminación en el cuerpo humano será totalmente posterior a la liberación del principio activo. En el ángulo de contacto de la membrana de PCL/CS w/w (10:1), se observa un incremento del 37.41% en la hidrofiliidad, respecto al andamio de PCL/CS w/w (8:1). Al inicio se tenía un ángulo de $42.83^{\circ} \pm 3.39^{\circ}$, a los 90 s aumentó a 69.00 ± 2.49 y a los 150 s se redujo hasta $65.22^{\circ} \pm 2.39^{\circ}$, este valor se mantuvo constante después de dicho tiempo y la gota se extendió sobre la membrana polimérica.

Se concluye que las fibras más finas producirán un área de contacto líquido-sólido más pequeño y

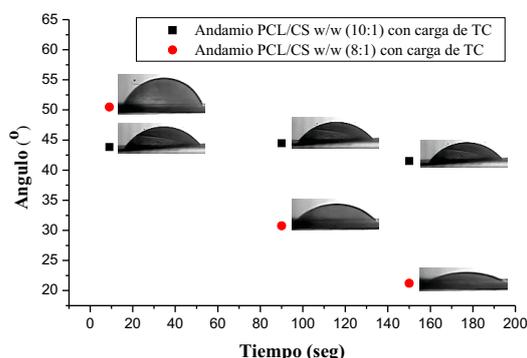
aumenta el área de contacto aire-líquido cuando se coloca una gota de agua sobre la superficie de la membrana, lo que lleva a un ángulo de contacto superior (superficie hidrofóbica), esto ocurre con la membrana de PCL/CS (10:1) que presenta un diámetro promedio de las fibras de $0.104 \mu\text{m}$. Además, la composición y el diámetro de la fibra en conjunto determinan los ángulos de contacto de la membrana polimérica debido a la naturaleza de los polímeros naturales y sintéticos. En la membrana PCL/CS (8:1), el promedio de los diámetros de las fibras fue de $0.317 \mu\text{m}$, un diámetro de fibra mayor a la membrana de PCL/CS (10:1), por lo tanto su ángulo de contacto fue menor (superficie hidrofílica) debido a que esta membrana tenía mayor concentración de quitosano (polímero hidrofílico).

En la Figura 5 se muestra las mediciones de ángulo de contacto para las diferentes membranas cargadas de TC, donde se hace evidente la disminución del ángulo de contacto concluyendo que la mezcla de la PCL con biopolímeros hidrófilos, mejora las

Tabla 5. Resultados de las mediciones de ángulo de contacto estático del agua de las membranas electrohiladas de PCL/CS (8:1) Y (10:1) con carga de TC

Memb.	No. TT	Tiempo (s)					
		1		90		150	
		Ang. (°)	Desv.	Ang. (°)	Desv.	Ang. (°)	Desv.
PCL/CS w/w (8:1) con carga de TC	1	57.75	2.64	35.83	1.21	26.13	3.22
	2	51.52	1.08	23.08	5.28	20.30	2.11
	3	51.37	0.48	39.98	2.91	20.76	2.19
	4	62.10	3.67	30.26	1.60	17.53	3.82
	5	29.70	2.26	24.65	2.06	21.45	2.15
	Prom.	50.48	2.02	30.76	2.61	21.23	2.69
	Imagen						
PCL/CS w/w (10:1) con carga de TC	1	43.11	0.66	40.38	0.77	40.77	3.01
	2	41.75	2.06	39.34	0.77	38.86	2.68
	3	38.01	3.91	26.86	1.57	19.83	3.08
	4	53.48	2.53	46.75	1.58	42.88	2.03
	Prom.	43.84	2.51	44.47	1.44	41.51	2.64
		Imagen					

Memb.: Membrana; TT: Tratamiento; Ang.: Ángulo; Desv.: Desviación estándar; Prom.: Promedio.

**Figura 5.** Medición de Ángulo de contacto vs Tiempo para las membranas electrohiladas de PCL/CS w/w (8:1) y (10:1))

propiedades de las membranas poliméricas como resistencia, alta porosidad y bioactividad para facilitar la adhesión celular y su fácil degradación dentro del organismo como lo reportan Barrera y Tan *et al.* [3, 41].

3.6. Ensayos mecánicos de las membranas en estudio

En la Figura 6 se observa los ensayos mecánicos donde se determinó que la membrana de PCL/CS w/w (8:1) con carga de TC presentó un valor de

esfuerzo a la tensión de 0.63 MPa, un módulo de Young de 5.55 MPa y una elongación a la ruptura de 78.7% (ver Tabla 6) en comparación de la membrana de PCL/CS w/w (10:1) con carga de TC que presentó una disminución del valor de esfuerzo a la tensión de 0.50 MPa, un módulo de Young de 1.86 MPa y una elongación a la ruptura de 221.4%; donde la elongación a la ruptura aumenta en la membrana de PCL/CS w/w (10:1) con carga de TC debido al aumento de su peso molecular y los defectos de las fibras como bulbos y diámetros menores entre $0.104 \pm 0.044 \mu\text{m}$ que componen la membrana en comparación del diámetro de las fibras homogéneas de la membrana PCL/CS w/w (8:1) que estuvieron entre $0.282 \pm 0.138 \mu\text{m}$ (ver Figura 1 D).

Tabla 6. Pruebas de tensión de las membranas electrohiladas de PCL/CS w/w (8:1) y (10:1)

Parám.	PCL/CS w/w con carga de TC					
	(8:1)	(10:1)				
	TT1	TT1	TT2	TT3	TT4	Prom.
σ máx. (Mpa)	0.63714	0.52579	0.73315	0.29882	0.46965	0.50685
E elást. (MPa)	5.55888	2.06965	2.40596	1.7348	1.24867	1.86477
ϵ máx.	0.07874	0.20998	0.24278	0.12467	0.3084	0.22146

Parám.: Parámetros; TT: Tratamiento; Prom.: Promedio

σ máx. (Mpa): Esfuerzo máximo en MPa

E elást. (MPa): Módulo de Young en Mpa

ϵ máx. : Deformación máxima

Los resultados dependen de la composición del material, de imperfecciones microscópicas, de la manera en que esté fabricado, de la velocidad de carga y de la temperatura durante la prueba [42, 43].

Barrera [3], reporta los valores de esfuerzo a la tensión de las membranas de PCL que se encuentra alrededor de 3 MPa, con elongación a la ruptura de 170% aproximadamente. Se concluye que la mezcla de polímeros naturales y sintéticos mejoran las propiedades mecánicas de los polímeros puros; además, que las fibras homogéneas con mínimos defectos tienen mayor esfuerzo a la tensión como es la membrana de PCL/CS w/w (8:1) en comparación de la membrana de PCL/CS w/w (10:1) que presenta menor esfuerzo a la tensión que puede ser debido a sus fibras heterogéneas y diámetros menores.

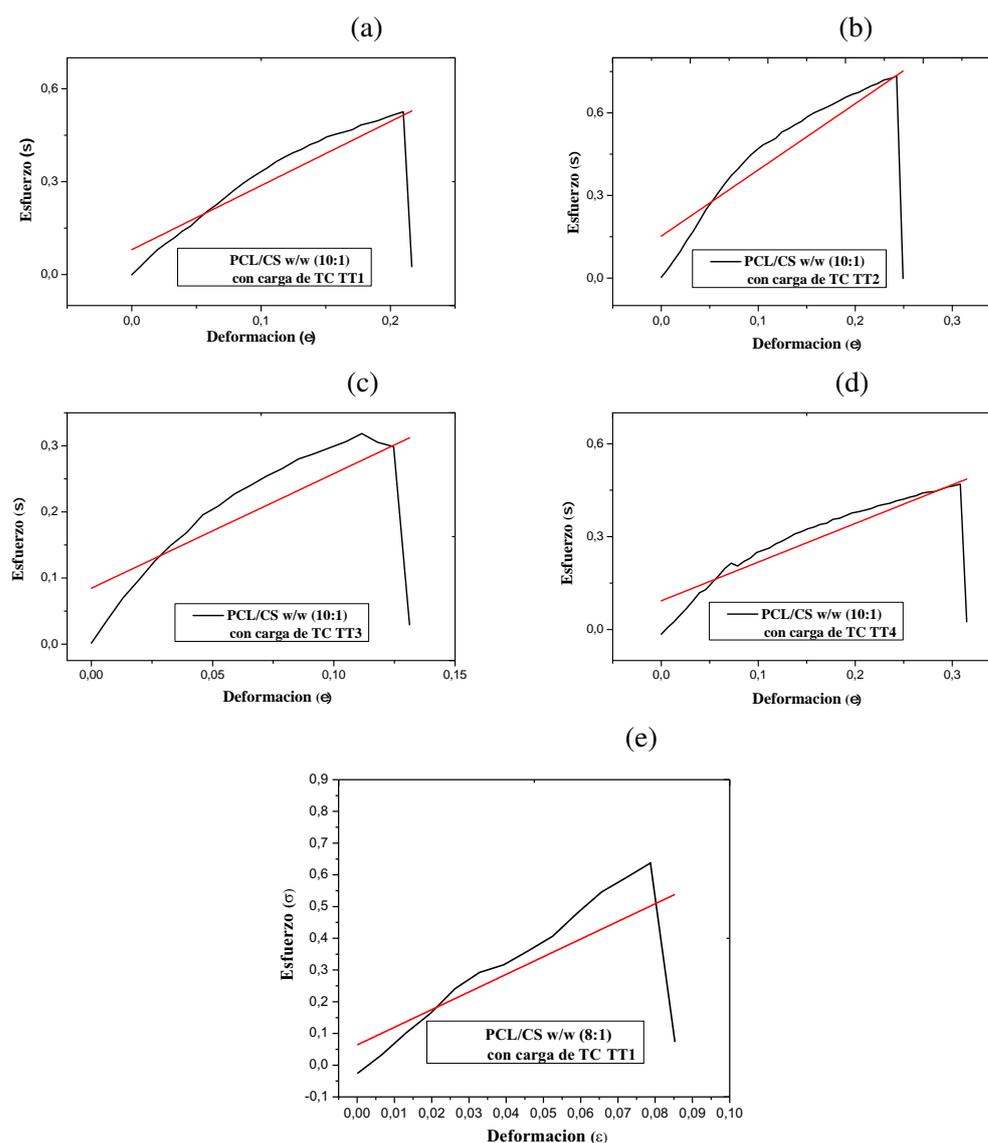


Figura 6. Curvas de tensión-deformación de las membranas electrohiladas de: PCL/CS w/w (10:1) con carga de TC (a) TT1, (b) TT2, (c) TT3 (d) TT4 y (e) PCL/CS w/w (8:1) con carga de TC TT1

3.7. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Para evaluar la morfología y la dispersabilidad de TC en la nanofibra con PCL y CS se utilizó la microscopía electrónica de transmisión (TEM). En la Figura 7 (a,b), se observa que el haz de electrones incidente atravesó la muestra permitiendo ver la sombra de detalles finos como es el fármaco (compuesto orgánico que se mezcla en la solución polimérica) dentro de las fibras de PCL, esto indica que la vitamina B_1 se encuentra distribuida en la membrana polimérica.

Las imágenes obtenidas por AFM (Figura 7 (c,d)),

muestran que las partículas orgánicas se encuentran superficialmente en las membranas poliméricas obtenidas por solución nanométrica. En la Figura 7 (c) se observa la estructura coraza/núcleo (core/shell) donde en el interior de la fibra (núcleo) el CS con fármaco se deposita en forma de fibra, se comparó con el estudio hecho por Gómez *et al.* [44]. En la Figura 7 (d) las fibras presentan incrustaciones de CS con fármaco sobre la superficie (coraza) esto se pudo haber dado debido a que la PCL es hidrofóbica y el CS es hidrofílico y su inmiscibilidad hace que el polímero de CS con TC se adhiera a la superficie de la fibra en forma de incrustaciones. El TC se distribuye en las nanofibras, tanto en su interior como en su superficie mezclándose con la PCL y CS [3, 45];

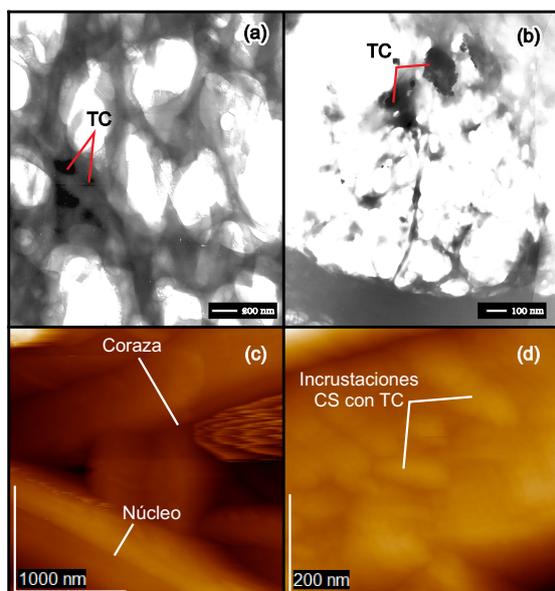


Figura 7. Microestructura de las fibras obtenidas por electrohilado de los polímeros de PCL/CS a una concentración w/w (8:1) disueltos en TFA/DCM a una concentración v/v (80:20) con una carga del 5% w/w de TC respecto a 1g de PCL (a,b) TEM y (c,d) AFM

3.8. Cinética de liberación del Clorhidrato de Tiamina (Vitamina B₁)

En la Figura 8 se muestran las curvas de absorbancia, calibración y liberación de TC de las membranas de PCL/CS. En la Figura 8 (a) se observa que el incremento en la concentración del fármaco de clorhidrato de tiamina tiene el efecto de aumentar el valor de la absorbancia. En la Figura 8 (b), se obtuvo una respuesta lineal con un coeficiente de correlación $>0,995$ en un intervalo de concentraciones de 5 - 160 $\mu\text{g/ml}$.

En la Figura 8 (c), se muestran las curvas de liberación de TC en función del tiempo para las dos membranas con concentraciones de PCL/CS (8:1) y (10:1). Se observa que la cinética de liberación del principio activo es similar en ambos casos; a las 15 horas se alcanza una liberación sostenida del TC, que se mantiene por lo menos 60 h. Sin embargo, la membrana de PCL/CS w/w (10:1) libera el 85% de la vitamina en tanto que el PCL/CS w/w (8:1) solo libera el 65%. Estos resultados indican que la membrana electrohilada de PCL/CS w/w (8:1) disueltos en TFA/DCM v/v (80:20) con una carga de TC respecto a la PCL w/w (20:1), (ver Figura 1 D), es una membrana adecuada para una liberación controlada de vitamina, por sus fibras homogéneas, con mínimos defectos y bulbos, cargadas tanto en su interior

como exterior por el TC a diferencia de la membrana de PCL/CS a una concentración w/w (10:1) (ver Figura 1 C), fibras no homogéneas, beads y diámetros de fibras menores donde su área superficial es mayor su cinética de liberación es más rápida.

En la Figura 9 se observa el perfil de liberación del TC a las concentraciones establecidas para el estudio de liberación. En la Figura 9 (a) FASE I se observa que a tiempo de 3.5 horas (valor del tiempo en horas en la Figura 9 (a) y (c) de 0 - 1.3) los valores de n calculados para las formulaciones que contienen TC son cercanos a 0.5, a medida que aumenta el contenido de PCL Figura 9 (b), en las dos formulaciones con igual contenido de CS se produce un aumento de n , lo que evidencia que la liberación del clorhidrato de tiamina en la primera hora depende de un proceso de difusión a través de la matriz polimérica hinchada y a través de los poros formados en el biomaterial una vez que este entra en contacto con la disolución buffer de fosfato, obteniéndose en las dos formulaciones valores de n entre 0.37107 y 0.42066 (ver Tabla 7), que corresponde a la fracción de TC que está ocluida en el material, pero muy próxima de la superficie.

En las siguientes horas la liberación de TC va a depender básicamente de lo que pueda avanzar frente al hinchamiento y el proceso de difusión se hace más lento, debido a que el TC debe recorrer un mayor camino para llegar al exterior. Cuando el medio externo penetra a la membrana, el polímero que inicialmente presenta un estado vítreo, se hincha y su temperatura de transición vítrea puede alcanzar valores inferiores a la temperatura del medio que lo rodea, pasando a un estado tipo elastomérico. En estas condiciones, el soluto difunde desde las regiones hinchadas al medio externo y su liberación está controlada por la velocidad de desplazamiento y posición de la interfase vítrea/elástica.

En la Figura 9 (b) y (d) FASE II se aprecia una disminución del valor de n en el tiempo, entre 0.056 y 0.0788 (ver Tabla 7 confirmándose de esta forma que la matriz polimérica PCL/CS es la encargada de controlar el proceso de liberación hasta 192 horas (valor del tiempo en horas en la Figura 9 (a) y (c) de 1.5 - 5), ya que el TC liberado sigue un mecanismo de difusión Fickian a través de la matriz polimérica.

En la Figura 10 se observa las micrografías de degradación que tuvo las membranas poliméricas

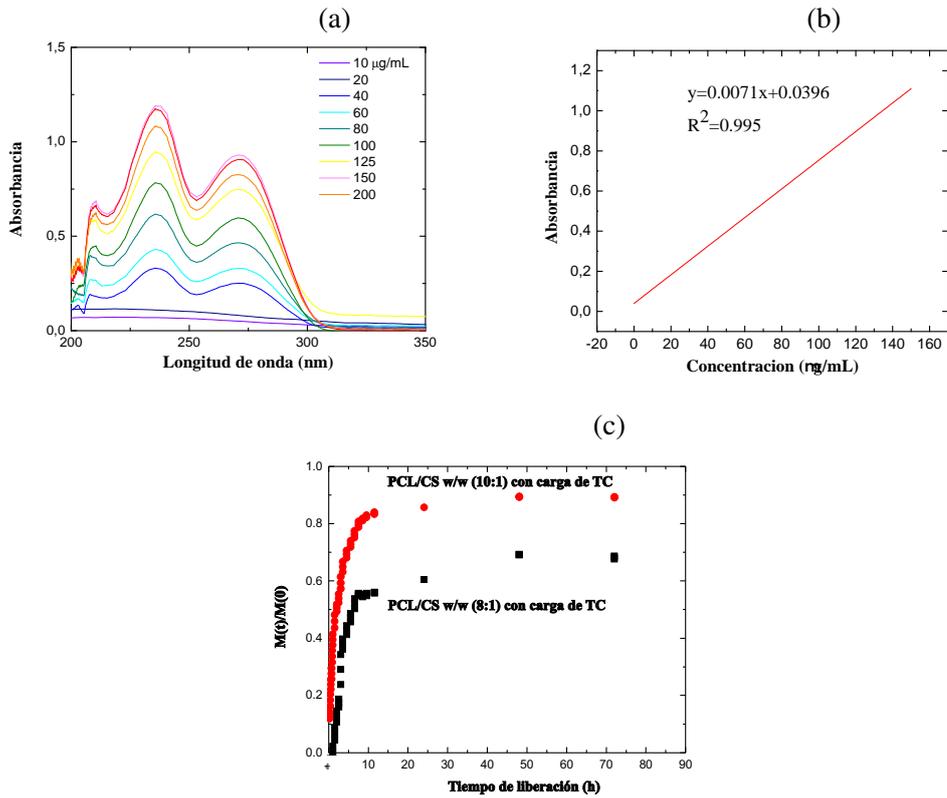


Figura 8. (a) Curvas de absorbancia de TC en solución buffer PBS al 0.1 M, (b) Curva de calibración empleada en los estudios de liberación de TC a $\lambda = 235.56$ nm y (c) Curvas de liberación de TC para las membranas de PCL/CS w/w (8:1) y (10:1), respectivamente

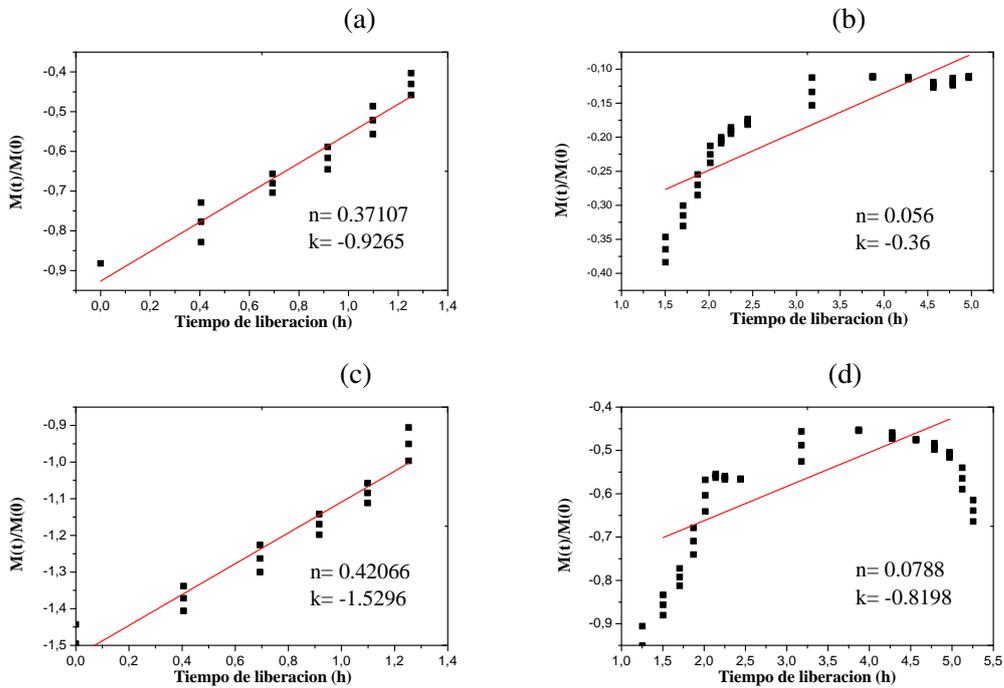


Figura 9. Perfil de liberación del clorhidrato de tiamina (a, b) PCL/CS w/w (8:1), (c, d) PCL/CS w/w (10:1)

posteriores a 9 días en PBS. Las nanofibras se hinchan por la disolución en PBS (solución hidrófila) y

la hidrólisis de los polímeros, formando una membrana irregular con muchos agujeros; también hay

Tabla 7. Coeficiente de difusión (n) obtenido de la ecuación de Ritger y Peppas en diferentes instantes de tiempo)

Fase	Fig.	Tiempo (h)	PCL/CS (8:1)		Fig.	PCL/CS (10:1)	
			n	k		n	k
Fase I	(a)	1 - 3.5 (0 - 1.3)	0.37	-0.92	(c)	0.42	-1.52
Fase II	(b)	4.5 - 192 (1.5 - 5)	0.056	-0.36	(d)	0.788	-0.82

ruptura y disminución del diámetro de la fibra como se observa en la Figura 10 (a), y cambios en la morfología de las fibras como hinchamiento por la hidrólisis, Figura 10 (b).

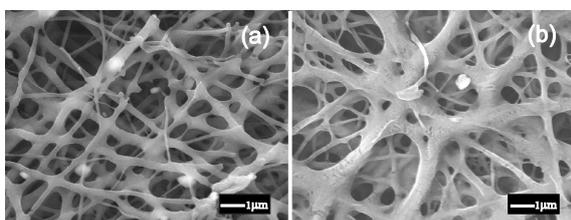


Figura 10. Micrografía SEM del estudio post-liberación de las membranas disueltas en PBS posterior a los 9 días: (a) PCL/CS w/w (8:1) y (b) PCL/CS w/w (10:1)

La hidrólisis es una reacción bimolecular en la que el agua y el grupo funcional que posee el enlace lábil están involucrados. El proceso de degradación consiste en dos etapas: primero, comienza una rotura aleatoria de enlaces éster, lo que conduce a una disminución en las propiedades mecánicas y reducción de la masa molecular del polímero. En la segunda etapa, existe un mayor desarrollo de rotura en los enlaces éster, lo que propicia una disminución de tamaño en las cadenas moleculares; provocando pérdidas de masa. Mediante la introducción de un segundo polímero en la solución polimérica, muchas de las propiedades de la mezcla polimérica pueden ser influenciadas, tales como cristalinidad, la temperatura de transición vítrea o el tiempo de degradación. Los polímeros hidrófilos ocupan grandes cantidades de agua, esto provoca un aumento en sus tasas de degradación correspondientes [46].

4. CONCLUSIONES

Se concluyó que los biopolímeros la PCL y CS usados en este estudio con propiedades físico químicas diferentes permiten ser mezclados con el TC a partir de disolventes orgánicos permitiendo su miscibilidad y biocompatibilidad bajo los análisis de

FTIR. Esta mezcla polimérica mejora las propiedades de las membranas como su resistencia mecánica por medio de la técnica de electrohilado facilitando la adhesión celular y su biodegradación en el organismo para una liberación controlada de fármacos, esta técnica no genera cambios químicos en los componentes, lo cual indicaría que se presenta solo cambios físicos.

En este estudio se consiguió electrohilar la mezcla de PCL y CS con bajos voltajes y distancias cortas entre aguja-colector lo que generaría unos parámetros nuevos en la fabricación de membranas poliméricas para la liberación controlada de fármacos. Las concentraciones óptimas en el electrohilado con las cuales se obtuvo una disolución homogénea con alto coeficiente dieléctrico para la fabricación de membranas poliméricas fueron: PCL/CS w/w (8:1) con una carga de TC respecto a la PCL w/w (20:1) en una mezcla de disolventes TFA/DCM v/v (80:20) para obtener membranas con nanofibras homogéneas, mínimos defectos, sin bulbos de PCL/CS y alta capacidad de liberación de un 65 %, bajo los parámetros de electrohilado de: flujo de inyección de 0.4 ml/h, voltaje de 13 kV y distancia aguja-colector de 10 cm. En el tratamiento de PCL/CS w/w (10:1) se comprueba que la vitamina fue liberada hasta un 85 % en 60 horas, lo que indica que fue más rápida la liberación en comparación con el tratamiento de PCL/CS w/w (8:1) debido a los defectos como bulbos y diámetros menores. En las dos formulaciones estudiadas el proceso de difusión cumple con la ley de Fick y el TC difunde a través de la matriz polimérica hinchada y los poros formados en el biomaterial.

Referencias

- [1] G. G. Walmsley, A. McArdle, R. Tevlin, A. Momeni, D. Atashroo, M. S. Hu, A. H. Feroze, V. W. Wong, P. H. Lorenz, M. T. Longaker, and D. C. Wan, "Nanotechnology in bone tissue engineering", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 11, pp. 1253-1263, 7, 2015.
- [2] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 75, pp. 1-18, 2010.
- [3] S. A. Barrera, "Obtención de nanofibras modificadas de Poli(ϵ -caprolactona) por electrohi-

- lado para aplicaciones biomédicas”, *Instituto de Investigaciones en Materiales. Universidad Nacional Autónoma de México*, 2014.
- [4] T. G. L. Kim, Doo Sung; Park, Tae Gwan, “Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene oxide)”, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 338, 2007.
- [5] K. T. Shalumon, K. H. Anulekha, C. M. Girish, R. Prasanth, S. V. Nair, and R. Jayakumar, “Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 80, pp. 413-419, 2010.
- [6] T. K. Dash and V. B. Konkimalla, “Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review”, *Journal of Controlled Release*, vol. 158, pp. 15-33, 2012.
- [7] Z. Sultanova, G. Kaleli, G. Kabay, and M. Mutlu, “Controlled Release of a Hydrophilic Drug from Coaxially Electrospun Polycaprolactone Nanofibers”, *International Journal of Pharmaceutics*, 2016.
- [8] A. Repanas and B. Glasmacher, “Dipyridamole embedded in Polycaprolactone fibers prepared by coaxial electrospinning as a novel drug delivery system”, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 29, pp. 132-142, 2015.
- [9] Y. D. Irani, Y. Tian, M. Wang, S. Klebe, S. J. McInnes, N. H. Voelcker, J. L. Coffey, and K. A. Williams, “A novel pressed porous silicon-polycaprolactone composite as a dual-purpose implant for the delivery of cells and drugs to the eye”, *Experimental eye research*, vol. 139, pp. 123-131, 2015.
- [10] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, and T. M. Aminabhavi, “Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery”, *Journal of Controlled Release*, vol. 100, pp. 5-28, 2004.
- [11] H. Zhang, I. A. Alsarra, and S. H. Neau, “An in vitro evaluation of a chitosan-containing multi-particulate system for macromolecule delivery to the colon”, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 239, pp. 197-205, 2002.
- [12] S. Jiang, J. Lv, M. Ding, Y. Li, H. Wang, and S. Jiang, “Release behavior of tetracycline hydrochloride loaded chitosan/poly(lactic acid) antimicrobial nanofibrous membranes”, *Materials Science and Engineering: C*, vol. 59, pp. 86-91, 2016.
- [13] K. A. Rieger and J. D. Schiffman, “Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly(ethylene oxide) nanofibers”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 113, pp. 561-568, 2014.
- [14] J. Song, S. J. A. Remmers, J. Shao, E. Kolwijck, X. F. Walboomers, J. A. Jansen, S. C. G. Leeuwenburgh, and F. Yang, “Antibacterial effects of electrospun chitosan/poly(ethylene oxide) nanofibrous membranes loaded with chlorhexidine and silver”, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 12, pp. 1357-1364, 2016.
- [15] M. S. Kim, S. J. Park, B. K. Gu, and C.-H. Kim, “Polycaprolactone-Chitin Nanofibrous Mats as Potential Scaffolds for Tissue Engineering”, *Journal of Nanomaterials*, vol. 2012, p. 9, 2012.
- [16] “Dielectric Constant of Common solvents.xls [online]”, *Disponible en: [http://depts.washington.edu/eoopic/linkfiles/dielectric_chart\[1\].pdf](http://depts.washington.edu/eoopic/linkfiles/dielectric_chart[1].pdf)*.
- [17] R. Jayakumar, H. Tamura, S. V. Nair, and T. Furuike, “Perspectives of Chitin and Chitosan Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering”, *Tissue Engineering*, 2010.
- [18] K. Ohkawa, D. Cha, H. Kim, A. Nishida, and H. Yamamoto, “Electrospinning of Chitosan”, *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 25, pp. 1600-1605, 2004.
- [19] C. F. Berghoff, “Desarrollo y caracterización de matrices compuestas Quitosano/Polímero sintético para regeneración de tejido óseo”, *Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de la Plata*, p. 229, 2011.
- [20] Z. H. L. K. Sun, “Preparations, properties and applications of chitosan based nanofibers fabricated by electrospinning”, *eXPRESS Polymer Letters*, vol. 5, pp. 342-361, 2011.
- [21] P. S. a. P. Supaphol, "Stability Improvement of Electrospun Chitosan Nanofibrous Membranes

- in Neutral or Weak Basic Aqueous Solutions”, *Biomacromolecules. American Chemical Society*, vol. 7, pp. 2710-2714, August 20, 2006.
- [22] M. V. Debandi, N. J. Francois, and M. E. Daraio, “Evaluación de distintas membranas para liberación in vitro de principios activos anticelulíticos”, *Avances en ciencias e ingeniería*, vol. 2, pp. 97-105, 2011.
- [23] P. L. Ritger and N. A. Peppas, “A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs”, *Journal of Controlled Release*, vol. 5, pp. 23-36, 1987.
- [24] M. T. V. Iborra, “Desarrollo Galénico de preparados obtenidos por interacción del Ácido 5-amino salicílico con Halloysita”, *Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Granada*, pp. 1-307, 2008.
- [25] Z. Li and C. Wang, “Effects of Working Parameters on Electrospinning”, in *One-Dimensional nanostructures: Electrospinning Technique and Unique Nanofibers*, o. p. m. e. a. <http://electrospintech.com/beads.html#VyaaMkweSkp>, Ed., ed Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 15-28, 2013
- [26] F. A. B. y. G. A. A. P. C. Caracciolo, “Matrices Poliuretánicas nanofibrosas obtenidas por el proceso de electrospinning”, *2º Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales. Posadas. Misiones. Asociación Argentina de Materiales. Divisió Polímeros. INTEMA. Univerisad de Mar de Plata, Pcia de Buenos Aires*, 2008.
- [27] T. Elzein, M. Nasser-Eddine, C. Delaite, S. Bistac, and P. Dumas, “FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces”, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 273, pp. 381-387, 2004.
- [28] S.-H. Chen, C.-H. Chen, Y. T. Fong, and J.-P. Chen, “Prevention of peritendinous adhesions with electrospun chitosan-grafted polycaprolactone nanofibrous membranes”, *Acta Biomaterialia*, vol. 10, pp. 4971-4982, 2014.
- [29] E. Á. A. H. Hernández Cocolletzi, O. Flores Agustin, E.L. Viveros Nava, E. Ramos Casseillis, “Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón”, *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*, vol. 22, pp. 57-60, 2009.
- [30] W.-T. Su, P.-S. Wu, and T.-Y. Huang, “Osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth on poly(ϵ -caprolactone) nanofibers containing strontium phosphate”, *Materials Science and Engineering: C*, vol. 46, pp. 427-434, 2015.
- [31] G. V. Joshi, H. A. Patel, B. D. Kevadiya, and H. C. Bajaj, “Montmorillonite intercalated with vitamin B1 as drug carrier”, *Applied Clay Science*, vol. 45, pp. 248-253, 2009.
- [32] C.-S. Wu, “A comparison of the structure, thermal properties, and biodegradability of polycaprolactone/chitosan and acrylic acid grafted polycaprolactone/chitosan”, *Polymer*, vol. 46, pp. 147-155, 2005.
- [33] S. H. Murphy, G. A. Leeke, and M. J. Jenkins, “A Comparison of the use of FTIR spectroscopy with DSC in the characterisation of melting and crystallisation in polycaprolactone”, *J Therm Anal Calorim*, vol. 107, pp. 669-674, 2012.
- [34] D. M. García Cruz, D. F. Coutinho, J. F. Mano, J. L. Gómez Ribelles, and M. Salmerón Sánchez, “Physical interactions in macroporous scaffolds based on poly(ϵ -caprolactone)/chitosan semi-interpenetrating polymer networks”, *Polymer*, vol. 50, pp. 2058-2064, 2009.
- [35] V. Balsamo, L. M. Gouveia, L. Herrera, E. Laredo, and B. Méndez, “Miscibilidad en Mezclas de Poli(Estireno-co-Anhídrido Maleico) y Poli(ϵ -Caprolactona) (SMA/PCL)”, *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, vol. 24, pp. 17-30, 2004.
- [36] F. S. Kittur, K. V. Harish Prashanth, K. Udaya Sankar, and R. N. Tharanathan, “Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 49, pp. 185-193, 2002.
- [37] E. V. R. Almeida, E. Frollini, A. Castellan, and V. Coma, “Chitosan, sisal cellulose, and biocomposite chitosan/sisal cellulose films prepared from thiourea/NaOH aqueous solution”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 80, pp. 655-664, 2010.

- [38] C. Albacete, A. Chiralta, and C. González-Martínez, “Efecto de la humedad y del glicerol en las transiciones de fase de biopolímeros: proteína de guisante y quitosano”, *Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, Valencia, España*, pp. 1-20.
- [39] J. H. Mina Hernández, S. Anderson Otero, C. A. Bolaños Arbelaez, and E. F. Toro Perea, “Preparación y caracterización físico-química y térmica de mezclas binarias de resina mopa-mopa (*elaegia pastoensis mora*) y policaprolactona (PCL)”, *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, vol. 32, pp. 176-184, 2012.
- [40] L. B. Rodríguez, M. S. Ballester, J. V. Baudrit, M. C. Elizondo, and S. M. Carballo, “Estudio cinético de la degradación térmica de quitina y quitosano de camarón de la especie *heterocarpus vicarius*? empleando la técnica termogravimétrica en modo dinámico”, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 11, pp. 558-573, 2010.
- [41] E. P. S. Tan, S. Y. Ng, and C. T. Lim, “Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber”, *Biomaterials*, vol. 26, pp. 1453-1456, 2005.
- [42] S. Y. Chew, T. C. Hufnagel, C. T. Lim, and K. W. Leong, “Mechanical properties of single electrospun drug-encapsulated nanofibres”, *Nanotechnology*, vol. 17, pp. 3880-3891, 2006.
- [43] R. C. Hibbeter, “Mecánica de materiales”, 7a ed., Person Educación, p. 876, 2006.
- [44] E. Y. Gómez-Pachón, F. M. Sánchez-Arévalo, F. J. Sabina, A. Maciel-Cerda, R. M. Campos, N. Batina, I. Morales-Reyes, and R. Vera-Graziano, “Characterisation and modelling of the elastic properties of poly(lactic acid) nanofibre scaffolds”, *Journal of Materials Science*, vol. 48, pp. 8308-8319, 2013.
- [45] A. Cooper, R. Oldinski, H. Ma, J. D. Bryers, and M. Zhang, “Chitosan-based nanofibrous membranes for antibacterial filter applications”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 92, pp. 254-259, 2013.
- [46] J. C. S. Pech, “Obtención de un membrana tubular de ácido Poli (láctico-co-glicólico) y Policaprolactona, mediante la técnica de electrohilado para la ingeniería en tejidos de la uretra”, *Tesis de Maestría, vol. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Posgrado en Materiales Poliméricos. Mérida, Yucatán*, 2014.