

## Resumen

A día de hoy, la sociedad busca cada vez más, diferentes alternativas a la medicina a base de fármacos. El uso de plantas como remedio medicinal natural data de millones de años atrás. Son muchas las plantas cuyas partes o extractos son utilizadas para el tratamiento de ciertas afecciones o enfermedades tanto del hombre como de animales.

En el presente proyecto se han estudiado los extractos de once plantas medicinales de América del Sur, tales como: *Bixa orellana* (BO), *Caesalpinia spinosa* (CS), *Dracotium loretense* (DL), *Equisetum arvense* L (EA), *Maytenus macrocarpa* (MM), *Myrciaria dubia* (MD), *Phyllanthus niruri* (PN), *Physalis peruviana* L (PP), *Schinus molle* (SM), *Tabebuia impetiginosa* (TI), *Uncaria tomentosa* L (UT). No todas las partes de una planta, arbusto o árbol tienen las mismas propiedades y es por esto que en algún caso se ha trabajado con diferentes extractos de una misma planta.

Estos extractos, en su origen fueron preparados como extractos etanólicos. En este PFC estos extractos fueron secados en baño María, luego fueron resuspendidos en una disolución de Cloroformo-Acetona (2:1, v/v), y posteriormente fueron filtrados y añadidos a la disolución de ácido poliláctico (PLA) al 8 %-w/v para su electrohilado o electrospinning. Finalmente, mediante el electrospinning aplicando parámetros operacionales optimizados (distancia, velocidad del flujo y voltaje) se obtuvieron matrices de nanofibras de PLA cargadas con extractos de plantas medicinales.

Las nanofibras obtenidas fueron caracterizadas morfológicamente mediante el uso de técnicas microscópicas (como la microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido o SEM), y estructuralmente mediante espectrometría infrarroja (FTIR), difracción de Rayos-X, y análisis termogravimétrico (TGA). La liberación de los extractos cargados fue estudiada en función del tiempo y del medio de liberación (buffer fosfato salino o PBS, y PBS-EtOH, respectivamente) usando espectroscopia UV-Vis. Finalmente, la actividad biológica de los extractos cargados en las nanofibras fue estudiada mediante su actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (tales como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente), y mediante la inhibición del crecimiento in-vitro de las líneas de células VERO, MCF-7, COS-1, MRC-5, PNT-2 y PC-3.

Por último, se ha efectuado un estudio sobre la sostenibilidad ambiental, el impacto social y económico de este proyecto.



# Sumario

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>SUMARIO</b>	<b>3</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>5</b>
<b>1. PREFACIO</b>	<b>7</b>
1.1. Origen del proyecto	7
1.2. Motivación	7
1.3. Requerimientos previos	8
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
2.1. Objetivo general del proyecto	9
2.2. Objetivo específico del proyecto	9
2.3. Alcance del proyecto	11
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
3.1. Polímeros	13
3.1.1. Breve historia	13
3.1.2. Clasificación	14
3.1.3. Polímeros biodegradables	15
3.2. Electrohilado ( <i>Electrospinning</i> )	19
3.2.1. Introducción a la técnica	19
3.2.2. Breve historia	20
3.2.3. Funcionamiento y montaje	20
3.2.4. Parámetros del proceso	22
3.3. Electrofibras cargadas con extractos y/o compuestos de plantas medicinales: Estado del arte	23
<b>4. MATERIALES Y METODOLOGÍA</b>	<b>29</b>
4.1. Reactivos	29
4.2. Material de laboratorio	29
4.3. Plantas medicinales	30
4.4. Preparación de los extractos de las plantas	30
4.5. Preparación de la disolución de PLA/extracto	31
4.6. Electrospinning	31
4.7. Microscopía óptica (OM)	32
4.8. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	33

4.9. Espectrómetro IR.....	35
4.10. Ángulos de contacto .....	36
4.11. UV-Vis.....	37
4.12. Cromatografía de capa fina .....	38
4.13. Análisis termogravimétrico (TGA).....	40
4.14. Liberación .....	40
4.15. Rayos X .....	41
4.16. Ensayos biológicos .....	42
4.16.1. Ensayo de Inhibición del crecimiento bacteriano.....	42
4.16.2. Ensayo de citotoxicidad usando líneas celulares.....	43
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
5.1. Preparación y Caracterización de los extractos .....	45
5.1.1. Preparación de los extractos .....	45
5.1.2. Caracterización de los extractos.....	48
5.2. Electrospinning de PLA cargado con extractos de plantas medicinales. ...	53
5.2.1. Parámetros para el electrospinning de PLA cargado con extractos.....	53
5.2.2. Morfología de las microfibras de PLA cargadas con extractos.....	55
5.2.3. Análisis FTIR del PLA cargado con extractos de plantas medicinales.....	60
5.2.4. Ángulos de Contacto .....	62
5.2.5. Difracción de Rayos-X.....	64
5.2.6. Análisis termogravimétrico.....	64
5.2.7. Liberación de los extractos cargados en la nanofibras de PLA.....	66
5.2.8. Inhibición del crecimiento bacteriano.....	67
5.2.9. Biocompatibilidad.....	70
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>72</b>
<b>7. ESTUDIO DE SOSTENIBILIDAD</b> .....	<b>73</b>
7.1. Impacto ambiental .....	73
7.2. Evaluación económica.....	75
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>78</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>79</b>
Bibliografía complementaria .....	82



## Glosario

### BACTERIAS

*E.coli*: bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

*S.aureus*: bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

### PLANTAS MEDICINALES

BO-l: *Bixa orellana* (hoja)

BO-s: *Bixa orellana* (semilla)

CS: *Caesalpinia spinosa* (semilla y vaina)

CS-s: *Caesalpinia spinosa* (semilla)

CS-sp: *Caesalpinia spinosa* (vainas)

DL: *Dracotium loretense*

EA: *Equisetum arvense* L

MM: *Maytenus macrocarpa*

MD: *Myrciaria dubia*

PN: *Phyllanthus niruri*

PP: *Physalis peruviana* L

SM: *Schinus molle*

TI: *Tabebuia impetiginosa*

UT: *Uncaria tomentosa* L

OM: Microscopía óptica

### TÉCNICAS

FTIR: espectroscopía de radiación infrarroja (Fourier transform infrared spectroscopy)

GPC: cromatografía de gel permeación.

SEM: microscopía electrónica de barrido (scanning electron microscopy)

TGA: termogravimetría o análisis termogravimétrico (thermogravimetric analysis)

TLC: cromatografía en capa fina (thin-layer chromatography)

UV-Vis: espectroscopía de luz UV-visible

XRD: difracción de rayos-x (X-ray diffraction)

### OTROS ABREVIATURAS

$\sigma$ : resistencia a la tensión.

$\gamma$ : tensión de enlongación.

E: módulo de Young.

EtOH: Etanol

Mn: peso molecular en número.

Mw: peso molecular en peso.

PLA : Ácido poliláctico

Tg: temperatura de transición vítrea.

Tm: punto de fusión o temperatura de melting.

UCR: unidad constitucional repetitiva, unidad monomérica o monómero



# 1. Prefacio

## 1.1. Origen del proyecto

El presente proyecto tiene su origen en el grupo de investigación de Polímeros Sintéticos, Estructura y Propiedades (PSEP) del Departamento de Ingeniería Química de la ETSEIB (Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Barcelona) de la UPC (Universidad Politécnica de Cataluña).

Una de las principales áreas de investigación recae en la investigación de materiales poliméricos biodegradables y su desarrollo para aplicaciones biomédicas. Por ello, en el PSEP se han realizado diversos trabajos de conformado de poliésteres, poliesteramidas y poliureas mediante la técnica de electrohilado (electrospinning), obteniéndose matrices de fibras de escala micro y/o nanométricas. Además, la técnica de electrospinning ha permitido obtener fibras cargadas con moléculas bioactivas tales como fármacos antimicrobianos, drogas antitumorales y antiinflamatorios.

El actual PFC fue diseñado en la línea de la preparación de estos sistemas de liberación basados en matrices de micro/nanofibras. A diferencia de proyectos anteriores en los cuales las matrices de fibras fueron cargadas con drogas o fármacos puros, en este PFC se propuso realizar la carga de las matrices con extractos etanólicos de plantas medicinales. El uso de extractos de plantas medicinales puede corresponder a una etapa inicial de purificación de nuevos fármacos, o a la mezcla natural de diversas moléculas que en su conjunto son responsables de ciertas actividades farmacológicas.

## 1.2. Motivación

Una de las motivaciones para ejecutar este proyecto surge del interés de aplicar los conocimientos adquiridos a lo largo de la licenciatura sobre las áreas de análisis químico, polímeros y materiales, y otras áreas de conocimiento. Este PFC me ofrecía obtener conocimientos de nuevas técnicas (p.e., electrohilado), trabajar con equipos de alta tecnología y ganar experiencia en el manejo del laboratorio químico mediante el desarrollo del trabajo experimental.

Por otro lado, el campo de la medicina alternativa o natural siempre me ha causado un gran interés personal ya que sería muy interesante poder llegar a utilizar recursos naturales como tratamiento para algunas enfermedades en el ámbito de la biomedicina. Cualquier

aportación por pequeña que sea es importante y ha sido una motivación extra el haber podido experimentar en este campo.

### **1.3. Requerimientos previos**

Para poder desarrollar correctamente este PFC es necesario tener unos conocimientos básicos de polímeros así como algunas de sus propiedades físicas y químicas. Por otro lado, los extractos de las plantas medicinales fueron manejados desde el área de conocimiento de la fitoquímica para obtener información sobre su procedencia, propiedades e investigaciones previas que se habían llevado a cabo. Además, se realizó una búsqueda bibliográfica, para establecer un estado del arte sobre el uso de los polímeros biodegradables (concretamente del PLA) como sistemas liberadores de extractos de plantas medicinales.

Dado que el proyecto ha sido realizado en un laboratorio de investigación, se ha requerido un aprendizaje y adiestramiento previo sobre el funcionamiento rutinario del laboratorio, tal como el correcto uso de pequeños equipos (balanzas, pH-metro, estufas, incubadoras, cabinas de gases, etc), almacenaje de productos químicos, la limpieza y desinfección adecuada de los equipos y áreas de trabajo, sobre la reserva de los equipos para poder realizar los diferentes ensayos, manejo de residuos químicos, etc.





## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general del proyecto

En la actualidad la medicina alternativa ha ganado una aceptación y base social muy importante. Una gran parte de su oferta de productos se basa en la medicina tradicional, donde se promueve el uso de plantas medicinales en su forma natural o parcialmente procesadas bajo la forma de pulverizados y extractos.

Por otro lado, el electrohilado de polímeros y en particular el electrohilado de polímeros biodegradables constituyen una nueva forma para el conformado de materiales obteniendo matrices de micro/nanofibras cuya aplicación en el área biomédica es como plataforma para el crecimiento celular y dispositivo de liberación de drogas y fármacos.

En este sentido, el objetivo general que se propuso en este PFC fue estudiar la conformación mediante la técnica de electrohilado o electrospinning de matrices de fibras del poliéster ácido poliláctico (PLA) cargado con extractos etanólicos de plantas medicinales.

Para alcanzar este objetivo general se han propuesto de manera secuencial diversos objetivos específicos que se describen en la siguiente sección.

### 2.2. Objetivo específico del proyecto

- Determinar los parámetros óptimos para realizar el electrohilado del PLA cargado con los extractos etanólicos de las plantas medicinales. El electrohilado PLA sin carga de extracto será utilizado como control o referencia.
  - Considerar que la disolución de PLA para su electrohilado será realizada en una mezcla de cloroformo: acetona (2v:1v).
  - Establecer la compatibilidad de los extractos etanólicos de las plantas medicinales con el solvente de electrohilado del PLA. Para ello, los extractos etanólicos serán secados por evaporación del etanol y redisolutos en la mezcla cloroformo: acetona para ser aditivados a la disolución de electrohilado del PLA.

- Evaluar los parámetros operacionales del electrohilado del PLA cargado con extractos de plantas medicinales. Estos parámetros corresponden al flujo de la disolución, el voltaje y la distancia aguja-colector. Para ello, la microscopía óptica permite una rápida evaluación de la morfología de las fibras obtenidas y en función de ello realizar los ajustes en los parámetros operacionales.
- Caracterizar la morfología de las electrofibras obtenidas mediante la medida de sus diámetros y distribución de los mismos. Para ello, se usaran imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Evaluar las propiedades estructurales del PLA conformado en electrofibras cargadas con extractos mediante el estudio de las matrices por técnicas de espectroscopia de radiación infrarroja (FTIR) y de difracción de rayos-x (XRD). Además, las propiedades térmicas de estas matrices serán evaluadas por análisis termogravimétrico (TGA).
- Determinar la mojabilidad de las matrices de fibras de PLA cargadas con los extractos. Para ello, se medirán los ángulos de contacto del agua y suero fetal bovino (FBS) sobre la superficie de las matrices.
- Estudiar la liberación de los extractos desde las matrices de PLA cargadas con los extractos de plantas medicinales. Para ello previamente, los extractos fueron caracterizados por espectroscopía UV-visible (UV-Vis) para obtener los espectros de absorción característicos de cada extracto, y relacionarlos con su análisis de metabolitos secundarios realizado por cromatografía en capa fina (TLC).
- Determinar la actividad biológica de los extractos liberados desde las matrices de fibras de PLA cargadas con los extractos de las plantas medicinales. Para esto se realizarán ensayos in-vitro de susceptibilidad bacteriana e inhibición del crecimiento de células inmortalizadas y tumorales.

## 2.3. Alcance del proyecto

Con anterioridad a este PFC se ha estudiado en el grupo de investigación PSEP la conformación de polímeros biodegradables en matrices de electrofibras como sistemas liberadores de drogas y fármacos. Adicionalmente, se encuentra en la literatura diversos trabajos que sostienen esta aplicación. Se ha de indicar que la mayoría de estos trabajos corresponden a la carga de un único compuesto químico en las fibras.

Existen algunos motivos que justifican el actual proyecto y proporcionan elementos para valorar su alcance:

- Recientemente, se han publicado algunos trabajos de electrospinning en los cuales se han cargado, dos y tres drogas o fármacos de manera simultánea en las matrices de fibras, ya sea en la misma fibra o diferentes fibras. La idea básica que sostiene estos trabajos es dotar con diversas actividades farmacológicas a una única matriz de fibras. Para ello, previamente se ha de comprender que una enfermedad o una lesión (p.e., una herida) requiere para su curación hacer frente a diversos factores biológicos para los cuales se deben suministrar de manera simultánea varios fármacos (p.e., antibacterianos, antiinflamatorios, antioxidantes, etc.). En este sentido, los extractos naturales de plantas medicinales pueden representar un cóctel de moléculas bioactivas con diferentes dianas celulares, y adicionalmente con una composición natural.
- Otro aspecto importante es que nuestra sociedad moderna requiere de nuevos fármacos para algunas afecciones. Por ejemplo, en el área de las infecciones bacterianas, en la actualidad se describen bacterias con características multidrogaresistentes (MDR) en cuanto a su susceptibilidad antimicrobiana, en otras palabras, son bacterias que presenta resistencia antimicrobiana de manera simultánea a varios antibióticos y ello imposibilita su eliminación. El desarrollo y puesta en el mercado de nuevos fármacos es un proceso lento y de elevado costo. Así, el uso de la medicina tradicional en base a los extractos de plantas medicinales representa una alternativa para el acceso de nuevas moléculas bioactivas en el mercado farmacológico, y sus costos son reducidos debido al hecho que las moléculas bioactivas no requieren de mayor purificación. En este sentido, la fitoquímica juega un rol muy importante porque contribuye a la caracterización química de los extractos de las plantas medicinales.

- Finalmente, existen poblaciones humanas donde el uso de la medicina tradicional es fundamental en la cura de sus afecciones (p.e., la población china y en general la población asiática; lo mismo sucede para poblaciones amazónicas de Sudamérica). En este sentido, existe un mercado donde nuevos dispositivos basados en la liberación de compuestos naturales tal como los extractos de plantas medicinales podrían encontrar una oportunidad de negocio.

Por los alcances mencionados se considera que este PFC cuenta con originalidad y rigor científico, y contribuye al conocimiento de la química de los polímeros y biomateriales en el área de la biomedicina.

## 3. Introducción

### 3.1. Polímeros

En la naturaleza existen las llamadas macromoléculas, las cuales están formadas por cientos de miles de átomos por lo que sus pesos moleculares son muy elevados. Los polímeros son un tipo particular de macromolécula, que se caracteriza por tener una unidad química y estructural que se repite a lo largo de la molécula.

Estas pequeñas unidades se denominan monómeros y se combinan entre sí mediante un proceso químico, llamado reacción de polimerización. La unión de todas estas pequeñas moléculas forma una estructura de constitución repetitiva. Así, en los polímeros, la unidad que se repite regularmente a lo largo de toda la macromolécula, se conoce con el nombre de unidad constitucional repetitiva (UCR) o unidad monomérica.

La longitud de la cadena del polímero viene determinada por el número UCR que se repiten en la cadena. Esto se llama grado de polimerización ( $\chi$ ), y su peso molecular viene dado por el peso de la UCR multiplicado por el grado de polimerización. [1]

#### 3.1.1. Breve historia

Los polímeros naturales, p.e., la lana, la seda, la celulosa, etc., se han empleado extensamente y han tenido mucha importancia a lo largo de la historia. Esto se debe al hecho, que los primeros polímeros sintéticos fueron obtenidos a finales del siglo XIX, como por ejemplo, el celuloide.

Los primeros polímeros que se sintetizaron se obtuvieron a través de transformaciones de polímeros naturales. Por mencionar algunos ejemplos de esto; en 1839, Charles Goodyear realizó el vulcanizado del caucho. El nitrato de celulosa se sintetizó accidentalmente en el año 1846 por el químico Christian Friedrich Schönbein, y en 1868, John W. Hyatt sintetizó el celuloide a partir de nitrato de celulosa.

El primer polímero totalmente sintético se obtuvo en 1909, cuando el químico belga Hendrik Baekeland sintetizó la baquelita a partir de formaldehído y fenol. En 1922, el químico alemán Hermann Staudinger comienza a estudiar los polímeros, y en 1926 expone su hipótesis de que se trata de largas cadenas de unidades pequeñas unidas por enlaces covalentes. En 1953 recibió el Premio Nobel de Química por su trabajo. [2]

### 3.1.2. Clasificación

Los polímeros pueden ser clasificados de acuerdo a diferentes características:

#### 3.1.2.1. Según su forma

- Los *polímeros lineales* se originan cuando el monómero que lo forma tiene dos puntos reactivos o de ataque químico, de modo que el polímero se forma unidireccionalmente, formando cadenas lineales.
- Los *polímeros ramificados* se forman porque el monómero posee tres o más puntos reactivos de ataque químico, de modo que la polimerización ocurre tridimensionalmente, es decir, en las tres direcciones del espacio. [3]

#### 3.1.2.2. Según el tipo de monómeros

- Los *homopolímeros* son aquellos que están constituidos por una sola clase de monómeros.
- Los *copolímeros* son aquellos constituidos por dos o más clases de monómeros, dispuestos al azar, alternadamente, en bloques o siendo injertados en una cadena principal. [3]

#### 3.1.2.3. Según sus propiedades físicas

- *Termoestables*: no fluyen, al calentarlos se descomponen químicamente. Este comportamiento se debe a una estructura con muchos entrecruzamientos, que impiden los desplazamientos relativos de las moléculas.
- *Elastómeros*: plásticos con un comportamiento elástico que pueden ser deformados fácilmente sin que se rompan sus enlaces o modifique su estructura.
- *Termoplásticos*: fluyen al calentarlos y se vuelven a endurecer al enfriarlos. Su estructura molecular presenta pocos (o ningún) entrecruzamientos. [3]

#### 3.1.2.4. Según su mecanismo de formación

- *Polímeros de adición*. La polimerización no implica la liberación de ningún compuesto de baja masa molecular. Esta polimerización se genera cuando un “catalizador” inicia la reacción. Este catalizador separa la unión de doble carbono en los monómeros, luego aquellos monómeros se unen con otros debido a los electrones libres, y así se van uniendo uno tras uno hasta que la reacción termina.

- *Polímeros de condensación*. La reacción de polimerización implica a cada paso la formación de una molécula de baja masa molecular. [3]

#### 3.1.2.5. Según su origen

- Los *polímeros naturales o biopolímeros* son aquellos que se encuentran en la naturaleza, formando parte de los seres vivos como la celulosa, el almidón, el caucho, el colágeno o la seda entre otros.
- Los *polímeros sintéticos* son aquellos fabricados en laboratorios o en procesos industriales de producción como el nylon, la baquelita, el PVC o el teflón. [3]

#### 3.1.3. Polímeros biodegradables

En la actualidad existen numerosos y diferentes tipos de polímeros de uso frecuente en el campo de la biomedicina (conocidos mayormente con el nombre de *biopolímeros*), en el campo de la química, industrialmente, etc. Los *polímeros biodegradables* son muy importantes en el campo de los implantes en los organismos humanos. Algunos de esos polímeros biodegradables son bastante estables, y se utilizan para usos permanentes, como por ejemplo es el caso del polimetilmetacrilato o PMMA, o el polietileno (PE). En años recientes se han ido introduciendo los polímeros biodegradables incluso para aplicaciones de tipo temporales, incluyéndose en los años 60 el término de “*material bioabsorbible*”. Dichos materiales poseen la capacidad de ser compatibles con los tejidos humanos pudiendo ser biodegradados dentro del cuerpo tiempo después de haber sido implantados, produciendo productos de carácter no tóxicos, que pueden eliminarse por el propio organismo o incluso ser metabolizados por él. Este hecho químico es de gran importancia para el campo de la medicina, y ha significado un gran adelanto y mejora en la calidad de vida de los pacientes.

Hay diferentes características que deben poseer los materiales biodegradables para poder ser utilizados en el cuerpo humano a modo de implantes, p.e., los materiales no deben tener carácter mutagénico, cancerígeno, antigénicos, tóxicos o no antisépticos. Deben ser fácilmente esterilizables, y por supuesto compatible con el tejido que lo albergará, así como también deben ser fácilmente conformados de manera sencilla para utilizarlos dependiendo de los requisitos impuestos. Así, en la actualidad, la mayor parte de las investigaciones en cuanto a los polímeros se encuentran dirigidas a su uso en aplicaciones biomédicas, como las anteriormente mencionadas, destacando el desarrollo de polímeros de origen sintético.

En lo que a la naturaleza de los polímeros se refiere, podemos destacar dos grandes familias de éstos, una de origen sintético, p.e., el ácido poliláctico (PLA), y otra de origen natural, p.e, el colágeno. Los primeros polímeros degradables que se sintetizaron, así como los más usados, son los que se consiguieron partiendo del ácido poliglicólico (PGA), y del ácido poliláctico (PLA), los cuales son de gran utilidad en la industria biomédica, empezando por las suturas biodegradables, que comenzaron a utilizarse legalmente en el año 1960. Desde entonces, se han desarrollado numerosos compuestos basados tanto en el PGA como en el PLA, así como también otros tipos de materiales, como pueden ser la polidioxanona, o copolímeros de policaprolactona que han sido aceptados como materiales de uso biomédico. En adición a estos materiales, podemos encontrar polianhídridos, poliortoésteres. Además, la síntesis de polímeros biodegradables es un campo en constante investigación y avance, por lo cual actualmente se encuentran muchos otros compuestos bajo estudio.

También es importante destacar que en la actualidad se están sustituyendo los polímeros plásticos por polímeros biodegradables, con la finalidad de reducir la contaminación que provocan los materiales plásticos, este hecho es parte del cuidado social por el medio ambiente. Así, los desechos que producen los polímeros biodegradables pueden ser tratados como si de restos de tipo orgánico se tratase. Los polímeros biodegradables tardan menos tiempo en descomponerse, ya que su formación química es distinta a un polímero basado en la petroquímica. La relación de los polímeros biodegradables con el medio ambiente es natural, pues incluso en la síntesis de muchos de ellos intervienen las bacterias, p.e., en la síntesis del PLA y polihidroxialcanoatos (PHAs). [4,5]

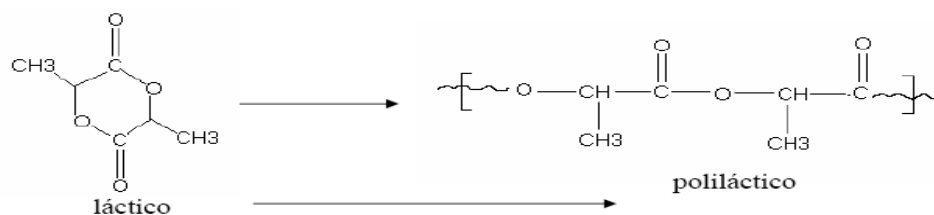
### **3.1.3.1. Ácido poliláctico (PLA)**

El ácido poliláctico (PLA) es un polímero termoplástico, amorfo o semicristalino, que ha sido ampliamente estudiado en aplicaciones como la liberación controlada de fármacos, suturas biodegradables y diferentes implantes para la fijación de fracturas y para la elaboración de dispositivos vasculares. [6]

#### **3.1.3.1.1 Síntesis**

La síntesis del PLA fue estudiada por Carothers en 1932. Generalmente, se lleva a cabo la polimerización por apertura del anillo de diéster cíclico (Figura 1). Diferentes compuestos metálicos, organometálicos e inorgánicos de Zn y estaño han sido usados como iniciadores. Sin embargo, el tetrafenil de estaño, el cloruro estañoso y el octato estañoso son los más efectivos. [6,7]





**Figura 1.** Síntesis del ácido poliláctico por apertura del anillo de diéster cíclico.

### 3.1.3.1.2 Propiedades

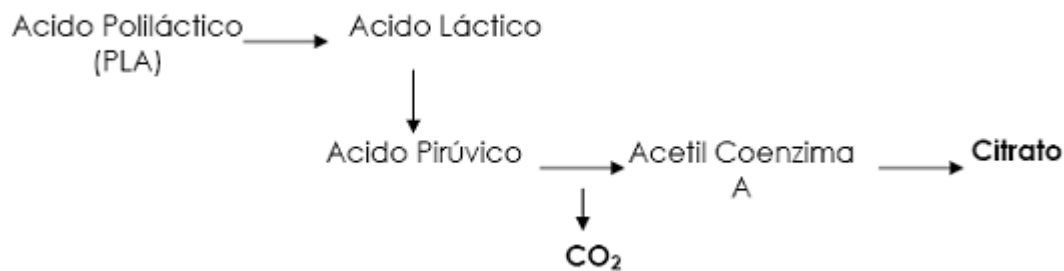
Algunas propiedades térmicas y mecánicas del PLA son mostradas en la Tabla 1. La configuración L-PLA es un polímero cristalino o semicristalino con un módulo de Young relativamente alto (2.7 GPa). Mientras que mezclas de configuraciones D,L-PLA corresponde a polímeros amorfos con un módulo de Young de 1.9 GPa. Sin embargo, sus propiedades mecánicas son muy bajas en comparación a materiales metálicos como el acero, pero no son tan lejanas a las propiedades mecánicas de algunos tejidos biológicos como p.e., el tejido óseo. Lo más destacable del PLA es su tiempo de degradación que depende de su ordenamiento cristalino. [6,7]

**Tabla 1.** Algunas propiedades del ácido poliláctico en comparación con el acero y el hueso cortical.

Material	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	E (GPa)	Tiempo Degradación(meses)
L-PLA	173-178	60-65	2,7	> 24
DL-PLA	Amorfo	55-60	1,9	12-16
Hueso			10-20	
Acero			210	

### 3.1.3.1.3 Biocompatibilidad

El ácido láctico es un intermediario común en el metabolismo de los carbohidratos en las células, el uso de este hidroxácido es generalmente visto como la situación ideal desde el punto de vista toxicológico, puesto que la acumulación del ácido láctico puede generar una serie de problemas fisiológicos. Los  $\alpha$ -poliésteres, como el PLA se degradan inicialmente por hidrólisis y su degradación puede ser acelerada *in-vivo* por la presencia de enzimas, lo cual con lleva a la liberación de su monómero (ácido láctico). Estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación entrando en la ruta metabólica de las células (Figura 2).



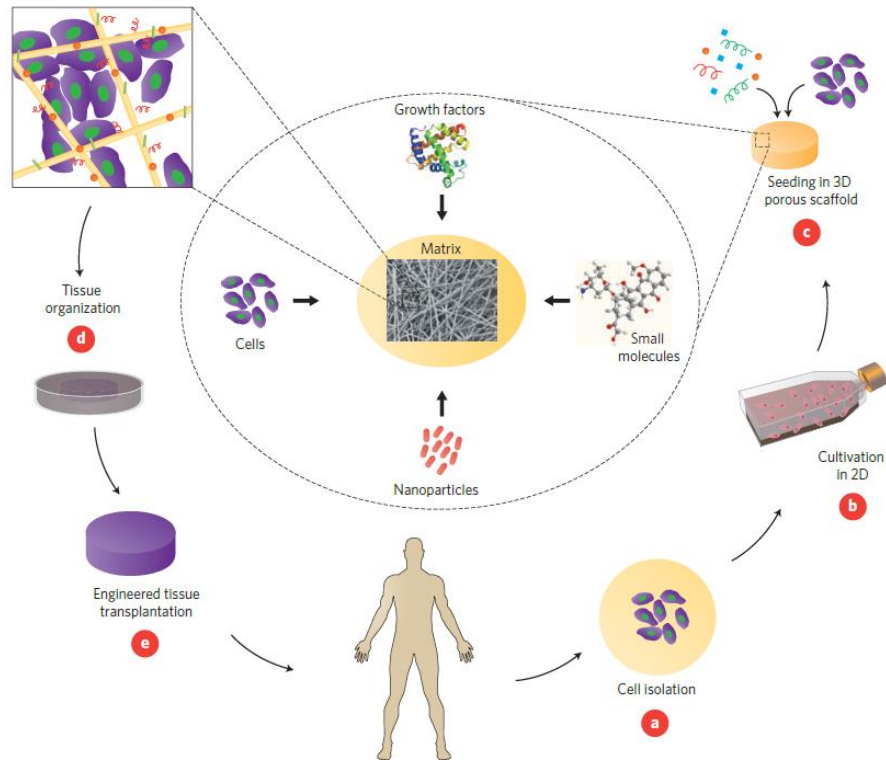
**Figura 2.** Ruta de degradación del ácido poliláctico en el organismo

La ruta metabólica del ácido láctico comienza con la transformación de lactato a piruvato por la acción de la enzima lactato dehidrogenasa; luego, el piruvato sufre una descarboxilación oxidativa para producir acetilcoenzima A. Esta molécula puede entrar en el ciclo del ácido tricarbóxico (o ciclo del ácido cítrico), el cual se realiza en las mitocondrias obteniéndose como resultado por fosforilación oxidativa: ATP más agua y dióxido de carbono, estos dos subproductos son eliminados en la respiración y excretados por los riñones. [6,7]

#### 3.1.3.1.4 Aplicaciones

El PLA es actualmente utilizado como materia primera para preparar diversos materiales y dispositivos de aplicación biomédica. Por ejemplo, el PLA es usado en clavos para la unión de ligamentos y reparación de meniscos, suturas, tornillos y clavos para la fijación de fracturas y cirugía maxilofacial, liberación de fármacos y stents para cirugía cardiovascular.

Una de las aplicaciones más recientes del PLA, la encontramos en el campo de la *ingeniería de tejidos*, la cual se basa en generar tejidos a partir de células del mismo paciente o de un donador compatible cuyo crecimiento es guiado *in-situ* mediante andamios reabsorbibles (*scaffolds*). Este tipo de terapia ha sido aplicada para la regeneración de diferentes tejidos, tales como el tejido cutáneo, hepático, cardiovascular y recientemente, el cartilaginoso y el tejido óseo (Figura 3). Actualmente, se encuentran en el mercado productos basados en ingeniería de tejidos para la reparación de tejido cutáneo. Otros tejidos como el óseo y el cartilaginoso se encuentran todavía en fase de desarrollo. [6, 7, 8]



**Figura 3.** Esquema de la aplicación de los andamios temporales o scaffolds en la ingeniería de tejidos

## 3.2. Electrohilado (*Electrospinning*)

### 3.2.1. Introducción a la técnica

El proceso de electrospinning permite obtener fibras por medio del estiramiento coaxial de una solución viscoelástica. Estas fibras poseen diámetros que se encuentran en la escala de las micras y los nanómetros. Bajo estos tamaños es posible encontrar características únicas, tales como la gran área superficial en relación al pequeño volumen, flexibilidad en la superficie, alta porosidad, poros interconectados y un rendimiento mecánico superior comparado con otras formas ya conocidas del material. Estas características hacen de las electrofibras candidatos óptimos para una variedad de aplicaciones, entre ellas: ingeniería de tejidos, textiles, elementos para cubrir heridas, medios de filtración, membranas especiales y diversas aplicaciones médicas tales como reemplazo de huesos, implantes dentales, sistemas de liberación de fármacos, injertos vasculares, vasos sanguíneos artificiales entre otros.

La técnica consiste en aplicar disoluciones de polímero a través de altos campos eléctricos, se basa en aplicar suficientes fuerzas eléctricas que superen las fuerzas de la tensión

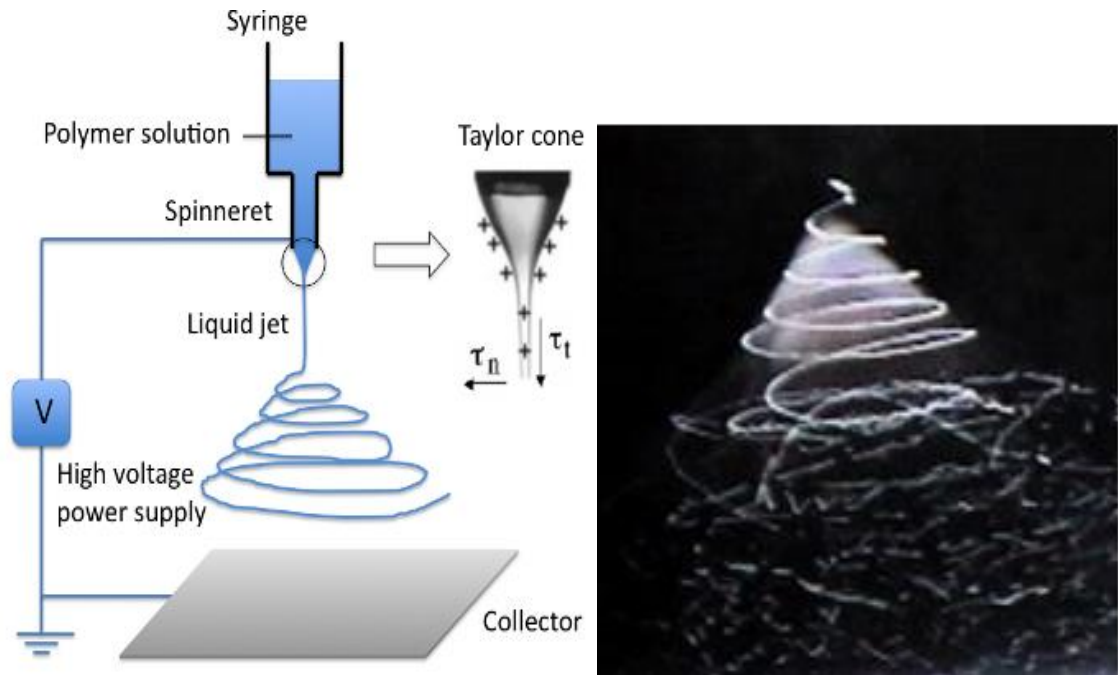
superficial en la disolución del polímero cargado, de esta forma a un voltaje determinado, finos chorros (*jets*) de disolución son expulsados desde el capilar hasta el plato colector. Este efecto electrostático sobre la gota de disolución del polímero en la punta del capilar es lo que se conoce como cono de Taylor. Posteriormente, el chorro se mueve en la dirección del campo eléctrico, desplegándose de acuerdo a las fuerzas externas e internas y experimentando inestabilidad en algunas ocasiones. Durante este movimiento, el disolvente se evapora y el polímero se solidifica formando las fibras que son depositadas al azar sobre el plato colector. [9, 10]

### 3.2.2. Breve historia

La técnica del electrospinning es una técnica antigua, su origen se remonta a más de 60 años. Fue observada por Rayleigh en 1897, quien evaluó el efecto de inducir cargas eléctricas en chorros de agua, así como la inestabilidad asimétrica del flujo del jet. Estudiada en detalle por Zeleny en 1914, a través del análisis del comportamiento de las gotas de solución en el extremo de un capilar y el inicio del proceso de modelamiento matemático del comportamiento de los fluidos bajo las fuerzas electroestáticas y patentada por Cooley, Morton y Formhals. Fue Formhals quien en 1934 logró describir de forma explícita el proceso, para ello trabajó con acetato de celulosa en su primera patente, para su segundo desarrollo ensambló un nuevo sistema con un mayor control de la distancia entre el capilar y el colector, con el cual redujo de forma considerable los problemas observados en sus primeras investigaciones. Más adelante investigadores como Reneker 1994-1995 profundizaron en la técnica. Solo hasta hace pocos años debido a la demanda de materiales con dimensiones en escala nanométrica, la técnica de electrospinning se ha convertido en un proceso más atractivo gracias a su capacidad de transformar una amplia variedad de materiales poliméricos en forma de micro/nanofibras a bajo costo y con relativa facilidad. [9]

### 3.2.3. Funcionamiento y montaje

El típico montaje para ejecutar la técnica de electrospinning se muestra en la Figura 4, consta de un capilar metálico a través del cual debe ser expulsada la solución polimérica; una fuente de alto voltaje que posee dos electrodos, uno de ellos debe conectarse al capilar metálico, y otro directamente al plato colector donde se depositarán las fibras que anteriormente deben evaporar el disolvente durante su tránsito desde el capilar al colector.



**Figura 4.** Representación esquemática de un sistema simple de electrohilado (electrospinning), e imagen estereográfica del cono de Taylor

La técnica puede ser desarrollada de forma horizontal o vertical según se desee. El principal inconveniente al trabajar en posición vertical es la posible salida de gotas de disolución desde el capilar hacia el plato colector debido a la inestabilidad del campo electrostático, pero también puede ocurrir por un descontrol del flujo de la disolución del polímero. Este goteo de la disolución del polímero, al caer sobre las fibras depositadas genera matrices defectuosas debido a la redisolución de las fibras previamente depositadas en el colector.

En la actualidad, existen diversos sistemas de electrohilado. El más sencillo, es la extensión del uso de un capilar a varios de ellos y corresponde al electrospinning multi-jet; este sistema tiene por finalidad reducir el tiempo de electrohilado. Por mencionar algunos otros, se tiene el sistema de coelectrospinning también llamado electrospinning dual, en el cual diferentes disoluciones de diferentes polímeros pueden ser electrohiladas de manera simultánea, permitiendo conformar matrices híbridas con polímeros de diferentes características. También se han obtenido fibras coaxiales las cuales quedan conformadas con un dominio central o nuclear llamado core y capas o cubiertas (llamada shell) alrededor del core, para lograr este tipo de fibras se disponen de capilares coaxiales. Las disoluciones que originan cada dominio en la fibra coaxial pueden ser operadas de manera independiente en su flujo. Finalmente, se han conseguido matrices con fibras alineadas, lo cual depende del sistema colector, por ejemplo se puede utilizar un plato giratorio o un tambor rotatorio, en ambos casos se obtienen fibras alineadas longitudinalmente. El uso de

aplicar un campo pulsante en el plato colector permite obtener fibras ordenadas ortogonalmente. [9]

### **3.2.4. Parámetros del proceso**

#### **3.2.4.1. Voltaje**

El voltaje es uno de los parámetros más importantes dentro del proceso de electrospinning, algunos autores afirman que aplicar voltajes altos hace que más fluido se transporte en el chorro lo que resulta en fibras con mayores diámetros, otros afirman que un incremento en la aplicación del voltaje decrece el diámetro de las nanofibras y aumenta la probabilidad de obtener fibras con defectos (beads), lo cierto es que en la mayoría de los casos un voltaje alto permite un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerza de coulomb en el chorro y un fuerte campo eléctrico, todos estos factores promueven una reducción en el diámetro de las fibras. La influencia del voltaje depende además de las propiedades viscoelásticas del material base, por ello es importante analizar el comportamiento para cada polímero con su respectivo disolvente. [9]

#### **3.2.4.2. Flujo de salida**

Un flujo de salida menor podría ser benéfico ya que el disolvente tendría más tiempo para evaporarse evitando la formación de defectos en las fibras. Cuando el flujo de salida se incrementa ocurre un incremento en el diámetro de las fibras y posiblemente en el tamaño de los defectos. Un mínimo valor de volumen de solución a la salida del capilar debería ser mantenido para obtener un cono de Taylor estable, el flujo de salida determina la cantidad de solución disponible para el proceso de electrospinning. [9]

#### **3.2.4.3. Distancia entre la punta de la aguja y el plato colector**

Dependiendo de las propiedades de la solución el efecto de la variación de la distancia puede o no, tener efecto en la morfología de las fibras. Al trabajar con distancias muy grandes las fibras electrohiladas podrían romperse debido a su propio peso, especialmente si la fibras son de diámetro pequeño. Una mínima distancia es requerida para dar a las fibras el tiempo suficiente para que el disolvente se evapore antes de alcanzar el plato colector, con distancias muy grandes o demasiado pequeñas se ha observado la aparición de beads o fibras húmedas que promueven la obtención de fibras aplanadas o con forma de cintas. La mayoría de los autores coinciden en que con mayores distancias la solución tendrá mayor tiempo de vuelo lo que promoverá un mayor estiramiento de las fibras antes de depositarse en el plato colector.[9]

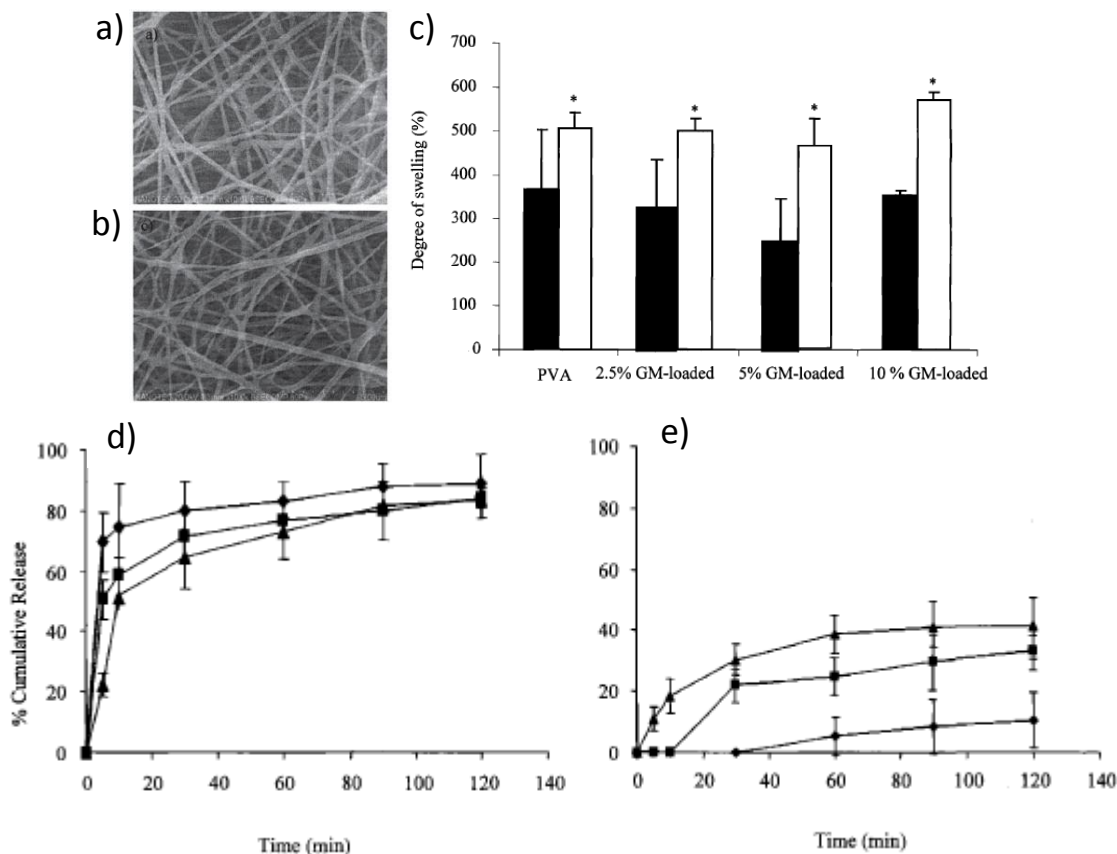
### 3.3. Electrofibras cargadas con extractos y/o compuestos de plantas medicinales: Estado del arte

Actualmente, el electrospinning puede ser reconocido como la técnica más simple para la fabricación de matrices de fibras. El tamaño micro/nano de las fibras genera una gran relación entre área y volumen, su superficie es flexible y sus propiedades mecánicas superiores (p.e., la rigidez y resistencia a la tracción). Así, estas características los indica como los scaffolds ideales para sostener el crecimiento celular. La producción y diseño de materiales nuevos y efectivos con propiedades antibacterianas y para el cierre de las heridas es un objetivo importante en los sistemas de salud. Varios biomateriales derivados de las plantas están emergiendo y abriendo las fronteras para las aplicaciones de la ingeniería de tejidos basada en la fitoquímica. Sin duda alguna, estos materiales necesitan ser evaluados por sus efectos farmacológicos debido a los diversos compuestos que los pueden constituir, p.e., fitoesteroides, antraquinonas, etc., sin embargo, sus propiedades beneficiosas pueden darle lugar en el mercado. Así, los scaffolds cargados con estos productos naturales podrían ser considerados los nuevos candidatos ideales como sistemas liberadores de droga y para la ingeniería de tejidos.

En el sureste de Asia es frecuente el uso del extracto acuoso de mangostán o “fruta reina” (*Garcinia mangostana* Linn) como medicina tradicional para el tratamiento de la diarrea, infecciones de la piel, heridas y úlceras crónicas, además de ser usado como astringente. Diferentes estudios han demostrado que este extracto contiene propiedades antimicrobianas, antiproliferativas, antioxidantes y antiinflamatorias. Particularmente, el pericarpio del fruto es una buena fuente para la purificación de diversas sustancia bioactivas tales como la mangostina, xantonas, chrysanthemin, garcinone, taninos, gartanin, vitaminas B1, B2, y C, etc. Así, su alta actividad antioxidante lo promueve como un ingrediente con aplicación en cosmética para la preparación de jabones y productos antienvjecimiento, además su actividad antibacteriana permite el tratamiento anti-acné. Por ello, el extracto del fruto del mangostán es indicado como un producto ideal para el cuidado de la piel. Por tal motivo, Opanasopit et al. (2008) usando la técnica de electrospinning, prepararon matrices de nanofibras de polivinilalcohol (PVA) al 10 %-w/w cargadas con extractos acuosos de mangostán (2.5 %, 5 % y 10 %-w/w) para estudiar la carga y liberación de la actividad antioxidante del extracto [11]. Los autores seleccionaron el PVA como polímero debido a sus propiedades hidrosolubles y biocompatibilidad, lo cual lo hace un soporte ideal para el extracto. De esta forma, los autores obtuvieron nanofibras cargadas con un rendimiento del 10% en cuanto al contenido de antioxidantes. La liberación en agua de la actividad antioxidante a los 120 min fue del 73% al 81% dependiendo de la carga, siendo significativamente mayor en comparación a la liberación desde films preparados por solvent-casting que solo liberaron como máximo el 41% desde

el film cargado al 10% (Figura 5). Los autores explican estos resultados en base al mayor hinchamiento de las matrices de fibras y a la más rápida disolución de las fibras de acuerdo a su mayor relación área/volumen.

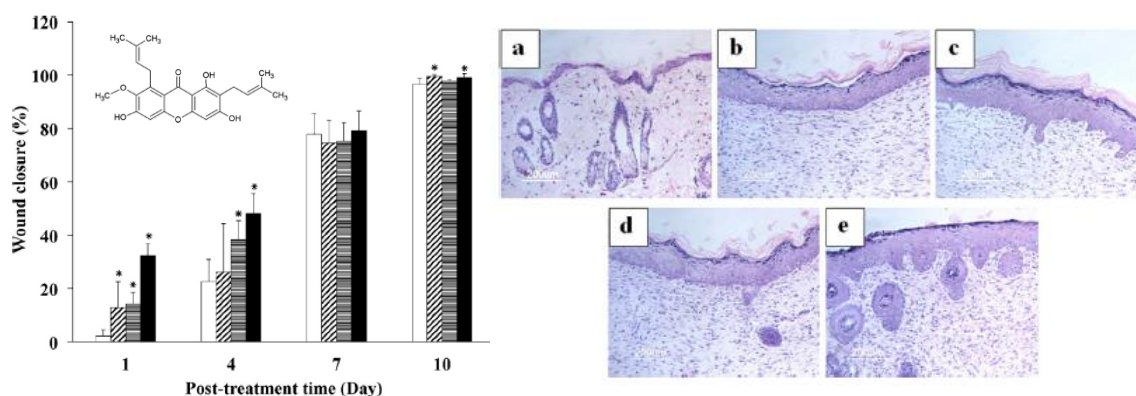
Recientemente, se han fabricado nanofibras de quitosano (CS) a partir de disolución acuosa sin necesidad del uso de solventes orgánicos y ácidos tóxicos. Así, las nanofibras de CS-EDTA/PVA han mostrado excelente actividad antibacteriana y antioxidante como era de esperar; sin embargo, se ha observado que el EDTA puede producir una desactivación irreversible de las metaloproteasa, las cuales son necesarias para la formación de la matriz extracelular y factores de crecimiento extracelulares durante el cierre de las heridas. Así, el grupo de Opanasopit et al. prepararon matrices de nanofibras de CS-EDTA/PVA cargadas con extracto de GM para mejorar su actividad antibacteriana y antioxidante durante el cierre de las heridas [12]. El extracto fue normalizado por su contenido de  $\alpha$ -mangostina. Estas matrices fueron probadas *in-vivo* en el ensayo de cierre de la herida y mostraron que



**Figura 5.** Electrofibras de PVA cargadas con extracto de mangostán (*Garcinia mangostana* Linn) (GM). Nanofibras de PVA (a), y nanofibras de PVA cargadas al 5% con extracto GM (b). Hinchamiento de las matrices de nanofibras cargadas (barras blancas) y films (barras negras) cargados con GM (c). Liberación de la actividad antioxidante desde las fibras (d) y films (e) cargados con GM.[11]



durante los primeros días del cierre (del 1ro al 4to) esta nueva matriz cargada con GM favoreció el cierre de la herida; sin embargo, durante los 7 y 10 día de tratamiento, todos los animales mostraron un cierre de herida de igual tamaño, del 80 y casi 100%, respectivamente. Sin embargo, el análisis histológico de las heridas demostró una mejor reepitelización de las heridas en los animales tratados con las matrices de CS-EDTA/PVA cargadas con los extractos de GM (Figura 6). Asimismo, se determinó una alta estabilidad de la  $\alpha$ -mangostina aportada por el extracto de GM durante la conservación de las matrices durante un periodo de tres meses.

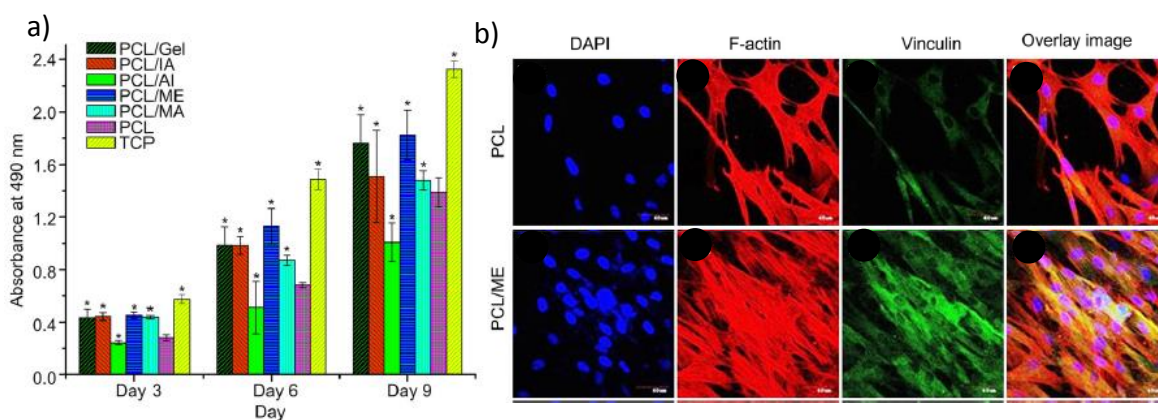


**Figura 6.** Gráfico de cierre de herida en rata, los animales fueron tratados: con las matrices de CS-EDTA/PVA cargadas con extracto de GM (barra negra) (e), matrices CS-EDTA/PVA (barras horizontales) (d), gaza antibacteriana comercial (barra inclinadas) (c) y con gaza (barra blanca) (b). El análisis histológico muestra la piel normal de rata (a) para comparar la reepitelización durante el tratamiento con las matrices (b-e).[12]

El cierre de heridas es un área de investigación importante para la ingeniería de tejidos. Esto se puede justificar desde algunas estadísticas, como por ejemplo se menciona que a nivel mundial más de 6 millones de pacientes sufren severas heridas cada año, y de las cuales más de 300,000 personas mueren. Por otro lado, se estima que el 25% de las drogas prescritas derivan de plantas medicinales. Además, recientes estudios sobre los extractos de plantas fortalecen su uso debido a la extraordinaria influencia que estos extractos pueden tener sobre las enfermedades. Tal es el caso, de la planta *Centella asiatica* para la cual se ha demostrado su capacidad para el cierre de heridas *in-vivo*; además, se ha identificado la molécula responsable de ello, el madecasonide, que es un triterpeno pentacíclico.

Un problema que pueden tener algunos extractos de plantas medicinales usadas para el cierre de heridas es su presentación. Los extractos acuosos pueden ser bebidos, pero otras formas como los ungüentos e hidrogeles pueden tener inconvenientes cuando son aplicados sobre las heridas. Por ejemplo, pueden sufrir deshidratación y secarse sobre la

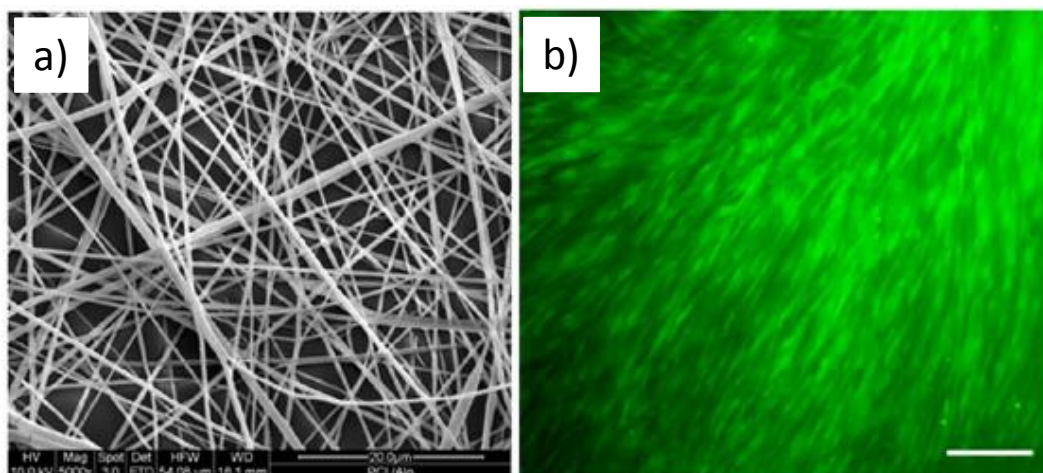
herida lo cual impide un íntimo contacto necesario para movilizar sus metabolitos secundarios a las heridas. Existen heridas exudativas las cuales también generan un problema de contacto con el ungüento e hidrogel. Para evitar estos tipos de problemas, Jin et al. [13] desarrollaron matrices de nanofibras de policaprolactona (PCL) cargadas con extractos de cuatro plantas medicinales *Indigofera aspalathoides*, *Azadirachta indica*, *Memecylon edule* (ME) y *Myristica andamanica*. La disolución de electrospinning fue preparada disolviendo la PCL junto con los extractos pulverizados de las plantas en una mezcla de cloroformo/metanol (50/50, v/v), en una ratio de 60:40 (%-wt) para obtener una disolución final del 12% (w/v). Estas matrices fueron desarrolladas bajo el concepto de ingeniería de tejidos con aplicación para piel, desde que el poliéster PCL es un polímero biodegradable y su conformación en nanofibras sería un andamio temporal. Estos investigadores evaluaron *in-vitro* la proliferación de fibroblastos de dermis humana (HDF), y encontraron que a los 9 días de cultivo la proliferación de HDF fue 31% más alta en la matriz de PCL cargada con el extracto ME en comparación a la matriz de PCL (Figura 7). Estos resultados se explicaron debido a la menor toxicidad del extracto ME, lo cual permite una mejor interacción entre los fibroblastos HDF y las nanofibras, lo cual fue demostrado por tinción de la F-actina y colágeno. Además, demostraron que en esta matriz de PCL/ME, los adipocitos derivados de células madre pueden diferenciarse hacia estados tempranos e intermedios de tejido epidermal.



**Figura 7. (a)** Proliferación de fibroblastos humanos sobre las matrices de nanofibras de PCL cargadas con los extractos de cuatro plantas medicinales *Indigofera aspalathoides*, *Azadirachta indica*, *Memecylon edule* (ME) y *Myristica andamanica*. **(b)** Imágenes de microscopía de fluorescencia para el análisis de la expresión de las proteínas F-actina y vinculina que marca los sitios de adhesión de la F-actina al lado citoplasmático de la membrana celular. La tinción DAPI marca los núcleos de los fibroblastos. [13]

Sin embargo, no solo se han preparado scaffolds de plantas medicinales “exóticas o raras”. El *Aloe vera* (Fam. *Liliaceae*) es ampliamente reconocida como planta medicinal para el tratamiento de una variedad de desórdenes incluyendo infecciones, y estreñimiento (usada

como laxante), pero su mayor reconocimiento es para el tratamiento de problemas dermatológicos. El gel que se obtiene de sus hojas consiste de 99% agua y contiene un polisacárido de cadena larga llamado glucomannan entre otros carbohidratos. También contiene aminoácidos, ácido salicílico, ácido ascórbico, vitaminas A y E a las cuales se le atribuye sus propiedades antioxidantes. Suganya et al. [14] prepararon con éxito nanofibras de PCL cargada con gel de *A. vera*. Las matrices de estas nanofibras de  $352 \pm 75$  nm fueron diseñadas como sustituyente de piel para el caso de cierres de heridas. Claramente se demostró que estas matrices soportan la adhesión y el crecimiento de fibroblastos de dermis humana, y ellos organizaron su citoesqueleto de manera guiada sobre las nanofibras (Figura 8).



**Figura 8.** Matriz de nanofibras de PCL/Aloe vera (a). Fibroblastos de dermis humana cultivados sobre la matriz (b). [14]

También se encuentran extractos medicinales para la reparación de tejidos duros, tal es el caso de tejido óseo. Se han preparado scaffolds de nanofibras de PCL cargadas con hidroxiapatita (HA) y extractos de *Cissus quadrangularis* (CQ). Esta planta medicinal posee actividad osteogénica y es de interés para el cierre de fracturas óseas. Entre sus componentes el extracto contiene esteroides fitoestrogénicos, ácido ascórbico, flavonoides, caroteno y calcio. El extracto preparado en éter de petróleo es rico en fitoesterol, el cual promueve la proliferación de células madres en el mesénquima de la médula ósea, y el crecimiento óseo fetal. Suganya et al. [15] reportaron que los scaffolds de PCL/CQ y PCL/HA/CQ mejoraron la proliferación y mineralización; sin embargo, la interacción celular con el scaffolds de PCL/HA/CQ fue mucho mejor debido a la combinación de HA con el extracto de CQ.

El silano es un polisacárido abundante en las plantas y generalmente es usado como biopolímero en la industria farmacéutica para el desarrollo de sistemas liberadores de drogas. Venugopal et al. [16] reportaron la preparación de una matriz de nanofibras de

silano/PVA para aplicaciones de la ingeniería de tejidos al tejido cardiaco. Las fibras conseguidas mostraron un diámetro de  $665 \pm 93$  nm, y excelentes propiedades mecánicas, el hinchamiento de las fibras por hidratación permitía el crecimiento *in-vitro* de cardiomiocitos, lo cual sugería que estas matrices podrían ser usadas como parches cardiacos para la regeneración del corazón infartado.

## 4. Materiales y metodología

En este apartado, se presentan tanto los materiales y reactivos utilizados, como los métodos y equipos utilizados para la caracterización de las matrices poliméricas.

### 4.1. Reactivos

- PLA amorfo comercial fue adquirido de Natureworks®, PLA grado 2002D con un contenido de L-isómero de 95.8%. De acuerdo al fabricante, este PLA es un sólido transparente, con una densidad de 1.24 g/mL. Sus propiedades térmicas y mecánicas son definidas por una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de 58 °C, un punto de fusión ( $T_m$ ) de 153 °C, un módulo de Young ( $E$ ) de 3500 MPa, una resistencia a la tensión ( $\sigma$ ) de 53-60 MPa, y una tensión de elongación ( $\gamma$ ) de 6%. Sus pesos moleculares determinados por GPC, específicamente el  $M_n$ ,  $M_w$  y el índice de polidispersidad fueron 98,100 g/mol, 181,000 g/mol y 1.85, respectivamente.
- Acetona, Panreac
- Triclorometano seco (máx. 0,01% de agua) estabilizado con 50 ppm de amileno
- Agua destilada
- Etanol absoluto
- Ácido acético glacial, Panreac
- N-Butanol

### 4.2. Material de laboratorio

- Tubos de ensayo de plástico
- Balanza de precisión
- Papel de filtro
- Papel de aluminio
- Jeringas de plástico (10 mL)
- Agujas
- Tubos Eppendorf
- Agitador tipo Vortex
- Placa calefactora
- Cubre objetos vidrio
- Porta objetos vidrio
- Micropipetas regulables (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 500  $\mu$ L)
- Parafilm

- Espátula
- Pinzas de precisión
- Guantes de nitrilo
- Gafas homologadas
- Bata de laboratorio

### 4.3. Plantas medicinales

Se trabajaron con 11 plantas medicinales subtropicales cuyo origen fue Perú (América del Sur), y cuya adquisición fue realizada por la Facultad de Medicina de la Universidad de Ciencias Aplicadas del Perú (Lima, Perú). Estas plantas medicinales fueron: *Bixa orellana* (BO), *Caesalpinia spinosa* (CS), *Dracotium lorentense* (DL), *Equisetum arvense* L (EA), *Maytenus macrocarpa* (MM), *Myrciaria dubia* (MD), *Phyllanthus niruri* (PN), *Physalis peruviana* L (PP), *Schinus molle* (SM), *Tabebuia impetiginosa* (TI), *Uncaria tomentosa* L (UT). Algunas características botánicas y su uso tradicional son indicados en la Tabla 2 (ver sección resultados).

### 4.4. Preparación de los extractos de las plantas

Las plantas se cortaron y fueron sumergidas en etanol absoluto (1: 2, w / v) (p.e. 25 g en 50 mL de etanol) y mantenidas protegidas de la luz (en oscuridad) durante 10 días a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, las mezclas se filtraron a través de un papel de filtro Whatman Nº 4 y almacenados a 4 °C hasta su uso. Estos extractos etanólicos fueron preparados en la Facultad de Medicina de la Universidad de Ciencias Aplicadas del Perú (Lima, Perú), y fueron cedidos por la Dra. J.M. del Valle.

Posteriormente, los extractos etanólicos (50 mL) fueron evaporados a 50 °C en un baño María hasta obtener un residuo sólido o viscoso. Luego, estos extractos secos fueron redisueltos hasta completar un volumen de 20 mL de disolución con una mezcla cloroformo/acetona (2v/1v). Para su total redisolución su uso agitación en vortex a velocidad máxima durante 15 min. Finalmente, los extractos fueron filtrados usando un filtro analítico de papel, y los filtrados fueron almacenados a 4 °C hasta su uso para preparar las electrofibras. Luego, estos extractos fueron almacenados a -20 °C para períodos más prolongados.

## 4.5. Preparación de la disolución de PLA/extracto

El PLA comercial en estado sólido fue disuelto en una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ /acetona (2v/1v). Se ha de tener siempre en cuenta que el cloroformo ha de ser puro y estabilizado con amileno ( $\leq 50$  ppm) y la acetona seca. En el mercado también existe cloroformo puro estabilizado con etanol ( $\leq 50$  ppm), el mismo que no solubiliza al PLA; esto se debe al simple hecho que los poliésteres son insolubles en etanol.

El PLA fue preparado al 10 %-w/v, rutinariamente 0.8 g de PLA fueron disueltos en 8 mL de la mezcla  $\text{CHCl}_3$ /acetona (2v/1v) usando un vial de vidrio con tapa hermética y sellado con parafilm, el vial fue mantenido en agitación orbital a 80 rpm y 37 °C durante 24 h.

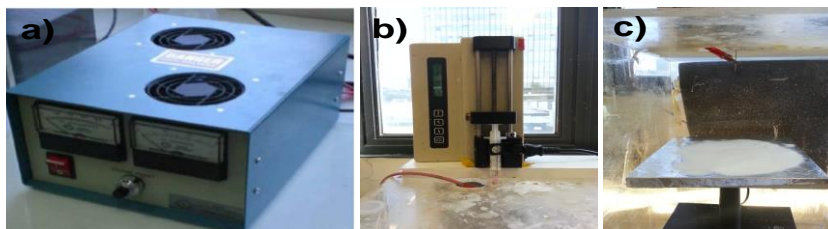
Luego, se añadieron 2 mL del extracto y se homogenizó en vortex a velocidad máxima durante 15 min. Esta disolución corresponde al PLA cargado con el extracto de la planta medicinal. Así, la concentración final de PLA fue del 8 %-w/v y para cada extracto fue del 0.25 %-w/v. Cada disolución fue denominada como PLA/Nombre de la planta (p.e. PLA/DL, corresponde al PLA cargado con el extracto de *Dracotium loretense* (DL)).

Una disolución de PLA al 8 %-w/v sin más aditivos fue preparada para obtener la matriz control de PLA.

## 4.6. Electrospinning

El equipo de electrohilado (Figura 9) que se ha utilizado para la obtención de las matrices está compuesto de los siguientes elementos:

- Fuente de alimentación con un voltaje máximo de 30 KV. Se debe destacar que aun tratándose de un equipo de alto voltaje, esta modificado para que la intensidades sean pequeñas y bajo la exposición involuntaria al campo eléctrico, el personal queda protegido de electrocución.
- 1 bomba impulsora KD *Scientific Infusion Pumps 100L*.
- 1 superficie colectora fija (20x20 cm<sup>2</sup>).
- 1 jeringa de 10 mL con aguja 18G (diámetro interno 0.84 mm) de punta roma (sin bisel).



**Figura 9.** Componentes del equipo de electrospinning. Fuente de alimentación (a), bomba de infusión para jeringas (b), y colector estatico con plato de aluminio (c).

Además, del equipo de electrospinning, se ha necesitado como material complementario: guantes, portaobjetos de vidrio, cubreobjetos de vidrio, pinzas y papel de aluminio.

Tal como se muestra en la Figura 9, el proceso de electrospinning fue realizado con una disposición vertical y un colector fijo. El procedimiento que se ha llevado a cabo para la obtención de las fibras mediante electrospinning es el siguiente:

- [1] Cubrir el colector con papel de plata para la posterior recogida de la muestra.
- [2] Cargar la jeringa con la correspondiente disolución de polímero.
- [3] Situar la jeringa en la bomba y colocarle a la aguja la pinza conectada al voltaje (ver Figura 9)
- [4] Encender la bomba e introducir las condiciones en las que queremos trabajar: tipo de jeringa (marca y volumen máximo), volumen de disolución en la jeringa (mL), velocidad de flujo (mL/h).
- [5] Poner un cubreobjetos sobre el colector para analizar posteriormente en el microscopio óptico si las fibras obtenidas son válidas.
- [6] Poner en marcha la bomba.
- [7] Conectar la fuente de alimentación y seleccionar el voltaje deseado.
- [8] Recoger muestra con el cubreobjetos y analizarla en el microscopio óptico con la ayuda de un portaobjetos.
- [9] Si observamos que las fibras son válidas ya podemos proceder a recoger el resto de solución. De lo contrario se reajustan los parámetros operacionales de acuerdo a los problemas y fibras observadas.

## 4.7. Microscopía óptica (OM)

El microscopio óptico *Carl Zeiss Standar 20*, se ha utilizado para observar las muestras recogidas en el cubreobjetos obtenidas mediante la técnica del electrospinning. Un microscopio óptico consta de un sistema de iluminación regulable, un sistema óptico que aumenta el tamaño de la imagen de la muestra y un sistema mecánico mediante el cual se consigue graduar el enfoque de la imagen aumentada. El microscopio óptico se sirve de la luz visible para formar una imagen aumentada de la muestra mediante un sistema de lentes. Si se mira a través del ocular se observa una imagen virtual aumentada respecto de la imagen real. [17]





**Figura 10.** *Microscopio óptico (OM) Carl Zeiss Standard 20*

Para el electrohilado es una herramienta indispensable, porque la evaluación de las fibras obtenidas de manera rápida (casi en línea) permite tomar decisiones para cambiar los parámetros operacionales del proceso.

#### **4.8. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

*Zeiss Neon 40 EsB FIB-SEM (Crossbeam)* situado en el CRNE (Centre for Research in NanoEngineering) ha sido el microscopio utilizado para el análisis de la morfología y diámetro de las fibras en las muestras de las matrices preparadas (Figura 11).

Para poder hacer uso de esta técnica, la muestra a analizar ha de ser conductora. En caso de que no lo sea, se procede a recubrirla con una capa fina de carbono mediante un sistema de pulverización catódica, campo eléctrico, gas argón y condiciones de vacío (*dispositivo Mitec K950 SputterCoater*).

Dicha técnica se basa en la reproducción de una imagen mediante el uso de electrones. La muestra es introducida en una cámara que trabaja al vacío donde una serie de lentes electromagnéticas la enfocan. En la parte superior de esta cámara se encuentra el cañón de electrones encargado de producir el haz vertical que generará la imagen. Los electrones son captados por detectores que los traducen a la señal digital captada por la pantalla. [17]



**Figura 11.** *Microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo Zeiss Neon 40 EsB FIB-SEM (Crossbeam)*

Las imágenes de las fibras fueron obtenidas observando las muestras con un voltaje acelerado de 5 kV. Como se sabe, en la microscopía electrónica la resolución depende de la intensidad del voltaje aplicado sobre la muestra. Esto es una restricción en el caso de la observación de las matrices de fibras de polímeros biodegradables puesto que estos materiales son fundidos con voltajes mayores a 5 kV. Además, las muestras también son fundidas si la distancia de trabajo disminuye y la magnificación aumenta a pesar de someter la muestra a 5 kV, esto ocurre porque al disminuir el área de exposición la intensidad de electrones por área aumenta y como consecuencia la muestra se funde. Otro problema relacionado a las imágenes SEM de las matrices de fibras es el enfoque, el hecho de que las fibras se distribuyan en diferentes planos, ocasiona que en una imagen de las matrices no todas las fibras tengan el mismo ajuste en el enfoque, es decir hay planos bien enfocados y otros quedan desenfocados.

Finalmente, las imágenes SEM de las matrices de fibras obtenidas a baja magnificación permiten analizar en su conjunto la distribución y defectos de las fibras, para obtener información sobre las características de la morfología superficial de las fibras se requieren imágenes obtenidas a la mayor magnificación posible, para la medida de los diámetros se requiere de imágenes obtenidas a magnificaciones intermedias que permitan realizar la medida inequívoca de las fibras identificando su distribución para no duplicar las medidas en una misma fibra. Una buena estadística para la distribución de tamaño de las fibras se

obtiene con la medida de 50 a 100 fibras. La medida de los diámetros se realiza usando el programa *SmartTiff* (Carl Zeiss SMT, Ltd.; Alemania), y se ha de medir en un trazo perpendicular al eje longitudinal de la fibra. Las medidas son tabuladas en una hoja Excel, y posteriormente estas medidas fueron analizadas con el programa *OriginPro v.10* (Origin Microcal, USA) para el procesamiento de los datos.

#### 4.9. Espectrómetro IR

*FTIR 4100 Jasco* ha sido el equipo utilizado para realizar el ensayo de espectrometría IR. Junto con los accesorios *Specacmodel MKII Golden Gate Heated Reflection Diamond ATR* y *ZnS lenses + High Stability Temperature Controller* (Figura 12). Con este equipo se han analizado cualitativamente las matrices obtenidas con la técnica del electrospinning para determinar los grupos funcionales que las componen. Gracias a estos accesorios los espectros se pueden adquirir sin necesidad de preparar las muestras en pastillas.



**Figura 12:** *Equipo FTIR 4100 Jasco que opera en modo ATR (reflexión total atenuada).*

El espectro IR de un compuesto no es más que una representación gráfica de la absorción que tiene lugar en la región infrarroja del espectro en función de la frecuencia de la radiación. Para poder cuantificar la cantidad de radiación absorbida se determina el porcentaje de transmitancia. La identificación de los grupos funcionales se realiza basándose en que cada uno de ellos tiene una absorción característica para una longitud de onda determinada. [17]

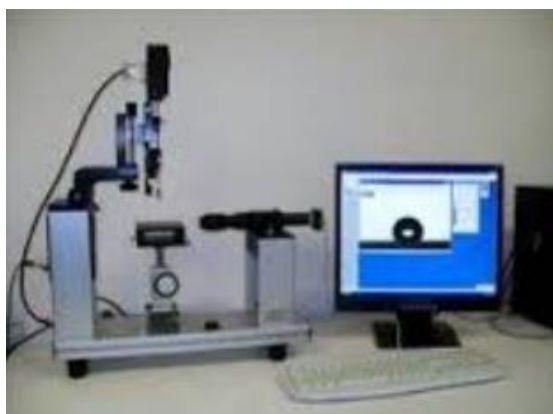
Para obtener los espectros FTIR de las matrices de fibras se procedió de la siguiente forma:

- [1] Poner en marcha el ordenador y el equipo de IR.
- [2] Abrir el ATR siguiendo las instrucciones y limpiar con un poco de acetona el cristal de zafiro y el soporte de diamante por la existencia de posibles residuos.

- [3] Abrir el programa Spectra-measurement, poner las condiciones en las que queremos trabajar y hacer una línea base (background). Rutinariamente, los espectros FTIR son recogidos en el rango de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , y cada espectro corresponde al espectro promedio de 32 barridos.
- [4] Si la línea base es correcta procedemos a poner la muestra entre el soporte y el cristal y obtener el espectro. Si no es correcta repetimos desde el punto 2 en adelante.
- [5] Repetimos el punto 4 para cada muestra.

## 4.10. Ángulos de contacto

*DataPhysics OCA 15plus* (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany) (Figura 13) ha sido el equipo utilizado para medir los ángulos de contacto. Los ángulos de contacto dan información sobre la mojabilidad de la superficie del material, en nuestro caso se refiere a la característica superficial de la matriz de fibras. Si el solvente que se utiliza para realizar la medida es acuoso, en general se puede indicar que ángulos  $> 90^\circ$  indican que la superficie es hidrofóbica, y ángulos  $< 90^\circ$  corresponde a superficies hidrofílicas.



**Figura 13.** *Equipo DataPhysics OCA 15plus para medir los ángulos de contacto*

Para la obtención de los ángulos de contacto se procede a analizar la gota aceptamos que tanto ésta es simétrica respecto a un eje vertical como que las únicas fuerzas que afectan a la forma de la gota son la gravedad y la tensión superficial. Los ángulos de contacto son medidos ajustando una expresión matemática a la forma de la gota, calculando el ángulo entre la recta tangente de la gota y la superficie de la muestra. [18]

Las medidas de los ángulos de contacto fueron realizados de la siguiente forma:

- [1] Colocar la jeringa en el equipo, cargada previamente con nuestro solvente.
- [2] Colocar nuestra muestra de matriz sobre una soporte circular metálico, fijándola con cinta adhesiva para que quede lo más plana posible.

- [3] Abrir el programa *SCA20* e introducir los parámetros referentes al solvente utilizado (básicamente, tipo de solvente), así como la manera que queremos que la gota sea dispensada en la muestra (p.e., de manera rápida), y volumen de la gota (p.e., 0.5  $\mu\text{L}$ ).
- [4] Colocar el soporte en la base del equipo y con la ayuda de la imagen que vemos en la pantalla procedente de la cámara, ajustar la aguja para que quede visible y centrada.
- [5] Para dispensar las gotas, acercamos la base del equipo hasta que el soporte metálico casi toque la aguja e inmediatamente separarlo para que la gota quede adherida a la muestra.
- [6] Calcular el ángulo con ayuda del programa
- [7] Repetir los puntos 5 y 6 para cada gota. Para cada muestra se requieren 15 medidas independientes, las cuales son promediadas para el análisis.
- [8] En este PFC se ha evaluado la superficie de la matriz usando como líquido de contacto agua, y suero fetal bovino (FBS), el cual siendo de naturaleza acuosa contiene diversos componentes hidrofóbicos y es un medio fisiológico.

## 4.11. UV-Vis

El espectrómetro *UV-Vis SHIMADZU UV-3600* de doble haz (Figura 14) ha sido el equipo utilizado para la obtención de los espectros. El hecho de ser un equipo de doble haz permite operar con dos cubetas, una de las cuales es usada como referencia y en la otra se realiza la medida de la muestra sustrayendo el valor de la referencia.



**Figura 14.** Espectrofotómetro UV-Vis de doble haz (modelo UV-3600, Shimadzu).

Esta técnica se basa en la absorción de energía correspondiente a una longitud de onda ( $\lambda$ ) que se encuentra dentro del rango de luz ultravioleta (190 a 350 nm) y visible del espectro electromagnético (350 a 780 nm). La absorción selectiva de la radiación produce el espectro resultante que proporciona información fundamental para la determinación de las propiedades del material, estructura y composición química.

En este proyecto los espectro UV-Vis de los extractos de las plantas medicinales fueron usados para su caracterización porque pueden representar un “fingerprinting” o “huella dactilar”, de tal manera que se pueden establecer bandas características de absorción las cuales pueden permitir su seguimiento durante otros experimentos (p.e., en los

experimentos de liberación). Es sobreentendido, que los espectros de absorción permiten la cuantificación de las especies químicas con bandas características puesto que los espectros de absorción son dependientes de la concentración.

Para obtener los espectros de absorción se ha procedido de la siguiente forma:

- [1] Encender ordenador y equipo. Se requiere un tiempo de 15-30 min para conseguir que las lámparas emitan una energía constante.
- [2] Abrir el programa *UVProbe-Spectrum* e introducir las condiciones en las que queremos trabajar.
- [3] Llenar las dos cubetas con nuestro disolvente para hacer la línea base. Enseguida se recoge un espectro, que si las cubetas están limpias y el solvente es estable, el espectro corresponde a una línea continua constante con valor 0 absorbancia.
- [4] A continuación, la cubeta posterior se deja como referencia para la medida de la absorbancia en las muestras.
- [5] Colocar la primera muestra y realizar el espectro. Vigilar siempre que quede bien cerrado.
- [6] Sacar la cubeta, vaciar el contenido, limpiar con etanol o acetona, y luego aclarar con el disolvente
- [7] Llenar la cubeta con la siguiente muestra y repetir los puntos 5 y 6. Hasta completar la serie de medidas.
- [8] Guardar los resultados en el servidor y apagar el equipo.

## 4.12. Cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina (TLC) es un procedimiento que se utiliza para separar moléculas relativamente pequeñas. Al igual que otras cromatografías, consiste de una fase estacionaria y una fase móvil y el principio es el mismo: la sustancia de interés se adherirá a la fase estacionaria y se moverá con la fase móvil, viajando una distancia que es inversamente proporcional a su afinidad por la fase móvil (Figura 15). La fase estacionaria en nuestro caso será de silicato activado depositado sobre una película de aluminio. Este silicato activado permite la visualización de componentes fluorescentes cuando la placa de cromatografía es expuesta a la radiación UV ( $\lambda=312$  nm).

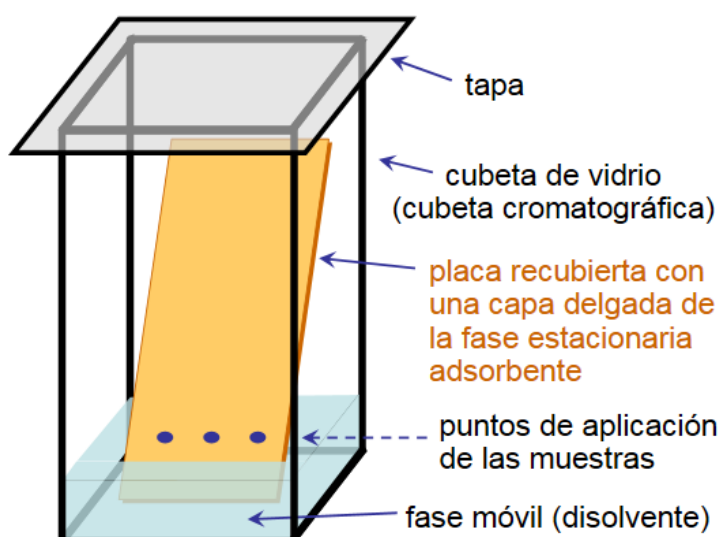
En los extractos de plantas es frecuente la detección de pequeñas moléculas como son los fenoles, flavonoides, alcaloides, etc. Estas moléculas corresponden a los denominados metabolitos secundarios, que frecuentemente son detectados de manera cualitativa usando TLC [19, 20]. Para separar estos compuestos se han utilizado dos fases móviles:

- N-Butanol: Ácido Acético y Agua (6:2:1). Esta fase móvil permite separar alcaloides. La placa de TLC se revela con exposición a la luz UV, y los alcaloides son identificados por una coloración violeta o anaranjada fluorescente.

- Benceno: Ácido Acético: Agua (6: 3.5:1). Esta fase móvil permite separar flavonoides. La placa de TLC se revela con exposición a la luz UV, y los flavonoides son identificados por la emisión de fluorescencia blanca.

Para la realización de la TLC se realizó el siguiente procedimiento:

- [1] La placa fue recortada con tijeras de acuerdo al tamaño de la cubeta cromatográfica. Siempre se ha de trabajar con guantes para evitar la contaminación de la placa de TLC.
- [2] Hacer una marca con lápiz a un centímetro del borde inferior de la placa, y otra marca a 10 cm arriba de la marca inferior. Servirán de guía para colocar las muestras y para saber hasta dónde dejar correr la cromatografía (frente cromatográfico).
- [3] Colocar 5  $\mu$ L de cada extracto sobre la placa a la altura de las marcas hechas con el lápiz. Mantener una separación de aproximadamente 1cm entre los diferentes extractos. Cada extracto fue identificado con un número.
- [4] Dejar secar las muestras a temperatura ambiente o en estufa a 37 °C durante unos 15 min.
- [5] Colocar las placas en la cubeta de vidrio con solvente. El solvente debe tener menos de 1 cm de profundidad para que no entre en contacto directo con las muestras. Tapar la cubeta para evitar la evaporación del solvente.
- [6] Dejar que el solvente suba por capilaridad hasta unos 10 cm del punto de partida de las muestras.
- [7] Retirar la placa del tanque y dejar secar.
- [8] Exponer la placa a luz UV, y observar el color de las manchas.



**Figura 15.** Representación esquemática de la cromatografía en capa fina (TLC).

### 4.13. Análisis termogravimétrico (TGA)

Con el análisis termogravimétrico se detectan los cambios de peso que tienen lugar en una muestra sometida a un determinado tratamiento térmico. Los experimentos pueden realizarse midiendo el cambio de peso de la muestra al aumentar la temperatura a una velocidad constante (análisis dinámico), o bien manteniendo constante la temperatura y midiendo los cambios que ocurren a lo largo del tiempo (análisis isotérmico).

Los cambios de peso (fundamentalmente pérdidas) que se producen en la muestra durante el experimento, pueden ser debidos a varias causas, implicando cada una de ellas un tipo de estudio diferente y una información específica de la muestra. Dentro de los estudios más importantes que pueden llevarse a cabo mediante el análisis termogravimétrico se puede citar: control de calidad, efectos de aditivos, estabilidad térmica en atmósfera inerte, oxidación en aire o en atmósfera rica en oxígeno, degradación térmica, estudio de la cinética de degradación, análisis de los productos producidos, etc.

En el caso de los polímeros, el análisis de TGA representa una forma fácil y rápida de estudiar la estabilidad térmica de los polímeros y puede ser utilizada para conocer las posibilidades de transformación por encima de la temperatura de fusión del polímero.

El análisis de estabilidad térmica se estudió a una velocidad de calentamiento de 2 °C·min<sup>-1</sup> con muestras de aproximadamente 5 mg en un analizador termogravimétrico Q50 de TA Instruments y bajo un flujo de nitrógeno seco. El análisis fue realizado en el intervalo de temperatura de 50 a 600 °C..

### 4.14. Liberación

El estudio de liberación fue realizado con las matrices cargadas con los extractos que mostraron efectos inhibitorios del crecimiento bacteriano y en el crecimiento de líneas celulares, los cuales corresponden a los ensayos biológicos que se describen en las siguientes secciones de este PFC.

El medio utilizado para la liberación fue PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) suplementado con 0.01% de azida de sodio para evitar el crecimiento microbiano. Para cada matriz se evaluaron 3 muestras con pesos entre 10-20 mg. Cada muestra de matriz fue colocada en un tubo de 15 mL y se añadieron 10 mL de medio de liberación. Los tubos fueron mantenidos en agitación a 80 rpm y 37 °C. En los tiempos determinados, el procedimiento a seguir fue extraer 1 mL de cada tubo y seguidamente añadir 1 mL de medio de liberación, con la finalidad de mantener constante el volumen a lo largo de todo el experimento.



Al finalizar el experimento, la cantidad de extracto que quedó retenido en las muestras (extracto no liberado) fue cuantificado. Para ello, se procedió a aspirar el medio de liberación de los tubos, y las muestras fueron secadas en una estufa a 37 °C durante toda la noche. Luego, a cada tubo se añadieron 400 µL de cloroformo y se agita bien para que la matriz se disuelva. A continuación se añade 1 mL de etanol para que se produzca la precipitación del polímero, y los componentes del extracto queden retenidos en la fase etanólica. Finalmente, el contenido de los tubos fue trasvasado en tubos eppendorf, los cuales fueron centrifugados a 12000 rpm durante 10 min.

Para cuantificar la cantidad de extracto liberado desde las matrices y la parte retenida, se realizaron barridos UV-Vis en modo absorbancia. El valor de absorbancia en una longitud de onda característica del extracto fue usado para la cuantificación. Los resultados fueron analizados como porcentajes de liberación en función del tiempo.

## 4.15. Rayos X

Esta técnica es utilizada para determinar el grado de cristalinidad, aunque en concreto la difracción de rayos X permite definir la orientación de las zonas cristalinas, y calcular las dimensiones de la red difractante.

En la difracción de rayos X, cuando se hace incidir sobre un cristal un haz de rayos X, supuesto monocromático de longitud de onda  $\lambda$ , se comprueba que a la salida del cristal el haz se escinde en varios rayos difractados, que se dispersan en abanico; ésta es la experiencia de Laue. Este fenómeno de difracción se explica por el hecho de que en la longitud de onda de los rayos X, siendo del orden del angström ( $\text{Cu}_{K\alpha 1}=1.540 \text{ \AA}$ ), se producen interferencias entre los rayos difundidos por los átomos o los iones del cristal que están separados entre sí por algunos angstroms. La onda total difundida en una dirección es la resultante de las ondas procedentes de las fuentes coherentes que constituyen todos los átomos del cristal.

Se deduce que un cristal da origen a haces difractados en direcciones bien definidas. Para determinar estas direcciones, basta señalar que las ondas elementales difundidas por dos átomos diferentes del cristal están en fase. Esto conduce, en el caso de las ondas difundidas por una familia de planos reticulares, a la relación de la Ley de Bragg:

$$2d_{hkl}\sin\theta=n\lambda$$

donde  $n$  es el orden de la difracción y debe corresponder a un número entero positivo,  $d$  es el espaciado interplanar,  $\theta$  es el ángulo de incidencia del haz sobre la familia de planos reticulares considerada, y  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación. Los índices  $hkl$

son los planos cristalográficos denominados índices de Miller, que son el inverso de la distancia al origen de coordenadas en unidades  $a$ ,  $b$ ,  $c$ .

Las magnitudes  $a$ ,  $b$  y  $c$ , junto con  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  constituyen los parámetros de red de la celdilla unitaria, que es la estructura más pequeña que contiene la simetría del cristal. Los datos experimentales que proporciona la difracción de rayos X, junto con los conocimientos de simetría molecular y cristalografía permiten obtener información sobre la estructura cristalográfica de los polímeros semicristalinos.

Los diagramas de difracción de las muestras se registraron con un difractómetro *Bruker D8 Advance* con radiación  $\text{Cu}_{K\alpha}$  ( $\lambda=0.1542$  nm) y la geometría de Bragg-Brentano, theta-2theta. Se empleó un detector unidimensional *Lynx Eye*. Las muestras se operaron a 40 kV y 40 mA, con un rango de 2-theta de  $2^\circ$ - $40^\circ$ , midiendo con pasos de  $0,02^\circ$ , y el tiempo/paso de 2 a 8 segundos. Los perfiles de difracción se procesaron con el software *PeakFit v4* (Jandel Scientific Software).

## 4.16. Ensayos biológicos

### 4.16.1. Ensayo de Inhibición del crecimiento bacteriano

Para evaluar la actividad antibacteriana de las matrices de nanofibras cargadas con los extractos de plantas medicinales se realizó el ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano en placa de agar. Este ensayo fue realizado con las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, del tipo Gram-negativa y Gram-positiva respectivamente.

Para la realización de este ensayo se cortaron piezas de 1cm x 1cm de cada una de las matrices. Las placas de agar LB fueron sembradas con la bacteria correspondiente usando un hisopo estéril de dracón por el método de estrías en escoses para extender de manera homogénea las bacterias sobre toda la superficie de la placa. En cada placa se colocaron 6 muestras distribuidas de manera equidistantes en forma de hexágono. Así, en cada placa se colocó la muestra de matriz control que corresponde a las fibras de PLA sin carga, y las otras muestras fueron de las matrices de fibras de PLA cargadas con los diferentes extractos. Finalmente, se prepararon 3 placas por cada bacteria. Se aseguró la estanqueidad con Parafilm y se dejaron 24h en una estufa a  $37^\circ\text{C}$  en posición invertida para evitar el desecamiento del agar y mantener la humedad dentro de la placa.

Además, se realizó la evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos de las plantas, con la finalidad de contrastar el efecto de las matrices cargadas con los respectivos extractos. Para ello, los extractos fueron absorbidos en piezas de papel de filtro de

1cmx1cm, las piezas fueron secadas al aire en una cabina de gases durante 30. Como control se aplicó la mezcla de cloroformo/acetona (2v/1v). Luego se realizó el mismo procedimiento empleado para evaluar las matrices de fibras, tal como se ha descrito en el párrafo anteriormente.

Finalmente, las placas fueron evaluadas a las 24 horas de su siembra con las bacterias. El efecto de inhibición del crecimiento bacteriano fue determinado cuando se formó alrededor de la muestra un halo de inhibición, el cual corresponde a una zona circular donde no se encuentran colonias de bacterias, siendo ello indicativo de un efecto antibacteriano producido por los extractos que han difundido de manera radial desde la muestra al medio. Para registrar este efecto las placas fueron fotografiadas.

#### **4.16.2. Ensayo de citotoxicidad usando líneas celulares**

El cultivo de células inmortalizadas y células cancerígenas o tumorales es una metodología que permite tener de forma continua células. Estas células pueden sufrir muerte y/o daño celular cuando son expuestas a sustancias citotóxicas. La muerte de estas células ocurre por necrosis puesto que su programa de muerte celular o apoptosis no es funcional. El uso de estas líneas celulares es con la finalidad de evitar o disminuir el número de animales sacrificado para realizar ensayos de toxicidad celular o citotoxicidad.

Para este estudio se utilizaron células VERO, MCF-7, COS-1, MRC-5, PNT2 y PC-3. Las células fueron cultivadas en Dulbecco medio Eagle modificado (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire. El medio de cultivo se cambió cada dos días y, para el subcultivo, las monocapas celulares se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y fueron tripsinizadas por incubación con tripsina-EDTA (0,25%) durante 2-5 min a 37 °C. La actividad de la tripsina fue detenida añadiendo medio de cultivo para obtener una suspensión celular.

Seguidamente se determinó la concentración de células en la suspensión por conteo celular directo usando el colorante vital azul de trypan al 4% para diferenciar células vivas de células muertas. Este colorante penetra en las células muertas y las colorea de azul. El principio de esta tinción superficial corresponde a la estabilidad de la membrana celular, las células muertas tienen la membrana celular dañada y permiten la penetración del colorante al interior citoplasmático.

Para este ensayo, las muestras de matrices de fibras fueron pegadas a la placa de cultivo mediante silicona biocompatible. Piezas de 1cm x 1cm de matriz fue colocada en cada pocillo de placas de cultivo de 24 pocillos, dejando siempre la primera columna como control. En las columnas restantes se colocaron cuatro piezas de una misma matriz (de

esta forma tendremos cuatro repeticiones por cada matriz y para cada tipo de línea celular). Antes, de iniciar el cultivo, las placas preparadas con las muestras fueron irradiadas durante 30 min con luz UV dentro de la cabina de flujo laminar.

Seguidamente las muestras fueron sembradas con  $2 \times 10^4$  células (20  $\mu\text{L}$  de células en cada muestra/pocillo). Luego la placa fue incubada durante 30 min, y seguidamente, 1 mL de medio de cultivo fue añadido a cada pocillo y las placas fueron incubadas en condiciones de cultivo (5%  $\text{CO}_2$  y 95% aire a 37 °C) durante 24h. Transcurrido este tiempo de cultivo, se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de reactivo MTT en cada pocillo y se volvieron a colocar en la incubadora durante 2-3 horas, luego se aspiró el medio de cada uno de los pocillos, el mismo que fue desechado. Finalmente, se añade a los pocillos 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla DMSO (Dimetilsulfóxido)/ Metanol/ Agua (20/70/10 en volumen), la placa se agita suavemente de manera manual durante 15 minutos para revelar el reactivo MTT que haya reaccionado con las células viables. Luego, el contenido de cada pocillo fue trasvasado a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Estas placas fueron leídas en un lector ELISA cuantificando la absorbancia a 570 nm.

El ensayo de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro) es usado para determinar la viabilidad celular. Las células viables contienen deshidrogenasas que convierten el reactivo MTT (de color amarillo) en una sal de formazán (de color azul o violeta). Esta transformación del MTT se evidencia por la aparición intracelular de microcristales. La formación de formazán es cuantificable cuando los cristales son disueltos y se realiza lectura de absorbancia a 570 nm. Así, el número de células viables es directamente proporcional a la absorbancia a 570 nm.

Los resultados de absorbancia a 570 nm fueron procesados en una hoja de cálculo. La viabilidad celular fue expresada de manera relativa al control que corresponde al cultivo de las células en los pocillos sin ningún material (TCPS o placa de cultivo de tejidos). Los valores obtenidos para cada muestra de la misma matriz fueron promediados y graficados. Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) fueron establecidas por análisis estadístico usando el software OriginPro v 10.0 (Origin Microcal, USA).

## 5. Resultados

### 5.1. Preparación y Caracterización de los extractos

#### 5.1.1. Preparación de los extractos

La emergente resistencia de los microorganismos a los antibióticos y los riesgos toxicológicos asociados al incremento de las dosis antibióticas usadas en el tratamiento de infecciones nosocomiales y en la comunidad ha abierto el camino a la exploración de nuevas drogas antimicrobianas dentro de la investigación de la fitoterapia. Por otro lado, la expansión de la medicina alternativa y homeoterapia (homeopatía) como método terapéutico justifica el interés en identificar y evaluar compuestos antimicrobianos contenidos en extractos de plantas medicinales como una nueva fuente de drogas y aproximaciones de tratamientos alternativos.

En este proyecto se han estudiado 14 extractos alcohólicos preparados a partir de 11 plantas de uso en la medicina tradicional del Perú (Sudamérica). En la Tabla 2 se indica el nombre científico y nombre común de las plantas, la parte de las plantas usadas para la preparación de los extractos y algunos de los usos tradicionales u homeopáticos. Asimismo, se introduce una abreviatura de los extractos para su manejo simplificado en la elaboración de este proyecto; por ejemplo, las abreviaturas BO-I y BO-s corresponden a los extractos de *Bixa orellana* preparados a partir de hoja y semilla, respectivamente. En la Figura 16 se muestran imágenes de las 11 plantas usadas para la preparación de los extractos.

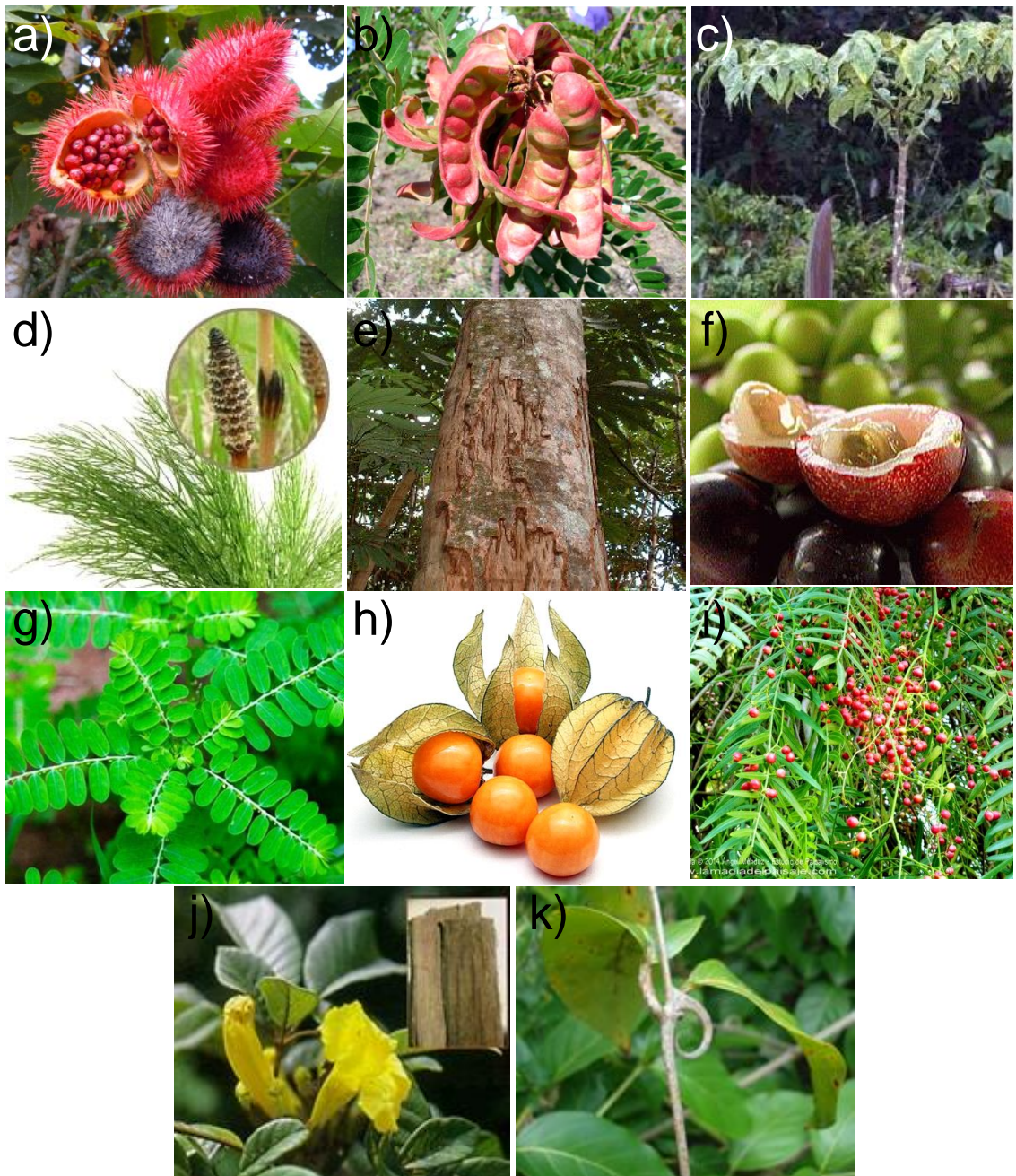
En todos los casos los extractos de las plantas correspondieron a preparaciones etanólicas. Para esto, las partes seleccionadas de las plantas fueron cortadas en pequeñas piezas, luego ellas fueron sumergidas en etanol absoluto (1:2, w/v; p.e. 25 g de material vegetal fue extraído en 50 mL de etanol absoluto) manteniendo los frascos herméticamente cerrados y protegidos de la luz (envueltos en papel de aluminio) durante 10 días a temperatura ambiente (20-22 °C, aprox.). Luego, las mezclas fueron filtradas usando papel de filtro Whatman N° 4, y los filtrados se evaporaron a 50 °C en rotavapor hasta obtener un material seco de aspecto viscoso y gomoso [21, 22]. Finalmente, todos los extractos se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Para iniciar la caracterización y preparación de las fibras cargadas con los extractos de las plantas. El material seco (que correspondió a un extracto de 25 g de material vegetal) obtenido anteriormente se resuspendió en 20 mL de la mezcla cloroformo/acetona (2v/1v),

**Tabla 2.** *Plantas medicinales (origen Perú) usadas para la preparación de los extractos etanólicos.* Se describe el nombre científico y el nombre común, la parte vegetal utilizada y su uso tradicional. La abreviatura corresponde a los acrónimos utilizados para identificar cada extracto en este trabajo.

Nombre científico	Nombre común	Extracto	Abreviatura*
<i>Bixa orellana</i>	Achiote	leaf	BO-l
	Achiote	seed	BO-s
<i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze	Tara	fruit	CS
	Tara	seed	CS-s
	Tara	seedpod	CS-sp
<i>Dracotium loretense</i>	jergon sacha		DL
<i>Equisetum arvense</i> L	Cola de Caballo (horsetail)	herbal	EA
<i>Maytenus macrocarpa</i>	Chuchuhua si	bark	MM
<i>Myrciaria dubia</i>	Camu-camu	fruit	MD
<i>Phyllanthus niruri</i>	Chancapied ra (crushed stone)	herbal	PN
<i>Physalis peruviana</i> L	Aguaymant o (water and mantle)	fruit	PP
<i>Schinus molle</i>	Molle	stalk	SM
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	Tahuari	bark	TI
<i>Uncaria tomentosa</i> L.	Uña de gato (cat's claw)	bark	UT

\*Utilizada en este proyecto



**Figura 16.** Imágenes de las plantas medicinales usadas en la obtención de los extractos. *Bixa orellana* “Achiote” (a), *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “Tara” (b), *Dracotium loretense* “jergon sacha” (c), *Equisetum arvense* L “Cola de Caballo (horsetail)” (d), *Maytenus macrocarpa* “Chuchuhuasi” (e), *Myrciaria dubia* “Camu-camu” (f), *Phyllanthus niruri* “Chancapiedra (crushed stone)” (g), *Physalis peruviana* L “Aguaymanto (water and mantle)” (h), *Schinus molle* “Molle” (i), *Tabebuia impetiginosa* “Tahuari” (j), *Uncaria tomentosa* L. “Uña de gato (cat’s claw)” (k).

la cual corresponde al sistema de solvente que se usa para preparar las fibras por electrospinning. El material fue resuspendido de manera vigorosa por agitación en vortex. Finalmente, filtrado en un papel analítico N°1, y el extracto fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

## 5.1.2. Caracterización de los extractos

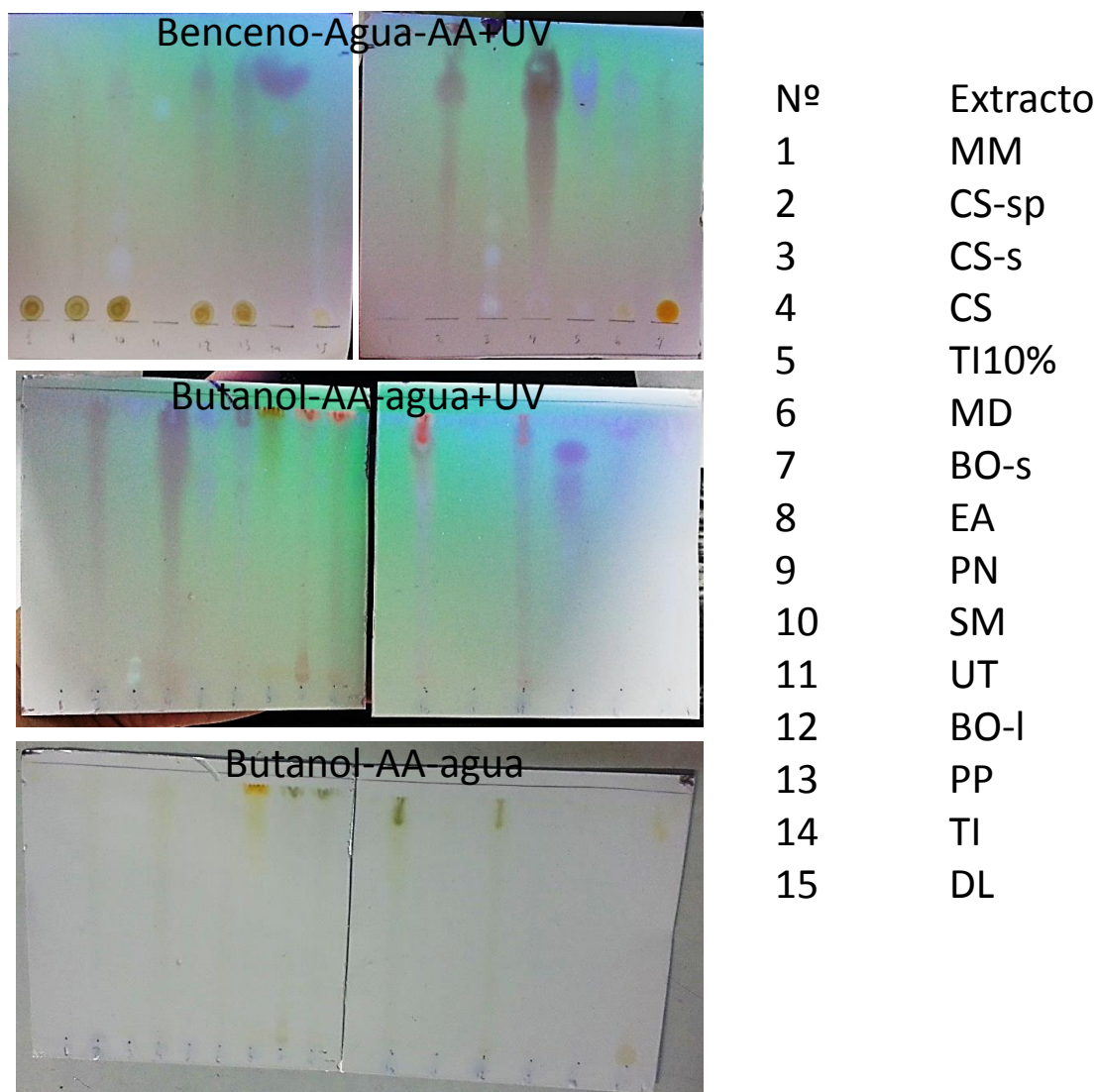
### 5.1.2.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina fue usada como método analítico que permite determinar de manera cualitativa los principales grupos de moléculas que contienen los diferentes extractos. Así, este estudio fitoquímico ha permitido detectar en placa de silica activada por luz UV de 254 nm moléculas como alcaloides, flavonoides, terpenos, etc. En la Fig 17 se muestra un cromatograma obtenido para los extractos y en la Tabla 3 se resumen los resultados cualitativos sobre la presencia o ausencia de las moléculas bioactivas contenidas en los extractos.

**Tabla 3.** Principales grupos de moléculas fitoquímicas encontradas en los extractos.

Extractos	Metabolitos secundarios		
	Alcaloides	Flavonoides	Fenoles
BO-I	+	-	-
BO-s	+	-	-
CS	+	-	-
CS-s	-	+	-
CS-sp	+	-	-
DL	-	+	-
EA	-	-	+
MM	-	-	-
MD	+	-	-
PN	-	-	+
PP	+	-	-
SM	+	+	-
TI	+	-	-
UT	-	+	-





**Figura 17.** Cromatograma en capa fina de silica de los extractos de plantas medicinales.

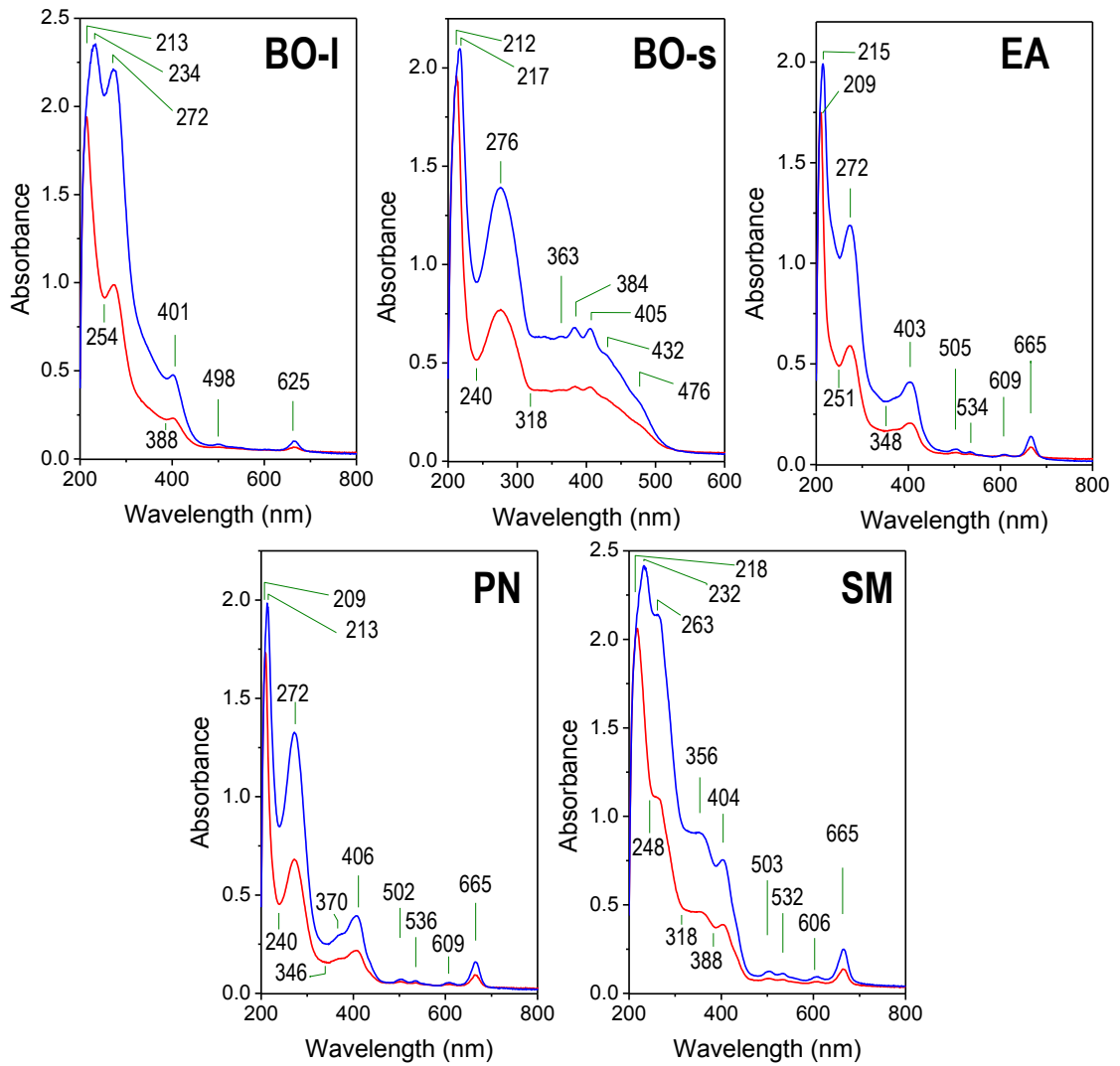
### 5.1.2.2. Características espectrales UV-Vis de los extractos

En general, los espectros UV-Vis de las moléculas pueden ser utilizados para su identificación puesto que estos pueden ser considerados como “finger-printing” o huellas moleculares características y se corresponden a estados vibracionales propios de la distribución electrónica en las moléculas. Así, los espectros de absorción UV-Vis son aplicados con fines cualitativos y cuantitativos.

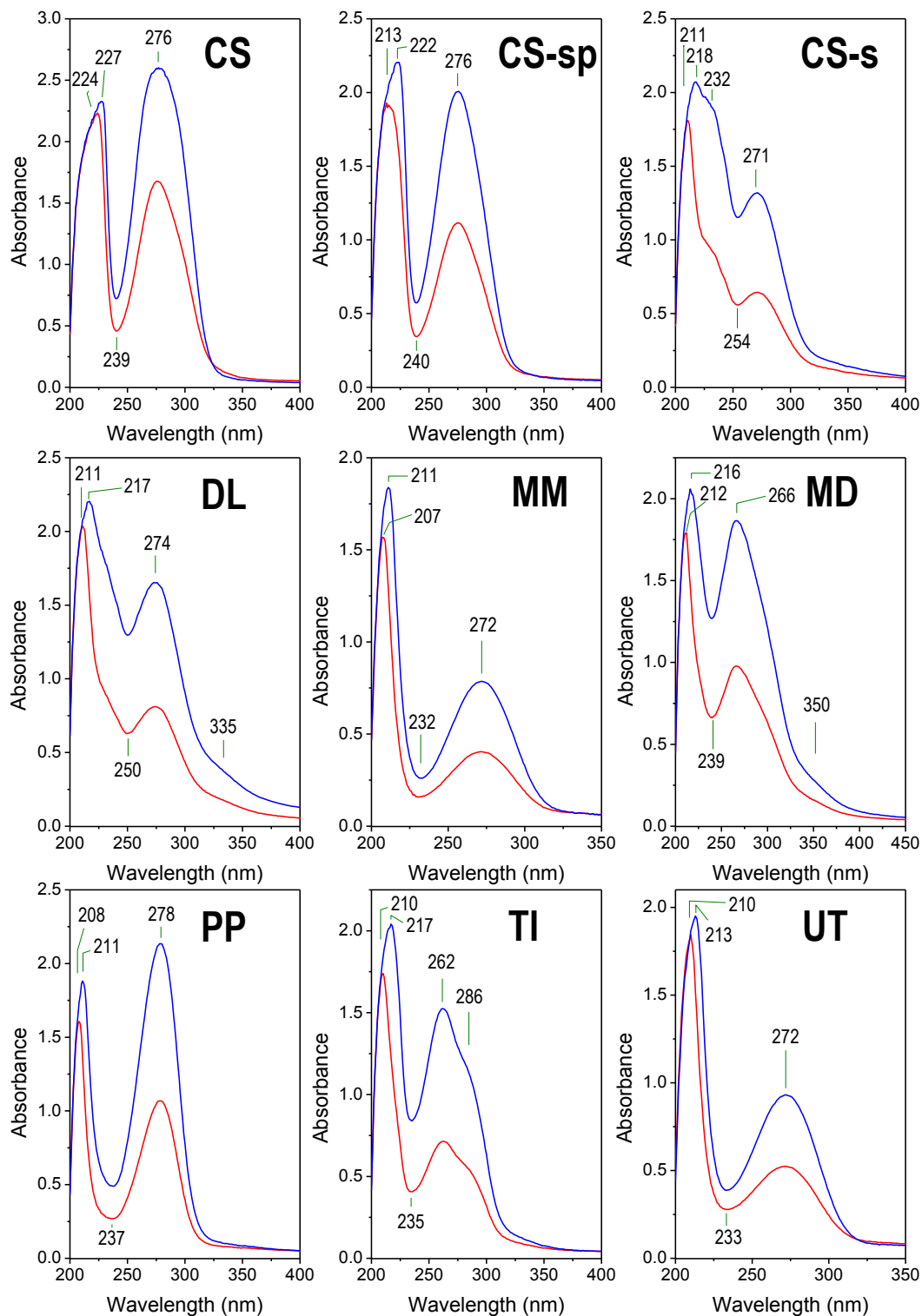
Los espectros UV-Vis de los extractos fueron registrados con la finalidad de obtener sus bandas de absorción características. Para un mejor análisis comparativo los espectros de absorción obtenidos fueron clasificados en dos grupos dependiendo de la longitud de onda en la que presentan las bandas de absorción. En la Figura 18 se muestran agrupados los extractos que presentan bandas de absorción tanto en el espectro visible como en el UV, y en la Figura 19 se muestran los espectros de absorción para los extractos que solo presentan bandas en la región del UV. Las bandas de absorción en el espectro visible corresponden a la presencia de grupos cromogénicos, lo cual en el caso de los vegetales dada su pigmentación corresponden a un grupo importante de moléculas. Por otro lado, las bandas de absorción en el UV se corresponden frecuentemente a las estructuras moleculares cíclicas o anillos.

Los pigmentos fotosintéticos en disolución muestran espectros de absorción característicos. Así, la clorofila tiene un espectro con dos bandas en el visible, la clorofila-a tiene un  $\lambda_{430 \text{ nm}}$  (azul) y otro  $\lambda_{662 \text{ nm}}$  (rojo), y de manera similar la clorofila-b con  $\lambda_{453 \text{ nm}}$  (azul) y  $\lambda_{642 \text{ nm}}$  (naranja). Mientras que los carotenoides tienen 2 máximos en la región del azul,  $\lambda_{442 \text{ nm}}$  y  $\lambda_{472 \text{ nm}}$ . La ficocianina corresponde a una banda amplia que se extiende del rojo al azul, con un  $\lambda$  máximo a 605 nm. Finalmente, el espectro de la ficoeritrina se extiende desde el naranja al azul, pero tiene 2  $\lambda$  máximos a 570 nm (amarillo) y 525 nm (verde). Teniendo en cuenta estas características espectrales para los pigmentos fotosintéticos se puede indicar que los extractos preparados carecen de ellos o podrían estar contenidos de manera mínima en los extractos (Figura 17).

En general, los extractos presentan una banda absorción importante en la región del azul-violeta con  $\lambda$  máximo entre 401-406 nm y una banda en el ultravioleta con  $\lambda$  máximo entre 263-276 nm. Una observación comparativa a destacar es la diferencia entre los perfiles espectrales de los extractos de *Bixa orellana* preparados de hojas (BO-I) y de semilla (BO-S), lo cual estaría indicando una acumulación de diferentes metabolitos o moléculas en las partes de la misma planta.



**Figura 18.** Espectros de absorción de los extractos con bandas características en el espectro visible y UV. *Bixa orellana* (BO-I, BO-s), *Equisetum arvense* L (EA), *Phyllanthus niruri* (PN), *Schinus molle* (SM).



**Figura 19.** Espectros de absorción de los extractos con bandas características en el espectro visible y UV. *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze (CS, CS-sp, CS-s), *Dracotium lorentense* (DL), *Maytenus macrocarpa* (MM), *Myciaria dubia* (MD), *Physalis peruviana* L (PP), *Tabebuia impetiginosa* (TI), *Uncaria tormentosa* L (UT).

En la Figura 19 se muestran los espectros con bandas únicas en la región del UV. En general, el  $\lambda$  máximo se encuentra en el rango de 271 nm a 278 nm; sin embargo, se puede destacar los espectros de los extractos MD y TI que tiene el  $\lambda$  máximo a 266 nm y 262 nm, respectivamente. Además, el espectro del extracto TI es característico porque adicionalmente al  $\lambda$  máximo a 262 nm, se observa un hombro a 286 nm.

En las Figuras 18 y 19 se muestra para cada extracto dos espectros que corresponden a diferentes concentraciones del extracto o moléculas contenidas en los extractos. Claramente, se puede observar que los valores de absorbancia para estas curvas son proporcionales a la concentración de las muestras. Por ello, es factible calcular gráficamente el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ), lo cual permitiría usarlo como herramienta para el cálculo de la concentración de los extractos.

## **5.2. Electrospinning de PLA cargado con extractos de plantas medicinales.**

### **5.2.1. Parámetros para el electrospinning de PLA cargado con extractos.**

Para realizar con éxito el electrospinning (electrohilado) de cualquier polímero se han de tener en cuenta tres clases de parámetros: 1) de la disolución, 2) operacionales, y 3) ambientales. En la actualidad, existe abundante información sobre esta técnica y el número de publicaciones sobre electrospinning de polímeros biodegradables es muy extenso, en particular los relativos al grupo de los poliésteres, como p.e. el PLA.

Así, el PLA de alto peso molecular puede ser electrohilado en condiciones óptimas a partir de una disolución del 10 %-p/v preparada en una mezcla de cloroformo-acetona (2v:1v), y aplicando un potencial de 15 KV entre la aguja y colector separados por una distancia de 15 cm, siendo el flujo del polímero de 10-5 mL/h, con estas condiciones se obtienen fibras con diámetros de micras [23]. Manteniendo estas condiciones operacionales y tan solo reduciendo la concentración del polímero hasta 2.5-5 %-p/v, se pueden obtener nanofibras [24]. Estos trabajos fueron considerados como referencia para el actual PFC desde que fueron desarrollados en el mismo laboratorio.

En PFC actual, se planteó como objetivo la preparación de microfibras de PLA cargadas con extractos de plantas medicinales. Por ello, las disoluciones de PLA fueron preparadas al 10 %-p/v en cloroformo-acetona (2v:1v). En este sentido, como una primera tarea se trabajó en compatibilizar los extractos etanólicos de las plantas medicinales con la disolución de PLA. Los extractos etanólicos no pueden ser aditivados a la disolución de PLA debido a la característica general de los poliésteres de formar precipitado en presencia

de alcoholes. Por ello, los extractos etanólicos de las plantas medicinales fueron secados y solubilizados en cloroformo-acetona (2v:1v) como se describe en la sección 6.1.1. Finalmente, la disolución para electrohilar consistió de una mezcla de 8 mL de PLA al 10%-p/v y 2 mL de extracto (1.25 g/mL), y como parámetros operacionales iniciales para un sistema de electrospinning vertical, se fijó el potencial electrostático en 15 KV, la distancia aguja-colector a 15 cm y el flujo a 10 mL/h. Las fibras obtenidas fueron muestreadas y observadas en un microscopio óptico y de acuerdo a la morfología evaluada los parámetros operacionales fueron cambiados para mejorar la calidad de las fibras. En la Tabla 4 se muestran los mejores parámetros operacionales para cada muestra de las mezclas PLA-extracto.

**Tabla 4.** Parámetros operacionales usados para obtener microfibras a partir de las mezclas de PLA y los extractos de las plantas medicinales.

Muestra	Voltaje (KV)	Flujo (mL/h)	Aguja-Colector (distancia, cm)
PLA	15	5	15
BO-I	15	5	15
BO-s	28	5	15
CS	28	4	15
CS-s	28	5	15
CS-sp	15	5	15
DL	28	5	15
EA	15	5	15
MM	15	10	15
MD	28	5	15
PN	28	3	15
PP	15	5	15
SM	28	5	15
TI	15	5	15
UT	15	5	15

En la Tabla 4 se muestra que el parámetro conservado durante el electrospinning de las muestras de PLA-extracto fue la distancia aguja-colector (15 cm). Esto se explica porque este parámetro influye en la evaporación del solvente usado en la preparación de la

disolución del polímero. Así, esta distancia permite una adecuada evaporación de la mezcla cloroformo/acetona (2v/1v), lo cual permite obtener fibras secas sobre el colector. En lo referente al flujo de la mezcla, se observó que en general, las mejores condiciones fueron conseguidas con flujo lento de 5 mL/h, este parámetro obedece a la viscosidad de la disolución. Por ello, puede indicarse que los componentes de los extractos de CS y PN disminuyeron la viscosidad de la disolución y por ello la reducción del flujo a 4 y 3 mL/h, respectivamente. Por el contrario, el extracto MM incremento la viscosidad de la disolución y por ello se incrementó el flujo de la disolución a 10 mL/h para mantener la aguja llena y tener un cono de Taylor formado continuamente en la punta de la aguja. Finalmente, el parámetro del potencial electrostático fue el más variado, de este parámetro depende la formación del cono de Taylor, el cual obedece al reordenamiento de cargas de la disolución del polímero, tanto del polímero y el solvente, en la gota debe ocurrir un desbalance de las cargas hacia la repulsión y por ello se favorece el desplazamiento atractivo hacia el colector. Para el PLA sin extracto se requirió 15 KV para formar las fibras, y en muchos casos este potencial tuvo que ser incrementado hasta 28 kV. Esto significaría que estos extractos tienen componentes atractivos para las cadenas de PLA y en consecuencia la repulsión polímero-solvente se ve desfavorecida. Al respecto, es interesante comentar algunos casos como por ejemplo, los extractos BO-l y BO-s que requieren 15 y 28 KV, respectivamente; o el caso de CS, CS-s y CS-sp que requieren 28, 28 y 15 kV, respectivamente. En estos casos estamos observando extractos de una misma planta pero obtenidos de diferentes partes de la planta (p.e., hojas y semillas), con lo cual se podría esperar que los componentes de estos extractos no sean iguales o siendo iguales varíen en concentración. En ambas situaciones se puede esperar que el balance de fuerzas atractivas y repulsivas entre el polímero y el solvente cambie y en consecuencia también se cambie la fuerza electrostática del campo.

### **5.2.2. Morfología de las microfibras de PLA cargadas con extractos.**

Para establecer un claro análisis de la morfología de las fibras de PLA cargado con los diferentes extractos de las plantas medicinales, las muestras fueron procesadas para obtener imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM), tal como se muestra en la Figura 20. En general, en las imágenes a menor aumento se puede observar que los electrospun se corresponden a fibras distribuidas al azar, y con morfología cilíndrica en disposición rectilínea, con excepción de la muestra PLA-UT (Figura 20o) donde se observan fibras cilíndricas pero distribuidas de manera sinuosa. A mayor aumento se observan detalles superficiales de las fibras mostrándose que en la mayoría de ellas la superficie es lisa.

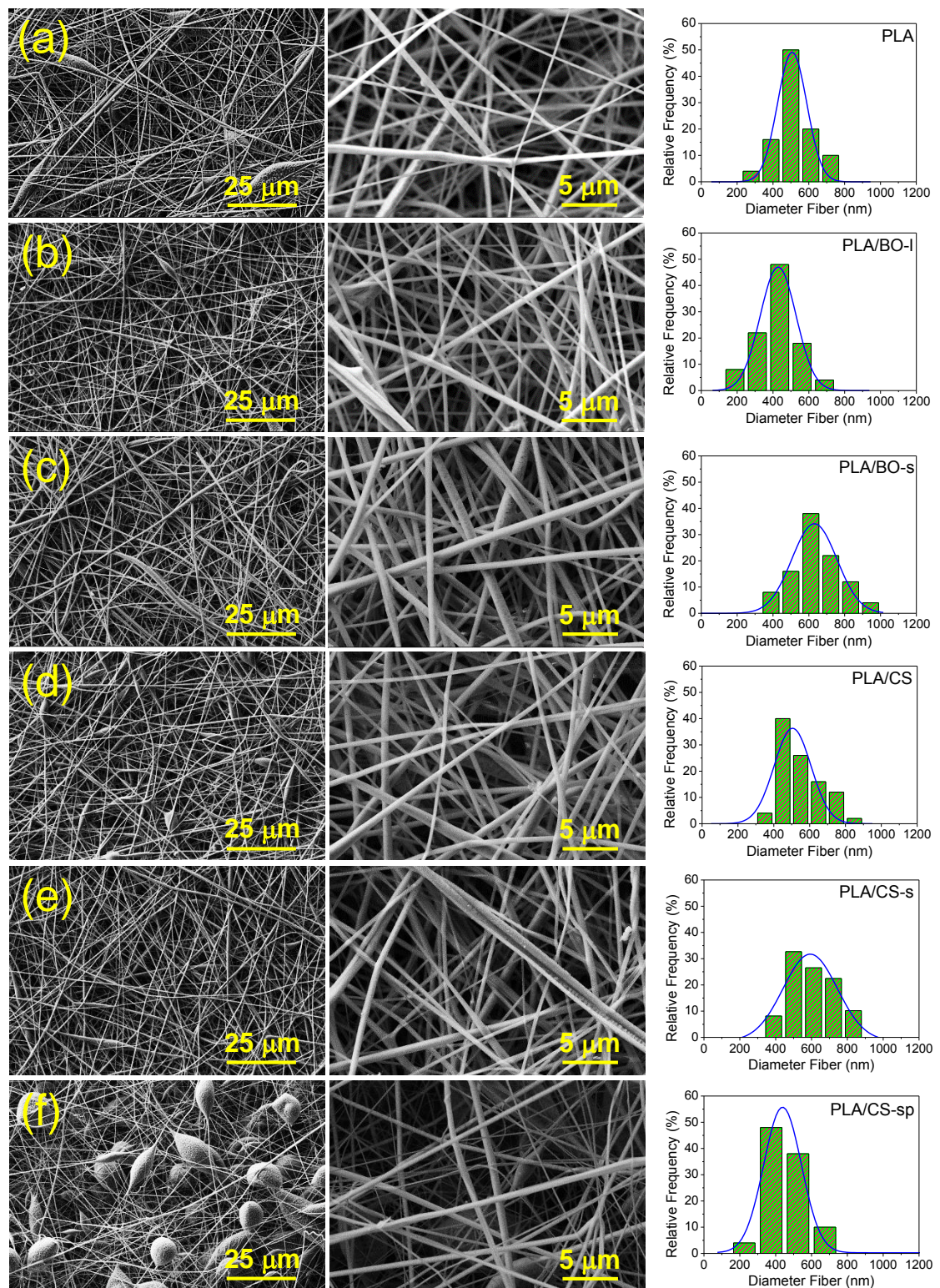
Como parte de la caracterización de las fibras se han medido los diámetros y en todos los casos las matrices de PLA cargadas con los extractos han presentado una distribución normal para la distribución de frecuencias de los diámetros, y estas distribuciones han podido ser ajustadas a un modelo Gaussiano (Figura 20).

La estadística descriptiva para las medidas de los diámetros se muestra en la Tabla 5. Para analizar los cambios en los diámetros de las fibras cargadas con los extractos se ha tomado como referencia la medida de diámetros en la matriz de PLA ( $519 \pm 15$  nm). En promedio se encuentran variaciones hacia fibras con menor diámetro tal como en el caso de PLA-PP ( $404 \pm 18$  nm), y hacia fibras con diámetro mayor tal como fue el caso de PLA-TI ( $799 \pm 31$  nm). Obviamente, estas variaciones en cuanto al diámetro de las fibras serían explicadas en base a las posibles interacciones de las moléculas contenidas en los extractos con el PLA. Estos resultados se muestran de manera gráfica en la Figura 21.

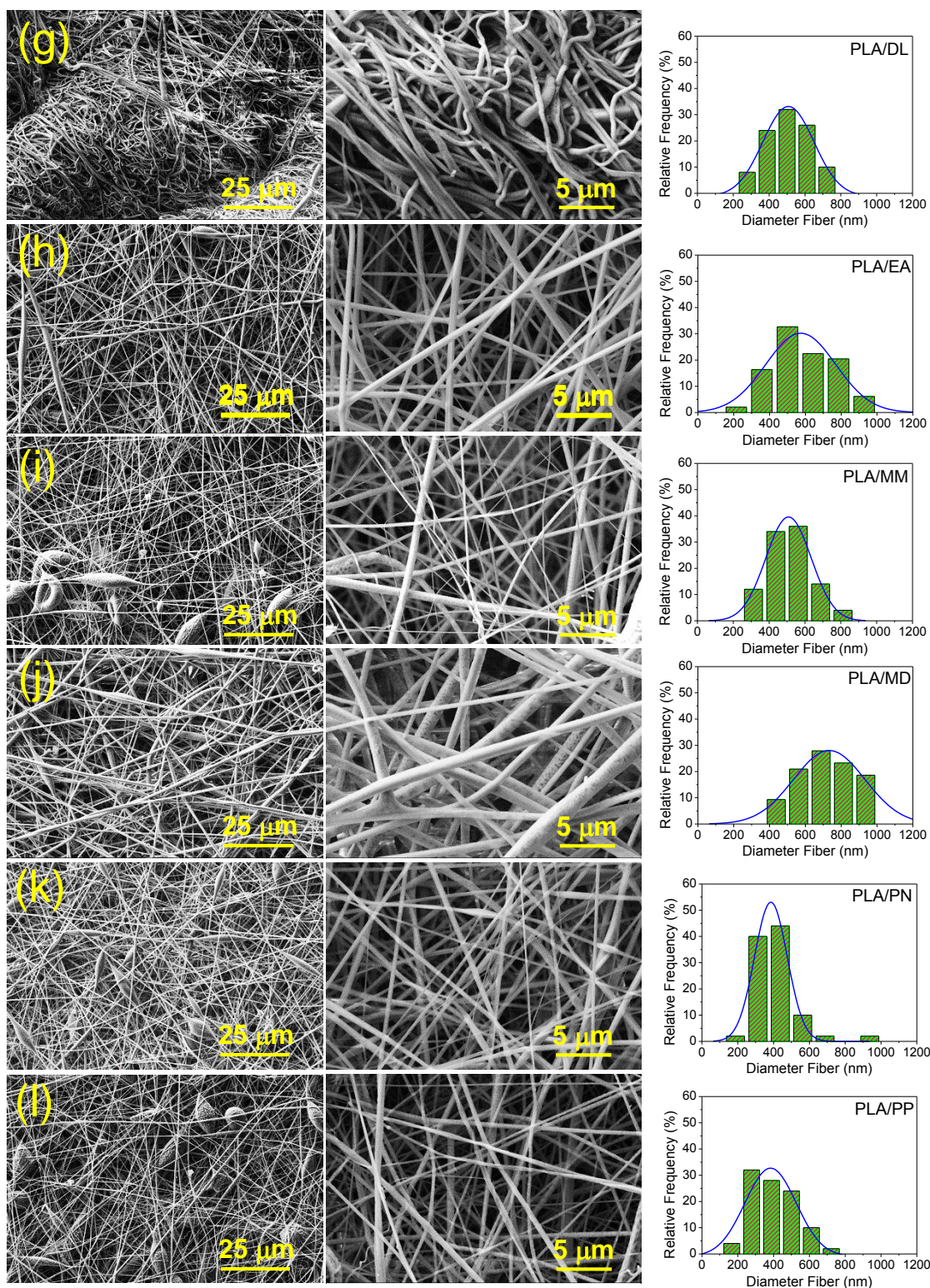
**Tabla 5.** Diámetros de las fibras de PLA cargadas con extractos. Valores extremos del intervalo de confianza al 95%, y kurtosis de la distribución.

Muestra	Promedio $\pm$ SE (nm)	IC-95% Lower (nm)	IC-95% Upper (nm)	Kurtosis
PLA	$519 \pm 15$	488	550	0
BO-l	$420 \pm 15$	389	450	1
BO-s	$637 \pm 19$	600	675	-0,5
CS	$554 \pm 16$	522	586	0
CS-s	$605 \pm 18$	569	642	0,7
CS-sp	$460 \pm 13$	435	486	-0,4
DL	$503 \pm 16$	470	536	-0,7
EA	$607 \pm 26$	554	659	-0,7
MM	$517 \pm 16$	484	550	-0,4
MD	$773 \pm 27$	719	828	-0,4
PN	$416 \pm 17$	383	449	9,2
PP	$404 \pm 18$	369	439	-0,6
SM	$495 \pm 16$	462	528	1,1
TI	$799 \pm 31$	737	851	0
UT	$454 \pm 16$	422	487	0,8

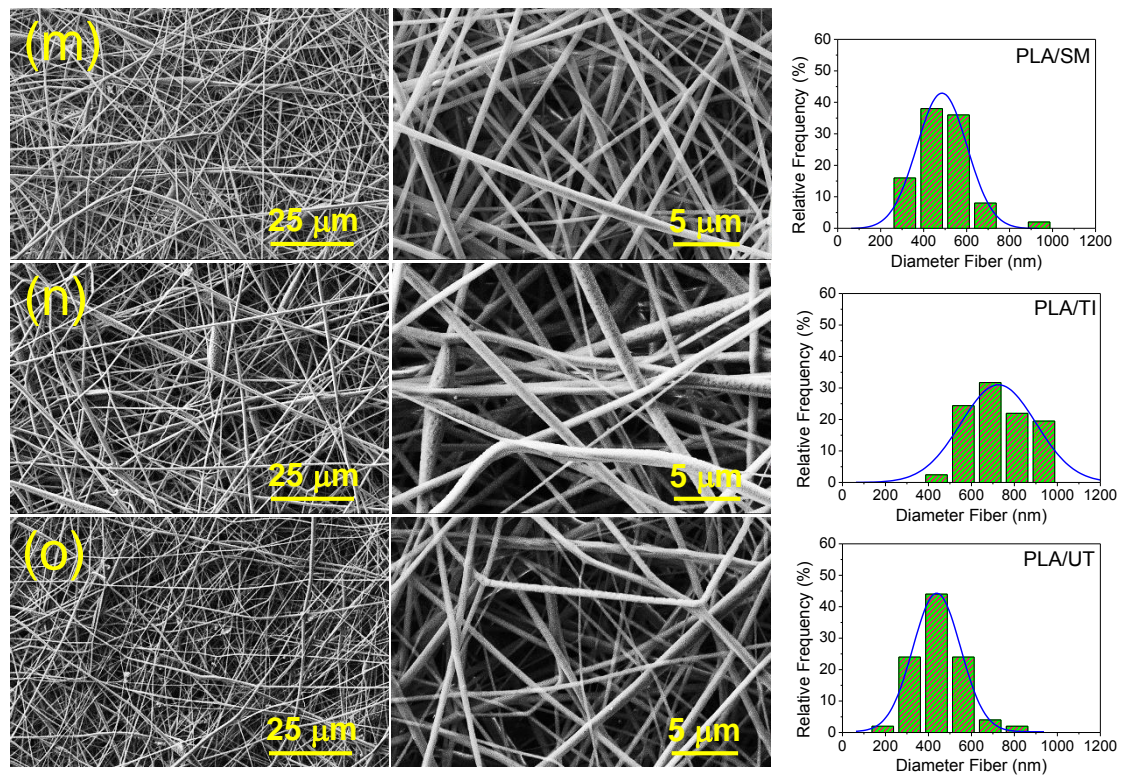




**Figura 20.** Imágenes SEM para mostrar la morfología de las matrices y fibras. Los gráficos muestran la distribución de frecuencia de los diámetros de las fibras. PLA (a). Matrices de fibras de PLA cargadas con BO-I (b), BO-s (c), CS (d), CS-s (e), CS-sp (f), DL (g), EA (h), MM (i), MD (j), PN (k), PP (l), SM (m), TI (n), UT (o).

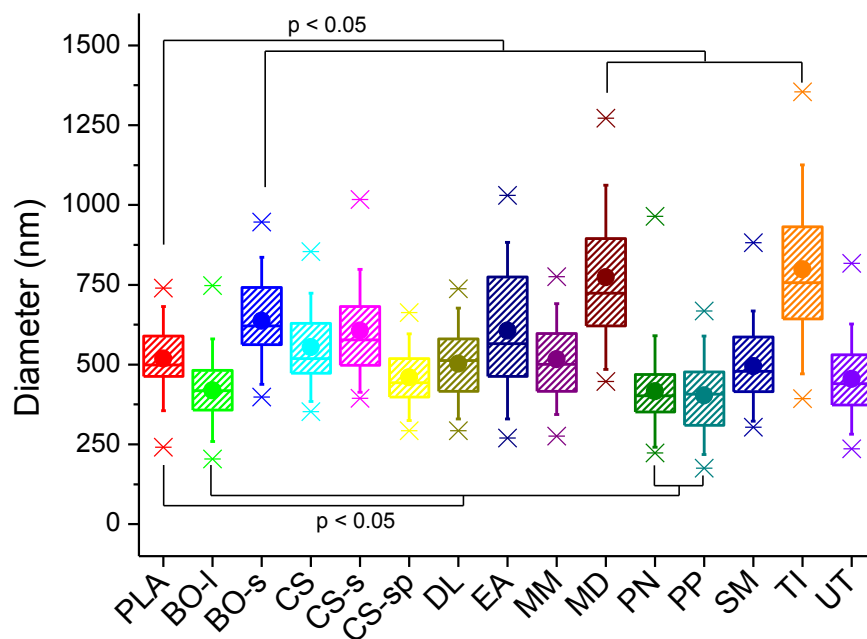


**Figura 20. (Continuación)** Imágenes SEM para mostrar la morfología de las matrices y fibras. Los gráficos muestran la distribución de frecuencia de los diámetros de las fibras. PLA (a). Matrices de fibras de PLA cargadas con BO-I (b), BO-s (c), CS (d), CS-s (e), CS-sp (f), DL (g), EA (h), MM (i), MD (j), PN (k), PP (l), SM (m), TI (n), UT (o).



**Figura 20. (Continuación)** Imágenes SEM para mostrar la morfología de las matrices y fibras. Los gráficos muestran la distribución de frecuencia de los diámetros de las fibras. PLA (a). Matrices de fibras de PLA cargadas con BO-I (b), BO-s (c), CS (d), CS-s (e), CS-sp (f), DL (g), EA (h), MM (i), MD (j), PN (k), PP (l), SM (m), TI (n), UT (o).

En la Figura 21, se muestra de manera gráfica que algunos extractos producen disminución significativa ( $p < 0.05$ ) del diámetro del PLA (p.e. BO-I, PN y PP) mientras que existen otros extractos que incrementan el diámetro (p.e. TI, MD y BO-s). Es interesante, el resultado producido por los extractos BO-I y BO-s, si bien es cierto en cualitativamente en cuanto a sus metabolitos secundarios se ha detectado en ambos casos presencia de alcaloides (Tabla 3), pero en cuanto a sus espectros de absorción tienen diferentes huellas (Figura 18). Esta observación es coherente con el conocimiento fitoquímico referido al hecho que los extractos de diferentes partes de la misma planta no necesariamente han de ser similar desde el punto de vista cuantitativo y/o cualitativo.



**Figura 21.** Gráfico de cajas para las medidas de los diámetros de las matrices de fibras de PLA cargado con los extractos de las plantas medicinales. Se representa el promedio (punto dentro de la caja), las barras (desviación estándar), la mediana (línea horizontal dentro de la caja), distribución del 25% y 75% de las medidas (límite superior e inferior de las cajas, respectivamente), los asteriscos (valor mínimo y máximo).

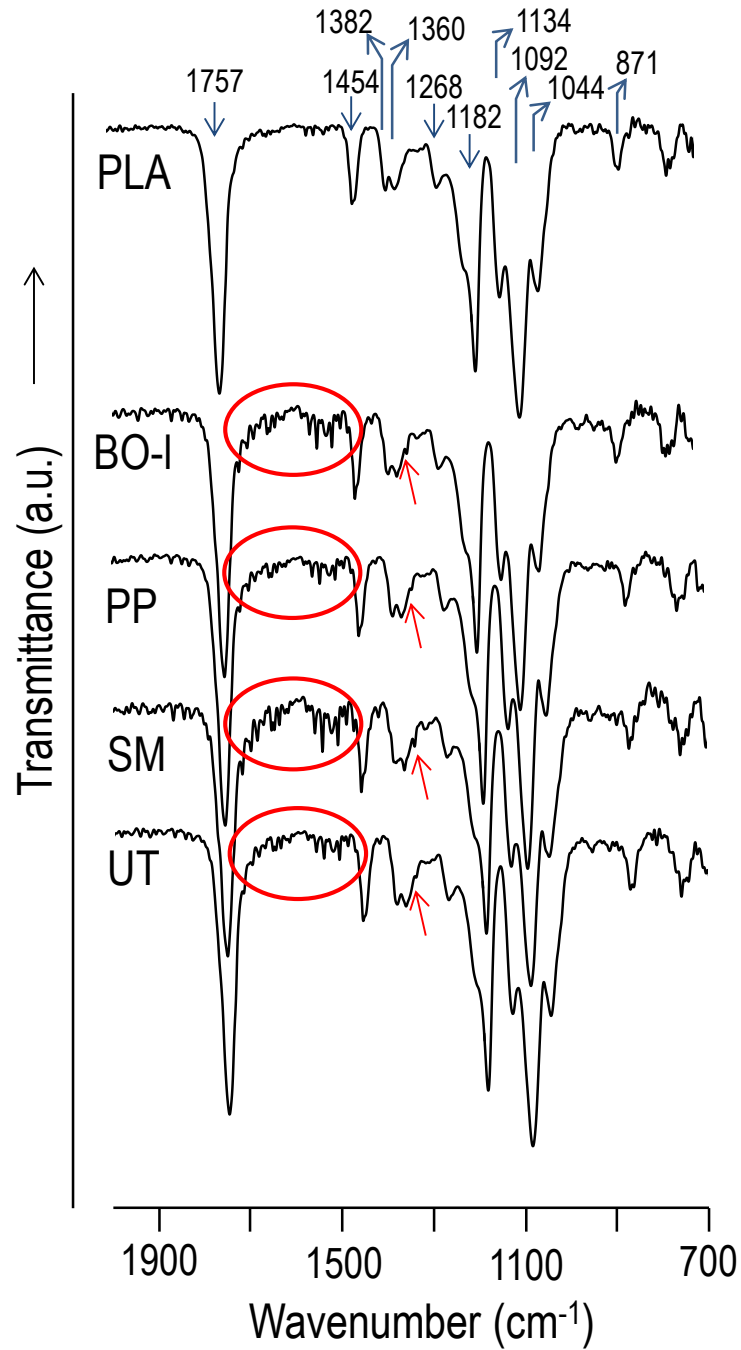
### 5.2.3. Análisis FTIR del PLA cargado con extractos de plantas medicinales

Se ha demostrado que el PLA procesado por electrospinning incrementa su cristalinidad [24]. La espectroscopia FTIR puede dar información sobre la conformación y cristalinidad, aunque su interpretación en el caso del PLA es difícil debido a sus diferentes conformaciones moleculares y empaquetamiento. Sin embargo, algunas observaciones pueden ser realizadas.

La absorbancia de la banda del carbonilo alrededor de  $1757\text{ cm}^{-1}$  tiene pequeña correlación con los cambios conformacionales de la cadena principal. Por este motivo esta banda puede ser usada como una banda de referencia para corregir las fluctuaciones debido a las diferencia en el espesor de las matrices.[25]

La comparación entre la absorbancia de la banda a  $1268\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{CH})+\nu(\text{C-O-C})$ ) que indica una conformación al azar, y la banda  $1209\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{as}(\text{C-O-C})+r_{as}(\text{CH}_3)$ ) que se observa como un hombro de la banda  $1182\text{ cm}^{-1}$ , es una banda que indica conformación helicoidal  $10_7$ ; al respecto se ha reportado que las moléculas adoptan una conformación helicoidal

más ordenada cuando la banda a  $1268\text{ cm}^{-1}$  disminuye y la banda a  $1209\text{ cm}^{-1}$  se incrementa.[26]



**Figura 22.** Espectros FTIR (en la región  $2000\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ ) de PLA y PLA cargado con los extractos de plantas medicinales BO-I, PP, SM y UT.

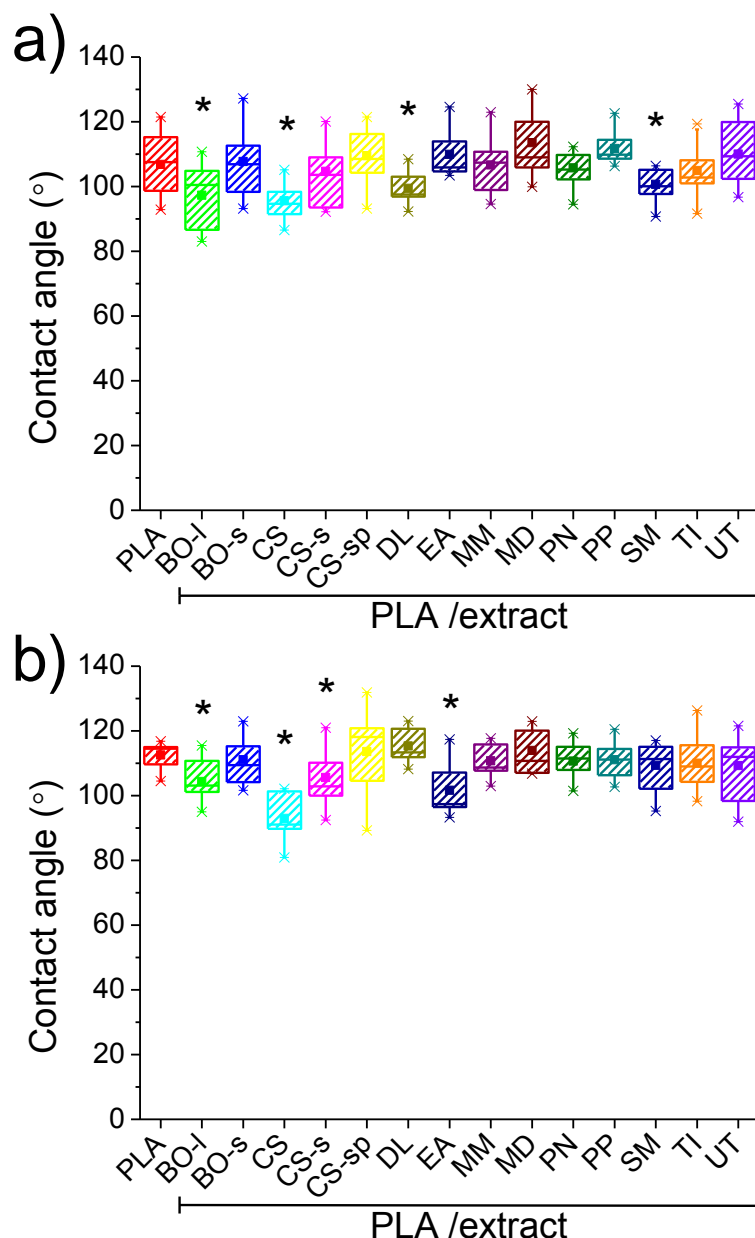
La relativa intensidad entre las bandas  $1382\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_s(\text{CH}_3)$ ) y  $1092\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$ ) cambian bajo el annealing de las muestras (p.e., cuando se incrementa la cristalinidad). Específicamente, la relativa intensidad de las bandas a  $1360\text{ cm}^{-1}$  y  $1134\text{ cm}^{-1}$  fue incrementada [27]. Finalmente, la banda de absorción a  $921\text{ cm}^{-1}$  es característica de la forma- $\alpha$  y corresponde al esqueleto C-C con estiramiento del  $\text{CH}_3$ . [28]

El espectro FTIR de la matriz de fibras de PLA y los espectros del PLA cargado con los extractos muestran algunos aspectos interesantes (Figura 22). En la mayoría de los casos, no se observaron grandes diferencias entre las bandas de absorción de PLA y el PLA cargado con los extractos de las plantas medicinales. La región espectral que se muestra ( $700\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ ) es sensible a la conformación molecular y cristalinidad. Sin embargo, el espectro FTIR de las matrices de PLA cargado con los extractos de BO-I, PP, SM y UT fue suficientemente sensible para detectar la incorporación de los extractos. Basicamente, múltiples señales fueron observadas en la región entre  $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ , donde las bandas asociadas al grupo carbonilo y anillos aromáticos pueden aparecer. Estos anillos son comunes para los metabolitos secundarios de las plantas como pueden ser los alcaloides, flavonoides y fenoles (Figura 22), y en consecuencia estas señales pueden ser detectadas en los espectros del PLA cargado con estos 4 extractos, siendo las señales muy similares (Figura 21, marca con círculo).

#### 5.2.4. Ángulos de Contacto

La medida de los ángulos de contacto da información de las características de mojabilidad de las superficies. En la Figura 23 se muestran los valores promedio de los ángulos de contacto medidos usando como solvente agua (Figura 23a), y suero fetal bovino (FBS) (Figura 23b). Estos solventes fueron escogidos porque el agua es el solvente hidrofílico universal, mientras el FBS es un medio acuoso que contiene algunos componentes hidrofóbicos, y en particular es un medio fisiológico, de allí la importancia de las medidas en este medio.

En agua la matriz de PLA muestra un ángulo de contacto de  $106.8^\circ \pm 9.2$ . Todas las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) que se observan entre el PLA y los PLA cargados con los extractos correspondieron a la disminución del ángulo de contacto (Figura 23a). Así, las matrices de PLA cargado con extractos de BO-I, CS, DL, y SM mostraron valores de  $97.3^\circ \pm 10.3^\circ$ ,  $95.5^\circ \pm 5.6^\circ$ ,  $99.4^\circ \pm 5.2^\circ$ , y  $100.6^\circ \pm 5.2^\circ$ .



**Figura 23.** Ángulos de contacto medidos sobre las superficies de las matrices de nanofibras de PLA cargadas con los extractos de plantas medicinales. (a) Medidas en agua. (b) Medidas en FBS. \*  $p < 0.05$  vs la matriz control de PLA,  $t$ -Student test.

En el medio FBS, las diferencias entre la matriz de PLA y PLA cargado con extractos fueron por conversión de las superficies hacia la hidrofiliidad. Para el PLA se obtuvo un valor de  $112.5^{\circ} \pm 4.1^{\circ}$  y para las matrices de PLA cargado con los extractos BO-I, CS, CS-s y EA fueron de  $104.3^{\circ} \pm 6.5^{\circ}$ ,  $92.9^{\circ} \pm 7.5^{\circ}$ ,  $105.6^{\circ} \pm 8.2^{\circ}$  y  $101.6^{\circ} \pm 7.6^{\circ}$  (Figura 23b). Estos resultados estarían indicando cambios conformacionales en la cadena principal del PLA, puesto que la morfología de las fibras no ha demostrado la presencia de cristales o algunas modificaciones en la superficie de las fibras (ver la Figura 20).

### 5.2.5. Difracción de Rayos-X

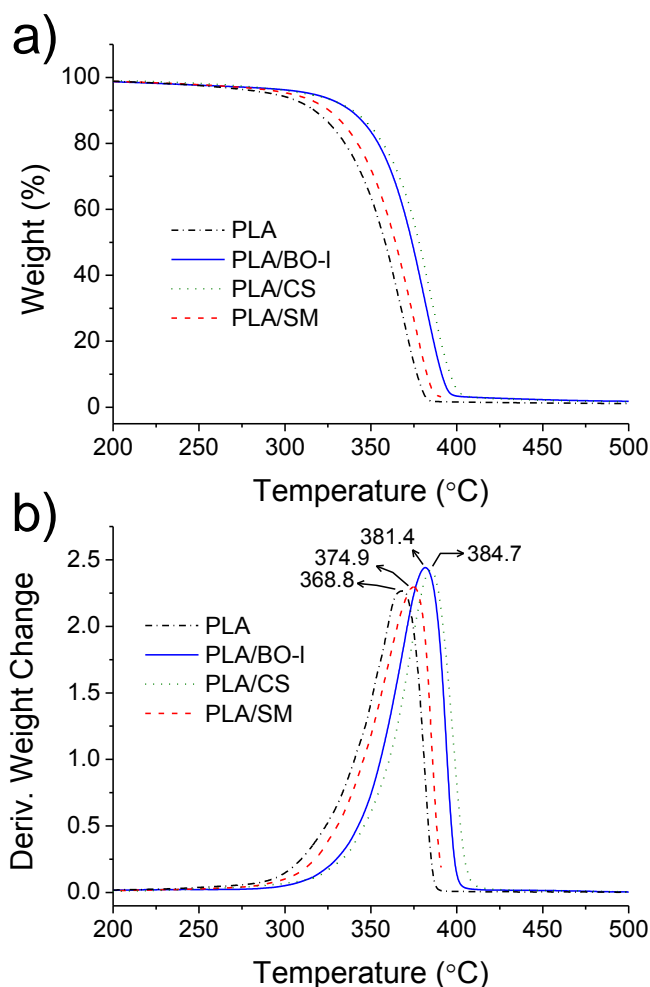
Usualmente, la difracción de rayos-X de las matrices de fibras obtenidas por electrospinning, dan información acerca de las fases cristalina y amorfa de las muestras. Para ello, se usan los difractogramas obtenidos por WAXD. Básicamente, la deconvolución de los patrones WAXD indico la presencia de dos halos amorfos a 0.433 y 0.349 nm y tres picos Bragg a 0.542, 0.472 y 0.403 nm que corresponden a las reflexiones (200)+(110), (203) y (015) de la forma- $\alpha$  de la poliláctida (conformación helicoidal  $10_3$ ). Estas conformaciones fueron mantenidas en las nanofibras obtenidas de mezclas de PLA-extractos de plantas.

La carga del PLA con los extractos de las plantas no produjo ningún cambio en la estructura cristalina del PLA, lo cual sugiere que la los extractos fueron suplementados en cantidades que no afecta la cristalinidad del PLA, y que ellos estarían bien distribuidos en ambas fases del polímero. La ausencia de cambios en la cristalinidad también sirve para explicar la morfología de las frías, las cuales se encuentran se observan de manera superficial como fibras lisas y homogéneas.

### 5.2.6. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico fue realizado con las matrices de nanofibras de PLA cargadas con los extractos y que mostraron actividad biológica inhibitoria (ver sección de actividad biológica). Para estudiar el efecto de los extractos en la estabilidad térmica de las nanofibras de PLA, se realizó el análisis termogravimétrico. El estudio permite también esclarecer si la incorporación del extracto contribuye a acelerar la degradación de la matriz de nanofibras de PLA. La Figura 24a y b representan las curvas de TGA y DTGA de las muestras procesadas de PLA cargada con los extractos, respectivamente, y revelan la diferente susceptibilidad a la degradación del PLA dependiendo del extracto (Figura 24b).





**Figura 24.** Curvas termogravimétricas **(a)** y de velocidad de pérdida de peso **(b)** determinadas a 2 °C/min bajo N<sub>2</sub> en las matrices de PLA sin carga y PLA cargado con los extractos que muestran efectos biológicos inhibitorios.

La incorporación del extracto BO-I y CS en las nanofibras de PLA aumenta claramente la estabilidad térmica y, específicamente, la temperatura inicial de degradación aumenta con la incorporación de extracto (Figura 24a). La degradación térmica del PLA fue en menor medida producida por la incorporación del extracto SM (Figura 24b). El aumento de la temperatura inicial es probablemente una consecuencia de la mayor estabilidad que los componentes del extracto introducen en la cadena principal del polímero por su posible arreglo en los espacios lamelares. Los extractos introducen modificaciones tal como se ha observado en la variación del diámetro de las fibras y en la conversión hacia matrices más hidrofílicas.

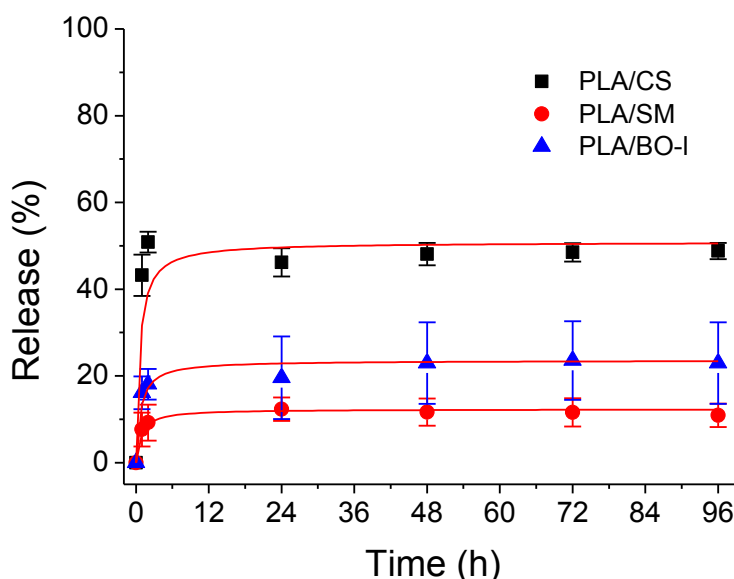
En este sentido es claro suponer que la desviación de la degradación térmica podría ser una consecuencia de la incorporación de los metabolitos secundarios de los extractos, que altera el comportamiento químico de las cadenas del PLA en las nanofibras. Por último, cabe señalar que el residuo restante fue igual para el PLA cargado con los extractos que para el PLA sin carga, tal como muestran las curvas termogravimétricas, esto podría sugerir una distribución homogénea de los metabolitos a lo largo de las nanofibras de PLA.

### **5.2.7. Liberación de los extractos cargados en la nanofibras de PLA**

Las tres matrices de PLA cargadas con los extractos BO-I, SM y CS fueron estudiados para obtener sus cinética de liberación en PBS (pH 7.2-7.4) como medio de liberación. El PBS es un buffer fosfato salino, diseñado para obtener una osmolaridad fisiológica. En la Figura 25 se observan las curvas de liberación para estas tres matrices de nanofibras de PLA cargado con los extractos.

Las curvas de liberación para cada extracto fueron realizadas cuantificando los espectros UV-Vis de cada extracto (ver Figura 18 y 19). Para los extractos BO-I y SM las medidas de absorbancia fueron realizadas a 405 nm, y para el extracto CS la longitud de onda correspondió a su único máximo que corresponde a 276 nm.

Claramente se puede observar que los menores porcentajes de liberación máxima fueron para las matrices de PLA/SM y PLA/BO-I con valores cercanos al 10% y 20%, respectivamente. Sin embargo, se puede considerar una alta liberación para el extracto de la matriz PLA/CS, la cual alcanza un valor cercano al 50%. En todos los casos los valores máximos de liberación fueron alcanzados alrededor de las 12 h de liberación, y luego la liberación se mantiene constante en equilibrio, es importante indicar que al cabo de 96 h, al final del experimento, se recuperó desde las matrices la parte no liberada de los extractos.



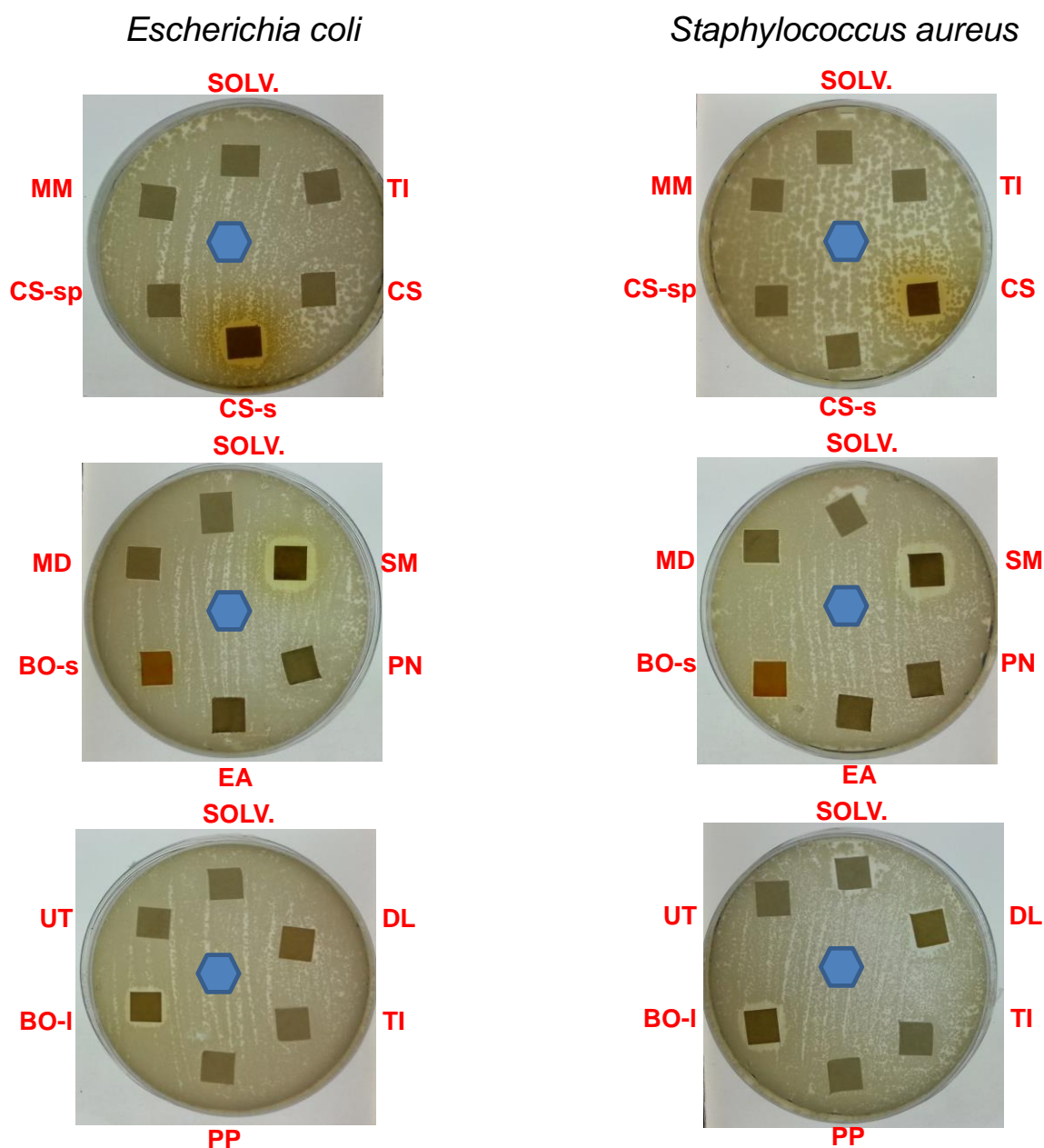
**Figura 25.** Liberación de los extractos desde las matrices de nanofibras de PLA cargadas. El medio de liberación correspondió a PBS (pH 7.2-7.4)

Por otro lado, y de manera lógica esta posible liberación podría estar relacionada al hecho que estas matrices mostraron una tendencia hacia la hidrofiliicidad cuando se midieron los ángulos de contacto tanto en agua como en suero fetal bovino (Figura 23)

### 5.2.8. Inhibición del crecimiento bacteriano

En la Figura 26 se muestran los resultados para los extractos de las plantas medicinales evaluados en el ensayo de inhibición del crecimiento de las bacterias *E.coli* y *S.aureus* como representantes de los grupos Gram-negativas y Gram-positivas, respectivamente. Este ensayo fue realizado para observar la potencia de la actividad antimicrobiana que podrían tener los extractos.

Claramente, se observó la formación de halo de inhibición alrededor de las muestras de los extractos CS, SM y BO-I. Asimismo, la actividad antimicrobiana de estos extractos correspondería a una actividad de amplio espectro, puesto que inhiben el crecimiento de ambos grupos de bacterias (Gram-negativas y Gram-positivas). Además, los controles de solvente no mostraron ninguna actividad indicando que el solvente fue totalmente evaporado antes de realizar el ensayo y por lo tanto los resultados observados no pueden ser falsos positivos. En la Figura 26 se debe notar que las placas que contienen los extractos de CS de las diferentes partes de la planta muestran un crecimiento individualizado de las colonias en casi toda la superficie de la placa, este hecho indica una susceptibilidad parcial de las bacterias, debido a que la cantidad de compuesto activo en el extracto no ha sido suficiente para matar todo el número bacteriano sembrado en las

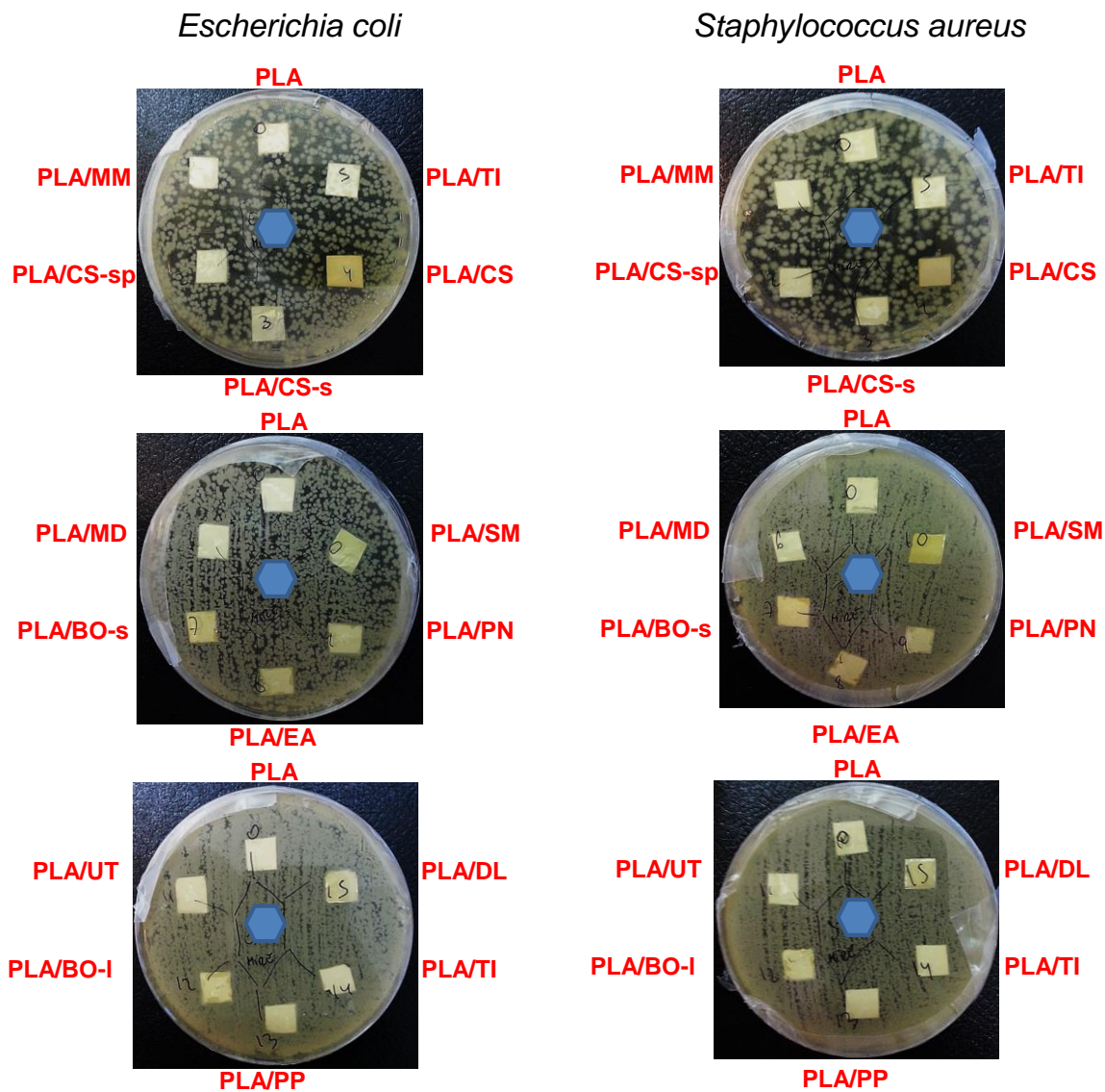


**Figura 26.** Inhibición del crecimiento bacteriano en placa de agar. Los extractos CS, SM y BO-I mostraron formación del halo de inhibición del crecimiento bacteriano.

placas. Con anterioridad, en los experimentos de liberación se ha mostrado la gran difusión que tiene el extracto CS en medio acuoso (p.e. PBS).

Los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano para evaluar las matrices de nanofibras cargadas con los extractos son mostrados en la Figura 27. Difícilmente se puede observar halos de inhibición para el crecimiento de ambos grupos. Sin embargo, el aspecto general de las placas que contienen los extractos de CS y SM mostró cierta

susceptibilidad bacteriana. En especial, en el caso para el extracto CS que tiene una acción muy similar tanto sobre las bacterias Gram-negativas como sobre las Gram-positivas.



**Figura 27.** Inhibición del crecimiento bacteriano en placa de agar. Las matrices de PLA cargadas con los extractos CS, SM y BO-I mostraron un efecto de susceptibilidad antimicrobiana.

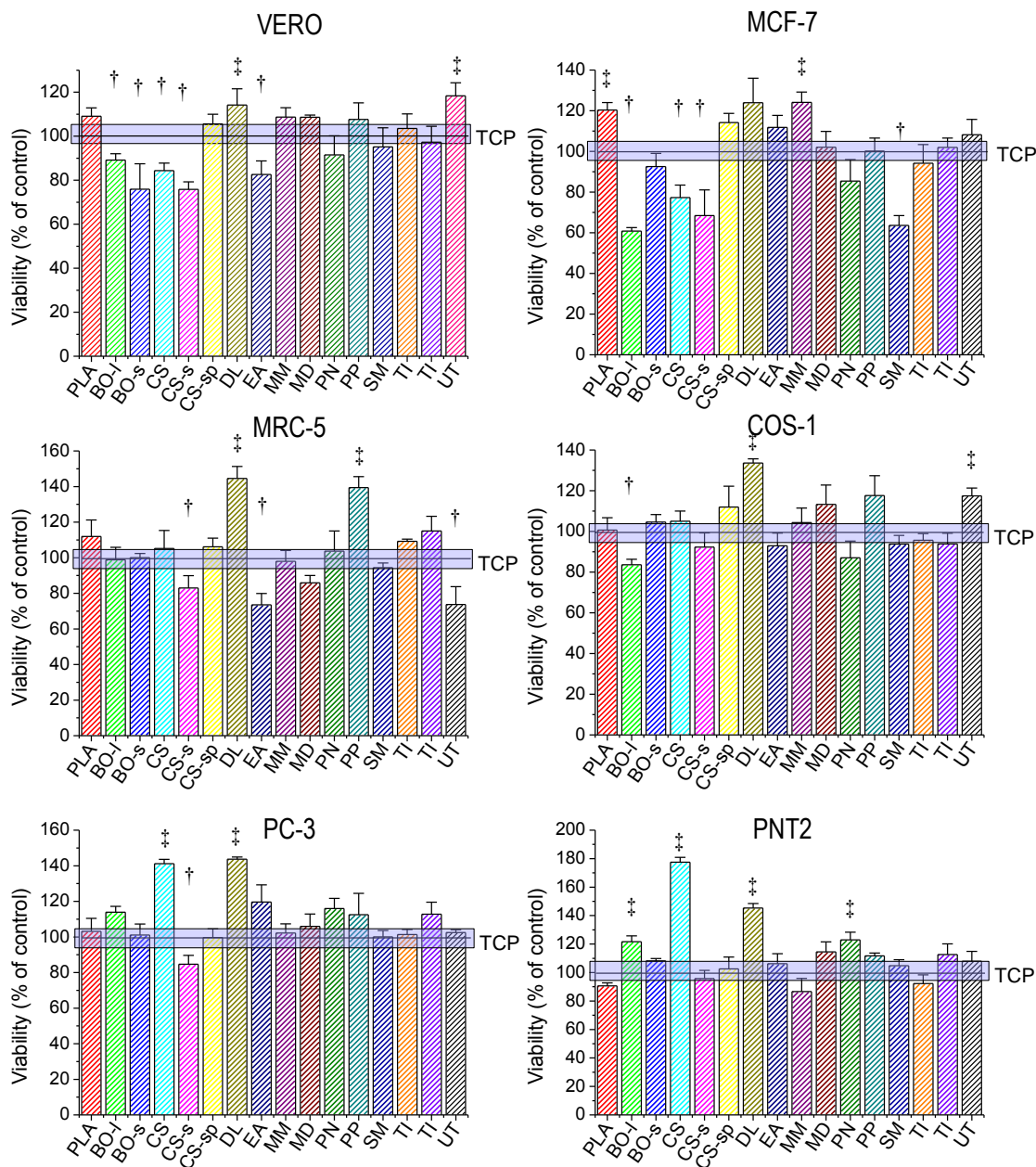
### 5.2.9. Biocompatibilidad

La biocompatibilidad de las matrices de nanofibras de PLA cargadas con los extractos fue evaluada usando un test de citotoxicidad a las 24 horas. El ensayo consiste en el cultivo de líneas celulares con características adherentes en presencia de las matrices de PLA, y a las 24 horas de cultivo se evalúa la actividad mitocondrial de las células como indicadora de viabilidad celular. Los resultados obtenidos de este ensayo se muestran en la Figura 28. Se han cultivado diferentes líneas celulares p.e., células VERO (de tipo epitelial inmortalizadas), COS-1 (de tipo fibroblasto inmortalizado), MCF-7 (línea de carcinoma mamario humano, células de tipo epitelial), MRC-5 (línea de carcinoma pulmonar humano, células de tipo fibroblasto), PC-3 (línea de cáncer de próstata humana, células de tipo fibroblasto), y PNT2 (línea inmortalizada de próstata humana, células de tipo fibroblasto usada frecuentemente con control y asume normalidad).

En la mayoría de los casos se observa que existen extractos con actividad inhibitoria del crecimiento celular, con porcentajes de viabilidad menor que el crecimiento control que corresponde al crecimiento de las células sobre la placa de cultivo, mientras que otros se comportan como estimuladores del crecimiento celular, lo cual es evidenciado por un sobre crecimiento. Para estos casos de sobre crecimiento es posible que la propia matriz de nanofibras contribuya en superficie para permitir un mayor número de células. En la actualidad las matrices de fibras obtenidas por electrospinning son claros dispositivos utilizados para promover el crecimiento de células.

Entre los extractos inhibitorios es casi común el extracto CS, y en especial lo fue para las células vero y MCF-7, mientras como extracto estimulador destaca el DL en todas las líneas celulares. Además, también es interesante mencionar que los extractos con actividad antimicrobiana como el BO-I, CS, y SM fueron en general extractos inhibitorios para el crecimiento de células.

Por otro lado, mencionar que las únicas células que no mostraron efectos inhibitorios fueron la PNT2, pero si mostraron efectos estimuladores. Finalmente, el encontrar tanto efectos inhibidores y estimuladores producidos por los extractos liberados desde las matrices de nanofibras de PLA cargado con los extractos es un buen resultado, porque esto estaría indicando que los extractos también son liberados en un medio acuoso complejo como son los medios de cultivo de células los cuales son suplementados con 10% FBS, y tal como se observó en este medio la mojabilidad de las superficies de las matrices tiende a ser más hidrofílicas.



**Figura 28.** Viabilidad celular en presencia de las matrices de PLA cargadas con extractos de plantas medicinales. TCP, crecimiento celular en la placa de cultivo de tejidos. †, ‡,  $p < 0.05$  vs TCP, *t*-Student test

## 6. Conclusiones

En este PFC se ha procedido a estudiar las nanofibras de PLA cargadas con extractos etanólicos de plantas medicinales. Las conclusiones que ha derivado del estudio son:

[1] Se han preparado con éxito matrices de nanofibras de PLA cargado con los productos de los extractos etanólicos de 11 diferentes especies de plantas medicinales.

[2] El extracto etanólico de las plantas medicinales no puede ser incorporado directamente en la disolución de electrospinning del PLA. El principal motivo es la precipitación de los poliésteres en presencia de alcohol. Así, el extracto etanólico requiere un cambio de solvente o etapa de adaptación antes de ser incorporado en la disolución de electrospinning.

[3] Las fibras obtenidas con 8 %-w/v de PLA en cloroformo/acetona (2v/1v) sin carga y con carga de los extractos produjeron electrofibras de escala nanométrica, y con una distribución normal de los diámetros de las matrices.

[4] La carga de extractos en las nanofibras de PLA modificó la mojabilidad de la superficie de las matrices de PLA. Con los extractos probados se obtuvo un cambio de una superficie hidrofóbica a una superficie algo más hidrofílica.

[5] Los extractos de las plantas medicinales fueron caracterizados de acuerdo a sus espectros UV-Vis, y por el contenido de sus metabolitos secundarios. Estos fueron identificados como flavonoides, alcaloides o fenoles mediante el uso de TLC.

[6] Los extractos cargados en las matrices de PLA fueron liberados en medio acuoso (PBS, pH 7.2-7.4). Además, se realizaron ensayos para evaluar su actividad biológica donde quedó reflejado su capacidad para difundir en un medio semisólido (p.e., agar) y liberarse en medios acuosos de alta complejidad (p.e., medios de cultivo).

[7] En cuanto a la actividad antibacteriana, se ha demostrado que algunos de los extractos cargados en las nanofibras de PLA mantienen su actividad una vez sean liberados al medio. Lo que indica que posiblemente estos metabolitos secundarios no fueron afectados durante el proceso de electrospinning.

[8] Los ensayos de viabilidad celular han demostrado que los extractos pueden poseer actividad inhibitoria del crecimiento celular, pero también encontramos otros extractos con actividad estimuladora.



## 7. Estudio de sostenibilidad

### 7.1. Impacto ambiental

Se realizará un análisis del peligro que comportan algunas de las sustancias que se han utilizado durante la realización de este proyecto. Para ello, se seguirá la normativa de la Unión Europea vigente. Dicha normativa está sujeta a las normas REACH que engloba el marco reglamentario de gestión de las sustancias químicas.

El Reglamento (CE) nº 1907/2006 (en adelante denominado REACH, acrónimo de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas) entró en vigor el 1 de junio de 2007 y tiene como objetivo principal mejorar la protección para la salud humana y el medio ambiente frente al riesgo que puede conllevar la fabricación, comercialización y uso de las sustancias y mezclas químicas.

En principio el REACH es de aplicación para todas las sustancias químicas presentes en la vida diaria ya sea como tales, en forma de mezclas o contenidas en artículos, siendo, por tanto, de aplicación en sectores económicos de índole diversa.

Para cumplir con las disposiciones del REACH las empresas deben identificar y gestionar los riesgos asociados a las sustancias que fabrican y comercializan en la Unión Europea. Deben demostrar cómo usar dichas sustancias de manera segura y comunicar toda aquella información relativa a las medidas de gestión de riesgos a las partes implicadas.

De acuerdo con este reglamento actual se presentan en la tabla 6 las sustancias utilizadas que son clasificadas como peligrosas y sus pictogramas y en la tabla 7 sus indicaciones (*Hazard Statements*) según el código establecido.

**Tabla 6:** Clasificación de las sustancias peligrosas utilizadas en el proyecto

Substancia química	Clase de peligro	Pictogramas
<b>Acetona</b>	H225, H319, H336, EUHO66	
<b>Cloroformo</b>	H302 + H332, H315, H319, H336, H351, H361d, H373	
<b>Etanol</b>	H225	

**Tabla 7:** Significado de los Hazard Statements de las sustancias de la tabla X

Hazard Statements	Significado
<b>H225</b>	Es un líquido inflamable
<b>H302</b>	Es nocivo en caso de ingestión
<b>H315</b>	Provoca irritación cutánea
<b>H319</b>	Provoca irritación ocular grave
<b>H332</b>	Es nocivo en caso de inhalación
<b>H336</b>	Puede provocar vértigo o somnolencia
<b>H351</b>	Se sospecha que provoca cáncer
<b>H361d</b>	Se sospecha que daña al feto
<b>H373</b>	La exposición prolongada o repetida puede provocar daños en los órganos
<b>EUHO66</b>	La exposición repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel

Los residuos de PLA se han depositado en un recipiente para polímeros sólidos y las mezclas de disolventes ( $\text{CHCl}_3$ , acetona y EtOH) en un recipiente para disolventes clorados dada la presencia del  $\text{CHCl}_3$ .

Los residuos generados durante el estudio con bacterias, se han depositado en un contenedor especial destinado a material biopeligroso, tratándolo previamente con legía al 10% para la eliminación de las bacterias.

## 7.2. Evaluación económica

En este apartado se hace una aproximación de lo que costaría el proyecto teniendo en cuenta factores como material, equipos y personal.

**Tabla 8:** Coste total de productos utilizados

Producto	Precio	Cantidad	Total (€)
Acetona	8,5€/L	0,5 L	4,25
Ácido acético	28€/L	0,2 L	5,60
Cloroformo	75€/L	1 L	75
Etanol	20€/L	0,1 L	2
N-Butanol	30€/L	0,1 L	3
Extractos plantas*	-	-	-
PLA	7,5€/100g	20 g	1,50
<b>SUBTOTAL</b>			91,35
<b>Otros (+15%)</b>			13,70
<b>TOTAL</b>			105,05

\*Material cedido sin costo alguno

A continuación la tabla muestra el coste de los equipos utilizados para el proyecto:

**Tabla 9: Coste equipamiento**

Equipo	Precio	Tasa amortización (años)	Nº personas	Total (€)
<b>Electrospinning</b>	20000	4	5	875
<b>Espectrofotómetro IR</b>	24000	10	7	288
<b>Espectrofotómetro UV</b>	16500	10	8	201,49
<b>Lector ELISA</b>	3440	5	9	69,55
<b>Microscopio óptico</b>	12000	15	7	96
<b>SEM</b>	210000	20	10	878,68
<b>TGA</b>	62000	6	7	1362,50
<b>TOTAL</b>				3771,22

En la tabla siguiente se puede ver el coste de personal teniendo en cuenta el total de horas dedicadas al proyecto:

**Tabla 10:** *Coste de personal*

Función	Precio (€/h)	Tiempo (h)	Total (€)
<b>Estudio previo y documentación</b>	10	90	900
<b>Experimentación</b>	15	500	7500
<b>Análisis de resultados</b>	20	400	8000
<b>TOTAL</b>			16400

Por último en la siguiente tabla podemos ver el coste final del proyecto:

**Tabla 11:** *Coste total del proyecto*

Concepto	Total (€)
<b>Coste productos</b>	105,05
<b>Coste equipos</b>	3771,22
<b>Coste personal</b>	16400
<b>Subtotal</b>	20276,27
<b>Gastos generales (10% subtotal)</b>	2027,63
<b>Coste operacional (21% subtotal, <i>Overhead</i>)</b>	4258,10
<b>TOTAL</b>	<b>26562</b>

## Agradecimientos

En primer lugar agradecer a mi tutor Dr. Luis del Valle la implicación, dedicación, paciencia y conocimientos transmitidos para la realización de este proyecto.

También quisiera agradecer al Dr. Jordi Puiggalí, por darme la oportunidad de realizar mi PFC en el grupo de investigación de PSEP y por su interés mostrado durante la evolución del proyecto. Asimismo a todos los miembros del Grupo de Investigación en Polímeros Sintéticos, Estructura y Propiedades (PSEP) del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Politècnica de Catalunya.

Por otro lado, agradecer a mi amiga Sonia Molina por el apoyo y compañía en el laboratorio y por hacer las horas de experimentación más llevaderas.

Especialmente quisiera dar las gracias a Alejandro, una persona que ha compartido nueve años de mi vida, entre ellos cinco largos años de carrera, que me ha apoyado incondicionalmente en todo momento y que me ha transmitido fuerza y positivismo cuando lo he necesitado. Sin él no habría sido lo mismo.

Agradecer también a mi novio por su ayuda y apoyo en la realización de este trabajo así como la agradable compañía ofrecida en las numerosas horas de trabajo en casa.

Por último, y no por ello menos importante, dar las gracias a mi familia por haberme servido de gran apoyo, por los grandes consejos, por la comprensión y ánimos que me han dado durante todos estos años. Sin ellos este proyecto no hubiera sido posible.



## Bibliografía

- [1] LÓPEZ CARRASQUERO, F. *Fundamentos de polímeros*, Venezuela: Universidad de los Andes, 2004.
- [2] UNIVERSIDAD DE OVIEDO. *Introducción a los polímeros*. [<http://www6.uniovi.es/usr/fblanco/AP.T1.1-MPyC.Tema1.IntroduccionPolimeros.Generalidades.pdf>, 2 de diciembre de 2015]
- [3] ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES DE VALLADOLID. *Los polímeros en medicina*. Valladolid, 2006. [[http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/sitios\\_relacionados.htm](http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/sitios_relacionados.htm), 10 de diciembre de 2015]
- [4] ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES DE VALLADOLID. *Polímeros biodegradables*. Valladolid, 2006. [[http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/polimeros\\_biodegradables.htm](http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/polimeros_biodegradables.htm), 2 de diciembre de 2015]
- [5] CHANDRA, R., RUSTGI, R. *Biodegradable polymers*. Progress in Polymer Science. Pergamon, 1998.
- [6] SERNA, L., RODRIGUEZ, A., ALBÁN, F. *Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones*. Ingeniería y Competitividad, 2003.
- [7] REN, J. *Biodegradable Poly(Lactic Acid). Synthesis, modification, processing and applications*. Shanghai, Springer 2010.
- [8] SILL T.J., VON RECUM H.A. *Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering*. *Biomaterials*, Mayo 2008.
- [9] LOPEZ, M., RODRIGUEZ, L., DUQUE SENCHEZ, M. *Electrospinning: la era de las nanofibras*. [<http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/ENE13/duque.pdf>, 3 de enero de 2016]
- [10] SEERAM, R., KAZUTOSHI, F., WEE-EONG, T., TEIK-CHENG, L., ZUWEI, M. *An introduction to electrospinning and nanofibers*, de Electrospinning process, Singapur, World Science, 2005.
- [11] OPANASOPIT P., RUKTANONCHAI U., SUWANTONG O., PANOMSUK S., NGAWHIRUNPAT T., SITTISOMBUT C., SUKSAMRAN T., SUPAPHOL P.,

*Electrospun poly(vinyl alcohol) fiber mats as carriers for extracts from the fruit hull of mangosteen.* Journal of Cosmetic Science. 2008, Vol. 59, p. 233-242.

- [12] CHARERNSRIWILAIWAT, N., ROJANARATA, T., NGAWHIRUNPAT, T., MONRUDEE, S., OPANASOPIT, P. *Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with Garcinia mangostana extracts.* International Journal of Pharmaceutics 452 (2013) p. 333-343.
- [13] JIN, G., PRABHAKARAN, M., KAI, D., KUMAR ANNAMALAI, S., ARUNACHALAM, K., RAMAKRISHNA, S. *Tissue engineered plant extracts as nanofibrous wound dressing.* Volume 34, Issue 3, January 2013, p. 724–734. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.026>
- [14] SUGANYA, S., VENUGOPAL, J., RAMAKRISHNA, S., LAKSHMI, B., & GIRI DEV, V. R. . *Aloe vera incorporated biomimetic nanofibrous scaffold: a regenerative approach for skin tissue engineering.* Iran Polymer Journal, 2014, 23(3), p. 237-248. <http://dx.doi.org/10.1007/s13726-013-0219-2>
- [15] SUGANYA, S., VENUGOPAL, J., RAMAKRISHNA, S., LAKSHMI, B., & GIRI DEV, V. R. *Herbally Derived Polymeric Nanofibrous Scaffolds for Bone Tissue Regeneration.* Journal of Applied Polymer Science, 2014, 131, 9835 (1-11). <http://dx.doi.org/10.1002/app.39835>
- [16] VENUGOPAL, J., SHAYANTI, M., RAJESWARI, R., SRIDHAR, R., & RAMAKRISHNA, S. *Xylan polysaccharides fabricated into nanofibrous substrate for Myocardial Infarction.* Materials Science and Engineering C, 2013, 33, p. 1325–1331. PMID: 23827578. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.032>
- [17] TECHNICAL STAFF OF MATERIALS EVALUATION AND ENGINEERING. *Handbook of Analytical Methods For Materials.* United States 2010.
- [18] WOODWARD R. *Contact angle measurements using the drop shape method.* Porstmouth: physics department of oregon's college of engineer. 1999.
- [19] BRICEÑO G., GARCÍA, J., MASELLI, A., ROSALES, L.C. *Efecto de extractos etanólicos de ruda y neem sobre el control de bacterias fitopatógenas del genero Erwinia.* Agronomía Trop. 2012, 61, 141-148.
- [20] RAMOS, N., SANABRIA, M.E., RODRÍGUEZ, D.A., ULACIO, D. *Efecto del extracto etanólico de albahaca genovesa (Ocimum basilicum var. Genovese) sobre Cercospora apii Fressen y el tizón temprano del celery (Apium graveolens).* Revista Científica UDO Agrícola, 2012, 12, 472-478.





- [21] DEL VALLE MENDOZA, J., PUMAROLA, T., GONZALES, L.A., DEL VALLE, L.J. *Antiviral activity of maca (Lepidium meyenii) against human influenza virus*. Asian Pac J Trop Med 2014; 7(S1): S415-20.
- [22] ULLOA-URIZAR, G., AGUILAR-LUIS, M.A., DE LAMA-ODRÍA, M.C., CAMARENA-LIZARZABURU, J., DEL VALLE MENDOZA, J. *Antibacterial activity of five Peruvian medicinal plants against Pseudomonas aeruginosa*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2015, 5: 928-931. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.07.016>
- [23] DEL VALLE, L.J., DIAZ, A., ROYO, M., RODRIGUEZ-GALAN, A., PUIGGALI, J. *Biodegradable polyesters reinforced with triclosan loaded polylactide micro/nanofibers: Properties, release and biocompatibility*. eXPRESS Polym Lett., 2012, 6(4):266-282.
- [24] DEL VALLE, L., CAMPS, R., DÍAZ, A., FRANCO, L., RODRÍGUEZ-GALÁN, A., PUIGGALÍ, J. *Electrospinning of polylactide and polycaprolactone mixtures for preparation of materials with tunable drug release properties*. Journal of Polymer Research., 2011, 18:1903-1917.
- [25] FUJIWARA, T., MIYAMOTO, M., KIMURA, Y., SAKURAI, S. Polymer, 2001, 42:1515-1523.
- [26] URUYAMA, H., MOON, S.I., KIMURA, Y. *Microstructure and thermal properties of polylactides with different L- and D- unit sequences: Importance of the helical nature of the L-sequenced segments*. Macromolecular Materials and Engineering 2003, 288: 137-143.
- [27] RIBEIRO, C., SENCADAS; V., COSTA, C.M., RIBELLES, J.L.G., LANCEROS-MENDEZ, S. *Tailoring the morphology and crystallinity of poly(L-lactide acid) electrospun membranes*. Science and Technology of Advanced Materials, 2011, 12: 015001
- [28] KANG, S., HSU, S:L., STIDHAM, H.D., SMITH, P.B., LEUGERS, M.A., YANG, X. Macromolecules, 2001, 34:4542
- [29] MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. *Reglamento REACH*. [<http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/reglamento-reach/>, 20 de enero de 2016]

## Bibliografía complementaria

- PUIGGALÍ J. Estructura y propiedades de los polímeros. CPDA, ETSEIB, 2009.
- PUIGGALÍ, J. *Apuntes de “estructura y propiedades de los polímeros. Física de polímeros.*
- SERNA, L., RODRÍGUEZ, A., ALBÁN, F. *Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones.* Ingeniería y Competitividad, 2003, p. 16-26
- STEVEN, B., LAWRENCE, H. *Tissue Engineering: Roles, Materials and Applications.* New York: Nova Science Publishers, 2008.
- TIPTON, A., MIDDLETON, J. *Biomaterials*, 2000, p. 23-35.
- KHON, J., PACHENCE, J. *Principles of tissue engineering.* New York, Academic Press, 1997, p. 273
- BHARDWAJ, N., KUNDU, C. *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique.* Biotechnology Advances, 2010, p. 325-347.
- BURGER, C., HSIAO, B., CHU, B. *Nanofibrous materials and their Applications.* Annual Materials Research, 2006.

