



B IOMATERIAIS APLICADOS AO
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS
TERAPÊUTICOS AVANÇADOS

B IOMATERIALES APLICADOS
AL DISEÑO DE SISTEMAS
TERAPÉUTICOS AVANZADOS

Hermínio C. de Sousa
Mara E. M. Braga
Alejandro Sosnik
(editores)

CAPÍTULO 9. NANOFIBRAS ELECTROHILADAS PARA USOS TERAPÉUTICOS

Florencia Montini Ballarin, Pablo R. Cortez Tornello, Gustavo A. Abraham
Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales, INTEMA (UNMDP-CONICET). Av. Juan B. Justo 4302, B7608FDQ, Mar del Plata, Argentina.

Resumen:

Los materiales nanofibrosos poseen un enorme potencial para el desarrollo de matrices extracelulares de aplicación en ingeniería de tejidos y de nuevos sistemas para liberación de agentes terapéuticos. En este capítulo se presentan brevemente los fundamentos de la obtención de matrices nanofibrosas poliméricas o compuestas mediante la tecnología de electrohilado de soluciones. Aunque la técnica de electrohilado constituye una vía versátil para la producción de nanofibras, el proceso es sumamente complejo y depende de numerosos parámetros de procesamiento y propiedades intrínsecas de la solución. Se describen las principales variables que afectan el proceso, el equipamiento disponible comercialmente y los desarrollos recientes. En el campo biomédico, se presentan diversas formas de incorporación de células en matrices nanofibrosas, técnicas para incrementar el tamaño de poros y mejorar la infiltración celular y el comportamiento celular en estructuras nanofibrosas. Entre las principales aplicaciones en este campo, se discuten los actuales avances en investigación de matrices para ingeniería de tejidos (óseo, cartilaginoso, vascular, nervioso y piel) y en el desarrollo de matrices multifuncionales que permiten la liberación controlada de agentes

terapéuticos. Finalmente se menciona una perspectiva futura del desarrollo y las nuevas aplicaciones de los biomateriales nanofibrosos.

Palabras clave: Electrohilado; procesos electrohidrodinámicos; nanofibras; matrices porosas; ingeniería de tejidos; liberación de agentes terapéuticos.

Abstract

Nanofibrous materials have a huge potential for the development of both extracellular matrices for tissue engineering applications and new systems for therapeutic agents delivery. In this chapter, the fundamentals for preparation of polymeric or composite nanofibrous matrices by electrospinning of solutions are briefly presented. Although electrospinning is a versatile technique for nanofiber production, the process is very complex and it depends on numerous processing parameters and intrinsic properties of the solution. The main variables that affect the process, the commercially available equipment and recent developments are described. In the biomedical field, several strategies for cell incorporation, techniques for pore enlargement and cellular infiltration improvement as well as cell behavior in nanofibrous structures, are presented. Among the main applications in the biomedical field, the ongoing research advances in tissue engineering (bone, cartilage, vascular, nerve and skin) and the development of multifunctional matrices for controlled release of therapeutic agents are discussed. Future perspectives on development and new applications of nanofibrous biomaterials are finally mentioned.

Keywords: Electrospinning; electrohydrodynamic processes; nanofibers; scaffolds; tissue engineering; therapeutic agent release.

9. Introducción

9.1. Nanofibras

Las nanofibras son estructuras nanométricas en forma de fibras, tubos, cintas, varillas y cables, que debido a su escala presentan propiedades nuevas que no están presentes en estructuras de igual composición y tamaño macroscópico. La *National Science Foundation* (NSF) considera que las nanofibras presentan un diámetro inferior a 100 nm. En la industria de los hilados no tejidos y en la literatura científica del ámbito biomédico, no obstante, se consideran las propiedades que presentan los sistemas nanofibrosos y no tan estrictamente las dimensiones, abarcando diámetros inferiores al micrón. Existen numerosas técnicas para la obtención de nanofibras, como por ejemplo estiramiento, patrones de diseño, separación de fases, auto-ensamblado, electrohilado, entre otras [1]. Las nanofibras presentan un enorme potencial para mejorar significativamente las tecnologías actuales, así como también para desarrollar nuevas aplicaciones. El diámetro submicrométrico, la elevada relación superficie volumen (por ejemplo, las nanofibras con diámetros de 100 nm presentan una superficie de 50 m² por gramo de material), la baja densidad y alta porosidad presente entre las fibras genera excelentes propiedades en los productos nanofibrosos finales. Las nanofibras presentan alta reactividad superficial, conductividad térmica y eléctrica, y propiedades mecánicas superiores como resultado de su dimensión [2].

La posibilidad de producir fibras de distintos materiales, con morfología y porosidad a medida, sumado a las excelentes propiedades intrínsecas a su tamaño, hacen que estas estructuras resulten apropiadas para numerosas aplicaciones [1, 3-6]. Entre los más estudiados se encuentran dispositivos biomédicos, tales como sistemas de liberación controlada de fármacos y principios activos e ingeniería de tejidos; productos de consumo, tales como prendas de vestir, productos de limpieza y de cuidado personal; hasta productos industriales de catálisis, filtrado, barrera y aislamiento, almacenamiento de energía, pilas de combustible, capacitores, transistores, separadores de baterías, microfluídica, sensores, óptica

y nanocables para aplicaciones en nanoelectrónica, fibras compuestas para refuerzo de materiales, tecnología de la información y aplicaciones de alta tecnología en el sector aeroespacial.

9.2. Procesos electrohidrodinámicos

Los procesos electrohidrodinámicos han sido de interés por muchos años [7]. En 1745, Bose creó un spray en aerosol al aplicar una alta tensión a un líquido en la punta de un capilar de vidrio. Lord Rayleigh calculó la máxima carga que una gota puede soportar antes de que las fuerzas eléctricas superen la tensión superficial de la gota. En 1917, Zeleny describió y fotografió el fenómeno de electrospraying. Taylor analizó las condiciones a las que es sometida una gota deformada por un campo eléctrico, y mostró que una interface cónica es estable si el cono tiene un semi-ángulo de $49,3^\circ$. En 1934, Formhals publicó la primera patente de electrohilado, pero la aplicación de estos procesos en ciencia de materiales no ocurrió hasta principios de los 90 como se observa en el enorme incremento de publicaciones y patentes en el tema [8].

Los procesos electrohidrodinámicos más usados en nanotecnología de materiales involucran las técnicas de electropulverizado (*electrospraying*) y electrohilado (*electrospinning*). El electropulverizado consiste en la atomización de un líquido (típicamente una solución diluida) mediante el empleo de un campo eléctrico de alta tensión. El campo eléctrico produce fuerzas eléctricas que estiran el menisco de la gota pendiente de un capilar, formando entonces un microchorro que luego es atomizado en gotas finas. Estas gotas pueden ser de tamaño submicrónico, con una distribución de tamaños angosta. La técnica de electropulverizado se usa en la producción de nanopartículas, deposición de films finos, y para la formación de capas funcionales. Cuando la viscosidad del líquido alcanza un valor crítico, el microchorro sufre otro tipo de inestabilidades y se forma una fibra continua de tamaño submicrónico, proceso conocido como electrohilado. Estos procesos electrodinámicos son impulsados solamente por el efecto del campo eléctrico aplicado. La morfología de las fibras o gotas depende fuertemente del peso molecular del

polímero, los enmarañamientos de las cadenas poliméricas, el/los solvente/s empleados, y la concentración de la solución, entre otros factores [9].

9.2.1. Proceso de electrohilado

La tecnología de electrohilado constituye uno de los métodos de procesamiento de vanguardia que presenta mayores ventajas para la producción de nanofibras. La técnica tiene la habilidad única de producir nanofibras de diferentes materiales y geometrías, bajo costo, relativamente alta velocidad de producción y simplicidad en el diseño del equipamiento. En los últimos años, se han electrohilado numerosos tipos de materiales que incluyen prácticamente todos los polímeros sintéticos y naturales que sean solubles o puedan fundirse, y nanocompuestos, para obtener fibras continuas de unos pocos nanómetros hasta algunos micrones que generan una membrana hilada no tejida altamente porosa [10]. Las fibras resultantes no requieren de una etapa extensa de purificación como, por ejemplo, los whiskers submicrométricos, las nanovarillas inorgánicas y los nanotubos de carbono.

Aunque la técnica de electrohilado constituye una vía versátil para la producción de nanofibras, el proceso es sumamente complejo y depende de numerosos parámetros. El diseño experimental básico para electrohilado de soluciones consta de cuatro componentes (Figura 9.1): un *reservorio* de solución o material fundido, una *bomba de infusión* que permite suministrar un flujo constante y controlado de solución, una *fuerza de alta tensión* y un *sistema colector* sobre el que se deposita el material electrohilado. Al aplicar una tensión de 5 - 30 kV, la solución polimérica se electrifica fuertemente. Se generan cargas inducidas que se distribuyen sobre la superficie de la gota de solución polimérica que pende de una boquilla. La gota experimenta un conjunto de fuerzas: fuerza de repulsión coulombica entre las cargas presentes, fuerza electroestática producto del campo eléctrico externo generado al aplicar la tensión, fuerza gravitatoria, fuerzas viscoelásticas que dependen del polímero y solvente, y la tensión superficial que se opone al estiramiento y afinamiento de la gota. Bajo

la acción de estas interacciones, la gota se distorsiona en forma cónica, fenómeno conocido como cono de Taylor.

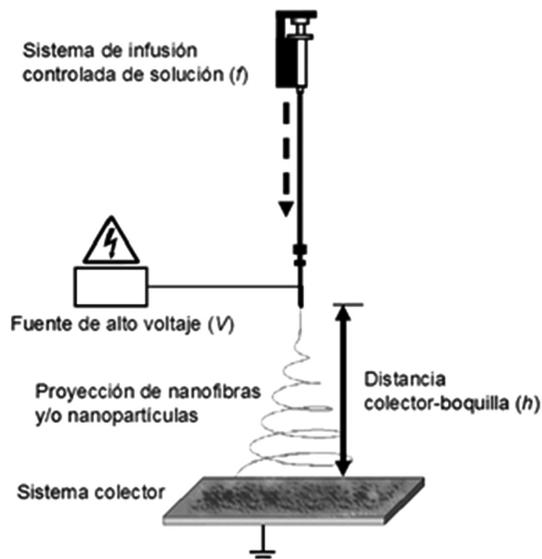


Figura 9.1. Montaje experimental básico para electrohilado de soluciones.

En estas condiciones el balance de fuerzas llega a un equilibrio. Cuando las fuerzas electroestáticas repulsivas superan la tensión superficial del polímero, se produce una situación inestable que provoca la expulsión de un microchorro líquido cargado desde la boquilla del capilar. Este microchorro electrizado sufre estiramiento y movimientos tipo latigazo (*whipping*), dando lugar a la formación de hilos largos y delgados. A medida que el chorro líquido se deforma continuamente y se evapora el solvente (o solidifica el fundido), las cargas superficiales aumentan conduciendo a una disminución drástica del diámetro de las fibras. Los entrecruzamientos físicos de las cadenas poliméricas permiten dar continuidad al microchorro, formando fibras que se depositan en el sistema colector que se encuentra conectado a tierra [2-3].

Las propiedades intrínsecas de la solución y los parámetros que afectan el procesamiento tienen un efecto directo en las fuerzas que dominan al proceso de electrohilado y la obtención de fibras con distinta morfología, estructura y tamaño.

9.2.2. Parámetros de la solución

Se ha demostrado que los parámetros de la solución influyen notablemente en la obtención de fibras y en la morfología de las mismas. Se describen a continuación algunos de los parámetros más importantes a considerar [2, 11-12].

Efecto de la concentración: Se requiere de una concentración crítica para que los entrecruzamientos físicos de las cadenas poliméricas permitan la formación de fibras bajo la acción del campo eléctrico aplicado. Si la concentración de polímero se encuentra debajo de una concentración crítica, los entrecruzamientos físicos entre las cadenas poliméricas no alcanzan a contrarrestar estas fuerzas y el microchorro se rompe, obteniendo un pulverizado de gotas (Figura 9.2a). Un incremento de la concentración puede formar una morfología de gotas conectadas por fibras. La concentración crítica para la cual se obtienen fibras uniformes varía con cada sistema analizado, y depende del peso molecular del polímero (a mayor peso molecular del mismo polímero, menor concentración para igual sistema de solventes), y de la viscosidad de la solución entre otros. Por otro lado, una vez alcanzada la concentración crítica para la obtención de nanofibras (Figura 9.2b), el incremento de la misma produce un aumento en el diámetro medio de las fibras.

Viscosidad: La viscosidad de la solución polimérica está relacionada con el peso molecular del polímero disuelto y el solvente. A mayor peso molecular, mayor es la viscosidad de la solución. La viscosidad actúa contrarrestando las fuerzas de estiramiento producidas por la repulsión electrostática del microchorro cargado. Aumentar la viscosidad ayuda a obtener un microchorro estable y por lo tanto fibras libres de gotas. La viscosidad de la solución se puede aumentar incrementando el peso molecular del polímero, la concentración de la solución polimérica, o incluso también con el agregado de polielectrolitos en pequeñas cantidades que permiten incrementar la viscosidad sin modificar la concentración. Si bien la viscosidad de la solución influye significativamente en generar fibras lisas, no necesariamente determina la concentración crítica a la cual se obtienen fibras por electrohilado.

Solventes: Los solventes utilizados influyen y determinan varios aspectos del proceso de electrohilado. En primer lugar afectan la conformación de las cadenas poliméricas en solución, e influyen en la facilidad del transporte de la carga del microchorro. Tanto el momento dipolar como la conductividad de la solución determinan la obtención o no de fibras electrohiladas, así como también el tamaño de las mismas. A mayor polaridad del solvente se obtienen fibras de menor diámetro. La velocidad de solidificación del microchorro también está determinada por el solvente o mezclas de solventes utilizados. Cuanto menor es la temperatura de ebullición del solvente mayor será la velocidad de solidificación del microchorro. No obstante, en ocasiones la solidificación puede ser muy rápida produciendo una obstrucción en la boquilla. Por otra parte cuando la temperatura de ebullición es muy elevada, las fibras alcanzan el colector con una cantidad considerable de solvente que produce un film por aglomeramiento. El empleo de mezclas de solventes de bajo y alto punto de ebullición permite balancear esta situación.

Conductividad: La conductividad de la solución polimérica es fundamental en la producción de fibras por electrohilado, dado que influye en la repulsión electrostática de las cargas superficiales presentes en la solución. La conductividad puede incrementarse por agregado de partículas conductoras o iones a la solución o seleccionando un solvente con mayor polaridad. El aumento de la conductividad de la solución también tiene un efecto en la disminución el diámetro medio de fibras.

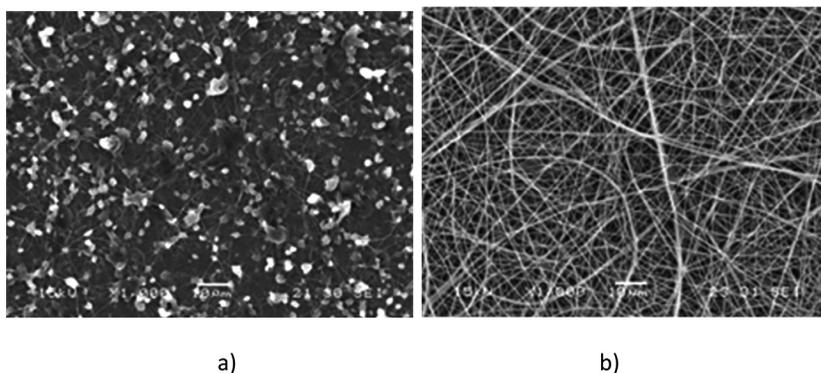


Figura 9.2. Micrografía de SEM de la estructura poliuretánica electrohilada de una solución en DMF:THF 50:50 (a) 6% m/V y (b) 12,5% m/V, $f = 1$ mL/h; $V = 12$ kV; $d = 10$ cm.

Tensión superficial: La tensión superficial de la solución es la fuerza principal a vencer para lograr el estiramiento del microchorro y la producción de nanofibras. Cuanto mayor es la tensión superficial, mayor cantidad de cargas superficiales y tensión aplicada se requerirá en el proceso. Dado que el solvente determina la tensión superficial de la solución, sería ideal emplear un solvente con baja tensión superficial. Sin embargo, la concentración y la naturaleza química del polímero también determinan la tensión superficial. En general, el aumentar la concentración polimérica de la solución disminuye la tensión superficial. Otra forma de disminuir la tensión superficial, es con el agregado de surfactantes a la solución.

Constante dieléctrica: La constante dieléctrica de una solución es una medida de la capacidad para mantener cargas eléctricas en la solución. Cuanto mayor es la constante dieléctrica de la solución, con más facilidad se obtendrán fibras uniformes y de menor diámetro medio. La constante dieléctrica de una solución se puede variar reemplazando el solvente o una fracción del mismo por uno con mayor o menor constante dieléctrica.

Factores ambientales: Por último, si bien en la mayoría de los casos se realiza el proceso de electrohilado en atmósfera de aire, también puede realizarse en presencia de nitrógeno u otros gases que modifican el proceso de secado del microchorro y la pérdida de cargas eléctricas superficiales al ambiente. Otras condiciones ambientales que afectan el secado del microchorro son la temperatura y humedad ambiente. En particular, la elevada humedad ambiente genera nanofibras con poros superficiales. Esto se debe a que gotas de agua se depositan sobre la superficie del microchorro, debido al enfriamiento del mismo por la evaporación del solvente. Los poros se producen cuando el solvente y el agua se evaporan.

9.2.3. Parámetros de procesamiento

Los parámetros del proceso de electrospinning también poseen una notable influencia en la obtención de fibras y en la morfología de las

mismas. A continuación se describen resumidamente los aspectos más importantes a tener en cuenta: [2, 11-12].

Tipo de colector: El colector conductor plano es el más usado para producir una membrana nanofibrosa con orientación al azar (Figura 9.3a). Existe una variedad de colectores para favorecer la obtención de membranas con una orientación determinada o para definir estructuras macroscópicas en la membrana. Uno de los colectores más populares es el colector rotatorio, ya sea en la forma de cilindro o como disco (Figura 9.3b). La velocidad de rotación es el factor dominante en el grado de alineación de las fibras. Si bien el colector de disco produce una mejor alineación, el cilindro de diámetro grande genera una membrana de mayor tamaño. Para mejorar la alineación, se han desarrollado cilindros con barras paralelas con separación de 2-3 cm, combinando el efecto de la rotación con la modificación del campo eléctrico. Otro tipo de colectores rotatorios son los cilindros de pequeño diámetro (< 6 mm), estos son de gran interés ya que permiten desarrollar estructuras 3D ideales para ingeniería de injertos vasculares. Este tipo de colector no presenta un efecto significativo en la morfología o el tamaño de fibra obtenido. Los colectores de placas paralelas (Figura 9.3c) también pueden producir membranas con fibras alineadas. Si bien estos colectores logran alinear las nanofibras, algunos con gran efectividad, el tamaño de la membrana obtenida es reducido. El colector de punta produce membranas de gran superficie con nanofibras alineadas, y se presenta como una alternativa a los colectores existentes. En este caso las fibras son eyectadas una a la vez y se alinean por repulsión electroestática entre la fibra ya depositada y la nueva (Figura 9.3d).

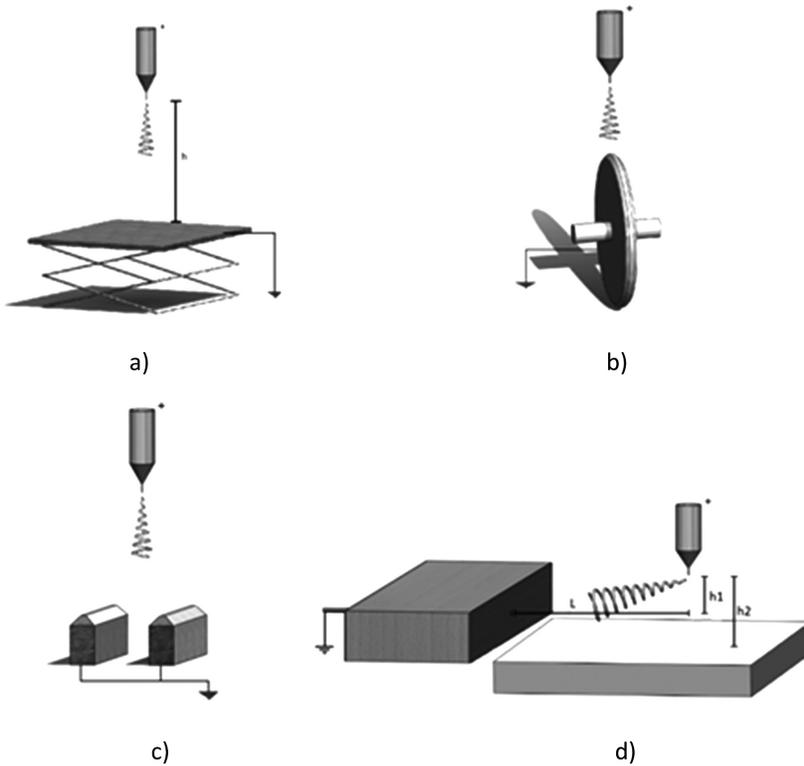


Figura 9.3. Algunos tipos de colectores utilizados en el proceso de electrohilado: (a) colector plano, (b) colector rotatorio de disco, (c) placas paralelas, y (d) colector de punta.

Material del colector: El material del colector influye en la estructura de la membrana obtenida. Por lo general, se utilizan colectores conductores conectados a tierra, ya que de esta manera el exceso de carga presente en la nanofibras depositadas es eliminado permitiendo un empaquetamiento compacto de las mismas. No obstante, en algunas aplicaciones se han utilizado colectores no conductores y se han obtenido empaquetamientos menos densos de fibras. Incluso, altos tiempos de deposición o una alta velocidad de flujo pueden producir empaquetamientos poco densos de fibras. En estos casos, donde una capa considerable de fibras no conductoras cubre el colector, la eliminación de cargas se dificulta obteniendo un efecto similar al de tener un colector no conductor. La deposición de nanofibras en agua antes de la colección por un colector

conectado a tierra produce un efecto significativo en la morfología de las fibras obtenidas y también aumenta la densidad de empaquetamiento.

Tensión aplicada: La tensión aplicada a la solución polimérica, carga superficialmente la misma, generando las fuerzas electroestáticas necesarias para vencer la tensión superficial. El efecto que tiene este parámetro en las nanofibras obtenidas depende fuertemente del sistema estudiado y de las otras variables en juego, como la concentración o la distancia boquilla-colector. Se ha demostrado que al aumentar la tensión aplicada se producen mayores cargas superficiales, lo que favorece el afinamiento del microchorro, resultando en fibras de menor diámetro. Sin embargo, una tensión alta aplicada también produce la evaporación más rápida del solvente y en consecuencia puede suprimir etapas de estiramiento y disminución del diámetro del microchorro, obteniéndose en algunos casos fibras de mayor tamaño del esperado. En algunos casos no se observa ninguna tendencia en el diámetro al variar la tensión aplicada.

Velocidad de flujo: Para que el proceso de electrohilado sea satisfactorio debe existir un equilibrio entre la velocidad a la cual la solución es dosificada y la velocidad de remoción de la misma por efecto del campo eléctrico aplicado. Por lo general, la velocidad de flujo es controlada mediante una bomba que infunde la solución a una velocidad constante determinada por el usuario. Si bien el mayor efecto de este parámetro es la obtención o no de un microchorro continuo, el aumento de la velocidad de flujo aumenta el diámetro medio de fibras, aunque se debe tener en cuenta que si la cantidad de solvente en el colector es apreciable se perderá la estructura fibrosa por disolución de las fibras.

Boquilla capilar: El diámetro interno de la boquilla influye en el diámetro de las nanofibras, y en la velocidad de evaporación del solvente en la boquilla. Al disminuir el diámetro interno de la boquilla aumenta la tensión superficial de la solución, por lo tanto a igual tensión aplicada se necesita de una mayor fuerza coulombica para vencerla. La aceleración del microchorro disminuye y posee mayor tiempo de estiramiento y elongación antes de ser depositado en el colector, generando fibras de menor diámetro. Los sistemas de producción industrial emplean un sistema de dosificación sin boquillas evitando la interferencia eléctrica

que se genera cuando se utilizan simultáneamente múltiples boquillas. Las boquillas coaxiales permiten obtener nanofibras con un núcleo interno y un recubrimiento exterior o nanofibras huecas.

Distancia boquilla-colector: Este parámetro influye directamente en el tiempo de vuelo del microchorro y en la fuerza del campo eléctrico aplicado. En consecuencia, variar este parámetro influye en el diámetro medio de fibras obtenidas y en su morfología. Si la distancia es alta, hay un mayor tiempo para que el microchorro se elongue y estire, lo que produce membranas con tamaño medio de fibra menor. No obstante, el aumentar la distancia se debilita la magnitud del campo eléctrico, resultando en menor estiramiento del microchorro y un mayor tamaño medio de fibra. Si la distancia es muy pequeña, la fuerza del campo eléctrico es mayor y se produce una mayor aceleración del microchorro, pero como el tiempo de vuelo también disminuye la evaporación del solvente es pobre.

9.2.4. Equipamiento

El equipamiento básico para el proceso de electrohilado, como se mencionó anteriormente, consiste en un reservorio de solución que alimenta una boquilla mediante una bomba de infusión, una fuente de alta tensión y un sistema colector. Con estos elementos se han montado equipos a escala laboratorio y se han obtenido nanofibras de muy buena calidad. Existe una amplia variedad de configuraciones que incluyen boquillas con desplazamiento en el plano x-y, boquillas rotacionales, roto colectores con traslación, arreglos con electrodos auxiliares, colectores criogénicos, entre otras posibilidades. En base a los requerimientos y descubrimientos de los distintos grupos de investigación, se han desarrollado equipos comerciales que contemplan todas estas modificaciones con particular cuidado en el control y automatización del proceso. Los equipos NEU[®] de Kato Tech Co., Nanon[®] de MECC Co., NaBond Technologies Co., Limited, Electroris[®] de Fanavarán Nano-Meghyas, ElectroSprayer[®] de Fulence Co.,Ltd. Yflow[®] Nanotechnology Solutions, e IME Technologies

se encuentran actualmente en el mercado y cuentan con distinto tipo de boquillas, colectores y otros accesorios.

Para la producción industrial de membranas electrohiladas existen varias estrategias [13-14]. El equipo NanoSpinner de NanoFMG Group emplea un sistema de multi-boquilla para aumentar el área de membrana producida, permitiendo la producción en masa. No obstante, estos equipos presentan repulsión entre los microchorros, que pueden disminuir la velocidad de producción y la calidad de las fibras obtenidas. Eliminar estas interferencias por completo no es factible, y más aún la limpieza de las boquillas resulta difícil de realizar. Por estos motivos se han desarrollado una gran variedad de sistemas para sobrellevar estas dificultades. Como por ejemplo se puede mencionar el empleo de cilindros con orificios, alambres enroscados cónicos, electrohilado a partir de placas conductoras, cilindros y conos rotatorios [15], para nombrar algunos. Los sistemas sin boquillas se presentan como la solución para evitar los problemas producidos por los sistemas de boquillas. En estos equipos un cilindro, colocado en un reservorio de solución polimérica, rota a una velocidad dada, se impregna de la solución y luego por la aplicación de un campo eléctrico (de mayor intensidad que cuando se emplean boquillas) forma conos de Taylor en la superficie del cilindro. Esta tecnología está patentada por la empresa Elmarco® y aplicada a su equipo nanospider™ para producción industrial.

9.2.5. Desarrollos recientes

El procesamiento de electrohilado presenta una nueva tecnología novedosa para el desarrollo de membranas nanofibras para diversas aplicaciones. No obstante, para algunas aplicaciones específicas puede presentar limitaciones. En los últimos años el equipamiento clásico se ha adaptado para cubrir aplicaciones específicas.

Electrohilado con distancia reducida entre los electrodos: La necesidad de producir patrones superficiales mediante la deposición selectiva de nanofibras en arreglos espaciales y geometrías específicas resulta de interés en aplicaciones de nanofluídica, superficies hidrofóbicas, y el desarrollo

de estructuras jerárquicas para circuitos de nanofotónica y nanoelectrónica [16]. Estos diseños se obtienen mediante el arreglo de los electrodos en geometrías específicas o el conformado de las nanofibras en el patrón deseado luego del electrohilado de las mismas. En los últimos años se ha desarrollado el electrohilado de campo cercano (*near field electrospinning*) [17], en donde una gota de solución pende de una punta de microscopio de fuerza atómica y con la aplicación de un campo eléctrico es dirigida a un electrodo opuesto situado a una distancia menor a los micrones. La solución se elonga y estira, depositándose en forma de fibras cortas en un colector en movimiento. Otro enfoque, llamado electrohilado de alta precisión (*high precision deposition electrospinning*) toma el sistema de boquilla-colector estándar y reduce la distancia entre los electrodos a un rango de unos pocos micrones hasta el milímetro. La disminución de la distancia en esa magnitud disminuye el área de deposición de las fibras, lo que produciría problemas con la evaporación del solvente y/o supresión de inestabilidades y consecuentemente del afinamiento de las fibras. Sorprendentemente, se obtienen nanofibras depositadas selectivamente, de tamaño, orientación y geometría controladas. Esta tecnología permite aplicaciones del proceso de electrohilado en el área de sensores, microfluídica y modificación superficial de implantes.

Electrohilado coaxial y triaxial: Como se mencionó anteriormente, El empleo de dos o más boquillas concéntricas permite la obtención de nanofibras con estructura de cáscara-núcleo. Esta técnica también es útil para electrohilar soluciones que no son óptimas para el proceso de electrohilado, utilizando la solución difícilmente electrohilable en el núcleo central y una solución fácil de procesar en la cáscara que puede ser removida posteriormente de manera selectiva. De igual modo se obtienen fibras huecas al eliminar selectivamente el componente del núcleo. También se han producido fibras cerámicas huecas, al realizar un tratamiento de sinterizado posterior a la extracción del núcleo. Otra ventaja de esta técnica es la obtención de fibras con doble funcionalidad, utilizando un material con integridad estructural en la cáscara y un fármaco, agente bioactivo o biológico en el interior, de alto interés en aplicaciones terapéuticas [16]. En particular, dado que las cargas eléctricas

se encuentran en la superficie del microchorro, los agentes dispersos en la solución del núcleo no están sometidos a estas interacciones pero sí al proceso de estiramiento y elongación. Es importante mencionar que durante la infusión las dos soluciones no están en contacto, solo toman contacto en la punta de la boquilla. De este modo la solución destinada al núcleo de la nanofibra se infunde en el centro del dispositivo y la solución de la cáscara en la cavidad anular entre los tubos concéntricos.

Fibras con estructura de cáscara-núcleo y huecas por medio de plantillas: Otra forma de obtener nanofibras con estructura de cáscara-núcleo o tubos huecos es utilizando las nanofibras electrohiladas como plantillas (*tubes by fiber templates, TUFT*) y depositando sobre ellas un recubrimiento polimérico, metálico o cerámico mediante deposición por fase vapor (*vapor phase deposition*) o recubrimiento por inmersión (*dip coating*) [16]. Empleando la técnica de deposición por fase vapor se obtuvieron recubrimientos delgados uniformes de 50 nm. Esta metodología permite la obtención de nanofibras con multicapas de distintos materiales con morfología específica. Esto es de particular utilidad para la liberación controlada de agentes bioactivos. Los agentes bioactivos se suspenden en la solución electrohilada y luego se realiza un recubrimiento sobre las nanofibras obtenidas por esta técnica, en donde se puede seleccionar el o los materiales del mismo para la liberación del fármaco en un tiempo o ambiente determinado. Con los mismos efectos se ha utilizado la técnica de recubrimiento por inmersión, para obtener nanofibras con estructura de cáscara-núcleo. Sin embargo, la solución puede no cubrir uniformemente toda la superficie. También se obtuvieron nanofibras huecas al remover el polímero usado como plantilla luego de la deposición del material de la cáscara y tubuladuras con rugosidad interna al usar plantillas de nanofibras con porosidad superficial.

Nanofibras con porosidad superficial: El área superficial de membranas electrohiladas se puede aumentar más aún al introducir porosidad superficial en las fibras. Esta morfología resulta atractiva para aplicaciones en sensores, catalizadores o liberación de agentes bioactivos. Entre las técnicas disponibles se encuentra la remoción de un componente en fibras de dos componentes. Ésta consiste en disolver dos polímeros

termodinámicamente inmiscibles en un mismo solvente. Se procesa la solución mediante electrohilado y se produce una separación de fases de los dos componentes *in situ*. Luego de la extracción de uno de los polímeros con un solvente que solo disuelve uno de los componentes, se obtienen nanofibras con porosidad superficial. Otra técnica se basa en la separación de fases durante el proceso de electrohilado de una solución de un solo polímero con un solvente volátil. Bajo ciertas condiciones de procesamiento se produce la separación de fases inducida termodinámicamente en la superficie del microchorro. Las zonas en donde el solvente es pobre solidifican en fibras, mientras que las zonas donde hay mayor contenido de solvente forman poros superficiales. Esta técnica puede ser promovida al enfriar el colector o el microchorro y obtener el mismo efecto para solventes no tan volátiles [2].

9.2.6. Otros métodos para producción de nanofibras

Las nanofibras poliméricas se pueden fabricar empleando diferentes métodos que utilizan técnicas físicas, químicas y térmicas. En el ámbito biomédico, los métodos más comúnmente usados incluyen, además de electrohilado, separación de fases, auto-ensamblado, y en menor extensión métodos bacteriales, patrones de diseño y extracción [18-20].

Separación de fases [18]: la separación de fases de una solución polimérica puede inducirse por un cambio en la temperatura, por la introducción de un líquido que no es solvente de la fase polimérica, o bien por polimerización.

La separación de fases inducida térmicamente (*thermally-induced phase separation, TIPS*) permite obtener morfologías nanofibrosas. En esta técnica se parte de un sistema multicomponente homogéneo que en determinadas condiciones se torna termodinámicamente inestable y tiende a separar en fases para disminuir la energía libre del sistema. La separación de fases líquido-líquido de una solución polimérica con temperatura crítica de solución superior se induce disminuyendo la temperatura. El sistema se separa en dos fases, una fase rica en polímero y otra pobre, formando

una estructura bicontinua. La fase rica en polímero solidifica después de la eliminación del solvente mediante liofilización y se obtiene la matriz con arquitectura macroporosa. Aunque originalmente esta técnica se ha empleado con poli(ácido L-láctico) (PLLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico (PGLA), su empleo se ha extendido a otros polímeros tales como polihidroxialcanoato, quitosano, gelatina y materiales compuestos con biocerámicos. Entre las ventajas de esta técnica se encuentran la posibilidad de incorporar moléculas bioactivas a las matrices sin disminuir la actividad de las moléculas por medio térmico o químico, la alta reproducibilidad, la producción de muestras en moldes que pueden adoptar una geometría particular y el empleo de equipamiento no especializado. Las desventajas están asociadas al escaso número de polímeros que pueden procesarse y la dificultad para el escalado comercial. Por otra parte, un pequeño cambio en los parámetros del proceso: tipo de polímero, concentración de la solución polimérica, relación disolvente/no disolvente y principalmente el programa térmico, puede afectar significativamente la morfología del soporte poroso resultante.

Auto-ensamblado molecular (molecular self-assembly) [21]: constituye otro campo de investigación emergente, especialmente cuando se trata de estructuras biológicas de tamaño nanométrico o texturizado. El auto-ensamblado es la organización autónoma de átomos, moléculas y agregados moleculares en patrones o estructuras sin intervención externa. El auto-ensamblado está mediado por fuerzas secundarias no covalentes tales como interacciones iónicas (electrostáticas), enlaces puente de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones de van der Waals para formar entidades estructuralmente bien definidas y estables (filmes, bicapas, membranas, nanopartículas, fibras, micelas, cápsulas, tubos, mesofases o vesículas). El auto-ensamblado de macromoléculas naturales o sintéticas produce estructuras con arquitectura supramolecular nanométrica y en determinadas condiciones nanofibras. Esta estrategia también se emplea en el desarrollo de materiales nanofibrosos con potencial aplicación como matrices para ingeniería de tejidos. Los hidrogeles basados en proteínas proporcionan, además de su capacidad de gelación *in situ*, las condiciones necesarias para la proliferación celular y formación de tejidos.

Para emular la estructura triple helicoidal del colágeno se han sintetizado diversos péptidos anfifílicos, que forman nanofibras supramoleculares de 5-8 nm de diámetro y más de 1 μm de longitud. Los copolímeros en dibloque y dendrímeros pueden también formar nanofibras. En comparación con la técnica de electrospinning, el auto-ensamblado produce nanofibras de menor diámetro (menores a 10 nm), pero requiere de procedimientos más complejos y técnicas extremadamente elaboradas. Estas desventajas se suman a la baja productividad de la técnica.

Métodos bacteriales [18]: las nanofibras de celulosa pueden obtenerse por síntesis bacterial empleando acetobacter, que polimeriza residuos de glucosa en cadenas seguida por la secreción extracelular, ensamblado y cristalización de cadenas en forma de cintas. De esta manera se producen nanofibras de celulosa de menos de 10 nm de diámetro, pudiendo también emplear diferentes cepas y agregar polímeros al medio de cultivo para producir copolímeros.

Patrones de diseño (templating) [18]: las nanofibras poliméricas también pueden obtenerse empleando patrones de diseño tales como redes de alúmina porosa. Las nanofibras se separan por despegado mecánico o destrucción del molde. Los procesos de extracción mediante tratamientos mecánicos y químicos de materiales naturales permiten obtener fibras de celulosa de 10 a 120 nm de diámetro y longitud de hasta varios micrones.

9.3. Aplicaciones biomédicas

Las matrices nanofibrosas poseen la capacidad de imitar la estructura de las matrices extracelulares ejerciendo una marcada influencia en la proliferación y diferenciación celular tanto *in vitro* como *in vivo*. Dos de sus características, elevada relación área/volumen y elevada porosidad, resultan de primordial importancia para esta aplicación, dado que facilitan la migración celular a través del implante, permitiendo la difusión de productos tales como sustancias propias de desecho celular y/o agentes terapéuticos que estimulen la adhesión, proliferación y diferenciación celular. El control del diámetro de fibras, área superficial,

porosidad y tamaño de poro permite la obtención de matrices biomiméticas para la regeneración de diversos tejidos.

9.3.1. Incorporación de células en matrices nanofibrosas

La incorporación de células en matrices nanofibrosas es aún un desafío de la ingeniería de tejidos [18]. Entre los métodos explorados se encuentran, la incorporación de células en el interior de las matrices nanofibrosas durante el proceso de fabricación y la migración de células *in vitro* en la matriz o mediante el implante de células huésped del tejido *in vivo*.

La incorporación directa de las células en materiales nanofibrosos durante el proceso de fabricación se realiza mediante pipeteado de suspensiones celulares durante la deposición de las nanofibras. Otro método consiste en la deposición de nanofibras sobre un anillo cargado incorporado en un medio de cultivo, realizando dosificaciones intermitentes de células durante el proceso. En este caso se consigue la incorporación uniforme de células y la ausencia de toxicidad por eliminación de solvente residual. La posibilidad de infiltrar células de músculo liso mediante electropulverizado durante el proceso de electrohilado es una estrategia abordada recientemente para favorecer la integración celular uniforme en matrices nanofibrosas [22].

9.3.2. Estructura de poros e infiltración celular

El control de la estructura de poros es un aspecto importante en la fabricación de matrices porosas y afecta directamente la infiltración celular. El electrohilado permite un control limitado de la estructura de poros y el tamaño de poros depende del diámetro de las fibras. El tamaño de poro puede disminuir la infiltración celular. Incluso en algunos casos, la infiltración puede verse limitada a una delgada capa de células en la parte superior de la matriz, reduciendo la interacción célula-nanofibra sólo a las regiones externas, disminuyendo así su potencialidad para regeneración de tejidos en tres dimensiones [23].

La importancia de las estructuras porosas ha llevado al desarrollo de estrategias destinadas a aumentar el tamaño de poro de los materiales electrohilados, manteniendo al mismo tiempo las características nanofibrosas [18, 24]. Estas estrategias incluyen la lixiviación de partículas de sal mezcladas con las fibras durante la fabricación [25], la inclusión de cristales de hielo en el colector durante el procesamiento [26], la incorporación de fibras de sacrificio que se eliminan luego del proceso [27] y la introducción de micro-orificios mediante litografía ultravioleta de matrices nanofibrosas [28]. Aunque estas estrategias han conseguido aumentar efectivamente el tamaño de poros, se disminuye significativamente la resistencia mecánica. La utilización de un colector esférico con clavijas metálicas dispersas produce la formación de membranas nanofibrosas con mayor diámetro de poro y mejor infiltración celular. La combinación de capas de microfibras con nanofibras (por ejemplo PCL y colágeno) y de electrohilado con electropulverizado de partículas de hidrogel incrementa el tamaño de los poros y al mismo tiempo se favorece la interacción con las células [18].

La infiltración celular en poros pequeños se puede mejorar con la aplicación de fuerzas físicas tales como, vacío, perfusión de flujo o centrifugado, que incrementan la velocidad de infiltración celular, y el transporte de nutrientes para mejorar la viabilidad hacia las regiones más profundas [24]. A pesar de las mejoras alcanzadas, la infiltración celular en matrices nanofibrosas continúa siendo limitada.

9.3.3. Comportamiento celular en nanofibras poliméricas

En el medio biológico natural las células están expuestas a un complejo contexto de estímulos químicos y estructurales. Por lo tanto es muy importante imitar el medio natural en un cultivo celular *in vitro*. Las funciones celulares de proliferación, diferenciación, morfología y migración se controlan comúnmente mediante la modulación de la química del medio de cultivo. Existen cuatro componentes involucrados en el crecimiento, diferenciación, funciones y morfología de las células en la superficie de un biomaterial [18, 29], adsorción de componentes

del suero sanguíneo, secreción de componentes de matriz extracelular, adhesión celular y mecánica del citoesqueleto. La rugosidad superficial puede causar una adsorción selectiva de proteínas, comportamiento que adquiere importancia en materiales con una nanotopografía que muestra un área superficial extremadamente alta. Las nanoestructuras con dimensiones similares a las dimensiones de la matriz extracelular natural pueden influir en el comportamiento celular a través de mecanismos aún poco conocidos. El mayor conocimiento de las interacciones célula-sustrato podría proporcionar una información valiosa para el diseño de mejores matrices para ingeniería de tejidos.

La morfología celular es una característica importante para el diseño de matrices debido a su significado en el control del arreglo celular y los efectos traslacionales que la morfología tiene en otras funciones. Las células adoptan una morfología diferente frente a sustratos nanofibrosos (forma más redondeada) comparados con los sustratos planos, debido a la falta de organización de las fibras de actina del citoesqueleto. El comportamiento depende también del diámetro de las nanofibras. La alineación celular en forma unidireccional se encuentra en muchos tejidos tales como nervios, músculos esquelético y cardíaco, tendones, ligamentos y vasos sanguíneos, por lo tanto, es deseable que las matrices diseñadas para estos tipos de tejidos sean capaces de inducir arreglos celulares altamente alineados.

La fijación celular es otro factor críticamente importante. La arquitectura nanofibrosa tiene capacidad para fijación de células tales como fibroblastos, células madre de adipocitos, y células de músculo liso, significativamente superior a la fijación en superficies planas. La fijación puede incrementarse a través de una mejora del atrapamiento físico de las células que penetran hacia el interior de la matriz nanofibrosa y de la adhesión. Dependiendo de las condiciones y del tipo de célula, las nanofibras también incrementan o disminuyen la viabilidad y proliferación celular, comparadas con un sustrato plano. Además, algunos estudios muestran que las matrices nanofibrosas pueden incrementar la producción de matriz extracelular de las células residentes y que la matriz depositada se encuentra más organizada. El efecto de las nanofibras en la diferenciación selectiva de células madre hacia un linaje celular específico depende del tipo celular y las

condiciones, pudiendo promover, evitar o no tener un efecto apreciable en la diferenciación celular cuando se lo compara con una superficie plana. Finalmente, la migración celular en matrices extracelulares nanofibrosas es un proceso crítico para determinar el éxito de la regeneración de tejidos. El diseño de la matriz debe contemplar una conducción celular controlada, minimizando la formación de agregados y facilitando la migración a través de toda la matriz.

9.3.4. Matrices para ingeniería de tejidos

Los biomateriales empleados en un gran número de aplicaciones en ingeniería de tejidos y órganos deben interactuar con las células, y las estructuras tridimensionales que adopten deben comportarse como verdaderas matrices extracelulares. Sus características biomiméticas y sus excelentes propiedades físico-químicas, desempeñan un rol clave en la estimulación del crecimiento celular, participando en la regeneración del tejido como una guía [30]. Las propiedades mecánicas y biomiméticas de los nanomateriales, sumado a las modificaciones superficiales que pueden lograrse mediante funcionalización de la superficie, promueven una mayor cantidad de interacciones con las células y por lo tanto también el crecimiento del nuevo tejido [18, 31]. Las siguientes secciones presentan brevemente los aspectos interesantes de algunas aplicaciones seleccionadas.

9.3.4.1. Ingeniería de tejido óseo y cartílago

Los polímeros naturales tales como gelatina, colágeno y quitosano y los polímeros sintéticos, principalmente PLLA, PGA, PLGA y PCL son biocompatibles y biorreabsorbibles y presentan propiedades adecuadas para la obtención de matrices nanofibrosas para aplicaciones en ingeniería de tejido óseo y cartilaginoso [31]. El trabajo de Jang y colaboradores presenta un excelente resumen las estrategias seguidas actualmente en este campo [32]. Existen numerosos estudios de matrices poliméricas

nanoestructuradas biomiméticas que encapsulan células madre u osteoblastos. Las matrices fibrosas nanocompuestas de PCL/hidroxiapatita/gelatina mostraron niveles de proliferación osteoblástica, actividad de fosfatasa alcalina y mineralización, mayores a los observados en matrices nanofibrosas de PCL pura. Las nanofibras compuestas promueven la actividad de la fosfatasa alcalina osteoblástica y la expresión de genes marcadores de osteoblastos (RNAm), que participan en la diferenciación y crecimiento del tejido óseo tanto *in vitro* como *in vivo*.

Las matrices nanofibrosas poseen propiedades mecánicas que resultan ideales para el trasplante de células madre durante la reparación clínica del cartílago. El principal interés reside en la incorporación de condrocitos o células madre dentro de la matriz polimérica durante el proceso de electrohilado. Existen estudios de condrogénesis *in vitro* de células mesenquimales pluripotenciales en matrices nanofibrosas de PCL. Sin embargo, debido al pequeño tamaño de poros que poseen las matrices electrohiladas, la infiltración celular se dificulta produciendo una distribución irregular de las células. La estrategia utilizada actualmente, consiste en el sembrado de condrocitos para obtener una distribución homogénea de células en matrices nanofibrosas incubadas en biorreactores dinámicos.

9.3.4.2. Ingeniería de tejido vascular

Según reportó en 2011 la organización mundial de la salud, las enfermedades cardíacas isquémicas se presentan en la actualidad como las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Debido a la prevalencia de enfermedades vasculares, existe la necesidad de disponer de injertos vasculares de mayor eficacia que permitan reemplazar los vasos sanguíneos dañados u obstruidos, ya sea por engrosamiento de las paredes vasculares o formación de placas de ateroma (ateroesclerosis).

El tejido vascular es una estructura multicapa, que posee diversas características nanoestructuradas de acuerdo a la composición de colágeno y elastina presentes en las diferentes capas. Los materiales electrohilados presentan una alternativa prometedora para mejorar las funciones de los

tejidos vasculares dañados, tanto a nivel de músculo liso como de células endoteliales, para inhibir la trombosis e inflamaciones graves de las paredes vasculares [33]. Las matrices de colágeno/elastina/PLLA muestran una extensa infiltración celular de músculo liso. La estructura de fibrillas orientadas en la capa media de una arteria se ha imitado con estructuras nanofibras alineadas de PLLA-PCL obtenidas en un colector rotacional de disco. Las células del músculo liso de la arteria coronaria no sólo interactuaron favorablemente con la matriz polimérica, sino que además se orientaron a lo largo de las fibras, emulando el entorno natural. Por otro lado, se ha aprovechado la versatilidad de utilizar un colector rotatorio de diámetro pequeño para obtener injertos vasculares electrohilados. Se desarrollaron tubuladuras nanofibras a partir de polímeros sintéticos biodegradables o bioestables, y naturales; con estructura simple o bicapa; topología al azar y/o alineada. Las matrices poliuretánicas electrohiladas resultan adecuadas para aplicaciones en ingeniería de tejidos blandos, en particular en tejidos vasculares [34].

9.3.4.3. Ingeniería de tejido nervioso

Las matrices empleadas en ingeniería de tejidos nervioso deben cumplir propiedades de histocompatibilidad, mecánicas y eléctricas. La ausencia de histocompatibilidad en los materiales empleados, no sólo dificulta el crecimiento de nuevo tejido neuronal sino que además puede provocar inflamación o infecciones graves. Las propiedades mecánicas son necesarias para asegurar la durabilidad de la matriz durante el tiempo necesario para soportar físicamente la regeneración del tejido. Finalmente, las propiedades eléctricas ayudan a estimular y controlar el comportamiento de las neuronas bajo estimulación eléctrica, lo que permite a la matriz actuar como una guía eficaz para la reparación del tejido nervioso [12].

Existen aún muchas deficiencias en los materiales utilizados. Los soportes de silicona empleados como guías para la reparación de tejido neuronal, poseen limitaciones por la extensa formación de tejido cicatrizal alrededor del material. Las estructuras nanofibras poseen excelentes

características de histocompatibilidad y conductividad para impulsar la actividad neuronal y permiten encapsular células madre neuronales, células de Schwann, y laminina favoreciendo aún más la regeneración neuronal [31]. Dado que los nanotubos de carbono poseen excelente conductividad eléctrica y propiedades mecánicas y dimensiones nanométricas similares a las neuritas, se han empleado como guía para la regeneración axonal y mejora de la actividad neuronal. Además los nanotubos de carbono estimulan la diferenciación de las células madre, lo que resulta favorable para reparar el tejido nervioso dañado.

9.3.4.4. Ingeniería de tejido de la piel

La regeneración de piel empleando nanofibras electrohiladas ha recibido mucha atención para el tratamiento de pacientes que sufren daños por quemaduras agudas y heridas crónicas tales como pie diabético y úlceras de distinta etiología. Las propiedades biomiméticas de las matrices extracelulares electrohiladas resultan atractivas para estas aplicaciones, dado que poseen un comportamiento mecánico, físico y biológico adecuado para restaurar funcionalmente la dermis y epidermis [12]. Aunque las membranas electrohiladas poseen una enorme área superficial para el contacto con células, existen limitaciones en la infiltración celular. Sin embargo, las técnicas avanzadas para controlar el diseño de matrices, mencionadas brevemente en la Sección IX-3.2, permiten mejorar la infiltración y vascularización. La combinación con factores de crecimiento que promueven la regeneración de la piel, así como nuevos biomateriales que mejoran la interacción celular y angiogénesis en ausencia completa de contracción de la herida y fibrosis es actualmente un campo de intensa investigación.

9.3.5. Liberación controlada de agentes terapéuticos

La liberación de agentes terapéuticos e ingeniería de tejidos son dos áreas íntimamente relacionadas. Además de servir como matrices

extracelulares para la infiltración celular y el crecimiento de tejidos, las matrices nanofibrosas pueden diseñarse y funcionalizarse para actuar como portadores de factores bioactivos que induzcan una respuesta celular o tisular determinada [18]. La técnica de electrohilado ofrece una gran flexibilidad para seleccionar materiales poliméricos biodegradables o no degradables para aplicaciones en liberación controlada de agentes terapéuticos que incrementen la eficiencia de la ingeniería de tejidos. La investigación de nanofibras en el campo de liberación controlada se encuentra en una etapa inicial de exploración [35]. El proceso de liberación puede ocurrir por distintos mecanismos que incluyen difusión o mecanismos más complejos de difusión simultánea con degradación de la matriz [23]. En general el perfil de liberación depende de la calidad de la dispersión del agente en la matriz polimérica, el cual normalmente se disuelve en la solución polimérica antes del proceso de electrohilado (Figura 9.4). Dependiendo de las propiedades de los factores bioactivos y del polímero, este método puede conducir a que los agentes se encuentren homogéneamente dispersos en las fibras, o en forma agregados distribuidos aleatoriamente en las fibras o localizados en la superficie de la matriz nanofibrosa (Figura 9.5a). Esta aproximación posee algunas desventajas inherentes a la técnica, por ejemplo la liberación muy significativa de la droga en un periodo muy corto de tiempo en la etapa inicial [36]. Esta liberación puede considerarse indeseable en ingeniería de tejidos pero es necesaria en los casos en los que se requiere una liberación rápida, como es en el caso de las infecciones que pueden ocurrir en las primeras horas después de una cirugía. El perfil de liberación puede modificarse disminuyendo la extensión de la liberación inicial, mediante cambios en la composición del polímero por mezcla con otro polímero o copolimerización con otro monómero, o recubrimiento la superficie de las fibras con otro polímero.

Un método alternativo que permite sobrellevar alguna de estas desventajas consiste en la encapsulación de agentes terapéuticos en el centro de nanofibras poliméricas mediante electrohilado coaxial. Esta técnica produce nanofibras que incorporan el agente en el núcleo (*core*) que se recubre con una capa exterior de polímero (*shell*) (Figura

9.5b). Los dos componentes tienen normalmente diferente solubilidad en solventes orgánicos o en agua, lo que evita el mezclado de las dos fases durante el proceso. La liberación se produce a través de poros de la cubierta polimérica o simultánea con la degradación de la misma. Este sistema coaxial permite una eficiencia de carga elevada y un comportamiento de liberación controlada que en muchos casos supera al observado en otros métodos convencionales de encapsulación. La encapsulación de la enzima lactato dehidrogenasa (LDH) en nanofibras de poli(vinilalcohol) (PVA) se realiza empleando electrospinning coaxial [37]. Esta metodología tiene en cuenta la pobre solubilidad de la enzima en la solución de PVA. La enzima conserva su función catalítica después del procesamiento en nanofibras. Los perfiles de liberación de LDH muestran la potencialidad de este sistema de liberación controlada para el tratamiento clínico de la deficiencia de LDH.

La incorporación de factores bioactivos puede realizarse después de la fabricación de la matriz nanofibrosa, mediante técnicas de modificación superficial de adsorción o inmovilización, cada una de las cuales posee ventajas y desventajas propias (Figura 9.5c y 9.5d). Finalmente, los hidrogeles de péptidos auto-ensamblados pueden emplearse también como portadores, con perfiles de liberación dependientes de la estructura del hidrogel y del factor a liberar.

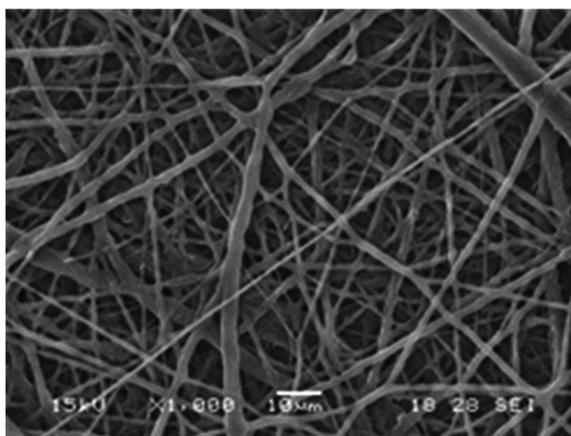


Figura 9.4. Micrografía de SEM de una membrana de PCL electrohilada incorporando embelina, principio activo pobremente soluble en agua.

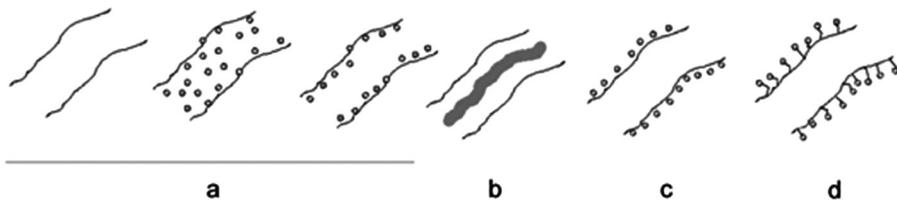


Figura 9.5. Formas de incorporación de agentes bioactivos en nanofibras. a) Incorporación por mezclado en la solución de electrohilado; b) electrohilado coaxial; c) adsorción superficial; d) inmovilización superficial.

Entre los agentes terapéuticos que se estudian en sistemas electrohilados se encuentran antibióticos con distinta solubilidad (hidrocloruro de tetraciclina, rifampicina, cefoxitina, ciprofloxacina, sulfato de gentamicina, ornidazol, mupirocin), antiinflamatorios no-esteroideos (naproxeno, salicilato sódico, diclofenaco sódico, ketoprofeno, indometacina), corticoides (acetado de dexametasona), anestésicos (lidocaína), antioxidantes (resveratrol), vitaminas (A y E), antifúngicos (itraconazol, ketanserín, ketoconazol), anticancerígenos (paclitaxel, doxorubicina, carmustina BCNU, cucurbitacina B, cucurbitacina I), anticoagulantes (heparina), extractos vegetales (centella asiática, embelina, chalconas), proteínas (principalmente factores de crecimiento, albúmina, lisozima) y plásmidos de ADN [38-40].

Aunque se han preparado muchos tipos de dispositivos de liberación empleando sistemas electrohilados, hasta la fecha no se reportaron resultados de experimentos clínicos, y los únicos trabajos realizados *in vivo* están principalmente asociados con la investigación en cáncer [35].

La liberación de antibióticos en la región abdominal luego de una cirugía invasiva es una estrategia común para evitar las complicaciones asociadas a infecciones. El empleo de barreras físicas para evitar la adhesión abdominal posquirúrgica entre tejidos adyacentes en conjunto con la incorporación de antibióticos permite disponer de un dispositivo con una doble funcionalidad. El tamaño de poro submicrométrico evita la migración celular, requerimiento fundamental para actuar como barrera, mientras que la elevada área superficial permite una carga de antibiótico mayor que en otras morfologías.

Como se mencionó anteriormente, una de las áreas de mayor investigación en el campo de liberación controlada es la liberación controlada y vectorizada de drogas anticancerígenas [41-42]. Las membranas electrohiladas poseen la capacidad de evitar las limitaciones en la carga de fármacos que poseen las micelas y liposomas usadas actualmente para el tratamiento de tumores. La utilización de membranas nanofibrosas también tiene notable interés para liberación de agentes bioactivos tales como factores de crecimiento capaces de promover la fijación, proliferación y diferenciación celular en ingeniería de tejidos, así como para la liberación de plásmidos de ADN para terapia génica. En este último caso resulta importante proteger los agentes biológicos que son incorporados a las matrices, dado que el proceso de electrohilado puede degradar el ADN, perdiendo la capacidad de transfección del plásmido.

Otro ejemplo de sistema de liberación constituye la administración tópica de óxido nítrico (NO) para el tratamiento de la úlcera de pié diabético así como de las úlceras generadas por leishmaniasis. Esta estrategia que está siendo actualmente explorada con el desarrollo de un parche nanofibroso para liberación de NO con un diseño que permite la liberación constante de NO durante 12 horas o más dependiendo de la dosis [43-44].

9.3.6. Dispositivos implantables

La combinación de dispositivos implantables con matrices nanofibrosas permite mejorar el comportamiento de éstos con el medio biológico [45]. El recubrimiento de una prótesis con nanofibras aumenta la superficie expuesta permitiendo un mayor e íntimo contacto con el medio, favoreciendo la fijación del dispositivo y mejorando su biocompatibilidad. En los recubrimientos nanofibrosos de la superficie de catéteres para angioplastia, la superficie externa del balón del catéter se recubre con una matriz nanofibrosa que tiene la capacidad de expandirse y contraerse junto con el balón. En algunas de estas aplicaciones se incorpora óxido nítrico que permite la vasodilatación arterial y relajación del músculo liso del vaso sanguíneo. Este dispositivo puede utilizarse directamente para tratar una

obstrucción en un vaso, o en combinación con un stent. La modificación superficial de un implante ortopédico a nanoescala mejora las propiedades del dispositivo como la hidrofobicidad, adhesión y biointegración.

Entre otros desarrollos se encuentran los dispositivos vaso-oclusivos que poseen un núcleo metálico y una matriz nanofibrosa que funciona como cubierta en la superficie. Estos dispositivos se utilizan para generar embolias u obstrucciones en aneurismas localizadas dentro de los vasos sanguíneos. Los dispositivos oftalmológicos poseen una matriz nanofibrosa para tratar glaucoma o deficiencia óptica de transmisión neural. El implante nanofibroso se inserta en el canal de Schlem, permitiendo desviar el humor acuoso desde la cámara anterior del ojo. Este tipo de dispositivos implantables mejoran la biocompatibilidad y reducen la fricción por la gran flexibilidad que presenta el material [45].

9.4. Perspectivas futuras

Los materiales nanofibrosos poseen un enorme potencial para el desarrollo de matrices extracelulares de aplicación en ingeniería de tejidos y para la obtención de nuevos sistemas para liberación de agentes terapéuticos. Aunque existen avances importantes en el diseño y obtención de estructuras nanofibrosas para aplicaciones biomédicas y tanto en aspectos conceptuales como tecnológicos, la mayoría de los ensayos realizados y sus conclusiones están basados en experiencias *in vitro*. En latinoamérica el desarrollo es incipiente aunque sostenido, y algunos grupos de investigación se están consolidando en esta área [46]. El desarrollo de estructuras y métodos adecuados para infiltración celular y el conocimiento de los mecanismos y señales químicas y mecánicas que modulan el comportamiento celular en estructuras nanofibrosas, abrirán el camino para la utilización de estos sistemas en aplicaciones *in vivo*. Sumado a esto, el incremento del número publicaciones interdisciplinarias y la aparición de equipos comerciales a escala de laboratorio, planta piloto e industrial son indicadores claros del amplio futuro que tienen los biomateriales nanofibrosos.

9.5. Referencias

- [1] Z-M. Huang, Y-Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Compos. Sci. Technol.* 2003, 63, 2223.
- [2] A.L. Andrady, *Science and technology of polymer nanofibers*, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2008.
- [3] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W-E. Teo, T. Yong, Z. Ma, R. Ramaseshan, *Mater. Today* 2006, 9, 40.
- [4] S. Tan, X. Huang, B. Wu, *Polym. Int.* 2007, 56, 1330.
- [5] J. Fang, H. Niu, T. Lin, X. Wang, *Chin. Sci. Bull.* 2008, 53, 2265.
- [6] R. Dersch, M. Steinhart, U. Boudriot, A. Greiner, J. H. Wendorff, *Polym. Adv. Technol.* 2005, 16, 276.
- [7] N. Tucker, J.J. Satnger, M.P. Staiger, H. Razzaq, K. Hofman, *J. Eng. Fibers Fabrics* 2012, July issue, 63.
- [8] J. Doshi, D.H. Reneker, *J. Electrostatics* 1995, 35, 151.
- [9] A. Jaworek, A. Krupa, M. Lackowski, A.T. Sobczyk, T. Czech, S. Ramakrishna, S. Sundarrajan, D. Pliszka, *J. Electrostatics* 2009, 67, 435.
- [10] A. Greiner, J.H. Wendorff, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 2.
- [11] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W-E. Teo, T-Ch. Lim, Z. Ma, *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, New Jersey, London, Singapur, 2005.
- [12] L.A. Bosworth, S. Downes, *Electrospinning for tissue regeneration*, Woodhead publishing, Oxford-Cambridge-Philadelphia-New Delhi, 2011.
- [13] Y. Yoshihiro, *J. Text. Eng.* 2008, 54, 109.
- [14] S. Petrik, M. Maly, *MRS Proceedings* 2009, 1240, 1240-WW03-07.
- [15] T. Lin, *Nanofibers Production, Properties and Functional Applications*, InTech, Croatia, 2011.
- [16] A. Greiner, J.H. Wendorff, *Adv. Polym. Sci.* 2008, 219, 107.
- [17] D. Sun, Ch. Chang, S. Li, L. Lin, *Nano Lett.* 2006, 6, 839.
- [18] V. Beachley, X. Wen, *Progr. Polym. Sci.* 2010, 35, 868.
- [19] Z. Ma, M. Kotaki, R. Inai, S. Ramakrishna, *Tissue Eng.* 2005, 11, 101.
- [20] E. Engel, A. Michiardi, M. Navarro, D. Lacroix, J.A. Planell, *Trends Biotech.* 2008, 26, 39.
- [21] N. Kimizuka, *Adv. Polym. Sci.* 2008, 219, 1.
- [22] J.J. Stankus, L. Soletti, K. Fujimoto, Y. Hong, D.A. Vorp, W.R. Wagner, *Biomaterials* 2007, 28, 2738.
- [23] R.L. Dahlin, F.K. Kasper, A.G. Mikos, *Tissue Eng. Part B* 2011, 17, 349.
- [24] S. Zhong, Y. Zhang, C.T. Lim, *Tissue Eng. Part B* 2012, 18, 77.
- [25] J. Nam, Y. Huang, S. Agarwal, J. Lanutti, *Tissue Eng.* 2007, 13, 2249.
- [26] M.F. Leong, M.Z. Rasheed, TCh. Lim, K.S. Chian, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2009, 91, 231.
- [27] B.M. Baker, A.O. Gee, R.B. Metter, A.S. Nathan, R.A. Marklein, J.A. Burdick, R.L. Mauck, *Biomaterials* 2008, 29, 2348.

- [28] H.W. Choi, J.K. Johnson, J. Nam, D.F. Farson, J. Lannutti, J. Laser Appl. 2007, 19, 225.
- [29] J. Venugopal, S. Low, A.T. Choon, S. Ramakrishna, J. Biomed Mater. Res. Part B. Appl. Biomater. 2008, 84B, 34.
- [30] C.P. Barnes, S.A. Sell, E.D. Boland, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, Adv. Drug Deliv. Rev. 2007, 59, 1413.
- [31] L. Zhang, T.J. Webster, Nano Today, 2009, 4, 66.
- [32] J-H. Jang, O. Castano, H-W. Kim, Adv. Drug Deliv. Rev. 2009, 61, 1065.
- [33] S. Agarwal, J.H. Wendorff, A. Greiner, Adv. Mater. 2009, 21, 3343.
- [34] P.C. Caracciolo, V. Thomas, Y.K. Vohra, F. Buffa, G. A. Abraham, J. Mater. Sci.: Mater. Med. 2009, 20, 2129.
- [35] D.G. Yu, L.M. Zhu, K. White, C. Branford-White, Health 2009, 1, 67.
- [36] P.R. Cortez Tornello, G.E. Feresin, A. Tapia, I.G. Veiga, Â.M. Moraes, G.A. Abraham, T.R. Cuadrado, Polym. J. 2012, 44, 1105.
- [37] I. Moreno, V. González-González, J. Romero-García, Eur. Polym. J. 2011, 47, 1264.
- [38] T.J. Sill, H.A. von Recum, Biomaterials 2008, 29, 1989.
- [39] J. Xie, X. Li, Y. Xia, Macromol. Rapid. Commun. 2008, 29, 1775.
- [40] S. Agarwal, J.H. Wendorff, A. Greiner, Polymer 2008, 49, 5603.
- [41] H.H. Huang, C.L. He, H.S. Wang, X.M. Mo, J. Biomed. Mater. Res. 2009, 90, 1243.
- [42] S.H. Ranganath, C.H. Wang, Biomaterials 2008, 29, 2996.
- [43] D.J. Smith, M. Lopez, P. Lopez-Jaramillo, Topical Nitric Oxide Donor Devices. [WO/2006/058318]. Ref Type: Patent 2006.
- [44] P. López-Jaramillo, M.Y. Rincón, R.G. García, S.Y. Silva, E. Smith, P. Kampeerappun, C. García, D.J. Smith, M. López, I.D. Vélez, Am. J. Trop. Med. Hyg. 2010, 83, 97.
- [45] S.G. Kumbara, S.P. Nukavarapua, R. Jamesb, M.V. Hogana, C.T. Laurencin, Recent Pat. Biomed. Eng. 2008, 1, 68.
- [46] P.C. Caracciolo, P.R. Cortez Tornello, F. Montini Ballarin, G.A. Abraham, J. Biomater. Tissue Eng. 2013, 3, 39-60.