



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

## DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA

### CARRERA DE INGENIERÍA MECÁNICA

### TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO MECÁNICO

TEMA: OBTENCIÓN DE FIBRAS SUBMICROMÉTRICAS DE FIBROÍNA  
DE SEDA CON SANGRE DE DRAGO (CROTON LECHLERI MÜLL)  
PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE  
ELECTROHILADO

AUTOR:

MELO ALTAMIRANO, JORGE GABRIEL

DIRECTOR:

ING. NARVÁEZ MUÑOZ, CHRISTIAN PATRICIO, MPhil.

SANGOLQUÍ

2018



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA MECÁNICA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, “OBTENCIÓN DE FIBRAS SUBMICROMÉTRICAS DE FIBROÍNA DE SEDA CON SANGRE DE DRAGO (CROTON LECHLERI MÜLL) PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE ELECTROHILADO” realizado por el señor JORGE GABRIEL MELO ALTAMIRANO, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlos y autorizar al señor JORGE GABRIEL MELO ALTAMIRANO para que lo sustenten públicamente.

Sangolquí, 14 de febrero de 2018

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Christian Patricio Narváez Muñoz', is written over a horizontal line.

ING. CHRISTIAN PATRICIO NARVÁEZ MUÑOZ, MSC.

DIRECTOR



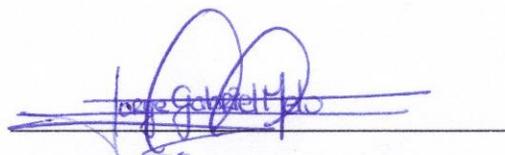
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA MECÁNICA**

**AUTORIA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, JORGE GABRIEL MELO ALTAMIRANO, con cédula de identidad N° 1723122592, declaro que este trabajo de titulación “OBTENCIÓN DE FIBRAS SUBMICROMÉTRICAS DE FIBROÍNA DE SEDA CON SANGRE DE DRAGO (CROTON LECHLERI MÜLL) PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE ELECTROHILADO” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, de 14 febrero de 2018



Sr. Jorge Gabriel Melo Altamirano

CI: 1723122592



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA MECÁNICA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, JORGE GABRIEL MELO ALTAMIRANO, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “OBTENCIÓN DE FIBRAS SUBMICROMÉTRICAS DE FIBROÍNA DE SEDA CON SANGRE DE DRAGO (CROTON LECHLERI MÜLL) PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE ELECTROHILADO” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, de 14 febrero del 2018

Sr. Jorge Gabriel Melo Altamirano

CI: 1723122592

## DEDICATORIA

Agradecido en primero lugar con Dios por brindarme la oportunidad de potenciar mis habilidades y luchar por cada uno de mis sueños siendo mi fuerza y guía en momentos difíciles.

Mis padres Jorge Iván y Alicia, por ser un apoyo constante en cada momento, que con amor y sacrificio me han demostrado que con esfuerzo, trabajo duro y honestidad todo es posible en la vida.

Mi hermana Andrea, por todos los consejos que me han permitido mejorar y dar lo mejor de mí en cada uno de los retos que se han presentado en el camino.

Este trabajo está especialmente dedicado a Alejandra Altamirano, un ángel, quizá no mi hermana de sangre, pero sí de corazón que ya hace 12 años nos tuvo que abandonar dejando enormes destellos de alegría dentro de mí, y brindándome con sus recuerdos la inspiración necesaria para nunca rendirme y siempre seguir adelante confiado en la idea de mejorar cada día.

A mi familia que me han demostrado con su apoyo que con esfuerzo todo se puede lograr cuando la familia está unida.

A Paola, mi mejor amiga, por acompañarme en el camino brindándome su apoyo y su amistad.

A la Lcda. Sheila Lima por su apoyo incondicional y consejos constructivos que siempre estuvieron presentes en cada una de las pruebas que se me presentaron.

Un agradecimiento especial a aquellos profesores que aparte de brindarme las herramientas para mi vida profesional, han sabido aconsejarme de la mejor manera para mejorar cada vez más como persona.

En general, agradezco a todos mis amigos y compañeros de la Universidad fuera de ella, que también han contribuido para lograr esta meta.

## AGRADECIMIENTO

A Dios por la vida, salud y la oportunidad de cumplir mi meta.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, el Departamento de las Ciencias de la Energía y Mecánica y cada uno de los docentes y laboratoristas, además de los Laboratorios de Reología y Microscopía(CENCINAT) que han aportado de alguna forma con este proyecto.

Al director del Proyecto MPhil. Christian Narváez por su apoyo incondicional en cada una de las etapas necesarias para la elaboración de este trabajo de titulación.

Al Sennescyt y la Beca Ensamble por brindar el auspicio al proyecto macro “Electrospinning de fibras micrométricas de fibroína de seda y quitosán: biopolímeros producidos en el Ecuador” del que forma parte el presente proyecto de Titulación.

Al Dr. Salvador Aznár Cervantes, investigador de la Universidad de Murcia por el apoyo brindado en el protocolo químico para extracción de la fibroína de seda.

A la Fundación Chankuap por proporcionarnos Sangre de Drago (Croton Lechleri Müll) orgánica para la elaboración del presente proyecto.

En general, a todas personas que de una u otra forma han brindado apoyo en el presente proyecto.

## ÍNDICE

1. GENERALIDADES.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Antecedentes .....	4
1.3. Definición Del Proyecto .....	6
1.4. Objetivos .....	7
1.4.1. Objetivo General .....	7
1.4.2. Objetivos Específicos .....	7
1.5. Justificación e Importancia .....	8
1.6. Alcance .....	9
2. ESTADO DEL ARTE .....	11
2.1. Técnica de electrohilado .....	11
2.1.1. Descripción del Proceso.....	11
2.1.2. Parámetros de funcionamiento.....	12
Parámetros de la solución.....	13
Parámetros operativos .....	14
Parámetros ambientales .....	15
2.1.3. Fases de la Técnica de Electrohilado.....	16
Régimen I: Cono de Taylor .....	17
Régimen II: Chorro del Cono.....	18
Régimen III: Whipping.....	18
2.1.4. Caracterización .....	19
Caracterización Morfológica.....	19
Caracterización Mecánica .....	20
Caracterización Reológica .....	22
2.1.5. Aplicaciones Biomédicas de las Fibras .....	23
Tissue scaffolds .....	23
Liberación de Fármacos.....	24
Wound Dressings.....	25
2.2. Fibroína de Seda.....	28
2.2.1. Extracción .....	30

2.2.2. Propiedades de la fibroína de seda.....	32
2.2.3. Electrospinning de Fibroína de seda.....	35
2.3. Sangre de Drago.....	36
2.3.1. Componentes.....	38
2.3.2. Propiedades.....	39
3. EXPERIMENTACIÓN.....	41
3.1. Metodología de Trabajo.....	41
3.1.1. Etapa 1: Extracción de Fibroína de Seda.....	42
3.1.1.1. Preparación de una solución de LiBr a 9.3 M.....	43
3.1.1.2. Desgomado de la fibroína.....	44
3.1.1.3. Disolución de la fibroína en LiBr (9.3 M).....	46
3.1.1.4. Diálisis.....	47
3.1.2. Etapa 2: Preparación de soluciones de Fibroína de Seda / PEO.....	48
3.1.3. Etapa 3: Electrospinning de Fibroína de Seda / PEO.....	49
3.1.4. Etapa 4: Preparación de soluciones y electrospinning de Fibroína de Seda / PEO / Sangre de Drago.....	50
3.1.5. Etapa 5: Preparación de soluciones y electrospinning de fibroína de seda china y ecuatoriana.....	50
3.1.6. Etapa 6: Análisis Morfológico.....	51
3.1.7. Etapa 7: Análisis Reológico.....	52
3.1.8. Etapa 8: Análisis Mecánico (AFM).....	53
3.2. Materiales.....	54
3.2.1. Óxido de Polietileno (PEO).....	54
3.2.2. Sangre de drago (Croton Lechleri Müll).....	55
3.3. Equipos e Instrumentos.....	55
3.3.1. Sistema de Electrospinning.....	56
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	58
4.1. Extracción de Fibroína de Seda.....	58
4.2. Membranas de Fibroína de Seda y PEO.....	59
4.5. Análisis Reológico.....	71
4.6. Análisis Mecánico.....	80
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	88

5.1.	Conclusiones .....	88
5.2.	Recomendaciones .....	91
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> <i>Influencia de los Parámetros de la Solución sobre las fibras</i> .....	13
<b>Tabla 2</b> <i>Influencia de los Parámetros Operacionales sobre las fibras</i> .....	14
<b>Tabla 3</b> <i>Influencia de los Parámetros Ambientales sobre las fibras</i> .....	16
<b>Tabla 4</b> <i>Propiedades mecánicas de la fibroína de seda</i> .....	33
<b>Tabla 5</b> <i>Componentes de la sangre de drago</i> .....	38
<b>Tabla 6</b> <i>Propiedades de la sangre de drago</i> .....	40
<b>Tabla 7</b> <i>Equipos del Sistema de Electrospinning</i> .....	57
<b>Tabla 8</b> <i>Resultados de las micrografías SEM de muestras de fibras de fibroína de seda con óxido de polietileno</i> .....	59
<b>Tabla 9</b> <i>Comportamiento de la Sangre de Drago como material electrohilable</i> .....	64
<b>Tabla 10</b> <i>Micrografía SEM de las fibras de RSF + PEO 3% w/v + SD 2% v/v</i> .....	66
<b>Tabla 11</b> <i>Micrografías SEM de muestras de fibras de RSF china y ecuatoriana</i> .....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Equipo de Electrospinning patentado por A. Formhals.....	5
<b>Figura 2.</b> Agentes que mejoran el rendimiento del apósito.....	9
<b>Figura 3.</b> Sistema de funcionamiento de la técnica de Electrospinning.....	12
<b>Figura 4.</b> Régimenes del proceso de electrospinning.....	17
<b>Figura 5.</b> Partículas de PVP 30KDa observado desde microscopio SEM.....	20
<b>Figura 6.</b> Esquema de la fibra ensayada en AFM.....	21
<b>Figura 7.</b> Andamios de Tejido en base a Fibroína de Seda Imagen SEM.....	24
<b>Figura 8.</b> Configuración Coaxial de Electrohilado para liberación de fármacos.....	25
<b>Figura 9.</b> Electrospinning de Fibras para apósitos con agentes bioactivos para la curación de heridas.....	27
<b>Figura 10.</b> Fases normales en la curación de heridas.....	28
<b>Figura 11.</b> Distintas presentaciones de la fibroína de seda para aplicaciones biomédicas.....	30
<b>Figura 12.</b> Protocolo de obtención de fibroína de seda reconstituida.....	31
<b>Figura 13.</b> Gráfica Tensión vs Deformación de algunos materiales.....	33
<b>Figura 14.</b> Propiedades de la Fibroína de Seda.....	34
<b>Figura 15.</b> Proceso de electrospinning de fibras de fibroína de seda.....	36
<b>Figura 16.</b> Sangre de drago.....	37
<b>Figura 17.</b> Diagrama de flujo referente a la experimentación realizada en el proyecto.....	41
<b>Figura 18.</b> Capullos de seda ecuatorianos (Fundación ISMI) y chinos.....	42
<b>Figura 19.</b> Bromuro de Litio.....	42
<b>Figura 20.</b> Carbonato de Sodio.....	43
<b>Figura 21.</b> (a) 5[g] de capullos de seda, (b) Solución 0.02M de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> en ebullición.....	44
<b>Figura 22.</b> Desgomado de fibroína de seda.....	45
<b>Figura 23.</b> (a) Enjuague de la fibroína de seda, (b) Secado de la fibroína de seda.....	46
<b>Figura 24.</b> Disolución de fibroína de seda.....	47
<b>Figura 25.</b> (a) Diálisis, (b) Solución acuosa de fibroína de seda.....	48
<b>Figura 26.</b> Microscopio electrónico de barrido TESCAN.....	51
<b>Figura 27.</b> Muestra de Fibroína de seda / PEO 5%.....	52
<b>Figura 28.</b> Reómetro TA-Instruments.....	53
<b>Figura 29.</b> Microscopio de Fuerza Atómica.....	54
<b>Figura 30.</b> Óxido de Polietileno (PEO).....	55
<b>Figura 31.</b> Sangre de drago (Croton Lechleri Müll).....	55
<b>Figura 32.</b> Equipos utilizados en el proyecto.....	56
<b>Figura 33.</b> Sistema de Electrospinning.....	57
<b>Figura 34.</b> Fuente de alto voltaje.....	57
<b>Figura 35.</b> Bomba de Jeringa.....	57
<b>Figura 36.</b> Cámara de acercamiento.....	57
<b>Figura 37.</b> Conductividad Eléctrica del Agua Ultrapura en la diálisis.....	58

<b>Figura 38.</b> Elaboración de la membrana de RSF +PEO 3%w/v con las mejores características morfológicas .....	63
<b>Figura 39.</b> Comportamiento de la sangre de drago al mezclarla con la solución de RSF + PEO 3% w/v .....	63
<b>Figura 40.</b> RSF + PEO 3% w/v recolectada en: (a) foil de aluminio, (b) gasa.....	70
<b>Figura 41.</b> RSF+PEO 3%w/v+SD 2% v/v recolectada en: (a) foil de aluminio, (b) gasa	70
<b>Figura 42.</b> Extracción de la membrana de Fibroína de seda recolectada en gasa .....	71
<b>Figura 43.</b> Preparación de la muestra en el reómetro previo al estudio reológico .....	72
<b>Figura 44.</b> Curva de flujo estacionario de la Sangre de Drago .....	73
<b>Figura 45.</b> Comportamiento de los fluidos no Newtonianos pseudoplásticos y dilatantes. ....	73
<b>Figura 46.</b> Gráficas esfuerzo de corte vs tasa de cizallamiento (azul) y viscosidad vs tasa de cizallamiento(rojo) de: (a)Fibroína de seda china, (b) Fibroína de seda ecuatoriana, (c) Fibroína de seda china + PEO 3% w/v, (d) Fibroína de seda ecuatoriana+PEO 3%w/v, (e) Fibroína de seda china+PEO 3%w/v +SD 2% v/v, (f) Fibroína de seda ecuatoriana+PEO 3% w/v +SD 2% v/v. ...	74
<b>Figura 47.</b> Comportamiento reológico de las muestras de fibroína de seda china .....	75
<b>Figura 48.</b> Comportamiento Reológico de la Fibroína de Seda Ecuatoriana .....	76
<b>Figura 49.</b> Comportamiento Reológico de la Fibroína de Seda .....	77
<b>Figura 50.</b> Comportamiento Reológico de la Solución Fibroína de Seda +PEO 3w/v ..	78
<b>Figura 51.</b> Comportamiento Reológico de la Fibroína de Seda + PEO 3%w/v + SD 2%v/v .....	79
<b>Figura 52.</b> Comportamiento Reológico de la Fibroína de Seda + PEO 3% w/v + SD 2% v/v .....	79
<b>Figura 53.</b> Histograma de frecuencia del Módulo de Young (RSF + PEO 3% w/v) .....	81
<b>Figura 54.</b> Distribución de Probabilidad Normal del Módulo de Young (RSF + PEO 3% w/v) .....	81
<b>Figura 55.</b> Gráfica Fuerza vs desplazamiento (RSF + PEO 3% w/v).....	82
<b>Figura 56.</b> Histograma de frecuencia del Módulo de Young (RSF + PEO 3% w/v+ SD 2% v/v).....	83
<b>Figura 57.</b> Distribución de Probabilidad Normal del Módulo de Young (RSF + PEO 3% w/v+ SD 2% v/v) .....	83
<b>Figura 58.</b> Gráfica Fuerza vs desplazamiento (RSF + PEO 3% w/v+ SD 2% v/v) .....	84
<b>Figura 59.</b> Fibras de RSF-PEO3% w/v-SD 2%v/v dopadas con nanopartículas de PVP 30K 13%w/w-SD 20% v/v .....	85
<b>Figura 60.</b> By-layer de RSF + PEO 3%w/v + SD 2% y CS4% en AA 70% + PVA 10% + SD 100% .....	86
<b>Figura 61.</b> Sangre de drago atomizada sobre una membrana de RSF + PEO 3% w/v	87

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación hace uso de la técnica de electrospinning, la cual emplea la acción de un campo eléctrico que influye sobre una solución polimérica alimentada por una bomba de inyección, hasta salir por un capilar formando así fibras muy finas en la escala de micrómetros y nanómetros para su posterior uso en aplicaciones biomédicas dada su estructura semejante a la matriz extracelular humana que le permite ser usado para la producción de un apósito para heridas cutáneas crónicas. El biomaterial utilizado es la fibroína de seda que resalta entre otros biopolímeros por sus excelentes propiedades mecánicas y biológicas dopado con sangre de drago, savia natural con muchas bondades curativas utilizadas ancestralmente por pueblos indígenas de la Amazonía. Tras la extracción del biopolímero y la preparación de la solución acuosa usando Óxido de polietileno (PEO) de 1'000 000 [Da] se obtuvieron como resultado membranas con los siguientes parámetros operativos: Voltaje: 6-7 [kV], caudal: 1,2-1,4[mL/h] y Distancia colector/capilar: 12[cm]. Las muestras fueron replicadas en fibroína china y ecuatoriana y posteriormente caracterizadas de 3 formas: morfológicamente a través de microscopía SEM(microscopio electrónico de barrido) obteniendo diámetros entre 139,43 - 160 [nm] y 144,1 - 145,4 [nm] respectivamente, reológicamente en el reómetro del Laboratorio de Reología del DECEM obteniendo viscosidades entre 15,03 – 31,621[mPa.s] y 26,58 – 39,45 [mPa.s], respectivamente y mecánicamente para las muestras de fibroína de seda china en microscopía AFM obteniendo módulos de Young de 279,9 y 107,1 [MPa] para diferentes porcentajes de concentración de cada uno de los componentes.

### **PALABRAS CLAVE:**

- **ELECTROSPINNING**
- **FIBROÍNA DE SEDA**
- **SANGRE DE DRAGO**
- **APÓSITOS**

## ABSTRACT

This research work makes use of the electrospinning technique, which uses the action of an electric field that influences a polymer solution fed by an injection pump, until leaving through a capillary forming very fine fibers in the micrometer and nanometers scale for its later use in biomedical applications given its structure similar to the human extracellular matrix that allows it to be used for the production of a wound dressing for chronic cutaneous wounds. The biomaterial used is silk fibroin that stands out among other biopolymers for its excellent mechanical and biological properties doped with Drago's blood, natural sap with many healing benefits used ancestrally by indigenous peoples of the Amazon. After extraction of the biopolymer and preparation of the aqueous solution using Polyethylene oxide (PEO) 1'000 000 [Da], membranes were obtained with the following operating parameters: Voltage: 6-7 [kV], flow rate: 1.2-1, 4 [mL / h] and Distance between collector/capillary: 12 [cm]. The samples were replicated in Chinese and Ecuadorian fibroin and subsequently characterized in 3 ways: morphologically through SEM microscopy (scanning electron microscope) obtaining diameters between 139.43 - 160 [nm] and 144.1 - 145.4 [nm] respectively, rheologically in the rheometer from the Rheology Laboratory of DECEM obtaining viscosities between 15.03 - 31.621 [mPa.s] and 26.58 - 39.45 [mPa.s], respectively and mechanically for samples of Chinese silk fibroin in AFM microscopy obtaining Young's modulus of 279.9 and 107.1 [MPa] for different percentages of concentration of each of the components.

### KEYWORDS:

- **ELECTROSPINNING**
- **SILK FIBROIN**
- **DRAGO'S BLOOD**
- **WOUND DRESSINGS**

# CAPÍTULO I

## GENERALIDADES

### 1.1. Introducción

La piel es el órgano más largo del cuerpo humano, se encarga de protegerlo del ambiente externo, expuesto a patógenos y pérdida de agua. Las heridas de piel se pueden clasificar en 2 categorías: Agudas (como son heridas quirúrgicas y traumáticas o quemaduras) y Crónicas (como son úlceras por pie diabético o úlceras por presión, también llamadas escaras).

Según el Centro Nacional de estadísticas de Salud en Estados Unidos en el año 2000 hubo 40 millones de procedimientos quirúrgicos en pacientes internados, junto con 31.5 millones de procedimientos ambulatorios (Sen, Gordillo, & Roy, 2009). Además, hay alrededor de 41 millones de casos de trauma o lesión cada año que representan una carga económica de más de 670 billones de dólares anualmente (Insitute National Trauma, 2005). Por otro lado, las quemaduras inducidas por fuego y calor repercuten en 35 millones de lesiones cada año en el mundo (Vos, Barber, & Bel, 2015), con 2.9 millones de hospitalizaciones y 238.000 muertes (Haagsma, Graetz, & Bolliger, 2015). De estas, las heridas crónicas afectan a 6.5 millones de pacientes en los Estados Unidos, con más de 25 mil millones de dólares gastados anualmente en su tratamiento. Esta situación es aún más grave en países en desarrollo y tercermundistas como el nuestro (O'Reilly, Cameron, & Joshipura, 2012). Adicionalmente, 2.5 millones de úlceras por presión son tratadas en Estados Unidos cada año. El manejo de cada una de estas representa aproximadamente \$70.000, de tal modo se ha estimado en \$11 millones el gasto anual total para el tratamiento de úlceras por presión en el país anglosajón (Sen, Gordillo, & Roy, 2009).

Según la OMS (2005), la diabetes es el tercer problema de salud del mundo. El 25% de los ingresos hospitalarios en pacientes con diabetes son debido al pie diabético. Aproximadamente un 15% de todos estos pacientes presentan mal perforante plantar o

úlceras por pie diabético en algún momento de su vida. Del 85% de estos, el 15% sufre una amputación. Los costos por úlcera son aproximadamente de \$20.000 a \$60.000 anuales por paciente (OMS 2005).

En nuestro país según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos - INEC en el Anuario de estadísticas de nacimientos y defunciones, el número de defunciones en el año 2014 fue de 62.981 personas, 10.960 en la provincia de Pichincha, 9.997 en el Cantón Quito y 257 en el cantón Rumiñahui (247 en la ciudad de Sangolquí). Producto de enfermedades de la piel y del tejido subcutáneo 122 personas han fallecido en el país, mientras que en la provincia de Pichincha son 24 los casos reportados de muerte (INEC, 2014). Además, en el Ecuador, existe un 55% de casos de úlceras por presión siendo el grupo de edad de 50 a 74 años el de mayor recurrencia, confirmando la premisa de que en personas de edad avanzada es común este tipo de lesiones debido a la fragilización del tejido celular subcutáneo y la elasticidad de la piel. (Cedeño & Molina, 2015). En el 2011 se registraron 700 casos de pacientes con úlceras por pie diabético, de los cuales la incidencia de las amputaciones de extremidades inferiores reportadas por los hospitales fue del 65%.

Por otro lado, en Colombia uno de los puntos más cercanos de referencia, según datos del Ministerio de Salud Pública el costo referente a tratamiento de úlceras crónicas de cualquier tipo representa un gasto de \$40.000, planteando que en temas de prevención el coste podría disminuir hasta los \$2.700 (Ministerio de Salud Pública, 2012). Mientras tanto en el Ecuador, en el periodo 2000 y 2005 se registró un incremento de 1.093.487 consultas preventivas, mientras que entre el 2008 al 2011, el aumento de consultas preventivas fue de 2.345.081, es decir, en los últimos tres años del período analizado el Ministerio de Salud Pública ha enfatizado su gestión en “prevenir” en lugar de “curar”. De esta forma, las prácticas más eficientes para evitar la presencia de heridas crónicas de piel como las antes mencionadas van dirigidas a la prevención ya sea mediante el uso de apósitos o vendajes que ayudan a evitar la infección y mantener un entorno apropiado que permita la correcta cicatrización de la herida (Percival, 2002).

Según datos tomados de las estadísticas del Comercio Exterior de Bienes del Banco Central del Ecuador, apoyado es el código de aranceles 30.05 referente a apósitos y vendajes en el año 2012 el Ecuador exportó 30,3 Ton. a Perú recibiendo como redito \$75.500 e importó 885,3 Ton. invirtiendo \$12'128.200, siendo Colombia el proveedor principal con 165,9Tm. En su lugar, en el año 2016 se exportaron 55,8 Ton. a Perú recibiendo como redito \$84.800 e importó 773,2 Ton. invirtiendo \$10'493.500, siendo nuevamente Colombia el principal proveedor con 169,4 Ton. En lo que va del 2017 en tema exportaciones el monto se redujo a 0,2 Ton. a Estados Unidos obteniendo una ganancia de \$26.300 y en tema importaciones del mismo modo se redujo 675,6 Ton. invirtiendo \$8'787.100 planteando claramente que el país proveedor de dichos artículos es Colombia con 105 Ton. (Banco Central del Ecuador, 2017). Lo que demuestra que en el Ecuador la carga de importaciones como de exportaciones presenta una reducción, dado que la producción nacional está siendo utilizada para consumo propio, lo que impulsa su producción interna, lo que a su vez llama a la innovación en producción nacional de productos de esta índole.

Procesos tecnológicos para la fabricación de fibras de pequeños diámetros como son *drawing*, *template synthesis*, *phase separation*, *self-assembly* y *electrospinning* han brindado la oportunidad de conseguir geometrías muy complicadas de lograr por otros métodos, pero problemas relativos al equipamiento, limitaciones en cuanto a materiales o simplemente lo complicado del proceso como tal, han resaltado al electrospinning basado en su versatilidad, facilidad de producción, una amplia gama de polímeros utilizables y costo bajo como la técnica apropiada para la producción de fibras. El electrospinning o electrohilado emplea la acción de fuerzas electrostáticas producidas a partir de un campo eléctrico que influye en una solución polimérica acuosa, alimentada por una bomba inyectora y cuya salida es a través de un capilar, permiten la elaboración de fibras muy finas en la escala micro y nanométrica, así como la producción de membranas utilizables como apósitos o parches.

Los materiales utilizables para la producción de fibras por electrospinning se dividen en 2 grupos principales: polímeros sintéticos como son el PVA (polyvinil alcohol), el PEO

(óxido de polietileno), PVP (polyvinyl pyrrolidone), PAN(poliacrilonitrilo), etc. y biopolímeros obtenidos como dice su nombre de fuentes biológicas como son el colágeno, quitosán, ácido hialurónico o la fibroína de seda que se caracteriza por ser de origen animal, específicamente del gusano de seda o Bombyx Mori que produce seda, membranas, nidos y estructuras que le den soporte a los huevos. La seda conformada está constituida por 2 proteínas: una fibrosa llamada fibroína y una amorfa y viscosa llamada sericina que es la que se encarga de mantener unidas las fibras de fibroína (Voet & Voet, 2004). La fibroína como biomaterial electrohilable ha presentado una serie de propiedades tales como la biocompatibilidad, biodegradación controlable, bajo nivel citotóxico, excelentes propiedades mecánicas que permiten e impulsan a que sea usada en una diversidad de aplicaciones biomédicas como: suturas, parches, encapsulación de fármacos, andamios de tejidos, etc. (Kundu S. C., 2014)

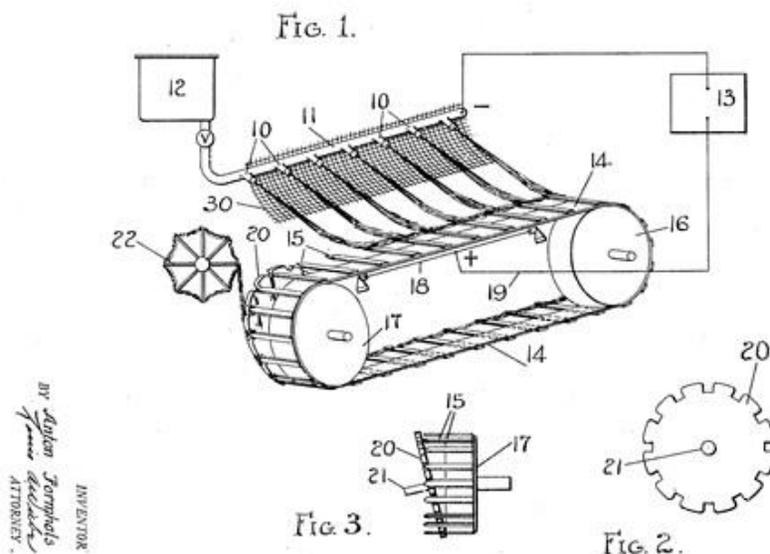
El presente trabajo pretende el estudio y caracterización de fibras de fibroína de seda dopada con sangre de drago (crotón lechleri müll) como agente de múltiples propiedades medicinales como la cicatrizante, homeostática, antibacterial, antiviral, etc. (Jones K. , 2003) De tal forma que plantee las bases iniciales para el posterior aplicación en el área biomédica, especialmente en la producción de parches o apósitos, dándole valor agregado a materias primas ecuatorianas poco aprovechadas hasta la actualidad, tecnificando además dichos saberes ancestrales.

## **1.2. Antecedentes**

La Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, como parte del sistema de Educación Superior, está enfocada en el desarrollo de nuevos proyectos que beneficien a la sociedad, para lo cual se desarrollará una investigación sobre la obtención y caracterización de microfibras de fibroína de seda con sangre de drago (Croton Lechleri Müll) mediante la técnica de electrospinning.

La técnica de electrohilado o también llamada *electrospinning* es un procedimiento que reúne las bases científicas de la electrohidrodinámica para la obtención de microfibras o nanofibras por medio de estiramiento coaxial de una solución viscoelástica (Teo & Ramakrishna, 2006). Este fenómeno fue observado inicialmente 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. Posteriormente fue estudiado a detalle por Zeleny en 1914, basado en el análisis del comportamiento de las gotas de solución en el extremo de un capilar e inició el proceso de modelamiento matemático del comportamiento de los fluidos bajo las fuerzas electroestáticas (Zeleny, 1914) y patentada por Formhals en 1934, quien describió de forma explícita el proceso experimental para la creación de nanofibras, fabricando un dispositivo que se componía de una fuente de alto voltaje que alimenta a la cinta segmentada encargada de recoger las fibras, que posteriormente eran removidas con la ayuda de un cilindro como se detalla en la *Figura 1*.



**Figura 1.** Equipo de Electrospinning patentado por A. Formhals

Patente: (US Patente nº 1975504, 1934)

En 1966 fue el profesor Harold Simons quien patentó el primer instrumento para la creación de fibras ultrafinas mediante la técnica de electrohilado. De allí en adelante han sido muchos los investigadores que han aportado al desarrollo de esta técnica hasta 1980, que fue cuando se construyó el primer dispositivo capaz de manufacturar nanofibras. Actualmente, producto de un sin número de bondades que brinda la técnica, son muchas las aplicaciones del electrohilado en investigación, tales como: dispositivos

electrónicos, catalizadores, absorbentes, filtración, creación de nuevos materiales, ingeniería de tejidos, implantes dentales, etc. (Radhakrishnan, y otros, 2013). Haciendo referencia a las aplicaciones previamente enunciadas es clara la elevada participación que tiene el área biomédica. Últimamente dicha relación se ha visto expuesta en el uso de materiales que se caracterizan por su riqueza en las llamadas “*biopropiedades*” como la biocompatibilidad, biodegradación, no toxicidad; un claro ejemplo de esto se ha encontrado en la Fibroína de Seda de los capullos de *Bombyx Mori* o capullos del gusano de seda (Ohgo, Zhao, Kobayashi, & Asakura, 2002), esto sumado a los beneficios ancestralmente conocidos y ahora científicamente demostrados de la Sangre de Drago (*Croton Lechleri Müll*) en cuanto a propiedades antisépticas, antibacteriales y antioxidantes (Guerrinib, y otros, 2010), hacen de la posible combinación Fibroína de Seda – Sangre de Drago(*Croton Lechleri Müll*) una fuente de investigación interesante en pro del desarrollo del área biomédica/biomecánica para la curación de heridas crónicas.

Aules y Quijije (2016) realizaron un protocolo tanto de extracción de fibroína de seda como de su posterior electrohilado, caracterizándolo tanto morfológicamente como reológicamente. En el área del electrohilado nunca antes se ha utilizado sangre de drago (*Croton Lechleri Müll*) como componente de la solución polimérica, argumento que plantea además la necesidad de realizarlo por primera vez en esta investigación.

### **1.3. Definición Del Proyecto**

En el campo de la biomedicina, el uso de biopolímeros para el desarrollo de ingeniería de tejidos ha sido uno de los campos más estudiados recientemente y gracias a técnicas de producción de elementos con propiedades geométricas y morfológicas controlables como el electrohilado dan cabida a la producción de una serie de elementos con diversas aplicaciones.

El electrospinning destaca de otros métodos químicos de fabricación de fibras por su versatilidad, métodos como drawing, phase separation, self-assembly, template synthesis cuentan con una serie de limitaciones técnicas, a través del electrospinning es posible controlar la morfología y resistencia mecánica de las fibras variando parámetros

funcionales de la solución y operacionales del proceso, además cuenta con una alta gama de polímeros utilizables, sean estos sintéticos como el óxido de polietileno(PEO), poli vinil-alcohol(PVA) o biopolímeros como el colágeno, quitosán y la misma fibroína de seda.

En el Ecuador resulta escaso el estudio de dicha técnica a tal grado que el Laboratorio de Reología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE es el único que genera investigación sobre ello. En el presente trabajo se realizará un estudio del comportamiento de la fibroína de seda y sangre de drago como solución polimérica para la producción de nano y micro fibras que posteriormente puedan ser usados en aplicaciones como apósitos en pro de la cicatrización y curación de heridas crónicas en la piel.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. *Objetivo General***

Obtener y caracterizar microfibras de fibroína de seda con Croton Lechleri Müll mediante la técnica de electrospinning.

### **1.4.2. *Objetivos Específicos***

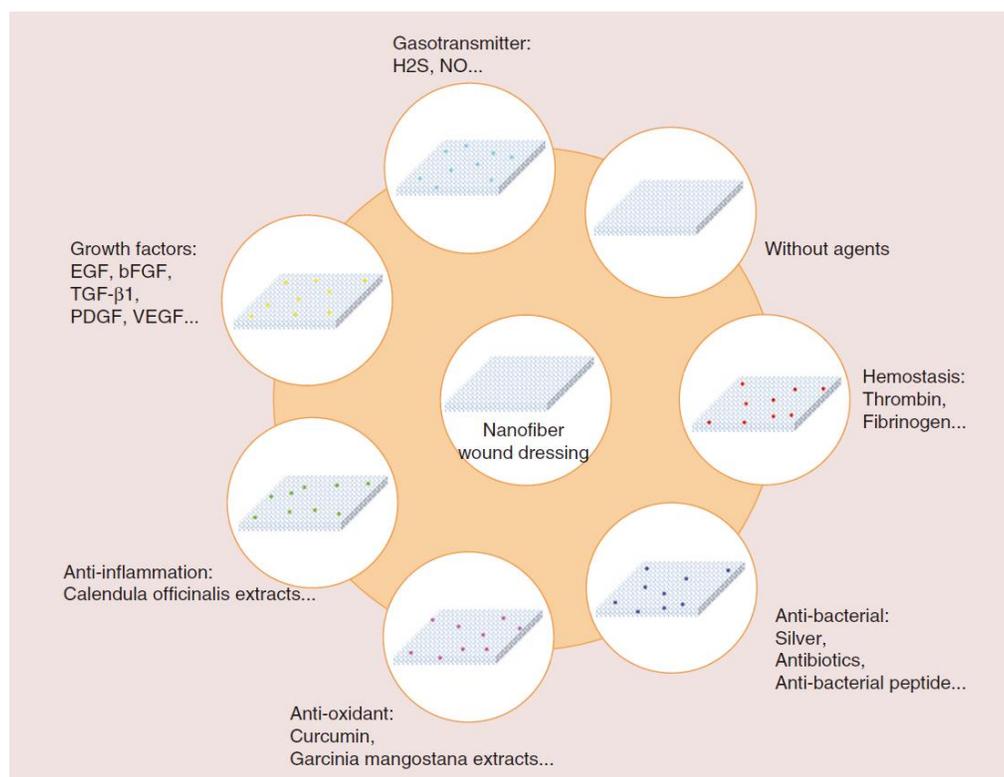
- Obtener microfibras de fibroína de seda con Croton Lechleri Müll mediante la técnica de electrospinning.
- Caracterizar morfológica y reológicamente muestras de microfibras de fibroína de seda ecuatoriana y china con Croton Lechleri Müll obtenidas de la técnica de electrospinning.
- Determinar el módulo de young de muestras de microfibras de fibroína de seda ecuatoriana y china con Croton Lechleri Müll obtenidas de la técnica de electrospinning
- Comparar la caracterización desarrollada de las muestras de microfibras en base de fibroína de seda china y ecuatoriana obtenidas de la técnica de electrospinning.

## 1.5. Justificación e Importancia

En el Ecuador existe poco desarrollo en el área nanotecnológica referida a la creación y utilización de nuevos biomateriales; relacionado al tema en cuestión, la utilización de técnicas como el electrospinning para la obtención de micro y nanofibras en el país es un tanto insuficiente, aunque sí demasiado interesante para su posterior estudio. El electrohilado cuenta con una alta versatilidad en la fabricación de elementos a escalas micro y nanométricas con proyección a una serie de aplicaciones tecnológicas en los campos de energía y electrónica, bioingeniería, seguridad y defensa, ingeniería ambiental y biotecnología. (Ramakrishna, Fujihara, Teo, Lim, & Ma, 2005)

Haciendo referencia a la Bioingeniería, uno de los campos mayormente estudiados en potenciales aplicaciones biomédicas como la farmacéutica, la distribución de fármacos y materiales para la garantizar la asepsia del tejido epitelial o parches o apósitos o también conocidos como wound dressing, se propuso este proyecto de investigación que no solo aprovecha el creciente desarrollo de la nanotecnología reflejada en procesos ingenieriles como el antes ya mencionado electrospinning, sino que además hace uso de los conocimientos ancestrales ya demostrados por la ciencia tecnificándolos para el posterior desarrollo de apósitos con fines biomédicos que aprovechen las propiedades biocompatibles y curativas de la sangre de drago y la fibroína de seda .

En la producción de apósitos según Chen et. al (2017), dependiendo de las necesidades del sujeto o paciente son varios los agentes aplicables a la membrana, si lo que se busca son propiedades homeostáticas, antibacteriales, anti inflamatorias, antioxidantes, etc. Curiosamente dichas propiedades son abarcadas por la sangre de drago, razón por la cual resulta necesario su estudio en la posible fabricación de membranas que a posteriori puedan ser utilizadas como parches para la curación de heridas crónicas en la piel. En la *Figura 2* se puede observar como para cada una de las necesidades del paciente se plantean opciones de agente dopante al parche.



**Figura 2.** Agentes que mejoran el rendimiento del apósito

Fuente: (Chen, y otros, 2017)

De esta forma se busca aportar al crecimiento del país en el ámbito de la investigación afín al cambio de la matriz productiva en temas de agregar valor a los recursos naturales poco aprovechados.

### 1.6. Alcance

La enorme diversidad del Ecuador y su riqueza en cuanto a materias primas lo convierten en un lugar único a la hora de hablar del desarrollo de biomateriales. Históricamente dicha diversidad se ha visto opacada por la falta de seguimiento que se les da a estos materiales, en ocasiones rebajándolos a ser materias primas de obtención y uso artesanal sin ningún valor agregado. Por ejemplo, la producción de capullos de gusano de seda o *Bombyx Mori* en el país es deficiente y se remite a ser artesanal para la elaboración de bufandas y ropa de carácter artesanal. Caso similar se presenta con la

sangre de drago, producto común en centros naturistas o en negocios ambulantes, pero que relativo a sus propiedades curativas resulta poco aprovechado.

De esta forma se pretende tecnificar los saberes ancestrales aprovechando las propiedades regenerativas de la fibroína de seda y las propiedades cicatrizantes, antibacteriales y antioxidantes que brinda la sangre de drago (*Croton Lechleri Müll*); caracterizando su morfología, reología y módulo de young, variando los parámetros estructurales de la técnica de electrohilado como el voltaje, el caudal, distancia entre capilar y colector y la concentración, de tal modo que se planten las bases necesarias para proyectar a posteriori su aplicación en apósitos que aprovechen todos estos beneficios en la regeneración de tejidos epiteliales en heridas crónicas.

## CAPÍTULO II

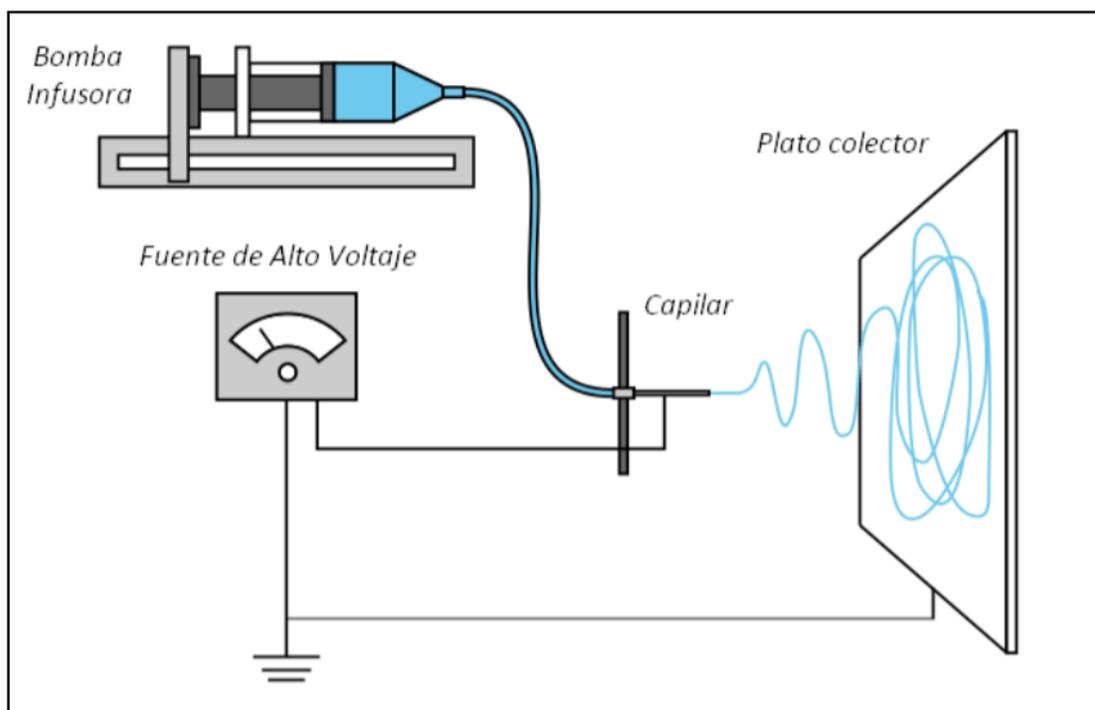
### ESTADO DEL ARTE

#### 2.1. Técnica de electrohilado

Es un proceso patentado por Formhals en 1934, que permite la formación de filamentos poliméricos mediante el uso de fuerzas electrostáticas, los mismos que presentan características particulares entre las que resaltan: alta relación área/volumen, flexibilidad, alta porosidad y un rendimiento mecánico relativamente superior comparados con otros tipos de material de características morfológicas similares; así como la posibilidad de combinar las propiedades de varios polímeros para la formación de fibras (Li, Caterson, Tuan, & Ko, 2012). El primer quipo diseñado por Formhals se ilustra en la *Figura 1*. Aplicable en diversos campos, tales como, nanocatálisis, andamios para ingeniería de tejidos, ropa protectora, apósitos o vendajes, filtración, biomédico, farmacéutico, óptica, electrónicos, biotecnología, defensa y seguridad e ingeniería ambiental (Radhakrishnan, y otros, 2013).

##### 2.1.1. Descripción del Proceso

Una máquina típica de electrohilado o electrospinning consta principalmente de 4 elementos: una bomba inyectora, una fuente de alto voltaje, un capilar y un plato colector. La solución *polimérica* es colocada generalmente dentro de una jeringa convencional es inyectada por la bomba hasta ser expulsada a través del capilar, donde se encuentran conectada una de las terminales de la fuente de alto voltaje que generará el campo eléctrico crítico necesario para vencer las fuerzas intermoleculares de la solución (tensión superficial) generando una fibra delgada extruida a escala micro y nanométrica que se depositará sobre un plato colector que se encuentra conectado con el otro terminal de la fuente, tras la evaporación del solvente (Hohman, Shin, Rutledge, & Brenner, 2001). En la *Figura 3* se ilustra una máquina convencional de electrospinning en configuración horizontal.



**Figura 3.** Sistema de funcionamiento de la técnica de Electrospinning

Fuente: (Rahmani, Arbabi Bidgoli, & Rezayat, 2017)

Las fuerzas electrostáticas y la tensión superficial ocupan un papel muy importante en el proceso de formación del jet o jetting, mientras las fuerzas gravitacionales resultan intrascendentes en la formación de fibras. Un jet estable se consigue cuando las fuerzas electrostáticas de repulsión entre los elementos cargados del jet líquido de la solución polimérica superan la tensión superficial de la misma (Agarwal, Burgard, Greiner, & Wendorff, 2016).

### 2.1.2. **Parámetros de funcionamiento**

Los parámetros de funcionamiento que intervienen en el proceso de electrospinning son los parámetros de la solución, los parámetros operacionales y ambientales.

### ***Parámetros de la solución***

Parámetros ligados a las características químicas de la solución, entre los que se encuentra la concentración, tensión superficial, viscosidad, conductividad eléctrica, peso molecular, etc.

En la *Tabla 1* se resume la influencia generada por los parámetros de la solución dentro de las fibras obtenidas, donde las flechas ↑↓ hacen referencia al incremento o decremento del valor del parámetro analizado.

**Tabla 1**  
*Influencia de los Parámetros de la Solución sobre las fibras*

<b>Parámetro</b>	<b>Característica</b>	<b>Referencia</b>
<b>Concentración de la solución del polímero</b>	↑ Se dificulta el paso de la solución a través del capilar, tapándolo. Aumento en el diámetro de fibras.	(Sill & Von Recum, 2008) (Ramakrishna, Fujihara, Teo, Lim, & Ma, 2005)
	↓ Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al colector	
<b>Tensión Superficial</b>	↑ Aparición de beads o collares en las fibras. Inestabilidad en el jet.	(Doshi & Reneker, 1995)
	↓ Fibras lisas, la única forma de disminuir la tensión superficial es con la adición de solventes de baja tensión como el etanol.	(Fong, Chung, & Reneker, 1999)
<b>Conductividad Eléctrica de la Solución</b>	↑ Mayor estiramiento fibras más delgadas. Bifurcación de fibras a voltajes bajos.	(Bhardwaj & Kundu, 2010)
	↓ Menor estiramiento, fibras más gruesas con beads. Genera partículas, no fibras	

CONTINÚA 

<b>Peso molecular del polímero</b>	↑	El voltaje necesario para superar la tensión superficial debe ser muy alto. Se reduce el goteo.	(Doshi & Reneker, 1995)
	↓	Generación de partículas antes que fibras. Existe goteo.	
<b>Viscosidad</b>	↑↑	Necesita de un voltaje muy alto y no genera el jet, provocando que la solución se seque en la punta del capilar.	(Doshi & Reneker, 1995)
	↑	Aumento en el diámetro de las fibras.	(Baumgarten, 1971)
	↓	Generación de beads. Baja uniformidad de fibras.	

### ***Parámetros operativos***

Parámetros ligados a la operación propia del proceso de electrohilado guiados a la estabilización del cono de Taylor, los cuales son el voltaje, el caudal y la distancia capilar /plato colector. En la *Tabla 2* se resume la influencia generada por los parámetros operacionales dentro de las fibras obtenidas, donde las flechas ↑↓ hacen referencia al incremento o decremento del valor del parámetro analizado.

**Tabla 2**

*Influencia de los Parámetros Operacionales sobre las fibras*

<b>Parámetro</b>		<b>Característica</b>	<b>Referencia</b>
<b>Voltaje</b>	↑↑	Reducción del diámetro de las fibras. Bifurcación del jet y aparición de beads. Aumento en densidad de beads.	(Deitzel, Kleinmeyer , Harris, & Beck Tan, 2001)

CONTINÚA 

	↓	Aumento del diámetro de las fibras. Poco impulso para la llegada de la solución al plato colector.	(Demir, Yilgor, Yilgor, & Erman, 2002) (Krishnappa, Desai, & Sung, 2003)
<b>Caudal</b>	↑	Aumento del diámetro de las fibras. Aparición de beads. Fibras húmedas con presencia de solvente no evaporado. Fibras discontinuas.	(Yuan, Zhang, Dong, & Sheng, 2004)
	↓	Las fibras se secan antes de la llegada al plato colector. No generación del jet	(Zong, y otros, 2002)
<b>Distancia capilar – colector</b>	↑↑	Las fibras no llegan al plato colector y caen por su propio peso.	(Li, Wang, & Xia, 2003)
	↑	El solvente se evapora completamente antes de que la fibra llegue al plato colector. Aparición de beads.	(Ki, y otros, 2005)
	↓	No se evapora completamente el solvente.	(Zhao, Wu, Wang, & Huang, 2004)
	↓↓	Fibras húmedas en el plato colector.	

### ***Parámetros ambientales***

Parámetros ajenos al proceso de electrohilado de difícil control, a pesar de no tener gran efecto sobre la morfología de las fibras los parámetros más relevantes son la temperatura y la humedad.

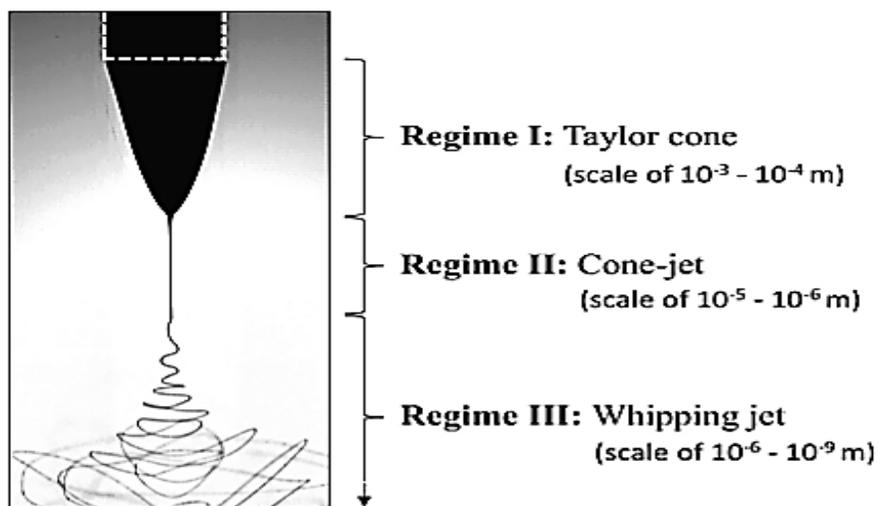
En la *Tabla 3* se resume la influencia generada por los parámetros ambientales dentro de las fibras obtenidas, donde las flechas ↑↓ hacen referencia al incremento o decremento del valor del parámetro analizado.

**Tabla 3***Influencia de los Parámetros Ambientales sobre las fibras*

Parámetro		Característica	Referencia
Temperatura	↑	Disminuye el diámetro de las fibras. Pueden aparecer beads.	(Demir, Yilgor, Yilgor, & Erman, 2002)
	↓	Modifica la viscosidad de la solución y modifica los parámetros de la solución	
Humedad Relativa	↑	Aparición de poros circulares en la superficie de las fibras.	(Megelski, Stephens, Chase, & Rabolt, 2005)
	↓	La tasa de evaporación del solvente aumenta y la fibra se seca antes de llegar al plato colector.	

### 2.1.3. Fases de la Técnica de Electrohilado

Al comenzar el proceso de electrohilado, la solución polimérica es cargada por un voltaje crítico  $V_c$  (fuerza eléctrica que forma al cono de Taylor). Tras estudios de Nuansing en 2014 mencionó que aproximadamente luego de  $0.05\text{ ms}$ , el chorro crea una fibra de diámetro entre  $1 - 10\ \mu\text{m}$  para formar el conocido whipping o latiguelo, y luego de  $3\text{ ms}$  se logra el estado estable. Finalmente, la evaporación del solvente y la extracción continua del whipping reduce el diámetro de la fibra hasta llegar al diámetro final. La complejidad del proceso recae en las altas velocidades hidrodinámicas, reología compleja, y transferencia de carga, masa y calor dentro del jet. De esta manera, es posible dividir al proceso en 3 regímenes descritos en la *Figura 4*. (Nuansing, 2014)



**Figura 4.** Régimenes del proceso de electrospinning

Fuente: (Nuansing, 2014)

### **Régimen I: Cono de Taylor**

Según Chen (2010) la técnica de electrospinning les brinda a las fibras submicrométricas mejores propiedades mecánicas dado que la disminución del diámetro del chorro se realiza en forma de cono, que es imposible lograr en procesos de hilado convencional. En 1960, Taylor desarrolló la teoría de la forma cónica que toma la gota de un polímero en la punta del capilar al aplicarse un campo eléctrico. Esta forma de cono se conoce como “Cono de Taylor”, y es trascendental en la formación de fibras por electrospinning (Chen C. H., 2010).

Este régimen inicia después de que la fuerza electrostática generada vence a la tensión superficial de la solución polimérica. Es posible estimar el voltaje crítico  $V_c$  o voltaje donde aparece el equilibrio del estado estable en la superficie del cono, con la ecuación (1) desarrollada por Taylor.

$$V_{c(cgs)}^2 = \frac{4H^2}{L^2} \left( \ln \frac{2L}{R_n} - \frac{3}{2} \right) 2\pi\gamma R_n \cos\phi \quad (1)$$

Donde H es la distancia de inyección, L es la longitud del capilar,  $R_n$  es el radio del capilar,  $V_c$  es el voltaje crítico,  $\gamma$  es la tensión superficial, y  $\phi$  es el ángulo del cono de Taylor (49.3° para un conductor perfecto).

### **Régimen II: Chorro del Cono**

En su estudio Nuansing (2014) menciona que es la fuerza tangencial la que dirige a la solución hacia el colector, cerrando así el circuito y pulverizando el chorro en caso de electrospray o extrayéndolo en caso de electrospinning. Para el caso de una solución polimérica con propiedades viscoelásticas se obtiene un chorro, para el cual, es posible aproximar el diámetro mediante la *ecuación (2)*.

$$d_j = 4 \left( \gamma \varepsilon_0 \frac{Q^2}{I^2} \right)^{1/3} \quad (2)$$

Donde  $d$  es el diámetro del chorro,  $\gamma$  es la tensión superficial,  $Q$  es el caudal,  $I$  es la corriente, y  $\varepsilon_0$  es la permitividad del vacío.

### **Régimen III: Whipping**

Después del jet existe una perturbación continua, y la trayectoria de cada segmento de fibra se vuelve perpendicular al eje. Dada la repulsión de las cargas se presentan muchos giros y elongaciones aleatorias, el solvente se evapora completamente, lo que permite la obtención de fibras delgada. Hohman y Fridrikh analizaron cuantitativamente el jet, tratándolo como un fluido Newtoniano ya que la evaporación del solvente es ignorada. La *ecuación (3)* describe aproximadamente el movimiento para desplazamiento normal de la fibra.

$$\rho \pi d^2 \ddot{x} = 2\pi d \sigma_0 E_\infty \cdot \hat{n} + \left( \pi \gamma + \frac{d \varepsilon_0}{2} (\varepsilon - 1) (E_\infty \cdot \hat{t})^2 - \frac{2\pi^2 d \sigma_0^2}{\varepsilon_0} (2 \ln x - 3) \right) \frac{d}{R_w} \quad (3)$$

Dicho desplazamiento normal se divide en dos términos:

- **Término I, Adelgazamiento del jet:** Debido a la fuerza electrostática que interactúa en la superficie de carga del jet.

$$2\pi d\sigma_0 E_\infty \cdot \hat{n} \quad (4)$$

- **Término II, Whipping del jet:** Debido al esfuerzo normal que afecta a la inestabilidad del jet.

$$\left( \pi\gamma + \frac{d\varepsilon_0}{2} (\varepsilon - 1) (E_\infty \cdot \hat{t})^2 - \frac{2\pi^2 d\sigma_0^2}{\varepsilon_0} (2\ln x - 3) \right) \frac{d}{R_w} \quad (5)$$

Donde  $\sigma_0$  es la densidad de carga superficial,  $E_\infty$  es el vector de campo eléctrico,  $R_w$  es el radio de curvatura del whipping.

En esta región es usual y normal que jet se vuelva inestable, y de esta manera es común que producto del latiguelo en el plato colector la muestra recolectada tenga forma circular a pesar de que al inicio el jet parece dirigirse a un solo punto.

#### 2.1.4. Caracterización

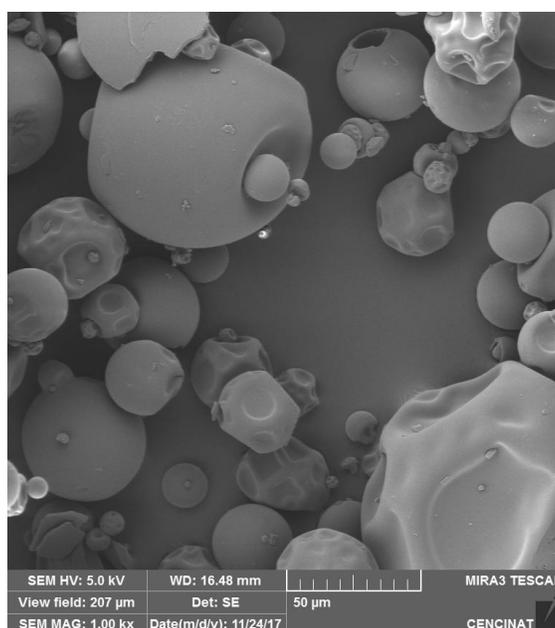
La caracterización proporciona una descripción en diversos ámbitos sobre las propiedades y características de las fibras obtenidas por el proceso de electrohilado. Entre los principales están la caracterización morfológica o de forma, mecánica y reológica, aunque en diferentes bibliografías se analizan otros campos como la caracterización térmica, química o de estructura molecular, que va a depender directamente de las aplicaciones proyectadas de las fibras. En el presente trabajo se realizarán las siguientes caracterizaciones:

##### **Caracterización Morfológica**

Caracterización física de las fibras asociada a su apariencia y estructura, como la forma y dimensiones de la sección transversal, rugosidad, porosidad, etc. Especialmente referida al diámetro promedio de las fibras obtenidas. La forma de determinar las propiedades morfológicas de nano y microfibras es a través de microscopía avanzada, tal como la microscopía electrónica de barrido (SEM) o la microscopía electrónica de

transmisión(TEM) en caso de necesitar mayor aumento, que permiten tener una visión clara de la forma de las fibras en ampliaciones de imagen muy altas. Para esto resulta necesario que la muestra sea conductora razón por la cual se suele recubrir las con una capa delgada de oro o platino para resultados de mayor resolución (Campbell, Pethrick, & White, 2000).

En la *Figura 5* se ilustra una imagen de partículas de PVP de 30KDa observadas desde un microscopio electrónico de barrido(SEM) obtenida en el laboratorio de microscopia del CENCINAT.



**Figura 5.** Partículas de PVP 30KDa observado desde microscopio SEM

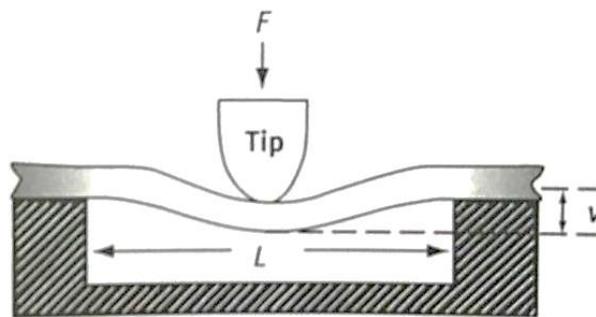
Fuente: CENCINAT

### ***Caracterización Mecánica***

La medición correcta de las propiedades mecánicas de las fibras es muy importante, especialmente en aplicaciones biomédicas relacionadas con la regeneración de tejidos considerados como duros (huesos o cartílagos), dado que el andamio debe resistir la presión que en el tiempo se genere por el crecimiento del nuevo tejido. En el caso de parches o apósitos parecería ser también crucial, pero estos no tienden a trabajar solos sobre una herida, participan como parche principal bioactivo apoyado por un secundario

pasivo como una gasa que es el que brinda la rigidez y resistencia a cualquier tipo de esfuerzo realizado en su manipulación, colocación y uso.

Las propiedades elásticas del material son determinadas por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), que consiste en un ensamble de cantiléver o palanca y una punta que es utilizada para la exploración de la superficie de la muestra, generándole una deflexión como que se trabajase sobre una viga. Debido a la repulsión que se presenta al entrar la punta en contacto con cortezas atómicas, es posible obtener una resolución atómica con un contacto muy ligero (Tan & Lim, 2004). Mediante el uso del microscopio de fuerza atómica, se asume a la fibra como una viga elástica con diámetro uniforme, basándose en la *Figura 6* la ecuación (6) permite determinar el módulo de elasticidad de la misma.



**Figura 6.** Esquema de la fibra ensayada en AFM

Fuente: (Tan & Lim, 2004).

$$E = \frac{FL^3}{192vI} \quad (6)$$

Donde  $F$  es la máxima carga de fuerza aplicada por el indentador,  $L$  la longitud de suspendida de la fibra,  $I = \frac{\pi D^4}{64}$  ( $D$ = diámetro de la fibra), el momento de inercia de una sección transversal circular y  $v$  la deflexión de la fibra en la mitad.

Otra de las formas de medir el módulo de Young está basado en la toma de imágenes haciendo vibrar la sonda a través de un movimiento oscilatorio, este método es conocido como el *Método de Contacto de Hertz*.

El Método de contacto de Hertz se basa principalmente en un modo de contacto, en el que un indentador sigue una trayectoria correspondiente a una fuerza de muestreo de punta constante y repulsiva. Esta técnica depende principalmente de la rigidez en voladizo de la muestra. (Petr, 2013)

Suponiendo conocida la constante  $A$  que relaciona la deflexión del voladizo  $d$  con su respectivo desplazamiento  $z$ , es posible calcular la Fuerza usando la rigidez del voladizo  $k$  como se muestra en la ecuación (7).

$$F = kz = kAd \quad (7)$$

El factor  $k$  que define la rigidez del voladizo o las constantes de resorte de los brazos telescópicos AFM es posible obtenerse mediante el Método de Sader para la constante del resorte y sensibilidad de la punta, que permite su cálculo a partir de frecuencia de resonancia descargada. Además, se torna necesario tener el valor de la masa del voladizo, densidad, grosor y vista en planta del voladizo. Particularmente para una muestra de voladizo rectangular la constante está dada por la ecuación (8). (Jhon, James, & Mulvaney, 1999).

$$k = M_e \cdot \rho_c \cdot b \cdot h \cdot L \cdot \omega_{vac}^2 \quad (8)$$

Donde  $M_e$  es la masa efectiva normalizada que toma el valor 0.2427 para  $L/b > 5$ ,  $\omega_{vac}$  es la frecuencia de resonancia radial fundamental del voladizo en vacío,  $\rho_c$  es la densidad,  $b$  el ancho y  $h$  el espesor del voladizo.

La deflexión en voladizo  $d$  y el factor de conversión  $A$  se pueden obtener del detector del cuadrante de señal, partiendo de un valor de desplazamiento conocido en el extremo del voladizo, que se fija al escáner mientras la sonda está en contacto con una superficie de muestra muy dura controlada. (Petr, 2013)

### **Caracterización Reológica**

La caracterización reológica se realiza a la solución polimérica o solución acuosa necesaria para la obtención de fibras. Es crucial en el punto de analizar cuál es el comportamiento de la viscosidad de la solución o el esfuerzo de corte frente a diferentes

tasas de cizallamiento. Definir si el fluido es newtoniano como no newtoniano permitirá entender como debe ser manipulado en pro de conseguir las características necesarias en las fibras a elaborar (Agarwal, Burgard, Greiner, & Wendorff, 2016).

### **2.1.5. Aplicaciones Biomédicas de las Fibras**

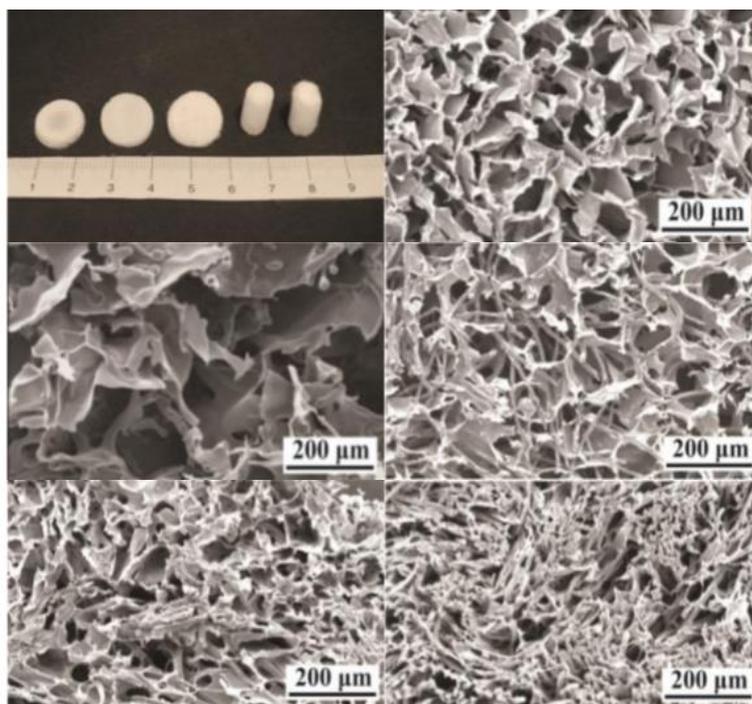
Las fibras obtenidas por el proceso de electrospinning con el tiempo han encontrado cabida en una serie de aplicaciones antes desconocidas entre las cuales resaltan: andamios de tejidos (Niklason, 2000), curación de heridas (Khil, Cha, Kim, Kim, & Bhattari, 2003), liberación de fármacos (Kim, y otros, 2004), filtración (Maus, Goppelsroder, & Umhauer, 1997) , inmovilización de enzimas (Roper & Lightfoot, 1995), biotecnología, aislantes térmicos, seguridad y defensa, generación y almacenamiento de energía (Cheng, Wan, Wang, & Wu, 2005) y otras (Radhakrishnan, y otros, 2013).

La aplicación de nanofibras no tejidas en aplicaciones biomédicas es posible dada la facilidad de trabajar con una serie de polímeros biocompatibles, los pequeños diámetros de fibra, que se asemejan a la matriz extracelular y al área de superficie grande de una fibra que permite unir las proteínas y los receptores de la membrana celular durante el proceso de cultivo celular. Por lo tanto, son capaces de potenciar la proliferación celular (Xu, Zhang, & Fan, 2010). Entre las aplicaciones biomédicas con mayor estudio se encuentran los andamios de tejidos (*tissue scaffolds*), liberación de fármacos o apósitos (*wound dressings*) y suturas que históricamente han sido la primera aplicación de las fibras obtenidas por este método.

#### ***Tissue scaffolds***

Los andamios de tejidos son estructuras biocompatibles utilizadas para reparar un tejido humano dañado, haciendo la función de plantillas temporales para la siembra, invasión, proliferación, diferenciación y regeneración de tejido biológicamente funcional. Últimamente se ha presentado un gran aumento en la incorporación de células madre a la estructura en estrategias de regeneración de cartílago y hueso dada su capacidad de poder diferenciar múltiples linajes celulares (Radhakrishnan, y otros, 2013).

Los investigadores han utilizado los andamios de tejidos para una serie de estructuras biológicas como son: vasos sanguíneos (Kidoaki, Kwon, & Matsuda, 2005), cartílagos (Hattori & Wakitani, 2002), huesos (Terai, Yamano, & Vacanti, 2002), nervios (Rukta, Apodaca, Stern, & Rosenblum, 1988) y piel en caso de que la herida lo requiera (Bhattarai, y otros, 2004). En la *Figura 7* se aprecia una imagen SEM de un andamio de tejido basado en fibroína de seda.



**Figura 7.** Andamios de Tejido en base a Fibroína de Seda Imagen SEM

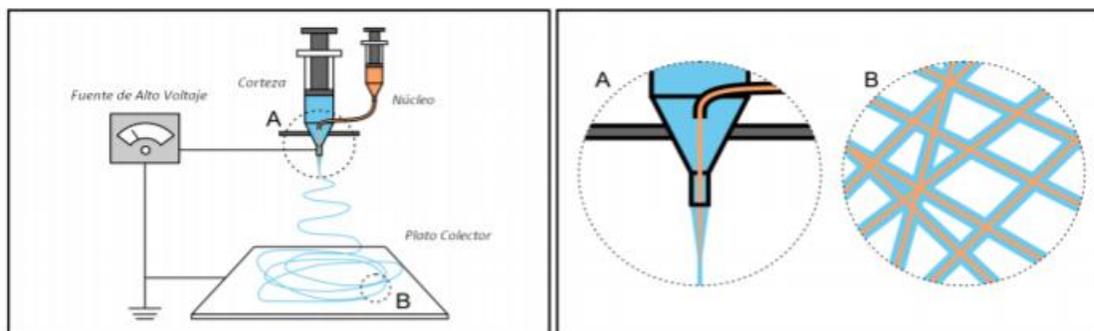
Fuente: (Mobini, y otros, 2012)

### ***Liberación de Fármacos***

La liberación controlada de fármacos a una velocidad determinada durante un periodo de tiempo es factible usando matrices poliméricas biocompatibles producidas por electrohilado. Las membranas nano y micro fibrosas han sido estudiadas y aplicadas en sistemas de liberación de fármacos dadas sus características altamente funcionales y basando el principio de liberación, en que la velocidad de disolución de una partícula aumenta cuando se incrementa el área superficial del fármaco y del portador

correspondiente, propiedad principal de las fibras electrohiladas en una configuración coaxial (Kim, y otros, 2004).

En la *Figura 8* se distingue la configuración coaxial de electrohilado para liberación de fármacos.



**Figura 8.** Configuración Coaxial de Electrohilado para liberación de fármacos

Fuente: (Duque Sánchez, Rodríguez, & López, 2013)

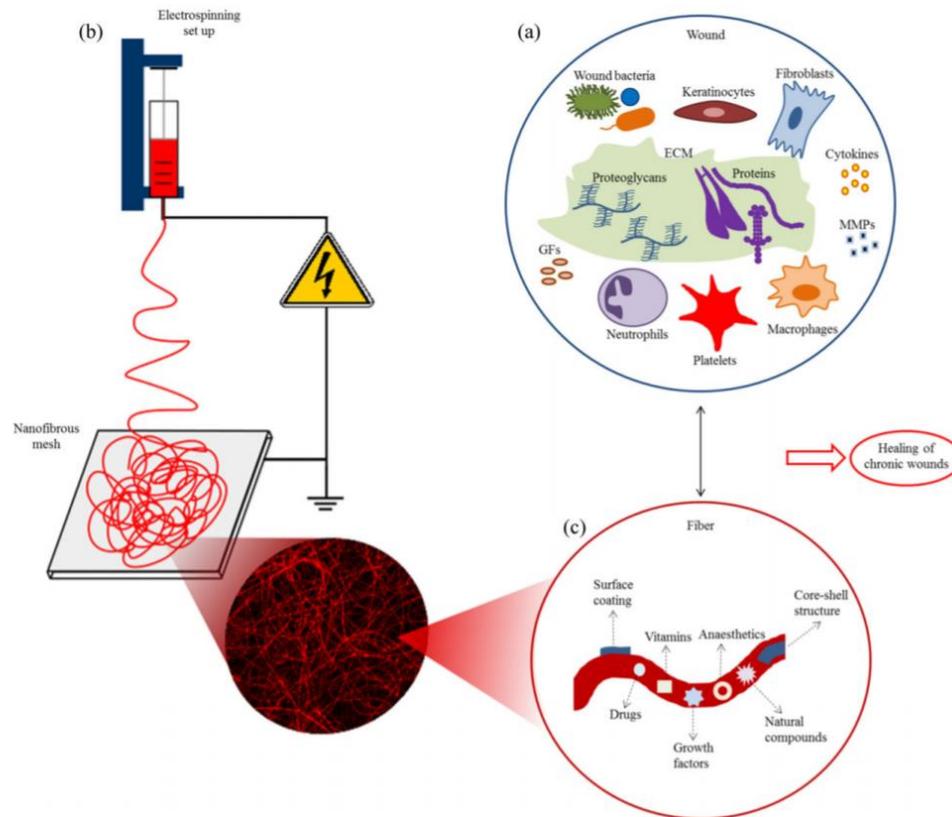
### **Wound Dressings**

Los *wound dressing* o apósitos son elementos que ayudan a evitar la infección y mantener un entorno apropiado que permita la correcta cicatrización de la herida (Percival, 2002), para ello debe contar con ciertas características esenciales como la capacidad hemostática, que son los mecanismos que detienen las hemorragias, poder antibacteriano, absorción de excesos de líquidos exudados como fluidos de la herida o pus, transmisión apropiada entre agua y vapor, capacidad de ajustarse al contorno de la herida, adhesión funcional, es decir, que se adhiera al tejido sano, no al herido, indoloro para el paciente, capacidad de removerse con facilidad y finalmente que sea de bajo costo (Venugopal, Ma, & Ramakrishna, 2005); (Bhattarai, y otros, 2004); (Zahedi, Rezaeian, Ranaei-Siadat, Jafari, & Supaphol, 2010); (Lionelli & Lawrence, 2003).

Las nanofibras electrohiladas cuentan con una serie de propiedades que las fortalecen como materiales para apósitos y vendaje de heridas tales como alta permeabilidad al oxígeno, tamaño de poro variable, alta relación de área superficial a

volumen y similitud morfológica a la matriz extracelular (EM) (Smith & Ma, 2004); (Zhou, y otros, 2008). Se ha reportado que con la disminución del diámetro de las fibras aumentan los contactos fibra a fibra por unidad de longitud; esto repercute en una reducción del tamaño promedio de poros en el enrejado y, por tanto, una difícil migración celular en el interior del apósito. Por lo anterior, los beads(collares) conocidos por la literatura como defectos en este caso permiten la proliferación celular, dado que aumentan la porosidad de la membrana, aumentando el tamaño poros e intersticios entre las fibras. (Murphy & O'Brien, 2014); (Khil, Cha, Kim, Kim, & Bhattari, 2003).

Una variedad de fibras preparadas con biomateriales que incluyen quitosán, fibrinógeno, fibroína de seda, celulosa bacteriana, gelatina y colágeno y compuestos de estos materiales pueden promover la curación de heridas haciendo uso de las propiedades antes citadas (Yannas, 1992). Las nanofibras además brindan la posibilidad de incorporar una variedad de moléculas bioactivas (fármacos como antimicrobianos, antiinflamatorios) en su estructura para aumentar las propiedades biológicas deseables en la curación de heridas (Elsner & Zilberman, 2009); (Chevalier, Chulia, Pouget, & Viana, 2008). Esto es posible identificarlo en la *Figura 9*.



**Figura 9.** Electrospinning de Fibras para apósitos con agentes bioactivos para la curación de heridas

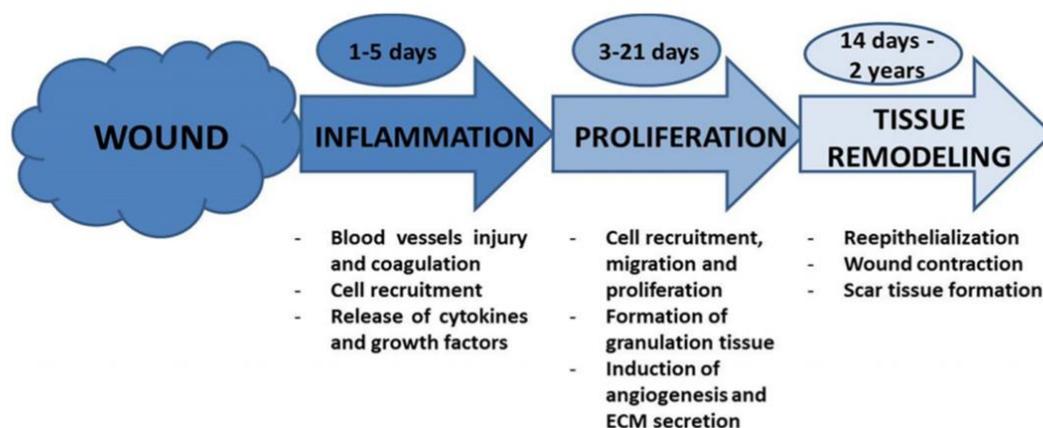
Fuente: (Abrigo, McArthur, & Kingshott, 2014)

El proceso de curación de heridas de un adulto se puede clasificar en tres fases distintas (Martin, 1997), como se distingue en la *Figura 10*.

1. Inflamación, fase en la que las células muertas y dañadas, junto con los patógenos o los desechos, se eliminan mediante la fagocitosis. Se liberan factores de crecimiento derivados de plaquetas que causan la migración y división de las células durante la proliferación.
2. Proliferación, fase en la que se produce proliferación o formación de nuevos tejidos y angiogénesis, regeneración de colágeno, crecimiento de tejido granulado,

epitelización y contracción de la herida. En esta fase es en la que el apósito acelera la proliferación celular mientras cuida el entorno de la herida.

3. Remodelación del tejido, fase en la que el colágeno se orienta a lo largo de las líneas de tensión, y las células no viables se eliminan por apoptosis (Bielefeld, Amini-Nik, & Alman, 2013).



**Figura 10.** Fases normales en la curación de heridas

Fuente: (Harding, Morris, & Patel, 2002)

## 2.2. Fibroína de Seda

Los biopolímeros se caracterizan principalmente por biocompatibilidad con el cuerpo humano permitiendo un sinnúmero de aplicaciones biomédicas. Sustancias naturales como el colágeno, ácido hialurónico, quitosán o la misma fibroína de seda son claros ejemplos de estos. La fibroína resalta entre ellos por algunas propiedades que la potencian como son la biocompatibilidad, biodegradación controlable, bajo nivel citotóxico y sus excelentes propiedades mecánicas.

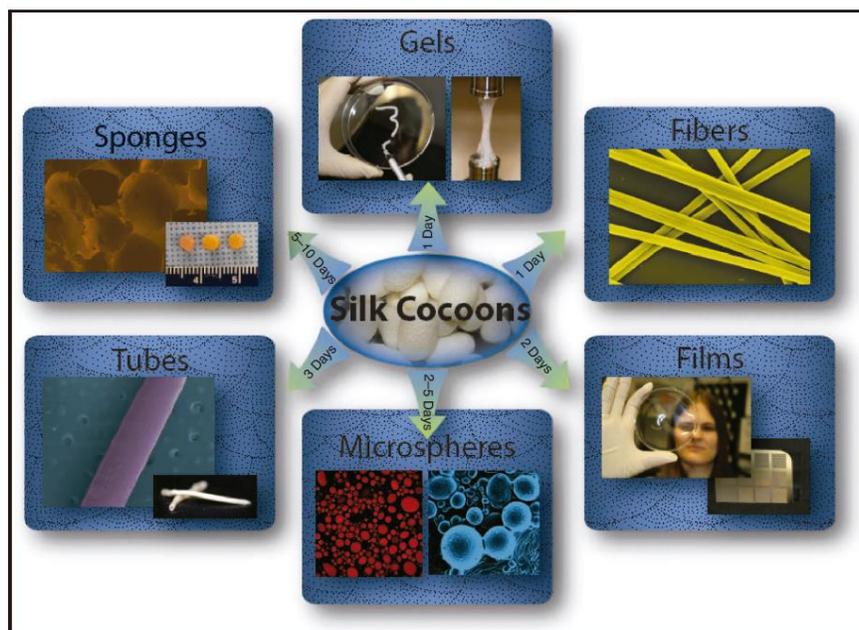
La seda, es segregada por las glándulas sericígenas del gusano de seda (*Bombyx Mori L.*), que la usa para construir el capullo, donde realizará la metamorfosis de larva a adulto. Durante la formación del capullo, la larva secreta dos hebras finas de

aproximadamente 10 $\mu$ m de diámetro, de fibroína de seda con sericina (Inoue, Tanaka, & Arisakaffi, 2000).

La fibroína de seda es el mayor constituyente proteico en los capullos del gusano de seda( alrededor del 72-81%), dejando el 19-28% a la sericina que es la proteína que hace la función de pegamento de las fibras de fibroína dentro del capullo. (Lee, 1999) La fibroína de seda como materia prima es insoluble en el agua, más cuando se realiza el proceso para la formación de la solución acuosa su estructura cambia y se vuelve soluble al agua. (Gamo, Inokuchi, & Laufer, 1977); (Cenis, 2009). Esto se debe a su composición y orientación molecular que hacen que la fibroína forme una estructura semicristalina que contiene dos fases: lámina  $\beta$  antiparalela cristalina altamente ordenada separada por espaciadores de lámina  $\beta$  de menor orden (Hardy & Scheibel, 2010). La parte cristalina contribuye a la fuerza y tenacidad y la parte no cristalina aporta la flexibilidad y la elasticidad a la fibra. (Hoa, Wanga, & Laua, 2012); (Murphy & Kaplan, 2009).

Actualmente la seda es muy utilizada en la industria textil dada su fuerza, brillo, baja conductividad térmica y sus propiedades de absorción de humedad. Lo que es más importante, en la actualidad se usa ampliamente como biomaterial en el campo biomédico, especialmente en ingeniería de tejidos y en medicina regenerativa, dado que facilita la adhesión de las células, estimula su crecimiento y permite la diferenciación, además, es biocompatible, resistente y biodegradable en fases controlables. (Calafat, Guinea, Rigueiro, & Plaza, 2011); (Kim, Park, Kim, Wada, & Kaplan, 2005).

De acuerdo a las cualidades que presenta la fibroína, esta puede elaborarse en diferentes configuraciones, según las necesidades: geles, películas, matrices porosas 3D, microfibras y microesferas como se observa en la *Figura 11* (Min, y otros, 2004).



**Figura 11.** Distintas presentaciones de la fibroína de seda para aplicaciones biomédicas

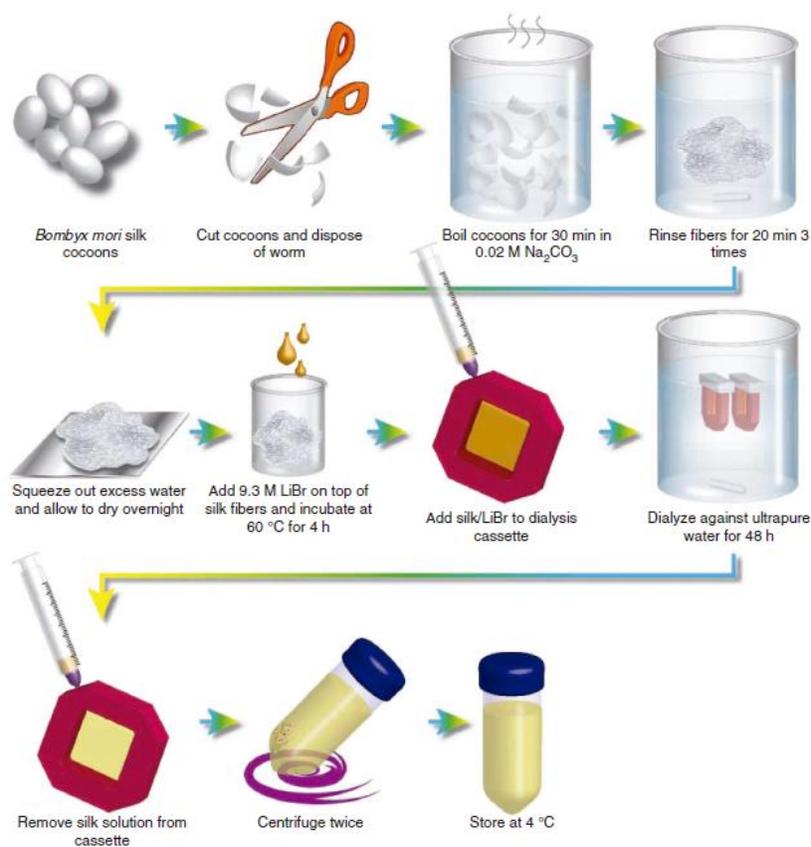
Fuente: (Rockwood, y otros, 2011)

### 2.2.1. Extracción

Dada la complejidad de manejar proteínas de alto peso molecular sin agregación como la fibroína de seda se ha vuelto necesario la formulación de una solución acuosa reconstituida o regenerada o conocida como *RSF* (*reconstituted silk fibroin*) para la fabricación de membranas de seda y estructuras complejas tales como nanofibras y nanopartículas. (Jiang, y otros, 2007); (Blond, McCarthy, Blau, & Coleman, 2007)

La producción de una solución acuosa de fibroína de seda para su posterior manipulación en la formación de membranas sigue un protocolo químico descrito por Kaplan (1994) que se observa en la *Figura 12*. Se comienza purificando los capullos de *Bombyx Mori* cosechados, a través de la eliminación de la sericina por un proceso denominado desgomado durante 30 minutos, que separa de la fibroína de la sericina con la ayuda de una solución salina como es el carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ) 0.02M. La sericina es una glucoproteína soluble en agua que se encarga de unir los filamentos de fibroína y, aunque contribuye aumentando las propiedades mecánicas de la seda, tiene

efectos perjudiciales biológicos sobre la integración de la seda en dispositivos ópticos y biomédicos (Meinel, y otros, 2005).



**Figura 12.** Protocolo de obtención de fibroína de seda reconstituida

Fuente: (Kaplan, 1994)

Tras el desgomado, la fibroína que tiene una apariencia similar al algodón debe ser secada al ambiente por 3 días. Dado que la proteína es insoluble al agua se vuelve necesaria su disolución en una solución salina o ácida como el bromuro de litio (LiBr) o ácido fórmico que para términos de una aplicación biomédica no es recomendable. Tras 3 horas a 60°C de temperatura constante la fibroína se disuelve por completo, formando una solución altamente viscosa con una conductividad eléctrica muy alta perjudicial para el proceso de electrohilado, por lo que se vuelve necesario un proceso de diálisis (Rockwood, y otros, 2011).

La diálisis permite realizar un intercambio de iones entre agua ultra pura y la solución previamente cargada por el LiBr mediante el uso de cassettes o membranas porosas de diálisis. Para el proceso de diálisis es necesario continuos cambios de agua durante 48 horas, hasta que el intercambio de iones sea mínimo y la conductividad de la solución de fibroína de seda sea la adecuada para el proceso de electrospinning entre 150-300  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Aznar Cervantes, Lozano, García, VÍllora, & Cervantes, 2015). Tras el proceso de diálisis la solución acuosa de fibroína de seda debe ser almacenada a 4°C por el lapso de 30 días, antes de que esta se degrade por completo y no sea electrohilable (Wray, Hu, & Kaplan, 2011).

### **2.2.2. Propiedades de la fibroína de seda**

La fibroína de seda presenta una serie de propiedades que la hacen muy interesante como biopolímero: es un material de naturaleza proteica, altamente biocompatible, no presenta rechazo ni respuesta inflamatoria en los tejidos donde se injerta (Gaviria & Caballero, 2015). El rechazo ocasional es producto de la contaminación de la fibroína con sericina generado por errores en el proceso de desgomado (Wong, Kim, Vunjak-Novakovic, & Kaplan, 2006). Presenta una gran resistencia mecánica a tracción, junto a una gran flexibilidad, es biodegradable, pero a un ritmo más lento que en otros biopolímeros orgánicos, lo que permite una mejor consolidación de los tejidos. En 2 años se reabsorbe totalmente y no se encuentran rastros de la misma en los tejidos (Altman, y otros, 2003); (Kim, Nam, Lee, & Park, 2003); (Kundu, Dewan, Ghoshal, & Kundu, 2008); (Kundu, y otros, 2012). Además, las propiedades mecánicas a la tracción de las fibras de fibroína de seda procedente de Bombyx Mori con un diámetro entre 200-400 nm son: Módulo de Young de 0.6 MPa y una Resistencia a la tracción de 15 MPa. (Ohgo, Zhao, Kobayashi, & Asakura, 2002)

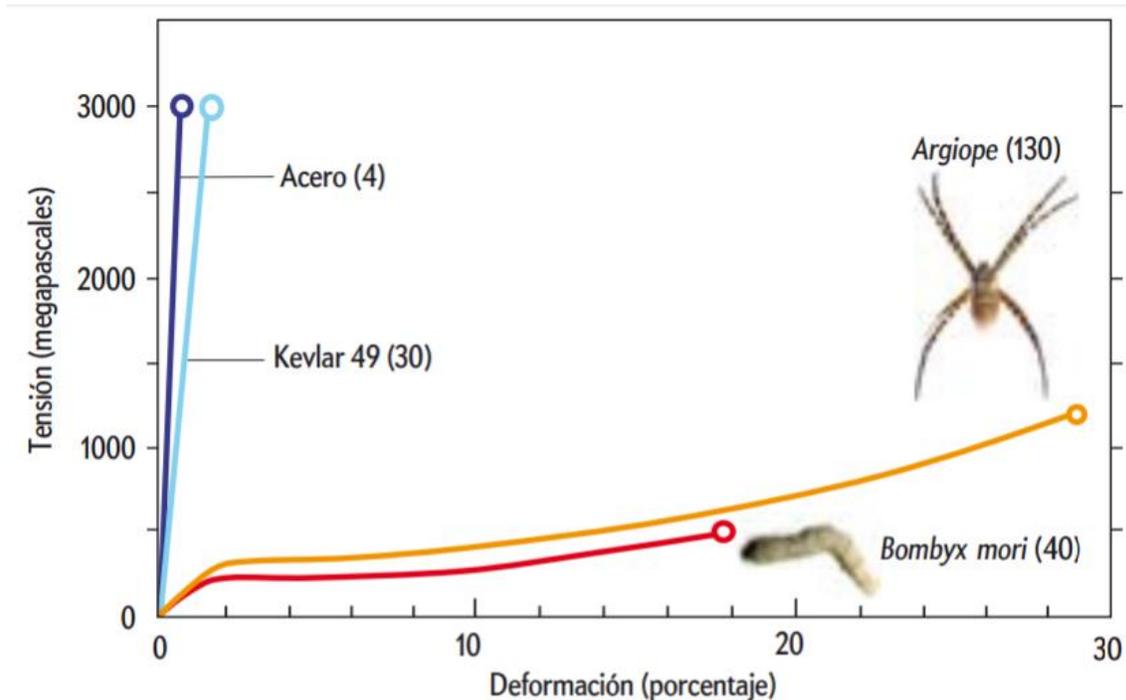
El hilo de gusano de seda es capaz de almacenar una energía de 40 [kJ/kg], superior a la mayoría de fibras artificiales (Wharram S. , Zhang, Kaplan, & McCarthy, 2010). La relación de resistencia a la densidad de la seda es hasta diez veces más alta que la del

acero (Giesa, Arslan, Pugno, & Buehler, 2011). En la *Tabla 4* se diferencian las propiedades mecánicas de la fibroína de seda tanto engomada como desgomada, mientras que en la *Figura 13* se observa la comparación del comportamiento a la tensión entre algunos materiales como el acero, el kevlar y la seda de gusano y araña.

**Tabla 4**  
*Propiedades mecánicas de la fibroína de seda*

Fibroína de Seda (Bombyx Mori)	Módulo de Young [ $MPa$ ]	Carga Máxima [ $N$ ]	Esfuerzo de rotura [ $MPa$ ]	Elongación [%]
Engomada	$365 \pm 102$	$49 \pm 8$	$30 \pm 7$	$16 \pm 1$
Desengomada	$13300 \pm 1.8$	$470 \pm 0.81$	$635 \pm 108$	$22 \pm 5$

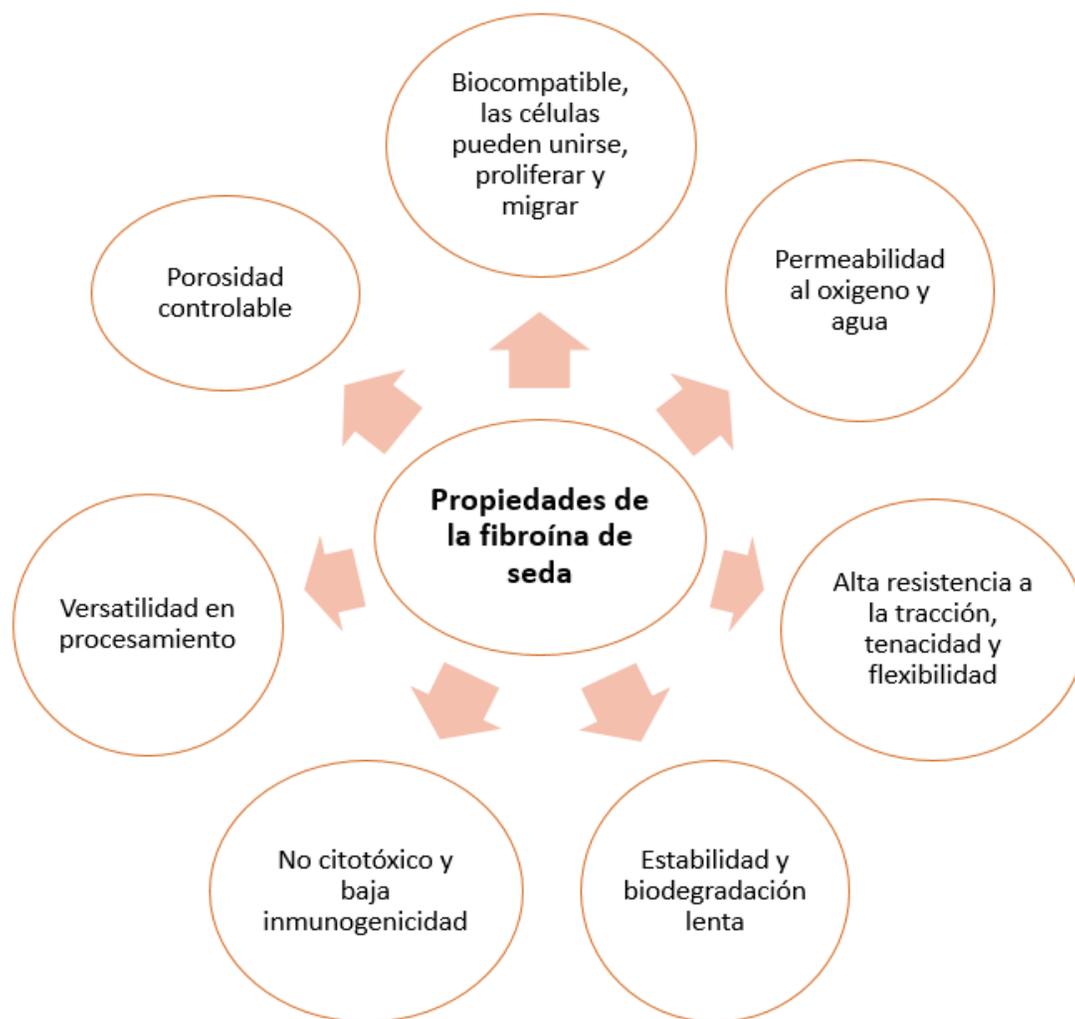
Fuente: (Zhang, y otros, 2013)



**Figura 13.** Gráfica Tensión vs Deformación de algunos materiales

Fuente: (Elices, Pérez, Plaza, & Guinea, 2011)

Las fibras de seda natural que se utilizan como suturas quirúrgicas, que es la aplicación histórica de la seda, retienen más del 50% de sus propiedades mecánicas después de dos meses de implantación in vivo, por dicha razón son consideradas como un biomaterial no degradable por la Farmacopea de los Estados Unidos (Omenetto & Kaplan, 2010); (Vepari & Kaplan, 2007). En la *Figura 17* se resumen todas las propiedades de la fibroína de seda.



**Figura 14.** Propiedades de la Fibroína de Seda

### **2.2.3. Electrospinning de Fibroína de seda**

Para ser electrohilable la solución acuosa de fibroína de seda es necesaria la mezcla con un polímero de alto peso molecular que le brinde mejores propiedades reológicas, mayor viscosidad y concentración, parámetros muy importantes en el electrospinning, (Jin H. J., Fridrikh, Rutledge, & Kaplan, 2002)

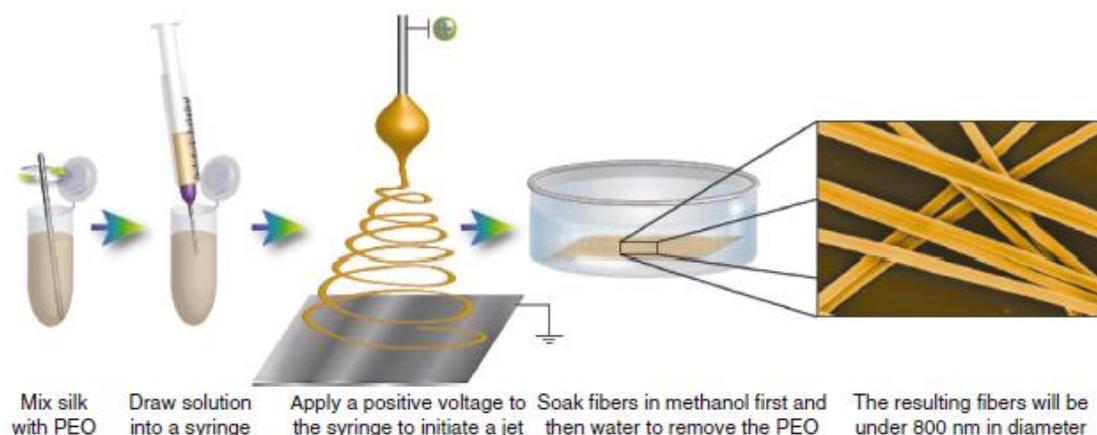
La mezcla de la fibroína de seda con poli (óxido de etileno) (PEO) reduce la fragilidad del material y permite el procesamiento y manejo del material final electrohilado (Jin H. , Fridrikh, Rutledge, & Kaplan, 2002). Los diámetros de fibra varían entre 700 y 900 nm para diferentes mezclas de seda / PEO. Una serie de trabajos realizados usando diferentes mezclas de seda / PEO para formar esteras electrohiladas para el cultivo de células estromales de médula ósea humana (hBMSC) demostraron tener una excelente unión celular, diseminación y crecimiento del cultivo durante un período de 14 días (Jin, Chen, Karageorgiou, & Altman, 2004); (Reneker & Chun, 1996). Además, se desarrollaron construcciones de electrohilado de seda mezclada / PEO similares para usar en aplicaciones de curación de heridas (Schneider A. , Wang, Kaplan, Garlick, & Egles, 2009); (Wharram S. E., Zhang, Kaplan, & McCarthy, 2010); (Jin H. J., Fridrikh, Rutledge, & Kaplan, 2002).

Schneider et. al (2009) demostró tras un estudio que las fibras de fibroína de seda / PEO podrían cargarse con factor de crecimiento epidérmico (EGF) y liberar 25% del contenido de la molécula durante un período de una semana. Se demostró además que las esteras electrohiladas aumentaban el cierre de la herida a un ritmo notable, aumentado en un 90% en comparación con los controles. (Schneider A. , Wang, Kaplan, Garlick, & Egles, 2009)

Dicho factor de crecimiento para el caso en cuestión sería la sangre de drago dadas las propiedades biológicas que esta posee y posteriormente se enunciarán. El tratamiento de las películas de fibroína con agentes biológicos líquidos necesitan previamente de una inmersión por 10 minutos en metanol que induce un cambio en la matriz polimérica de una estructura amorfa a una estructura más cristalina dominada por hojas  $\beta$

antiparalelas insolubles en agua (Motta, Fambri, & Migliaresi, 2002); (Aznár Cervantes, 2012). Este proceso se lo conoce como cristalización de la fibra.

Wharram et. al. (2007) investigaron las propiedades funcionales de seis matrices de fibroína de seda preparadas mediante electrospinning de seis formulaciones diferentes de fibroína / PEO. El PEO en este caso cumple el papel de mejorar la viscosidad extensional de la solución acuosa para prevenir la ruptura del chorro de fluido durante el electrospinning y se elimina empapando los andamios en agua después de la fabricación. (Sugihara, y otros, 2000). En la *Figura 15* se ilustra el proceso de electrohilado de fibras de fibroína de seda.



**Figura 15.** Proceso de electrospinning de fibras de fibroína de seda

Fuentes: (Rockwood, y otros, 2011)

Para la ingeniería de tejidos dérmicos, la fibroína de seda tiene el potencial de actuar como un sustituto del colágeno, proporcionando soporte estructural y resistencia mecánica al injerto de ingeniería de tejidos (Wray L. , y otros, 2011).

### 2.3. Sangre de Drago

La sangre de drago o croton lechleri Müll. Arg. (sin. Croton draconoides Müll. Arg., Euphorbiaceae) es un árbol amazónico de pequeña envergadura común en las laderas

andinas orientales de Perú, Colombia, Bolivia y Ecuador. Históricamente la savia se ha utilizado sobre heridas para detener la hemorragia, acelerar el proceso de cicatrización evitando dejar huellas visibles o queloideas, sellar y proteger las lesiones de la infección. La savia se seca rápidamente y genera una barrera de tono rojizo, formando una "segunda piel". (Gupta, Bleakley, & Gupta, 2008).

La savia extraída de la corteza (látex) de dicho árbol mostrada en la *Figura 16* es conocida como sangre de drago, se usa principalmente para el tratamiento de una serie de patologías como: diarreas crónicas, leucorrea; gastritis, úlceras, como cicatrizante, estimulante de defensas del organismo, bacteriostático, bactericida, fungicida, antiviral, antioxidante, anticancerígeno (hígado, estómago, útero), antireumático, anti inflamatorio, antiofídico; es usado también en el tratamiento de influenza, tonsilitis, herpes, uta, anemias, tuberculosis, quemaduras, acné, resfriados, afecciones de amígdalas, gingivitis, cervicitis; para mejorar la fertilidad, bajar de peso, controlar hemorragias, etc.. (Cerutti, 2000); (Marcelo, y otros, 1999); (Persinos-Perdue, Blomster, Blake, & Farnsworth, 1979); (Domínguez, 1985) .



**Figura 16.** Sangre de drago

Fuente: (Risco, Iglesias, & Cañigüeral, 2001)

### 2.3.1. Componentes

Dentro de los componentes principales de la sangre de drago existen aquellos que aceleran la cicatrización como los taninos, taspina, lignanos, las proteínas que ayudan a la producción fibrina que ayuda a mantener la cicatriz adherida a la piel mientras se genera el nuevo tejido, además cuenta con antioxidantes y antiinflamatorios entre otros, como los flavonoides, saponinas, proantocianidina SP-303, catequinas, etc. (Lobardo, 1994); (Herforth, 2002).

Además la sangre de drago tiene como componente activo principal un elemento llamado taspina, que es un alcaloide encargado de la formación del colágeno y por ende la aceleración de la cicatrización, además de ser un excelente antibacteriano y antiséptico (Allaica Tenesaca, 2015); (Vaisber & Millan, 1989). En la Tabla 5 se detallan los componentes principales de la sangre de drago.

**Tabla 5**

*Componentes de la sangre de drago*

Grupo compuesto químico	Compuestos químicos específicos	Función	Descripción
<b>Proantocianidina (Lignanos Dihydrobenzofuranos)</b>	3'-4-O-dimetilcedrusina	Cicatrizante	Precipitan las proteínas celulares y forman una costra oscura en la herida. Estimula la formación de fibroblastos y colágeno. Parcial responsable de la actividad cicatrizante.
	(SP – 303)		
	4-O-metilcedrusina	Antiviral	Usado contra una serie de cepas de laboratorio de virus ADN y ARN entre ellos el virus sincitial respiratorio (RSV) y el virus de la influenza.
3-O-metilcedrusina (neolignano)			
<b>Taspina (alcaloide) (9% del peso seco)</b>	Sitosterol	Cicatrizante	Posee un efecto cicatrizante en dosis pequeñas. Acelera la curación de una herida, dada la estimulación de la
	Sitosterol glucopiranósido		
	Crolequinol(Triterp		

CONTINÚA 

	enoide) Ácido crolequínico (Triterpenoide) Polifenoles (fenoles simples)	quimiotaxis de fibroblastos. Tiene un efecto directo sobre la migración celular y la síntesis de colágeno, lo que activa la cicatrización (Heredia & Goñi-Morgan, 1985)
		Antiulcerosa Reduce los índices de ulceración, aumenta el espesor y la consistencia de la capa de mucus gástrico.
		Antitumoral Actividad citostática frente a los tumores KB y V-79.
<b>Flavonoides (polifenoles)</b>	Ácidos fenólicos: cafeico, clorogénico, ferúlico, sinápico y p-cumárico	Encargados de actividades antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas y vasodilatadoras. La actividad antioxidante es una de las principales de los flavonoides, que derivan en la antimutagenicidad, anticarcinogenicidad, fortalecimiento de las fibras de colágeno y retraso del envejecimiento.

Fuente: (Gupta, Bleakley, & Gupta, 2008); (Jones K. , 2003); (Pieters, y otros, 1993).

### 2.3.2. *Propiedades*

En 1994, se encontraron otros fitoquímicos, incluyendo los compuestos fenólicos, proantocianinas y diterpenos que mostraron actividad antibacteriana potente así como propiedades curativas de heridas (Elliot, Buret, McKnight, Miller, & Wallace, 1998). Varios estudios demostraron que la sangre de grado a concentraciones mayores de 1:300, tienen un efecto citotóxico en las células de la mucosa gástrica (Chen Z. P., 1994). La dosis usual en pueblos de la amazonia es muy diluida (aproximadamente tres gotas en 500ml de agua o una cucharada pequeña en un litro de agua, aproximadamente el 0.06% v/v), claramente mucho más diluida que la concentración que inhibe el crecimiento de *Helicobacter pylori*, sin perder sus propiedades curativas. (Elliot, y otros, 2000).

Vaisberg et al. (1989) demostraron que la aplicación tópica diaria de 0,05 ml de una solución al 10% de la savia de sangre de drago (*Croton lechleri*) a heridas cutáneas presentadas por ratones causó un aumento significativo del 31% en la tasa de reparación de la herida, corroborando además que el efecto de cicatrización de la herida está estrechamente relacionado a su agente activo principal como es la taspina. (Vaisberg, y otros, 1989)

Porras-Reyes et. al (1993) que enfocaron su estudio en la actividad cicatrizante de taspina, concluyeron que es "la primera planta alcaloide confirmada que acelera la curación de heridas" (Porras-Reyes, Lewis, Roman, Simchowit, & Mustoe, 1993). En la *Tabla 6* se detallan las principales propiedades de la sangre de drago como agente curativo.

**Tabla 6**  
*Propiedades de la sangre de drago*

<b>Propiedad</b>	<b>Beneficio</b>
<b>Cicatrizante</b>	Acelera la formación tanto del colágeno como de la costra, debido a que presenta taninos y alcaloides como la taspina.
<b>Antiviral y antibacteriana</b>	Inhibe una serie de virus que se pueden presentar en el organismo gracias a la presencia de proantocianidinas.
<b>Antioxidante</b>	Cuenta con la presencia de radicales libres que benefician a los procesos inflamatorios.
<b>Protección gástrica</b>	Combate la principal bacteria ( <i>Helicobacter pylori</i> ) que afecta las mucosas gastrointestinales en concentraciones bajas.
<b>Analgésica y antiinflamatoria</b>	Actúa como agente desinflamatorio y a su vez suele evitar la activación de las fibras nerviosas que se encargan de transmitir el dolor al cerebro.

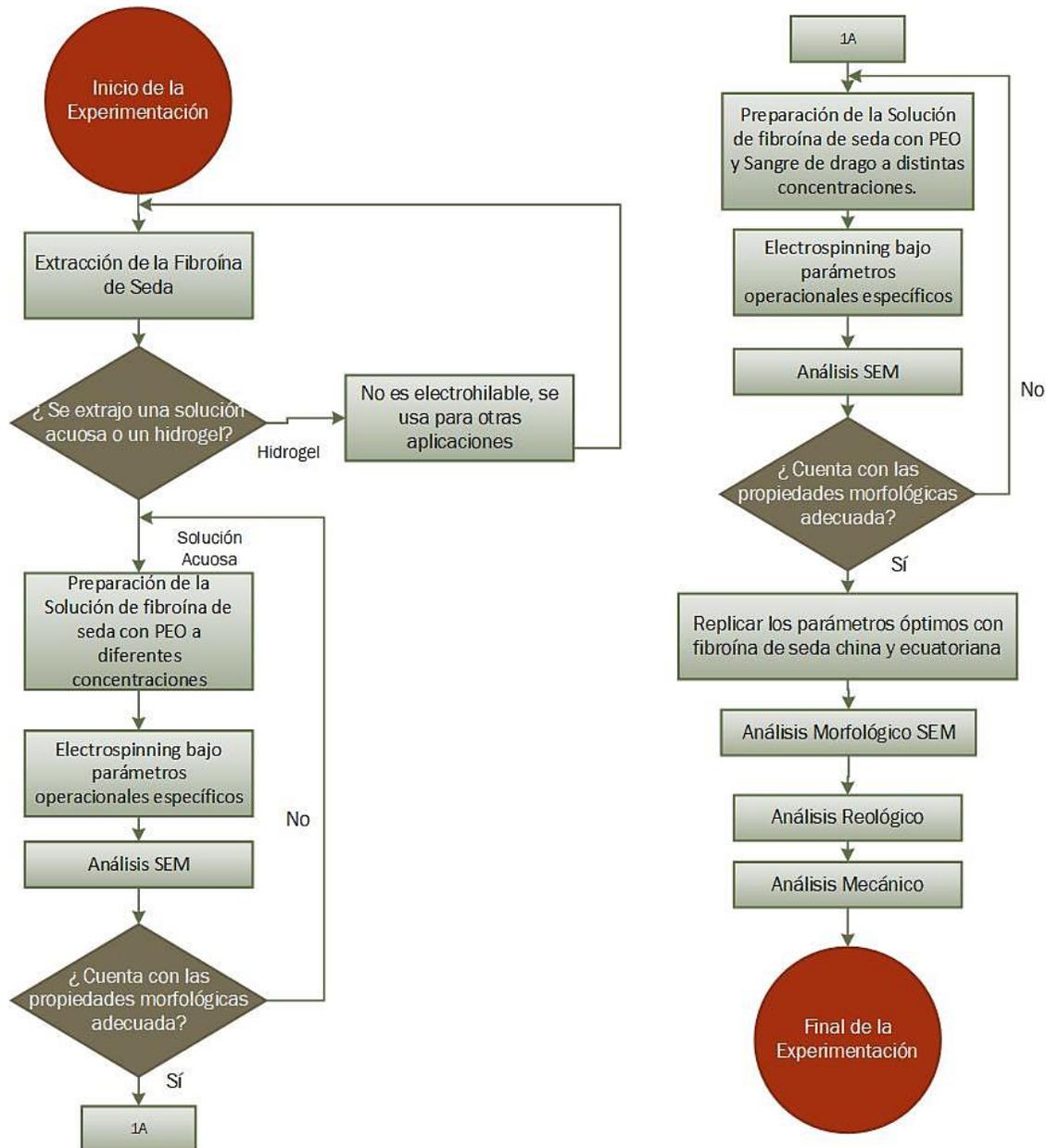
Fuente: (Allaica Tenesaca, 2015); (Jones K. , 2003)

## CAPÍTULO III

### EXPERIMENTACIÓN

#### 3.1. Metodología de Trabajo

En la Figura 17 se presenta un el diagrama de flujo referente a la experimentación realizada en el presente proyecto.



**Figura 17.** Diagrama de flujo referente a la experimentación realizada en el proyecto.

Cabe recalcar que dada la escasa producción de fibroína de seda ecuatoriana, las etapas de la 1 a la 5 se realizarán con fibroína china y luego se replicarán los mejores resultados en ecuatoriana para su posterior análisis.

### 3.1.1. *Etapa 1: Extracción de Fibroína de Seda*

La extracción de fibroína de seda se realizó considerando recomendaciones propuestas por el Dr. Salvador Cervantes y la tesis realizada por Aules y Quijije en el 2006, dado que las primeras muestras extraídas tendían a gelarse con facilidad y por ende no podían ser electrohilables.

#### ***Materiales***

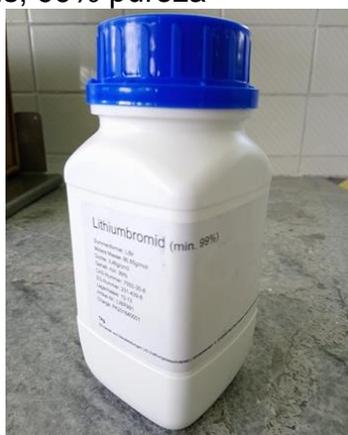
- Capullos de Seda Ecuatorianos y chinos



**Figura 18.** Capullos de seda ecuatorianos (Fundación ISMI) y chinos

#### ***Reactivos***

- Bromuro de Litio S3 Chemicals, 99% pureza



**Figura 19.** Bromuro de Litio

- Carbonato de Sodio Panreac 99% pureza



**Figura 20.** Carbonato de Sodio

- Agua Ultrapura

### **3.1.1.1. Preparación de una solución de LiBr a 9.3 M**

Previo a iniciar el proceso de extracción de fibroína reconstituida es necesario la realización de la solución salina de LiBr a 9.3M, la razón dicha concentración molar, ya que no daña la estructura molecular del polímero y no altera las propiedades físicas del mismo.

1. Dentro de una cámara Sorbona de preferencia, pesar 80.77 [g] de LiBr y medir 100[mL] de agua destilada y mezclar dentro de un balón con aforación de 100[mL] con agitación manual y constante hasta lograr homogeneidad en la mezcla, dicha mezcla genera una reacción exotérmica razón por la cual es necesario tener los cuidados adecuados, evitando la aspiración de gases y el contacto directo con la zona de mezcla.
2. Luego de haber terminado, verter la mezcla fotosensible dentro de un frasco ámbar para que no se vea afectado por radiación del sol cuando se esté transportando fuera de los laboratorios y ubicar en refrigeración a 4°C, sin exposición a la luz para evitar la degradación acelerada.

### 3.1.1.2. Desgomado de la fibroína

Las fibras del capullo de *Bombyx mori* está compuestas de 2 proteínas fibroína y sericina, pero esta última trabaja como material pegante, de tal manera es necesaria la utilización de una solución salina que separe las dos proteínas disolviendo una de ellas en agua. En fin, de conseguir esto se siguen los siguientes pasos:

1. Cortar con tijeras los capullos en varias partes y pesar 5 [g].
2. Precautelar que los capullos estén muy limpios antes de la extracción.
3. Pesar 4.24 [g] de Carbonato de Sodio.
4. Elaborar una mezcla de Carbonato de Sodio en Agua destilada 0.02M, en un balón de aforación de 2[L].
5. Verter la mezcla en el vaso de precipitación, cubrir con papel aluminio y hacer hervir, como se muestra en la *Figura 21*.



(a)

(b)

**Figura 21.** (a) 5[g] de capullos de seda, (b) Solución 0.02M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en ebullición

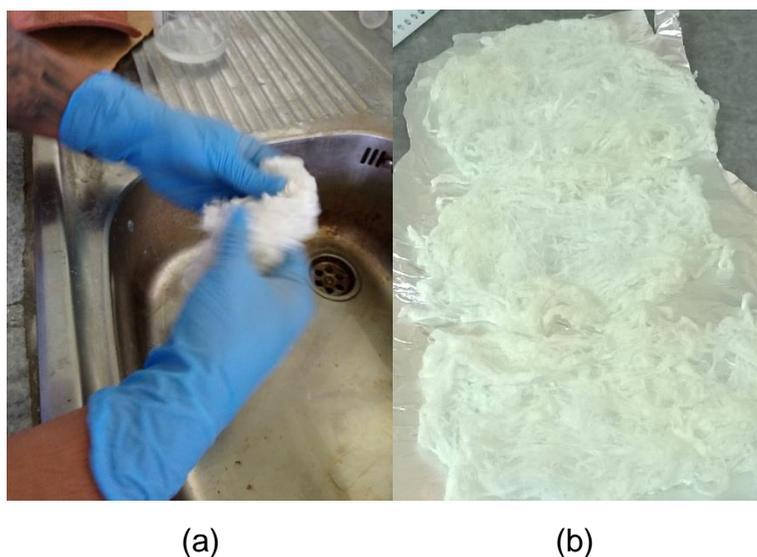
6. Colocar dentro del vaso de precipitación con la solución al 0.02M los 5[g] de capullos cortados y dejar hervir por 30 minutos exactos. Durante ese tiempo, es

necesario remover con la ayuda de una varilla de agitación suciedad dentro de los capullos, además de procurar la correcta dispersión de la seda y eficiente remoción de sericina.

7. Tener cuidado con la temperatura de la solución y procurar que la misma no se riegue.
8. Remover la fibroína con una un agitador y enjuagar con agua destilada. Exprimir el exceso de agua. Usar guantes de nitrilo, ya que la fibroína estará caliente y es mejor no contaminarla.
9. Realizar de 2 a 3 enjuagues procurando limpiar impurezas y desatando las fibras enredadas.
10. Exprimir bien las fibras y dejar secar en un pedazo de papel aluminio.
11. Dejar secar en un lugar con ventilación durante 3 días a temperatura ambiente, lo antes mencionado se detalla en la *Figura 22 y 23*.



**Figura 22.** Desgomado de fibroína de seda

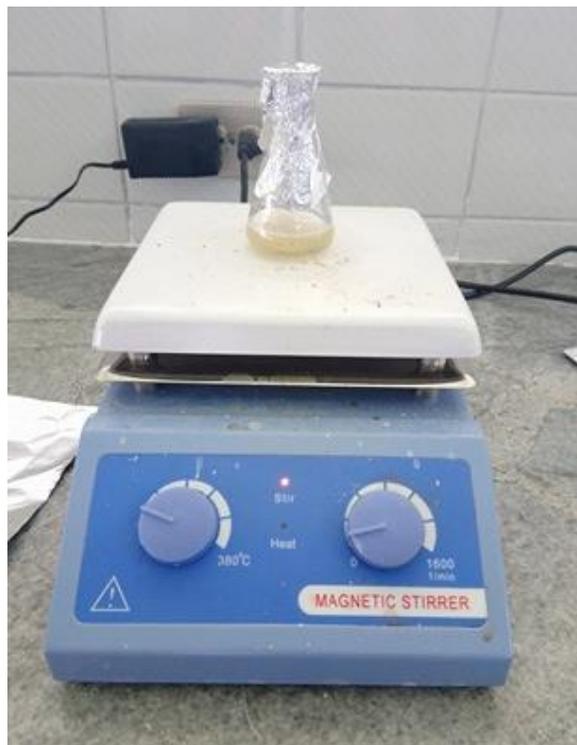


**Figura 23.** (a) Enjuague de la fibroína de seda, (b) Secado de la fibroína de seda

### 3.1.1.3. **Disolución de la fibroína en LiBr (9.3 M)**

La solución de LiBr a 9.3 M cuenta con una conductividad eléctrica muy alta, la cual no serviría para el proceso de electrospinning. Por tanto, esta solución solamente se utiliza para disolver la fibroína y lograr una solución polimérica adecuada.

1. Según Aznar Cervantes es necesario diluir la fibroína en una concentración del 20 w/v%, por tanto, para 2.5 [g] de fibroína se necesita 10 [mL] de LiBr 9.3 M.
2. Colocar los 2.5 [g] de fibroína dentro de un matraz de Erlenmeyer de 50 [mL]. Colocar primero la fibroína y luego la solución de bromuro de litio, pero no lo contrario para precautelar que toda la fibroína tenga contacto con la solución de LiBr. Tapar con papel aluminio.
3. Dejar disolver a 60°C por 3 horas exactas, ubicar un agitador dentro del matraz. Al final, tendrá dicha mezcla un color ámbar y transparente muy viscosa, e impurezas, el proceso de disolución se observa en la *Figura 24*.



**Figura 24.** *Disolución de fibroína de seda*

#### **3.1.1.4. Diálisis**

El proceso de diálisis es muy conocido como un proceso de separación de sustancias a través de una membrana semipermeable. En este caso se utiliza para realizar el intercambio de los iones de LiBr con moléculas de agua, por tanto, se pretende obtener una solución acuosa libre de LiBr, reduciendo tanto la viscosidad como la conductividad eléctrica de la solución acuosa final.

1. Preparar un vaso de precipitados de 1 [L] con agua ultrapura.
2. Cortar la longitud necesaria de membrana de diálisis de piel de serpiente y sumergirla en agua destilada dejándola reposar durante al menos 1 hora.
3. Introducir la solución de fibroína/LiBr dentro de la membrana de diálisis, procurando que el pH del agua destilada y la solución de fibroína se asemejen.
4. Dializar la solución durante 48 horas con la ayuda de un agitador magnético, tomando en cuenta no interrumpir el proceso cambiando la solución de la membrana de diálisis, procurando que la temperatura esté entre 4 y 7°C.

5. Cambiar el agua destilada luego de 1 hora, 4 horas, hasta esa noche. Luego cambiar la siguiente madrugada y 6 horas después, los siguientes 2 días (7 cambios en 48 horas).
6. Corroborar que la conductividad eléctrica de la solución este entre 200 a 400  $[\mu\text{S}/\text{cm}]$  y la del agua sea menor a 10  $[\mu\text{S}/\text{cm}]$ .
7. Extraer la solución dializada de fibroína de seda, el proceso de diálisis se detalla en la *Figura 25*.



(a)

(b)

**Figura 25.** (a) Diálisis, (b) Solución acuosa de fibroína de seda

### **3.1.2. Etapa 2: Preparación de soluciones de Fibroína de Seda / PEO**

Para ejecutar el proceso de electrohilado es necesario aumentar la viscosidad de la solución de fibroína de seda pura, así como la concentración y el peso molecular. Según la literatura el óxido de polietileno mejora la electrohilabilidad de la fibroína de seda. Para ello es necesario seguir los siguientes pasos:

1. Dependiendo de la concentración de PEO, para X% de PEO v/v mezclar 0,X [g] de PEO con 10[mL] de agua destilada, con la ayuda de un agitador magnético y una plancha de agitación, agitar constante la mezcla hasta que la solución sea

uniforme. Dado que el peso molecular del PEO es 1000000 [Da], la mezcla tiene a tardar entre 30 minutos a 1 hora.

2. Mezclar con agitación simple 4 partes de fibroína de seda con 1 de PEO durante 10 minutos con ayuda de un agitador magnético a 4°C de temperatura, procurando de esta forma uniformidad en la solución final.
3. De encontrarse fibrillas en la mezcla, es necesario filtrar la solución en una gasa previo a realizar el proceso de electrohilado.

### **3.1.3. Etapa 3: Electrospinning de Fibroína de Seda / PEO.**

Una vez realizada la mezcla de fibroína de seda con PEO, se debe seguir un protocolo de electrohilado, en el que a través del control de los parámetros previamente estudiados permitan obtener las membranas que posteriormente serán analizadas y caracterizadas.

El protocolo de electrohilado consta de los siguientes pasos:

1. Colocar la solución de fibroína de seda/ PEO en una jeringa de 10[mL], procurar que la jeringa no almacene burbujas que son perjudiciales en el proceso de electrohilado.
2. Colocar la jeringa en la bomba de inyección y el capilar.
3. Preparar el plato colector con papel aluminio o gasa, precautelando así la fácil extracción de la membrana al final del proceso.
4. Colocar el plato a una distancia entre 12 y 16 [cm] de la punta del capilar.
5. Conectar el polo positivo de la fuente de alto voltaje en el capilar y el polo negativo en el colector.
6. Setear el caudal entre 0.5 y 1.5[mL/hr] y aplicar un voltaje afín de generar un cono de Taylor estable entre 5 y 10 [kV].
7. Recolectar la muestra en una placa Petri para su futuro análisis morfológico en microscopio electrónico de barrido (SEM).

El protocolo anterior se utilizó en distintas soluciones en las que se variaba los parámetros operacionales en búsqueda de los parámetros óptimo de producción de fibras de fibroína

de seda / PEO previo a la inclusión de la sangre de drago dentro de la solución acuosa, tomando como punto de partida las concentraciones de PEO obtenidas en el proyecto de titulación de Edwin Aules y Juan Carlo Quijije.

#### **3.1.4. Etapa 4: Preparación de soluciones y electrospinning de Fibroína de Seda / PEO / Sangre de Drago**

Posterior a definir los parámetros óptimos para la producción de membranas de Fibroína de Seda/ PEO, el siguiente paso es mezclarlo con Sangre de Drago en distintas concentraciones y repetir tanto el protocolo de preparación de muestras como el de electrohilado. Dado que previamente no se han realizado de electrohilado de sangre de drago croton lechleri, no hay referencias de su manejo, por esta razón se realizarán combinaciones de 100%, 50%, 25%, 10% y 2% v/v.

Las proporciones de mezcla de fibroína de seda, PEO y sangre de drago son 4:1:1 respectivamente. El solvente de la sangre de drago es agua ultrapura, procurando de esta forma ningún tipo de impurezas en la solución. Del mismo modo como con la primera solución es el ensayo morfológico en el microscopio SEM para discriminar los parámetros óptimos de electrospinning.

#### **3.1.5. Etapa 5: Preparación de soluciones y electrospinning de fibroína de seda china y ecuatoriana.**

Una vez definidos los parámetros óptimos para la producción de membranas de RSF (fibroína de seda reconstituida) /PEO y RSF/PEO/Sangre de Drago con fibroína de seda china, es necesario replicar tanto los parámetros como con el proceso en fibroína china. Estas muestras son las que se analizará posteriormente tanto morfológica como reológica y mecánicamente.

### 3.1.6. Etapa 6: Análisis Morfológico

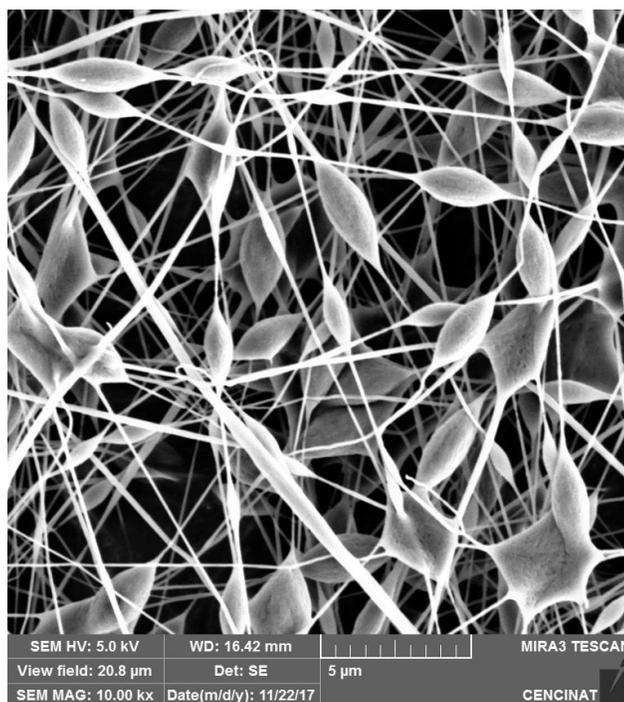
Una de las principales pruebas, que se realiza además a partir de etapas anteriores, es el análisis morfológico mediante microscopía avanzada, dado que las fibras a simple vista son imperceptibles.

Para esto el CENCINAT brindó su apoyo técnico en la caracterización morfológica de las muestras en un microscopio electrónico de barrido (SEM) marca TESCAN MIRA 3XM que tiene un aumento de  $1 \times 1'000\ 000x$  a 30[kV] y una resolución en modo de alto vacío de 1,2 [nm] a 30 [kV]; 2,5 [nm] a 3 [kV], el equipo utilizado se muestra en la *Figura 26*.



**Figura 26.** Microscopio electrónico de barrido TESCAN

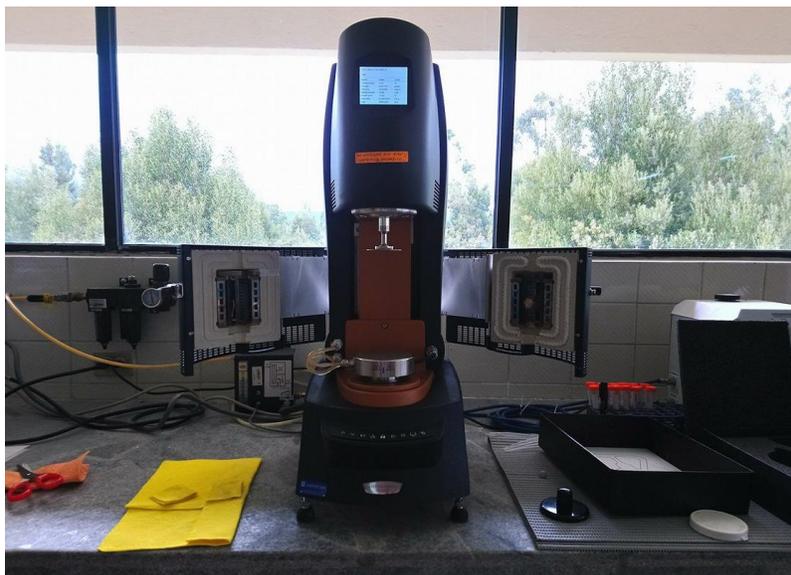
En la *Figura 27* se presenta uno de los ensayos realizados en una muestra de fibroína de seda/PEO 5%, donde se observa una serie de collares o beads, así como membranas de diferentes diámetros con aparente humedad producto de la evaporación incompleta del solvente, de esta forma además es posible un acercamiento mayor que permita observar o distinguir los poros que se encuentran en los beads.



**Figura 27.** Muestra de Fibroína de seda / PEO 5%

### **3.1.7. Etapa 7: Análisis Reológico**

Para realizar el análisis reológico se utiliza un reómetro de TA Instruments ubicando en el Laboratorio de Reología del Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica. Cuenta con una velocidad angular máxima de 300 [rad/s], un torque máximo de 200[mN\*m] y una resolución de torque de 0.1[mN\*m]. En la *Figura 28* se muestra el reómetro presente en el Laboratorio.



**Figura 28.** Reómetro TA-Instruments

Para el análisis se usa la configuración placa-cono. Para evitar que la muestra se seque y forme una capa, el área fuera del cono se inunda con agua destilada y se encerró con una cámara ambiental, que se diseñó para ajustarse alrededor del cono y el eje de accionamiento sin tocarlo. En primer lugar, se realiza una pre-cizalla durante 100[s] a una velocidad de cizalla constante de 1 [rad/s] a 25°C, con el fin de garantizar que la muestra se distribuyó uniformemente entre el cono y la placa y para establecer un estado reológico uniforme (es decir, reemplazar cualquier tensión residual de la carga de la muestra) (Laity, Gilks, & Holland, 2015).

Posteriormente, se realiza un estudio de flujo estacionario en velocidades de cizalla entre 0.01 y 160 [rad/s], obteniendo así una gráfica viscosidad vs tasa de cizalla, que define el comportamiento reológico de la solución acuosa analizada.

### **3.1.8. Etapa 8: Análisis Mecánico (AFM)**

Dada la relativa fragilidad de las membranas a obtenerse por el proceso de electrospinning realizar un ensayo de tensión en una máquina de ensayos universales se vuelve imposible por problemas de manipulación de las fibras y resolución del equipo. De tal manera, se vuelve necesario nuevamente el uso de microscopia avanzada.

El microscopio de Fuerza atómica permite determinar las características elásticas de una fibra en escalas del micro y nanómetros, con la ayuda del software AR 15.06.109 que permite la aproximación del valor del módulo de Young. El Microscopio AFM MFP-3D Infinity Asylum Research, se encuentra en la Universidad de Antioquia-Medellín, Colombia y cuenta con un modo de asignación de distancia de fuerza que opera a una velocidad de píxeles de hasta 300 [Hz], una punta de silicio recubierta de Ti/Ir que permite realizar la medición. En la *Figura 29* se presenta el microscopio AFM.



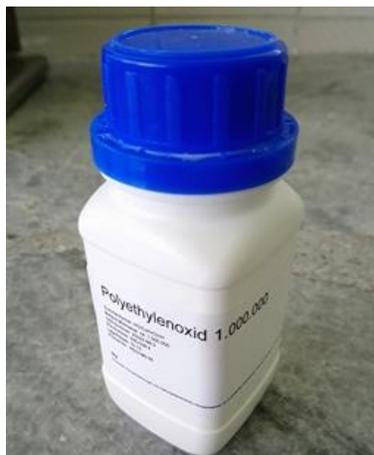
**Figura 29.** Microscopio de Fuerza Atómica

### 3.2. Materiales

La mayoría de materiales utilizados se describieron en la etapa 1 referente a la extracción de fibroína de seda.

#### 3.2.1. Óxido de Polietileno (PEO)

Se adquirió óxido de Polietileno S3 Chemicals, con peso molecular 10000000[Da]. El PEO se caracteriza principalmente por ser un polímero sintético biocompatible con un alto peso molecular que mejora las características de electrohilabilidad de las soluciones acuosas (Schneider A. , Wang, Kaplan, Garlick, & Egles, 2009).



**Figura 30.** Óxido de Polietileno (PEO)

### **3.2.2. Sangre de drago (Croton Lechleri Müll)**

La sangre de drago se caracteriza principalmente por su característica orgánica certificada, adquirida en la Fundación Chankuap ubicada en la ciudad de Macas, Ecuador. La sangre de drago adquirida se presenta en la *Figura 31*.



**Figura 31.** Sangre de drago (Croton Lechleri Müll)

Fuente: Fundación Chankuap

### **3.3. Equipos e Instrumentos**

Los equipos utilizados para la elaboración del proyecto fueron:

- *Balanza electrónica* Shimadzu (Unibloc) TW423L con apreciación de 1[mg], un rango entre 2[mg] y 420[g], un error aproximado de 1mg y la posibilidad de salida y entrada digital de datos.

- *Placa de calentamiento y agitación BIPEE* con rango de agitación entre 0-2000[1/min], calentamiento entre 0-400°C, un RTD-PT100 como sensor de temperatura con un error menor del 0.5%.
- *Plancha de agitación Thermo scientific CIMARC* con rango de agitación entre 0-2000[1/min].
- *Conductivímetro OHAUS Starter 300C* con rango de medición entre 0-199.9[mS/cm], con un error de  $\pm 0.5\%$  y temperatura admisible entre 5-40°C.
- *Termohigrómetro BOECO BOE327* con medición de temperatura entre -10 t 50°C, humedad relativa entre 20 y 99% y una exactitud de  $\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\pm 5\% \text{HR}$ .



**Figura 32.** Equipos utilizados en el proyecto

### **3.3.1. Sistema de Electrospinning**

Los elementos que componen el sistema de electrospinning utilizado para el presente trabajo se detallan en la *Tabla 7*.

**Tabla 7***Equipos del Sistema de Electrospinning***Figura 33.** Sistema de Electrospinning

Fuente de alto voltaje Genvolt

Modelo: **73030**

Salida de Voltaje: **0-30 [kV]**

Máx. salida de corriente: **1[mA]**

Salida de Poder: **30[W]**

Eficiencia: **>75%**

**Figura 34.** Fuente de alto voltaje

Bomba de Jeringa Cole Parmer

Modelo: **788110C**

Exactitud: **±0.5%**

Jeringas: **0.5[μL], 10[mL], 60[mL]**

Caudal:

- **0.5[μL] (mín. 1.6 [pL/min])**
- **10[mL] (máx. 26.014 [mL/min])**
- **60[mL] (máx. 80.404 [mL/min])**

**Figura 35.** Bomba de Jeringa

Cámara Imaging Source

Modelo: **DFK 22BUC03**

Resolución: **744x480 (0.4MP), hasta 76 fps**

Obturador global

Rango dinámico **8bits**

Tipo de Sensor: **CMOS**

**Figura 36.** Cámara de acercamiento

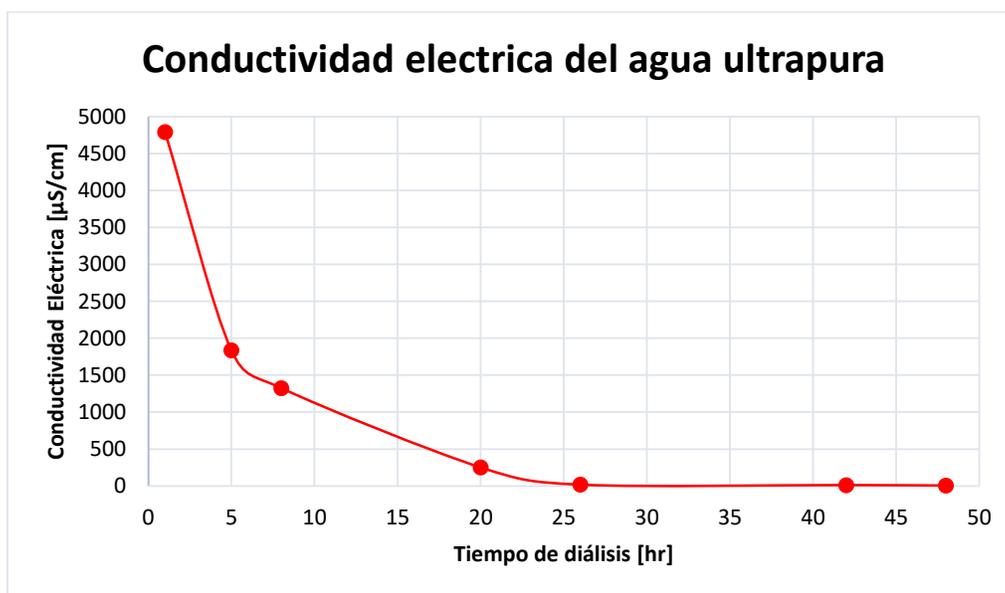
## CAPÍTULO IV

### 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 4.1. Extracción de Fibroína de Seda

El proceso de diálisis en la extracción de fibroína de seda permite el intercambio de iones entre una solución altamente conductora por efecto de la disolución en bromuro de litio (LiBr) y agua ultrapura teóricamente no conductora, por tal motivo y por recomendación de Salvador Aznár Cervantes, se analizó el comportamiento eléctrico del agua ultrapura tras cada cambio de agua en el proceso de extracción.

Considerando que la conductividad eléctrica del agua ultrapura es de  $3,47[\mu\text{S}/\text{cm}]$ , tras el primer cambio de agua la conductividad registró un valor de  $4796 [\mu\text{S}/\text{cm}]$ , a partir del cuarto cambio a las 20 horas de empezado el proceso de diálisis se observó un cambio radical a  $251[\mu\text{S}/\text{cm}]$  y 6 horas después a  $17,81[\mu\text{S}/\text{cm}]$ . Fue en el séptimo cambio cuando el agua ultrapura registró una conductividad de  $6,42[\mu\text{S}/\text{cm}]$  y según la recomendación de Aznár la solución acuosa estaba lista para electrohilar. Estos resultados de observan mejor en la *Figura 37*.



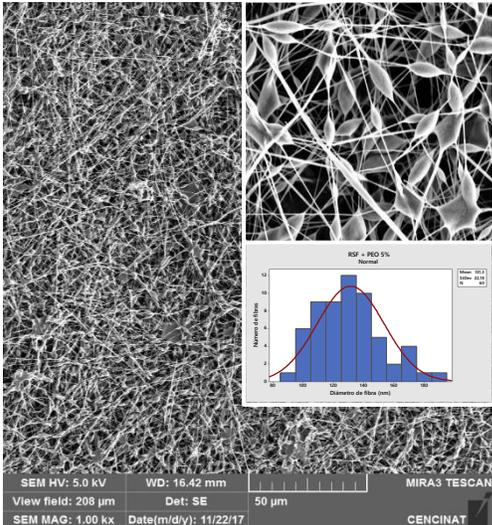
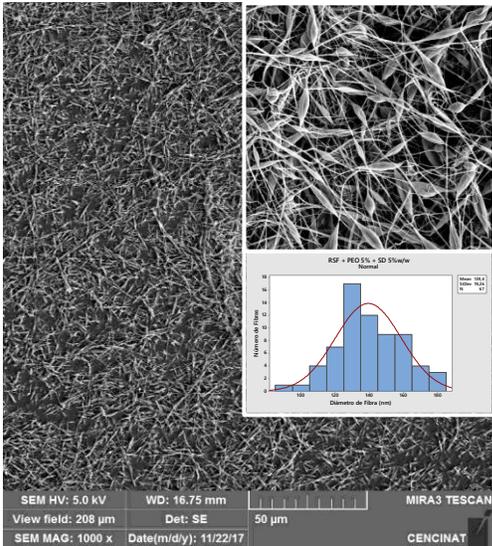
**Figura 37.** Conductividad Eléctrica del Agua Ultrapura en la diálisis

## 4.2. Membranas de Fibroína de Seda y PEO

Primero se realizó un estudio previo del comportamiento de la solución de fibroína de seda con PEO en electrospinning y tras un análisis morfológico en microscopía SEM se obtuvieron los resultados mostrados en la *Tabla 8*.

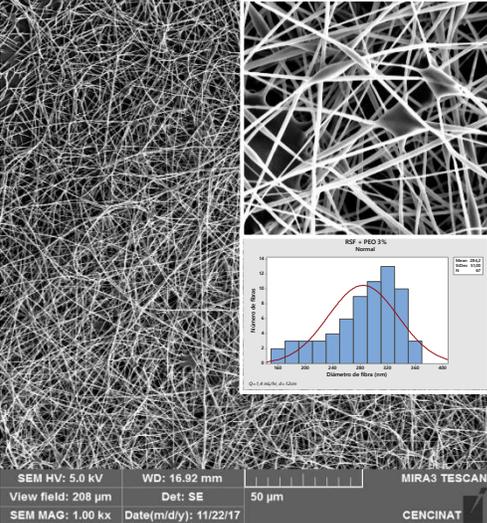
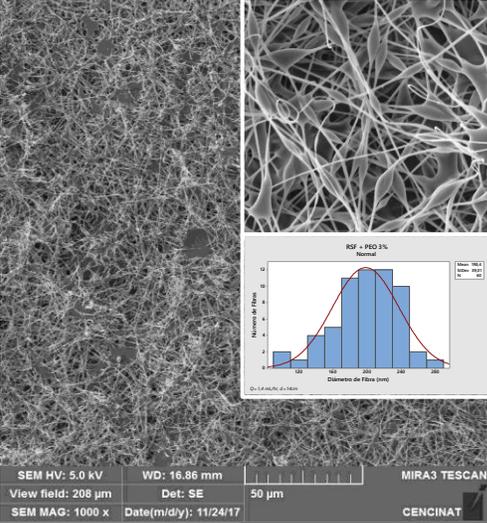
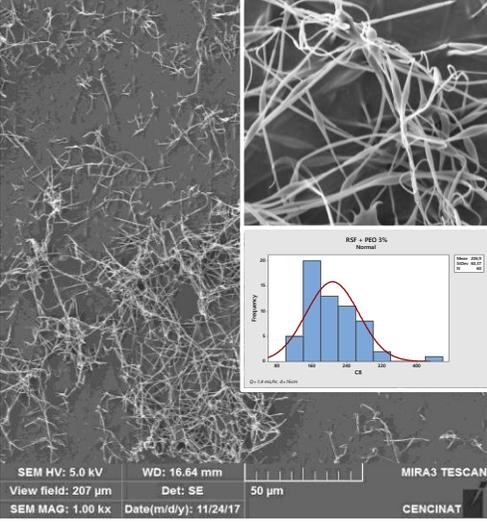
**Tabla 8**

*Resultados de las micrografías SEM de muestras de fibras de fibroína de seda con óxido de polietileno<sup>1</sup>*

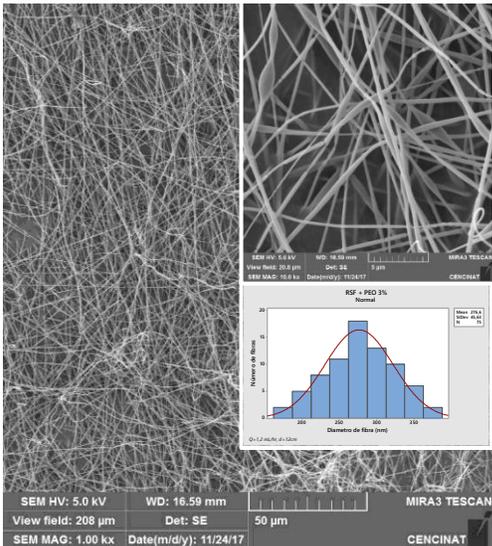
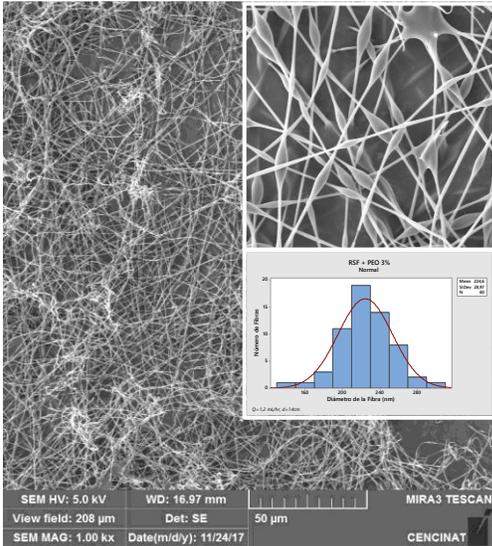
Solución	Variables	Micrografías SEM
RSF+ PEO 5%w/v	<u>Parámetros Operacionales</u>	
	$V= 6,90$ [kV]	
	$Q= 1,40$ [mL/hr]	
	$d= 12$ [cm]	
	$E= 57,50$ [kV/m]	
	<u>Resultados</u>	
$\theta m= 131,32$ [nm]		
RSF + PEO 5%w/v + SD 5% w/w	<u>Parámetros Operacionales</u>	
	$V= 7,10$ [kV]	
	$Q= 1,20$ [mL/hr]	
	$d= 12$ [cm]	
	$E= 59,17$ [kV/m]	
	<u>Resultados</u>	
$\theta m= 139,43$ [nm]		
	$\sigma= 19,26$ [nm]	

CONTINÚA 

<sup>1</sup> Todas las pruebas fueron realizadas en proporción Fibroína 4: PEO 1

<b>RSF+ PEO 3%w/v</b>	<u>Parámetros Operacionales</u> <b>V= 8,50 [kV]</b> <b>Q= 1,40 [mL/hr]</b> <b>d= 12 [cm]</b> <b>E= 70,83 [kV/m]</b>	 <p>SEM HV: 5.0 kV WD: 16.92 mm MIRA3 TESCAN View field: 208 μm Det: SE 50 μm SEM MAG: 1.00 kx Date(m/d/y): 11/22/17 CENCINAT</p>
<b>RSF+ PEO 3%w/v</b>	<u>Parámetros Operacionales</u> <b>V= 8,70 [kV]</b> <b>Q= 1,40 [mL/hr]</b> <b>d= 14 [cm]</b> <b>E= 62,14 [kV/m]</b> <u>Resultados</u> <b><math>\theta m</math>= 198,38 [nm]</b> <b><math>\sigma</math>= 39,01 [nm]</b>	 <p>SEM HV: 5.0 kV WD: 16.86 mm MIRA3 TESCAN View field: 208 μm Det: SE 50 μm SEM MAG: 1000 x Date(m/d/y): 11/24/17 CENCINAT</p>
<b>RSF+ PEO 3%w/v</b>	<u>Parámetros Operacionales</u> <b>V= 11,40 [kV]</b> <b>Q= 1,40 [mL/hr]</b> <b>d= 16 [cm]</b> <b>E= 71,25 [kV/m]</b> <u>Resultados</u> <b><math>\theta m</math>= 206,93 [nm]</b> <b><math>\sigma</math>= 60,37 [nm]</b>	 <p>SEM HV: 5.0 kV WD: 16.64 mm MIRA3 TESCAN View field: 207 μm Det: SE 50 μm SEM MAG: 1.00 kx Date(m/d/y): 11/24/17 CENCINAT</p>

CONTINUÍA 

<b>RSF+ PEO 3%w/v</b>	<u>Parámetros Operacionales</u>	
	$V= 7,10$ [kV]	
	$Q= 1,20$ [mL/hr]	
	$d= 12$ [cm]	
	$E= 60$ [kV/m]	
	<u>Resultados</u>	
	$\theta m= 139,43$ [nm]	
	$\sigma= 19,26$ [nm]	
<b>RSF+ PEO 3%w/v</b>	<u>Parámetros Operacionales</u>	
	$V= 8,50$ [kV]	
	$Q= 1,20$ [mL/hr]	
	$d= 14$ [cm]	
	$E= 60,71$ [kV/m]	
	<u>Resultados</u>	
	$\theta m= 224,55$ [nm]	
	$\sigma= 28,97$ [nm]	

De los resultados mostrados en la *Tabla 8* se puede recabar algunos datos interesantes:

- Las soluciones realizadas con una concentración de PEO al 5% w/v generan fibras discontinuas a pesar de la desviación estándar relativamente baja con presencia de collares o beads grandes.
- Las soluciones realizadas con una concentración de PEO al 5% w/v y sangre de drago al 5% w/w no se mezclaban homogéneamente y fue necesario realizar un filtrado de la solución previo al electrohilado, el cono de Taylor no se estabilizo y

es por eso que en la micrografía SEM no hay presencia de fibras continuas, existen beads grandes y alargados en toda la estructura y la muestra recolectada no es manipulable.

Las soluciones que mejores resultados presentaron son las que cuentan con una concentración de PEO al 3% w/v variando el caudal entre 1,2 y 1,4 [mL/hr] y la distancia entre 12 y 16 cm obteniendo lo siguiente:

- Las muestras obtenidas con un caudal de 1,4 [mL/hr] presentaron las mejores características morfológicas a una distancia de 12 cm, aun así, las fibras cuentan con un número mínimo de beads, pero tiene una apariencia húmeda producto del alto caudal, lo que además hace que la muestra se adhiera al papel aluminio y su extracción se complique. Al aumentar la distancia capilar-colector la calidad de las fibras tiende a reducir generando una matriz no manipulable con presencia de áreas húmedas que no resultan adecuadas para la producción de apósitos.
- En su lugar, las muestras obtenidas con un caudal de 1,2 [mL/hr] presentaron mejores características morfológicas a una distancia de 12 cm, logrando producir fibras lisas continuas con poca aparición de beads y lo más importante es manipulable tras su recolección. Por estas razones esta se convierte en la muestra con los parámetros óptimos para la mezclar con sangre de drago y posteriormente caracterizar mecánica y reológicamente.

Por lo tanto, la muestra de mejores características es la obtenida baso las siguientes condiciones: voltaje 7,10 [kV], caudal 1,20 [mL/hr], y distancia capilar-colector 12 [cm]. En la *Figura 38* se muestra la elaboración de la membrana de RSF +PEO 3% w/v con las mejores características morfológicas. El alto valor de la desviación estándar en cada una de las muestras es producto del control de las condiciones tanto ambientales como operacionales, así como de la dificultad que se genera al trabajar con biopolímeros dada la complejidad en su estructura molecular y la tasa de degradación mayor a la de los polímeros sintéticos.



**Figura 38.** Elaboración de la membrana de RSF +PEO 3%w/v con las mejores características morfológicas

#### 4.3. Solubilidad de la Sangre de Drago

Al mezclar la Sangre de drago con la solución acuosa de Fibroína de Seda + PEO 3%w/v en distintas concentraciones 100%, 50%, 25%, 10% v/v, la solución tendía a formar una mezcla altamente viscosa, no homogénea y grumosa imposible de electrohilar como se muestra en la *Figura 39*.



**Figura 39.** Comportamiento de la sangre de drago al mezclarla con la solución de RSF + PEO 3% w/v

Producto de que no es posible generar una mezcla homogénea entre la solución de fibroína de seda y la sangre de drago, se volvió necesario realizar un estudio experimental de la solubilidad de la savia frente a otros polímeros y solventes como se muestra en la *Tabla 9*.

**Tabla 9**

*Comportamiento de la Sangre de Drago como material electrohilable*

<b>Solvente</b>	<b>Concentración (v/v)</b>	<b>Resultado</b>	<b>Observaciones</b>
<b>RSF + PEO 3% w/v</b>	100% + Calor	Insoluble	La Sangre de drago reacciona con la mezcla de RSF y PEO e impide que se homogenice. Con calor la sangre forma grumos y se afecta la estructura molecular de la fibroína que es sensible a cambios bruscos de temperatura.
	100% + Temperatura ambiente + Agitación Lenta	Insoluble	La Sangre de drago reacciona con el PEO y a RSF e impide que se homogenice. A temperatura ambiente se forma un gel altamente viscoso.
<b>Demitilformamida (DMF)</b>	100%	Soluble. No genera fibras, ni partículas	El solvente demetilformamida en altas concentraciones tiende a generar reacciones alérgicas en la piel y hasta cáncer, razón por la que para aplicaciones biomédicas no es conveniente, dada la dificultad para controlar si todo el solvente se volatiliza en el proceso de electrohilado. Por esta razón no se hará más pruebas con este solvente.
<b>Etanol</b>	100%	Soluble. No genera fibras, ni partículas	Dado que el etanol no genera una reacción alérgica en contacto con el cuerpo humano, el etanol es uno de los solventes que se probarán con la Sangre de Drago.

CONTINÚA 

<b>Agua</b>	100%	Soluble, pero no genera fibras, ni partículas	El agua es el solvente indicado para aplicaciones biomédicas, dado que aún sin que se volatilice en el proceso no genera ningún tipo de reacción en el cuerpo humano.
<b>PVP 30KDa 5% w/w</b>	100%	Soluble, No genera fibras.	Se genera una solución grumosa con alta viscosidad no homogénea. El PVP de bajo PM genera partículas
<b>PVP 1300KDa 5% w/w</b>	100%	Insoluble	El hecho de que se mezcle con PVP de 30[KDa] y no con la de 1300[KDa] demuestra que la sangre de drago reacciona cuando se la intenta mezclar con polímeros de alto peso molecular.
	10%	Insoluble	
<b>PVP 30KDa 13%w/w</b>	100%	Insoluble	Se genera una solución grumosa con alta viscosidad no homogénea
	10% etanol	Soluble, genera partículas	Genera partículas con cierto goteo (Q=1,2[mL/hr], V= 11,2[kV], d=16[cm])
<b>RSF</b>	100%	Insoluble	Se genera un gel, dado que la sangre de drago en mezcla directa reacciona con la fibroína.
	100%	Insoluble	La sangre de drago no se mezcla con el PEO, en su defecto se gela y genera un fluido altamente viscoso
	25%	Insoluble	
	10%	Insoluble	
<b>PEO 3% w/v</b>	5%	Soluble	Quedan residuos de sangre de drago producto del elevado peso molecular del polímero
	1%	Soluble, genera fibras.	Genera fibras, lo que da cabida a que se pueda mezclar posteriormente con fibroína de seda.(Q=0,9[mL/hr], V= 6,2[kV], d=12[cm])
<b>PEO 5%w/v</b>	10%	Insoluble	Genera grumos y no se mezcla homogéneamente

CONTINÚA 

<b>CS4% AA70% PVA 10%</b>	100%	Soluble, genera fibras.	Genera una membrana concentrada en el centro de la matriz (Q=0,45[mL/hr], V= 21,4[kV], d=12[cm])
<b>RSF + PEO 3% w/v</b>	2% en agua	Soluble, genera fibras.	Genera una membrana manipulable. (Q=1,2[mL/hr], V= 7,2[kV], d=12[cm])

Posterior al anterior análisis se encontró una concentración de sangre de drago que permitía realizar una mezcla homogénea electrohilable como se muestra en la *Tabla 10*.

**Tabla 10**

*Micrografía SEM de las fibras de RSF + PEO 3% w/v + SD 2% v/v*

<b>Solución</b>	<b>Variables</b>	<b>Micrografías SEM</b>
<b>RSF+ PEO 3%w/v SD 2% v/v</b>	<u>Parámetros Operacionales</u>	
	<b>V= 7,20 [kV]</b>	
	<b>Q= 1,20 [mL/hr]</b>	
	<b>d= 12 [cm]</b>	
	<b>E= 60 [kV/m]</b>	
	<u>Resultados</u>	
<b><math>\theta m= 160</math> [nm]</b>		
<b><math>\sigma= 47,14</math> [nm]</b>		

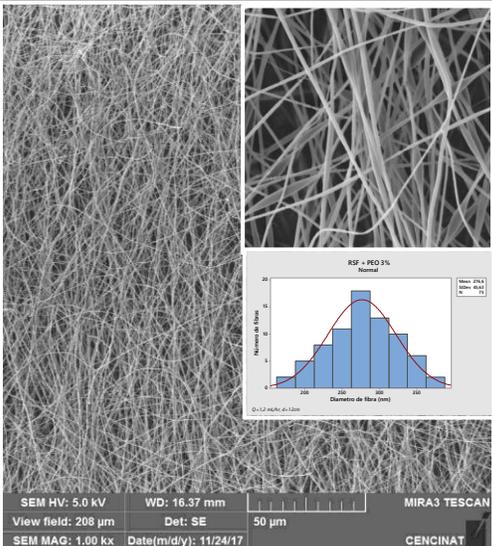
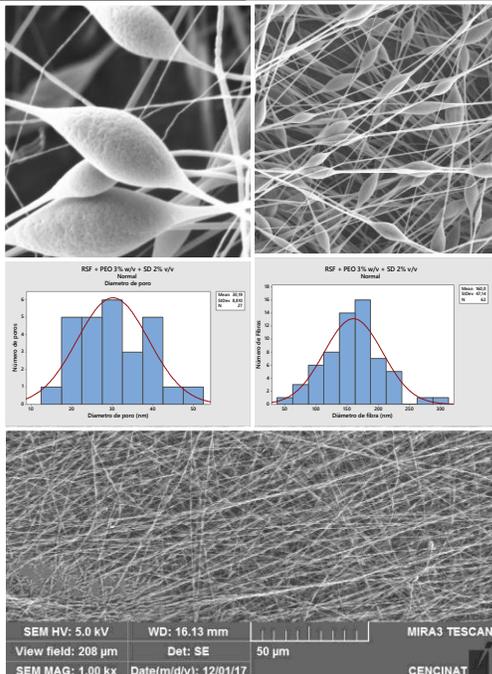
Se obtuvo una membrana manipulable con presencia de beads dado el aumento de la concentración al añadirle la sangre de drago con un diámetro medio de 160 [nm] y una desviación estándar relativamente alta de 47,14 [nm].

#### 4.4. Análisis Morfológico de las Muestras de Fibroína de Seda China y ecuatoriana

Una vez obtenidos los parámetros óptimos, se procede a replicarlos en fibroína de seda china y ecuatoriana para su análisis SEM como se muestra en la *Tabla 11*.

Tabla 11

Micrografías SEM de muestras de fibras de RSF china y ecuatoriana

Solución	Variables	Micrografías SEM
	<b>Fibroína de Seda China</b>	
<b>RSF+ PEO 3%w/v</b>	<u>Parámetros Operacionales</u>	
	$V= 7,10$ [kV]	
	$Q= 1,20$ [mL/hr]	
	$d= 12$ [cm]	
	$E= 60$ [kV/m]	
	<u>Resultados</u>	
$\theta m= 139,43$ [nm]		
$\sigma= 19,26$ [nm]		
	Malla manipulable formada por fibras lisas continuas, con poca presencia de beads y excelente apariencia.	
<b>RSF+ PEO 3%w/v + SD 2% v/v<sup>2</sup></b>	<u>Parámetros Operacionales</u>	
	$V= 7,20$ [kV]	
	$Q= 1,20$ [mL/hr]	
	$d= 12$ [cm]	
	$E= 60$ [kV/m]	
	<u>Resultados</u>	
$\theta m= 160$ [nm]		
$\sigma= 47,14$ [nm]		
$\theta mp= 30,19$ [nm]		
$\sigma p= 8,81$ [nm]		

CONTINÚA <sup>2</sup>  $\theta m_f$  significa diámetro medio de fibra, mientras que  $\theta m_p$  significa diámetro medio de poro.

Malla manipulable formada de fibras continuas con presencia de beads porosos. Los beads porosos y la membrana que cuenta con intericios son unos de los principales requerimientos en apósitos para acelerar la migración celular y por ende el crecimiento de células epiteliales que regeneren el tejido.

### Fibroína de Seda ecuatoriana

#### Parámetros Operacionales

$V = 7,80$  [kV]

$Q = 0,90$  [mL/hr]

$d = 12$  [cm]

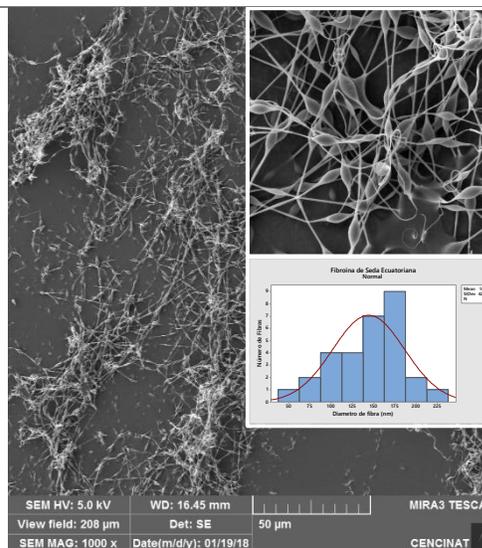
$E = 65$  [kV/m]

#### Resultados

$\theta m = 144,11$  [nm]

$\sigma = 42,32$  [nm]

RSF



Dado que la fibroína de seda ecuatoriana cuenta con una concentración del 13% mayor a la fibroína china cuya concentración es del 9%, se hizo un ensayo unicamente con fibroína de seda, obteniendo una malla húmeda no manipulable con fibras discontinuas y presencia de beads, producto de la humedad de la membrana es que se vuelve difícil la extracción para el posterior analisis en microscopia, es por esta razón que en la imagen se distingue zonas sin fibras en la muestra.

RSF+ PEO 3%w/v

Se realizó una mezcla de fibroína ecuatoriana con PEO al 3% w/v, pero esta resulto ser más viscosa e inestable al aplicársele un campo eléctrico, el cono de Taylor a diferentes parámetros operacionales nunca se estabilizó y por ende fue imposible la recolección de una muestra de membrana. Una de las razones de que haya sucedido esto puede ser la elevada concentración producto de haber añadido un polímero que por lo general trabaja como aditivo para mejorar la concentración de la solución y por ende la electrohilabilidad.

CONTINÚA 

**RSF+ PEO 3%w/v  
+ SD 2% v/v**

Parámetros  
Operacionales

**V= 6-9 [kV]**

**Q= 1,20 [mL/hr]**

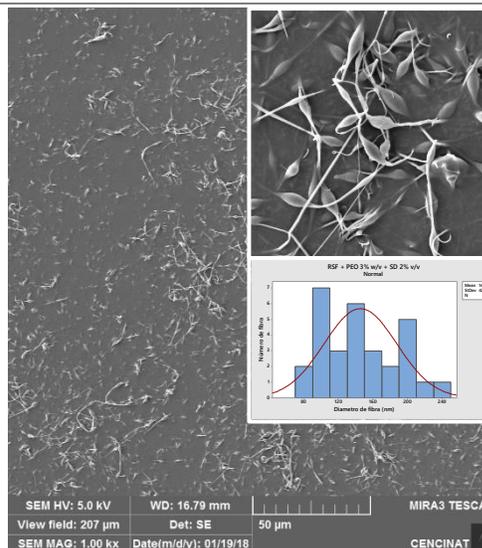
**d= 14 [cm]**

**E= 42 - 64 [kV/m]**

Resultados

**$\theta_m$ = 145,4 [nm]**

**$\sigma$ = 42,10 [nm]**

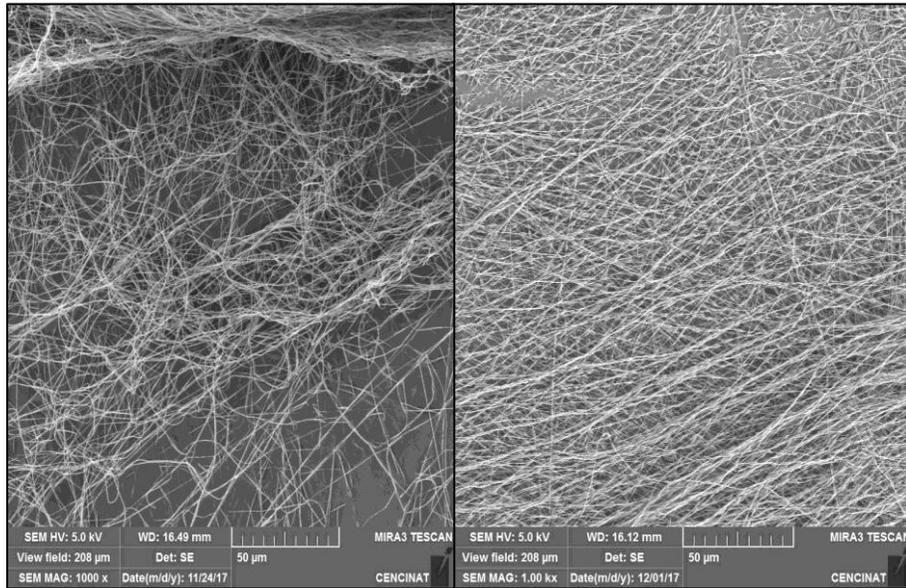


Al añadirle la solución de sangre de drago al 2%v/v en agua la solución tendió a aumentar un poco la viscosidad, pero fue posible electrohilar. Aun así, era muy difícil estabilizar el cono de Taylor, razón por la que en voltaje en lugar de existir un valor preciso se establece un intervalos de valores.

Se obtuvo una membrana húmeda con fibras discontinuas, que por su humedad, las fibras se adherieron al foli de aluminio lo que complico su extracción para el analisis SEM.

La fibroína de seda ecuatoriana se diferencia principalmente de la fibroína de seda china por tener una mayor viscosidad, esta diferencia marcada en ambas soluciones acuosas es la que plantea la necesidad de manejarlas como dos materiales diferentes en el proceso de electrospinning, utilizando distintas concentraciones de PEO y por ende variando los parámetros operacionales asociados a la producción de membranas. Como producto de la experimentación y la dificultad de la extracción de la membrana del foil de aluminio se probó con otra matriz de recolección como la gasa que cuenta con una porosidad deseable para el apósito, teniendo como resultado lo que se muestra en la *Figura 40 y 41*.

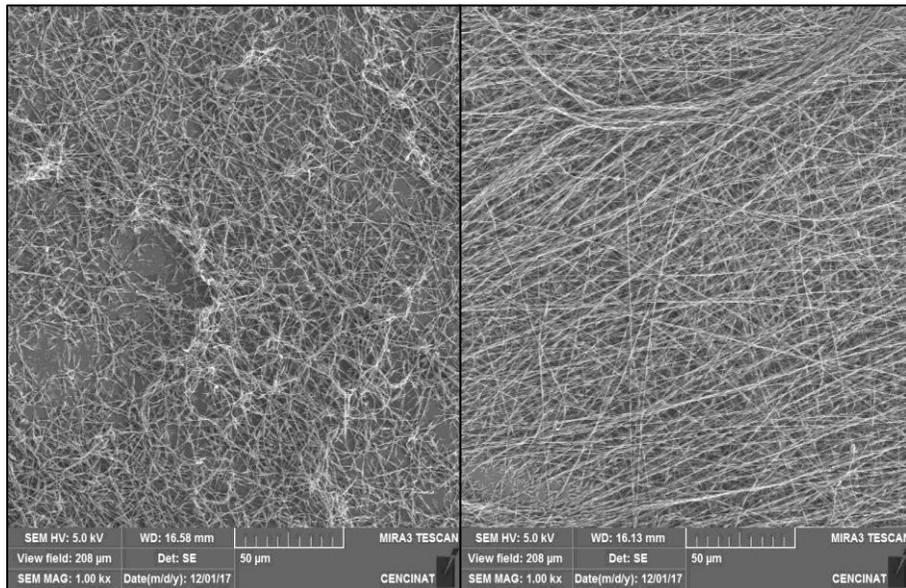
Lo llamativo de estos resultados es que la gasa no actúa como un material conductor capaz de cargarse y a pesar de ello alinea las fibras tomando el papel de un colector metálico de rejillas, esto plantea la necesidad el estudio del efecto de la matriz de recolección tanto en la morfología como en las propiedades mecánicas de la membrana producida por electrospinning.



(a)

(b)

**Figura 40.** RSF + PEO 3% w/v recolectada en: (a) foil de aluminio, (b) gasa



(a)

(b)

**Figura 41.** RSF+PEO 3%w/v+SD 2% v/v recolectada en: (a) foil de aluminio, (b) gasa

Como se muestra en la *Figura 42* las membranas recolectadas en la gasa toman la forma de la matriz de recolección, deseables para la producción de apósitos, con la porosidad adecuada para la migración celular y posterior regeneración del tejido.



**Figura 42.** Extracción de la membrana de Fibroína de seda recolectada en gasa

#### 4.5. Análisis Reológico

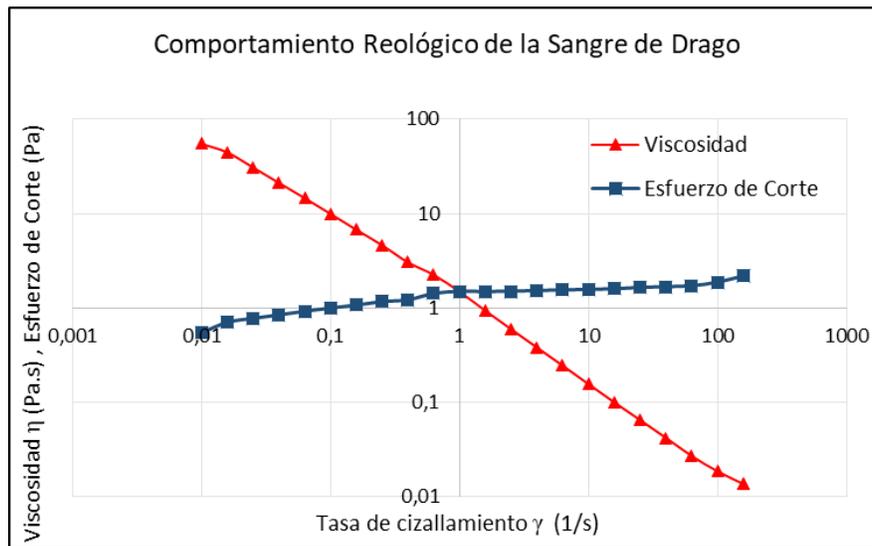
Para el análisis reológico se realizó como se explicó en el Capítulo 3 una precizalla a una velocidad de cizalla constante de 1 rad/s por 100 [s] a 25°C para procurar uniformidad en la solución y posteriormente un ensayo de flujo estacionario a velocidades de cizalla entre 0.01 y 160 [rad/s] a 25°C para obtener la gráfica viscosidad vs tasa de cizallamiento, que nos permita definir el tipo de fluido. En la *Figura 43* se muestra la preparación de la muestra en el reómetro previo a la realización del estudio.



**Figura 43.** Preparación de la muestra en el reómetro previo al estudio reológico

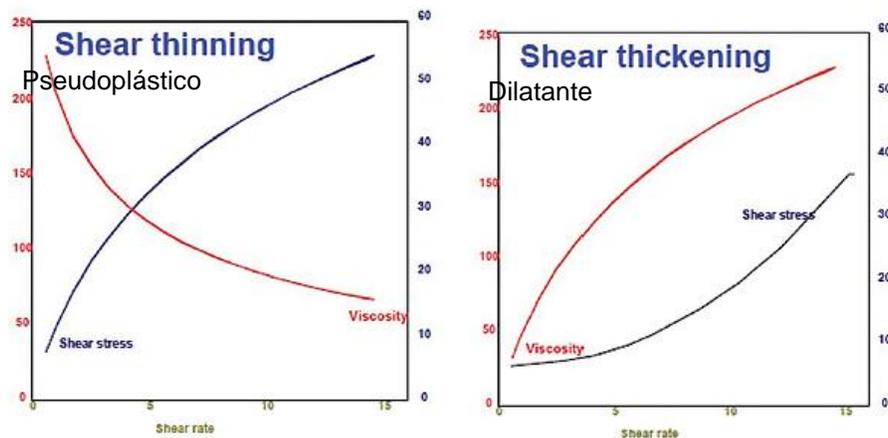
Se realizará en primer lugar un análisis de las gráficas esfuerzo de corte vs tasa de cizallamiento y viscosidad vs tasa de cizallamiento de cada una de las soluciones a fin de comprender el comportamiento y el tipo de fluido. Posteriormente se realizará una comparación entre las 3 soluciones acuosas de cada tipo de fibroína de seda y finalmente se comparará el comportamiento de cada uno de los tipos de fibroína de seda en cada solución acuosa por separado.

Previo a realizarse el estudio de cada una de las soluciones acuosas electrohilables se analizó el comportamiento de la sangre de drago obteniendo como resultado la *Figura 44*.



**Figura 44.** Curva de flujo estacionario de la Sangre de Drago

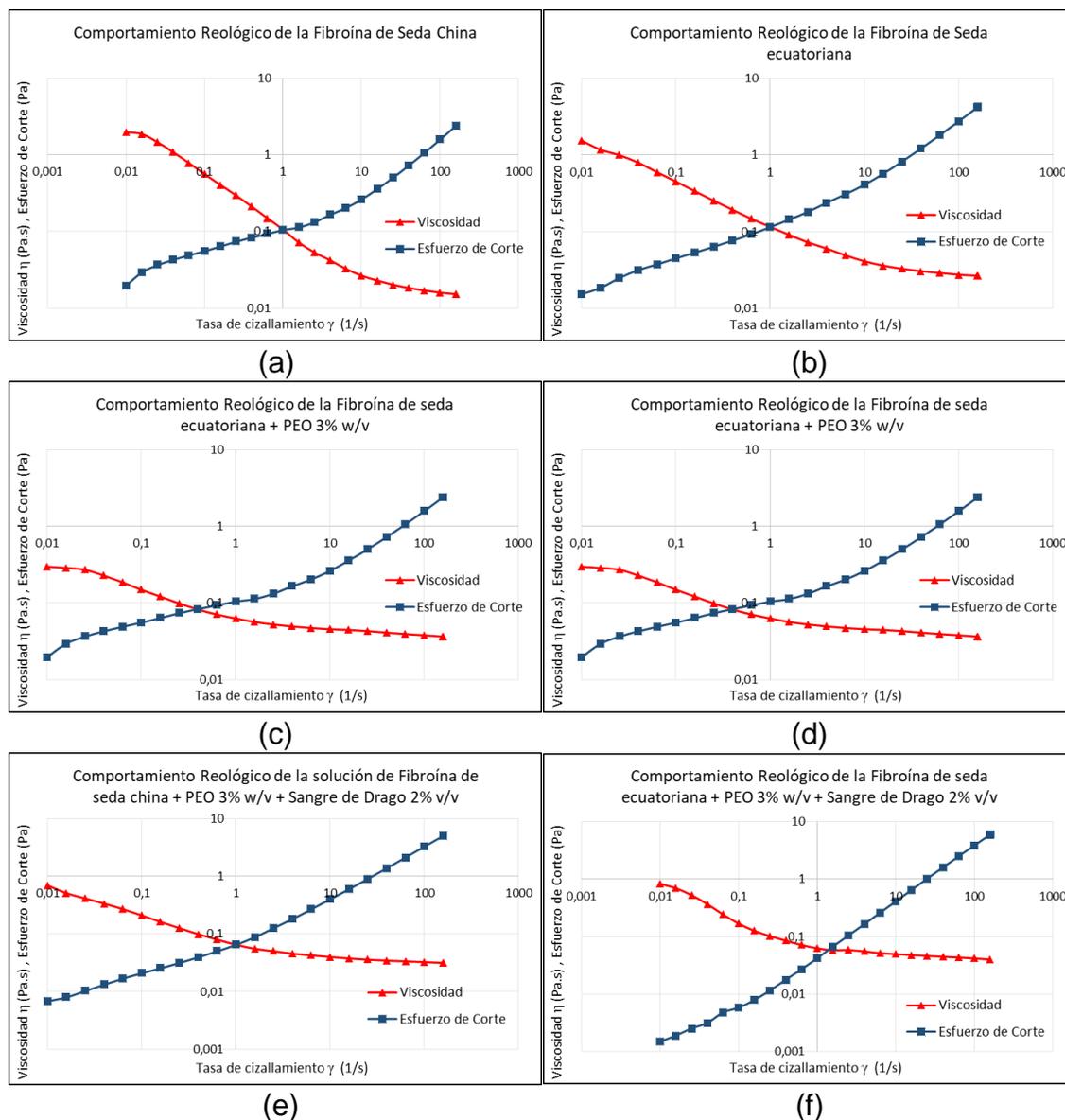
La viscosidad de la sangre de drago fluctúa entre 1,493 [Pa.s] a la velocidad de precizalla y 13,61 [Pa.s] a 160 [rad/s]. Dado que no existe una relación lineal entre el esfuerzo de corte y la tasa de cizallamiento y que la viscosidad decrece mientras que el esfuerzo crece frente al aumento de la velocidad de cizalla, se concluye que se trata de un fluido no newtoniano pseudoplástico como se muestra en la *Figura 45*.



**Figura 45.** Comportamiento de los fluidos no Newtonianos pseudoplásticos y dilatantes.

Fuente: (Polymer Properties Database, 2018)

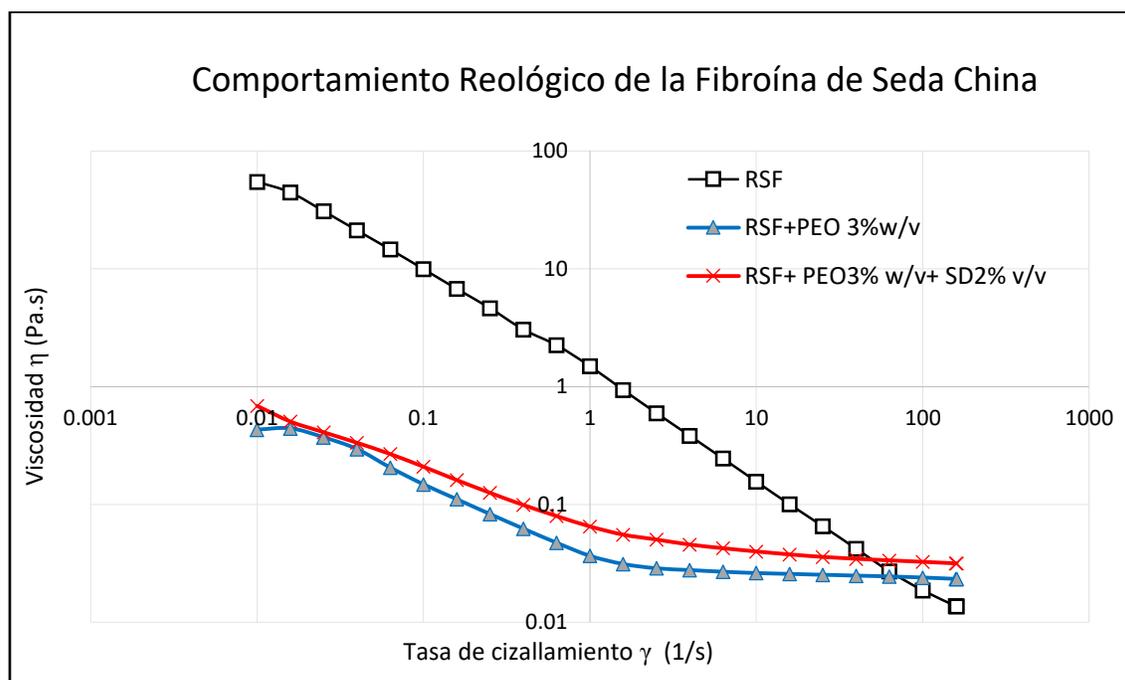
Del mismo modo se realizó las gráficas para cada una de las soluciones acuosas electrohilable obteniendo los resultados mostrados en la *Figura 46*.



**Figura 46.** Gráficas esfuerzo de corte vs tasa de cizallamiento (azul) y viscosidad vs tasa de cizallamiento(rojo) de: (a)Fibroína de seda china, (b) Fibroína de seda ecuatoriana, (c) Fibroína de seda china + PEO 3% w/v, (d) Fibroína de seda ecuatoriana+PEO 3% w/v, (e) Fibroína de seda china+PEO 3% w/v +SD 2% v/v, (f) Fibroína de seda ecuatoriana+PEO 3% w/v +SD 2% v/v.

Las gráficas anteriormente observadas repiten la tendencia, no existe una relación lineal entre el esfuerzo de corte y la tasa de cizallamiento y la viscosidad decrece mientras que el esfuerzo crece a medida que aumenta la velocidad de cizalla lo que define que los fluidos analizados son no newtonianos pseudoplásticos basándonos en la *Figura 45*.

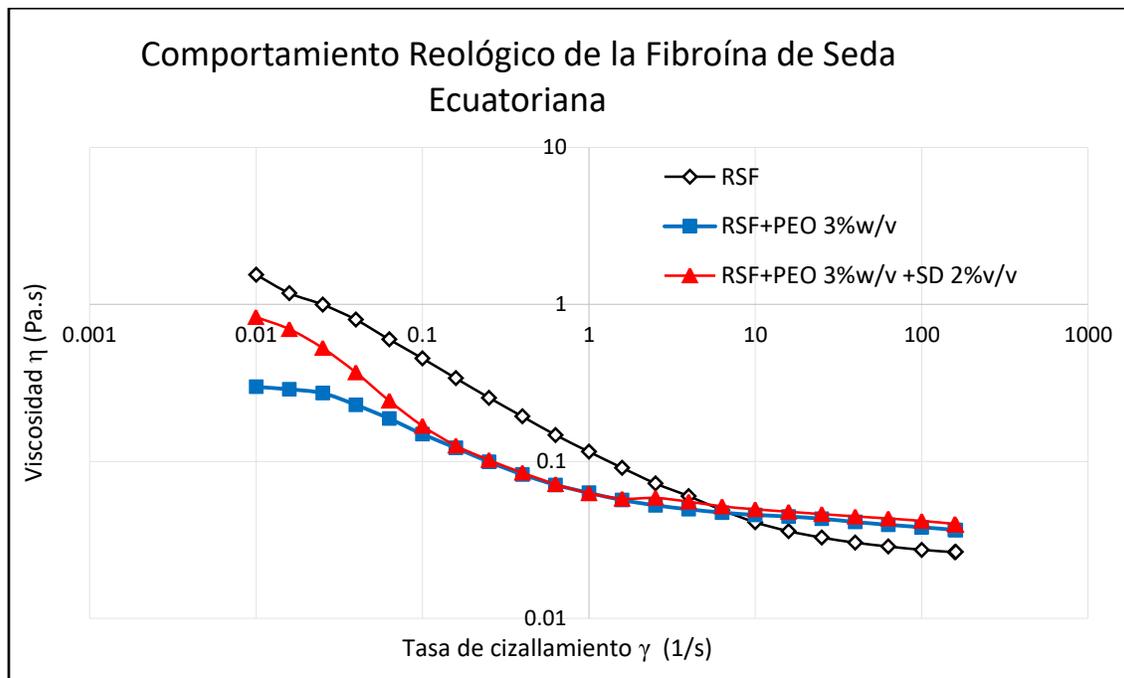
A continuación, en la *Figura 47* se compara el comportamiento de las gráficas Viscosidad vs Tasa de cizallamiento de las muestras tomadas con fibroína de seda china.



**Figura 47.** Comportamiento reológico de las muestras de fibroína de seda china

La muestra de fibroína de seda china pura tiene una viscosidad de 15,024 [mPa.s], la muestra de RSF + PEO 3% w/v de 23,256 [mPa.s] y la muestra de RSF + PEO 3% w/v + SD 2% v/v de 31,621 [mPa.s] a 160 [rad/s], lo que demuestra lo dicho por Sugihara et al. en el 2000 plantenado que el PEO aumentaría y mejoraría la viscosidad de la solución acuosa previo al uso en el proceso de electrospinning. Del mismo modo se observa que agregarle la Sangre de drago tiende a aumentar la viscosidad de la solución final lo que a su vez aumente su concentración y esa puede ser la razón de la presencia de un número mayor de beads en relación a la muestra que solo contiene PEO. En la *Figura*

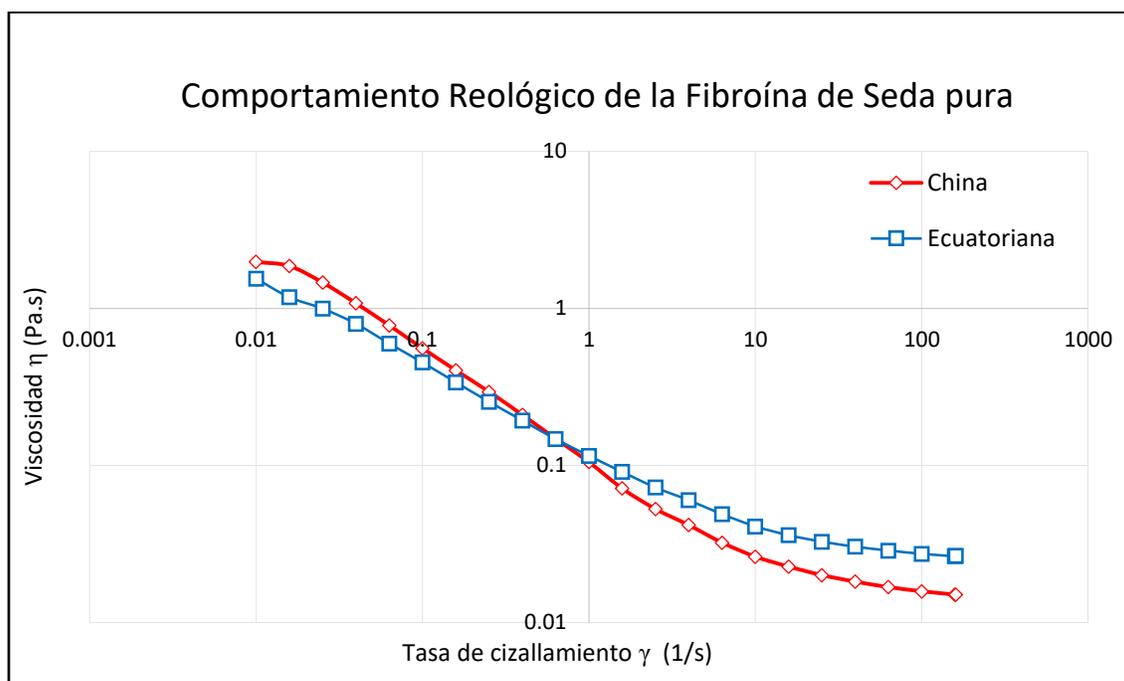
48, se realiza la misma comparación entre soluciones acuosas pero de fibroína de seda ecuatoriana.



**Figura 48.** Comportamiento Reológico de la Fibroína de Seda Ecuatoriana

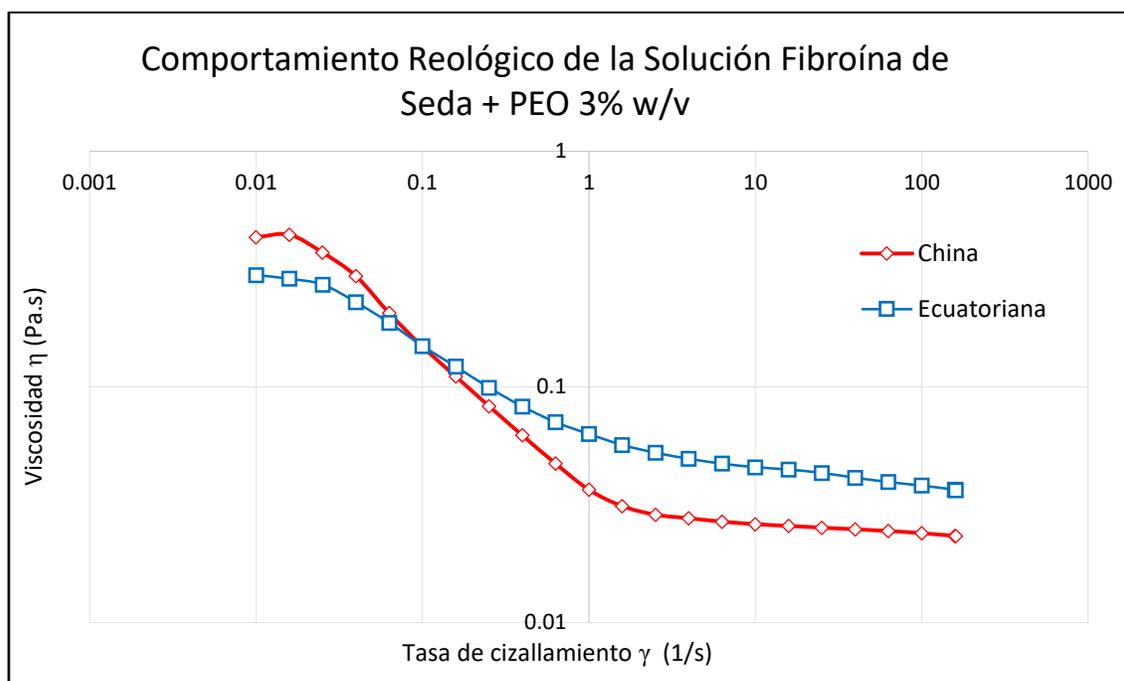
La muestra de fibroína de seda ecuatoriana pura tiene una viscosidad de 26,586 [mPa.s], la muestra de RSF + PEO 3% w/v de 36,39 [mPa.s] y la muestra de RSF + PEO 3% w/v + SD 2% v/v de 39,457 [mPa.s] a 160 [rad/s], demostrando al igual la tesis de Sugihara et al. en el 2000, es llamativo que la viscosidad de la fibroína de seda pura ecuatoriana es mayor a la viscosidad de la muestra de RSF china + PEO 3% w/v que es la muestra que mejores propiedades morfológicas brinda. Este aumento en la viscosidad y por ende de la concentración de las soluciones acuosas es el que impidió la elaboración de membranas de fibroína de seda ecuatoriana replicando los parámetros operacionales óptimos para a fibroína china previamente establecidos.

A continuación, en la *Figura 49, 50 y 52* se hace una comparación del comportamiento de las soluciones acuosas de fibroína de seda entre china y ecuatoriana.



**Figura 49.** Comportamiento Reológico de la Fibroína de Seda

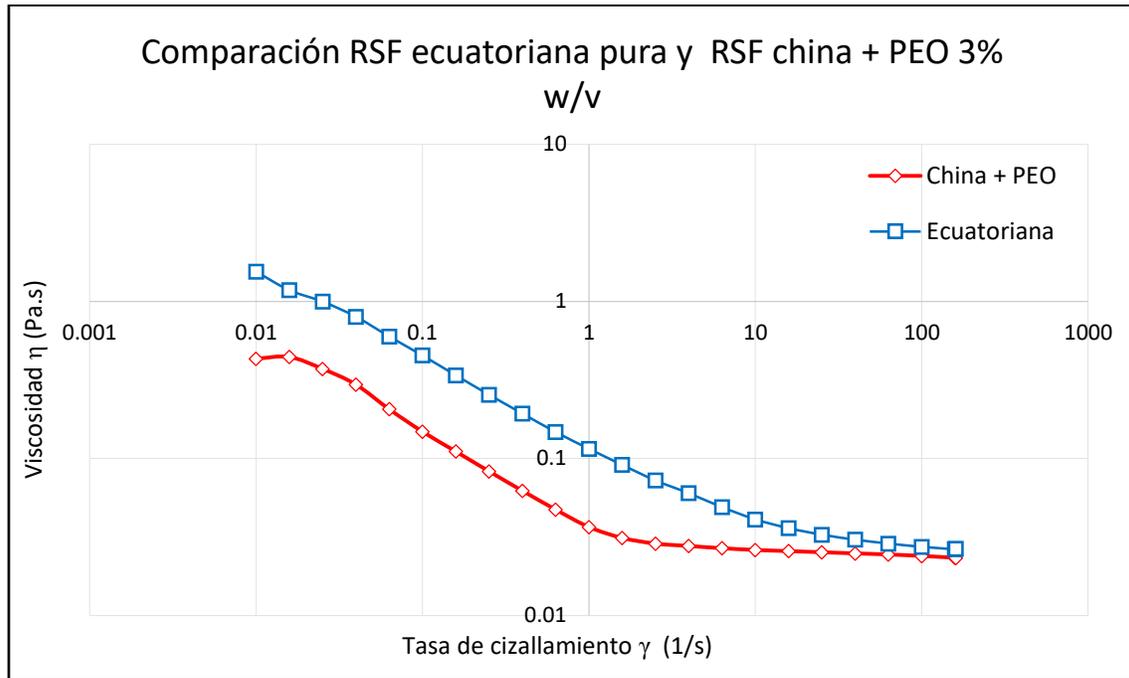
Se confirma lo previamente establecido, la solución de fibroína de seda ecuatoriana pura (26,586 [mPa.s]) es más viscosa que la solución de fibroína de seda china pura (15,024 [mPa.s]) a 160 [rad/s] manteniendo constante el protocolo de extracción, esta diferencia en la viscosidad es la que hizo posible obtener fibras con la solución ecuatoriana, que aun cuando su morfología no resultó adecuada permitió estabilizar el cono de Taylor, lo que no pasó con la solución de fibroína china pura.



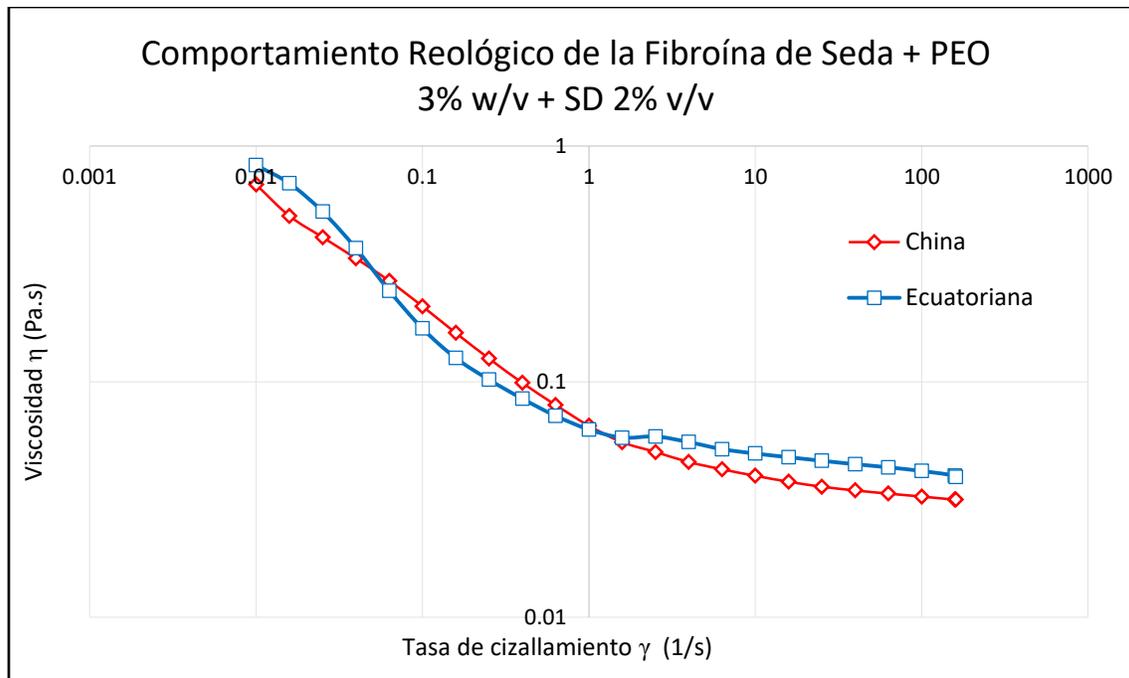
**Figura 50.** Comportamiento Reológico de la Solución Fibroína de Seda + PEO 3% w/v

Al aumentarle PEO, que trabaja aumentando la viscosidad y concentración de la solución acuosa para aumentar su electrohilabilidad sucede lo mismo. La solución de fibroína de seda ecuatoriana (36,39 [mPa.s]) cuenta con una mayor viscosidad que la solución china (23,256 [mPa.s]) a 160 [rad/s]. Este aumento en la viscosidad de la solución ecuatoriana, como se postuló previamente, es una de las razones por las que fue imposible estabilizar el cono de Taylor y por ende obtener una membrana manipulable como se muestra en la *Tabla 11*.

Previo al análisis de la última solución acuosa en la *Figura 51* se compara el comportamiento de la solución de fibroína ecuatoriana pura y la fibroína china con la adición de PEO 3% w/v, para de esta forma evidenciar que la solución ecuatoriana sin aditivos (26,586 [mPa.s]) cuenta con una viscosidad mucho más alta que la solución china con aditivos (23,256 [mPa.s]) a 160 [rad/s], razón principal por la que la solución ecuatoriana pura pudo generar fibras por el método de electrospinning.



**Figura 51.** Comportamiento Reológico de la Fibroína de Seda + PEO 3% w/v + SD 2% v/v



**Figura 52.** Comportamiento Reológico de la Fibroína de Seda + PEO 3% w/v + SD 2% v/v

Por último, al añadirle la solución de Sangre de Drago la tendencia es la misma. La solución de fibroína de seda ecuatoriana (39,457 [mPa.s]) tiene una mayor viscosidad que la solución china (31,621 [mPa.s]) a 160 [rad/s]. Este aumento en la viscosidad de la solución ecuatoriana, es la que dificultó la estabilización del cono de Taylor y por ende la morfología de las fibras no es la adecuada como se muestra en la *Tabla 11*.

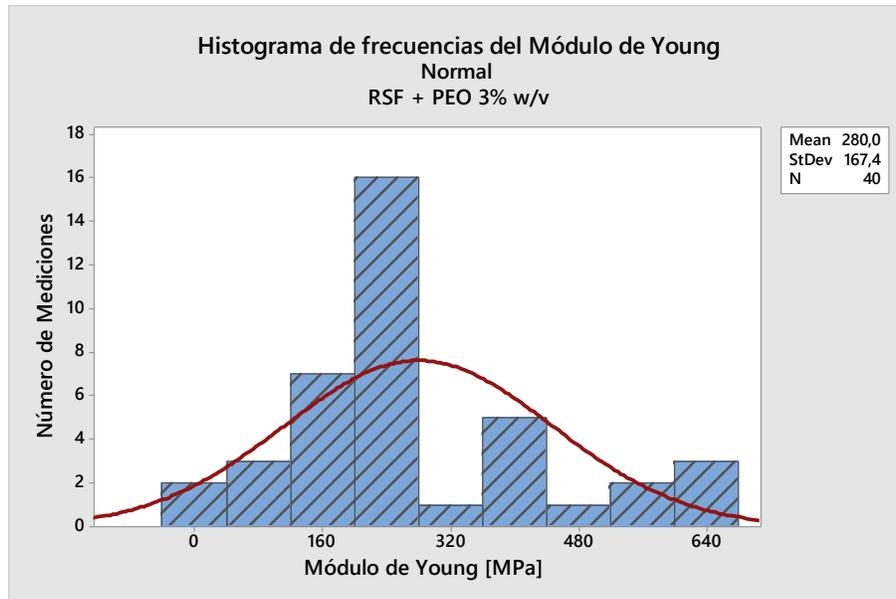
#### **4.6. Análisis Mecánico**

Para proceder a la medición del módulo de Young, las muestras fueron cortadas en trozos de aproximadamente 1 [cm<sup>2</sup>] y fueron pegadas al portamuestras del AFM usando cinta doble faz. Para las mediciones se usó una punta de silicio recubierta de Ti/Ir con el fin de disminuir las interacciones electrostáticas, de aproximadamente 20 [nm] de radio. La constante de resorte y la sensibilidad de la punta fue calculada usando el método de Sader reportando valores de 2,27 [nN/nm] y de 83,4 [nm/V]; respectivamente. Cabe resaltar que todos los ensayos fueron realizados usando la misma punta y la misma calibración para garantizar la reproducibilidad y confiabilidad de los datos. Posterior a la calibración se realizó la aproximación a la muestra y se efectuaron las curvas de fuerza respectivas, en escaneos de 10 [μm] x 10 [μm], y resolución de 16 x 16 pixeles. Una vez obtenidos, los datos fueron procesados usando el software AR 15.06.109, y ajustándolos al modelo de contacto de Hertz para dar lugar al valor aproximado del módulo de Young o de elasticidad.

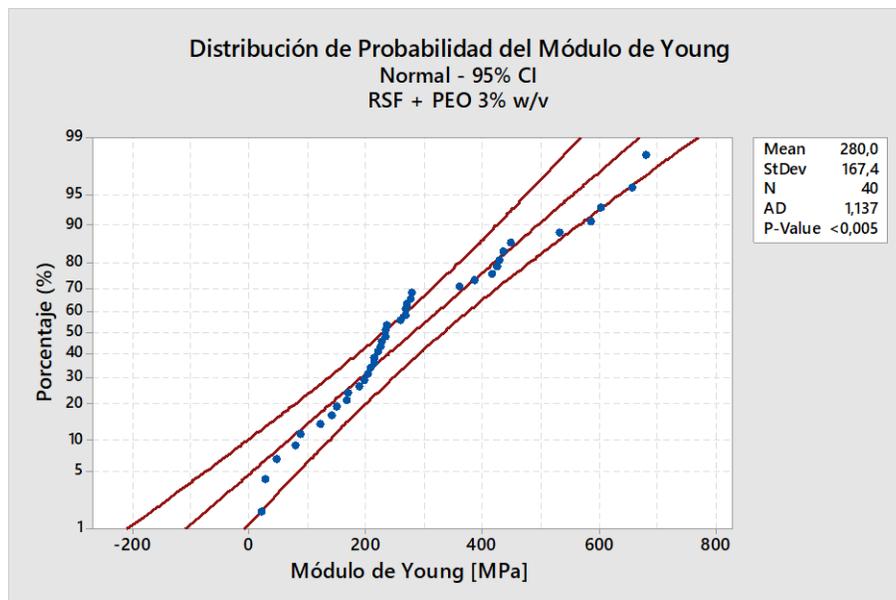
Dado que las muestras de fibroína de seda ecuatoriana no permitieron obtener membranas manipulables necesarias para hacer la medición del Módulo de Young, la caracterización mecánica es únicamente de las muestras en base a fibroína de seda china.

#### 4.6.1. Muestras de Fibroína de Seda China + PEO 3% w/v

Para la muestra de RSF + PEO 3% w/v se reportó un valor promedio de 279,9 [MPa]. La *Figura 53* presenta el histograma de frecuencia de los datos mientras que la *Figura 54* muestra la gráfica de distribución de probabilidad normal.

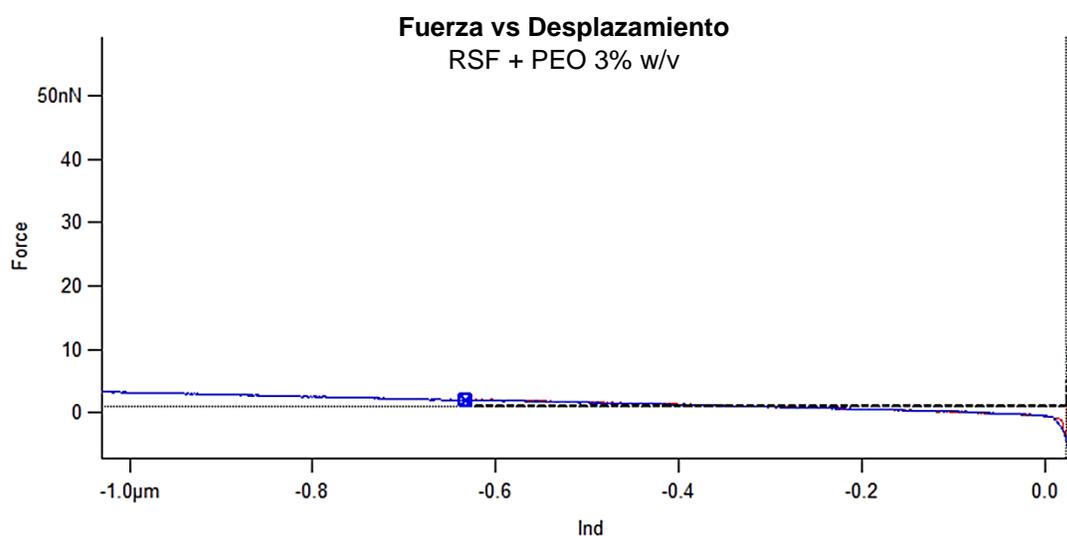


**Figura 53.** Histograma de frecuencia del Módulo de Young (RSF + PEO 3% w/v)



**Figura 54.** Distribución de Probabilidad Normal del Módulo de Young (RSF + PEO 3% w/v)

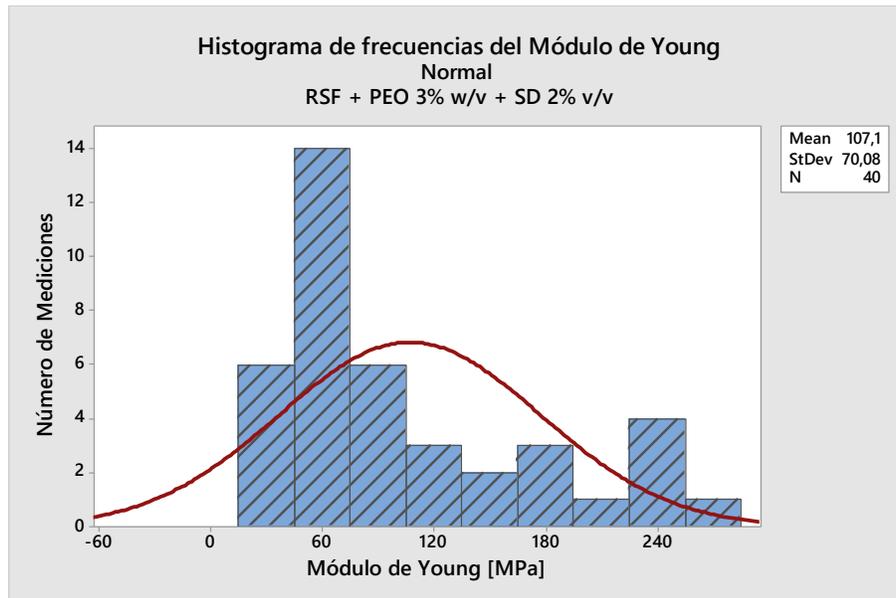
En las Figuras previamente presentadas se observa que no existe uniformidad en cuanto a los valores obtenidos, siendo la desviación estándar de los valores del Módulo de Young de aproximadamente 167 [MPa], esto producto del número reducido de pruebas realizadas dada la complejidad y por ende coste de las mismas, así como de la variación de los diámetros de las fibras cuya desviación es de 19,26 [nm] como se muestra en la *Tabla 11*. En la *Figura 55* se muestra la gráfica Fuerza vs desplazamiento obtenida de la prueba realizada a las fibras.



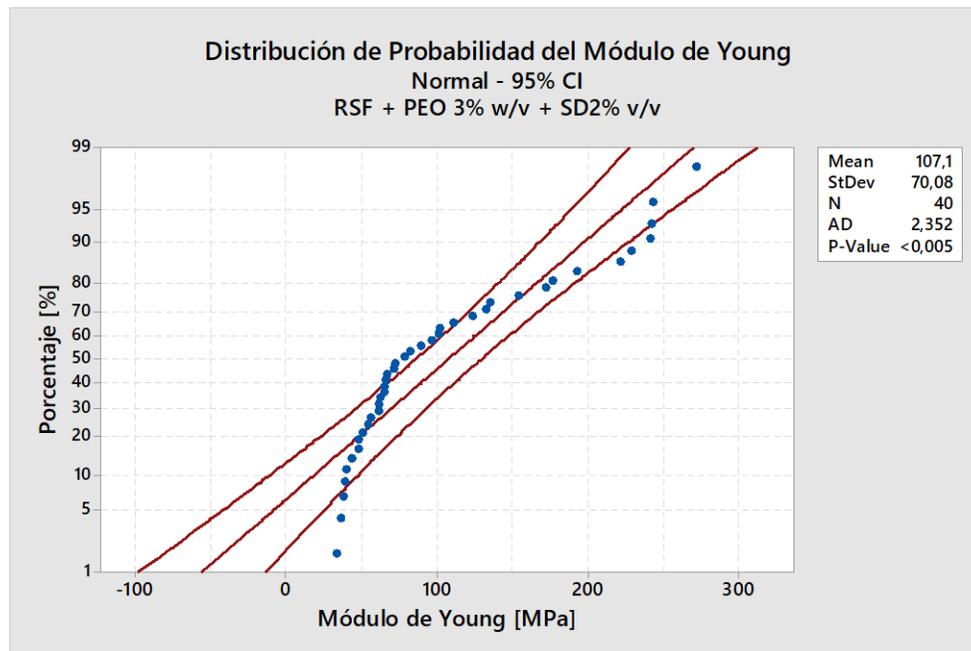
**Figura 55.** Gráfica Fuerza vs desplazamiento (RSF + PEO 3% w/v)

#### **4.6.2. Muestras de Fibroína de Seda China + PEO 3% w/v + SD 2% v/v**

Para la muestra de RSF + PEO 3% w/v + SD 2% v/v se reportó un valor promedio de 107,1 [MPa], lo que quiere decir que, aunque la adición de sangre de drago aumenta la viscosidad de la solución acuosa también disminuye el valor del módulo de Young de la membrana obtenida por electrospinning. La *Figura 56* presenta el histograma de frecuencia de los datos mientras que la *Figura 57* muestra la gráfica de distribución de probabilidad normal.



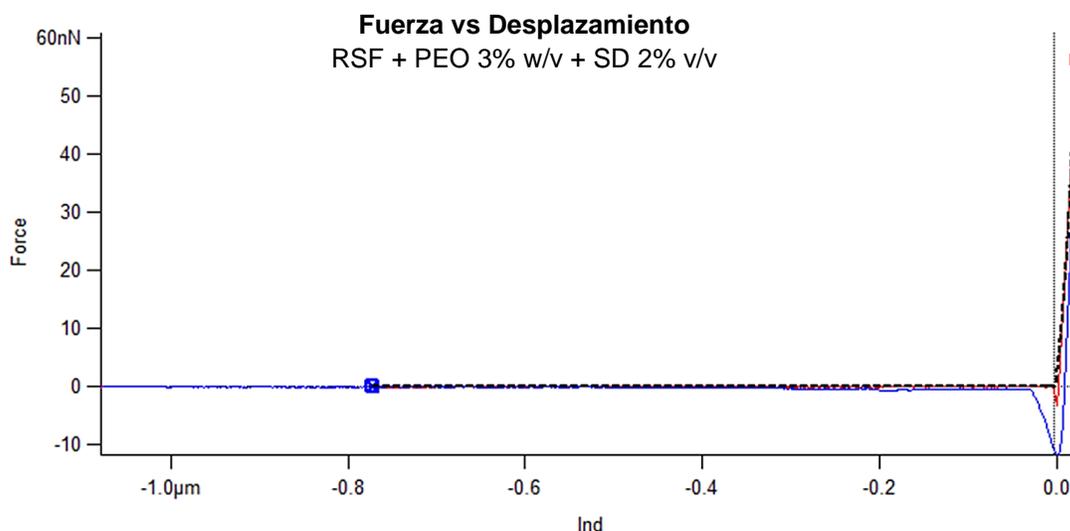
**Figura 56.** Histograma de frecuencia del Módulo de Young (RSF + PEO 3% w/v+ SD 2% v/v)



**Figura 57.** Distribución de Probabilidad Normal del Módulo de Young (RSF + PEO 3% w/v+ SD 2% v/v)

De la misma forma en las figuras anteriores es evidente la no uniformidad en los valores obtenidos, siendo la desviación estándar de los valores del Módulo de Young de

aproximadamente 70,08 [MPa], esto producto igualmente del número reducido de pruebas realizadas dada la complejidad y por ende coste de las mismas, así como de la variación de los diámetros de las fibras cuya desviación es de 47,14 [nm] como se muestra en la *Tabla 11*. En la *Figura 58* se muestra la gráfica Fuerza vs desplazamiento obtenida de la prueba realizada a las fibras.



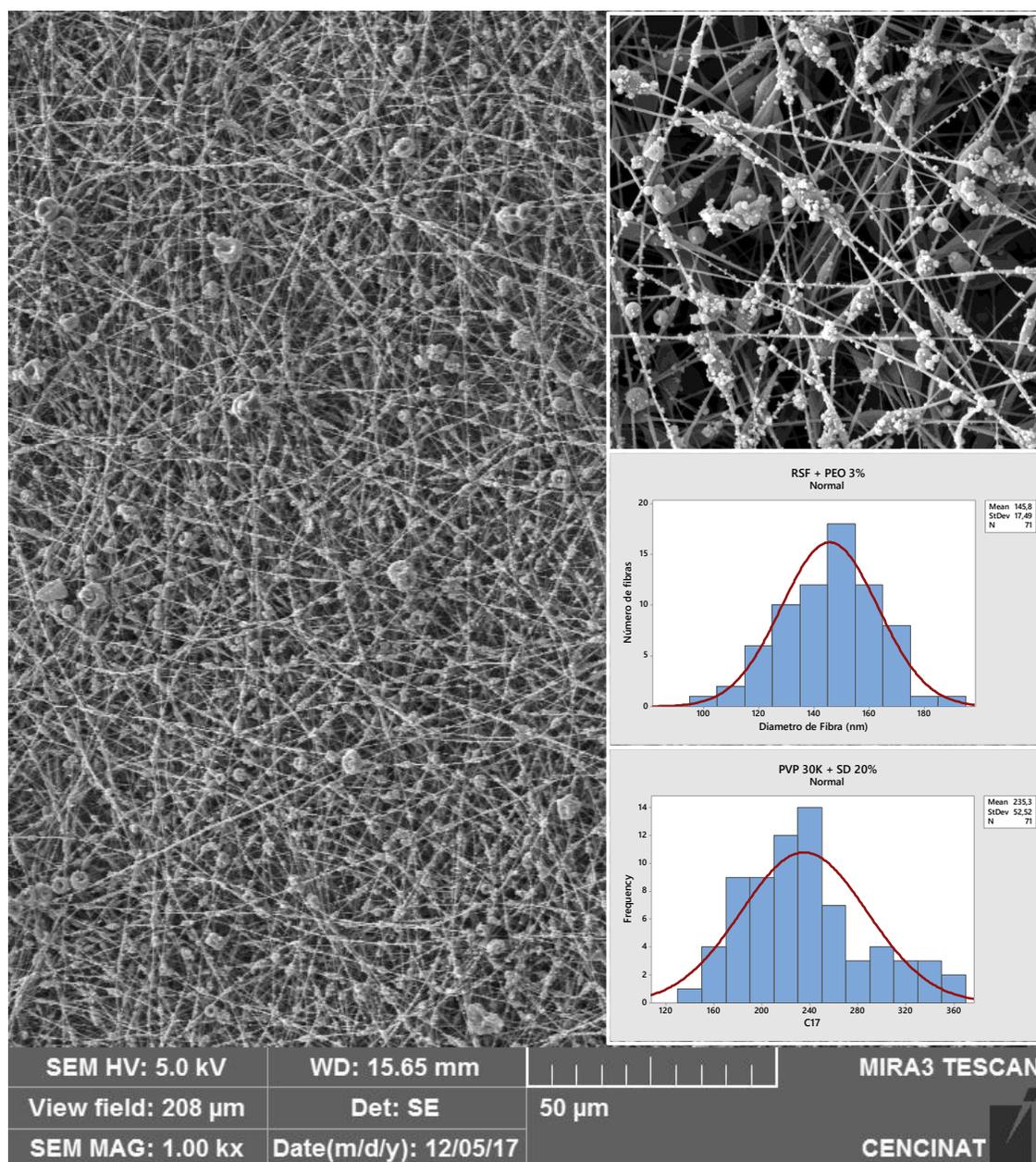
**Figura 58.** Gráfica Fuerza vs desplazamiento (RSF + PEO 3% w/v+ SD 2% v/v)

#### 4.7. Alternativas para una posterior aplicación biomédica

Dadas las complicaciones que se presentaron durante la investigación al trabajar con la sangre de drago por primera vez como material electrohilable, se plantearon algunas alternativas para una posterior aplicación biomédica procurando la presencia de la mayor concentración de sangre de drago debido las grandes propiedades biológicas previamente postuladas. Las alternativas experimentadas son las siguientes.

##### 4.7.1. Nanopartículas de PVP 30K 10%w/w + SD 20%v/v

Una de las alternativas fue dopar las membranas obtenidas de RSF + PEO 3% + SD 2% v/v con nano y micropartículas de PVP 30K + SD 20% v/v obteniendo los resultados que se muestran en la *Figura 59*.

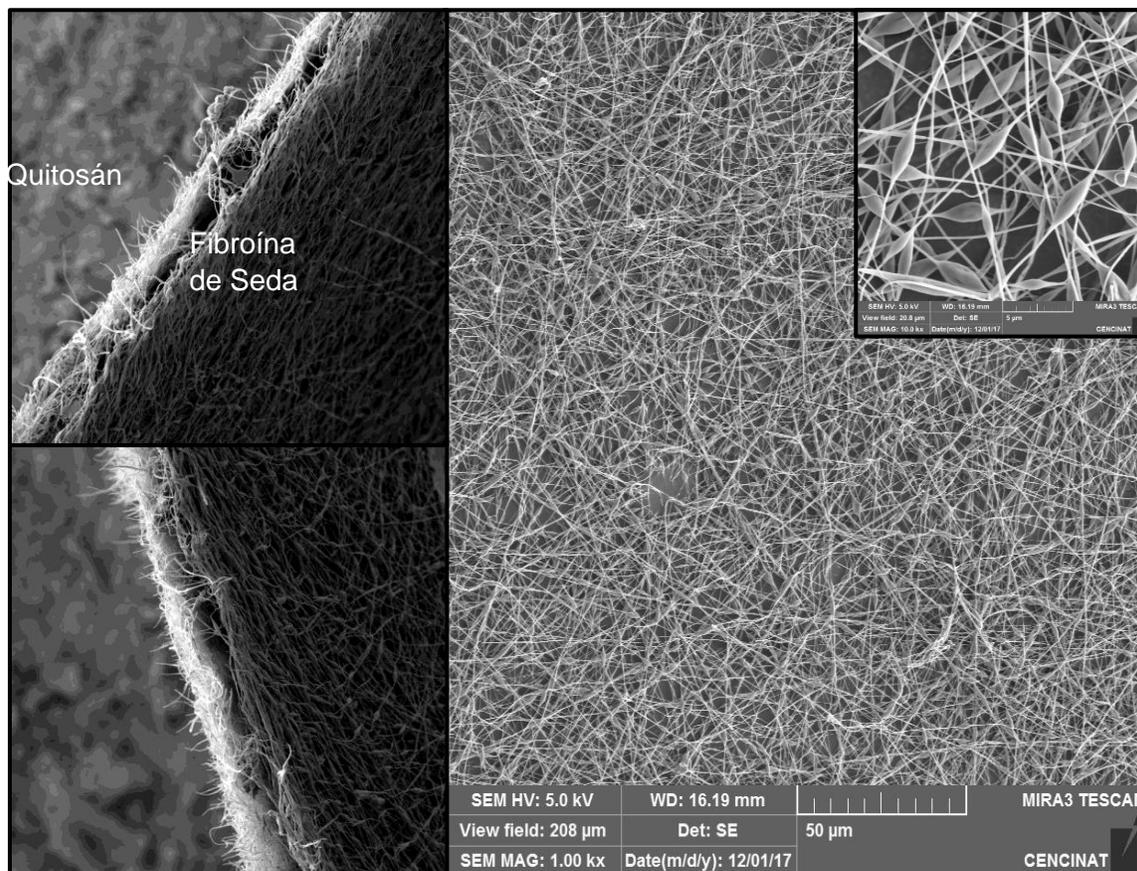


**Figura 59.** Fibras de RSF-PEO3% w/v-SD 2%v/v dopadas con nanopartículas de PVP 30K 13%w/w-SD 20% v/v

#### 4.7.2. By-Layer de RSF + PEO 3%w/v + SD 2% y CS4% en AA 70% + PVA 10% + SD 100%

Otra de las opciones fue realizar un by-layer uniendo una capa de RSF + PEO 3%w/v + SD 2% v/v con una capa de quitosán(CS)4% en AA 70% + PVA 10% + SD 100% aprovechando que la solución de quitosán permitió solubilizar la sangre de drago

concentrada al 100%. De esta forma se obtuvieron los resultados mostrados en la *Figura 60*.



**Figura 60.** By-layer de RSF + PEO 3%w/v + SD 2% y CS4% en AA 70% + PVA 10% + SD 100%

La membrana obtenida de la solución de quitosán tiene un espesor mayor dado que el radio de dibujo en el colector es mucho menor al de la fibroína, es por esta razón que a pesar de tener el mismo tiempo de deposición existe una mayor cantidad de fibras de quitosán en relación a las de fibroína de seda.

#### 4.7.3. Atomización de Sangre de Drago concentrada

Una de las alternativas más sencillas es agregar directamente sangre de drago concentrada al 100% mediante un atomizador de uso comercial, pero el inconveniente que se presenta con este método es que la fibroína de seda reconstituida o RSF obtenida

de la extracción por protocolo químico al ser electrohilada es soluble al agua y dado que la sangre de drago cuenta con agua en su estructura disuelve la fibroína obteniendo la imagen del microscopio óptico que se observa en la *Figura 61*.



**Figura 61.** Sangre de drago atomizada sobre una membrana de RSF + PEO 3% w/v

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Se realizó el protocolo químico para la extracción de la fibroína de seda en el Laboratorio de Reología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, desde la fase de capullo hasta la solución acuosa a través del uso de soluciones salinas como el carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ) para la eliminación de la sericina en los capullos o desgomado, la solución de bromuro de litio (LiBr) 9.3M para la disolución de la fibroína en una solución altamente cargada y viscosa y el proceso de diálisis durante 48 horas mediante el uso de membranas de piel de serpiente para intercambiar con agua ultrapura los iones cargados de bromuro de litio que perjudicaban las propiedades químicas de la solución y por ende impedían que sea electrohilable, obteniendo así una solución acuosa entre 9-12% de concentración w/v, pH 6,46 y conductividad eléctrica de 280  $[\mu S/cm]$ . La principal diferencia entre la extracción de fibroína de seda china y ecuatoriana yace en el proceso de desgomado, donde el porcentaje de fibroína en el capullo para el material de origen chino es de 75,2%, mientras que el de origen ecuatoriano es de 83,6%, concluyendo que existe más fibroína en los capullos ecuatorianos, tomando en cuenta que las propiedades de cada capullo son dependientes de una serie de parámetros como la alimentación del gusano, el tiempo de crecimiento, la especie, las condiciones ambientales, etc.
- La solubilidad de la sangre de drago presentó problemas a la hora de mezclarla con la solución de RSF + PEO 3%w/v, por tal motivo, se experimentó la solubilidad con ciertos polímeros sintéticos y biopolímeros; permitiendo una mezcla uniforme en polímeros de bajo peso molecular como el PVA de 15000[Da] o como el PVP 30000 [Da] y generando una solución grumosa y poco uniforme con polímeros como el PEO de 1000000[Da]; esto dio lugar a que la única concentración de sangre de drago que se mezcló uniformemente con la solución de fibroína de seda sea al 2% v/v en agua, concentración relativamente baja frente al uso común

que está concentrado al 100% y relativamente alta frente a la solución diluida que se usa en úlceras gástricas que está aproximadamente en 0,06% v/v en agua.

- Producto de la caracterización morfológica se obtuvieron las mejores muestras a los siguientes parámetros operacionales de electrospinning: Voltaje: 6-7 [kV], caudal: 1,2-1,4 [mL/h] y distancia entre el colector/capilar: 12 [cm] y parámetros ambientales: Temperatura: 18-19 °C y humedad relativa: 60-63% , tras el análisis mediante microscopía SEM se obtuvieron los siguientes datos, por un lado para la solución RSF china + PEO 3% w/v se obtuvo diámetro medio de 139,43[nm] con una desviación estándar de 19,26[nm] siendo esta la mejor muestra en cuanto a morfología, mientras que la solución RSF china + PEO 3%w/v + SD2%v/v tuvo un diámetro medio de 160[nm] con una desviación estándar de 47,14,19[nm] con presencia de beads porosos que tenían como diámetro medio de poro 30,19[nm] y desviación de 8,81[nm] siendo las dos membranas manipulables que pueden ser utilizadas como apósitos en heridas tras análisis biológicos. Mientras tanto para las soluciones acuosas ecuatorianas se obtuvieron los siguientes datos, dada la viscosidad relativamente alta de la fibroína de seda pura fue posible la formación de fibras con un diámetro medio de 144,1[nm] y desviación estándar de 42,32[nm] aunque no formó una membrana manipulable a fin de la aplicación proyectada, por otro lado la solución de RSF ecuatoriana + PEO 3% w/v dado el aumento de la viscosidad no permitió la estabilización del cono y por ende no permitió obtener fibras y por último la solución de RSF ecuatoriana + PEO 3% w/v+ SD 2%v/v a pesar del aumento de la viscosidad permitió la estabilización del cono a voltaje variable obteniendo como diámetro medio 145,4[nm] y desviación 42,10[nm], esto ratifica que dadas las diferencias en los parámetros de las soluciones chinas y ecuatorianas deben ser analizadas como materiales completamente distintos a la hora de establecer los parámetros operativos en el proceso de electrospinning.
- El comportamiento reológico de todas las soluciones considerando que no existe una relación lineal entre el esfuerzo de corte y la tasa de cizallamiento y que la

viscosidad decrece mientras que el esfuerzo crece frente al aumento de la velocidad de cizalla, se concluye que las soluciones son fluidos no newtonianos pseudoplásticos. Además, a una velocidad de cizalla de 160 [rad/s], para la muestra de fibroína de seda china pura la viscosidad es de 15,024[mPa.s], la muestra de RSF china + PEO 3% w/v de 23,256 [mPa.s] y la muestra de RSF china + PEO 3% w/v + SD 2% v/v de 31,621 [mPa.s]; concluyendo que a medida que se adiciona PEO y PEO + SD la viscosidad de la solución aumenta facilitando el electrohilado, pero dando lugar a la presencia de beads dado el aumento en la concentración; del mismo modo para la muestra de fibroína de seda ecuatoriana pura tiene una viscosidad de 26,586 [mPa.s], la muestra de RSF + PEO 3% w/v de 36,39 [mPa.s] y la muestra de RSF + PEO 3% w/v + SD 2% v/v de 39,457 [mPa.s], que a partir de la elevada viscosidad de la solución pura, al aumentar PEO o PEO + SD la concentración también aumenta y se complica tanto la estabilización del cono, como la formación de fibras. Por lo tanto, la viscosidad de las soluciones en base a fibroína de seda ecuatoriana es mayor aun manteniendo constante el protocolo químico de extracción.

- Producto de la diferencia en las propiedades físicas presentadas en la fibroína de seda ecuatoriana, resultó complicado replicar los parámetros operacionales para la producción de membranas manipulables establecidos previamente en fibroína de seda china, por esta razón fue imposible realizar el estudio mecánico de ellas. Los datos de Módulo de Young obtenidos de las pruebas realizadas en el Microscopio de Fuerza Atómica AFM muestra que las fibras en base a fibroína de seda china RSF + PEO 3% w/v tiene un valor promedio de 279,9 [MPa] con una desviación estándar de 167[MPa], mientras que al agregarle la savia de sangre de drago obteniendo la solución RSF + PEO 3% w/v + SD 2% v/v tiene un valor promedio de 170,1 [MPa] con una desviación estándar de 70,08 [MPa]. Además, se puede concluir que los altos valores de desviación estándar en las pruebas demuestran que es necesario realizar más ensayos con variaciones en los diferentes parámetros, lo que se dificulta por la complejidad técnica del ensayo y

el elevado costo de la misma, además de procurar que la desviación estándar del diámetro de las fibras ensayadas no tienda a ser muy elevado, para el caso en particular la desviación para la primera muestra es de 19,26 [nm], mientras que para el segundo caso es de 47,14 [nm] que en escala nanométrica es relativamente alto provocado por la dificultad presentada al trabajar con biopolímeros y el reducido control que se tiene sobre los parámetros ambientales en el proceso de electrospinning. Adicionar sangre de drago a la solución de RSF + PEO 3% w/v a pesar de aumentar la viscosidad de la solución tiende a reducir el módulo de Young de las fibras obtenidas del proceso de electrospinning, aspecto que no cuenta con mucha relevancia para el caso de un apósito donde un parche secundario se caracteriza por su rigidez y resistencia mecánica mientras que el apósito primario como el elaborado, es el que cuenta con los agentes biológicos que aportan a acelerar la cicatrización de la herida.

## 5.2. Recomendaciones

- Tener un mayor control sobre las condiciones ambientales y técnicas tanto de la extracción de la fibroína de seda como del proceso de electrospinning para que no exista tanta variación entre las muestras y se logre la mayor reproducibilidad posible en los datos obtenidos de las distintas caracterizaciones.
- Se recomienda realizar los estudios del comportamiento de la fibroína de seda ecuatoriana como material electrohilable con diferentes concentraciones de PEO para la formación de membranas que puedan ser utilizables como apósitos para la curación de heridas crónicas.
- Profundizar el estudio y realizar los ensayos biológicos a las alternativas planteadas en el presente trabajo para la curación de heridas, considerando que

el apósito cuenta con el mayor porcentaje de sangre de drago y las mejores características biológicas destinadas a mejorar la cicatrización de una herida crónica.

- Estudiar más a detalle el comportamiento de la sangre de drago en el proceso de electrospinning como material dopante en la producción de membranas con fines biomédicos para la curación de heridas en apósitos o andamios de tejidos.
- Elaborar un estudio sobre el efecto que tiene la matriz de recolección sobre las propiedades mecánicas y morfológicas de las membranas de fibroína de seda obtenidas a través del proceso de electrospinning.

### **5.3. Trabajos Futuros**

- Estudio biológico de membranas de fibroína de seda dopadas con sangre de drago por distintos métodos.
- Caracterización de fibras submicrométricas de fibroína de seda de capullos de diferente procedencia.
- Estudio del comportamiento mecánico de las fibras obtenidas por la técnica de electrospinning variando la matriz de recolección
- Caracterización de films de fibroína de seda obtenidos por la técnica de electrospinning para aplicaciones de transmisión de datos por fibra óptica.
- Estudio del comportamiento de by-layers obtenidos por la técnica de electrospinning como aislantes térmicos.
- Estudio del comportamiento reológico de soluciones biopoliméricas según su tasa de degradación.
- Caracterización mecánica de andamios de tejidos de fibroína de seda obtenidos por la técnica de electrospinning para tejidos duros.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrigo, M., McArthur, S., & Kingshott, P. (2014). Electrospun Nanofibers as Dressings for Chronic Wound Care: Advances, Challenges and Future Prospects. *Macromolecular Bioscience*, 774.
- Agarwal, S., Burgard, M., Greiner, A., & Wendorff, J. (2016). *Electrospinning: A Practical guide to nanofibers*. Berlín, Germany: De Gruyter.
- Allaica Tenesaca, P. (2015). *Comparación del efecto cicatrizante de tinturas elaboradas a base de guarango (caesalpinia spinosa) y sangre de drago (croton lechleri) aplicados en ratones (mus musculus)*. . Riobamba: Tesis.
- Altman, G., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., . . . Kaplan, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*.
- Anitha, R. (2011). Indian silk industry in the global scenario. *J. Multidisciplinary Maagement Studies* 1, 100-110.
- Aznár Cervantes, S. D. (2012). Electrospinning of silk hydrogels and aqueous dissolutions per se. *Report Tufts-MIT*, 10.
- Aznar Cervantes, S. D., Lozano, A., García, M., Villora, G., & Cervantes, V. (2015). Importance of refrigeration time in the electrospinning of silk fibroin aqueous solutions. *Journal of Materials Science*.
- Banco Central del Ecuador. (20 de Noviembre de 2017). Obtenido de <https://www.bce.fin.ec>: <https://www.bce.fin.ec>
- Baumgarten, P. (1971). Electrostatic Spinning of Acrylic Microfibers. *J. Colloid Interf. Sci.* 36, 75-79.
- Benavides, J. (2008). Reparación de heridas cutáneas. *Revista de la asociación colombiana de dermatología*, 29-35.
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. (2010). "Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnol. Adv.*, 28.
- Bhattacharai, S., Bhattacharai, N., Yi, H., Hwang, P., Cha, D., & Kim, H. (2004). Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*. 25, 2595-2602.
- Bielefeld, K. A., Amini-Nik, S., & Alman, B. A. (2013). Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci.*, 2059–2081.
- Blond, D., McCarthy, D. N., Blau, W. J., & Coleman, J. N. (2007). Toughening of artificial silk by incorporation of carbon nanotubes. *Biomacromolecules*. 8, 3973.

- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N., & Eccleston, G. M. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Pharm. Sci.* 97, 2892.
- Buer, A., Ugbohue, S., & Warner, S. (2001). Electrospinning and properties of some nanofibers. *Tex. Res. J.* 71, 323-328.
- Calafat, M., Guinea, G., Rigueiro, J., & Plaza, G. (2011). Usos médicos de la seda. *Investigación y Ciencia*, 28-35.
- Campbell, D., Pethrick, R., & White, J. (2000). Chapter 10: Scanning electron microscopy. *Polymer Characterization, Physical Techniques*. Second Edition. Stanley Thornes Publishers Ltd.
- Cedeño, V., & Molina, L. (2015). *Aplicación del proceso de atención de enfermería en pacientes con úlceras por presión en el Hospital Universitario*. Guayaquil, Ecuador: Universidad de Guayaquil.
- Cenis, J. L. (2009). La Seda como biomaterial en medicina regenerativa. *Eubacteria*.
- Cerutti, T. (2000). Plantas Medicinales Cultivo, importancia y formas de uso. *EsSalud - IMET Iquitos*, 72-73.
- Chen, C. H. (2010). *Electrohydrodynamic Stability*.
- Chen, S., Bing, L., Carlson, M., Gombart, A., Reilly, D., & Xie, J. (2017). Recent advances in electrospun nanofibers for wound healing Review. *Nanomedicine*, 107-115.
- Chen, S., Zhang, M., & Shao, X. (2015). A laminin mimetic peptide SIKVAV-conjugated chitosan hydrogel promoting wound healing by enhancing angiogenesis, re-epithelialization and collagen deposition. *J. Mater. Chem. B*3, 33.
- Chen, Z. P. (1994). Studies on the anti-tumour, anti-bacterial and wound-healing properties of dragon's blood. *Planta Med.*
- Cheng, C., Wan, C., Wang, Y., & Wu, M. (2005). Thermal shutdown behavior of PVdf-HFP based polymer electrolytes comprising heat sensitive cross-linkable oligomers. *J. Power Resources*.
- Chevalier, E., Chulia, D., Pouget, C., & Viana, M. (2008). Fabrication of porous substrates: A review of processes using pore forming agents in the biomaterial field. *J. Pharm. Sci.* 1135–1154.
- Deitzel, J., Kleinmeyer, J., Harris, D., & Beck Tan, N. (2001). The Effect of Processing Variables on the Morphology of Electrospun Nanofibers and Textiles. *Polymer*, 42.
- Demir, M., Yilgor, I., Yilgor, E., & Erman, B. (2002). Electrospinning of Polyurethane Fibers. *Polymer*, 3303.

- Domínguez, A. (1985). *Fitoquímica y Caracterización del alcaloide*. USA: Editorial WHO.
- Doshi, J., & Reneker, D. H. (1995). Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers. *J. Electrostatics*, 35, 151.
- Duque Sánchez, L. M., Rodríguez, L., & López, M. (2013). Electrospinning: La era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros*.
- Elices, M., Pérez, J., Plaza, G., & Guinea, G. (2011). Usos médicos de la seda. *Investigación y Ciencia*, 31.
- Elliot, S. N., Buret, A., McKnight, W., Miller, M., & Wallace, J. L. (1998). Bacteria rapidly colonize and delay the healing of gastric ulcers in rats. *Am. J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 275, 424-432.
- Elliot, S. N., Wallace, J. L., Mc Knight, W., Gall, D. G., Harding, J. A., Olson, M., & Buret, A. (2000). Bacterial colonization and healing of gastric ulcers: the effects of epidermal growth factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 278, 105-112.
- Elsner, J. J., & Zilberman, M. (2009). Antibiotic-eluting bioresorbable composite fibers for wound healing applications: Microstructure, drug delivery and mechanical properties. *Acta Biomater*.5, 2872–2883.
- Fong, H., Chung, I., & Reneker, D. (1999). Beaded Nanofibers Formed During Electrospinning. *Polymer*, 40.
- Formhals, A. (1934). *US Patente nº 1975504*.
- Fradique, R., Correia, T. R., Miguel, S. P., de Sá, K. D., Figueira, D. R., Mendonza, A. G., & Correia, I. J. (2016). Production of new 3D scaffolds for bone tissue regeneration by rapid prototyping. *J Mater Sci: Mater Med*, 69.
- Freed, L. E., Vunjak-Novakovic, G., Biron, R. J., Eagles, D. B., Lesnoy, D. C., & Barlow, S. K. (1994). Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Nat Biotechnol*. 12, 689–693.
- Gamo, T., Inokuchi, T., & Laufer, H. (1977). Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different section of the silk gland in *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*. 7, 285–295.
- Gaviria, D., & Caballero, L. C. (2015). Uso de biomateriales a partir de la fibroína de la seda de gusano de seda (*Bombyx mori* L.) Para procesos de medicina regenerativa basada en ingeniería de tejidos. *Rev. Méd. Risaralda*, 38-43.
- Giesa, T., Arslan, M., Pugno, N. M., & Buehler, M. J. (2011). Nanoconfinement of spider silkfibrils begets superior strength, extensibility, and toughness. *Nano Lett*. 11, 5038-5046.

- Guerrinib, A., Maiettib, S., Brunic, R., Paganettob, G., Polid, F., Scalvenzib, L., . . . Sacchettib, G. (2010). Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador Croton lechleri Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient. *Food Chemistry* 126, 837-848.
- Gupta, D., Bleakley, B., & Gupta, R. K. (2008). Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 361–380.
- Haagsma, J., Graetz, N., & Bolliger, I. (2015). The global burden of injury: incidence, mortality, disability-adjusted life years and time trends from the Global Burden of Disease study 2013. *Inj. Prev.* 22(1), 3-18.
- Harding, K. G., Morris, H. L., & Patel, G. K. (2002). Science, medicine and the future: Healing chronic wounds. *BMJ.* 324, 160-163.
- Hardy, J., & Scheibel, T. (2010). Composite materials based on silk proteins. *Progress in Polymer Science*, vol. 35, nº, 1093-1115.
- Hattori, T., & Wakitani, S. (2002). Articular Cartilage regeneration. *Clin. Calcium.* 12, 217-221.
- Heredia, L., & Goñi-Morgan, M. (1985). Efecto del alcaloide taspina de la sangre de grado sobre la migración celular y síntesis de colágeno en células 3T3. *Universidad Peruana Cayetano*.
- Herforth, A. (2002). *Antifungal plants of the Peruvian Amazon: A Survey of ethnomedicinal uses and biological activity*. Cornell University USA: Honors Thesis.
- Hingorani, A., LaMuraglia, G., & Henke, P. (2016). The management of diabetic foot: A clinical practice guideline by the Society for Vascular Surgery in collaboration with the American Podiatric Medical Association and the Society for Vascular Medicine. *JVS*, 3S–21S.
- Hoa, M., Wanga, H., & Laua, K. (2012). Effect of degumming time on silkworm silk fibre for biodegradable polymer composites. *Appl. Surf. Sci.* 258, 3948–3955.
- Hohman, M. M., Shin, M., Rutledge, G., & Brenner, M. P. (2001). Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Phys. Fluids* 13, 2201–2220.
- Huang, Z., Zhang, Y., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63, 2223–2253.
- INEC. (2014). *Anuario de estadísticas de nacimientos y defunciones*.

- Inoue, A., Tanaka, K., & Arisakaffi, F. (2000). Silk fibroin of Bombyx Mori is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol. Chem.* 275, 40517-40528.
- Inoue, S., Takara, K., Arisaka, F., Kimura, S., Ohtomo, K., & Mizuno, S. (2000). Silk fibroin of Bombyx mori is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol. Chem.* 275, 40517–40528.
- Institute National Trauma. (2005). *Trauma statistics*. Obtenido de [www.nationaltraumainstitute.org/home/trauma\\_statistics.html](http://www.nationaltraumainstitute.org/home/trauma_statistics.html)
- Jannesari, M., Varshosaz, J., Morshed, M., & Zamani, M. (2011). Composite poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs. *Int. J. Nanomed.* 6, 993-1003.
- Jhon, E. S., James, W. C., & Mulvaney, P. (1999). Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *AIP Review of Scientific Instruments* 70, 3697.
- Jiang, C., Wang, X., Gunawidjaja, R., Lin, Y., Gupta, M. K., Kaplan, D. L., . . . Tsukruk, V. (2007). Free standing nanostructures via Layer-by-Layer Assembly. *Adv. Funct. Mater.* 17, 2229.
- Jin, H. J., Fridrikh, S. V., Rutledge, G. C., & Kaplan, D. L. (2002). Electrospinning Bombyx mori silk with poly (ethylene oxide). *Biomacromolecules*, 1233-1239.
- Jin, H., Chen, J., Karageorgiou, V., & Altman, G. (2004). Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats. *Biomaterials*, vol. 25, 1039–1047.
- Jin, H., Fridrikh, S., Rutledge, G., & Kaplan, D. (2002). Electrospinning Bombyx mori silk with poly (ethylene oxide). *Biomacromolecules*, vol. 3, no. 6, 1233–1239.
- Jones, K. (2003). Review of Sangre de Drago (Croton lechleri)—A South American Tree Sap in the Treatment of Diarrhea, Inflammation, Insect Bites, Viral Infections, and Wounds: Traditional Uses to Clinical Research. *The Journal of alternative and complementary medicine*, 878-892.
- Jones, K. (2003). Review of Sangre de Drago (Croton lechleri)—A South American Tree Sap in the Treatment of Diarrhea, Inflammation, Insect Bites, Viral Infections, and Wounds: Traditional Uses to Clinical Research. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 877-896.
- Jones, V., Grey, J. E., & Harding, K. G. (2006). Wound dressings. *Br. Med. J.* 332, 777.
- Kaplan, D. (1994). Silk Polymers. *An American Chemical Society Publication, University of Michigan*.

- Khil, M., Cha, D., Kim, H., Kim, I., & Bhattari, N. (2003). Electrospun nanofibrous polyurethane membrane as wound dressing. *Biomed. Res.* 67B, 675-679.
- Ki, C., Baek, D., Gang, K., Lee, K., Um, I., & Park, Y. (2005). Characterization of Gelatin Nanofiber Prepared from Gelatin–Formic Acid Solution. *Polymer*, 46, 5094.
- Kidoaki, S., Kwon, I., & Matsuda, T. (2005). Mesoscopic spatial designs of nano and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials*. 26, 37-46.
- Kim, K., Luuc, Y., Chang, C., Fang, D., Hsiao, B., Chua, B., & Hadjiargyrou, M. (2004). Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide) based electrospun nanofibrous scaffolds. *J. Control Release*. 98, 47-56.
- Kim, S. H., Nam, Y. S., Lee, T. S., & Park, W. H. (2003). Silk fibroin nanofiber. Electrospinning, properties, and structure. *Polym. J.* 35, 185-190.
- Kim, U., Park, J., Kim, H., Wada, M., & Kaplan, D. (2005). Three dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials*. 26, 2775-2785.
- Krishnappa, R., Desai, K., & Sung, C. (2003). Morphological study of electrospun polycarbonates as a function of the solvent and processing voltage. *J. Mater. Sci.* 38, 2357-2365.
- Kundu, J., Dewan, M., Ghoshal, S., & Kundu, S. (2008). Mulberry non-engineered silk gland protein vis- à-vis silk cocoon protein engineered by silkworms as biomaterial matrices. *Mater. Sci. Mater. Med.* 19, 2679–2689.
- Kundu, S. C. (2014). *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Boston, USA: Elsevier.
- Kundu, S., Kundu, B., Talukdar, S., Bano, S., Nayak, S., Kundu, J., . . . Ghosh, A. (2012). Invited review nonmulberry silk biopolymers. *Biopolymers*. 97, 455–467.
- Laity, P. R., Gilks, S. E., & Holland, C. (2015). Rheological behaviour of native silk feedstocks. *Polymer* 67, 28-39.
- Lee, Y. (1999). 'Characteristics of the cocoon. Silk reeling and testing manual', In Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. *FAO Agricultural Services, Bulletin no. 136*, Chapter 2.
- Li, D., Wang, Y., & Xia, Y. (2003). Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays. *Nano Lett.*, 1167.
- Li, W., Caterson, E., Tuan, R., & Ko, F. (2012). Electrospun Nanofibrous Structure a Novel Scaffold for Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res*, 60, 613.

- Lionelli, G. T., & Lawrence, T. W. (2003). Wound dressings. *Surg. Clin. North Am.* 83, 617.
- Lobardo, J. (1994). *Diccionario Médico*. España: Ediciones Doyna. Pág. 400.
- Lojan, L. (1992). *El Verdor de los Andes: Arboles y Arbustos Nativos para el desarrollo Forestal Alto andino*. Quito, Ecuador.
- Marcelo, A. J., Calderon, C., Medina, D., Valencia, M., Pariona, M., & Meza, M. (1999). *Desarrollando Nuestra Diversidad Biocultural "Sangre de grado" y el Reto de su Producción Sustentable en el Perú*. Lima: Gráficos S.R . Ltd.
- Martin, P. (1997). Wound healing-Aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.
- Maus, R., Goppelsroder, A., & Umhauer, H. (1997). Viability of bacteria in unused air filter media. *Atmos. Environ.* 31, 2305-2310.
- Megelski, S., Stephens, J., Chase, D., & Rabolt, J. (2005). Micro and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules.* 37, 8456-8466.
- Meinel, L., Hofmann, S., Karageorgiou, V., Kirker-Head, C., McCool, J., Gronowicz, G., . . . Kaplan, D. K. (2005). The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials* 26, 147.
- Milla, M. (2009). Estudio sobre el mecanismo de acción del principio activo taspina de sangre de grado. *Tesis. Universidad Peruana Cayetano*.
- Min, B., Lee, G., Kim, S., Nam, Y., Lee, T., & Park, W. (2004). Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials.* 25, 1289.
- Ministerio de Salud Pública. (2012). *Prevención Úlceras por Presión Versión 2.0*. Bogotá, Colombia.
- Minoura, N., Tsukada, M., & Nagura, M. (1990). Fine-structure and oxygen permeability of silk fibroin membrane treated with methanol. *Polymer.* 31, 265-269.
- Mobini, S., Solati-Hashjin, M., Peirovi, H., Azuan Abu Osman, N., Gholipourmalekabadi, M., Barati, M., & Samadikuchaksaraei, A. (2012). Bioactivity and Biocompatibility Studies on Silk-Based scaffold for Bone Tissue Engineering. *Journal of Medical and Biological Engineering* 33, 207-2014.
- Motta, A., Fambri, L., & Migliaresi, C. (2002). Regenerated silk fibroin films: thermal and dynamic mechanical analysis. *Macromolecular Chemistry and Physics.* 203, 1658-1665.

- Murphy, A. R., & Kaplan, D. L. (2009). Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *J Mat Chem*, 6443–6450.
- Murphy, C., & O'Brien, F. (2014). Cell Adhesion and Migration. USA.
- Niklason, L. (2000). Engineering of bone grafts. *Nature Biotechnol.* 18, 929-930.
- Nuansing, W. (2014). *Tesis: Electrospinning of Biomolecules*.
- O'Reilly, G., Cameron, P., & Joshipura, M. (2012). Global trauma registry mapping: a scoping review. *Injury* 43(7), 1148–1153.
- Ohgo, K., Zhao, C., Kobayashi, M., & Asakura, T. (2002). Preparation of non-woven nanofibers of Bombyx mori silk, Samia cynthiaricini silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method. *Polymer* 44, pp.841-845.
- Omenetto, F., & Kaplan, D. L. (2010). 'New opportunities for an ancient material. *Science*. 329, 528-531.
- Percival, N. (2002). Classification of wounds and their management. *Surgery (Oxford)* 20(5), 114–117.
- Persinos-Perdue, G., Blomster, R. N., Blake, D. A., & Farnsworth, N. R. (1979). South American Plants II: Taspine isolation and anti-inflammatory activity. *J. Pharm. Sci.* 68, 124-126.
- Petr, K. (2013). *Quantitative data processing in scanning probe microscopy. SPM Applications for Nanometrology*. USA: ELSEVIER.
- Pieters, L., De Bruyne, T., Claeys, M., Vlietinck, A., Calomme, M., & Vanden, D. (1993). Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from south American dragon's blood (croton ssp) as an inhibitor of cell proliferation. *J. Natural Products*, 899-906.
- Polymer Properties Database*. (9 de Febrero de 2018). Obtenido de Flow Properties of polymers: Time-independent fluids: polymerdatabase.com
- Porras-Reyes, B. H., Lewis, W. H., Roman, J., Simchowit, L., & Mustoe, T. A. (1993). Enhancement of wound healing by the alkaloid taspine defining mechanism of action. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 203, 18-25.
- Proksch, E., Bradner, J., & Jensen, J. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol* 17(12), 1063–1072.
- Radhakrishnan, S., Lakshminarayanan, R., Madhaiyan, K., Barathi, V., Chin, K., & Radhakrishnan, S. (2013). Electrospayed nanoparticles an electrospun nanofiber based on natural materials: applications in tissue regeneration, drug delivery and pharmaceutic.

- Rahmani, M., Arbabi Bidgoli, S., & Rezayat, S. (2017). Electrospun polymeric nanofibers for transdermal drug delivery. *Nanomed. J.* 4, 63.
- Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.-E., Lim, T.-C., & Ma, Z. (2005). *An Introduction to electrospinning and nanofibers*. Singapur: World Scientific.
- Ramos, A. (2010). *Electrokinetics and Electrohydrodynamics in Microsystems*.
- Reneker, D. H., & Chun, I. (1996). Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology.* 7, 216-223.
- Riboldia, S., Sampaolesib, M., Neuenschwander, P., Cossub, G., & Manteroa, S. (2005). Electrospun degradable polyester urethane membranes: potential scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomaterials*, 26, 4606-4615.
- Risco, E., Iglesias, J., & Cañigüeral, S. (2001). Interés Terapéutico del látex de Croton Lechleri. 12vo. *Forum de Natura Rerum*, 1.
- Rockwood, D., Preda, R., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M., & Kaplan, D. (2011). Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. Protocol. *Nature Protocols Vol6.*, 1612-1632.
- Roper, D., & Lightfoot, E. (1995). Separation of biomolecules using adsorptive membranes. *Chromatogra A*, 3-26.
- Rukta, J., Apodaca, G., Stern, R., & Rosenblum, M. (1988). The extracellular matrix of the central and peripheral nervous system: structure and function. *J. Neurosurg.* 69, 155-170.
- Sakabe, H., Ito, H., Miyamoto, T., Noishiki, Y., & Ha, W. (1989). In vivo blood compatibility of regenerated silk fibroin. *Sen-i Gakkaishi* 45, 487-490.
- Sandoval, M., Ayala, S., Oré, R., Loli, A., Huamán A, Valdivieso, R., & Béjar, E. (2006). Capacidad antioxidante de la sangre de grado (Croton palanostigma) sobre la mucosa gástrica, en animales de experimentación. *An. Fac. Med.*, ISSN 1025 – 5583.
- Santin, M., Motta, A., Freddi, G., & Cannas, M. (1999). In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J. Biomed. Mater. Res.* 46, 382–389.
- Schneider, A., Wang, X., Garlick, J., Garlick, J., & Egles, C. (2009). Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing. *Acta Biomater.* 5, 2570–2578.
- Schneider, A., Wang, X., Kaplan, D., Garlick, J., & Egles, C. (2009). Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing. *Acta Biomaterialia*, vol. 5, no. 7, 2570–2578.

- Sen, C., Gordillo, G., & Roy, S. (2009). Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen.* 17(6), 763–771.
- Sill, T. J., & Von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Biomaterials*, 29.
- Singer, A. J., & Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 341, 738-746.
- Skorkowska-Telichowska, K., Czemplik, M., & Kulma, A. (2011). The local treatment and available dressings designed for chronic wounds. *J. Am. Acad. Dermatol.* 68, 117.
- Smith, L. A., & Ma, P. X. (2004). Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 39, 125-131.
- Sugihara, A., Sugiura, K., Morita, H., Ninagawa, T., Tubouchi, K., Tobe, R., . . . Ikehara, S. (2000). Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds. *Proc Soc Exp Biol Med.* 225, 58-64.
- Tan, E., & Lim, C. (2004). Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber. *Biomaterials.* 26, 1453-1456.
- Teo, W., & Ramakrishna, S. (2006). A Review on Electrospinning Design and Nanofiber Assemblies. *Nanotechnology*, R89, 17.
- Terai, H., Yamano, Y., & Vacanti, J. (2002). In vitro engineering of bone using a rotational oxygen-permeable bioreactor system. *Mater. Sci. Eng.C.* 20, 3-8.
- Torres, A. L., Gaspar, V. M., Serra, I. R., Diogo, G. S., Fradique, R., & Silva, A. P. (2013). Bioactive polymeric–ceramic hybrid 3D scaffold for application in bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C.* 33, 4460-4469.
- Unger, R. E., Wolf, M., Peters, K., Motta, A., Migliaresi, C., & Kirkpatrick, C. J. (2004). Growth of human cells on a non-woven silk fibroin net: a potential for use in tissue engineering. *Biomaterials*, 25, 1069-1075.
- Vaisber, A., & Millan, J. (1989). *Taspine in the Cicatrizant Principle in Sangre de Grado Extracte from (Croton lechlerii)*. Córdoba. Argentina: Plantas M.C Vol. 5.
- Vaisberg, A. J., Milla, M., del Carmen Planas, M., Cordova, J. L., de Agusti, E. R., Ferreyra, R., . . . Hammond, G. B. (1989). Taspine is the cicatrizant principle in sangre de drago extracted from Croton lechleri. *Planta Med.* 55, 140-143.
- Valente, J. F., Valente, T. A., Alves, P., Ferreira, P., Silva, A., & Correia, I. J. (2012). Alginate based scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C.* 32, 2596-2603.

- Venugopal, J., Ma, L., & Ramakrishna, S. (2005). Biocompatible nanofiber matrices for engineering dermal substitute for skin regeneration. *Tissue Engineering*.
- Vepari, C., & Kaplan, D. L. (2007). Silk as a biomaterial. *Prog Polym Sci*, 32, 991–1007.
- Voet, D., & Voet, J. (2004). *Bioquímica 3ra. edición*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Vos, T., Barber, R., & Bel, B. (2015). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 386(9995), 743–800.
- Wang, X., Rajkhowa, R., & Tsuzuki, T. (2010). Recent Innovations in Silk Biomaterials. *Biomaterials Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*, 202-213.
- Wang, Y., Kim, H. J., Vunjak-Novakovic, G., & Kaplan, D. (2006). Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*. 27, 6064-6082.
- Weller, C., & Sussman, G. (2006). Wound Dressings Update. *J. Pharm. Pract.* 6, 318.
- Wharram, S. E., Zhang, X., Kaplan, D. L., & McCarthy, S. P. (2010). 'Electrospun silk material systems for wound healing. *Macromolecular Bioscience*, vol. 10, no. 3, 246–257.
- Wharram, S., Zhang, X., Kaplan, D., & McCarthy, S. (2010). Electrospun silk material systems for wound healing. *Macromol. Biosci.* 10, 246–257.
- Wong, Y., Kim, H. J., Vunjak-Novakovic, G., & Kaplan, D. L. (2006). Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*. 27, 6064-6082.
- Wray, L., Hu, X., & Kaplan, D. (2011). Effect of processing on silk-based biomaterials: reproducibility and biocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* published online doi:10.1002/jbm.b.31875.
- Wray, L., Hu, X., Gallego, J., Georgakoudi, I., Omenetto, F., Schmidt, D., & Kaplan, D. (2011). Effect of processing on silk-based biomaterials: reproducibility and biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 99, 89–101.
- Xu, X., Zhang, J., & Fan, Y. (2010). *Biomacromolecules*, 2283-2289.
- Yannas, I. V. (1992). Tissue regeneration by use of collagen-glycosaminoglycan copolymers. *Clin. Mater.* 9, 179-187.
- Yuan, X., Zhang, Y., Dong, C., & Sheng, J. (2004). Morphology of Ultrafine Polysulfone Fibers Prepared by Electrospinning. *Polym. Int* 53, 1704.

- Zahedi, P., Rezaeian, I., Ranaei-Siadat, S. O., Jafari, S. H., & Supaphol, P. (2010). A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymers for Advanced Technologies* 21, 77-95.
- Zamani, M., Prabhakaran, M. P., & Ramakrishna, S. (2013). Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *Int. J. Nanomed.* 8, 2997-3017.
- Zeleny, J. (1914). The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces. *Phys Rev*, 3, 69.
- Zhang, J., Du, S., Kafi, A., Fox, B., Li, J. L., X, Y. L., . . . Wang, X. G. (2013). Surface Energy of Silk Fibroin and Mechanical Properties of Silk Cocoon Composites. *RSC Advances*, 4.
- Zhao, S., Wu, X., Wang, L., & Huang, Y. (2004). Electrospinning of Ethyl-Cyanoethyl Cellulose/Tetrahydrofuran Solutions. *Appl. Polym. Sci.* 91, 242-246.
- Zhou, Y., Yang, D., Chen, X., Xu, Q., Lu, F., & Nie, J. (2008). Electrospun water-soluble carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for skin regeneration. *Biomacromolecules* 9, 349-354.
- Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao, B., & Chu, B. (2002). Structure and Process Relationship of Electrospun Bioabsorbable Nanofiber Membranes. *Polymer*, 43, 4403.