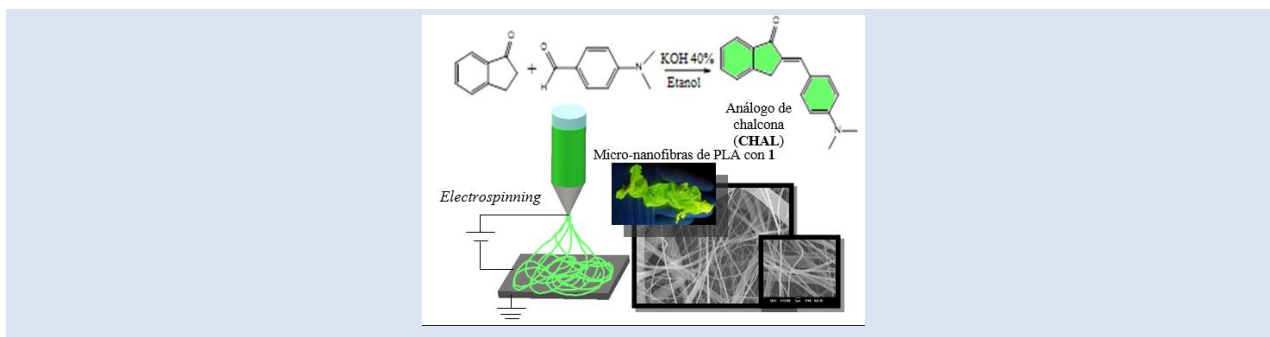


MICRO-NANOFIBRAS DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO) FABRICADAS POR ELECTROSPINNING Y ENCAPSULACIÓN DE 2-[(E)-4-(DIMETILAMINO)BENZILIDENO)]INDAN-1-ONA

Jesús Campos Pacheco^{1*}, Liliana Hurtado¹, Neudo Urdaneta², Antônio José Cantanhede Filho³, Railda Neyva Moreira Araújo⁴, Marcos A. Sabino^{1**}

1: Grupo B5IDA, Departamento de Química. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. 2: Laboratorio de Síntesis Orgánica, Departamento de Química. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. 3: Instituto Federal do Maranhão, IFMA, Departamento Acadêmico de Química, Campus Monte Castelo, São Luis, Maranhão –Brasil. 4: Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil.

email: *jecp.usb@gmail.com, **msabino@usb.ve



RESUMEN

En este trabajo se presenta la encapsulación del análogo de chalcona 2-[(E)-4-(dimetilamino)benzilideno]indan-1-ona (compuesto fluorescente) en micro-nanofibras de poli(ácido láctico) (PLA), con fines de investigar en el desarrollo de biomateriales y/o andamios para ingeniería de tejidos. Este análogo de chalcona (CHAL) fue sintetizado mediante la reacción de condensación de Claisen-Schmidt en medio básico, y fue caracterizado por espectroscopía FT-IR y RMN. El análisis de biocompatibilidad de CHAL con eritrocitos humanos indicó que este compuesto puede ser considerado no hemolítico hasta una concentración de 500 μ M. La fabricación de las micro-nanofibras de PLA (cargadas con CHAL) fue realizado mediante la técnica de electrospinning. Las condiciones óptimas del proceso de electrospinning fueron: voltaje de 15 kV, distancia punta-colector de 13 cm, concentración de la solución polimérica de 12,5 % P/V a 23 °C. La caracterización morfológica de las fibras fue realizada mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Las fibras cargadas con CHAL a concentraciones de 10, 20 y 50 μ g/mg presentaron una distribución de tamaño dentro de la escala micrométrica a 5-9 μ m, mientras que las microfibras de PLA se encontraban en un intervalo ligeramente menor de 3-5 μ m. Se demostró que la encapsulación de CHAL induce una modificación morfológica sobre las fibras de PLA, donde incluso se observó la formación de gotas dentro de las mallas. Además, se demostró mediante MEB que se lograron obtener nanofibras que presentaron tamaños menores a 200 nm y una rugosidad superficial apreciable, lo cual es relevante para pensar en la biomimetización de matriz extracelular (ME) en ingeniería tisular. Finalmente, se comprobó un alto porcentaje de rendimiento de encapsulación de CHAL (mayor al 95 %) mediante espectrofotometría UV-visible, y se evidenció el carácter fluorescente que poseen las mallas cargadas con este análogo de chalcona.

Palabras Claves: Chalcona, Poli(ácido láctico), Micro-nanofibras, Electrospinning.

MICRO-NANOFIBERS OF POLY(LACTIC ACID) FABRICATED BY ELECTROSPINNING AND ENCAPSULATION OF 2-[(E)-4-(DIMETHYLAMINE)BENZYLIDENE]INDAN-1-ONE

ABSTRACT

In this work the encapsulation of a chalcone analogue (2-[(E)-4-(dimethylamine)benzylidene]indan-1-one) in micro-nanofibers of poly(lactic acid) (PLA) is presented. The purpose is to investigate the development of potential biomaterials or scaffolds for tissue engineering. This chalcone analogue (CHAL) was synthesized by Claisen-Schmidt condensation in basic medium and was characterized by FT-IR and NMR spectroscopy. The biocompatibility analysis of CHAL with human erythrocytes indicated that this compound can be considered non-hemolytic up to a concentration of 500 μ M. The fabrication of PLA micro-nanofibers (loaded with CHAL) was carried out using the electrospinning technique. The optimal conditions of the electrospinning process were: voltage of 15 kV, tip-collector distance of 13 cm, concentration of polymer solutions of 12.5 % w/V at 23 °C. The morphological characterization of the fibers was realized by scanning electron microscopy (SEM). Fibers loaded with CHAL at concentrations of 10, 20 and 50 μ g/mg presented a representative size distribution in the micrometric scale at 5-9 μ m, while PLA microfibers were mostly in the 3-5 μ m range. It was demonstrated that the encapsulation of CHAL induces a morphological modification on the PLA fibers; even, the formation of drops inside the scaffolds was observed. As well, we proved by SEM the formation of nanofibers with diameter sizes smaller than 200 nm and an appreciable surface roughness. These results are interesting to think about the biomimetization of extracellular matrix (EM) for tissue engineering. Finally, a high percentage of encapsulation yield of CHAL (>95 %) was verified by visible UV spectrophotometry, and the fluorescent character of the structures loaded with this chalcone analogue was evidenced.

Keywords: Chalcone, Poly(lactic acid), Micro-nanofibers, Electrospinning.

1. INTRODUCCIÓN

La chalcona, 1,3-difenil-2-propen-1-ona, es una cetona α , β -insaturada que consta de dos anillos aromáticos interconectados por el grupo $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-$ (sistema carbonilo α , β -insaturado altamente electrofílico), cuya estructura es lineal o casi planar [1]. Los estudios biológicos contemporáneos reportan un amplio espectro de actividades farmacológicas para los derivados o análogos de chalcona, que incluyen efectos antibióticos [2], antiinflamatorios [3], antidiabéticos [4] y antitumorales [5]. Más allá del potencial farmacológico que pueden aportar las chalconas, su estructura química planar (con alta conjugación de electrones π) puede absorber fotones de longitudes de onda en la región del ultravioleta visible, lo cual amplía su potencial aplicación en otras áreas como terapia fotodinámica y fluorescencia. Las chalconas en este sentido han sido estudiadas como marcadores fluorescentes de proteínas, membranas biológicas y lipoproteína [6,7].

Las investigaciones realizadas sobre el núcleo chalcona refieren precisamente al compuesto libre. La innovación científica de este trabajo radica entonces en explorar el encapsulamiento de este tipo de estructuras en una matriz polimérica, específicamente, en fibras de poli (ácido láctico): PLA. El interés en el poli (ácido láctico) puede sustentarse en el hecho de que es un poliéster lineal biodegradable, donde la rapidez de su degradación depende de la relación de su morfología amorfo/semicristalino y de su masa molar inicial; así como del pH del medio donde se someta a su degradación [8]. También el PLA puede ser considerado biocompatible y biodegradable en organismos vivos, lo que permite a este polímero tener una versátil aplicación para la regeneración de tejidos [9], y puede ser obtenido en diferentes formas como fibras [10], partículas [11], andamios [12], usado en impresión 3D [13], biofabricación [14], etc.

Cuando los diámetros de una fibra polimérica se encuentran por debajo de un micrómetro se considera una nanofibra, y esto permite que sobresalgan relevantes características como alta área superficial, flexibilidad, funcionalidad de la superficie y un superior desempeño mecánico [15-17]. En cuanto al área superficial y biodegradabilidad que puedan presentar las micro/nanofibras de PLA, esto les confiere una

primera ventaja de servir como mejor soporte para reparar un tejido dañado, debido a que la función del biomaterial es crear un ambiente óptimo para que las células lleven a cabo sus procesos de adhesión, proliferación y diferenciación. Como segunda ventaja, el biomaterial tiene la posibilidad de ser excretado del organismo después del tiempo establecido para la terapia [18].

Dentro de los métodos actualmente empleados para la obtención de fibras poliméricas se destaca la técnica de electrospinning. En el proceso de electrospinning (Figura 1), el polímero en solución dentro de un reservorio es sostenido por su tensión superficial y luego de ser sometido al campo eléctrico (de alto voltaje), una carga eléctrica es inducida en su superficie. Cuando el campo eléctrico alcanza un valor crítico, las fuerzas eléctricas repulsivas superan las fuerzas de tensión superficial, iniciando el proceso de hilado del polímero con la consiguiente formación del cono de Taylor. El solvente es evaporado durante el recorrido de los hilos poliméricos desde la punta del tubo capilar hacia el colector metálico, resultando así en una disposición aleatoria de las fibras sobre el colector. Además, los parámetros que afectan la morfología de las micro/nanofibras son: viscosidad, masa molar y concentración del polímero, voltaje aplicado, distancia entre la punta y el colector, entre otros [15,19,20]. La disposición final de fibras posee un carácter biomimético que puede simular las estructuras construidas por una araña: un entramado de hilos que poseen una alta conectividad y rigidez [21].

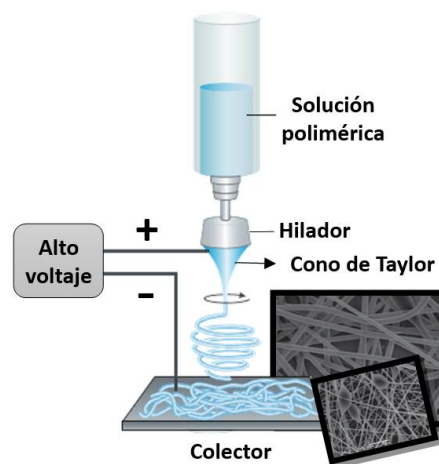


Figura 1. Técnica de *electrospinning*: formación de fibras poliméricas

El propósito este trabajo es el estudio del encapsulamiento de un compuesto análogo de chalcona dentro de una matriz polimérica de PLA que biomimetiza una matriz extracelular usando la técnica de *electrospinning*. En este sentido, se estudiaron los parámetros morfológicos de las mallas 3D de PLA y destacar las posibles diferencias que pueden presentarse en la morfología de dichas mallas una vez incorporado el compuesto 2-[(*E*)-4-(dimetilamino)benzilideno]indan-1-ona (CHAL) (Figura 2). La importancia de este compuesto es dar una propuesta en el proceso de encapsulación de fármacos claves en el tratamiento de una afección tisular como son los antibióticos y antiinflamatorios.

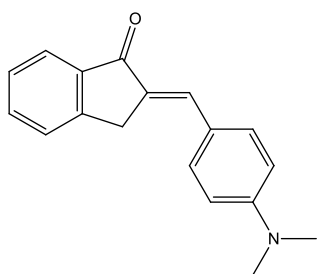


Figura 2. Estructura de 2-[(*E*)-4-(dimetilamino)benzilideno]indan-1-ona (CHAL).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiales y equipos

Los compuestos 1-indanona y 4-dimetilamino-benzaldehído fueron obtenidos de los proveedores Sigma-Aldrich y Riedel-de Haën, respectivamente. El poli (ácido láctico) PLA fue obtenido de Nature Works. Los solventes orgánicos utilizados eran de grado analítico. La medición del punto de fusión de CHAL se realizó con un fusímetro MEL-TEMP. La naturaleza amorfa del PLA fue evaluada mediante calorimetría diferencial de barrido usando un equipo DSC-7 Perkin Elmer. Condiciones de ensayo: 5 mg de muestra, velocidad de estudio de 20°C/min entre 25°C-200°C. Este resultado no es presentado aquí, pero el termograma DSC del PLA usado no presentó ninguna evidencia de cristalización (T_c) o de fusión (T_f), solo la transición vítrea T_g alrededor de ~ 70°C.

2.2 Síntesis de 2-[(*E*)-4-(dimetilamino)benzilideno]indan-1-ona

La síntesis de CHAL se fundamentó en la reacción

de condensación de Claisen-Schmidt [22]. Se mezclaron 2 mmol (264 mg) de 1-indanona y 2 mmol (298 mg) de 4-dimetilamino benzaldehído en medio básico (KOH al 40 % en etanol). El producto obtenido fue recristalizado en etanol.

2.2.1 Caracterización de CHAL

El compuesto orgánico sintetizado fue caracterizado usando un espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) Thermo Scientific, Nicolet iS10 (en pastilla de KBr), un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Varian de 300 MHz modelo MERCURY-300 (referencia interna: TMS tetrametilsilano; solvente: $CDCl_3$). La caracterización morfológica de CHAL se realizó empleando un microscopio electrónico de barrido (MEB) JEOL JSM6390 a 25 KV; el pretratamiento de las muestras con oro/paladio antes de visualizarse en el MEB se realizó con un equipo de metalización *sputter-coater* Blazers-SCD-030.

2.2.2 Ensayo de hemocompatibilidad de CHAL

Se realizó la determinación de la fragilidad osmótica de los eritrocitos humanos al estar en contacto con el compuesto en estudio, lo cual es una evidencia de la hemocompatibilidad de cualquier compuesto en presencia de fluido sanguíneo [9]. El primer paso fue la recolección de la sangre de un voluntario humano sano. La sangre recolectada y anticoagulada con citrato sódico se centrifugó a 2000 rpm para separar el plasma, la cantidad de plasma retirada se sustituyó por una solución de NaCl 0,9 % y se volvió a centrifugar, este procedimiento se realizó tres veces más. Los eritrocitos lavados se almacenaron a 4 °C y se emplearon en los experimentos dentro de las primeras cuatro horas posteriores a la extracción.

Se preparó una solución de buffer fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés) al 0,9 % para disolver el compuesto y emplearse como control negativo. Una solución de Triton X-100 (1% v/v) se empleó como control positivo y para la solución madre de CHAL se utilizó DMSO (Dimetilsulfoxido) al 1% v/v. Las concentraciones de CHAL fueron 100-500 mM. Las muestras se colocaron en *eppendorf* 200 μ L junto con 800 μ L de una suspensión de eritrocitos al 2,5%. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 45 minutos, luego se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos y se midió la absorbancia a 540 nm. El porcentaje de hemólisis se determinó por medio de la siguiente ecuación (1) [20].

$$\%EE = \frac{\text{absorbancia muestra} - \text{absorbancia PBS}}{\text{absorbancia Triton} \times 100 - \text{absorbancia PBS}} \times 100 \quad (1)$$

2.3 Encapsulación de CHAL en fibras de PLA por electrospinning

Se preparó 5 ml de la solución polimérica de PLA a una concentración del 12,5 % P/V , disolviendo $(0,6250 \pm 0,0001)$ g de PLA en cloroformo mediante agitación magnética, y aforado a un volumen de $(5,000 \pm 0,025)$ ml. Las soluciones poliméricas de PLA que contienen a CHAL fueron preparadas usando las siguientes relaciones: 10, 20 y 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (compuesto fluorescente/PLA). La concentración de PLA en cloroformo fue 12,5 % P/V .

El aparato de *electrospinning* estaba constituido por: un reservorio (inyectora con punta metálica), en el cual descendió la solución polimérica, un colector a base de aluminio, dos electrodos que forman la configuración punta-colector y una fuente de alta tensión en el orden de los kilovoltios (kV) que generó corriente continua. Las condiciones experimentales que permitieron la obtención de las estructuras fluorescentes tipo andamio fueron: aplicación de un voltaje de 15 kV, distancia punta-colector de 13 cm, concentración de la solución polimérica de 12,5 % P/V a 23 °C. Las micro/nanofibras poliméricas obtenidas fueron caracterizadas por MEB, usando las condiciones en 2.2.1

2.3.1 Determinación de la masa molar viscosimétrica del PLA antes y después del proceso de electrospinning

La determinación de la masa molar del PLA se realizó empleando la técnica de viscosimetría capilar, de manera que, fueron preparadas soluciones diluidas de PLA/Cloroformo de 0,8; 0,6; 0,4; 0,2% m/v partiendo de una solución madre de 1% m/v . Se midió el tiempo de caída de cada solución polimérica empleando un cronómetro *hybrid stopwatch*. Con este procedimiento se obtiene la viscosidad intrínseca $[\eta]$ y a partir de allí es posible determinar la masa molar viscosimétrica (M_v) del PLA aplicando la ecuación de Mark-Howink-Sakurada (2).

$$\eta = K \times M_v^a \quad (2)$$

Las constantes viscosimétricas dependen tanto de la relación polímero-solvente como de la temperatura, de modo que, para el caso de estudio PLA/ CHCl_3 los valores de las constantes a 25 °C son: $a=0,777$ y $K=0,0131$ [23].

2.3.2 Determinación de la eficiencia de encapsulación de CHAL

Para conocer la cantidad del compuesto encapsulado en las fibras poliméricas se procedió a disolver una cantidad conocida de fibras en CH_3Cl . Finalizada su disolución, empleando un espectrofotómetro UV-Visible HP Agilent 8452, se midió la absorbancia a 271 y 423 nm que corresponden a los máximos de absorción de CHAL. Luego de conocer la cantidad del compuesto presente en las fibras, y previamente conocida la cantidad de compuesto empleado para su encapsulación, por diferencia se determinó el porcentaje de eficiencia usando la siguiente ecuación (3).

$$\%EE = \frac{\text{Cantidad de chalcona encapsulada}}{\text{Cantidad inicial de chalcona en el sistema}} \times 100 \quad (3)$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis y caracterización de 2-[(E)-4-(dimetilamino)benzilideno]indan-1-ona

El rendimiento de la síntesis de CHAL fue de 83 %. La apariencia del producto fue de un sólido naranja con punto de fusión de 158-159 °C. Mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) se caracterizó el compuesto recristalizado en etanol (Figura 3). Se observaron cristales de tipo laminar, con secciones quebradizas. Bajo las condiciones de recristalización (etanol puro a 24 °C), se obtuvieron tamaños de cristales en un rango de 1-15 μm . Estos tipos de cristales son particulares de los compuestos orgánicos como los derivados de chalcona [24,25].

El análisis por espectroscopia infrarroja FT-IR permitió confirmar el tipo de grupos funcionales que presenta CHAL. El espectro FT-IR (Figura 4) muestra las bandas características de los grupos funcionales: tensión del enlace simple C-N del grupo dimetilamino entre 1293 y 1378 cm^{-1} , tensión de los dobles enlaces conjugados C=C en los anillos aromáticos en el intervalo de 1525 - 1590 cm^{-1} , tensión del grupo carbonilo en 1675 cm^{-1} y la banda

de tensión de los enlaces C-H (alifáticos e insaturados) entre 2847 y 3000 cm^{-1} .

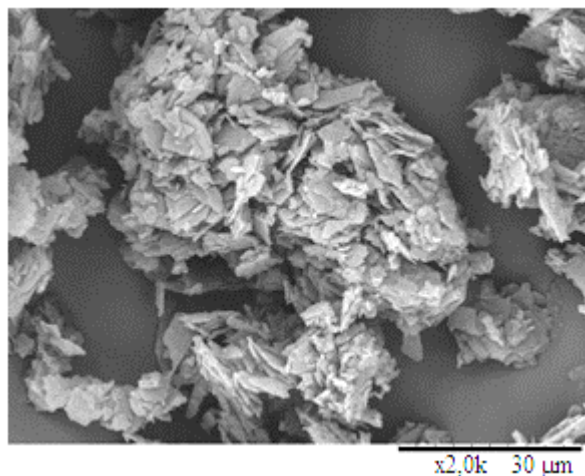


Figura 3. Micrografía (MEB) de CHAL recristalizada

Los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN mostraron las señales de los protones y carbonos que presenta CHAL (Figuras 5 y 6, respectivamente). Señales en el espectro de protones, δ ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 3.04 ppm (6H, 1S, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.99 ppm (2H, 1S, alílicos $-\text{CH}_2-$), 7.55 ppm (1H, 1S, vinílico $=\text{CH}-$) y protones aromáticos ($=\text{CH}-$) en 6.74, 7.40, 7.58, 7.60, 7.63, 7.90 ppm. Señales en el espectro de carbono, δ ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz): 32.7 ppm (carbono de grupo metileno), 40.1 ppm (carbono metílico), carbonos vinílicos (2) y aromáticos (12) en 112-151 ppm, y 194.3 ppm (carbono carbonílico). Los espectros de RMN permitieron realizar una elucidación completa de la estructura orgánica de CHAL. Las asignaciones químicas de los protones y carbonos tienen concordancia con lo reportado en la literatura para compuestos derivados de chalcona [26].

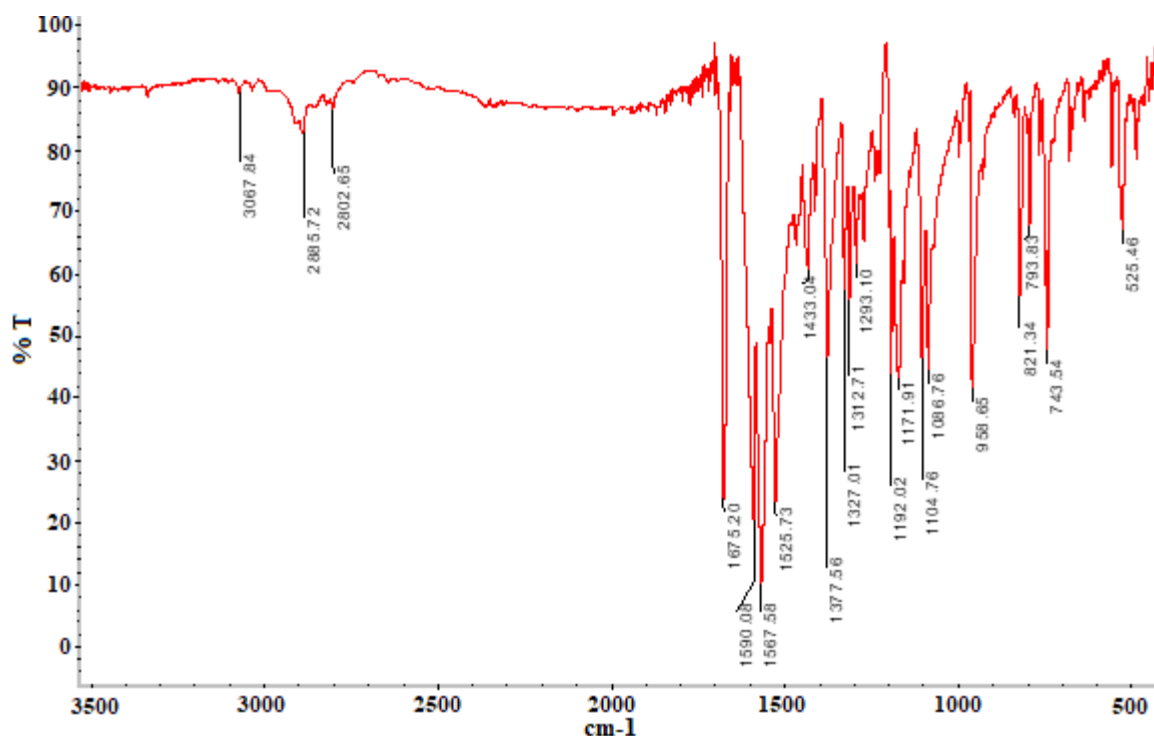


Figura 4. Espectro FT-IR (KBr) de CHAL

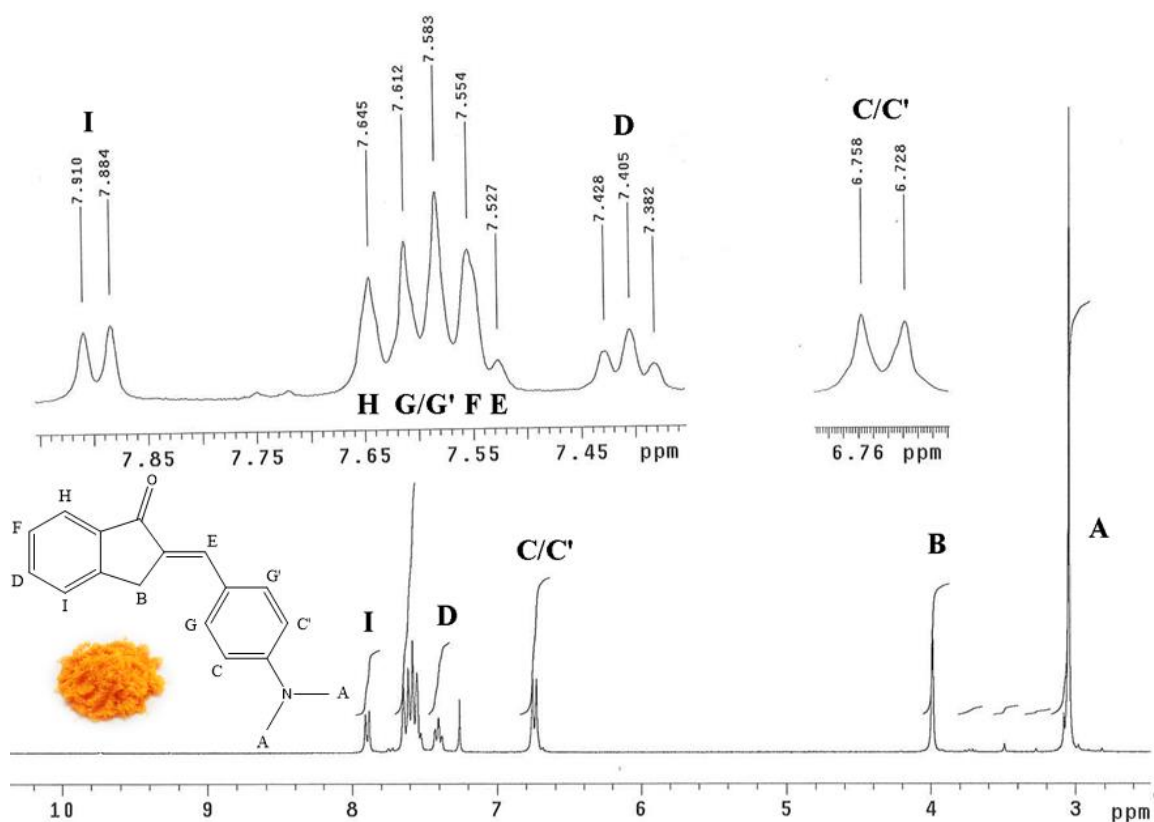


Figura 5. Espectro ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) de CHAL

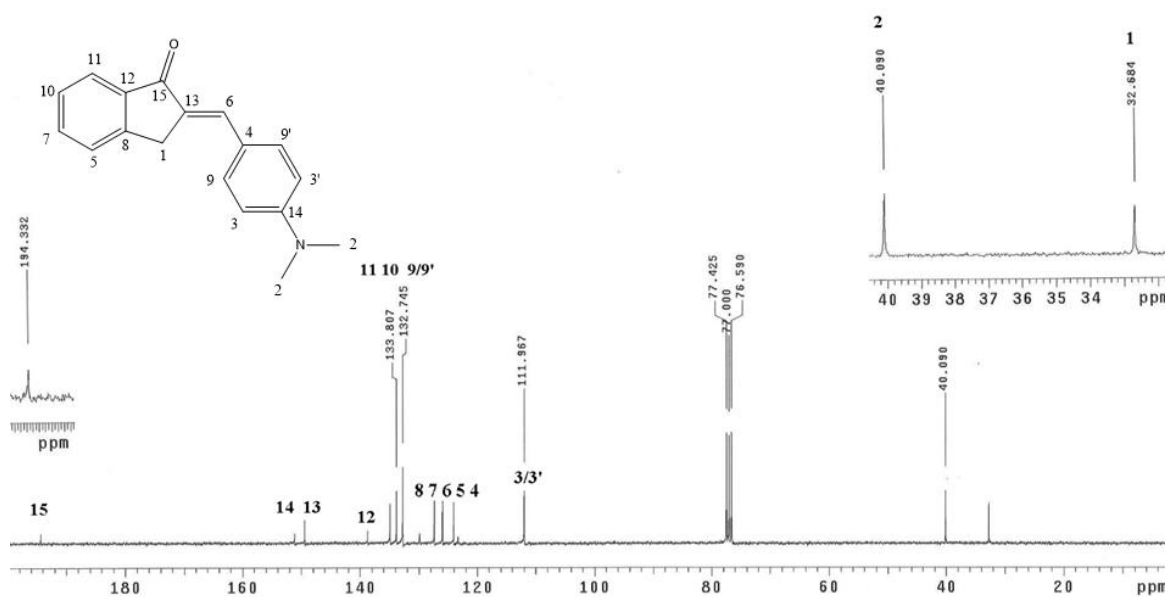


Figura 6. Espectro ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) de CHAL

3.2 Estudio de hemocompatibilidad de CHAL

La prueba de hemocompatibilidad es muy común e importante durante el desarrollo de biomateriales, pues mide la tolerancia del material al estar en contacto directo con un sistema biológico activo como la sangre [27]. Si a través de las células que conforman la sangre, se puede evidenciar algún tipo de respuesta negativa o positiva, entonces, se puede tener una primera evidencia de la biocompatibilidad que tiene ese biomaterial.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, los materiales se pueden clasificar en tres grupos, de acuerdo al porcentaje de hemólisis. Valores superiores al 5% se consideran hemolíticos, mientras que, aquellos con índice hemolítico entre 5% y 2% se clasifican como levemente hemolíticos. Finalmente, cuando el material presenta un porcentaje de hemólisis inferior al 2%, se considera como un material no hemolítico [27]. En base a los resultados aquí obtenidos, el porcentaje de hemólisis para todas las concentraciones estudiadas de CHAL fue inferior al 2% (Figura 7 a), de manera que se puede clasificar como un material no hemolítico. Los resultados visuales de la actividad hemolítica de la CHAL fueron muy similares a la de las células tratadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) como se puede observar en la Figura 7b, y se observa que en caso del control positivo (usando Triton X-100) se tiene la hemólisis total de los eritrocitos, pues se aprecia toda la solución con coloración rojiza.

3.3 Encapsulación de CHAL en fibras de PLA por electrospinning

Primero, fue importante tener una vista general del entramado de fibras de PLA (sin carga), con el fin de determinar posteriormente los cambios (físicos y morfológicos) que pudieran presentarse en la encapsulación de CHAL. En la figura 8 se observan detalles superficiales y se muestra la distribución del diámetro de las fibras de PLA en la escala nano y micrométrica. En la Figuras 9 y 10 se observan las estructuras 3D cargadas con una concentración del compuesto en PLA de 20 y 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente, empleando las mismas condiciones de preparación. De igual manera, se observa la distribución de tamaño de las fibras, y

particularmente se evidencia la fluorescencia de las mallas obtenidas. Esta evidencia mostrada en las figuras permite decir que, efectivamente, durante proceso de electrohilado del PLA, se preservó el carácter fluorescente de la estructura química encapsulada, como era de esperarse según resultados consultados en la literatura para la encapsulación de un compuesto orgánico como la doxorrubicina en fibras de PLA empleando la técnica de *electrospinning* [28].

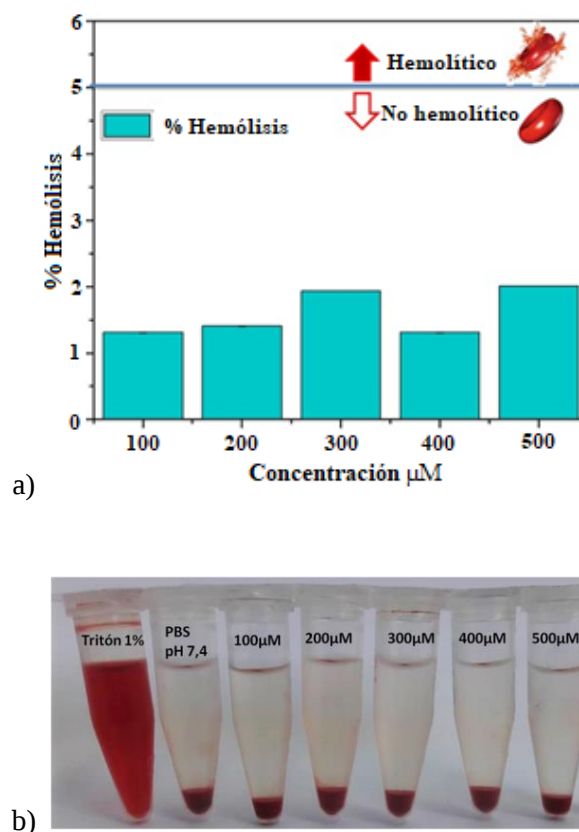


Figura 7. a) Representación gráfica del porcentaje de hemólisis obtenido en eritrocitos humanos tras la incubación por 45 minutos a 37°C a diferentes concentraciones de CHAL (100-500 μM). b) Imagen de los tubos *ependorf* que contienen las diferentes concentraciones de CHAL tras la incubación y luego del proceso de centrifugación.

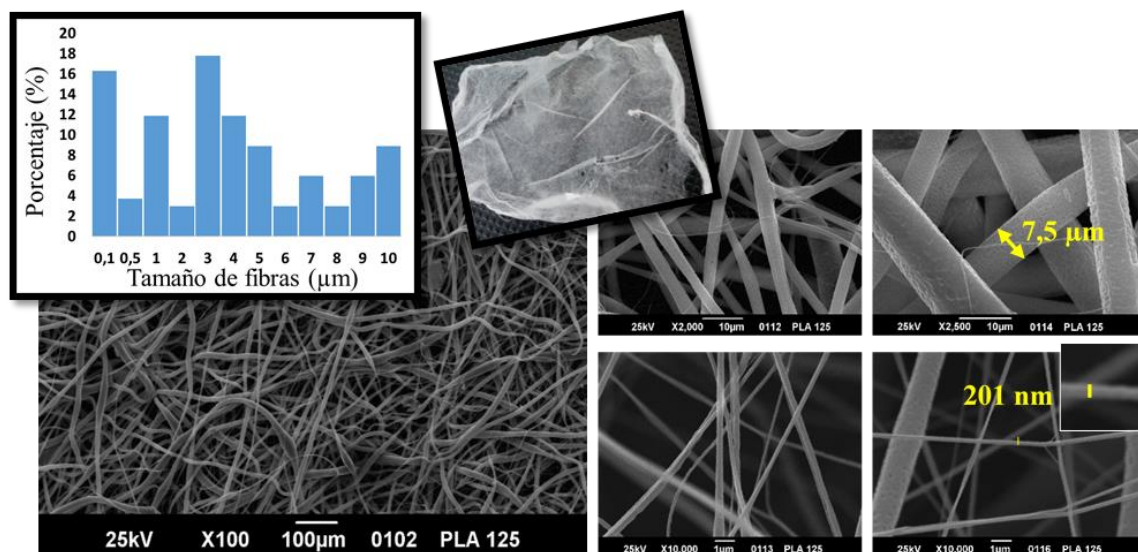


Figura 8. Micrografía (MEB) de la malla obtenida por *electrospinning* usando solo PLA, a C=12,5 % p/v y 15 KV. En la parte superior se muestra un histograma con la distribución de los diámetros de las fibras extraídos de las micrografías.

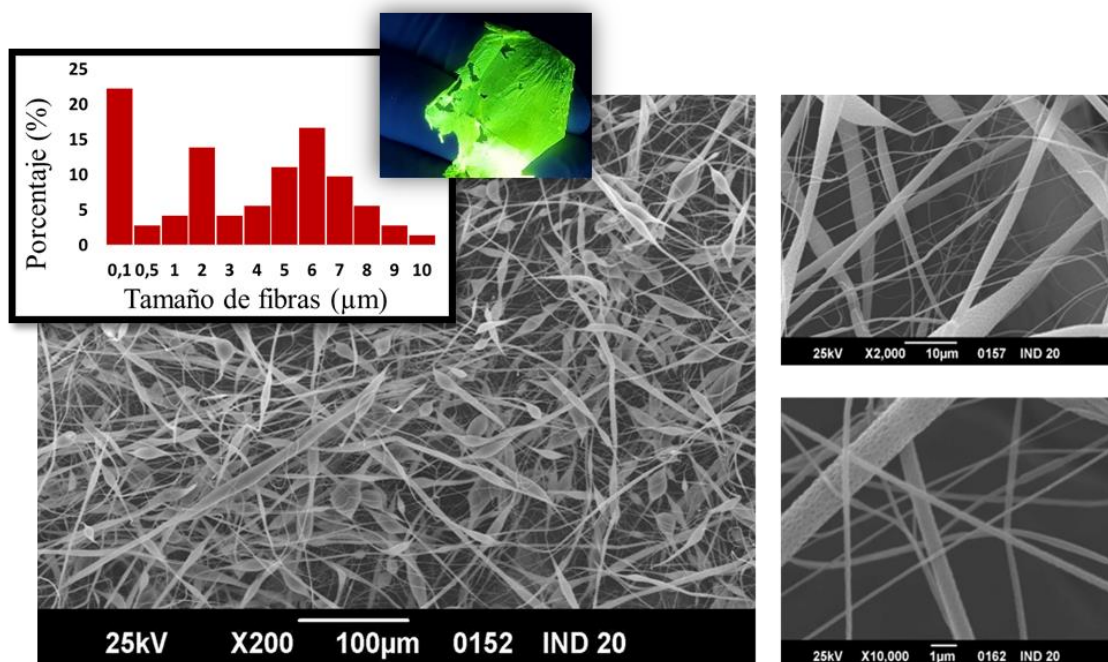


Figura 9. Micrografía (MEB) de la malla con carga obtenida por *electrospinning* a una relación de CHAL en PLA de 20 µg/mg, a una C=12,5 % P/V y 15 KV. En la parte superior se muestra un histograma con la distribución de los diámetros de las fibras extraídos de las micrografías.

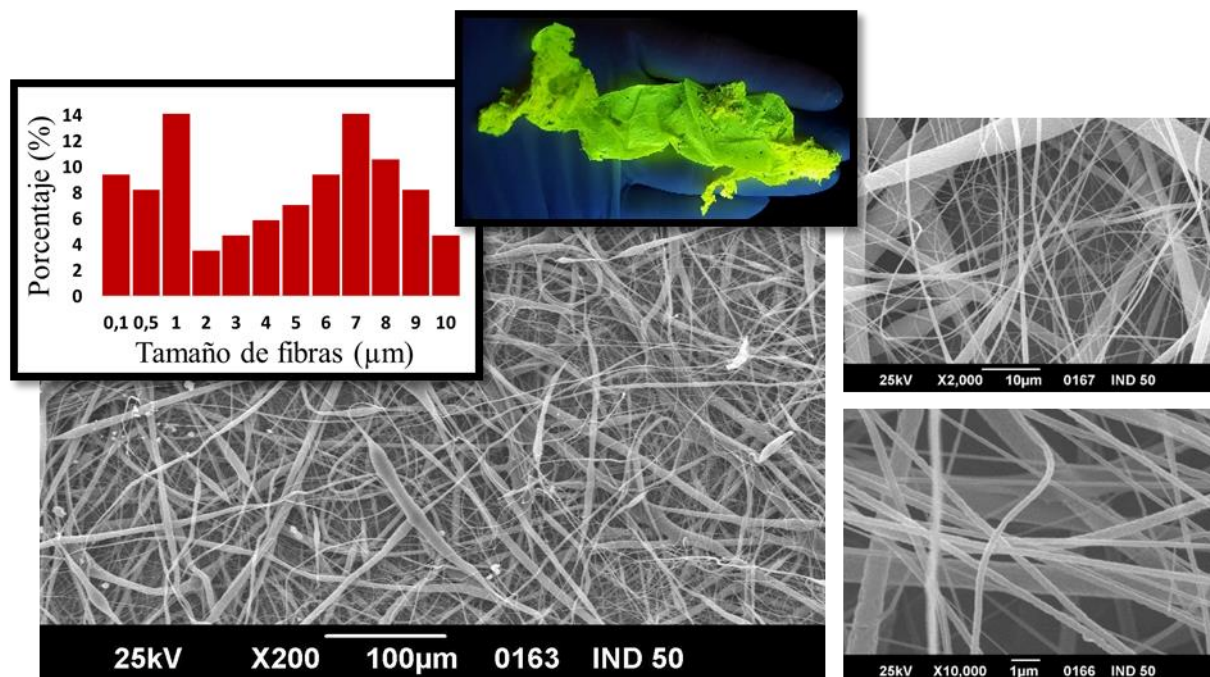


Figura 10. Micrografía (MEB) de la malla con carga obtenida por *electrospinning* a una relación de CHAL en PLA de 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$, a una $C=12,5\% \text{ } P/V$ y 15 KV. En la parte superior se muestra un histograma con la distribución de los diámetros de las fibras extraídos de las micrografías.

Los diámetros observados en las micrografías mostraron que la distribución de tamaño de las fibras de solamente PLA tiene un predominio en la escala nanométrica de 100, 500 y 1000 nm; y de fibras más gruesas en la escala micrométrica de 3-5 μm y 10 μm (Figura 8). Por otro lado, las fibras de PLA cargadas con CHAL a 20 y 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ presentaron entre sí dominios de frecuencia de tamaño de manera importante en la escala micrométrica (5-9 μm), donde se observa entonces que las microfibras presentaron una tendencia a incrementar su diámetro cuando se incorpora el análogo chalcona. Estos resultados sugieren entonces que el compuesto fue debidamente encapsulado [29]. Asimismo, el modo de fabricación de fibras de PLA y PEG (cargadas con fármacos anticancerígenos como la doxorubicina y el paclitaxel), empleando la técnica de *electrospinning*, posee la ventaja de brindar porcentajes de encapsulación mayores al 90 % [30], [31]. En la Tabla 1 se muestra que estos valores de eficiencia fueron mayores al 95 % lo cual representa resultados satisfactorios.

Tabla 1. Eficiencia de encapsulación de CHAL en micro-nanofibras de PLA

Relación de CHAL en PLA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Porcentaje de encapsulación ($\pm 1\%$) ^a
20	98
50	99

a: Determinación realizada por espectrofotometría UV-visible

A partir de las estructuras 3D que se obtienen con la técnica de *electrospinning*, se consigue biomimetizar lo que corresponde a una matriz extracelular, tanto en la distribución de las fibras como en sus diámetros y en su morfología superficial [32-34]. En líneas generales el resultado ideal era obtener un entramado tridimensional de fibras en la escala nanométrica y sin la presencia de gotas dentro de la malla. La obtención de nanofibras en el área de ingeniería de tejidos presenta una propiedad importante que es la alta área superficial, lo cual es muy beneficioso para la adhesión celular, mimetizando así la matriz extracelular. El tamaño de poros en las mallas poliméricas es un factor importante porque dentro de estos poros las células

pueden llevar a cabo procesos de infiltración, migración y proliferación celular, así como también el transporte de fluidos y procesos de vascularización. El control y tamaño de poros es dependiente del diámetro de las fibras [35,36]. Por tanto, con fines de obtener poros de tamaño micrométrico donde las células puedan favorecer procesos de infiltración y migración celular, y adicionalmente promover la degradación del material biomimético, la obtención de microfibras presenta una ventaja interesante. En este sentido, la heterogeneidad en el tamaño de las fibras (con carga y sin carga) puede entonces brindar una estructura 3D que puede biometizar una matriz extracelular la cual presenta fibras proteicas en la escala micro y nanométricas [35].

Referente a otra propiedad morfológica como la rugosidad, se evidencia que este parámetro no presenta una variación importante entre las fibras cargadas y sin carga. La rugosidad superficial observadas en todas las fibras obtenidas es ideal para el cultivo celular, porque favorece el proceso de adhesión de las células sobre el biomaterial. Este efecto rugoso sobre las fibras puede ser atribuido a la rápida evaporación del solvente (cloroformo) durante el viaje de la solución polimérica desde la punta hasta el colector metálico, debido a que este solvente orgánico presenta una alta presión de vapor a temperatura ambiente [15]. Por tanto, la presencia del compuesto no disminuye este factor importante en la morfolología de las fibras.

Por otro lado, a medida que la concentración de CHAL aumenta, se genera mayor cantidad de gotas dentro de las mallas, que pudiesen favorecer el proceso de adhesión celular sobre este tipo de superficie. Además, la formación de gotas sugiere que la solución polimérica podría estar sufriendo una variación en su viscosidad por este hecho, lo cual estaría relacionado con variaciones en el masa molar del polímero base (PLA) usado. Es así como la determinación del masa molar viscosimétrico del PLA antes y después del proceso de *electrospinning* pueden sustentar o descartar dicha hipótesis. Los valores del masa molar viscosimétrico del polímero antes y después de ser sometido a alto voltaje (15 kV) son $9,5 \times 10^4$ y $8,7 \times 10^4$ g/mol, respectivamente. El error asociado a los cálculos está en el orden del 10-15 % de la medida, de modo que, se puede decir que no existió variación en el masa molar del PLA, y que no se presentó un proceso de

depolymerización del polímero bajo las condiciones de estudio con la técnica de *electrospinning*. Continuando la idea anterior, el tipo de morfolología obtenida para las fibras y la formación de gotas dentro de las mallas pudiesen favorecer el proceso de adhesión celular sobre esos tipo de superficies, lo cual es un requisito primordial para la ingeniería de tejidos, así como para el estudio del encapsulamiento de fármacos o biomoléculas necesarias durante el proceso de regeneración de un tejido.

4. CONCLUSIONES

El compuesto 2-[(*E*)-4-(dimetilamino)benzilideno)]indan-1-ona fue sintetizado, y luego encapsulado con un alto rendimiento dentro de estructuras biomiméticas de PLA mediante el proceso de *electrospinning*. Se logró evidenciar que existen diferencias morfológicas entre las fibras cargadas con el compuesto y las fibras de PLA sin carga. Las fibras obtenidas se encontraron en las escala nano y micrométrica, aunque para el caso de las mallas cargadas con el análogo de chalcona, sus diámetros se presentaron mayoritariamente en la escala micrométrica. Asimismo, se obtuvo que estas fibras presentaron una rugosidad superficial relevante para desarrollar a futuro procesos de adhesión celular, facilitando así procesos de proliferación y replicación celular.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Laboratorios de Fotoquímica y Biología, Síntesis Orgánica, Alta Tensión y Análisis Instrumental de la Universidad Simón Bolívar (USB) por su colaboración con materiales y equipos. Se agradece al Laboratorio de Superficies de la USB por los análisis de MEB y al Laboratorio de Farmacología y Toxicología de la USB por los ensayos de hemocompatibilidad. Finalmente, se agrade a la Universidad Federal do Pará, Belém-Brasil, por los análisis de RMN.

6. REFERENCIAS

- [1]. Lim S, Kim H, Lee D. Bulletin of the Korean Chemical Society. 2007; 28: 2495-2497.
- [2]. Božić D, Milenković M, Ivković B, Cirković I.

- Indian Journal of Medical Research, 2014; 140 (1): 130-137.
- [3]. Rücker H, Al-Rifai N, Rasclé A, Gottfried E, Brodziak-Jarosz L, Gerhäuser C, Amslinger S. Organic and Biomolecular Chemistry. 2015; 13 (10): 3040-3047.
- [4]. Hsieh C, Hsieh T, El-Shazly M, Chuang D, Tsai Y, Yen C, Wu S, Chang F. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2012; 22 (12): 3912-3915.
- [5]. Zhang X, Zhao D, Quan Y, Sun L, Yin X, Guan L. Medicinal Chemistry Research. 2010; 19: 403-412.
- [6]. Bakhshiev N, Gularyan S, Dobretsov G, Kirillova A, Svetlichnyi V. Journal of Optics and Spectroscopy. 2008; 104 (5): 732-736.
- [7]. Kamakshi R, Reddy R. Journal of Polymer Science. 2008; 46 (4): 1521-1531.
- [8]. Garlotta D. Journal of Polymers and the Environment. 2001; 9 (2): 63-84.
- [9]. Barbeck M, Serra T, Booms P, Stojanovic S, Najman S, Engel E, Kirkpatrick S, Navarro M, Ghanaati S. Bioactive Materials. 2017; 2 (4): 208-223.
- [10]. Li Y, Teck C, Kotaki M. Polymer. 2015; 56: 572-580.
- [11]. Rancan F, Papakostas D, Hadam S, Hackbarth S, Delair T, Primard C, Verrier B, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Pharmaceutical Research. 2009; 26 (8): 2027-2036.
- [12]. Salerno A, Gutiérrez M, Román J, Domingo C. The Journal of Supercritical Fluids. 2015; 97 : 238-246.
- [13]. Serra T, Timoneda M, Planell J, Navarro M. Organogenesis. 2013; 9 (4): 239-244.
- [14]. Sensini A, Gualandi C, Cristofolini L, Tozzi G, Dicarolo M, Teti G, Mattioli-Belmonte M, Focarete M. Biofabrication. 2017; 9 (1): 1-28.
- [15]. Idalba A, Hidalgo I, Sojo F, Arvelo F, Sabino M. Molecular and Cellular Biomechanics. 2013; 10 (2): 85-105.
- [16]. Liang D, Chu B, Liang D. Advanced Drug Delivery Reviews. 2007; 59: 1392-1412.
- [17]. Bhardwaj N, Kundu S. Biotechnology Advances. 2010; 28: 325-347.
- [18]. Bazile D, Ropert C, Huve P, Verrecchia T, Marlard M, Frydman A, Veillard M, Spenlehauer G. Biomaterials. 1992; 13 (15): 1093-1102.
- [19]. Sabino M, Loaiza M, Dernowsek J, Rezende R, Da Silva J. Rev. LatinAm. Metal. Mat. 2017; 37 (2): 1-27.
- [20]. Rezende R, Sabino M, Dernowsek J, Vilalba F, Mironov W, Da Silva J. Int. J. of Advances in Medical Biotechnology. 2018; 1 (1): 41-47.
- [21]. Xie L, Xu H, Li L, Hsiao B, Zhong G, Li Z. Scientific Reports. 2016; 6: 34572.
- [22]. Ono M, Hori M, Haratake M, Tomiyama T, Mori H, Nakayama M. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 2007; 15: 6388-6396.
- [23]. Rojas H, Rosales C, González C, Perera R, Trujillo M. Rev. LatinAm. Metal. Mat. 2014; 34 (1): 118-135.
- [24]. Jarag K, Pinjari D, Pandit A, Shankarling D. Ultrasonics Sonochemistry. 2011;18: 317-323.
- [25]. Meenatchi V, Muthu K, Rajasekar M, Meenakshisundaram S. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2014; 120: 72-76.
- [26]. Hwang D, Hyun J, Jo G, Koh D, Lim Y, Magnetic Resonance in Chemistry. 2011; 49: 41-45.
- [27]. Elahi M, Guan G, Wang L. Reviews on Advanced Materials Science. 2014; 38: 148-159.
- [28]. Liu S, Zhou G, Liu D, Xie Z, Huang Y, Wang X, Wu W, Jing X. Journal of Materials Chemistry B. 2013; 1: 101-109.
- [29]. Xu X, Chen X, Xu X, Lu T, Wang X, Yang L, Jing J. Journal of controlled release. 2006; 114: 307-316.
- [30]. Ranganath S, Wang C. Biomaterial. 2008; 29: 2996-3003.
- [31]. Xu X, Chen X, Wang Z, Jing X. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.2009; 72: 18-25.
- [32]. Wang X, Ding B, Li B. Materials Today. 2013; 16 (6): 229-241.
- [33]. Ji W, Sun Y, Yang F, Beucken J, Fan M, Chen Z, Jansen J. Pharmaceutical Research. 2011; 28: 1259-1272.
- [34]. Jang J, Castano O, Kim H. Advanced Drug Delivery Reviews. 2009; 61: 1065-1083.
- [35]. Dahlin R, Kasper K, Mikos A. Tissue Engineering: Part B. 2011; 17 (5): 349-364.
- [36]. Shanmugasundaram S, Chaudhry H, Arinzeh T. Tissue Engineering: Part A. 2011; 17(5, 6): 831-840.