

Synthetic polymeric scaffolds design and fabrication for wound healing treatment

Gabriela Rodríguez¹, María Lourdes Delgado Gonzalez¹, Silvia Kozuzsko²,
Juan Carlos Valdez³ and Andrea Paola Rodríguez¹

¹Laboratorio de Medios e Interfases, Departamento de Bioingeniería, Universidad Nacional de Tucumán, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Tucumán, Argentina; ²Cátedra de Anatomía y fisiología patológicas Facultad de Odontología UNT; ³Cátedra de Inmunología, Facultad de Bioquímica, Química, Farmacia y Biotecnología, Instituto de Microbiología, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.

Abstract— Ulcers are a type of chronic wounds that are very susceptible to microbial infections of bacteria that produce biofilm, which makes them refractory to antibiotic and antiseptic treatment. It has been observed that treatment with *Lactobacillus plantarum* supernatant (SNLP) in venous ulcers, reduces wound healing time, significantly decreasing bacterial load, so it could be a good alternative as treatment for different types of chronic wounds. Polycaprolactone (PCL) is a biocompatible and biodegradable polymer, with excellent mechanical properties, whose effectiveness in dermatological applications has been widely demonstrated. In addition, with the electrospinning technique, PCL fibers can be created in micro and nanometric scale with a certain degree of porosity, very useful for different biomedical applications. Therefore, the purpose of this work is to manufacture polymeric nanomembranes incorporating the supernatant of *Lactobacillus plantarum*, as an antibiotic and healing substance to PCL nanofibers by means of the immersion technique. The method of manufacturing PCL nanomembranes was optimized by electrospinning using various polymeric supports. Different immersion methods were tested for supernatant incorporation, controlled release of the same was studied and its morphology was observed in a Scanning Microscope. The 10% concentration PCL nanomembranes are made up of uniform nanofibers of random distribution, with an average diameter of 169.06 ± 32.28 nm and an average pore size of 1266.74 ± 292.55 nm. According to these results, fiber morphology was adequate for encapsulation. On the other hand, these scaffolds show antimicrobial activity, however, SNLP release was almost instantaneous, so, we conclude that it is not a suitable biomaterial as a possible treatment for chronic wounds. Therefore, it is necessary to review the technique to incorporate and controlled release of this substance and apply coaxial electrospinning for hollow nanofibers filled manufacture with this bioactive substance as an alternative technique.

Keywords— Electrospinning, scaffold, antibiotic activity, ulcer foot.

Resumen— Las úlceras son un tipo de heridas crónicas muy susceptibles a infecciones microbianas por bacterias productoras de biofilm, lo que las hace refractarias al tratamiento con antibióticos y antisépticos. Se ha observado que el tratamiento con sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* (SNLP) en úlceras venosas, reduce el tiempo de cicatrización, disminuyendo significativamente la carga bacteriana, por lo que podría ser una buena alternativa para la curación de diferentes tipos de heridas crónicas. La Policaprolactona (PCL) es un polímero biocompatible y biodegradable, con excelentes propiedades mecánicas, cuya eficacia en aplicaciones dermatológicas ha sido ampliamente demostrada. La técnica de electrospinning, permite fabricar nanomembranas de poliméricas con diferente grado de porosidad según la aplicación biomédica. El objetivo del presente trabajo es fabricar un scaffold de PCL mediante electrospinning con el SNLP incorporado por el método de inmersión (PCL+SNLP), estudiar la morfología, la liberación controlada del SNLP y la actividad antimicrobiana del scaffold fabricado.

Los resultados indicaron que los scaffolds de PCL al 10% están conformados por nanofibras uniformes de distribución aleatoria, con diámetro promedio de $169,06 \pm 32,28$ nm y un tamaño de poro promedio de $1266,74 \pm 292,55$ nm. De acuerdo con estos resultados, la morfología de la fibra resultaría adecuada para el encapsulado. Por otro lado, estos scaffolds presentan actividad antimicrobiana, sin embargo, la liberación del SNLP fue casi instantánea, por lo que concluimos que no es un biomaterial adecuado como posible tratamiento para heridas crónicas. Por ello, es necesario una revisión en la técnica de incorporación y liberación controlada de esta sustancia y aplicar electrospinning coaxial para la fabricación de nanofibras huecas rellenas de esta sustancia bioactiva como técnica alternativa.

Palabras clave— Actividad antibiótica, pie ulcerado.

I. INTRODUCCIÓN

Se estima que entre un 15-25% de los pacientes que padecen Diabetes Mellitus, presentan riesgos a desarrollar úlceras de pie diabético (UPD) y de estos, un 85% requieren amputación como consecuencia de las mismas [1]. Las UPD se producen a consecuencia de la neuropatía, la microangiopatía e inmunopatología. Son muy difíciles de curar. A su vez, como toda herida crónica, son muy

susceptible a las infecciones en particular aquellas mediadas por bacterias que producen biofilm [2]. El tratamiento convencional de desbridamiento quirúrgico más los antibióticos ha resultado ineficaz en muchos casos para la curación de heridas crónicas, incluyendo UPD. Por ello, es necesario el desarrollo de tratamientos adyuvantes a este tratamiento convencional. Muchos de ellos son costosos, complejos y no siempre eficaces. Por otro lado, nuestro equipo ha observado que el tratamiento con *Lactobacillus*

plantarum en heridas producidas por quemaduras y en úlceras venosas crónicas reduce el tiempo de cicatrización, por la disminución de la carga bacteriana [3], [4] la generación de tejido de granulación y epitelización [5], [6]. Para estimular la cicatrización de una herida crónica, la sustancia medicamentosa debe ser liberada de forma controlada, localizada y prolongada. La posibilidad de incorporar la sustancia activa a un scaffold que permitiría su liberación continua y permitiría espaciar el tiempo de curación. El material de construcción de un scaffold debe ser biocompatible para no inducir ningún tipo de reacción biológica adversa [7]. La técnica de electrospinning o electrohilado permite crear nanofibras estructuradas en scaffolds para una gran variedad de aplicaciones biomédicas [8]. En nuestro laboratorio, hemos diseñado y validado un equipo de electrospinning [9], [10] para la fabricación de nanomembranas. En base a todo lo expuesto, este trabajo tiene como objetivos fabricar un scaffold de policaprolactona (PCL), un biomaterial biocompatible con excelentes propiedades mecánicas, cuya eficacia en aplicaciones dermatológicas ha sido ampliamente demostrada [11], utilizando la técnica de electrospinning con sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* (SNLP) incorporado por el método de inmersión (PCL+SNLP), determinar su morfología, evaluar el tiempo de liberación del SNLP y la actividad antimicrobiana del scaffold fabricado.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Fabricación de scaffolds de PCL

Los scaffolds de nanofibras fueron fabricadas utilizando la técnica de electrospinning (Fig. 1). Para ello se preparó una solución de Policaprolactona (PCL Mn, 80000 Sigma-Aldrich USA) al 10% p/v en Dimetilformamida (Cicarelli, Argentina) y cloroformo (Cicarelli, Argentina) con una relación 80:20. La mezcla fue homogeneizada durante 24 hs con agitador magnético. A continuación, la suspensión se cargó en una jeringa de 5 ml. Se aplicó una diferencia de potencial de 8 kv, lo que genera un campo eléctrico entre el extremo de la aguja metálica y la placa colectora, cuya distancia entre uno y otro fue de 15 cm.

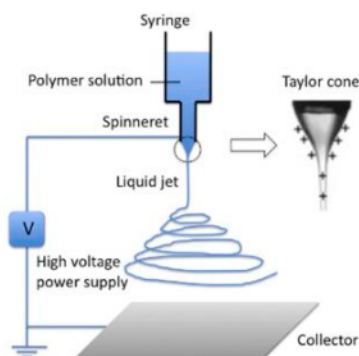


Fig 1 Esquema de la técnica de electrospinning [12]

B. Incorporación del SNLP

Se cultivó la cepa de *L. plantarum* ATCC 10241 en medio líquido MRS a 37°C sin agitación durante 8 horas. Luego se centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos a 15°C. Se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de un filtro Millipore de 0,22 μm de poros para eliminar las bacterias restantes del

sobrenadante. Finalmente se liofilizó y se llevó al SNLP a una concentración del 24% en H₂O destilada estéril.

El SNLP fue incorporado mediante el método de inmersión. Las muestras fueron pesadas antes de la incorporación de esta sustancia (peso inicial: PI) y luego del secado (peso final: PF). La cantidad de sobrenadante que se incorporó a cada scaffold fue estimado por la diferencia entre el PF y PI. Para este método, se sumergieron los scaffolds en placas de 24 pocillos con 0,25 ml de SNLP. Luego, las muestras fueron secadas a 37°C en estufa por 24 horas.

Los grupos experimentales fueron los scaffolds de 1 capa (PCL+SNLP 1 capa), y 3 capas (PCL+SNLP 3 capas). El grupo control fue el PCL solo.

C. Análisis de morfología

Para analizar la morfología de los scaffolds, se utilizó el equipo SEM Zeiss Supra 55VP perteneciente al CIME (Centro Integral de Microscopía Electrónica) dependiente del CONICET, Tucumán. Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software Image J para medir: a) El diámetro promedio de las nanofibras de las muestras sin sobrenadante. b) El diámetro promedio de las nanofibras de las muestras, previo a la incorporación y posterior a la liberación del SNLP. c) El tamaño promedio de los poros presentes entre las nanofibras.

D. Ensayo de Liberación de SNLP

Para conocer el perfil de liberación del SNLP, las muestras de PCL + SNPL, se colocaron en placas de 24 pocillos con 2,5 ml de solución fisiológica, se llevaron a estufa a 37°C y fueron retiradas en distintos intervalos de tiempo (Tabla 1).

TABLA I
ENSAYO DE LIBERACIÓN DE SNLP,
INTERVALOS DE TIEMPO ANALIZADOS.

Intervalos de tiempo	Cantidad de minutos
T0	0 min
T1	5 min
T2	10 min
T3	15 min
T4	30 min
T5	60 min
T6	120 min

E. Ensayo de actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana, se determinó mediante el método de difusión en agar usando *Staphylococcus aureus*, y oxiclina como control. A las 24 hs, se midió la formación de halos de inhibición según la norma ISO 22196 relativa a la medición de la actividad antibacteriana en superficies de plásticos.

F. Análisis estadístico

Se utilizó un ANOVA comparativo para analizar el SNLP incorporado en los scaffolds de PCL.

III. RESULTADOS

A. Incorporación de SNLP a los scaffolds de PCL al 10%

Los scaffolds de PCL al 10% que fueron desecadas en estufa, resultaron difíciles para calcular su peso final, por lo que no pudimos evaluar la cantidad de SNLP incorporadas en ellas. Sin embargo, logró evaporar el componente líquido del SNLP dejando las muestras completamente cubiertas de esta sustancia bioactiva, sin necesidad de utilizar el desecador (Fig. 2).

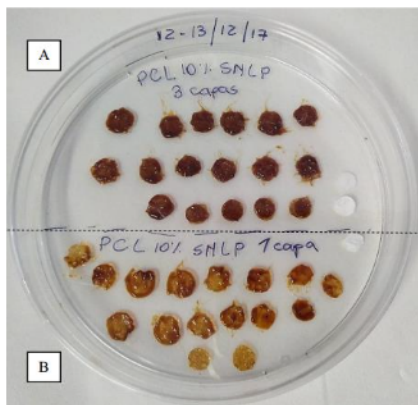


Fig. 2. Scaffolds de PCL al 10%; A, Muestras de tres capas de scaffolds de PCL al 10% con SNLP; B, Muestras de capa simple de scaffolds de PCL al 10% con SNLP.

B. Análisis de morfología

Se observa que los diámetros medidos poseen valores muy cercanos, con un rango de variabilidad entre: $150,49 \pm 26,35$ nm y $191,45 \pm 38,47$ nm. Y un diámetro promedio de nanofibra de $169,06 \pm 32,28$ nm (Fig.3 y Fig.4 A).

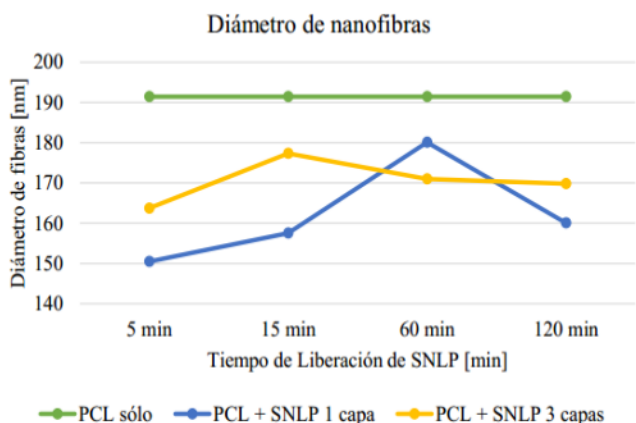


Figura 3. Diámetros promedio de nanofibras del scaffold de PCL al 10% de muestras analizadas con SEM.

Se puede observar que los tamaños de poros de las distintas muestras analizadas son semejantes, con un rango de variabilidad de $1016,09 \pm 364,72$ nm y $1403,52 \pm 298,31$ nm. Y un tamaño promedio de poro de: $1266,74 \pm 292,55$ nm (Fig. 4,B; Fig. 5).

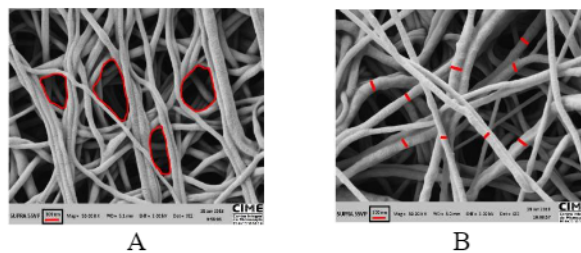


Fig. 4. Imagen SEM 50x de scaffolds de PCL al 10%. A, se observan destacados los diámetros medidos de algunas nanofibras; B, Imagen SEM de nanomembrana de PCL al 10%. Se observan remarcados algunos poros presentes entre las nanofibras.

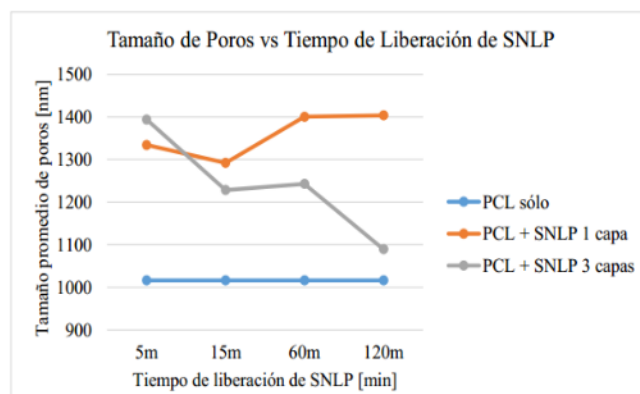


Fig. 5. Tamaño promedio de poros presentes en las muestras.

C. Ensayo de actividad antimicrobiana

En las muestras de PCL + SNLP 3 capas, se observa un halo de inhibición de 24 mm de diámetro sobre el cultivo bacteriano de *S. aureus*, mientras que el scaffold de PCL + SNLP 1 capa, muestra un halo de inhibición de 19 mm de diámetro. El grupo control (oxiciclina) presenta un halo de inhibición de 19 mm de diámetro. Esto confirma que el segundo método utilizado para la incorporación de SNLP brinda una buena actividad antimicrobiana (Fig.6).

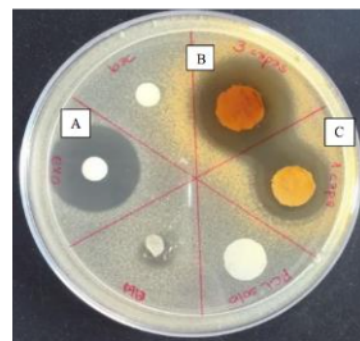


Fig. 6. Análisis de actividad antimicrobiana en muestras fabricadas. Control positivo (A); oxitriclina, antibiótico utilizado como control (B); scaffold de PCL + SNLP 3 capas (C). scaffold PCL + SNLP 1 capa. Se observa que ambas muestras, B y C, poseen una buena actividad antimicrobiana.

D. Ensayo de Liberación

Las muestras de capa simple (PCL + SNPL1) al ser sumergidas en solución fisiológica a 37°C, se liberaron instantáneamente el contenido de SNLP, al igual que las muestras de triple capa (PCL + SNPL1) (Fig.7).

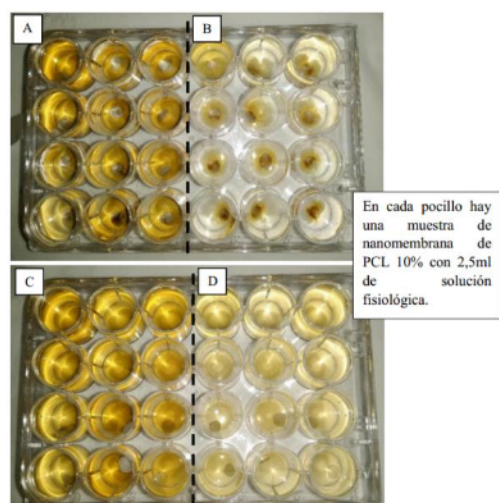


Fig. 7. Ensayo de liberación de SNLP. (A). Scaffolds PCL + SNLP 1 capa, en el minuto cero de colocadas en solución fisiológica (B). Scaffolds PCL + SNLP 3 capas, luego de cinco minutos en solución fisiológica (C). Scaffolds PCL + SNLP 1 capa, luego de cinco minutos en solución fisiológica (D). Scaffolds PCL + SNLP 3 capas, luego de cinco minutos.

IV. DISCUSIÓN

El proceso de electrospinning se basa en el fenómeno de la eyección uniaxial de un chorro cargado, que se ve significativamente afectado por el cambio de la concentración de la solución polimérica. El aumento de la concentración de la solución polimérica dará lugar a un aumento en la viscosidad y las cadenas de polímero superaran la tensión superficial resultando nanofibras uniformes [13]. Para que el parche sea maleable, sintetizamos las nanofibras con PCL al 10%.

Para utilizarse como un material antimicrobiano y de transporte de sustancias que favorezcan la reparación tisular, los scaffolds de nanofibras deben tener alta porosidad con excelente interconexión de poros. Esto permite el paso e intercambio conveniente de nutrientes y gases, exudar el fluido de la herida y prevenir infecciones exógenas debido al efecto de tamiz de la membrana [14]. En este trabajo, los entrelazados de las nanofibras de los scaffolds obtenidos, formaron poros de tamaños que oscilan entre 1266.74 ± 292.55 nm. Esto permitiría el encapsulado adecuado de la sustancia a incorporar. Por otro lado, se diseñan scaffolds inteligentes con fármacos que liberan inicialmente una alta concentración de antibióticos en un corto plazo (horas a un día) para impedir la adhesión inicial de bacterias. Esta liberación explosiva de droga se denomina liberación en forma de ráfaga. Posteriormente, sucede una liberación lenta a largo plazo (semanas a meses) que evita la proliferación y multiplicación de las bacterias patógenas, hasta que se completa la cicatrización [15, 16]. En el ensayo de liberación realizado sobre los scaffolds fabricados, el SNLP presentó una liberación tipo ráfaga en los primeros minutos. Bolgen, et al. [17], estudiaron la cinética de liberación del fármaco Biteral® presente en membranas de PCL y se encontró que aproximadamente el 80% del medicamento fue liberado en 3h y el liberación se completó en casi 18h. Ruckh, et al. [18], fabricaron matrices de nanofibras de PCL cargadas con rifampicina (RIF) e investigaron su cinética de liberación. Hubo inicialmente un lanzamiento explosivo de RIF y la liberación se completó después de 8 h. Thakur, et al. [19], fabricaron una matriz de ácido poli-l-láctico (PLLA) para

liberación dual de fármacos que contenía lidocaína y mupirocina. La lidocaína mostró una liberación inicial masiva (80% de liberación en una hora) seguido de una meseta después de las primeras horas, mientras que la Mupirocina exhibió solo un 5% de liberación en la primera hora antes de experimentar una liberación más sostenida para proporcionar acción antibacteriana por más de 72 h. El tipo de liberación en cada aplicación depende del material de fabricación y del fármaco incorporado. En este trabajo, obtuvimos un scaffold que al permitir una liberación inicial importante, puede ser utilizado en las primeras curaciones de heridas infectadas. Sin embargo, es necesario que para los tratamientos de dichas heridas, se deben fabricar scaffolds con un método diferente de incorporación de SNLP para obtener perfiles de liberación más prolongados. Por otra parte, durante el desecado el SNLP se evapora completamente, quedando presente los componentes no volátiles que cumplen la función antibiótica

V. CONCLUSIONES

El método de fabricación de los scaffolds de PCL al 10% con electrospinning logro nanofibras uniformes. La porosidad y su distribución aleatoria resultaron adecuadas para el encapsulado del SNLP. Sin embargo, es necesario lograr optimizar la liberación de esta sustancia de forma controlada que permita obtener un parche dermatológico que permita un recambio menos recurrente. Es necesario, analizar otros métodos de incorporación de sustancias a las nanofibras como la técnica de electrospinning coaxial, incorporando el SNLP dentro de las nanofibras para obtener una liberación más lenta y controlada. También así, realizar una caracterización físico-química y análisis de biocompatibilidad in vitro siguiendo la Norma ISO 10993 de *Evaluación biológica para dispositivos biomédicos* y validar su efectividad mediante pruebas preclínicas y clínicas experimentales.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto está subsidiado por el PDTs (proyecto de desarrollo tecnológico y social) N°574 bajo la dirección de la Dra. Andrea Rodriguez otorgado por el Consejo Interuniversitario Nacional (CIN), por el proyecto Peirano, dirigido también por la Dra. Rodriguez y por el subsidio PICT 370 otorgado por el MINCYT, bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Valdez. Agradecemos al instituto de virología Dr. Vanella, facultad de Ciencias Médicas de las Universidad Nacional de Córdoba (UNC) y a la cátedra de Inmunología de la facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT).

REFERENCIAS

- [1] Y. Kato *et al.*, "Creation and transplantation of an adipose-derived stem cell (ASC) sheet in a diabetic wound-healing model," *J. Vis. Exp.*, vol. 2017, no. 126, pp. 1–10, 2017.
- [2] S. C. Wu, V. R. Driver, J. S. Wrobel, and D. G. Armstrong, "Foot ulcers in the diabetic patient, prevention and treatment," *Vasc. Health Risk Manag.*, vol. 3, no. 1, pp. 65–76, 2007.
- [3] J. C. Valdéz, M. C. Peral, M. Rachid, M. Santana, and G. Perdigón, "Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: The potential use of probiotics in wound treatment," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 11, no. 6, pp. 472–479, 2005.
- [4] M. C. Peral, M. A. Huaman Martinez, and J. C. Valdez, "Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns," *Int. Wound J.*, vol. 6, no. 1, pp. 73–81, 2009.
- [5] M. C. Peral, M. M. Rachid, N. M. Gobbato, M. A. Huaman Martinez,

and J. C. Valdez, "Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with *Lactobacillus plantarum*," *Clin. Microbiol. Infect.* vol. 16, no. 3, pp. 281–286, 2010.

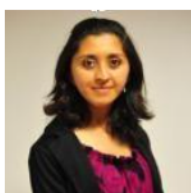
- [6] Valdez, J. C., Ramos, A. N., & Fernández, D. (2013). -Probiotics and their Potential use in Wound Treatment. In *Probiotics* (pp. 309-346). CRC Press.
- [7] Joon P and Lakes RS. 2007. *Biomaterials an introduction*, third edition.
- [8] Duque Sánchez LM, Rodríguez L, López M. 2013. Electrospinning: la era de las nanofibras. *Rev. Iber. Polímeros*. 14(1): 10-27.
- [9] Masino LM. 2012. Equipo de electrospinning. Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, UNT. Tucumán.
- [10] Nasrallah L. 2013. Sistema para electrospinnig. Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, UNT. Tucumán.
- [11] I. Rajzer, E. Menaszek, R. Kwiatkowski, J. A. Planell, and O. Castano, "Electrospun gelatin/poly(ϵ -caprolactone) fibrous scaffold modified with calcium phosphate for bone tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 44, pp. 183–190, 2014.
- [12] Ghorani, B., & Tucker, N. (2015). Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids*, 51, 227-240.
- [13] Haider, A., Haider, S. & Kang, I.-K., 2015. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, Volumen 30.
- [14] Murugan, R. & Ramakrishna, S., 2006. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. *Tissue Engineering*, 12(3), pp. 435-447.
- [15] Wang, H. y otros, 2013. Preparation and Optimization of Silver Nanoparticles Embedded Electrospun Membrane for Implant Associated Infections Prevention. *ACS: Applied Materials and Interfaces*, Volumen 5, pp. 11014-11021.
- [16] Cui, W., Zhou, Y. & Chang, J., 2010. Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery. *Science and Technology of Advanced Materials*, 11(1).
- [17] Bolgen, N. y otros, 2006. In Vivo Performance of Antibiotic Embedded Electrospun PCL Membranes for Prevention of Abdominal Adhesions. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*.
- [18] Ruckh, T. T., Oldinski, R. A., Carroll, D. A., Mikhova, K., Bryers, J. D., & Popat, K. C. (2012). Antimicrobial effects of nanofiber poly (caprolactone) tissue scaffolds releasing rifampicin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(6), 1411-1420.
- [19] Thakur, R. A., Florek, C. A., Kohn, J. & Michniak, B. B., 2008. Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(1), pp. 87-93



Juan Carlos Valdez es Dr. en Bioquímica, docente e investigador de la UNT. Profesor Asociado de la cátedra de Inmunología. Coordinador de Investigación clínica de la Facultad de Medicina de la UNT. Becario postdoctoral del Rush Medical College, Chicago USA.



Andrea Paola Rodriguez es profesora asociada en el CONICET y en el departamento de Bioingeniería de la UNT. Ha realizado sus estudios doctorales y postdoctorales en el departamento de Patología Oral y Medicina en la Universidad de Okayama. Su campo de estudio es la ingeniería de tejidos con foco en tejido óseo y adiposo, cultivo celular e interacciones con biomateriales.



Gabriela Rodriguez es Lic. En Cs. Biológicas egresada de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Actualmente se encuentra terminando su doctorado en Cs. Biológicas. Es becaria CONICET y desempeña su labor en el Laboratorio de Medios e Interfases (LAMEIN). Se especializó en medicina regenerativa en el Wake Forest Institute of Regenerative Medicine, Carolina del Norte, USA.



María Lourdes Gonzales Delgado es Ingeniera Biomédica egresada de la UNT. Realizó su tesina de grado en el LAMEIN, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología (FACET).



Silvia Noemi Kozuszko es odontóloga, especialista en endodoncia. Magister en Investigación en Cs. de la Salud. Docente autorizado en la facultad de Odontología de la UNT.