

**“Desarrollo de un andamio fibrilar poroso a partir del ácido poliláctico mediante la técnica de Electrospinning”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**Presenta:**

Ing. Omar Genaro Román Díaz.

**Director:**

Dra. Zully Vargas Galarza

**Co-director:**

Dr. Alfredo Olarte Paredes

ZACATEPEC, MORELOS

AGOSTO 2019

# Dedicatoria

Siempre me he sentido agradecido por la increíble familia en la que he crecido, desde que tengo memoria han visto por mí, estoy seguro que así fue en el momento en que llegué a este mundo, me han dedicado tanto tiempo para poder aprender cómo luchar y salir adelante ante las diversas situaciones de la vida. Muchos años después, sus enseñanzas no cesan, y aquí estoy, con un nuevo logro exitosamente conseguido, mi proyecto de tesis.

Quiero agradecerles absolutamente por todo, no me alcanzan las palabras para expresar el orgullo y lo bien que me siento por tener una familia tan asombrosa.

# Agradecimientos

Quiero agradecer a las personas que se han visto involucradas a lo largo del desarrollo de mi formación en este grado académico, desde mis respetables colegas y amigos compañeros de la maestría con quienes he compartido tantas gratas experiencias estos últimos años, mi mejor amigo quien al igual que mi familia siempre han estado para poder fortalecerme y extender su ayuda siempre que la he necesitado, al mismo Instituto Tecnológico de Zacatepec por, además de permitir el uso de sus instalaciones para poder llevar a cabo el proyecto de la maestría, me ha permitido continuar con actividades extra académicas en la cual he podido volver a vivir la inolvidable experiencia de representar al Tecnológico en competencias de natación, dicho esto también he de agradecer al departamento mismo, así como al equipo, por volver a abrir sus puertas y permitirme tener estas experiencias.

También he de extender mi infinito agradecimiento a todo el departamento de postgrado, Dra. Dinorah, Dra. Claudia, Dra. Areli, Dra. Wendy, Dr. Olarte, Dr. Álvarez, Dr. Edgar, Dr. René, Dr. Juan Pablo, Dr. Quinto sus enseñanzas dentro y fuera del aula siempre van a prevalecer en mí así como mi gratitud, sin olvidar la gran perseverancia, apoyo, empatía, ayuda, guía mostrada por mi asesora, Dra. Zully Vargas Galarza, a quien con toda certeza he de agradecer la oportunidad de poder llevar a cabo este trabajo.

Así mismo también agradezco a CONACyT por el apoyo económico otorgado a lo largo de este periodo. Sin dejar de lado al TecNM por su apoyo prestado al proyecto que lleva por clave 5847.19P, para la realización de este trabajo.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
RESUMEN .....	x
ABSTRACT .....	xii
ABREVIATURAS .....	xiv
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Introducción .....	1
1.2 Justificación .....	4
1.3 Planteamiento del problema.....	5
1.4 Objetivo general.....	6
1.5 Objetivos específicos .....	6
1.6 Hipótesis .....	7
1.7 Metas .....	7
CAPÍTULO 2: MARCO CONCEPTUAL.....	8
2.1 Estado del arte.....	8
2.2 Marco teórico .....	15
2.2.1 Ingeniería de tejidos.....	15
2.2.2 Tipos de andamios.....	17
2.2.3 Andamio fibrilar .....	17
2.2.4 Electrospinning.....	18
2.2.5 Poli vinil alcohol.....	25
2.2.6 Ácido poli (láctico-co-glicólico) .....	26
2.2.7 Colágeno tipo I.....	27
2.2.8 Técnicas de análisis utilizadas.....	28
2.2.8.1 Espectroscopia de infrarrojo .....	28

2.2.8.2 Microscopia electrónica de barrido .....	29
2.2.8.3 Análisis termogravimétricos .....	30
2.2.8.4 Determinación de biodegradabilidad .....	30
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA .....	32
3.1 Descripción .....	32
3.1.1 Fase preliminar .....	32
3.1.2 Desarrollo de andamios AFP.....	32
3.1.3 Desarrollo de andamios EFP.....	34
3.1.4 Desarrollo de andamios IFP .....	35
3.2 Equipo .....	36
3.3 Análisis de grupos funcionales mediante FTIR.....	40
3.4 Estudio de la morfología de los andamios desarrollados.....	40
3.6 Evaluación de la biodegradabilidad.....	40
3.6.1 Fluido Corporal Simulado (SBF).....	40
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	43
4.1 Caracterización de los andamios mediante FTIR .....	43
4.2 Resultados de la fase preliminar .....	45
4.3 Resultados en el desarrollo de los andamios AFP .....	47
4.4 Resultados en el desarrollo de andamios EFP .....	50
4.5 Resultados en el desarrollo de andamios IFP .....	53
4.6 Caracterización química y física de andamios IFP .....	55
4.6.1 Resultados de espectros de los andamios IFP mediante FTIR.....	55
4.6.2 Resultados de características morfológicas de los andamios IFP .....	56
4.6.3 Resultados termogravimétricos de los andamios IFP .....	57
4.6.4 Resultados de las propiedades mecánicas en los andamios IFP.....	60
4.6.5 Resultados de las características físicas generales de los andamios IFP ...	60
4.6.7 Caracterización del flujo viscoelástico .....	63

4.6.7.1	Tensión superficial.....	63
4.6.7.2	Viscosidad intrínseca del flujo viscoelástico.....	63
4.6.7.3	Tiempo de relajación máximo en el proceso de electrospinning .....	65
4.6.7.4	Voltaje crítico durante el desarrollo de fibras .....	66
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....		68
ANEXOS.....		70
REFERENCIAS .....		81

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros en el proceso de electrospinning.....	23
Tabla 2. Reactivos para la preparación de SBF.....	42
Tabla 3. Señales características de los materiales presentes en el espectro FTIR. ....	45
Tabla 4. Parámetros de desarrollo de los andamios. ....	46
Tabla 5. Parámetros en el desarrollo de andamios AFP por electrohilado. ....	48
Tabla 6. Parámetros en el desarrollo de andamios EFP por electrohilado. ....	50
Tabla 7. Relaciones y condiciones del electrohilado. ....	53
Tabla 8. Resultados obtenidos en las propiedades mecánicas de los andamios IFP. ....	60
Tabla 10. Área bajo la curva de PVA, PLGA, colágeno tipo I, andamio IFP-1.....	72
Tabla 11. Área bajo la curva de PVA, PLGA, colágeno tipo I, andamio IFP-1.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Montaje típico de la técnica de electrospinning (Duque Sánchez et al., 2013).	20
Figura 2. Diversos ensambles de la técnica de electrospinning.	21
Figura 3. Unidad monomérica repetitiva del PVA.	26
Figura 4. Unidad monomérica repetitiva del PLGA.	26
Figura 5. Estructura molecular del colágeno tipo I.	27
Figura 6. Diagrama representativo de la fase preliminar.	32
Figura 7. Diagrama representativo del desarrollo de los andamios AFP.	33
Figura 8. Diagrama representativo del desarrollo de los andamios EFP.	34
Figura 9. Diagrama representativo del desarrollo de los andamios IFP.	35
Figura 10. Equipo de FTIR, marca PerkinElmer modelo Spectrum two.	36
Figura 11. Equipo de electrospinning.	36
Figura 12. Microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6010LA	37
Figura 13. Circulador refrigerante Thermo Haake K-20.	37
Figura 14. Equipo BlueHill Lite de Instron modelo 2519-107.	38
Figura 15. Micrómetro Digimatic IP65 Mitutoyo modelo MDC-1'MJ.	38
Figura 16. Tensiómetro de anillo DSC-DuNOUY No. 7035.	39
Figura 17. NETZSCH modelo STA 449F3.	39
Figura 18. Espectro obtenido en la caracterización del PVA.	43
Figura 19. Espectro obtenido en la caracterización del PLGA.	44
Figura 20. Espectro obtenido en la caracterización del colágeno tipo I.	44
Figura 21. Espectro FTIR de andamio A6-PVA.	47
Figura 22. Imagen del andamio A6-PVA obtenido mediante SEM a 700X.	47
Figura 23. Imagen del andamio AFP-6B obtenida mediante SEM a 200X.	49
Figura 24. Imagen del andamio AFP-6D obtenida mediante SEM a 200X.	49
Figura 25. Imagen del andamio AFP-6C obtenida mediante SEM a 200X.	49
Figura 26. Imagen del andamio AFP-7B obtenida mediante SEM a 200X.	49
Figura 27. Imagen SEM del andamio EFP en placa a 430X.	51
Figura 28. Imagen SEM del andamio EFP en placa a 750X.	51
Figura 29. Imagen SEM del andamio EFP en placa a 1000X.	51
Figura 30. Imagen SEM del andamio EFP en cilindro rotatorio a 430X.	51
Figura 31. Imagen SEM del andamio EFP en cilindro rotatorio a 750X.	51
Figura 32. Imagen SEM del andamio EFP en cilindro rotatorio a 1000X.	51

Figura 33. Imagen SEM del andamio EFP-3 en cilindro rotatorio a 1400X.....	52
Figura 34. Imagen SEM del andamio EFP-6 en placa a 430X. ....	52
Figura 35. Imagen SEM del andamio EFP-7 en placa a 800X. ....	52
Figura 36. Espectro obtenido para el andamio EFP-3 en placa. ....	52
Figura 37 Imagen obtenida por SEM del andamio IFP-1 a 200X. ....	54
Figura 38. Imagen obtenida por SEM del andamio IFP-2 a 200X.....	54
Figura 39. Imagen obtenida por SEM del andamio IFP-1 a 500X.....	54
Figura 40. Imagen obtenida por SEM del andamio IFP-2 a 500X.....	54
Figura 41. Imagen obtenida por SEM del andamio IFP-1 a 1000X.....	54
Figura 42. Imagen obtenida por SEM del andamio IFP-2 a 1000X.....	54
Figura 43. Espectros obtenidos para los andamios IFP-1 e IFP-2.....	55
Figura 44. Espectros obtenidos para los andamios IFP-3 e IFP-4.....	56
Figura 45. Diámetros y datos estadísticos de las fibras IFP. ....	57
Figura 46. Resultados de análisis termogavimétricos de IFP-1 e IFP-3. ....	58
Figura 47. Moléculas de PVA, colágeno tipo I y PLGA.....	59
Figura 48. Determinación de la densidad del andamio IFP. ....	61
Figura 49. Relación y determinación de absorción de andamio IFP.....	62
Figura 50. Resultados de porosidad, hinchamiento y degradación de andamios IFP.....	62
Figura 51. Andamio A1-PVA a 700 aumentos.....	70
Figura 52. Andamio A2-PVA a 700 aumentos.....	70
Figura 53. Andamio A4-PVA a 700 aumentos.....	70
Figura 54. Andamio A5-PVA a 700 aumentos.....	70
Figura 55. Andamio A6-PVA a 700 aumentos.....	70
Figura 56. Andamio A8-PVA a 700 aumentos.....	70
Figura 57. Andamio AFP-6B a 200 aumentos.....	71
Figura 58. Andamio AFP-6C a 200 aumentos.....	71
Figura 59. Andamio AFP-6D a 200 aumentos.....	71
Figura 60. Andamio AFP-7B a 200 aumentos.....	71
Figura 61. Andamio AFP-7C a 200 aumentos.....	71
Figura 62. Andamio AFP-7D a 200 aumentos.....	71
Figura 63. Gráfica TGA y DTG del andamio IFP-1.....	76
Figura 64. Gráfica TGA y DTG del andamio IFP-3.....	76

## RESUMEN

La necesidad actual de reemplazo, reparación y regeneración de órganos y tejidos para pacientes se encuentra en continuo crecimiento, tal que los suministros disponibles no cubren la demanda existente; debido principalmente a la falta de donantes, y a problemas de compatibilidad que llevan al rechazo de trasplantes. Para superar estas desventajas, se han investigado el uso de andamios biocompatibles como alternativa al trasplante (Ikada, 2006). Entre estos andamios se encuentran: cementos óseos (MacDonald, Price, & Boyd, 2017), hidrogeles para liberación de fármacos (Siddhesh, Papadimitrakopoulos, & Burgess, 2004), materiales para prótesis y para pacientes cardiovasculares (Amini, Laurencin, & Nukavarapu, 2012; Dimitriou, Jones, McGonagle, & Giannoudis, 2011; Ferrone & Raut, 2012; Martou & Antonyshyn, 2011). En el presente trabajo se describe el proceso para la obtención del método en el desarrollo de un andamio fibrilar poroso mediante la técnica de electrospinning, utilizando solventes con bajo impacto ambiental y de bajo riesgo a la salud, así como la caracterización morfológica a considerar para un posible uso como material en la ingeniería de tejidos, obteniendo las características del fluido viscoelástico del andamio. El andamio fibrilar fue obtenido variando las concentraciones de poli vinil alcohol (PVA), ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA, 75:25) y colágeno tipo 1 en una relación de 2:1, 1:1.11, y 167:1, 3.3:1 respectivamente. Las condiciones del electrohilado fueron de 18 y 20 KV con un diámetro de aguja externo de 3 a 5 mm, una distancia del colector de 11 cm y temperatura variable de 70, 40 y 25 °C. El andamio obtenido fue almacenado a 6 °C. Se realizaron pruebas de espectro del proceso haciendo uso de un espectro marca Perkin Elmer modelo Spectrum Two para análisis de FTIR dando como resultado bandas características del grupo hidroxilo ( $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ ,  $1600$  y  $660\text{ cm}^{-1}$ ), amino ( $3100-3500\text{ cm}^{-1}$ ,  $1600\text{ cm}^{-1}$ ) procedentes del PVA y del colágeno, carbonilo ( $1700-1800\text{ cm}^{-1}$ ) proveniente del PLGA, C-N ( $1200-1300\text{ cm}^{-1}$ ) del colágeno y C-O ( $900-1200\text{ cm}^{-1}$ ) para los tres compuestos. La caracterización por SEM para corroborar la morfología del material se llevó a cabo mediante un equipo marca JEOL modelo JSM-6010LA,

así como pruebas de absorción, degradabilidad, hinchamiento y porosidad dando como resultado 200%, 64.29%, 55.1%, 27.28% respectivamente. Las pruebas de termogravimetría muestran resultados en los cuales se puede confirmar que la presencia del PVA ayuda a mejorar la estabilidad térmica del andamio debido a que es un polímero cristalino, así como un 95% de degradación mayor a 400 °C en comparación al andamio que presenta ausencia de este polímero.

## ABSTRACT

The current need for replacement, repair, and regeneration of organs and tissues for patients is constantly growing so that the available supplies do not cover the existing demand; due mainly to the lack of donors, and to compatibility problems that lead to transplants rejection. To overcome these disadvantages, the use of biocompatible scaffolds has been investigated as an alternative to transplantation (Ikada, 2006). Among these scaffolds are: bone cements (MacDonald, Price, & Boyd, 2017), hydrogels for drug release (Siddhesh, Papadimitrakopoulos, & Burgess, 2004), materials for prostheses and for cardiovascular patients (Amini, Laurencin, & Nukavarapu, 2012; Dimitriou, Jones, McGonagle, & Giannoudis, 2011; Ferrone & Raut, 2012; Martou & Antonyshyn, 2011). In the present work we describe the process for obtaining the method in the development of a porous fibrillary scaffold using the electrospinning technique, using solvents with low environmental impact and low risk to health, as well as the morphological characterization to be considered for a possible use as material in tissue engineering, obtaining the viscoelastic fluid characteristics of the scaffolding. The fibrillar scaffold was obtained by varying the concentrations of polyvinyl alcohol (PVA), polylactic acid-co-glycolic acid (PLGA, 75:25) and collagen type 1 in a ratio of 2: 1, 1: 1.11, and 167: 1, 3.3: 1 respectively. The electrospinning conditions were 18 and 20 KV with an external needle diameter of 3 to 5 mm, a collector distance of 11 cm and a variable temperature of 70, 40 and 25 °C. The obtained scaffold was stored at 6 °C. Spectrum testing of the process was performed using a Perkin Elmer Spectrum Two spectrum spectrum for FTIR analysis resulting in characteristic bands of the hydroxyl group ( $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ ,  $1600$  and  $660\text{ cm}^{-1}$ ), amino ( $3100- 3500\text{ cm}^{-1}$ ,  $1600\text{ cm}^{-1}$ ) from PVA and collagen, carbonyl ( $1700-1800\text{ cm}^{-1}$ ) from PLGA, CN ( $1200-1300\text{ cm}^{-1}$ ) of collagen and CO ( $900-1200\text{ cm}^{-1}$ ) for the three compounds. The characterization by SEM to corroborate the morphology of the material was carried out by a JEOL brand JSM-6010LA equipment, as well as absorption, degradability, swelling, and porosity tests resulting in 200%, 64.29%, 55.1%, 27.28% respectively. The thermogravimetry tests show results in which it

can be confirmed that the presence of the PVA helps to improve the thermal stability of the scaffold because it is a crystalline polymer, as well as a percentage of degradation 95% higher than 400 °C compared to the scaffolding which shows an absence of this polymer.

## ABREVIATURAS

<b>[<math>\eta</math>]</b>	Viscosidad intrínseca
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	Micrómetro
<b>amb</b>	Ambiente
<b>C</b>	Concentración de la solución
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de calcio
<b>CDI</b>	1,1'-carbonil-diimidazol
<b>CICY</b>	Centro de Investigación Científica de Yucatán
<b>cm</b>	Centímetro
<b>Col I</b>	Colágeno tipo I
<b>cp</b>	Centi poise
<b>dL</b>	Decilitros
<b>D<sub>M</sub></b>	Diámetro mayor
<b>D<sub>m</sub></b>	Diámetro menor
<b>DSC</b>	Calorimetría diferencial de barrido
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier
<b>g</b>	Gramos
<b>G</b>	Diámetro comercial de aguja
<b>h</b>	Hora
<b>H</b>	Distancia entre la punta de la aguja y el colector
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HFP</b>	1,1,1,3,3,3-hexafluoruro-2-propanol
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O</b>	Fosfato de potasio dibásico trihidratado
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>Kg</b>	Kilo gramo
<b>KV</b>	Kilo Volt
<b>L</b>	Litro
<b>L</b>	Longitud de la aguja
<b>m</b>	Metro

---

<b>M</b>	Concentración molar
<b>MEC</b>	Matriz extra celular
<b>mg</b>	Mili gramos
<b>MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O</b>	Cloruro de magnesio hexahidratado
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>MPa</b>	Mega Pascales
<b>M<sub>w</sub> – P<sub>M</sub></b>	Peso molecular
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de sodio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sodio
<b>NF</b>	Nano fibras
<b>NIBIB</b>	Instituto Nacional de Bioingeniería e Imágenes Biomédicas
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>NMP</b>	1-metil-2-pirrolidinona anhídrida
<b>PCL</b>	Poli caprolactona
<b>PGA</b>	Ácido poli glicólico
<b>PHEMA</b>	Poli hidroximetacrilato de etilo
<b>PLA</b>	Ácido poli láctico
<b>PLGA</b>	Ácido poli láctico-co-glicólico
<b>Pol</b>	Polímero
<b>PVA</b>	Poli vinil alcohol
<b>R</b>	Constante de los gases
<b>R'</b>	Diámetro interno de la aguja
<b>s</b>	Segundo
<b>SBF</b>	Suero simulador corporal
<b>SEM</b>	Microscopio electrónico de barrido
<b>T</b>	Temperatura
<b>T.T.</b>	Tratamiento térmico
<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TRIS</b>	Trisaminometano
<b>V<sub>c</sub><sup>2</sup></b>	Voltaje crítico

<b>w</b>	Ancho
<b>W</b>	Peso
<b>X</b>	Fracción molar
<b><math>\alpha</math></b>	Constante de Huhn-Mark-Houwink-Sakurada
<b><math>\gamma</math></b>	Tensión superficial
<b><math>\lambda</math></b>	Tiempo de relajación máximo
<b><math>\rho</math></b>	Densidad
<b><math>\sigma_m</math></b>	Desviación estándar muestral
<b><math>\sigma_m^2</math></b>	Varianza muestral
<b><math>\sigma_p</math></b>	Desviación estándar poblacional
<b><math>\sigma_p^2</math></b>	Varianza poblacional
<b><i>k</i></b>	Constante de Huhn-Mark-Houwink-Sakurada
<b><math>\eta</math></b>	Viscosidad

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Introducción

El término ingeniería de tejidos nació en 1987 y se desarrolló como una alternativa al trasplante tradicional de órganos debido a la escasez o rechazo por parte de los pacientes. La convención fundamental de la ingeniería de tejidos parte de la capacidad del cuerpo humano para curarse a sí mismo, esto depende del tipo de enfermedades o heridas, del tipo de tejido, el grado de daño, pérdida de la función y el número de tejidos involucrados. El proceso de reparación, sin embargo, se ha mejorado en gran medida gracias a los avances en la tecnología médica (Q. Chen, Liang, & Thouas, 2013).

Se ha implementado el uso de nuevas nano-estructuras y técnicas que permitan producir nano-partículas para su aplicación en diversos sectores de la ingeniería tisular, con la finalidad de mejorar los procesos e incrementar la productividad. Una de éstas es el método de electrohilado o electrospinning, teniendo la característica de ser sencillo, de bajo costo y de utilizar una gran variedad de materiales, convirtiendo esta técnica en una de las más recurridas. Las estructuras obtenidas poseen características únicas, entre ellas su gran área de contacto y alta porosidad. Debido a estas propiedades, las nano-fibras presentan gran interés para ser aplicadas en diferentes áreas, como son la biomédica, textil y de alimentos obteniendo resultados benéficos (Robles-García *et al.*, 2014). El proceso de electrospinning permite obtener fibras por medio de estiramiento coaxial de una solución visco-elástica, estas fibras poseen diámetros que van de las sub-micras a los nanómetros, intervalos en los que es posible encontrar características únicas, algunas son: área superficial muy grande en relación al volumen (en el caso de las nano-fibras, esta relación puede ser un aproximado de 103 veces más que una microfibra), flexibilidad en la superficie, alta porosidad, poros interconectados y rendimiento mecánico superior comparado con otras formas ya conocidas del material, estas características hacen de las nano fibras,

óptimos candidatos para una variedad de aplicaciones, entre ellas: ingeniería de tejidos (Duque Sánchez, Rodríguez, & López, 2013).

Por otra parte, con el fin de imitar mejor la nano-estructura de la matriz extracelular (MEC) natural, los nano-materiales se muestran como candidatos prometedores que se asemejan a la MEC y que puedan reemplazar con eficacia los tejidos defectuosos. Durante la última década, andamios fabricados a partir de nano-fibras, nano-tubos y nano-partículas han sido investigados para la manipulación de células madre. Las nano-fibras son de los materiales mayormente reportados, que parten de polímeros biodegradables sintéticos como ácido poliláctico (PLA), ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA), alcohol polivinílico (PVA) o poli caprolactona (PCL); y materiales naturales tales como colágeno y quitosano (H. Chen *et al.*, 2013; Q. Chen *et al.*, 2013; Zhao, Tan, Pastorin, & Ho, 2013).

El andamio reportado en el presente trabajo es obtenido a partir de colágeno hidrolizado de origen bovino, PVA y PLGA. El colágeno es una de las proteínas más abundantes en la naturaleza y es el responsable de mantener la integridad estructural de los tejidos. En la piel están presentes principalmente los tipos de colágeno sintetizados por los fibroblastos y los miofibroblastos. El colágeno ha sido utilizado en el diseño de sustitutos de la piel (Supp & Boyce, 2005), los derivados de colágeno bovino son hoy en día aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y percibidos como elementos de bajo riesgo. El colágeno bovino, disponible en tiras y hojas como película o en polvo, es asequible y de fácil manejo, tiene buena adherencia y excelente potencial de vascularización. Su desventaja se centra en la falta de función de barrera y elasticidad, y su incapacidad para prevenir la invasión bacteriana (MacNeil, 2008). Todas las moléculas de colágeno están compuestas por tres cadenas polipeptídicas en una conformación triple helicoidal, con una estructura primaria repetitiva con glicina en cada tercera posición y prolina o 4-hidroxiprolina que preceden a la glicina. El colágeno tipo I (Col I) difiere de otros

colágenos por su baja hidroxilación de lisina y su baja composición en carbohidratos.

El alcohol poli vinílico (PVA) ha ganado popularidad como material de soporte de andamios para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Otorga estabilidad mecánica y flexibilidad a los andamios convencionales hechos de polímeros naturales (Youn Chang *et al.*, 2005). Además, los hidrogeles de PVA se han utilizado en una serie de aplicaciones biomédicas que incluyen lentes de contacto blandos (Hyon *et al.*, 1994), implantes de cartílago (J.-H., S., Y., J.P., & G.C., 1996), liberación de fármacos (Thanoo, Sunny, & Jayakrishnan, 1993), cubiertas de piel temporales o vendajes para quemaduras (Ficek & Peppas, 1993) y órganos artificiales (Masanori Kobayashi & Oka, 2004). Esto se debe a su inherente no toxicidad, no carcinogenicidad, buena biocompatibilidad y propiedades físicas deseables, como la naturaleza gomosa o elástica y un alto grado de hinchamiento en soluciones acuosas (M Kobayashi, 2003). Además, se ha seleccionado como el aditivo polimérico para producir matrices nano-fibrosas electrohiladas debido a su buena formación de fibras, biocompatibilidad y propiedades de resistencia química (Krumova, López, Benavente, Mijangos, & Pereña, 2000).

El PLGA ha atraído un interés considerable como material base para aplicaciones biomédicas debido a su: biocompatibilidad (Amini *et al.*, 2012); velocidad de biodegradación adaptada (según el peso molecular y la proporción del copolímero) ; aprobación para uso clínico en humanos por parte de la FDA (Ferrone & Raut, 2012); potencial para modificar las propiedades de la superficie para proporcionar una mejor interacción con los materiales biológicos (Dimitriou *et al.*, 2011); e idoneidad para su exportación a países y culturas donde la implantación de productos derivados de animales no es bien vista (Martou & Antonyshyn, 2011).

En el presente trabajo se realizó una fase preliminar y tres metodologías para el desarrollo y caracterización del material compuesto a base de PVA/Col I/PLGA variando sus concentraciones y condiciones durante el electrohilado con la

finalidad de obtener una morfología que sea de tipo fibrilar, asimismo se realizaron pruebas de absorción, porosidad, hinchamiento, densidad y degradabilidad del material final, también se realizó el estudio de algunas características propias del fluido viscoelástico y fases del desarrollo de la fibra. La fase preliminar consistió en la determinación de la concentración de PVA en la solución la cual se determinó en 70% (Asran, Henning, & Michler, 2010), asimismo se realizaron modificaciones a técnicas propuestas (Oktay, Kayaman-Apohan, Erdem-Kuruca, & Süleymanoğlu, 2015; Sadeghi-Avalshahr, Nokhasteh, Molavi, Khorsand-Ghayeni, & Mahdavi-Shahri, 2017; Yao, Wang, Ren, Zhe Liu, & Wang, 2012) en las cuales son usados agentes acoplantes; como el 1,1'-carbonil-diimidazol (CDI) y 1-metil-2-pirrolidinona anhídrida (NMP), y 1,1,1,3,3,3-hexafluoruro-2-propanol (HFP) como agente nano-estructurador.

## 1.2 Justificación

La ingeniería de tejidos es el resultado de la combinación de tres elementos principalmente, un material, un soporte biodegradable para la siembra de las células requeridas, y estímulos mecánicos que ayudan al desarrollo de un tejido nuevo y saludable. El objetivo de la ingeniería de tejidos es desarrollar tejidos novedosos, ya que el propio cuerpo tiene una capacidad limitada para regenerarse, y aunque hay sustitutos naturales no están disponibles para todas las aplicaciones médicas.

La ingeniería de tejidos es una rama relativamente nueva de la biomedicina, en la cual se desarrollan polímeros que tienen aplicaciones en el campo de la medicina. Entre estos materiales encontramos cementos óseos, hidrogeles para liberación de fármacos, materiales para prótesis y para pacientes cardiovasculares. Estos tejidos que se desarrollan en un laboratorio y son biocompatibles, permiten avanzar en la investigación biomédica al encontrar alternativas de tratamiento a enfermedades congénitas o adquiridas en pacientes de todas las edades.

En el presente trabajo se usaron tres tipos diferentes de polímeros en una matriz, aprovechando cada una de sus características particulares en la producción de un andamio de tipo fibrilar poroso. Se empleó el PLGA ya que tiene amplias aplicaciones médicas debido a su: biocompatibilidad, rango modificable de biodegradación, así como la aprobación para usos clínicos en humanos por la FDA; y por su potencial para modificar propiedades de su superficie facilitando una mejor interacción con los materiales biológicos. El PVA es distinguido en el uso médico por sus propiedades mecánicas, como el módulo de Young's y la resistencia a la tensión, permitiendo así el diseño de diferentes tejidos artificiales suaves. Para el caso del colágeno su uso es de importancia debido a sus aplicaciones clínicas, dado que presenta una alta producción de queratinocitos y fuerte anclaje permitiendo la producción de un área de superficie grande a ser injertada. Su uso se ha extendido a la producción de otros tejidos, como vasos sanguíneos, ligamentos y bronquios.

De acuerdo con el CICY en el 2018 (Centro de Investigación Científica de Yucatán) los retos en México más importantes son centrarse en la solución de los problemas de salud que nos aquejan como nación, entre ellos la diabetes y las cardiopatías. Si hablamos de diabetes, hay muchos medicamentos que se utilizan para controlar los niveles de azúcar, pero si la enfermedad ha avanzado tanto como para provocar una úlcera que conduzca a una amputación, ningún fármaco es capaz de parar ese daño, sin embargo, un tejido creado en laboratorio, puede desarrollar un sustituto de la piel, que pueda trabajar desde lo profundo de la lesión, que restablezca los vasos sanguíneos, y permita al propio tejido regenerarse sin necesidad de recurrir a la piel de otro ser vivo, o del mismo paciente.

### 1.3 Planteamiento del problema

En la actualidad existen diversos tipos de andamios aplicados a la ingeniería tisular, asimismo existen diferentes conjugaciones en sus matrices permitiendo así

que MEC pueda mejorar las propiedades mecánicas de un polímero sintético o viceversa.

Dentro de las diferentes morfologías presentes en los andamios se encuentran los de tipo fibrilar, que reportan mejores resultados en comparación con hidrogeles y esponjas. Asimismo mediante el uso de la técnica de electrohilado su producción es rápida y eficiente.

Sin embargo, los andamios de morfología fibrilar, al ser un componente de la ingeniería tisular relativamente nuevo no se han explorado completamente las posibilidades en cuanto a la conjugación de polímeros para la construcción de su matriz; por lo que se realizaron conjugaciones con PLGA, PVA y colágeno hidrolizado para el estudio de la morfología final del andamio así como la presencia de los grupos funcionales que lo conforman, características de absorción, hinchamiento, degradabilidad, porosidad y propiedades mecánicas que puedan acreditarlo como un material con un posible uso en la ingeniería de tejidos.

#### 1.4 Objetivo general

Desarrollar un andamio fibrilar poroso a partir de una matriz de PLGA - colágeno hidrolizado – PVA mediante la técnica de electrohilado.

#### 1.5 Objetivos específicos

- Caracterizar los componentes y bioelementos que conformarán la matriz del andamio.
- Determinar la relación adecuada de las concentraciones de la matriz del andamio.
- Desarrollar el andamio fibrilar poroso de acuerdo a la matriz adecuada.
- Caracterizar el andamio mediante pruebas de FTIR para determinar la presencia de los grupos activos de los componentes de la matriz.

- Determinar la morfología del andamio mediante pruebas de SEM.
- Determinar el comportamiento térmico del andamio por medio del análisis termogravimétrico (TGA).
- Determinar propiedades mecánicas de flexión mediante metodologías propuestas en los artículos de referencia.
- Determinar el porcentaje de: porosidad, hinchamiento, absorción y degradación en un suero simulador corporal (SBF).

## 1.6 Hipótesis

El andamio desarrollado con PVA/colágeno/PLGA mediante la técnica de electrospinning presenta características morfológicas fibrilares, así como la presencia de los grupos funcionales que conforman la matriz y los refuerzos del andamio para un posible uso en la ingeniería de tejidos.

## 1.7 Metas

- Obtención de un material compuesto a partir de una matriz de PVA/Colágeno I/PLGA mediante la técnica de electrospinning, con propiedades atractivas en el campo de aplicación de la ingeniería de tejidos.
- Asistir al menos a un congreso especializado aportando conocimiento del estado del arte presentando los resultados de este trabajo y conocer más a fondo los avances en el área de polímeros.
- Obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Ingeniería.
- Publicación de artículo en revista científica.

## CAPÍTULO 2: MARCO CONCEPTUAL

### 2.1 Estado del arte

El proceso de electrospinning ha sido ampliamente utilizado en la fabricación de fibras a escala nanométrica con distintas aplicaciones que van desde el uso de estas fibras en la industria textil hasta la biomédica.

En el año 2002 se tiene reportado el estudio de fibras de colágeno tipo I y III procesadas mediante la técnica de electrospinning, en la cual se realizó la comparación de las fibras en cuanto a sus propiedades mecánicas, características morfológicas y su bioactividad presente, los autores discuten la concentración óptima en la cual el colágeno tipo I se disuelve en HFP, la cual resulta ser 0.08 g/mL, se establece un voltaje de 15 – 30 KV para la fabricación estructuralmente idónea de las fibras mediante electrospinning, asimismo atribuyen al colágeno tipo I su importancia como material clave en las investigaciones futuras de la ingeniería de tejidos debido a que su estructura de hélice  $\alpha$  puede ser desplegada gracias a la intervención del HFP (Matthews, Wnek, Simpson, & Bowlin, 2002). El material obtenido fue morfológicamente caracterizado dando como resultado una estructura fibrilar observada a 430 y 4300 aumentos mediante SEM y TEM respectivamente, asimismo fueron realizadas pruebas mecánicas en las cuales se obtuvieron como parámetros el punto de ruptura:  $1.5 \pm 0.2$  MPa y un módulo elástico de  $26.1 \pm 4$  MPa. En cuestión de bioactividad se realizó con el uso de células del músculo liso aórtico, éstas presentaron un gran crecimiento celular en 7 días por lo cual se concluye que el material obtenido cumplió con las características deseadas. Sin embargo esta investigación no presenta un análisis de biodegradabilidad ni análisis FTIR o de cualquier otro espectro.

Para el año 2004 se realiza el estudio de los efectos del peso molecular promedio en peso ( $P_M$ ) del polímero en la estructura de la fibra del alcohol polivinílico electrostático (PVA). En el cual se disolvió PVA con un grado de hidrólisis de 98-

99% y con pesos moleculares que oscilaban entre 9000 y 186,000 g/mol en agua. La concentración (C) del polímero en la solución se varió dependiendo del peso molecular. La solución fue electrohilada a 30 KV y la muestra obtenida en el colector fue examinada por microscopía electrónica de barrido. Asimismo se calcula la viscosidad intrínseca ( $[\eta]$ ) teórica del material mediante la ecuación de Mark–Houwink. Se observó que para cada peso molecular, una estructura fibrosa se estabilizaba por encima de una concentración mínima, generalmente correspondiente a  $[\eta] C > 5$ . El diámetro promedio de fibra estaba entre 250 nm y 2  $\mu$ m. El diámetro de la fibra aumenta con el  $P_M$  y la concentración. A bajos  $P_M$  y/o concentraciones ( $[\eta] C < 9$ ), las fibras exhiben una sección transversal circular. Las fibras planas se observaron a alto  $P_M$  y concentraciones ( $[\eta] C > 9$ ). Por lo cual se concluye que el peso molecular así como la concentración del polímero en el medio acuoso es de gran importancia debido a que su estructura y resistencia estructural están directamente ligadas (Koski, Yim, & Shivkumar, 2004).

En el año 2006 se desarrolló un andamio hueco y poroso a partir de PLGA mediante la técnica de electrospinning en la universidad de Bath, Reino Unido (Ellis & Chaudhuri, 2006). Se detalla que las limitaciones de transferencia de masa de los andamios en ese entonces dificultaban el desarrollo de construcciones de tejido tridimensional, clínicamente viables. Se desarrolló un andamio de membrana de fibra hueca de PLGA que proporciona soporte para el cultivo celular, permite la pseudovascularización in vitro y proporciona canales para la angiogénesis in vivo. Se produjeron membranas de lámina plana PLGA usando 1, 4-dioxano y 1-metil-2-pirrolidinona (NMP) como solventes y agua como no solvente, y membranas de fibra hueca, usando NMP y agua, por hilatura en seco / húmedo y húmedo. Las fibras resultantes tenían un diámetro exterior de 700  $\mu$ m y un diámetro interior de 250  $\mu$ m con poros de 0.2 a 1.0  $\mu$ m en la superficie de cultivo. Se demostró que la variación del espacio y la temperatura del aire al girar cambian la morfología de las fibras. La introducción de un espacio de aire de 50 mm hizo que se formara una piel densa de 5  $\mu$ m de espesor, en comparación con una piel de 0,5  $\mu$ m de espesor sin un espacio de aire. El hilado a 40 ° C produjo fibras con una sección

central más abierta en la pared que contenía más macrovoides y más grandes en comparación con las fibras hiladas a 20°C. El cultivo de la línea celular osteogénica inmortalizada 560pZIPv.neo (pZIP) se llevó a cabo en las láminas planas de PLGA en cultivo estático y en un biorreactor de fibra hueca PLGA en condiciones de flujo a contracorriente. El acoplamiento y la proliferación fueron estadísticamente similares al poliestireno de cultivo de tejidos en las hojas planas y también fue exitoso en el biorreactor de fibra hueca. Se establece que las fibras huecas de PLGA son un andamio prometedor para abordar las limitaciones de tamaño que se observaban en construcciones de la ingeniería tisular.

De acuerdo con Meneghello *et al.*, 2009 se continuó con el trabajo propuesto por Ellis *et al* en el 2006 con la adición de PVA al material compuesto. En este trabajo se establece que la adición de PVA a las partículas de hilado de PLGA da como resultado membranas de fibras huecas porosas asimétricas con tamaños de poros medios que aumentan linealmente desde 0.54  $\mu\text{m}$  para PLGA a 1.1  $\mu\text{m}$  para PVA al 5%, y la porosidad aumenta de 0.46 a 0.77. Una disminución exponencial en el ángulo de contacto del agua de 64° a 50° indica que el PVA mejora la hidrofiliidad de las membranas de fibra hueca de PLGA. En la transferencia de fluido el flujo de agua pura solo se obtuvo con fibras de PLGA con PVA al 5%, y estas fibras no mostraron rechazo de soluto de albúmina sérica bovina (BSA), flujo reducido o tamaño de poro debido a la incrustación. Se observó una disminución en la resistencia mecánica de 109 a 75 MPa, sin embargo, esto no resultó perjudicial en el manejo de las fibras. Los autores concluyen que la adición de PVA en un 5%, a los materiales de PLGA electrohilados, mejora las propiedades del andamio de membrana de la fibra hueca de PLGA, lo cual permite la humectación sin la necesidad de añadir un agente humectante, el hueco presente en la fibra es necesario para el flujo de agua pura y la permeación de proteínas.

En el año 2010 se desarrollaron nano fibras PVA con colágeno e hidroxiapatita para su aplicación en huesos en la ingeniería de tejidos (Asran *et al.*, 2010). En este trabajo se establece la interacción de los grupos hidroxilo entre el PVA y el

colágeno como para la unión de estos mediante puentes de hidrógeno, asimismo se concluye que los resultados muestran la posibilidad de producir un nuevo andamio de nano fibras (NF) biocompuesta en 3-D para posibles aplicaciones de injerto óseo, que tiene biocompatibilidad y composiciones similares a las del hueso. Las fotografías microscópicas mostraron que los NF biocompuestos de PVA / Col / n-HAp tenían una nano estructura similar al hueso en el que los cristales de HAp con forma de nano varilla se alinearon a lo largo de los NF de PVA / Col. La alineación de n-HAp, Col y PVA fue auto ensamblada por una fuerte interacción de enlaces de hidrógeno entre ellos. El andamio PVA / Col / n-HAp NCNF (7 cm x 11 cm), tiene una estructura porosa con un tamaño y forma de poro controlables, el tamaño de los poros está en el rango de 650  $\mu\text{m}$  con una porosidad del 49.5%. El andamio puro de PVA NF electrohilado (sin n-HAp) mostró una resistencia a la tracción de  $0.22 \pm 0.09$  MPa y módulo elástico de  $2.67 \pm 0.78$  MPa. Mezclar el tipo Col con PVA aumenta la resistencia a la tracción para los electrohilados de PVA / Col NFs a  $0.62 \pm 0.13$  MPa y el módulo elástico a  $4.97 \pm 2.41$  MPa. La introducción de nano partículas de Col y 5% en peso de HAp aumenta la resistencia a la tracción de las nano fibras de biocompuestos en el andamio a  $1.03 \pm 0.17$  MPa y el módulo elástico a  $11.10 \pm 3.38$  MPa. Se presentó un aumento adicional del contenido de n-HAp hasta un 10% en peso, lo cual disminuye la resistencia a la tracción a  $0.17 \pm 0.05$  MPa y el módulo elástico a  $30.10 \pm 0.94$  MPa. En conclusión, las propiedades más notables del biocompuesto electrohilado PVA / Col / n-HAp NF no solo determinan la composición sino que también imitan la estructura jerárquica de la MEC y la organización mineral en el hueso a nivel de nano escala, lo que puede abrir una gran variedad de aplicaciones para materiales de injerto óseo bioactivos superiores, especialmente para ingeniería de tejido óseo sin carga.

Para el año 2014 se realizó una revisión de polímeros aplicados como materiales en la ingeniería de tejidos, en la cual se destaca el uso de PLGA en una proporción 75:25 de ácido poliláctico y ácido glicólico respectivamente (Gentile, Chiono, Carmagnola, & Hatton, 2014). En el trabajo se destaca que las nano fibras

electrohiladas poseen muchas ventajas, tales como una relación superficie-volumen extremadamente alta, un tamaño de poro inter fibroso pequeño con porosidad ajustable, así como amplias posibilidades para lograr propiedades y funcionalidades deseables; además, en la regeneración ósea, se supone que las fibras electrohiladas desempeñan un papel en el mantenimiento de las propiedades mecánicas, además de permitir la biodegradabilidad y actuar como un andamio osteoconductor real después de la adición o estar recubiertas por partículas cerámicas. Menciona además, que las partículas de nano-HA influyen fuertemente en las propiedades mecánicas, lo que muestra que la adición de nano-HA al 20% (p/p) influye fuertemente en el módulo de Young de las mallas compuestas electrohiladas. Sin embargo, el módulo disminuye cuando la concentración de nano-HA se incrementa más del 20% en peso. Se menciona que la disminución en el módulo puede deberse a malas propiedades interfaciales entre las partículas y el polímero.

Un año después, se realiza una nano-fibra de PVA-metacrilato modificada con CDI y colágeno tipo I (Oktay *et al.*, 2015). Se reporta la exitosa fabricación de andamios nanos fibrosos entrecruzados homogéneamente por electrospinning combinado con radiación UV en un solo paso. Las fibras nanométricas mostraron un entrecruzamiento eficiente con la foto-reticulación in situ durante el proceso de electrospinning para lograr nano fibras más resistentes. Se prepararon dos soportes diferentes, y se cultivaron células de fibroblasto 3T3 y ECV304 sobre las superficies. Se demostró que la morfología de los andamios nanos fibrosos proporciona una mayor área de superficie para la unión y propagación de las células. Las observaciones de la morfología celular, las pruebas de viabilidad y la migración de las células dentro de la matriz indican que los andamios nanos fibrosos modificados con colágeno muestran un mejor comportamiento no citotóxico y podrían ser un candidato potencial para las aplicaciones de ingeniería de tejidos.

A inicios del año 2017 se presenta un trabajo donde se realiza una fibra electrohilada de PLGA con colágeno tipo I para el estudio de su influencia sobre los hepatocitos, el soporte y la viabilidad *in vitro* de la fibra (Brown *et al.*, 2017). El trabajo presentado demuestra que los andamios nanos fibrosos 3D electrohilados de PLGA modificados con colágeno tipo I se unen mediante la interacción de puentes hidrógeno y aumentan la actividad sintética de hepatocitos humanos primarios y pueden servir como material de partida biosintético para el cultivo a largo plazo de hepatocitos primarios. Después de la modificación, el andamio electrohilado nano fibroso altamente poroso desarrollado por la técnica de electrospinning imita la estructura de la MEC *in vivo*, que es esencial para la interacción y función de los hepatocitos. Este microentorno poroso está completamente ausente en el cultivo tipo sándwich de la MEC, que está limitado por su producción en células transformadas y una composición de proteína potencialmente inconsistente. Se demostró que la incorporación de componentes esenciales de la MEC en andamios biosintéticos 3D conduce a un mejor desempeño *in vitro* de los hepatocitos humanos primarios estimulados específicamente por el colágeno tipo I. Se plantea que en estudios futuros, este sistema, ya sea solo o en combinación con otras moléculas de la MEC, puede servir como una plataforma para investigar los componentes individuales necesarios para optimizar aún más la función hepática para aplicaciones biomédicas como la detección farmacológica, las pruebas basadas en enfermedades y la terapia celular humana.

A mediados del año 2017 se presenta un trabajo donde se realizan fibras biodegradables electrohiladas a partir de PLGA (75:25) y colágeno tipo I como un posible material sustituyente para la piel en la ingeniería de tejidos (Sadeghi-Avalshahr *et al.*, 2017). Se prepararon andamios electrohilados de colágeno tipo I con PLGA para su uso en ingeniería de tejidos de la piel. El diámetro de la fibra y la distribución del tamaño de los poros se midieron  $200 \pm 60$  nm y 4–30  $\mu$ m respectivamente. La resistencia mecánica del andamio podría ser aceptable para aplicaciones de ingeniería de tejidos de la piel, pero la tensión no fue satisfactoria.

La degradación del andamio se midió aproximadamente en un 29% después de 4 semanas, lo que es adecuado para los sustitutos temporales de la piel. Los estudios celulares mostraron que las líneas celulares HDF y HaCat tenían una buena adherencia superficial en el andamio. Mientras que los fibroblastos proliferaron con el tiempo, la población de queratinocitos disminuyó. Asimismo se observó mediante espectro infrarrojo la presencia de los grupos activos pertenecientes al PLGA y el colágeno tipo I. En general, parece que las propiedades mecánicas y el diámetro de la fibra deben modificarse para que este andamio sea aplicable como sustituto de la piel.

Asimismo en el año 2018 se presenta un trabajo de un andamio 3D a partir de la previa purificación de colágeno tipo I para la creación de sustitutos biológicos con utilidad en la ingeniería de tejidos (Adragna *et al.*, 2018). En esta ocasión el trabajo hace uso de una impresora 3D para recrear andamios fibrosos (a diferencia del resto presente en este estado del arte donde se reportan materiales nanos fibrosos). Sin embargo es el uso del material base y la aplicación lo que da importancia de este trabajo en la presente tesis. La metodología propuesta de purificación permitió la obtención de colágeno tipo I con un alto grado de pureza, adecuado para ser empleado en impresión 3D de andamios. Uno de los objetivos planteados fue la preparación de una biotinta de colágeno apta para la impresión tridimensional de una estructura compleja; con adecuada fidelidad de impresión y que pueda dispensarse a través de la boquilla de la bioimpresora. La viscosidad del material fue un determinante clave, por lo que se hicieron las correspondientes mediciones reológicas que permitieron confirmar un comportamiento adecuado del fluido de alta viscosidad. La impresión tridimensional a temperatura ambiente de la biotinta de colágeno descrita en el presente estudio permitió la fabricación precisa de andamios 3D para uso biomédico. El uso de la técnica de impresión 3D por deposición controlada de capa, previo diseño, permite el acceso a un método económico y asequible. El objetivo del presente trabajo fue cumplido y ha sentado las bases para la realización de futuros ensayos sobre los andamios impresos con cultivos celulares sobre los mismos, así como la posibilidad de aplicación de

dichos andamios in vivo en animales permitiendo la adhesión, diferenciación y posterior migración de las células circundantes.

## 2.2 Marco teórico

### 2.2.1 Ingeniería de tejidos

El término ingeniería de tejidos nació en 1987 y se desarrolló como una alternativa al trasplante tradicional de órganos debido a la escasez o rechazo por parte de los pacientes. La convención fundamental de la ingeniería de tejidos parte de la capacidad del cuerpo humano para curarse a sí mismo, que depende del tipo de enfermedades o heridas, del tejido, el grado de daño, pérdida de la función y el número de tejidos involucrados. El proceso de reparación, sin embargo, se ha mejorado en gran medida gracias a los avances en la tecnología médica (Q. Chen *et al.*, 2013). El concepto actual de la ingeniería de tejidos implica la combinación de un andamio con células y/o biomoléculas para promover la reparación y regeneración de tejidos dañados.

La necesidad actual de reemplazo, reparación y regeneración de órganos y tejidos para pacientes se encuentra en continuo crecimiento, tal que los suministros disponibles no cubren la demanda existente (Ikada, 2006). Para superar estas desventajas, se han investigado el uso de biomateriales como alternativa al trasplante. Estos biomateriales se pueden definir como “materiales implantables que desarrollan su función en contacto con tejidos vivos”. En el desarrollo de cualquiera de ellos se deben tener en cuenta dos conceptos clave: biocompatibilidad y biofuncionalidad. Por biocompatibilidad se entiende la capacidad del material para ser aceptado por el medio biológico en contacto con el mismo (Palacios Casarrubias, 2018). La biofuncionalidad del biomaterial debe asegurar una buena transmisión de cargas y distribución de fuerzas entre el implante y la zona de reparación.

De acuerdo con el Instituto Nacional de Bioingeniería e Imágenes Biomédicas (NIBIB) la ingeniería de tejidos evolucionó del campo de desarrollo de biomateriales y se refiere a la práctica de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. El objetivo de la ingeniería de tejidos es recopilar ideas o teorías que restauren, mantengan o mejoren los tejidos dañados u órganos completos. La piel y los cartílagos artificiales son ejemplos de tejidos fabricados por ingeniería que han sido aprobados por la FDA; sin embargo, actualmente tienen un uso limitado en pacientes humanos. Parte fundamental de la ingeniería de tejidos son las células debido a que son los componentes fundamentales del tejido, y los tejidos son la unidad básica de la función en el cuerpo. Generalmente, grupos de células forman y secretan sus propias estructuras de soporte, llamadas matriz extracelular (MEC). Esta matriz, o andamio, hace más que sólo servir como soporte para las células; también actúa como una estación repetidora para varias moléculas de señalización. Por consiguiente, las células reciben mensajes de muchas fuentes que se vuelven disponibles desde el entorno local. Cada señal puede iniciar una cadena de respuestas que determina qué le sucede a la célula. Al entender cómo responden las células individuales a las señales, cómo interactúan con su entorno y cómo se organizan en los tejidos y organismos, los investigadores han podido manipular estos procesos para sanar los tejidos dañados o incluso crear nuevos.

El proceso frecuentemente comienza con la construcción de un andamio a partir de un amplio grupo de fuentes posibles, desde proteínas hasta plásticos. Una vez que se crean los andamios, se pueden introducir células con o sin un “coctel” de factores de crecimiento. Si el entorno es adecuado, se desarrolla un tejido. En algunos casos, las células, los andamios y los factores de crecimiento se mezclan todos al mismo tiempo, permitiendo que el tejido se “autoensamble”. Otro método para crear un tejido nuevo utiliza un andamio existente. Las células de un órgano donado se desprenden y el andamio de colágeno restante se usa para crecer un tejido nuevo. Este proceso ha sido utilizado para la bioingeniería de tejidos de corazón, hígado, pulmón y riñón. Este enfoque ofrece grandes esperanzas para

utilizar el andamiaje con el tejido humano descartado durante una cirugía y combinarlo con las propias células de un paciente para hacer órganos personalizados que no sean rechazados por el sistema inmunológico.

### 2.2.2 Tipos de andamios

Los andamios son aquellos materiales que permiten la migración y adhesión celular, la difusión de nutrientes, de factores de crecimiento y de factores expresados por la misma célula. Asimismo son estructuras capaces de desarrollar distintas funciones simultáneamente: ejercer/soportar funciones mecánicas necesarias para el funcionamiento celular. Las características con las que un andamio debe cumplir son: debe ser apropiado para la adhesión/proliferación/diferenciación celular, altamente poroso permitiendo así e crecimiento celular/transporte de nutrientes/flujo de residuos, debe ser biocompatible/bioabsorbible, presentar resistencia a la tensión, adaptables para la liberación de fármacos/biomoléculas/liberación sostenida para factores de crecimiento (Granados, Montesinos-Montesinos, & Álvarez-Pérez, 2017).

Los métodos más usados para la creación de nano andamios usados en la ingeniería de tejidos son por medio de: electro spinning o electrohilado, auto ensamblado, auto montaje y por secuencia RGD. De acuerdo al método empleado para la producción de andamios estos pueden presentar diversas características morfológicas, tales son: esponja, fibras, hidrogeles o micro esferas.

### 2.2.3 Andamio fibrilar

Los andamios fibrilares han recibido un enorme interés como futuros biomateriales con potencial aplicación en el campo de la biomedicina regenerativa.

Los resultados obtenidos por M. Granados *et al.*, 2017, muestran que los andamios fibrilares con diámetros en escalas nanométricas aumentan la

biocompatibilidad celular in vitro, probándose al realizar ensayos de adhesión, proliferación y de interacción célula-material al cultivar células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea. Sus datos indican que las membranas fibrilares de PLA aumentan la respuesta celular, no son citotóxicas al compararse con las películas delgadas de PLA. Por lo tanto; se tiene el potencial para la fabricación de membranas hiladas con una facilidad de procesamiento y podría ser un prometedor biomaterial económico con futuras aplicaciones en la regeneración de tejidos.

Para su producción es necesario el uso de materiales a base de polímeros sintéticos, algunos de estos son: ácido poli glicólico (PGA), ácido L-láctico, ácido DL-láctico, ácido poliláctico (PLA), b-caprolactona, poli hidroximetacrilato de etilo (PHEMA), por mencionar algunos.

Los métodos más usados para la creación de nano andamios usados en la ingeniería de tejidos son por medio de: electro spinning o electrohilado, auto ensamblado, auto montaje y por secuencia RGD.

#### 2.2.4 Electrospinning

La técnica de electrospinning o electrohilado, ha sido ampliamente estudiada durante los últimos años gracias a la posibilidad de crear fibras en escala micro y nanométrica para una gran variedad de aplicaciones biomédicas, esta técnica aporta a los elementos desarrollados diversas características como: amplia superficie por unidad de área, porosidad y una serie de propiedades mecánicas, siendo atractiva a nivel biotecnológico. La técnica es versátil y de fácil ensamble lo que ha permitido procesar una gran variedad de polímeros, integrando en los últimos años otras clases de materiales, sin embargo durante el desarrollo del proceso existen una serie de variables que influyen en las características de los elementos obtenidos, ya sea porque están ligadas a las características del

material base o porque su desempeño está relacionado con otros parámetros dentro del proceso (Duque Sánchez *et al.*, 2013).

El proceso de electrospinning permite obtener fibras por medio de estiramiento coaxial de una solución viscoelástica (Teo & Ramakrishna, 2006), estas fibras poseen diámetros que van de las sub-micras a los nanómetros rangos en los que es posible encontrar características únicas, entre las que se encuentra: un área superficial muy grande en relación al volumen (Tong, Zhang, & Wang, 2012) (en el caso de las nano-fibras, esta relación puede ser un aproximado de  $10^3$  veces más que una microfibra) (Huang, Zhang, Kotaki, & Ramakrishna, 2003), flexibilidad en la superficie, alta porosidad (Khil, Bhattarai, Kim, Kim, & Lee, 2004; C. Li, Vepari, Jin, Joo, & Kaplan, 2006; W. Li, Laurencin, Caterson, Tuan, & Ko, 2001; Ma, Ph, Kotaki, Ph, & Inai, 2005; Smith & Ma, 2004), poros interconectados (Jiang, Hu, Li, & Zhao, 2005) y un rendimiento mecánico superior comparado con otras formas ya conocidas del material, estas características hacen de las nano fibras, óptimos candidatos para una variedad de aplicaciones, entre ellas: ingeniería de tejidos (B. S. Agarwal, Wendorff, & Greiner, 2009; Dersch, Steinhart, Boudriot, Greiner, & Wendorff, 2005; Gomes, Leonor, Mano, Reis, & Kaplan, 2012; Jayaraman, Kotaki, Zhang, Mo, & Ramakrishna, 2004; M. Li *et al.*, 2005; W. Li, Mauck, & Tuan, 2005; Lutolf & Hubbell, 2005; Prabhakaran, Kai, Ghasemi-mobarakeh, & Ramakrishna, 2011), textiles [(Jayaraman *et al.*, 2004), (Raj *et al.*, 2011; Srinivasan & Renekers, 1995; Subbiah, Bhat, Tock, Parameswaran, & Ramkumar, 2004; Xue, Chen, Yin, Jia, & Ma, 2012)], elementos para cubrir heridas (S. Agarwal, Wendorff, & Greiner, 2008; Ngawhirunpat, Opanasopit, Rojanarata, & Akkaramongkolporn, 2009), medios de filtración (Gopal *et al.*, 2006; Myoung *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010), membranas especiales (Ma *et al.*, 2005; Venugopal & Ramakrishna, 2005) y diversas aplicaciones médicas (S. Agarwal *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2005; Chronakis, 2005), tales como reemplazo de huesos, implantes dentales, sistemas de liberación de fármacos, injertos vasculares, vasos sanguíneos artificiales entre otros.

La técnica de electrospinning consiste en hacer girar soluciones de polímero a través de altos campos eléctricos, se basa en aplicar suficientes fuerzas eléctricas que superen las fuerzas de la tensión superficial en la solución de polímero cargado, de esta forma a un voltaje determinado, finos chorros de solución son expulsados desde el capilar hasta el plato colector. Posteriormente el chorro se mueve en la dirección del campo eléctrico, elongándose de acuerdo a las fuerzas externas e internas y experimentando inestabilidad en algunas ocasiones (Chew, Wen, Dzenis, & Leong, 2006). El disolvente se evapora y los segmentos de fibras son depositados al azar en un sustrato.

El típico montaje para la ejecución de la técnica de electrospinning (figura 1), consta de un capilar a través del cual debe ser expulsada la solución polimérica (aguja, cono, etc.); una fuente de alto voltaje que posee dos electrodos los cuales deben conectarse uno al lugar de salida de la solución y otro directamente al plato colector que puede ser: lamina de metal conductor, mandril rotativo, etc. (Duque Sánchez *et al.*, 2013) donde se depositarán las fibras posterior a la evaporación del disolvente.

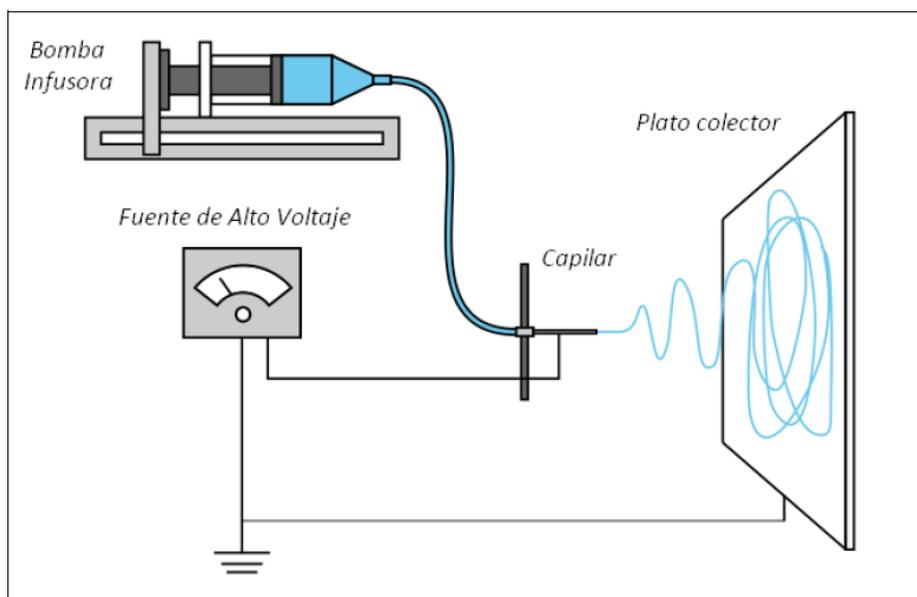


Figura 1. Montaje típico de la técnica de electrospinning (Duque Sánchez *et al.*, 2013).

La técnica puede ser desarrollada de forma horizontal o vertical según se desee, figura 2, el principal inconveniente al trabajar en posición vertical es la posible salida de gotas de solución desde el capilar hacia el plato colector las cuales pueden caer sobre las fibras depositadas haciendo defectuosa la superficie de las mismas e interrumpiendo el proceso. Para impulsar la solución a través del capilar puede utilizarse una bomba de infusión; si se trabaja de forma horizontal con cono como capilar, la salida de la solución puede estar determinada por la fuerza de gravedad ligada a la viscosidad de la solución.

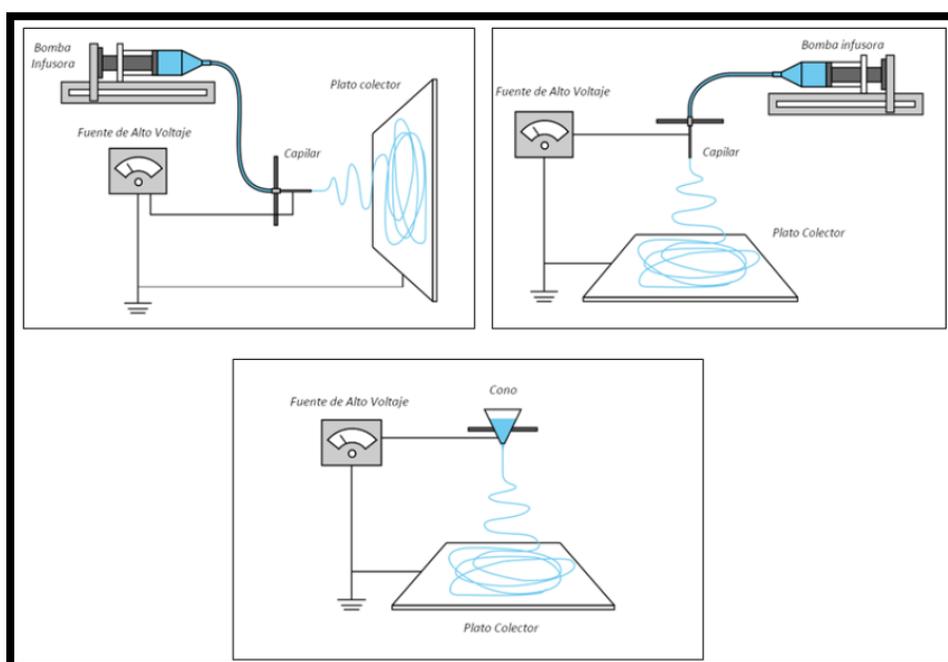


Figura 2. Diversos ensambles de la técnica de electrospinning.

Para el inicio del proceso, el polímero debe estar diluido en el o los disolventes que permitan una dilución completa del mismo (debe ser completa, para evitar taponamiento del capilar durante el proceso) pero que a la vez promuevan la obtención de fibras homogéneas. Los polímeros son dieléctricos, en presencia de un campo eléctrico pueden considerarse como un arreglo de dipolos eléctricos microscópicos compuestos por cargas positivas y negativas cuyos centros no coinciden perfectamente (Duque Sánchez *et al.*, 2013), se mantienen en su lugar por acción de las fuerzas atómicas y moleculares, y solo pueden cambiar su

posición ligeramente en respuesta a fuertes campos eléctricos externos, lo que explica por qué ocurre el estiramiento de la solución en el proceso. Son llamadas cargas ligadas en contraposición a cargas libres que determinan la conductividad en otro material “conductor”. En ocasiones para incrementar las propiedades dieléctricas de la solución, algunos disolventes con altas constantes dieléctricas son adicionados (Lee, Kim, Khil, Ra, & Lee, 2003), esto favorece la formación de fibras con menos estructuras defectuosas (las estructuras defectuosas conocidas como *beads*, decrecen la superficie por unidad de área del proceso) y con diámetros reducidos (Keun, Ho, Seung, & Ho, 2004; Son, Youk, Lee, & Park, 2003). Una vez se tiene la solución en el lugar sea jeringa o cono se inicia la aplicación de alto voltaje, cuando este potencial eléctrico se aplica, las cargas se acumulan promoviendo la formación de una gota en la punta del capilar, a medida que la intensidad del campo eléctrico se incrementa, la gota se alarga para crear una forma cónica conocida como cono de *Taylor* (Taylor, 1969). La fuerza del campo eléctrico supera las fuerzas de cohesión de la solución, en la mayoría de los casos dominada por la tensión superficial, es así como un chorro de solución de polímero inicia un viaje desde la punta del capilar hasta el plato colector; en su viaje, el chorro de solución polimérica es alargado debido a las interacciones electrostáticas entre las cargas cercanas a segmentos del mismo chorro, mientras tanto, el disolvente se evapora, finalmente, las fibras se solidifican a su llegada al plato colector (Lannutti, Reneker, Ma, Tomasko, & Farson, 2007). Luego de ser extraídas del plato colector algunos autores sugieren mantener las fibras en vacío para eliminar el disolvente remanente (Jiang *et al.*, 2005; Ravichandran *et al.*, 2012). Es importante tener precaución durante la ejecución del proceso ya que algunos disolventes como el cloroformo, dimetilformamida y en general aquellos productos químicos nocivos, pueden emitir vapores perjudiciales para la salud, por lo que se recomienda incluir sistemas de ventilación y protección para quienes ejecutan el proceso (Huang *et al.*, 2003).

Existen diversos parámetros a considerar que están íntimamente relacionados con las propiedades y características de las fibras obtenidas por medio de

electrospinning por lo que su control durante la ejecución del proceso es indispensable, en la Tabla 1, se resume la influencia de los parámetros en las características de las fibras obtenidas (Duque Sánchez *et al.*, 2013).

*Tabla 1. Parámetros en el proceso de electrospinning.*

Parámetro		Característica que aporta
Concentración de la solución del polímero	+	Dificulta el paso de la solución a través del capilar.
	-	Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al plato colector.
Tensión superficial	+	Aparición de defectos (beads) en las fibras.
	-	Obtención de fibras lisas, para disminuir la tensión superficial se pueden adicionar solventes con baja tensión como el etanol.
Conductividad de la solución	+	Mayor transporte de cargas, mayor estiramiento de la solución, fibras más delgadas.
	-	Menor transporte de cargas, menor estiramiento de la solución, fibras más gruesas.
Voltaje	+	Fibras gruesas, distorsión del jet, aparición de beads.
	-	Poco impulso para llegada de la solución al plato colector.
Flujo de salida	+	Fibras más gruesas, beads con mayores tamaños.
	-	Mayor tiempo para evaporación del solvente, fibras sin defectos.
Distancia aguja-colector	+	Las fibras pueden romperse debido a su propio peso. Mayor estiramiento de la solución, obtención de fibras delgadas.
	++	Aparición de defectos (beads) en las fibras al trabajar con muy amplias o muy cortas distancias.
	--	
	-	Poco tiempo para la evaporación del solvente por tanto, las fibras llegan húmedas al plato colector.
Humedad relativa	+	Aparición de poros en las nano-fibras.

A continuación se describen los efectos que tienen los parámetros utilizados sobre el presente trabajo en la producción de fibras durante el proceso de electrospinning.

**Concentración de la solución:** es uno de los parámetros determinantes del tamaño y la morfología de las fibras. La concentración de polímero en la solución influye tanto la viscosidad como la tensión superficial de esta, la viscosidad de una solución de polímero está relacionada con el enredo de las cadenas poliméricas, si las cadenas son menos enredadas, la solución tendrá una viscosidad baja y viceversa. El diámetro de las fibras tiende a aumentar con la viscosidad. Si la solución está muy diluida las fibras de polímero se rompen en gotas antes de llegar al plato colector debido al efecto de la tensión superficial, de igual forma si la solución está muy concentrada entonces las fibras no se podrán formar debido a la alta viscosidad, lo que dificulta el paso de la solución a través del capilar (Duque Sánchez *et al.*, 2013).

**Tensión superficial:** La tensión superficial intenta reducir el área superficial por unidad de masa, cambiando los chorros (jets) por esferas, al aplicar el alto voltaje se busca aumentar la superficie oponiéndose a la formación de *beads* y favoreciendo la formación de chorros más delgados, en este caso es la fuerza viscoelástica la que se resiste a cambios rápidos en la forma. El coeficiente de tensión superficial depende del polímero y el disolvente, adicionar algunos como el etanol a una solución con baja tensión superficial, podría contribuir a la obtención de fibras lisas (Duque Sánchez *et al.*, 2013).

**Voltaje:** El voltaje es uno de los parámetros más importantes dentro del proceso de electrospinning, algunos autores afirman que aplicar voltajes altos hace que más fluido se transporte en el chorro lo que resulta en fibras con mayores diámetros, en la mayoría de los casos un voltaje alto permite un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerza de coulomb en el chorro y un fuerte campo eléctrico, todos estos factores promueven una reducción en el diámetro de las fibras. La influencia del voltaje depende además de las propiedades visco-elásticas del material base, por ello es importante analizar el comportamiento para cada polímero con su respectivo disolvente (Duque Sánchez *et al.*, 2013).

**Distancia aguja-colector:** De acuerdo con la literatura, al trabajar con distancias muy grandes las fibras electrohiladas podrían romperse debido a su propio peso, especialmente si las fibras son de diámetro pequeño. Se requiere una mínima distancia para dar a las fibras el tiempo suficiente para que el disolvente se evapore antes de alcanzar el plato colector, con distancias muy grandes o demasiado pequeñas se ha observado la aparición de *beads* o fibras húmedas que promueven la obtención de fibras aplanadas o con forma de cintas (Duque Sánchez et al., 2013). La mayoría de los autores coinciden en que con mayores distancias la solución tendrá mayor tiempo de vuelo lo que promoverá un mayor estiramiento de las fibras antes de depositarse en el plato colector.

#### 2.2.5 Poli vinil alcohol

El poli vinil alcohol (PVA) ha ganado popularidad como material de soporte de andamios para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Otorga estabilidad mecánica y flexibilidad a los andamios convencionales hechos de polímeros naturales (Youn Chang *et al.*, 2005). Además, los hidrogeles de PVA se han utilizado en una serie de aplicaciones biomédicas que incluyen lentes de contacto blandos (Hyon *et al.*, 1994), implantes de cartílago (J.-H. *et al.*, 1996), liberación de fármacos (Thanoo *et al.*, 1993), cubiertas de piel temporales o vendajes para quemaduras (Ficek & Peppas, 1993) y órganos artificiales (Masanori Kobayashi & Oka, 2004). Esto se debe a su inherente no toxicidad, no carcinogenicidad, buena biocompatibilidad y propiedades físicas deseables, como la naturaleza gomosa o elástica y un alto grado de hinchamiento en soluciones acuosas (M Kobayashi, 2003). Además, se ha seleccionado como el aditivo polimérico para producir matrices nano-fibras electrohiladas debido a su buena formación de fibras, biocompatibilidad y propiedades de resistencia química (Krumova *et al.*, 2000). La unidad monomérica repetitiva del PVA se muestra a continuación en la figura 3.

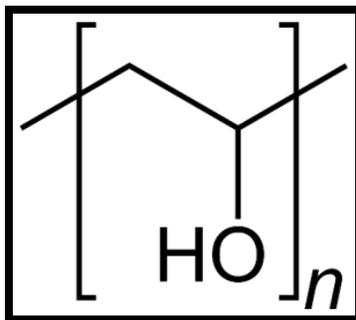


Figura 3. Unidad monomérica repetitiva del PVA (Asran, 2010).

### 2.2.6 Ácido poli (láctico-co-glicólico)

El ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) es un copolímero compuesto de ácido poli láctico (PLA) y ácido poli glicólico (PGA), ha atraído un interés considerable como material base para aplicaciones biomédicas debido a su: biocompatibilidad (Amini *et al.*, 2012); velocidad de biodegradación adaptada (según el peso molecular y la proporción del copolímero) (Ferrone & Raut, 2012); aprobación para uso clínico en humanos por parte de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) (Dimitriou *et al.*, 2011); potencial para modificar las propiedades de la superficie para proporcionar una mejor interacción con los materiales biológicos (Martou & Antonyshyn, 2011); e idoneidad para su exportación a países y culturas donde la implantación de productos derivados de animales no es bien vista (Stevens, 2008). La unidad monomérica repetitiva del PLGA se muestra a continuación en la figura 4.

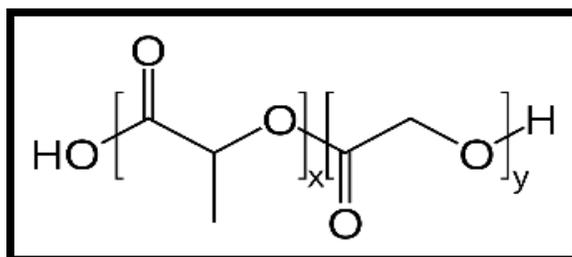


Figura 4. Unidad monomérica repetitiva del PLGA (Gentile, 2014).

### 2.2.7 Colágeno tipo I

El colágeno es una de las proteínas más abundantes en la naturaleza y es el responsable de mantener la integridad estructural de los tejidos. En la piel están presentes principalmente los tipos de colágeno sintetizados por los fibroblastos y los miofibroblastos. El colágeno ha sido utilizado en el diseño de sustitutos de la piel (Supp & Boyce, 2005), los derivados del colágeno bovino son hoy en día aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y percibidos como elementos de bajo riesgo. El colágeno bovino, disponible en tiras y hojas como película o en polvo, es asequible y de fácil manejo, tiene buena adherencia y excelente potencial de vascularización. Su desventaja se centra en la falta de función de barrera y elasticidad, y su incapacidad para prevenir la invasión bacteriana (MacNeil, 2008). Todas las moléculas de colágeno están compuestas por tres cadenas polipeptídicas en una conformación triple helicoidal, con una estructura primaria repetitiva con glicina en cada tercera posición y prolina o 4-hidroxiprolina que preceden a la glicina, tal como se puede observar en la figura 5. El colágeno tipo I difiere de otros colágenos por su baja hidroxilación de lisina y su baja composición en carbohidratos.

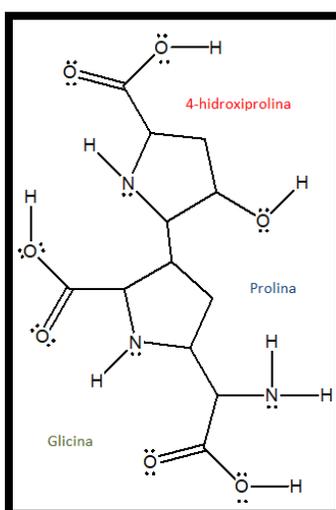


Figura 5. Estructura molecular del colágeno tipo I.

## 2.2.8 Técnicas de análisis utilizadas

### *2.2.8.1 Espectroscopia de infrarrojo*

La espectroscopia de infrarrojo es actualmente una de las técnicas analíticas más utilizadas en todo el mundo, por analistas, científicos y estudiantes, todo ello en un amplio campo de aplicaciones, por ejemplo en la medicina, alimentos, ambiental, ciencia de los materiales, biotecnología, ciencias forenses, etc. (Mondragón Cortez, 2017).

La radiación infrarroja se encuentra en el intervalo de  $13000$  y  $10\text{ cm}^{-1}$  o, entre  $0.77$  y  $1000\text{ }\mu\text{m}$ . En función de las distintas aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo por conveniencia la radiación infrarroja se ha clasificado en tres intervalos: infrarrojo cercano, infrarrojo medio e infrarrojo lejano. Siendo el intervalo de infrarrojo medio en donde se han encontrado las principales aplicaciones fundamentales.

La espectroscopia de infrarrojo estudia los fenómenos de interacción entre la radiación de origen infrarrojo y la materia. Esencialmente la energía de la radiación, localizada en determinada longitud de onda del infrarrojo, es absorbida por una molécula (o parte de ella) que se encuentra vibrando en su estado basal a la misma longitud de onda que la radiación infrarroja incidente, provocando con ello un cambio en la intensidad de la vibración. Una condición necesaria para que se produzca una vibración en una molécula al incidir sobre ella un haz de energía infrarroja es la presencia de momentos dipolares. Sí el momento dipolar es nulo no hay absorción de energía infrarroja, caso contrario, habrá absorción de energía infrarroja.

En una molécula los átomos no se encuentran fijos unos respecto a otros, sino que vibran alrededor de sus posiciones de equilibrio. La energía necesaria para generar una vibración depende de la energía de enlace y de la masa de los

átomos involucrados. Las vibraciones en una molécula pueden hacerlo con ciertos valores de energía. La existencia de estos valores, para producir una vibración implica que sí se hace incidir fotones de energía adecuados (en el infrarrojo), éstos serán absorbidos solamente por aquellas uniones atómicas que posean un momento dipolar. El momento dipolar de enlace es el producto entre el valor de las cargas y la distancia que las separa, o sea la longitud del enlace.

#### **2.2.8.2 Microscopia electrónica de barrido**

En un microscopio electrónico de barrido la imagen se obtiene a partir de las señales emitidas por la muestra y se va formando a medida que el haz de electrones se desplaza sobre una porción de su superficie. Este barrido (*scanning*) se realiza línea por línea sobre una pequeña zona de forma rectangular (*raster*). Esta zona es la que se visualiza ampliada en la imagen final. A medida que el haz explora la muestra de esta manera la intensidad de la señal generada varía según el punto particular analizado en cada instante. La señal detectada puede ser entonces analizada y ampliada, tanto en su forma analógica como digital, y finalmente procesada convenientemente.

A diferencia de una imagen óptica, el microscopio electrónico de barrido no forma una imagen real del objeto sino que construye una imagen virtual a partir de alguna de las señales emitidas por la muestra. La imagen se visualiza en un tubo de rayos catódicos donde las bobinas de deflexión del haz están sincronizadas con el barrido del haz de electrones en el microscopio. Modulando la intensidad del haz del tubo de rayos catódicos se obtiene finalmente un registro punto a punto en la pantalla que es precisamente la imagen electrónica proporcionada por el microscopio. Actualmente la visualización se realiza en la pantalla de una computadora (Ipohorski & Bozzano, 2013).

### **2.2.8.3 Análisis termogravimétricos**

Los efectos del calor sobre los materiales pueden ser varios y producir cambios en muchas de sus propiedades. En el análisis térmico, los cambios de peso configuran la base de la termogravimetría (TG), mientras que la medida de los cambios de energía constituye la base del análisis térmico diferencial (ATD) y de la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Así por ejemplo, la termogravimetría nos dice cuándo una muestra pierde o gana peso y cuánto, mientras que el ATD y el DSC nos dice si una reacción o cambio físico es endotérmico o exotérmico, y a menudo es capaz de medir la variación de calor.

En un análisis termogravimétrico se registra, de manera continua, la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada, o bien en función de la temperatura, o bien en función del tiempo. En el primer caso (experimento dinámico) la temperatura de la muestra va aumentando de manera controlada (normalmente de forma lineal con el tiempo), y en el segundo (experimento isoterma), la temperatura se mantiene constante durante todo el experimento. La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o de la temperatura se denomina termograma o curva de descomposición térmica. Existen otros tipos de análisis denominados de 2 termogravimetría diferencial donde se registra o representa la variación de masa o derivada con respecto a la temperatura o respecto al tiempo dependiendo de que el experimento sea dinámico o isoterma respectivamente (Skoog & Crouch, 2008).

### **2.2.8.4 Determinación de biodegradabilidad**

La revolución en la biología celular molecular, en combinación con los avances de la ciencia y la ingeniería de polímeros, está impulsando el campo de los biomateriales hacia nuevas aplicaciones y hacia una era de diseño molecular. Nuevas clases de materiales degradables e hidrogeles han sido desarrollados y asociados con ligandos moleculares para el control de comportamientos celulares

específicos. Actualmente, existen polímeros sintéticos bioabsorbibles utilizados en el campo biomédico, los cuales tienen la capacidad de degradarse, debido a reacciones de hidrólisis en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo humano. Después de cierto tiempo de ser implantados dan lugar a productos que no son tóxicos y que pueden ser eliminados por el organismo o metabolizados por éste (Conde & Damborenea, 2002).

Éstos son materiales atractivos para la elaboración de soportes en ingeniería de tejidos, los soportes fabricados a partir de este tipo de polímeros ofrecen la posibilidad de crear tejidos completamente naturales. En consecuencia, dejan de lado los problemas de infección y formación de tejido fibroso, asociados a los implantes permanentes (F. Ardila, A. Estupiñan, Vásques, & Y. Peña, 2011).

Una de las técnicas más recurridas para la determinación de la biodegradabilidad es el uso de un suero corporal simulado (SBF, por sus siglas en inglés). El SBF o plasma humano sintético es una solución con fuerza iónica similar a la del plasma de la sangre humana que se mantiene en las mismas condiciones de pH y temperatura fisiológicas (Kokubo, 1991).

Diversos estudios de la evaluación de la biodegradabilidad mediante la técnica de SBF son encontrados en la literatura (F. Ardila *et al.*, 2011; Gentile *et al.*, 2014; Ravichandran *et al.*, 2012; Sartuqui, 2017).

## CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

### 3.1 Descripción

#### 3.1.1 Fase preliminar

Se realizaron soluciones de poli vinil alcohol (PVA) con un peso molecular de 130,000 KDa (Sigma-Aldrich) y un grado de pureza de 88 y 98% a diferentes concentraciones (5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 y 25%) en tubos de ensayo con 10 mL de agua. Se realizó el calentamiento individual de cada uno de ellos a baño maría con el uso de una parrilla eléctrica a una temperatura de 70° C durante 2 h con una agitación magnética de nivel 3 en una parrilla de agitación modelo *nuova*, marca Thermolyne, con base en la metodología propuesta (Asran *et al.*, 2010). Asimismo se preparó el electrospinning con una aguja de 18,20 y 25 G a una distancia de 15 cm del colector que es un cilindro rotatorio realizando una variación de voltaje de 18 y 20 KV. El electrohilado se realizó usando 3 mL de cada solución con una duración de tiempo intercalada entre 2 y 3 h. Posteriormente las muestras obtenidas se analizaron bajo el microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6010LA. Se puede observar el proceso mencionado en el diagrama representado por la figura 6.

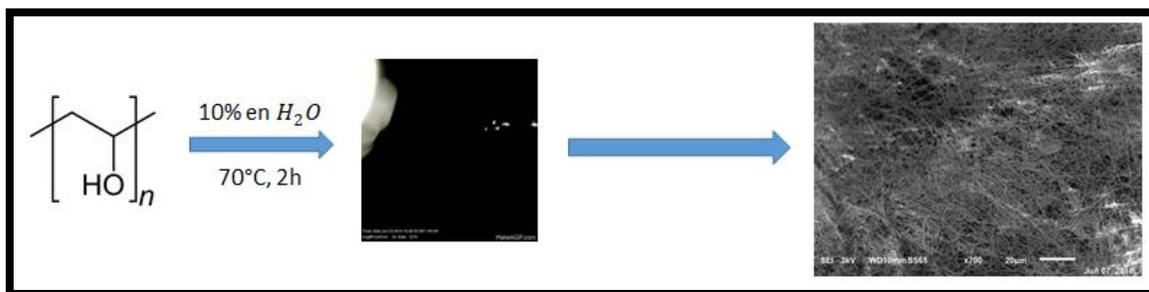


Figura 6. Diagrama representativo de la fase preliminar.

#### 3.1.2 Desarrollo de andamios AFP

Para el desarrollo de estos andamios todos los materiales utilizados fueron obtenidos por Sigma-Aldrich. Se consideraron las metodologías establecidas para

la interacción PVA/PLGA, PVA/Col y PLGA/Col (Asran *et al.*, 2010; Sadeghi-Avalshahr *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2012) las cuales requieren la preparación de dos mezclas que se integran en una segunda etapa. Con fundamento en la fase preliminar se usó una concentración de PVA (p.m. de 130 000 KDa con un grado de pureza del 99%) del 10% en una primer mezcla con 1,1'-carbonil-diimidazol (CDI, grado de pureza  $\geq 90\%$ ) una relación de PVA:CDI = 0.64 en una mezcla de CDI con Tetrahidrofurano (THF al 99%) al 15.95% la cuál fue sometida a una agitación de nivel 3 en una parrilla eléctrica marca *nouva*, modelo Thermolyne, durante 24 h a una temperatura de 40°C. Una segunda mezcla de ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA, 75:25 pm promedio de 76 000 – 115 000 KDa), y colágeno tipo I hidrolizado (Col, C9791) fue preparada en relación PLGA:Col = 4 en 20% w/v de 1,1,1,3,3,3-hexafluoruro-2-propanol (HFP, con grado de pureza del 99%), la cual fue sometida a una agitación de nivel 3 durante 24 h. Finalmente se realizó una integración de las mezclas añadiendo 1-metil-2-pirrolidinona anhídrida (NMP, con un grado de pureza del 99.5%) hasta llegar a una mezcla en relación de 20% w/v, la relación de PVA:PLGA debe mantenerse en 2. Las condiciones para el electrohilado fueron de 18 y 20 KV, una distancia entre la aguja y el colector de 11 cm, un diámetro de tamaño de aguja comercial de 18 G, así como en algunos casos la aplicación de un tratamiento térmico y refrigeración.

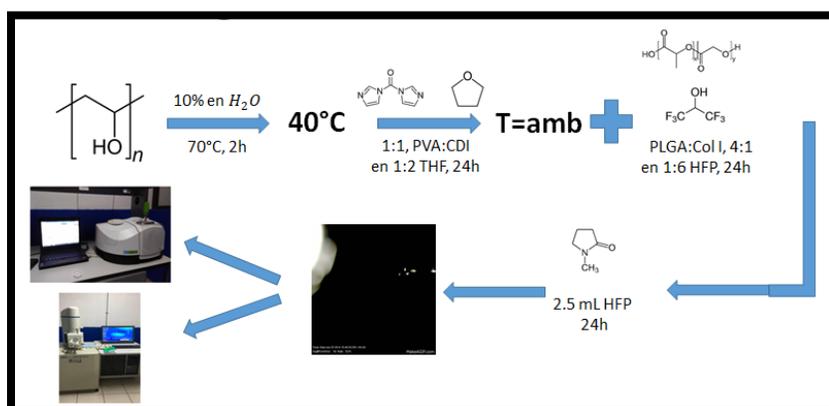


Figura 7, Diagrama representativo del desarrollo de los andamios AFP.

Posteriormente las muestras obtenidas se analizaron bajo espectro infrarrojo, marca Perkin Elmer modelo Spectrum Two, y el microscopio electrónico de barrido

marca JEOL modelo JSM-6010LA. Se puede observar el proceso mencionado en el diagrama representado por la figura 7.

### 3.1.3 Desarrollo de andamios EFP

Debido a que en los andamios AFP no se observaba una homogeneidad en la mezcla con HTF se propuso una variación en la metodología (Asran *et al.*, 2010; Sadeghi-Avalshahr *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2012) las cuales requieren la preparación de dos mezclas que se integran en una segunda etapa. Para el desarrollo de estos andamios todos los materiales utilizados fueron obtenidos por Sigma-Aldrich, poli vinil alcohol (PVA p.m. de 130 000 KDa y grado de pureza del 99%), ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA, 75:25 pm promedio de 76 000 – 115 000 KDa), colágeno tipo I hidrolizado (Col, C9791), 1,1'-carbonil-diimidazol (CDI, grado de pureza  $\geq 90\%$ ), Tetrahidrofurano (THF al 99%), 1,1,1,3,3,3-hexafluoruro-2-propanol (HFP, con grado de pureza del 99%) y 1-metil-2-pirrolidinona anhídrida (NMP, con un grado de pureza del 99.5%). Se realiza la fase preliminar propuesta con anterioridad a una concentración de PVA del 10% la cuál es agregada a una primera mezcla al 5% de CDI en THF, la relación de PVA:CDI fue establecida en 2, las condiciones de estás mezclas son establecidas a una temperatura de 40°C y una agitación de nivel 3 por 24 h. Posteriormente se agrega PLGA al 10% en NMP en una relación PVA:PLGA = 1.11 a temperatura ambiente durante 24 h. Finalmente se agrega Colágeno I al 10% en ácido acético en HFP (0.1% en HFP), guardando una relación de PVA:Col = 167, a una temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h.

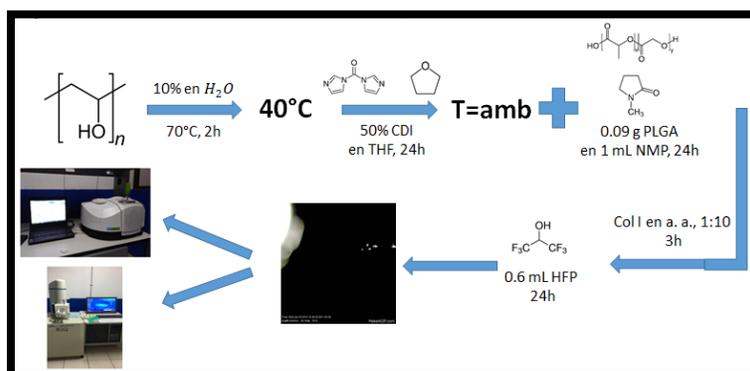


Figura 8. Diagrama representativo del desarrollo de los andamios EFP.

Las condiciones de proceso del electrospinning fueron de un diámetro interno de aguja comercial de 18 G, voltaje empleado de 18 KV y tiempo de procesamiento de 1 a 3h. Posteriormente las muestras obtenidas se analizaron bajo espectro infrarrojo y el microscopio electrónico de barrido. Se puede observar el proceso mencionado en el diagrama representado por la figura 8.

### 3.1.4 Desarrollo de andamios IFP

Para el desarrollo de estos andamios todos los materiales utilizados fueron obtenidos por Sigma-Aldrich, se desarrollaron en fases de distintas mezclas PVA 99% hidrolizado pm promedio de 130 000 KDa, PLGA 75:25 pm promedio de 76 000 – 115 000 KDa y Col I (C9791) realizando modificaciones en la metodología reportada (Sadeghi-Avalshahr *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2012), utilizando agua como solvente y HFIP ( $\geq 99\%$ ) como agente nano-estructurador. Los andamios fueron preparados mediante fases de agitación suave a condiciones térmicas de  $70^{\circ}\text{C}$  y 2 h de agitación para la dispersión de PVA en agua al 10% (mezcla A),  $58^{\circ}\text{C}$  y 5 minutos de agitación para la dispersión de colágeno tipo I en HFP al 0.3% (mezcla B) y  $24^{\circ}\text{C}$  con agitación constante agregando PLGA hasta lograr la homogenización de la mezcla A y B. Las condiciones de proceso del electrospinning fueron de un diámetro interno de aguja comercial de 18 G, voltaje empleado de 18 KV y tiempo de procesamiento de 1 a 3h.

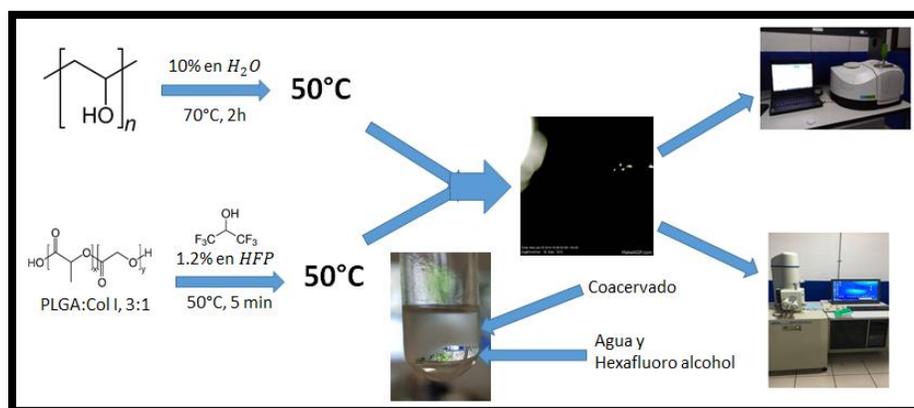


Figura 9. Diagrama representativo del desarrollo de los andamios IFP.

Posteriormente las muestras obtenidas se analizaron bajo espectro infrarrojo y el microscopio electrónico de barrido. Se puede observar el proceso mencionado en el diagrama representado por la figura 9.

### 3.2 Equipo

El equipo de FTIR utilizado fue marca Perkin Elmer modelo Spectrum Two (figura 10), el cual utiliza intervalos de medición desde  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $650\text{ cm}^{-1}$ .



*Figura 10. Equipo de FTIR, marca PerkinElmer modelo Spectrum two.*

El equipo de electrospinning empleado fue diseñado y construido por expertos en el tema. Figura 11.



*Figura 11. Equipo de electrospinning.*

Para obtener imágenes de alta resolución de la superficie de las muestras se utilizó un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6010LA (figura 12).



*Figura 12. Microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6010LA*

En cuanto a la prueba de viscosidad se empleó un circulador de refrigerante Thermo Haake K-20 de Sigma-Aldrich, figura 13.



*Figura 13. Circulador refrigerante Thermo Haake K-20.*

Se utilizó un equipo BlueHill Lite de Instron modelo 2519-107 para la medición de las propiedades mecánicas, figura 14.



*Figura 14. Equipo BlueHill Lite de Instron modelo 2519-107*

Para determinar el grosor del andamio se empleó un equipo micrómetro Digimatic IP65 Mitutoyo modelo MDC-1'MJ, figura 15.



*Figura 15. Micrómetro Digimatic IP65 Mitutoyo modelo MDC-1'MJ*

Para la determinación de la tensión superficial del fluido viscoelástico se empleó un Tensiómetro de anillo marca CSC-DuNOUY no. 7035, figura 16.



*Figura 16. Tensiómetro de anillo DSC-DuNOUY No. 7035.*

Los análisis termogravimétricos fueron realizados en el laboratorio del departamento de ingeniería química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla se utilizó el equipo marca NETZSCH modelo STA 449F3, figura 17.



*Figura 17. NETZSCH modelo STA 449F3.*

### 3.3 Análisis de grupos funcionales mediante FTIR

El equipo de FTIR utilizado fue marca PerkinElmer modelo Spectrum Two, con intervalos de medición desde  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $650\text{ cm}^{-1}$  (ATR), se analizaron cada una de las muestras y posteriormente se hizo la comparación con los FTIR encontrados en la literatura y los componentes en solitario para verificar la existencia de los grupos funcionales activos en los compuestos poliméricos.

### 3.4 Estudio de la morfología de los andamios desarrollados

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que es capaz de producir imágenes de alta resolución utilizando un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar la imagen, con ella es posible observar el desarrollo morfológico de la superficie, las micro fibras y nano fibras, así como la microestructura de la red tridimensional. Se utilizaron aumentos de 200x a 1500x para la observación de las muestras.

### 3.6 Evaluación de la biodegradabilidad

Para predecir este fenómeno, los andamios fabricados fueron sumergidos en fluido corporal simulado (SBF – Simulated body fluid) durante 7, 14 y 28 días. Esta solución contiene concentraciones de iones casi iguales a las del plasma sanguíneo humano y, por tanto, la biodegradabilidad de un material puede predecirse por medio de la formación de hidroxiapatita en su superficie cuando se lo sumerge en SBF.

#### 3.6.1 Fluido Corporal Simulado (SBF)

Para preparar el fluido corporal simulado se utilizó la tesis publicada por Palacios (Palacios Casarrubias, 2018), donde las características y cantidades de los reactivos, así como los pasos en su elaboración se detallan a continuación:

- Se lavaron todos los elementos que fueron usados en la preparación del SBF con 1M HCl, detergente neutro y agua destilada. Los elementos utilizados son los siguientes: un agitador magnético, ocho bandejas de plástico, un vaso de precipitado de 1000 mL, una botella de plástico de 1000 mL, un matraz aforado de vidrio de 1000 mL, una cuchara, un termómetro, una pipeta desechable para ajustar el pH (a ser utilizada con 1M HCl), un embudo de plástico, un cilindro aforado de 50 mL y un recipiente de 50 mL.
- Se añadió aproximadamente 700 mL de agua pura destilada dentro del vaso de precipitado de 1000 mL y se agitó por medio de un agitador magnético mientras se calentó hasta 36.5 °C.
- Se añadieron los reactivos dentro del vaso de precipitado con agua pura destilada, siguiendo el orden mostrado en la tabla 2, se agrega de uno en uno y hasta encontrarse completamente disuelto se agrega el siguiente.
- Una vez que todos los reactivos se disolvieron, éstos se vertieron dentro de un nuevo vaso de precipitado con capacidad de 1 L. Se ajustó la temperatura de la solución a 36.5 °C mientras se ajustó el pH a 7.4 agregando poco a poco (aproximadamente 1 mL) de una solución 1 M de HCl.
- Se traspasó la solución del vaso de precipitado de 1000 mL al matraz aforado de vidrio de 1000 mL y se dejó enfriar hasta 20 °C. Se ajustó el volumen total a 1000 mL añadiendo agua destilada.
- Se traspasó la solución a la botella de plástico de 1000 mL tapándola. Se mantuvo refrigerada la solución a 4 °C.

Es de suma importancia llevar a cabo los pasos como se plantean en la descripción anterior, para poder garantizar la correcta disolución de las sales en el agua. En el caso donde no se haya llevado a cabo la correcta disolución, esta debe ser desechada y se debe comenzar desde el inicio.

*Tabla 2. Reactivos para la preparación de SBF.*

Reactivos	% de pureza	C-SBF (g)
<b>NaCl</b>	>99.5	8.036
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	>99.5	0.352
<b>KCl</b>	>99.5	0.225
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O</b>	>99.0	0.23
<b>MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O</b>	>98.0	0.311
<b>1.0 M HCl</b>	-	40
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	>95.0	0.293
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	>99.0	0.072
<b>TRIS</b>	>99.9	6.063
<b>1.0 M HCl</b>	-	0.2

Nota: Esta solución es estable hasta 8 semanas, pero si se advierte la presencia de algún tipo de precipitado de alguna de las sales disueltas, debe ser desechada. Antes de utilizar el SBF, se debe dejar reposar a temperatura ambiente y filtrarlo utilizando filtros estériles de 0.22  $\mu\text{m}$  bajo flujo laminar.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Caracterización de los andamios mediante FTIR

En las siguientes figuras 18 a 20 se observa la caracterización del PVA, PLGA y Col I, respectivamente, donde pueden observarse los grupos funcionales de cada estructura, estos mismos grupos se hacen presentes en los resultados de transmitancia del andamio final para cada metodología empleada.

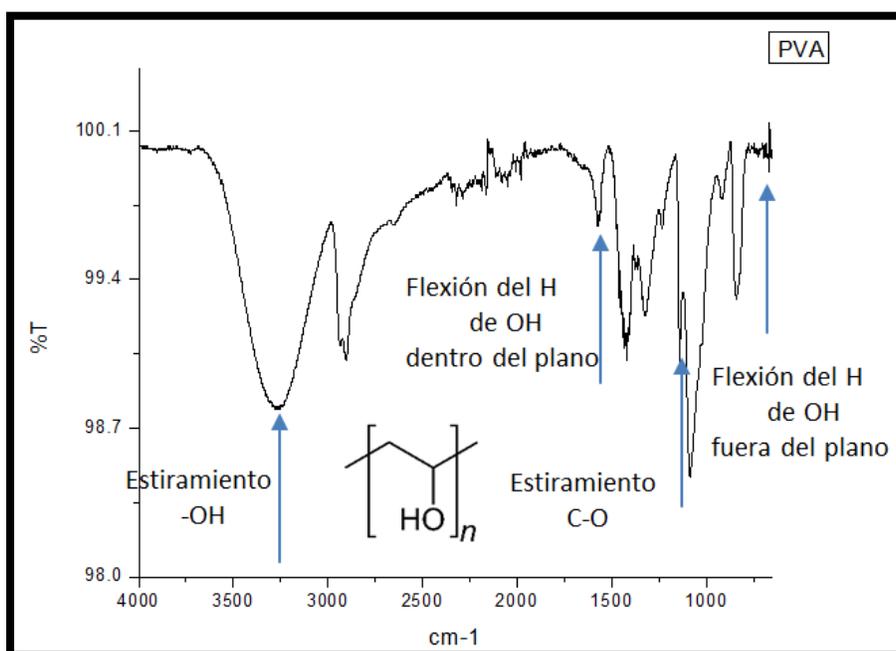


Figura 18. Espectro obtenido en la caracterización del PVA.

Para el PVA se obtiene un resultado en el que se puede observar con facilidad el estiramiento del grupo  $\text{-OH}$  (entre  $3000$  y  $3500\text{ cm}^{-1}$ ) así como el movimiento de estiramiento típico de  $\text{C-O}$  (entre  $1000$  y  $1100\text{ cm}^{-1}$ ) característico del PVA, junto con la parte alifática del polímero (figura 9).

En los resultados obtenidos para el PLGA se puede distinguir con facilidad el estiramiento del grupo  $\text{C=O}$  (entre  $1600$  y  $1800\text{ cm}^{-1}$ ) y estiramiento de  $\text{C-O}$  (entre  $1000$  y  $1100\text{ cm}^{-1}$ ) característico del PLGA, así como un pequeño pico entre  $3400$  y  $3500\text{ cm}^{-1}$  que puede ser atribuible al estiramiento de los enlaces  $\text{-OH}$  en los extremos del polímero, también se puede apreciar la parte alifática (figura 10).

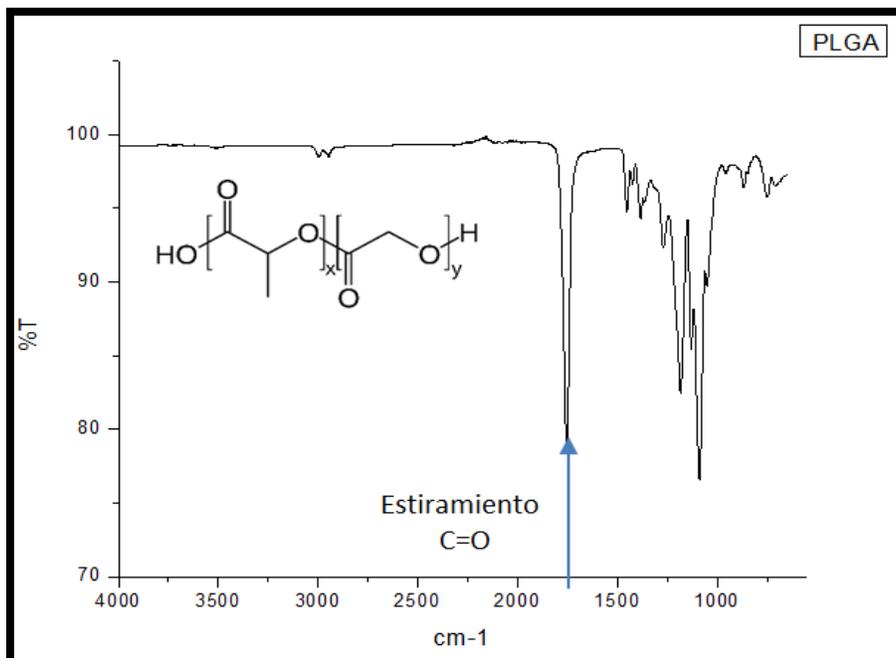


Figura 19. Espectro obtenido en la caracterización del PLGA.

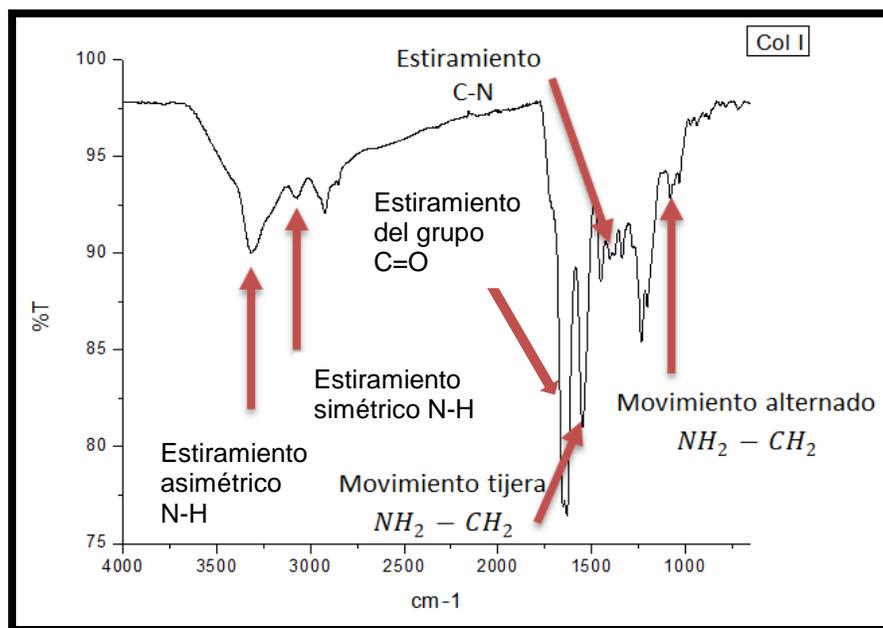


Figura 20. Espectro obtenido en la caracterización del colágeno tipo I.

En el resultado obtenido para el colágeno tipo I se puede ver con facilidad el estiramiento del grupo  $-OH$  (entre  $3000$  y  $3500\text{ cm}^{-1}$ ), también se observa el estiramiento de  $C-O$  (entre  $1000$  y  $1100\text{ cm}^{-1}$ ) característicos, las bandas encontradas para los estiramientos de  $C-N$  ( $1690$  a  $1480\text{ cm}^{-1}$ ) y  $-NH$  ( $3500$  a

3300  $\text{cm}^{-1}$ ) se encuentran traslapadas entre las señales de la parte alifática y del grupo hidroxilo respectivamente (figura 20). Las señales características de cada material se encuentran en la tabla 3 descrita a continuación.

Tabla 3. Señales características de los materiales presentes en el espectro FTIR.

PVA		COL I		PLGA	
$\text{CH}_3$	2900-2999 $\text{cm}^{-1}$ (E)	$\text{CH}$	2800-3000 $\text{cm}^{-1}$ (E)	$\text{CH}_2$	2900-2999 $\text{cm}^{-1}$ (E)
$\text{CH}_2$	2900-2999 $\text{cm}^{-1}$ (E)	$\text{CH}_2$	2900-2999 $\text{cm}^{-1}$ (E)	$\text{CH}_2$	1400-1500 $\text{cm}^{-1}$ (F)
$\text{CH}_3$	1400-1500 $\text{cm}^{-1}$ (F)	$\text{CH}_2$	1400-1500 $\text{cm}^{-1}$ (F)	$\text{CH}_2$	720-740 $\text{cm}^{-1}$ (MA)
$\text{CH}_2$	1400-1500 $\text{cm}^{-1}$ (F)	$\text{CH}_2$	720-740 $\text{cm}^{-1}$ (MA)	$\text{C-C}$	1200-1300 $\text{cm}^{-1}$ (E)
$\text{CH}_2$	720-740 $\text{cm}^{-1}$ (MA)	$\text{C-C}$	1200-1300 $\text{cm}^{-1}$ (E)	$\text{C-O}$	900-1200 $\text{cm}^{-1}$ (E)
$\text{C-C}$	1200-1300 $\text{cm}^{-1}$ (E)	$\text{C-O}$	900-1200 $\text{cm}^{-1}$ (E)	$\text{C=O}$	1700-1800 $\text{cm}^{-1}$ (E)
$\text{C-O}$	900-1200 $\text{cm}^{-1}$ (E)	$\text{C=O}$	1700-1800 $\text{cm}^{-1}$ (E)	$-\text{OH}$	3100-3500 $\text{cm}^{-1}$ (E)
$-\text{OH}$	3100-3500 $\text{cm}^{-1}$ (E)	$-\text{OH}$	3100-3500 $\text{cm}^{-1}$ (E)	$-\text{OH}$	1400-1500 $\text{cm}^{-1}$ (F <sub>1</sub> )
$-\text{OH}$	1400-1500 $\text{cm}^{-1}$ (F <sub>1</sub> )	$-\text{OH}$	1400-1500 $\text{cm}^{-1}$ (F <sub>1</sub> )	$-\text{OH}$	660 $\text{cm}^{-1}$ (F <sub>2</sub> )
$-\text{OH}$	660 $\text{cm}^{-1}$ (F <sub>2</sub> )	$-\text{OH}$	660 $\text{cm}^{-1}$ (F <sub>2</sub> )	$\text{CH}_3$	2900-2999 $\text{cm}^{-1}$ (E)
		$\text{C-N}$	1200-1300 $\text{cm}^{-1}$ (E)	$\text{CH}_3$	1400-1500 $\text{cm}^{-1}$ (F)
		$\text{NH}_2$	3100-3500 $\text{cm}^{-1}$ (E)	$\text{CH}$	2800-3000 $\text{cm}^{-1}$ (E)
		$\text{NH}_2$	1600 $\text{cm}^{-1}$ (Tijeras)		

Estiramiento: E ; Flexión: F ; Movimiento alternado: MA ; Flexión dentro del plano: F<sub>1</sub> ; Flexión fuera del plano: F<sub>2</sub>

## 4.2 Resultados de la fase preliminar

Se realizaron diluciones a distintas concentraciones de PVA en agua de 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 y 25%, en las cuales se observó que a concentraciones de 5% la mezcla no presentaba comportamiento viscoelástico deseado, asimismo no se generaban las fases características durante el proceso de electrospinning (Duque Sánchez *et al.*, 2013). A concentraciones de 7.5 a 12.5% se podía observar que el proceso de electrohilado se llevaba a cabo de manera ideal de acuerdo con lo reportado (Asran *et al.*, 2010), usando concentraciones mayores a 12.5% el proceso de electrohilado se veía dificultado, debido a la alta viscosidad que se confería al momento de aumentar la concentración de PVA en agua. Por lo observado con anterioridad se trabajó con concentraciones constantes de PVA al 10% en agua, con variaciones de voltaje de 18 y 20 KV y diámetros de jeringa

comerciales de 18, 20 y 25 G. En algunos casos se agregó etanol, debido a que su uso ha sido reportado para facilitar el desarrollo de la fibra mediante el electrohilado (Duque Sánchez *et al.*, 2013), no se presentó ningún tipo de estructura fibrilar formada al usar un diámetro de jeringa comercial de 25G.

En la tabla 4 se muestran los parámetros del desarrollo de cada electrohilado, con una distancia de 11 cm entre la aguja y el colector. Posteriormente en las figuras 21 y 22 se realiza la caracterización mediante FTIR y SEM respectivamente.

*Tabla 4. Parámetros de desarrollo de los andamios.*

Rótulo	PVA	Agua	EtOH	Voltaje	Diámetro comercial de jeringa
A1-PVA	1g	10 mL		18 KV	18G
A2-PVA	1g	10 mL		18 KV	20G
A3-PVA	1g	10 mL		18 KV	25G
A4-PVA	1g	10 mL	1 mL	18 KV	18G
A5-PVA	1g	10 mL	1 mL	20 KV	20G
A6-PVA	1g	10 mL		20 KV	20G
A7-PVA	1g	10 mL	1 mL	20 KV	25G
A8-PVA	1g	10 mL		20 KV	18G

Se realizó la caracterización del polímero haciendo uso del equipo FTIR, mediante el cual se obtuvieron los resultados de las señales características del PVA son:  $3440\text{ cm}^{-1}$  muestran el estiramiento de  $-\text{OH}$ , estiramiento asimétrico y simétrico de  $-\text{CH}_2$  a  $2940\text{ cm}^{-1}$ , a  $1418\text{ cm}^{-1}$  se muestra una flexión de tipo tijera del grupo  $-\text{CH}_2$ , y a  $1334\text{ cm}^{-1}$  estiramiento C-C, en  $900$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$  se da el estiramiento C-O, como puede observarse en la figura 21, asimismo se observa una señal aproximadamente en  $1700\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento de  $-\text{CH-OH}$  de acuerdo con diversos autores (Asran *et al.*, 2010; X. Li, Kanjwal, Lin, & Chronakis, 2013; Wu, Yuan, & Sheng, 2005), posiblemente incrementado al hidratar el PVA con agua y someterlo al proceso de electrohilado. En la figura 22 se muestra la morfología obtenida para estos electrohilados, la cual es la morfología deseada, en comparación con la metodología propuesta (Asran *et al.*, 2010), en todo el material compuesto, pueden observarse a detalle las fibras, el entrecruzamiento y

dirección que se genera al aplicar la técnica de electrospinning en un colector rotatorio de tipo cilíndrico.

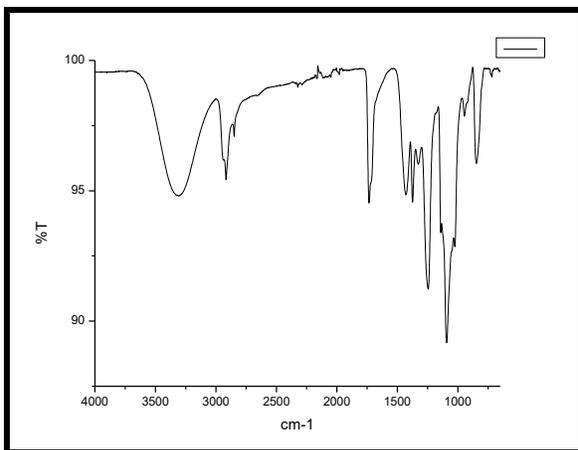


Figura 21. Espectro FTIR de andamio A6-PVA.

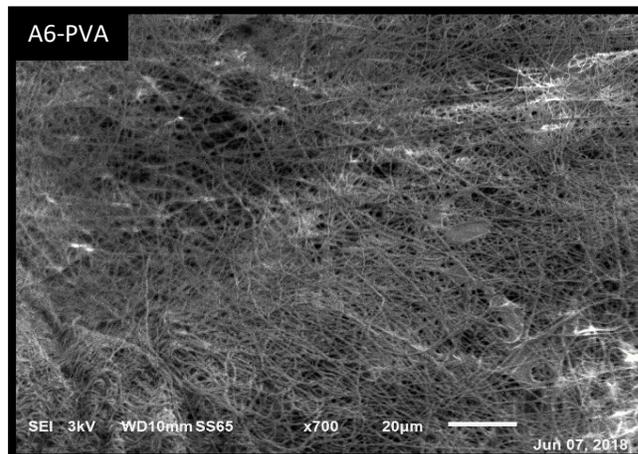


Figura 22. Imagen del andamio A6-PVA obtenido mediante SEM a 700X.

Los resultados obtenidos en la formación de fibras, mediante su análisis morfológico (ver anexos, figura 51 a 56), sugieren que los parámetros empleados en los andamios A1-PVA y A6-PVA son los que mejores características presentan, por lo tanto son los parámetros a considerar en la siguiente etapa.

#### 4.3 Resultados en el desarrollo de los andamios AFP

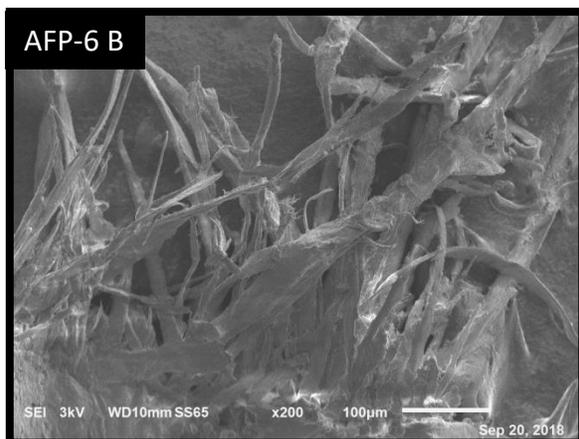
Con los resultados obtenidos en la fase preliminar, se desarrollaron electrohilados a partir de una dilución del 10% de PVA en agua. Se agregó PLGA y colágeno tipo I mediante un seguimiento de la metodología citada con anterioridad. Las relaciones de las mezclas son descritas en la tabla 5. Dónde T.T. indica que los andamios fueron sometidos a un tratamiento térmico inmediatamente después de su fabricación con agua a 6 °C con la finalidad de mantener su estructura inicial, la refrigeración se refiere al almacenamiento de los andamios en un medio a 6 °C esto sin necesariamente recibir el T.T.

Los resultados morfológicos para estos andamios no fueron los deseados como puede observarse en las figuras 23 a 26. Los andamios más distinguidos fueron aquellos que presentaron una producción incompleta de fibras, los cuales recibieron a una refrigeración después de su producción y se usó un diámetro de jeringa comercial de 18 G, un voltaje de 18 KV y una distancia de 11 cm entre la aguja y el colector.

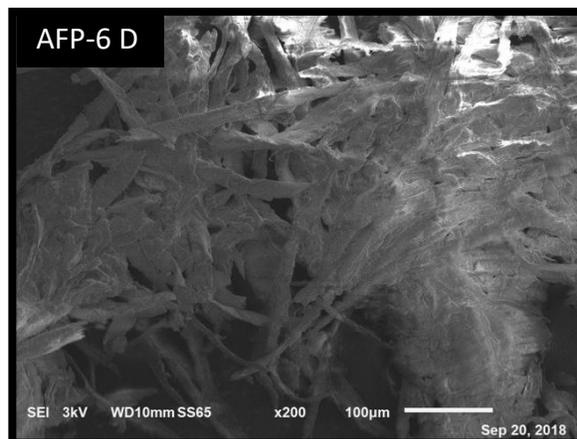
*Tabla 5. Parámetros en el desarrollo de andamios AFP por electrohilado.*

Rótulo	C (PVA)	PVA:PLGA	PVA:Col I	T.T.	Refrigeración	Voltaje	Diámetro comercial de jeringa
AFP-1	10%	2 : 1	167 : 1			18 KV	18G
AFP-2	10%	2 : 1	167 : 1			20 KV	18G
AFP-3	10%	2 : 1	167 : 1			18 KV	18G
AFP-4	10%	2 : 1	167 : 1			20 KV	18G
AFP-5	10%	2 : 1	167 : 1			18 KV	18G
AFP-6	10%	2 : 1	167 : 1			18 KV	18G
AFP-6 B	10%	2 : 1	167 : 1		X	18 KV	18G
AFP-6 C	10%	2 : 1	167 : 1	X		18 KV	18G
AFP-6 D	10%	2 : 1	167 : 1	X	X	18 KV	18G
AFP-7	10%	2 : 1	167 : 1			20 KV	18G
AFP-7 B	10%	2 : 1	167 : 1		X	20 KV	18G
AFP-7 C	10%	2 : 1	167 : 1	X		20 KV	18G
AFP-7 D	10%	2 : 1	167 : 1	X	X	20 KV	18G

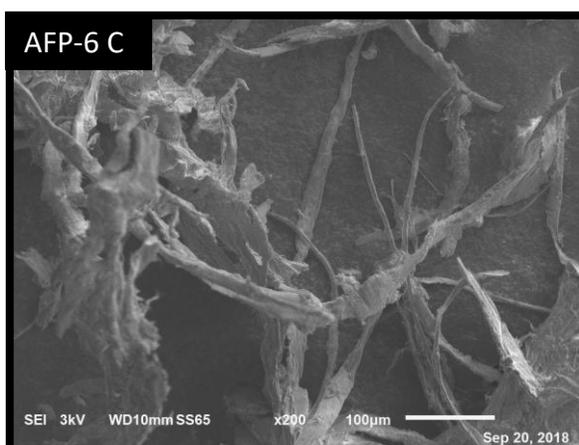
Se puede observar en la tabla 5 que los andamios AFP-1, AFP3, AFP-5 y AFP-6 fueron desarrollados bajo las mismas condiciones, así como los andamios AFP-2, AFP-4 y AFP-7, sin embargo al no presentar una formación estructural se implementó el desarrollo de andamios sometidos a tratamiento térmico y refrigeración, donde los andamios AFP-6 de rótulo B,C y D varían en cuanto al voltaje utilizado en los andamios AFP-7 de rótulo B, C y D.



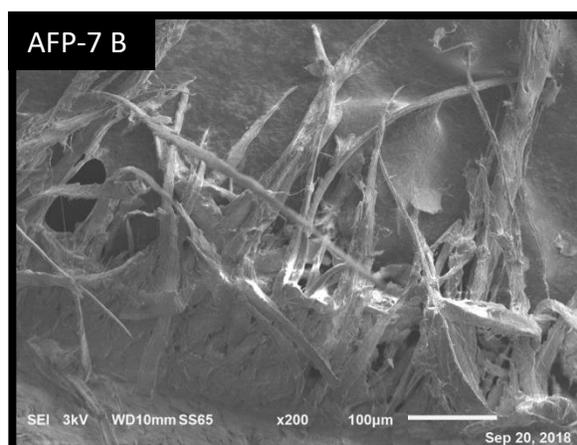
*Figura 23. Imagen del andamio AFP-6B obtenida mediante SEM a 200X.*



*Figura 24. Imagen del andamio AFP-6D obtenida mediante SEM a 200X.*



*Figura 25. Imagen del andamio AFP-6C obtenida mediante SEM a 200X.*



*Figura 26. Imagen del andamio AFP-7B obtenida mediante SEM a 200X.*

Los mejores resultados en cuestión de morfología fueron los que se desarrollaron a 18 KV usando un diámetro de jeringa comercial de 18 G, se puede apreciar en las micrografías de los andamios AFP-6 B, C y D que tienden a presentar una mayor formación de fibras y menor material sin desarrollar en comparación de los andamios AFP-7 B, C y D, ver anexos (figura 57 – 62). La estructura obtenida no fue la esperada, por lo que no se realizó un análisis de espectro mediante FTIR, debido a los resultados obtenidos, se implementaron modificaciones a la metodología propuesta (Sadeghi-Avalshahr *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2012),.

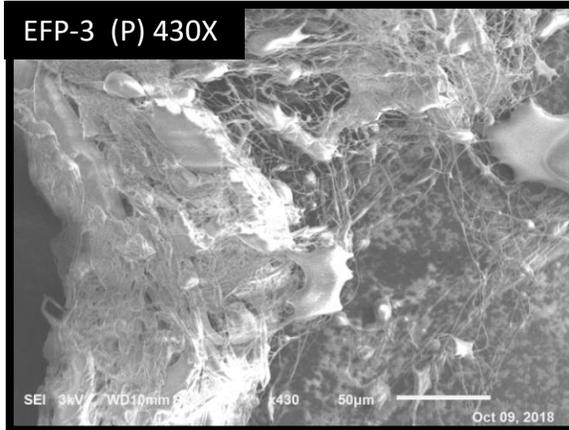
#### 4.4 Resultados en el desarrollo de andamios EFP

Con los resultados obtenidos en la fase preliminar y en el desarrollo de los andamios AFP, se desarrollaron electrohilados a partir de una dilución del 10% de PVA en agua, se mantuvo un voltaje constante de 18 KV, diámetro de jeringa comercial de 18 G y una distancia de 11 cm entre la aguja y el colector. Se modificó ligeramente la cantidad de PLGA y colágeno tipo I mediante la metodología citada con anterioridad. Las relaciones de las mezclas y condiciones del electrohilado (placa plana y cilindro rotatorio) son descritas en la tabla 6.

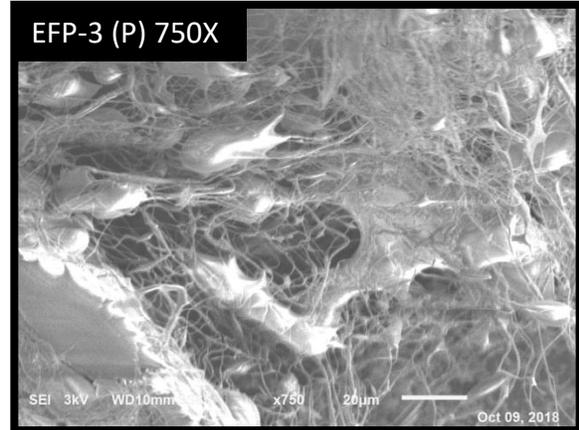
*Tabla 6. Parámetros en el desarrollo de andamios EFP por electrohilado.*

Rótulo	C (PVA)	PVA:PLGA	PVA:Col I	T.T.	Refrigeración	Tipo colector	Voltaje	Diámetro de jeringa
EFP-1	10%	1.11 : 1	167 : 1	X	X	Rotatorio Placa	18 KV	18G
EFP-2	10%	1.11 : 1	167 : 1	X		Rotatorio Placa	18 KV	18G
EFP-3	10%	1.11 : 1	167 : 1		X	Rotatorio Placa	18 KV	18G
EFP-4	10%	1.11 : 1	167 : 1			Placa	18 KV	18G

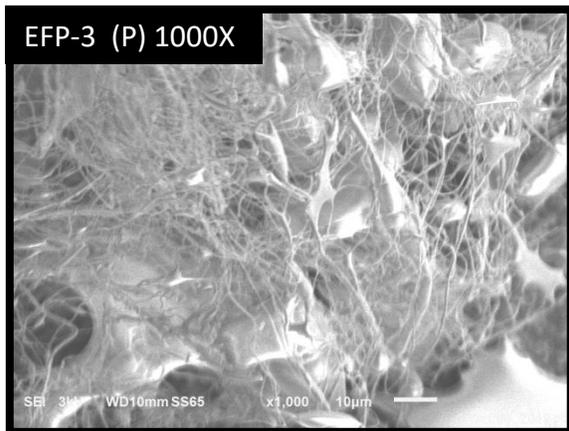
El andamio EFP-3 fue el único que presentó material en el colector, tanto para placa como rotatorio. El principal problema que se presentó es la formación parcial las fibras y la repetitividad del electrohilado como se puede observar en las figuras 27 a 35. En el espectro FTIR obtenido para el andamio EFP-3 (figura 36) se puede corroborar la presencia de la mayoría de los grupos característicos de la matriz y de los refuerzos del material compuesto, siendo los más notorios el grupo –OH, C-O, C-N, así como la parte alifática del material (véase *tabla 3*).



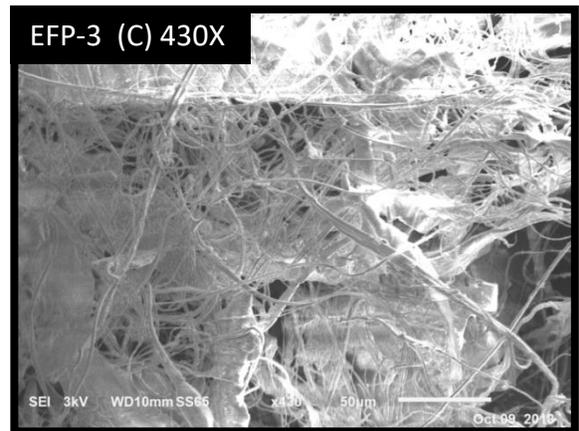
*Figura 27. Imagen SEM del andamio EFP en placa a 430X.*



*Figura 28. Imagen SEM del andamio EFP en placa a 750X.*



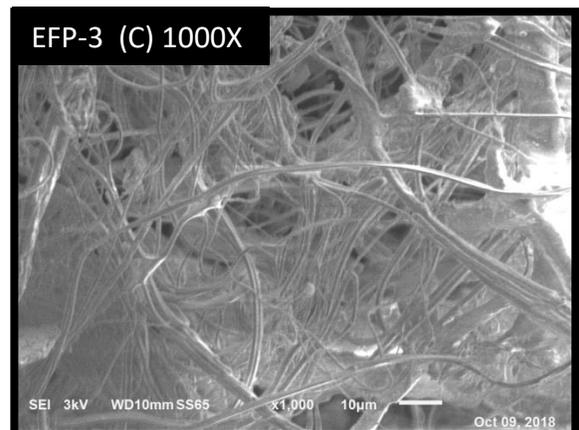
*Figura 29. Imagen SEM del andamio EFP en placa a 1000X.*



*Figura 30. Imagen SEM del andamio EFP en cilindro rotatorio a 430X.*



*Figura 31. Imagen SEM del andamio EFP en cilindro rotatorio a 750X.*



*Figura 32. Imagen SEM del andamio EFP en cilindro rotatorio a 1000X.*

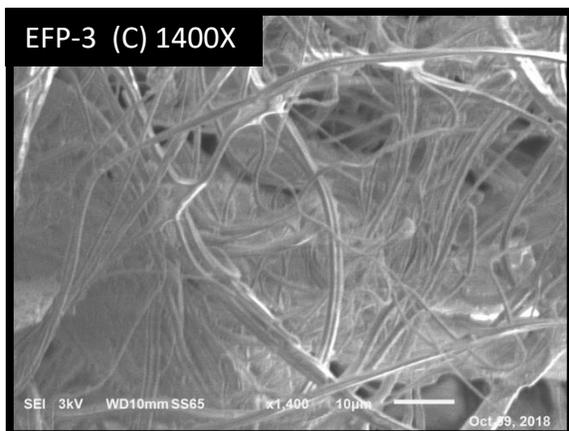


Figura 33. Imagen SEM del andamio EFP-3 en cilindro rotatorio a 1400X.



Figura 34. Imagen SEM del andamio EFP-6 en placa a 430X.

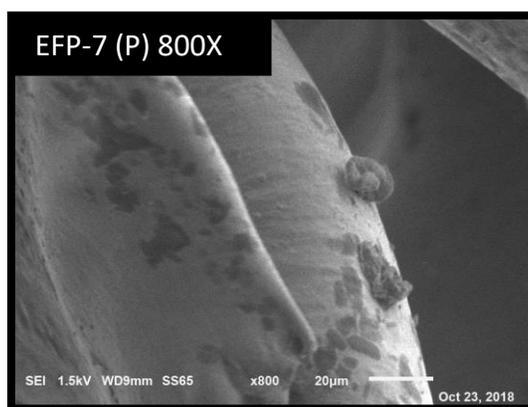


Figura 35. Imagen SEM del andamio EFP-7 en placa a 800X.

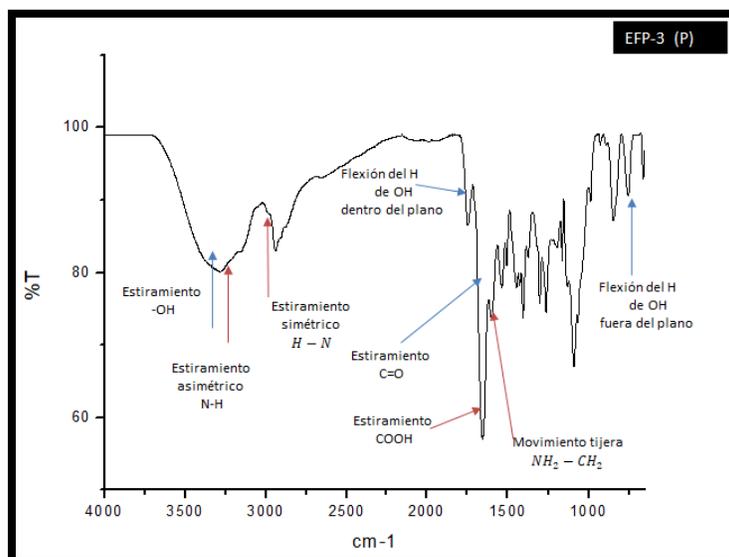


Figura 36. Espectro obtenido para el andamio EFP-3 en placa.

#### 4.5 Resultados en el desarrollo de andamios IFP

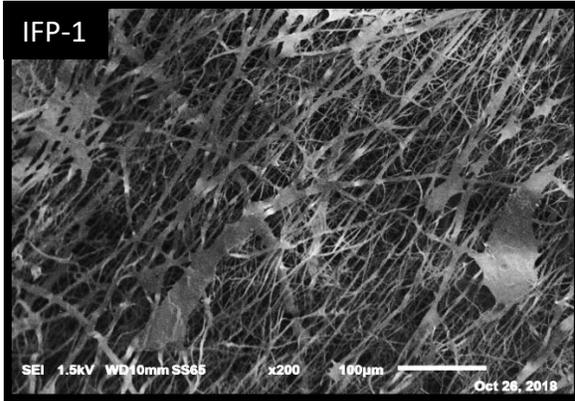
Con los resultados obtenidos en la fase preliminar y en el desarrollo de los andamios AFP, así como en el desarrollo de los andamios EFP, se desarrollaron electrohilados a partir de una dilución del 10% de PVA en agua, se mantuvo un voltaje constante de 18 KV así como un diámetro de jeringa comercial de 18 G y 11 cm de distancia aguja-colector. Se modificó la cantidad de PLGA y colágeno tipo I mediante una modificación de la metodología citada anteriormente. Las relaciones de las mezclas son descritas en la tabla 7.

*Tabla 7. Relaciones y condiciones del electrohilado.*

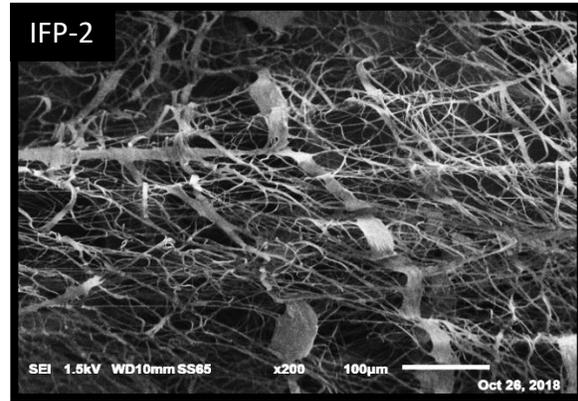
Rótulo	C (PVA)	PVA:PLGA	PVA:Col I	T.T.	Refrigeración	Tipo colector	Voltaje	Diámetro de jeringa
IFP-1	10%	1.11 : 1	3.3 : 1		X	Rotatorio	18 KV	18G
IFP-2	10%	1.11 : 1	3.3 : 1		X	Rotatorio	18 KV	18G
IFP-3	10%	1.11 : 1	Ausencia		X	Rotatorio	18 KV	18G
IFP-4	10%	1.11 : 1	Ausencia		X	Rotatorio	18 KV	18G

Se observa que al utilizar cantidades parcialmente equitativas en los componentes del andamio se producen estructuras de tipo fibrilar con una dirección de hilado casi uniforme, asimismo se encuentra la presencia de los grupos funcionales mediante el uso de la técnica de FTIR. Las imágenes obtenidas por SEM pueden observarse en las figuras 37 a 42.

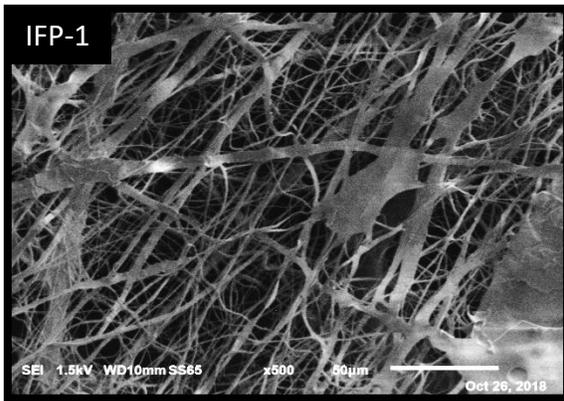
El andamio presenta una estructura fibrilar deseada, presenta los grupos funcionales característicos del PVA, PLGA y colágeno de tipo I, posee una distribución de fibras y orientación casi uniforme, al igual que diámetros de fibras con baja desviación estándar entre ellos, así mismo los andamios IFP-1 e IFP-3 (así como sus repeticiones) tienen un interesante comportamiento térmico, como se menciona en la siguiente sección.



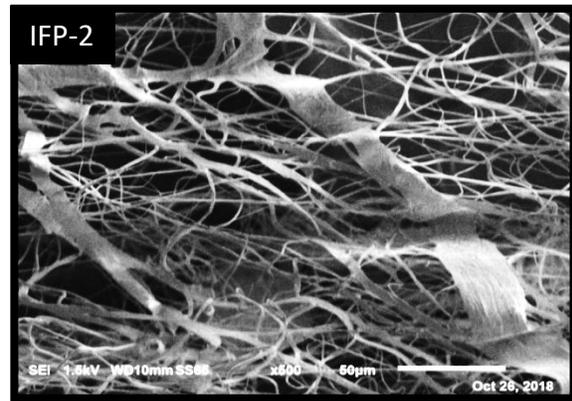
*Figura 37 Imagen obtenida por SEM del andamio IFP-1 a 200X.*



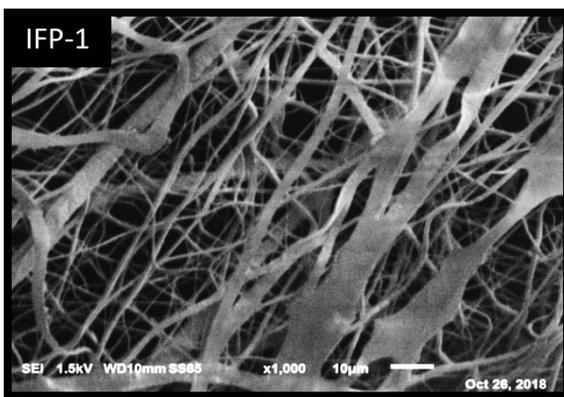
*Figura 38. Imagen obtenida por SEM del andamio IFP-2 a 200X.*



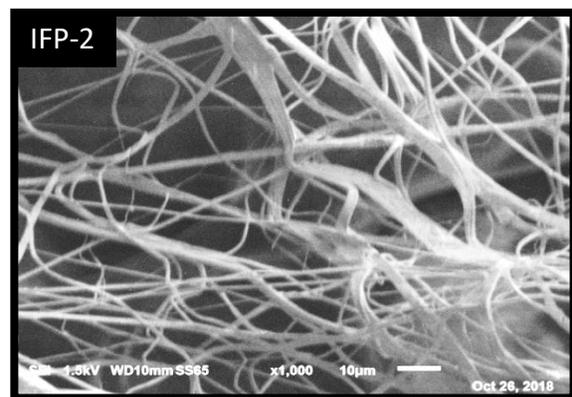
*Figura 39. Imagen obtenida por SEM del andamio IFP-1 a 500X.*



*Figura 40. Imagen obtenida por SEM del andamio IFP-2 a 500X.*



*Figura 41. Imagen obtenida por SEM del andamio IFP-1 a 1000X.*



*Figura 42. Imagen obtenida por SEM del andamio IFP-2 a 1000X.*

## 4.6 Caracterización química y física de andamios IFP

En la presente sección se analizan los resultados obtenidos como lo son los espectros mediante FTIR, características morfológicas, resultados termogravimétricos, propiedades mecánicas, densidad, hinchamiento, absorción, porosidad y degradabilidad de los andamios IFP.

### 4.6.1 Resultados de espectros de los andamios IFP mediante FTIR

Los espectros obtenidos para el andamio IFP-1 e IFP-2 presentan picos característicos de los materiales que lo componen (véase figura 18, 19, 20 y tabla 3) (Brown *et al.*, 2017; Matthews *et al.*, 2002; Oktay *et al.*, 2015). Asimismo los espectros obtenidos para el andamio IFP-3 e IFP-4 muestran un comportamiento interesante, es notable la ausencia de estiramiento de grupos hidroxilo, es presumible que la estructura este compuesta en su mayoría por PLGA, incluso si fue agregado PVA al parecer no existe una interacción entre estos sin la presencia del colágeno. Podría pensarse que la estructura del andamio IFP-1 e IFP-2 está compuesta por PLGA /colágeno y que el PVA no se encuentra presente en esta estructura, sin embargo esto se analiza en los análisis termogravimétricos. En la figura 43 se muestran los espectros obtenidos para los andamios IFP-1 e IFP-2, mientras que en la figura 44 se muestra el espectro obtenido para el andamio IFP-3 e IFP4.

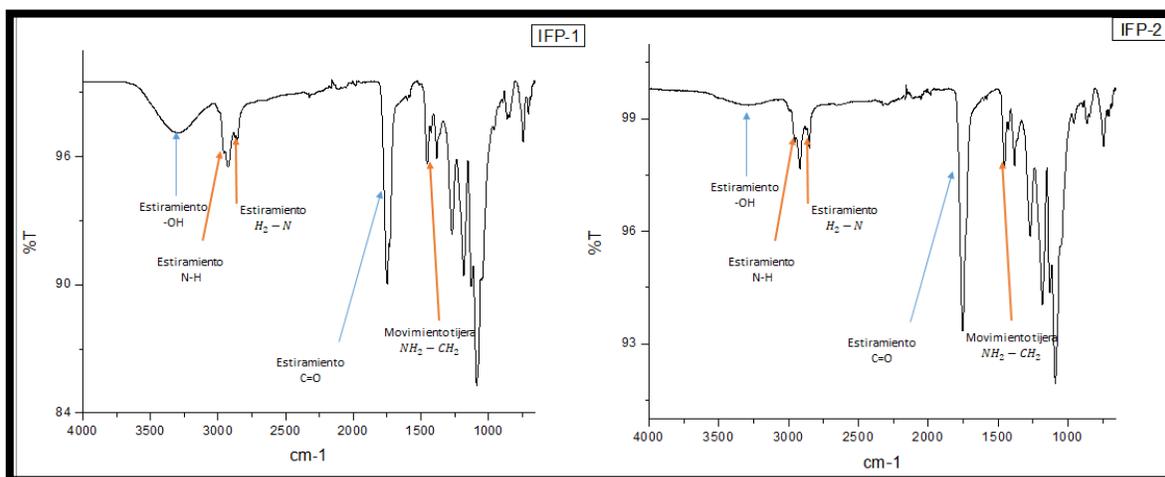


Figura 43. Espectros obtenidos para los andamios IFP-1 e IFP-2.

Se observa una gran similitud entre ambos espectros, lo que indica, al igual que el parecido morfológico, que la metodología propuesta en el desarrollo de andamios de tipo fibrilar propuesto para IFP tiene resultados ideales.

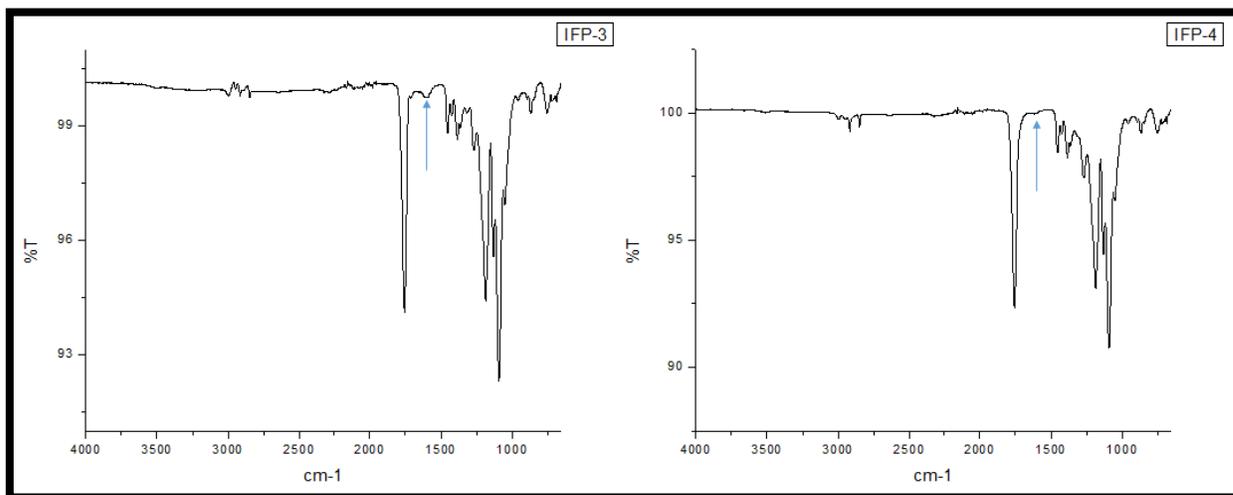


Figura 44. Espectros obtenidos para los andamios IFP-3 e IFP-4.

#### 4.6.2 Resultados de características morfológicas de los andamios IFP

Los diámetros de las fibras desarrolladas fueron obtenidos mediante el uso de herramientas en SEM, teniendo una muestra de 27 datos. El análisis de los datos de la muestra se distribuyen de la siguiente forma: diámetro máximo ( $3.846 \mu\text{m}$ ), diámetro mínimo ( $1.075 \mu\text{m}$ ), el diámetro mediano ( $2 \mu\text{m}$ ), promedio ( $1.927 \mu\text{m}$ ), desviación estándar poblacional ( $0.7233 \mu\text{m}$ ), varianza poblacional ( $0.5231 \mu\text{m}$ ), desviación estándar muestral ( $0.7098 \mu\text{m}$ ), varianza muestral ( $0.5038 \mu\text{m}$ ) y el coeficiente de varianza ( $37.54\%$ ), véase figura 45. Los datos estadísticos obtenidos muestran cierta homogeneidad en la distribución de los diámetros de las fibras.

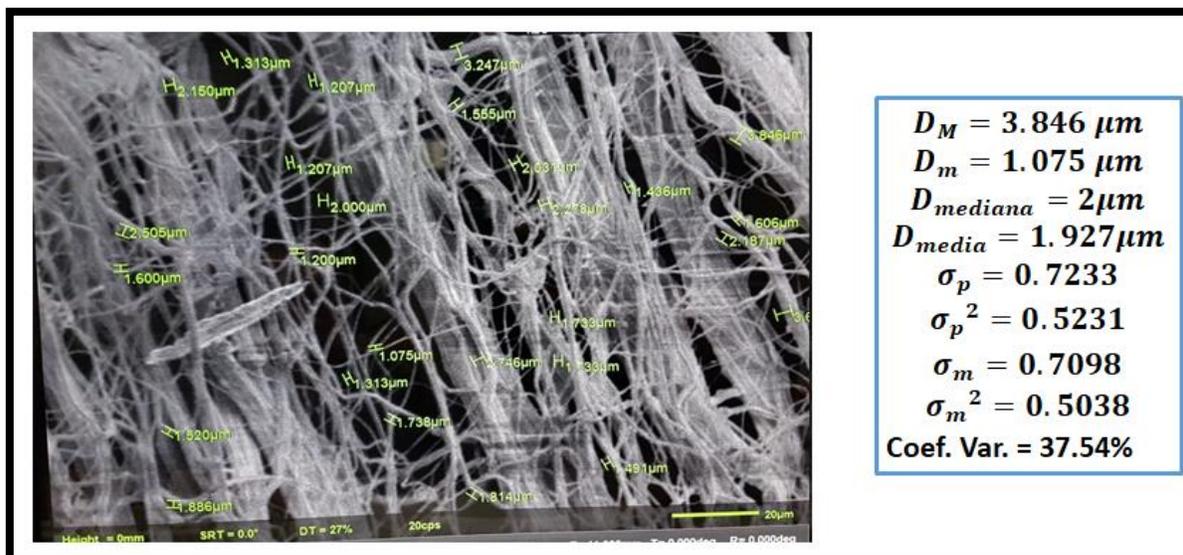


Figura 45. Diámetros y datos estadísticos de las fibras IFP.

#### 4.6.3 Resultados termogravimétricos de los andamios IFP

Los análisis termogravimétricos exhiben los resultados más concluyentes de este trabajo en cuanto a la compatibilidad lograda de los elementos utilizados en la matriz de los andamios IFP. Como debe recordarse, véase *tabla 7*, se realizaron andamios compuestos de los tres materiales (PVA, PLGA, colágeno tipo I) que corresponden al IFP-1 e IFP-2, asimismo se desarrollaron dos andamios más en los que se mezclaron PVA y PLGA en ausencia del colágeno tipo I. Se puede apreciar en la figura 46 que el andamio que cuenta con colágeno (IFP-1) muestra una estabilidad térmica mayor (IFP-1 a 295.078 °C e IFP-3 a 278.086 °C, de acuerdo con sus respectivas gráficas en anexos) que el andamio ausente de este compuesto, se debe recordar también los espectros obtenidos para estos dos andamios (véase *figura 43 y 44*), donde en la figura 43 se muestran grupos característicos de los tres compuestos, caso contrario a la figura 44 donde únicamente se observa la presencia de PLGA (véase *tabla 3*), se puede atribuir que la presencia del colágeno tipo I permite una interacción entre el PVA y el PLGA, de acuerdo con algunos autores (Krumova *et al.*, 2000; Youn Chang *et al.*, 2005) el PVA atribuye características como lo son resistencia estructurales de índole físico y químico, es por esto que los andamios IFP con PVA presentan un grado de resistencia térmica mayor. Los resultados de TG y DSC muestran una

estabilidad térmica (16.992 °C mayor a IFP-3) y cristalinidad (en 220 y 297 °C), respectivamente, que se le puede atribuir a la presencia del PVA en el andamio IFP-1 a diferencia del andamio IFP-3 que muestra un carácter más amorfo propio del PLGA (Gentile *et al.*, 2014). También se puede apreciar que el andamio compuesto por los tres materiales presenta un porcentaje de remanente menor al del IFP-3. Este comportamiento presentado junto con los resultados obtenidos en los espectros y SEM dan como resultado una interacción que se propone en la figura 47, así como los establecidos previamente (Asran *et al.*, 2010; Gentile *et al.*, 2014).

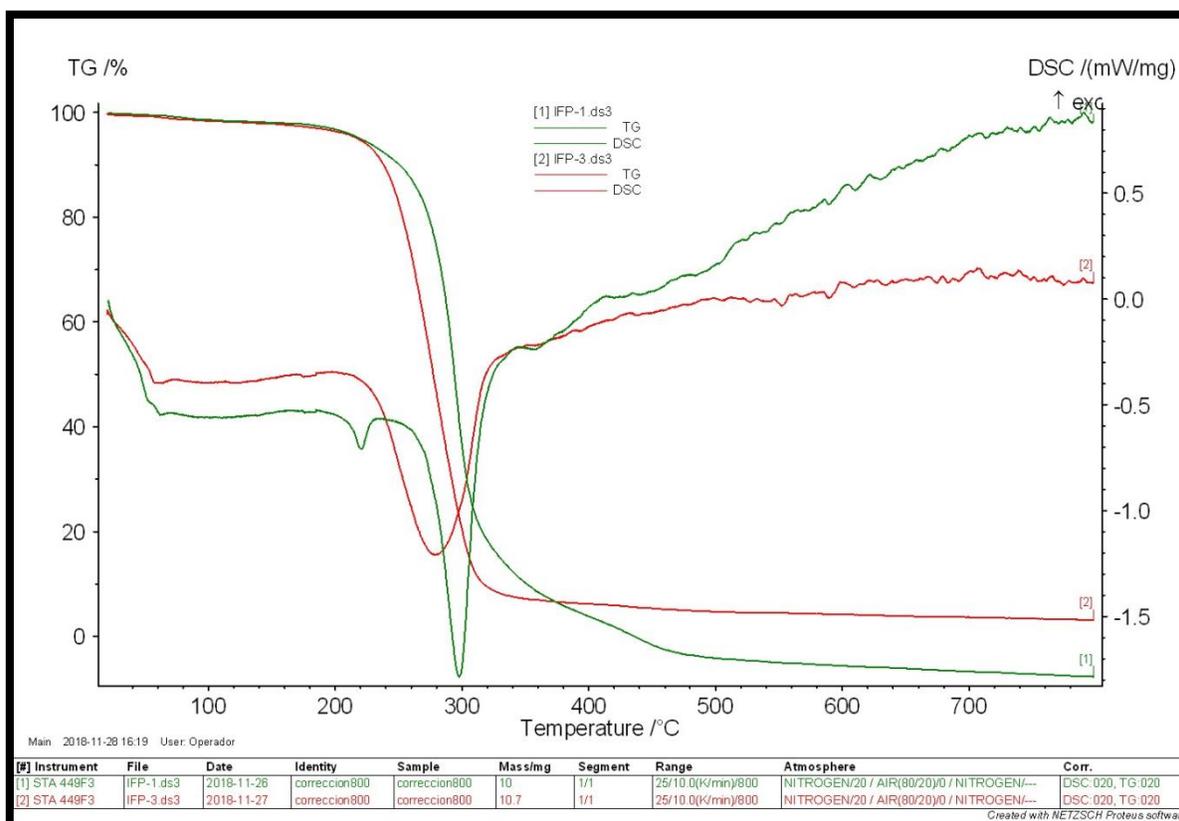


Figura 46. Resultados de análisis termogravimétricos de IFP-1 e IFP-3.

El análisis termogravimétrico fue realizado en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, los parámetros establecidos fueron: rampa de calentamiento de 10 K/min, atmósfera de 20% nitrógeno y 80% de aire.

Asimismo se realizó una medición de área bajo la curva del PVA, PLGA, Colágeno tipo I y de andamio fibrilar IFP-1 para determinar la actividad por separado y colectiva de los puentes hidrógeno que puedan generarse, tabla 8 y 9.

Se puede apreciar en a tabla 8 que el área bajo la curva en esta sección presenta un cambio significativo en la estructura del PVA en comparación al andamio IFP-1 y el resto de los componentes. Esto da indicio de que el acoplamiento de los materiales sucede en los grupos hidroxilo del PVA y, el andamio IFP-1 al tener un área relativamente menor al del PLGA y colágeno tipo I, podría no llevarse completamente a cabo.

Estos indicios están presentes de igual manera en relación al colágeno tipo I, presente en la tabla 9, que presenta la flexión del hidrógeno del grupo hidroxilo fuera del plano.

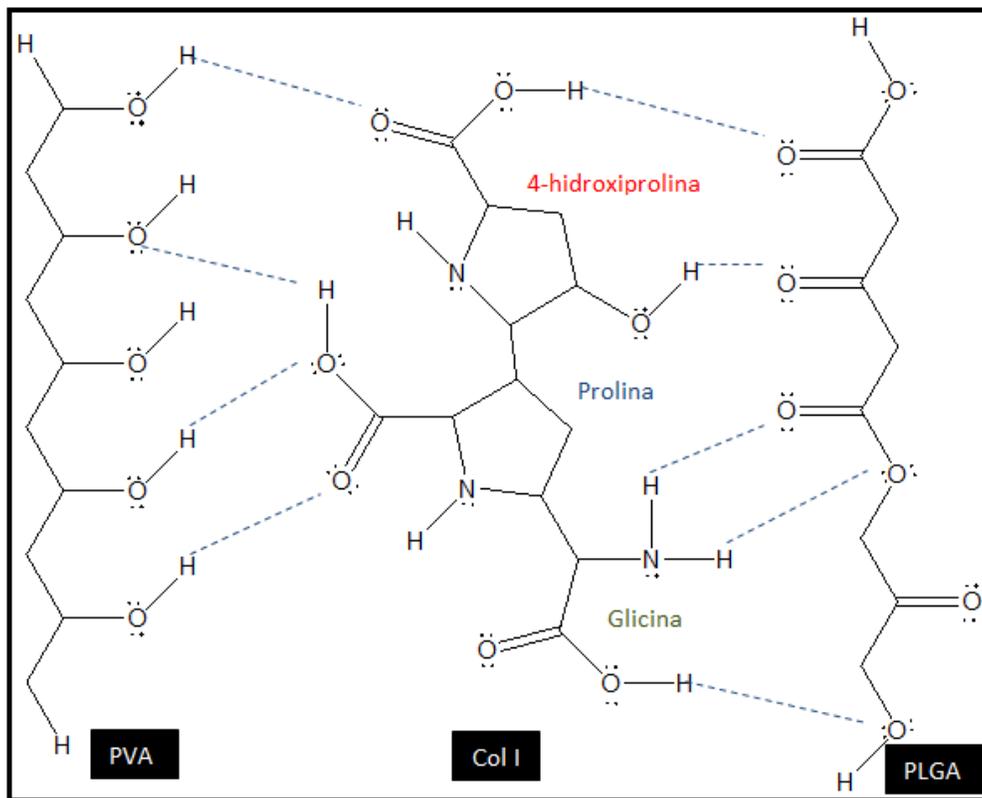


Figura 47. Moléculas de PVA, colágeno tipo I y PLGA.

#### 4.6.4 Resultados de las propiedades mecánicas en los andamios IFP

Las propiedades mecánicas del material fueron medidas mediante un arreglo a metodologías descritas (Mi *et al.*, 2018; Sadeghi-Avalshahr *et al.*, 2017). Se realizaron muestras de 60x10 mm y un grosor de 0.014 mm (medido por un micrómetro Digimatic IP65 Mitutoyo modelo MDC-1'MJ). Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 8. Resultados obtenidos en las propiedades mecánicas de los andamios IFP.

Repetición	Resistencia a la tensión (MPa)	Elongación (%)	Módulo elástico (MPa)
1	<b>1.25498</b>	<b>0.79756</b>	<b>1.57</b>
2	<b>1.25508</b>	<b>0.79946</b>	<b>1.57</b>
3	<b>1.26067</b>	<b>0.79974</b>	<b>1.57</b>

Los resultados obtenidos en el andamio IFP presentan propiedades mecánicas de tensión (1.25 MPa) superiores a los reportados para la dermis de la piel ( $27.7 \pm 6.7$  KPa) (Oftadeh, Connizzo, Nia, Ortiz, & Grodzinsky, 2018) y propiedades mecánicas similares a las propuestas en el hueso esponjoso de la vértebra (1.2 MPa) (Gonzalez Arrieta, Chac, & Gonz, 2007).

#### 4.6.5 Resultados de las características físicas generales de los andamios IFP

Las características físicas del andamio fueron determinadas mediante metodologías experimentales. La primera de ellas es la determinación de la densidad, la cual consiste en tomar un andamio con geometría regular, tomar sus medidas y peso, se realiza una relación para determinar la densidad del material. Las dimensiones del material fueron establecidas de 25x24x0.014 mm y un peso de 0.0023 g, resultando en una densidad de  $0.2738 \text{ g cm}^{-3}$ . Esta relación se puede observar en la figura 48.

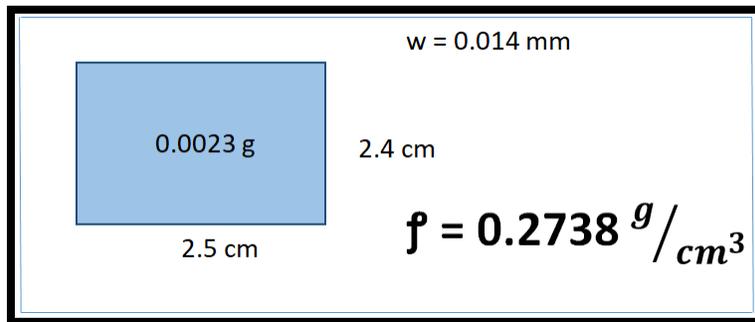


Figura 48. Determinación de la densidad del andamio IFP.

La determinación de la absorción de material fue determinada mediante el uso de la metodología (He *et al.*, 2018), dando como resultado una absorción promedio de 200% en relación al peso inicial. La figura 49 muestra la relación de los pesos iniciales junto con los finales, haciendo uso de un gráfico de barras y la relación de pesos se determina la absorción del material.

La tasa de hinchamiento y porosidad del material fueron determinados mediante el uso de metodología (Adragna *et al.*, 2018; Hadjizadeh, Savoji, & Aji, 2016; Wang, Zhao, & Pan, 2015), las cuales determinan un hinchamiento del material de 55.1% en relación a su peso inicial (donde el peso inicial es de 0.0049 g y el peso final de 0.0075 g). La porosidad fue determinada mediante diferencia de peso del andamio IFP al ser sumergido por 24 h en etanol. El cálculo de esta característica se dio con un peso inicial de 0.0029 g, peso final de 0.0245 g, densidad del andamio de 0.2738 g cm<sup>-3</sup> y densidad del etanol de 0.79 g cm<sup>-3</sup>, dando como resultado una porosidad del 27.38%. La relación usada para el cálculo de la porosidad de puede observar en la figura 50, donde  $w$  es el peso del andamio después de 24 h de inmersión en etanol,  $w_0$  el peso inicial del andamio,  $\rho_1$  es la densidad del andamio y  $\rho_2$  la densidad del etanol.

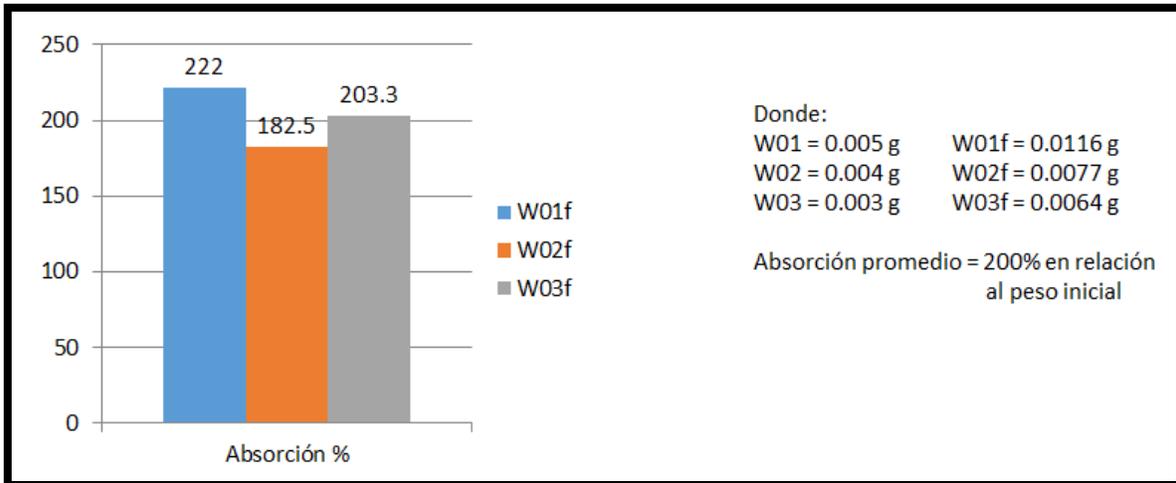


Figura 49. Relación y determinación de absorción de andamio IFP.

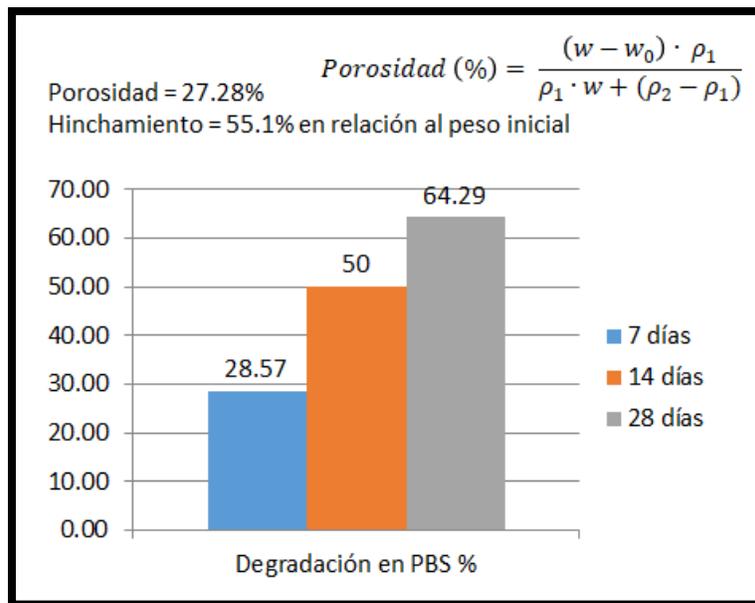


Figura 50. Resultados de porosidad, hinchamiento y degradación de andamios IFP.

Los resultados de degradación del andamio IFP en PBS alcanzan un porcentaje de 64.29% en 28 días (Sadeghi-Avalshahr *et al.*, 2017, Palacios S. *et al.*, 2018) y exhibe un comportamiento aparentemente lineal.

#### 4.6.7 Caracterización del flujo viscoelástico

Las propiedades del flujo viscoelástico son cruciales al momento del desarrollo de fibras mediante la técnica de electrospinning, es por esto que en esta sección se realiza una breve caracterización de algunas de las propiedades mayormente descritas durante el proceso de electrospinning.

##### 4.6.7.1 Tensión superficial

La tensión superficial de un fluido es directamente proporcional a la concentración de la fase dispersa (Duque Sánchez *et al.*, 2013), esta propiedad interfiere directamente a la formación del cono de Taylor descrito en la primera fase de transición del polímero mediante la técnica de electrospinning, es por esto que la determinación de esta característica es fundamental para el entendimiento de cada fibra desarrollada por la técnica descrita, cabe destacar que la tensión superficial de distintos polímeros nunca será igual.

En el presente trabajo se realizó la medición de la tensión superficial de un fluido viscoelástico compuesto por PVA, PLGA y colágeno tipo I dispersos en agua y HFP. Se determinó la medición de esta característica usando un fluido al 6.92% en un volumen de 6 mL, las mediciones obtenidas por un tensiómetro de anillo fueron de 91, 93 y 95 dina  $\text{cm}^{-1}$ . La medición de esta característica es de importancia para los cálculos que se describen durante el procesado mediante electrospinning (Koski *et al.*, 2004), véase *Voltaje crítico durante el desarrollo de fibras en el proceso de electrospinning*.

##### 4.6.7.2 Viscosidad intrínseca del flujo viscoelástico

La viscosidad intrínseca de un fluido viscoelástico se relaciona de manera proporcional con la concentración de la fase dispersa utilizada, dando como resultado una relación matemática para la determinación de la resistencia estructural de un andamio desarrollado por electrospinning (Koski *et al.*, 2004). En el presente trabajo se realizó la determinación de las viscosidades intrínsecas de las fases dispersas por separados en sus respectivas fases estacionarias y

posteriormente se determina la viscosidad intrínseca total mediante el uso de la ley general de mezclas, asumiendo una mezcla ideal

$$[\eta] = k \cdot M_w^\alpha$$

La ecuación descrita con anterioridad corresponde al cálculo de la viscosidad intrínseca, donde k y alfa son las constantes Mark-Houwink del polímero en el solvente y  $M_w$  es el peso molecular del polímero.

$$M = x_1M_1 + x_2M_2 + \dots x_nM_n$$

La ecuación anterior corresponde a la Ley General de las Mezclas, lo que corresponde a M como la propiedad a calcular,  $M_1$  la propiedad del primer compuesto,  $M_2$  la propiedad del segundo compuesto,  $M_n$  la propiedad del enésimo compuesto, y x representa el porcentaje en fracción de cada compuesto en la mezcla.

El cálculo de la viscosidad intrínseca se comprende con las constantes obtenidas para cada material. En el caso del PVA en agua (Koski *et al.*, 2004) la ecuación descrita es de la siguiente forma:

$$[\eta] = (6.51 \times 10^{-4}) \cdot M_w^{0.628}$$

Dando como resultado una viscosidad intrínseca de 1.06 dL/g.

En el caso del PLGA en HFP (Kenley, Lee, Mahoney, & Sanders, 1987) la ecuación descrita es de la siguiente forma:

$$[\eta] = (1.67 \times 10^{-4}) \cdot M_w^{0.794}$$

Dando como resultado una viscosidad intrínseca de 1.503 dL/g.

En el caso del colágeno tipo I en HFP (Bornstein & Sage, 1980) la ecuación descrita es de la siguiente forma:

$$[\eta] = (1.23 \times 10^{-4}) \cdot M_w^{1.8}$$

Dando como resultado una viscosidad intrínseca de 2.552 dL/g.

Asumiendo que es una mezcla ideal se puede estimar el cálculo de la viscosidad intrínseca final del material, el cual viene dado con la siguiente ecuación:

$$[\eta]_{pol} = x_{PVA}[\eta_{PVA}] + x_{col}[\eta_{col}] + x_{PLGA}[\eta_{PLGA}] = 1.2894 \text{ dL/g}$$

De acuerdo con la relación propuesta para la estabilidad estructural  $[\eta]C$  (Koski *et al.*, 2004), se presenta una aparente estabilidad en el andamio IFP cuando se utiliza una concentración total de 6.92% de PVA, PLGA y colágeno I en agua y HFP.

#### 4.6.7.3 Tiempo de relajación máximo en el proceso de electrospinning

El tiempo de relajación máximo describe el momento en el cual el polímero se ordena y pasa de una fase líquida a una fase sólida, esto ocurre en la zona de aceleración rápida en el proceso de electrospinning, es decir, después de la formación del jet en el cono de Taylor y el rompimiento o separación de la dispersión al momento que se evapora el solvente (Huang *et al.*, 2003; Koski *et al.*, 2004). La relación matemática se comprende mediante la siguiente ecuación:

$$\lambda = \frac{6\eta_s[\eta]M_w}{\pi^2 RT}$$

Donde *lamda* es el tiempo de relajación máximo en segundos,  $\eta_s$  es la viscosidad del solvente,  $[\eta]$  la viscosidad intrínseca del material,  $M_w$  el peso molecular del

material, R es la constante de los gases ideales, T la temperatura ambiente a la que es llevada a cabo el procesado.

El cálculo de la viscosidad del solvente se establece mediante la ley general de las mezcla, la viscosidad de cada solvente fue obtenida mediante la ficha técnica de los proveedores.

$$\eta_s = x_{H_2O}\eta_{H_2O} + x_{HFP}\eta_{HFP} = 1.3461 \text{ cp}$$

El cálculo del peso molecular se evaluó mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$M_w = M_{wPVA} + M_{wcol} + M_{wPLGA} = 375686 \text{ g/mol}$$

El proceso de electrospinning se realizó a una temperatura ambiente de 298.15 K, y se utilizó una constante de gases ideales de  $8.314472 \text{ Kg m}^2 \text{ s}^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . El tiempo de relajación máximo del material es de 0.016 s lo que es un resultado muy por encima de los reportados en otros materiales (Huang *et al.*, 2003; Koski *et al.*, 2004), lo cual sugiere que el peso molecular del PVA, PLGA y colágeno I en el flujo viscoelástico interfieren de manera directa en el tiempo de alineamiento de estos materiales en la fibra mediante la técnica de electrospinning.

#### 4.6.7.4 Voltaje crítico durante el desarrollo de fibras

El voltaje crítico establece la relación de las condiciones de procesamiento con la tensión superficial del flujo viscoelástico, véase *Tensión superficial*, en el cual se establece la relación del peso molecular y su interacción con el voltaje para modificar el diámetro de las fibras durante el proceso de electrospinning (Huang *et al.*, 2003; Koski *et al.*, 2004). La ecuación que establece el dominio sobre esta relación es la siguiente:

$$V_c^2 = \frac{4H^2}{L^2} \cdot \left( \ln \frac{2L}{R} - \frac{3}{2} \right) \cdot 0.117\pi\gamma R$$

Donde  $V_c^2$  simboliza el voltaje crítico, H distancia entre la punta de la aguja y el colector (11 cm), L longitud de la aguja (3.6 cm), R diámetro interno de la aguja (0.1 cm), gamma es la tensión superficial (93 dina  $\text{cm}^{-1}$ , véase *Tensión superficial*). El voltaje crítico calculado con estas condiciones da un resultado de 543.27 KV, lo cual indica una clara intervención del peso molecular en la distribución del diámetro de las fibras.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

La fabricación de fibras compuestas por PVA, PLGA y colágeno tipo I en solvente amigable con el medio ambiente y de bajo riesgo a la salud es posible mediante la técnica de electrospinning. En este punto se establece la relación del colágeno como un puente de unión entre el PVA y el PLGA por los resultados obtenidos mediante SEM y termogavimetría, asimismo se denota la importancia del PVA en la estabilidad térmica del material debido a sus propiedades cristalinas como se observan en los resultados termogavimétricos. El andamio IFP obtenido muestra características morfológicas y químicas muy superiores a sus predecesores AFP y EFP, así como propiedades mecánicas que superan a las reportadas en los andamios usados en la piel y con propiedades similares a algunos tipos de hueso. El material presenta un hinchamiento de 55.1% en relación a su peso inicial así como una absorción de agua bastante notable del 200%, el material también presenta una degradación importante en SBF de 64% en 28 días, así como una porosidad del 27.38% y propiedades mecánicas de tensión (1.25 MPa) superiores a los reportados para la dermis de la piel ( $27.7 \pm 6.7$  KPa) (Oftadeh *et al.*, 2018) y propiedades mecánicas similares a las propuestas en el hueso esponjoso de la vértebra (1.2 MPa) (Gonzalez Arrieta *et al.*, 2007).

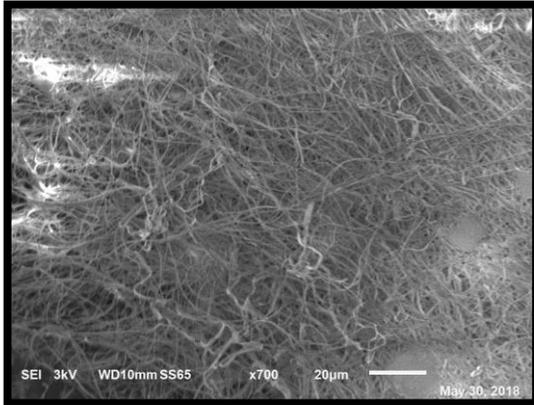
Se puede concluir que la metodología establecida en el presente trabajo logra conseguir un material de tipo andamio fibrilar que con base en las características que presenta podría ser de utilidad en la ingeniería de tejidos, con un futuro estudio de la actividad celular sobre el andamio.

Así mismo se puede concluir que ciertas condiciones del proceso, durante el electrohilado, requieren un mayor estudio del material descrito, se sugiere la modificación de aspectos como la distancia de la aguja con el colector, peso molecular de los componentes, concentración de la fase dispersa, con la finalidad de encontrar rangos de estabilidad estructural del material, distancias y voltajes óptimos que permitan el estudio en cuanto a la distribución de diámetros del material, puesto que un material con alta cantidad de fibras de menor diámetro

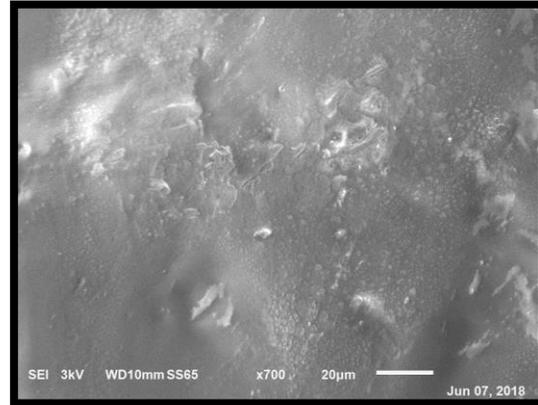
debe en teoría presentar mayores propiedades mecánicas debido a la distribución del polímero en la fibra, así como también se propone el efecto del peso molecular ligado al grado de cristalinidad y concentración de PVA en el material. Para en un futuro mejorar las características y propiedades descritas en este trabajo.

## ANEXOS

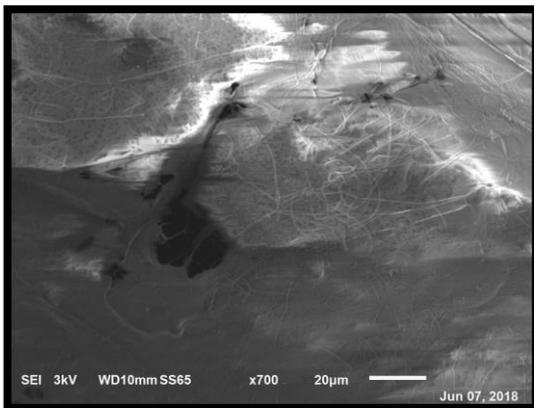
A continuación se muestran las morfologías obtenidas en la fase preliminar en el desarrollo de los andamio A1 al A8-PVA.



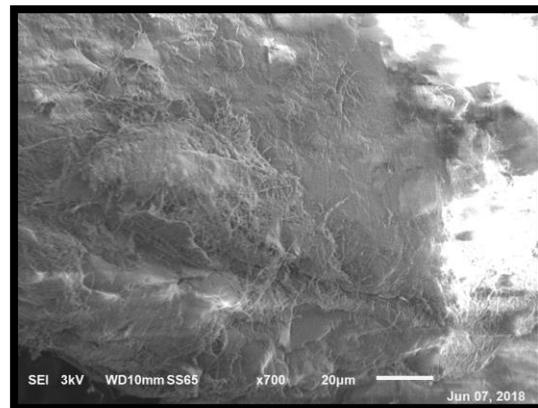
*Figura 51. Andamio A1-PVA a 700 aumentos.*



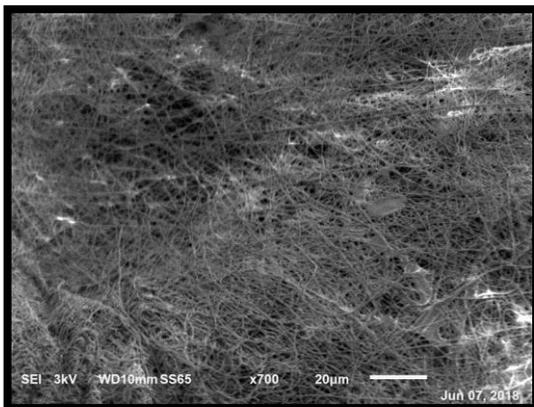
*Figura 52. Andamio A2-PVA a 700 aumentos.*



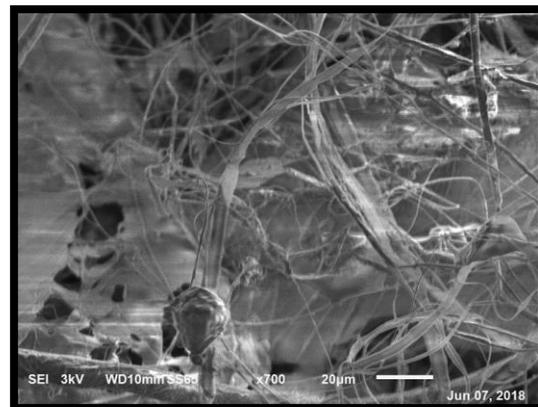
*Figura 53. Andamio A4-PVA a 700 aumentos.*



*Figura 54. Andamio A5-PVA a 700 aumentos.*

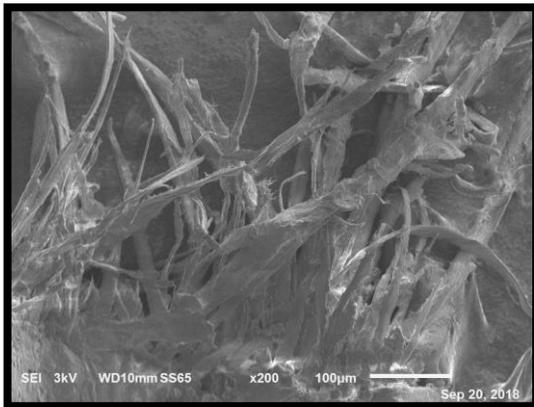


*Figura 55. Andamio A6-PVA a 700 aumentos.*

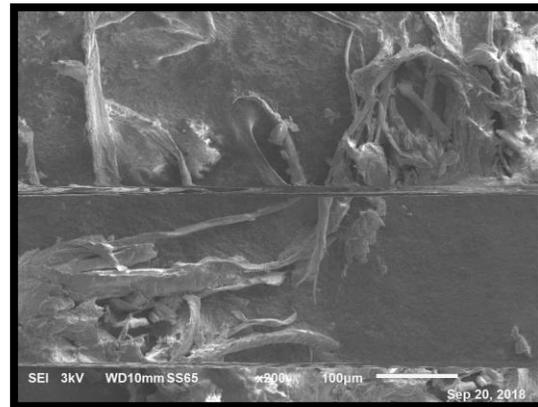


*Figura 56. Andamio A8-PVA a 700 aumentos.*

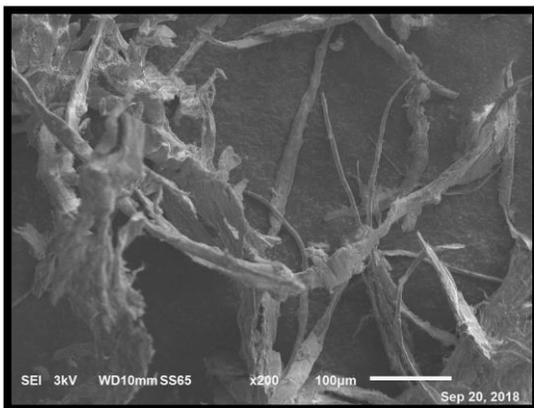
A continuación se muestran las morfologías obtenidas en el desarrollo de los andamio AFP del AFP-6B al AFP-7D.



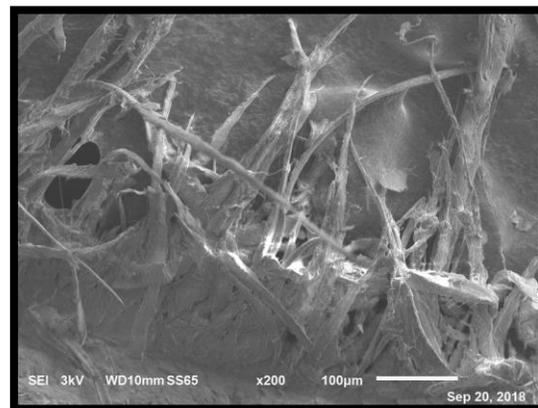
*Figura 57. Andamio AFP-6B a 200 aumentos.*



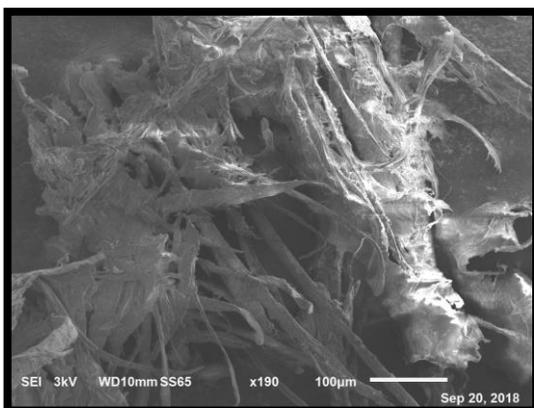
*Figura 58. Andamio AFP-6C a 200 aumentos.*



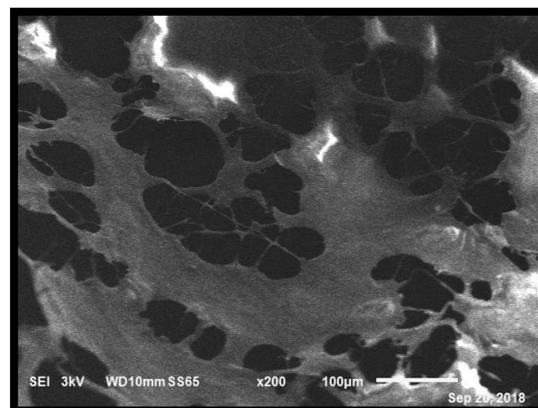
*Figura 59. Andamio AFP-6D a 200 aumentos.*



*Figura 60. Andamio AFP-7B a 200 aumentos.*

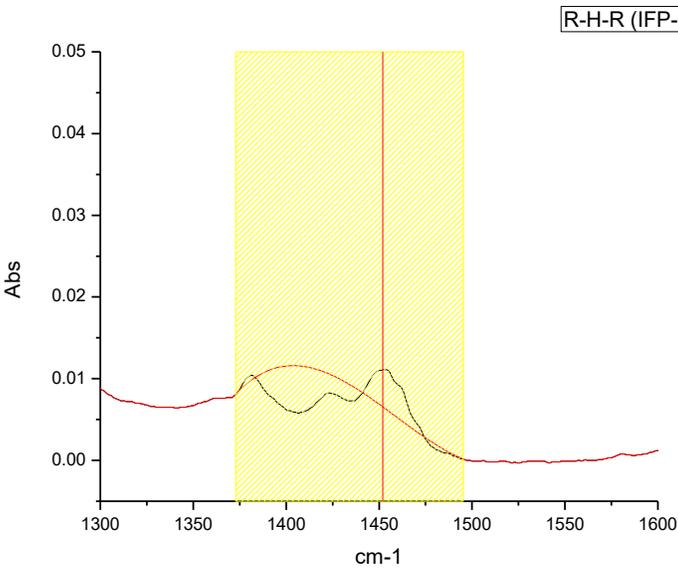
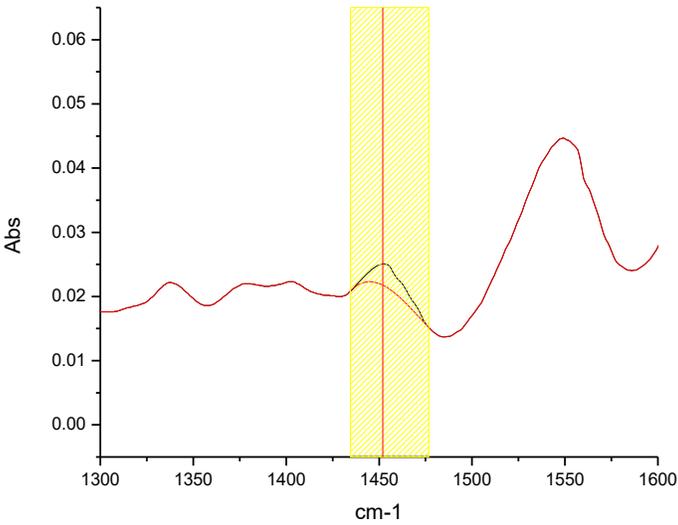


*Figura 61. Andamio AFP-7C a 200 aumentos.*



*Figura 62. Andamio AFP-7D a 200 aumentos.*

Tabla 9. Área bajo la curva de PVA, PLGA, colágeno tipo I, andamio IFP-1.

<b>Flexión dentro del plano</b>	
 <p style="text-align: right;">R-H-R (IFP-1)</p>	<p>Integrate from 1373 to 1495: Area = 0.8265</p>
 <p style="text-align: right;">-O-H (Col1)</p>	<p>Integrate from 1435 to 1477: Area = 0.9152</p>

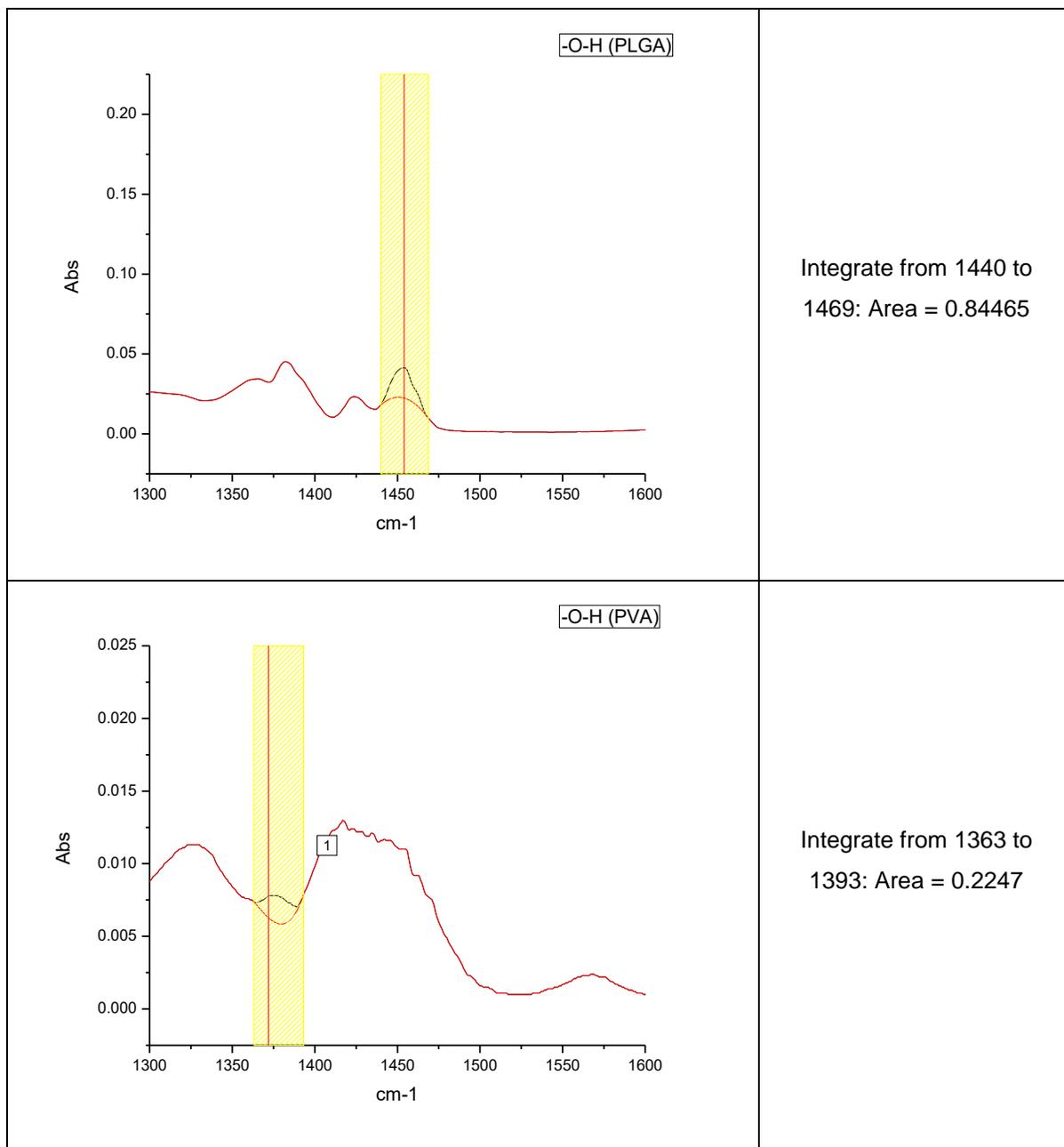
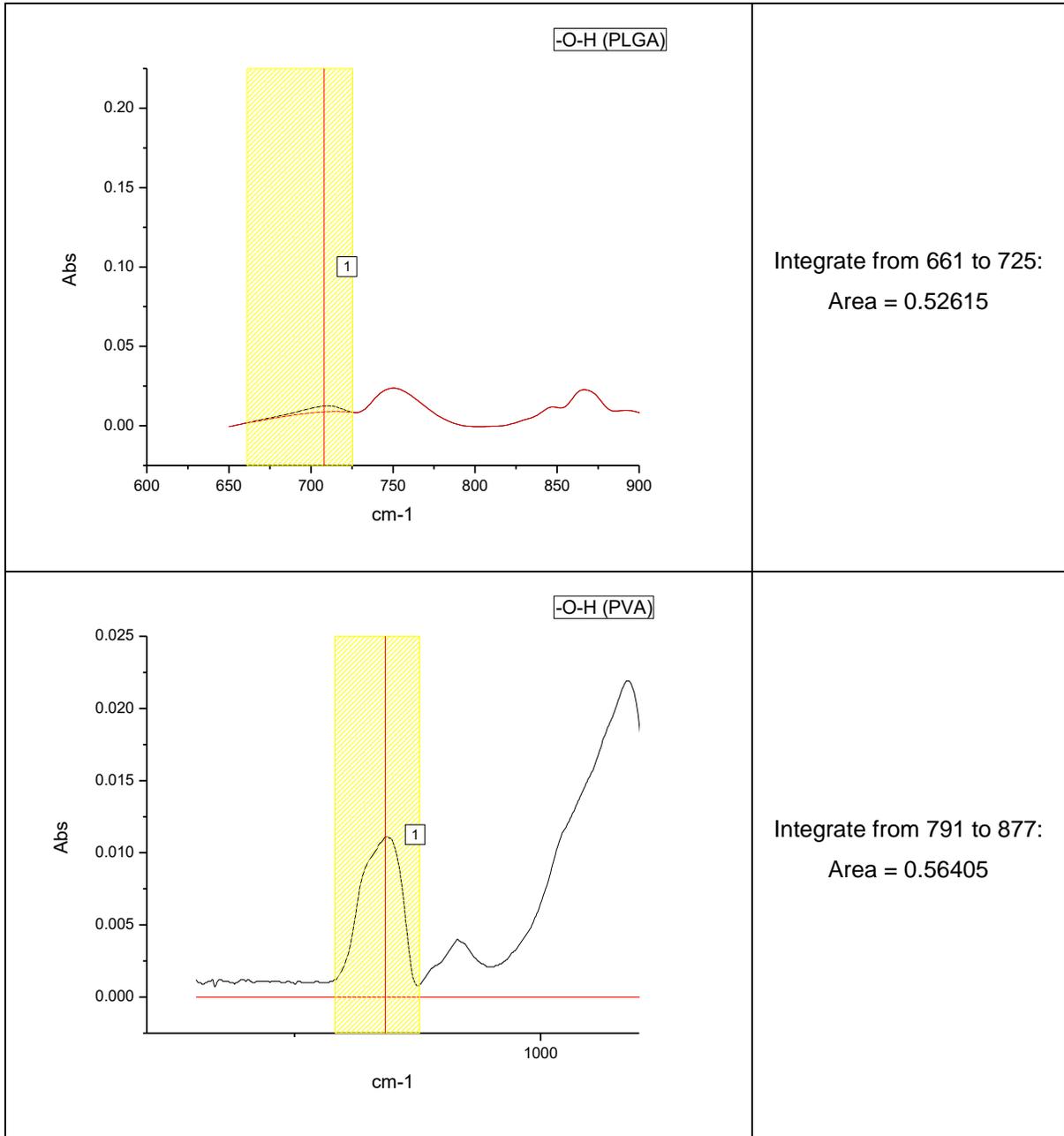


Tabla 10. Área bajo la curva de PVA, PLGA, colágeno tipo I, andamio IFP-1, TGA Y DTG.

<b>Flexión fuera del plano</b>	
<p style="text-align: right;">-O-H (IFP-1)</p>	<p>Integrate from 676 to 778: Area = 0.23375</p>
<p style="text-align: right;">-O-H (Col1)</p>	<p>Integrate from 695 to 735: Area = 0.1671</p>



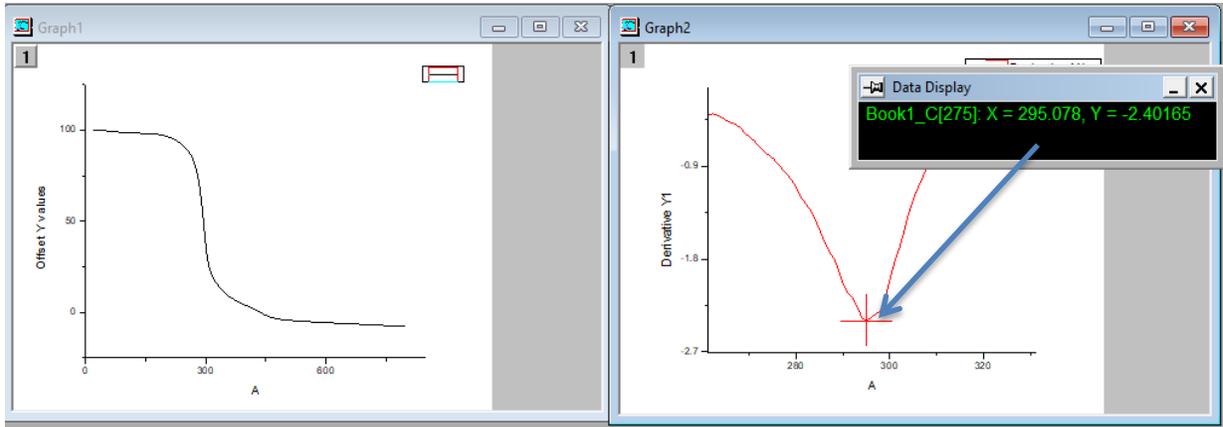


Figura 63. Gráfica TGA y DTG del andamio IFP-1.

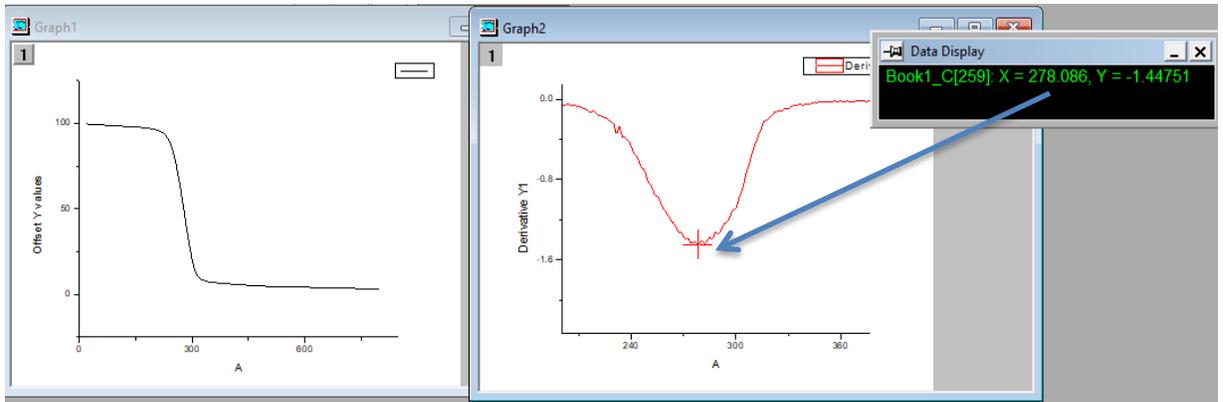


Figura 64. Gráfica TGA y DTG del andamio IFP-3.

Participación en el Congreso Internacional en Tecnología, Innovación y Docencia (CITID, 2019).

CITID 2019

ISSN No. 2594-0465

## UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELECTROSPINNING EN LA OBTENCIÓN DE UN ANDAMIO TISULAR PVA/PLGA/COLÁGENO

O. G. Román-Díaz<sup>1</sup>, C. D. Arrieta-Gonzalez<sup>1</sup>, W. N. Hernández-Díaz<sup>1</sup>, R. Salgado-Delgado<sup>1</sup>, Z. Vargas-Galarza<sup>1</sup> y R. C. Cárdenas-Valdez<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Zacatepec, Calzada Tecnológico No.27, Col. Centro, Zacatepec Morelos, México- [omar.grd92@gmail.com](mailto:omar.grd92@gmail.com), [cdaglez@gmail.com](mailto:cdaglez@gmail.com), [wendynetz@yahoo.com.mx](mailto:wendynetz@yahoo.com.mx), [renesalgado@hotmail.com](mailto:renesalgado@hotmail.com), [zully.vg@itzacatepec.edu.mx](mailto:zully.vg@itzacatepec.edu.mx).

<sup>2</sup> Tecnológico Nacional de México/I.T. Zacatepec, Departamento de Ingeniería Industrial, Calzada Tecnológico No. 27, Zacatepec, Morelos, C.P. 62780, México.

*Área de participación: Materiales poliméricos*

**Resumen:** La necesidad actual de reemplazo, reparación y regeneración de órganos y tejidos para pacientes se encuentra en continuo crecimiento, tal que los suministros disponibles no cubren la demanda existente; debido principalmente a la falta de donantes, y a problemas de compatibilidad que llevan al rechazo de trasplantes. Para superar estas desventajas, se han investigado el uso de andamios biocompatibles como alternativa al trasplante [1]. Entre estos andamios se encuentran: cementos óseos [2], hidrogeles para liberación de fármacos [3], materiales para prótesis y para pacientes cardiovasculares [4, 5, 6, 7]. En el presente trabajo se describe el método de obtención de un andamio fibrilar poroso mediante la técnica de electrospinning. El andamio fibrilar fue obtenido variando las concentraciones de poli vinil alcohol (PVA), ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA, 75:25) y colágeno tipo 1. Las condiciones del electrohilado fueron de 6, 8, 10 y 18 kVs con un diámetro de aguja interno de 3 mm, una distancia del colector de 15 cm. El andamio obtenido fue almacenado a 6°C. Se realizó un seguimiento del proceso haciendo uso de FTIR y su posterior caracterización por SEM, para corroborar la morfología del material.

Constancia de aceptación para participación en Congreso Nacional de Academia Journals.

**ACADEMIA JOURNALS**  
OPUS PRO SCIENTIA ET STUDIUM

SAN ANTONIO, TX  
INFO@ACADEMIAJOURNALS.COM  
ACADEMIAJOURNALS.COM

10 junio 2019

AUTORES: Ing. Omar Genaro Román Díaz  
Dra. Zully Vargas Galarza  
Dra. Cinthya Dinorah Arrieta González  
Dra. Wendy Netzy Hernández Díaz  
M.C. Roberto Carlos Cárdenas Váldez

ARTÍCULO: Desarrollo y Caracterización de un Andamio Electrohilado a partir de Poli vinil alcohol, Colágeno tipo I, Ácido poli (láctico-co-glicólico)

ARTÍCULO Núm: PUE044

Estimados autores,

Con agrado les informamos que, con fecha de hoy, el artículo arriba citado ha sido aprobado para su presentación en el Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Puebla 2019. El congreso tendrá lugar los días 15 y 16 de agosto del año 2019, en Puebla, Puebla, México.

El artículo será incluido en las publicaciones del congreso, que incluyen modalidades ISSN e ISBN. Le recordamos que la política del congreso es que para recibir su reconocimiento e incluir su artículo en las publicaciones, es necesario presentar el mismo en el congreso. Le rogamos que utilice su número de artículo en toda correspondencia con Academia Journals.

Saludos cordiales.

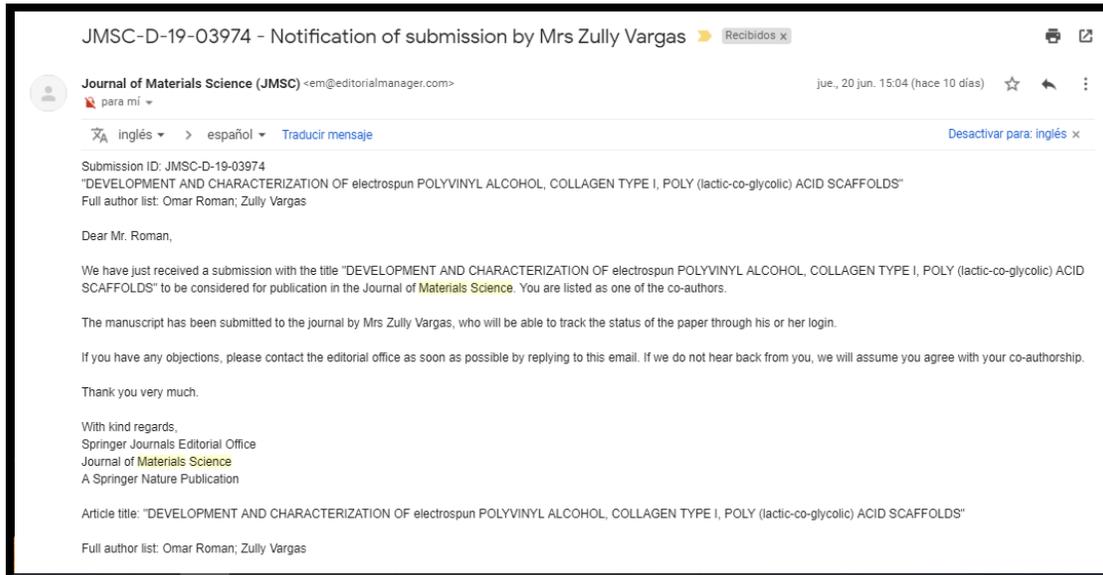


Dr. Rafael Moras, P.E.  
Editor  
Academia Journals  
Info@academiajournals.com

---

ACADEMIA JOURNALS  
OPUS PRO SCIENTIA ET STUDIUM

## Envío de artículo y recepción por parte de revista Journal of Materials Science.



## Constancia por participación oral en el XL encuentro nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A. C.



Constancia por asistencia en el XL encuentro nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A. C.



## REFERENCIAS

- Adragna, C., Jurczynszyn, S., Comín, R., Nocera, A. D., Salvatierra, N. A., & Cid, M. P. (2018). Collagen obtaining for 3D printing to create biological substitutes for biomedical applications, *22*(1), 24–32.
- Agarwal, B. S., Wendorff, J. H., & Greiner, A. (2009). Progress in the Field of Electrospinning for Tissue Engineering Applications. *Advances Materials*, 3343–3351. <https://doi.org/10.1002/adma.200803092>
- Agarwal, S., Wendorff, J. H., & Greiner, A. (2008). Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, *49*(26), 5603–5621. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.09.014>
- Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, *40*(5), 363–408. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10>
- Asran, A. S., Henning, S., & Michler, G. H. (2010). Polyvinyl alcohol-collagen-hydroxyapatite biocomposite nanofibrous scaffold: Mimicking the key features of natural bone at the nanoscale level. *Polymer*, *51*(4), 868–876. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.12.046>
- Bornstein, P., & Sage, H. (1980). Structurally Distinct Collagen Types. *Annual Review of Biochemistry*, *49*(1), 957–1003. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.004521>
- Brown, J. H., Das, P., DiVito, M. D., Ivancic, D., Tan, L. P., & Wertheim, J. A. (2017). Nanofibrous PLGA electrospun scaffolds modified with type I collagen influence hepatocyte function and support viability in vitro. *Acta Biomaterialia*, *73*, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.009>
- Chen, H., Zeng, Y., Liu, W., Zhao, S., Wu, J., & Du, Y. (2013). Multifaceted applications of nanomaterials in cell engineering and therapy. *Biotechnology Advances*, *31*(5), 638–653. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.08.002>
- Chen, Q., Liang, S., & Thouas, G. A. (2013). Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, *38*(3–4), 584–671. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.05.003>

- Chew, S. Y., Wen, Y., Dzenis, Y., & Leong, K. W. (2006). The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 4751–4770.
- Chiu, J. B., Luu, Y. K., Fang, D., Hsiao, B. S., Chu, B., & Hadjiargyrou, M. (2005). Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Biomedical Applications. *Biomedical Nanotechnology*, 1(2), 115–132. <https://doi.org/10.1166/jbn.2005.018>
- Chronakis, I. S. (2005). Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process — A review. *Materials Processing Technology*, 167, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2005.06.053>
- Conde, A., & Damborenea, J. J. De. (2002). Electrochemical impedance spectroscopy for studying the degradation of enamel coatings, 44, 1555–1567.
- Dersch, R., Steinhart, M., Boudriot, U., Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2005). Nanoprocessing of polymers : applications in medicine , sensors , catalysis , photonics, (January), 276–282. <https://doi.org/10.1002/pat.568>
- Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., & Giannoudis, P. V. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 9(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>
- Duque Sánchez, L. M., Rodríguez, L., & López, M. (2013). Electrospinning: The Nanofibers Age. *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen Iber. Polímeros*, 14(141), 10–27.
- Ellis, M. J., & Chaudhuri, J. B. (2006). Poly(lactic-co-glycolic acid) Hollow Fibre Membranes for use as a Tissue Engineering Scaffold. *Biotechnology and Bioengineering*, 96, 177–187. <https://doi.org/10.1002/bit>
- F. Ardila, L., A. Estupiñan, H., Vásques, C., & Y. Peña, D. (2011). Estudio de la biodegradación hidrolítica de recubrimientos de biopolímeros / cerámico mediante EQCM. *Revista de Ingeniería*, (1), 41–46.
- Ferrone, M. L., & Raut, C. P. (2012). Modern Surgical Therapy: Limb Salvage and the Role of Amputation for Extremity Soft-Tissue Sarcomas. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 21(2), 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2011.11.001>

- Ficek, B. J., & Peppas, N. A. (1993). Novel preparation of poly (vinyl alcohol) microparticles without crosslinking agent for controlled drug delivery of proteins. *Journal of Controlled Release*, 27(3), 259–264. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(93\)90156-Y](https://doi.org/10.1016/0168-3659(93)90156-Y)
- Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., & Hatton, P. V. (2014). An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 3640–3659. <https://doi.org/10.3390/ijms15033640>
- Gomes, S., Leonor, I. B., Mano, J. F., Reis, R. L., & Kaplan, D. L. (2012). Progress in Polymer Science Natural and genetically engineered proteins for tissue engineering, 37, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.07.003>
- Gonzalez Arrieta, C. D., Chac, G., & Gonz, G. (2007). Efecto de la Composición Química y Tratamiento Térmico en la Resistencia a la Corrosión en Fluidos Humanos de Materiales Intermetálicos Tipo Fe 3 Al (PROTOCOLO DE TESIS DOCTORAL).
- Gopal, R., Kaur, S., Ma, Z., Chan, C., Ramakrishna, S., & Matsuura, T. (2006). Electrospun nanofibrous filtration membrane. *Membrane Science*, 281, 581–586. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.04.026>
- Granados, M. V., Montesinos-Montesinos, J. J., & Álvarez-Pérez, M. A. (2017). Adhesión y proliferación de las células troncales mesenquimales de médula ósea en andamios fibrilares de poli (ácido L-láctico) (PLA). *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, 38(1), 288–296. <https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.24>
- Hadjizadeh, A., Savoji, H., & Ajji, A. (2016). A Facile Approach for the Mass Production of Submicro/Micro Poly (Lactic Acid) Fibrous Mats and Their Cytotoxicity Test towards Neural Stem Cells. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8921316>
- He, F. L., Li, D. W., He, J., Liu, Y. Y., Ahmad, F., Liu, Y. L., ... Yin, D. C. (2018). A novel layer-structured scaffold with large pore sizes suitable for 3D cell culture prepared by near-field electrospinning. *Materials Science and Engineering C*, 86, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.016>

- Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63(15), 2223–2253. [https://doi.org/10.1016/S0266-3538\(03\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0266-3538(03)00178-7)
- Hyon, S.-H., Cha, W.-I., Ikada, Y., Kita, M., Ogura, Y., & Honda, Y. (1994). Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 5(5), 397–406. <https://doi.org/10.1163/156856294X00103>
- Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. <https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0124>
- Ipohorski, M., & Bozzano, P. B. (2013). Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales. *Ciencia e Investigación*, 63, 43–53.
- J.-H., J., S., B.-W., Y., O., J.P., V., & G.C., W. (1996). Outcome of subcutaneous islet transplantation improved by polymer device. *Transplantation*, 61(11), 1557–1561. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L26190894%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1097/00007890-199606150-00001>
- Jayaraman, K., Kotaki, M., Zhang, Y., Mo, X., & Ramakrishna, S. (2004). Recent Advances in Polymer Nanofibers REVIEW, 4(1). <https://doi.org/10.1166/jnn.2004.078>
- Jiang, H., Hu, Y., Li, Y., & Zhao, P. (2005). A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents, 108, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.08.006>
- Kenley, R. A., Lee, M. O., Mahoney, T. R., & Sanders, L. M. (1987). Poly(lactide-co-glycolide) Decomposition Kinetics in Vivo and in Vitro. *Macromolecules*, 20(10), 2398–2403. <https://doi.org/10.1021/ma00176a012>
- Keun, W., Ho, J., Seung, T., & Ho, W. (2004). The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly ( ethylene oxide ) fibers. *Polymer*, 45, 2959–2966. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.03.006>
- Khil, M., Bhattarai, S. R., Kim, H., Kim, S., & Lee, K. (2004). Novel Fabricated Matrix Via Electrospinning for Tissue Engineering, 117–124.

- <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30122>
- Kobayashi, M. (2003). Preliminary study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials*, 24(4), 639–647. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00378-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00378-2)
- Kobayashi, M., & Oka, M. (2004). Composite Device for Attachment of Polyvinyl Alcohol-hydrogel to Underlying Bone. *Artificial Organs*, 28(8), 734–738. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2004.00079.x>
- Kokubo, T. (1991). Bioactive glass ceramics : properties and applications, 12, 155–163.
- Koski, A., Yim, K., & Shivkumar, S. (2004). Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters*, 58(3–4), 493–497. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(03\)00532-9](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(03)00532-9)
- Krumova, M., López, D., Benavente, R., Mijangos, C., & Pereña, J. . (2000). Effect of crosslinking on the mechanical and thermal properties of poly(vinyl alcohol). *Polymer*, 41(26), 9265–9272. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00287-1](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00287-1)
- Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D., & Farson, D. (2007). Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, 27, 504–509. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.019>
- Lee, K. H., Kim, H. Y., Khil, M. S., Ra, Y. M., & Lee, D. R. (2003). Characterization of nano-structured poly( $\epsilon$ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. *Polymer*, 44, 1287–1294.
- Li, C., Vepari, C., Jin, H., Joo, H., & Kaplan, D. L. (2006). Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering, 27, 3115–3124. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.022>
- Li, M., Mondrinos, M. J., Gandhi, M. R., Ko, F. K., Weiss, A. S., & Lelkes, P. I. (2005). Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering, 26, 5999–6008. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.030>
- Li, W., Laurencin, C. T., Caterson, E. J., Tuan, R. S., & Ko, F. K. (2001). Electrospun nanofibrous structure : A novel scaffold for tissue engineering.
- Li, W., Mauck, R. L., & Tuan, R. S. (2005). Electrospun Nanofibrous Scaffolds : Production , Characterization , and Applications for Tissue Engineering and

- Drug Delivery, 1(3), 259–275. <https://doi.org/10.1166/jbn.2005.032>
- Li, X., Kanjwal, M. A., Lin, L., & Chronakis, I. S. (2013). Electrospun polyvinyl-alcohol nanofibers as oral fast-dissolving delivery system of caffeine and riboflavin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.016>
- Lutolf, M. P., & Hubbell, J. A. (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature Biotechnology*, 23(1), 47–55. <https://doi.org/10.1038/nbt1055>
- Ma, Z., Ph, D., Kotaki, M., Ph, D., & Inai, R. (2005). Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds, 11(1).
- MacDonald, K., Price, R., & Boyd, D. (2017). The Feasibility and Functional Performance of Ternary Borate-Filled Hydrophilic Bone Cements: Targeting Therapeutic Release Thresholds for Strontium. *Journal of Functional Biomaterials*, 8(3), 28. <https://doi.org/10.3390/jfb8030028>
- MacNeil, S. (2008). Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials Today*, 11(5), 26–35. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(08\)70087-7](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(08)70087-7)
- Martou, G., & Antonyshyn, O. M. (2011). Advances in surgical approaches to the upper facial skeleton. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 19(4), 242–247. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e328347f895>
- Matthews, J. A., Wnek, G. E., Simpson, D. G., & Bowlin, G. L. (2002). Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 3(2), 232–238. <https://doi.org/10.1021/bm015533u>
- Meneghello, G., Parker, D. J., Ainsworth, B. J., Perera, S. P., Chaudhuri, J. B., Ellis, M. J., & De Bank, P. A. (2009). Fabrication and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid)/polyvinyl alcohol blended hollow fibre membranes for tissue engineering applications. *Journal of Membrane Science*, 344(1–2), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.07.034>
- Mi, H.-Y., Jing, X., Yu, E., Wang, X., Li, Q., & Turng, L.-S. (2018). Manipulating the structure and mechanical properties of thermoplastic polyurethane/polycaprolactone hybrid small diameter vascular scaffolds fabricated via electrospinning using an assembled rotating collector. *Journal of*

- the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 78, 433–441.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.11.046>
- Mondragón Cortez, P. (2017). *Espectroscopia de infrarrojo para todos* (Primer edi). Zapopan, Jalisco.
- Myoung, K., Hogan, C. J., Matsubayashi, Y., Kawabe, M., Iskandar, F., & Okuyama, K. (2007). Nanoparticle filtration by electrospun polymer fibers. *Chemical Engineering Science*, 62, 4751–4759.  
<https://doi.org/10.1016/j.ces.2007.06.007>
- Ngawhirunpat, T., Opanasopit, P., Rojanarata, T., & Akkaramongkolporn, P. (2009). Development of Meloxicam-Loaded Electrospun Polyvinyl Alcohol Mats as a Transdermal Therapeutic Agent. *Pharmaceuticl Development and Technology*, 14, 73–82. <https://doi.org/10.1080/10837450802409420>
- Oftadeh, R., Connizzo, B. K., Nia, H. T., Ortiz, C., & Grodzinsky, A. J. (2018). Biological connective tissues exhibit viscoelastic and poroelastic behavior at different frequency regimes: Application to tendon and skin biophysics. *Acta Biomaterialia*, 70, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.01.041>
- Oktay, B., Kayaman-Apohan, N., Erdem-Kuruca, S., & Süleymanoğlu, M. (2015). Fabrication of collagen immobilized electrospun poly (vinyl alcohol) scaffolds. *Polymers for Advanced Technologies*, 26(8), 978–987.  
<https://doi.org/10.1002/pat.3512>
- Palacios Casarrubias, S. (2018). Development of a polyacrylamide / hydroxiapatite / chitosan / poly (2-hydroxiethyl methacrylate) composite material and in vitro performance with SBF.
- Prabhakaran, M. P., Kai, D., Ghasemi-mobarakeh, L., & Ramakrishna, S. (2011). Electrospun biocomposite nanofibrous patch for cardiac tissue engineering. *Biomedical Materials*, 6. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/6/5/055001>
- Raj, H., Prasad, M., Taek, K., Seo, Y. A., Raj, D., Tshool, S., & Yong, H. (2011). Electrospun nylon-6 spider-net like nanofiber mat containing TiO<sub>2</sub> nanoparticles : A multifunctional nanocomposite textile material. *Journal of Hazardous Materials*, 185(1), 124–130.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.006>

- Ravichandran, R., Ng, C. C. H., Liao, S., Pliszka, D., Raghunath, M., Ramakrishna, S., & Chan, C. K. (2012). Biomimetic surface modification of titanium surfaces for early cell capture by advanced electrospinning. *Biomedical Materials*, 7, 1–16. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/7/1/015001>
- Robles-García, M. A., Francisco, R.-F., Márquez-Ríos, E., Barrera-Rodríguez, A., Aguilar-Martínez, J., & toro-Sánchez, C. L. Del. (2014). APLICACIONES BIOMÉDICAS, TEXTILES Y ALIMENTARIAS DE NANOESTRUCTURAS ELABORADAS POR ELECTROHILADO. *Biotecnia*, 16(2), 44–52. Retrieved from <http://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/46/42>
- Sadeghi-Avalshahr, A., Nokhasteh, S., Molavi, A. M., Khorsand-Ghayeni, M., & Mahdavi-Shahri, M. (2017). Synthesis and characterization of collagen/PLGA biodegradable skin scaffold fibers. *Regenerative Biomaterials*, 4(5), 309–314. <https://doi.org/10.1093/rb/rbx026>
- Sartuqui, J. (2017). Materiales-híbridos fibrilares en base a polímeros biodegradables. 1., (i), 1–5.
- Siddhesh, D. P., Papadimitrakopoulos, F., & Burgess, D. J. (2004). Dexamethasone-Loaded Poly(Lactic-Co-Glycolic) Acid Microspheres/Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogel Composite Coatings for Inflammation Control. *Diabetes Technology & Therapeutics*, pp. 887–897. <https://doi.org/10.1097/WNO.0b013e3181c2d07e>
- Skoog, D. A., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental* (Sexta edic). CENGAGE Learning.
- Smith, L. A., & Ma, P. X. (2004). Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering, 39, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.12.004>
- Son, W. O. N. K., Youk, J. I. H. O., Lee, T. S., & Park, W. O. N. H. O. (2003). Electrospinning of Ultrafine Cellulose Acetate Fibers: Studies of a New Solvent System and Deacetylation of. *Polymer Physics*, 42, 5–11.
- Srinivasan, G., & Renekers, D. H. (1995). Structure and Morphology of Small Diameter Electrospun Aramid Fibers\*. *Polymer International*, 36, 195–201.
- Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering, 11(5), 18–25.
- Subbiah, T., Bhat, G. S., Tock, R. W., Parameswaran, S., & Ramkumar, S. S.

- (2004). Electrospinning of Nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 96, 557–569. <https://doi.org/10.1002/app.21481>
- Supp, D. M., & Boyce, S. T. (2005). Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clinics in Dermatology*, 23(4), 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.07.023>
- Taylor, G. (1969). Electrically driven jets. *The Royal Society*, 313, 453–475.
- Teo, W. E., & Ramakrishna, S. (2006). A review on electrospinning design and nanofibre assemblies, 89. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/14/R01>
- Thanoo, B. C., Sunny, M. C., & Jayakrishnan, A. (1993). Controlled Release of Oral Drugs from Cross-linked Polyvinyl Alcohol Microspheres. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 45(1), 16–20. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1993.tb03671.x>
- Tong, H., Zhang, X., & Wang, M. (2012). A new nano fiber fabrication technique based on coaxial electrospinning. *Materials Letters*, 66(1), 257–260. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.08.095>
- Venugopal, J., & Ramakrishna, S. (2005). Applications of Polymer Nanofibers in Biomedicine and Biotechnology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 125, 147–157.
- Wang, Z., Zhao, C., & Pan, Z. (2015). Porous bead-on-string poly(lactic acid) fibrous membranes for air filtration. *Journal of Colloid and Interface Science*, 441, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.11.041>
- Wu, L., Yuan, X., & Sheng, J. (2005). Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning.pdf. *Journal of Membrane Science*, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.10.024>
- Xue, C., Chen, J., Yin, W., Jia, S., & Ma, J. (2012). Applied Surface Science Superhydrophobic conductive textiles with antibacterial property by coating fibers with silver nanoparticles. *Applied Surface Science*, 258(7), 2468–2472. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.10.074>
- Yao, J., Wang, K., Ren, M., Zhe Liu, J., & Wang, H. (2012). Phase inversion spinning of ultrafine hollow fiber membranes through a single orifice spinneret. *Journal of Membrane Science*, 421–422, 8–14.

<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.03.069>

Youn Chang, N., Seok-Whan, M., Kwen Haeng, L., Chong Won, P., Tae Suk, S., You Jin, J., ... Heung Jae, C. (2005). Evaluations of Poly (vinil alcohol) Hydrogels Cross-Linked under gamma-Ray Irradiation. *J. Ind. Eng. Chem*, 11, 159–164. Retrieved from <https://www.cheric.org/PDF/JIEC/IE11/IE11-1-0159.pdf>

Zhang, Q., Welch, J., Park, H., Wu, C., Sigmund, W., & Marijnissen, J. C. M. (2010). Improvement in nanofiber filtration by multiple thin layers of nanofiber mats. *Journal of Aerosol Science*, 41(2), 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2009.10.001>

Zhao, C., Tan, A., Pastorin, G., & Ho, H. K. (2013). Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Biotechnology Advances*, 31(5), 654–668. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.08.001>