



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS



**SÍNTESIS DE MATERIALES COMPUESTOS BASE
BIOPOLÍMERO MEDIANTE EL PROCESO DE ELECTROHILADO**

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias presenta:

Q.F.B. Luis Humberto Delgado Rangel

Directora de tesis:

D.C. Janett Betzabe González Campos

Sinodales:

D.C. Judit A. Aviña Verduzco

D.C. Rosa E. Del Río Torres

D.C. Yliana López Castro

D.C. Manuel Arroyo Albiter

Morelia Mich. Agosto 2017

Dedicatoria.

A Mayra y Janikua.

Ustedes son la lluvia de flores que empapa de felicidad mi vida.

Las amo a las dos y agradezco que me amen

Agradecimientos.

A CONACYT por la beca otorgada para realizar los estudios de Maestría y al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas que me dio la oportunidad de convertirme en alumno de la UMSNH con su programa de Maestría en Ciencias Químicas.

A la doctora Betzabe que me adopto dentro de su grupo de investigación dándome su confianza, y ayudándome a expandir el panorama científico que yo conocía.

A mi mamá y mi papá que siempre me enseñaron el valor de estudiar y me impulsaron a no rendirme.

A la familia de Mayra que dese que llegue a Michoacán me han hecho sentir como en casa.

A mis compañeras de generación en el posgrado Jessi y Araceli, así como a mis compañeros dentro del grupo de trabajo Ale, Fany e Ismael.

A mis sinodales cuyos consejos semestre tras semestre me ayudaron a desarrollar mejor mi trabajo de investigación.

Índice

Abstract	1
Resumen.....	2
1. Introducción	3
2. Objetivos	5
2.1. Objetivo General	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
3. Justificación	6
4. Hipótesis	7
5. Antecedentes	8
5.1. Electrohilado	8
5.1.1. Electrohilado en la ingeniería de tejidos.	10
5.2. Andamios celulares.	10
5.3. Biopolímeros.	12
5.3.1. Colágeno (CG)	12
5.3.2. Sulfato de condroitina (SC)	13
5.3.3. Alcohol polivinílico (PVA)	14
5.3.4. Ácido Hialurónico (HA).....	15
5.4 Antecedentes dentro del grupo de trabajo.....	15
6. Materiales y Métodos	18
7. Resultados y Discusión	19
7.1. Colágeno/Alcohol polivinílico + Sulfato de condroitina	19
7.1.1. Combinación CG/PVA + SC (25/37.5+37.5)	19
7.1.1.1 Análisis estructural mediante FESEM	21
7.1.1.1.1 Muestras 1 y 1.A.....	21
7.1.1.1.2 Muestra 2 y 2.A	22
7.1.1.1.3 Muestras 3 y 3.A.....	22
7.1.1.1.4 Muestra 4 y 4.A	24
7.1.1.1.5 Muestra 5 y 5.A	24
7.1.1.1.6 Muestra 10 y 10.A	25
7.1.1.2 Análisis superficial EDS.....	25
7.1.1.3 Análisis infrarrojo.....	27

7.1.1.3.1 Materiales 1, 1.A, 2, 2.A, 3 y 3.A	29
7.1.1.3.2 Materiales 4, 4.A, 5, 5.A, 10 y 10.A	31
7.1.2. Combinación CG/PVA + SC (25/50+25)	33
7.1.2.1 Análisis morfológico por FESEM	35
7.1.2.1.1 Muestras 6 y 6.A.....	35
7.1.2.1.2 Muestras 7 y 7.A.....	36
7.1.2.1.3 Muestras 8 y 8.A.....	37
7.1.2.1.4 Muestras 9 y 9.A.....	38
7.1.2.1.5 Muestras 14y 14.A.....	38
7.1.2.1.6 Muestras 15 y 15.A.....	40
7.1.2.1.7 Muestras 16 y 16.A.....	41
7.1.2.1.8 Muestras 17 y 17.A.....	41
7.1.2.2 Análisis infrarrojo.....	43
7.1.2.2.1 Muestras 6 a 9 y 6.A a 9.A	43
7.1.2.2.2 Muestras 14, 15 16 y 17.....	43
7.1.3. Combinación CG/PVA + SC (25/25+50)	45
7.1.3.1 Análisis morfológico por FESEM	46
7.1.3.1.1 Muestras 11 y 11.A.....	46
7.1.3.1.2 Muestras 12 y 12.A.....	47
7.1.3.1.3 Muestras 13 y 13.A.....	48
7.1.3.2 Análisis infrarrojo.....	48
7.2. Combinación Colágeno /Alcohol polivinílico +Ácido Hialurónico	50
7.2.1 Análisis morfológico por FESEM	53
7.2.1.1 Muestras 18 y 19	53
7.2.1.2 Muestra 20.....	53
7.2.1.3 Muestra 21.....	54
7.2.1.4 Muestra 22.....	55
7.2.1.5 Muestra 23.....	56
7.2.1.6 Muestra 24.....	56
7.2.1.7 Muestra 25.....	57
7.2.1.8 Muestra 26.....	57
7.2.2 Análisis infrarrojo.....	58

7.3. Análisis Térmicos.....	60
7.3.1. Análisis Termogravimétrico (TGA)	60
8. Conclusiones	65
9. Perspectivas.....	66
10. Referencias.....	68

Abstract

Electrospun scaffolds are of particular interest because the three-dimensional architecture of nanofibers collections closely mimics the structure of natural extracellular matrix. Biopolymer base materials synthesized by the electrospinning technique can facilitate the transition of the study in 2-D cell cultures to 3-D cell cultures. *In vitro* cell culture in 3-D systems has provided a better understanding of the biology of various diseases, therefore, these *in vitro* systems have become a convenient and accessible alternative for the biological study of different cell lines providing an alternative to animal experimentation. Since collagen is one of the major components of the extracellular matrix of the native tissue, it is typically a biomaterial of first choice for scaffolds production, however, the manufacture of 3-D collagen based scaffolds has been a constant challenge given its low solubility and processability.

This research presents the production of electrospun 3-D collagen (CG) based scaffolds for potential use in cell cultures. Keeping in mind that collagen processing through electrospinning is complicated given its low solubility and electrospinnability, it was mixed with other polymers to analyze their effect on collagen electrospinnability. Polyvinyl alcohol (PVA) was chosen because it is a highly electrospinnable polymer producing high quality nanofibers, besides it is biodegradable, biocompatible and non-toxic. The incorporation of chondroitin sulfate (SC) and hyaluronic acid (HA) was also explored; two biopolymers highly distributed in the extracellular matrix that favor cell adhesion making them ideal for scaffolds production. Polymer blends, in percentage ratios: 25/37.5+37.5 (CG/PVA+SC), 25/50+25 (CG/PVA+SC), 25/25+50 (CG/PVA+SC) and 25/50+25 (CG/PVA+HA) were analyzed. These polymer blends were electrospun evaluating the effect of five electrospinning parameters: 1) voltage 2) needle-collector distance, 3) flow rate 4) temperature, and 5) type of collector.

In general, the increase on PVA content improves the electrospinnability of blends, favoring the production of a continuous and stable jet during the electrospinning process, this results into nanofibers with uniform diameters, good porosity which are resistant and easy to handle materials at the macroscopic level. The increase in the amount of SC difficults the processability of blends, producing an unstable jet that does not help the nanofibers production, nonetheless, uniform nanospheres with attractive features for drug release were produced. When switching from SC to HA, an increase in density solution was observed which helped to obtain a stable jet at flow rates greater than 1 mL/h, however there is an ineffective drying on the collector, thus, flow rates lower than 1 mL/h and 40 °C were used. Therefore, the synthesis of these materials requires voltages between 14 and 20 kV, 12 cm of needle-collector average distance, a rotatory collector and a processing temperature of 40°C.

Resumen

La obtención de andamios celulares mediante la técnica de electrohilado es de particular interés debido a la arquitectura tridimensional que las colecciones de nanofibras proporcionan, ya que mimetizan en gran medida a la estructura de la matriz extracelular. Los materiales base biopolímeros sintetizados mediante la técnica de electrohilado, pueden facilitar la transición del estudio en cultivos celulares de 2-D a cultivos celulares de 3-D. El cultivo de células *in vitro* en sistemas 3-D ha aportado un mejor entendimiento de la biología de varias enfermedades por lo que estos sistemas *in vitro* se han convertido en una alternativa cómoda y accesible para el estudio biológico de diferentes líneas celulares, y proporcionan una alternativa a la experimentación animal. Debido a que el colágeno es uno de los componentes principales de la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos del cuerpo, suele ser el biopolímero de primera elección para la fabricación de andamios celulares. Sin embargo, la fabricación de andamios celulares 3-D base colágeno ha sido un constante reto en los últimos años dada su baja solubilidad y dificultad de procesamiento.

Este trabajo de investigación presenta la fabricación de andamios celulares 3-D base colágeno (CG) mediante la técnica de electrohilado para su posible uso en cultivos celulares. Teniendo presente que el procesamiento de este biopolímero mediante esta técnica es complicado dada su baja solubilidad y electrohilabilidad, se analizó la influencia de la incorporación de otros polímeros para la generación de mezclas base colágeno con mejores características de electrohilado. Se empleó alcohol polivinílico (PVA), un polímero altamente electrohilable, biodegradable, biocompatible y no tóxico. Además se exploró la incorporación de sulfato de condroitina (SC) y ácido hialurónico (HA), dos biopolímeros que se encuentran altamente distribuidos en la matriz extracelular y que favorecen la adhesión celular, lo que los hace ideales para la generación de andamios. Se analizaron mezclas de los polímeros en proporciones porcentuales: 25/37.5+37.5 (CG/PVA+SC), 25/50+25 (CG/PVA+SC), 25/25+50 (CG/PVA+SC) y 25/50+25 (CG/PVA+HA). Las diferentes combinaciones se procesaron en el equipo de electrohilado realizando modificaciones principalmente en 5 parámetros: 1) voltaje, 2) distancia aguja-colector, 3) velocidad de flujo de inyección, 4) temperatura y 5) tipo de colector.

En general, el aumento en el contenido de PVA mejora la electrohilabilidad de las mezclas facilitando la obtención de un jet continuo y estable durante el proceso de electrohilado, dando como resultado nanofibras con diámetros uniformes, buena porosidad, y materiales resistentes fáciles de manipular a nivel macroscópico. Por su parte, al aumentar la cantidad de SC el procesamiento de las mezclas se complica al no obtener un jet estable, sin embargo, bajo estas condiciones los materiales se obtienen en forma de nanoesferas con características estructurales atractivas para el encapsulamiento de fármacos. Al sustituir el SC por HA se observó un aumento en la densidad de la disolución, lo que ayuda a obtener un jet estable a velocidades de flujo mayores de 1 mL/h, pero con dificultad para un secado efectivo de las fibras en el colector, por lo que su procesamiento requirió velocidades de flujo menores a 1 mL/h y aumentar la temperatura a 40 °C. Es así que para el procesamiento de estas mezclas se requiere de voltajes entre 14 y 20 kV, una distancia aguja-colector promedio de 12 cm, además del empleo de un colector rotatorio y una temperatura de procesamiento de 40 °C.

Palabras clave: electrohilado, andamio celular, nanofibras, nanoesferas, colágeno

1. Introducción

El proceso de electrohilado es un método empleado para la obtención de nanofibras poliméricas. En esta técnica, se utiliza un alto voltaje para crear un campo electrostático con el fin de atraer partículas eléctricamente cargadas de una solución polimérica desde un inyector hacia una superficie metálica, donde se solidifica formando micro y nanofibras. En este proceso se emplean soluciones poliméricas debido a que presentan las propiedades físicas y químicas requeridas para formar fibras resistentes, elásticas y duraderas.

El uso de biopolímeros en el proceso de electrohilado hace que los materiales sintetizados mediante ésta técnica sean altamente atractivos para su uso en la ingeniería de tejidos como andamios celulares (scaffolds), esto se debe a que sus propiedades fisicoquímicas son altamente deseables para este fin. La técnica de electrohilado promueve la formación de fibras nanométricas con porosidad adecuada, brindando una alta relación superficie/volumen y un espacio tridimensional que asemeja las condiciones naturales para el desarrollo de células, lo que permite una fácil migración celular, difusión de nutrientes y vascularización. Al utilizar los biopolímeros adecuados es posible promover la adhesión celular, además de brindar un soporte con propiedades mecánicas adecuadas para realizar las diversas funciones biológicas requeridas.

La finalidad particular dentro de la ingeniería de tejidos de los materiales base biopolímeros sintetizados por electrohilado, es facilitar la transición de cultivos celulares en 2-D a cultivos celulares en 3-D. Un ejemplo claro es el uso de estos materiales para el estudio del desarrollo de varios tipos de cáncer, tal es el caso del cáncer de colon. La capacidad de crecimiento que tienen las células cancerosas *in vitro* ha aportado un mejor entendimiento de la biología de este tipo de cáncer, estos sistemas *in vitro* se han convertido en una alternativa cómoda y accesible para estudiar su biología y proporciona una alternativa a la experimentación animal. Sin embargo, la simplicidad de muchos de estos modelos ha fallado, ya que tienden a ser sistemas bidimensionales (2-D) y pasan por alto en gran medida los factores determinantes de la progresión del tumor [1]. Para superar estas limitaciones, es necesario un modelo *in vitro* que contenga muchos de los atributos conocidos de un cáncer *in vivo* (que crece dentro de un entorno que favorezca el crecimiento de los tumores). Los atributos necesarios para un modelo biomimético relacionado con el tumor comprenderían idealmente una configuración 3-D, los cuales brindan una proliferación diferencial de células, hipoxia central, invasión del compartimiento y formación de nuevos vasos [1]. Empleando andamios celulares como los obtenidos por la técnica de electrohilado es posible cumplir con todos los atributos necesarios para tener un modelo biomimético, los cuáles hasta ahora han sido útiles en la comprensión de muchos de los procesos relacionados con el crecimiento de un tumor, como la invasión y la capacidad de respuesta a agentes antitumorales. Los modelos 3-D que se han descrito hasta la fecha han incorporado una variedad de matrices, tanto naturales como sintéticas. Los constituyentes naturales comprenden típicamente una matriz extracelular a base de laminina, ricos en colágeno tipo I o ácido hialurónico.

La mayoría de los biomateriales o andamios de uso clínico se basan en el colágeno (CG) natural o extraído debido a que es una de las proteínas más ampliamente distribuidas en el cuerpo humano, y por la gran variedad de funciones desempeñadas por éste polímero

natural en diferentes tejidos. Es un polímero biocompatible al ser posible su degradación por la enzima humana colagenasa, y su uso se ha extendido ampliamente en muchas aplicaciones biomédicas. El empleo de biomateriales base colágeno en ingeniería de tejidos ha crecido intensivamente, y es por esta razón que se ha explorado su combinación con diferentes biopolímeros con la finalidad de mejorar la función tisular; obteniendo biomateriales con propiedades mecánicas, físicas y químicas potenciadas, esperando su función como andamios celulares efectivos para reemplazar la matriz extracelular nativa base colágeno.

Es así que este trabajo de investigación surge como resultado del interés de aportar conocimiento científico en este tema y en el intento de reducir la brecha entre los modelos 2-D y 3-D *in vitro* y el escenario *in vivo*; es decir, en el desarrollo de un modelo 3D para la investigación del cáncer de colon. Sin embargo, para lograrlo es necesario realizar algunas experimentaciones preliminares; por lo que este trabajo de investigación está enfocado y delimitado a la fabricación de un andamio 3-D biomimético a base de polímeros naturales (colágeno, sulfato de condroitina y ácido hialurónico) mediante la técnica de electrohilado, aprovechando las cualidades individuales de cada uno de los componentes, ampliamente documentados en su estudio para su aplicación en la ingeniería de tejidos. El objetivo es la generación de un biomaterial biocompatible y biodegradable de buena calidad con propiedades potenciadas, así como su caracterización mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM por sus siglas en inglés) y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Fabricar materiales compuestos CG/PVA/SC y CG/PVA/HA en forma de colecciones de nanofibras de buena calidad mediante la técnica de electrohilado.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar las condiciones óptimas de procesamiento, tanto del equipo de electrohilado como de las soluciones CG/PVA/SC y CG/PVA/HA, variando la concentración de los componentes de las soluciones así como los principales parámetros del equipo: flujo de inyección, voltaje, distancia aguja-colector, temperatura y tipo de colector.

2. Analizar la morfología y calidad de las nanofibras sintetizadas con ayuda de FESEM para verificar las mejores condiciones de producción, y caracterizarlos mediante FTIR para verificar posibles interacciones químicas entre los componentes.

3. Justificación

El uso de biopolímeros para su procesamiento mediante la técnica de electrohilado promueve la creación de materiales con características deseables para ser usados como andamios celulares. La incorporación de colágeno en estos andamios es altamente deseable, ya que es el componente principal de la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos. Sin embargo, la disolución del colágeno es muy complicada (ya que se requiere el uso de disolventes altamente corrosivos y tóxicos, los cuales son altamente volátiles) y excesivamente lenta, lo que origina un reto importante para la generación de soluciones con características adecuadas para su electrohilado. Aun con estas complicaciones, el lograr incorporar al colágeno a los materiales en forma de nanofibras mediante la técnica de electrohilado será en sí un aporte importante ya que existen pocos reportes de materiales base colágeno obtenidos por esta técnica usados como andamios.

El presente trabajo de tesis describe el análisis de los parámetros involucrados en el desarrollo de materiales biodegradables y biocompatibles de buena calidad morfológica a través de la técnica de electrohilado, esto con miras para su posible uso como andamios celulares, particularmente para el estudio *in vitro* de cáncer de colon o el desarrollo de xenoinjertos, aloinjertos o autoinjertos.

4. Hipótesis

Se ha reportado el uso de colágeno en combinación con alcohol polivinílico (PVA), sulfato de condroitina (SC) y ácido hialurónico (HA), como mezclas bicomponente para la elaboración de andamios celulares utilizando la técnica de electrohilado. Es así que existe la probabilidad de generar mezclas tricomponeente base colágeno con la finalidad de mejorar la electrohilabilidad del colágeno y producir colecciones de nanofibras de buena calidad; encontrando la proporción idónea de cada mezcla y encontrando los parámetros adecuados del equipo de electrohilado para la generación de nanofibras de buena calidad.

El PVA es un polímero con propiedades magnificas para ser electrohilado (sin olvidar que es biodegradable, una cualidad crucial para la elaboración de andamios celulares), y brinda nanofibras de excelente calidad, por lo que su uso debe ayudar a estabilizar el jet durante el proceso de electrohilado, además de brindar un ancla para el colágeno y el SC o él HA, esto mediante la formación de puentes de hidrógeno que se deben presentar como interacciones entre los grupos hidroxilos del PVA y los grupos funcionales capaces de formar puentes de hidrógeno presentes en el colágeno y el SC o él HA.

Es así que existen grandes probabilidades de producir materiales con potencial para su uso como andamios celulares, con porosidades adecuadas y gran superficie de contacto; cualidades proporcionadas por el uso de la técnica de electrohilado. Asimismo, el uso de colágeno brinda una matriz ideal para el crecimiento de cualquier tipo de célula, por lo que suele ser el polímero de primera elección para el desarrollo de andamios. Mientras que el SC así como él HA son proteoglicanos, cuya función principal es aumentar la adhesión celular, deberán promover precisamente una mejor adhesión celular. Y además el PVA debe brindar mejoras en las cualidades mecánicas como resistencia y flexibilidad de los materiales para facilitar su manipulación, además de favorecer el proceso de electrohilado.

5. Antecedentes

5.1. Electrohilado

El proceso de electrohilado permite obtener fibras de diámetros nanométricos mediante estiramiento coaxial de una solución viscoelástica. Durante el procesamiento de la solución un campo electrostático lo suficientemente elevado, es aplicado entre dos polos opuestos, conformados por una aguja o sistema de inyección y una placa metálica o colector, donde se depositan las fibras nanométricas formando un tejido con textura, color, y densidad características (figura 1).

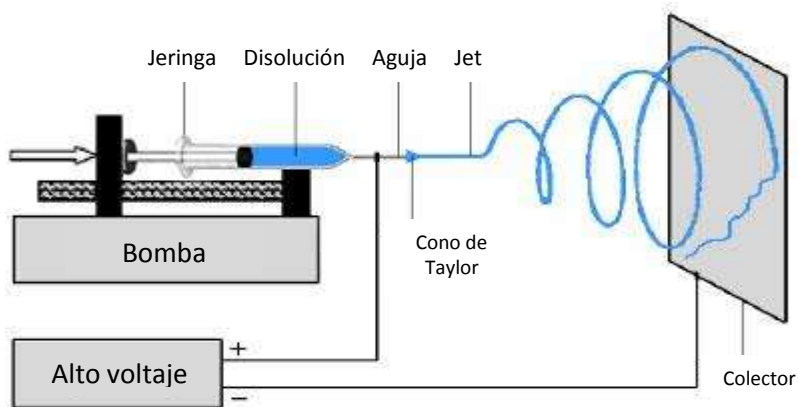


Figura 1.- Montaje del sistema de electrohilado.

La disolución polimérica se carga en una jeringa, que mediante un tubo de plástico inerte se conecta a una aguja. Una bomba de infusión unida al émbolo de la jeringa genera una presión y un flujo constante de la disolución del polímero en la aguja. Por el efecto de la polarización y la carga originadas por el campo eléctrico, una vez que se vence la tensión superficial, la solución es arrojada en forma de jet hacia una superficie conductora conectada a tierra (colector) a una distancia entre los 5 y 30 cm del cono o aguja. Una vez creado el jet (figura 2), el solvente gradualmente se evapora durante su trayectoria desde la aguja hasta llegar al colector, y el producto obtenido se deposita en forma de fibras con diámetros que van desde 10 μm hasta 50 nm aproximadamente [2].



Figura 2.- Fotografía del jet durante el proceso de electrohilado. En el círculo amarillo se observa como el jet se dispersa hasta ser indetectable a la vista.

Características importantes para el proceso de electrohilado [3].

- El disolvente adecuado debe estar disponible para disolver el polímero.
- La presión de vapor del disolvente debe ser adecuada para que se evapore con la suficiente rapidez y se mantenga la integridad de las fibras cuando se alcanza el colector, pero no demasiado rápida para permitir que la fibra se endurezca antes de que alcance el rango nanométrico.
- La viscosidad y la tensión superficial del disolvente no deben ser ni demasiado grandes para evitar la formación del jet, ni ser demasiado pequeñas, para permitir que la solución de polímero fluya libremente.

Durante el proceso de electrohilado es posible modificar varios parámetros involucrados en el proceso, los cuales provocan cambios importantes en la morfología de las fibras obtenidas. Algunos de estos parámetros y sus implicaciones se explican en la Tabla 1 [4]. Es importante tener en cuenta que la tabla no maneja cantidades ya que cada variable es diferente de acuerdo a los polímeros o mezclas de estos utilizados, además de cambiar también para los diversos tipos de disolventes que se pueden utilizar.

Tabla 1. Parámetros del proceso de electrohilado.

PARÁMETRO		CARACTERÍSTICA QUE APORTA
Voltaje	↑↑	Fibras gruesas, distorsión del jet, aparición de beads*.
	↓	Poco impulso para llegada de la disolución al plato colector.
Flujo de salida	↑	Fibras más gruesas, beads de mayor tamaño.
	↓	Mayor tiempo de evaporación del disolvente, fibras con pocos o nulos defectos.
Distancia aguja-colector	↑	Las fibras pueden romperse debido a su propio peso. Mayor estiramiento de la disolución, obtención de fibras delgadas.
	↑↑	Aparición de beads en las fibras al trabajar con muy grandes o muy cortas distancias.
	↓↓	
	↓	Poco tiempo para la evaporación del solvente por tanto, las fibras llegan húmedas al colector.
Temperatura	↑↑	El disolvente se evapora rápidamente y las fibras pueden romperse antes de llegar al colector.
	↓↓	El disolvente no logra evaporarse antes de llegar al colector y las fibras se acumulan con humedad, formando una película.

*La palabra beads se refiere a defectos principalmente en forma de aplastamiento de gotas o zonas en las cuales las fibras se acumulan como película por no haber secado adecuadamente.

↑ Aumento en la magnitud del parámetro.

↓ Disminución en la magnitud del parámetro.

Una variable importante de mencionar es el tipo de colector a utilizar, puede ser un colector fijo en el cual las fibras se acomodan de manera totalmente desordenada, o un colector rotatorio que puede provocar mayor estiramiento de las fibras, mejor secado y un acomodo hacia la dirección de rotación del mismo.

5.1.1. Electrohilado en la ingeniería de tejidos.

El uso de biopolímeros en el proceso de electrohilado hace que los materiales sintetizados mediante ésta técnica sean altamente atractivos para la ingeniería de tejidos en el diseño de andamios celulares ya que los materiales a usar en esta área deben cumplir con una o más de las siguientes funciones [2]:

- Adhesión y migración celular.
- Difusión de nutrientes vitales y de productos expresados por las células.
- Vascularización.
- Soporte de funciones mecánicas y biológicas en situaciones particulares.

La técnica de electrohilado promueve la formación de fibras nanométricas con porosidad adecuada, brindando una relación superficie-volumen y un espacio tridimensional que asemeja las condiciones naturales para el desarrollo de células. Pues permite una fácil migración celular, difusión de nutrientes y vascularización, además de que al utilizar los biopolímeros adecuados es posible promover la adhesión celular, y brinda un soporte con propiedades mecánicas adecuadas para realizar las diversas funciones biológicas requeridas.

5.2. Andamios celulares.

Los andamios celulares son dispositivos de sujeción y soporte de estructura tridimensional y porosa. Su función es servir de soporte artificial a un tejido debilitado por enfermedad, lesión o cirugía hasta que el tejido haya recuperado su funcionalidad, permitiendo su crecimiento tanto *in-vitro* a través del desarrollo de andamios tridimensionales, que inicialmente son colonizados por las células progenitoras, y luego son implantados en el paciente para reemplazar el tejido dañado, como *in-vivo* con el desarrollo de andamios tridimensionales acelulares, que servirán para alojar las diferentes células una vez implantados.

Los polímeros sintéticos bioabsorbibles con capacidad de degradarse gracias a reacciones de hidrólisis en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo, y eliminarse completamente por vías metabólicas son los materiales más atractivos para la elaboración de andamios celulares. Los andamios elaborados a partir de este tipo de polímeros ofrecen la posibilidad de crear tejidos completamente naturales dejando de lado los problemas de infección y formación de tejido fibroso, asociados a los implantes permanentes.

Para que un polímero pueda ser utilizado como andamio debe:

- Ser biocompatible.
- No presentar ningún tipo de reacción biológica adversa.
- Ser reabsorbible.
- Degradarse de forma paulatina a medida que se forma el nuevo tejido.
- Ser de fácil degradación y no tóxico.

Los andamios usualmente sirven para cumplir alguno de los siguientes propósitos:

- Permitir la adhesión y migración celular.
- Liberar o retener células o factores bioquímicos.
- Permitir la difusión de nutrientes vitales para las células.
- Ejercer cierta influencia biológica y mecánica para modificar el comportamiento de fase celular.

Los prerequisites de los andamios incluyen:

- Perfiles de biocompatibilidad y citotoxicidad aceptable así como poseer habilidad para soportar el crecimiento y la proliferación celular.
- Debe tener propiedades mecánicas similares a las del tejido en el sitio de implantación, o propiedades mecánicas suficientes para proteger a las células de daño por fuerzas de compresión o tensión sin inhibir las señales biomecánicas.
- Debe estar constituido de formas complicadas y poseer una porosidad apropiada. Una alta porosidad y un tamaño de poro adecuado son necesarios para facilitar el cultivo y la difusión celular a través de toda la estructura de las células y los nutrientes.
- La biodegradabilidad es un factor esencial, el material debe absorberse por los tejidos circundantes sin la necesidad de su remoción quirúrgica.
- Mimetizar la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), una sustancia endógena que rodea a las células enlazándolas con los tejidos y provee señales que ayudan al desarrollo celular y la morfogénesis.

Regularmente es muy difícil que un solo polímero cumpla con las características deseables para su aplicación como andamio en la regeneración de tejidos, principalmente respecto de las propiedades mecánicas. Una estrategia para la obtención de andamios con propiedades mecánicas deseables, además de potenciar las propiedades biológicas es la fabricación de materiales compuestos. Desde los años 60 han surgido una gran cantidad de materiales compuestos propuestos para su uso en esta área, los cuales son denominados biomateriales. Los materiales diseñados buscan interactuar con el tejido de forma específica, mediante estímulos a nivel celular y molecular, y combinan las propiedades de bioabsorbabilidad y bioactividad dentro del mismo material. Por lo que cada vez, los criterios se van acercando más a lo que sería el biomaterial ideal.

5.3. Biopolímeros.

Los biopolímeros son componentes (de origen natural o sintético) que presentan propiedades físicas y termoplásticas muy parecidas a las de los polímeros fabricados a partir del petróleo, pero con la cualidad de ser biodegradables y biocompatibles.

El que un polímero sea biodegradable implica que pueda ser fragmentado en sustancias inocuas más pequeñas. Para que un polímero se considere biodegradable, debe descomponerse entre un 60-90% en un periodo de 90 días. La biodegradación depende de las propiedades mecánicas del polímero como:

- La naturaleza del monómero.
- El iniciador de la reacción de polimerización.
- Los aditivos presentes en el polímero.
- Las condiciones en que fue procesado.

También depende de la velocidad de degradación, que a su vez está influenciada por:

1. Condiciones del medio: temperatura, humedad y pH.
2. Características del polímero: presencia de enlaces químicos susceptibles a la hidrólisis, la hidrofiliidad, la estereoquímica, el peso molecular, la cristalinidad y la superficie específica [5].

El principal compuesto polimérico natural, y biodegradable utilizado en la ingeniería de tejidos es el colágeno pues juega un papel crucial en el mantenimiento de la ECM de forma natural.

5.3.1. Colágeno (CG)

De forma natural el colágeno representa una matriz ideal para el desarrollo de diferentes tipos de células, por lo cual es común que este sea utilizado como uno de los elementos principales para la creación de andamios en la ingeniería de tejidos. En los vertebrados el colágeno es la principal proteína estructural extracelular en el tejido conectivo y el hueso, constituyendo alrededor de un tercio o más de las proteínas totales del cuerpo. La interacción entre el colágeno y las células involucra fenómenos como la adhesión y propagación celular, desempeñando un rol importante en la determinación de las vías de diferenciación, crecimiento y supervivencia celular [6].

La mayor parte de las fibras de colágeno contienen alrededor de 35% de glicina (Gli) y 11% de alanina (Ala). Además de 12% de prolina (Pro) y 9% de hidroxiprolina (Hyp), que es la principal diferencia con las β -queratinas. Los frecuentes restos de prolina determinan el tipo distinto de ordenación helicoidal de la cadena, mientras que los pequeños grupos R (R=Hidrógeno) de los restos de glicina que aparecen en cada tercera posición, permiten que las cadenas se enrosquen entre sí. Por lo que se ha deducido que la estructura secundaria del colágeno es la de una triple hélice de cadenas polipeptídicas (figura 3).

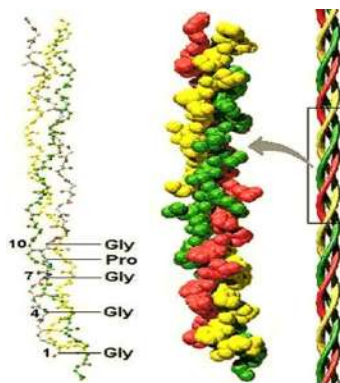


Figura 3. Estructura del colágeno.

La secuencia aminoácida completa de las cadenas de colágeno no es todavía conocida, pero las secuencias que aparecen con más frecuencia son Gli-X-Pro, Gli-Pro-X y Gli-X-Hyp, en las que X puede ser cualquier aminoácido [7].

El uso de biomateriales a base de colágeno en estudios fundamentales, tienen una amplia gama de aplicaciones tanto *in vivo* como *in vitro* para estudiar el comportamiento de células, como la migración y la proliferación, así como la diferenciación y la expresión del fenotipo. Los hallazgos fundamentales acerca de cómo se comportan las células en entornos complejos se basan en la capacidad de las células para crecer *in vitro* en un andamio similar a un tejido 3D. Andamios a base de colágeno se utilizan como modelos del sistema nervioso para visualizar la mielinización de las neuronas motoras por células de Schwann [8]. Los estudios de cáncer son también un importante tema de investigación, y un andamio 3D de colágeno puede ser de gran utilidad para probar medicamentos contra el cáncer. En el campo de la inmunología, en experimentos 3D *in vitro* también es posible evaluar los mecanismos de migración de células. Por otra parte, los biomateriales a base de colágeno podrían servir como material de anclaje para cultivar órganos *ex vivo* o modelos 3D para enfermedades como la osteoartritis [8].

En el diseño de andamios base colágeno por el método de electrohilado es común utilizar 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol como disolvente [3, 9, 10, 11]. Tal disolvente es altamente volátil, así como corrosivo y tóxico por lo que su uso para esta técnica es poco deseable.

5.3.2. Sulfato de condroitina (SC)

Es el polisacárido principal de los glucosaminoglucanos del cartílago y se encuentra distribuido en diversos tejidos como parte de la ECM, ayudando en los procesos de adhesión celular. Dentro de la ingeniería de tejidos, se ha usado en andamios para la regeneración o estudio de tejido del corazón, hígado, pulmón, piel y cartílago además de su uso en la liberación de fármacos [12]. En estas aplicaciones se encuentra mezclado principalmente con colágeno, con el cual se ha observado puede ser electrohilado [13].

Contiene unidades alternativas de ácido *D*-glucurónico, y de 4-sulfato de *N*-acetil-*D*-galactosamina (GalNac) (figura 4), en lugar de los restos de *N*-acetil-*D*-glucosamina del hialuronato. Estas unidades alternativas están unidas como β (1 \rightarrow 3). Los grupos de sulfato están insertos en las posiciones C4 o C6 de los residuos de GalNac. La presencia de grupos 4-O-[SO₃⁻], 6-O-[SO₃⁻] y -COO⁻ contribuye a que la estructura sea decisivamente polianiónica. La longitud de una cadena de sulfato de condroitina puede variar de modo considerable, pues oscila entre 15 y 150 unidades de disacáridos en diferentes tejidos [14].

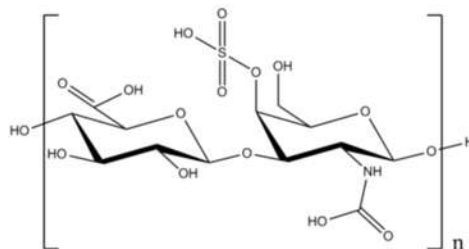


Figura 4. Estructura de la sal de sodio del sulfato de condroitina.

El sulfato de condroitina es de fácil disolución en agua a temperatura ambiente con agitación, lo cual ayuda en el proceso de electrohilado.

5.3.3. Alcohol polivinílico (PVA)

Es un polímero biodegradable de gran interés por su carácter biocompatible, no tóxico y por poseer diversas aplicaciones como: la producción de fibras, coloides de protección, agentes de apresto para textiles y papel, adhesivos, fibras de sutura útiles en cirugía y membranas, entre otras. Estas propiedades vienen conjuntamente con una versatilidad química notable debido a la presencia de los grupos hidroxilo, que hacen posible un gran número de interacciones tipo puente de hidrógeno y reacciones de adición y/o sustitución de grupos funcionales de la cadena principal del polímero, la cual se encuentra formada por cadenas del monómero que se presenta en la figura 5.

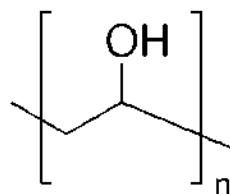


Figura 5. Monómero del alcohol polivinílico

El PVA es un polímero altamente electrohilable por lo que las colecciones de nanofibras generadas son de alta calidad, los materiales de PVA electrohilados pueden usarse como súper filtros o andamios para compósitos de interés biológico [15, 16, 17]. Es fácil de disolver en agua en concentraciones de hasta un 31% p/v al calentar y su inclusión en mezclas de polímeros poco electrohilables promueve el electrohilado [3].

5.3.4. Ácido Hialurónico (HA)

El ácido hialurónico (HA) es un polisacárido lineal formado a partir de un disacárido compuesto por *N*-acetil-*D*-glucosamina y ácido glucurónico (figura 6). Posee un alto peso molecular, usualmente en el orden de millones de Dalton. Presenta propiedades viscoelásticas interesantes así como características de poli-electrólito. Es un componente común del fluido sinovial y la matriz extracelular, por lo que se encuentra distribuido por todo el cuerpo humano, así como el de otros vertebrados.

Este polímero es de fácil disolución en agua a temperatura ambiente y ha sido ampliamente usado en la ingeniería de tejidos para ayudar a la reparación de articulaciones.

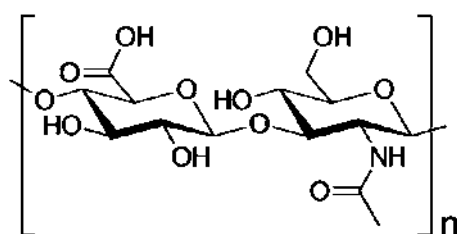


Figura 6. Monómero del ácido hialurónico

El HA es electrohilable, y se ha combinado con colágeno, así como otros polímeros para la elaboración de andamios en forma de nanofibras [18, 19, 20].

5.4 Antecedentes dentro del grupo de trabajo

Dentro del grupo de trabajo, la M.C. Julia Hernández Vargas como parte de sus resultados obtenidos durante sus estudios de doctorado trabajando con mezclas de: CG, PVA, SC, HA, y nano tubos de carbono, logró obtener nanofibras de una combinación CG/PVA+SC (en porcentajes de las disoluciones: 25/37.5+37.5), mezcla obtenida a partir de soluciones de colágeno 3.2% p/v en 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol, PVA 8% p/v en agua y SC 2.5 % p/v en agua.

El proceso de electrohilado se llevó a cabo a 25 °C, 20 kV de voltaje aplicado sobre una solución inyectada a una velocidad de 1 mL/h, con una distancia entre aguja y colector de 12 cm, obteniendo los resultados que se muestran en la figura 7. En la imagen de la Figura 7b se observa la producción de nanofibras, aunque con una gran cantidad de defectos ocasionados posiblemente por goteo. De las diversas combinaciones usadas de los polímeros antes mencionados, esta fue la de mejor resultado en cuanto a la calidad y posibilidad de producción de nanofibras se refiere, pero dada la cantidad de nanofibras obtenidas es necesario mejorar la calidad del material, aumentando la cantidad y la calidad de nanofibras y disminuyendo los defectos.

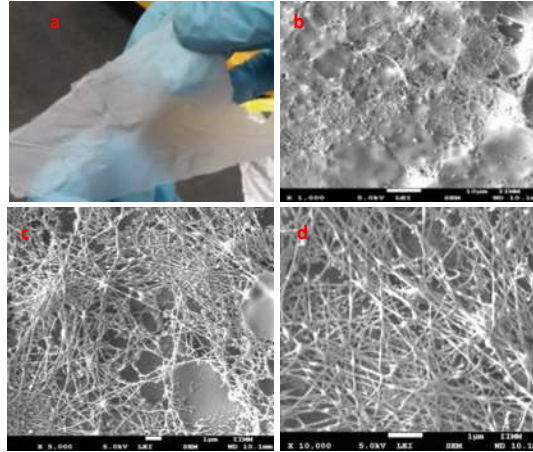


Figura 7. Fotografía (a) e imágenes obtenidas por SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d) de la fibra CG-PVA-SC.

Otra combinación en la cual fue posible la obtención de algunas fibras se realizó partiendo de una mezcla de colágeno 3.2% p/v en 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol, PVA 8% p/v en agua y HA 0.5% p/v en agua en proporción 25 % de la solución de colágeno, 37.5% de la solución de PVA y 37.5% de HA. El electrohilado se llevó a cabo a 20 °C, a 29 kV aplicado sobre una solución inyectada a una velocidad de 1.5 mL/h, con una distancia entre colector y aguja de 15 cm. Resultando la morfología mostrada en la Figura 8.

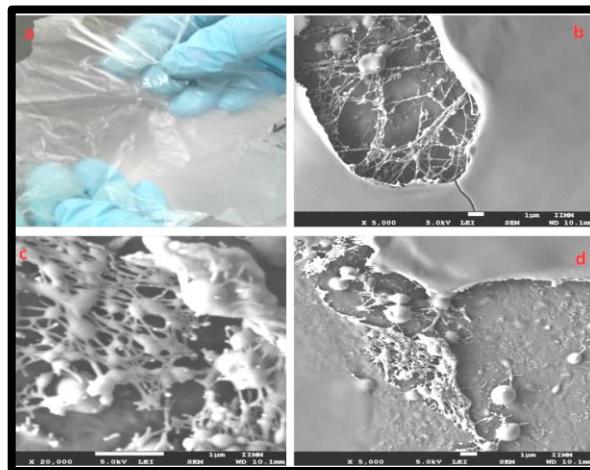


Figura 8. Fotografía (a) e imágenes obtenidas por SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d) de la fibra CG-PVA-HA.

Como se observa en la Figura 8, la combinación CG/PVA+HA (25/37.5+37.5) se electrohiló de manera deficiente, ya que una gran parte del material parece más una película que colecciones de nanofibras, lo cual puede estar asociado a la evaporación inadecuada del disolvente.

Al ser estos dos de los mejores materiales obtenidos, se busca mejorar su calidad, pero, existe otro motivo del porque continuar el trabajo con estas dos combinaciones para la obtención de materiales tridimensionales, y es que en las pruebas biológicas preliminares

realizadas con células adherentes de adenocarcinoma de colon humano HT29, ambos materiales (y especialmente el de la combinación CG/PVA+SC) mostraron resultados muy favorables en los ensayos con azul de toluidina, cristal violeta y MTT. En el ensayo de adhesión con azul de toluidina de la combinación CG/PVA+SC, se obtuvo un 165.04% de adhesión celular con respecto al control positivo. Mientras que en el ensayo de adhesión con cristal violeta se presentó un 183.30% de adhesión celular con respecto al control positivo. Para el ensayo de citotoxicidad por MTT se determinó una viabilidad del 161.85% con respecto al control positivo. Estos resultados indican la alta factibilidad de utilizar el material como andamio celular.

6. Materiales y Métodos

Partiendo de las siguientes disoluciones de cada uno de los componentes:

- Colágeno 3.2% p/v en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol.
- Alcohol polivinílico 8% p/v en agua destilada.
- Sulfato de Condroitina 2.5% p/v en agua destilada.
- Ácido hialurónico 0.5% p/v en agua destilada.

Se prepararon mezclas de diferentes concentraciones con la finalidad de determinar las proporciones óptimas para la obtención de soluciones que conduzcan al electrohilado de buena calidad (Tabla 2).

Tabla 2. Combinaciones probadas de polímeros.

POLIMEROS	PROPORCIÓN DE LOS POLIMEROS (%)
CG/PVA+SC	25/37.5+37.5
CG/PVA+SC	25/50+25
CG/PVA+SC	25/25+50
CG/PVA+HA	25/50+25

Los parámetros del proceso de electrohilado analizados para mejorar la calidad fueron:

- Velocidad de flujo de inyección.
- Voltaje.
- Distancia aguja-colector.
- Temperatura.
- Tipo de colector (fijo o rotatorio).
- Diámetro de la aguja.

La estructura o morfología de las nanofibras obtenidas se analizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM) para determinar la calidad de las mismas, y en función del análisis obtenido modificar las condiciones para su mejora. Mientras que las posibles interacciones químicas entre los polímeros se estudiaron mediante Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR). Adicionalmente, los materiales se caracterizaron mediante técnicas calorimétricas empleando la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y el Análisis Termogravimétrico (TGA).

7. Resultados y Discusión

7.1. Colágeno/Alcohol polivinílico + Sulfato de condroitina

7.1.1. Combinación CG/PVA + SC (25/37.5+37.5)

La combinación *CG/PVA+SC (25/37.5+37.5)* está compuesta de una mezcla de las disoluciones poliméricas antes mencionadas en la siguiente proporción: Colágeno 25%, PVA 37.5% y SC 37.5 %, lo que equivale a 0.32 g de colágeno, 1.2 g de PVA y 0.375 g de SC por cada 40 mL de disolución, y una composición de 25% de colágeno y 75% de PVA+SC. Para este caso, los primeros tres materiales obtenidos partieron de una misma disolución, mientras que los otros tres se elaboraron a partir de una disolución preparada posteriormente, presentando un aspecto más blanco y homogéneo. Se obtuvieron seis materiales en total de esta proporción de la mezcla, empleando los parámetros de electrohilado descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones del proceso de electrohilado de la combinación: *CG/PVA+SC (25/37.5+37.5)*



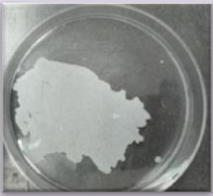
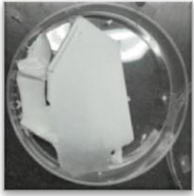

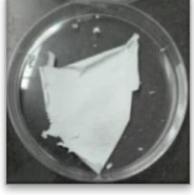
Material	Distancia aguja- colector (cm)	Voltaje (kV)	Velocidad de flujo (mL/h)	Temperatura (°C)	Aguja	Tiempo aproximado del proceso (horas)	Cantidad de disolución usada (mL)
1	12	21	1	40	#8	11.5	11.5
2	12	20	0.5	40	#8	24	12
3	12	22	0.25	40	#8	48	12
4	12	20	1	40	#8	8	8
5	15	20	0.65	40	#8	8	6.8
10	13.5	19.5	0.7	40	#8	17.5	12.5

Los materiales 1, 2 y 3 se diferencian principalmente en la velocidad de flujo, la cual se modificó para observar su influencia sobre la calidad de las fibras, mientras que para la producción de los materiales 4, 5 y 10 se modificó la distancia aguja-colector, y aunque las velocidades de flujo son diferentes entre sí, estas se eligieron por ser las que producen un mejor jet durante el proceso, y no fueron predeterminadas como las de las otras tres combinaciones.

Los materiales obtenidos, se secaron en estufa a 50 °C de uno a cinco días, posteriormente fueron retirados del colector de aluminio. Las colecciones de nanofibras resultantes, macroscópicamente tienen las características descritas en la Tabla 4.

Síntesis de Materiales Compuestos Base Biopolímero Mediante el Proceso de Electrohilado

Tabla 4. Características de los materiales obtenidos a partir de la combinación: *CG/PVA + SC (25/37.5+37.5)*.

Material	Apariencia	Observaciones
1		Se logró retirar aproximadamente la mitad de lo contenido del colector en fragmentos de entre 4 y 5 cm de ancho. El material parece flexible, pero resulta ser quebradizo lo que lo hace de difícil manejo.
2		Se logró retirar más de la mitad de lo contenido en el colector, la mayor parte en una sola pieza de gran tamaño y el resto en piezas pequeñas de 1 o 2 cm aproximadamente. La colección parece ser más flexible y menos quebradiza.
3		Fue posible separar solo una pequeña porción de lo contenido del colector (15-20 %), todo en una pieza. El material es de textura polvosa y es muy quebradizo.
4		Se recuperó más del 50 % del contenido del colector casi en una sola pieza, por lo que el material es muy manejable debido a su flexibilidad, sin embargo, es ligeramente quebradizo.
5		Solo fue posible obtener poco material del colector, debido a que desprende como si fueran pequeñas pelusas, por lo que solo se recuperó alrededor de un 20 %.
10		Se recuperó alrededor del 50 % del material contenido en el colector, la textura es aterciopelada y quebradiza aunque es posible enrollar.

En general, los materiales 1, 2 y 3 son de difícil desprendimiento del colector y quebradizos. En este contexto, los materiales 4 y 10 tienen mayor flexibilidad y fueron más

fáciles de remover del colector. En el caso del material 5, si bien no es tan quebradizo, si se rompe con facilidad y es muy difícil de desprender del colector.

La importancia de evaluar si es o no fácil de separar el material del colector radica en dos argumentos; 1) es más fácil trabajar con una pieza grande de material que después se puede fragmentar en pedazos de diferentes medidas, que trabajar con piezas pequeñas difíciles de manipular por el tamaño y las cuales quizá no tengan las medidas necesarias para lo que sean requeridas, y 2) el hecho de separar fácilmente el material del colector implica menor pérdida de componentes y mejores características para su posterior manejo.

De cada uno de los materiales obtenidos se tomó aproximadamente la mitad, porción que se sumergió en alcohol isopropílico durante 1 hora para observar posibles cambios en sus propiedades. Con esto lo que se espera es provocar un aumento en la porosidad del material, de tal manera que este sea más flexible, y a nivel microscópico exista un espacio mayor para el crecimiento celular y la angiogénesis. A partir de ahora los materiales tratados se nombran con el número del material del cual se tomaron y adicionando la letra **A**, para diferenciar los materiales tratados (**A**) y los no tratados con alcohol isopropílico.

7.1.1.1 Análisis estructural mediante FESEM

7.1.1.1.1 Muestras 1 y 1.A

En la Figura 9 se muestran las imágenes obtenidas por FESEM de los materiales 1 y 1.A, donde se puede observar que: a) no hubo formación de nanofibras, aun cuando a simple vista el jet se formó, el material finalmente llegó al colector en forma de gotas, b) no se observa ningún efecto del isopropanol que provoque un cambio morfológico sobre el material tratado.

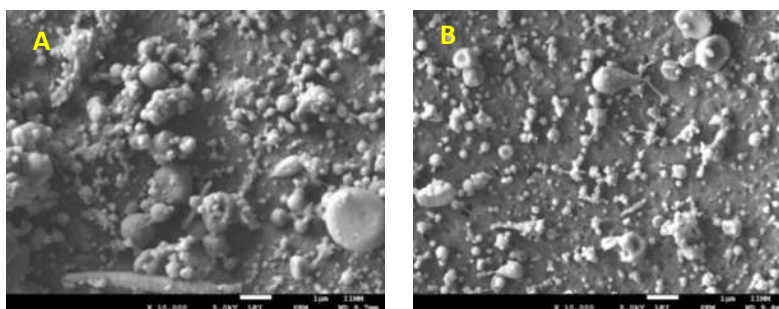


Figura 9. Materiales 1 y 1.A, imágenes obtenidas por FESEM a X10000 de muestras obtenidas a: 20 kV, 1 mL/h, 12 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:37.5/37.5) A) sin tratamiento con isopropanol y B) tratada con isopropanol.

7.1.1.1.2 Muestra 2 y 2.A

El análisis por FESEM de la Figura 10 muestra que el material se colocó por la cara que se encontraba unida al colector (en adelante a esta cara se le nombrará simplemente como la parte de atrás del material) este hecho se denota, por las líneas que se observan en el material (Figura 10 A), las cuales son características del colector, por esta razón, no es posible verificar la formación de nanofibras en la superficie expuesta al jet.

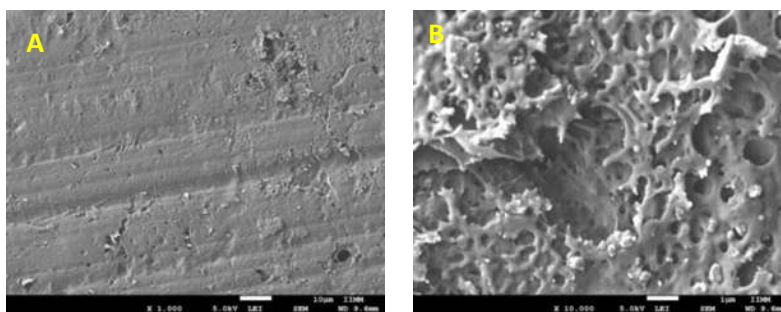


Figura 10. Material 2 y 2.A, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000 y B) X10000 de la mezcla CG/PVA + SC (25:37.5/37.5).

En la Figura 11 se observa que el material está colocado por la cara frontal con beads (defectos) característicos del goteo, y pequeñas fibras dispersas.

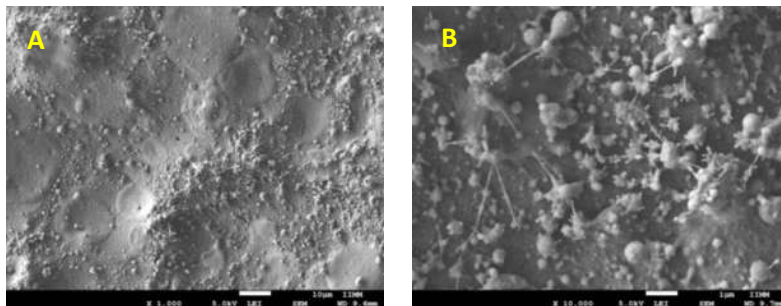


Figura 11. Material 2.A, Imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000 y B) X10000 de muestras obtenidas a: 20 kV, 0.5 mL/h, 12 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:37.5/37.5), tratada con isopropanol.

7.1.1.1.3 Muestras 3 y 3.A

En la Figura 12 es fácil observar que el material se colocó por la cara de atrás ya que se denotan zonas con fracturas o poros. Al observar la Figura 13 la cual es la cara frontal, se observa que realmente el material es poroso y se observan algunas fibras, aunque con muchos defectos. Esto indica que al reducir la velocidad de flujo de inyección la posibilidad de obtener fibras aumenta.

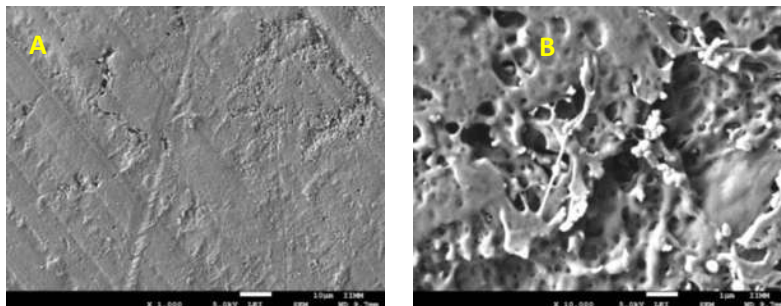


Figura 12. Material 3, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000 y B) X10000 de muestras obtenidas a: 20 kV, 0.25 mL/h, 12 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:37.5/37.5).

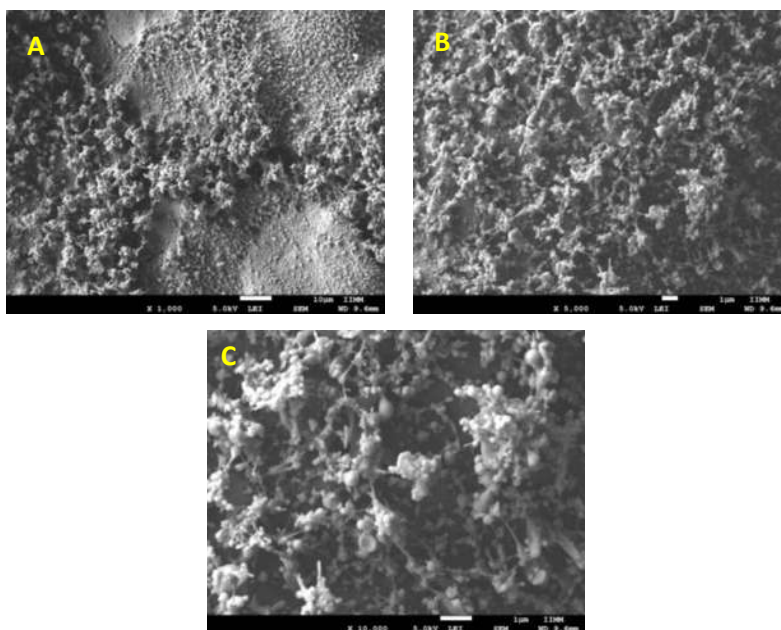


Figura 13. Material 3.A, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 20 kV, 0.25 mL/h, 12 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:37.5/37.5), tratada con isopropanol.

Al observar los materiales 4, 5 y 10, de manera general es posible verificar que el proceso de electrohilado fue exitoso, pues en los tres casos se observan nanofibras. Y aunque existen defectos estos podrían minimizarse al cambiar las condiciones del proceso, como la velocidad de flujo para evitar goteo. De manera general fue posible verificar a través del análisis por microscopía electrónica que este lote de muestras tampoco registra cambios morfológicos al tratarlas con isopropanol, razón por la cual se presentará indistintamente la morfología de los materiales con o sin tratamiento.

7.1.1.1.4 Muestra 4 y 4.A

De acuerdo a la Figura 14, en este material se observa que la formación de colecciones de nanofibras fue exitosa, con la presencia de pocos defectos por goteo de la disolución (Figura 14.A). Sin embargo, existe presencia de imperfecciones a lo largo de las nanofibras, ya que se deforman cambiando de diámetro drásticamente, este tipo de defectos son denominados “beads” (cuentas), y son provocados por la inestabilidad capilar, dicha inestabilidad causa que el jet cilíndrico de un líquido colapse lo que ocurre cuando hay una reducción en la carga eléctrica llevada por el jet, por lo que la estructura solidifica en forma de nanofibras con “cuentas”. No es inusual que se produzcan perlas o ramas producidas por la inestabilidad de flexión pero es raro que se produzcan al mismo tiempo [21]. De la Figura 14 D, obtenida a X 30 000 se determinó un diámetro de 121 nm en la zona más homogénea de la nanofibra.

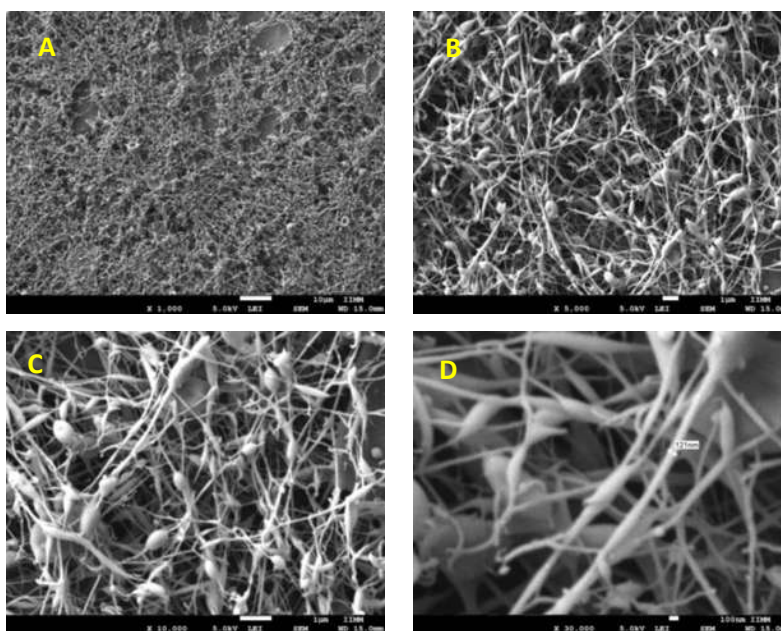


Figura 14. Material 4, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000, C) X10000 y D) X30000 de muestras obtenidas a: 20 kV, 1 mL/h, 12 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:37.5/37.5).

7.1.1.1.5 Muestra 5 y 5.A

En este material se observa la formación de algunas fibras, pero con algunas deficiencias provocadas por la distancia empleada entre la aguja y el colector. En la Figura 15.A, se denotan fracturas sobre el material, lo cual explica la complejidad para retirarlo del colector dada su fragilidad. Se observan más defectos sobre las fibras (comparando con el material 4). El diámetro en la zona más homogénea de la nanofibra es de 81.5 nm.

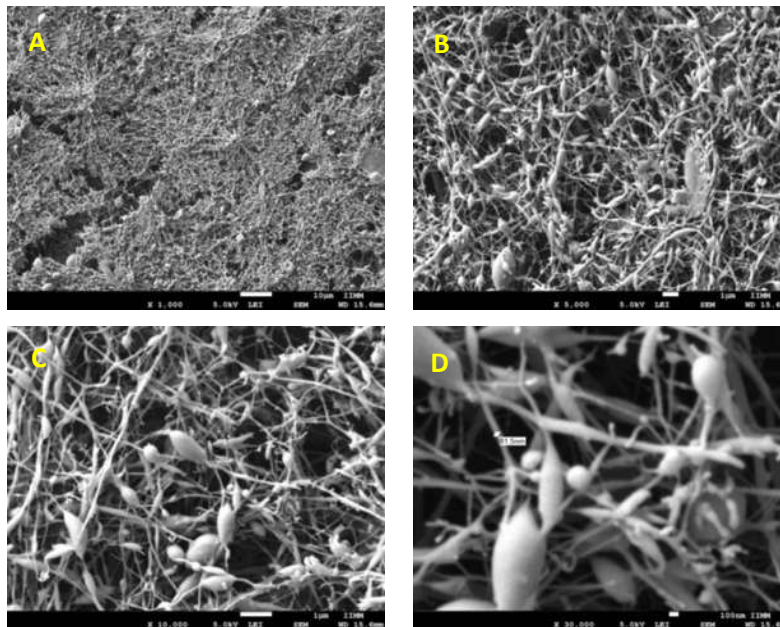


Figura 15. Material 5, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000, C) X10000 y D) X30000 de muestras obtenidas a: 20 kV, 0.65 mL/h, 15 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:37.5/37.5).

7.1.1.1.6 Muestra 10 y 10.A

En la Figura 16 se observa la formación de fibras y un material con mayor porosidad, lamentablemente las fibras obtenidas presentan una gran cantidad de defectos.

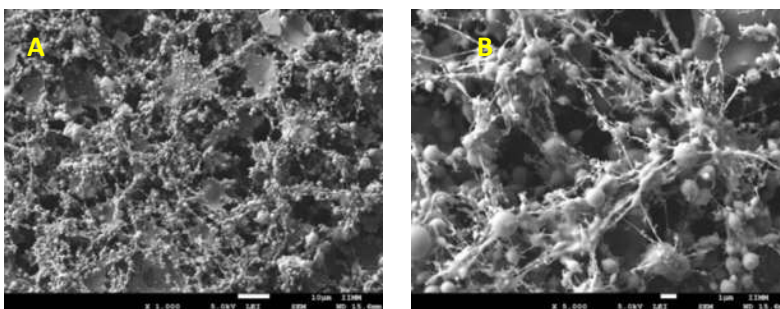


Figura 16. Material 10, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 19.5 kV, 0.7 mL/h, 13.5 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:37.5/37.5).

7.1.1.2 Análisis superficial EDS

Con el uso del equipo de FESEM, fue posible obtener los espectros EDS (Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy, también abreviada: EDX o XEDS) de algunas muestras, en las que se observa la composición elemental superficial de las mismas.

La Figura 17 muestra los espectros EDS de la muestra 1 y 1.A, en los cuales se observa principalmente la presencia de carbono (C) y oxígeno (O); elementos principales en los biopolímeros utilizados para la producción del material. Se tiene presencia de azufre (S) y sodio (Na) provenientes de la sal de sulfato de condroitina, flúor (F) que probablemente sea del 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanon usado como disolvente para el colágeno, fósforo (P), potasio (K) y cloro (Cl) que podrían ser contaminación del material o el agua utilizada (es importante recordar que el Cu es el material usado para recubrir las muestras y es por eso que aparece en todos los espectros EDS).

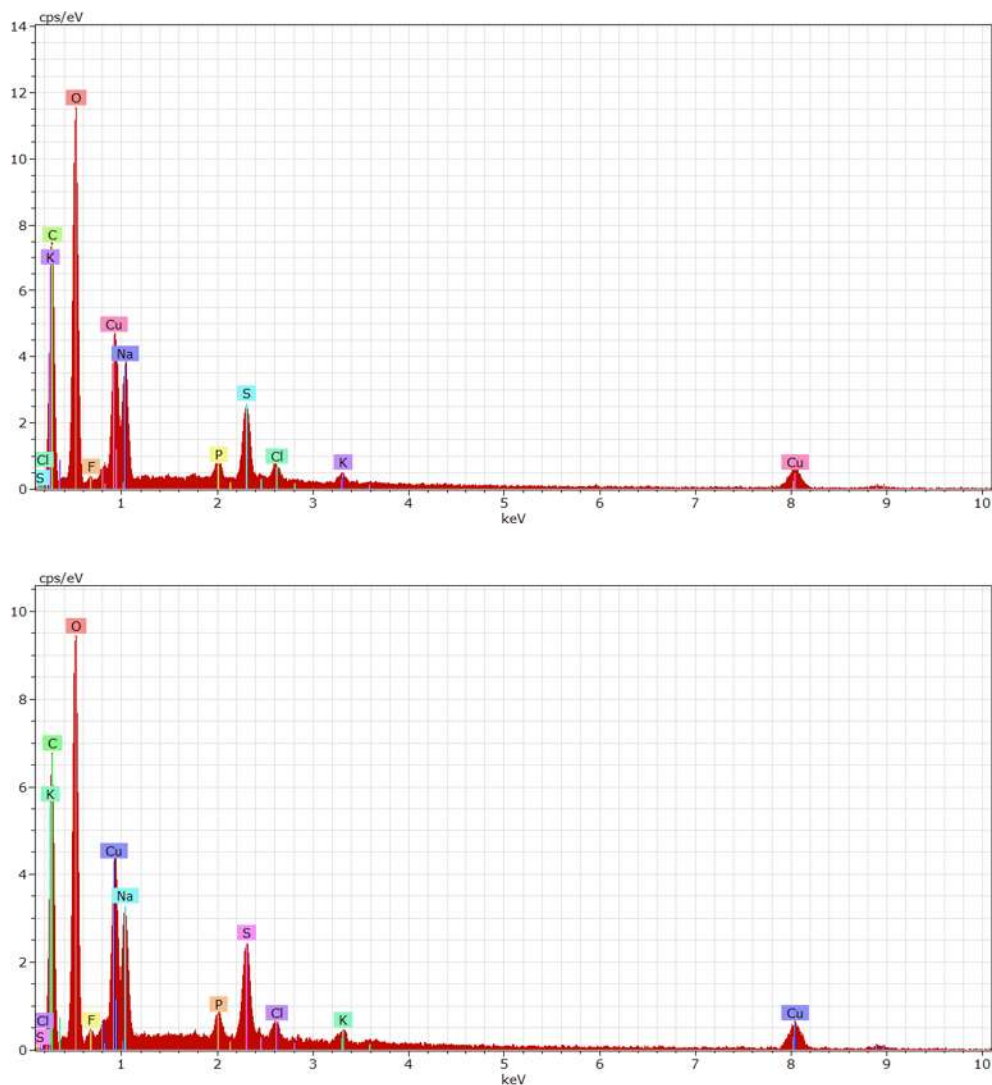


Figura 17. Espectros EDS de las muestras 1 y 1.A.

Ya que los materiales 2, 2.A, 3 y 3.A se obtuvieron de la misma mezcla, la composición superficial que presentan los materiales es muy similar a los mostrados en la Figura 17, por lo cual no se muestran.

Debido a que los materiales 4, 5, 10 y sus homólogos tratados con isopropanol se elaboraron partiendo de una mezcla preparada posteriormente, se optó por obtener un

espectro EDS del material 4 para comparar su composición superficial con la de los primeros materiales. En el espectro, mostrado en la Figura 18 se observan trazas de silicio (Si), compuesto que no se detectó en los materiales anteriores, y que puede ser contaminación del material por polvo. Algo interesante es la diferencia entre los picos de los dos principales elementos; el carbono y el oxígeno, los cuales en los análisis EDS de los materiales obtenidos con la primera preparación de mezcla el pico de mayor intensidad es el proveniente de los fotones del oxígeno (algo que sería ilógico si se toma en cuenta que la composición de los biopolímeros utilizados presentan una mayor cantidad de átomos de carbono que de oxígeno), mientras que el material 4 presenta como pico más alto que el de los fotones obtenidos del carbono. Posiblemente los materiales 1, 2 y 3 estén reteniendo una gran cantidad de agua y de ahí provienen los conteos más altos de fotones de oxígeno, ya que estos materiales no se obtuvieron como fibras como consecuencia de un deficiente secado del jet antes de llegar al colector.

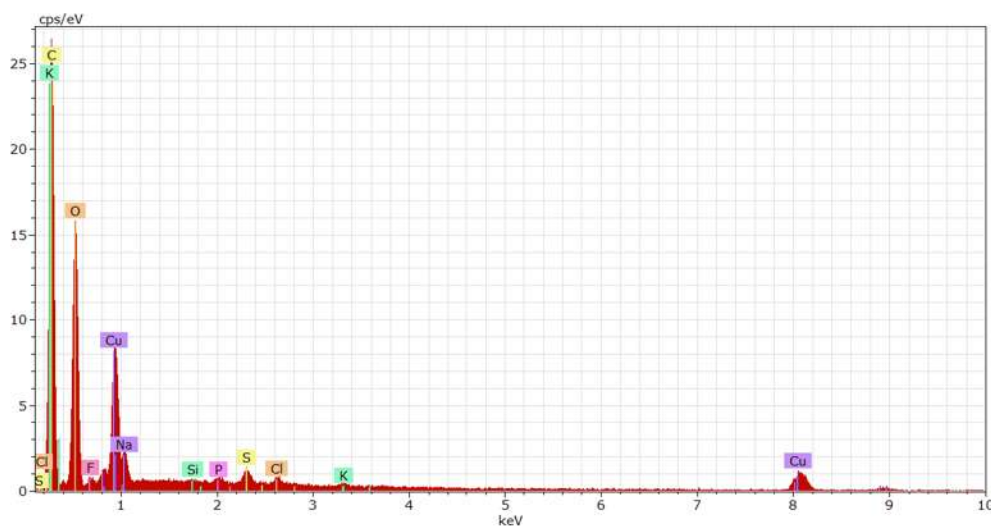


Figura 18. Espectros EDS de la muestra 4.

7.1.1.3 Análisis infrarrojo

A manera de antecedente y para un mejor análisis de los datos obtenidos mediante espectroscopia de infrarrojo, se obtuvieron los espectros FTIR de los compuestos que forman la mezcla de forma individual, los cuales se muestran en la Figura 19. En conjunto con los espectros, se presenta en la Tabla 5 las frecuencias principales que presentan las vibraciones características y sus asignaciones.

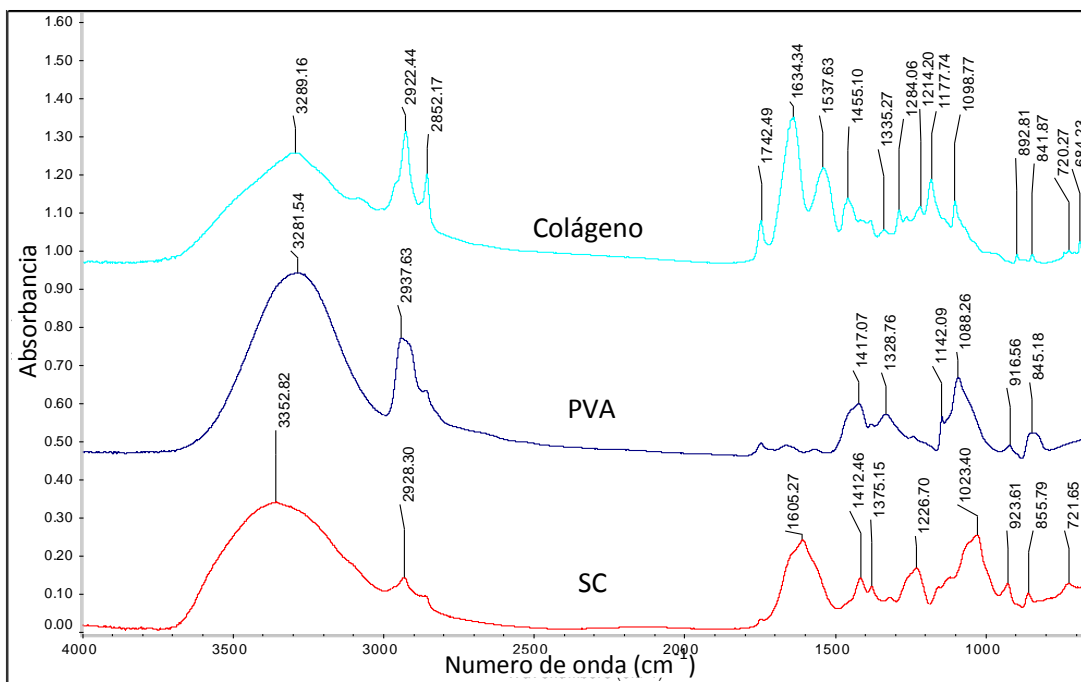


Figura 19. Espectro FTIR del colágeno, PVA y SC.

Tabla 5. Vibraciones principales observadas en los espectros FTIR de colágeno, PVA y SC.

Colágeno		PVA		SC	
Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación	Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación	Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación
3289.16	Estiramiento O-H y N-H	3281.54	Estiramiento O-H	3352.82	Estiramiento O-H
2922.44	Estiramiento C-H	2937.63	Estiramiento C-H	2928.30	Estiramiento C-H
2852.17	Estiramiento C-H	1417.07	Tensión C-O y C-C	1412.46	Tensión C-O y C-C
1742.49	Estiramiento C=O	1328.76	Estiramiento C-O	1375.15	Tensión C-O y C-C
1634.34	Estiramiento C=O de amida	1142.09	Torsión O-H y tensión C-O de alcoholes secundarios	1226.70	Tensión C-O y C-C
1537.63	Torsión N-H	1088.26	Torsión O-H y tensión C-O de alcoholes secundarios	1023.40	Estiramiento C-O de ésteres
1455.10	Tensión C-C	916.56	Tensión C-C	923.61	Tensión C-C
1335.27	Tensión C-O y	845.18	Tensión	855.79	Balaceo N-H

	C-C		C-C de metilenos		
1284.06	Tensión C-O y C-C			721.65	Balanceo C-H y N-H
1214.53	Tensión C-N y C-C				
1177.74	Tensión C-N y C-C				
1098.77	Tensión C-N y C-C				
892.81	Tensión C-C				
841.87	Tensión C-C				
720.27	Balanceo C-H y N-H				
684.23	Balanceo C-H				

7.1.1.3.1 Materiales 1, 1.A, 2, 2.A, 3 y 3.A

Los primeros materiales sintetizados provienen de la misma mezcla por lo que es de esperar que presenten las mismas vibraciones en el espectro de infrarrojo, y aunque tienen gran similitud, se observan cambios en algunas regiones. En la figura 20 se muestran los espectros FTIR de los materiales 1, 2 y 3 sin tratamiento con isopropanol, ya que sus análogos tratados no presentan cambios en las vibraciones.

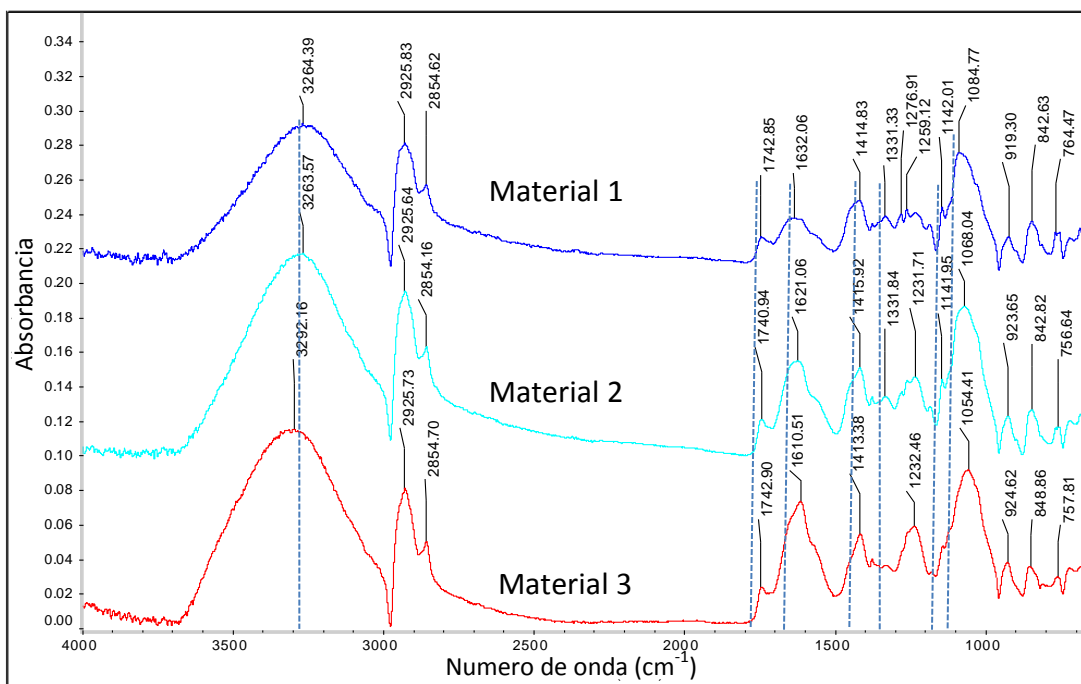


Figura 20. Espectros FTIR de las muestras 1, 1.A, 2, 2.A, 3 y 3.A.

Síntesis de Materiales Compuestos Base Biopolímero Mediante el Proceso de Electrohilado

Se observa un ligero desplazamiento de la señal ancha que se encuentra entre 3000 y 3600 cm^{-1} de las muestras 1 y 2 respecto de la muestra 3. Además de que esta muestra presenta una menor cantidad de vibraciones entre 1100 y 1400 cm^{-1} , particularmente si se compara con la muestra 1, de igual forma, en esta misma zona la muestra también presenta menos señales pero en una menor proporción que en la muestra 3. Así mismo la vibración presente en aproximadamente 1232 cm^{-1} , solo aparece en las muestras 2 y 3. En la Tabla 6 se muestran las vibraciones de la muestra 1 y se comparan con las de los compuestos que componen la mezcla (las vibraciones de los materiales 2 y 3 son similares a las del material 1, exceptuando las que solo aparecen en el material 1).

Tabla 6. Comparativo de las señales de FTIR de la muestra 1 con los componentes de la mezcla.

Muestra 1		Colágeno	PVA	SC
Frecuencia (cm^{-1})	Asignación	Frecuencia (cm^{-1})	Frecuencia (cm^{-1})	Frecuencia (cm^{-1})
3264.39	Estiramiento O-H y N-H	3289.16	3281.54	3352.82
2925.83	Estiramiento C-H	2922.44	2937.63	2928.30
2854.62	Estiramiento C-H	2852.17	1417.07	1412.46
1742.85	Estiramiento C=O	1742.49	1328.76	1375.15
1632.06	Estiramiento C=O de amida	1634.34	1142.09	1226.70
1414.83	Tensión C-O y C-C	1537.63	1088.26	1023.40
1331.33	Estiramiento C-O	1455.10	916.56	923.61
1276.91	Tensión C-O y C-C	1335.27	845.18	855.79
1259.12	Tensión C-O y C-C	1284.06		721.65
1142.01	Torsión O-H y tensión C-O de alcoholes secundarios	1214.53		
1084.77	Torsión O-H y tensión C-O de alcoholes secundarios	1177.74		
919.30	Tensión C-C	1098.77		
842.63	Tensión C-C de metilenos	892.81		
764.47	Balanceo C-H y N-H	841.87		

		720.27		
		684.23		

En la Tabla 6 se resaltan algunas de las vibraciones que se encuentran en la muestra 1, las cuales son muy similares a algunas vibraciones de los polímeros que componen la mezcla. Particularmente las vibraciones entre 1742 y 1630 cm^{-1} (en azul) son similares a las del colágeno en el mismo rango y comparando sus espectros, son muy similares (principalmente con los materiales 2 y 3 que tienen las mismas señales). Las vibraciones marcadas en rojo son muy parecidas a las del PVA y como se analizará más adelante, estas señales se conservan al cambiar las concentraciones de los polímeros.

7.1.1.3.2 Materiales 4, 4.A, 5, 5.A, 10 y 10.A

Al provenir de la misma mezcla, las muestras presentan las mismas vibraciones en el espectro de FTIR, por lo que solo se analizan las vibraciones del material 4. Las vibraciones presentes en el material 4 son similares a las de las muestras de los materiales 1, 2 y 3, pero aparecen una menor cantidad de vibraciones. Además de que el espectro muestra un mayor parecido con el espectro del PVA, tal como se observa en la Figura 21, donde se denota que entre 800 y 1420 cm^{-1} , de las ocho vibraciones que aparecen en el material 4, seis coinciden con las que aparecen en el PVA no solo en el número de onda en el que aparecen, sino también en intensidad. La Tabla 7 muestra una comparación de las vibraciones obtenidas de las muestras 1 y 4.

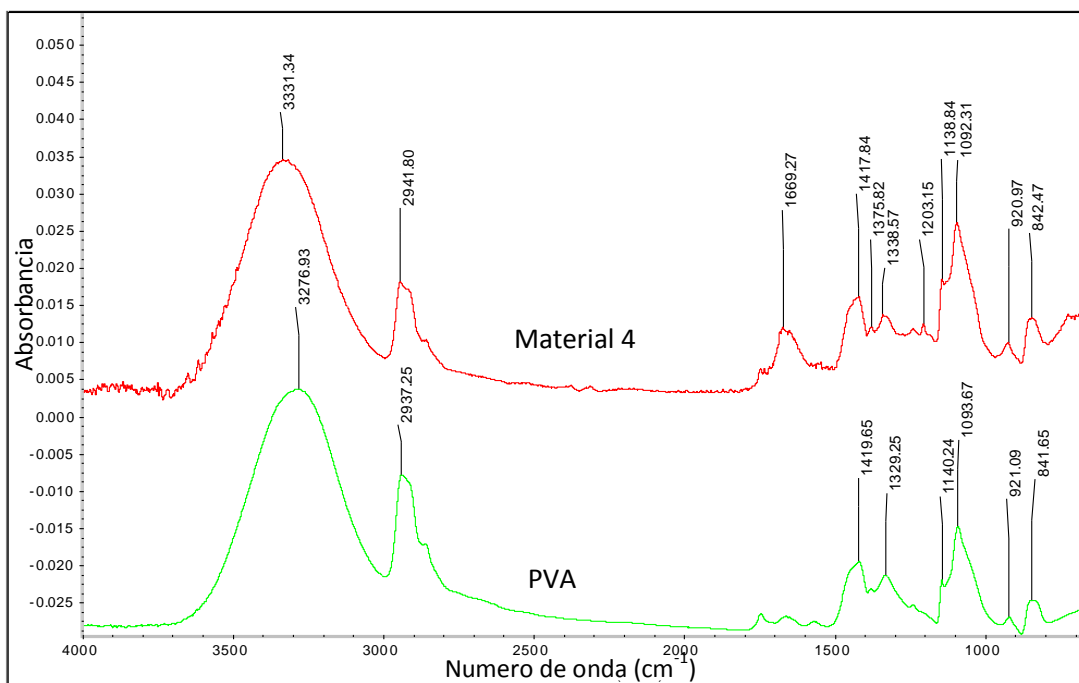


Figura 21. Espectros FTIR de las muestras 4 y 4.A.

Síntesis de Materiales Compuestos Base Biopolímero Mediante el Proceso de Electrohilado

Tabla 7. Comparativo de las señales de FTIR de la muestra 1, 4 y 4.A.

Muestra 1		Muestra 4	
Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación	Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación
3264.39	Estiramiento O-H y N-H	3331.34	Estiramiento O-H y N-H
2925.83	Estiramiento C-H	2941.80	Estiramiento C-H
2854.62	Estiramiento C-H		
1742.85	Estiramiento C=O		
1632.06	Estiramiento C=O de amida	1669.27	Estiramiento C=O de amida
1414.83	Tensión C-O y C-C	1417.84	Tensión C-O y C-C
1331.33	Estiramiento C-O	1375.82	Estiramiento C-O
1276.91	Tensión C-O y C-C	1338.57	Estiramiento C-O
1259.12	Tensión C-O y C-C	1203.15	Tensión C-O y C-C
1142.01	Torsión O-H y tensión C-O de alcoholes secundarios	1138.84	Torsión O-H y tensión C-O de alcoholes secundarios
1084.77	Torsión O-H y tensión C-O de alcoholes secundarios	1092.31	Torsión O-H y tensión C-O de alcoholes secundarios
919.30	Tensión C-C	920.97	Tensión C-C
842.63	Tensión C-C de metilenos	842.47	Tensión C-C de metilenos
764.47	Balaceo C-H y N-H		

7.1.2. Combinación CG/PVA + SC (25/50+25)

La combinación *CG/PVA+SC (25/50+25)* está compuesta de una mezcla de las disoluciones poliméricas indicadas en la sección de materiales y métodos, en la siguiente proporción: Colágeno 25%, PVA 50 % y SC 25 %, lo que equivale a 0.32 g de colágeno, 1.6 g de PVA y 0.25 g de SC por cada 40 mL de disolución total. Los primeros 4 materiales obtenidos partieron de una misma disolución, mientras que los otros cuatro se elaboraron a partir de una disolución preparada después observar los buenos resultados obtenidos con esta mezcla de polímeros. Una vez preparada, la mezcla se dejó en reposo por algunas horas, de esta manera que se presentó la precipitación de uno de los componentes de la mezcla, posiblemente el colágeno. Los 8 materiales de esta proporción de la mezcla, se obtuvieron empleando los parámetros de electrohilado descritos en la Tabla 8:

Tabla 8. Condiciones de procesamiento de los materiales creados en la segunda ronda de experimentos.

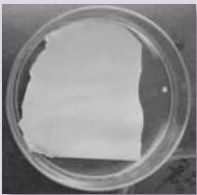
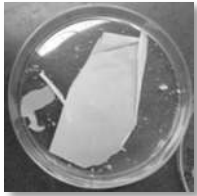
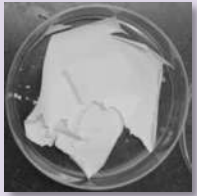

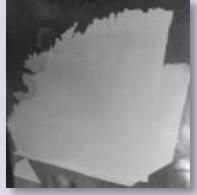
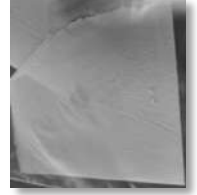
Material	Distancia aguja- colector (cm)	Voltaje (kV)	V de flujo de inyección (mL/h)	Aguja	Temperatura (°C)	Colector	Tiempo aprox. del proceso (horas)	Cantidad de disolución usada (mL)
6	15	20	0.72	#8	40	Fijo	8	7.2
7	15	20	0.5	#6	40	Fijo	8	4.5
8	12	20	1.0	#8	40	Fijo	8	8.0
9	13.5	20	0.7	#8	40	Fijo	7	4.9
14	12	19	0.5	#8	40	Fijo	14	7.0
15	12	15.5	0.5	#8	T. A.	Fijo	13	6.5
16	12	15.5	0.75	#8	40	Rotatorio	6	4.5
17	12	15.5	0.5	#8	T. A.	Rotatorio	6	3.0



En el caso de los materiales 6, 8 y 9 se varió la distancia aguja-colector para determinar su efecto en la morfología, manteniendo el voltaje, la temperatura y la aguja sin cambios. El material 7 es resultado de tratar de verificar la influencia del diámetro de la aguja, por lo que se empleó un diámetro menor (se intentó repetirlo empleando las otras dos distancias, sin embargo, no fue posible estabilizar el jet). Los materiales 14, 15, 16 y 17 son cambios basados en los resultados del análisis del material 8, del cual se observaron las mejores cualidades, por lo que la distancia se mantuvo, cambiando parámetros importantes como el voltaje, la temperatura y el tipo de colector. Para la elaboración de todos los materiales la mejor velocidad de flujo de inyección se determinó por observación, es decir, se usó la que proporcionaba el mejor jet visible al momento de trabajar con la disolución.

Los materiales obtenidos se secaron en estufa a 50 °C para después retirarlos del colector, los resultados se muestran en la Tabla 9. En general las muestras son fáciles de manejar, no se quiebran tan fácilmente, sino que son un poco flexibles y además se recuperaron en cantidades superiores al 50 % del contenido del colector lo que ayuda a futuro para realizar varias pruebas.

Síntesis de Materiales Compuestos Base Biopolímero Mediante el Proceso de Electrohilado

Tabla 9. Características de los materiales obtenidos a partir de la combinación: *CG/PVA + SC (25/50+25)*.

Material	Apariencia	Observaciones
6		Se pudo remover del colector más del 90 % de la muestra en una sola pieza, el material es flexible y no es quebradizo.
7		Se recuperó alrededor de un 60 % del contenido del colector, el material es un poco flexible.
8		Fue posible obtener un 70 % de lo contenido en el colector, el material ligeramente flexible, de textura aterciopelada y no es quebradizo.
9		Se recuperó un aproximado de 50%. El material es quebradizo.
14		El material se pudo retirar en más de un 90 % del contenido en el colector y en una sola pieza. El material es moderadamente flexible, presentando una cara lisa justo por el lado unido al colector.
15		El material se pudo retirar en más de un 90 % del contenido en el colector y en una sola pieza. El material es moderadamente flexible, presentando una cara lisa justo por el lado unido al colector.

16		El material se pudo retirar en más de un 90 % del contenido en el colector y en una sola pieza. El material es moderadamente flexible, presentando una cara lisa justo por el lado unido al colector.
17		El material se pudo retirar en más de un 90 % del contenido en el colector y en una sola pieza. El material es moderadamente flexible, presentando una cara lisa justo por el lado unido al colector.

De cada uno de los materiales obtenidos se tomó aproximadamente la mitad, porción que se sumergió en alcohol isopropílico durante 1 hora para observar si existe algún cambio en sus propiedades. De manera similar, las muestras tratadas se designan agregando la letra “A”, es decir 6.A, 7.A 8.A, etc.

7.1.2.1 Análisis morfológico por FESEM

Se observa que el uso de PVA en mayor cantidad aumenta la resistencia mecánica del material así como su flexibilidad, además de que la disolución es más viscosa, razón por la cual a mayor distancia aguja-colector se presenta goteo. Esto último explica que las muestras 6 y 7 presenten varios defectos en el electrohilado, seguramente provocados por el exceso de goteo. Es interesante el hecho de que la muestra 6 con tantos defectos durante el proceso, sea la que tiene las mejores propiedades a nivel macroscópico, ya que es la de mayor resistencia y flexibilidad, además de haber sido separado del colector más del 90% del material en una sola pieza. Parece ser que en este caso los defectos promueven una mejora en las propiedades macroscópicas, quizá por haber una mayor cantidad de interacciones tipo Van der Waals.

7.1.2.1.1 Muestras 6 y 6.A

Al analizar el material generado, a nivel microscópico (Figura 22) es posible observar la formación de fibras con una gran cantidad de defectos, así como una gran cantidad de goteo, el cual parece ser resultado del aumento en la distancia aguja-colector. De igual manera que en los materiales antes analizados, no se percibe ningún cambio morfológico por el tratamiento con isopropanol, por lo que solo se presentan las imágenes de la muestra tratada.

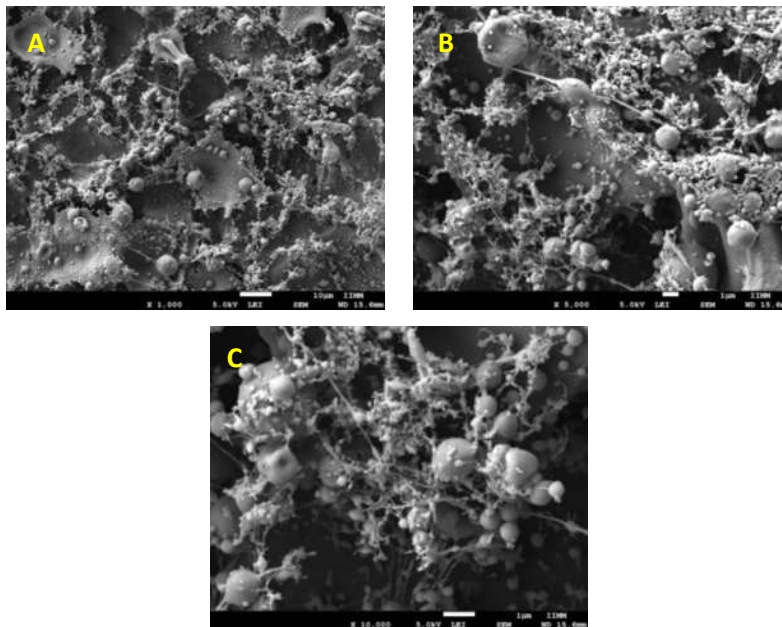
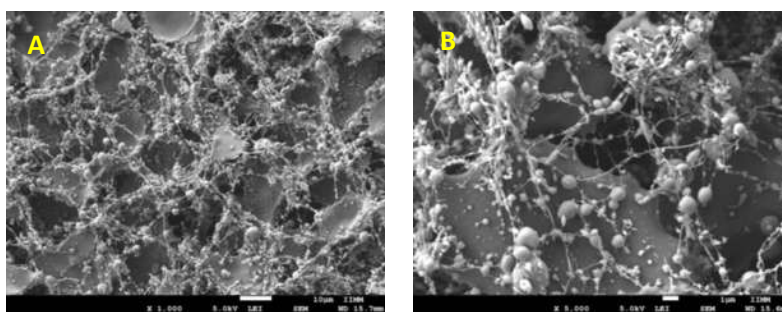


Figura 22. Material 6.A, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 20 kV, 0.72 mL/h, 15 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:50/25), tratada con isopropanol.

7.1.2.1.2 Muestras 7 y 7.A

Este material presenta algunas fibras pero con una gran cantidad de defectos por goteo sobre el material (Figura23), algo predecible debido a la dificultad que represento la estabilización en la formación del jet de electrohilado. De la misma manera, no se observan cambios en los materiales al tratarlo con isopropanol, por lo que solo se presenta la muestra tratada.



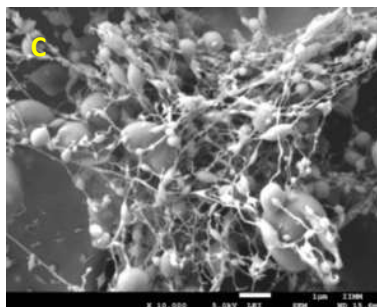


Figura 23. Material 7.A, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 20 kV, 0.5 mL/h, 15 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #6 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:50/25), tratada con isopropanol.

7.1.2.1.3 Muestras 8 y 8.A

El material 8 presenta una gran cantidad de fibras, y como se observa en las Figura 24A, no presentan defectos por goteo. Las fibras obtenidas continúan presentando defectos, asociados a la dificultad para disolver o dispersar adecuadamente el colágeno, problema en el que se debe seguir trabajando. Un aumento del material 8 en la Figura 24 D, muestra que las fibras tienen diámetros alrededor de 85 nm, lo que se encuentra en la escala nanométrica. En el material tratado con isopropanol no se observan cambios morfológicos, es decir, la porosidad es similar y las fibras no presentan cambios perceptibles por lo cual solamente se presenta la muestra sin tratamiento.

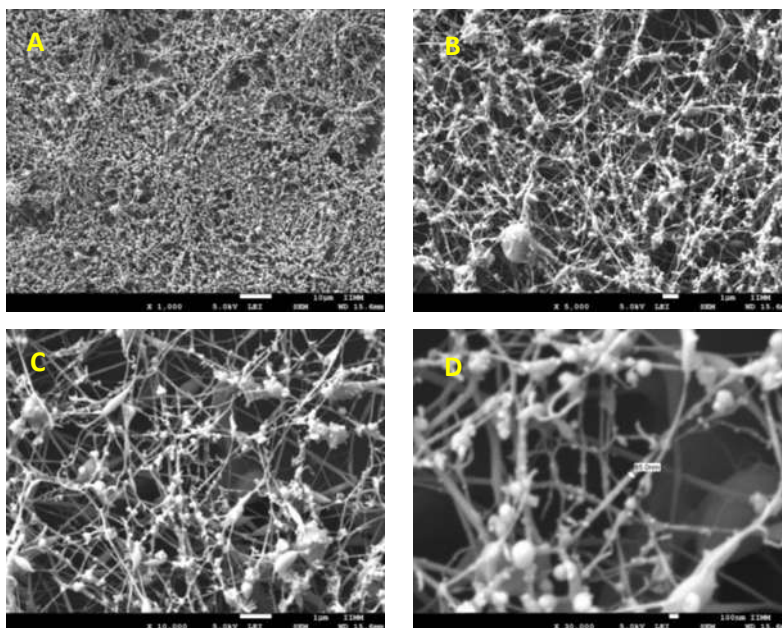


Figura 24. Material 8, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000, C) X10000 y D) X30000 de muestras obtenidas a: 20 kV, 1 mL/h, 12 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:50/25).

7.1.2.1.4 Muestras 9 y 9.A

Se obtuvieron fibras con defectos, y el material presenta defectos por goteo, pero además contiene defectos por aglutinamiento, lo que se observa como aglomeración de fibras en algunas zonas (Figura 25), provocando que existan zonas con gran porosidad, esto explica que a nivel macroscópico el material es quebradizo. No se observan cambios morfológicos en el material tratado con isopropanol, por lo que solo se presenta la muestra sin tratamiento.

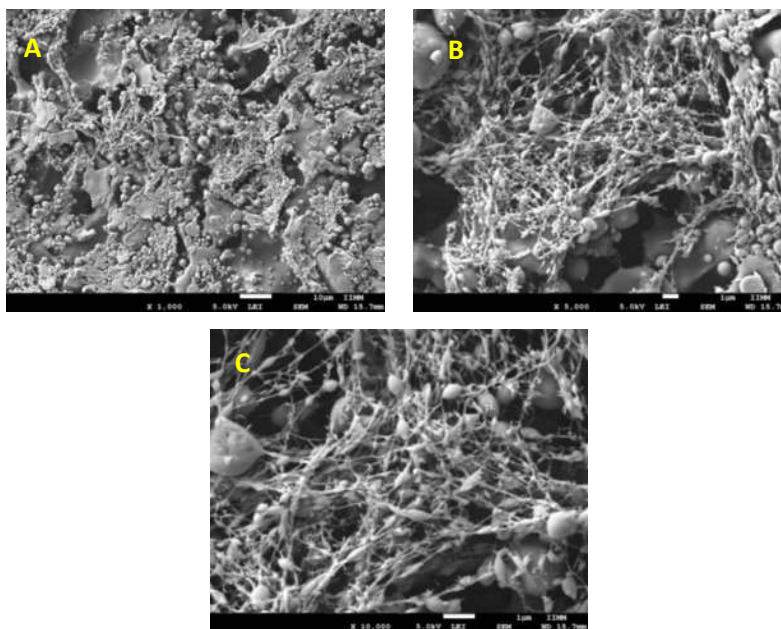


Figura 25. Material 9, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 20 kV, 0.7 mL/h, 13.5 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:50/25).

7.1.2.1.5 Muestras 14y 14.A

En esta muestra se obtuvieron fibras con menos defectos que con el material 8, pero con una gran cantidad de goteo sobre el material, el cual fue provocado por una obstrucción de la aguja (Figura 26). En este caso no es posible verificar si existe algún cambio en la morfología del material que se trató con isopropanol, ya que el material tratado fue colocado para su observación con la parte de atrás hacia el detector del microscopio. Aun así se observó una orilla del material (Figura 27 A) donde se puede verificar que las fibras existen pero no es posible observarlas fácilmente.

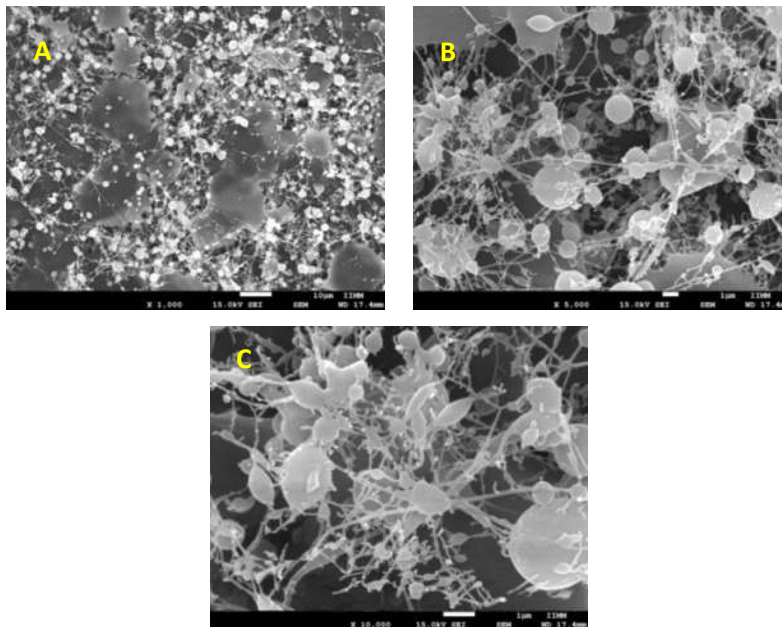


Figura 26. Material 14, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 19 kV, 0.5 mL/h, 12 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:50/25).

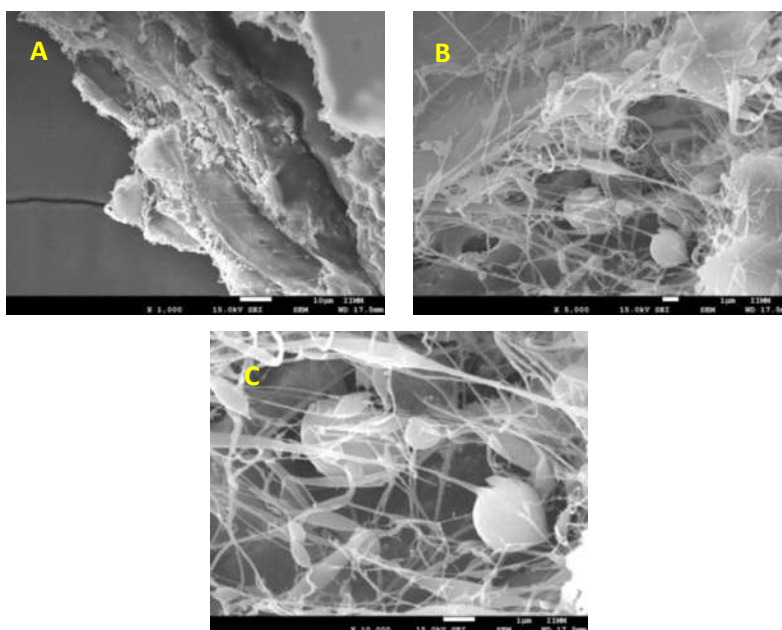


Figura 27. Material 14.A, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 19 kV, 0.5 mL/h, 12 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:50/25), tratada con isopropanol.

Algunos aspectos importantes observados en la Figura 27A del material 14.A, son:

- 1) La parte del material que está en contacto con el colector, se colecta en forma de una película muy fina, una tendencia general en todos los materiales. Para

esto se proponen dos explicaciones, a) la superficie del colector aún se encuentra fría (más fría que el sistema que apenas empieza a aumentar su temperatura a los 40 °C) al momento de empezar el proceso de electrohilado, por lo que al momento de hacer contacto se aglomera en forma de película; b) la carga neta sobre el colector al inicio del proceso de electrohilado es mayor a la que se presenta en la superficie del material que se está acumulando. Esta pequeña diferencia de carga podría provocar que el jet se mueva ligeramente más rápido y se provoque el aplastamiento y la formación de la película. Una posible forma de verificar si realmente disminuye la carga neta en la superficie del material que se está electrohilando sería adicionar mezcla polimérica constantemente, hasta que el jet no pueda formarse, o sea necesario aumentar el voltaje para mantener el jet; esto implicaría también el límite en el grosor que se puede alcanzar en un material electrohilado.

2) Es posible observar la formación de por lo menos tres o cuatro capas del material, las cuales parecen como finas películas sobre las cuales se forman las fibras. Para un mejor análisis de esta peculiaridad, será necesario observar más zonas tanto de este mismo material, como de otros por la orilla de la cara trasera.

7.1.2.1.6 Muestras 15 y 15.A

Las fibras observadas del material 15.A presentan defectos de gran tamaño (Figura 28), con la particularidad de que existe aglomeración de fibras y goteo. Es posible que la aglomeración se deba a que las fibras a temperatura ambiente no alcanzan a secar y se juntan unas con otras. El material 15 se colocó con la parte trasera hacia el analizador del microscopio, por lo que no es posible diferenciar si existen variaciones morfológicas entre el material tratado con isopropanol y el no tratado.

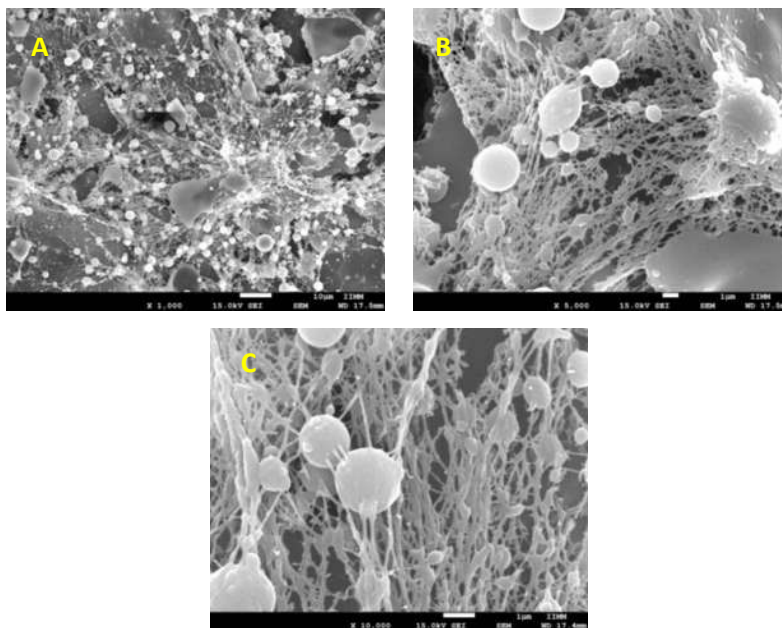


Figura 28. Material 15.A imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 15.5 kV, 0.5 mL/h, 12 cm aguja-colector y T.A. con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:50/25), tratada con isopropanol.

7.1.2.1.7 Muestras 16 y 16.A

En la Figura 29 se observan defectos por goteo y los anteriormente observados debido al problema de dispersar adecuadamente los componentes de la mezcla. Hay una gran cantidad de fibras a lo largo del material y fue posible medir los diámetros de algunas, los cuales están entre 41.7 nm y 108 nm. Si bien no se han eliminado los defectos por completo, si se ha logrado obtener nanofibras más delgadas empleando un colector rotatorio (recordando que los diámetros del material 8 eran de alrededor de 85 nm). Entre los materiales 16 y 16.A no se detectan cambios morfológicos significativos por lo que solo se presenta la muestra con tratamiento.

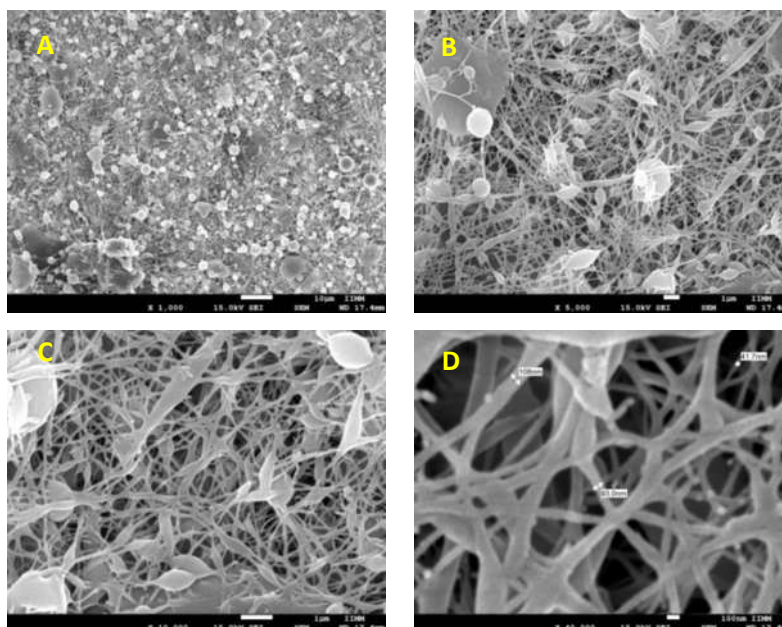


Figura 29 Material 16.A, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000, C) X10000 y D) X40000 de muestras obtenidas a: 15.5 kV, 0.75 mL/h, 12 cm aguja-colector y 40°C con aguja del #8 en colector rotatorio, de la mezcla CG/PVA + SC (25:50/25), tratada con isopropanol.

7.1.2.1.8 Muestras 17 y 17.A

La morfología de esta muestra sin y con tratamiento se muestra en las Figuras 30 y 31, respectivamente. A diferencia de lo que ocurre con el material 15 que al trabajar a temperatura ambiente se provocan aglomeraciones de fibras, en este caso, con el uso de un colector rotatorio no se presenta este problema. Esto se atribuye a que la rotación promueve un ligero estiramiento de las fibras, y al no estar completamente secas al momento de tocar el colector, este estiramiento es más factible, al mismo tiempo, la rotación favorece el secado de las fibras y no se presenta aglomeración. Aun así es importante observar que este material presenta una menor porosidad que material 16.

En este caso la Figura 30D muestra diámetros de las fibras de 59.3 nm, 107 nm y 119 nm, mientras que las de la Figura 31D son de 31.9 nm, 77.9 nm y 115 nm. Esto no quiere

decir que exista un efecto directo por el uso de isopropanol en la muestra 17.A, simplemente es otra zona del material la que se está observando. El efecto que se esperaría es un aumento en la porosidad, lo que hasta el momento no se ha observado.

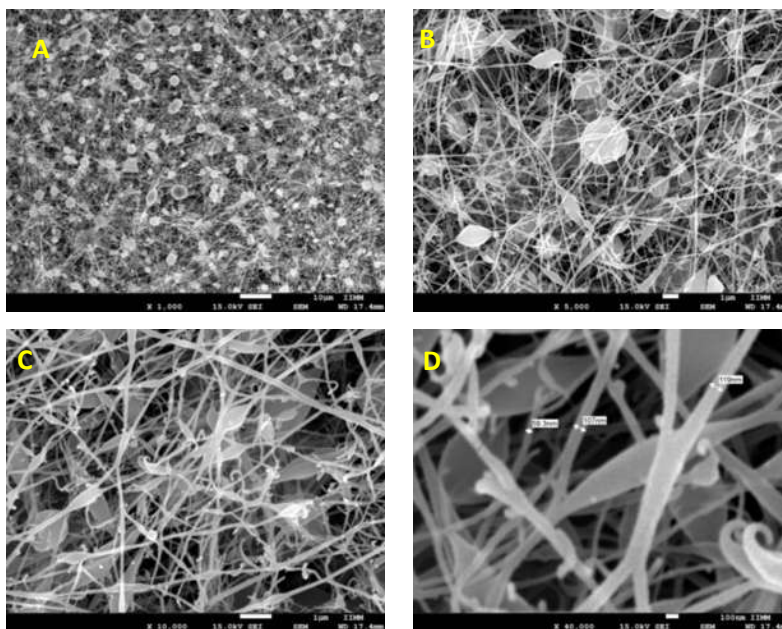


Figura 30. Material 17, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000, C) X10000 y D) X40000 de muestras obtenidas a: 15.5 kV, 0.5 mL/h, 12 cm aguja-colector y T.A. con aguja del #8 en colector rotatorio, de la mezcla CG/PVA + SC (25:50/25).

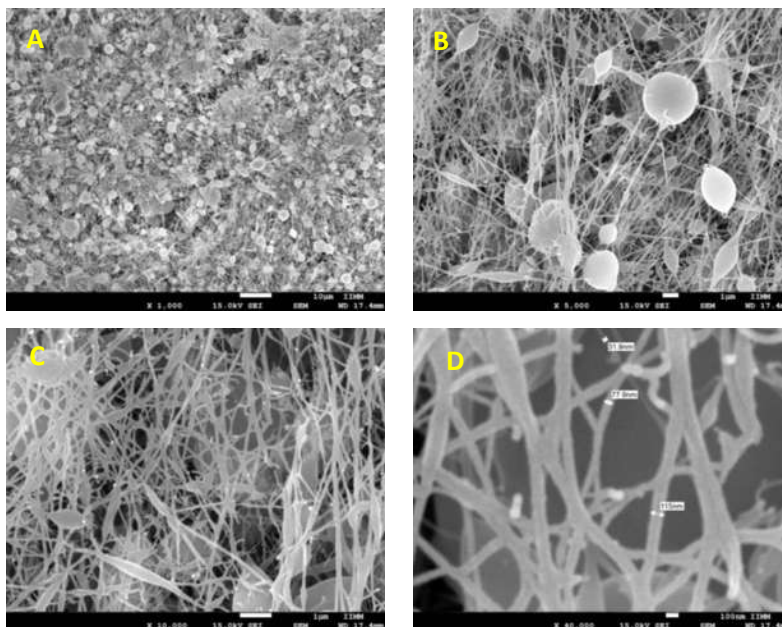


Figura 31. Material 17.A, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000, C) X10000 y D) X40000 de muestras obtenidas a: 15.5 kV, 0.5 mL/h, 12 cm aguja-colector y T.A. con aguja del #8 en colector rotatorio, de la mezcla CG/PVA + SC (25:50/25) tratada con isopropanol.

7.1.2.2 Análisis infrarrojo

7.1.2.2.1 Muestras 6 a 9 y 6.A a 9.A

Los espectros FTIR de las muestras 6, 7, 8, 9 y sus homólogos tratados con isopropanol presentan vibraciones muy similares entre sí por lo que solo se presenta un espectro FTIR, el del material 7 (figura 32), en el que además se observa un gran parecido a las de los espectros antes analizados, principalmente con el del material 4 el cual solo difiere por una vibración presente en 1236 cm^{-1} la cual en estos espectro es de mayor intensidad que en el material 4. Además tienen una mayor similitud con el espectro FTIR del PVA, esto era de esperarse ya que la concentración de PVA es mayor en estas muestras.

Las asignaciones de las vibraciones son las mismas que las de la muestra 1 y 4 analizadas anteriormente.

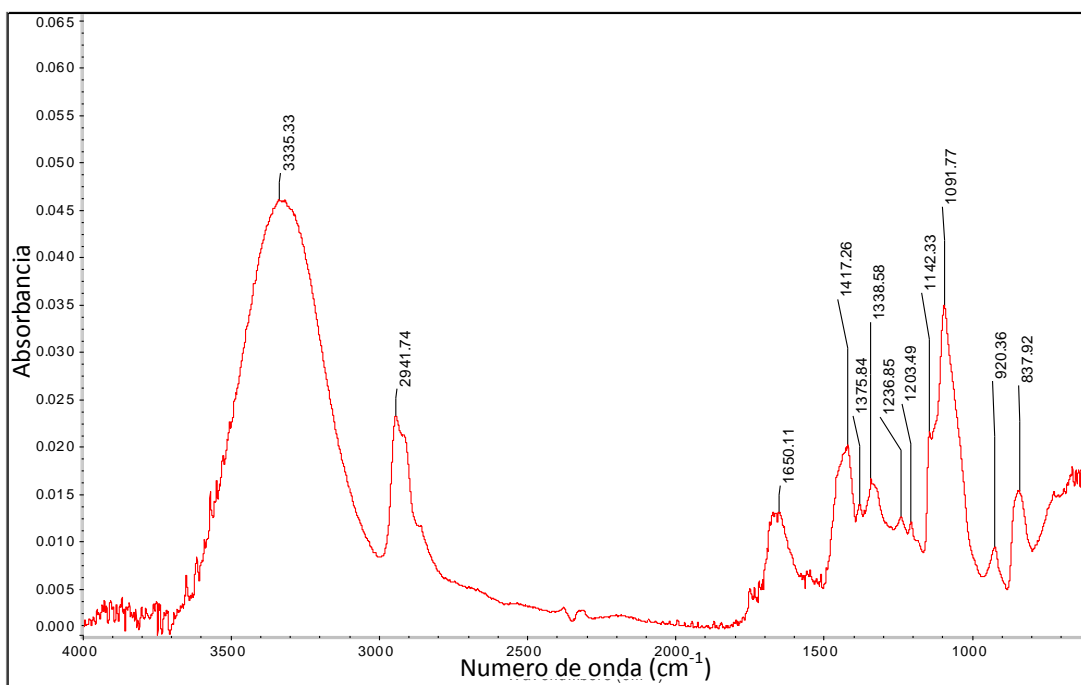


Figura 32. Espectros FTIR del material 7.

7.1.2.2.2 Muestras 14, 15 16 y 17

Aunque estas muestras provienen de una mezcla similar a la anterior, es importante recordar que en este caso la disolución final de la mezcla se dejó reposar, de tal manera que las partículas no disueltas precipitaran para disminuir los defectos de las fibras, por lo cual podría haber diferencias en los espectros FTIR obtenidos. En general las vibraciones obtenidas para estas muestras son similares (Figura 33), sin embargo algunas vibraciones de la muestra 17, son de menor intensidad, además de la presencia de la vibración en 1743 cm^{-1} .

La comparación de los espectros de esta muestra 17 y del colágeno puro se muestra en la Figura 34. Se observa gran similitud de ambos espectros pero con diferencias evidentes

en las intensidades de algunas vibraciones. La vibración en 1743 cm^{-1} de la muestra 17 coincide con la observada a 1742 cm^{-1} del colágeno, además aparece una vibración en 684 cm^{-1} que es idéntica a la del colágeno, esta vibración no aparece en los espectros de las muestras 14, 15 y 16. Tomando en cuenta que el material 17 se elaboró con la última porción de la mezcla, es factible pensar que parte de las partículas precipitadas fueron arrastradas al tomar la disolución para su electrohilado, y que estas partículas sean colágeno.

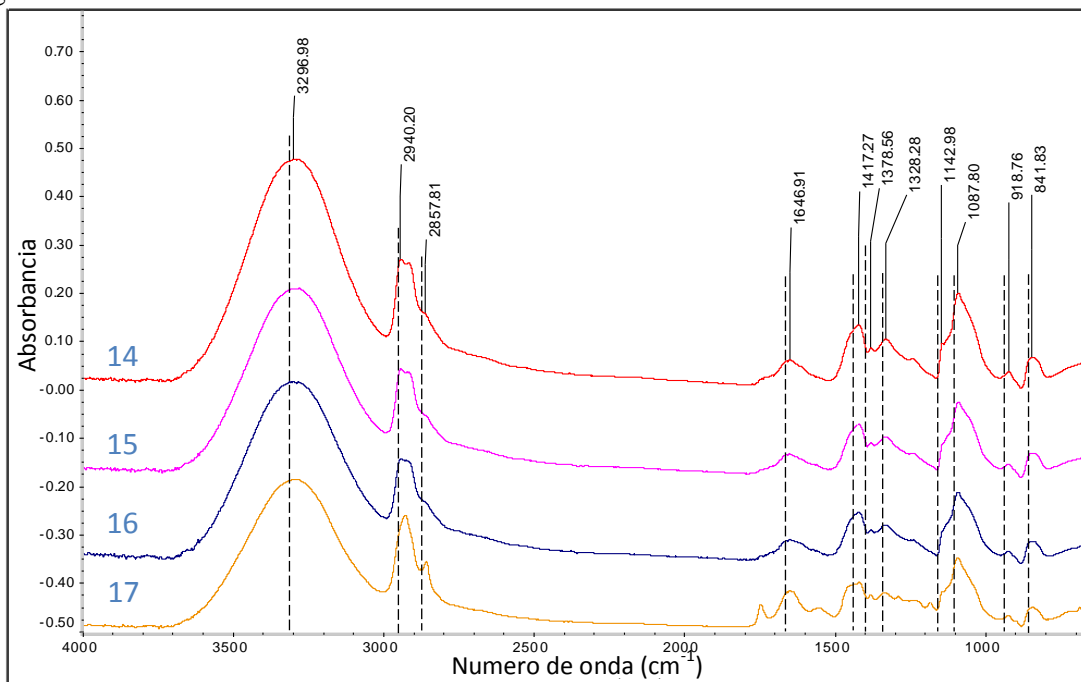


Figura 33. Espectros FTIR de los materiales 14, 15, 16, 17.

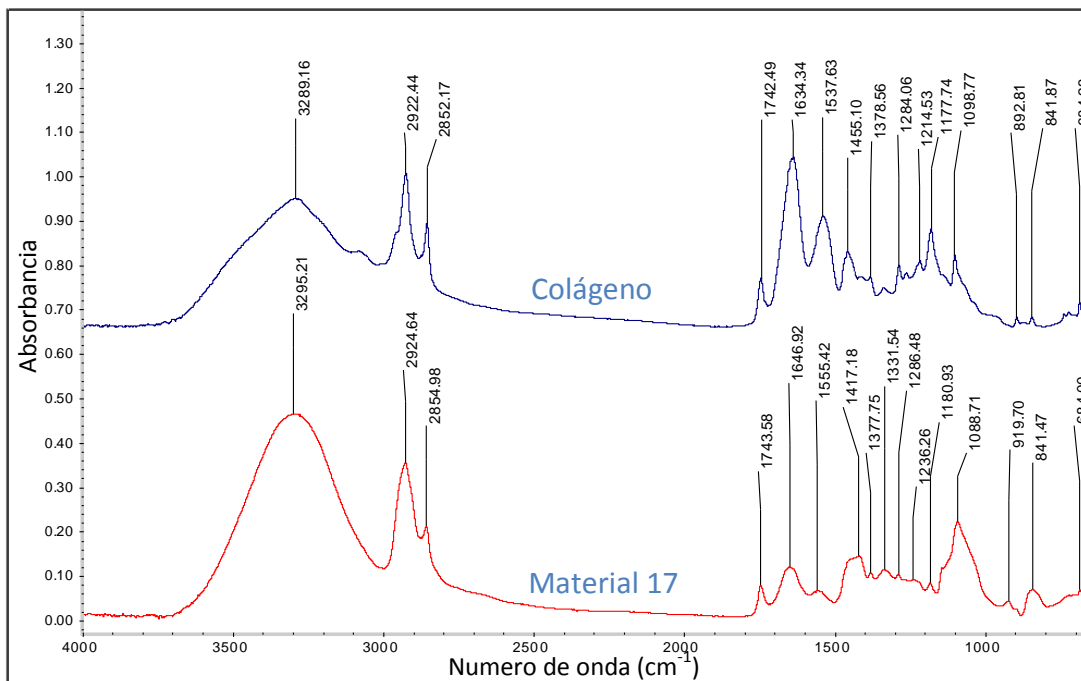


Figura 34. Comparación de los espectros FTIR del colágeno y el material 17.

7.1.3. Combinación CG/PVA + SC (25/25+50)

De esta mezcla fue posible obtener tres materiales, cuya elaboración resulto complicada, debido a que no era posible obtener un jet adecuado sin evitar taponamiento de la aguja o goteo excesivo. Los parámetros de electrohilado se describen en la Tabla 10. En general se emplearon 12 cm de distancia aguja-colector, 20 kV y temperatura ambiente, ya que a temperaturas mayores (40 °C) no fue posible obtener el material en forma de colecciones de nanofibras aun cuando se realizaron varios ensayos a diferentes condiciones.



Tabla 10. Parámetros de procesamiento de los materiales creados en la segunda ronda de experimentos.


Material	Distancia aguja-colector (cm)	Voltaje (kV)	V de flujo (mL/h)	Aguja	Temperatura	Colector	Tiempo aprox. del proceso (horas)	Cantidad de disolución usada (mL)
11	12	20	0.5	#8	T. A.	Fijo	6.5	2.0
12	12	20	0.3	#8	T. A.	Fijo	8	2.9
13	12.5	19	0.38	#8	T. A.	Rotatorio	8	3.11

Los materiales obtenidos se secaron en estufa a 50 °C durante 24 horas para después retirarlos del colector, los resultados se muestran en la Tabla 11.

En general las propiedades macroscópicas de los materiales no son las ideales para su manipulación y la cantidad recuperada del colector es muy pequeña, exceptuando el material 13. Siguiendo la metodología descrita anteriormente, los materiales se dividieron en dos partes y una fue tratada con isopropanol.

Tabla 11. Características macroscópicas de los materiales obtenidos a partir de la combinación: CG/PVA + SC (25/25+50).

Material	Apariencia	Observaciones
11		Fue posible remover más del 50 % del material depositado en el colector, el cual es flexible y no es quebradizo. Pero muy delgado y frágil.
12		Se recuperó menos de un 40% del contenido en el colector, el material es flexible y frágil, pues se fragmenta fácilmente.

13		Fue posible obtener un 70 % de lo contenido en el colector, el material es rígido, de textura aterciopelada y quebradiza.
----	---	---

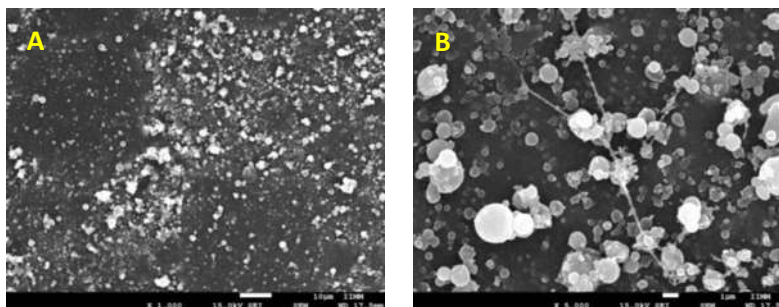
7.1.3.1 Análisis morfológico por FESEM

De manera general, a través del análisis microscópico se observa que ninguno de los materiales se electrohiló, lo cual indica que la disminución en el contenido de PVA provoca dificultades para el proceso de electrohilado para estas combinaciones probadas. Esto indica que el PVA es el polímero con el que se llevan a cabo las principales interacciones para que la mezcla sea uniforme, además de que es el componente que en mayor medida favorece la producción de mezclas con viscosidades adecuadas para electrohilar.

De manera general microscópicamente no se observaron cambios morfológicos en las muestras tratadas con isopropanol, razón por la cual solamente se muestra la morfología de una de las muestras (pudiendo ser la tratada o la no tratada con isopropanol).

7.1.3.1.1 Muestras 11 y 11.A

La Figura 35 muestra la morfología del material 11, se observa que esta mezcla no tiene las características adecuadas para su electrohilado ya que existen muchas partículas dispersas que no se integraron adecuadamente a la mezcla. En este caso, tampoco existen diferencias morfológicas significantes entre el material tratado con isopropanol y el no tratado.



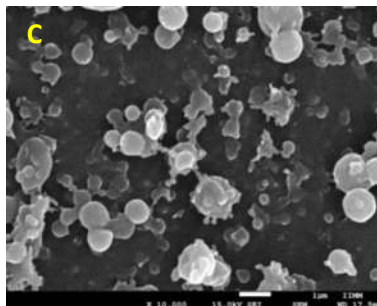


Figura 35. Material 11.A, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 20 kV, 0.5 mL/h, 12 cm aguja-colector y T.A. con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:25/50), tratada con isopropanol.

7.1.3.1.2 Muestras 12 y 12.A

Como se observa en la Figura 36 esta muestra tampoco se electrohiló, solo se observan miles de partículas en forma de esferas y ligeros vestigios de la formación de fibras. Sin embargo, aun cuando no fue posible electrohilar esta combinación, las características morfológicas del material resultante son igualmente atractivas para su posible uso como biomaterial, ya que se observa una alta relación superficie-volumen y gran porosidad interconectada, además de que el tamaño de las esferas se mantiene en la escala nanométrica y la distribución del tamaño de las esferas no es muy amplia, aunado al hecho de que están distribuidas homogéneamente.

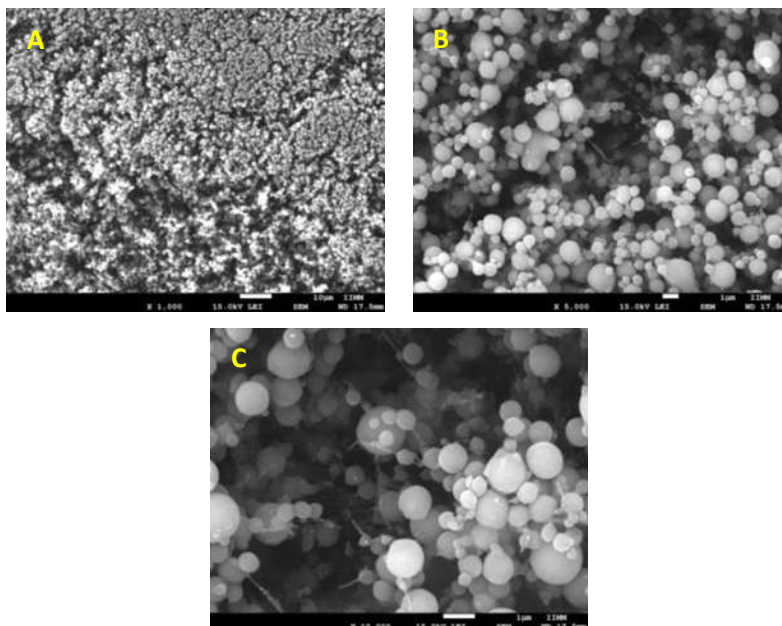


Figura 36. Material 12, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 20 kV, 0.3 mL/h, 12 cm aguja-colector y T.A. con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA + SC (25:25/50).

7.1.3.1.3 Muestras 13 y 13.A

De igual manera, esta muestra no fue electrohilable, ya que de acuerdo a las imágenes FESEM mostradas en la Figura 37 aún se observa gran cantidad de partículas esféricas y solo rastros de fibras que empiezan a formarse, sin embargo, estas esferas no tienen las características del material 12, es decir, el material no es homogéneo, por lo tanto, esta combinación no es tan atractiva.

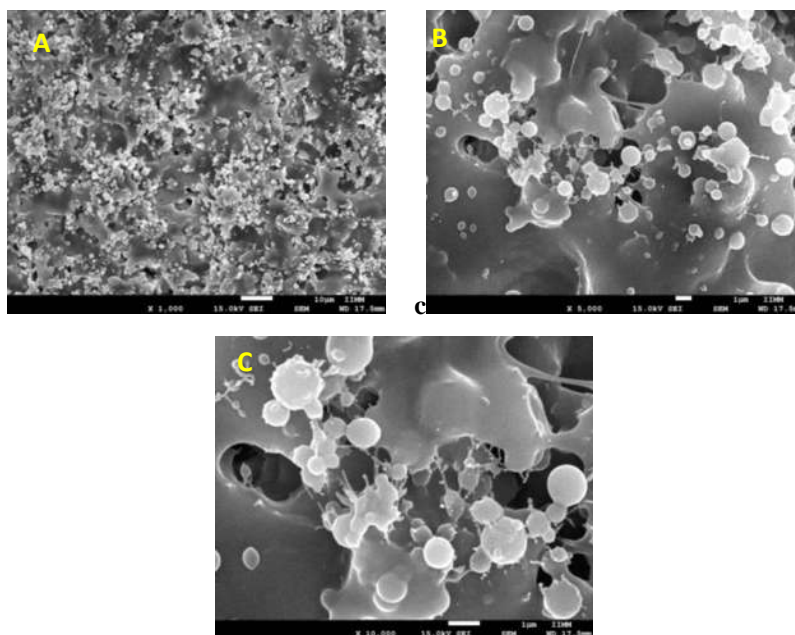


Figura 37. Material 13, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 19 kV, 0.38 mL/h, 12.5 cm aguja-colector y T.A. con aguja del #8 en colector rotatorio, de la mezcla CG/PVA + SC (25:25/50).

7.1.3.2 Análisis infrarrojo

En el análisis de los espectros de infrarrojo de las muestras 11, 12, 13 y las tratadas con isopropanol (ejemplificado en la Figura 38 con los espectros FTIR de las muestras 12 y 12.A), se observa que presentan espectros muy similares entre sí, e inclusive muy parecidos a los espectros que se obtienen de las otras combinaciones de esta misma mezcla, particularmente se observa que algunas de las vibraciones principales siguen observándose en 1141 , 1084 y 850 cm^{-1} que son características del PVA

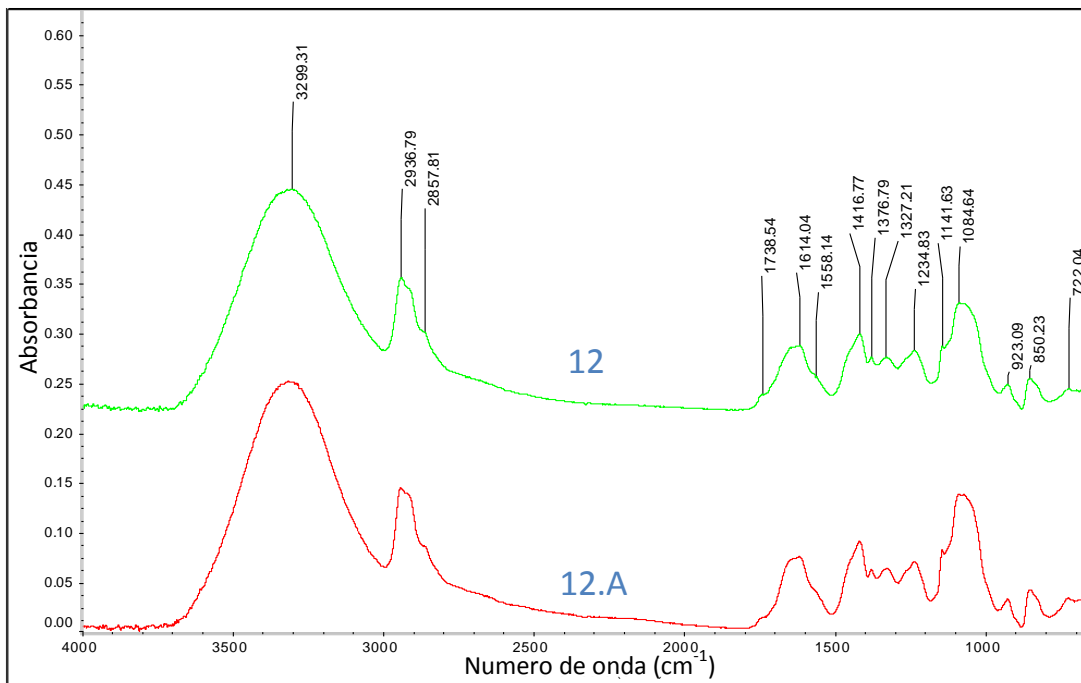


Figura 38. Espectros FTIR de las muestras 12 y 12.A de la mezcla Colágeno /PVA+SC (25/25+50).

7.2. Combinación Colágeno /Alcohol polivinílico +Ácido Hialurónico

Se utilizó una mezcla en la proporción: CG/PVA+HA (25/50+25), de la cual fue posible obtener 9 materiales, los parámetros de electrohilado se muestran en la Tabla 12. En general se empleó una distancia aguja-colector de 12 cm, variando de 40 °C a temperatura ambiente, además del tipo de colector.

Tabla 12. Condiciones de procesamiento de los materiales creados en la segunda ronda de experimentos.

Material	Distancia a aguja-colector (cm)	Voltaje (kV)	V de flujo (mL/h)	Aguj a	Temperatura (°C)	Colector	Tiempo aprox. del proceso (horas)	Cantidad de disolución usada (mL)
18	12	14.5	1.1	#8	T. A.	Fijo	4	4.0
19	12	14.5	0.75	#8	T. A.	Fijo	6.5	5
20	12	14.5	0.7	#8	40	Fijo	6.5	4.5
21	12	14.5	0.8	#8	T. A.	Rotatorio	6.5	5.2
22	12	14.5	0.6	#8	40	Rotatorio	6.7	4.2
23	12	14.5	0.6	#8	40	Rotatorio	7	4.21
24	12	15	0.75	#8	T. A.	Fijo	6.7	5
25	12	15	0.8	#8	40	Fijo	5	4
26	12	14.5	0.6	#8	T. A.	Rotatorio	4.6	5.6

De la Tabla 12, se observa que el material 18 presenta la velocidad de flujo de inyección mayor, y aun cuando el jet fue fácil de estabilizar a esta velocidad, resulto poco conveniente ya que como se observa en la Tabla 13 este material presento un considerable escurrimiento de la disolución, pues al estar a temperatura ambiente se secó adecuadamente, por tal motivo las últimas dos horas de procesamiento la velocidad de flujo de inyección se redujo a 0.75 mL/h. Los parámetros para el electrohilado de los materiales 19 a 26 difieren principalmente en dos aspectos: la temperatura y el tipo de colector, obteniendo dos materiales en un mismo tipo de colector a diferentes temperaturas.

Los materiales 23 a 26 son resultado de una prueba para el mejoramiento de la calidad de las fibras, para tal caso, se utiliza ultra sonido (US) para promover la dispersión del colágeno. Esto se basa en el artículo de Dirk Dippold *et al.* [21], en el cual con ayuda de ultrasonido mejoran la calidad de las fibras PCL-Colágeno, (disminuyendo los defectos asociados a la dificultad de dispersar el colágeno) al exponer algunos minutos al US la disolución. En este caso, la disolución preparada se agito durante 3 horas, se sometió a US por 3 min y se agito 2 horas más para después usarla.

En el caso específico del material 26, utilizó una velocidad de flujo de inyección 0.6 mL/h y con 4.6 horas de electrohilado como se muestra en la Tabla 12, obteniendo una cantidad mayor de disolución agregada respecto a los demás materiales. Esto se logró

Síntesis de Materiales Compuestos Base Biopolímero Mediante el Proceso de Electrohilado


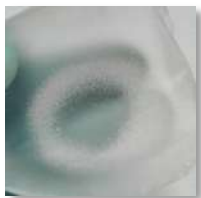
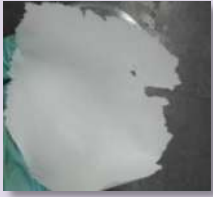
utilizando dos inyectores de la misma capacidad, empleando la misma velocidad de flujo y agujas del mismo diámetro, uniendo ambas agujas con un puente de cobre para garantizar el mismo voltaje en ambas (Figura 39).






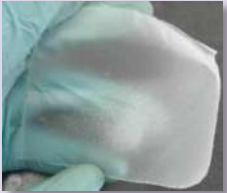


Figura 39. Agujas utilizadas para elaborar el material 26, unidas por un puente de cobre cubierto con aislante.

Los materiales obtenidos se secaron en estufa a 50 °C para después retirarlos del colector, los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Características de los materiales obtenidos a partir de la combinación: *CG/PVA + HA (25/50+25)*.

Material	Apariencia	Observaciones
18		Fue posible remover del colector casi el 100 % del material, el cual es flexible, transparente y con apariencia de película. Durante su preparación el material se escurrió como una disolución muy densa, como se observa en la parte resaltada con un círculo.
19		El material se obtuvo en más de un 90%, es transparente, flexible y resistente.
20		Se obtuvo alrededor de 80% del contenido en el colector, el material es flexible.

Síntesis de Materiales Compuestos Base Biopolímero Mediante el Proceso de Electrohilado

21		Se recuperó más de 80 % del material contenido en el colector, la película es flexible y no se rompe fácilmente.
22		El material se recuperó en un 50 % aproximadamente, es flexible pero quebradizo.
23		Se recuperó alrededor de un 80% del contenido en el colector, la película es flexible y resistente, sin embargo las orillas son frágiles.
24		Se recuperó más del 90% del contenido en el colector, la película es ligeramente transparente, flexible y resistente.
25		Se recuperó alrededor de un 70 % del contenido en el colector, el material es flexible y resistente.
26		El material se recuperó en más del 90% del contenido en el colector, es flexible y resistente.

Al analizar con detalle la Tabla 13 y corroborar con la Tabla 12, se encuentran algunas tendencias. Los materiales 20, 22, 25 y 23 se recuperan del colector en cantidades menores y son más frágiles, particularmente en las orillas. La dificultad para recuperar los materiales es aún más notoria en los elaborados con el colector rotatorio (22 y 23); probablemente el secado es demasiado rápido, provocando mayor fragilidad en los materiales. Los materiales elaborados a temperatura ambiente son más resistentes y fáciles de recuperar del colector fijo (18, 19 y 24), son ligeramente transparentes y con una textura similar a la que se

obtendría al formar películas de los materiales, estos grados de transparencia no se observan en los materiales elaborados con el colector rotatorio. Esto sugiere que a temperatura ambiente empleando el colector fijo el jet de electrohilado no seca adecuadamente lo que promueve la aglomeración de las fibras, mientras que empleando el colector rotatorio, es precisamente su rotación lo que ayuda a mejorar el secado, facilitando la formación de fibras.

7.2.1 Análisis morfológico por FESEM

7.2.1.1 Muestras 18 y 19

En ambos casos no se logró electrohilar adecuadamente (Figura 40), aunque las fibras se formaron, las ramificaciones indican que el secado de estas fibras no fue adecuado lo que promovió su aglomeración en el colector.

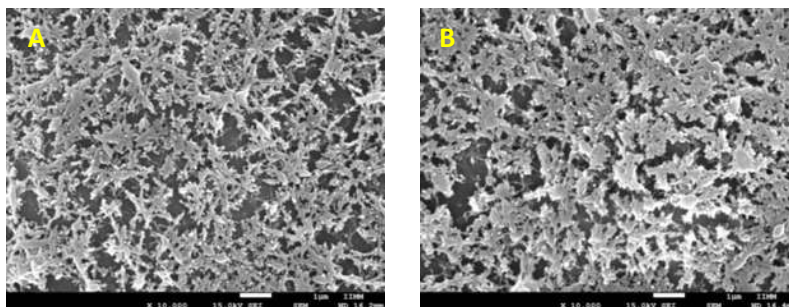


Figura 40. A) Muestra 18 (velocidad de flujo: 1.1 mL/h) y B) muestra 19 (velocidad de flujo: 0.75 mL/h), imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de X10000 de muestras obtenidas a: 14.5 kV, 12 cm aguja-colector y T.A. con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA+HA (25/50+25).

1.2.1.2 Muestra 20

Al elevar la temperatura a 40 °C se promueve la evaporación del disolvente y por ende la formación de fibras (Figura 41), lo que indica que el secado es más efectivo, ayudando a que las fibras formadas no se aglomeren. En la Figura 41A se observa una gran cantidad de defectos por goteo, lo que afecta la calidad del material, y sugiere que el disminuir la velocidad de flujo de inyección ayuda a disminuir estos defectos. Probablemente, muchos de estos defectos estén relacionados a la dificultad de disolución de los componentes de la mezcla, particularmente, en la Figura 41C se distinguen partículas pequeñas alrededor de las fibras.

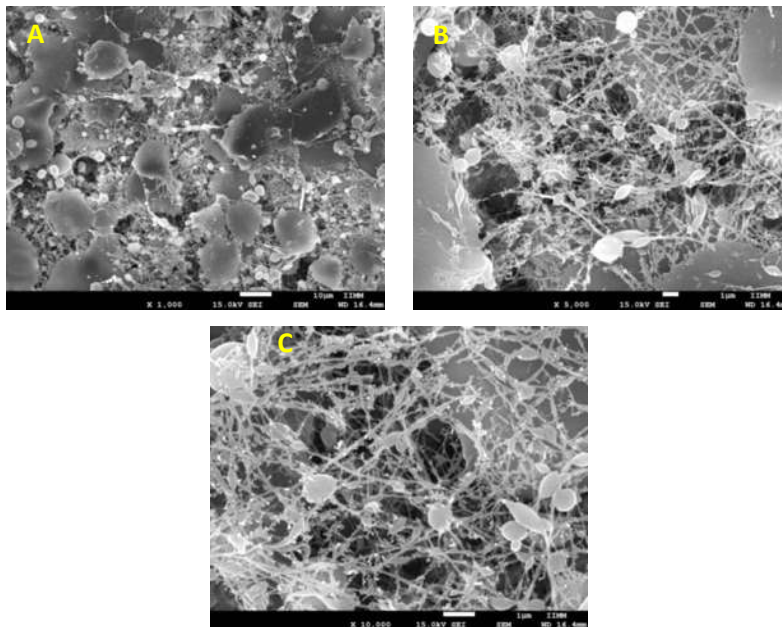
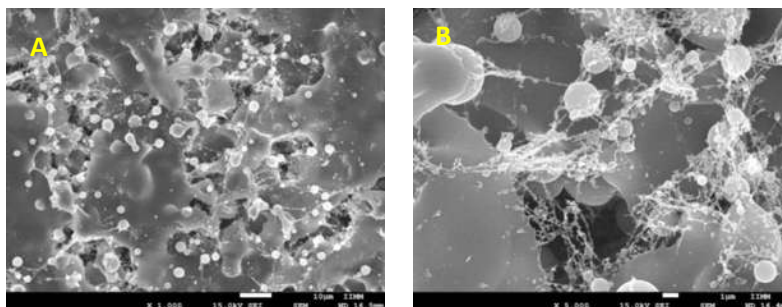


Figura 41. Material 20, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 14.5 kV, 0.7 mL/h, 12 cm aguja-colector y 40 °C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA+HA (25/50+25).

7.2.1.3 Muestra 21

Al igual que las muestras 18 y 19, la muestra 21 también se procesó a temperatura ambiente, pero en este caso se presenta evidencia de la formación de fibras en forma de estructuras ramificadas, con una gran cantidad de defectos por goteo y defectos relacionados a la dificultad de disolución los componentes de la mezcla, igualmente existe una gran cantidad de partículas pequeñas dispersas y unidas a las fibras formadas (Figura 42).



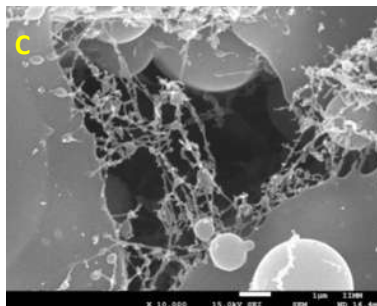


Figura 42. Material 21, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 14.5 kV, 0.8 mL/h, 12 cm aguja-colector y T.A. con aguja del #8 en colector rotatorio, de la mezcla CG/PVA+HA (25/50+25).

7.1.1.4 Muestra 22

En este caso, la muestra presenta menor cantidad de defectos por goteo pero una gran cantidad de las partículas (las grandes esferas). Se evidencia la formación de fibras (Figura 43), por lo que es necesario analizar el cambio de algún parámetro de electrohilado para aumentar la cantidad de fibras y disminuir las partículas. No obstante, la morfología y arreglo estructural tridimensional de este material, puede resultar igualmente atractivo para una posible aplicación biológica dada la presencia de micro y nanoesferas y porosidad interconectada.

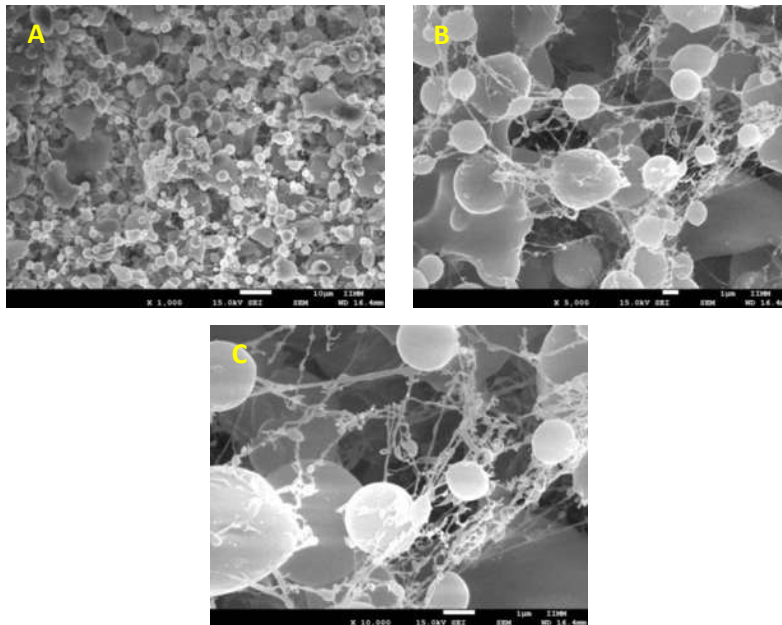


Figura 43. Material 22, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 14.5 kV, 0.6 mL/h, 12 cm aguja-colector y 40 °C con aguja del #8 en colector rotatorio, de la mezcla CG/PVA+HA (25/50+25).

7.2.1.5 Muestra 23

La muestra 23, que fue procesada bajo los mismos parámetros de electrohilado que el material 22, presenta la formación de una mayor cantidad de fibras y una notable disminución de los defectos originados por la baja solubilidad de los componentes. La cantidad de partículas pequeñas formadas alrededor de las fibras también disminuye. En la Figura 44D se presenta un acercamiento a X 40,000 aumentos, lo que permite la medición de los diámetros de las fibras, los cuales en promedio son de 132 nm para las fibras más gruesas, y de 45 nm para las más delgadas.

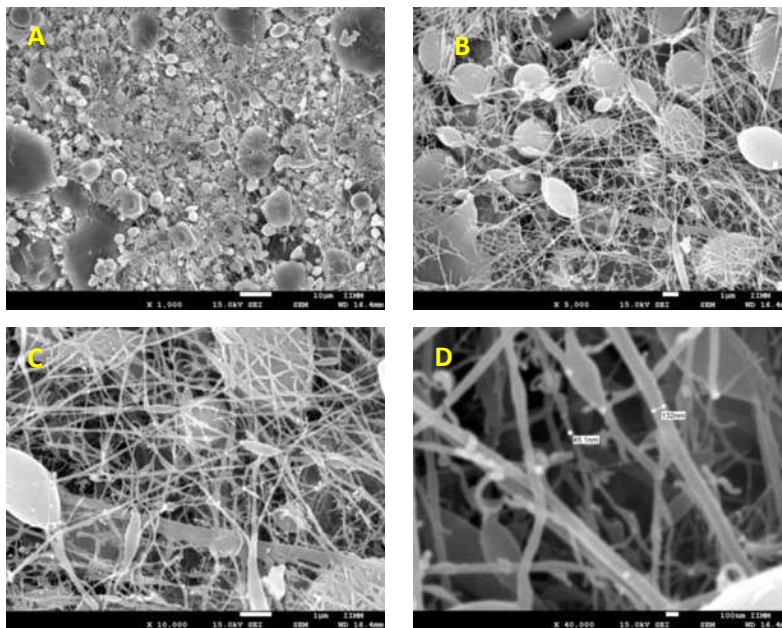
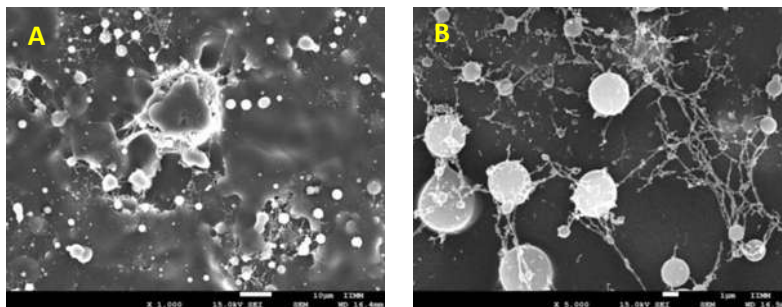


Figura 44. Material 23, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000, C) X10000 y D) X40000 de muestras obtenidas a: 14.5 kV, 0.6 mL/h, 12 cm aguja-colector y 40 °C con aguja del #8 en colector rotatorio, de la mezcla CG/PVA+HA (25/50+25), tratado con US.

7.2.1.6 Muestra 24

En la muestra 24 es posible observar que la mayor parte de la mezcla se aglomero formando una película, obteniendo solo algunas fibras, las cuales al hacer un acercamiento (Figura 45C) presentan las mismas ramificaciones observadas en los materiales 18 y 19.



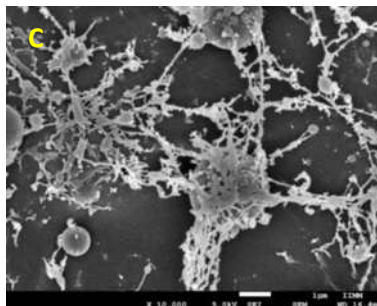


Figura 45. Material 24, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 15 kV, 0.75 mL/h, 12 cm aguja-colector y T.A. con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA+HA (25/50+25) tratado con US.

7.2.1.7 Muestra 25

Aumentando la temperatura se logra obtener una mayor cantidad de fibras (como ha sido la tendencia al trabajar con este mezcla de polímeros), con varios defectos por goteo y los y la obtención de micro y nano esferas (Figura 46).

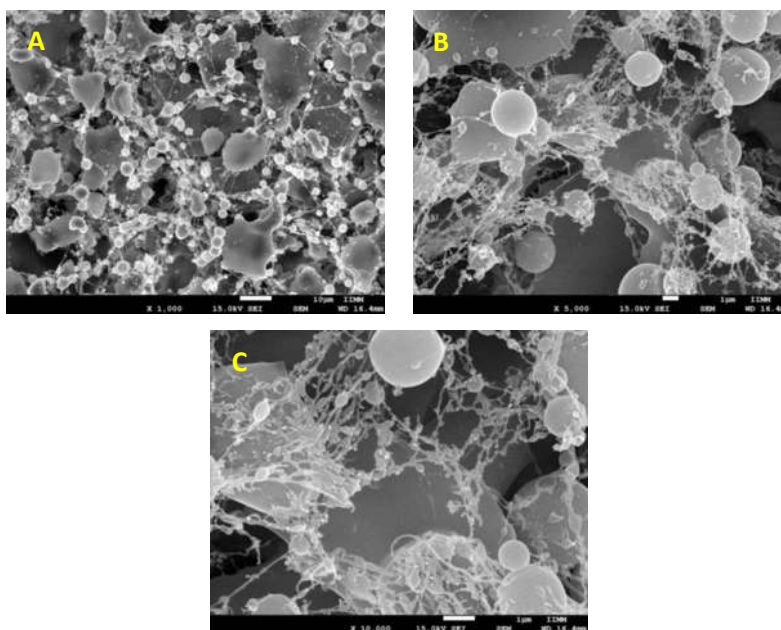


Figura 46. Material 25, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 y C) X10000 de muestras obtenidas a: 15 kV, 0.8 mL/h, 12 cm aguja-colector y 40 °C con aguja del #8 en colector fijo, de la mezcla CG/PVA+HA (25/50+25) tratado con US.

7.2.1.8 Muestra 26

Al trabajar a temperatura ambiente con el colector rotatorio se observan algunos defectos por goteo (muestra 26, Figura 47). Bajo estas condiciones, se logra la formación de una gran cantidad de fibras, de las cuales llama la atención la presencia de fibras muy

gruesas (comparadas con las de sus alrededores), que como se aprecia en la Figura 47B tienen diámetros de alrededor de 1 μm . Estas fibras gruesas pueden ser resultado de la combinación de 2 o más fibras al cruzarse los jets provenientes de las dos agujas (debido a que este material se obtuvo usando dos inyectores a la misma velocidad de flujo de inyección). Un acercamiento en la muestra permite observar en la Figura 47D diámetros promedio de las fibras más gruesas de 84.5 nm (sin tomar en cuenta las mencionadas anteriormente) y de 41.9 nm de las más delgadas.

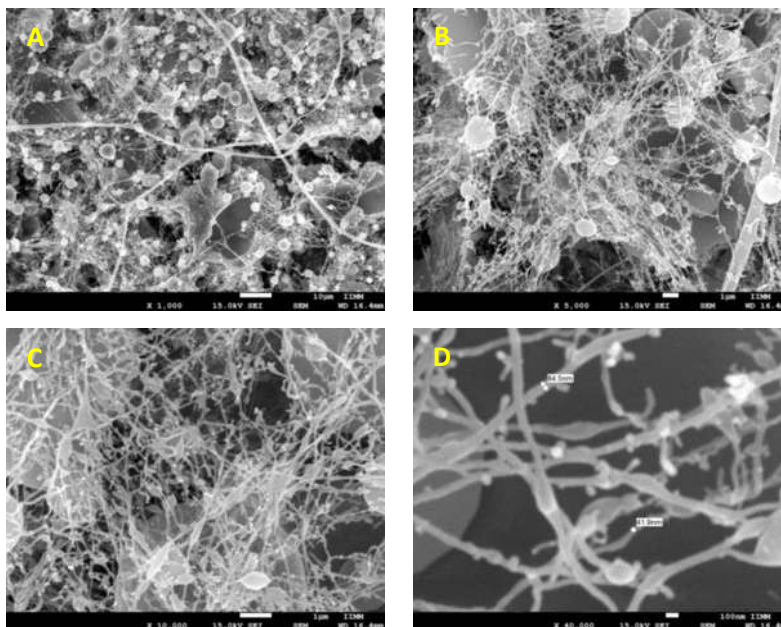


Figura 47. Material 26, imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de A) X1000, B) X5000 C) X10000 y D) X40000 de muestras obtenidas a: 14.5 kV, 0.6 mL/h, 12 cm aguja-colector y T.A. con aguja del #8 en colector rotatorio, de la mezcla CG/PVA+HA (25/50+25) tratado con ultrasonido.

7.2.2 Análisis infrarrojo

En la Figura 48 se muestra los espectros FTIR de la muestra 20 y el HA puro. La asignación de las vibraciones características del HA se describen en la Tabla 14. En general se observa que las vibraciones FTIR de los materiales provenientes de la mezcla Colágeno/PVA+HA (25/50+25) son muy parecidas entre si y no observan diferencias significativas respecto del espectro de la mezcla colágeno/PVA+SC, solamente en un ligero desplazamiento de la vibración observada en 1682 cm^{-1} , la cual en el espectro de la mezcla Colágeno/PVA+SC aparece a menor frecuencia.

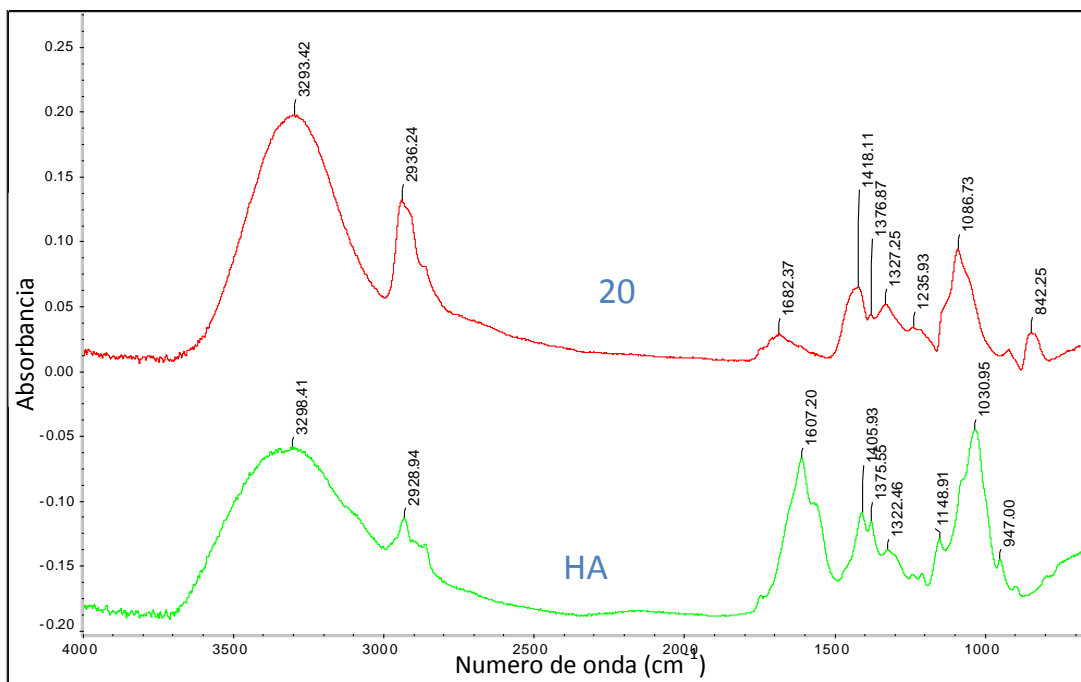


Figura 48. Espectro FTIR del ácido hialurónico.

Tabla 14. Asignación de las señales de FTIR del HA.

HA	
Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación
3298.41	Estiramiento O-H y N-H
2928.94	Estiramiento C=O de amida
1607.20	Estiramiento C=O de amida
1405.93	Tensión C-C
1375.55	Tensión C-O y C-C
1322.46	Tensión C-O y C-C
1148.91	Tensión C-N y C-C
1030.95	Tensión C-N y C-C
947.00	Tensión C-C

7.3. Análisis Térmicos

7.3.1. Análisis Termogravimétrico (TGA)

En un análisis termogravimétrico se registra de manera continua el cambio en la masa de una muestra respecto del cambio en la temperatura, bajo una atmosfera controlada. Para este caso se tomaron de 5 a 10 mg de muestra los cuales se colocaron en la balanza del equipo de DSC y TGA del Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la UMSNH (Figura 49).



Figura 49. Equipo para análisis DSC y TGA.

Los experimentos se realizaron en función de la temperatura (experimento dinámico), realizando dos rampas de calentamiento, iniciando con 3 min a temperatura ambiente para estabilizar el equipo para posteriormente calentar a una velocidad calentamiento de 20 °C/min hasta alcanzar los 120 °C, permaneciendo durante 10 min a 120 °C. Este primer calentamiento y su isoterma tienen la finalidad de eliminar y determinar el contenido de humedad en el material. A continuación, se realiza un enfriamiento hasta una temperatura entre 50 y 25 °C. Finalmente, se realiza un segundo calentamiento desde esta última temperatura hasta alcanzar los 400 °C a una velocidad de 10 °C/min (la Figura 50 resume las rampas de calentamiento y enfriamiento realizadas).

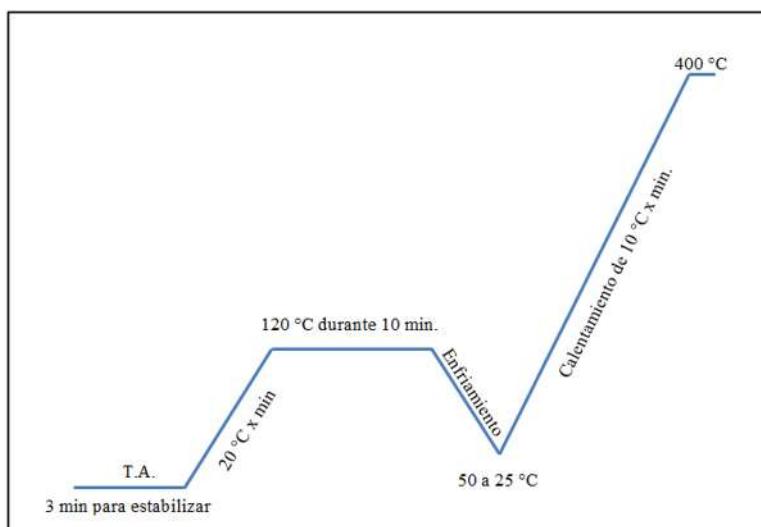


Figura 50. Rampa de calentamiento para los análisis térmicos.

Se analizaron las muestras 4 (Colágeno/PVA+SC en la proporción 25/37.5+37.5), 8 y una película obtenida a partir de la combinación Colágeno/PVA+SC en la proporción 25/50+25 (la misma de la muestra 8). Estas muestras fueron elegidas debido que son las que presentan una mejor calidad.

El termograma resultante (Figura 51) muestra tres pérdidas principales de peso en cada una de las muestras. La primera es originada por la pérdida de los diferentes tipos de agua presentes en las muestras, representando un 6.95% de pérdida de peso en el material 4, 5.55% en el material 8 y un 4.71% de pérdida en la película. Se observa que después del primer calentamiento donde se pierde el agua, en el segundo calentamiento no se registran pérdidas de peso hasta llegar a una temperatura entre 225 y 230 °C, donde inicia la descomposición térmica de los materiales, siendo muy similar para los tres casos. Esta primer fase de descomposición en el caso de polímeros suele atribuirse a la pérdida de grupos funcionales que se convierten en grupos volátiles, tal es el caso de los hidróxidos que suelen estar acompañados de un hidrogeno en forma de agua, nitrógenos en forma de amoníaco, carbonilos en forma de CO₂, etc. [23]

Alrededor de los 290 °C se presenta un aumento en la velocidad de descomposición, lo que se atribuye a la descomposición total de la estructura polimérica, en la cual se forman de hidrocarburos volátiles principalmente (es decir las estructuras poliméricas se rompen obteniéndose fragmentos pequeños y volátiles). Al alcanzar los 400 °C, las tres muestras se descomponen por completo quedando solo cenizas. Al final del proceso el material 4 perdió un 73.55% de su peso, el material 8 un 75.14 % de peso y la muestra en forma de película un 69.49%.

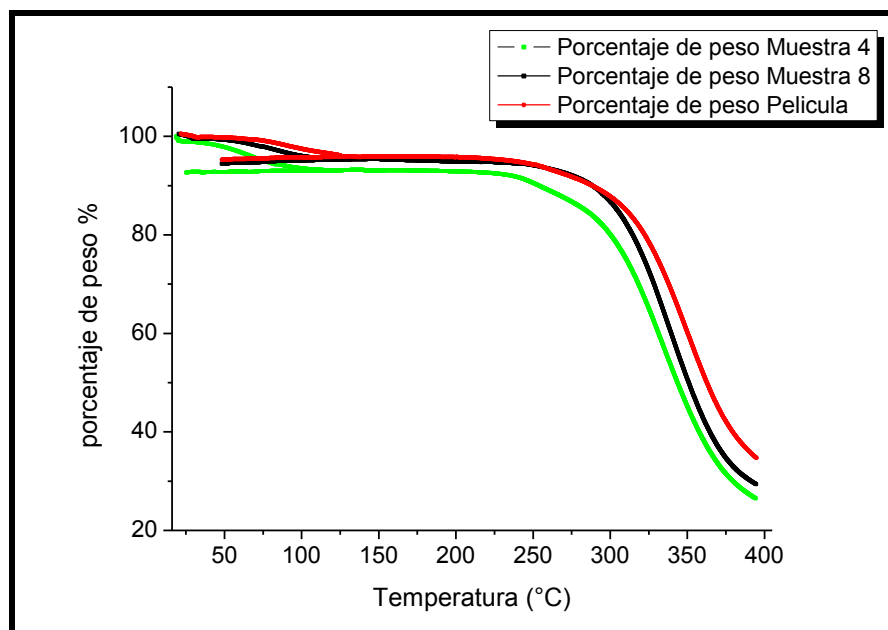


Figura 51. Termograma de las muestras de los materiales 4, 8 y de una película con la misma composición que el material 8.

Se observa que el material 4 absorbe una mayor cantidad de humedad, y que aun cuando los tres materiales se descomponen casi a la misma temperatura, la película se

descompone a una velocidad menor, lo que indica que el material en forma de películas es ligeramente más estable, comparado con su homólogo en forma de colecciones de nanofibras (muestra8).

Un análisis más detallado de la primera pérdida de peso de los tres materiales permite identificar cómo se origina la pérdida gradual de peso, al relacionarla con el tipo de humedad presente en la muestra, además de poder determinar un aproximado de la cantidad de cada tipo de humedad contenida en las muestras. En la Figura 52 es posible observar la pérdida tanto de agua libre, agua intermedia y agua ligada [24] en las tres muestras. La primer pérdida de peso está relacionada con la evaporación del agua libre la cual en estos casos se presenta entre los 20 y 33 °C, representando una pérdida entre 0.7 a 0.9%, la muestra 4 presenta una mayor velocidad de eliminación. Además se observa que la pérdida de peso es ligeramente mayor en los materiales que están en forma de nanofibras.

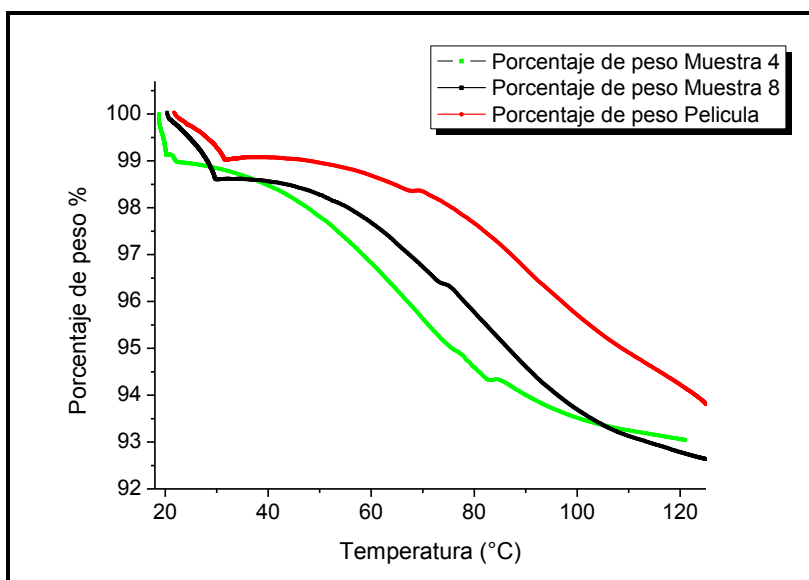


Figura 52. Primer calentamiento de los materiales en la cual se registra la pérdida de peso debida a la humedad retenida en los materiales.

La segunda pérdida de peso está relacionada a la pérdida de agua por evaporación, ya que este tipo de agua presenta interacciones más fuertes con los polímeros es de suponer que se requiere de una mayor temperatura para provocar su salida. Al observar los datos de la muestra 8 y de la película, es fácil determinar que existe una mayor cantidad de absorción de humedad en las fibras que en la película, aun cuando ambas están constituidas por la misma combinación y composición. Esto se atribuye a la mayor área superficial presente en las fibras, lo que permite que el agua pueda tener mayor interacción con los diferentes grupos funcionales presentes en la estructura de los polímeros. Por último el hecho de que la muestra 4 registre una mayor pérdida de peso debido a la humedad se puede atribuir a que existe una mayor cantidad de grupos funcionales expuestos (lo que puede significar que es más poroso), por lo que la probabilidad de encontrar agua ligada es mayor en esta muestra.

El análisis termogravimétrico del material 26 (mezcla colágeno/PVA+HA, 25/50+25 elegida por la calidad de las fibras) se muestra en la Figura 53. Al comparar la pérdida total de peso registrada en los materiales analizados anteriormente, se observa que esta muestra registra una pérdida total de peso mayor (87%), además de que su descomposición térmica se presenta por debajo de los 400 °C. La descomposición inicia a una temperatura aproximada a los 190 °C. Por otro lado, el primer calentamiento provoca una pérdida de peso alrededor de un 5%, asociada a pérdida de humedad.

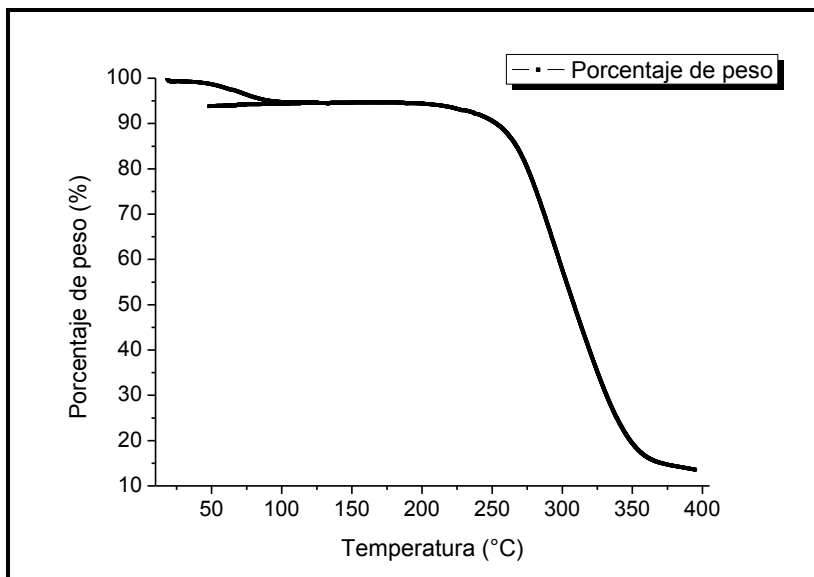


Figura 53. Termograma del material 26.

La Figura 54 muestra el termograma del primer calentamiento de este mismo material (muestra 26), se observa la pérdida de 0.7 % peso del agua libre alrededor de los 20 °C y la pérdida total de agua alrededor de 105 °C, representando un 5.3% del peso total, a su vez, un 4.6% se adjudica la evaporación de agua intermedia y ligada. Es importante denotar que el agua retenida se evapora totalmente a una temperatura un poco menor que en los materiales que contienen SC en lugar del HA.

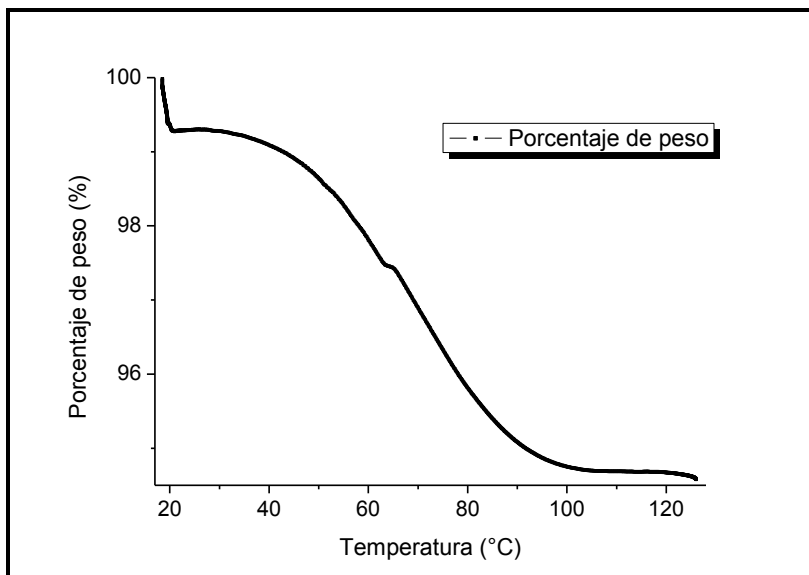


Figura 54. Termograma que indica la pérdida de humedad presente en el materia 26.

8. Conclusiones

Se ha logrado el objetivo principal de fabricar nanofibras Colágeno/PVA/SC y Colágeno/PVA+HA mediante la técnica de electrohilado.

Se observó que al aumentar el contenido de PVA, se mejoraron las cualidades micro y macroscópicas de los materiales, al facilitar el proceso de electrohilado.

La distancia aguja-colector óptima para el electrohilado de los materiales es entre 12 y 13 cm, aplicando voltajes entre 14 y 20 kV, con velocidades de flujos de inyección menores a 1 mL/h. El aumento en la temperatura es crucial ya que los mejores resultados en general se observaron a 40 °C, aunque con el uso del colector rotatorio la influencia de la temperatura es menos notoria.

Se determinó que el tratamiento de las colecciones de fibras con isopropanol no ocasiona cambios morfológicos en los materiales. El uso de ultrasonido para promover la disolución y mezcla de los componentes parece tampoco tener gran influencia en la mejora de estas características.

Se incluyó también el uso de dos agujas conectadas por un puente de cobre inyectando ambas disoluciones a una misma velocidad de flujo, con esto fue posible disminuir los tiempos de electrohilado. Se observó en este caso la presencia de fibras de alrededor de una micra de diámetro, se cree que estas escasas fibras son resultado de zonas donde se combinan los jets de ambas agujas dando como resultado la formación de fibras más gruesas, que bien podrían proporcionar una mayor resistencia a los materiales.

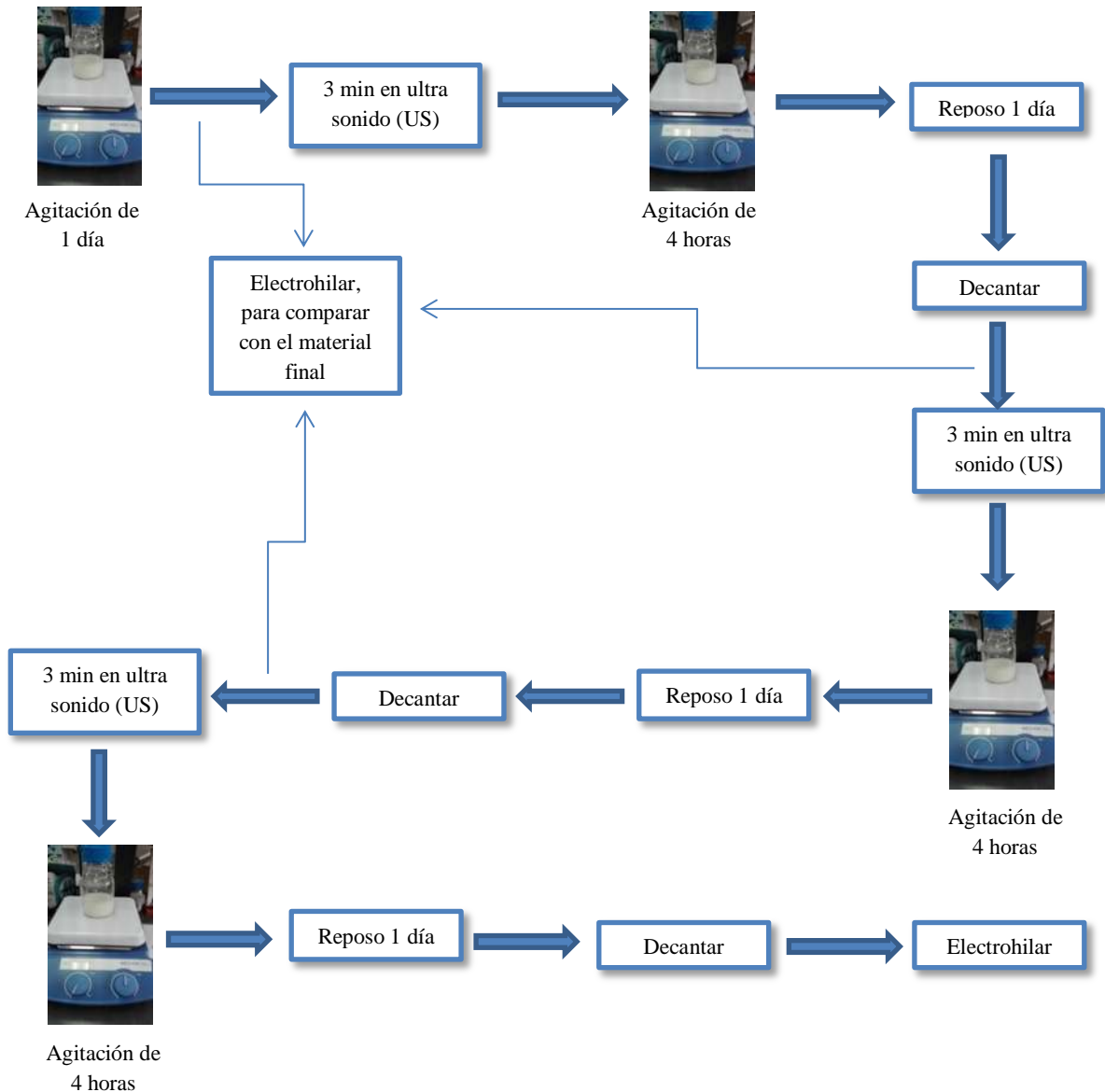
El análisis por FTIR mostró que en general los espectros de los materiales tienden a ser más parecidos al del PVA que a los de los otros polímeros, lo cual sugiere que este encapsula o rodea por completo a los otros dos polímeros y por lo tanto las señales de este son las más notorias.

Los análisis térmicos mostraron diferencias en la capacidad de retención de humedad, observando que la combinación Colágeno/PVA+SC (25/37.5+37.5) es la que retiene un mayor porcentaje de humedad. De igual manera se observó que en los materiales en forma de nanofibras la absorción de humedad es mayor, esto se atribuye a la mayor área superficial presente en las colecciones de fibras lo que proporciona un mayor número de grupos funcionales hidrofílicos expuestos para su interacción con la humedad del ambiente.

9. Perspectivas.

Existe una complicación al utilizar la mezcla Colágeno/PVA+SC o HA, y es que no se disuelve o dispersa adecuadamente, lo que implica que al permanecer en reposo, la mezcla comienza a precipitar y por lo tanto la concentración real de los componentes de la mezcla que entra al proceso de electrohilado no es la calculada inicialmente.

Es necesario proponer un protocolo para disminuir los defectos de las fibras por componentes no disueltos (o adecuadamente dispersos). Por lo que se propone el siguiente esquema de trabajo.



El esquema está pensado en cinco días de trabajo, realizando un total de cuatro procesos de electrohilado, los cuales deberán ser bajo condiciones similares para que la comparación sea más certera. De esta manera se podrá observar cómo cambia la calidad de las fibras y si

es que realmente se disminuyen los defectos. Esta serie de ciclos de electrohilado después podrán no ser necesarios ya que un primer experimento puede servir para definir hasta qué punto se puede empezar a electrohilar, es decir, después de un día, dos o tres, o inclusive si es necesario que se repita en más ocasiones. Una sugerencia extra podría ser la implementación del uso de una centrifuga para apresurar o mejorar el proceso de decantado.

Por otro lado, resulta evidente que la disolución de colágeno en 1,1,1,3,3,3-hexafluorisopropanol al 3.2% p/v, por sí misma presenta problemas por el hecho de que el colágeno se precipita, por lo que podría probarse con concentraciones menores en las que la disolución no se encuentre tan saturada. De tal manera que se desperdicie la menor cantidad de colágeno y que la mezcla final igualmente presente la menor cantidad de precipitado posible. Todo esto puede ayudar a la obtención de materiales en forma de nanofibras de mejor calidad que las ya obtenidas hasta ahora.

10. Referencias

1. Nyaga A., Loizidou M., Emberton M., Cheema U.; “A novel tissue engineered three-dimensional in vitro colorectal cancer model”; *Acta Biomaterialia*, **2013**, 9 7917-7926.
2. Masino M.; “Equipo de Electrospinning”; (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán Argentina **2012**.
3. Ramakrishna, S., Fujihara K., Teo W., Lim, T., Ma Z.; “An Introduction to Electrospinning and Nanofibers”; *World Scientific Printers*, Singapore.**2005**.
4. Duque S.,Rodriguez L.,López L.; “Electrospinning: la era de las nanofibras”; *Revista iberoamericana de polímeros*, **2013**, 14, 10-27.
5. https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/20087/PFC_Electrohilado%20de%20fibras%20coaxiales%20constituidas%20por%20polibutilenosuccinato%20y%20polietilenglicol%20Funcionalizaci%C3%B3n%20mediante%20carga%20de%20drogas.pdf?sequence=1&isAllowed=y
6. Da J., Seung M., Hae Y., Hye., M.; “Bioactive fish collagen/polycaprolactone composite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for 3D cell culture”; *Journal of Biotechnology*, **2015**, 205, 47-58.
7. Nelson D., Cox M.; “Lehninger, Principios de Bioquímica”; *Ediciones Omega*, quinta edición, **2009**, pp 124-128.
8. Parentau R., Gauvin R., Berthod F.; “Collagen- Based Biomaterials for Tissue Engineering Application”; *Materials*, **2010**, 3, 1863-1887
9. Boland E., Matthews J., Pawlowski K., Simpson D., Wnek G., Bowlin G.; “Electrospinning Collagen and Elastin: Preliminary Vascular Tissue Engineering”; *Frontiers in Bioscience*, **2004**, 9, 1422-1432.
10. Matthews J., Wnek G., Simpson D., Bowlin G.; “Electrospinning of Collagen Nanofibers”; *Biomacromolecules*, **2002**, 3,232-238.
11. Teng S., Lee E., Wang P., Kim H.; “Collagen/hydroxyapatite composite Nanofibers by Electrospinning”; *Materials Letters*, **2008**, 62, 3055-3058.
12. Garrod M., Chau D.; “An Overview of Tissue Engineering as an Alternative for Toxicity Assesmente”; *J Pharm Pharm Sci*, **2016**, 19, 31-71.
13. Douglas T., Heinemann S., Mietrach C., Hempel U., Bierbaum S., Scharnweber D., Worch H.; “Interactions of Collagen Types I and II with Chondroitin Sulfates A-C and Their Effect on Osteoblast Adhesion”; *Biomacromolecules*, **2007**, 8, 1085-1092.
14. Melo V., Cuamatzi O.; “Bioquímica de los procesos metabólicos”; *Editorial Reverte*, segunda edición, **2007**, pp 70.
15. Peresin M., Habibi Y., Zoppe J., Pawlak J., Rojas O.; “Nanofiber composites of polyvinyl alcohol and cellulose nanocrystals: manufacture and characterization”; *Biomacromolecules*, **2010**,11, 674-681.
16. Yoon K., Hsiao B., Chu B.; “High flux ultrafiltration membranes based on polyacrylonitrile electrospun scaffolds and crosslinked polyvinyl alcohol coating”; *Journal of Membrane Science*, **2009**, 338, 145-152
17. Shu T., Eun L., Peng W., Hyoun K.; “Collagen/hydroxyapatite composite nanofibers by electrospinning”; *Material Letters*, **2008**, 62, 3055-3058.
18. Andrew K., Ekaputra Glenn P., Simon M., Dietmar W.; “The three-dimensional vascularization of growth factor- releasing hybrid scaffold of poly (ϵ -

caprolactone)/collagen fibers and hyaluronic acid hydrogel”; *Biomaterials*, **2011**, 32, 8108-8117

19. Fischer R., McCoy M., Grant S.; “Electrospinning collagen and hyaluronic acid nanofiber meshes”; *J Mater Sci Mater Med*, **2012**, 23, 1645–1654

20. Ji Y., Ghosh K., Shu X., Li B., Sokolov J., Prestwich G., Clark R., Rafailovich M.; “Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds”; *Biomaterials*, **2006**, 27, 3782-3792.

21. Dippold D., Cai A., Hardt M., Boccaccini A., Horch R., Beier J., Shubert D.; “Novel approach towards aligned PCL-Collagen nanofibrous constructs from a benign solvent system”; *Materials Science & Engineering C*, Accepted November **2016**, 72, 278-283.

22. Darrel H. Reneker, Alexander L. Yarin. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer* **2008**, 49, 2387-2425.

23. http://ocw.uc3m.es/ciencia-e-oin/caracterizacion-de-materiales/material-de-clase-1/Apuntes_MeTODOS_DE_ANALISIS_TERMICO.pdf

24. Liu W., Yao K.; “What cause the unfrozen water in polymers: hydrogen bonds between water a polymer chains?” *Polymer* **2001**, 42, 3943-3947.