

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y
MATERIALES

**“Preparación y Caracterización de Fibras Electrohiladas
de Poli (Ácido Láctico) / Colágeno con Aplicación Potencial en
Ingeniería de Tejidos”**

TUDO · LO · ILLUMINAN

Como requisito para obtener el título de

Maestra en Ciencia de Materiales

Presenta:

Q.B.C Claudia Georgina Ramírez Mendoza

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director de la Tesis.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dra. Teresa del Castillo Castro


Jefe del Departamento

VOTOS APROBATORIOS

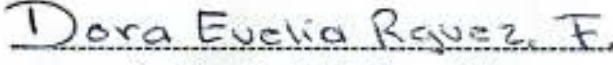
Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría de Claudia Georgina Ramírez Mendoza han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencia de Materiales otorgado por la Universidad de Sonora.




Dra. María Mónica Castillo Ortega
(Presidente)




Dra. Lorena Armenta Villegas
(Secretario)



Dra. Dora Evelia Rodríguez Félix
(Sinodal)



Dra. Hisila del Carmen Santacruz
(Sinodal)



Dra. Celia Olivia García Sifuentes
(Sinodal Externo)

AGRADECIMIENTOS

Principalmente quiero agradecer a mi familia por apoyarme en esta etapa de mi vida.

A una persona muy importante para mí, Uriel, por siempre animarme, darme consejos y escucharme.

A la Dra. Lorena Armenta por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por todo su apoyo durante estos años y por siempre tomarse el tiempo para resolver dudas.

A la Dra. Celia García por recibirme en su laboratorio, por su disponibilidad para atenderme y por sus consejos. Gracias también a sus alumnos Julio y Diana que siempre me apoyaron y aclararon mis dudas.

A la Dra. Mónica Castillo, la Dra. Dora Rodríguez y Dra. Hisila Santacruz, por todos sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio de Química de Polímeros, Cristian, Ramón, Ana Daymi, Yaniris, Abraham y Lupita, por sus observaciones, consejos y principalmente por su amistad.

A mi compañera del DIPM Rocío por siempre escucharme, animarme y por ser mi amiga.

A la Universidad de Sonora, por ser mi segunda casa y por ayudar a mi formación profesional.

Al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, por aceptarme en el programa de posgrado.

Al Dr. Rafael Ramírez Bon, por recibirme en su laboratorio durante mi estancia.

A CINVESTAV unidad Querétaro por las facilidades otorgadas en el uso de la infraestructura de LIDTRA a través de los proyectos LN-295261 y LN-254119., así como la asistencia técnica de Adair Jiménez Nieto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por la beca que me fue otorgada.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT	X
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	3
1.1 Objetivo General	3
1.2 Objetivos Específicos	3
CAPÍTULO 2	4
ANTECEDENTES	4
2.1 Ingeniería de Tejidos	4
2.2 Infarto de Miocardio	5
2.3 Estrategia para la Reparación del Infarto de Miocardio	6
2.4 Andamios	7
2.5 Biomateriales.....	8
2.6 Polímeros Sintéticos	9
2.6.1 Poli (ácido láctico) (PLA).....	9
2.7 Polímeros Naturales.....	10
2.7.1 Colágeno Tipo I	10
2.7.1.1 Aplicación del Colágeno en Ingeniería de Tejidos	12
2.7.1.2 Análisis Proximal de Alimentos	13
2.8 Técnicas de Fabricación de Andamios	14
2.8.1 Electrohilado	14
2.9 Modificación Superficial de Fibras Electrohiladas	18
2.9.1 Modificación de Superficie con Dopamina	19
2.10 Técnicas de Caracterización de Fibras Electrohiladas.....	21
2.10.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	21
2.10.2 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)	22
2.10.3 Análisis Térmico	24
2.10.4 Ángulo de Contacto.....	26

CAPÍTULO 3	28
EXPERIMENTAL.....	28
3.1 Materiales.....	28
3.2 Métodos.....	29
3.2.1 Preparación de Fibras Electrohiladas de Poli Ácido Láctico (PLA).....	29
3.2.2 Alineación de Fibras Electrohiladas de PLA.....	31
3.3 Extracción de Colágeno Soluble en Pepsina (CSP) a partir de Piel de Tilapia.....	31
3.3.1 Pre-tratamiento a las Piel de Tilapia	31
3.3.2 Extracción y Purificación de Colágeno Soluble en Pepsina (CSP)	33
3.3.3 Análisis Proximal	34
3.4 Preparación de Fibras Electrohiladas de Colágeno	34
3.5 Modificación de la Superficie con Dopamina.....	34
3.6 Preparación de Fibras Híbridas de PLA/Colágeno y PLA + dopamina/Colágeno	35
3.7 Técnicas de Caracterización.....	35
3.7.1 Microscopía Electrónica de Barrido.....	35
3.7.2 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier	36
3.7.3 Análisis Termogravimétrico	36
3.7.4 Ángulo de Contacto.....	37
CAPÍTULO 4	38
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	38
4.1 Condiciones Óptimas para la Preparación de Fibras Electrohiladas de PLA	38
4.2 Extracción de Colágeno Soluble en Pepsina (CSP)	41
4.2.1 Análisis Proximal.....	42
4.3 Condiciones Óptimas para la Preparación de Fibras de Electrohiladas de Colágeno	43
4.4 Modificación de la Superficie con Dopamina.....	44
4.5 Caracterización de Materiales	45
4.5.1 Morfología de Fibras de PLA, Colágeno, PLA/Colágeno y PLA + dopamina/Colágeno.....	45
4.5.2 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier.....	48
4.5.3 Análisis Termogravimétrico	49
4.5.4 Angulo de Contacto.....	52
CAPÍTULO 5	55
CONCLUSIONES.....	55

RECOMENDACIONES	56
REFERENCIAS	57
ANEXOS.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representación de tejido necrótico por infarto de miocardio. [4]	6
Figura 2.	Estructura del poli (ácido láctico)	10
Figura 3.	Representación de la triple hélice de colágeno y los residuos de aminoácidos. [22]	12
Figura 4.	Representación del proceso de electrohilado. [38]	15
Figura 5.	Representación de un cilindro giratorio como colector para proceso de electrohilado. [19]	18
Figura 6.	Polimerización de la dopamina. [42]	19
Figura 7.	Proceso de formación de la polidopamina. [41]	20
Figura 8.	Diagrama del microscopio electrónico de barrido. [43]	22
Figura 9.	Micrografías de PLA con diferentes soluciones y flujos a 5000X: 1) solución A, DMF/DCM (10:90), 2) solución B, DMF/DCM (40:60), 3) solución C, acetona, a flujos de a) 0.8 mL/h, b) 1.2 mL/h, c) 1.6 mL/h	39
Figura 10.	Colágeno antes de liofilizar	42
Figura 11.	Fibra de PLA recubierta por polidopamina	45
Figura 12.	Micrografías de fibras electrohiladas a 5000X: a) PLA, b) colágeno, c) PLA/colágeno y d) PLA+dopamina/colágeno	46
Figura 13.	Histogramas de distribución de diámetro, a) PLA, b) colágeno, c) PLA/colágeno y d) PLA+dopamina/colágeno	47
Figura 14.	Espectro FTIR para fibras electrohiladas de a) PLA, b) PLA/colágeno, c) PLA+dopamina/colágeno y d) colágeno	49
Figura 15.	TGA de andamios electrohilados de PLA, colágeno, PLA/colágeno y PLA+dopamina/colágeno	51
Figura 16.	DTG para andamios electrohilados de PLA, colágeno, PLA/colágeno y PLA+dopamina/colágeno	52
Figura 17.	Ángulo de contacto para PLA, a) agua desionizada y b) etilenglicol	53
Figura 18.	Ángulo de contacto para, a) PLA/colágeno y b) PLA+dopamina/colágeno	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Polímeros sintéticos y naturales utilizados para la fabricación de andamios	8
Tabla 2.	Efecto de los parámetros del proceso de electrohilado [39]	17
Tabla 3.	Regiones del espectro infrarrojo [44]	24
Tabla 4.	Parámetros utilizados para la preparación de fibras electrohiladas de PLA	31
Tabla 5.	Diámetros promedio de fibras de PLA	39
Tabla 6.	Condiciones óptimas para la preparación de fibras de PLA	41
Tabla 7.	Análisis proximal de CSP	43
Tabla 8.	Condiciones óptimas para la preparación de fibras de colágeno	44

RESUMEN

En los últimos años las enfermedades cardiovasculares son las responsables de una gran parte de muertes en el mundo. El corazón es uno de los órganos que presenta una gran insuficiencia para regenerarse, debido a que las células musculares cardíacas se encuentran amenazadas por varios factores, como lo es la necrosis. La ingeniería de tejidos es una de las alternativas para tratar los daños al corazón mediante el uso de andamios con estructuras en tercera dimensión, lo que proporciona un ambiente biomimético muy similar a la matriz extracelular (MEC). En este trabajo se muestra la preparación de andamios para la ingeniería de tejidos, por medio de la técnica de electrohilado. Se fabricaron andamios de poli (ácido láctico) (PLA), colágeno y andamios híbridos de PLA/colágeno, para la matriz híbrida se realizó una activación de la superficie en los andamios de PLA con polidopamina para exponer grupos funcionales y crear enlaces químicos con colágeno. Posteriormente fueron caracterizados mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA) y ángulo de contacto. Se encontraron las condiciones óptimas para la fabricación de los andamios, los espectros de FTIR comprueban la presencia de colágeno en los andamios híbridos, los termogramas TGA y DTG demuestran que el tratamiento con dopamina favorece a la estabilidad térmica del andamio y el ángulo de contacto de la superficie de los andamios híbridos indica que son hidrofílicos, lo que favorece la adhesión y proliferación celular, lo que puede ser prometedor para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

ABSTRACT

In recent years, cardiovascular diseases are responsible for a large part of deaths in the world. The heart is one of the organs that has a great insufficiency to regenerate, because the cardiac muscle cells are threatened by various factors, such as necrosis. Tissue engineering is one of the alternatives to treat heart damage through the use of scaffolds with third-dimensional structures, which provides a biomimetic environment very similar to the extracellular matrix (MEC). This work shows the preparation of scaffolds for tissue engineering, using the electrospinning technique. Poly (lactic acid) (PLA), collagen and hybrid PLA/collagen scaffolds were manufactured, for the hybrid matrix surface activation was performed on the PLA scaffolds with polydopamine to expose functional groups and create chemical bonds with collagen. Subsequently, they were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA) and contact angle. Optimum conditions for scaffold fabrication were found, FTIR spectra check for collagen presence in hybrid scaffolds, TGA and DTG thermograms demonstrate that dopamine treatment favors scaffold thermal stability and contact angle of contact the surface of hybrid scaffolds indicates that they are hydrophilic, which favors cell adhesion and proliferation, which may be promising for tissue engineering applications.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las enfermedades cardiovasculares son las responsables de una gran parte de muertes en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) dio a conocer que 17.5 millones de muertes al año son a causa de enfermedades cardiovasculares, donde sobresale como causa principal o más común el infarto agudo al miocardio. [1,2]

El corazón de un mamífero adulto es uno de los órganos que presenta una gran insuficiencia para regenerarse, esto es debido a que las células musculares cardíacas llamadas cardiomiocitos se encuentran amenazadas por varios factores, como lo es la necrosis, la cual puede provocar insuficiencia cardíaca, por lo que surge el tema de la ingeniería de tejidos para tratar los daños al corazón. Durante los pasados 20 años se han buscado alternativas para tratar la regeneración cardíaca, entre ellas se encuentra la cardiomioplastia, la cual se basa en la administración aislada de células que tienen capacidad regenerativa. Sin embargo, los ensayos clínicos han demostrado que tienen una muy baja proliferación y diferenciación celular. Para mejorar las limitaciones anteriormente mencionadas, se han propuesto nuevos métodos entre ellos se encuentra el uso de andamios con estructuras en tercera dimensión, los cuales proporcionan un entorno biomimético similar a la matriz extracelular (MEC). [3–5]

Para la fabricación de andamios 3D nanoporosos existen varias técnicas entre ellas separación de fases, autoensamblaje y soplado por fusión. Sin embargo, la técnica de electrohilado es más atractiva y de interés creciente ya que proporciona una distribución de tamaño de poro ajustable y gran área de superficie, lo que permite mejorar la funcionalidad celular. Los materiales utilizados para su producción son muy importantes, entre ellos se encuentran los polímeros, los cuáles pueden ser naturales o sintéticos. [6,7] Los polímeros sintéticos más comunes para la aplicación de ingeniería de tejidos son la familia de los poliésteres. Un ejemplo es el poli (ácido láctico) (PLA) el cual tiene la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. Este polímero también es muy utilizado en material de sutura y en sistemas de administración controlada de

fármacos debido a sus propiedades biodegradables y biocompatibles. [8] Entre los polímeros naturales más utilizados se encuentra el colágeno, ya que es la proteína fibrosa más abundante de la MEC de muchos tejidos, juega un papel clave en la integridad biológica y estructural de esta matriz. Gracias a la naturaleza química del colágeno las propiedades de los andamios pueden mejorar, aumentando la biocompatibilidad, crecimiento y adhesión celular. [8,9]

Electrohilado de polímeros naturales ofrece muchas ventajas, pero está limitado por la variabilidad de lote a lote y por las propiedades mecánicas deficientes, en cambio los polímeros sintéticos brindan buenas propiedades mecánicas pero su superficie química no es ideal para la adhesión celular. [10]

En particular se prepararon andamios utilizando materiales híbridos, es decir, sintéticos y naturales, con el fin de aportar sinergia entre los materiales y así mejorar las propiedades de dicho andamio para tener aplicación en ingeniería de tejidos.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Preparar y caracterizar fibras a base de poli (ácido láctico) / colágeno con posible aplicación en ingeniería de tejidos.

1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Preparar fibras electrohiladas de PLA eligiendo las condiciones óptimas.
- ✓ Caracterizar por microscopía electrónica de barrido, espectroscopia infrarroja, análisis termogravimétrico y ángulo de contacto las fibras electrohiladas de PLA.
- ✓ Extraer colágeno a partir de la piel de tilapia y utilizarlo en la preparación de fibras electrohiladas.
- ✓ Preparar fibras electrohiladas de PLA recubiertas con colágeno.
- ✓ Caracterizar fibras electrohiladas de PLA recubiertas con colágeno por microscopía electrónica de barrido, espectroscopia infrarroja, análisis termogravimétrico y ángulo de contacto.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Ingeniería de Tejidos

La alta incidencia de daño tisular y falla orgánica ha provocado que la demanda de trasplante de órganos aumente año tras año. Los tratamientos que existen en la actualidad para el infarto agudo de miocardio y la insuficiencia cardíaca incluyen un soporte mecánico mediante dispositivos de asistencia ventricular y el trasplante, los cuales presentan graves problemas, como ejemplo, la falta de donantes de órganos y el rechazo inmunológico que existe. En los últimos años ha surgido como propuesta la terapia celular como un nuevo enfoque de regenerar el tejido del miocardio lesionado. Las estrategias de este enfoque incluyen cardiomioplastia celular y técnicas de ingeniería de tejidos. [11]

La cardiomioplastia se centra en restaurar el miocardio dañado mediante la implantación de células sanas, los aspectos clave son la elección de la línea celular y la vía de administración. La mayor parte de los estudios demuestran que este tratamiento puede mejorar la función contráctil, sin embargo, la eficacia del injerto celular no es muy buena. [4,11]

La ingeniería de tejidos es un método que ha llamado mucho la atención para la regeneración del tejido evitando los inconvenientes con el trasplante de tejido autólogo y alogénico. Es un área multidisciplinaria que requiere conocimientos de biología celular, química, ciencia de los materiales y nanotecnología, la perspectiva final es la creación de injertos para reparar o reemplazar las funciones de tejidos y órganos. [7,10,12]

La ingeniería de tejidos se puede clasificar como ingeniería de tejido cardíaco basado en injerto. La alternativa que ofrece consiste en la siembra de células seleccionadas (por ejemplo, células cardíacas progenitoras) en un soporte estructural en tercera dimensión, el cual es mejor conocido como andamio. El andamio proporciona un ambiente biomimético muy semejante al entorno fisiológico, por lo tanto, favorece la adhesión y proliferación celular. [5]

Existen varios elementos críticos para que un andamio sea exitoso, esto incluye el biomaterial que se utilizará y servirá como soporte mecánico y biológico para las células, debe tener buenas propiedades mecánicas, células progenitoras que deben diferenciarse en células cardíacas y factores de crecimiento inductivos que instruyen las actividades celulares. [13]

Los objetivos que promete la ingeniería de tejidos son crear, reparar o reemplazar tejidos u órganos y modificar las terapias que existen en la actualidad para tratar el daño irreversible del miocardio, la insuficiencia cardíaca y con esto mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes. La necesidad de mejorar los tratamientos para la regeneración cardíaca ha motivado la investigación en esta área y se ha convertido en una preferencia potencial sobre el trasplante de órganos. [14]

2.2 Infarto de Miocardio

Al ir avanzando la enfermedad cardiovascular, es muy probable que cause infarto de miocardio que está relacionada con la disfunción de las células endoteliales (CE) de los vasos sanguíneos. La capa interna de los vasos sanguíneos está compuesta por una capa delgada de CE que ofrecen una superficie lisa y protectora evitando que sustancias tóxicas y transportadas por la sangre penetren las células musculares. La acumulación de tóxicos y de lípidos en estas células junto con cascadas oxidativas e inflamatorias conduce al desarrollo de depósitos de placa que crecen lentamente y estrechan localmente el vaso sanguíneo, este proceso es mejor conocido como aterosclerosis. Al pasar el tiempo las placas se van calcificando y se vuelven bastante susceptibles a romperse. En el momento que se rompe una placa en la arteria se da la formación de un coágulo de sangre alrededor de esa placa y puede bloquear el flujo sanguíneo. Si esto ocurre en una arteria coronaria del corazón, el flujo sanguíneo que es el encargado de suministrar oxígeno al músculo cardíaco se reduce (o se corta) de una manera muy severa, de modo que el músculo cardíaco se queda sin oxígeno y sin nutrientes, a este proceso o hecho se le conoce como isquemia. Debido a que la pared del corazón está compuesta por miocitos y fibroblastos con alta demanda metabólica, el miocardio necesita de grandes cantidades de oxígeno y no tolera la isquemia. Entonces al producirse un infarto, el miocardio reacciona a la isquemia con una serie de cambios en la

MEC. La falta de oxígeno que tiene el miocardio provoca necrosis de los cardiomiocitos y una respuesta inflamatoria posterior. Una vez que el tejido se encuentra en estado de necrosis es muy complicado que se regenere. En la Figura 1 se puede observar una representación del tejido necrótico al sufrir un infarto al miocardio. [13]

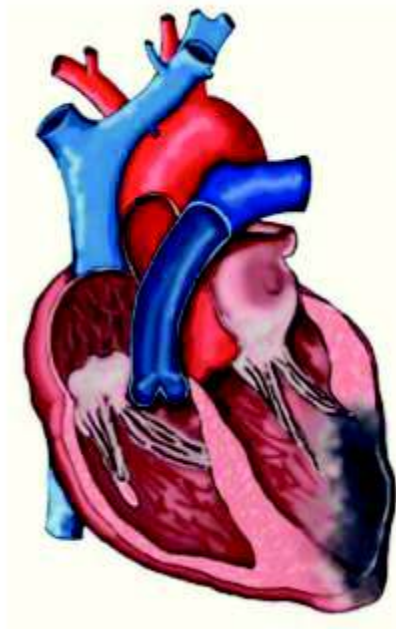


Figura 1. Representación de tejido necrótico por infarto de miocardio. [4]

2.3 Estrategia para la Reparación del Infarto de Miocardio

Para la reparación del tejido cardíaco existen varias estrategias entre las que se encuentran: el trasplante directo de células, la ingeniería de tejidos basado en andamios y terapias que induce al corazón a regenerar tejidos dañados. La primera estrategia se basa en la repoblación del miocardio que se encuentra dañado, por el trasplante de células que están en un estado sano. Las células más utilizadas son los cardiomiocitos fetales, los mioblastos esqueléticos y las células madre de médula ósea. [13]

2.4 Andamios

En la gran mayoría de los tejidos nativos, las células se encuentran dentro de un tejido específico. Este tejido es una MEC tridimensional, que abarca una red compleja de fibras de una escala nanométrica, que forma microambientes locales altamente estructurados. [14]

La MEC es esencial para la homeostasis de los tejidos, como se mencionó anteriormente esta MEC forma un microambiente especializado y distinto, con las biomacromoléculas (por ejemplo, colágenos, lamininas, fibronectina, elastina, entre otros) que comprenden este material y materiales asociados (por ejemplo, citocinas y factores de crecimiento) dictando la forma, la función del tejido, la naturaleza y el comportamiento de las células asociadas. [15]

La comunicación celular, el transporte de oxígeno y nutrientes, la eliminación de los desechos y el metabolismo celular, requieren un ambiente donde las células tengan una buena orientación. Por lo que es necesario organizar las células en un conjunto o base ordenada y así lograr que cumplan la función del tejido deseado. Para lograr esto la mayoría de los tejidos y órganos necesitan un soporte conocido como andamio para su formación a partir de células. El andamio proporciona un ambiente muy similar a la MEC, incluso se cree que entre más parecido sea el andamio a esta, puede ofrecer un ambiente más adecuado para la adherencia, migración, proliferación y diferenciación celular. Los andamios se pueden lograr a través de esponjas porosas, hidrogeles, fibras y micropartículas, se forman a través de un material o mediante la combinación de varios materiales diferentes para fabricar una composición híbrida para mejorar sus propiedades. Los nanomateriales han surgido como candidatos muy prometedores para la producción de andamios que se asemejan a la MEC, estos nanomateriales están definidos por al menos, una dimensión inferior a los 100 nm. Los andamios producidos por la técnica de electrohilado son muy estudiados en los últimos años y se han realizado una gran variedad de estudios con respecto a la viabilidad y funcionalidad de estos. Entre los materiales más utilizados para su obtención se encuentran polímeros sintéticos como el poli (ácido láctico) (PLA), poli (D-L-láctico-co-glicólico) (PLGA), poli (vinil alcohol) (PVA) y poli (ε-caprolactona) (PCL) y polímeros naturales como colágeno, gelatina, quitosano y alginato (Tabla 1). Al momento de pensar en una aplicación biomédica

es muy importante tener en mente que el material a utilizar debe de tener características de biodegradabilidad y biocompatibilidad, además de presentar baja toxicidad. [14,16,17]

Tabla 1. Polímeros sintéticos y naturales utilizados para la fabricación de andamios.

Polímeros Sintéticos	Referencias
Poli (ácido láctico) (PLA)	[18]
Poli (D-L-láctico-co-glicólico) (PLGA)	[19]
Poli (vinil alcohol) (PVA)	[20]
Poli (ε-caprolactona) (PCL)	[21]
Polímeros Naturales	
Colágeno	[22]
Gelatina	[23]
Quitosano	[24]
Alginato	[17]

En la actualidad los investigadores se están inclinando por fabricar andamios de materiales híbridos, un ejemplo de esto es la utilización de polímeros tanto sintéticos como naturales. En lo que respecta al uso de polímeros naturales aportan propiedades mecánicas mínimas, pero tienden a formar un ambiente adecuado para las células, ayudando con su adhesión, crecimiento y diferenciación. Los polímeros sintéticos aportan mejoras al andamio sobre las propiedades mecánicas y también en sus propiedades térmicas. [18]

2.5 Biomateriales

El biomaterial juega un papel fundamental para la ingeniería de tejidos, para su uso en aplicaciones regenerativas debe de contar con ciertas características, por ejemplo, biocompatibilidad, es decir, química y mecánicamente estable en el entorno del huésped, no trombogénico y fácilmente esterilizable; porosidad para permitir la infiltración celular, el transporte de nutrientes y la eliminación de desechos; mecánicamente ajustable con el fin de

mantener propiedades mecánicas intrínsecas del tejido a través del proceso de curación; biodegradabilidad para permitir que el tejido se desarrolle conforme el material se degrade. Es de mucha importancia tener en cuenta que los productos de degradación del material deben de ser no tóxicos, además los materiales deben ser reproducibles, fáciles de preparar y ser compatibles con células y tejidos. El objetivo de un biomaterial es apoyar el proceso de regeneración del tejido en el sitio del defecto, eventualmente degradarse y ser reemplazado con el tejido recién generado. [25,26] El biomaterial óptimo sería la MEC nativa del tejido de interés, por lo que, en años recientes, la tendencia es diseñar materiales bioactivos, que puedan tener la fuerza mecánica suficiente y especificidad biológica para reconocer los componentes principales de la MEC. Los biomateriales que se asemejan a los biológicos son denominados biomiméticos y su función es promover las interacciones célula-matriz, provocar respuestas celulares específicas y de reconocimiento biomolecular. [14,27]

2.6 Polímeros Sintéticos

2.6.1 Poli (ácido láctico) (PLA)

Uno de los polímeros más importantes es el PLA (Figura 2), es un poliéster alifático, bioabsorbible y biocompatible, utilizado ampliamente en aplicaciones biomédicas, incluyendo la ingeniería de tejidos. Su producción es a partir de los recursos renovables de la agricultura (por ejemplo, el maíz) mediante procesos combinados de fermentación y polimerización, por lo anterior su producción requiere menos recursos fósiles en comparación con los polímeros a base de petróleo.

Hay dos rutas principales para la síntesis del PLA:

1. Policondensación directa de ácido láctico (crecimiento por etapas).

Los desafíos incluyen la eliminación de agua como un producto secundario, esta ruta de polimerización conduce a productos de bajo peso molecular.

2. Polimerización de apertura de anillo de monómeros de lactida (ROP).

Este tipo de polimerización no requiere la eliminación de agua y produce PLA de alto peso molecular.

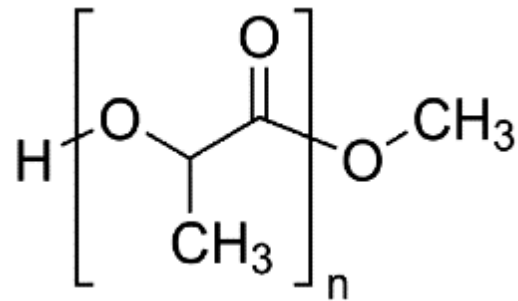


Figura 2. Estructura del poli (ácido láctico)

El PLA es un polímero hidrofóbico que tiene grupos laterales metilo. En el PLA comercial la temperatura ideal de transición vítrea (T_g) es de 50°C a 60°C , la resistencia a la tracción es aproximadamente de 32 MPa y el alargamiento a la rotura es de 30%. La limitación de este polímero es su fragilidad y su pobre estabilidad térmica, sin embargo, las propiedades mecánicas y térmicas dependen mucho del peso molecular del polímero. [28,29]

2.7 Polímeros Naturales

2.7.1 Colágeno Tipo I

El colágeno es el componente principal del tejido conectivo de los mamíferos, es una proteína que representa aproximadamente el 30% de todas las proteínas en el cuerpo humano. Abunda en todos los tejidos principales que requieren fuerza y flexibilidad (por ejemplo, la piel y los huesos). Se han identificado hasta el momento 28 tipos de colágeno que se caracterizan por pequeñas variaciones genéticas y el que se encuentra en mayor cantidad es el tipo I. [22,30] El colágeno tipo I representa hasta el 70-90% del colágeno que se encuentra en el cuerpo (proteínas fibrosas) esto lo convierte en la proteína más abundante en la MEC. Debido a esa abundancia, sus propiedades físicas y biológicas únicas se han utilizado ampliamente en aplicaciones biomédicas. Sirve como la principal proteína estructural que confiere fuerza a

los tejidos, se encuentra en altas concentraciones en los tendones, la piel, los huesos y la fascia, por lo anterior estos sitios son muy convenientes para el aislamiento de este polímero natural. [31]

La proteína de colágeno está presente en forma de fibras alargadas. Estas fibras individualmente pueden tener más de 500 μm de longitud y 500 nm de diámetro, aproximadamente. La estructura primaria del colágeno tipo I consiste en tres cadenas peptídicas, cada cadena es llamada como una cadena alfa (α), de las cuales dos son idénticas y son mejor conocidas como cadenas α_1 , mientras que la tercera cadena se denomina cadena α_2 y juntas forman la estructura de triple hélice (Figura 3), tienen alto contenido en prolina e hidroxiprolina y cada tercer aminoácido tiene glicina. Se caracteriza por esta triple hélice, que se extiende sobre una gran parte de la molécula y se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno intramoleculares entre glicina e hidroxiprolina en cadenas adyacentes. La estructura secundaria consta en que el dominio central de las tres cadenas α forma una hélice α estrecha con una separación axial de residuo a residuo de 0.286 nm y una separación angular de 108° . El que la hélice se encuentre enrollada se debe a la repulsión estérica entre los residuos de prolina e hidroxiprolina. Los enlaces peptídicos forman una columna vertebral de la hélice α , empujando así las cadenas laterales de la hélice α hacia el exterior de la cadena, la geometría de la hélice α da como resultado tres residuos por vuelta helicoidal y cada tercer residuo es una glicina, esto genera una fila de residuos de glicina superpuestos, esta fila de glicina se enrolla en la superficie de la molécula en espiral y por último en la estructura terciaria la fila de glicina crea la triple hélice. [22]

El colágeno que es extraído a partir de disolventes ácidos o de enzimas proteolíticas, es muy utilizado en aplicaciones biomédicas, debido a que en condiciones apropiadas se autoensamblará espontáneamente para formar fibras insolubles biodegradables y biocompatibles de alta resistencia mecánica y baja inmunogenicidad. Los disolventes ácidos diluidos se utilizan para romper los enlaces cruzados intermoleculares del tipo aldimina, y las enzimas proteolíticas como es el caso de la pepsina, son usadas para romper los enlaces cruzados más estables del tipo cetoimida. La pepsina corta los telopeptidos carbono y nitrógeno no helicoidales, dejando intacta la triple hélice. [31,32]

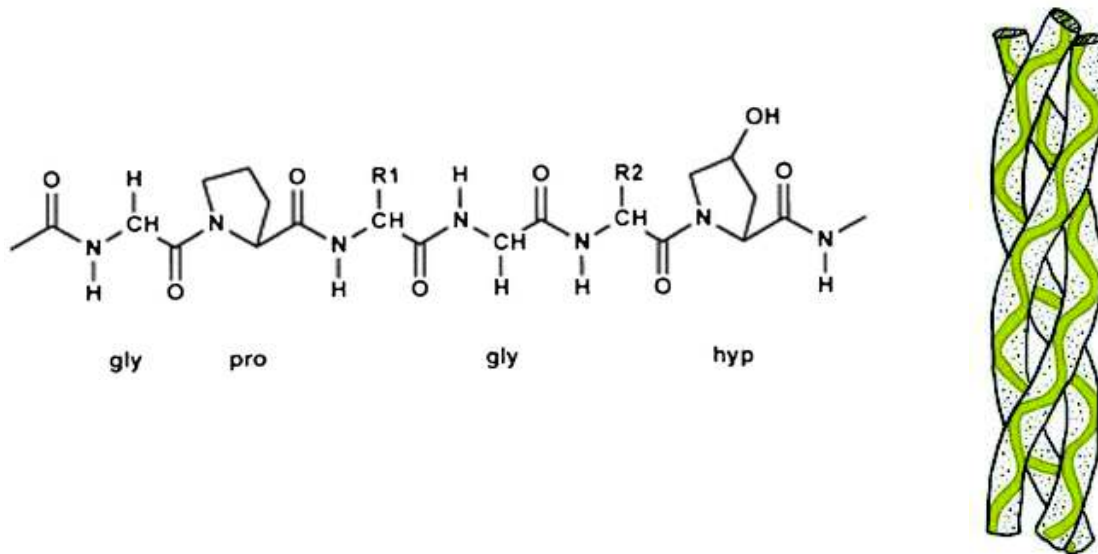


Figura 3. Representación de la triple hélice de colágeno y los residuos de aminoácidos. [22]

El colágeno proveniente de especies bovinas puede presentar dificultades como el riesgo de reacciones autoinmunes y alérgicas, el rechazo asociado a creencias religiosas, además después de los brotes de encefalopatía esponjiforme bovina se necesitan fuentes alternas seguras de colágeno. El colágeno obtenido del pescado tiene ventajas como una gran resistencia al daño físico y químico, debido a la variedad de temperaturas y presiones que soportan los peces. [33]

Las propiedades del colágeno ofrecen grandes ventajas para apoyar el crecimiento del tejido, se han utilizado junto con los polímeros sintéticos y sus buenas propiedades mecánicas, para fabricar andamios. [31]

2.7.1.1 Aplicación del Colágeno en Ingeniería de Tejidos

Las propiedades que debe tener un biomaterial para aplicaciones de ingeniería de tejidos incluyen una alta biocompatibilidad, baja inmunogenicidad, debe replicar tanto la forma como la función de la matriz extracelular nativa; tanto la resistencia mecánica como las interacciones celulares y señalización no deben verse comprometidas.

El colágeno cumple con todos los requisitos para ser utilizado en el área de ingeniería de tejidos, además, a diferencia de los materiales sintéticos, la estructura del colágeno se compone de varias secuencias de aminoácidos que se unen a las células y ayudan a la unión celular mediada por integrinas sin la necesidad de modificar la superficie. [34]

El colágeno tipo I es el componente principal de la pared vascular y se usa ampliamente en la ingeniería de tejidos vasculares. Venugopal y colaboradores realizó un estudio comparativo entre nanofibras de colágeno y PCL para la proliferación de células de músculo liso (SMC) de la arteria coronaria humana. Descubrieron que, para aplicaciones de injerto vascular, las SMC preferían proliferar o crecer en andamios de PCL recubierto con colágeno sobre los andamios de PCL puros. [35]

Para superar las pobres propiedades mecánicas de un andamio de colágeno, He y colaboradores prepararon andamios electrohilados de poli (ácido L-láctico)-co-poli (ε-caprolactona) mezclado con colágeno para simular una arteria. El andamio obtuvo un valor de deformación lineal deseable de $66 \pm 22\%$ que está mucho más cerca del de una arteria coronaria humana (45-99%). [36]

Es importante analizar la composición del colágeno con la finalidad de conocer la pureza y calidad para ser utilizado en el área biomédica, es común que se realicen análisis proximales de este material.

2.7.1.2 Análisis Proximal de Alimentos

En el área de alimentos se realizan análisis fisicoquímicos o proximales de los productos, esto se aplica principalmente como un control para verificar que cumplan con las especificaciones o requerimientos establecidos durante la formulación. Estos análisis nos indican el contenido de humedad, grasa o extracto etéreo, cenizas y proteína. Cuando un alimento es sometido a secado a una temperatura adecuada, presenta una pérdida de peso, debido a la evaporación del agua, esta pérdida de peso se mide analíticamente reportándose como humedad. Es fundamental conocer el porcentaje de humedad en los alimentos debido a que éste nos indica la estabilidad y calidad del producto, cuando los niveles son mayores al

8% favorecen la presencia de insectos y arriba del 14% existe el riesgo de contaminación por hongos y bacterias, por lo que es importante obtener un producto con poca humedad. El contenido de grasa es un estimador de la fracción lipídica del alimento, es importante obtener un porcentaje bajo, esto es indicativo de una mejor calidad, la grasa cruda es la fracción separada del material seco por extracción en forma directa con solventes orgánicos. Los alimentos contienen pequeñas cantidades de materiales inorgánicos que varían en composición y concentración, al calcinar la muestra obtenemos cenizas que están constituidas por el residuo inorgánico, altos contenidos de ceniza indican una adición de algún adulterante inorgánico, lo cual afecta en la pureza del alimento. La proteína total es el componente más importante, su adecuada evaluación permite controlar la calidad de los insumos proteicos del alimento, su análisis mediante el método de microkjeldhal también evalúa el contenido de nitrógeno total en la muestra. [37]

2.8 Técnicas de Fabricación de Andamios

Existen varios métodos para fabricar andamios, como la separación de fases, autoensamblaje, soplado por fusión y electrohilado, donde el último es el más utilizado en la actualidad. [6]

2.8.1 Electrohilado

El electrohilado es una técnica muy versátil y aceptable mundialmente, debido a que el método es bastante conveniente para producir redes fibrosas de tamaño uniforme y continuo que va desde la escala nanométrica hasta micrométrica, [19] el proceso de electrohilado permite obtener fibras de un material desde un depósito de polímero fundido o en solución a una placa colectora de aluminio que se encuentra conectada a tierra, en esta placa el material se va acumulando hasta producir la estera fibrosa con el espesor que se desee, esto se logra al inducir la acumulación de carga en la superficie de la solución mediante la aplicación de voltajes fuertes, se induce carga en la solución y provoca la formación de una forma cónica conocida como cono de Taylor. Cuando el voltaje es suficientemente fuerte, el potencial

electrostático supera la energía asociada con la tensión superficial del material a granel en el orificio, y la solución se acelera hacia el colector conectado a tierra. A medida que la solución de polímero se impulsa hacia el colector, el solvente se evapora, dando como resultado una corriente continua de fibras ultrafinas. [38,39]

Los componentes principales de la técnica de electrohilado son:

1. Un suministro de alto voltaje (Fuente de Voltaje): Para poder generar las fibras se necesita tener un campo eléctrico entre la aguja y el colector lo suficientemente alto para romper la tensión superficial del polímero.
2. Una bomba de inyección: Se encarga de mantener un flujo constante del polímero hacia la aguja.
3. Aguja: Es la encargada de contener el polímero. La forma tradicional es una aguja capilar, existen una infinidad de novedosos diseños con la intención de mejorar la producción de las fibras.
4. Un colector que se encuentre conectado a tierra: pueden ser dinámicos o estáticos, la geometría del colector, ubicación espacial y velocidad de giro define la alineación de las fibras. [40]

El esquema de los componentes del sistema de electrohilado se puede observar en la Figura 4.

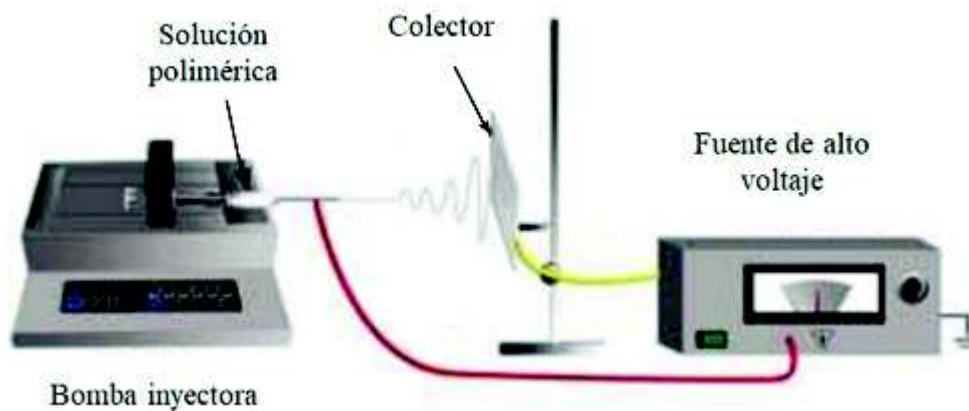


Figura 4. Representación del proceso de electrohilado. [64]

El electrohilado se ha estudiado desde los años 90 para la fabricación de andamios fibrosos y puede utilizar una gran variedad de materiales. La formación de fibras electrohiladas es influenciada por varios factores, primeramente, por parámetros de la solución, estos incluyen la conductividad, viscosidad y tensión superficial, son determinantes del tamaño y la morfología de las fibras. También hay parámetros de proceso, conformados por el voltaje, la distancia y el flujo de inyección. El voltaje aplicado es de los más importantes, el cual permite un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerza de coulomb en el chorro y un fuerte campo eléctrico, promoviendo la reducción del diámetro de las fibras. La distancia del hilador hasta el colector tiene efecto en la morfología de las fibras, si la distancia es muy grande la fibra podría romperse esto a causa de su propio peso, por el contrario, si la distancia es muy mínima se puede observar en la fibra la aparición de grumos. El flujo de inyección determina la cantidad de solución disponible para el proceso y también influye en la morfología de las fibras, un flujo lento da más tiempo de que el solvente se evapore, evitando así la formación de defectos y con un flujo alto ocurre un incremento en el diámetro de las fibras y posiblemente en el tamaño de los defectos. Otro parámetro para tomar en cuenta es el campo eléctrico inducido por el colector. Por último, también afectan parámetros ambientales como la temperatura y la humedad, pueden causar que la fibra presente la formación de pequeños poros circulares en la superficie, estos últimos no los podemos controlar. Para apreciar mejor los parámetros que afectan a la formación de las fibras se resume en la Tabla 2. [38,40,41]

Tabla 2. Efecto de los parámetros del proceso de electrohilado. [41]

Parámetros	Características en la fibra
Concentración de la solución	Alta: aumenta el diámetro de las fibras. Baja: las fibras pueden llegar a romperse en gotas.
Voltaje	Alto: fibras gruesas. Bajo: Poco impulso para llegar al colector.
Flujo de inyección	Alto: mayores diámetros, grumos más grandes. Bajo: mayor tiempo para evaporación del solvente.
Distancia	Aparición de grumos o defectos en la fibra si se utiliza una distancia muy alta o baja.
Humedad	Aparición de poros

Los andamios fibrosos producidos por electrohilado por lo general dan como resultado fibras orientadas aleatoriamente, las cuales son útiles para producir superficies con textura rica. Para mejorar la utilidad de los materiales dirigidos hacia la ingeniería de tejidos también se han fabricado sistemas de fibras alineadas utilizando un cilindro giratorio como colector (Figura 5). Este tipo de andamios son utilizados para controlar la orientación celular, mejorar la respuesta de contacto con las células y a su vez conducir a funciones celulares diseñadas, como lo es la movilidad dirigida. La razón por la cual las células se orientan a lo largo de la fibra puede explicarse por la teoría de la “guía de contacto”, que ilustra que una célula tiene la máxima probabilidad de migrar en direcciones asociadas con propiedades químicas, estructurales o mecánicas del sustrato. [38,39]

Cirillo y colaboradores utilizaron fibras electrohiladas de PCL/Gelatina totalmente alineadas para facilitar la extensión de neuritas a través de la guía de contacto para la regeneración nerviosa. Los resultados obtenidos fueron positivos en la respuesta celular in vitro, las fibras alineadas ofrecieron una guía de contacto eficiente para dirigir la orientación de las células

nerviosas a lo largo de las fibras con respecto a las organizadas al azar, promoviendo un alto alargamiento de las neuritas a los 7 días. [42]

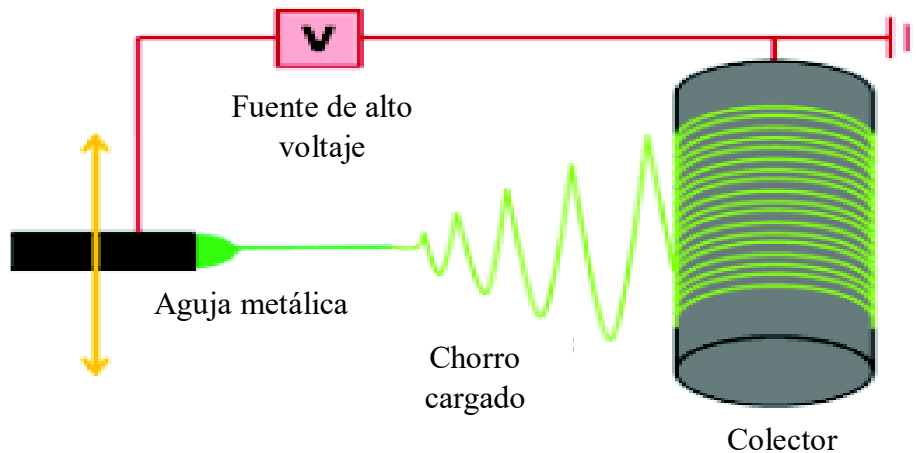


Figura 5. Representación de un cilindro giratorio como colector para proceso de electrohilado. [19]

2.9 Modificación Superficial de Fibras Electrohiladas

Debido a las propiedades químicas relativamente inertes de los polímeros sintéticos, el ajuste de sus propiedades superficiales como humectabilidad, hidrofilia y adhesión celular sigue siendo un desafío. La modificación de la superficie de fibras después del electrohilado es sumamente importante porque las hace más compatibles con la ingeniería de tejidos. Las propiedades superficiales de las fibras pueden modificarse química y físicamente con moléculas bioactivas y ligandos reconocibles por células. El tratamiento con plasma se ha utilizado generalmente para la modificación de la superficie de fibras preparadas a partir de polímeros sintéticos. La introducción de especies de carbono con un estado de oxidación superior que contienen alcohol, éter y grupos carbonilo también puede funcionalizar la superficie de las fibras, los grupos funcionales resultantes alteran las características de la superficie, incluida la humectabilidad, la polaridad y la adsorción de proteínas, mejorando así el comportamiento celular a través de interacciones polares mejoradas inducidas por los

grupos funcionales. Otro método que se ha utilizado para modificación de superficies es el recubrimiento con polidopamina. [7]

2.9.1 Modificación de Superficie con Dopamina

Se ha descrito que la dopamina disuelta en una disolución tampón a pH alcalino entre 7.5 y 8.5, polimeriza al ser oxidada por el oxígeno del aire, para recubrir un gran número de superficies (Figura 6). La dopamina tiene grupos alquilamina y catecol que podrían sufrir autopolimerización y formar polidopamina, los primeros pasos en la formación de la polidopamina han sido estudiados por técnicas electroquímicas y los resultados obtenidos indican que primero tiene lugar la oxidación de los grupos hidroxilo a grupos quinona, formándose dopamina-quinona, después se produce una ciclación intramolecular dando lugar a la leucodopaminacromo, la cual tras una nueva oxidación y reagrupamiento de la molécula forma el 5,6-Dihidroxiindol (Figura 7). [43]

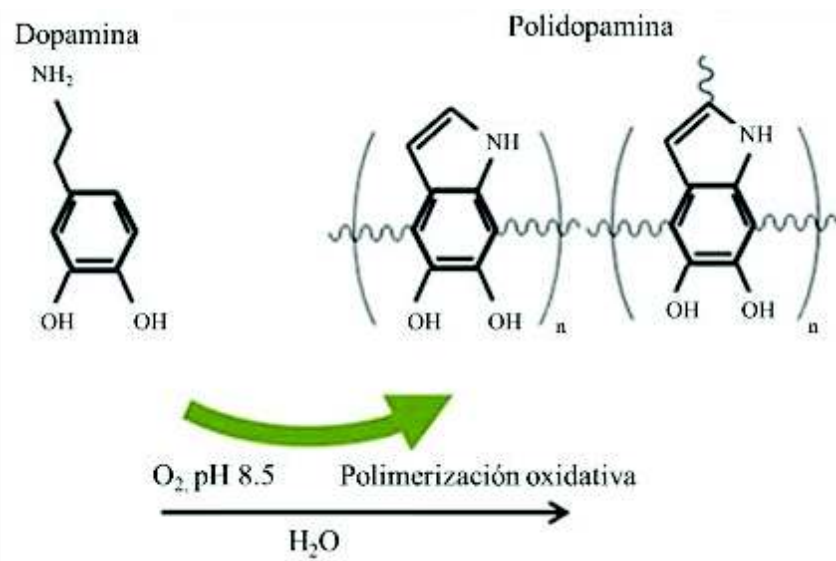


Figura 6. Polimerización de la dopamina. [44]

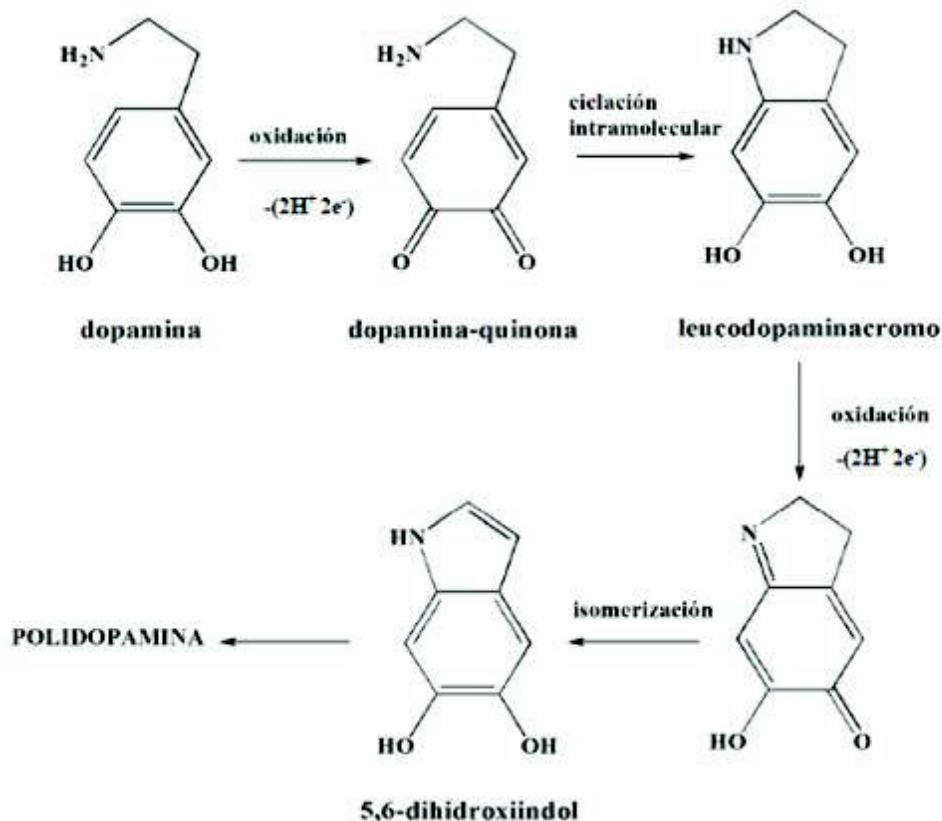


Figura 7. Proceso de formación de la polidopamina. [43]

Para las modificaciones de superficies de fibras electrohiladas, se espera la formación de capas de polidopamina en materiales poliméricos como PLA y PCL a través de puentes de hidrógeno, apilamiento π - π e interacciones de Van der Waals, y esa capa de polidopamina podría permitir reacciones covalentes con diferentes grupos funcionales, potencialmente al reaccionar con tioles o grupos amina. Sobre polidopamina se han inmovilizado un gran número de especies que contienen grupos amino como polímeros terminados en grupos $-NH_2$ (PEG- NH_2), proteínas, péptidos, anticuerpos, ADN, incluso bacterias o células. [7]

Lin y Fu, prepararon fibras electrohiladas de PLA y las recubrieron con polidopamina para analizar la osteogénesis de células madre derivadas de tejido adiposo humano (hADSC), observaron que la fibra tratada aumentó la adhesión celular en comparación de las fibras sin tratamiento. [44]

2.10 Técnicas de Caracterización de Fibras Electrohiladas

2.10.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Un microscopio electrónico de barrido (MEB o mejor conocido como SEM por sus siglas en inglés) permite obtener imágenes y analizar muestras utilizando un haz de electrones enfocado. Cuando el haz irradia una muestra se generan varias señales como consecuencia de la interacción del electrón incidente con los átomos en la muestra. Las señales generadas desde la superficie de la muestra pueden detectar electrones secundarios y electrones retro-dispersados para observar la forma y la composición. Los electrones secundarios generados a poca profundidad en la superficie de la muestra se detectan porque tienen poca energía (menos de 50 eV) y el rendimiento de estos depende del ángulo incidente del haz de electrones a la superficie de la muestra. Dentro de las características del MEB se encuentra que es posible observar una estructura en la escala nanométrica, se puede obtener la forma, composición, contraste de voltaje e información cristalográfica, un MEB de bajo vacío permite observar una muestra aislante y una muestra con contenido de agua sin ningún tratamiento previo. La MEB es una técnica muy eficaz para la observación de fibras electrohiladas y andamios utilizados en la ingeniería de tejidos. El MEB está compuesto por varias partes como se puede observar en la Figura 8, cuenta con (1) una fuente de electrones para generar estos mismos; (2) un sistema óptico de electrones que incluye lente de condensador, lente de objetivo y deflector para enfocar electrones generados a partir de una fuente de electrones para formar una sonda y escanear; (3) una cámara y una plataforma para mover una muestra; (4) detectores de señal, para detectar electrones generados a partir de una muestra; (5) un sistema de evacuación para mantener la columna óptica electrónica en el vacío y (6) un sistema de control de imagen para mostrar la señal detectada. [45]

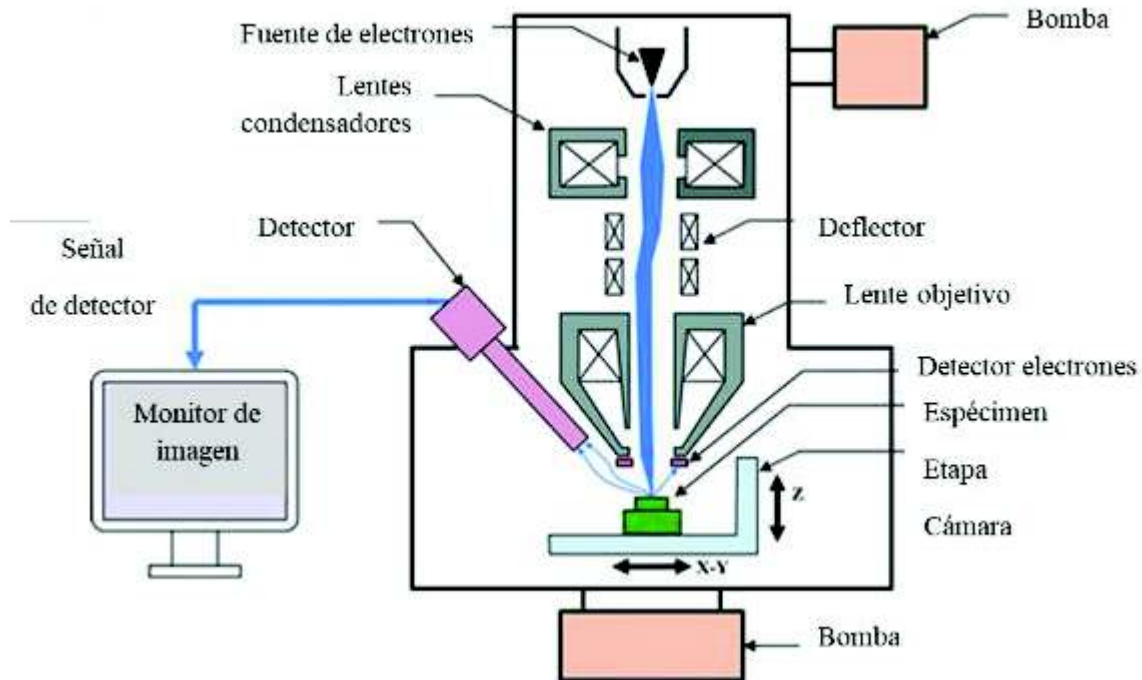


Figura 8. Diagrama del microscopio electrónico de barrido. [45]

2.10.2 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia de infrarrojo es una herramienta bastante útil para la identificación de compuestos orgánicos puros porque las especies moleculares absorben radiación infrarroja. Además, cada especie molecular tiene un espectro de infrarrojo característico. [46] La luz IR es radiación electromagnética con una longitud de onda entre 0.7 y 300 μm , ubicada entre la luz visible y microondas. Las posiciones de banda en IR se presentan como número de onda (cm^{-1}), que están recíprocamente relacionados con la longitud de onda (λ). La región IR del espectro electromagnético se divide en tres regiones: el IR cercano, el IR medio y el IR lejano (Tabla 3). La energía cercana al IR cercano con números de onda de 12800 a 4000 cm^{-1} puede excitar los sobretonos o las vibraciones armónicas. El IR medio con números de onda de 4000 a 200 cm^{-1} puede utilizarse para estudiar la estructura rotacional-vibratoria asociada. El IR lejano con números de onda de 200 a 10 cm^{-1} es el más bajo en energía y puede usarse para espectroscopia rotacional. Cuando se exponen a la radiación infrarroja, las moléculas orgánicas pueden absorber la radiación infrarroja y convertirla en vibraciones moleculares. Las vibraciones y rotaciones moleculares dentro de una molécula deben dar como resultado

un cambio en el momento dipolar para que sea activa por IR. La radiación electromagnética consiste en un campo eléctrico y un campo magnético oscilante, perpendiculares entre sí. Cuando la radiación IR incide en una molécula, la radiación solo se absorberá si la frecuencia de la radiación coincide con la frecuencia vibratoria de la molécula. La absorción de la radiación IR produce un aumento de la amplitud de vibración de la molécula. Si las longitudes de onda de la luz absorbida por cierta molécula pueden determinarse y asociarse con un modo de movimiento específico, entonces es posible determinar qué modos de vibración y rotación exhibe esa molécula. Esta información hace posible determinar qué tipos de enlaces están presentes en la molécula.

El espectro de IR de una muestra se registra pasando un haz infrarrojo a través de la muestra. La detección y el análisis de la radiación transmitida se utilizan para determinar la magnitud de la energía absorbida en cada longitud de onda discreta. Por lo general, hay dos formas de recopilar estos datos. En diseños más antiguos, la muestra se expone a un haz monocromático de radiación IR cuya longitud de onda se puede desplazar para obtener un espectro de transmisión, los instrumentos más nuevos utilizan una transformada de Fourier (FTIR) que es una técnica de procesamiento de datos que se utiliza para modificar como tal los datos sin procesar recopilados. Mediante el análisis de la radiación transmitida a través de la muestra, se puede construir un gráfico de absorción o transmitancia graficando el número de onda en el eje X en el orden de energía creciente y en porcentaje de transmitancia o absorbancia en el eje Y. En un gráfico de transmitancia, una absorción se indica mediante un pico que apunta hacia abajo, mientras que en un gráfico de absorción los picos apuntan hacia arriba. Con base a estos gráficos, se pueden determinar las longitudes de onda a las que la molécula absorbe la radiación y, por lo tanto, la información sobre los enlaces químicos que contiene la molécula. La mayoría de los instrumentos IR modernos utilizan FTIR con un interferómetro de Michelson. A diferencia del espectrómetro de IR dispersivo basado en la refracción y difracción de la luz, FTIR es un diseño de espectrómetro infrarrojo interferométrico basado en el principio de coherencia óptica. El corazón de los espectrómetros de FTIR modernos es el interferómetro de Michelson de dos haces, que consiste en un divisor de haz, un espejo fijo y un espejo móvil. El espejo móvil oscila de un lado a otro, mientras que el fijo es estacionario. El divisor de haz es un material laminado que transmite el 50% de la luz al espejo móvil y refleja el 50% al espejo fijo. Los dos haces IR se reflejan de nuevo en el

divisor de haz por los espejos. El rayo transmitido desde el espejo fijo y el rayo reflejado desde el espejo móvil son grabados simultáneamente por el detector. Los dos haces combinados interfieren de manera constructiva o destructiva, dependiendo de la longitud de onda de la luz y la diferencia de trayectoria óptica introducida por el espejo móvil. Al reflexionar desde estos espejos, el divisor de haz recombina la luz, que luego es guiada hacia la muestra. Después de que la radiación IR interactúa con la muestra, ingresa a un detector y se convierte en señales eléctricas. La información recopilada del detector permite determinar la diferencia de longitud de la ruta entre los dos haces del interferómetro, esta diferencia de longitud es mejor conocida como el retraso del interferómetro. Al cambiar el retardo y recolectar la señal del detector a diferentes niveles de retardo, se puede construir un interferograma, que es utilizado para determinar qué cambios se realizan en la señal del detector debido a la presencia de una muestra. Se realiza una decodificación del interferograma utilizando una transformada de Fourier, esta operación matemática la lleva a cabo la computadora, actualmente este cálculo es parte integral de casi todos los espectrómetros. [47]

Tabla 3. Regiones del espectro infrarrojo. [46]

Región	Longitud de onda, μm	Número de onda, cm^{-1}	Frecuencia, Hz
Cercana	0.78 a 2.5	12800 a 4000	3.5×10^{14} a 1.2×10^{14}
Media	2.5 a 50	4000 a 200	1.2×10^{14} a 6.0×10^{12}
Lejana	50 a 1000	200 a 10	6.0×10^{12} a 3.0×10^{11}
Más utilizada	2.5 a 15	4000 a 670	1.2×10^{14} a 2.0×10^{13}

2.10.3 Análisis Térmico

2.10.3.1 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El TGA se utiliza para realizar estudios de descomposición térmica de biomasa, pertenece al análisis térmico, esto se debe a que la muestra se trata a diversas temperaturas y a diferentes

atmósferas. Este método permite una medición simultánea de la temperatura, el tiempo y la masa de una muestra en una atmósfera controlada. Esta técnica se basa en las medidas de variación del peso de la muestra como consecuencia del tratamiento térmico. Debido al proceso se perderá algo de masa y esta pérdida de peso normalmente se mide por medio de una microbalanza. La muestra se inserta en una “bandeja de muestra” o contenedor que está específicamente diseñado para este tipo de medida. En cuanto a las condiciones de temperatura y su medición, la variación de temperatura se establece de acuerdo con un programa de temperatura personalizado que puede incluir pasos isotérmicos y de rampa con diferentes velocidades de calentamiento, mientras que la temperatura se mide con termopares que están en contacto con el recipiente de muestra. La bandeja se coloca generalmente en un soporte de muestra, que está conectado con el elemento sensible a la masa (la microbalanza). El sistema termogravimétrico (muestra, soporte y bandeja) se calienta utilizando un horno eléctrico, que en casos particulares puede alcanzar hasta 2000°C, dependiendo de los materiales específicos y el diseño del horno. Las bandejas de muestra que se usan en un dispositivo TGA pueden ser de diferentes formas y materiales. Deben poder almacenar la muestra de forma segura, no reaccionar con la muestra y ser adecuados para la temperatura deseada, las bandejas más comunes están hechas de alúmina, platino y aluminio. El aparato TGA generalmente se carga con una masa de muestra en el intervalo de 2 a 20 mg, según la densidad de la muestra, el tamaño de la bandeja de muestra y el propósito del análisis. Por ejemplo, en el caso de una reacción exotérmica, una mayor carga de masa puede conducir a una temperatura de inicio más alta debido al mayor calor liberado por la muestra, que implica un aumento repentino de la temperatura local. Por lo tanto, teniendo en cuenta la inercia térmica del sistema y el hecho de que el termopar se coloca en contacto cercano con la muestra, la temperatura detectada aparentemente puede ser mayor que la observada durante las pruebas con una masa más baja. La magnitud de este efecto está correlacionada con las propiedades físicas de la muestra, la bandeja de muestra y la cantidad de calor liberado o absorbido durante la transformación de la muestra. Los resultados de TGA se trazan como masa contra temperatura o tiempo. Otro tipo de representación de los resultados es la termogravimetría derivada (DTG), que es la primera derivada de la curva TGA que describe la tasa de cambio de masa. DTG también se usa para detectar efectos más sutiles o cuando se deben investigar los parámetros cinéticos. Dado que la señal TGA se informa en mg o

porcentaje (100% es la masa inicial en el tiempo cero), el DTG generalmente se representa como mg/min o porcentaje/min. El diagrama DTG ayuda a detectar transformaciones que se superponen o están asociadas con una pérdida de masa deficiente. De hecho, los picos de DTG indican una transformación específica, y los valores mínimos coinciden con la tasa máxima de pérdida de masa del paso de descomposición relacionado. [48]

2.10.4 Ángulo de Contacto

El ángulo de contacto es definido como el ángulo que forma la superficie de un líquido cuando se encuentra en contacto con una superficie sólida. Su valor depende principalmente de la relación que existe entre las fuerzas adhesivas del líquido y del sólido y además de las fuerzas cohesivas del propio líquido. Al momento que entran en contacto una fase líquida y una fase sólida forman una interfase común. La capacidad de los sólidos para formar interfases con los líquidos es llamada mojabilidad. La mojabilidad de un determinado sólido por un líquido es definida mediante el ángulo de contacto θ . La gota del líquido adopta un perfil que es el resultado del balance entre las fuerzas de la superficie y de la interfase, que tienden a minimizar la energía superficial libre del sistema. El ángulo de contacto está relacionado con las tres tensiones de las interfases sólido/gas (γ_{SG}), sólido/líquido (γ_{SL}) y líquido/gas (γ_{LG}), a través de la ecuación de Young:

$$\gamma_{LG} \cos \theta = \gamma_{SG} - \gamma_{SL}$$

Cuando $\theta < 90^\circ$ se dice que el líquido moja al sólido o que el sistema moja. Cuando el líquido no moja al sólido se observan $\theta > 90^\circ$. En los casos que el ángulo se aproxima a cero, el líquido se expande sobre el sólido y se dice que el mojado es perfecto. [49]

2.10.4.1 Método de Medida del Ángulo de Contacto

El método para la medición del ángulo de contacto se llama gota sésil (SD), se basa en la gota sésil del líquido que descansa en equilibrio sobre un sustrato sólido horizontal. Mediante técnicas fotográficas o video se obtienen imágenes de la gota y se determinan las principales

dimensiones de su perfil. La gota puede ser producida in situ o a través de un capilar. La posterior evaluación matemática de las dimensiones de la gota proporciona θ . Este método es muy empleado en la medida de las tensiones superficiales y de los ángulos de contacto debido a la simplicidad del equipo experimental, puede ser usado en un amplio intervalo de temperaturas, permitiendo observar la variación de θ durante largos periodos de tiempo. El ángulo de contacto puede medirse en:

1. Gotas estáticas. La gota es producida antes de la medida y tiene un valor constante durante la misma.
2. Gotas dinámicas. La gota se expande o se retrae como resultado de las tensiones para alcanzar el equilibrio, la superficie límite se renueva constantemente durante la medida. Los ángulos de contacto medidos en gotas crecientes se denominan “ángulos de avance” y los medidos en gotas que menguan son llamados “ángulos de retroceso”.

[49]

CAPÍTULO 3

EXPERIMENTAL

3.1 Materiales

Los materiales que fueron utilizados en este trabajo se presentan a continuación:

- ✓ Poli (ácido láctico), 4060Dmarca NatureWorks
- ✓ Acetona
- ✓ Diclorometano (DCM), marca Sigma-Aldrich
- ✓ Dimetilformamida (DMF), marca Sigma-Aldrich
- ✓ Piel de tilapia
- ✓ Papaína (de Carica Papaya), marca Millipore
- ✓ 1-Butanol, marca Sigma-Aldrich
- ✓ EDTA, marca Sigma-Aldrich
- ✓ Hidroxido de Sodio (NaOH), marca Sigma-Aldrich
- ✓ Hipoclorito de sodio (NaClO)
- ✓ Pepsina (de mucosa gástrica porcina), marca Sigma-Aldrich
- ✓ Cloruro de sodio (NaCl), marca Sigma-Aldrich
- ✓ Membranas de celulosa, marca Sigma-Aldrich
- ✓ Agua milliQ
- ✓ Colágeno
- ✓ Ácido acético glacial, marca FAGALAB
- ✓ Buffer Tris alcalino pH 8.5, marca Sigma Life Science
- ✓ Clorhidrato de dopamina, marca SIGMA
- ✓ Buffer PBS
- ✓ Agua destilada

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación de Fibras Electrohiladas de Poli Ácido Láctico (PLA)

La fabricación del andamio por medio de la técnica de electrohilado es muy importante, debido a que los parámetros que maneja este método son cruciales para obtener una morfología adecuada que cumpla con los requisitos para ser utilizados en ingeniería de tejidos, como diámetros pequeños, porosidad entre fibras para permitir la infiltración celular y que no se encuentren restos de solventes. Con el fin de establecer los parámetros ideales se varió: solvente y concentración, flujo, voltaje y distancia. Para evaluar el efecto de la variación de solvente en las características de las fibras se prepararon tres diferentes soluciones las cuales se nombraron A, B y C. Los solventes utilizados en las soluciones A y B se encuentran reportados en la literatura para disolver PLA, debido a la conductividad y viscosidad que aportan a la solución podemos obtener diámetros y morfología adecuada. Magiera y colaboradores prepararon una solución de PLA utilizando como solventes dimetilformamida (DMF) y diclorometano (DCM), posteriormente electrohilaron la solución y caracterizaron por MEB, los resultados obtenidos fueron fibras bien formadas, sin cuentas, uniformes, con poros altos entre las fibras y con diámetros pequeños. [18]

El DMF produce fibras libres de cuentas, esto se atribuye a su mayor conductividad eléctrica y constante dieléctrica. El DCM produce fibras con diferentes morfologías, específicamente conduce a pequeños poros superficiales distribuidos uniformemente sobre las fibras, debido a su evaporación, la cual es bastante rápida. [50]

Para la preparación de la solución A se utilizó como solvente una mezcla binaria de DMF:DCM a una proporción de 10:90, con una concentración final de 10% en peso de PLA. Para lograrlo se pesó 1 g de pellets de PLA y se disolvió en 1 mL de DMF más 9 mL de DCM. Esta solución se mantuvo en agitación magnética por un tiempo aproximado de 12 horas a temperatura ambiente, esperando obtener fibras con diámetros altos, debido a que la mezcla contiene poca cantidad de DMF.

Para la preparación de la solución B también se utilizó como mezcla binaria DMF:DCM pero a una diferente proporción la cual fue de 40:60, con una concentración final de 10% (p/v).

Para esta solución se pesó 1 g de PLA que fue disuelto en 4 mL de DMF y 6 mL de DCM. De igual manera se dejó en agitación magnética durante 12 horas a temperatura ambiente, esperando obtener fibras con diámetros pequeños en comparación con la solución A, debido a la mayor cantidad de DMF presente en la mezcla.

Se ha reportado que al utilizar DMF como solvente una pequeña cantidad no se evapora, lo que trae problemas para el cultivo celular debido a que es tóxico, por lo tanto, el solvente utilizado fue acetona, ya que es noble, se evapora rápidamente y su manipulación es fácil. Para la preparación de la solución C se utilizó acetona, con una concentración final de 10% (p/v). Entonces se pesó 1 g de PLA y se llevó a un volumen de 10 mL de acetona. Se dejó en agitación magnética por 6 horas a temperatura ambiente, en la Tabla 4 se resumen los parámetros utilizados para la fabricación de las fibras. Una vez listas las soluciones se transfirieron a jeringas de plástico de 5 mL de capacidad de 22Gx32mm (BD Plastipak). La jeringa con la solución se colocó en una bomba KDScientific modelo KDS-200 para su inyección, se utilizó una placa de aluminio fija (10 cm x 10 cm) como colector. Se varió el flujo desde 0.8 mL/h hasta 3.0 mL/h a intervalos de 0.2 mL/h, utilizando voltaje y distancia fijos de 15 kV y 15 cm, respectivamente. Se utilizó una fuente de poder de alto voltaje, marca Spellman, modelo CZE 1000R, para la aplicación de voltaje a la solución polimérica.

Para realizar el estudio del efecto de la variación de voltaje sobre las características de las fibras se realizó una variación de voltaje en un intervalo de 15 kV hasta 20 kV y se mantuvieron fijos los parámetros de flujo de solución 1.6 mL/h y la distancia entre la punta de la aguja a la placa colectora de 15 cm.

Para estudiar el efecto de la distancia desde la punta de la aguja hacia la placa colectora sobre las características de las fibras se varió dicha distancia desde 15 cm hasta 18 cm y manteniendo constantes los parámetros de voltaje a 15 kV y flujo de solución a 1.6 mL/h. Se realizó un análisis comparativo entre las fibras obtenidas de las diferentes soluciones, flujos, voltajes y distancias, en cuanto a su morfología y tamaño de diámetro, con el fin de elegir los parámetros que contribuyen a una mejor formación del andamio.

Tabla 4. Parámetros utilizados para la preparación de fibras electrohiladas de PLA.

Fibra	Concentración	Solventes	Flujo (mL/h)	Voltaje (kV)	Distancia (cm)
Solución A	10%	DMF/DCM 10:90	0.8 – 3.0	15 – 19	15 – 18
Solución B	10%	DMF/DCM 40:60	0.8 – 3.0	15 – 19	15 – 18
Solución C	10%	Acetona	0.8 – 3.0	15 – 19	15 – 18

3.2.2 Alineación de Fibras Electrohiladas de PLA

Chan Hun Lee y colaboradores, cultivaron fibroblastos de ligamento humano en nanofibras de poliuretano alineadas donde se obtuvo una mayor producción de MEC y secreción de colágeno en comparación con nanofibras aleatorias. [51]

Con el fin de obtener fibras con una orientación alineada, debido a que esta característica es de gran beneficio para controlar la orientación celular, se realizó el proceso de electrohilado utilizando como colector un cilindro giratorio recubierto con aluminio (10 cm x 6 cm). Se aplicó un voltaje de 5 V al colector para que girara. Para este sistema se varió el flujo de 0.6 mL/h hasta 1.6 mL/h, mientras que el voltaje y la distancia se mantuvieron fijas, 15 kV y 15 cm respectivamente.

3.3 Extracción de Colágeno Soluble en Pepsina (CSP) a partir de Piel de Tilapia

3.3.1 Pre-tratamiento a las Piel de Tilapia

Para la realización del proceso de pretratamiento se prepararon y almacenaron soluciones, en frío (4°C). Se prepararon 2 L de solución de 1-Butanol al 10%, una solución de NaClO al 0.5% y por último una solución de EDTA 0.5 M, se ajustó a un pH de 8 agregando lentejas de NaOH poco a poco. Después se descongelaron las pieles de tilapia proporcionadas por el

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), se colocaron en un recipiente con agua durante unas horas para acelerar el proceso, una vez descongeladas se limpiaron muy bien (se quitaron escamas), después se cortaron en cuadros de 2 cm x 2 cm aproximadamente hasta tener un peso de 100 g de muestra. Se preparó una solución de papaína (10 mg/Kg) a una relación 1:4 p/v. Para lograr esto se pesó 1 mg de papaína y fue disuelta en 400 mL de agua milliQ, se mezcló con las pieles limpias; esto con la finalidad de desnaturalizar las proteínas no colagénicas. Se colocaron en un vaso de precipitado de 1L y se mantuvo en agitación constante durante 1 hora. Después la solución (que contenía las pieles) se colocó en una centrífuga Beckman Coulter modelo Avanti J-26S XPI a 5000 x G durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. Al terminar de centrifugar se retiró el sobrenadante y se hicieron 2 lavados de 5 minutos al precipitado con agua milliQ relación 1:3 p/v. Luego de los lavados, las pieles fueron colocadas en un vaso de precipitado de 2 L donde se agregó la solución de 1-Butanol al 10% en una relación 1:10 p/v, se refrigeraron durante 48 horas manteniendo agitación magnética constante, esto se realizó con la finalidad de desengrasar las pieles y así reducir el contenido de grasa del colágeno final. En este paso se realizó un recambio de solución a las 24 horas para evitar la saturación de grasa que liberan las pieles, esto permite que el proceso de desengrasado continúe y así obtener colágeno de mejor calidad. Pasado este tiempo, se centrifugo la solución a 5000 x g durante 20 minutos, el precipitado se lavó 2 veces durante 5 minutos con agua milliQ relación 1:3 p/v. Este paso tiene la finalidad de reducir el contenido de grasa del colágeno final. Se mezclaron las pieles con la solución de EDTA relación 1:10 p/v, se mantuvo en agitación magnética durante 48 horas. Después fue centrifugada a 5000 x g por 20 minutos, se hicieron los respectivos lavados con agua milliQ. El EDTA sirve como quelante para el calcio, y al reducir su concentración permite mantener la pureza del colágeno. Las pieles se colocaron en NaClO al 0.5% relación 1:3 p/v, se agitaron durante 30 minutos, se llevaron a la centrifuga en las mismas condiciones y por último fueron lavadas con agua milliQ. El NaClO fue utilizado como agente blanqueador para la decoloración de las pieles, además tiene efecto desinfectante que ataca a los microorganismos que se presentan en la piel, siendo así atractivo para biomateriales por su color y su inocuidad.

3.3.2 Extracción y Purificación de Colágeno Soluble en Pepsina (CSP)

Después de haber realizado el pretratamiento se inició el proceso de extracción y purificación del colágeno. Se inició preparando la solución de ácido acético 0.5 M, para lograr esto se utilizaron 28.71 mL de ácido acético concentrado y se aforaron a un volumen de 1 L con agua milliQ. El objetivo de agregar una enzima proteolítica como la pepsina es que la proteína se desprenda de los aminoácidos terminales para la eliminación de cualquier respuesta inmunológica. Para realizar dicho procedimiento las pieles se colocaron en un vaso de precipitado de 2 L y se agregó 0.1 g de pepsina y 1 L de ácido acético 0.5 M, unos minutos después se agregaron 700 mL más de ácido acético 0.5 M para evitar la gelatinización de la solución. Se dejó en agitación magnética en refrigeración (4°C) durante un periodo de 24 horas. Se colocó el vaso de precipitado con las pieles en solución a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo para disminuir la viscosidad. Después la solución fue centrifugada a 10000 x g a temperatura ambiente durante 40 minutos. El sobrenadante se pasó a un vaso de precipitado y se guardó en refrigeración. Se repitió el proceso con el precipitado utilizando 0.05 g de pepsina y 500 mL de ácido acético, se mantuvo en agitación durante 24 horas. Se centrifugo en las mismas condiciones. Después de la centrifugación se juntaron los sobrenadantes en un vaso de precipitado de 2 L. Se utilizó NaCl para precipitar los sobrenadantes debido a las cargas iónicas que esta sal proporciona a la proteína, hasta una concentración final de 2 M, se agitó 20 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugo a 10000 x g por 40 minutos. El precipitado obtenido fue colágeno y el sobrenadante se descartó. Con el fin de retirar la mayor cantidad de sales presentes el colágeno se resuspendió en ácido acético 0.5 M relación 1:2 p/v. Después se pasó a membranas de celulosa para dializar contra agua milliQ. La diálisis se mantuvo en agitación en refrigeración durante 3 días aproximadamente, haciendo recambios de agua cada 12 horas. Durante cada recambio se midió la conductividad del agua para verificar que esta se reduzca, esto quiere decir que la cantidad de sales va disminuyendo. El colágeno se vació en bolsas herméticas, se pesaron y se congelaron a -80°C. Por último, se liofilizó entre 1-2 semanas.

3.3.3 Análisis Proximal

El estudio de la composición química del colágeno es relevante, porque indica la variación de la concentración de nutrimentos que contiene. Particularmente se analiza el contenido de humedad, grasa o extracto etéreo, ceniza y proteínas totales. Se siguieron los métodos de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC), se determinó el contenido de humedad por el método de la estufa por aire (950.46), para la extracción de grasa se siguió el método por Goldfish (920.39), para ceniza fue utilizado el método de incineración en mufla (920.153) y para proteínas totales fue utilizado el método de micro-kjeldahl (960.52). Estos análisis fueron realizados por triplicado.

3.4 Preparación de Fibras Electrohiladas de Colágeno

Se realizó una variación de concentración de solución, flujo de inyección, voltaje y distancia hasta encontrar los parámetros ideales. Se utilizaron concentraciones de 15% y 20% de colágeno disuelto en una mezcla de agua/ácido acético relación 10:90 p/v, según lo reportado por Li y colaboradores, [52] intervalos de flujo desde 0.2 mL/h hasta 0.6 mL/h, voltaje entre 15-17 kV y distancia entre 15-20 cm, todas las posibles combinaciones se inyectaron durante 30 minutos. Para la obtención de las fibras se utilizó el sistema de electrohilado, se colocó la solución en una jeringa de plástico de 5 mL de capacidad de 21Gx32mm (BD Plastipak) y se llevó a cabo la recolección de fibras en la placa colectora fija de aluminio. Posteriormente las fibras fueron analizadas por MEB, con el fin de observar la morfología y que no se presentaran aglomeraciones, también se realizó la medición de diámetros promedio a partir de 4 muestras mediante el software ImageJ.

3.5 Modificación de la Superficie con Dopamina

La modificación de la superficie de fibras después del electrohilado es sumamente importante porque las hace más compatibles para uso en ingeniería de tejidos. Las propiedades

superficiales pueden modificarse química y físicamente con moléculas bioactivas. Un método reportado para la modificación de superficie es el recubrimiento con dopamina, el fin de esto fue exponer grupos hidroxilo y aminos en la superficie de la matriz polimérica y así mejorar su unión con el colágeno. Se tomaron placas de fibras de PLA puro de 10 cm x 6 cm para modificar su superficie antes de agregar el colágeno. Para lograr esto se preparó un buffer Tris-alcálico a un pH de 8.5 y se agregó clorhidrato de dopamina (10 mg/mL). Las fibras de PLA puro se despegaron del aluminio colector, se hizo un lavado con agua desionizada, se colocaron en cajas Petri y se sumergieron en 10 mL de buffer que contenía dopamina durante 3 horas. Después las fibras se retiraron de la caja Petri, se lavaron con solución PBS y se dejaron secar durante toda la noche.

3.6 Preparación de Fibras Híbridas de PLA/Colágeno y PLA + dopamina/Colágeno

Para la fabricación de las fibras de híbridas se electrohiló la solución de colágeno sobre la matriz polimérica de PLA puro y PLA con tratamiento de dopamina, utilizando los siguientes parámetros, flujo de 0.3 mL/h, voltaje de 15 kV y distancia de 20 cm. La finalidad de comparar las fibras sin y con tratamiento de dopamina, es para comprobar la funcionalidad y propiedades que aporta la modificación de la superficie como una mejor interacción entre los grupos funcionales expuestos para poder inmovilizar el colágeno sobre la superficie del andamio y mejores propiedades de humectabilidad, lo cual es de gran importancia para la adhesión celular.

3.7 Técnicas de Caracterización

3.7.1 Microscopía Electrónica de Barrido

Se estudió la morfología de las fibras mediante un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5410LV y JEOL 7610F de alta resolución (CINVESTAV-Querétaro). Se realizaron micrografías de la fibra de PLA, colágeno, PLA/colágeno y PLA + dopamina/colágeno. Se

utilizó un haz de electrones secundarios de 20 kV de intensidad a alto vacío y todas las muestras fueron montadas en un portamuestras de cobre utilizando cinta de carbono de doble cara y se recubrieron por una película de oro para proporcionar conductividad eléctrica, necesaria para dirigir los electrones a tierra y permitir la observación de la imagen. Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el software ImageJ (National Institute of Health (NIH), USA [53] para determinar los diámetros de las fibras. Se midieron 200 diámetros de cada andamio y se procesaron mediante Origin 9 para realizar un análisis estadístico obteniendo diámetros promedio y desviaciones estándar para cada uno de los andamios.

3.7.2 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier

Con la finalidad de comprobar la presencia de los grupos característicos de cada material puro en las fibras híbridas. Se realizó el análisis de los espectros de FTIR en un equipo Perkin Elmer Frontier utilizando el aditamento de ATR Pike con detector de diamante, sin ninguna preparación previa de la muestra. Se cortó un trozo de la muestra y se colocó directamente en el ATR. Con ayuda del software Spectrum el análisis se realizó en un intervalo de número de onda de 4000 cm^{-1} hasta 400 cm^{-1} , a 16 barridos y una resolución de 4. Se obtuvo el espectro de infrarrojo de PLA, colágeno, PLA/colágeno y PLA + dopamina/colágeno.

3.7.3 Análisis Termogravimétrico

Para estudiar la descomposición térmica de los materiales y poder conocer la temperatura máxima a la que el material comienza a degradarse, se realizó el análisis termogravimétrico, utilizando un equipo Pyris 1 TGA Perkin Elmer. Se realizó un análisis por triplicado de cada una de las muestras, realizando un calentamiento desde 25°C hasta 800°C a una velocidad de calentamiento y enfriamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bajo atmósfera de nitrógeno.

3.7.4 Ángulo de Contacto

Para evaluar la variación en la humectabilidad de la superficie de las muestras, se midió el ángulo de contacto (θ) a través del método de gota sésil mediante un equipo VCA optima, AST Products, Inc, con un intervalo de medición de 0 a 180° (CINVESTAV-Querétaro) y un equipo CAM-Plus, marca ChemInstrument. Se depositó 1 gota de agua desionizada sobre la superficie de las fibras de PLA, PLA/colágeno y PLA + dopamina/colágeno. Con el fin de comprobar la hidrofobicidad del PLA se depositó 1 gota de etilenglicol en la superficie de la fibra, debido a que es afín a PLA, se espera que la gota se absorba. Las estimaciones de la humectabilidad se calcularon con un promedio de 3 mediciones acompañadas de su desviación estándar.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Condiciones Óptimas para la Preparación de Fibras Electrohiladas de PLA

Las fibras obtenidas utilizando las soluciones A (PLA + DMF:DCM proporción 10:90), B (PLA + DMF:DCM proporción 40:60) y C (PLA + acetona), se analizaron mediante MEB a una ampliación de 5000 aumentos (Figura 9); para estudiar la morfología y realizar mediciones de diámetro. Las fibras se obtuvieron variando solo la velocidad de flujo; así, los flujos fueron: a) 0.8 mL/h, b) 1.2 mL/h y c) 1.6 mL/h. El voltaje y la distancia se mantuvieron fijos a 15 kV y 15 cm, respectivamente. Las fibras obtenidas con la solución A (imágenes 1a, 1b y 1c de la Figura 9), cada una mostró buena apariencia, superficie lisa, uniforme y sin aglomeraciones, a medida que el flujo aumentaba el diámetro de las fibras también lo hacía, en la imagen 1c, la fibra es más gruesa en comparación a la imagen 1a, razón por la cual fue descartada esta solución, otro motivo por el cual se descartó el uso de esta solución fue la mezcla de solventes utilizados (DMF:DCM). Es importante señalar que una de las principales características que debe tener la membrana fibrosa, son diámetros pequeños para poder obtener un mayor número de poros interconectados y mayor área superficial; características muy importantes en ingeniería de tejidos, porque permiten la infiltración celular. Para la solución B se muestra la imagen 2a, la cual presenta aglomeraciones, esto puede ser restos del solvente que no alcanzo a evaporarse, las imágenes 2b y 2c muestran fibras más lisas, delgadas y homogéneas, con poros interconectados, pero debido a los solventes que se utilizaron (DMF:DCM) se descartó su uso, el DMF y DCM son tóxicos y, la eliminación total del DMF en las fibras sería muy difícil, existiendo la posibilidad de no eliminarse en su totalidad, por lo que afectaría a la viabilidad y proliferación celular. Las imágenes 3a, 3b y 3c pertenecen a la solución C, presentan una morfología lisa, sin cuentas, delgadas y con poros interconectados, esta solución presentó buenas características morfológicas, además de utilizar un solvente más adecuado para ser utilizado en aplicaciones biomédicas y de ingeniería de tejidos.

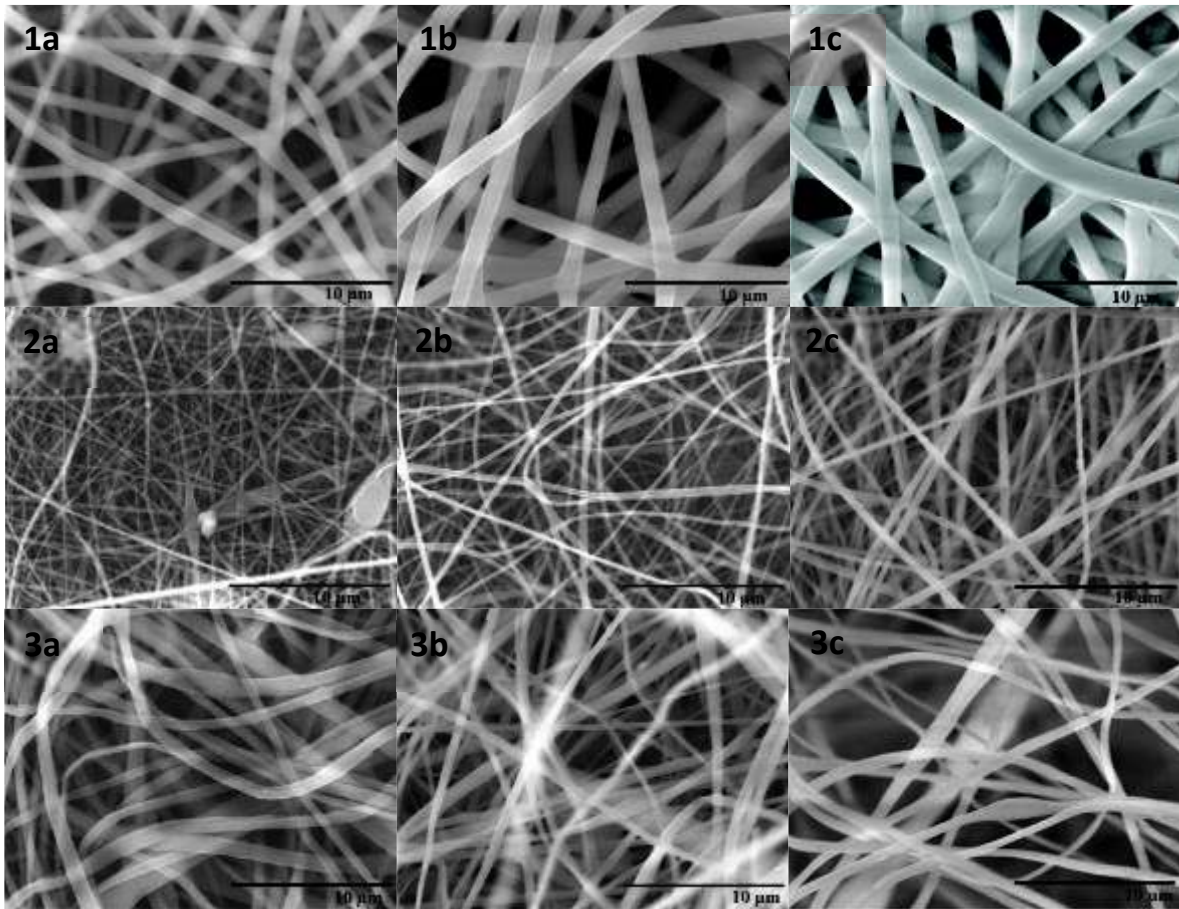


Figura 9. Micrografías de PLA con diferentes soluciones y flujos a 5000X: 1) solución A, DMF/DCM (10:90), 2) solución B, DMF/DCM (40:60), 3) solución C, acetona, a flujos de a) 0.8 mL/h, b) 1.2 mL/h, c) 1.6 mL/h.

Además de analizar la morfología también se realizaron mediciones de los diámetros los cuales se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Diámetros promedio de fibras de PLA.

Fibras de PLA	Diámetros promedio (μm)
Solución A	1.100
Solución B	0.364
Solución C	0.598

La solución A presentó los diámetros más grandes por arriba del micrómetro, debido al aumento de flujo que se estaba utilizando, es posible que el solvente no alcanzó a evaporarse rápidamente y esto afectó al tamaño de los diámetros. La solución B presentó los menores diámetros de $0.364\ \mu\text{m}$, la diferencia entre la solución A y B, es que B tiene una mayor cantidad de DMF, el cual tiene una conductividad eléctrica y constante dieléctrica muy alta en comparación con DCM, estas características aumentan las propiedades dieléctricas de la solución, favoreciendo la formación de fibras con menos estructuras defectuosas y con diámetros reducidos. La solución C presenta diámetros menores a $1\ \mu\text{m}$ y mayores a los de la solución B, se puede atribuir a su constante dieléctrica, es menor que la de DMF, pero mayor que la de DCM, al no tener una constante tan alta no se obtienen diámetros tan reducidos. Por lo tanto, se eligió seguir trabajando con la solución C debido a que las fibras presentaron buena morfología y el solvente utilizado era menos tóxico para las células, se evaporaba rápidamente, además su manipulación es más sencilla. Se decidió trabajar con esta solución en un cilindro rotatorio como colector con la finalidad de alinear la matriz polimérica utilizando como flujo $0.6\ \text{mL/h}$, debido a que a flujos más altos los diámetros eran mayores y se daba la formación de grumos. El voltaje seleccionado fue de $15\ \text{kV}$, a voltajes más altos las fibras eran más gruesas esto quiere decir, diámetros más grandes. Se eligió trabajar con una distancia de $15\ \text{cm}$, a distancias más elevadas la fibra presentaba defectos y aparición de grumos, por último, se aplicó un voltaje de $5\ \text{V}$ al cilindro para que girara. En la tabla 6 se resumen las condiciones seleccionadas. Kim y colaboradores en 2016 utilizaron el sistema de electrohilado con cilindro giratorio para la preparación de nanofibras alineadas de PLGA y poliuretano (PU) para conductos nerviosos. Los parámetros utilizados fueron: voltaje de $16\ \text{kV}$, distancia entre la punta de la aguja y el colector de $15\ \text{cm}$, flujo de $1\ \text{mL/h}$ y la velocidad de giro para el cilindro fue de $1000\ \text{rpm}$. La alineación de las fibras ayudo como guía para las células neurales y fueron capaces de lograr una mayor proliferación y migración celular en comparación con las nanofibras orientadas al azar. [54] Este método de procesamiento puede ser candidato prometedor para la fabricación de andamios para la ingeniería de tejidos. Los parámetros utilizados en este trabajo son muy similares a los utilizados en el estudio de Kim, por lo que se pretende obtener resultados favorables con respecto a la proliferación y migración celular.

Tabla 6. Condiciones óptimas para la preparación de fibras de PLA.

Parámetro	Valor óptimo
Solución C	10 mL acetona + 1 g PLA
Flujo	0.6 mL/h
Voltaje	15 kV
Distancia	15 cm

4.2 Extracción de Colágeno Soluble en Pepsina (CSP)

Al realizar el proceso de extracción de colágeno de tilapia se obtuvo una mezcla proteica de color grisáceo como se puede observar en la Figura 10, con olor débil a ácido acético y a pescado fresco. De 100 gramos de piel de tilapia se obtuvieron 24 gramos de colágeno liofilizado, el rendimiento de colágeno extraído se calculó basado en el peso del producto final obtenido (colágeno liofilizado) con respecto al peso inicial de las pieles, usando la siguiente ecuación:

$$Rendimiento (\%) = \frac{(Peso\ del\ colágeno\ liofilizado)}{(Peso\ de\ las\ pieles)} * 100$$

Por lo tanto, el rendimiento de nuestro colágeno fue del 24%. Silvera en 2018 utilizó tilapia roja para extraer colágeno, obteniendo un rendimiento de 56.29% en base seca, mientras que Quintero y Zapata en 2017 trabajaron con subproductos de tilapia roja, como la piel, escamas y espinas, para extraer colágeno soluble en ácido. El porcentaje de rendimiento de colágeno que obtuvieron para la piel fue de 15.57%, discuten que el porcentaje de colágeno puede variar debido a características como los diferentes procesos de extracción, las distintas especies utilizadas, las variaciones de lote a lote, el lugar de cultivo de los animales y la temperatura en su medio de crecimiento. [55,56] Gómez-Lizárraga y cols., obtuvieron colágeno soluble en pepsina a partir de tendón bovino con un rendimiento de 41.02%, en mamíferos el colágeno se encuentra en gran abundancia, esto podría ser la principal causa de la diferencia de resultado. [57] El procedimiento de extracción de colágeno soluble en

pepsina utilizada en este trabajo proporcionó mejores resultados en el rendimiento en comparación de colágeno soluble en ácido extraído por Quintero y Zapata.



Figura 10. Colágeno antes de liofilizar.

4.2.1 Análisis Proximal

La caracterización fisicoquímica del colágeno obtenido se realizó reportando contenido de humedad, grasa, cenizas y proteína total. Cada análisis se realizó por triplicado, en la Tabla 7 se muestran los resultados finales. El porcentaje obtenido para humedad fue de 1.84 ± 0.14 , es un porcentaje bajo, esto quiere decir que nuestro colágeno es estable y de buena calidad, para grasa fue de 1.13 ± 0.19 , también es bajo e indicador de una mejor calidad, para cenizas se obtuvo 5.04 ± 0.08 , es ligeramente elevado indicando la presencia de sales en la muestra y para proteína total se obtuvo un resultado de 72.07 ± 1.09 .

Quintero y Zapata obtuvieron colágeno a partir de subproductos de tilapia, ellos realizaron la caracterización de estos subproductos donde la piel sobresale con un alto contenido en porcentaje de proteína (82.27%). El extraer colágeno solo de la piel de tilapia nos proporcionó un muy buen resultado con un 72.07% de proteína comparado con otros subproductos como escamas y espinas, en las cuales se reportan valores de 67.96% y 55.54%, respectivamente. [55]

Tabla 7. Análisis proximal de CSP.

Muestra	Proteína (%)	Humedad (%)	Ceniza (%)	Grasa (%)
CSP	72.07 ± 1.09	1.84 ± 0.14	5.04 ± 0.08	1.13 ± 0.19

4.3 Condiciones Óptimas para la Preparación de Fibras de Electrohiladas de Colágeno

Para encontrar los parámetros ideales para la fabricación de las fibras electrohiladas de colágeno se utilizaron dos soluciones con diferente concentración en peso de colágeno, al 15% y 20%. La solución al 15% era muy poco viscosa, esto afectaba a la formación de las fibras, debido a que el solvente agua:ácido acético no se evaporaba y creaba poros en la superficie del colector, por lo que se decidió trabajar con la solución al 20%, donde la solución era un poco más viscosa, permitiendo la formación de las fibras en el colector. En el sistema de electrohilado es importante la viscosidad de la solución, debido a que una solución menos viscosa o muy diluida da como resultado que las fibras de polímero se deshagan en gotas antes de llegar al colector debido al efecto de la tensión superficial, de igual forma si la solución está muy concentrada entonces las fibras no se podrán formar debido a la alta viscosidad, lo que dificulta el paso de la solución a través del capilar.[41]

Para lograr una concentración al 20%, se pesó 1 g de colágeno y se disolvió en 0.5 mL de agua más 4.5 mL de ácido acético. Los parámetros utilizados fueron: flujo de 0.3 mL/h, voltaje de 15 kV, a flujos y voltajes más elevados la fibra presentaba aglomeraciones, la distancia elegida fue de 20 cm, a distancias menores el solvente no lograba evaporarse, por lo tanto, la formación de la fibra no se lograba. En la Tabla 8 se pueden observar las condiciones resumidas.

Tabla 8. Condiciones óptimas para la preparación de fibras de colágeno.

Parámetro	Valor óptimo
Solución	0.5 mL agua + 4.5 mL ácido acético + 1 g colágeno
Flujo	0.3 mL/h
Voltaje	15 kV
Distancia	20 cm

4.4 Modificación de la Superficie con Dopamina

Para modificar la superficie de la matriz polimérica y controlar la unión de las fibras de colágeno, las fibras de PLA fueron sumergidas en un buffer Tris a un pH de 8.5 que contenía 10 mg/ml de dopamina, debido a los grupos alquilamina y catecol que contiene la dopamina puede autopolimerizar en un pH alcalino (7.5 a 8.5), formando polidopamina. El recubrimiento con polidopamina en la fibra de PLA mostró un cambio de color, de blanco a ligeramente negro en la superficie (Figura 11), este cambio de color se podría decir que es indicativo que la polimerización de la dopamina ocurrió parcialmente, debido a que en algunas áreas de la fibra electrohilada, se muestran sin cambios de color.

Kwon y colaboradores en 2017 prepararon fibras electrohiladas de PLGA compuestas con colágeno e hidroxiapatita para regeneración de tejido óseo. Para el andamio puro de PLGA realizaron una modificación de superficie con dopamina que se encontraba en una solución alcalina, la dopamina autopolimerizó dentro de los poros y en la superficie del andamio. El recubrimiento con polidopamina mostró un cambio de marrón claro a marrón oscuro, este cambio de color fue considerado como una indicación primaria para la polimerización de dopamina mediante la oxidación de catecol a quinina. La intensidad del color marrón fue variando con respecto al tiempo y fue utilizado como indicador para evaluar la extensión de la dopamina depositada en el andamio de PLGA puro. [19]



Figura 11. Fibra de PLA recubierta por polidopamina.

4.5 Caracterización de Materiales

4.5.1 Morfología de Fibras de PLA, Colágeno, PLA/Colágeno y PLA + dopamina/Colágeno

Las micrografías de los andamios electrohilados se muestran en la Figura 12. La morfología de la fibra de PLA se puede observar en la Figura 12a. Las imágenes muestran que las fibras se encuentran bien formadas, sin cuentas; sin embargo, no se lograron alinear, presentaron una orientación al azar, debido a que el cilindro rotatorio necesita un voltaje muy alto para girar más rápido y que la fibra pueda alinearse alrededor de él. Kim utilizó un cilindro giratorio para la fabricación de nanofibras de PLGA alineadas. Se aplicó una velocidad de giro de 1000 rpm para lograr la alineación de las fibras. Los autores mencionan que la velocidad de rotación del colector es de gran importancia para la obtención de nanofibras alineadas, si la velocidad es demasiado lenta o rápida las nanofibras recolectadas tienden a romperse y desviarse de la alineación. [54]

La micrografía de colágeno se muestra en la Figura 12b, las fibras se lograron formar sin aglomeraciones, lisas y con orientación al azar. Li y colaboradores electrohilieron fibras compuestas de colágeno/hidroxiapatita para aplicaciones en ingeniería de tejido óseo. A manera de control, prepararon fibras de colágeno puro utilizando como disolvente una mezcla de etanol:agua y las analizaron por MEB, obteniendo una superficie altamente lisa, orientación al azar y un diámetro promedio aproximado a 700 nm. [58]

En la imagen 12c podemos observar la fibra híbrida de PLA/Colágeno, mostrando una morfología uniforme, lisa y de diámetros interconectados y en la imagen 12d se observa la fibra de PLA + dopamina/colágeno, presenta fibras lisas, sin cuentas o aglomeraciones, el recubrimiento no afecto la morfología de las fibras. Sadeghi en 2016 preparó fibras electrohiladas de PLGA, después modificó la superficie con hidrólisis alcalina y tratamiento químico, posteriormente fueron recubiertas con colágeno, la morfología de las fibras fue un aspecto liso, con orientación al azar, el recubrimiento no afecto la morfología, pero si aumentó el diámetro promedio de las fibras en comparación con el andamio de PLGA puro. [59]

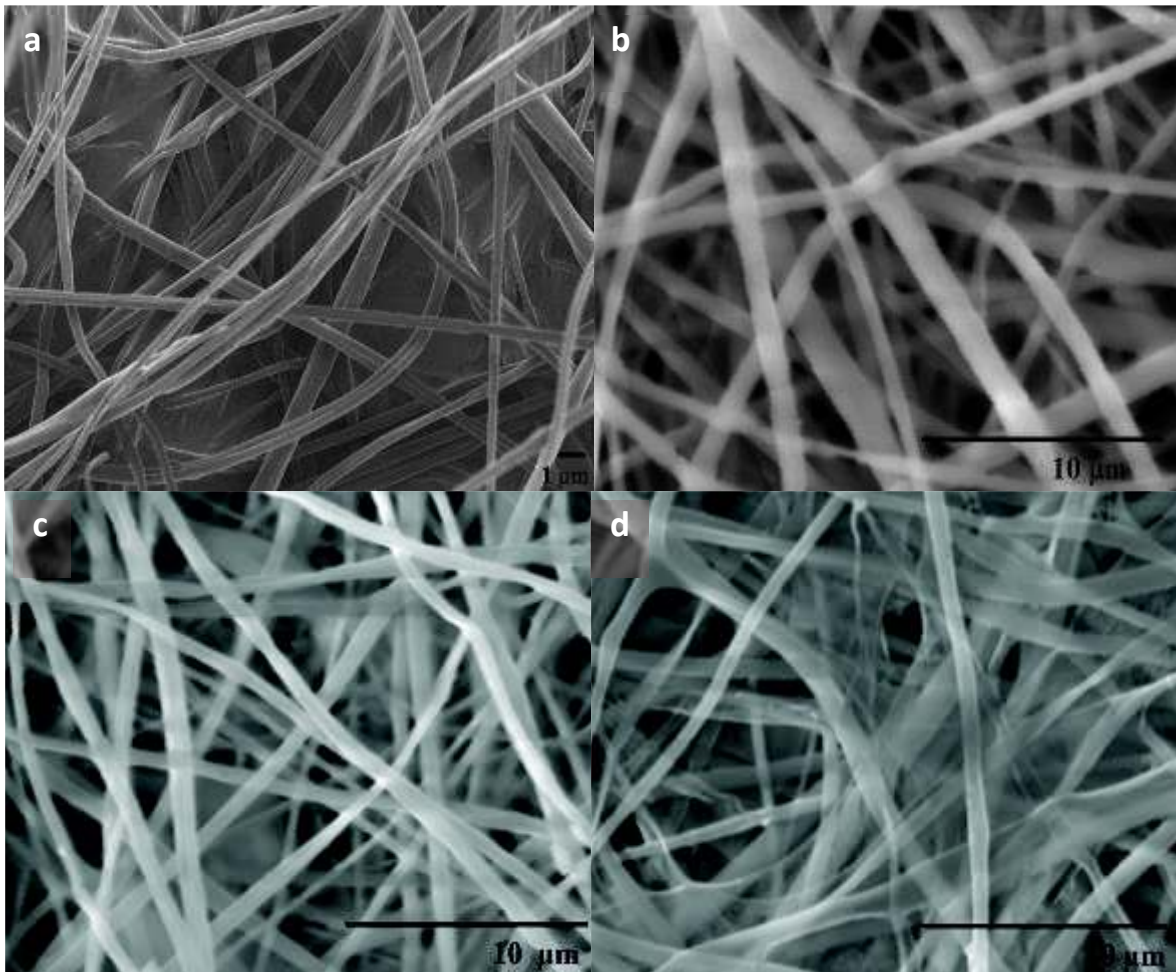


Figura 12. Micrografías de fibras electrohiladas a 5000X: a) PLA, b) colágeno, c) PLA/colágeno y d) PLA + dopamina/colágeno.

En la Figura 13 se presentan los histogramas con la distribución de diámetros para cada andamio. En la Figura 13a y 13b, podemos observar que el diámetro promedio para PLA fue de $0.560 \pm 0.10 \mu\text{m}$ y para colágeno $0.778 \pm 0.189 \mu\text{m}$, las fibras de colágeno tienen un mayor diámetro que la matriz polimérica de PLA. En la Figura 13c y 13d muestra los diámetros para las fibras híbridas sin tratamiento y con tratamiento de dopamina, respectivamente. Los diámetros obtenidos fueron de $0.657 \pm 0.190 \mu\text{m}$ para PLA/colágeno y de $0.645 \pm 0.187 \mu\text{m}$ para PLA + dopamina/colágeno. Al electrohilar colágeno arriba de una membrana de fibras de PLA disminuye el espacio disponible para seguir depositando colágeno en la superficie, por lo que se capta una cantidad más reducida de colágeno en la placa colectora. La dopamina recubre la superficie de la fibra de PLA mediante puentes de hidrogeno, los diámetros presentados (Figura 13c y 13d) confirman la presencia de colágeno en la superficie.

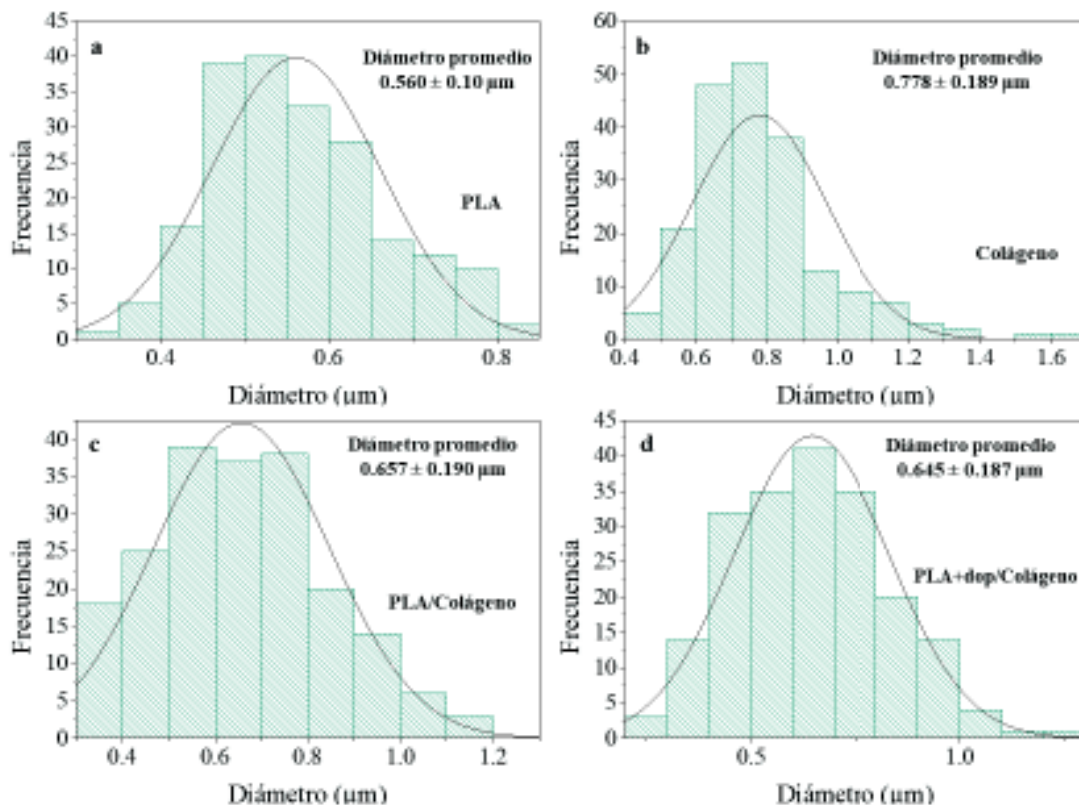


Figura 13. Histogramas de distribución de diámetro, a) PLA, b) colágeno, c) PLA/colágeno y d) PLA + dopamina/colágeno.

4.5.2 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier

La espectroscopía se utilizó para identificar la interacción entre el PLA y el colágeno en los andamios híbridos. La Figura 14 muestra los espectros de infrarrojo de las muestras electrohiladas. El espectro correspondiente para PLA en la Figura 14a muestra las señales características para este polímero a 2995 cm^{-1} y 2944 cm^{-1} se encuentran los estiramientos simétricos y asimétricos de los grupos CH_3 , a 1753 cm^{-1} corresponde al enlace $\text{C}=\text{O}$, a 1184 cm^{-1} y 1091 cm^{-1} pertenecen al estiramiento de los grupos $\text{C}-\text{O}$. La Figura 14d pertenece al espectro de colágeno mostrando sus señales particulares, a 3291 cm^{-1} se encuentra el grupo amida A debido al estiramiento $\text{N}-\text{H}$ en resonancia con sobretono de amida II, a 1634 cm^{-1} la amida I debido a las vibraciones de estiramiento de los grupos $\text{C}=\text{O}$, la amida II a 1546 cm^{-1} que se origina por el estiramiento $\text{C}-\text{N}$ y la flexión $\text{N}-\text{H}$ y la amida III a 1240 cm^{-1} asignada al estiramiento CO y vibración de unión de $\text{N}-\text{H}$. Los espectros correspondientes a PLA y colágeno coinciden con los reportados en la literatura. [8,23] El espectro para las fibras híbridas sin y con tratamiento de dopamina corresponde a la Figura 14b y 14c, los espectros muestran las señales características del colágeno, esto se debe a que se encuentra recubriendo la superficie de la fibra.

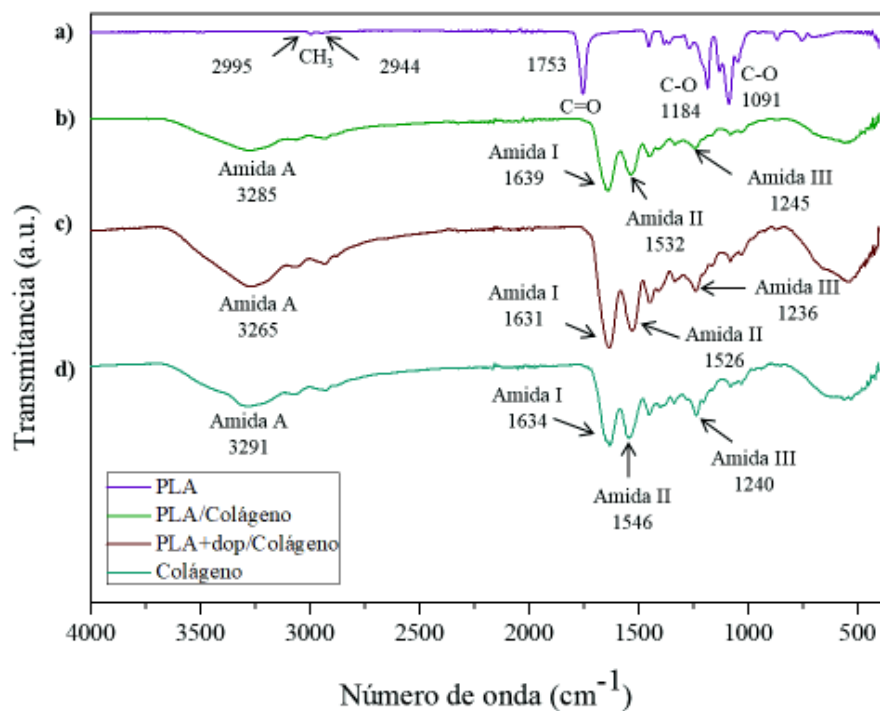


Figura 14. Espectro FTIR para fibras electrohiladas de a) PLA, b) PLA/colágeno, c) PLA + dopamina/colágeno y d) colágeno.

4.5.3 Análisis Termogravimétrico

Para evaluar la estabilidad de nuestros materiales, se realizó un análisis termogravimétrico, el cual registra la pérdida de masa de una muestra en la medida que se incrementa la temperatura bajo condiciones controladas de velocidad de calentamiento. En la Figura 15 se muestran las curvas de TGA de todos los andamios, PLA, Colágeno, PLA/Colágeno y PLA + dopamina/Colágeno.

El termograma correspondiente para PLA, muestra una degradación en una etapa debido a que es un polímero lineal por lo tanto la degradación comienza en la cadena principal, presenta una degradación inicial de 264.91°C y una degradación máxima de 343.59°C, los cuales coinciden con la literatura. Jandas y colaboradores estudiaron las propiedades térmicas del PLA obteniendo una temperatura inicial de 261.3°C y una degradación máxima de 349.4°C. [60]

El termograma para el colágeno presenta una degradación de pérdida de masa en 3 etapas, comenzando a 53.42°C, asociado con la liberación del contenido de agua de la muestra, la segunda etapa fue a 223.91°C se debe a la degradación de la estructura de la molécula de colágeno y la tercera a 410.23°C relacionado con la combustión de los componentes orgánicos residuales. Se obtuvieron residuos inorgánicos a 575.38°C. Plepis y colaboradores realizaron análisis térmicos para muestras de andamios de colágeno, obtuvieron una degradación en 3 etapas, la primera en el intervalo de 25°C a 200°C, la segunda entre 200°C y 400°C, para la tercer etapa entre 400°C y 650°C, por ultimo obtuvieron residuos a partir de 750°C. [61]

Los resultados para el andamio PLA/colágeno mostraron una degradación térmica en 3 etapas al igual que el colágeno puro, la primera etapa a 56.7°C, la segunda a 230.74°C, la tercera etapa se presentó a 382.08°C y los residuos inorgánicos a 579.48°C, la degradación de PLA ocurre entre 260°C y 350°C y se superpone con las etapas de colágeno, por lo que la degradación de los materiales se dan de manera individual, o mejor conocida como una degradación heterogénea, esto sucede cuando no hay una buena interacción entre los materiales. Por lo tanto, no hay buena estabilidad en el andamio, esto puede ser un problema al momento de utilizar el andamio en un sistema fisiológico, debido a que el colágeno se degradara de una manera más rápida impidiendo la proliferación celular.

Para el andamio de PLA+dopamina/colágeno se observa una degradación en un solo paso, la temperatura inicial fue de 254.27°C y de 351.32°C como temperatura de degradación final, al ocurrir una degradación homogénea, es decir, en una sola etapa en el andamio híbrido demuestra una buena interacción entre los materiales, se atribuye que la dopamina mejoró la estabilidad térmica del andamio en comparación con el andamio híbrido que no fue tratado previamente. Las ventajas de una buena estabilidad térmica en el andamio es que se degradara más lentamente en el sistema fisiológico, permitiendo que las células puedan proliferar y diferenciarse.

La Figura 16 corresponde a la DTG de los andamios, esto ayuda a detectar transformaciones que se superponen o que están asociadas con pérdida de masa deficiente e indican la temperatura de degradación máxima.

En la gráfica se observan los picos máximos de cada andamio, para PLA+dopamina/colágeno se logra observar un desplazamiento hacia la derecha con respecto al PLA, alcanzando un pico máximo de 337.13°C, esto confirma la estabilidad térmica que proporciona la dopamina.

El andamio híbrido previamente tratado con dopamina ayudó a que los materiales tuvieran una buena interacción entre ellos, además presentó una mejor estabilidad térmica, lo cual es de gran beneficio para ingeniería de tejidos, debido a que ayuda a que el andamio no se degrade rápidamente y pueda lograr su función.

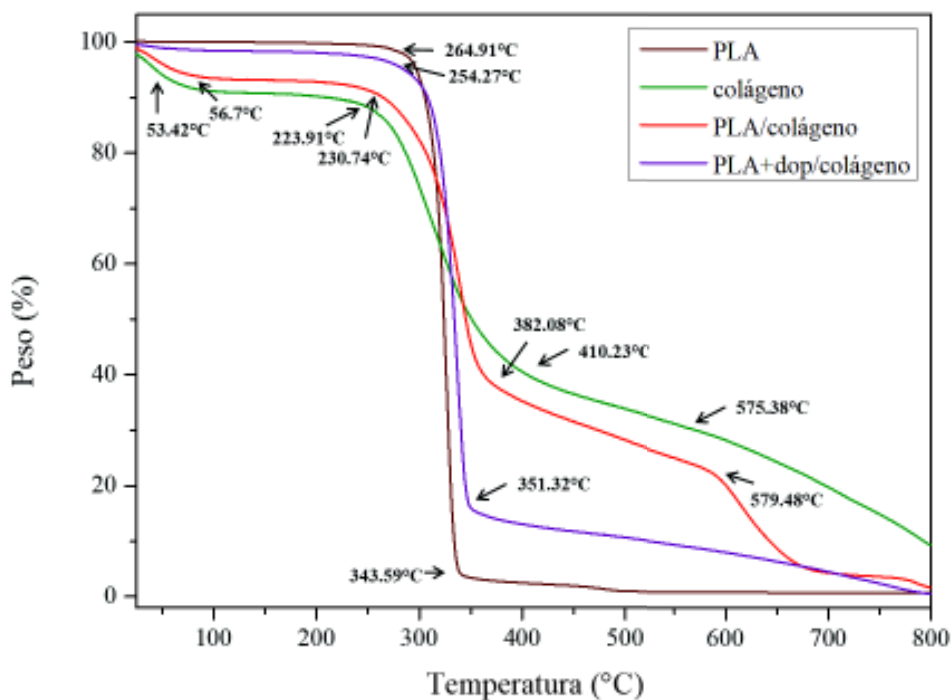


Figura 15. TGA de andamios electrohilados de PLA, colágeno, PLA/colágeno y PLA+dopamina/colágeno.

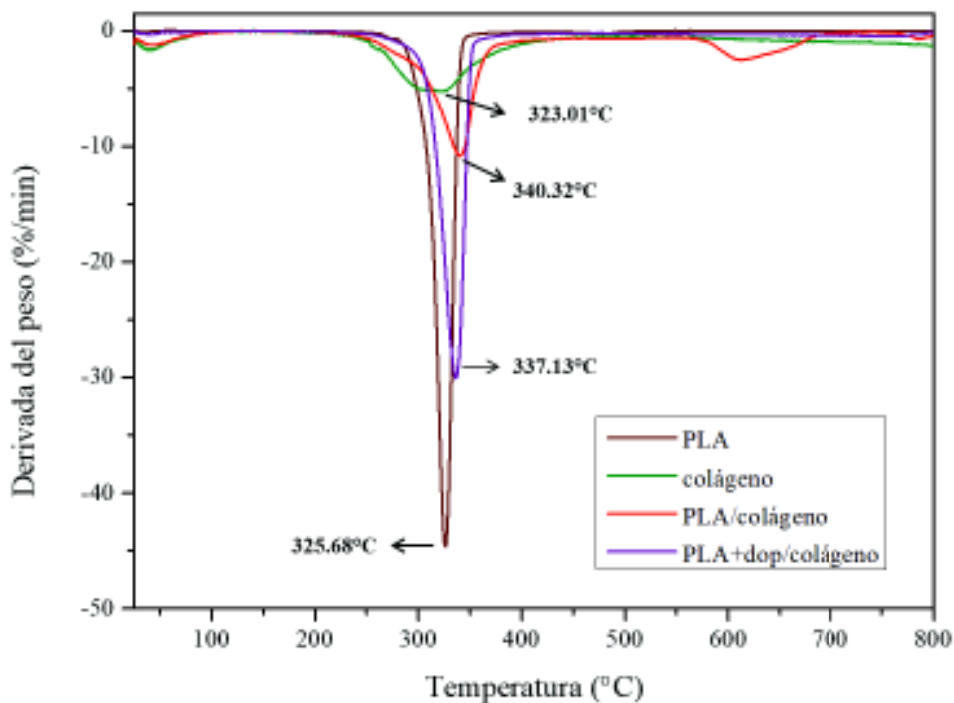


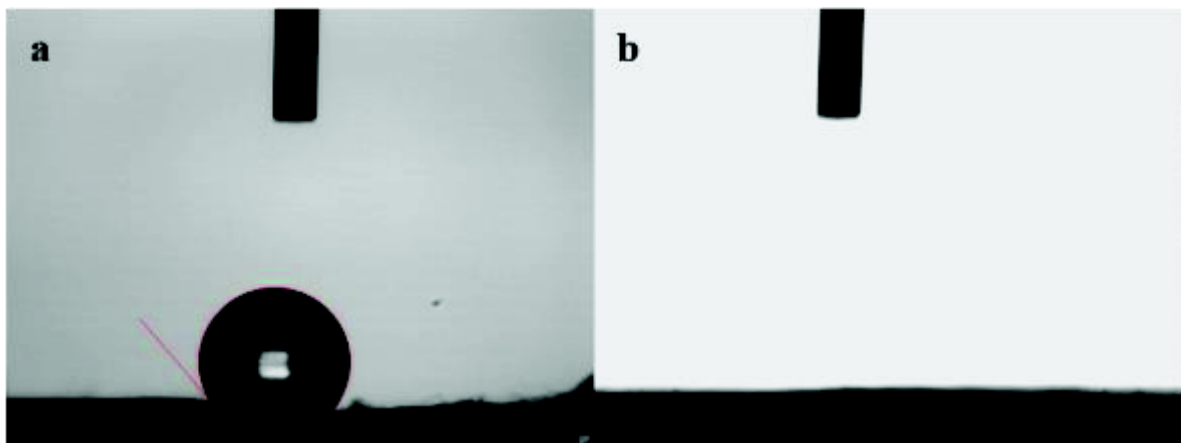
Figura 16. DTG para andamios electrohilados de PLA, colágeno, PLA/colágeno y PLA+dopamina/colágeno.

4.5.4 Angulo de Contacto

El comportamiento de la superficie de los andamios es una característica muy importante, debido a que, el grado de humectabilidad de la superficie puede afectar la adhesión, mantenimiento y proliferación celular [62].

Para evidenciar el tipo de interacción presente en las fibras se realizó la determinación de ángulo de contacto utilizando como solventes agua desionizada y etilenglicol (sólo para PLA). El PLA se puso en contacto con el agua y obtuvo un ángulo θ : $132.2^\circ \pm 3.8$ (Figura 17), lo cual demuestra que no tiene afinidad por el agua, es un material hidrofóbico, Magiera en su estudio reporta un ángulo θ : 113° para fibras de PLA. [18] Por el contrario, al poner en contacto la gota de etilenglicol con la superficie de PLA, se absorbió casi inmediatamente, es importante mencionar que el etilenglicol tiene un grupo etileno el cual es hidrofóbico por

lo que es más afín al PLA, además, el agua tiene una tensión superficial alta esto quiere decir que en el interior del líquido cada molécula se encuentra rodeada por otras moléculas en todas las direcciones, de forma que las fuerzas atractivas entre ellas se compensan, en cambio en la superficie de la gota al no existir más moléculas fuera, estas atraen con más fuerza formando una fina barrera, lo que produce que el agua no sea tan humectable o que no moje fácilmente al andamio, debido a que la tensión superficial de etilenglicol es mucho menor que la del agua, moja fácilmente la superficie del andamio. [49]



Material	Humectabilidad θ ($^{\circ}$)
PLA	132.2 ± 3.8

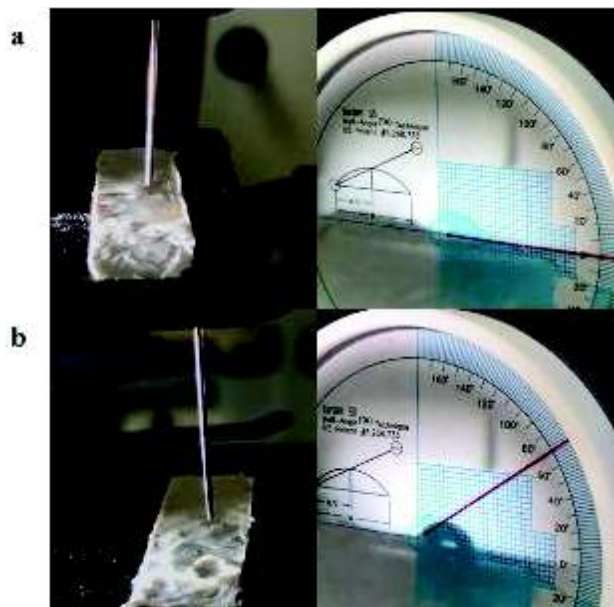
Figura 17. Ángulo de contacto para PLA, a) agua desionizada y b) etilenglicol.

Por otra parte, los polímeros naturales como el colágeno son hidrófilos debido a la presencia de grupos nitrogenados en su estructura. Al agregar un material hidrofílico a la matriz polimérica aumentará su afinidad por el agua, esto es conveniente para ser utilizado como soporte para el crecimiento celular. [62]

Para los andamios híbridos, se depositó una gota de agua desionizada en su superficie, en la Figura 18a se muestran las imágenes obtenidas para PLA/colágeno, como se puede observar su ángulo de contacto fue de $\theta: 0$, la gota se esparció por la superficie y esto es debido al colágeno que se encuentra en la parte exterior del andamio, el cual tiene grupos amina y grupos carboxilo que pueden formar puentes de hidrogeno con agua.

La Figura 18b corresponde al andamio PLA + dopamina/colágeno, presenta un ángulo de θ : $67^\circ \pm 2.65$, esto se debe a la presencia de polidopamina la cual se une a PLA mediante puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals y se une al colágeno mediante los grupos carboxilo libres de los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico formando enlaces amida, se deduce que no existe interacción entre el agua y la polidopamina, sin embargo, con el colágeno que se encuentra en la superficie puede formar puentes de hidrógeno, volviendo al andamio más humectable.

Los resultados obtenidos para los andamios híbridos sugieren hidrofiliidad y un soporte potencial para el crecimiento celular. Zadeh y colaboradores en 2019 desarrollaron andamios electrohilados de PLA y polifenoles de palma datilera para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Obtuvieron un ángulo de contacto para PLA puro de 140° y el ángulo para el andamio de PLA y polifenol se redujo a 98° . Los estudios de cultivo celular in vitro mostraron que los andamios eran biocompatibles y apoyaban la adhesión celular al aumentar la hidrofilia de los andamios. Por lo tanto, los autores mencionan que la mejora en la proliferación y viabilidad celular, son atribuidos al aumento de la hidrofilia de los andamios. [63]



Material	Humectabilidad θ ($^\circ$)
PLA/colágeno	0
PLA + dopamina/colágeno	$67^\circ \pm 2.65$

Figura 18. Ángulo de contacto para, a) PLA/colágeno y b) PLA + dopamina/colágeno.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Se determinaron las condiciones óptimas para la fabricación de membranas fibrosas de PLA, colágeno y PLA/colágeno mediante la técnica de electrohilado.

Se obtuvo colágeno tipo I a partir de pieles de tilapia, con un 72% de proteína pura.

Se logró modificar la superficie de la matriz polimérica de PLA con dopamina, exponiendo grupos funcionales adecuados para el recubrimiento con colágeno. Los andamios híbridos presentan un buen recubrimiento de colágeno en la superficie de la membrana electrohilada de PLA.

Los espectros FTIR comprobaron la presencia de los grupos funcionales de cada material puro, además los espectros para los andamios híbridos evidencian la presencia de colágeno en la superficie.

El PLA presentó una degradación en una etapa y el colágeno en 3 etapas, para los andamios híbridos el tratamiento con dopamina mejoró la interacción y la estabilidad térmica, esto es de beneficio para ser utilizado en ingeniería de tejidos, para que el material no tenga una degradación rápida, en comparación de utilizar un andamio de colágeno puro.

El uso de un polímero natural mejoró significativamente la humectabilidad del andamio de PLA. El ángulo de contacto para el andamio de PLA/colágeno mostró una mayor humectabilidad en su superficie, sin embargo, el andamio de PLA + dopamina/colágeno presentó un ángulo de 67° considerado como una superficie hidrofílica, puede utilizarse de una manera más eficiente por lo que se espera que se degrade en los tiempos adecuados para su uso potencial en ingeniería de tejidos.

RECOMENDACIONES

Se recomienda probar el material como sustrato en el cultivo de células mesenquimales y hacer pruebas de viabilidad, adhesión, proliferación y diferenciación celular para probar que el andamio puede ser útil en ingeniería de tejidos.

REFERENCIAS

- [1] L. Alberto, Biomédica Instituto Nacional de Salud, (2011).
- [2] M. Rosas-Peralta, F. Attie, Enfermedad cardiovascular. Primera causa de muerte en adultos de México y el mundo, *Arch. Cardiol. Mex.* 77 (2007) 91–93.
- [3] A.H. Nguyen, P. Marsh, L. Schmiess-Heine, P.J. Burke, A. Lee, J. Lee, H. Cao, Cardiac tissue engineering: state-of-the-art methods and outlook, *J. Biol. Eng.* 13 (2019) 57. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0185-0>.
- [4] C. Gálvez-Montón, C. Prat-Vidal, S. Roura, C. Soler-Botija, A. Bayes-Genis, Ingeniería tisular cardiaca y corazón bioartificial, *Rev. Española Cardiol.* 66 (2013) 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2012.11.013>.
- [5] I. Perea-Gil, C. Prat-Vidal, A. Bayes-Genis, In vivo experience with natural scaffolds for myocardial infarction: The times they are a-changin', *Stem Cell Res. Ther.* 6 (2015) 1–25. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0237-4>.
- [6] A. Eatemadi, H. Daraee, N. Zarghami, H. Melat Yar, A. Akbarzadeh, Nanofiber: Synthesis and biomedical applications, *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 44 (2016) 111–121. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.922568>.
- [7] S. Nemati, S. Kim, Y.M. Shin, H. Shin, Current progress in application of polymeric nanofibers to tissue engineering, *Nano Converg.* 6 (2019) 36. <https://doi.org/10.1186/s40580-019-0209-y>.
- [8] A.R. Sadeghi-avalshahr, M. Khorsand-Ghayeni, S. Nokhasteh, A.M. Molavi, H. Naderi-Meshkin, Synthesis and characterization of PLGA/collagen composite scaffolds as skin substitute produced by electrospinning through two different approaches, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 28 (2017) 14. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5789-z>.
- [9] Q. Jiang, N. Reddy, S. Zhang, N. Roscioli, Y. Yang, Water-stable electrospun collagen fibers from a non-toxic solvent and crosslinking system, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 101A (2013) 1237–1247. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34422>.
- [10] K. Chawla Editor, *Biomaterials for Tissue Engineering Methods and Protocols Methods in Molecular Biology* 1758, 2018. <http://www.springer.com/series/7651>.
- [11] T.M. McGloughlin, *Computational Modeling in Tissue Engineering*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-32563-2>.
- [12] N. Beheshtizadeh, N. Lotfibakhshaesh, Z. Pazhouhnia, M. Hoseinpour, M. Nafari, A review of 3D bio-printing for bone and skin tissue engineering: a commercial approach, *J. Mater. Sci.* 55 (2020) 3729–3749. <https://doi.org/10.1007/s10853-019-04259-0>.
- [13] M. Izadifar, M.E. Kelly, X. Chen, Engineering Angiogenesis for Myocardial Infarction Repair: Recent Developments, Challenges, and Future Directions, *Cardiovasc. Eng. Technol.* 5 (2014) 281–307. <https://doi.org/10.1007/s13239-014->

0193-7.

- [14] Y.G. Morales, Universidad de sonora, (2009).
- [15] H. Cai, C.Y. Chuang, C.L. Hawkins, M.J. Davies, Binding of myeloperoxidase to the extracellular matrix of smooth muscle cells and subsequent matrix modification, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57299-6>.
- [16] K.Y. Ye, L.D. Black, Strategies for Tissue Engineering Cardiac Constructs to Affect Functional Repair Following Myocardial Infarction, *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 4 (2011) 575. <https://doi.org/10.1007/s12265-011-9303-1>.
- [17] M. Farokhi, F. Jonidi Shariatzadeh, A. Solouk, H. Mirzadeh, Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: A Review, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 69 (2020) 230–247. <https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1562924>.
- [18] A. Magiera, J. Markowski, E. Menaszek, J. Pilch, S. Blazewicz, PLA-Based Hybrid and Composite Electrospun Fibrous Scaffolds as Potential Materials for Tissue Engineering, *J. Nanomater.* 2017 (2017) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2017/9246802>.
- [19] G.-W. Kwon, K.C. Gupta, K.-H. Jung, I.-K. Kang, Lamination of microfibrillar PLGA fabric by electrospinning a layer of collagen-hydroxyapatite composite nanofibers for bone tissue engineering, *Biomater. Res.* 21 (2017) 11. <https://doi.org/10.1186/s40824-017-0097-3>.
- [20] M.A. Teixeira, M.T.P. Amorim, H.P. Felgueiras, Poly (Vinyl Alcohol) -Based Nanofibrous Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications, (2020).
- [21] W. Jia, M. Li, H. Weng, G. Gu, Z. Chen, Design and comprehensive assessment of a biomimetic tri-layer tubular scaffold via biodegradable polymers for vascular tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 110 (2020) 110717. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110717>.
- [22] M.J. Fullana, G.E. Wnek, Electrospun collagen and its applications in regenerative medicine, *Drug Deliv. Transl. Res.* 2 (2012) 313–322. <https://doi.org/10.1007/s13346-012-0087-x>.
- [23] A.A. Leyva-Verduzco, M.M. Castillo-Ortega, L.H. Chan-Chan, E. Silva-Campa, R. Galaz-Méndez, R. Vera-Graziano, J.C. Encinas-Encinas, T. Del Castillo-Castro, D.E. Rodríguez-Félix, H. del C. Santacruz-Ortega, I. Santos-Sauceda, Electrospun tubes based on PLA, gelatin and genipin in different arrangements for blood vessel tissue engineering, *Polym. Bull.* (2019). <https://doi.org/10.1007/s00289-019-03057-7>.
- [24] H. Li, Z. Wang, H. Zhang, Z. Pan, Nanoporous PLA/(Chitosan Nanoparticle) Composite Fibrous Membranes with Excellent Air Filtration and Antibacterial Performance, *Polymers (Basel)*. 10 (2018) 1085. <https://doi.org/10.3390/polym10101085>.
- [25] R.D. Abbott, D.L. Kaplan, Engineering Biomaterials for Enhanced Tissue Regeneration, *Curr. Stem Cell Reports.* 2 (2016) 140–146. <https://doi.org/10.1007/s40778-016-0039-3>.

- [26] A. Bharadwaz, A.C. Jayasuriya, Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration, *Mater. Sci. Eng. C*. 110 (2020) 110698. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110698>.
- [27] B.P. Chan, K.W. Leong, Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations, *Eur. Spine J.* 17 (2008) 467–479. <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>.
- [28] M.A. Ghalia, Y. Dahman, Biodegradable poly(lactic acid)-based scaffolds: synthesis and biomedical applications, *J. Polym. Res.* 24 (2017) 74. <https://doi.org/10.1007/s10965-017-1227-2>.
- [29] M. Eldessouki, Solution-based synthesis of a four-arm star-shaped poly (L-lactide), 19 (2016) 180–192.
- [30] J. Bella, D.J.S. Hulmes, Fibrillar Collagens, in: *Subcell. Biochem.*, 2017: pp. 457–490. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_14.
- [31] J.M. Pachence, M.P. Bohrer, J. Kohn, Biodegradable Polymers, in: *Princ. Tissue Eng.*, Elsevier, 2007: pp. 323–339. <https://doi.org/10.1016/B978-012370615-7/50027-5>.
- [32] D.I. Zeugolis, S.T. Khew, E.S.Y. Yew, A.K. Ekaputra, Y.W. Tong, L.-Y.L. Yung, D.W. Huttmacher, C. Sheppard, M. Raghunath, Electro-spinning of pure collagen nano-fibres – Just an expensive way to make gelatin?, *Biomaterials*. 29 (2008) 2293–2305. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.02.009>.
- [33] F. Rodríguez, L. Morán, G. González, E. Troncoso, R.N. Zúñiga, Collagen extraction from mussel byssus: a new marine collagen source with physicochemical properties of industrial interest, *J. Food Sci. Technol.* 54 (2017) 1228–1238. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2566-z>.
- [34] B. Li, T. Webster, *Orthopedic Biomaterials*, Springer International Publishing, Cham, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-73664-8>.
- [35] J. VENUGOPAL, L. MA, T. YONG, S. RAMAKRISHNA, In vitro study of smooth muscle cells on polycaprolactone and collagen nanofibrous matrices, *Cell Biol. Int.* 29 (2005) 861–867. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.03.026>.
- [36] W. He, T. Yong, W.E. Teo, Z. Ma, S. Ramakrishna, Fabrication and Endothelialization of Collagen-Blended Biodegradable Polymer Nanofibers: Potential Vascular Graft for Blood Vessel Tissue Engineering, *Tissue Eng.* 11 (2005) 1574–1588. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.1574>.
- [37] O. de las N.U. para la A. y la A.A. proximal. FAO, *Análisis proximal*, (2017) 1–15.
- [38] C.J. Bettinger, J.T. Borenstein, R. Langer, Micro- and Nanofabricated Scaffolds, in: *Princ. Tissue Eng.*, Elsevier, 2007: pp. 341–358. <https://doi.org/10.1016/B978-012370615-7/50028-7>.
- [39] J. Venugopal, S. Low, A.T. Choon, S. Ramakrishna, Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 84B (2008) 34–48. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30841>.

- [40] K.C. Gupta, A. Haider, Y. Choi, I. Kang, Nanofibrous scaffolds in biomedical applications, *Biomater. Res.* 18 (2014) 5. <https://doi.org/10.1186/2055-7124-18-5>.
- [41] L. Sánchez, L. Rodriguez, M. López, Electrospinning: la era de las nanofibras, *Rev. Iberoam. Polímeros.* 14 (2013) 10–27.
- [42] V. Cirillo, V. Guarino, M.A. Alvarez-Perez, M. Marrese, L. Ambrosio, Optimization of fully aligned bioactive electrospun fibers for “in vitro” nerve guidance, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 25 (2014) 2323–2332. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5214-4>.
- [43] B. Allende Sánchez, Modificación De Superficies Con Polidopamina, (2012). [http://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/4162%0Ahttp://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/4162/1/TFM_Beatriz Allende Sánchez.pdf](http://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/4162%0Ahttp://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/4162/1/TFM_Beatriz%20Allende%20Sánchez.pdf).
- [44] C.-C. Lin, S.-J. Fu, Osteogenesis of human adipose-derived stem cells on poly(dopamine)-coated electrospun poly(lactic acid) fiber mats, *Mater. Sci. Eng. C.* 58 (2016) 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.009>.
- [45] W. Han, H. Jiao, D. Fox, Scanning Electron Microscopy, in: Springer Tracts Mod. Phys., 2018: pp. 35–68. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0454-5_2.
- [46] L. Vinet, A. Zhedanov, A “missing” family of classical orthogonal polynomials, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2010) 7250–7257. <https://doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201>.
- [47] I. Osteoarthritis, V. Delamination, V. Wear, I.F. Energy, I. Subjected, *Encyclopedia of Tribology*, Springer US, Boston, MA, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92897-5>.
- [48] C. De Blasio, *Fundamentals of Biofuels Engineering and Technology*, Springer International Publishing, Cham, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-11599-9>.
- [49] Á. Rodríguez, Estudio del ángulo de contacto y de la mojabilidad a alta temperatura de fases líquidas en la sinterización de metales, (2010) 114. http://e-archivo.uc3m.es/bitstream/handle/10016/10046/PFC_Alvaro_Rodriguez_Garcia-Cebadera-.pdf?sequence=1.
- [50] W. Liu, C. Huang, X. Jin, Electrospinning of Grooved Polystyrene Fibers: Effect of Solvent Systems, *Nanoscale Res. Lett.* 10 (2015). <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0949-5>.
- [51] C.H. Lee, H.J. Shin, I.H. Cho, Y.-M. Kang, I.A. Kim, K.-D. Park, J.-W. Shin, Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast, *Biomaterials.* 26 (2005) 1261–1270. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.037>.
- [52] M. Li, M.J. Mondrinos, M.R. Gandhi, F.K. Ko, A.S. Weiss, P.I. Leikes, Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering, *Biomaterials.* 26 (2005) 5999–6008. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.030>.
- [53] T.J. Collins, ImageJ for microscopy, *Biotechniques.* 43 (2007) S25–S30. <https://doi.org/10.2144/000112517>.

- [54] J.I. Kim, T.I. Hwang, L.E. Aguilar, C.H. Park, C.S. Kim, A Controlled Design of Aligned and Random Nanofibers for 3D Bi-functionalized Nerve Conduits Fabricated via a Novel Electrospinning Set-up, *Sci. Rep.* 6 (2016) 23761. <https://doi.org/10.1038/srep23761>.
- [55] J. Quintero, J.E. Zapata, Optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis spp*) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta, *Inf. Tecnol.* 28 (2017) 109–120. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000100011>.
- [56] M.D. Silvera, D.E.I. Agroindustrial, Universidad Nacional Micaela Bastidas De Apurímac Facultad De Ingeniería Escuela Profesional De Ingeniería Agroindustrial, (2018).
- [57] K. Gómez-Lizárraga, C. Piña-Barba, N. Rodríguez-Fuentes, C. Universitaria, Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino, *Superf. y Vacío.* 24 (2011) 137–140.
- [58] Z. Li, Y. Zhou, H. Yao, J. Wang, D. Wang, Q. Liu, Greener synthesis of electrospun collagen/hydroxyapatite composite fibers with an excellent microstructure for bone tissue engineering, *Int. J. Nanomedicine.* 10 (2015) 3203. <https://doi.org/10.2147/IJN.S79241>.
- [59] A.R. Sadeghi, S. Nokhasteh, A.M. Molavi, M. Khorsand-Ghayeni, H. Naderi-Meshkin, A. Mahdizadeh, Surface modification of electrospun PLGA scaffold with collagen for bioengineered skin substitutes, *Mater. Sci. Eng. C.* 66 (2016) 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.073>.
- [60] P.J. Jandas, S. Mohanty, S.K. Nayak, Thermal properties and cold crystallization kinetics of surface-treated banana fiber (BF)-reinforced poly(lactic acid) (PLA) nanocomposites, *J. Therm. Anal. Calorim.* 114 (2013) 1265–1278. <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3102-7>.
- [61] A.M.D. Plepis, T.M. de Batista, V.C.A. Martins, Thermal Behavior of in Vitro Mineralized Anionic Collagen Matrices, *J. Therm. Anal. Calorim.* 95 (2009) 945–949.
- [62] L. Liliana, C. Bernardo, S. Gustavo, S. Ingrid, Electrospun poly (ϵ -caprolactone)/ collagen scaffolds with potential use for skin regeneration, *Cienc. En Desarro.* 10 (2019).
- [63] K.M. Zadeh, A.S. Luyt, L. Zarif, R. Augustine, A. Hasan, M. Messori, M.K. Hassan, H.C. Yalcin, Electrospun polylactic acid/date palm polyphenol extract nanofibres for tissue engineering applications, *Emergent Mater.* 2 (2019) 141–151. <https://doi.org/10.1007/s42247-019-00042-8>.

ANEXOS

Congresos

- Participación en el XIII Coloquio Bienal y II Coloquio Internacional en Ciencia de Materiales: desafíos en salud y ambiente, en la Universidad de Sonora en 2019 con el tema “Preparación y Caracterización de Fibras Electrohiladas de Poli (Ácido-Láctico) con Aplicación Potencial en Ingeniería de Tejidos” modalidad poster.
- Participación en el XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México A.C. 2019 de la Universidad Veracruzana, en Boca del Río, Veracruz con el tema “Preparación y Caracterización de Fibras Electrohiladas de Poli (Ácido-Láctico) con Aplicación Potencial en Ingeniería de Tejidos” modalidad poster.
- Participación en la XXIV Reunión Universitaria de Investigación en Materiales (RUIM 2019) en la Universidad de Sonora, con el tema “Preparación y Caracterización de Fibras Electrohiladas de Poli (Ácido-Láctico) con Aplicación Potencial en Ingeniería de Tejidos” modalidad poster.

Estancias

- Estancia en Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Unidad Querétaro, en el grupo de trabajo del Dr. Rafael Ramírez Bon, durante el período, 1ro de julio del 2019 al 02 de agosto del 2019.