

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

DIVISION DE INGENIERIA

Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FIBRAS COMPOSITAS  
ELECTROHILADAS DE PLA E HIDROXIAPATITA CON APLICACIÓN  
POTENCIAL EN EL SECTOR SALUD.



**TESIS**

Que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIA DE MATERIALES**

Presenta:

**Q.B.C. Guadalupe de Jesus Bojorquez Guerrero**

Hermosillo, Sonora.

Julio 2021

# 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

*A mi padre:*

*Que hasta el cielo le dedico este y todos mis logros.*

*A mi madre:*

*Que ha estado conmigo a cada paso brindándome su apoyo.*

*A mi familia:*

*Que me ha brindado su apoyo y animado a continuar con mi  
formación académica.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigación de Polímeros y Materiales, en especial al área de Polímeros por aceptarme en el programa de posgrado y por permitirme hacer uso de las instalaciones para desarrollar mi proyecto de tesis. Así como también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por la beca que me fue otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Agradezco a la Dra. Lorena Armenta Villegas por su confianza, su apoyo, sus asesorías y su disponibilidad para sacar adelante este proyecto.

Agradezco a la Dra. Lerma Hanaiy Chan Chan Catedrática CONACyT integrante de la Academia de Biofísica y Fluidos Complejos del Departamento de Física de la Universidad de Sonora por la colaboración realizada y por permitirme hacer uso de las instalaciones del Laboratorio de Biofísica Celular, así como también por la asesoría brindada para el desarrollo de los experimentos de viabilidad celular y pruebas micromecánicas.

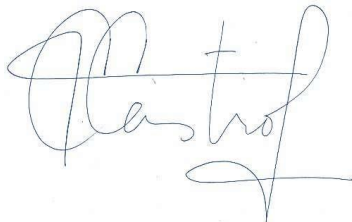
Agradezco a la Dra. Astrid Lorena Giraldo Betancur Catedrática CONACyT integrante del grupo de Biocerámicos de CINVESTAV por la colaboración realizada y proporcionar la hidroxiapatita y biohidroxiapatita utilizada para la obtención de las fibras, además de su asesoría y disponibilidad.

Agradezco al Dr. Diego German Espinosa Arbeláez y a la Dirección de Fabricación Aditiva y Materiales (FADMAT) de CIDESI unidad Querétaro, por las facilidades brindadas para la realización de análisis de materiales obtenidos durante el desarrollo de este proyecto.

## **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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Castro', with a stylized flourish at the end.

**Dra. Teresa del Castillo Castro**

**Jefe del Departamento**

## VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría de Guadalupe de Jesús Bojórquez Guerrero 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.



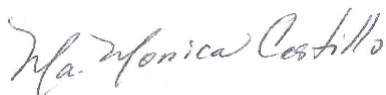
---

Dra. Hisila del Carmen Santacruz Ortega  
Presidente



---

Dra. Lorena Armenta Villegas  
Secretario



---

Dra. María Mónica Castillo Ortega  
Sinodal



---

Dra. Lerma Hanay Chan Chan  
Sinodal



---

Dra. Astrid Lorena Giraldo Betancur  
Sinodal Externo

Contenido	
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	3
<b>Objetivo General</b> .....	3
<b>Objetivos Particulares</b> .....	3
<b>ANTECEDENTES</b> .....	4
<b>Ingeniería de tejidos</b> .....	4
<b>Ingeniería de tejido óseo</b> .....	4
<b>Polímeros</b> .....	8
<b>Biopolímeros</b> .....	9
<b>Ácido poliláctico (PLA)</b> .....	10
<b>Síntesis de PLA</b> .....	10
<b>Hidroxiapatita</b> .....	12
<b>Materiales compósitos</b> .....	13
<b>Técnica de electrohilado</b> .....	14
<b>EXPERIMENTAL</b> .....	17
<b>Metodología</b> .....	17
<b>Preparación de soluciones</b> .....	17
<b>Tratamiento de sonicación a Hidroxiapatita</b> .....	17
<b>Tratamiento químico a Hidroxiapatita</b> .....	18
<b>Electrohilado</b> .....	18
<b>Caracterización de las nanofibras</b> .....	19
<b>Microscopía electrónica de barrido -Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (MEB-EDS)</b> .....	19
<b>Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	19
<b>Difracción de Rayos X</b> .....	20
<b>Análisis termogravimétrico (TGA)</b> .....	20
<b>Pruebas Micromecánicas</b> .....	20
<b>Cultivo celular <i>in vitro</i></b> .....	21
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	25

<b>Caracterización de las fibras electrohiladas</b> .....	25
<b>Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	30
<b>Difracción de Rayos X</b> .....	33
<b>Análisis Termogravimétrico (TGA)</b> .....	35
<b>Pruebas Micromecánicas</b> .....	37
<b>Cultivo celular <i>in vitro</i></b> .....	38
<b>CONCLUSIONES</b> .....	48
<b>PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES</b> .....	50
<b>REFERENCIAS</b> .....	51



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de Electrohilado.	15
Tabla 2. Formulaciones de las fibras electrohiladas.	19
Tabla 3. Diámetros obtenidos de las fibras electrohiladas.	27
Tabla 4. Propiedades mecánicas.	38
Tabla 5. Comparación de diámetros de las fibras electrohiladas	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Composición química del ácido poliláctico (PLA).....	10
Figura 2	Polimerización del PLA por policondensación.....	11
Figura 3	Polimerización del PLA por apertura de anillo.....	11
Figura 4	Estructura de la hidroxiapatita.....	13
Figura 5	Esquema representativo del proceso de electrohilado.....	16
Figura 6	Micrográficas de las fibras electrohiladas. (A) y (B) sólo PLA, (C) y (D) HAc SON, (E) y (F) HAc TQ, (G) y (H) bHA SON, (I) y (J) bHA TQ, barras marcadoras de 30 $\mu\text{m}$ y 6 $\mu\text{m}$ .....	27
Figura 7	Micrográficas EDS y mapeo elemental de las fibras de B-HAp A, B y C con tratamiento de sonicación y D, E y F con tratamiento químico.....	28
Figura 8	Mapeo elemental de las fibras electrohiladas de PLA y bHASON.....	29
Figura 9	Mapeo elemental de las fibras electrohiladas de PLA y bHATQ.....	29
Figura 10	Espectro EDS para fibras de PLA y B-HAp con tratamiento de sonicación.....	30
Figura 11	Espectro EDS para fibras de PLA y B-HAp con tratamiento de químico.....	30
Figura 12	Espectro FTIR de fibras electrohiladas donde a) PLA, b) PLA-bHASON, c) PLA-bHATQ, d) PLA-HAcSON y e) PLA-HAcTQ.	31
Figura 13	Espectros deconvolucionados de la Figura 7 de las fibras electrohiladas que contienen HAp.....	32
Figura 14	Representación de la reacción del tratamiento químico dado a la HAp.....	33
Figura 15	Patrón de Difracción de Rayos X de las fibras electrohiladas.	35
Figura 16	a) Termogramas y b) DTG de: Fibras de PLA, bHASON, bHATQ, HAcSON, y HAcTQ haciendo un barrido de temperatura de 10 $^{\circ}\text{C}$ por min desde 25-900 $^{\circ}\text{C}$ en atmosfera de Nitrógeno.....	36
Figura 17	Evaluación de citotoxicidad por contacto directo 1 de las distintas formulaciones de las fibras electrohiladas y el control sin fibras mediante prueba de resazurina con una densidad celular de 5,000 células por pozo.....	38
Figura 18	Evaluación de citotoxicidad por contacto directo 2 de las distintas formulaciones de las fibras electrohiladas y el control sin fibras mediante prueba de resazurina con una densidad celular de 10,000 células por pozo.....	39

Figura 19	Extractos de las fibras electrohiladas en sus distintas formulaciones antes de filtrar.....	40
Figura 20	Imágenes del microscopio optico invertido.de la evaluación de citotoxicidad de extractos de las fibras electrohiladas en el pocillo de control sin células. (A) cosecha de células, (B) día 1 de cultivo celular, (C) día 2 de cultivo celular y (D) día 3 de cultivo celular.....	41
Figura 21	Evaluación de citotoxicidad de extractos de las distintas formulaciones de las fibras electrohiladas en el día 1 mediante prueba de resazurina.....	42
Figura 22	Evaluación de citotoxicidad de extractos de las distintas formulaciones de las fibras electrohiladas en el día 2 mediante prueba de resazurina.....	43
Figura 23	Evaluación de citotoxicidad de extractos de las distintas formulaciones de las fibras electrohiladas en el día 3 mediante prueba de resazurina.....	43
Figura 24	Imágenes de MEB de las fibras electrohiladas después del día 1 de cultivo celular. (A) y (B) sólo PLA, (C) y (D) HAc SON, (E) y (F) HAc TQ, (G) y (H) bHA SON, (I) y (J) bHA TQ, barras marcadoras de 30 $\mu\text{m}$ y 6 $\mu\text{m}$ .....	45
Figura 25	Imágenes de MEB de las fibras electrohiladas después del día 2 de cultivo celular. (A) y (B) sólo PLA, (C) y (D) HAcSON, (E) y (F) HAcTQ, (G) y (H) bHASON, (I) y (J) bHATQ, barras marcadoras de 30 $\mu\text{m}$ y 6 $\mu\text{m}$ .....	46
Figura 26	Imágenes de MEB de las fibras electrohiladas después del día 3 de cultivo celular. (A) y (B) sólo PLA, (C) y (D) HAcSON, (E) y (F) HAcTQ, (G) y (H) bHASON, (I) y (J) bHATQ, barras marcadoras de 30 $\mu\text{m}$ y 6 $\mu\text{m}$ .....	46

## RESUMEN

Actualmente las prótesis óseas son altamente utilizadas en el área de la salud, fabricadas de metales como titanio y sus aleaciones. Algunas de las desventajas de estos materiales son la integración de manera pasiva con el hueso, debido a su naturaleza bio-inerte y el aflojamiento de la prótesis y su subsecuente falla. Debido a esto, se ha buscado la implementación de un material compuesto de PLA e hidroxiapatita, ya que el PLA es un polímero biocompatible y biodegradable, el cual es muy utilizado en la ingeniería de tejidos debido a estas propiedades; mientras que la HAp es ampliamente utilizada debido a sus cualidades de bioactividad, biocompatibilidad, osteoconducción, alta resistencia a la compresión, estabilidad y no toxicidad. En este proyecto se sintetizaron fibras electrohiladas de PLA e hidroxiapatita, generando así fibras compuestas, las cuales tendrán potencial aplicación al sector salud y representan una posible alternativa para la obtención de prótesis de titanio funcionalizadas con material de origen natural, como los huesos de bovinos. Se evaluó la bioactividad, así como la biocompatibilidad de fibras electrohiladas de PLA y bio-hidroxiapatita obtenida a partir de hueso de res, las cuales se compararon con fibras de PLA e hidroxiapatita comercial (C-HAp) esperando resultados semejantes o incluso una mejoría en las que contienen bio-hidroxiapatita (B-HAp). Se caracterizaron las fibras compuestas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), Difracción de Rayos X (DRX), propiedades mecánicas, Análisis Termogravimétrico (TGA), y viabilidad celular para hacer una comparación tanto en el uso de ambas hidroxiapatitas, como también su integración en las fibras electrohiladas.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el cuerpo humano se puede ver afectado por diferentes padecimientos como enfermedades, lesiones o traumatismos no reversibles, los cuales necesitan una gran variedad de tratamientos para hacer posible su reparación, reemplazo o regeneración. Para la regeneración de tejido óseo, en comparación con otros tipos de tejido, es más difícil y, por lo tanto, en su mayoría se necesita de tratamientos restauradores como distintos injertos o implantes metálicos para llevarse a cabo (Martin-Piedra A, 2019). Por estas razones la ingeniería de tejidos ha buscado otras opciones como la implementación de biomateriales.

En la ingeniería de tejidos, las diferentes estructuras y propiedades de los andamios son de vital importancia para el control de actividad de las células de interés, ya que los andamios deben tener compatibilidad con los tejidos que los rodean y también contar con sitios para que se lleve a cabo la adhesión celular. (Kwak, S., et al., 2016). En la fabricación de estos andamios, se encuentra el electrohilado como la técnica más aceptable, así como una de las más utilizadas ya que es una técnica versátil, económica y con una gran facilidad de operación (Robles-García, M. A. et al., 2014).

La técnica de electrohilado es una técnica versátil y fácil de utilizar, en la que se pueden producir fibras a diferentes escalas, tanto nano como micrométricas, las cuales imitan una matriz extracelular o bien sirven como un andamio en la ingeniería de tejidos. La versatilidad de esta técnica se debe a los materiales que se pueden utilizar, polímeros que pueden ser naturales, sintéticos o compuestos, además que a estos diferentes polímeros se le pueden integrar una gran variedad de materiales y por diferentes métodos. En el proceso de electrohilado, se pueden ajustar varios parámetros, produciendo así una gran variedad de fibras con diferentes morfologías y, por lo tanto, también aplicación. Los procesos de control se pueden dividir en estos diferentes parámetros de la solución: viscosidad, concentración del polímero,

conductividad y distancia de la punta de la jeringa hasta el colector metálico (Castro M., 2017).

El ácido poliláctico (PLA) es un biopolímero termoplástico obtenido a partir de la polimerización del ácido láctico. El PLA es altamente utilizado en la actualidad debido a sus propiedades, tales como biodegradabilidad y biocompatibilidad. Debido a su biodegradabilidad, el PLA es utilizado en diversas aplicaciones en medicina, industria alimentaria, textil, cosméticos y otras. En medicina, el PLA es utilizado debido a que se asimila por el organismo y, por lo tanto, sus aplicaciones son múltiples, tales como ortodoncia, oftalmología, traumatología y otras ramas de la medicina. Un campo para destacar en el cual es ampliamente utilizado es en la ingeniería de tejidos (Li, G. et al., 2020).

La hidroxiapatita es un fosfato de calcio que se encuentra entre las cerámicas que es altamente estudiado, ya que en áreas de la medicina como la ortopedia y odontología se han estudiado materiales que demuestran su biocompatibilidad, la cual permite el crecimiento óseo alrededor del material implantado en un corto periodo de tiempo, por lo cual la hidroxiapatita se considera como material a integrar en prótesis e implantes óseos (Reis, P. R. S., 2018).

En este proyecto se sintetizaron fibras electrohiladas de PLA e hidroxiapatita, generando así fibras compositas las cuales tendrán potencial aplicación al sector salud y representan una posible alternativa para la obtención prótesis de titanio funcionalizadas con material de origen natural, como los huesos de bovinos.

Se evaluó la bioactividad, así como la biocompatibilidad de hidroxiapatita obtenida a partir de hueso de res (bio-hidroxiapatita), la cual se comparó con hidroxiapatita comercial esperando resultados semejantes o incluso una mejoría en el uso de la bio-hidroxiapatita. Se caracterizaron las fibras compositas micrométricas mediante microscopia electrónica de barrido (MEB), espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), difracción de rayos X, propiedades mecánicas, análisis termogravimétrico (TGA) y se estudió la viabilidad celular (Citotoxicidad y adhesión) de las fibras electrohiladas para hacer una comparación tanto en ambas hidroxiapatitas, como también su integración en las fibras electrohiladas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Sintetizar y caracterizar fibras compuestas de PLA e Hidroxiapatita con aplicación potencial al sector salud.

### **Objetivos Particulares**

- 1.- Sintetizar fibras electrohiladas de PLA con hidroxiapatita comercial (C-HAp) y Bio-hidroxiapatita (B-HAp) agregando la hidroxiapatita mediante sonicación.
- 2.- Sintetizar fibras electrohiladas de PLA con hidroxiapatita comercial (C-HAp) y Bio-hidroxiapatita (B-HAp) agregando la hidroxiapatita mediante tratamiento químico.
- 3.- Caracterizar las fibras electrohiladas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), difracción de rayos X (DRX), mediciones de propiedades mecánicas y propiedades térmicas.
- 4.- Estudiar la viabilidad celular (Citotoxicidad y adhesión) de las fibras electrohiladas de PLA con Hidroxiapatita comercial y Bio-hidroxiapatita.

## **ANTECEDENTES**

### **Ingeniería de tejidos**

La ingeniería de tejidos es una rama de la biomedicina que tiene como objetivos reemplazar, reparar o mejorar la función biológica de órganos o tejidos dañados mediante la implementación de materiales que son utilizados como sustitutos biológicos. Algunos de los factores de mayor relevancia en la ingeniería de tejidos es que los materiales a utilizar proporcionen viabilidad celular al implante, las propiedades requeridas por el área a tratar y una buena interacción entre el huésped y el implante o injerto. Los materiales utilizados en la ingeniería de tejidos suelen ser estructuras tridimensionales, en las cuales es muy importante su diseño para que se pueda adaptar al huésped, además de servir como matriz o plantillas que permiten la adhesión y proliferación celular de interés (Hollander & Hatton, 2003).

### **Ingeniería de tejido óseo**

En la actualidad, el cuerpo humano se puede ver afectado por diferentes padecimientos, tales como enfermedades, lesiones o traumatismos no reversibles, los cuales necesitan una gran variedad de tratamientos para hacer posible su reparación, reemplazo o regeneración. En el caso del tejido óseo, la mayoría de las veces no puede haber una regeneración propia y, en casos como fractura, es necesario recurrir a tratamientos óseos restauradores como autoinjertos (en el mismo paciente), aloinjerto (de otro individuo), isoinjertos (de un donador relacionado genéticamente con el receptor) incluso de animales (también llamado xenoinjertos) o también implantes metálicos de titanio y sus diferentes aleaciones, solo que todas estas opciones pueden tener algunas complicaciones como el rechazo en el caso del trasplante o una integración pasiva de los materiales en el caso de las prótesis metálicas (Soto & Taxis, 2005). Debido a las complicaciones



de compatibilidad, existe poca disponibilidad de tejidos, cuando hablamos de los que dependen de donantes, para estos tipos de tratamientos o restauraciones.

Uno de los objetivos de la ingeniería de tejidos es generar sustitutos de tejidos naturales o simularlos, esto debido a la poca disponibilidad de tejidos para los tratamientos. No solo se busca reemplazar los tejidos dañados, si no también regenerar los tejidos comprometidos, en ocasiones desde unas pocas células o hasta desarrollar simuladores biológicos que ayuden a desarrollar, mantener o mejorar la función del tejido natural, en este caso del tejido óseo.

Algunos de los componentes del tejido óseo son orgánicos como el colágeno, osteonectina, factores de crecimiento, proteoglicanos y proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), así como también componentes inorgánicos como hidroxapatita, que es uno de los principales componentes de la matriz extracelular (MEC), donde se lleva a cabo el desarrollo de células específicas como osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. El hueso sano tiene excelentes cualidades como su regeneración con el detalle de que, si su lesión o defecto compromete la integridad ósea superando cierto nivel crítico, este no se podrá auto regenerar y se necesitará recurrir a alguna intervención probablemente quirúrgica. En el caso del trasplante autogénico, este consiste en utilizar injertos óseos del mismo paciente, siendo una opción con grandes ventajas ya que este tipo de trasplantes son histocompatibles y no presentan inmunogenicidad (Martin-Piedra A, 2019).

Un material de injerto óseo debe de presentar las siguientes propiedades:

**Osteoconducción:** proceso donde, por medio de una matriz, es permitido el crecimiento de células pasivamente, así como también tejidos y vascularización en la zona donde se llevó a cabo el implante.

**Osteoinducción:** En este proceso, la diferenciación de células madre es promovido por factores de crecimiento exógenos, logrando la formación de nuevos huesos.

**Osteogénesis:** Proceso que se lleva a cabo cuando las células madre procedentes del donante o del huésped permiten sintetizar nuevo hueso.

Osteointegración: Proceso en el cual se da un crecimiento de hueso con macro y microporos de la matriz.

Los autoinjertos presentan todas las propiedades necesarias antes mencionadas, pero también cuentan con sus limitaciones y complicaciones, las cuales suelen ser: una segunda intervención quirúrgica, que además de ser procedimientos costosos también afectan la calidad de vida del paciente, otro punto que destacar es que en ocasiones el paciente llega a necesitar cantidades de trasplante mayores a las disponibles (Martin-Piedra A, 2019).

Los trasplantes de un donador externo, ya sea vivo o cadáver son otros de los más utilizados, siendo estos los aloinjertos. Estos materiales llegan a ser histocompatibles o se procesan según los requisitos de la zona donde se injertarán y esto suele reducir sus propiedades osteoinductoras. Algunos riesgos de los aloinjertos son que se pueden transmitir infecciones o provocar reacciones inmunes. Otra alternativa como ya se mencionó, son los implantes metálicos compuestos por titanio y sus diferentes aleaciones, estas proporcionan un gran soporte, pero como todo, también presentan algunas limitaciones y desventajas como que no se degradan, tienen elevada rigidez, pueden llevar a fractura, no se integran con el tejido del aceptor y pueden transmitir posibles infecciones (Martin-Piedra A, 2019).

La ingeniería de tejidos ha buscado durante los últimos años otra alternativa para el caso en que las dimensiones de los defectos óseos son críticas, así como también mejorar la disponibilidad de terapias óseas. Generalmente podemos mencionar “la triada de la ingeniería de tejidos”, la cual se compone de tres elementos necesarios para la regeneración del tejido, estas son:

1.- Andamios tridimensionales o matrices: estos elementos están formados por biomateriales que brindan cierta porosidad, soporte y entorno de crecimiento, lo cual aporta un medio apto para desarrollar la proliferación celular de interés.

2.- Células: que las células de interés logren replicarse y/o diferenciarse en la matriz para poder formar tejidos.

3.- Factores de crecimiento: debe de haber factores como hormonas o proteínas que logren estimular la diferenciación, proliferación y crecimiento celular. En algunos casos, estos factores de crecimiento se pueden llegar a sustituir por medio de estímulos físicos, los cuales inducen la evolución de las células e inician con un proceso in vitro y llegando a la implementación, siempre y cuando sea en el lugar adecuado.

En el caso de la ingeniería de tejido óseo (ITO), como en toda ingeniería de tejidos, el imitar la morfología, estructura y propiedades de la matriz extracelular (MEC) es de vital importancia, ya que en ella es donde se lleva a cabo el desarrollo de las células que conformaran el nuevo tejido.

Las Matrices constructoras de tejido óseo (MCTO) deben cumplir con distintas propiedades básica como las siguientes:

**Biocompatibilidad:** Es cuando el material se logra integrar con el tejido del huésped sin causar respuesta inmune. Algunos ejemplos pueden ser los fosfatos de calcio.

**Biodegradabilidad:** Proceso en el cual el material se degrada para adaptarse y permitir el desarrollo de nuevo tejido mientras que se reemplaza el material de la matriz. Un ejemplo son los vidrios bioactivos de borato.

**Bioabsorbilidad:** Proceso que se lleva a cabo a cierta velocidad a la cual se logra degradar el material, similar a la regeneración y al crecimiento del nuevo tejido. Algunos ejemplos son el Ácido poliláctico (PLA) y el Ácido poliglicólico (PGA).

**Biomiméisis:** En este proceso se adopta la estructura macro y microscópica que imita la característica del tejido que se planea imitar.

**Bioactividad:** Proceso en el cual se estimulan respuestas celulares, también el material logra contribuir con algunas características similares al tejido que se quiere simular.

**Propiedades mecánicas:** Proporcionan soporte a los defectos y fuerzas de carga in vivo.

Microarquitectura: Son estructuras que distribuyen las tensiones en la matriz, logrando uniformidad.

Osteoconductividad: Propiedad que logra que las células osteoprogenitoras promuevan su diferenciación celular en el área con defecto.

Porosidad: El material cuenta con poros que tienen tamaño adecuado para permitir vascularización y en los cuales se da un área superficial que permite el crecimiento celular (Martin-Piedra A, 2019).

Entre algunos de los materiales estudiados por la ingeniería de tejidos destacan la preparación de andamios o fibras basados en materiales poliméricos.

## **Polímeros**

Los polímeros son macromoléculas formadas a partir de unidades (monómeros), estos se encuentran en cadenas unidas entre sí por enlaces químicos. El peso molecular de estas macromoléculas es definido como peso molecular promedio y es la suma de las masas atómicas en cada molécula. La gran mayoría de los polímeros se basa en átomos de carbono ya que son orgánicos, aunque también existen polímeros inorgánicos como por ejemplo siliconas basadas en redes de Si-O. Además de encontrarse en la naturaleza como ADN, proteínas y lípidos por decir algunos, existen polímeros sintéticos y semisintéticos, siendo estos últimos una combinación de los naturales y sintéticos. Los plásticos forman parte de los materiales poliméricos ya que están constituidos principalmente de polímeros sintéticos o semisintéticos. En la polimerización, pequeñas moléculas (monómeros, de una unidad) se van uniendo por enlaces covalentes desde pocas unidades (oligómeros) hasta formar polímeros (moléculas gigantes), se van produciendo largas cadenas donde los átomos quedan fuertemente unidos. Los polímeros son muy utilizados en distintas áreas y una gran variedad de aplicaciones, entre las cuales podemos nombrar la industria textil, juguetería, recubrimientos, pinturas, neumáticos, adhesivos, empaques para alimentos, industria automotriz, electrónica,

cosméticos, incluso en medicina e ingeniería de tejidos (Askeland, 2004). Los polímeros se utilizan con más frecuencia en áreas como biomedicina, siendo la ingeniería de tejidos la que más centra sus investigaciones en estos materiales para aplicaciones como prótesis de órganos o huesos, simuladores de injertos de piel, entre otros (Koltzenburg, 2017).

Las aplicaciones de estos materiales dependen mucho de su composición y sus propiedades, algunas de las propiedades a tomar en cuenta son: resistencia mecánica, estabilidad térmica, resistencia a la degradación tanto por químicos como por radiación ultravioleta (UV), resistencia a campos eléctricos, apariencia, costos de producción, peso, resistencia al fuego, entre otras (Koltzenburg, 2017).

### **Biopolímeros**

Los biopolímeros son polímeros presentes en los seres vivos o bien, polímeros sintéticos a partir de materiales biocompatibles con los seres vivos. Estos pueden ser producidos mayormente de recursos naturales, ya que algunos son producidos por microorganismos o por alimentos como el maíz. Algunos biopolímeros desarrollados en el campo de los biomateriales son los polímeros sintéticos, que son bioabsorbibles al tener la capacidad de degradarse en el organismo; esto los hace muy buenos candidatos para su uso en medicina y el campo biomédico. Esta degradación es posible gracias a la hidrólisis que se da en el cuerpo humano, la cual ayuda a que después los restos del material puedan ser eliminados o metabolizados por el mismo organismo. Al implementar el uso de este tipo de materiales, se evitan consecuencias como infecciones, fibrosis u otras secuelas que suelen presentarse en el uso de materiales de injertos o implantes. Algunos de los biopolímeros más estudiados son el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PLGA), entre otros (Valero-Valdivieso et al. 2013).

## Ácido poliláctico (PLA)

El PLA es un poliéster termoplástico, biodegradable, biocompatible y ampliamente utilizado en la ingeniería de tejidos debido a estas propiedades, además, es producido a partir de recursos ecológicos como el trigo y el maíz, entre otros. Se ha demostrado en estudios previos que el PLA tiene capacidad de permitir el crecimiento de tejido biológico mientras se degrada, simulando así una excelente matriz polimérica, la cual como ya se mencionó, al hidrolizarse no provoca reacción de rechazo y se reabsorbe, además de ser no tóxico e inerte (Luisa F. Ardila *et al.*, 2011). El PLA tiene una gran variedad de aplicaciones en distintas áreas como medicina, industria alimentaria, textil, cosméticos, electrónica, entre otras (Li, G. *et al.*, 2020).

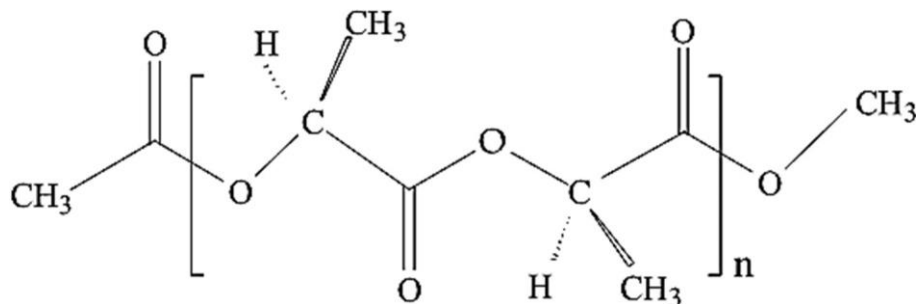


Figura 1. Composición química del ácido poliláctico (PLA) (Bouamer *et al.* 2018).

### Síntesis de PLA

La síntesis del PLA se lleva a cabo polimerizando el ácido láctico, esta se ha logrado por diferentes vías, siendo la policondensación la más sencilla. Por esta vía, se logra obtener el PLA con la característica de que su peso molecular es bajo. En el caso de la obtención de PLA con alto peso molecular, la vía a seguir de esta síntesis es por medio de polimerización por apertura de anillo (ROMP) del dímero de lactida

(dímero cíclico de ácido láctico), y es necesario utilizar catalizadores y/o iniciadores, los cuales pueden ser ácidos y bases de Lewis con compuestos organometálicos como óxidos, carboxilatos y alcóxidos. Ambas reacciones se pueden observar en las Figuras 2 y 3 (Ali & Ismail, 2018).

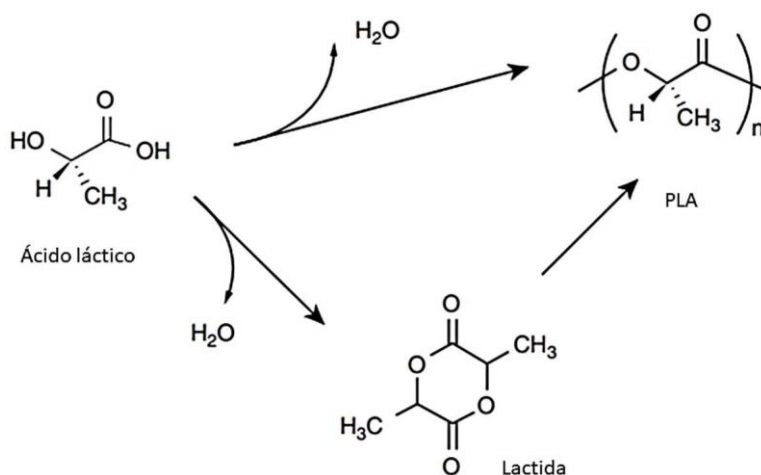


Figura 2. Polimerización del PLA por policondensación (Ali & Ismail, 2018).

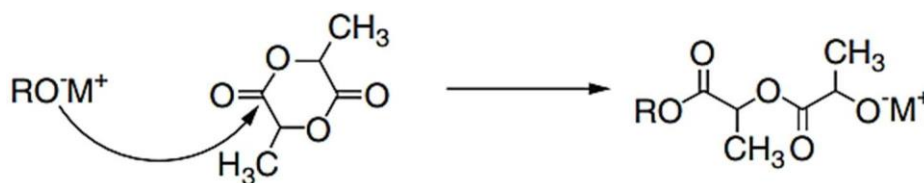


Figura 3. Polimerización del PLA por apertura de anillo (Ali & Ismail, 2018).

## Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HAp) es un fosfato de calcio que se encuentra entre las cerámicas más altamente estudiadas, ya que en áreas de la medicina como la ortopedia y odontología se han estudiado materiales que demuestran su biocompatibilidad.

La HAp permite el crecimiento óseo alrededor del material implantado en un corto periodo de tiempo, por lo cual la HAp se considera como material a integrar en prótesis e implantes óseos (Reis, P. R. S., 2018). La fórmula general de HAp, en su forma estequiométrica, es  $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ , como se observa en la Figura 4, siendo esta un mineral que tiene una composición química muy similar a la parte de la matriz inorgánica que forma al hueso, por lo tanto, la HAp presenta una gran similitud y afinidad con el tejido óseo (Rodríguez, 2014).

La HAp puede obtenerse de forma sintética, o de forma natural a partir de huesos de humanos o animales, así como también de esqueletos de corales y cáscara de huevos. Dependiendo del método de obtención de la HA, variarán sus propiedades morfológicas y fisicoquímicas (Orozco Cardona et al., 2014).

En el caso del hueso humano, este tiene en su composición iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{F}^-$  y la HAp natural contiene además de iones de  $\text{P}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{OH}^-$  también pequeñas cantidades de  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y trazas de algunos elementos como  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  haciendo la relación Ca/P diferente a la estequiométrica obtenida artificialmente, las trazas de estos iones la hacen más similar al hueso humano y a esto se atribuyen las ventajas en los procesos biológicos (Mendez Gonzalez, 2016).



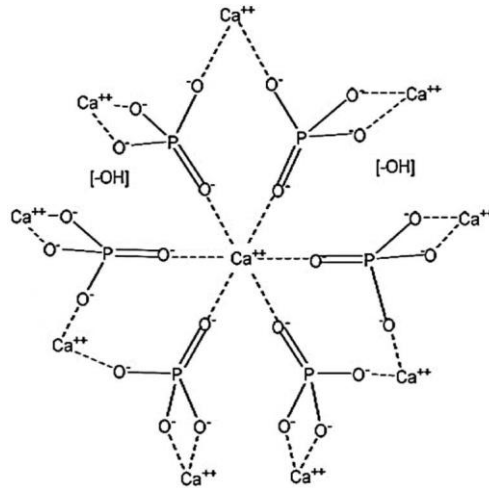


Figura 4. Estructura de la hidroxiapatita (K. Hapuhinna *et al.*2019).

### Materiales compósitos

Aunque existe una gran variedad de materiales, no se ha encontrado el material ideal, el cual cuente con todas las propiedades necesarias para su aplicación. Si hablamos de aplicaciones biomédica, propiedades tales como biodegradabilidad, bioabsorción, firmeza, propiedades mecánicas, e inducción de la adhesión y proliferación celular, entre otras, son deseables. Los materiales compósitos o materiales compuestos están formados por dos o más materiales que están combinados macroscópicamente pero no son solubles entre ellos. Como resultado de estos materiales compósitos, se ha logrado obtener las aportaciones deseadas de ambos materiales, haciendolos excelentes candidatos para áreas como la ingeniería de tejidos, como por ejemplo cerámicas y polímeros. Estos materiales se pueden procesar en su mayoría por las mismas técnicas que los distintos polímeros, como la extrusión, la compresión, entre otras, pero una que en particular destaca por su utilidad y versatilidad en la ingeniería de tejidos es la técnica de electrohilado (Luisa F. Ardila *et al.*, 2011).

## Técnica de electrohilado

La técnica de electrohilado es una técnica versátil y fácil de utilizar, en la cual se pueden producir fibras a diferentes escalas, tanto nano como micrométricas. Las fibras fabricadas pueden imitar una matriz extracelular o bien sirven como un andamio en la ingeniería de tejidos. La versatilidad de esta técnica se debe a los materiales que se pueden utilizar, polímeros que pueden ser naturales, sintéticos o compuestos, además que a estos diferentes polímeros se le pueden acoplar una gran variedad de materiales y por diferentes métodos. El proceso del electrohilado consiste en el uso de fuerzas electrostáticas para sintetizar fibras, el dispositivo se divide en 3 componentes básicos: una fuente de alto voltaje que consta de una corriente eléctrica con varias decenas de kV, un sistema de inyección y un colector metálico. Al aplicar un alto voltaje a la solución, se induce la carga de la solución y se crean las fuerzas repulsivas entre las cargas de la solución, esto aumenta el campo eléctrico inducido por el cambio de voltaje aplicado. Cuando las fuerzas electrostáticas se equilibran con la tensión superficial, se forma el cono de Taylor, una región en la cual se observa una forma cónica en la punta de la jeringa orientada hacia el colector metálico. Una vez que las fuerzas electrostáticas superan la tensión superficial, un chorro de la fibra cargada es expulsado desde la punta de la jeringa que tiene el cono de Taylor, depositándose así en el colector metálico. Mientras el contenido de la jeringa viaja al colector, el disolvente se está evaporando, por lo tanto, en el colector sólo queda depositada la fibra. En el proceso de electrohilado, se pueden ajustar varios parámetros (Figura 5), produciendo así una gran variedad de fibras con diferentes morfologías y, por lo tanto, también aplicaciones. (Castro Menezes, 2017).

**Parámetros de electrohilado.** Como se muestra en la Figura 5, existen distintos tipos de parámetros al momento de ejecutar la técnica de electrohilado. De acuerdo con Long, Y. Z. y colaboradores (Long, Y. Z., et al., 2019) y Molfino, H. y colaboradores (Molfino, H. et al., 2020) los parámetros de electrohilado pueden

definir las características de las fibras electrohiladas y como muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de Electrohilado.

PARAMETRO	AUMENTADO	DISMINUIDO
<b>Variables del entorno</b>		
Humedad	Fibras con poros.	Disolventes volátiles se evaporarán muy rápido.
Temperatura	Al aumentar la temperatura se produce disminución del diámetro de las fibras.	
<b>Variables de la solución</b>		
Concentración	Dificulta a la solución pasar por el capilar	Las fibras no se logran formar antes de llegar al colector, en su lugar se forman gotas.
Conductividad	Fibras más delgadas debido al mayor transporte de cargas.	Menor estiramiento, fibras más gruesas debido al menor transporte de cargas.
Viscosidad	Menor generación de perlas, aumento del diámetro de las fibras.	Se producen perlas.
Peso molecular	Reducción de la cantidad de perlas y gotas.	Presencia de perlas y gotas.
Volatilidad del solvente	Presencia de poros en la superficie. Rápida evaporación.	Lenta separación de las fases y lenta evaporación del solvente. Grosor en las fibras.
Estructura molecular	El polímero rara vez es totalmente cristalino, ya que, al solidificarse la viscosidad se ve aumentada e impide el movimiento de las macromoléculas al ordenarse como cristal.	
<b>Variables del electrohilado</b>		
Distancia	A distancias muy elevadas, las fibras se pueden romper debido al peso y/o se obtienen fibras delgadas. Aparecen defectos como perlas.	El solvente no se alcanza a evaporar, aparecen defectos como perlas.
Voltaje	Fibras de diámetros menores, perlas de mayores tamaños	Falta impulso para que la solución llegue al colector y se evapore el solvente.
Flujo	Fibras con mayores diámetros, perlas de tamaños aumentados.	Fibras sin defectos, tiempo de evaporación aumentado, menores diámetros.
Colector	Placa metálica: fibras ordenadas al azar. Rotor: fibras alineadas.	

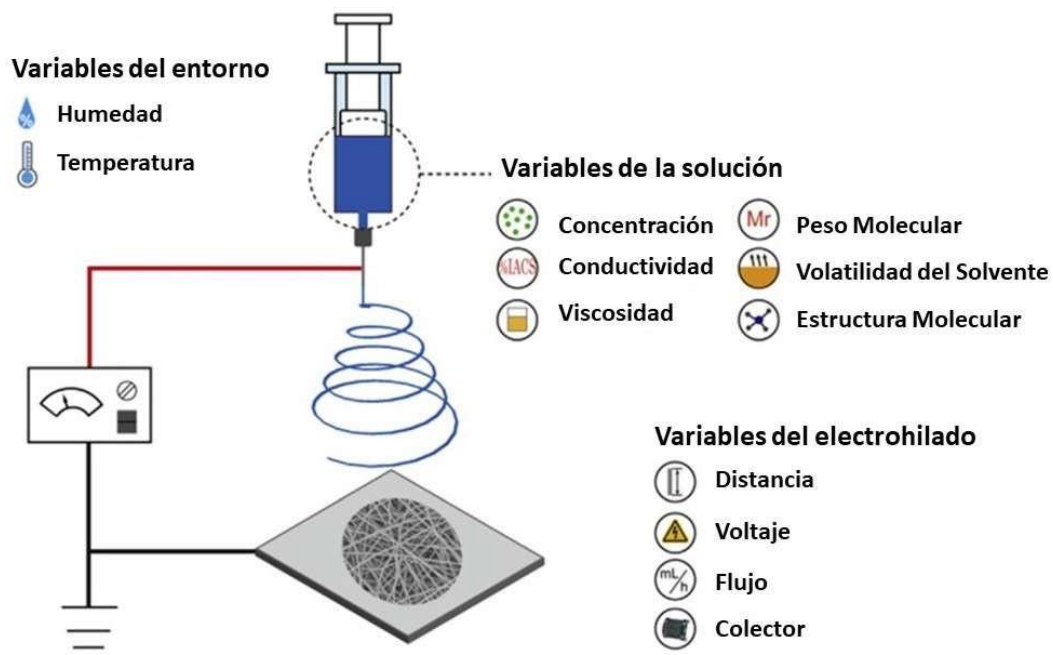


Figura 5. Esquema representativo del proceso de electrohilado (Long et al., 2019).

## EXPERIMENTAL

### Materiales

**Síntesis de las fibras:** Poli (ácido láctico) (PLA, peso molecular =119 kDa, Nature Works Ingeo), N-hidroxisuccinimida (Sigma-Aldrich), N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocliclorida (Sigma-Aldrich), Ácido L-Glutámico (Sigma-Aldrich), N,N-Dimetilformamida (Sigma-Aldrich), Diclorometano (Sigma-Aldrich), Bio-hidroxiapatita obtenida de hueso de res tratada química y térmicamente ( $\geq 20 \mu\text{m}$ , CINVESTAV, Querétaro, México), Hidroxiapatita comercial (Captal).

**Cultivo celular:** Medio de cultivo RPMI (con piruvato, L-glutamina, rojo de fenol, CLAISSON), Bicarbonato de Sodio (Sigma-Aldrich), Suero Fetal Bovino (PBS, BioWest), Penicilina-10 mg de Estreptomina/mL, (Sigma-Aldrich), tripsina-EDTA (0.25%, Sigma-Aldrich), azul de tripano (solución 0.4%, Sigma-Aldrich).

### Metodología

#### Preparación de soluciones.

#### Tratamiento de sonicación a Hidroxiapatita.

Se prepararon las soluciones poliméricas al 15% (p/v) de PLA en los solventes DMF y Diclorometano (80:20) agitando hasta homogenizar. Se agregó 5% (p/v) de C-HAp a la solución polimérica previamente preparada y homogenizada, se agitó hasta homogenizar y, posteriormente, se dio tratamiento de sonicación por 30 min. Se repitió el mismo procedimiento para la solución PLA y B-HAp.

### **Tratamiento químico a Hidroxiapatita.**

Se colocaron en un reactor 0.5 g de ácido L-Glutámico, 0.2 g de NHS (N-hidroxisuccinimida) y 0.2 g de EDC (N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidroclicorida) en 10 mL de PBS, se mantuvieron en agitación constante a temperatura ambiente por 13 h. Una vez pasado el tiempo, se agregaron 0.5 g de C-HAp y 10 mL de PBS a la solución previamente preparada y se dejó reaccionar por 6 h agitando constantemente a temperatura ambiente. La solución se dializó durante 3 h a temperatura ambiente con agua desionizada en membranas de celulosa manteniendo un pH de 7.4. Se descartó el sobrenadante y se puso a secar durante 2 h a 50 °C con vacío. Una vez concluido el tratamiento químico de la C-HAp, se pesaron 0.5 g y se agregaron a la solución polimérica, se agitó hasta homogenizar. Se siguieron los mismos pasos para el tratamiento químico de la B-HAp.

### **Electrohilado.**

Se electrohilaron las diferentes formulaciones utilizando los mismos parámetros de electrohilado: volumen de 5 mL, distancia de la punta de la aguja al colector metálico de 15 cm, voltaje de 17 kV y un flujo de inyección de 3.6 mL por h. El arreglo de electrohilado fue sencillo y horizontal con una placa recolectora de aluminio conectada a tierra. Una vez electrohiladas las fibras se secaron por 24 h en estufa de vacío a 50 °C para eliminar los restos de solvente que pudieran haber quedado. En la tabla 2 se muestran las formulaciones preparadas.

Tabla 2. Formulaciones de las fibras electrohiladas.

Formulación	Cantidad de polímero (%)	Cantidad de HAp (%)	Solvente
PLA	15		DMF-DCM
PLA-HAcSON	15	5	DMF-DCM
PLA-HAcTQ	15	5	DMF-DCM
PLA-bHASON	15	5	DMF-DCM
PLA-bHATQ	15	5	DMF-DCM

### **Caracterización de las nanofibras.**

#### **Microscopía electrónica de barrido -Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (MEB-EDS).**

Se analizaron las fibras electrohiladas con sus distintas formulaciones utilizando un microscopio marca JEOL JSM modelo 5410LV. Las muestras se colocaron en un porta muestra de cobre utilizando cinta doble de carbono y se realizó un recubrimiento con oro. El fin del análisis fue estudiar la morfología, las distribuciones de diámetro y tamaño de poro de las fibras, las cuales se analizaron mediante el software ImageJ® (Instituto Nacional de Salud (NIH), USA). Se utilizó la técnica de EDS para confirmar la presencia de HAp con un análisis elemental semicuantitativo, para lo que se realizaron mapeos en zonas de la muestra para evaluar la distribución de los elementos que componen la fase de la HAp en las muestras y corroborar su presencia.

#### **Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)**

Con el fin de demostrar los espectros característicos del material, se analizaron las fibras por medio del sistema ATR con detector de diamante en un equipo Perkin

Elmer Frontier utilizando un barrido del espectro de número de onda desde 4000  $\text{cm}^{-1}$  hasta 400  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y 16 barridos.

### **Difracción de Rayos X**

La estructura cristalina de las muestras fue analizada mediante la técnica de difracción de Rayos X (DRX) en el difractómetro marca Rigaku modelo SmartLab, usando radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ), y a 40 kV y 20 mA. La medición se realizó en el rango de  $7^\circ$  a  $70^\circ$  en  $2\theta$ , con un paso de  $0.02^\circ$  y un ángulo de incidencia de  $2^\circ$ . Los datos se graficaron utilizando el software OriginLab®. El análisis se realizó antes y después de recubrir las fibras y se identificó la presencia de la fase de la HAp. Para corroborar la presencia de HAp se tomó como referencia la ficha identificada como JCPDS:00-009-0432.

### **Análisis termogravimétrico (TGA)**

Se analizaron las propiedades térmicas de las fibras por medio de TGA utilizando un equipo Pyris 1 con automuestreador marca Perkin Elmer. Se pesaron aproximadamente 5 mg por muestra y se realizaron corridas de  $25^\circ\text{C}$  hasta  $900^\circ\text{C}$ , utilizando una velocidad de calentamiento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  y un cambio de gases  $\text{N}_2/\text{O}_2$  a  $600^\circ\text{C}$ . Los termogramas obtenidos sirvieron para determinar las temperaturas de velocidad máxima de descomposición de los materiales.

### **Pruebas Micromecánicas.**

Ensayo de Tracción. Se determinaron las propiedades mecánicas de las fibras electrohiladas con las diferentes formulaciones en una máquina universal de pruebas Electroforce 51-10 utilizando Win Test 7. Se cortaron probetas (5 mm de largo por 2 mm de ancho), se colocaron a una distancia de 12 mm y se alargaron a



una velocidad de 1 mm/s hasta producir el fallo. Posteriormente, se calcularon la resistencia a la tracción, el porcentaje de elongación y el módulo de Young a partir de las curvas de alargamiento de deformación obtenidas.

## **Cultivo celular *in vitro***

### **Experimento de citotoxicidad por contacto directo.**

#### Cultivo celular

Se cultivaron osteoblastos de la línea SAOS-2 en frascos de cultivo de 25 mm<sup>2</sup>, con medio de cultivo RPMI (con piruvato, L-glutamina, rojo de fenol) suplementado con 2g/L de Bicarbonato de Sodio, 5% de PBS, 1% de antibióticos (10,000 U. I. de Penicilina-10 mg de Estreptomina/mL). Las células se mantuvieron en incubación a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> con cambios de medio cada segundo o tercer día. Cuando las células llegaban a confluencia se realizaba un pasaje celular de la siguiente manera: se retiraba el sobrenadante del frasco de cultivo, se realizaba un lavado con solución salina estéril para después descartarla. Se agregaba 1 mL de solución de tripsina-EDTA (0.25%) al frasco con las células adheridas y se incubaba por 5 min a 37 °C con CO<sub>2</sub>. Se agregaron 2 mL de RPMI suplementado al frasco de cultivo para inactivar la tripsina y se subía y bajaba el medio con ayuda del pipetor para despegar todas las células de la pared. Después se pasó la suspensión celular del frasco de cultivo a un tubo cónico limpio y estéril. Se centrifugó por 7 min a 1200 rpm. Se sacó el tubo de la centrífuga y se descartó el sobrenadante evitando sacudir el tubo para no perder el pellet celular observado al fondo del tubo cónico. Se agregaba 1 o 2 mL de medio RPMI para resuspender las células subiendo y bajando el medio con el pipetor. Un quinto de la suspensión se utilizaba para resembrar en el frasco de cultivo o se contaban las células para prepararlas a la concentración deseada y sembrarlas para el experimento.

### Conteo Celular

Se tomaron 90  $\mu$ L y se procedió a contar las células en cámara Neubauer con 10  $\mu$ L de azul de tripano (solución 0.4%).

### Preparación de las muestras

Se cortaron las fibras electrohiladas de las distintas formulaciones: PLA, PLA-C-HAp con tratamiento de sonicación, PLA-C-HAp con tratamiento químico, PLA-B-HAp con tratamiento de sonicación y PLA-B-HAp con tratamiento químico en discos de 5 mm de diámetro y se esterilizan con luz ultravioleta por ambos lados por 15 min en la campana de flujo laminar.

Se colocaron las muestras en una placa para cultivo de 96 pocillos colocando 3 fibras de cada formulación por cada día a evaluar (días 1, 3 y 5). Una vez colocadas las fibras en la placa, se volvió a irradiar con luz ultravioleta antes de utilizar.

### Sembrado de células

Se contaron 357500 cel/mL y se preparó una dilución de 7 mL (6.021 mL medio RPMI con 0.979 mL de células). Posteriormente, en la placa con las fibras, se sembraron 100  $\mu$ L de la dilución de las células en cada pozo, sembrando también un control sin fibras.

### Determinación de viabilidad celular mediante la prueba de la resazurina

Un día después de sembrar las células en las fibras electrohiladas, se preparó una solución de resazurina 1:200. Se retiraron 100  $\mu$ L de medio de cada día, correspondiente al día de medición y se agregaron 100  $\mu$ L de la solución de resazurina y se incubó por 4 h a 37 °C con CO<sub>2</sub>. Una vez pasadas las 4 h de incubación, se retiraron 50  $\mu$ L de cada pozo correspondiente al día y se colocaron en una placa limpia para proceder con su lectura. Se agregó un control conteniendo

solo medio RPMI y un control sin células (solo solución de resazurina), estos leyéndose por triplicado al igual que las muestras. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro SYNERGY HTX multi-mode reader, utilizando el software Gen 2007 donde se hicieron dos lecturas, una a 570 nm y otra a 600 nm, correspondiendo a las concentraciones de resazurina y resofurina, respectivamente. Se repitió el procedimiento para los días 3 y 5 de cultivo para su posterior análisis de datos. Se repitió el experimento de contacto directo, pero sembrando  $5 \times 10^3$  células por pozo y evaluándose la viabilidad celular los días 1, 2 y 3 de cultivo.

#### Preparación de las membranas para observación en el Microscopio electrónico de Barrido (MEB)

Después de llevar a cabo las pruebas de citotoxicidad en contacto directo, se retiró el medio (resazurina/RPMI) restante de cada pocillo a evaluar, se fijaron las muestras agregando a cada pocillo 200  $\mu$ L de glutaraldehído 2% en PBS estéril filtrado y se dejaron a temperatura ambiente por 5 h, después se lavaron con PBS para después ser deshidratadas en series crecientes de etanol (al 50%, 60%, 70%, 80%, 95% y al 100%) por 10 min cada uno. Después del último cambio de etanol, se dejaron secar las muestras durante toda la noche en la cabina de bioseguridad a temperatura ambiente y con el flujo de aire. Una vez secas las membranas, se recubrieron con oro para después ser evaluadas morfológicamente mediante MEB.

#### **Experimento de citotoxicidad de extractos.**

Las distintas formulaciones de las fibras electrohiladas se cortaron en discos de 5 mm de diámetro y se esterilizaron con luz UV por 30 min por cada lado. Los extractos se obtuvieron colocando 10 mg de las fibras electrohiladas en 2.5 mL de medio RPMI (con piruvato, L-glutamina, rojo de fenol) suplementado con 2g/L de Bicarbonato de Sodio, 5% de SFB (Suero Fetal Bovino), 1% de antibióticos (10,000

U. I. de Penicilina-10 mg de Estreptomina/mL). Después de 72 h, los extractos se diluyeron a 1:2, 1:4 y 1:8 utilizando más medio de cultivo RPMI suplementado.

Las células se sembraron en la placa de cultivo en una concentración de 10 000 células/pozo y se incubaron por 24 h; pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se agregaron los extractos con las diferentes diluciones, estos se incubaron a 37 °C por 1, 2 y 3 días. Como control se usaron pozos con la misma cantidad de células en medio de cultivo suplementado sin los extractos.

Después de cada tiempo de cultivo, se determinó la viabilidad celular mediante la prueba de la resazurina. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro SYNERGY HTX multi-mode reader, utilizando el software Gen 2007 donde se hicieron 2 lecturas, una a 570 nm y otra a 600 nm, correspondiendo a las concentraciones de resazurina y resofurina, respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se sintetizaron fibras mediante la técnica de electrohilado obteniendo 5 diferentes formulaciones, fibras de PLA, de PLA e C-HAp con tratamiento de sonicación (HAcSON), de PLA e C-HAp con tratamiento químico (HAcTQ), de PLA y B-HAp con tratamiento de sonicación (bHASON) y de PLA y B-HAp con tratamiento químico (bHATQ). A simple vista las fibras de las diferentes formulaciones se veían homogéneas, de color blanco y sin gotas depositadas en ellas.

Al estar sintetizando las fibras, se observó la notoria diferencia en la precipitación de la HAp en la solución durante el electrohilado. En el caso de las fibras con tratamiento de sonicación, la solución dentro de la jeringa se tenía que agitar cada 1 mL depositado ya que se observaba como se iba depositando la HAp al fondo de la jeringa, mientras que las formulaciones con tratamiento químico no mostraban este comportamiento, lo que se puede atribuir a la contribución del tratamiento químico en cuanto a la dispersión de la HAp desde la solución en la jeringa.

### **Caracterización de las fibras electrohiladas.**

#### **Microscopía electrónica de Barrido (MEB)**

En la Figura 6 se muestran las morfologías de las fibras electrohiladas con sus diferentes formulaciones ordenadas de la siguiente manera: 6A y 6B son micrografías de las fibras electrohiladas de PLA, 6C y 6D de fibras electrohiladas de PLA e C-HAp con tratamiento de sonicación (HAcSON), 6E y 6F de PLA e C-HAp con tratamiento químico a la HAp (HAcTQ), 6G y 6H de PLA y B-HAp con tratamiento de sonicación (bHASON), 6I y 6J de PLA y B-HAp con tratamiento químico a la HAp (bHATQ). En algunas de las micrografías de la Figura 6 se señalan con flechas algunas partículas de HAp presentes en las muestras. Los diámetros obtenidos de las micrografías se muestran en la Tabla 3; para obtenerlos, se promediaron los diámetros de 50 fibras por micrografía. En las micrografías se

pueden observar fibras sin defectos como gotas o perlas y sin porosidades. Las Figuras 6A y 6B muestran las fibras de PLA puro, estas fibras tuvieron los diámetros menores de todas las formulaciones y a diferencia de las que contienen HAp, se observan fibras lisas y sin agregados. En las imágenes de las fibras de PLA e HAcSON (6C y 6D) se observan fibras de mayor diámetro (1.281  $\mu\text{m}$ ) con agregados de HAp. Para las fibras de PLA e HAcTQ (6E y 6F), se observan fibras más delgadas que con el tratamiento de sonicación (con un diámetro de 1.162  $\mu\text{m}$ ), y se consigue mayor distribución de partículas de HAp. Este resultado podría ser un indicador de que el tratamiento químico aplicado a la HAp tiene un impacto en la distribución de la HAp en las fibras. En las imágenes de las fibras PLA y bHASON (6G y 6H) se observa mayor cantidad de partículas de HAp incrustadas en las fibras distribuidas en el polímero y, como se mostró en la Tabla 3, esta distribución se refleja en un aumento del diámetro en comparación de las fibras con tratamiento químico, siendo esta formulación, la segunda con diámetros más gruesos. La HAp no se observa en grandes aglomerados en la superficie de las fibras, si no aparentemente distribuida homogéneamente, lo cual cumple con lo que se esperaba al plantear el experimento. Por último, se muestran las micrografías de las fibras de PLA y bHATQ (6I y 6J), donde se observan fibras de menor diámetro (1.089  $\mu\text{m}$ ) que, con el tratamiento de sonicación, se observan fibras sin poros, perlas o defectos, además de que no se observan las partículas de HAp en la superficie como en las muestras anteriores. Es importante resaltar los resultados obtenidos de esta nueva comparación en los tratamientos para la distribución de la HAp en las fibras de PLA, debido a que no se ha comparado antes estas metodologías y se han obtenido resultados favorables demostrando más eficiencia en el tratamiento químico.

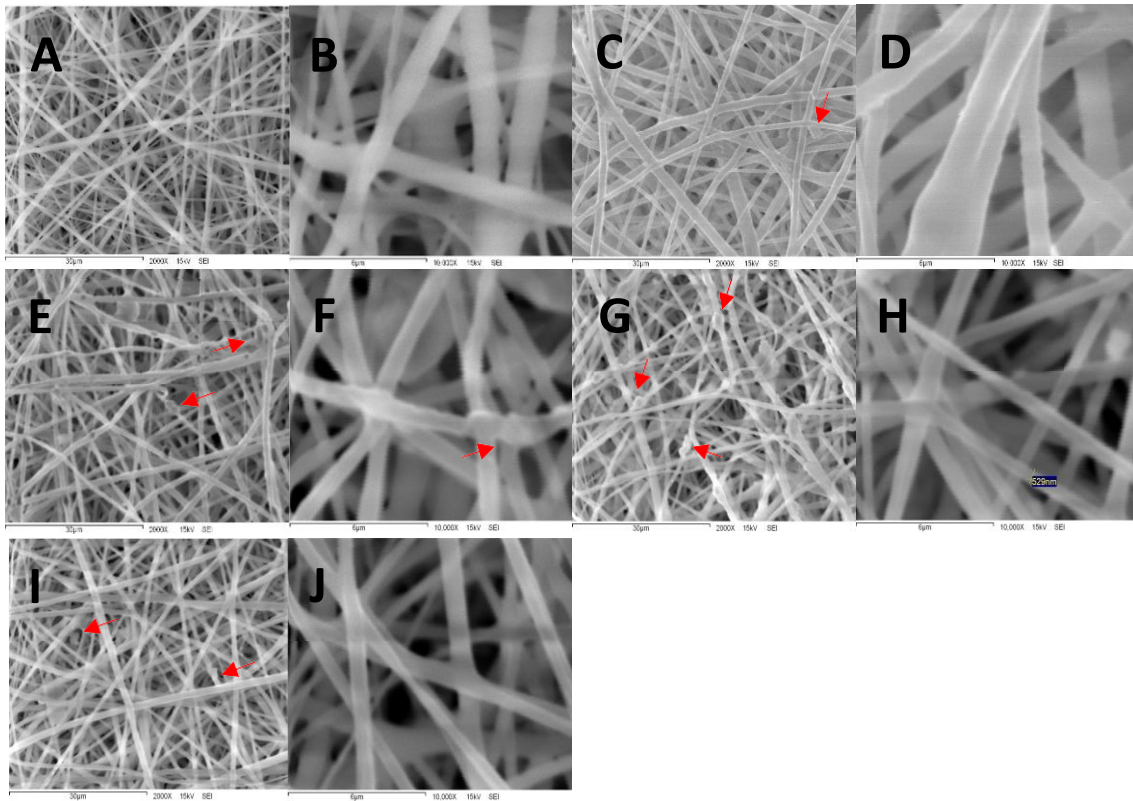


Figura 6. Micrografías de las fibras electrohiladas. (A) y (B) sólo PLA, (C) y (D) HAcSON, (E) y (F) HAcTQ, (G) y (H) bHASON, (I) y (J) bHATQ, barras marcadoras de 30  $\mu\text{m}$  y 6  $\mu\text{m}$ .

Tabla 3. Diámetros obtenidos de las fibras electrohiladas.

Muestra	Diámetros ( $\mu\text{m}$ )
PLA	$0.803 \pm 0.166$
PLA/HAcSON	$1.281 \pm 0.144$
PLA/HAcTQ	$1.162 \pm 0.170$
PLA/bHASON	$1.204 \pm 0.109$
PLA/bHATQ	$1.089 \pm 1.181$

En la Figura 7 se observan las micrografías de las fibras electrohiladas de PLA y B-HAp con tratamiento de sonicación A, B y C, con tratamiento químico D, E y F a diferentes magnificaciones; las imágenes C y D muestran los mapeos elementales por EDS de las imágenes B y E. A diferencia de las imágenes de la Figura 6, en la Figura 7 se logra apreciar la dispersión de la HAp en las fibras electrohiladas. Se observa una mejor dispersión en las fibras con tratamiento químico, ya que en las

fibras con tratamiento de sonicación se observan aglomerados de partículas de HAp, lo que demuestra que el tratamiento químico permitió lograr una distribución más homogénea del cerámico en las fibras de PLA.

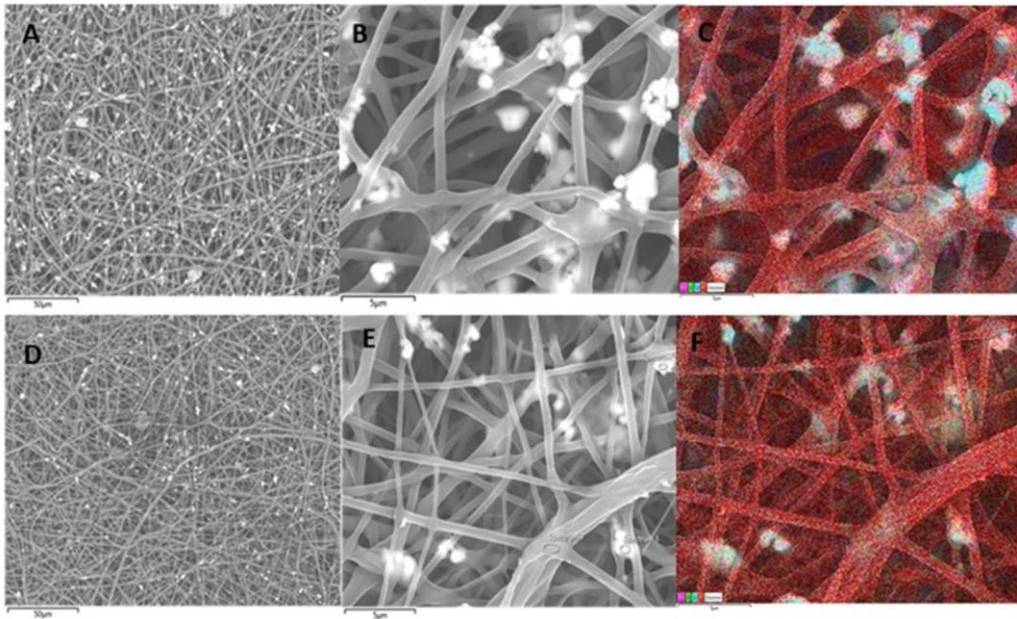


Figura 7. micrografías EDS y mapeo elemental de las fibras de B-HAp A, B y C con tratamiento de sonicación y D, E y F con tratamiento químico.

Se realizó mapeo elemental a las fibras electrohiladas de PLA y B-HAp con tratamiento de sonicación (Figura 8) y con tratamiento químico (Figura 9) con el fin de identificar la distribución de los elementos presentes. Con este resultado, se logró identificar la presencia de los elementos que C (color rojo) y O (color azul) correspondientes al PLA, como también P (color verde) y Ca (color morado) correspondientes a la HAp. Además de los iones de P y Ca de HAp también se lograron identificar trazas de algunos elementos como Mg y Na, correspondientes a la fuente y metodología de obtención de la B-HAp (Giraldo Betancur 2013) (Figuras 10 y 11). La identificación de estos elementos a nivel traza, si bien los muestra el espectro, derivado de la mejorada dispersión de la B-HAp con el tratamiento químico son menos notorios al compararlos con la B-HAp con tratamiento de sonicación, en



donde se tienen cúmulos bien marcados. De acuerdo con Méndez en el 2016 (Méndez González, 2016), la presencia del Mg y Na, hacen a la HAp más compatible con el tejido óseo humano que la C-HA y a los que se atribuye la mejor viabilidad celular que evalúa en el estudio de viabilidad celular *in vitro*.

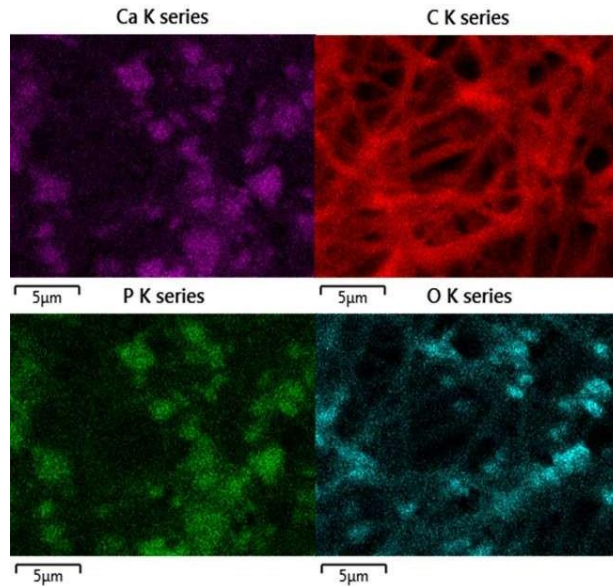


Figura 8. Mapeo elemental de las fibras electrohiladas de PLA y bHASON

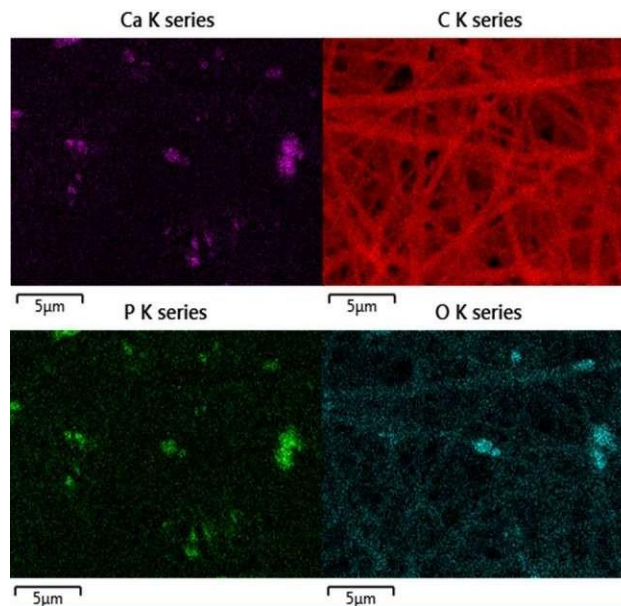


Figura 9. Mapeo elemental de las fibras electrohiladas de PLA y bHATQ.

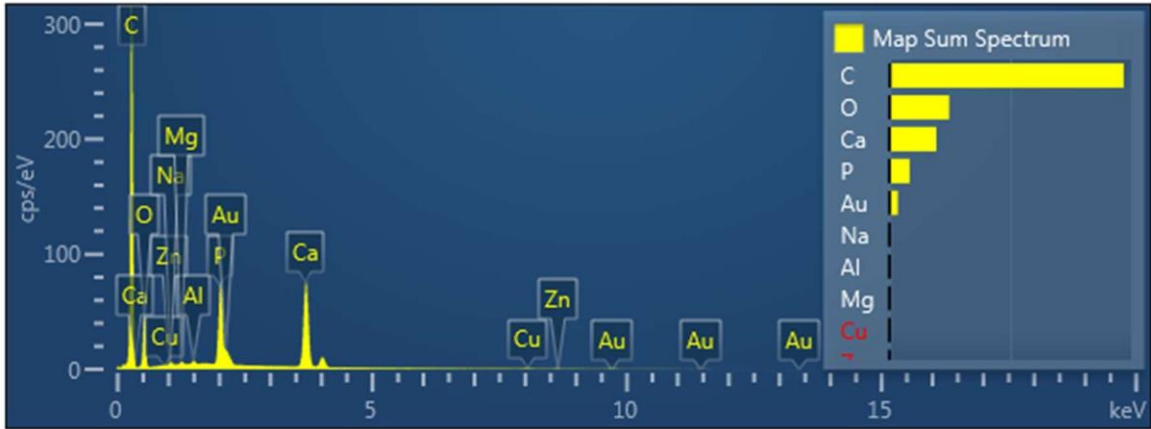


Figura 10. Espectro EDS para fibras de PLA y B-HAp con tratamiento de sonicación.

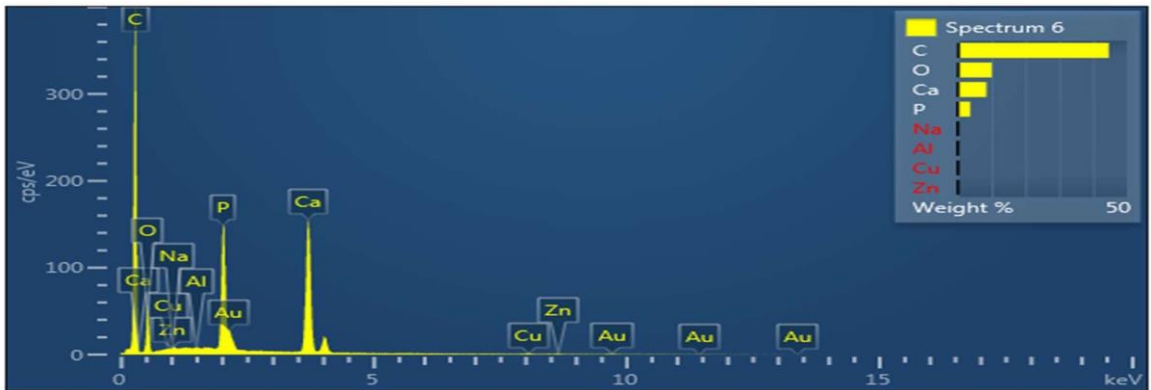


Figura 11. Espectro EDS para fibras de PLA y B-HAp con tratamiento de químico.

### Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

Se observaron las bandas características del material compuesto, que corresponden al PLA y la HAp (Figura 12), las señales observadas se asignan de la siguiente manera: en la región de los 1050-1300  $\text{cm}^{-1}$  se identifican dos picos correspondientes al enlace éster del polímero; las bandas de PLA corresponden a las señales de 1085 y 1184  $\text{cm}^{-1}$ . En la región de 1750 a 1753  $\text{cm}^{-1}$  identificamos una banda que corresponde al estiramiento del grupo C=O característica del PLA, lo anterior coincide con lo reportado por Kareem, M. M et al. (2020).

También se identificó la banda característica del PLA, a los 2993  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo  $\text{CH}_3$ . En el caso de los demás espectros que contienen tanto PLA como HAp, se observan las mismas bandas. Las muestras que contienen HAp presentan un aumento en el ancho de las bandas en la región de los 1183 y 1184  $\text{cm}^{-1}$ , ya que la HA tiene una banda en la región de los 1100  $\text{cm}^{-1}$ , la cual nos indica la presencia de los grupos  $(\text{PO}_4)^{3-}$  característico de la HAp. De acuerdo con Marín Pareja y colaboradores (Marín Pareja, N. et al., 2008) la HAp presenta señales alrededor de los 3500 – 3600  $\text{cm}^{-1}$  atribuidos al grupo OH, en la Figura 12 alrededor de los 3630  $\text{cm}^{-1}$  se logra observar una banda muy débil que podría atribuirse a los grupos  $\text{OH}^-$  de la HAp, pero a simple vista puede confundirse con ruido del espectro, pero no está presente en el espectro correspondiente al PLA.

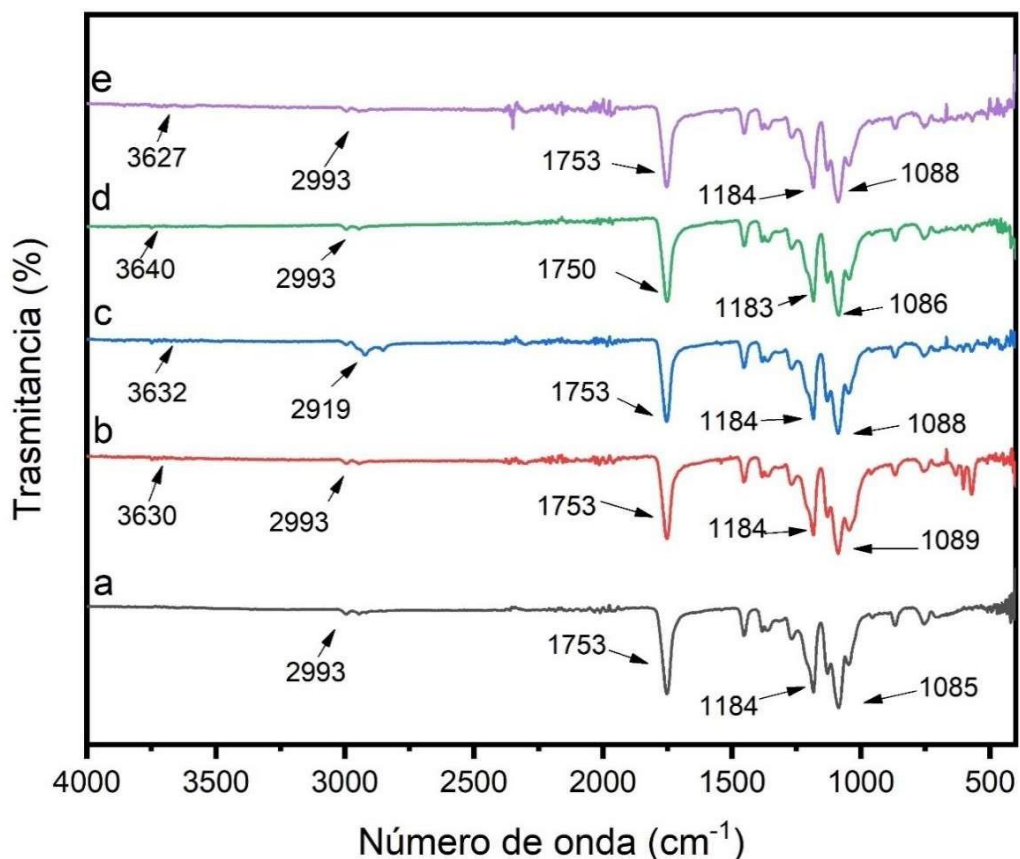


Figura 12. Espectro FTIR de fibras electrohiladas donde a) PLA, b) PLA-bHASON, c) PLA-bHATQ, d) PLA-HAcSON y e) PLA-HAcTQ.

En la Figura 13 se muestran los espectros de deconvolución gaussiana de las muestras que contienen HAp en la región  $1200\text{ cm}^{-1}$  a  $950\text{ cm}^{-1}$ . Se les realizó el tratamiento matemático conocido como deconvolución a los espectros mostrados en la Figura 7 mediante el software OriginPro para poder observar las bandas de la HAp que se presenta alrededor de los  $1100\text{ cm}^{-1}$  perteneciente al grupo  $(\text{PO}_4)$  y la banda alrededor de los  $1085\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo éster del PLA, debido a que en el espectro original se observa un solapamiento de bandas por presentar señales tan cercanas. Las otras bandas señaladas son pertenecientes al polímero.

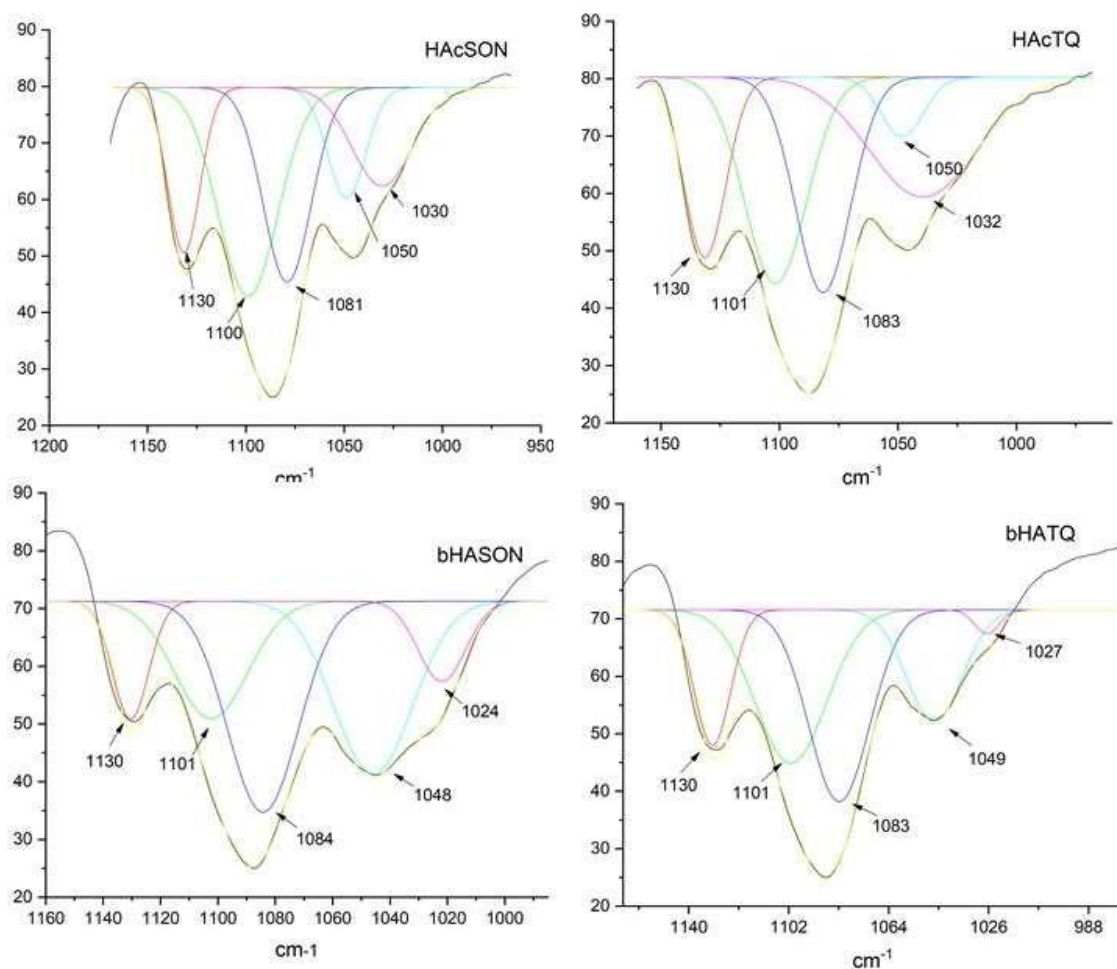


Figura 13. Espectros deconvolucionados de la Figura 12 de las fibras electrohiladas que contienen HAp.

De acuerdo con las bandas obtenidas en el espectro de FTIR de las fibras electrohiladas, se propone la reacción que se muestra en la Figura 14, que es la que posiblemente se lleva a cabo en el tratamiento químico que se le da a la HAp. Esta reacción se propone basándonos en el mecanismo reportado por Kim, H. H. y colaboradores sobre los entrecruzantes EDC y NHS (Kim, H. H. et al., 2015). En el espectro de infrarrojo no se muestran señales de grupos amino como el mostrado en la reacción, esto se puede deber al hecho de que la proporción de HAp es del 5% y la cantidad de los grupos amino es muy pequeña con respecto al polímero, lo cual ocasiona que no se logren observar las señales características de este grupo, Kwak y colaboradores (2016) presentaron este tratamiento químico y en su caso evaluaron los espectros FTIR del polvo de la HAp con tratamiento químico antes de agregarla a la solución para evidenciar la presencia del ácido L-glutámico, esto podría llevarse a cabo en un futuro para evidenciar la presencia de dichos grupos .

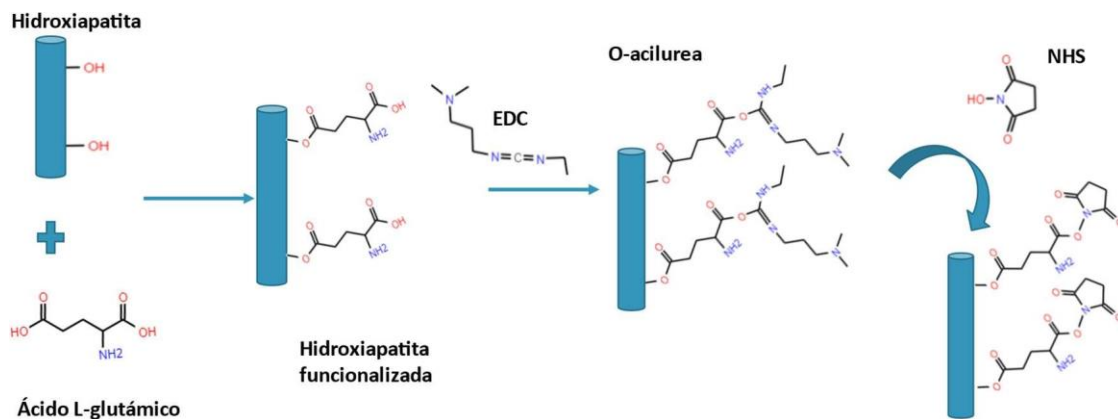


Figura 14. Representación de la reacción del tratamiento químico dado a la HAp.

### Difracción de Rayos X

Se analizó la estructura cristalina por la técnica de difracción de rayos x (DRX). En la Figura 15 se presentan los patrones de DRX de las fibras electrohiladas en sus

distintas formulaciones. En los patrones de difracción se observan los planos característicos de HA utilizando como referencia JCPDS 09-0432. También se observa un pico ancho alrededor de los  $17^\circ$ , el cual se atribuye al PLA según Gorrasi y Pantani (Gorrasi, G., & Pantani, R., 2013) ya que, al ser una mezcla de los isómeros D y L, el PLA no es completamente amorfo; adicionalmente, tiene mayor cantidad del isómero D, a lo que se debe su característica amorfa, pero puede tener cristalinidad debido a la cantidad del isómero L y esta se observa el patrón de DRX. Al presentar estos patrones, se demuestra que la HAp está presente en las fibras electrohiladas, lo que se contrasta con lo observado en las imágenes obtenidas por MEB. En cuanto a las diferencias de los patrones obtenidos, se observan patrones similares en las fibras tanto con B-HAp e C-HAp, donde se observan diferencias es en los tratamientos a las HAp. Se observa una disminución en la intensidad de los picos de las fibras con tratamiento químico a  $25.8^\circ$ ,  $31.8^\circ$ ,  $32.19^\circ$ ,  $32.9^\circ$ ,  $39.8^\circ$ ,  $46.7^\circ$ ,  $48.1^\circ$ ,  $49.4^\circ$  y  $64.07^\circ$  a diferencia de las fibras con tratamiento de sonicación, lo que se puede atribuirse a que en las fibras con tratamiento químico hay una mejor dispersión del cerámico en las fibras de PLA, ya que en las fibras con tratamiento de sonicación probablemente se hayan detectado aglomerados de HAp y por eso presenten esa diferencia en la intensidad de los picos, como se observa en los mapeos elementales. En el caso de Ramirez-Gutierrez y colaboradores (Ramirez-Gutierrez et al., 2016), evaluaron HAp obtenida por diferentes métodos y evalúan su cristalinidad, ellos reportaron que la diferencia en la intensidad de los picos puede deberse a una mejora en el porcentaje cristalino, entonces se lo podemos atribuir también a que con el tratamiento químico se ve afectado el porcentaje cristalino debido a la funcionalización con ácido glutámico.

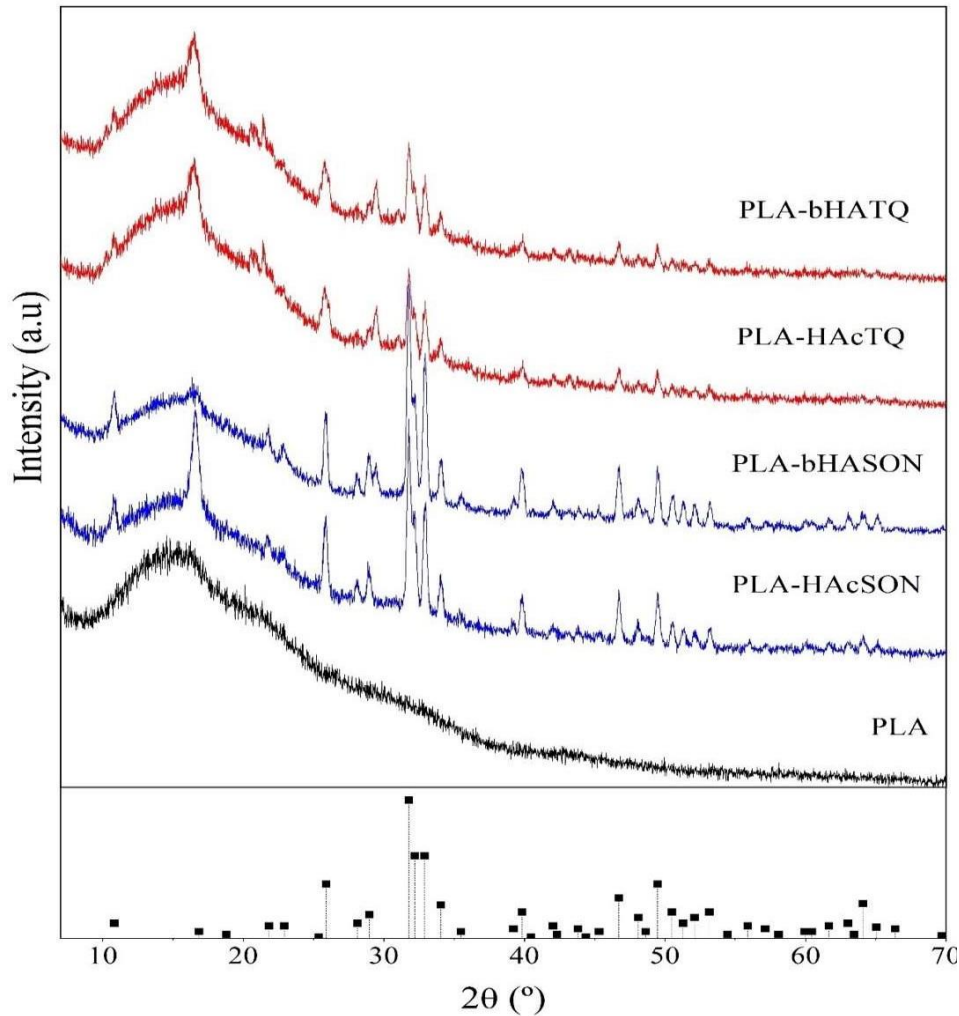


Figura 15. Patrón de Difracción de Rayos X de las fibras electrohiladas.

### Análisis Termogravimétrico (TGA)

Se analizaron las fibras electrohiladas mediante análisis termogravimétrico y los resultados se muestran en la Figura 16a. En el termograma de las fibras de PLA se observó son las más estables, mostrando un inicio de degradación térmica a la temperatura de 298 °C; también podemos destacar que las fibras que más se acercan a esta estabilidad térmica son las que se sometieron a tratamiento químico, tanto con C-HAp como con B-HAp, siendo así las fibras menos estables térmicamente las fibras con tratamiento de sonicación, lo que evidencia que el tratamiento químico otorga mejor estabilidad térmica que el tratamiento de



sonicación de acuerdo a la Figura 16a. Se calculó la temperatura máxima de degradación con la derivada de la curva, como se observa en la Figura 16b, siendo las fibras de PLA puro las más estables con un pico a los 364 °C, seguidas de las fibras de PLA e HAp con tratamiento químico con una señal de degradación máxima a los 362 °C. De acuerdo con algunos autores (Kareem et al. 2019), aquí deberíamos observar que las fibras que contienen HAp son más estables térmicamente. De acuerdo con Kareem y colaboradores (Kareem et al. 2019) al agregar la HAp a las fibras puede suceder que, al estar bien distribuidas las partículas de HAp en las fibras del polímero, estas actúen como barrera ante la transferencia de calor protegiendo así al polímero y bloqueando la descomposición, por lo tanto tendrían más estabilidad térmica las fibras con HAp, pero al no obtener estos resultados, se podría decir que este comportamiento tal vez sea debido a aglomerados de HAp que no permiten una integración uniforme de la HAp en el polímero y, por lo tanto, no otorga esa estabilidad térmica esperada.

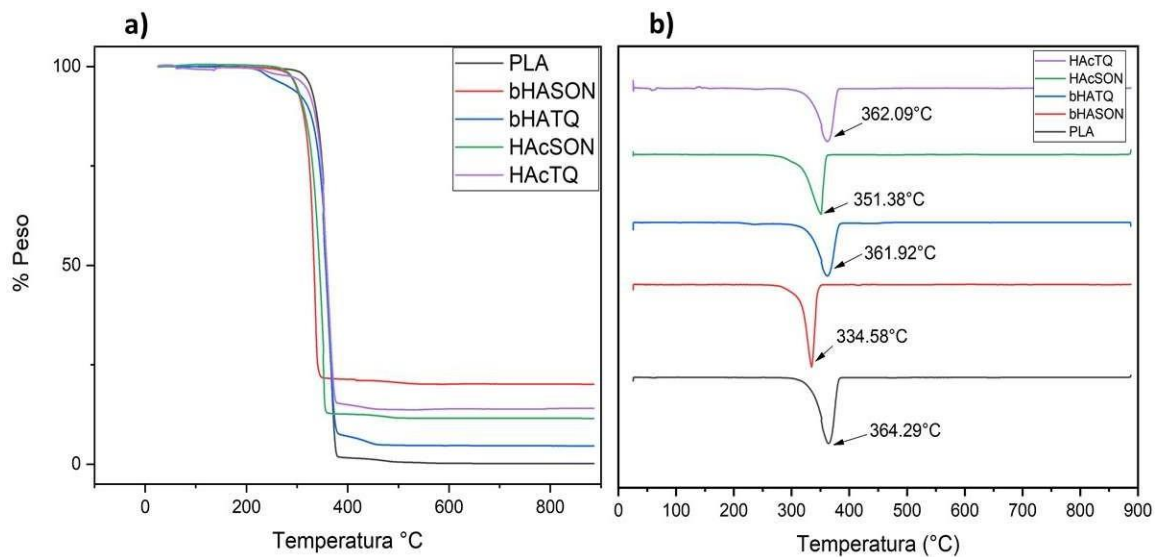


Figura 16. a) Termogramas y b) DTG de: Fibras de PLA, bHASON, bHATQ, HAcSON, y HAcTQ haciendo un barrido de temperatura de 10 °C por min desde 25-900 °C en atmosfera de Nitrógeno.



## Pruebas Micromecánicas

### Ensayo de Tracción

Al realizar los ensayos de tracción, cuyos resultados se muestran en la Tabla 4, se observó que las fibras con mayor Módulo de Young fueron las dos formulaciones con C-HAp, seguidas de las fibras que contienen B-HAp con tratamiento de sonicación. Con la evidencia anterior, se puede deducir que el agregarle HAp a la solución del polímero, aumentó su módulo de elasticidad, ya que las fibras que solo contienen PLA son las que presentan menor Módulo de Young. Los resultados obtenidos en cuanto al módulo de Young son similares a los reportados por Muna M Kareem y colaboradores (Muna M. Kareem et al. 2019) al evaluar fibras electrohiladas de PLA e HAp de un solo núcleo en 2D. Es importante destacar que, de acuerdo con Encinas M. (Encinas, M., 2015), los resultados obtenidos indican que un área posible de aplicación de estas fibras es en hueso cortical, ya que en esta área se necesita un módulo de Young en un rango de 0-4 GPa. Otra cualidad que destacar, es el hecho de que aumentó considerablemente el porcentaje de elongación de las fibras, lo cual sería una gran ventaja ya que ayudaría a que las fibras soportaran mayor alargamiento antes de la fractura, las fibras de PLA con B-HAp con tratamiento de sonicación presentan alrededor del 50 por ciento más elongación que las fibras de sólo PLA y las formulaciones con tratamiento químico presentan mayor por ciento de elongación que las de C-HAp con tratamiento de sonicación, lo cual podría ser una ventaja al momento de su aplicación en la ITO, ya que el material presentaría un mayor aumento en su longitud antes de la fractura y esta propiedad podría ser sumamente importante al momento de evaluar su área de aplicación. Es posible que se haya obtenido mayor Módulo de Young en el caso de las fibras que contienen C-HA debido a que el tamaño de partículas de la C-HA es más homogéneo que el de la bHA, ya que en la B-HA no se le realizó tamizado para homogenizar su tamaño de partícula y esto pudo afectar al momento de la fractura.

Tabla 4. Propiedades mecánicas.

Formulación	Módulo de Young MPa	Resistencia MPa	%Elongación
PLA	34.236 ± 1.040	4.152 ± 0.791	166.265 ± 1.934
PLA/bHASON	48.229 ± 6.694	4.357 ± 0.826	224.906 ± 3.975
PLA/bHATQ	33.417 ± 1.247	3.343 ± 0.172	136.466 ± 4.500
PLA/HAcSON	52.928 ± 1.580	5.016 ± 1.090	110.650 ± 0.212
PLA/HAcTQ	55.507 ± 1.650	6.002 ± 1.475	156.360 ± 6.032

### Cultivo celular *in vitro*.

#### Experimento de citotoxicidad en contacto directo.

Los resultados obtenidos en el experimento de citotoxicidad por contacto directo evaluado en los días 3, 5 y 7 se pueden observar en la Figura 17. De acuerdo con la norma ISO 10993 para pruebas de Citotoxicidad *In vitro*, se considera citotóxico a un material si su viabilidad es menor a 70%. En este caso, se obtuvieron muchas variaciones, esto es común en este tipo de experimentos, especialmente en superficies heterogéneas, por lo que es necesario realizar más repeticiones. Se realizaron otros experimentos como el de evaluación de extractos para corroborar si las muestras son citotóxicas o solo presentan problemas de adhesión.

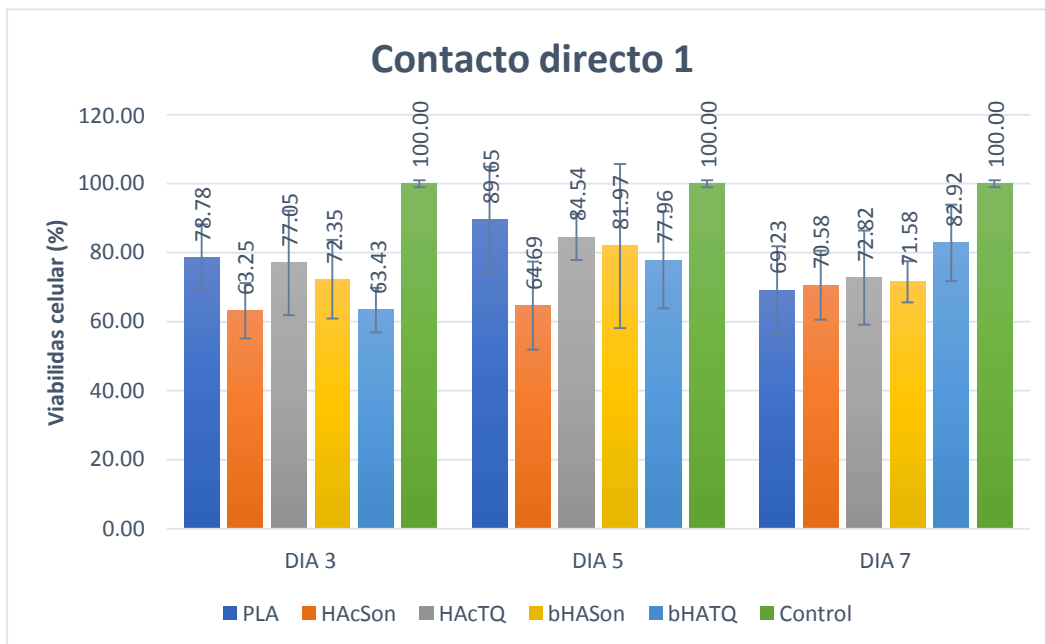


Figura 17. Evaluación de citotoxicidad por contacto directo 1 de las distintas formulaciones de las fibras electrohiladas y el control sin fibras mediante prueba de resazurina con una densidad celular de 5,000 células por pozo.

Al obtener los resultados del estudio de citotoxicidad por contacto directo de los primeros experimentos que se realizaron con la densidad celular de 5,000 células por pozo, se procedió a evaluar la citotoxicidad en contacto directo también aumentando la densidad celular a 10,000 células por pozo y, por lo tanto, se cambiaron también los días de lectura en el espectrofotómetro a los días 1, 2 y 3 para evitar saturación de la superficie por la cantidad de células. Al realizar este experimento se obtuvieron mejores resultados, ya que todas las formulaciones presentan viabilidad celular arriba del 80%, las cuales aumentaron desde el día 1 al día 3 de cultivo, siendo las formulaciones con tratamiento químico las que presentan mejor viabilidad celular, ya que presentan resultados mayores a los del control sin fibras con más del 10% como se muestra en la Figura 18.

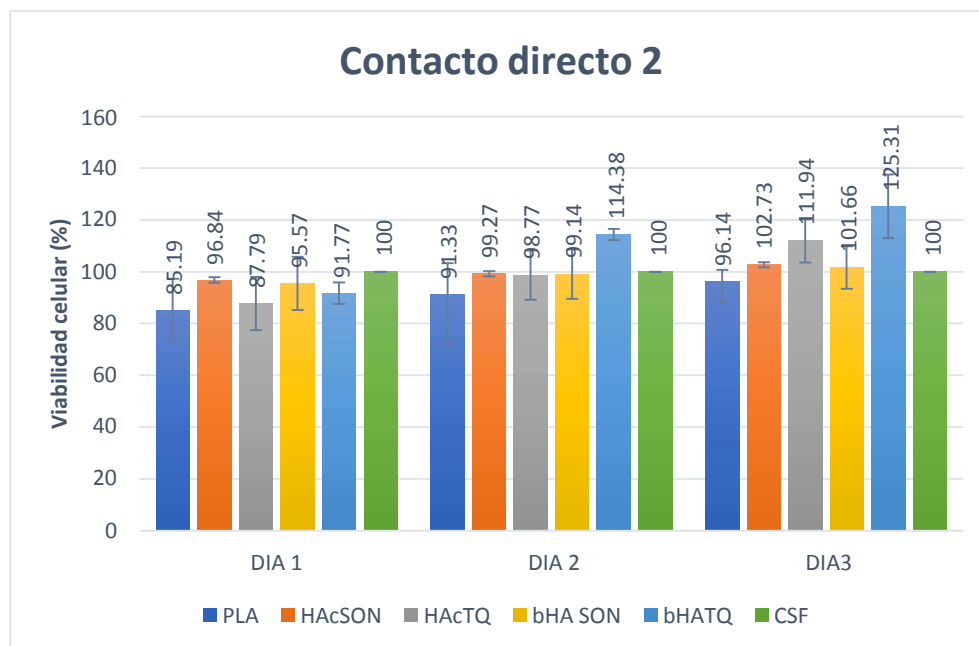


Figura 18 Evaluación de citotoxicidad por contacto directo 2 de las distintas formulaciones de las fibras electrohiladas y el control sin fibras mediante prueba de resazurina con una densidad celular de 10,000 células por pozo.

## Experimento de citotoxicidad de extractos.

Se evaluó la citotoxicidad de los extractos de las fibras electrohiladas, ya que en el experimento de contacto directo los resultados tenían bastante variabilidad. En la Figura 19 se observan los extractos de las muestras en sus diferentes formulaciones antes de filtrar y sembrar para su evaluación de citotoxicidad.



Figura 19. Extractos de las fibras electrohiladas en sus distintas formulaciones antes de filtrar.

La Figura 20 muestra las imágenes del control sembrado en los días (A) cosecha de la botella de cultivo, que fue cuando se despegaron y sembraron las células, (B) día 1 de cultivo, (C) día 2 de cultivo y (D) día 3 de cultivo. En las imágenes se puede observar cada vez más confluencia, lo que indica que conforme a más días de cultivo debería dar mejores resultados porque había más células.

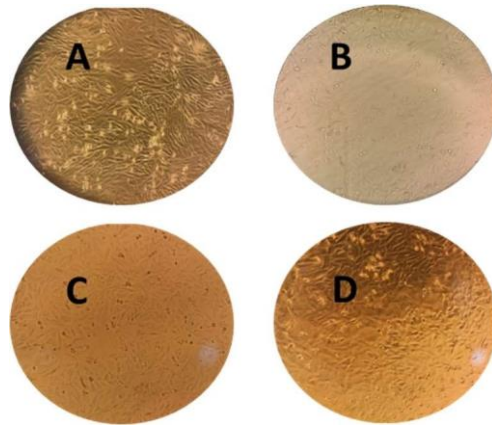


Figura 20. Imágenes del microscopio óptico invertido de la evaluación de citotoxicidad de extractos de las fibras electrohiladas en el pocillo de control sin muestras. (A) células en la botella de cultivo, (B) día 1 de cultivo celular, (C) día 2 de cultivo celular y (D) día 3 de cultivo celular.

En las Figuras 21, 22 y 23 se muestra la viabilidad celular obtenida a partir de extractos de las fibras de PLA, PLA-HAcSON, PLA-HAcTQ, PLA-bHASON y PLA-bHATQ en medio de cultivo RPMI suplementado. Como se observa en las gráficas, los extractos con mayor concentración de las fibras de PLA-HAp en sus diferentes formulaciones mostraron mayor viabilidad para las células óseas, a diferencia de los extractos de solo PLA, que estos a menor concentración, mayor viabilidad, siendo la dilución 1 el extracto de las fibras y las diluciones 1:2, 1:4 y 1:8 las diluciones 2, 3 y 4 respectivamente. En todas las formulaciones se evidencia que los lixiviados de las fibras electrohiladas no presentan citotoxicidad para las células cultivadas, lo que indica la evidencia de que los solventes utilizados al igual que el tratamiento realizado fueron exitosos para tener esta viabilidad celular. Las formulaciones que presentan resultados más prometedores son las que contienen B-HAp; esto puede deberse a que la B-HAp cuenta con trazas de minerales que se asemejan más al hueso humano y esto brinda un mejor ambiente para las células, lo que puede promover la osteoconducción de acuerdo con Mendez Gonzalez (Mendez Gonzalez, 2016). En el caso de la Figura 21, muestra valores más bajos de

viabilidad, pero esto se puede atribuir a que las células tuvieron menos tiempo de cultivo en la placa; si se observa, en el día 2 han tenido más tiempo para desarrollarse y aún más en el caso del día 3. En el caso de los días 2 y 3 se obtuvieron mejores resultados que los del control sin extracto de las fibras, ya que este presentó un valor de 100% de viabilidad.

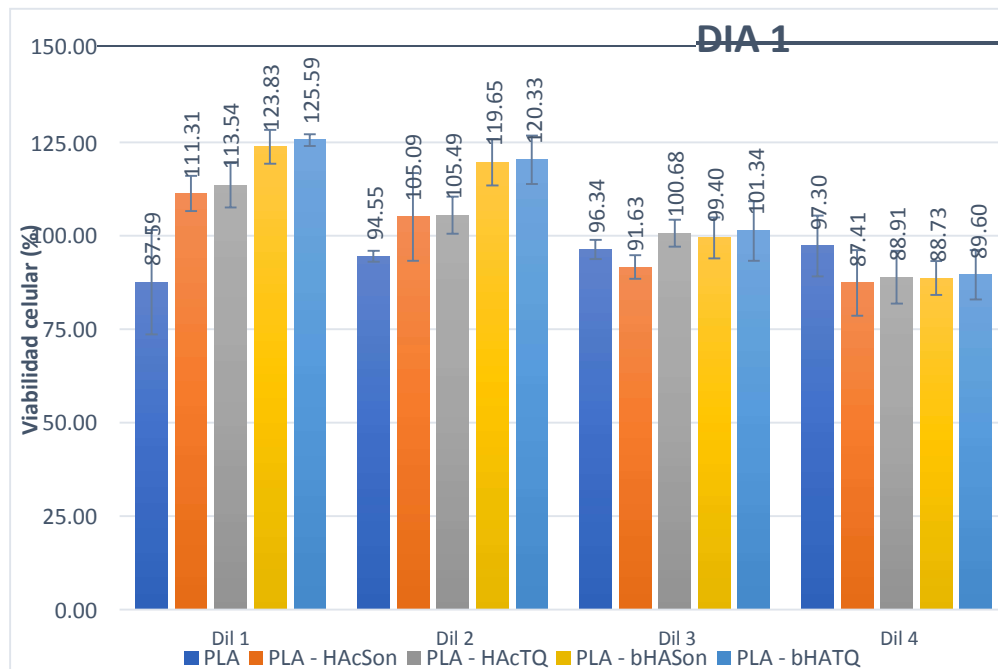


Figura 21. Evaluación de citotoxicidad de extractos de las distintas formulaciones de las fibras electrohiladas en el día 1 mediante prueba de resazurina.

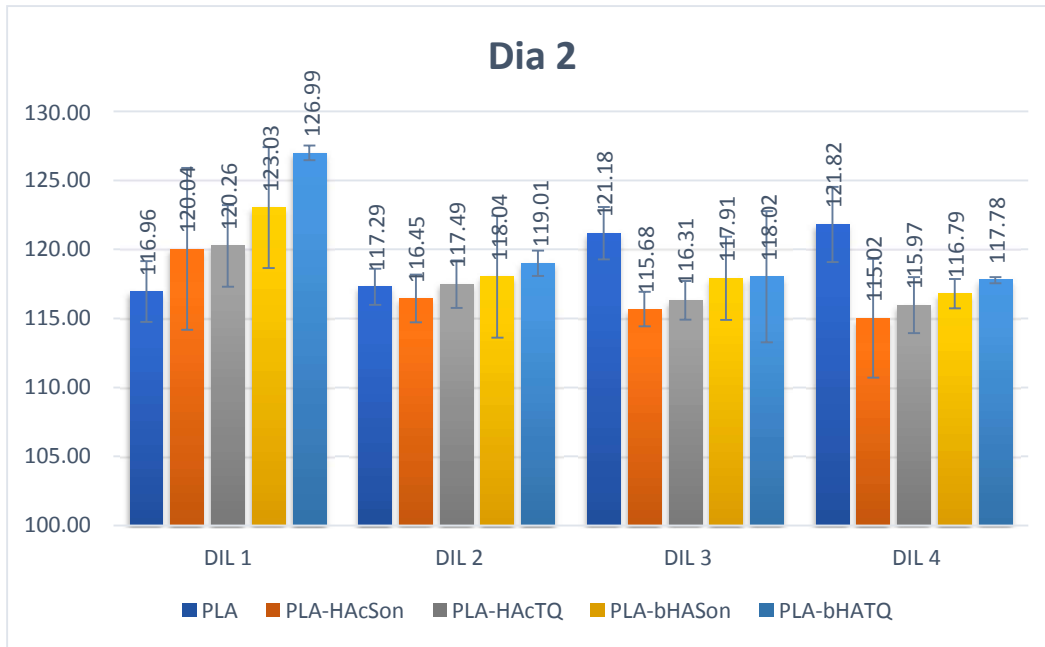


Figura 22. Evaluación de citotoxicidad de extractos de las distintas formulaciones de las fibras electrohiladas en el día 2 mediante prueba de resazurina.

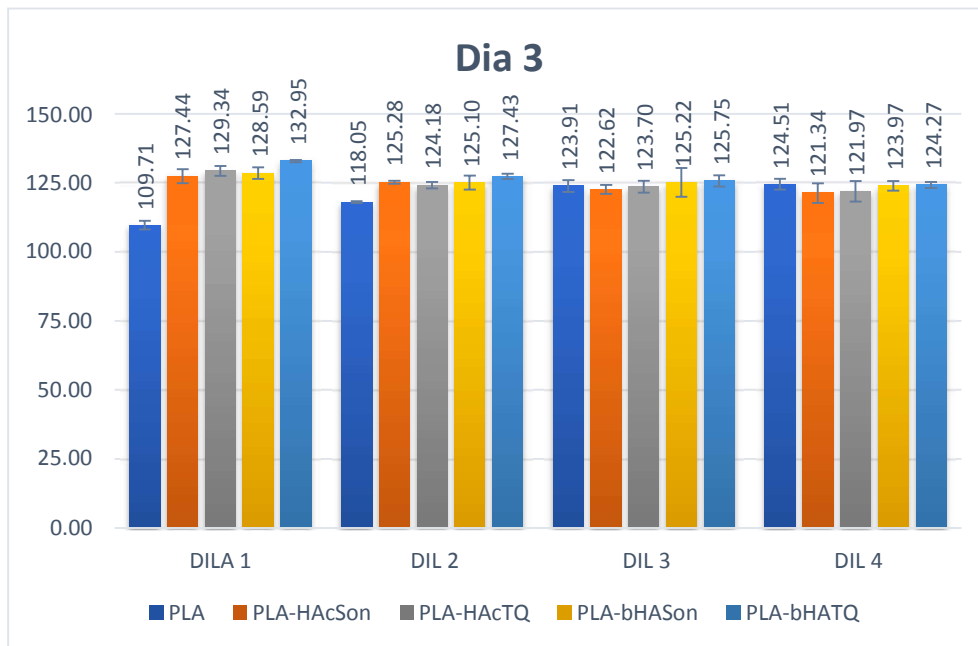


Figura 23. Evaluación de citotoxicidad de extractos de las distintas formulaciones de las fibras electrohiladas en el día 3 mediante prueba de resazurina.

Después de evaluar la citotoxicidad de las fibras electrohiladas por contacto directo, basándonos en la metodología reportada por Rodríguez Sáenz y colaboradores (Rodríguez Sáenz et al. 2019), se fijaron y se deshidrataron las muestras utilizadas para dar continuidad al experimento de citotoxicidad y así evaluar la adhesión celular en las muestras. Se observaron las imágenes de MEB de las fibras electrohiladas con sus diferentes formulaciones en los días 1, 2 y 3 de cultivo como se muestran en las imágenes de las Figuras 24, 25 y 26. Trabajos reportados como el de Rodríguez Sáenz y colaboradores muestran resultados con más días de cultivo celular y, comparando con los resultados obtenidos en este trabajo, es evidente que es poco el tiempo de cultivo para observar más notoriamente la adhesión de las células a las muestras electrohiladas. Es posible que hayan quedado células fijadas al fondo de la placa de cultivo y estas no se hayan adherido al material, lo cual si se hubiera llevado a cabo el cultivo celular por más tiempo probablemente presentaría más células fijadas a las muestras como en el caso de Kwak y colaboradores (Kwak, Sanghwa, et al., 2016).

En las fibras de PLA se puede observar cómo se aumentó el diámetro casi un 80% de acuerdo con la Tabla 5. Se observa en las Figuras 24, 25 y 26 (A y B) que, al aumentar los días de cultivo celular, las fibras van aumentando de diámetro, sin defectos o roturas. Como se señala en la Figura 26A, se observa matriz extracelular adherida a las fibras, similar a lo reportado por Tanir, T. E. y colaboradores (Tanir, T. E. et al. 2014).

En la formulación PLA-HAcSON comparando las imágenes MEB de las muestras sin cultivo celular y después del día 3 de cultivo celular, se pueden observar fibras con mayor diámetro, más compactas y se alcanzan a observar cómo está señalado en las Figuras 26C y 26D, partículas de hidroxiapatita y lo que parece ser células adheridas.

La formulación PLA-HAcTQ después del día 3, muestra una reducción en el tamaño de partículas de hidroxiapatita, pero aun así se siguen observando en las micrografías. Al igual que en las imágenes de la formulación anterior, se logran observar aparentes células adheridas a las fibras, similares a lo reportado por Tanir,



T. E. y colaboradores, con la diferencia que su estudio lo midieron hasta los 7 días (Tanir, T. E. et al. 2014).

En la formulación PLA-bHASON es donde se observan más partículas de hidroxiapatita adheridas a las fibras y, después de 3 días de cultivo celular (imágenes 26G y 26H), se observan fibras con diámetros mayores y se logra apreciar lo que parece ser la matriz extracelular adherida a las partículas de hidroxiapatita similar a lo reportado por Ayatollahi, M. R. y colaboradores (Ayatollahi, M. R. et al. 2015). En la formulación PLA-bHATQ se observan tanto partículas de hidroxiapatita como la matriz extracelular adherida a las partículas de hidroxiapatita al igual que en la formulación anterior, pero en menor cantidad.

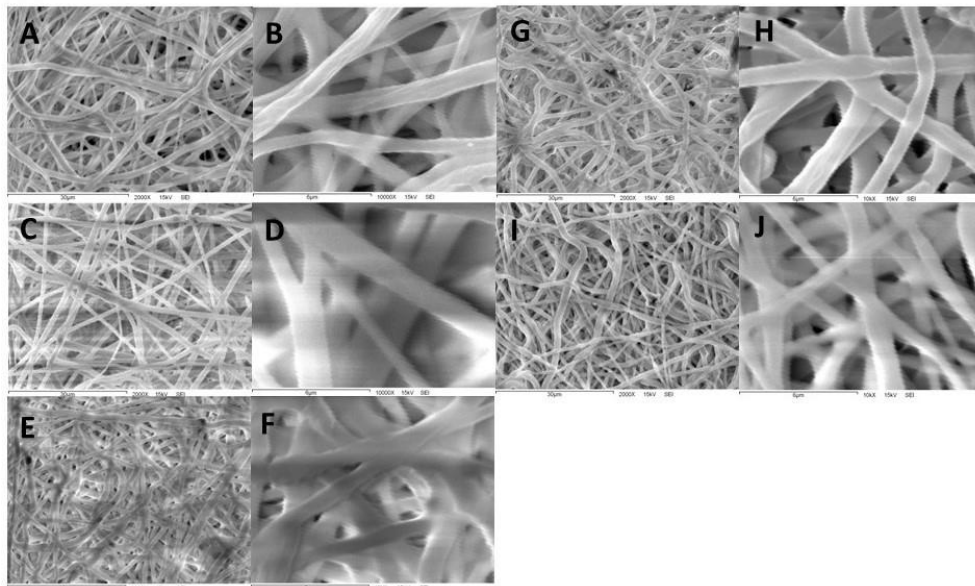


Figura 24. Imágenes de MEB de las fibras electrohiladas después del día 1 de cultivo celular. (A) y (B) sólo PLA, (C) y (D) HAcSON, (E) y (F) HAcTQ, (G) y (H) bHASON, (I) y (J) bHATQ, barras marcadoras de 30  $\mu\text{m}$  y 6  $\mu\text{m}$ .

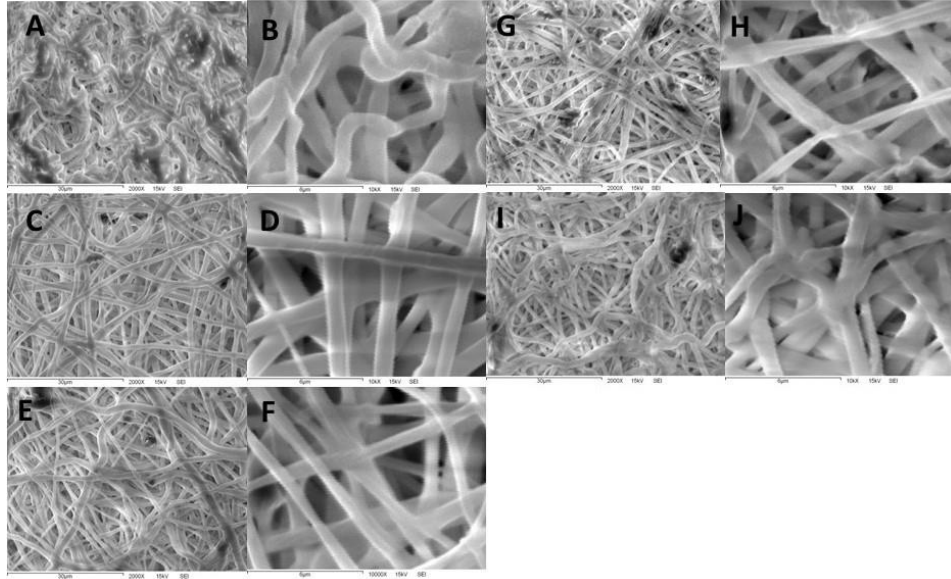


Figura 25. Imágenes de MEB de las fibras electrohiladas después del día 2 de cultivo celular. (A) y (B) sólo PLA, (C) y (D) HAcSON, (E) y (F) HAcTQ, (G) y (H) bHASON, (I) y (J) bHATQ, barras marcadoras de 30  $\mu\text{m}$  y 6  $\mu\text{m}$ .

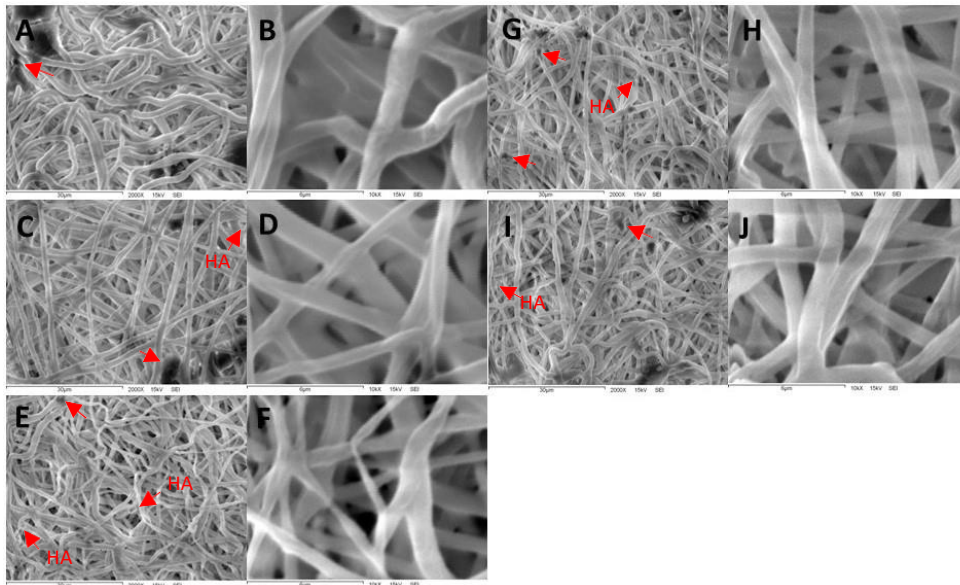


Figura 26. Imágenes de MEB de las fibras electrohiladas después del día 3 de cultivo celular. (A) y (B) sólo PLA, (C) y (D) HAcSON, (E) y (F) HAcTQ, (G) y (H) bHASON, (I) y (J) bHATQ, barras marcadoras de 30  $\mu\text{m}$  y 6  $\mu\text{m}$ .

Tabla 5. Comparación de diámetros de las fibras electrohiladas

<b>Muestra</b>	<b>Dia 0 cultivo celular (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Dia 3 cultivo celular (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
PLA	$0.803 \pm 0.166$	$1.647 \pm 0.195$
PLA/HAcSON	$1.281 \pm 0.144$	$1.411 \pm 0.251$
PLA/HAcTQ	$1.162 \pm 0.170$	$1.217 \pm 0.211$
PLA/bHASON	$1.204 \pm 0.109$	$1.280 \pm 0.197$
PLA/bHATQ	$1.089 \pm 0.181$	$1.191 \pm 0.190$

## CONCLUSIONES

Se logró sintetizar fibras electrohiladas de escala nano a micrométricas, sin aparentes defectos de PLA y con partículas de HAp adheridas a ellas en sus distintas formulaciones.

Se llevó a cabo la caracterización por MEB y se observaron fibras electrohiladas sin defectos aparentes, sin porosidades y sin perlas o gotas, las fibras más delgadas fueron las de PLA sin HAp y, morfológicamente, se observó que las fibras con mayores partículas de hidroxiapatita adheridas en la superficie de las fibras fueron las de PLA-bHASON, lo que indica que no hubo mejor dispersión, como se pudo observar en los mapeos elementales. En los mapeos elementales de las fibras de Pla y B-HAp se logró verificar que el tratamiento químico otorga una mejor dispersión de HAp en las fibras de PLA que el tratamiento de sonicación. Por medio de los mapeos elementales se logró identificar los elementos C y O correspondientes al PLA, así como Ca y P pertenecientes a la HAp, además de trazas de algunos elementos como Na y Mg.

Por medio del análisis por FTIR, se logró observar que están presentes los grupos funcionales tanto del PLA como de la HAp, por lo que ambos materiales se encuentran presentes en el material sintetizado.

Los análisis de difracción de rayos X indican que todas las formulaciones contienen partículas de HAp. Con los patrones de DRX se estudió la estructura cristalina de las fibras electrohiladas y se observó una mejor dispersión de HAp en las fibras de PLA con el tratamiento químico en comparación con las del tratamiento se sonicación.

Del análisis termogravimétrico se destaca que, de las fibras adicionadas con HAp, las más estables térmicamente fueron las de PLA y bHATQ seguido de las de PLA e HAcTQ, por lo que el tratamiento químico fue más efectivo al momento de otorgar estabilidad térmica que el tratamiento de sonicación, lo cual se puede atribuir a una mejor dispersión de HAp en las fibras.

Al estudiar las propiedades mecánicas, mostraron que las fibras con mayor módulo de Young fueron las de la formulación PLA-HAcTQ seguidas de las de PLA-HAcSON, esto se puede atribuir a que, al ser un producto comercial, su tamaño de partículas es más homogéneo que el de la bHA, ya que no se le realizó tamizado para homogenizar a gran escala su tamaño de partícula y esto pudo afectar al momento de la fractura.

En el cultivo celular *in vitro*, las pruebas de citotoxicidad demostraron que el material no es citotóxico para las células SAOS-2, según la norma ISO 10993, ya que el material arrojó resultados de viabilidades mayores al 80% con una densidad celular de 10 000 células/pozo. La formulación con mejores resultados fue la de PLA-bHATQ ya que al día 3 de cultivo alcanzó viabilidad celular mayor al 130%. Mostrando un efecto estimulante para el crecimiento celular.

Se evaluó la adhesión celular como continuación del experimento de citotoxicidad y al tercer día de cultivo se logra apreciar lo que parece ser adhesión de la matriz extracelular a las fibras o a las partículas de hidroxiapatita, para hacer esta evaluación más concluyente se recomienda llevar a cabo el experimento con más días de cultivo como está establecido en algunos trabajos reportados como los consultados en la bibliografía.

## PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

En este trabajo se han obtenido resultados muy prometedores, por lo que se recomienda para futuros trabajos realizar los siguientes estudios: porcentaje de hinchamiento de las fibras electrohiladas, tiempo de degradación de las fibras electrohiladas, cultivos celulares con tiempos entre 7 y 15 días para poder apreciar la adhesión celular y realizar estudios de proliferación o diferenciación celular.

Algunas recomendaciones que podrían ser útiles para posteriores estudios son: realizar un tamizaje y medir el tamaño de las partículas de HAp para homogenizarlo, así como también obtener espectros FTIR de los polvos de HAp funcionalizada para evidenciar la presencia del ácido glutámico del tratamiento químico y sin tratamiento químico.

## REFERENCIAS

Ali F.B., Ismail N. (2018) *Polymerization Methods and Characterizations for Poly(Lactic Acid) (PLA) Based Polymers*. In: Amid A., Sulaiman S., Jimat D., Azmin N. (eds) *Multifaceted Protocol in Biotechnology*. Springer, Singapore.

Altamirano Valencia, Alfonso Ali, & Vargas Becerril, Nancy, & Vázquez Vázquez, Febe Carolina, & Vargas Koudriavtsev, Tatiana, & Montesinos Montesinos, Juan José, & Alfaro Mayorga, Erika, & Álvarez Pérez, Marco Antonio (2017). *Biocompatibilidad de andamios nanofibrilares con diferentes concentraciones de PLA/Hidroxiapatita*. *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*, 18(3), 39-50.

Arcos, D., & Vallet-Regí, M. (2020). *Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants*. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(9), 1781-1800.

Ardila, L. F., Estupiñán, H. A., Vásquez, C., & Peña, D. Y. (2011). *Estudio de la biodegradación hidrolítica de recubrimientos de biopolímeros/cerámico mediante EQCM*. *Revista de ingeniería*, (35), 41-46.

Askeland Donald, R., & Phulé Pradeep, P. (2004). *Ciencia e Ingeniería de los Materiales*. Ed. Thomson Learning, Cuarta Edición. México DF México.

Ayatollahi, M. R., Yahya, M. Y., Asgharzadeh Shirazi, H., & Hassan, S. A. (2015). *Mechanical and tribological properties of hydroxyapatite nanoparticles extracted from natural bovine bone and the bone cement developed by nano-sized bovine hydroxyapatite filler*. *Ceramics International*, 41(9), 10818-10827.

Bart, J., Tiggelaar, R., Yang, M., Schlautmann, S., Zuilhof, H., & Gardeniers, H. (2009). *Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices*. *Lab on a Chip*, 9(24), 3481-3488.

Bermúdez García VS, Huaman Mujica K, Castañeda-Vía JA, Landauro CV, Quispe J, Tay Chu Jon LY. (2021). *Obtención de hidroxiapatita a través de residuos biológicos para injertos óseos dentales*. Revista Estomatológica. 31(2), 111-116.

Bouamer, A., Benrekaa, N., Younes, A., & Amar, H. (2018). *Characterization of the Polylactic acid stretched uniaxial and annealed by Raman spectrometry and Differential scanning calorimetry*. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 461(1), 012006. IOP Publishing.

Chen, F., Wang, M., Wang, J., Chen, X., Li, X., Xiao, Y., & Zhang, X. (2019). *Effects of hydroxyapatite surface nano/micro-structure on osteoclast formation and activity*. Journal of Materials Chemistry B, 7(47), 7574-7587.

Chen, W., Nichols, L., Brinkley, F., Bohna, K., Tian, W., Priddy, M. W., & Priddy, L. B. (2021). *Alkali treatment facilitates functional nano-hydroxyapatite coating of 3D printed polylactic acid scaffolds*. Materials Science and Engineering: C, 120, 111686.

Contreras Q., Héctor J., & Trujillo P., Hugo A., & Arias O., Gerardo, & Pérez C., José L., & Delgado F., Ezequiel (2010). *Espectroscopia ATR-FTIR de celulosa: aspecto instrumental y tratamiento matemático de espectros*. e-Gnosis, 8, 1-13.

EL Boujaady, Hicham & Mourabet, Mohamed & Abdelhadi, El Rhilassi & Bennani-Ziatni, M. & El Hamri, Rachid & Abderrahim, Taitai. (2016). *Adsorption of a textile dye on synthesized calcium deficient hydroxyapatite (CDHAp): Kinetic and thermodynamic studies*. 7, 4049-4063.

García-Garduño, Margarita Victoria, & Reyes-Gasga, José. (2006). *La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica*. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 9(2), 90-95.

Gérrard Eddy Jai Poinern, Ravi Krishna Brundavanam, Derek Fawcett. (2013). *Nanometre Scale Hydroxyapatite Ceramics for Bone Tissue Engineering*, American Journal of Biomedical Engineering, 3(6), 148-168.



- Gorrasi, G., & Pantani, R. (2013). *Effect of PLA grades and morphologies on hydrolytic degradation at composting temperature: Assessment of structural modification and kinetic parameters*. *Polymer Degradation and Stability*, 98(5), 1006-1014.
- Granados, M.V., & Montesinos-Montesinos, J.J., & Álvarez-Pérez, M.A. (2017). *Adhesión y proliferación de las células troncales mesenquimales de médula ósea en andamios fibrilares de poli (ácido L-láctico) (PLA)*. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 38(1), 288-296.
- Hapuhinna, K., Gunaratne, R., & Pitawala, J. (2019). Comparison between differently synthesized hydroxyapatite composites for orthopedic applications. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 7(5), 16-28.
- Hollander, A. P., & Hatton, P. V. (Eds.). (2004). *Biopolymer methods in tissue engineering*, 238, 3-4. Totowa, NJ: Humana Press.
- Hua J, Li Z, Xia W, Yang N, Gong J, Zhang J, Qiao C. (2016) *Preparation and properties of EDC/NHS mediated crosslinking poly (gamma-glutamic acid)/epsilon-polylysine hydrogels*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 79-92.
- Kaur, M., & Singh, K. (2019). *Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications*. *Materials Science and Engineering: C*, 102, 844-862.
- Kareem, M. M., & Tanner, K. E. (2020). Optimising micro-hydroxyapatite reinforced poly (lactide acid) electrospun scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31(4), 1-13.
- Kim, H. H., Jeon, H. J., Cho, H. K., Cheong, J. H., Moon, H. S., & Go, J. S. (2015). *Highly sensitive microcantilever biosensors with enhanced sensitivity for detection of human papilloma virus infection*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 221, 1372-1383.
- Koltzenburg, S., Maskos, M., & Nuyken, O. (2017). *Polymer chemistry*. 477-491. Berlin, Germany: Springer.

Kwak, Sanghwa, et al. (2016). *Micro/Nano Multilayered Scaffolds of PLGA and Collagen By Alternately Electrospinning for Bone Tissue Engineering*. *Nanoscale Research Letters*, 11(1), 323.

Li, G., Zhao, M., Xu, F., Yang, B., Li, X., Meng, X., Teng, L., Sun, F., & Li, Y. (2020). *Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(21), 5023.

Long, Y. Z., Yan, X., Wang, X. X., Zhang, J., & Yu, M. (2019). *Electrospinning: the setup and procedure*. In *Electrospinning: nanofabrication and applications*. William Andrew Publishing. 21-52.

Marín Pareja, Nathalia., Escobar, Diana Marcela., Ossa, Claudia Patricia, & Echavarría, Alejandro. (2008). *Síntesis y caracterización de hidroxiapatita microporosa, comparación con un producto comercial*. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (43),67-76

Martin-Piedra A, M.-P. L. (2019). *Matrices para Ingeniería del tejido óseo*. *Actual. Med.*, 36-45.

Mendez Gonzalez, María Magdalena. (2006). *Desarrollo de la porosidad en Hidroxiapatita y en recubrimientos cerámicos para su uso ortopédico*. Tesis de Doctorado, Instituto Politécnico Nacional. 30 -31.

Menezes, F. C. (2017). *Eletrofiacão de nanofibras poliméricas para uso em engenharia tecidual*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Molfino, H. Mauricio Gonzales, Alcalde-Yañez, Alexander, Valverde-Morón, Valery, & Villanueva-Salvatierra, Dulce. (2020). *Electrospinning: Avances y aplicaciones en el campo de la biomedicina*. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 20(4), 706-713.

Navarro, M., Michiardi, A., Castaño, O., & Planell, J. A. (2008). *Biomaterials in orthopaedics*. *Journal of the Royal Society, Interface*, 5(27), 1137-1158.

Nejati, E., Mirzadeh, H., & Zandi, M. (2008). *Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite rods/poly(L-lactide acid) composite scaffolds for bone tissue*

*engineering*. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, 39(10), 1589-1596.

Orozco Cardona J. C., Zuluaga I. M., Forero Sossa P. A., Arango Arango P. J., & Restrepo Parra E. (2014). *Síntesis y caracterización de la hidroxiapatita natural obtenida del hueso de cerdo*. Revista Colombiana De Materiales, (5), 165-171.

Rajan, M., & Sumathra, M. (2019). *Biomedical Applications of Hydroxyapatite Nanocomposites*. In *Polymer Nanocomposites in Biomedical Engineering*. Springer, Cham. 167-204.

Ramirez-Gutierrez CF, Palechor-Ocampo AF, Londoño-Restrepo SM, Millán-Malo BM, Rodríguez-García ME. (2016). *Cooling rate effects on thermal, structural, and microstructural properties of bio-hydroxyapatite obtained from bovine bone*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater.104(2):339-44.

Reis, P. R. S. (2018). *Obtenção e caracterização de compósitos de blendas poliméricas biodegradáveis reforçadas com bio-hidroxiapatita*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Robles-García, M. A., Francisco, R., Márquez-Ríos, E., Barrera-Rodríguez, A., Aguilar-Martínez, J., & toro-Sánchez, C. L. D. (2014). *Aplicaciones biomédicas, textiles y alimentarias de nanoestructuras elaboradas por electrohilado*. Biotecnia, 16(2).

Rodríguez, I. C. (2014). *Preparación y propiedades bioactivas de bionanocompósitos para regeneración de tejido óseo basada en polímeros y nanopartículas cerámicas*. Santiago, Chile: Universidad de Chile, Facultad de Medicina.12-15.

Rodríguez Sáenz, Álvaro A., Lozano Macías, M. A., Benedetti Canabal, A. E., Munévar Niño, J. C., Sarmiento O'Meara, J. A., & Gómez Bahamón, R. A. (2017). *Evaluación in vitro de la adhesión de células troncales mesenquimales a matrices dentales impresas en tercera dimensión*. Universitas Odontologica. 36 (77).

Soto Góngora, Sergio, & Taxis González, Miriam Guadalupe. (2005). *Injertos óseos: Una alternativa efectiva y actual para la reconstrucción del complejo cráneo-facial*. Revista Cubana de Estomatología, 42(1).

Tanir, T. E., Hasirci, V., & Hasirci, N. (2014). *Electrospinning of chitosan/poly(lactic acid-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composite nanofibrous mats for tissue engineering applications*. Polymer Bulletin, 71(11), 2999-3016.

VALERO-VALDIVIESO, M. F., Ortegon, Y., & Uscategui, Y. (2013). Biopolymers:

Yan, X., Yu, M., Ramakrishna, S., Russell, S. J., & Long, Y. Z. (2019). *Advances in portable electrospinning devices for in situ delivery of personalized wound care*. Nanoscale, 11(41). 19166-19178.

Yue TW, Chien WC, Tseng SJ, Tang SC. (2007). *EDC/NHS-mediated heparinization of small intestinal submucosa for recombinant adeno-associated virus serotype 2 binding and transduction*. Biomaterials, 28(14), 2350-2357.