



*“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOFIBRAS  
DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO) MODIFICADO CON  
COLÁGENO MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
ELECTROHILADO”*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIA  
E INGENIERÍA EN MATERIALES**

P R E S E N T A

**I.Q. ALIDA OSPINA OREJARENA**

Tutor: Dr. Alfredo Maciel Cerda



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

A mi hermosa familia por el gran esfuerzo y apoyo que me brindaron para poder llegar a México y realizar este trabajo de investigación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Investigaciones en Materiales por permitirme ser parte de su comunidad, por la formación tanto académica como profesional que durante este tiempo adquirí y por el apoyo brindado para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Dr. Alfredo Maciel Cerda por ser más que un maestro para mí, por su amistad, por su apoyo incondicional, por su entrega, por su asesoría, por su confianza, por hacer todo esto posible mil gracias.

Al Dr. Ricardo Vera Graziano por permitirme ser parte del grupo de investigación, por su confianza, por su gran apoyo y asesoría.

Al Departamento de polímeros y materiales de la Universidad de Sonora por permitirme realizar la estancia de investigación.

A la Dra. Maria Mónica Castillo Ortega por permitirme trabajar en su laboratorio, por su gran apoyo tanto académico y personal durante mi estancia en la Universidad de Sonora, por su asesoría y por el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo.

Al Dr. Raúl Montiel Campos por su apoyo, asesoría y por el tiempo dedicado para la revisión de esta tesis.

A mis otros jurados M en C. José Manuel Méndez Stivalet y Dra. Lioudmila Fomina por el tiempo brindado para la revisión de esta tesis.

A todos mis compañeros y maestros del grupo de investigación por su gran apoyo y asesoría durante el desarrollo de este trabajo y durante mi estancia en el IIM.

Al Ing. José de Jesús Camacho por su colaboración para la puesta en marcha del laboratorio donde se realizó este trabajo.

A Omar Novelo por su enorme disposición y gran ayuda en las sesiones de microscopía electrónica de barrido.

A Lázaro Huerta por su gran apoyo para las pruebas y análisis de los espectros de XPS.

A Esteban Fregoso por su gran apoyo en las pruebas de caracterización térmica.

A Gerardo Cedillo por su gran apoyo en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN

A Ernesto Sánchez por su apoyo en la realización de las pruebas mecánicas.

A Salvador López por su apoyo en las pruebas de GPC.

A Erika Contreras por su apoyo en las pruebas de ángulo de contacto.

A Carlos Flores por su apoyo en las pruebas de TEM.

A Miguel Canseco por su colaboración en los espectros de IR.

A la Dra. Cristina Piña y Karla Gómez por la muestra de colágeno brindada para las pruebas preliminares del trabajo experimental.

A la Dra. Lorena Armenta por su apoyo en los espectros de IR y  $^1\text{H}$ -RMN en la Universidad de Sonora.

Al Ing. Roberto Mora por su apoyo en los espectros de XPS en la Universidad de Sonora.

Al Dr. José Carmelo Encinas de la Universidad de Sonora por su apoyo en la preparación de las probetas para las pruebas mecánicas.

A Gaby, Irela, Alma y Juan Manuel por su gran apoyo y colaboración en mi estancia en la Universidad de Sonora.

Al Dr. Héctor Domínguez Castro por su gran apoyo y colaboración en la asignación de la beca de maestría durante el primer semestre, gracias al apoyo otorgado por el proyecto PAPIIT #IN102207-3.

A Conacyt por la beca otorgada para el segundo, tercero y cuarto semestre del programa de maestría.

Al programa de movilidad nacional ECOES-SANTANDER de la UNAM por el apoyo otorgado para realizar la estancia de investigación en la Universidad de Sonora.

Al ICy TDF por el apoyo otorgado para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Dr. Tatsuo Akachi, Isabel, Lilia y Esther por su colaboración en todos los trámites realizados en el posgrado y apoyos otorgados para la participación en congresos.

A Don Adrián Gallardo por su colaboración en la fabricación y reparación de piezas para la realización del trabajo experimental.

A la Lic. Teresa Vázquez por su colaboración en los trámites de la Biblioteca del IIM.

A Carlos Ramos por toda su colaboración durante mi estancia en el IIM.

A Eyleen Vanessa Moreno por todo su apoyo y colaboración para el desarrollo de este trabajo.

A Sonia reyes, Carolina Caicedo, Johanna Galindo, Johans Restrepo, David Giraldo por todo su apoyo en mi estancia en México y porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en todo para que pudiera sacar este trabajo adelante, muchísimas gracias.

A todos los que se me escapan, y de una u otra forma contribuyeron al desarrollo de este proyecto, mis más sinceros agradecimientos y excusas.

## DEDICATORIA

*A mi **mami Rosita** y a mis **hnas Bella y Surley** por ser las mujeres más excepcionales que conozco, porque me siento orgullosa de ser su hija y hermana, por ser mi ejemplo a seguir, por su apoyo incondicional y sacrificio para poder emprender este viaje a México y hacer de este sueño una realidad, por su confianza, por ser mis guías en este camino llamado vida, por todo el amor que me brindan cada día, y especialmente porque todo lo que soy se lo debo a  
ustedes*

*A ti **mi shenoa** por todo el amor que te tengo y porque llegaste a llenarnos de vida y felicidad*

*A mi **padre** por enseñarme que el estudio es una de las herramientas más valiosas en la vida*

*Y A ti **mama oti** que desde el cielo siempre me acompañas.*

*“Nuestras almas, cuyas facultades pueden comprender la maravillosa arquitectura del mundo, y medir el curso de cada planeta vagabundo, aún escalan tras el conocimiento infinito” Christopher Marlowe*

## TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	1
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABLAS .....	8
TRABAJOS EN CONGRESOS.....	9
RESUMEN .....	10
CAPÍTULO 1 .....	12
INTRODUCCIÓN .....	12
1.1    Antecedentes .....	12
1.2    Justificación.....	15
1.3    Objetivos .....	16
1.3.1    Objetivo general.....	16
1.3.2    Objetivos específicos .....	16
CAPÍTULO 2 .....	18
FUNDAMENTO TEÓRICO.....	18
2.1    Ingeniería de tejidos .....	18
2.2    Polímeros usados para la fabricación de andamios en ingeniería de tejidos .....	19
2.2.1    Polímeros de origen natural.....	20
2.2.1.1    Colágeno.....	22
2.2.1.1.1    Generalidades.....	22
2.2.1.1.2    Tipos de colágeno .....	23
2.2.1.1.3    Caracterización del colágeno para aplicaciones en ingeniería de tejidos .....	24
2.2.2    Polímeros de origen sintético.....	26
2.2.2.1    Poli (ácido láctico).....	27
2.2.2.1.1    Generalidades.....	27



2.2.2.1.2 Síntesis del poli (ácido láctico).....	30
2.2.2.1.3 Propiedades del poli (ácido láctico).....	31
2.2.2.1.4 Degradación del poli (ácido láctico).....	33
2.2.2.1.5 Ventajas y limitaciones del poli (ácido láctico) .....	34
2.2.2.1.6 Modificación del poli (ácido láctico) .....	35
2.3 Nanotecnología en ingeniería de tejidos .....	37
2.3.1 Técnicas para la fabricación de nanofibras poliméricas para ingeniería de tejidos.....	37
2.3.1.1 Electrohilado.....	38
CAPÍTULO 3 .....	41
TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	41
3.1 Descripción de las técnicas analíticas .....	41
3.1.1 Espectroscopía de infrarrojo (IR) .....	41
3.1.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	42
3.1.3 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) .....	44
3.1.4 Caracterización térmica.....	46
3.1.4.1 Análisis termogravimétrico (TGA).....	46
3.1.4.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	47
3.1.5 Cromatografía de permeación en gel.....	48
3.1.6 Ángulo de contacto .....	49
3.1.7 Microscopía electrónica .....	50
3.1.7.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	50
3.1.7.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	51
3.1.8 Caracterización mecánica .....	53
3.1.8.1 Ensayo de Tensión.....	53
CAPÍTULO 4 .....	57
SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	57
4.1 Materiales .....	57

4.2 Procedimiento Experimental.....	57
4.2.1 Modificación del poli (ácido láctico) con anhídrido maléico (AM-PLLA).....	57
4.2.1.1 Caracterización.....	58
4.2.1.1.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (ATR-FTIR).....	58
4.2.1.1.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (1H-RMN).....	58
4.2.1.1.3 Cromatografía de permeación en gel.....	59
4.2.1.1.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	59
4.2.1.1.5 Análisis termogravimétrico (TGA).....	59
4.2.1.1.6 Ángulo de contacto.....	59
4.2.1.1.7 Determinación de grupos anhídrido.....	60
4.2.2 Obtención y caracterización de nanofibras mediante la técnica de electrohilado.....	60
4.2.2.1 Equipo de electrohilado.....	60
4.2.2.2 Preparación de las soluciones poliméricas para el electrohilado.....	62
4.2.2.2.1 Preparación de las soluciones de PLLA y Colágeno.....	62
4.2.2.2.2 Preparación de las soluciones de AM-PLLA y Colágeno.....	62
4.2.2.3 Obtención de las nanofibras.....	63
4.2.2.4 Caracterización de las nanofibras.....	64
4.2.2.4.1 Espectroscopía de infrarrojo (ATR-FTIR).....	64
4.2.2.4.2 Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	64
4.2.2.4.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	65
4.2.2.4.4 Análisis termogravimétrico (TGA).....	65
4.2.2.4.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	65
4.2.2.4.6 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	65
4.2.2.4.7 Ensayo de tensión.....	66
CAPÍTULO 5.....	67
RESULTADOS.....	67
5.1 Modificación del poli (ácido láctico) con anhídrido maléico (AM-PLLA).....	67

5.1.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (ATR-FTIR).....	69
5.1.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ( <sup>1</sup> H) .....	73
5.1.4 Cromatografía de permeación en gel.....	74
5.1.5 Análisis termogravimétrico (TGA) .....	76
5.1.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	78
5.1.6 Angulo de contacto .....	81
5.2 Preparación de nanofibras por medio de la técnica de electrohilado.....	81
5.2.1 Microscopia electrónica de barrido.....	81
5.2.1.1 Análisis de la distribución de diámetros en las nanofibras .....	81
5.2.1.1.1 Electrohilado de PLLA.....	81
5.2.1.1.2 Electrohilado de colágeno (Col) y PLLA-Col.....	85
5.2.1.1.3 Electrohilado de AM-PLLA1/Col .....	88
5.2.1.1.4 Electrohilado coaxial.....	90
5.2.1.2 Análisis del porcentaje de área porosa en las nanofibras.....	91
5.2.2 Microscopia electrónica de transmisión (TEM) .....	93
5.2.3 Análisis termogravimétrico (TGA) .....	93
5.2.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	95
5.2.5 Espectroscopía de infrarrojo .....	98
5.2.6 Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (XPS) .....	99
5.2.7 Ensayo de tensión.....	102
CAPÍTULO 6 .....	108
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	108
CAPÍTULO 7 .....	110
CONCLUSIÓN .....	110
CAPÍTULO 8 .....	111
RECOMENDACIONES.....	111
REFERENCIAS .....	112

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Triada de la ingeniería de tejidos (ej. Regeneración de tejido dental).....	19
Figura 2. Estructura molecular del colágeno tipo I .....	23
Figura 3. Estereoisómeros de ácido láctico y lactida .....	29
Figura 4. Síntesis de lactida .....	30
Figura 5. Polimerización por apertura de anillo de L-lactida.....	31
Figura 6. Equipo de electrohilado a) Colección de fibras alineadas y no alineadas; b) esquema de configuración de agujas coaxiales .....	40
Figura 7. Niveles de energía de los núcleos en un campo magnético .....	42
Figura 8. Espectrómetro de resonancia magnética nuclear .....	43
Figura 9. Diagrama de un espectrómetro XPS .....	46
Figura 10. Termogramas diferencial (curva superior, eje derecho) y convencional.....	47
Figura 11. Representación esquemática de una gota de líquido (L) que reposa en equilibrio sobre una superficie sólida horizontal (S) en una atmósfera de gas (G). Ángulo de contacto y tensiones superficiales ( $\gamma$ ) en el punto triple. ....	50
Figura 12. Esquema general de las partes de un microscopio electrónico de barrido.....	51
Figura 13. Esquema de un microscopio electrónico de transmisión.....	52
Figura 14. Curvas típicas para ensayos de esfuerzo contra deformación en polímeros .....	54
Figura 15. Curva esfuerzo-deformación de un material.....	56
Figura 16. Máquina de ensayo de tensión.....	56
Figura 17. Equipo de electrohilado.....	61
Figura 18. Sistema de una aguja.....	61
Figura 19. Sistema de dos agujas coaxiales .....	62
Figura 20. Ruptura homolítica del peróxido de benzoílo.....	67
Figura 21. Reacción propuesta del injerto de AM en la cadena del PLLA.....	69
Figura 22. Espectro IR de PLLA .....	70
Figura 23. Espectro IR de AM-PLLA1.....	71

Figura 24. Espectro IR de AM-PLLA2.....	71
Figura 25. Espectro IR de AM-PLLA3.....	72
Figura 26. Espectro ATR-FTIR de a) PLLA y AM-PLLA3 b) Ampliación de los espectros en el grupo carbonilo. ....	72
Figura 27. Espectro <sup>1</sup> H-RMN de PLLA .....	73
Figura 28. Espectro <sup>1</sup> H-RMN de AM-PLLA1.....	74
Figura 29. Efecto de la concentración de AM sobre el rendimiento del injerto .....	75
Figura 30. Efecto de la concentración de AM sobre el peso molecular promedio en número. ....	76
Figura 31. Termogramas del PLLA, AM-PLLA1, AM-PLLA2 y AM-PLLA3 .....	77
Figura 32. Termogramas del PLLA, AM, AM-PLLA10 y AM-PLLA1.....	77
Figura 33. Termograma de DSC para el PLLA .....	78
Figura 34. Termograma de DSC para el AM-PLLA1.....	79
Figura 35. Termograma de DSC para el AM-PLLA2.....	79
Figura 36. Termograma de DSC para el AM-PLLA3.....	80
Figura 37. Micrografías de SEM (1000x) de nanofibras de PLLA a) 10% p/v; b) 13% p/v; c) 15% p/v. La velocidad de inyección, el voltaje aplicado y la distancia se mantuvieron constantes (0.6 ml/h, 10 kV, 10cm).....	82
Figura 38. Micrografías SEM (1000X) de nanofibras de PLLA (13% p/v) a) 0.4 ml/h, b) 0.6 ml/h, c) 0.8 ml/h. Voltaje y distancia constante (10 kV, 10cm).....	83
Figura 39. Micrografías SEM (1000X) de nanofibras de PLLA a) 10 kV, b) 13kV. Concentración de la solución, velocidad de inyección y distancia constante (13% p/v, 0.4 ml/h, 10cm).....	84
Figura 40. a) Micrografía SEM (1000X) de (Col) tipo I liofilizado extraído de piel de borrego (Elastin Products Company, Inc.), b) Micrografías SEM (10000X) de nanofibras de Colágeno.....	86
Figura 41. a) Micrografía SEM (100X) de nanofibras de PLLA-Col (30:1), b) Micrografía SEM (1000X) de nanofibras de PLLA-Col (30:1).....	87
Figura 42. Micrografías de SEM (10000x) de nanofibras de a) PLLA, b) AM-PLLA1-Col (100:0), c) AM-PLLA1-Col (30:1), d) AM-PLLA1-Col (15:1), e) Colágeno (0:100).....	89
Figura 43. Micrografías de SEM (10000x) de nanofibras coaxiales de a) AM-PLLA1-Col (coraza)/PLLA (núcleo), b) AM-PLLA1-Col (coraza)/Col (núcleo) .....	90
Figura 44. Micrografía de SEM (10000x) de nanofibras de PLLA con análisis de porosidad (% $\phi$ =41.2) .....	91

Figura 45. Micrografía de SEM (10000x) de nanofibras de PLLA-Col con análisis de porosidad (% $\phi=30.6$ ).....	91
Figura 46. Micrografía de SEM (10000x) de nanofibras de AM-PLLA1-Col (30:1) con análisis de porosidad (% $\phi=45.7$ ).....	92
Figura 47. Micrografía de SEM (10000x) de nanofibras de AM-PLLA1-Col (15:1) con análisis de porosidad (% $\phi=43.9$ ).....	92
Figura 48. Micrografía de SEM (10000x) de nanofibras de colágeno con análisis de porosidad (% $\phi=45$ ).....	92
Figura 49. Micrografía de TEM (25000x) de nanofibras de a) AM-PLLA1-Col (coraza)/Col (núcleo), b) AM-PLLA1-Col (coraza)/PLLA (núcleo).....	93
Figura 50. Termogramas de NFPLLA, NFCol, NFAM-PLLA1 y NFAM-PLLA1-Col. ....	94
Figura 51. Termogramas de PLLA, Col, AM-PLLA1 y AM-PLLA1-Col.....	95
Figura 52. Termograma de NFPLLA.....	96
Figura 53. Termogramas de PLLA-Col y AM-PLLA1-Col.....	96
Figura 54. a) Espectro IR de Col, b) Espectro IR de nanofibras de AM-PLLA1/Col.....	98
Figura 55. Espectro XPS de amplio barrido de nanofibras de a) PLLA, b) AM-PLLA1,c) PLLA-Col (30:1) y d) AM-PLLA1-Col (30:1).....	100
Figura 56. Espectros para el orbital C 1s de nanofibras de a) AM-PLLA1,b) PLLA-Col (30:1),c) AM-PLLA1-Col (30:1).....	101
Figura 57. Espectros para el orbital O 1s de nanofibras de a) AM-PLLA1,b) PLLA-Col (30:1),c) AM-PLLA1-Col (30:1).....	101
Figura 58. Espectros para el orbital O 1s de nanofibras de a) PLLA-Col (30:1),b) AM-PLLA1-Col (30:1).....	102
Figura 59. Curva esfuerzo vs deformación de la membrana de nanofibras de PLLA. ....	103
Figura 60. Micrografía SEM (1000X) de la membrana de nanofibras de PLLA a) en el punto inicial de la curva, b) en el punto C de la curva de la Figura 55.....	103
Figura 61. Propiedades mecánicas de las membranas de nanofibras.....	105
Figura 62. Propiedades mecánicas de las membranas fabricadas con el sistema de agujas coaxiales. ...	107

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación entre los polímeros sintéticos y naturales.....	20
Tabla 2. Polímeros naturales usados en ingeniería de tejidos.....	21
Tabla 3. Ventajas y desventajas del colágeno como biomaterial.....	25
Tabla 4. Poliésteres Biodegradables usados en ingeniería de tejidos.....	27
Tabla 5. Resumen de experimentos.....	58
Tabla 6. Electrohilado de PLLA.....	63
Tabla 7. Electrohilado de colágeno (Col).....	63
Tabla 8. Electrohilado de PLLA/Col.....	63
Tabla 9. Electrohilado de AM-PLLA1/Col.....	63
Tabla 10. Electrohilado coaxial.....	64
Tabla 11. Grupos funcionales característicos según espectro ATR-FTIR de PLLA.....	70
Tabla 12. Peso molecular y rendimiento del injerto como función del % de AM.....	74
Tabla 13. Datos de $T_g$ y $T_f$ obtenidos de los termogramas de DSC de las muestras de AM-PLLA.....	80
Tabla 14. Ángulos de contacto.....	81
Tabla 15. . Condiciones óptimas para la obtención de nanofibras de PLLA.....	85
Tabla 16. Datos de $T_g$ , $T_c$ y $T_f$ obtenidos de los termogramas de DSC, para el primer calentamiento de las muestras de nanofibras.....	97
Tabla 17. Datos de $T_g$ , $T_c$ y $T_f$ obtenidos de los termogramas de DSC, para el segundo calentamiento de las muestras de nanofibras.....	97
Tabla 18. Grupos funcionales característicos del colágeno en la nanofibra de AM-PLLA1/Col.....	99

## TRABAJOS EN CONGRESOS

**A. Ospina**, A. Maciel, R. Vera-Graziano, E. Moreno, C. Piña, and R. Montiel. **Preparation of Poly (Lactic Acid)/Collagen Electrospun Fibers for Tissue Engineering Applications**. XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México, Tijuana B.C, Octubre de 2010 (presentación tipo poster)

R. Vera-Graziano, A. Maciel, R. Montiel, E.Y. Gómez, E. Moreno, **A. Ospina**, C. Garcia, E. Martinez, N. Batina, J.P. Hinestroza, I. Morales. **Efecto de las Condiciones de Electrohilado en la Estructura y Propiedades de Nanofibras de Poli (Ácido Láctico)**. Semana de la Ciencia y la Innovación 2010 del ICyTDF, Ciudad de México, Noviembre de 2010 (presentación tipo poster)

**A. Ospina**, A. Maciel, R. Vera-Graziano, R. Montiel. Nanofibras de Poli (Ácido Láctico) Modificado con Colágeno para Regeneración de Tejidos. Semana de Vanguardia tecnológica 2011 del ICyTDF, Ciudad de México, Marzo de 2011 (presentación tipo poster)



## RESUMEN

Recientes estudios han conducido al desarrollo de andamios a base de polímeros degradables y sintéticos con nanofibras obtenidos mediante la técnica de electrohilado, para su aplicación en el campo de la ingeniería de tejidos. El uso efectivo de estos andamios poliméricos no solo se basa en la obtención de las nanofibras, las cuales pueden imitar la estructura física de la matriz nativa extracelular, sino también de las características bioquímicas del material usado. El poli (ácido láctico) (PLA) es uno de los polímeros biodegradables sintéticos más conocidos a nivel mundial. Es ampliamente utilizado en el área biomédica, debido a su biocompatibilidad, buenas propiedades mecánicas y biodegradabilidad. Sin embargo, presenta algunas desventajas como su alta hidrofobicidad y ausencia de grupos reactivos en la cadena para el acoplamiento con moléculas bioactivas. Por otra parte, los polímeros naturales como el colágeno tienen una alta bioactividad e hidrofiliidad, lo cual beneficia la adhesión, el crecimiento y la proliferación celular, sin embargo tiene la desventaja que sus propiedades mecánicas no son las mejores. Es por esto que muchas investigaciones se han encaminado a la búsqueda de un acoplamiento del PLA, y el colágeno, ya que la literatura reporta que las mezclas físicas de estos dos polímeros son parcialmente miscibles, lo cual reduce drásticamente las propiedades mecánicas del PLA.

En este trabajo se realizó el injerto de anhídrido maléico (AM) a la cadena del poli (L-ácido láctico) (PLLA), para favorecer el acoplamiento de éste con moléculas bioactivas. Por último, se prepararon nanofibras del PLLA modificado con colágeno (Col), con el fin de crear un andamio con propiedades mecánicas y biológicas adecuadas para el crecimiento y adhesión celular.

El injerto de anhídrido maléico a la cadena del poli (L-ácido láctico) (AM-PLLA) se llevó a cabo mediante una reacción por radicales libres. Se empleó peróxido de benzoílo como iniciador. Los resultados se reportaron con base al porcentaje de injerto, peso molecular, comportamiento térmico y ángulo de contacto, esto último para medir su hidrofobicidad. Se

estableció una relación inversa entre la concentración inicial de AM con el porcentaje de injerto y peso molecular. También se observó que a medida que aumentó el porcentaje de injerto de AM en la cadena de PLLA disminuyó el ángulo de contacto de las muestras comparado con el de PLLA sin modificar.

Las nanofibras del PLLA modificado con colágeno (AM-PLLA-Col) se prepararon mediante la técnica de electrohilado y se caracterizaron de acuerdo a sus propiedades morfológicas, superficiales, térmicas y mecánicas. El acoplamiento efectivo del colágeno con el AM-PLLA en las nanofibras, se verificó mediante las técnicas de espectroscopía de infrarrojo (IR) y fotoelectrónica de rayos X (XPS). Las propiedades mecánicas y térmicas de las nanofibras de AM-PLLA-Col fueron mejores comparadas con las de las nanofibras de la mezcla física de PLLA-Col, con la misma proporción de colágeno.

Con estos resultados se puede afirmar que, la modificación del PLLA con anhídrido maléico mejora la hidrofiliidad del PLLA y favorece el acoplamiento de éste con el colágeno. Además, aumenta las propiedades mecánicas de las nanofibras de AM-PLLA-Col, en comparación con las nanofibras de la mezcla de PLLA-Col.

## **CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Antecedentes**

En el cuerpo, la mayoría de las células están rodeadas por una mezcla compleja de materiales inertes que componen la matriz extracelular (MEC). Esta matriz se compone de diversas proteínas y proteoglicanos que se ensamblan en una red altamente ordenada de fibras a escala nanométrica en estrecha relación con las células que las secretan. También alberga varias moléculas biológicamente activas tales como factores de crecimiento, citoquinas, enzimas e inhibidores. La composición y distribución de estas moléculas no es rígida, lo que da lugar a diversas organizaciones y funciones de la MEC en diferentes tejidos y en diferentes etapas de desarrollo en un mismo tejido [1-3].

La MEC no sólo sirve como un cerco en el cual las células se anclan y donde proporciona una resistencia mecánica suficiente para estabilizar la estructura del tejido, sino también desempeña un papel importante en la regulación de los comportamientos de las células en contacto con ella. La interacción célula-MEC contribuye a la migración, proliferación y diferenciación celular, lo cual es parte fundamental para la construcción, desarrollo y funcionalidad del tejido [4-5].

Por lo tanto, la fabricación de andamios que puedan imitar las funciones de la MEC es de gran importancia y presenta una de las etapas críticas hacia el éxito de la ingeniería de tejidos.

Debido a la similitud de las fibras a escala nanométrica con la estructura de la MEC, las nanofibras han sido ampliamente utilizados como andamios en ingeniería de tejidos [6-9].

El electrohilado se conoce desde 1934, no obstante fue hasta el año de 1990 que dicha técnica atrajo gran atención, como un método sencillo para la producción de fibras a escala nano y micro, debido a su simplicidad, versatilidad y bajo costo. El proceso central consiste en la aplicación de un alto potencial eléctrico a una gota colgante de una solución polimérica o un polímero fundido, para formar una nano o micro fibra [10].

Numerosos polímeros de origen natural y sintético han sido utilizados para producir andamios de nanofibras a través de la técnica de electrohilado [11-15]. Los polímeros biodegradables naturales, como el colágeno, proporcionan sitios inherentes de unión para las células y promueven la adhesión y crecimiento celular. Sin embargo, estos materiales por lo general son aislados de tejidos animales o humanos, lo que implica que tienen un alto costo y no están disponibles en gran cantidad y presentan variaciones de lote a lote. Por el contrario, los polímeros biodegradables sintéticos como el Poli (ácido láctico) (PLA) permiten un control preciso sobre sus propiedades fisicoquímicas, como la tasa de degradación, la porosidad, la microestructura y sus propiedades mecánicas. Es por esto que muchas investigaciones se han encaminado en la búsqueda de un acoplamiento efectivo de estas dos clases de polímeros para combinar las ventajas de cada uno de ellos[16-19].

Gaoyong Zhang y colaboradores [20] realizaron una mezcla física entre moléculas de PLA y colágeno y encontraron que el PLA forma una fase continua y el colágeno forma una fase separada, lo que indicó que eran parcialmente compatibles. La introducción de la fase de

colágeno redujo drásticamente las propiedades mecánicas del PLA y la tasa de biodegradabilidad del PLA se incrementó con el aumento en el contenido de colágeno.

Las matrices de colágeno son generalmente entrecruzadas químicamente (por ejemplo, utilizando glutaraldehído) para mejorar la estabilidad biológica, la facilidad de manejo y las propiedades mecánicas. Sin embargo pueden causar problemas de toxicidad debido a residuos de catalizadores, iniciadores o agentes de entrecruzamiento que no reaccionaron[21-22]. S. Downes y colaboradores[23] desarrollaron un biocompuesto por medio de la impregnación de colágeno liofilizado a una solución de policaprolactona (PCL) en diclorometano (DCM), seguido por una evaporación de disolvente. Este enfoque evita los problemas de toxicidad asociados a productos químicos. Sin embargo hasta el momento este tipo de materiales solo han sido investigados para su aplicación en la regeneración de tejidos blandos[24].

Por otra parte, es conocido que las propiedades superficiales del PLA no son ideales para el crecimiento celular debido a que es relativamente hidrofóbico comparado con la naturaleza de la matriz extracelular. Por lo tanto, es incapaz de interactuar específicamente con células y además, no posee ningún grupo funcional que pueda ser atacado por moléculas biológicamente activas.

Dado que el PLA posee excelentes propiedades mecánicas y degradativas y además es aprobado por la U.S. Food Drug Administration (FDA) y otros organismos reguladores para su implantación en el ser humano, resulta entonces prometedor estudiar la modificación de la superficie del PLA, y así obtener una superficie funcional sin cambiar las propiedades del polímero. Es por ello que se han realizado diferentes trabajos en esta área, entre los cuales se destacan el tratamiento por plasma, la hidrólisis y la aminólisis[25-28].

Sin embargo, los grupos reactivos introducidos en la superficie del PLA pueden perderse después de un periodo de degradación, por lo tanto, existen otras investigaciones las cuales involucran la introducción de grupos reactivos por medio de la copolimerización de la lactida con moléculas que contengan grupos terminales funcionales en su cadena (por ejemplo grupos amino , grupos carboxilo o grupos hidroxilo) o por el acoplamiento químico de los grupos finales del PLA con poli etilenglicol y sus derivados. La copolimerización puede cambiar la estructura de la cadena del PLA, y por lo tanto, cambia su biodegradabilidad. La cantidad de grupos reactivos injertados por acoplamiento químico con los grupos finales del PLA puede ser limitada.

Charles Baquey y colaboradores [29] acoplaron, mediante enlace covalente, colágeno sobre PLA por medio de irradiación de rayos gamma utilizando poli (ácido acrílico) como agente de acoplamiento. Esta técnica ha sido intensamente utilizada para diferentes aplicaciones en el campo de la medicina, tales como la producción de polímeros hemocompatibles, inmovilización de enzimas en matrices poliméricas o para acarreadores de fármacos. Un gran número de enzimas se han inmovilizado sobre polímeros mediante este procedimiento como: ureasa, celulasa y lipasa. En estas investigaciones, el injerto se ha llevado a cabo en dos etapas o a baja temperatura. Esta técnica se basa en la introducción de sitios activos sobre el sustrato polimérico y el acoplamiento de la molécula a injertar. Sin embargo, esta técnica tiene la desventaja de que en algunos casos induce a un alto grado de degradación del polímero y, por tanto, un cambio contundente en sus propiedades mecánicas.

## 1.2 Justificación

Recientemente se ha buscado modificar el PLA sin producir cambios en su estructura que puedan provocar cambios en sus propiedades físicas y químicas. Debido a esto Yuan Liang

Wang y colaboradores [30-32] reportaron un nuevo método para la introducción de grupos reactivos en la cadena de PLA. Este se lleva a cabo en varias etapas, en la primera etapa se realiza el injerto de anhídrido maléico a la cadena de PLA, en segunda instancia se hace reaccionar los grupos anhídrido injertados con una diamina lo cual permite obtener grupos carboxilos y aminos en la cadena del PLA. Finalmente se espera que estos grupos favorezcan el acoplamiento del PLA con moléculas bioactivas tales como péptidos o proteínas y así obtener un compuesto con buenas propiedades mecánicas y alta actividad celular. Por lo tanto, para favorecer el acoplamiento del PLA con moléculas bioactivas, en este trabajo se realizó el injerto de anhídrido maléico (AM) a la cadena del poli (L-ácido láctico) (PLLA). Se evitó el uso de diaminas para reducir las etapas del proceso y además que la diamina podría atacar el grupo éster del PLA y cortar las cadenas poliméricas. Por último, se prepararon nanofibras del PLLA modificado con colágeno (Col) mediante la técnica de electrohilado, con el fin de crear un andamio con propiedades mecánicas y biológicas adecuadas para el crecimiento y adhesión celular.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Modificar el poli (ácido láctico) mediante el injerto de anhídrido maléico en su cadena, para favorecer el acoplamiento de éste con moléculas bioactivas y así obtener nanofibras del polímero modificado con colágeno mediante la técnica de electrohilado, para crear un andamio con propiedades morfológicas, mecánicas y térmicas aptas para su aplicación en la regeneración de tejidos.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Sintetizar el poli (ácido láctico) modificado con anhídrido maléico.

- Caracterizar el poli (ácido láctico) modificado con anhídrido maléico mediante las diferentes técnicas espectroscópicas (ATR-FTIR y RMN de  $^1\text{H}$ ) y térmicas (TGA y DSC).
- Obtener nanofibras del poli (ácido láctico) modificado con colágeno, mediante la técnica de electrohilado.
- Conocer las propiedades morfológicas, superficiales, térmicas y mecánicas de las nanofibras electrohiladas.



## CAPÍTULO 2 FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.1 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que combina los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida con el propósito de mejorar, reparar o reemplazar la función de un tejido u órgano. Esta se basa en la combinación de tres componentes básicos (ver Figura 1): células (fuentes: los nervios, el hígado, el páncreas, los cartílagos y huesos, así como de embriones o de células precursoras), andamios (matriz extracelular artificial donde las células se adjuntan y se cultivan) y señales moleculares (la adhesión celular, la proliferación, migración y diferenciación, factores de crecimiento, receptores).

La composición, es decir, los biomateriales de origen sintético o natural, y la arquitectura de un andamio para ingeniería de tejidos se determinan teniendo en cuenta las interacciones de las células dentro del ambiente de destino. El propósito es permitir que el cuerpo sane, por medio de la introducción de andamios y que los reconozca como parte de él y así los utilice para regenerar el nuevo tejido funcional [33-34].

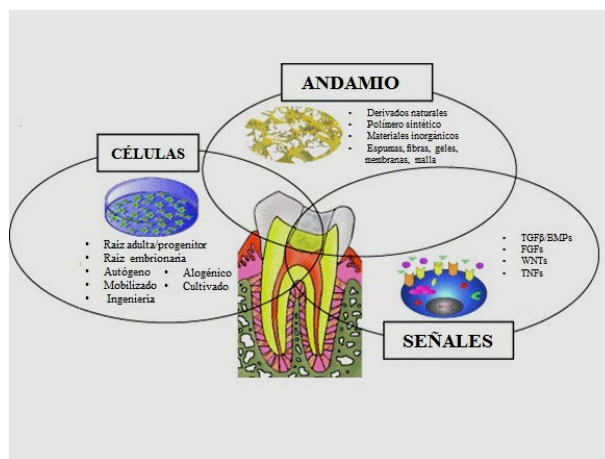


Figura 1. Triada de la ingeniería de tejidos (ej. Regeneración de tejido dental).

Por tal motivo, estos andamios deben ser diseñados para adaptarse a un conjunto específico de requerimientos. El primer requisito es que el material sea biocompatible y que cumpla con su función, sin interrumpir otros procesos fisiológicos. Esta funcionalidad incluye la capacidad de promover el crecimiento celular, la diferenciación, y la posibilidad de que haya una orientación tridimensional, con espacio para las células. En segundo lugar, el andamio no debe promover o iniciar ninguna reacción adversa en el tejido [35]. Además, para el éxito clínico y comercial, la fabricación de estos andamios debe ser simple y lo suficientemente versátil para producir una gran variedad de configuraciones que se acomoden al tamaño, forma, resistencia y otras complejidades del tejido u órgano objetivo. Finalmente, una vez implantado ya sea “in vitro” o “in vivo”, el material debe ser removido mediante degradación y/o absorción, para dejar solo el tejido nativo [35-36].

## 2.2 Polímeros usados para la fabricación de andamios en ingeniería de tejidos

Los andamios pueden ser hechos a partir de cualquiera de las tres familias de materiales: metales, cerámicos y polímeros. Sin embargo, los materiales poliméricos son los que se han utilizado con mayor frecuencia y preferencia [37].

Los polímeros utilizados en ingeniería de tejidos pueden ser de origen natural o sintético o la combinación de ambos. Existen ventajas y desventajas para los dos tipos de polímeros cuando se utilizan como andamios en ingeniería de tejidos [38-39]. Estas se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación entre los polímeros sintéticos y naturales

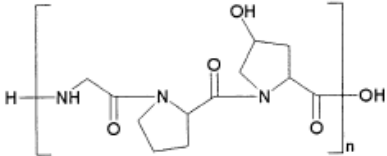
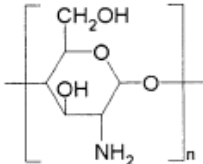
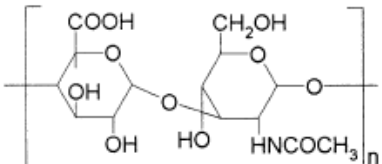
<b>POLÍMERO</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<b>Sintético</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil procesamiento en diversas estructuras</li> <li>• Producción a bajo costo y reproducible</li> <li>• Control preciso de sus propiedades fisicoquímicas (peso molecular, degradación, propiedades mecánicas, entre otras)</li> <li>• Degradación generalmente por hidrólisis lo que garantiza tasas de degradación uniformes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausencia de actividad biológica</li> <li>• Productos de degradación pueden ser tóxicos o alterar el microambiente local (ej. pH)</li> <li>• Hidrofobicidad</li> </ul>
<b>Natural</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta Actividad biológica</li> <li>• Degradación enzimática</li> <li>• Hidrofilicidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Escaso debido a su alto costo</li> <li>• Control limitado sobre sus propiedades fisicoquímicas</li> <li>• Susceptibles a contaminación de virus desconocidos o enfermedades no deseadas</li> <li>• Propiedades mecánicas bajas</li> </ul>

### 2.2.1 Polímeros de origen natural

Dentro de los polímeros de origen natural existentes cabe mencionar los siguientes: las proteínas como el colágeno, elastina, y fibronectina. Los polisacáridos como el quitosano, el alginato, la celulosa y el ácido hialurónico. Finalmente, los polihidroxicanoatos como el polihidroxiacetato entre otros. En general, los polímeros naturales más utilizados en ingeniería

de tejidos son el colágeno, el quitosano y el ácido hialurónico. En la Tabla 2 se resume sus estructuras y propiedades generales [39].

Tabla 2. Polímeros naturales usados en ingeniería de tejidos

Polímero Natural	Estructura	Propiedades
Colágeno		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Existe como tres cadenas polipeptídicas dispuestas en una estructura helicoidal triple</li> <li>• Cada cadena polipeptídica está formada por una secuencia de (Gly-X-Y)<sub>n</sub>, donde con frecuencia X es prolina, Y es 4-hidroxiprolina y n ~ 340</li> <li>• Excelente sustrato para la adhesión y migración celular</li> </ul>
Quitosano		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se deriva de la desacetilación de la quitina; polímero estructural que se encuentra en el exoesqueleto de artrópodos</li> <li>• Normalmente insoluble en soluciones acuosas por encima de pH 7</li> <li>• Catiónico</li> <li>• Hidrolizable por enzimas in vivo</li> <li>• Gran potencial para el desarrollo de materiales reabsorbibles y biológicamente activos</li> </ul>
Ácido Hialurónico		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se encuentra en abundancia en cartílagos, articulaciones y piel</li> <li>• Polímero de alto peso molecular</li> <li>• Retiene grandes cantidades de agua y adopta una conformación extendida en disolución</li> <li>• Desarrollador de colágeno</li> </ul>

## 2.2.1.1 Colágeno

### 2.2.1.1.1 Generalidades

El colágeno es considerado el elemento estructural más importante en los seres vivos conocidos. Es la proteína más abundante de los mamíferos, representa alrededor del 20-30% del total de las proteínas del cuerpo (Harkness, 1961). Constituye la mayor parte de la masa orgánica de la piel, los tendones, los vasos sanguíneos, los huesos, el cartílago, la córnea, el humor vítreo del ojo, los dientes y las membranas basales. Su principal función es brindarle al organismo el armazón o matriz de sustentación en la que toman forma órganos y tejidos. Básicamente, el colágeno mantiene unidas las células de la mayoría de los animales. La importancia del colágeno queda manifestada por su alta concentración en algunos de los tejidos y órganos más representativos del ser humano, 74% en la piel, 64% en la córnea, 50% en el cartílago, 23% en el hueso cortical entero, 12-24% en la aorta, 10% en el pulmón y 4% en el hígado. Es sintetizado por los fibroblastos, que usualmente se originan de células pluripotenciales adventicias o células reticulares.

El colágeno tiene una única estructura, tamaño y secuencia de aminoácidos (Miyata y colaboradores, 1992; Rao 1995). Está compuesta por tres cadenas polipeptídicas levógiras, cada una de ellas con aproximadamente mil residuos, que enrolladas entre sí forman una superhélice dextrógira (Figura 2). Cada cadena tiene una torsión individual en direcciones opuestas. Cada cadena polipeptídica está formada por una secuencia de  $(\text{Gly-X-Y})_n$ , donde con frecuencia X es prolina, Y es 4-hidroxiprolina y  $n \sim 340$ . Las tres cadenas están unidas entre ellas mediante puentes de hidrógeno. Los donadores de hidrógeno son los grupos peptídicos  $-\text{NH}-$  de los residuos de glicina y los aceptores son los grupos peptídicos  $-\text{CO}-$  de los aminoácidos de otras cadenas. Los grupos hidroxilo de los residuos de hidroxiprolina también participan en la unión por puentes de hidrógeno.

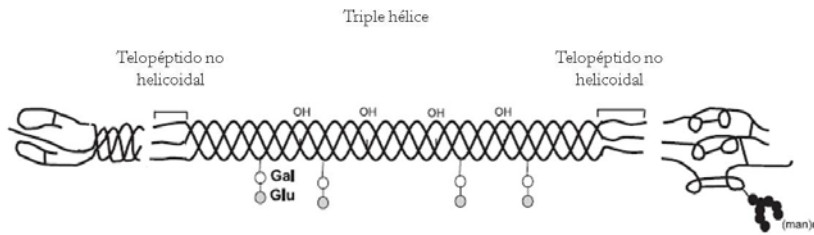


Figura 2. Estructura molecular del colágeno tipo I [40]

Las tres cadenas tienen sus extremos alineados y, aunque la forma helicoidal se extiende a lo largo de la mayoría de la molécula, hay regiones en los extremos amino y carboxilo terminales, que implican a unos 15-20 aminoácidos, que no son helicoidales. Estas regiones, son conocidas como telopéptidos, son susceptibles de proteólisis, mientras que la triple hélice es resistente al ataque de la mayoría de enzimas proteolíticas y en la forma nativa sólo es digerida por colagenasas específicas [39-41].

#### 2.2.1.1.2 Tipos de colágeno

El nombre de ‘colágeno’ [del griego *κολλα* (cola) y *γενναω* (engendrar)] se utiliza como un término genérico para denominar proteínas que forman una triple hélice característica de tres cadenas polipeptídicas. Todos los miembros de la familia del colágeno forman estas estructuras supramoleculares, aunque su tamaño, función y distribución tisular varía considerablemente. Hasta ahora se han descrito 26 tipos de colágeno genéticamente distintos [40].

Los colágenos de tipo I, II y III son los principales colágenos fibrilares. El tipo I se encuentra en muchos tejidos conectivos, entre los que se incluyen la piel, los huesos, los tendones y los ligamentos. El tipo II es el principal tipo de colágeno del cartílago hialino. El tipo III es menos abundante que los tipos I y II pero se pueden encontrar pequeñas cantidades en los tejidos que contienen el tipo I, con excepción del hueso y el tendón, y representa aproximadamente la mitad del colágeno total en los principales tejidos del sistema cardiovascular, como las válvulas

cardíacas y las principales arterias. El tipo V se encuentra en varios tejidos, particularmente en vasos sanguíneos y entre las células musculares lisas. El colágeno tipo IV es el principal colágeno no fibrilar del cuerpo y es el mayor constituyente de las membranas basales. El tipo VI y otra familia de colágenos menores se encuentran en pequeñas cantidades en diversos tejidos [40-41].

### **2.2.1.1.3 Caracterización del colágeno para aplicaciones en ingeniería de tejidos**

Dado que el colágeno sirve como elemento estructural en casi todos los tejidos y está presente en cierto grado en todas las membranas basales, es lógico que la mayoría de las células ancladas-dependientes expresen receptores para uno o más epítomos de la molécula. Como resultado, las fibras y geles de colágeno son excelentes sustratos para la adhesión y migración celular. Numerosos estudios experimentales han utilizado el colágeno como superficie de cultivo para la conservación in vitro de una amplia variedad de tipos de células primarias. Ha sido reconocido como un agente hemostático, es decir, un material que estimula la coagulación de la sangre. Como tal, ha tenido un gran uso en procedimientos quirúrgicos como una herramienta para detener hemorragias debido a heridas de algún tejido [42].

Teniendo en cuenta esto, se infiere entonces la posibilidad de que los procesos de reparación de los tejidos puedan ser acelerados mediante la implantación de un andamio a base de colágeno.

Actualmente, el colágeno se usa como material para la reparación de tejidos en forma de suturas y esponjas y como recubrimiento biocompatible sobre los implantes no degradables tales como las prótesis vasculares [39]. Ha sido utilizado con éxito en la reparación y/o regeneración de piel. También se estudia su uso para la reparación de cartílago y como conductos para la regeneración de nervios [43-44].

La Tabla 3 resume las principales características del colágeno como biomaterial (Jerome y Ramshaw, 1992; Rao, 1995; Friess, 1998; Fujioka y colaboradores, 1998). Algunas de las desventajas de los sistemas a base de colágeno se deben a la dificultad de asegurar una fuente adecuada para su obtención y a su baja resistencia mecánica (Friedrich, 1998). Por tal motivo, la mejora de sus propiedades físicas, químicas y biológicas es una de las necesidades que se deben abordar para ampliar su intervalo de aplicación en el área biomédica. La combinación de colágeno con otros polímeros, es una de las posibles vías que se están estudiando para aumentar su estabilidad [41,44].

Tabla 3. Ventajas y desventajas del colágeno como biomaterial

---

***Ventajas***

- Disponible en gran abundancia en los organismos vivos
- No antigénico
- Biodegradable y bioreabsorbible
- Bicompatible y no tóxico
- Sinérgia con componentes bioactivos
- Hemostático
- Formulado en un gran número de formas diferentes
- Fácilmente modificable para producir materiales según lo deseado por medio de la utilización de sus grupos funcionales
- Compatible con los polímeros sintéticos

***Desventajas***

- Alto costo
  - Variabilidad de acuerdo al tipo de fuente (por ejemplo: tamaño de la fibra, trazas de impurezas, etc.)
  - Alta hidrofiliidad que conduce a la hinchazón y hace más rápida su liberación
  - Variabilidad en la tasa de degradación enzimática en comparación con la degradación hidrolítica
  - Propiedades complejas de manipulación
  - Efectos secundarios, como la encefalopatía bovina (BSF) y la mineralización
  - Baja resistencia mecánica
-



### 2.2.2 Polímeros de origen sintético

En la actualidad, los poliésteres, específicamente el poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), la poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), y sus copolímeros; son los polímeros sintéticos más utilizados en el campo de la ingeniería de tejidos. Estos polímeros han ganado su popularidad ya que ofrecen las propiedades típicas de los polímeros sintéticos como alta pureza, fácil procesabilidad, y buenas propiedades mecánicas, con la ventaja adicional de que son biodegradables.

Además, estos materiales se han utilizado por más de 25 años como suturas reabsorbibles y dispositivos de fijación, y están aprobados para su uso in vivo en el cuerpo humano, en varias formas y formulaciones [10]. La Polimerización puede ser inducida, ya sea por reacciones de condensación directa entre los monómeros ácidos o catalítica por reacciones de apertura de anillo de su dímero cíclico [11]. En la Tabla 4 se resumen las estructuras y las características principales de estos polímeros.

Los poliésteres se degradan por medio de la hidrólisis de sus enlaces éster. El PGA es hidrofílico de naturaleza y se degrada rápidamente in vitro, en medios acuosos o in vivo. El PLA es más hidrofóbico que el PGA debido al grupo metilo extra que posee en su cadena, lo que conduce a una hidrólisis más lenta [10,16-17]. El PGA, PLA y PCL no poseen ninguna actividad biológica intrínseca. La respuesta celular de los implantes a base de estos polímeros es mediada principalmente por las proteínas adsorbidas a su superficie, la topografía de la superficie y los efectos del pH debido a sus productos de degradación[39].

Finalmente, aparte de la biocompatibilidad y la biodegradación para la fabricación de andamios, con esta clase de polímeros se debe tener en cuenta que deben poseer propiedades mecánicas en conformidad con el tejido u órgano de destino [12].

Tabla 4. Poliésteres Biodegradables usados en ingeniería de tejidos

Polímero	Estructura	Propiedades
<b>Poli(ácido láctico) (PLA)</b>	$\left[ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{---CH---C---O---} \\    \\ \text{O} \end{array} \right]_n$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrofóbico</li> <li>• Posee quiralidad</li> <li>• Se degrada por medio de la hidrólisis de sus enlaces éster en solución acuosa o in vivo (meses o incluso años)</li> </ul>
<b>Poli(ácido glicólico) (PGA)</b>	$\left[ \text{---CH}_2\text{---C---O---} \right]_n$ <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}    \\ \text{O} \end{array}</math> </div>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relativamente Hidrofilico</li> <li>• Alta cristalinidad</li> <li>• Insoluble en la mayoría de los disolventes</li> <li>• Se degrada entre 4-6 meses</li> </ul>
<b>Poli(ε-caprolactona) (PCL)</b>	$\left[ \text{---(CH}_2\text{)}_5\text{---C---O---} \right]_n$ <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}    \\ \text{O} \end{array}</math> </div>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrofóbico</li> <li>• Semicristalino</li> <li>• Su tiempo de degradación es mayor comparado con el del PLA y PGA</li> </ul>

### 2.2.2.1 Poli (ácido láctico)

#### 2.2.2.1.1 Generalidades

El poli (ácido láctico) es considerado el policondensado del ácido láctico, que pertenece a la clase de los α-hidróxi-ácidos. El ácido láctico es una molécula bifuncional, posee las funciones de ácido carboxílico y alcohol, el cual puede ser convertido en polímero por diferentes vías de polimerización. La vía más sencilla es la policondensación. Sin embargo, por esta ruta se obtienen productos de bajo peso molecular. Para obtener un alto grado de polimerización se

debe usar como monómero de partida el dímero cíclico del ácido láctico, denominado lactida mediante la ruta de polimerización por apertura de anillo [13].

La ventaja de esta clase de polímeros es que los monómeros usados como punto de partida para su producción (ácido láctico y lactida) son asequibles químicamente. Existen una gran variedad de rutas químicas que pueden ser usadas para obtener ácido láctico y, a través de diferentes técnicas, puede ser convertido en lactida con altos rendimientos.

El PLA ha encontrado numerosas aplicaciones en el sector médico, farmacéutico y de empaques. Las propiedades físicas de éste, como punto de fusión, cristalinidad, temperatura de transición vítrea y resistencia a la tensión se ven afectadas por la estructura polimérica y su peso molecular. Como ocurre en la mayoría de los poliésteres alifáticos, los ligandos ésteres de la cadena principal del polímero son hidrolíticamente inestables. Esta característica en el pasado representaba una desventaja, dado que buscaban materiales químicamente estables. Sin embargo, el desarrollo de dispositivos médicos temporales generó un espacio para esta clase de polímeros [14].

### ***Isomería del ácido láctico y lactida***

Los dos monómeros que se utilizan para la síntesis de PLA, ácido láctico y lactida, presentan quiralidad. El ácido láctico presenta dos formas estereoisómeras, L o D-ácido láctico. El diéster cíclico de ácido láctico ó lactida presenta tres isómeros diferentes: L-lactida, D-lactida, y la mezcla racémica D, L-lactida o meso-lactida.

En la Figura 3 se representan los estereoisómeros de ácido láctico y lactida:

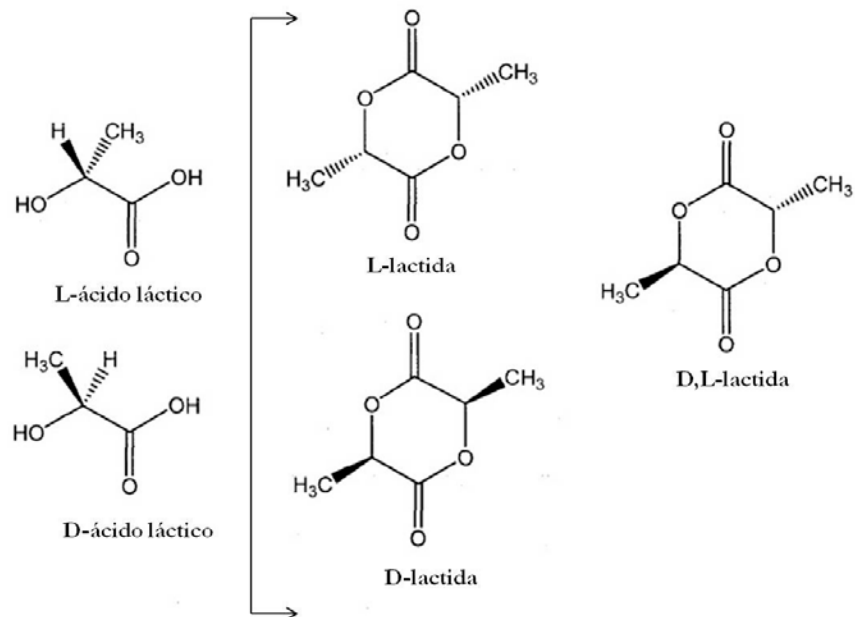


Figura 3. Estereoisómeros de ácido láctico y lactida [14]

### ***Producción de ácido láctico y lactida***

El descubrimiento del ácido láctico en términos químicos fue en el año de 1780, por Carl Scheele, por lo que este compuesto es una de las más antiguas sustancias orgánicas conocidas. El ácido láctico puede ser fabricado por vía química a pequeña escala, aunque generalmente es obtenido por rutas bioquímicas que son, tal vez, las más importantes. Este compuesto forma parte de una gran variedad de productos que son empleados como aditivos alimentarios, solventes, cosméticos y también en el área médica. La ruta bioquímica de producción del ácido láctico se realiza generalmente a través de la fermentación microbiana de azúcares, tales como glucosa o hexosa.

La lactida, es el dímero cíclico del ácido láctico que tiene como característica la producción de polímero de alto peso molecular. La ruta sintética para la fabricación de lactida fue descrita por Pelouze (1845). En este procedimiento, una solución de ácido láctico es sometida a calentamiento a altas temperaturas para la eliminación de agua y así producir la lactida. Este proceso ocurre en dos etapas. En la primera etapa se obtienen oligómeros de poli (ácido

lático) y en la segunda etapa se realiza la depolimerización a altas temperaturas y presión reducida del oligómero de poli (ácido láctico) para producir la lactida [15]. En la Figura 4 se ilustran estas etapas:

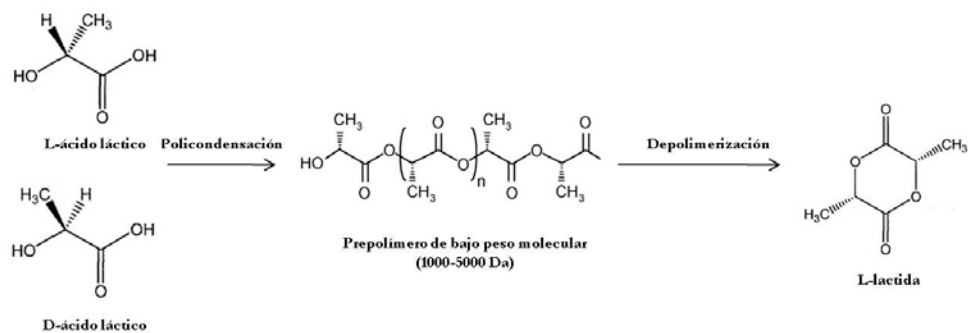


Figura 4. Síntesis de lactida [13]

#### 2.2.2.1.2 Síntesis del poli (ácido láctico)

La polimerización de PLA ha sido llevada a cabo por diferentes procesos. La ruta más simple es la policondensación del ácido láctico, sin embargo es difícil obtener polímeros de alto peso molecular. La ruta que lleva a la preparación de PLA de alto peso molecular es la polimerización por apertura de anillo (ROP) del dímero cíclico de ácido láctico llamado lactida. Para este tipo de ruta se requiere la presencia de un iniciador y/o catalizador.

Los catalizadores y/o iniciadores usados principalmente son los ácidos y bases de Lewis, como algunos compuestos organometálicos y diferentes sales de metales. Sin embargo, los compuestos organometálicos son los más efectivos en la síntesis de PLA de alto peso molecular, particularmente óxidos, carboxilatos y alcóxidos.

El catalizador y/o iniciador estándar para la síntesis de PLA es el 2-etilhexanoato de estaño. Es usualmente preferido dado que brinda alta conversión y elevados pesos moleculares. El 2-etilhexanoato de estaño a su vez ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso en aplicaciones biomédicas como catalizador [13-15].

Sumado a este, existe una larga lista de catalizadores que han sido estudiados para la ROP de lactida y han reportado excelentes resultados. Sin embargo, para aplicaciones biomédicas se requiere que el PLA presente la mínima cantidad de residuos tóxicos, debido a que estos son imposibles de remover en su totalidad después del proceso de polimerización. Por tanto, los catalizadores basados en Ca, Mg, Zn y Fe son de gran interés, ya que pueden participar en el metabolismo humano y probablemente no produzcan iones tóxicos que generen complicaciones y efectos secundarios en el organismo del paciente [45].

En la Figura 5 se presenta la polimerización por apertura de anillo de la L-lactida.

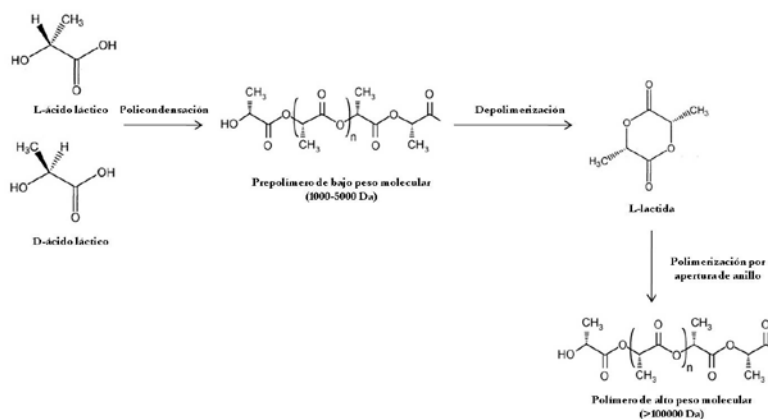


Figura 5. Polimerización por apertura de anillo de L-lactida [19]

### 2.2.2.1.3 Propiedades del poli (ácido láctico)

Al igual que muchos de los polímeros, las propiedades físicas del PLA dependen de una serie de factores. La más importante de ellas es la composición estereoquímica de la cadena del polímero, que puede ser controlada por la polimerización de los diferentes isómeros que posee, tales como L ó D. La relación de sus estereoisómeros influye directamente en la cinética de cristalización, las propiedades mecánicas y las condiciones de procesamiento. En forma particular, la estereoisomería tiene un efecto muy importante en el comportamiento cristalino del PLA. Si se usan diferentes cantidades de los estereoisómeros de

la lactida, se puede obtener PLA semicristalino o amorfo. El PLA semicristalino se forma por el arreglo sindiotáctico que se obtiene de la polimerización de L-lactida o D-lactida. La polimerización del meso-monómero produce un arreglo atáctico en la cadena del PLA lo cual interrumpe la estereorregularidad del polímero e inhibe la cristalización, lo que resulta en un polímero amorfo (PDLLA).

La composición estereoquímica del PLA también determina la temperatura de fusión, la velocidad de cristalización y el grado de cristalización. Por ejemplo, el PLA producido a partir de L-lactida (PLLA) tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 175°C y una temperatura de transición vítrea de 60-65°C [46]. Por otra parte, el PDLLA tiene una temperatura de transición vítrea de 55-60°C. La copolimerización de L-lactida con meso-lactida o D-lactida produce polímeros con temperaturas de fusión alrededor de 130°C. Esto se debe a que la adición de meso-lactida o D-lactida altera el orden de apilamiento de las cadenas de L-lactida, y también reduce el nivel de cristalinidad y la velocidad de cristalización, pero no afecta significativamente la temperatura de transición vítrea. Un fenómeno interesante que se encuentra en las mezclas equimolares de poli (L-lactida) PLLA y poli (D-lactida) (PDLA), es la formación de un estereocomplejo con una estructura cristalina diferente a la de cada homopolímero y una temperatura de fusión de 230°C, que es de aproximadamente 50°C más alta que cualquiera de los homopolímeros.

La distribución estereoquímica del PLA, junto con su orientación cristalina y el peso molecular, también afecta las propiedades mecánicas y la velocidad de degradación del polímero. El PLLA, debido a su estereoregularidad, tiene alta resistencia a la tensión (50-70MPa), baja elongación y un alto módulo de Young. Por tanto, ha sido considerado un biomaterial ideal para aplicaciones sujetas a carga, tales como dispositivos de fijación ósea, entre otras. Por otra parte, el PDLLA, por su naturaleza amorfa tiene una resistencia a la tensión (40-45MPa) mucho menor en comparación con la del PLLA [47]. Este polímero pierde su resistencia mecánica en un plazo de 1-2 meses cuando es hidrolizado, y sufre una pérdida de

masa total entre 12-16 meses. El PDLLA es un polímero de baja resistencia mecánica y con una velocidad de degradación más rápida en comparación con la del PLLA (6-24 meses) y esto lo hace buen candidato para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos [10].

#### **2.2.2.1.4 Degradación del poli (ácido láctico)**

La degradación de un polímero se produce principalmente a través de la ruptura de las cadenas poliméricas. En el ambiente, una gran variedad de procesos químicos, físicos y biológicos desempeñan un papel en la degradación de los polímeros.

Por lo tanto, existen diferentes mecanismos de degradación que pueden estar implicados, tales como la activación térmica, la hidrólisis, la actividad biológica (enzimas), oxidación, fotólisis y la radiación. Estos mecanismos pueden ocurrir de forma combinada o en una sola forma. El proceso de degradación depende de ciertos factores del polímero tales como el peso molecular, el ordenamiento cristalino, la porosidad, la morfología, la pureza y la reactividad química, y de factores del medio como temperatura, pH y especies catalíticas (álcalis, enzimas, etc.), los cuales pueden ser controlados. El poli (ácido láctico) es susceptible a la degradación hidrolítica, en contraste con otros poliésteres aromáticos como el PET (Politereftalato de etileno). La velocidad de degradación hidrolítica del PLA puede ser manipulada cuando materiales a base de este son usados en aplicaciones y fines biomédicos y farmacéuticos. Es conocido que la degradación hidrolítica del PLA *in vivo* es comparable con la degradación hidrolítica del PLA *in vitro* [47]. Por lo tanto, el comportamiento y la velocidad de degradación hidrolítica *in vivo* pueden ser predichas de la degradación hidrolítica del PLA *in vitro* de cierta manera. Los materiales a base de PLA que se utilizarán en aplicaciones biomédicas deberán ser seleccionados y fabricados con una velocidad de degradación hidrológica en concordancia con la rapidez de curación del órgano y/o tejido.



Por lo general, la degradación hidrolítica en el PLA es autocatalizada por grupos terminales carboxílicos, lo que resulta en el rompimiento de los enlaces éster. Esto produce ácido láctico y conduce a una reducción en el peso molecular con la pérdida de sus propiedades mecánicas. Debido a que el peso molecular se acerca a valores muy bajos ( $\sim M_n$  10.000 - 40.000 g/mol), los microorganismos consumen los oligómeros restantes, convirtiéndolos en dióxido de carbono y agua por medio del ciclo de krebs (ciclo del ácido cítrico o de los ácidos tricarboxílicos) [48].

#### 2.2.2.1.5 Ventajas y limitaciones del poli (ácido láctico)

##### *Ventajas*

*Ecológico:* Además de ser derivado de fuentes renovables (por ejemplo, maíz, trigo o arroz), el PLA es biodegradable, reciclable y compostable. Su producción consume dióxido de carbono.

*Biocompatible:* El aspecto más atractivo del PLA especialmente con respecto a las aplicaciones biomédicas, es su biocompatibilidad. Un material biocompatible no debe producir efectos tóxicos o cancerígenos en los tejidos locales. Por otra parte, los productos de degradación del PLA no son tóxicos. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha aprobado al PLA para ser utilizado en contacto directo con fluidos biológicos.

*Procesabilidad:* El PLA tiene mejor procesabilidad térmica que otros biopolímeros como los poli(hidrixialcanoatos), poli(etilenglicol), poli(caprolactona), etc. Éste puede ser procesado por inyección, extrusión, soplado, termoformado, hilado de fibras, y formación de películas.

*Ahorro de energía:* El PLA requiere de un 25 a 55% menos energía para su producción que los polímeros derivados del petróleo.

### ***Limitaciones***

El PLA ha demostrado que posee propiedades muy interesantes. Sin embargo, si tenemos en cuenta las exigencias prácticas en la ingeniería de embalaje y sistemas médicos, el PLA también tiene muchas desventajas obvias: su tasa de degradación no puede satisfacer una amplia gama de aplicaciones con requerimientos específicos. También se tiene que el PLA es relativamente hidrofóbico, con un ángulo de contacto estático con el agua de 80°, esto resulta en una baja afinidad celular y puede producir una respuesta inflamatoria del tejido cuando está en contacto directo con los tejidos biológicos. Además no posee ningún grupo funcional que pueda ser atacado por moléculas biológicamente activas. Por ende, en términos de aplicaciones biomédicas, estos factores son unas limitantes muy importantes para su uso [14-15].

#### **2.2.2.1.6 Modificación del poli (ácido láctico)**

Si bien el éxito del PLA como material para aplicaciones biomédicas, especialmente en ingeniería de tejidos, no solo se basa en sus propiedades mecánicas, que son mejores o comparables con las de los plásticos convencionales, sino también en el control de sus propiedades superficiales. Por lo tanto, la modificación de la superficie del PLA se hace necesaria para el control de la hidrofiliidad, rugosidad e introducción de grupos reactivos a la cadena polimérica. La mejora en la hidrofiliidad por medio de la introducción de grupos reactivos beneficiaría la interacción con las células y la compatibilidad con moléculas biológicamente activas. Es por ello que se han realizado diferentes trabajos en esta área entre los cuales se destacan el tratamiento por plasma, la hidrólisis y la aminólisis [25-28].

Tratamiento por plasma: El término "plasma" se refiere a una mezcla de iones positivos y electrones producidos por ionización. La principal desventaja de esta técnica es que la eficacia en la modificación de la superficie no es permanente, esta es parcialmente perdida debido al

reordenamiento de la superficie por movimientos macromoleculares activados térmicamente para minimizar la energía interfacial [25,28].

Hidrólisis: La hidrólisis de poliésteres como PLA puede ser conducida por condiciones ácidas o básicas. La reacción es impulsada por protones que tienen una alta movilidad, y son capaces de difundirse con relativa facilidad entre las cadenas del polímero sin carga y se regeneran por la reacción. Por lo tanto, es necesaria una rápida velocidad de reacción para restringir la hidrólisis a sólo la superficie. Puesto que los enlaces éster son poco disponibles para la hidrólisis electrofílica, se requieren condiciones fuertemente ácidas. Se ha encontrado, en el caso del poli(ácido L-láctico) (PLLA), que la hidrólisis en solución acuosa a pH 2 se conduce en todo el bulto, en lugar de solo en la superficie.

Sobre condiciones básicas, la hidrólisis es conducida vía ataque nucleofílico de los iones hidroxilos sobre la región de más baja densidad de electrones, la cual es el carbono del grupo carbonilo. Estos iones hidroxilos son consumidos durante toda la reacción de hidrólisis. En este proceso se generan grupos de ácidos carboxílicos cargados negativamente sobre la superficie del polímero [26-28].

Aminólisis: La reacción ocurre vía ataque nucleofílico sobre el carbono del grupo carbonilo para formar una carga positiva intermediaria tetraédrica. En un medio ácido o neutro, la amina, grupo saliente ( $R-NH_2$ ), es fuertemente preferida sobre el alcohol del grupo saliente ( $RC-OH$ ), y, por lo tanto, la reacción no se detiene. La aminólisis generalmente se lleva a cabo en soluciones acuosas básicas ( $pH > pK_a$  de la amina) o en disolventes apróticos, polares con un alto grado de basicidad, como un alcohol [25,49].

Sin embargo, los grupos reactivos introducidos en la superficie del PLA pueden perderse después de un periodo de degradación. Por lo tanto, existen otras investigaciones encaminadas a mejorar estos resultados.

## **2.3 Nanotecnología en ingeniería de tejidos**

Más allá de los requisitos generales que se mencionaron en la sección 2.1 para los andamios en ingeniería de tejidos, se debe mirar la forma en que una sola célula interactúa con su entorno inmediato. No es aceptable ver a una célula como una unidad autónoma que reside en una red estructural pasiva. Por el contrario, existe una interrelación dinámica en las tres dimensiones que se mantiene constantemente en el equilibrio y tiene la influencia de estímulos internos y externos. Por lo tanto, cualquier andamio debe ser capaz de interactuar con las células en las tres dimensiones y facilitar esta comunicación. En los tejidos nativos, la matriz extracelular de las proteínas son de 1 a 2 órdenes de magnitud más pequeña que la propia célula, lo que permite a la célula estar en contacto directo con muchas fibras de la matriz extracelular, con lo cual se define una orientación tridimensional. Esta propiedad puede ser un factor crucial para determinar el éxito o el fracaso de un andamio para ingeniería de tejidos. Es por esto que científicos en el campo de la ingeniería de tejidos han recurrido a la nanotecnología, específicamente a las nanofibras, como la solución para el desarrollo de andamios en ingeniería de tejidos. Las nanofibras poseen una relación superficie-volumen elevada, lo cual mejora la adhesión celular. La migración, proliferación y diferenciación celular dependen de la adhesión celular. Por lo tanto, las nanofibras permiten interacciones favorables a nivel celular [16,50-52].

### **2.3.1 Técnicas para la fabricación de nanofibras poliméricas para ingeniería de tejidos**

Las técnicas convencionales para el procesamiento de polímeros tienen dificultades para producir fibras con diámetros menores a 10  $\mu\text{m}$ , los cuales son varias órdenes de magnitud más grande que la matriz extracelular nativa. Por esta razón, se han desarrollado varios métodos para la producción de nanofibras que simulen, de la forma más adecuada, la geometría de la matriz extracelular. En la actualidad, existen varias técnicas para la producción de fibras poliméricas a escala nanométrica, tales como la separación de fases, autoensamble y

electrohilado. La separación de fases consiste en la disolución del polímero para su posterior gelificación, seguido de la extracción del solvente del gel utilizando un solvente diferente, y finalmente la congelación y el secado a alto vacío, dando lugar a una espuma porosa a escala nano. El proceso toma relativamente un período largo de tiempo para transferir el polímero a una espuma nano-porosa. El autoensamble implica la organización espontánea de componentes individuales dentro de una estructura ordenada y estable con enlaces no covalentes. Mientras este es un proceso común y natural para varios de los componentes biológicos esenciales (ej. síntesis de ácidos nucleicos y proteínas), es un procedimiento bastante complejo en el laboratorio y es limitado a un grupo selecto de configuraciones poliméricas (copolímeros en di-tribloque, tribloques de péptidos-anfifilios y dendrímeros). La técnica de electrohilado es un proceso por el cual una solución polimérica polarizable es sometida a un campo eléctrico para la generación de fibras a escala micro y nanométrica, que pueden ser colectadas en varias orientaciones, para crear una única estructura en términos de composición y propiedades mecánicas. Esta técnica ha despertado gran interés en el campo de la ingeniería de tejidos, en parte a la simplicidad del proceso, diversidad en las geometrías de los andamios fabricados y al control de las características mecánicas que ofrece al usuario [16,50-54].

### **2.3.1.1 Electrohilado**

La técnica de electrohilado apareció por primera vez en el año de 1930. Formhals diseñó un aparato para producir microfibras de polímeros con fuerzas electrostáticas, el cual fue patentado en 1934. Actualmente, esta técnica puede producir fibras poliméricas con diámetros desde 3 nm a 6  $\mu\text{m}$ . A pesar de que el concepto de electrohilado ha sido conocido desde entonces, las nanofibras poliméricas producidas por electrohilado se convirtieron en un tópico de gran interés solamente hasta la década de los noventa. Las nanofibras tienen alta área superficial y porosidad, lo cual permite interacciones favorables a nivel celular y, por lo tanto,

las hacen candidatas potenciales para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Otras aplicaciones incluyen membranas de filtración, catálisis y sensores.

La alta productividad, sencillez y el bajo costo del equipo de electrohilado lo hacen altamente atractivo tanto para la academia como para la industria. Los componentes básicos del equipo de electrohilado consisten de una bomba de inyección, una fuente de alto voltaje y un colector. El proceso central consiste en la aplicación de un alto potencial eléctrico (varios kV) a una gota colgante de una solución polimérica o un polímero fundido, para formar una fibra delgada, como se muestra en la Figura 6. Específicamente se aplica un voltaje a la aguja de la jeringa cargada de polímero dirigido a un colector conductor que sirve como contraelectrodo. La resultante del campo eléctrico externo aplicado produce un esfuerzo en dirección tangencial sobre la solución del polímero. Esto causa una deformación de la gota en forma cónica llamada “cono de Taylor”. Cuando la tensión superficial de la solución polimérica es superada por el campo eléctrico, el líquido conductor es dirigido desde el cono de Taylor hacia el colector, lo que permite la formación de un chorro fibroso. Durante ese trayecto, el disolvente se evapora y las fibras secas se depositan en el colector.

Las nanofibras resultantes pueden ser alineadas o no alineadas, dependiendo del tipo de colector utilizado. Las nanofibras no alineadas se caracterizan por tener grandes poros interconectados, que pueden ser utilizadas para aplicaciones en liberación de fármacos, para imitar a la matriz extracelular o como membranas. Por otra parte, las fibras alineadas pueden promover las conformaciones celulares y direccionalidad.

La preparación de la solución polimérica y los parámetros del equipo de electrohilado pueden afectar las propiedades finales de las nanofibras. Entonces se infiere que el proceso de electrohilado se ve afectado por dos conjuntos de parámetros: los parámetros del sistema y los parámetros del proceso. (1) Los parámetros del sistema pueden ser el peso molecular, la

distribución del peso molecular y la arquitectura del polímero. Por su parte, las propiedades de la solución polimérica pueden ser la viscosidad, la tensión superficial y la conductividad.

(2) Algunos de los parámetros del proceso que se deben considerar son: el diámetro del orificio de salida, el flujo y concentración de la solución polimérica, el potencial eléctrico, la distancia entre el orificio y el colector de metal, parámetros ambientales (temperatura, humedad y velocidad del aire en la cámara) y el movimiento del colector. Con la manipulación de estos parámetros es posible obtener diferentes variaciones en la morfología de las nanofibras [16,50-58].

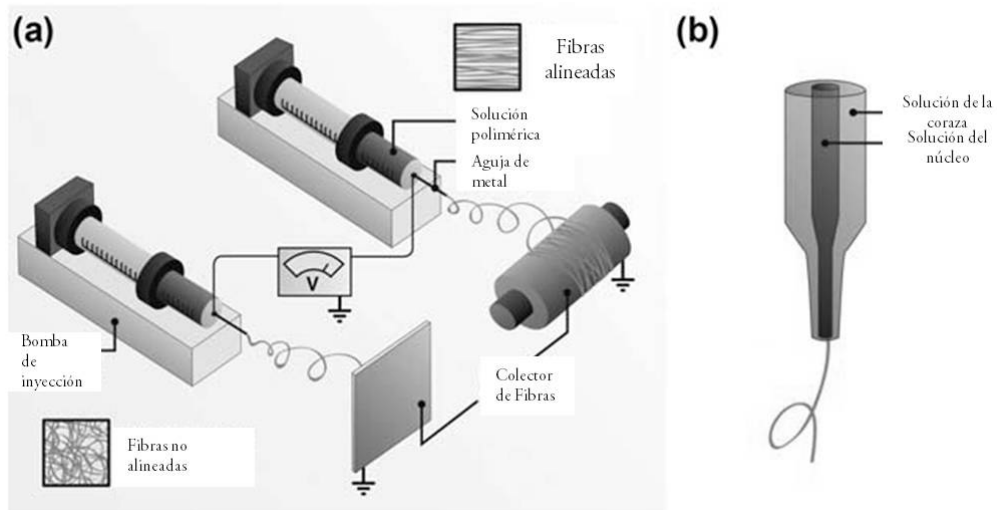


Figura 6. Equipo de electrohilado a) Colección de fibras alineadas y no alineadas; b) esquema de configuración de agujas coaxiales [56].

## CAPÍTULO 3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

### 3.1 Descripción de las técnicas analíticas

#### 3.1.1 Espectroscopía de infrarrojo (IR)

La radiación infrarroja fue descubierta en 1800 por el señor William Hersheld. Pero la investigación de la absorción infrarroja de materiales empezó en 1900. Fue hasta a finales de la segunda guerra mundial cuando se construyó el primer espectrómetro de infrarrojo. La espectroscopía de infrarrojo, es probablemente, el método más extensamente estudiado para la investigación de estructuras de polímeros y el análisis de grupos funcionales.

Esta espectroscopía se fundamenta en la absorción de la radiación infrarroja por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria, para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una manera determinada debido a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja.

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces.

La espectroscopía de infrarrojo puede ser usada para estudiar muestras en estado gaseoso, líquido y sólido, dependiendo de los tipos de accesorios empleados. Actualmente existen una



multitud de accesorios para la espectroscopía de IR que han logrado extender notablemente el campo de actuación [59-61].

### 3.1.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de RMN fue desarrollada a finales de los años cuarenta para estudiar los núcleos atómicos. En 1951, los químicos descubrieron que la espectroscopía de resonancia magnética nuclear podía ser utilizada para determinar las estructuras de los compuestos orgánicos. Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  entre otros. Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes.

En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo, cuando una muestra se coloca en un campo magnético, tal y como se muestra en la siguiente Figura, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín  $\alpha$ , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín  $\beta$ .

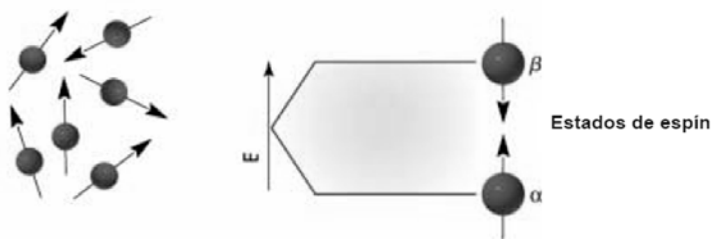


Figura 7. Niveles de energía de los núcleos en un campo magnético

Existen más núcleos en el estado de espín  $\alpha$  que en el  $\beta$  pero, aunque la diferencia de población no es enorme, sí que es suficiente para establecer las bases de la espectroscopía de RMN.

Los núcleos de sustancias orgánicas más usuales en RMN son los de protón ( $^1\text{H}$ ) y carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ). La posición de las señales obtenidas depende en los dos casos del entorno electrónico. Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN consisten en un registro de las señales de resonancia, que corresponden a los diferentes tipos de hidrógeno presentes en la muestra en forma de picos cuya posición, ancho, área y subestructura permiten la caracterización arriba mencionada. La posición está asociada a la identidad de los diferentes grupos vecinos a los protones y se expresa como desplazamiento químico en ppm respecto a la señal de un grupo de referencia. El área es proporcional al número de protones presentes en la muestra [59-61].

#### *Espectrómetro de resonancia magnética nuclear*

A continuación, se muestra de forma esquemática los principales componentes de un equipo para medidas de resonancia magnética nuclear.

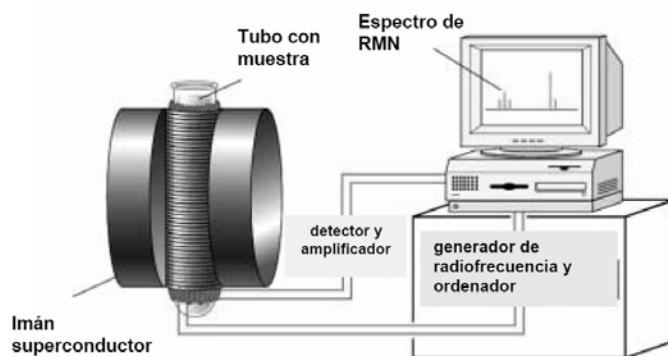


Figura 8. Espectrómetro de resonancia magnética nuclear

Como se observa, el espectrómetro de RMN consta de cuatro partes:

- Un imán estable superconductor, con un controlador que produce un campo magnético preciso.
- Un transmisor de radiofrecuencias, capaz de emitir frecuencias precisas.

- Un detector para medir la absorción de energía de radiofrecuencia de la muestra.
- Un ordenador y un registrador para realizar las gráficas que constituyen el espectro de RMN.

### 3.1.3 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X, (XPS) o ESCA (Espectroscopía Electrónica para Análisis Químico), consiste básicamente en la excitación mediante un haz de rayos-X a los niveles más internos de los átomos, esto provoca la emisión de fotoelectrones que proporcionan información sobre la energía de cada nivel y, por tanto, sobre la naturaleza de cada átomo emisor.

El proceso de fotoemisión resulta ser rápido,  $10^{-16}$  s, y su física básica se describe mediante la ecuación de Einstein:

$$E_B = h\nu - KE$$

Donde  $E_B$  es la energía de enlace del electrón en el átomo,  $h\nu$  es la energía de la fuente de rayos X, y  $KE$  es la energía cinética del electrón detectado que es medida por el espectrómetro del XPS.

La energía de enlace de un electrón variará según el tipo de átomo (valor absoluto de su carga nuclear) y de los átomos que a él se unan (los cuales pueden alterar la distribución electrónica). En el caso de los isótopos, estos poseen distinto número de neutrones pero igual carga nuclear, por tanto no varía la energía de enlace. Las interacciones débiles entre átomos, como fuerzas de cristalización o enlace de hidrógeno, no alteran suficientemente la distribución electrónica como para que se pueda observar un cambio en la energía de enlace medible. La energía de enlace que se mide por XPS se asocia siempre a enlaces de tipo iónico o covalente entre átomo.

El más básico análisis XPS de una superficie puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presentes en la muestra, excepto H y He. La gran potencia de esta técnica se aprecia en las siguientes aplicaciones, realizadas en los primeros 10 nm de una superficie:

- Identificación de todos los elementos presentes (excepto H, He) en concentraciones mayores al 0.1%.
- Determinación semicuantitativa de la composición elemental de la superficie (error <math>< \pm 10\% </math>).
- Información acerca del entorno molecular: estado de oxidación, átomos enlazantes, orbitales moleculares, etc.
- Información de grupos orgánicos mediante reacciones de derivatización.

La técnica de (XPS) se puede emplear en los siguientes campos: polímeros y adhesivos, catálisis heterogénea, fenómenos de corrosión, metalurgia, microelectrónica. En general, en la caracterización de superficies de sólidos [62].

### *Instrumentación*

Los componentes básicos de un espectrómetro fotoelectrónico de rayos X son:

- Fuente de rayos X
- Analizador de la energía de los electrones (que puede dispersar a los electrones emitidos de acuerdo a su energía cinética y por lo tanto, medir el flujo de electrones emitidos, de una energía particular).
- Cámara de alto vacío (para que los fotoelectrones emitidos puedan ser analizados sin la interferencia de las colisiones en fase gaseosa).

A continuación se muestra un diagrama esquemático de un espectrómetro XPS:

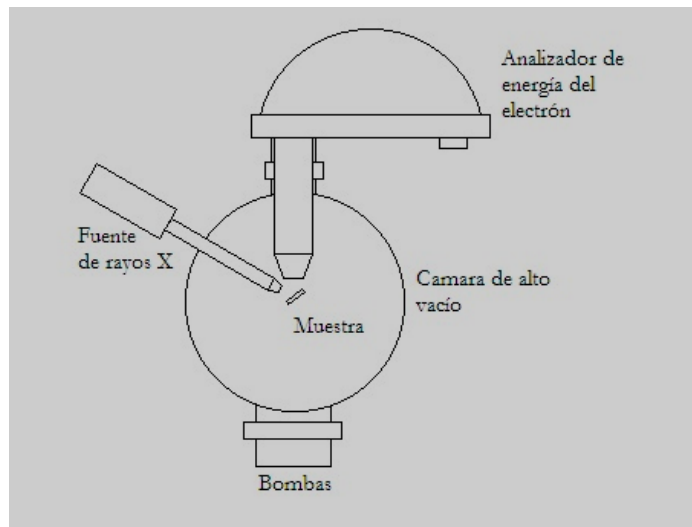


Figura 9. Diagrama de un espectrómetro XPS [62]

### 3.1.4 Caracterización térmica

El análisis térmico comprende un conjunto de técnicas cuyo objetivo es la determinación del comportamiento térmico de un material en función de la temperatura o del tiempo. En el campo de los polímeros, las técnicas más usuales son: análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

#### 3.1.4.1 Análisis termogravimétrico (TGA)

En un análisis termogravimétrico se registra, de manera continua, la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada, en función de la temperatura, o bien en función del tiempo. En el primer caso (experimento dinámico) la temperatura de la muestra aumenta de manera controlada (normalmente de forma lineal con el tiempo), y en el segundo (experimento isoterma), la temperatura se mantiene constante durante todo el experimento.

La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o de la temperatura se denomina termograma o curva de descomposición térmica. Existen otros tipos de análisis denominados termogravimetría diferencial, donde se registra o representa la variación de masa o su derivada con respecto a la temperatura o respecto al tiempo, dependiendo de que el experimento sea dinámico o isotérmico, respectivamente [46]. En la Figura 9 se representan estos dos tipos de termogramas: a) convencional; b) diferencial.

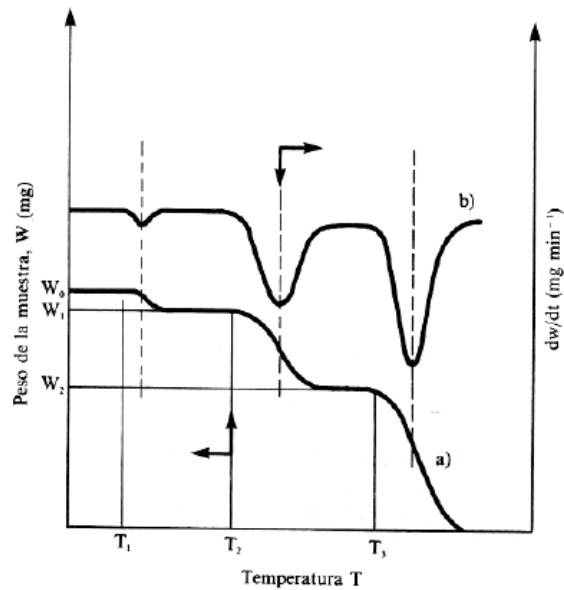


Figura 10. Termogramas diferencial (curva superior, eje derecho) y convencional (curva inferior, eje izquierdo)[45]

### 3.1.4.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La técnica de calorimetría diferencial de barrido se basa en registrar la diferencia en el cambio de entalpía entre la muestra y un material inerte de referencia en función de la temperatura o del tiempo, cuando ambos están sometidos a un programa controlado de temperaturas. La muestra y la referencia se alojan en dos crisoles idénticos que se calientan mediante resistencias

independientes. Esto hace posible emplear el principio de “balance nulo” de temperatura. Cuando en la muestra se produce una transición térmica (un cambio físico o químico que da lugar a una liberación o absorción de calor), se adiciona energía térmica bien sea a la muestra o a la referencia, con objeto de mantener ambas a la misma temperatura. Debido a que la energía térmica es exactamente equivalente en magnitud a la energía absorbida o liberada en la transición, el balance de energía proporciona una medición calorimétrica directa de la energía de la transición.

En los materiales poliméricos, las transiciones térmicas más importantes son la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y la temperatura de fusión ( $T_f$ ). En los polímeros amorfos, la  $T_g$  es la única transición que se registra y aparece como un cambio abrupto de la línea base. Por otra parte, en los muy cristalinos, la  $T_g$  es difícil de observar debido a la baja proporción de parte amorfa en el polímero. Los procesos de fusión/cristalización dan información cualitativa sobre la temperatura del pico de fusión y cuantitativa sobre la cristalinidad del polímero (área del pico). La fusión se manifiesta en un pico endotérmico con subida más o menos gradual y regular, según la naturaleza e historia térmica de la muestra y bajada brusca hasta recobrar la línea base. Si la línea base se mantiene tras la fusión, puede decirse que el material es estable para ser procesado por fusión. Lo contrario es indicio de descomposición y debe estudiarse con más detalle por análisis termogravimétrico [63].

### **3.1.5 Cromatografía de permeación en gel**

La cromatografía de permeación en gel (GPC) es una potente técnica de separación que encontró gran aplicación en el campo de los polímeros después de su desarrollo en 1961. Actualmente es la técnica más utilizada para la separación de las moléculas de una muestra polimérica en función del tamaño molecular. Se produce como consecuencia de la diferente permeación de las macromoléculas a través de los poros de un gel dispuesto en el interior de

una columna cromatográfica. Los materiales de relleno de la columna son principalmente poliestireno poroso (entrecruzado e hinchado) y vidrio poroso. Las partes más importantes del cromatógrafo son la columna y el detector.

Cuando una disolución polimérica, con diferentes tamaños moleculares, es introducida en el interior de la columna cromatográfica, tiene lugar un fraccionamiento en función de su tamaño molecular y de la distribución de tamaño de poro del gel polimérico. Las moléculas de mayor tamaño se arrastran con el disolvente, tardan menos tiempo en atravesar la columna y son las primeras en abandonarla, mientras que las de tamaño menor son retenidas durante un tiempo superior. A la salida de la columna se registra la variación entre el índice de refracción del disolvente puro y la fracción recogida. Para conocer los valores de los pesos moleculares se requiere un calibrado con patrones [59].

### 3.1.6 Ángulo de contacto

Antes de definir el ángulo de contacto, se debe tener claro el concepto de tensión superficial. La tensión superficial ( $\gamma$ ) de un líquido está asociada a la cantidad de energía necesaria para aumentar su superficie por unidad de área ( $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ ) o, de forma equivalente, a la fuerza normal que actúa por unidad de longitud ( $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ ). La tensión superficial es causada por los efectos de las fuerzas intermoleculares que existen en la interfaz (plano de separación entre dos fases) y depende de la naturaleza del líquido, del medio que le rodea y de la temperatura.

Se define entonces el ángulo de contacto, como el ángulo que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con una superficie sólida. El valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación existente entre las fuerzas adhesivas del líquido y del sólido y las fuerzas cohesivas del propio líquido. Cuando una fase líquida y una fase sólida entran en contacto, forman una interfase común. La mojabilidad es la capacidad de los sólidos para



formar interfases con los líquidos. La mojabilidad de un determinado sólido por un líquido viene determinada por el ángulo de contacto  $\theta$ , como se muestra en la Figura 10. En ella se representa esquemáticamente una gota de líquido (L) reposando en equilibrio sobre una superficie sólida horizontal (S) en una atmósfera de gas (G).

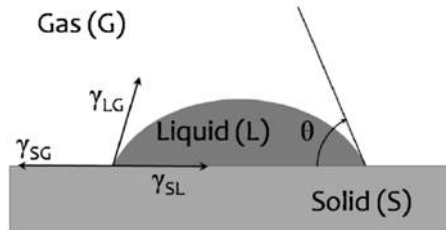


Figura 11. Representación esquemática de una gota de líquido (L) que reposa en equilibrio sobre una superficie sólida horizontal (S) en una atmósfera de gas (G). Ángulo de contacto y tensiones superficiales ( $\gamma$ ) en el punto triple.

El perfil que adopta la gota es el resultado del balance entre las fuerzas de la superficie y de la interfase, que tienden a minimizar la energía superficial libre del sistema. El ángulo de contacto está relacionado con las tres tensiones  $\gamma_{SG}$ ,  $\gamma_{SL}$ ,  $\gamma_{LG}$  de las interfaces sólido/gas, sólido/líquido y líquido/gas, respectivamente, a través de la ecuación de Young:

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

Por convenio, cuando  $\theta < 90^\circ$  (equivalente a  $\gamma_{SG} > \gamma_{SL}$ ) se dice que el líquido moja al sólido o que el sistema moja. El sistema no moja cuando  $\theta > 90^\circ$ ; en este caso, el líquido no moja al sólido. Un caso extremo ocurre cuando  $\theta$  se aproxima a cero, entonces el líquido se expande sobre el sólido y se dice que el mojado es perfecto [64].

### 3.1.7 Microscopía electrónica

#### 3.1.7.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En 1938 Ardenne Von M. construye el primer microscopio electrónico de barrido, cuyo principio se basa en un haz de electrones que focaliza y rastrea la superficie del espécimen de

tal manera que los electrones no atraviesan la muestra, si no que son absorbidos por la superficie de la misma, esto produce una emisión secundaria de electrones que son captados por un sistema integrador y transductor de imagen, para hacerla observable en un monitor similar a los empleados en la televisión convencional [65]. Las partes esenciales del microscopio electrónico de barrido se muestran en la Figura 11.

El microscopio electrónico de barrido proporciona información morfológica y topográfica sobre la superficie de los sólidos que son normalmente necesarias para entender el comportamiento de las superficies.

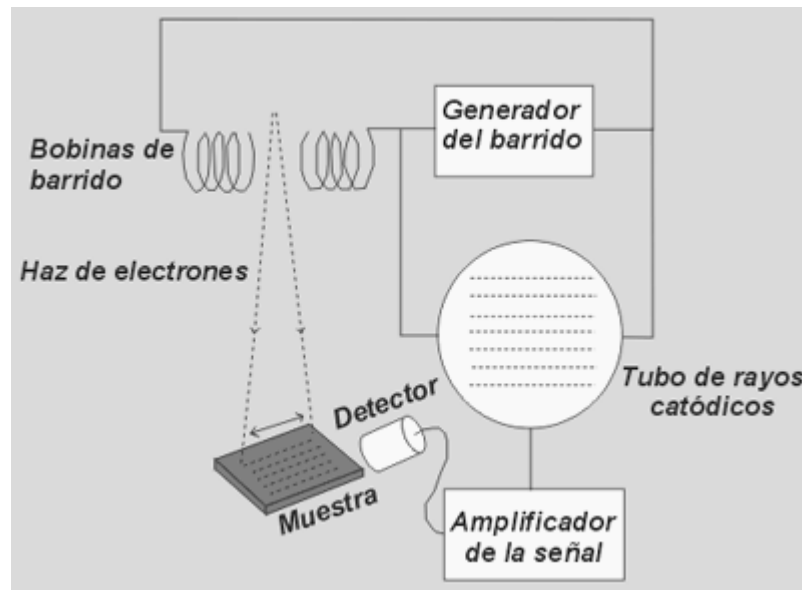


Figura 12. Esquema general de las partes de un microscopio electrónico de barrido [65]

### 3.1.7.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los microscopios electrónicos más sencillos constan de dos lentes formadoras de la imagen de forma muy parecida a los microscopios ópticos convencionales. La iluminación proviene de un cañón de electrones emitidos por un filamento de W o LaB<sub>6</sub>. Los electrones son acelerados al

aplicar un potencial negativo (100 kV - 1000 kV) y focalizados mediante dos lentes condensadoras sobre una muestra delgada, transparente a los electrones.

Después de pasar a través de la muestra, los electrones son recogidos y focalizados por la lente objetivo dentro de una imagen intermedia ampliada. La imagen es ampliada aún más mediante las lentes proyectoras, las cuales controlan la ampliación de la imagen en la pantalla fluorescente. La imagen final se proyecta sobre una pantalla fluorescente o una película fotográfica.

Existen diferentes modos de formación de la imagen en un microscopio de transmisión: si la imagen se forma a partir del haz transmitido, que no ha sufrido dispersión, entonces la imagen del objeto es oscura sobre un fondo brillante. Si, por el contrario, se utilizan los electrones dispersados, la imagen aparece brillante sobre un fondo oscuro. Por ello estas dos técnicas se denominan formación de imagen en campo claro y en campo oscuro respectivamente, la primera es la más utilizada. El esquema de un microscopio electrónico de transmisión de muestra en la Figura 13.

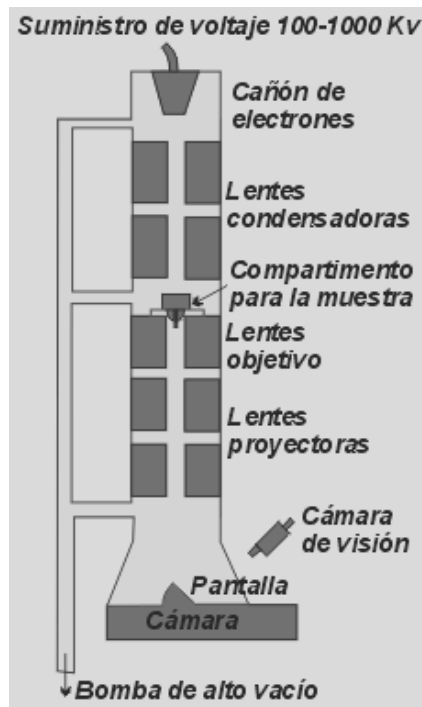


Figura 13. Esquema de un microscopio electrónico de transmisión [66]

### 3.1.8 Caracterización mecánica

Las características más importantes de los materiales en general son aquellas relacionadas con su uso final. En este sentido, el estudio de las propiedades mecánicas es una de las más interesantes, pues restringe la aplicación específica de un material.

El estudio de las propiedades mecánicas se refiere a la respuesta de un cuerpo cuando se le somete a una fuerza externa, la cual genera relaciones del tipo tensorial con la deformación que sufre este material. De los diferentes ensayos existentes, el más empleado es el ensayo de tensión en una dimensión, el cual entrega la mayoría de los datos relevantes para un primer estudio mecánico de materiales [67].

#### 3.1.8.1 Ensayo de Tensión

Este ensayo consiste en someter al material (moldeado en una forma estandarizada llamada probeta) a una velocidad de deformación constante y medir la fuerza necesaria para cada deformación. Esto se hace generalmente hasta que el material se fractura. Finalmente, se entrega una curva donde en el eje de las abscisas se muestra la deformación del material y en el eje de las ordenadas la tensión requerida. Es importante señalar que, para no depender de las dimensiones particulares de cada probeta, en lugar de trabajar con la fuerza ( $F$ ) se utiliza la tensión o carga ( $\sigma$ , en inglés “stress” o “load”) la cual se define como la fuerza aplicada dividida por el área transversal a la deformación ( $A$ ):

$$\sigma = \frac{F}{A(t)}$$

Se utiliza el término  $A(t)$  para mostrar explícitamente la dependencia del área con la deformación que sufre el material, o lo que es lo mismo en este tipo de ensayo, con el tiempo de estiramiento. Generalmente es mucho más fácil trabajar sólo con el área inicial, ya que así se evita medir constantemente las dimensiones de las probetas y, en ese caso, a la tensión se le

denomina nominal o de ingeniería. Con la deformación ( $\epsilon$ , en inglés “strain” o “extension”) sucede algo similar y se trabaja generalmente con la deformación nominal o de ingeniería:

$$\epsilon = \frac{l - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0}$$

Una de las grandes dificultades que presentan los polímeros desde el punto de vista mecánico, es la gran dependencia que tienen sus propiedades con la temperatura y la velocidad de deformación. Lo anterior debido a su comportamiento viscoelástico que, en primera aproximación es producto de los altos tiempos de relajación de los procesos microscópicos, debido al alto peso molecular de ellos. En la Figura 14 se muestran diferentes tipos de comportamiento de materiales poliméricos que se pueden encontrar, los cuales además se pueden tener para un mismo material si se modifica la temperatura del ensayo [68].

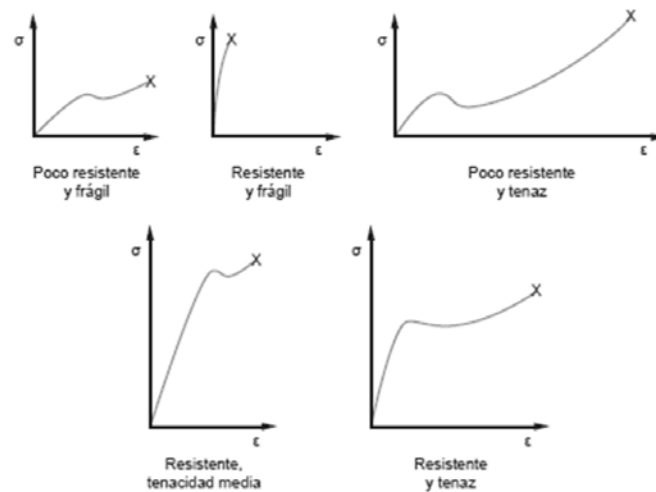


Figura 14. Curvas típicas para ensayos de esfuerzo contra deformación en polímeros [68]

La Figura 15 ilustra la terminología para ensayos de esfuerzo contra deformación. A bajas deformaciones se dice que el material sufre una deformación elástica, término que manifiesta un proceso reversible, o sea el material almacena energía, es decir, cuando cesa la fuerza externa, el material en esa zona es capaz de volver a su estado (o longitud) inicial, y expulsa la

energía acumulada. En general, esta zona elástica coincide con la zona lineal de la curva de esfuerzo vs deformación, por lo que se emplea la siguiente relación (análoga a la ley de Hooke), válida sólo para la zona elástica-lineal:

$$\sigma = E\varepsilon$$

La constante  $E$  se denomina módulo de elasticidad o de Young y es la constante que relaciona, en la zona elástica-lineal, la tensión con la deformación. Con lo anterior su cálculo resulta directo: es la pendiente a bajas deformaciones en la curva esfuerzo-deformación. Un material con un módulo alto es un material rígido, el cual no se deforma fácilmente, mientras que un módulo pequeño, corresponde a materiales fácilmente deformables.

Cuando la curva se desvía de la recta inicial, el material alcanza el punto de fluencia, desde aquí el material comienza a adquirir una deformación permanente, es decir parte de la energía que se le entrega al material para ser deformado no se recupera. A partir de este punto deja de ser válida la fórmula  $\sigma = E\varepsilon$  y se define que ha comenzado la zona plástica del ensayo de tensión. El punto de transición, es decir el límite entre los procesos elásticos y los plásticos, se denomina punto de fluencia (“yield point”) y queda caracterizado por una tensión ( $\sigma_y$ ) y deformación ( $\varepsilon_y$ ) de fluencia.

Luego de la fluencia sigue una parte inestable, que depende de cada material, para llegar a un máximo en  $\sigma = \sigma_{m\acute{a}x}$ . Entre  $\sigma = \sigma_y$  y  $\sigma = \sigma_{m\acute{a}x}$  la probeta se alarga en forma permanente y distribuída, a lo largo de toda su longitud. En  $\sigma = \sigma_{m\acute{a}x}$  la probeta muestra su punto débil, y la deformación se concentra en una zona en la cual se forma un cuello.

La deformación en la zona del cuello, provoca que la carga deje de subir. Al adelgazarse la probeta la carga queda aplicada en menor área, y así induce a la ruptura del material [69].

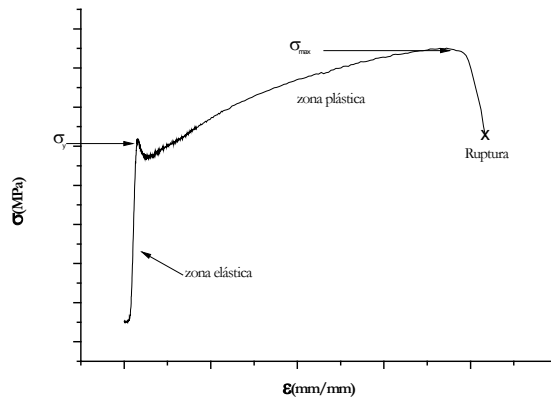


Figura 15. Curva esfuerzo-deformación de un material

*Instrumentación*

Un esquema de la máquina de ensayo de tracción se muestra en la Figura 16. La máquina de ensayo impone la deformación desplazando el cabezal móvil a una velocidad seleccionable. La celda de carga conectada a la mordaza fija entrega una señal que representa la carga aplicada, las máquinas poseen un graficador que traza en un eje el desplazamiento y en el otro eje la carga suministrada.

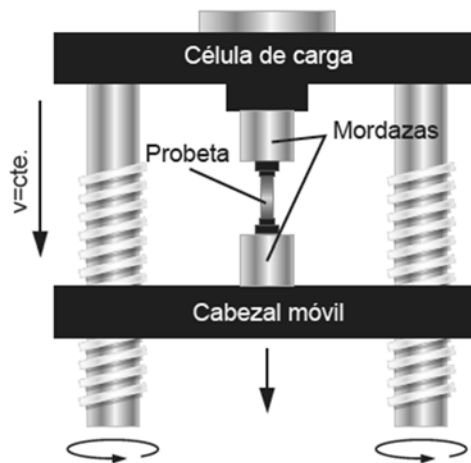


Figura 16. Máquina de ensayo de tensión [70]

## CAPÍTULO 4 SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 4.1 Materiales

Poli (ácido L-láctico) (PLLA) (Natureworks 2002D), colágeno (Col) tipo I extraído de piel de borrego (Elastin Products Company, Inc.), anhídrido maléico (AM) y peróxido de benzoílo (PBO) (Sigma-Aldrich Chemical Company). Se usaron como disolventes: Diclorometano anhidro (DCM), dietil éter anhidro (DE) y trifluoroetanol (TFE) (Sigma-Aldrich Chemical Company). Rodamina 6G (HYCEL) y benceno (Baker Analyzed). Todos los reactivos se usaron sin ningún tratamiento previo.

### 4.2 Procedimiento Experimental

#### 4.2.1 Modificación del poli (ácido láctico) con anhídrido maléico (AM-PLLA)

El injerto del AM a la cadena del PLLA se llevó a cabo mediante una reacción por radicales libres. Se empleó PBO como iniciador. El PLLA y el AM se mezclaron previamente en DCM y luego se adicionó 5% de PBO, en relación a la cantidad de AM agregado. La mezcla se agitó hasta disolver y, seguidamente, se retiró el disolvente mediante vacío a temperatura ambiente. Luego se selló al vacío y se sumergió en un baño de aceite a 100°C durante 12h. El producto obtenido se disolvió en DCM y se precipitó con DE para remover los residuos de anhídrido maléico. Finalmente se filtró al vacío y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24h.



## Experimentos:

Tabla 5. Resumen de experimentos

Síntesis	PLLA (g)	Anhídrido Maléico (%w/w)
AM-PLLA1	1	10
AM-PLLA2	1	15
AM-PLLA3	1	20

Se realizó una réplica a cada uno de los experimentos.

### 4.2.1.1 Caracterización

#### 4.2.1.1.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (ATR-FTIR)

Los espectros infrarrojos se obtuvieron en el intervalo de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  con un espectrómetro ATR-FTIR, Thermo Scientific Nicolet 6700, para determinar la presencia de anhídrido maléico en la molécula..

#### 4.2.1.1.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN)

Los espectros para cada una de las muestras de AM-PLLA se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Avance III microbay operado a 400 MHz. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Se tomaron 30mg de la muestra se disolvieron en cloroformo deuterado ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ ) para el análisis y la determinación del injerto de anhídrido maléico en la estructura del poli (ácido láctico).

#### 4.2.1.1.3 Cromatografía de permeación en gel

El peso molecular promedio en número ( $\overline{M}_n$ ) y en peso ( $\overline{M}_w$ ) e índice de polidispersidad (IP) se determinaron a través de un cromatógrafo HPLC Perkin Elmer serie 200, a temperatura ambiente, con tetrahidrofurano (THF) grado HPLC como disolvente, en una concentración de 2 mg/ml. Se utilizó poliestireno como estándar.

#### 4.2.1.1.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), la temperatura de fusión ( $T_f$ ) y la entalpía de fusión de las muestras de AM-PLLA fueron determinadas por medio de la técnica de calorimetría diferencial de barrido en un equipo DSC 2910 TA Instrument. Las muestras fueron llevadas hasta 200°C a una velocidad de calentamiento de 10°C /min. Todas las muestras fueron sometidas a dos ciclos de calentamiento.

#### 4.2.1.1.5 Análisis termogravimétrico (TGA)

Los termogramas se obtuvieron en un equipo Perkin-Elmer 7 series thermal analysis system. Las muestras, aproximadamente de 7 mg, fueron sometidas a calentamiento desde 25 hasta 400 °C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min bajo atmósfera de nitrógeno. A través de esta técnica se determinó la degradación y estabilidad térmica de cada una de las muestras de AM-PLLA.

#### 4.2.1.1.6 Ángulo de contacto

Se empleó un goniómetro Ramé-hart, ajustado con un sistema óptico para observar la interacción del agua con la superficie de las películas de AM-PLLA previamente preparadas. Se grabó un video en el momento en que se deposita una gota de 6  $\mu$ L de agua destilada sobre las películas. A partir del video se obtienen las imágenes después de haber sido retirada la punta de

la jeringa. Con ayuda del programa ImageJ 1.44p, se hizo el análisis de la curvatura de la gota y se obtuvo el ángulo de contacto.

#### **4.2.1.1.7 Determinación de grupos anhídrido**

El contenido de grupos anhídrido injertados en las muestra de AM-PLLA fue determinado por el método de interacción rodamina-grupo carboxilo [71]. En primer lugar, se sumergieron las muestras de AM-PLLA en agua destilada durante 2h, para hacer que los grupos anhídrido se hidrolizaran totalmente en grupos carboxilo. Seguidamente se realizó un secado al vacío. La Rodamina 6G (10 mg) se disolvió en 10 ml de una solución tampón de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 M, pH 12), que se extrajo inmediatamente con 200 ml de benceno para obtener un producto de color amarillo, el cual se utilizó como agente colorante para los experimentos. Los compuestos carboxílicos y polímeros que contienen grupos carboxilo cambian su color, de amarillo a rosa en muy bajas concentraciones de carboxilo. La coloración rosa de las soluciones de AM-PLLA se midió en un espectrofotómetro de UV-visible a 516 nm. Se realizó una curva de calibración con soluciones de ácido metacrílico en benceno de concentraciones conocidas.

### **4.2.2 Obtención y caracterización de nanofibras mediante la técnica de electrohilado**

#### **4.2.2.1 Equipo de electrohilado**

- Las nanofibras se obtuvieron en un equipo de electrohilado (ver Figura 17). Se usó una aguja (ver Figura 18) y dos agujas coaxiales (ver Figura 19). Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente.
- Se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros del proceso:
  - Concentración de la solución (%p/v)
  - Tipo de disolvente
  - Velocidad de inyección (ml/h)

- Voltaje directo (DC) aplicado (kV)
  - Distancia entre la aguja y la placa colectora (cm)
- 
- Las soluciones poliméricas fueron transferidas en jeringas de plástico de 5 ml de capacidad, con agujas de 0.8 mm de diámetro para el sistema de una aguja. Para el arreglo de agujas coaxiales, se utilizaron 2 diferentes diámetros de agujas (1.5 mm y 0.8 mm). El volumen inyectado en ambos casos fue de 1 ml.
- 
- Se utilizó una placa colectora de aluminio repujado de 4 milésimas de espesor (8 cm x 8 cm).

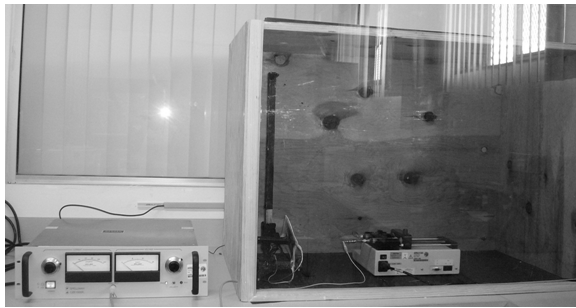


Figura 17. Equipo de electrohilado



Figura 18. Sistema de una aguja

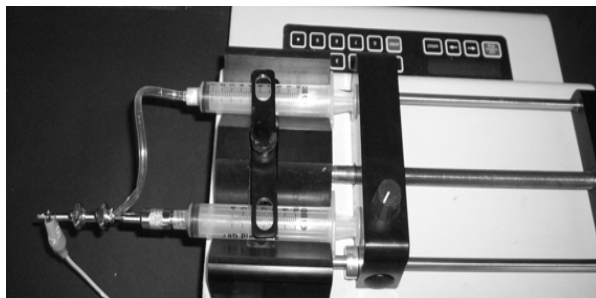


Figura 19. Sistema de dos agujas coaxiales

#### 4.2.2.2 Preparación de las soluciones poliméricas para el electrohilado

##### 4.2.2.2.1 Preparación de las soluciones de PLLA y Colágeno

- Se prepararon diferentes soluciones de PLLA. La concentración se varió de 10 a 15%p/v.
- Se preparó una solución de colágeno a una concentración del 5 %p/v. Cabe resaltar que no se pudo realizar variaciones en la concentración de las soluciones de colágeno, ya que se disponía de poca cantidad del mismo, por esto se decidió utilizar la concentración más baja posible. Se preparó una solución de PLLA y colágeno donde se utilizó una relación 30:1 (p/p). La concentración de la solución fue de 13% p/v con respecto al PLLA.

Para todas las soluciones se utilizó como disolvente TFE.

##### 4.2.2.2.2 Preparación de las soluciones de AM-PLLA y Colágeno

El AM-PLLA1 y el colágeno se mezclaron en TFE. La mezcla se dejó en agitación durante 24h, para promover el acoplamiento del colágeno con el AM-PLLA1. Las relaciones (p/p) de

AM-PLLA1 y colágeno utilizadas fueron de 30:1 y 15/1. La concentración de la solución fue de 13% p/v con respecto del AM-PLLA1.

#### 4.2.2.3 Obtención de las nanofibras

Los experimentos realizados se describen en las siguientes tablas:

Tabla 6. Electrohilado de PLLA

Muestra	Concentración (%p/v)	Disolvente	Velocidad (ml/h)	Voltaje(kV)	Distancia(cm)
PLLA	10; 13; 15	TFE	0.4; 0.6; 0.8	10; 13	10

Tabla 7. Electrohilado de colágeno (Col)

Muestra	Concentración (%p/v)	Disolvente	Velocidad (ml/h)	Voltaje(kV)	Distancia(cm)
Col	5	TFE	0.4	10	10

Tabla 8. Electrohilado de PLLA/Col

Muestra	Concentración (%p/v)	Relación PLLA-Col	Disolvente	Velocidad (ml/h)	Voltaje(kV)	Distancia(cm)
PLLA-Col	13	30:1	TFE	0.4	10	10

Tabla 9. Electrohilado de AM-PLLA1/Col

Muestra	Concentración (%p/v)	Relación AM-PLLA1/Col	Disolvente	Velocidad (ml/h)	Voltaje(kV)	Distancia(cm)
AM-PLLA1	13	100:0	TFE	0.4	10	10
AM-PLLA1-Col	13	15:1	TFE	0.4	10	10
AM-PLLA1-Col	13	30:1	TFE	0.4	10	10

Tabla 10. Electrohilado coaxial

Muestra	Concentración (%p/v)	Relación AM- PLLA1/Col	Disolvente	Velocidad (ml/h)	Voltaje(kV)	Distancia(cm)
AM- PLLA1-Col (coraza)  PLLA (núcleo)	13(PLLA)  13(AM- PLLA1-Col)	30:1	TFE	0.4	10	10
AM- PLLA1- Col(coraza)  Col(núcleo)	13(AM- PLLA1-Col)  5(Col)	30:1	TFE	0.4	10	10

#### 4.2.2.4 Caracterización de las nanofibras

##### 4.2.2.4.1 Espectroscopía de infrarrojo (ATR-FTIR)

La composición química de las nanofibras fue determinada mediante esta técnica. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en el intervalo de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , con un espectrómetro ATR-FTIR, Thermo Scientific Nicolet 6700.

##### 4.2.2.4.2 Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (XPS)

El acoplamiento del colágeno con el AM-PLLA1 en la superficie de las nanofibras fue determinado por XPS, con un espectrómetro VG Microtech Multilab ESCA 2000 system, equipado con detector multicanal hemisférico CLAM4-MDC. El espectro se obtiene utilizando una fuente de rayos X MgK $\alpha$ , a 15 kV y 20 mA.

#### **4.2.2.4.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), la temperatura de cristalización ( $T_c$ ) y la temperatura de fusión ( $T_f$ ) de las nanofibras fueron determinadas por medio de la técnica de calorimetría diferencial de barrido en un equipo DSC 2910 TA Instrument. Las muestras fueron llevadas hasta 200°C a una velocidad de calentamiento de 10°C /min. Las muestras fueron sometidas a dos ciclos de calentamiento.

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

Las curvas termogravimétricas se obtuvieron en un equipo Perkin-Elmer 7 series Thermal Analysis System. Las muestras, aproximadamente de 2 mg, fueron sometidas a calentamiento desde 25 hasta 400 °C, a 10°C/min bajo atmósfera de nitrógeno. A través de esta técnica se determinó la degradación y estabilidad térmica de cada una de las muestras de nanofibras.

#### **4.2.2.4.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La morfología de las nanofibras electrohiladas fue observada mediante esta técnica en un microscopio Leica-Cambridge Stereoscan 440, equipado con filamento de tungsteno (W). Las muestras fueron previamente recubiertas con oro por medio de pulverización catódica asistida por plasma. La distribución de diámetros, el diámetro promedio y el porcentaje de área porosa ( $\% \varphi$ ) se calcularon a partir de las micrografías obtenidas con ayuda del software ImageJ 1.44p.

#### **4.2.2.4.6 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

La estructura núcleo-coraza de las nanofibras obtenidas con el sistema de agujas coaxiales fue verificada por medio de esta técnica, en un microscopio JEOL JEM-1200EX. La muestra a observar fue recubierta con una capa delgada de oro por medio de pulverización catódica asistida por plasma, y posteriormente fue puesta en una rejilla de cobre.



#### **4.2.2.4.7 Ensayo de tensión**

Una máquina universal de pruebas mecánicas (Instron 5500R) fue usada para determinar las propiedades mecánicas de las nanofibras a una velocidad de deformación de 10 mm/min a 25°C. Las probetas fueron cortadas en una prensa manual con un troquel afilado con medidas de acuerdo a la norma ASTM D-1708-96 [72]. Se utilizaron cinco probetas para cada muestra.

## CAPÍTULO 5 RESULTADOS

### 5.1 Modificación del poli (ácido láctico) con anhídrido maléico (AM-PLLA)

La reacción de injerto de anhídrido maléico a la cadena del poli (ácido láctico) se discutirá en esta sección. El efecto de las condiciones de reacción, así como el tipo de iniciador y concentración debe tenerse en cuenta para garantizar el éxito de la reacción de injerto. En la selección adecuada del peróxido para el injerto de AM en PLLA se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- Baja toxicidad
- Baja volatilidad
- Tiempo de vida media corto
- Alta capacidad para abstraer hidrógenos

Para satisfacer estos criterios, se seleccionó el peróxido de benzoílo como iniciador, ya que es conocida su habilidad de inducir el injerto de AM en la cadena de varios polímeros con excelentes resultados, según lo reportado en la literatura [73].

El peróxido de benzoílo se caracteriza por tener un enlace oxígeno-oxígeno débil y, por tanto, es susceptible de sufrir homólisis (ver Figura 74), ya sea por calentamiento o por acción de la luz para iniciar una reacción en cadena por radicales libres.

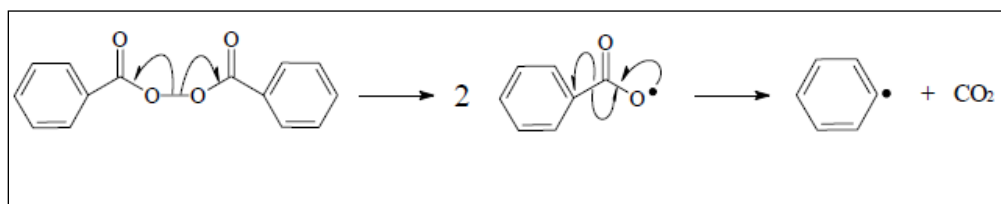


Figura 20. Ruptura homolítica del peróxido de benzoílo [74]

La reacción propuesta del injerto de AM en la cadena de PLLA se presenta en la Figura 21. Como se muestra, la reacción ocurre en dos etapas. En la primera etapa el peróxido de benzoílo sufre una ruptura homolítica que genera radicales acilos. Estos radicales aciloxi a su vez sufren una  $\beta$ -escisión y forman radicales arilo, que sustraen un hidrógeno de la cadena polimérica del PLLA. Esto da lugar a la formación de un radical en la cadena del PLLA. Entonces, para que suceda la reacción de injerto, el radical reacciona con la insaturación del AM, injertándose en la cadena del PLLA y forma un nuevo radical ramificado. Este radical puede o no reaccionar con más moléculas de AM o someterse a la transferencia de un átomo de hidrogeno en su cadena o a otra cadena de PLLA. Este proceso continúa hasta que el injerto es terminado por recombinación.

Además de la reacción de injerto, el radical en la cadena del PLLA se enfrenta a dos reacciones secundarias: entrecruzamiento y escisión de la cadena. El entrecruzamiento puede ocurrir cuando el radical en la cadena del PLLA reacciona con el AM por una reacción de adición y éste se injerta en la cadena del polímero, el radical se propaga para formar un injerto de AM colgante y largo. Esta reacción es indeseable, ya que consume sitios activos. En la segunda posible reacción secundaria, después de la adición de la molécula de AM, la cadena de PLA se puede romper y el radical es transferido a los grupos finales. Excesiva escisión de la cadena conduce a bajos pesos moleculares y a un pobre rendimiento del material. La probabilidad de que ocurran estas reacciones secundarias depende de la naturaleza del radical y de la cadena polimérica.

Además, en cualquier sistema que implique AM y radicales libres, es probable que se produzca una reacción lateral adicional, la cual es la homopolimerización del AM que puede competir con el injerto de AM [75]. Aunque este trabajo no profundiza en los detalles de la cinética de polimerización, es útil comentar algunas de las cuestiones pertinentes del injerto de AM.

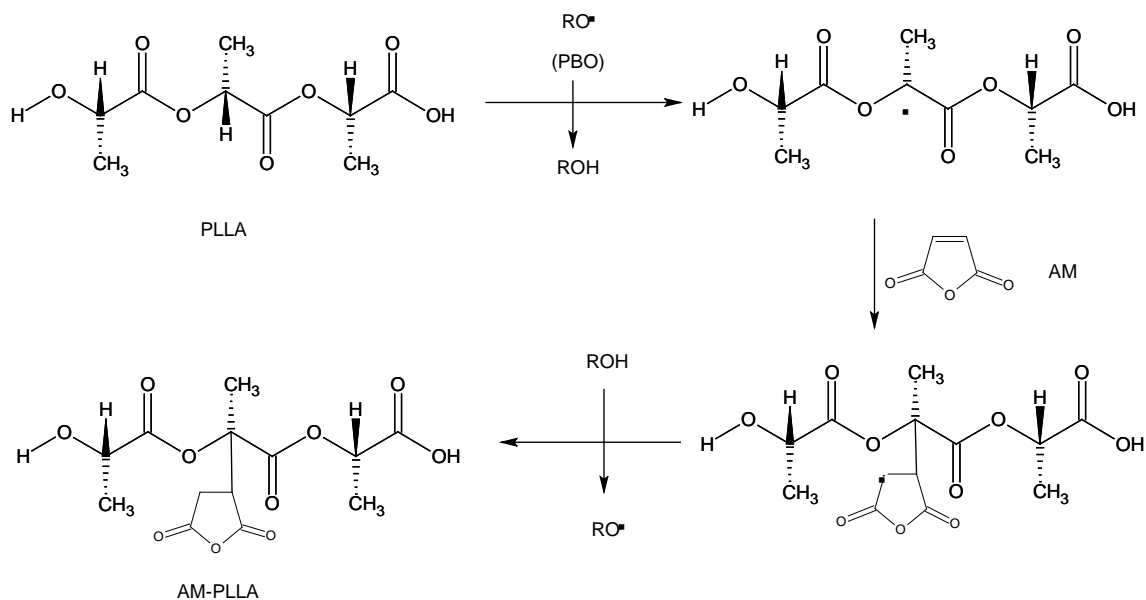


Figura 21. Reacción propuesta del injerto de AM en la cadena del PLLA

### 5.1.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (ATR-FTIR)

En la Figura 22 se puede observar el espectro para el PLLA con sus bandas características las cuales se describen en la tabla 11. En las Figuras 23, 24 y 25 se muestran los espectros para el AM-PLLA1, AM-PLLA2, y AM-PLLA3. En la Figura 26 se comparan los espectros de PLLA y AM-PLLA1 donde se puede observar un cambio en la banda del grupo carbonilo, el cual muestra dos bandas de absorción; a 1755 y 1748  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=O}}$  en  $\text{O=C-O-C=O}$ ). Para el PLLA sólo se observa una banda de absorción a 1747  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo éster. El doblete que presentan las muestras de AM-PLLA es el resultado de la superposición de dos bandas de absorción. La banda a 1748  $\text{cm}^{-1}$  es asociada al estiramiento del carbonilo del grupo éster en el PLLA. La banda a 1755  $\text{cm}^{-1}$  puede ser asignada al anhídrido injertado porque el AM se caracteriza por presentar una banda de absorción intensa entre 1750 y 1794  $\text{cm}^{-1}$  debido al estiramiento simétrico del  $\text{C=O}$ . Esto indica que, aparentemente, el AM se encuentra injertado en la cadena del PLLA.

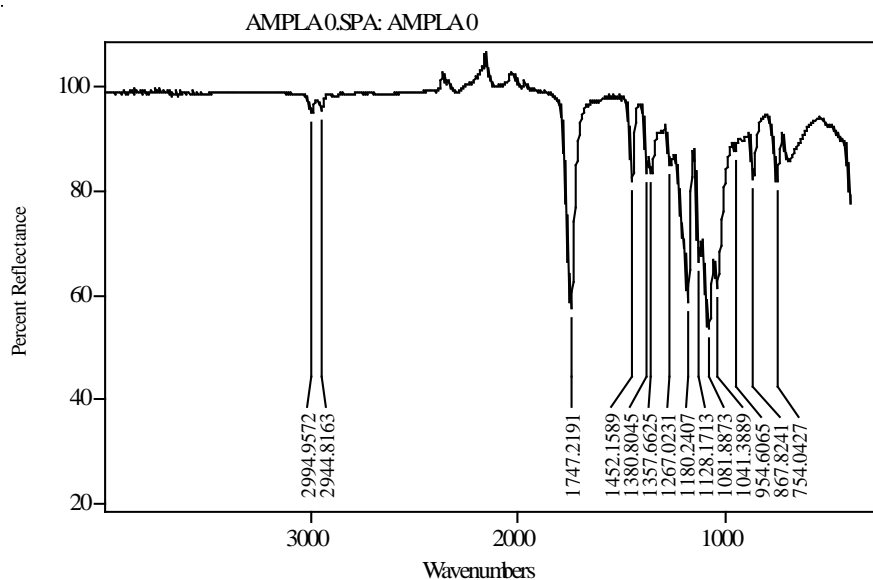


Figura 22. Espectro IR de PLLA

Tabla 11. Grupos funcionales característicos según espectro ATR-FTIR de PLLA

<i>GRUPO FUNCIONAL</i>	<i>NÚMERO DE ONDA <math>\nu</math></i> <i>[<math>\text{cm}^{-1}</math>]</i>
$\text{CH}_3 (\nu_{as})$	2944 – 2994
$\text{CH} (\nu)$	2879
$\text{C}=\text{O} (\nu)$	1747
$\text{CH}_3 (\delta_{as}, \delta_s, \delta_t + \delta_s)$	1357 – 1452
$\text{CH} (\delta_2)$	1319
$\text{CH} (\delta) + \text{COC} (\nu)$	1267
$\text{COC} (\nu_{as}) + \text{CH}_3 (\nu_{as})$	1180
$\text{CH}_3 (\nu_{as})$	1128
$\text{COC} (\nu_s)$	1092
$\text{C-OH} (\delta)$	1081
$\text{CH}_3 (\nu) + \text{CC} (\nu)$	954
$\text{C-COO} (\nu)$	867 -754

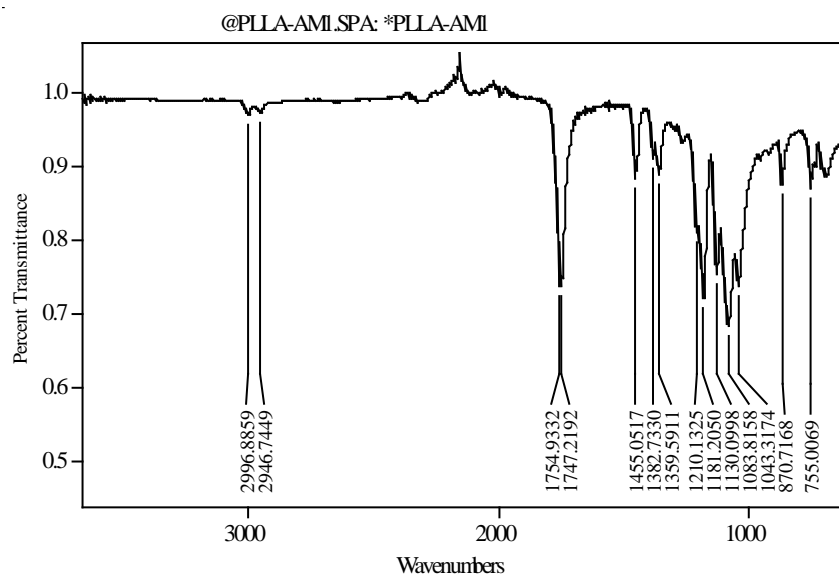


Figura 23. Espectro IR de AM-PLLA1

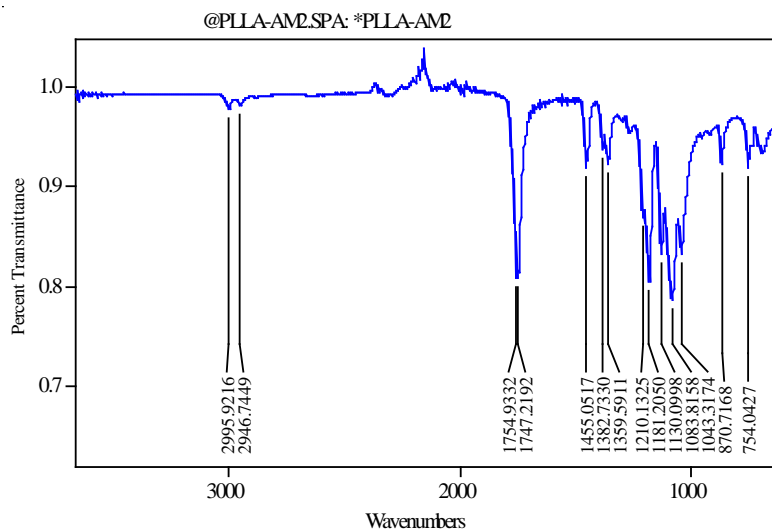


Figura 24. Espectro IR de AM-PLLA2

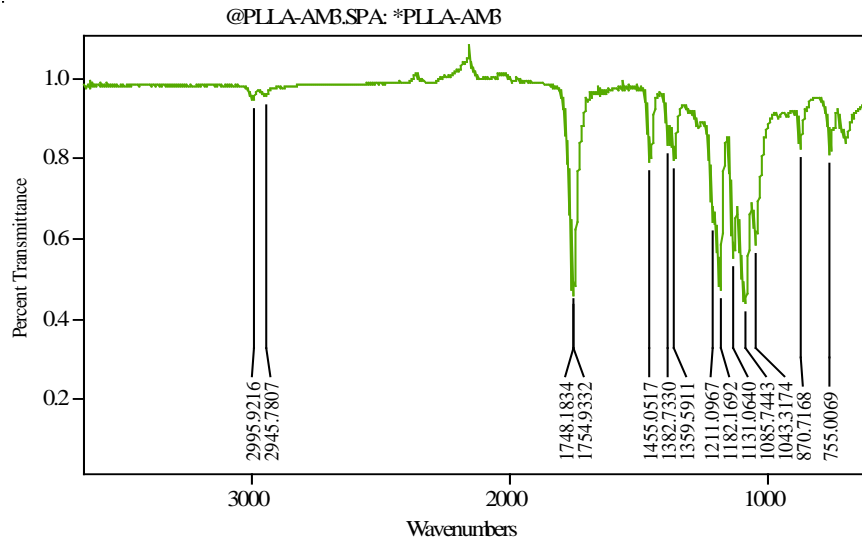
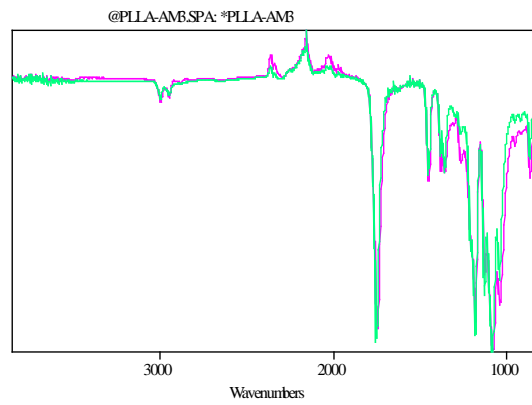
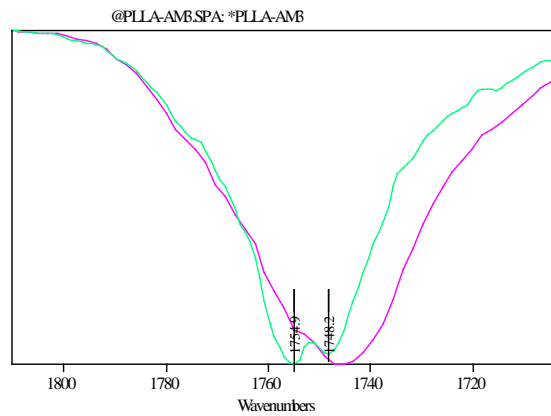


Figura 25. Espectro IR de AM-PLLA3



a)



b)

Figura 26. Espectro ATR-FTIR de a) PLLA y AM-PLLA3 b) Ampliación de los espectros en el grupo carbonilo.

### 5.1.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ )

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del PLLA (Figura 27) se pueden observar las siguientes señales:  $\delta_{\text{CH}}$  = 5.13-5.18 ppm,  $\delta_{\text{CH}_3}$  = 1.56-1.58 ppm. Al comparar este espectro con los obtenidos para el AM-PLLA1, AM-PLLA2 y AM-PLLA3 (Figura 28), se observa la aparición de una señal a  $\delta$  = 3.48 ppm, correspondiente al  $\delta_{\text{CH}_2}$  y un triplete a 3.92 ppm debido al metino unido al carbono cuaternario de la cadena del PLLA, las cuales corresponden al anhídrido maléico. Además se aprecia un singulete a 2.16 ppm debido al metilo unido al carbono cuaternario de la cadena del PLLA. Lo anterior confirma que se logró el injerto de AM a la cadena del PLLA.

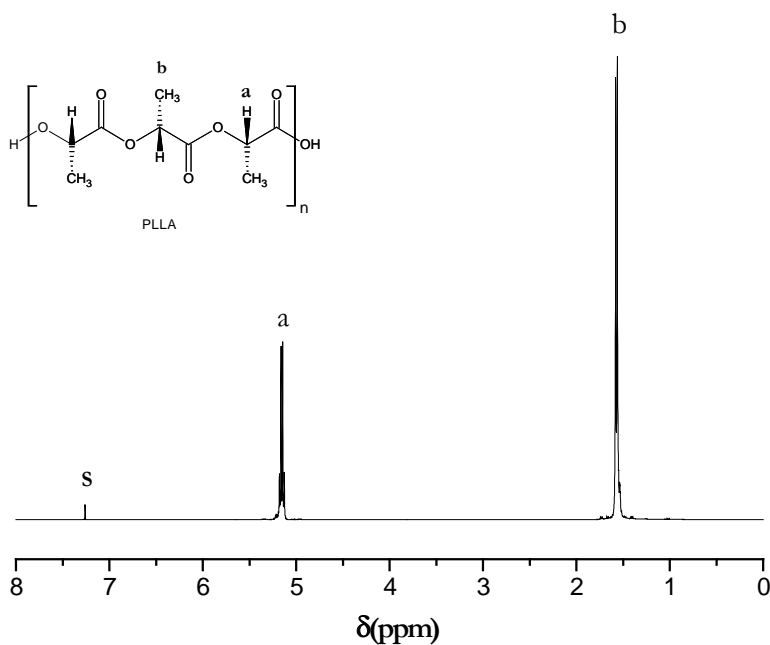


Figura 27. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de PLLA



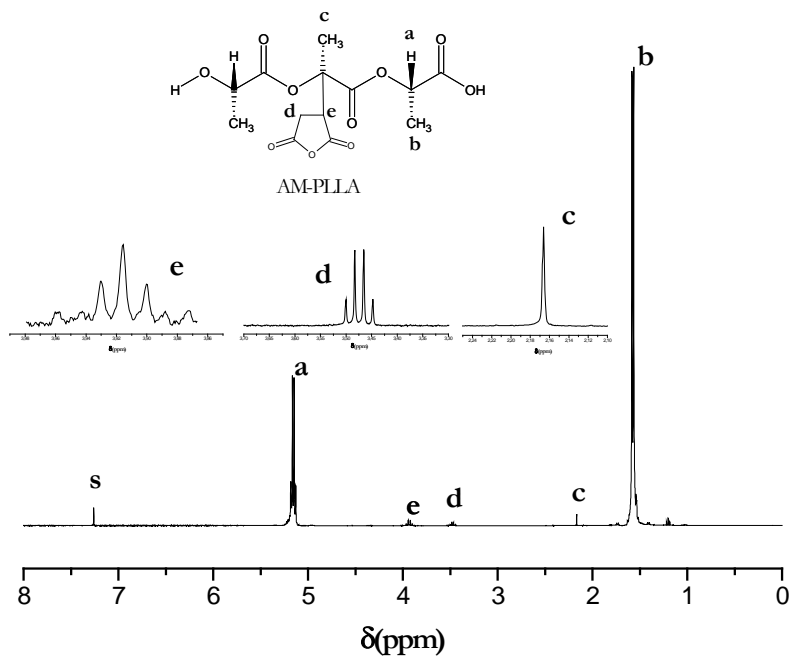


Figura 28. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de AM-PLLA1

#### 5.1.4 Cromatografía de permeación en gel

La tabla 12 muestra el peso molecular promedio en número ( $\overline{M}_n$ ) y en peso ( $\overline{M}_w$ ) e índice de polidispersidad ( $\overline{M}_w / \overline{M}_n$ ) de cada uno de los AM-PLLA obtenidos variando la concentración de AM de 10% a 20%, manteniendo constante la concentración del iniciador a 5%.

Tabla 12. Peso molecular y rendimiento del injerto como función del % de AM

%AM	$\overline{M}_n$ (g/mol)	$\overline{M}_w$ (g/mol)	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$	% Injerto de AM <sup>a</sup>
0	106,787	192,610	1.80	-
10	87,780	160,889	1.83	0.32
15	83,681	156,170	1.86	0.25
20	70,607	137,319	1.94	0.12

<sup>a</sup>Determinado por el método de interacción rodamina-grupo carboxilo [71]

En la Figura 29 se presenta el rendimiento del injerto en función de la concentración de AM. Se observa que el contenido de injerto disminuye con el incremento en la concentración de AM. Este comportamiento es similar al presentado por Mani y colaboradores [76] sobre el injerto de anhídrido maléico a la cadena del poli (succinato de butileno), quien sugiere que existe una concentración óptima que depende de la proporción de [peróxido/AM] para promover el injerto, que por encima de ésta la eficiencia del injerto disminuye. Esto es lo que ocurre, aparentemente, en este caso. A bajas concentraciones de AM, los radicales en la cadena del PLLA reaccionan directamente con el AM. Al aumentar la concentración de AM, las reacciones de terminación empiezan a ser prioritarias y el contenido de injerto disminuye. Esto sugiere que existe una competición entre el AM y las cadenas de PLLA que reaccionan con los radicales generados por la descomposición del peróxido. Sin embargo, la eficiencia de la reacción de injerto depende de la estructura, el poder de abstracción, la temperatura, y el tiempo de vida del radical del iniciador empleado.

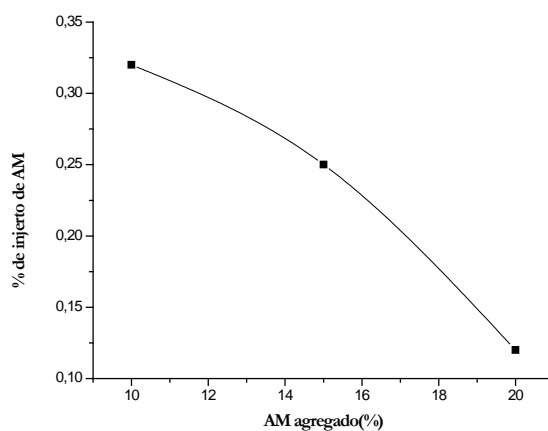


Figura 29. Efecto de la concentración de AM sobre el rendimiento del injerto

En la Figura 30 se muestra la variación del peso molecular en función de la concentración de AM agregada. El peso molecular promedio en número disminuyó a medida que se aumentó la concentración de AM a causa de la posible hidrólisis de los grupos éster del PLLA.

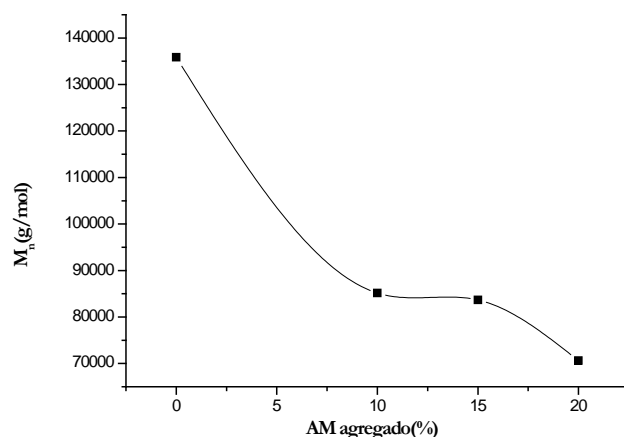


Figura 30. Efecto de la concentración de AM sobre el peso molecular promedio en número.

### 5.1.5 Análisis termogravimétrico (TGA)

En la Figura 31 se presentan los termogramas para cada una de las muestras de AM-PLLA. El análisis termogravimétrico muestra temperaturas de descomposición más bajas para cada una de las muestras de AM-PLLA, comparadas con la del PLLA sin modificar. Esto se debe a que el injerto de AM modifica la estabilidad térmica del producto. También se observa que la concentración de AM adicionada al sistema influye en la estabilidad térmica del polímero resultante. A medida que se aumentó la concentración de AM, la estabilidad térmica del producto disminuyó. La disminución de la estabilidad térmica se correlaciona con los datos de peso molecular obtenidos.

Por otra parte, se tomaron los termogramas para las mezclas físicas de PLLA y AM, los cuales se compararon con los obtenidos para el AM-PLLA. En la Figura 32 se presenta el termograma para la mezcla física con 10% (w/w) de AM (AM-PLLA10) y se incluye la derivada con respecto al tiempo para hacer más notables los cambios de pendiente. En el termograma se pueden observar dos cambios de pendiente. El primero se debe a la pérdida de peso del AM y el segundo está acorde al intervalo de descomposición del PLLA. Para el

termograma del AM-PLLA1 se observa solo un cambio de pendiente y su comportamiento es diferente al del PLLA. Por lo tanto, el injerto de AM modifica la naturaleza del PLLA y se confirma nuevamente que el AM-PLLA se preparó con éxito.

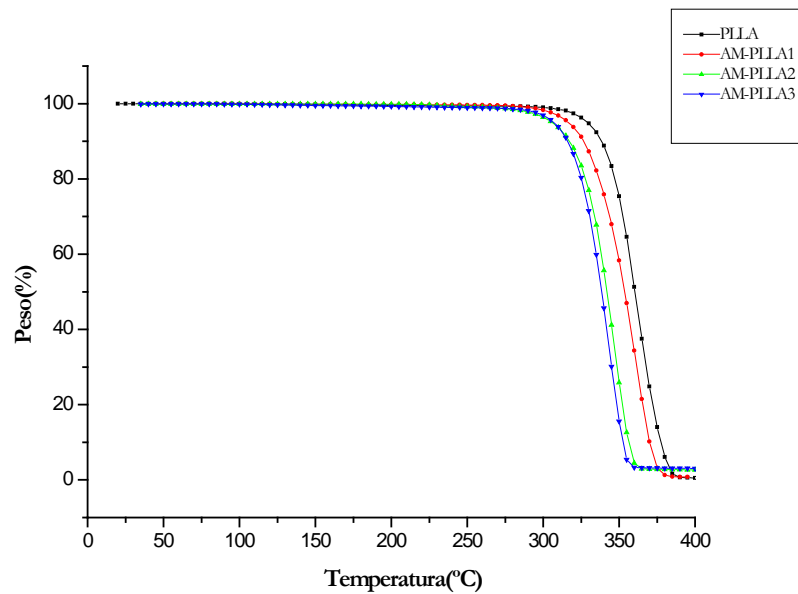


Figura 31. Termogramas del PLLA, AM-PLLA1, AM-PLLA2 y AM-PLLA3

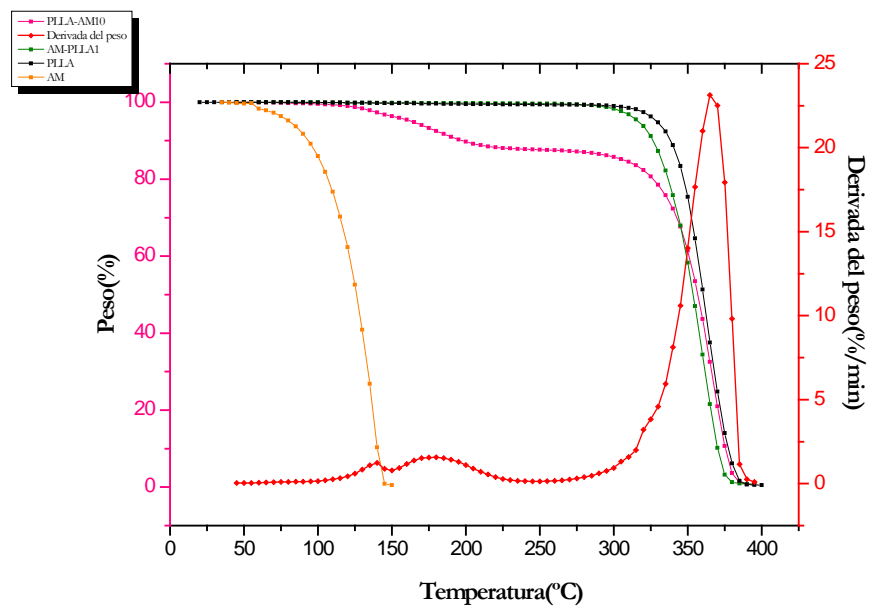


Figura 32. Termogramas del PLLA, AM, AM-PLLA10 y AM-PLLA1

### 5.1.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Por esta técnica se observó el efecto del injerto de AM a la cadena del PLLA en el comportamiento térmico. Las Figuras 33- 37 presentan los termogramas para cada una de las muestras de AM-PLLA y PLLA sin modificar. En la tabla 13 se resumen los datos de  $T_g$  y  $T_f$  obtenidos.

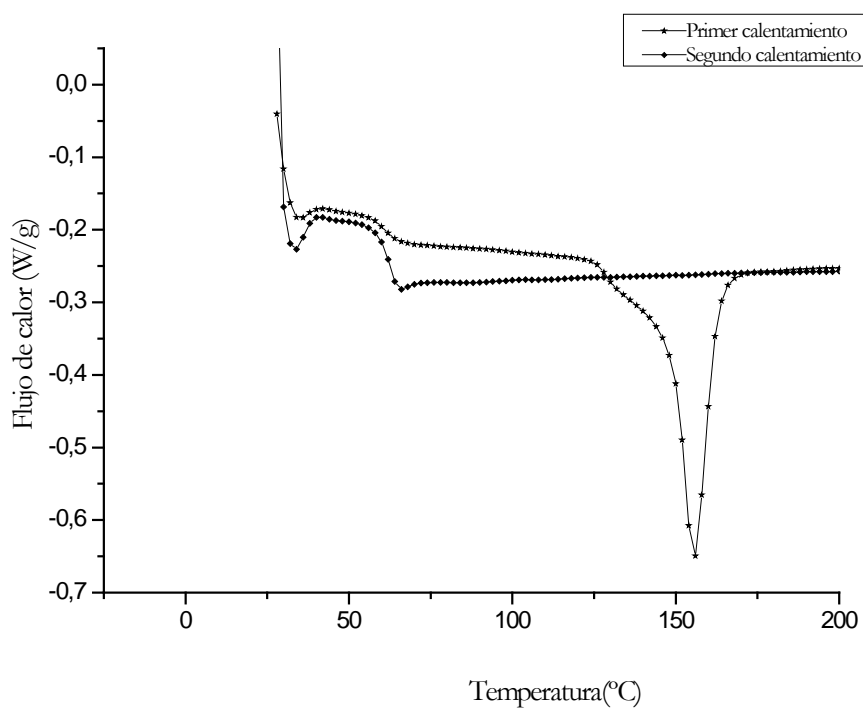


Figura 33. Termograma de DSC para el PLLA

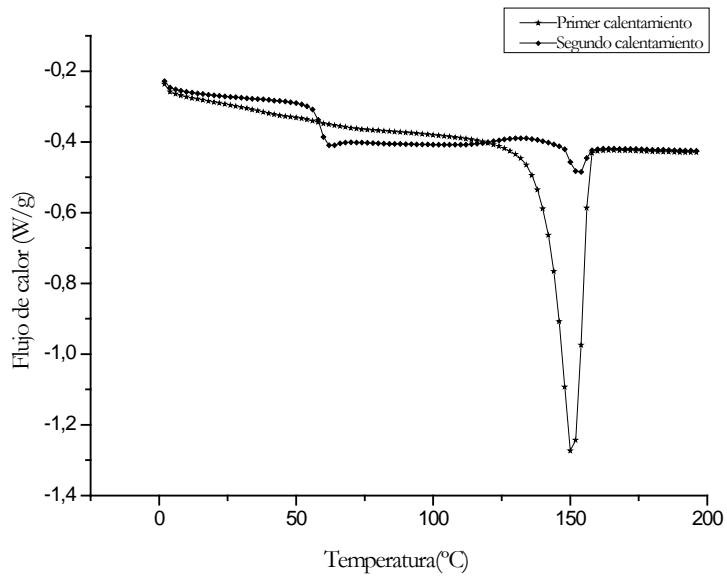


Figura 34. Termograma de DSC para el AM-PLLA1

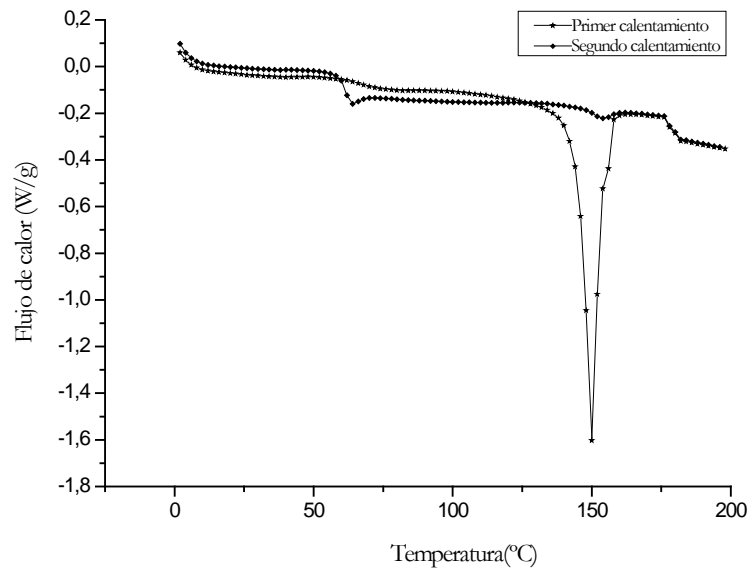


Figura 35. Termograma de DSC para el AM-PLLA2

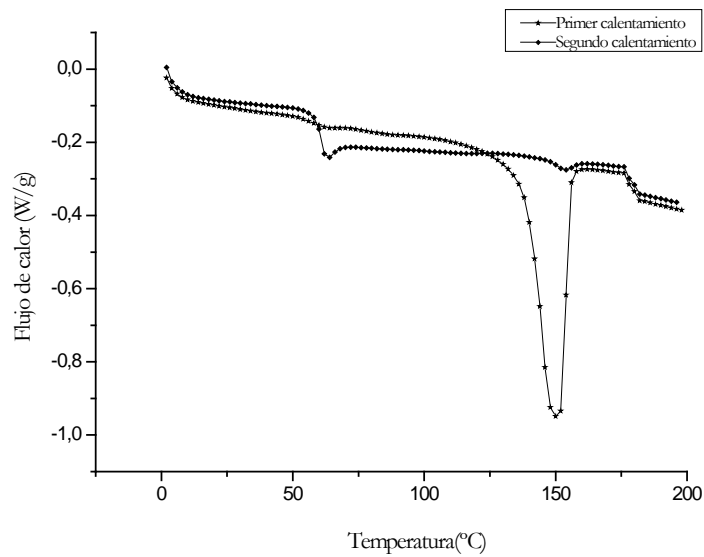


Figura 36. Termograma de DSC para el AM-PLLA3

Para la muestra de 10% de AM se observa una disminución en la  $T_g$  y  $T_f$  comparada con la del PLLA sin modificar, cabe resaltar que esta muestra tiene el porcentaje más alto de injerto de AM, lo cual incrementa la movilidad de la cadena y, por ende, una disminución en la  $T_g$  y en la  $T_f$ . Para las muestras de AM-PLLA2 y AM-PLLA3 se observan  $T_g$  muy cercanas, pero temperaturas de fusión diferentes. El AM-PLLA3 presenta la temperatura de fusión más baja en comparación a la del AM-PLLA2, esto se debe a que una mayor concentración de AM promueve la degradación del polímero, lo cual se referencia con la disminución del peso molecular.

Tabla 13. Datos de  $T_g$  y  $T_f$  obtenidos de los termogramas de DSC de las muestras de AM-PLLA.

%AM	$T_g$ (°C)	$T_f$ (°C)
<b>0(PLLA)</b>	62.68	155.5
<b>10(AM-PLLA1)</b>	59.02	152.8
<b>15((AM-PLLA2)</b>	61.58	153.6
<b>20(AM-PLLA3)</b>	60.71	152.5

### 5.1.6 Angulo de contacto

En la tabla 14 se presentan los datos de ángulo de contacto para las muestras de AM-PLLA. Se puede observar que, a medida que aumenta el % de injerto de AM en la cadena de PLLA disminuye el ángulo de contacto de las muestras comparado con el de PLLA sin modificar. Por lo tanto, el AM-PLLA es más hidrofílico que el PLLA., con lo que se espera que la afinidad celular del AM-PLLA sea mejor con respecto a la del PLLA.

Tabla 14. Ángulos de contacto (agua)

<b>Muestra</b>	<b>% Injerto de AM</b>	<b>Angulo de contacto (°)</b>
<b>PLLA</b>	0	80
<b>AM-PLLA1</b>	0.32	74.5
<b>AM-PLLA2</b>	0.25	74.7
<b>AM-PLLA3</b>	0.12	76.2

## 5.2 Preparación de nanofibras por medio de la técnica de electrohilado

### 5.2.1 Microscopia electrónica de barrido

#### 5.2.1.1 Análisis de la distribución de diámetros en las nanofibras

##### 5.2.1.1.1 Electrohilado de PLLA

A continuación se muestra un resumen de las micrografías obtenidas de las nanofibras de PLLA, para cada una de las condiciones mencionadas en la tabla 6.



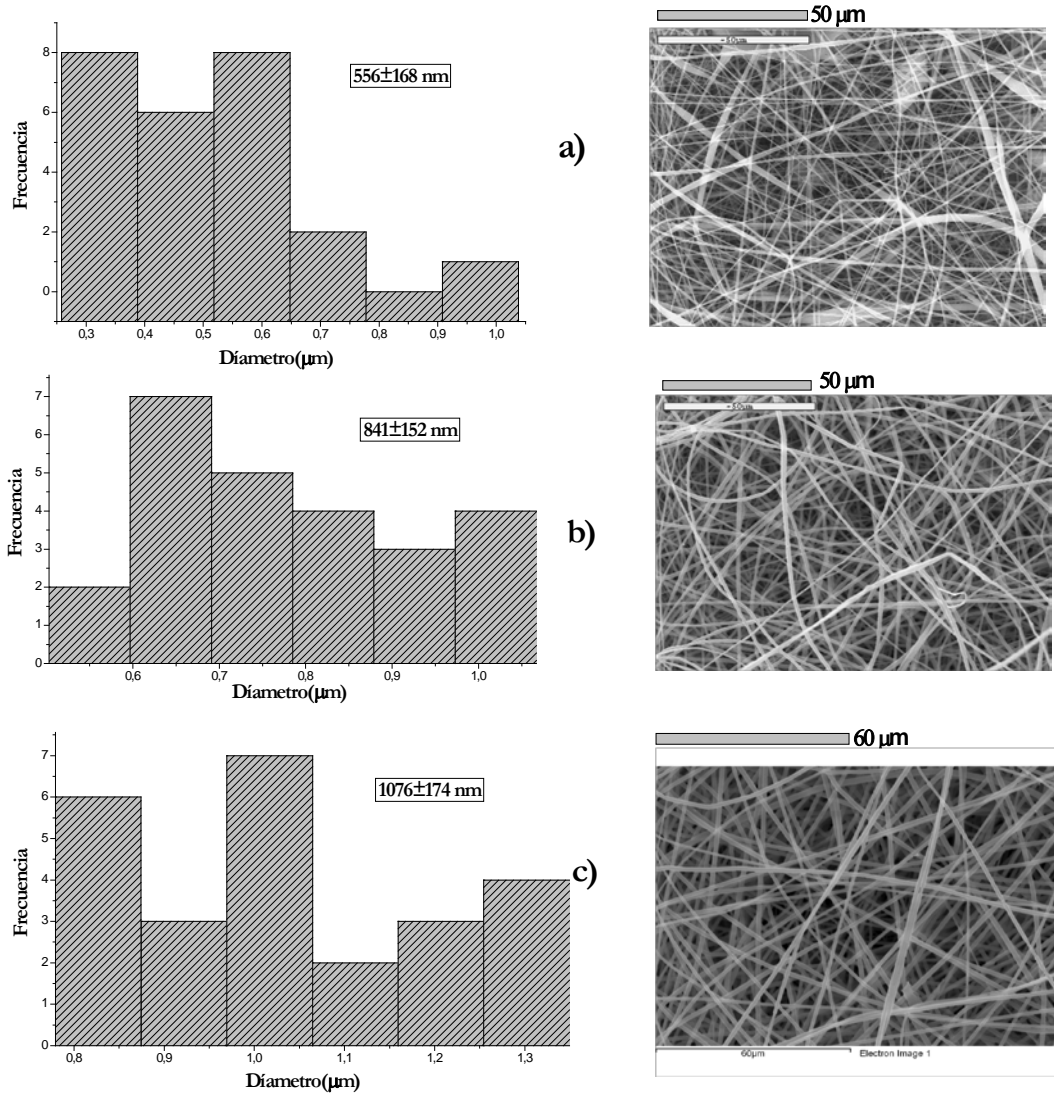


Figura 37. Micrografías de SEM (1000x) de nanofibras de PLLA a) 10% p/v; b) 13% p/v; c) 15% p/v. La velocidad de inyección, el voltaje aplicado y la distancia se mantuvieron constantes (0.6 ml/h, 10 kV, 10cm)

La Figura 37 muestra las micrografías de las nanofibras de PLLA obtenidas a diferentes concentraciones, tomadas a 1000 aumentos. Se observa que a medida que se aumenta la concentración de la solución de PLLA, el diámetro promedio de las fibras aumenta. La solución de 10% p/v presenta la formación de perlas en las fibras, indicando que el disolvente no se evaporó completamente [77]. Para las soluciones de 13 y 15 % p/v no se observa este comportamiento.

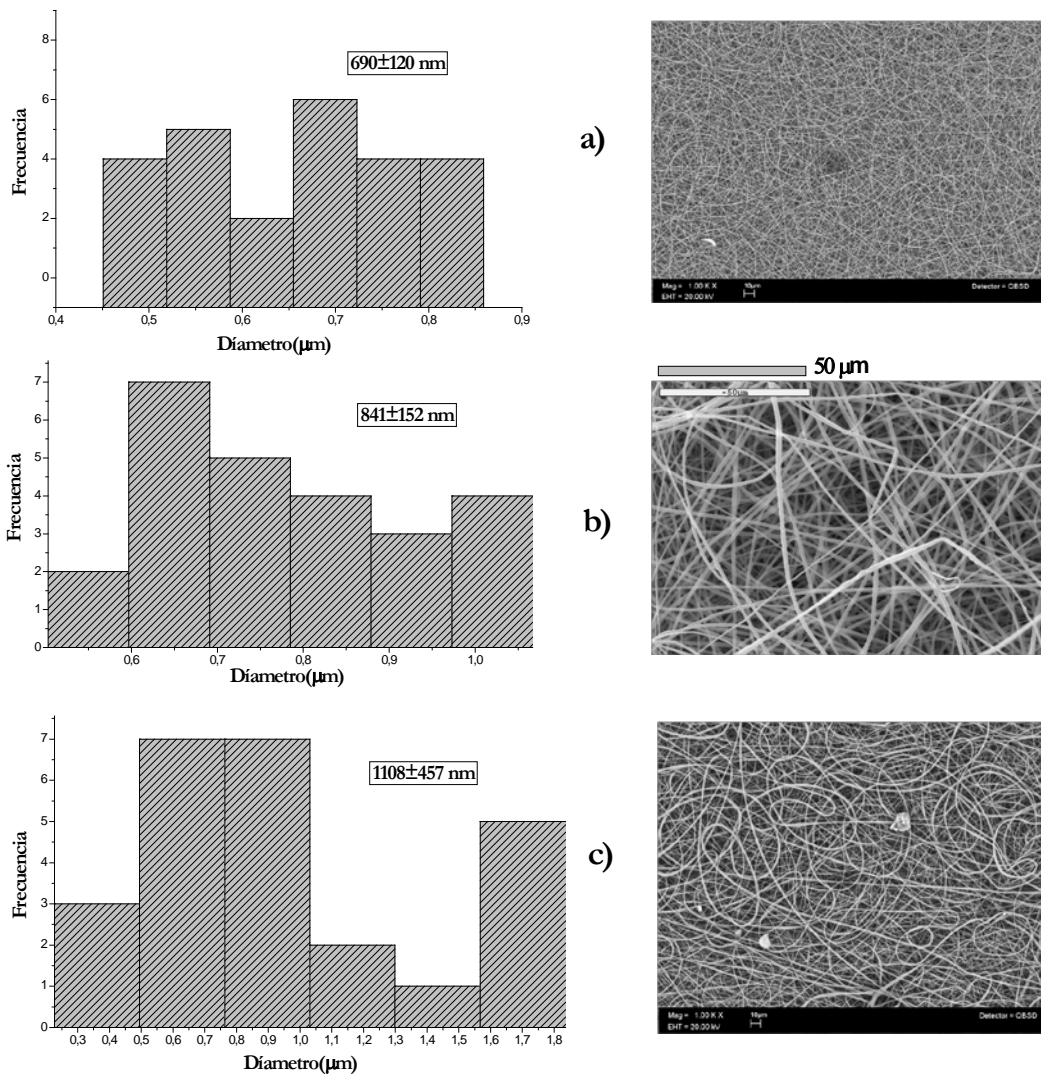


Figura 38. Micrografías SEM (1000X) de nanofibras de PLLA (13% p/v) a) 0.4 ml/h, b) 0.6 ml/h, c) 0.8 ml/h. Voltaje y distancia constante (10 kV, 10cm).

La Figura 38 muestra las micrografías de las nanofibras de PLLA obtenidas a diferentes velocidades de inyección, tomadas a 1000 aumentos. Se observa que, a medida que aumenta la velocidad de inyección para una concentración constante, la desviación estándar de los diámetros de las fibras aumenta. A una velocidad de inyección de 0.4 ml/h para una concentración del 13% p/v de PLLA se encuentra mayor homogeneidad en los diámetros de

las fibras, comparado con lo obtenido para las velocidades de 0.6 y 0.8 ml/h, cuya desviación estándar es más alta. A una velocidad de 0.8 ml/h se observa una variación grande en el diámetro de las fibras desde 361 nm hasta 1.7  $\mu\text{m}$ .

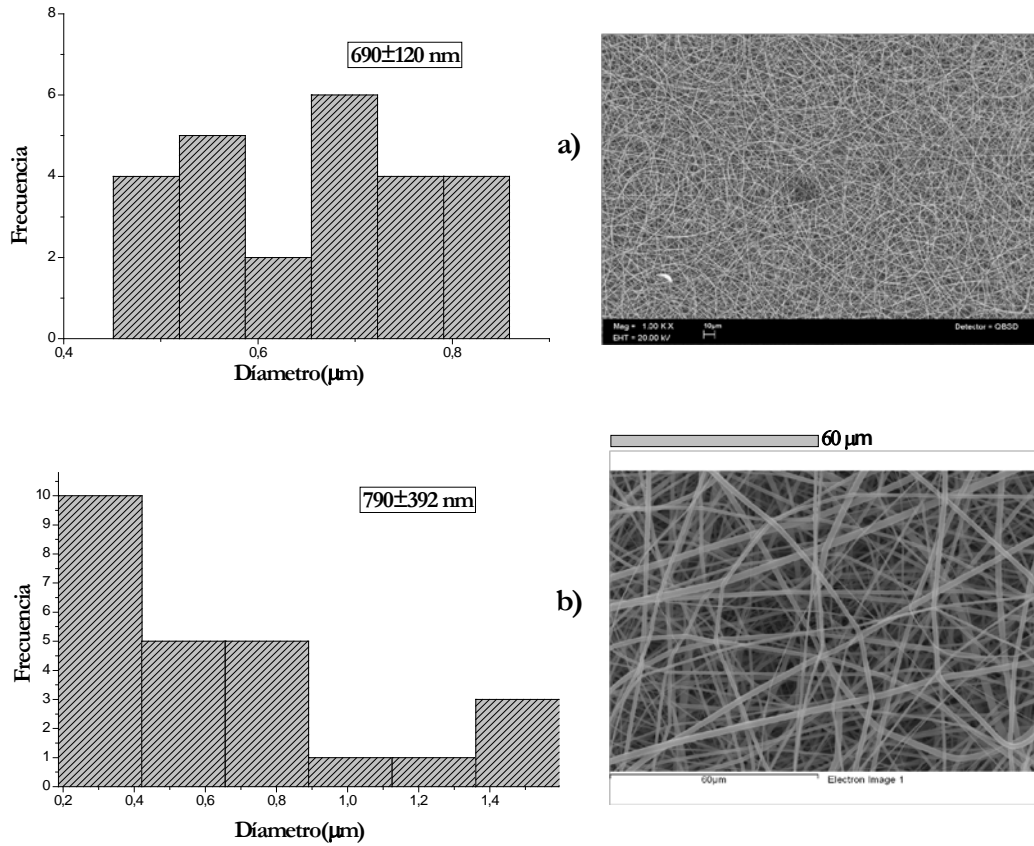


Figura 39. Micrografías SEM (1000X) de nanofibras de PLLA a) 10 kV, b) 13kV. Concentración de la solución, velocidad de inyección y distancia constante (13% p/v, 0.4 ml/h, 10cm).

La Figura 39 muestra las micrografías de las nanofibras de PLLA obtenidas a diferentes voltajes aplicados, tomadas a 1000 aumentos. Se observa que, al aumentar el voltaje para una concentración y velocidad constante, el diámetro promedio de las fibras aumenta. Para un voltaje aplicado de 10 kV hay más homogeneidad en los diámetros de las fibras, comparado con lo obtenido para un voltaje de 13 kV, cuya desviación estándar es bastante elevada.

Además, con un voltaje aplicado de 13 kV, se pueden encontrar fibras desde 300 nm hasta 1.5  $\mu\text{m}$ .

De acuerdo al estudio presentado en las Figuras 37-39, se encontraron las condiciones óptimas de preparación de las nanofibras de PLLA con TFE como disolvente, las cuales son presentadas en la Tabla 15 y se utilizaron para los experimentos posteriores.

Tabla 15. . Condiciones óptimas para la obtención de nanofibras de PLLA

Variable	Polímero
	<b>PLLA</b>
Concentración de la Solución	13 %p/v
Solvente	TFE
Velocidad de inyección	0.4 ml/h
Voltaje aplicado	10 kV
Distancia entre aguja y colector	10 cm

#### 5.2.1.1.2 Electrohilado de colágeno (Col) y PLLA-Col

A continuación se muestra un resumen de las micrografías obtenidas de las nanofibras de colágeno y PLLA-Col, para cada una de las condiciones mencionadas en las tablas 7 y 8:

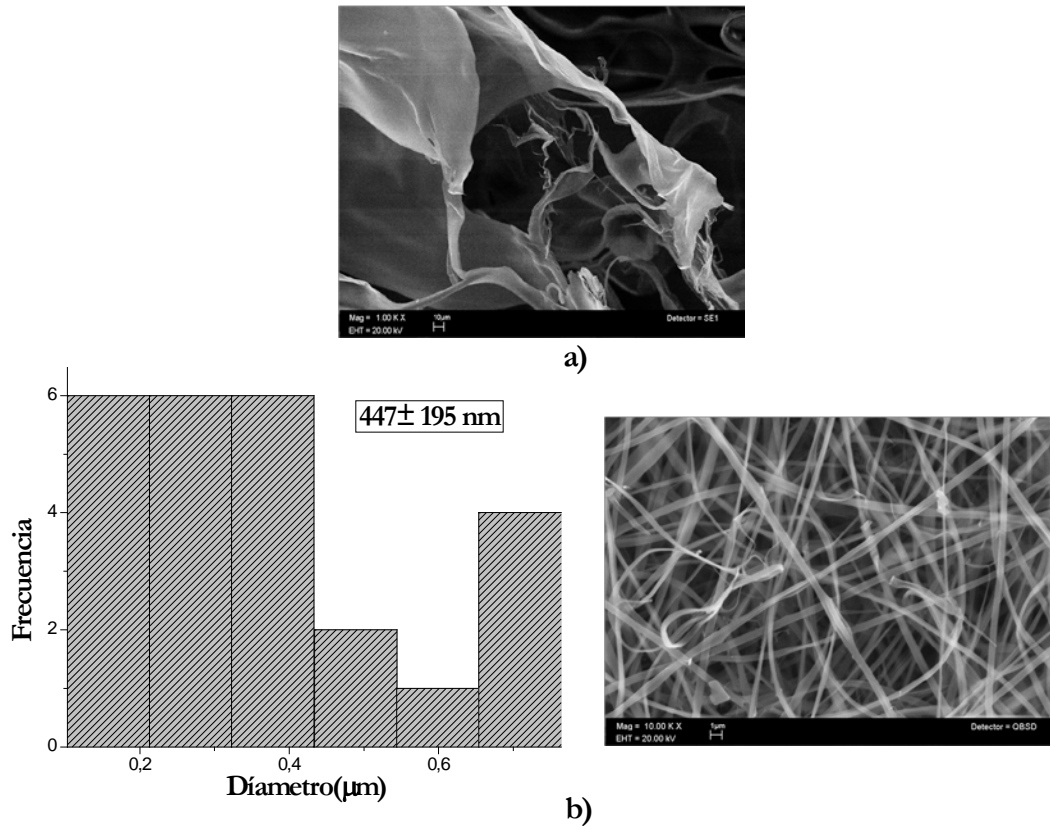


Figura 40. a) Micrografía SEM (1000X) de (Col) tipo I liofilizado extraído de piel de borrego (Elastin Products Company, Inc.), b) Micrografías SEM (10000X) de nanofibras de Colágeno

La Figura 40 muestra las micrografías del colágeno tipo I liofilizado extraído de piel de borrego, tal como se recibió (tomada a 1000 aumentos) y de las nanofibras elaboradas a base de éste con una concentración del 5% p/v (tomada a 10000 aumentos). Se observa que se pueden obtener nanofibras con diámetros desde 158 nm, lo cual no se había alcanzado en las nanofibras de PLLA.

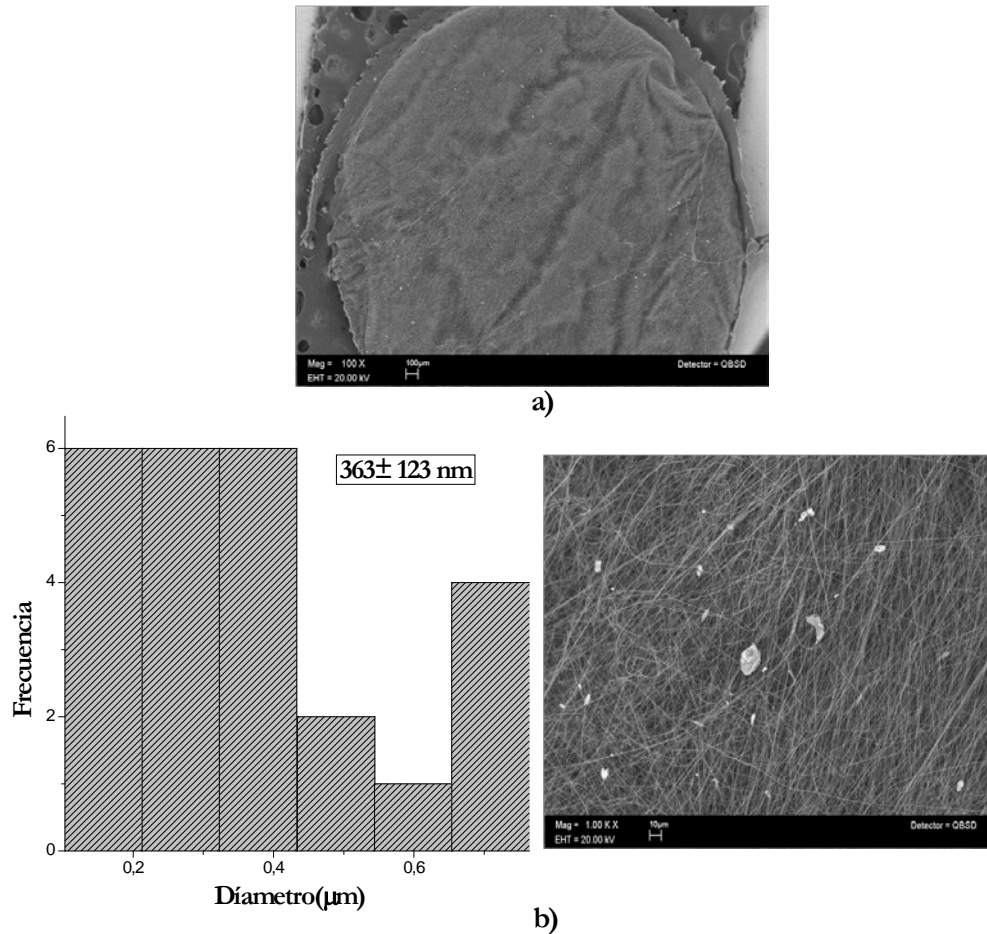


Figura 41. a) Micrografía SEM (100X) de nanofibras de PLLA-Col (30:1), b) Micrografía SEM (1000X) de nanofibras de PLLA-Col (30:1).

La Figura 41 muestra las micrografías de las nanofibras obtenidas de la mezcla física de PLLA-Col (30:1), tomadas a 100 y 1000 aumentos. A 100 aumentos, se observa para diferentes zonas de la muestra, la presencia de cúmulos en los alrededores de las fibras. Lo cual supone que el colágeno no se compatibilizó completamente con el PLLA, y generó precipitados de éste en la superficie de las fibras, a pesar de que la cantidad de colágeno agregado fue muy baja. A mayor magnificación (1000x), se observan igualmente los precipitados y además diámetros inferiores a los obtenidos en las nanofibras de PLLA.

### 5.2.1.1.3 Electrohilado de AM-PLLA1/Col

De acuerdo a los resultados del injerto de AM en la cadena del PLLA se seleccionó el AM-PLLA1 para la fabricación de las nanofibras de AM-PLLA-Col, ya que éste presentó el mayor porcentaje de injerto de AM, menor ángulo de contacto y mayor peso molecular.

La Figura 42 muestra una compilación de las micrografías obtenidas para las nanofibras de AM-PLLA1-Col con diferentes concentraciones de colágeno, tomadas a 10000 aumentos. Al aumentar la concentración de colágeno, el diámetro promedio de las fibras disminuyó comparado con el diámetro de las fibras de PLLA y AM-PLLA1. Al aumentar la concentración de colágeno aumentó la desviación estándar de los diámetros de las fibras. No se observa la aparición de precipitados o aglomerados en las nanofibras de AM-PLLA1-Col. Por lo tanto el colágeno se compatibilizó mejor con el AM-PLLA1, comparado con el PLLA. Las nanofibras de colágeno se observan maltratadas, por lo cual se infiere que la mezcla de colágeno con el AM-PLLA1, aumenta la estabilidad del colágeno y disminuye el diámetro de las fibras. Con esto aumenta el área superficial de la membrana de AM-PLLA1-Col, lo cual favorece su aplicación en ingeniería de tejidos.

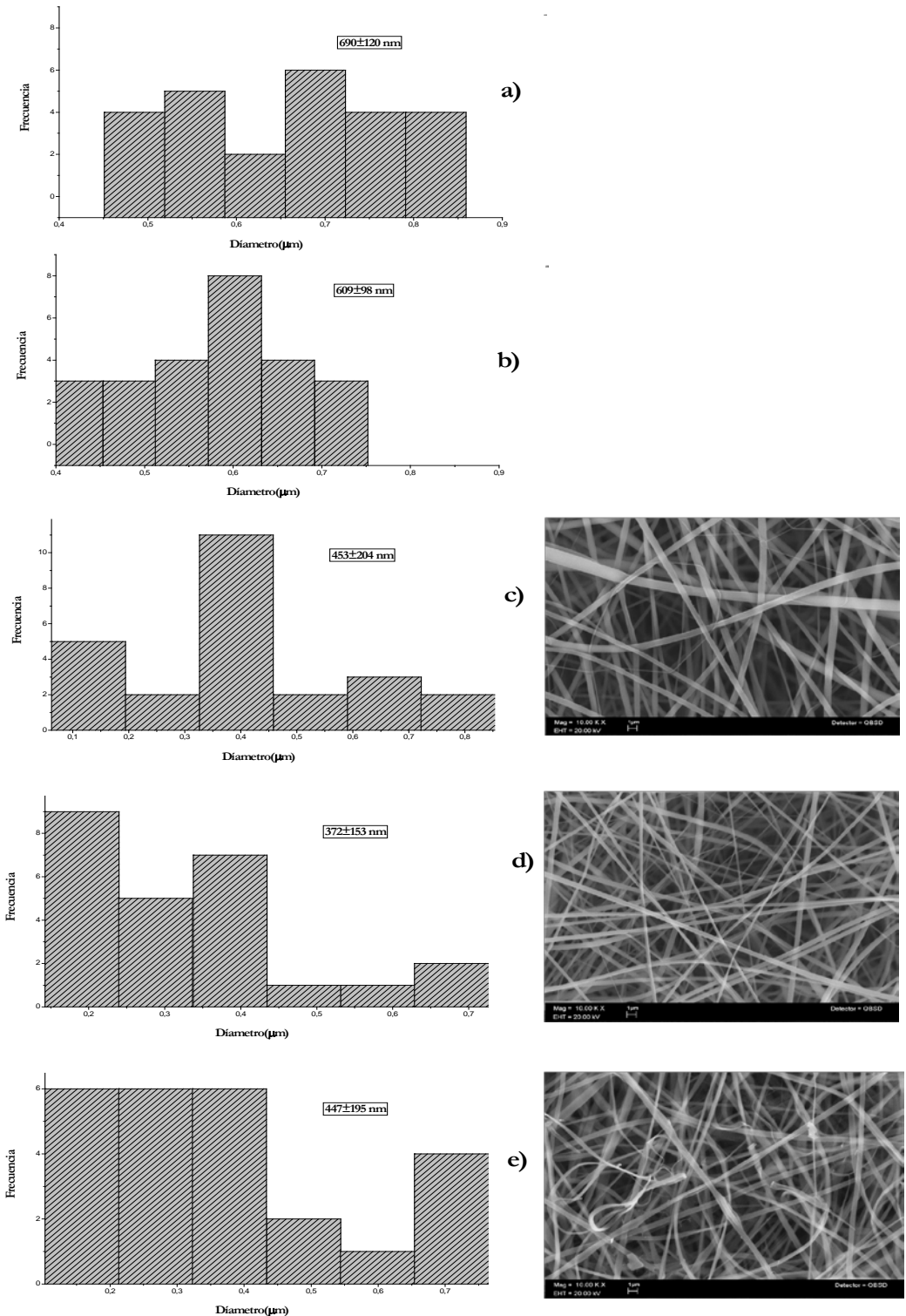


Figura 42. Micrografías de SEM (10000x) de nanofibras de a) PLLA, b) AM-PLLA1-Col (100:0), c) AM-PLLA1-Col (30:1), d) AM-PLLA1-Col (15:1), e) Colágeno (0:100).



#### 5.2.1.1.4 Electrohilado coaxial

A continuación se muestra un resumen de las micrografías obtenidas de las nanofibras preparadas, obtenidas con el sistema de dos agujas coaxiales, para cada una de las condiciones mencionadas en la tabla 10:

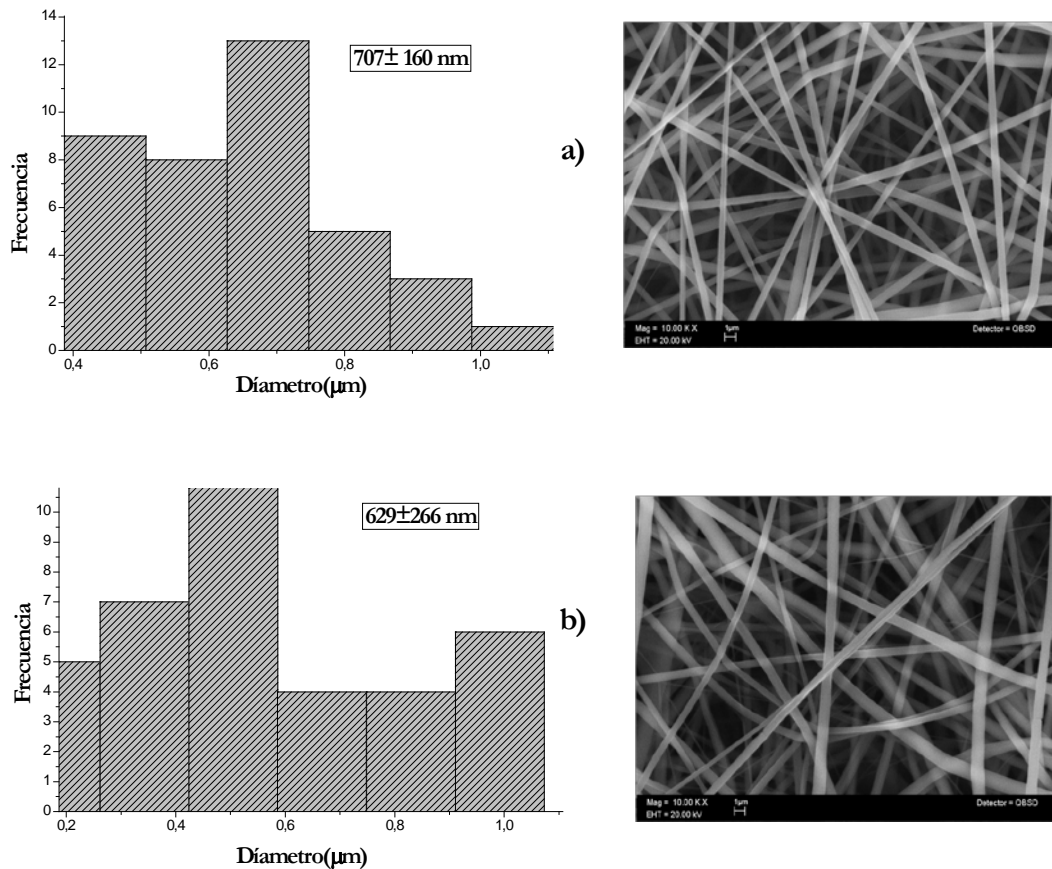


Figura 43. Micrografías de SEM (10000x) de nanofibras coaxiales de a) AM-PLLA1-Col (coraza)/PLLA (núcleo), b) AM-PLLA1-Col (coraza)/Col (núcleo)

La Figura 43 resume las micrografías de las nanofibras coaxiales, tomadas a 10000 aumentos. En los dos sistemas de nanofibras coaxiales se observa el aumento del diámetro promedio de las nanofibras, comparado con el obtenido para cada solución en el sistema de una aguja. El sistema con núcleo de colágeno muestra diámetros de fibras menores, comparados con el

sistema con núcleo de PLLA con una desviación estándar más alta. La estructura núcleo-coraza de las nanofibras se determinó por medio de TEM, los resultados se presentan en la sección 5.2.2.

### 5.2.1.2 Análisis del porcentaje de área porosa en las nanofibras

Se determinó la fracción de área porosa ( $\% \phi$ ) con ayuda del software ImageJ 1.44p por medio de las siguientes imágenes:

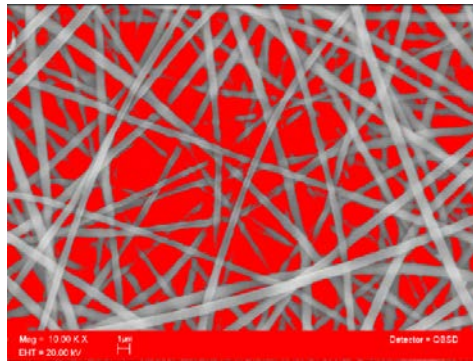


Figura 44. Micrografía de SEM (10000x) de nanofibras de PLLA con análisis de porosidad ( $\% \phi=41.2$ ).

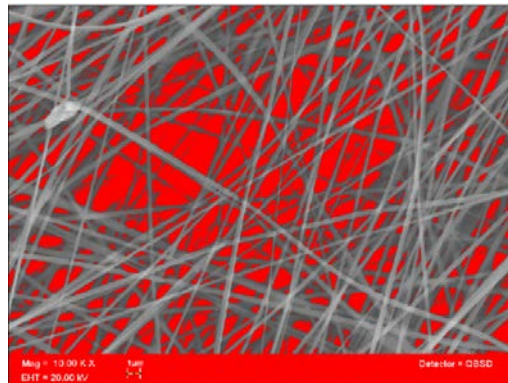


Figura 45. Micrografía de SEM (10000x) de nanofibras de PLLA-Col con análisis de porosidad ( $\% \phi=30.6$ ).

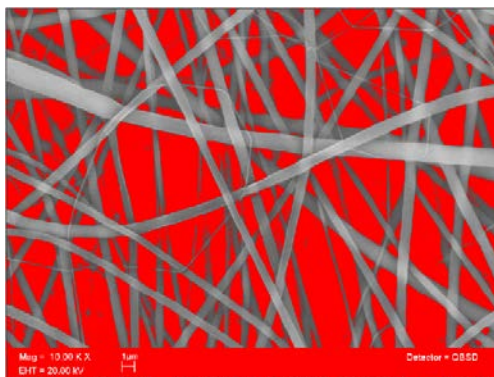


Figura 46. Micrografía de SEM (10000x) de nanofibras de AM-PLLA1-Col (30:1) con análisis de porosidad (%  $\phi=45.7$ ).

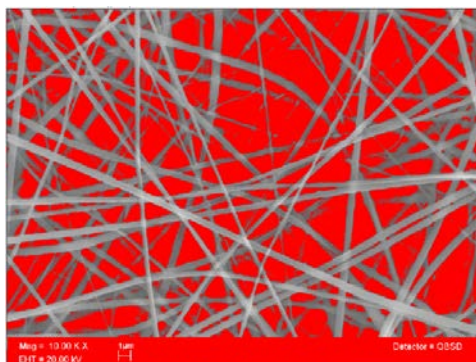


Figura 47. Micrografía de SEM (10000x) de nanofibras de AM-PLLA1-Col (15:1) con análisis de porosidad (%  $\phi=43.9$ ).

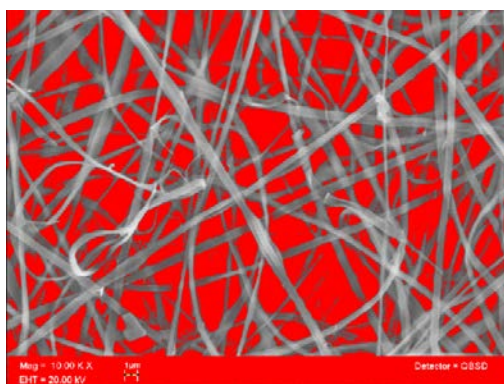


Figura 48. Micrografía de SEM (10000x) de nanofibras de colágeno con análisis de porosidad (%  $\phi=45$ ).

Los resultados del porcentaje de área porosa mostrados en las Figuras 44-48, resultan ser muy parecidos, excepto para las nanofibras de PLLA-Col (30:1). El mayor porcentaje de área porosa se presentó en las nanofibras de AM-PLLA1-Col, con un valor de 45.7%.

### 5.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La Figura 49 muestra las micrografías tomadas a 25000 aumentos, de las muestras de nanofibras del sistema AM-PLLA1-Col (coraza)/Col (núcleo) y AM-PLLA1-Col (coraza)/PLLA (núcleo). La estructura coaxial de las nanofibras es verificada, ya que los límites de la coraza y el núcleo se pueden observar claramente.

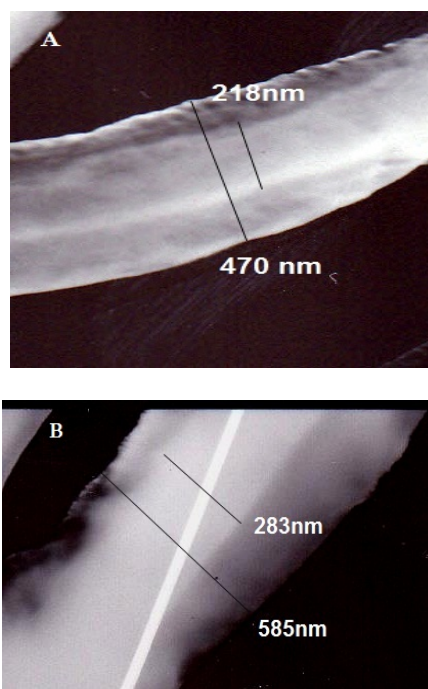


Figura 49. Micrografía de TEM (25000x) de nanofibras de a) AM-PLLA1-Col (coraza)/Col (núcleo), b) AM-PLLA1-Col (coraza)/PLLA (núcleo).

### 5.2.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

La Figura 50 presenta los termogramas para cada una de las muestras de nanofibras de PLLA, Col, AM-PLLA1 y AM-PLLA1-Col. El análisis termogravimétrico muestra temperaturas de

descomposición más altas para cada una de las muestras de nanofibras de AM-PLLA1-Col comparadas con la de AM-PLLA1. Esto se debe al posible aumento en el peso molecular. La muestra de AM-PLLA1-Col (30:1) presenta la mayor estabilidad térmica comparada con la observada para la muestra de AM-PLLA1-Col (15:1). Conforme aumenta la proporción de colágeno, la muestra empieza a tener un comportamiento, similar al de la nanofibra de colágeno, que presenta una baja estabilidad térmica en comparación con todas las muestras. Por lo tanto, el colágeno modifica la estabilidad térmica de las nanofibras de AM-PLLA1-Col.

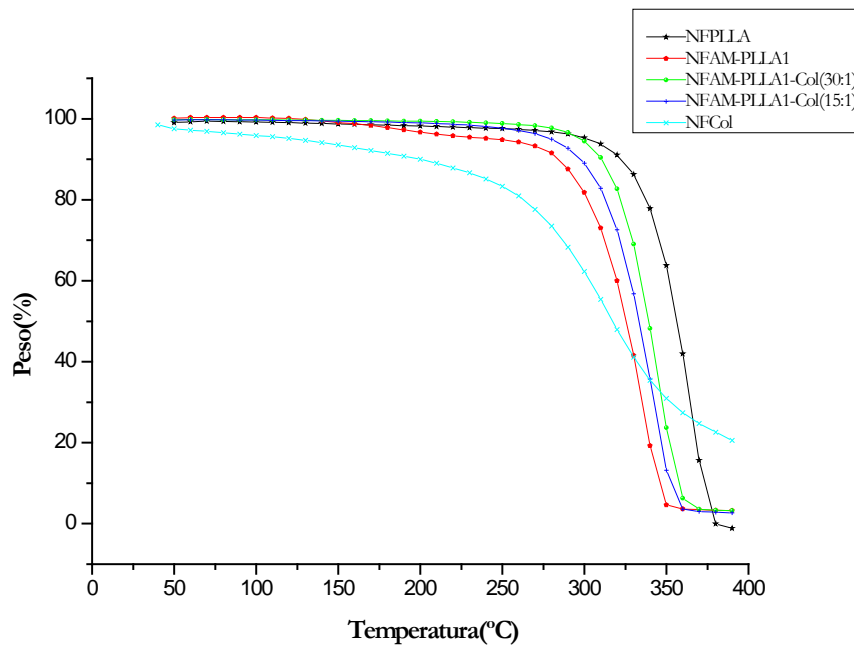


Figura 50. Termogramas de NFPLLA, NFCol, NFAM-PLLA1 y NFAM-PLLA1-Col.

Por otra parte, la Figura 51 presenta el termograma para la muestra de nanofibras de PLLA-Col (30:1), el cual se compara con el obtenido para las nanofibras de PLLA y AM-PLLA1-Col (30:1). Se puede observar que la muestra de nanofibras de AM-PLLA1-Col presenta una mayor temperatura de descomposición comparada con la de la muestra de PLLA-Col (30:1). Este comportamiento muestra que la presencia de AM en la cadena del PLLA mejora el acoplamiento del colágeno con el PLLA.

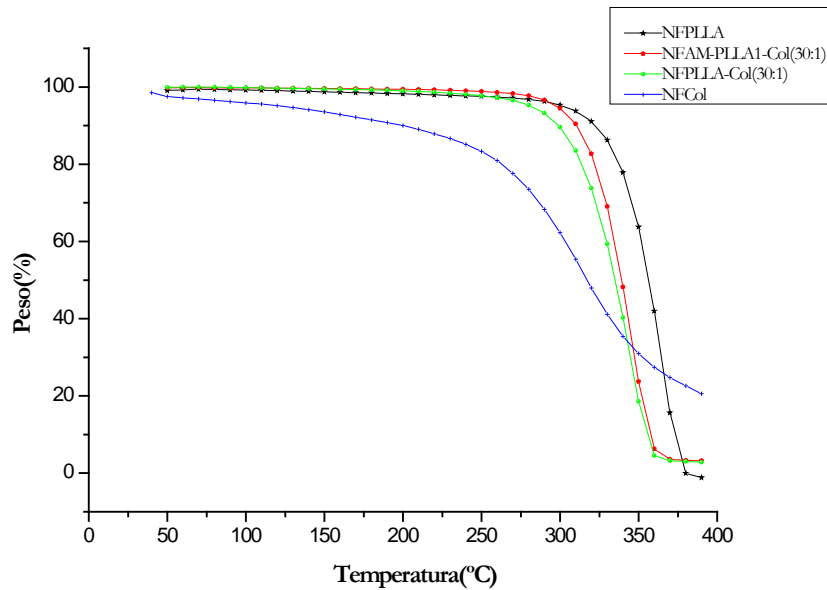


Figura 51. Termogramas de PLLA, Col, AM-PLLA1 y AM-PLLA1-Col

#### 5.2.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Por esta técnica se observó el comportamiento térmico de las nanofibras de PLLA, PLLA-Col y AM-PLLA1-Col.

La Figura 52 presenta el termograma para las nanofibras de PLLA. En el primer calentamiento se tiene una  $T_g$  que va de 61.93 a 63.27°C, seguido de un pico de relajación entálpica. También se observa una temperatura de cristalización que va de 89.6 a 102.6 °C, según lo reportado por Zong, X. H., y colaboradores, este comportamiento se debe a que en el proceso de electrohilado las nanofibras adquieren un alto grado de orientación molecular, el cual es un estado metaestable. Finalmente se tiene una temperatura de fusión que va de 147.5°C a 151.48°C. En la Figura 53 se muestran los termogramas para las nanofibras de PLLA-Col y AM-PLLA1-Col, donde se observa para el primer calentamiento el mismo comportamiento descrito para las nanofibras de PLLA. En el segundo calentamiento ya no se tienen nanofibras y se observan las propiedades del polímero en bulto. En las tabla 13 y 14 se resumen los datos de  $T_g$ ,  $T_c$  y  $T_f$  obtenidos para cada una de las muestras.

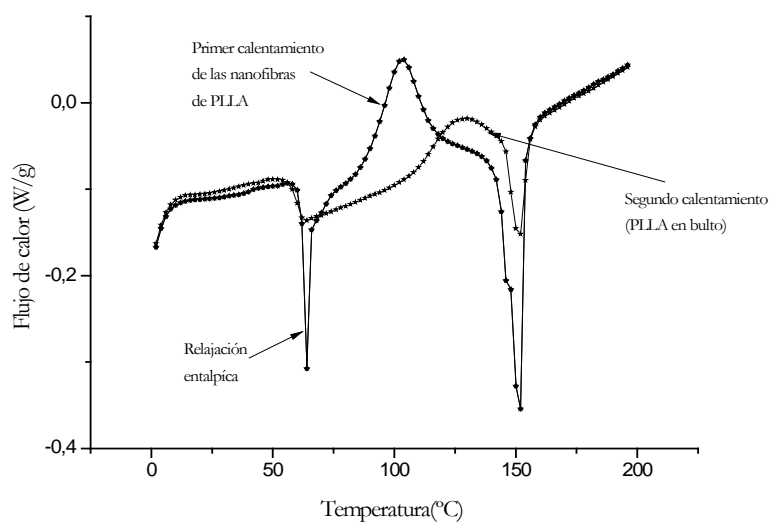


Figura 52. Termograma de NFPLLA

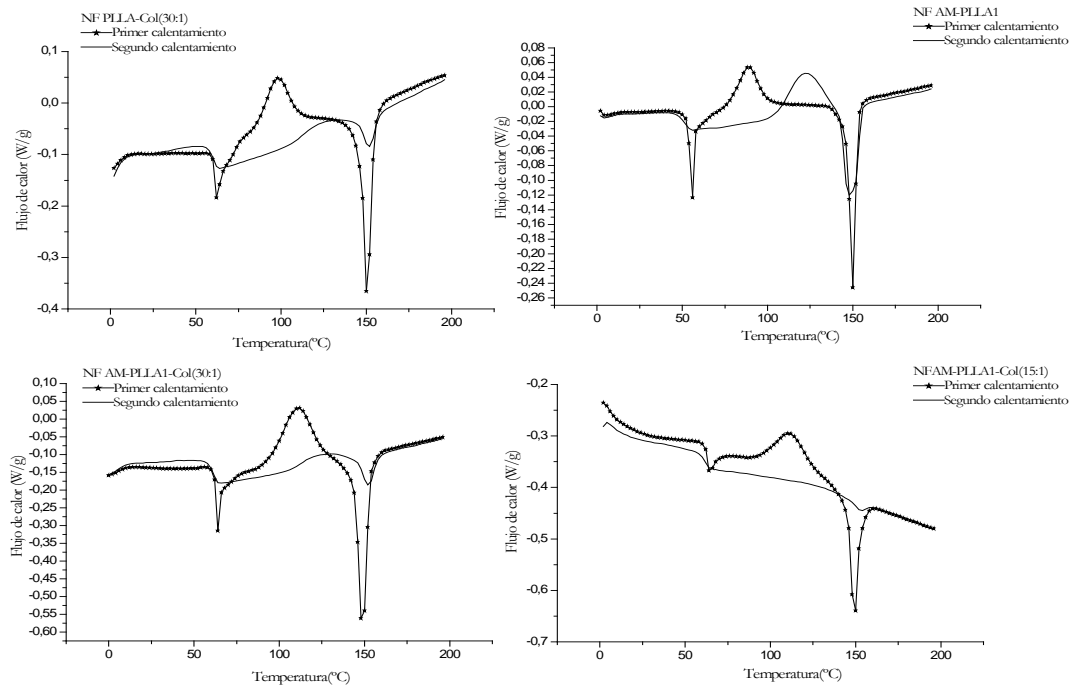


Figura 53. Termogramas de PLLA-Col y AM-PLLA1-Col.

Tabla 16. Datos de  $T_g$ ,  $T_c$  y  $T_f$  obtenidos de los termogramas de DSC, para el primer calentamiento de las muestras de nanofibras.

Muestra	Primer calentamiento		
	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$T_f$ (°C)
NFPLLA	62,65	102,66	151,48
NFPLLA-Col(30:1)	61,97	97,79	150,98
NFAM-PLLA1	54,29	88,86	150,18
NFAM-PLLA1-Col(30:1)	62,87	111,25	149,19
NFAM-PLLA1-Col(15:1)	63,48	110,92	149,77

Tabla 17. Datos de  $T_g$ ,  $T_c$  y  $T_f$  obtenidos de los termogramas de DSC, para el segundo calentamiento de las muestras de nanofibras.

Muestra	Segundo calentamiento		
	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$T_f$ (°C)
NFPLLA	60,36	124,25	151,75
NFPLLA-Col(30:1)	60,44	120,68	151,75
NFAM-PLLA1	52,11	121,55	148,71
NFAM-PLLA1-Col(30:1)	61,82	121,36	152,3
NFAM-PLLA1-Col(15:1)	61,73	123,87	152,51

De acuerdo a los datos mostrados en la tabla 17, se tiene que el comportamiento térmico de la mezcla de PLLA-Col (30:1), es muy similar al del PLLA. Esto indica que la muestra que se tomó para la medición era mayoritariamente PLLA, demostrándose que la compatibilización



del colágeno en mezcla con el PLLA es ineficiente. Por otra parte, las muestras de AM-PLLA1-Col presentan temperaturas de transición vítrea y fusión mayores comparadas con la del AM-PLLA1. Se infiere entonces que el colágeno modifica las propiedades térmicas del AM-PLLA1, por lo cual existe una fuerte interacción entre ellos.

### 5.2.5 Espectroscopía de infrarrojo

En la Figura 50 se presentan los espectros del Colágeno Tipo I y de las nanofibras de AM-PLLA1-Col. En el espectro de las nanofibras de AM-PLLA1-Col se observa la aparición de tres nuevas señales, la primera a  $3400\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{N-H}}$  en  $\text{NH}_2$ ), la cual es característica de los grupos amino, la segunda y la tercera a  $1629$  y  $1537\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{N-H}}$  en  $-\text{CONH}-$ ), las cuales son características de los grupos amida. Además se observa la desaparición de la doble señal del grupo carbonilo y la señal a  $3400\text{ cm}^{-1}$  también se le puede atribuir al grupo ácido que se forma cuando el anhídrido reacciona. Por lo tanto, de este resultado se puede inferir que posiblemente hubo una reacción de los grupos anhídrido de la cadena de AM-PLLA1 con los grupos amino del colágeno.

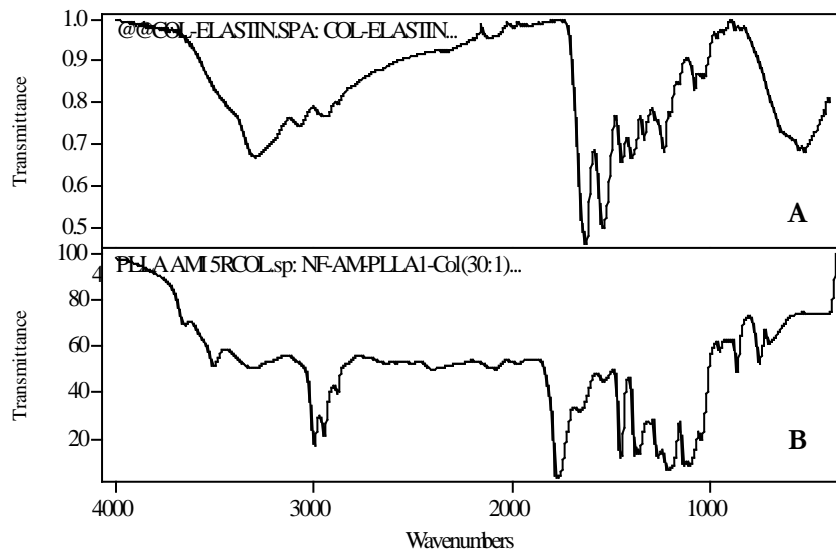


Figura 54. a) Espectro IR de Col, b) Espectro IR de nanofibras de AM-PLLA1/Col(30:1)

Tabla 18. Grupos funcionales característicos del colágeno en la nanofibra de AM-PLLA1/Col

Grupo funcional	Número de onda $\nu$ [ $cm^{-1}$ ]
$\nu_{N-H}$ en $NH_2$	3300-3500
$\delta_{N-H}$ en	1629
-CONH-	
Amida I	
$\delta_{N-H}$ en	1537
-CONH-	
Amida II	

### 5.2.6 Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Los espectros XPS de amplio barrido de la superficie de las nanofibras de PLLA, AM-PLLA1, PLLA-Col (30:1) y AM-PLLA1-Col (30:1) se muestran en la Figura 55. El espectro de AM-PLLA1 muestra los picos correspondientes al C 1s y al O 1s. En contraste, un nuevo pico correspondiente al N 1s aparece en el espectro para las nanofibras de PLLA-Col (30:1) y AM-PLLA1-Col (30:1). Este pico es más notorio en el espectro de las nanofibras de AM-PLLA1-Col, comparado con el observado para las nanofibras de la mezcla de PLLA-Col (30:1). Como la magnitud del pico de nitrógeno corresponde a los grupos amino del colágeno, se puede inferir que hay mayor cantidad de colágeno en la superficie de las nanofibras de AM-PLLA1-Col (30:1) que en la superficie de las nanofibras de PLLA-Col (30:1).

Los espectros para el orbital C 1s de las nanofibras de AM-PLLA1, PLLA-Col (30:1) y AM-PLLA1-Col (30:1) se muestra en la Figura 56. Para las nanofibras de AM-PLLA1, se compone de tres picos, con energía de enlace a 285.00 eV para los enlaces C-H, a 286.97 eV para los enlaces C-O y a 288.94 eV para los enlaces O-C=O. En el espectro de las nanofibras de AM-PLLA1-Col aparecen dos nuevos picos asociados con los enlaces C-N y O=C-NH a 285.80 eV

y 288.17 eV, respectivamente. En el espectro para las nanofibras de PLLA-Col (30:1) también aparecen estos picos. Sin embargo, el enlace formado por los grupos anhídrido del AM-PLLA1 y los grupos amino del colágeno se hace evidente por la intensidad y el área de cada pico.

La figura 57 presenta los espectros para el orbital O 1s. Para las nanofibras de AM-PLLA1 presenta dos picos, con energía de enlace a 531.94 eV para los enlaces O-C=O y a 533.38 eV para los enlaces C-O. En el espectro para las nanofibras de AM-PLLA1-Col (30:1) aparece un nuevo pico a 532.81 eV para los enlaces O=C-NH.

Por último, en la Figura 58 se muestran los espectros para el orbital N 1s para las nanofibras de AM-PLLA1-Col (30:1) y PLLA-Col (30:1), donde se presentan dos picos; a 398.60 eV para los enlaces C-N y a 399.91 eV para los enlaces O=C-NH. Los resultados demuestran el acoplamiento del colágeno y el AM-PLLA1 en las nanofibras.

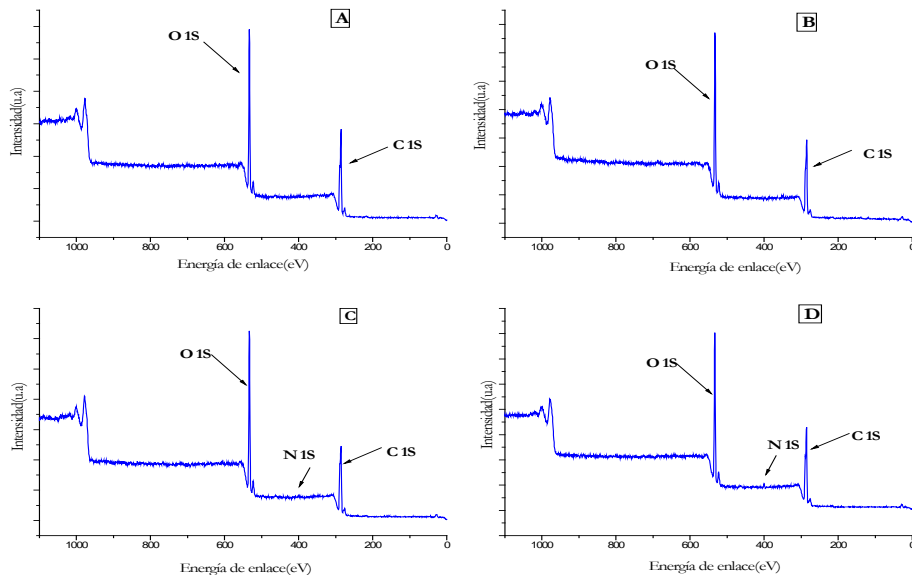


Figura 55. Espectro XPS de amplio barrido de nanofibras de a) PLLA, b) AM-PLLA1, c) PLLA-Col (30:1) y d) AM-PLLA1-Col (30:1)

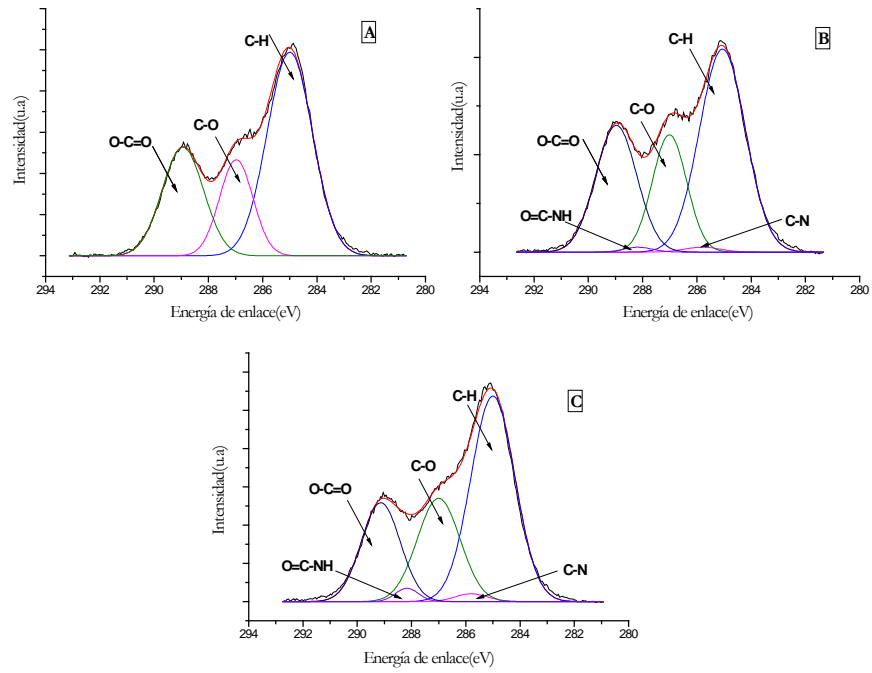


Figura 56. Espectros para el orbital C 1s de nanofibras de a) AM-PLLA1,b) PLLA-Col (30:1),c) AM-PLLA1-Col (30:1)

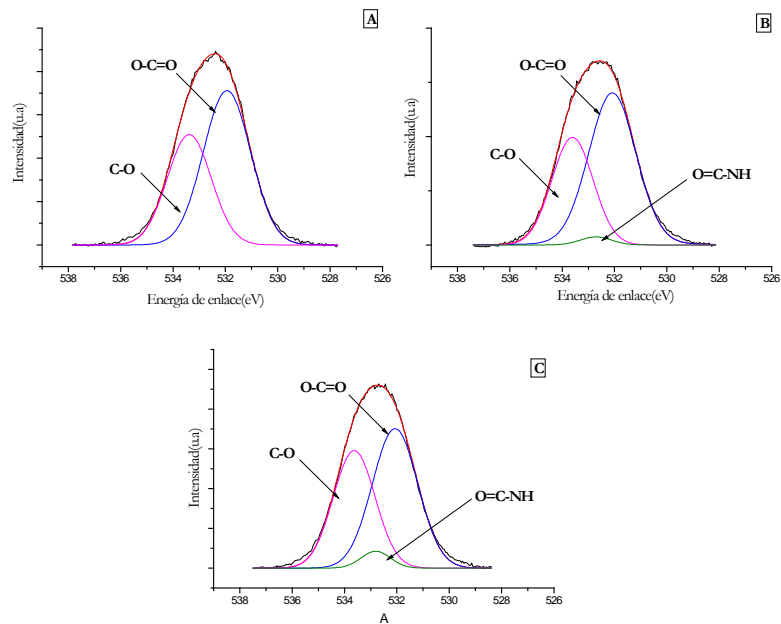


Figura 57. Espectros para el orbital O 1s de nanofibras de a) AM-PLLA1,b) PLLA-Col (30:1),c) AM-PLLA1-Col (30:1)

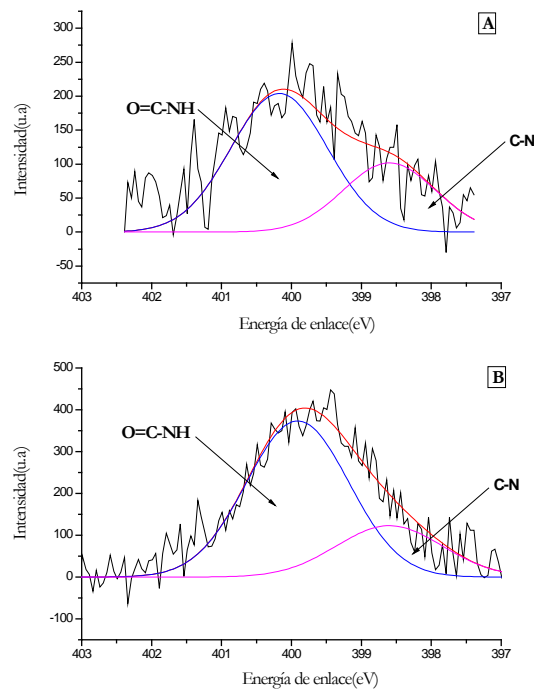


Figura 58. Espectros para el orbital N 1s de nanofibras de a) PLLA-Col (30:1), b) AM-PLLA1-Col (30:1)

### 5.2.7 Ensayo de tensión

En la Figura 59 se muestra la curva esfuerzo vs deformación obtenida para la membrana de nanofibras de PLLA. Se puede observar claramente la zona elástica y plástica del material. Además, se presenta un punto de fluencia, donde aparece un cuello en la probeta, caracterizado por una disminución muy marcada en la sección transversal de esta, en un punto particular, por lo que en la zona de área reducida, el material estaría recibiendo una carga o tensión mucho mayor que la que se grafica realmente (tensión nominal) producto de la disminución del área en ese punto. Seguido a esto, se observa el punto de carga máxima y el punto de ruptura de la probeta. Cabe resaltar que las nanofibras sufren un alto grado de alineación, debido a la tensión uniaxial que se les ejerció. La Figura 60 muestra una micrografía SEM de la membrana, tomada

a 10000 aumentos donde se observa la alineación de las fibras en el punto C de la curva esfuerzo vs deformación.

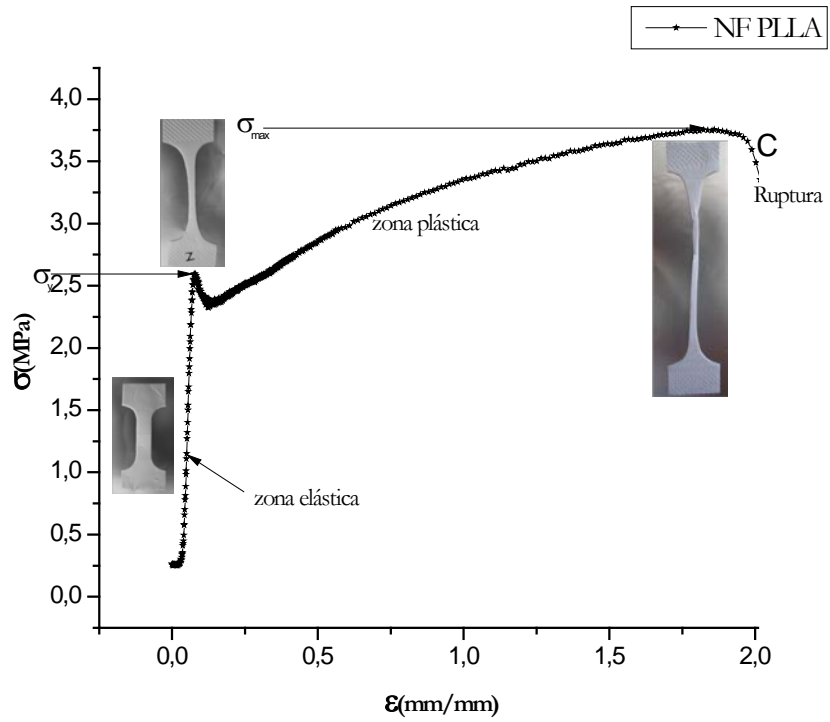
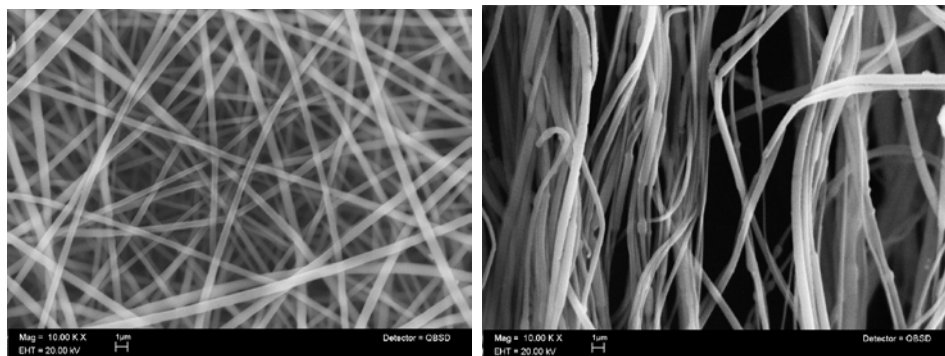


Figura 59. Curva esfuerzo vs deformación de la membrana de nanofibras de PLLA.



a)

b)

Figura 60. Micrografía SEM (1000X) de la membrana de nanofibras de PLLA a) en el punto inicial de la curva, b) en el punto C de la curva de la Figura 55.

El comportamiento descrito anteriormente para la membrana de nanofibras de PLLA, también se observó para las demás muestras.

En la Figura 61 se presentan los resultados de las propiedades mecánicas medidas, a las membranas de nanofibras de PLLA, PLLA-Col y AM-PLLA1-Col; módulo de elasticidad, resistencia a la tensión y porcentaje de deformación. Los datos para las nanofibras de colágeno, son los encontrados por Gary L. Bowlin y colaboradores [78], quien usó el mismo tipo y fuente de colágeno de este trabajo.

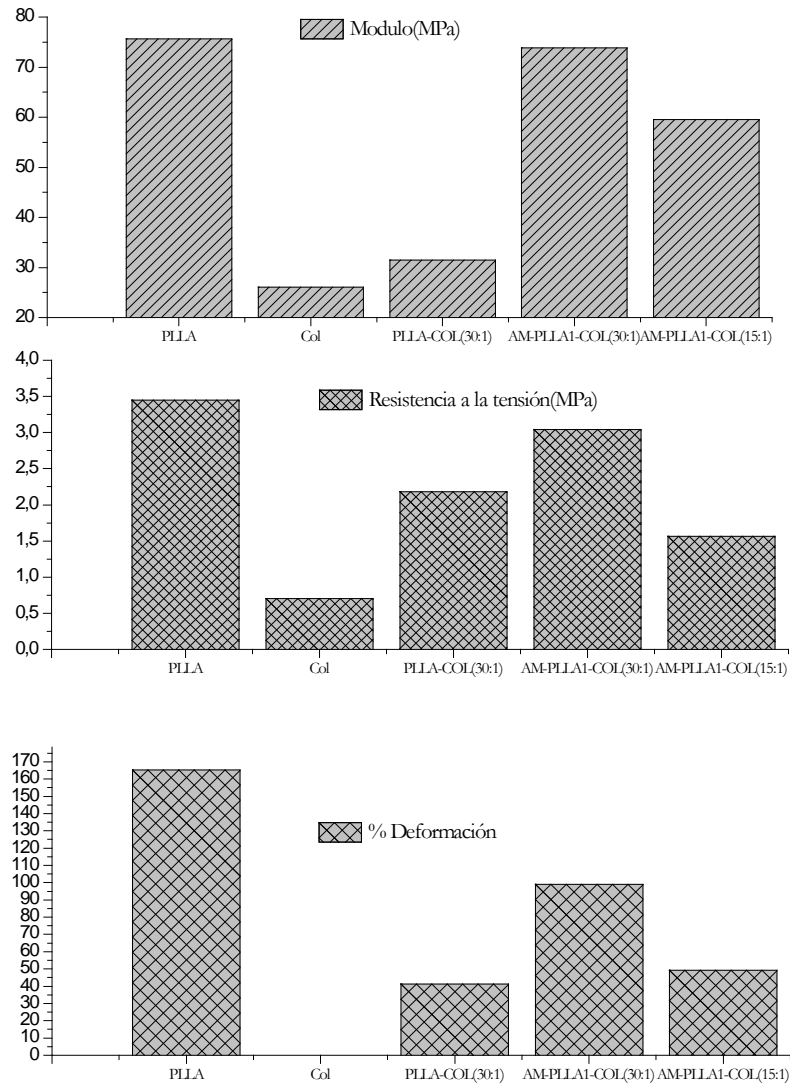


Figura 61. Propiedades mecánicas de las membranas de nanofibras

De acuerdo a los datos mostrados en la Figura 61, se observa que la membrana de las nanofibras de la mezcla física de PLLA-Col (30:1) tiene bajas propiedades mecánicas y que se asemeja al comportamiento de las nanofibras de colágeno, debido a la baja miscibilidad de las fases. La membrana de AM-PLLA1-Col (30:1) muestra mejores propiedades mecánicas, en comparación con la de PLLA-Col (30:1), por lo cual se infiere, de acuerdo a los resultados de ATR-FTIR y XPS, que existe una mejora en el acoplamiento del colágeno con el AM-PLLA1.



Esto brinda a las nanofibras una mayor resistencia y deformación. También se observa que a medida que se aumenta la concentración de colágeno, la resistencia y la deformación disminuyen.

Las propiedades mecánicas medidas a las membranas de nanofibras fabricadas con el sistema de agujas coaxiales se presentan en la Figura 62. De acuerdo a los resultados para el sistema de AM-PLLA1-Col (30:1) (coraza)/PLLA (núcleo), se obtuvieron mejores propiedades mecánicas, comparadas con las membranas de cada componente individual. Para el sistema de AM-PLLA1-Col (30:1) (coraza)/Colágeno (núcleo) no se presentó el mismo comportamiento, ya que el soporte era de colágeno y este tiene pobres propiedades mecánicas.

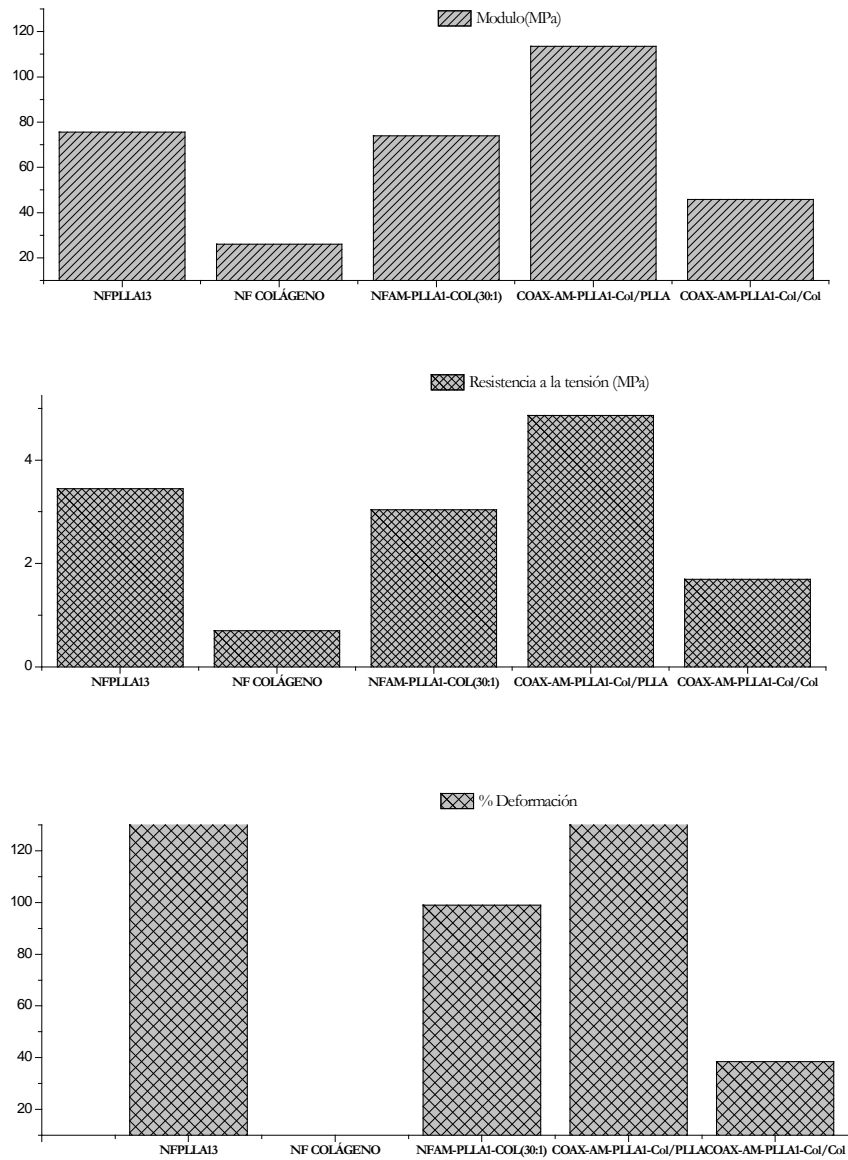


Figura 62. Propiedades mecánicas de las membranas fabricadas con el sistema de agujas coaxiales.

## CAPÍTULO 6 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

- El anhídrido maléico se injertó en la cadena del PLLA mediante una reacción por radicales libres, de acuerdo a los resultados de infrarrojo y resonancia magnética nuclear. El peso molecular del PLLA disminuye al aumentar el injerto de AM a la cadena y con el aumento de la concentración inicial de AM. El análisis termogravimétrico mostró que, a medida que aumenta el injerto de AM, disminuye la estabilidad térmica del PLLA. Los resultados de DSC indican que a mayor porcentaje de injerto de AM a la cadena del PLLA disminuye la temperatura de transición vítrea, debido a que la cadena del PLLA se hace más flexible.
- Se lograron obtener nanofibras de PLLA en solución con TFE, mediante la técnica de electrohilado. La variación en los parámetros del proceso tales como concentración, velocidad de inyección, voltaje y distancia entre la aguja y el colector, influyen sobre el diámetro de las fibras. Se evidenció que al aumentar la concentración de la solución de PLLA, el diámetro de las fibras se incrementa. Por otra parte, a una concentración dada, el aumento en la velocidad de inyección aumenta el diámetro de las fibras y además aumenta la desviación estándar, dando como resultado fibras con diámetros muy variables.
- Las nanofibras de la mezcla física de PLLA y colágeno, mostraron que la mezcla es parcialmente miscible, ya que en la superficie de las nanofibras se observaron precipitados de colágeno.

- Al aumentar el contenido de colágeno, el diámetro de las nanofibras disminuye, y esto favorece el aumento del área superficial de la membrana.
- El porcentaje de área porosa para las nanofibras de AM-PLLA1 fue mayor comparado con el de las nanofibras de la mezcla de PLLA-Col, lo cual favorecerá el crecimiento y adhesión celular.
- El análisis termogravimétrico de las nanofibras de AM-PLLA1-Col mostró que la presencia de AM en la cadena del PLLA, mejora el acoplamiento del colágeno con el PLLA, brindándole una mayor estabilidad térmica comparada con la de la mezcla física de PLLA-Col.
- Los resultados de DSC evidenciaron que, en el proceso de electrohilado, las nanofibras adquieren un alto grado de orientación molecular. Por otra parte, las muestras de AM-PLLA1-Col presentaron temperaturas de fusión mayores comparadas con la del AM-PLLA1, por lo cual existe una interacción fuerte del colágeno con el AM-PLLA1.
- De acuerdo a los resultados de espectroscopía de IR y XPS de las nanofibras de AM-PLLA1-Col, se evidencia un enlace entre el PLLA y el colágeno gracias al injerto de AM.
- Las propiedades mecánicas de las nanofibras de AM-PLLA1-Col fueron mejores en comparación con las nanofibras de la mezcla de PLLA-Col, con la misma proporción de colágeno.
- Se lograron producir nanofibras con estructura núcleo-coraza por medio del sistema de agujas coaxiales.
- Las propiedades mecánicas de las nanofibras de AM-PLLA1-Col (coraza)/PLLA (núcleo) mejoraron con respecto a las de los componentes individuales.

**CAPÍTULO 7  
CONCLUSIÓN**

Los resultados del presente estudio demuestran que el injerto de AM a la cadena del PLLA favorece el acoplamiento de éste con el colágeno y, debido a esto, las propiedades morfológicas, mecánicas y térmicas de las nanofibras de AM-PLLA1-Col son mejores en comparación con las nanofibras de la mezcla física de PLLA-Col, con la misma proporción de colágeno. Por lo tanto se considera que se logró satisfactoriamente el objetivo general planteado en este trabajo.

## CAPÍTULO 8 RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar otro tipo de peróxido para la reacción de injerto de AM a la cadena del PLLA, para comparar el porcentaje de injerto obtenido en este trabajo.
- Se recomienda realizar pruebas de crecimiento celular *in vitro* e *in vivo* para las membranas de AM-PLLA1/Col obtenidas y estudiar el comportamiento de estas en el campo de la ingeniería de tejidos.

## REFERENCIAS

- [1] Laurie Gw, Horikoshi S, Killen Pd, Segui-Real B, Yamada Y. In situ hybridization reveals temporal and spatial changes in cellular expression of mRNA for a laminin receptor, laminin, and basement membrane (type IV) collagen in the developing kidney. *J. Cell Biol.* 109(1989)1351-1362.
- [2] Sane Jr, Engvall E, Butkowski R, Hunter Dd. Molecular heterogeneity of basal laminae: Isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J. Cell Biol.* 111(1990)1685-1699.
- [3] Werb Z, Chin Jr. Extracellular matrix remodeling during morphogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 857 (1998)110-118.
- [4] Boudreau N, Myers C, Bissell MJ: From lamini to lamin. Regulation of tissue-specific gene expression by the ECM. *Trends Cell Biol.* 5(1995)1-4.
- [5] Ingber D. Extracellular matrix and cell shape: Potential control points for inhibition of angiogenesis. *J. Cell. Biochem.* 47(1991)236-241.
- [6] Baker SC, Atkin N, Gunning PA, Granville N, Wilson K, Wilson D, Southgate J. Characterization of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional *in vitro* biological studies. *Biomaterials* 27(2006)3136-3146.
- [7] Yang F, Murugan R, Ramakrishna S, Wang X, Ma YX, Wang S. Fabrication of nanostructured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials* 25(2004)1891-1900.
- [8] Zhang YZ, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Review: Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 16(2005)933-946.
- [9] Zhang YZ, Venugopal, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S: Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts. *Biomacromolecules* 6(2005)2583-2589.
- [10] Lakshmi S. Nair, Cato T. Laurencin. Biodegradable Polymers as Biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 762–798.
- [11] R. Smith. Biodegradable Polymers for Industrial Applications. Woodhead Publishing Limited (2000).

- [12] Larry L. Hench, Julian R. Jones. *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC (2005).
- [13] L.T. Lima, R. Auras, M. Rubino. *Processing Technologies For Poly(Lactic Acid)*. *Progress in Polymer Science* 33 (2008) 820–852.
- [14] Y. Cheng, S. Deng, P. Chen, R. Ruan. *Poly(lactic Acid) (PLA) Synthesis and Modifications: A Review*. *Front. Chem. China*. 4(3) (2009) 259–264.
- [15] Rahul M. Rasala, Amol V. Janorkar, Douglas E. Hirt. *Poly(Lactic Acid) Modifications*. *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 338–356.
- [16] Peter X. Ma. *Biomimetic Materials for Tissue Engineering*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 184–198.
- [17] Heungsoo Shin, Seongbong Jo, Antonios G. Mikos. *Biomimetic Materials for Tissue Engineering*. *Biomaterials* 24 (2003) 4353–4364.
- [18] G. García De Gregorio, E. López-Cabarcos, R.M. Castro. *Study of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Interactions with Collagen*. *European Polymer Journal* 41 (2005) 2416–2421.
- [19] Guoping Chen, Takashi Ushida, Tetsuya Tateishi. *Scaffold Design for Tissue Engineering*. *Macromol. Biosci.* 2002. 2. 67-77.
- [20] Xiaoqiang Yang, Minglong Yuan, Wei Li, Gaoyong Zhang. *Synthesis and Properties of Collagen/Poly(lactic Acid) Blends*. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 94 (2004) 1670-1675.
- [21] V. Charulatha, A. Rajaram. *Influence of Different Crosslinking Treatments on the Physical Properties of Collagen Membranes*. *Biomaterials* 24 (2003) 759–767.
- [22] Wolfgang Friess. *Collagen – Biomaterial for Drug Delivery*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45 (1998) 113–136.
- [23] A. G. A. Coombes, E. Verderio, B. Shaw, X. Lib, M. Griffin, S. Downes. *Biocomposites of Non-Crosslinked Natural and Synthetic Polymers*. *Biomaterials* 23 (2002) 2113–2118.
- [24] Kee Woei Ng, Jevon Louis, Barnabas Saey, Tuan Ho, Hosur N Achuth, Jia Lu, Shabbir Moomhala, Thiam Chye Lim, Dietmar W Huttmacher. *Characterization of a Novel Bioactive Poly[(Lactic Acid)-Co-(Glycolic Acid)] and Collagen Hybrid Matrix for Dermal Regeneration*. *Polym Int* 54 (2005) 1449–1457.
- [25] Wei He, Zuwei Ma, Thomas Yong, Wee Eong Teo, Seeram Ramakrishna. *Fabrication of Collagen-Coated Biodegradable Polymer Nanofibers Mesh and its Potential for Endothelial Cells Growth*. *Biomaterials* 26 (2005) 7606–7615.



- [26] Yuan Lu Cui, Ai Di Qi, Wen Guang Liu, Xiang Hui Wang, Hong Wang, Dong Ming Ma, Kang De Yao. Biomimetic Surface Modification of Poly(L-Lactic Acid) with Chitosan and its effects on articular chondrocytes in Vitro. *Biomaterials* 24 (2003) 3859–3868.
- [27] Tristan I. Croll, Andrea J. O’connor, Geoffrey W. Stevens, Justin J. Cooper-White. Controllable Surface Modification of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) (PLGA) by Hydrolysis or Aminolysis I: Physical Chemical and Theoretical Aspects. *Biomacromolecules* 2004. 5. 463-473.
- [28] J.M. Goddard, J.H. Hotchkiss. Polymer Surface Modification for the attachment of bioactive compounds. *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 698–725.
- [29] Ying Yang, Marie-Christine Porte, Pascal Marmey, Alicia J, El Haj. Joelle Amedee, Charles Baquey. Covalent Bonding of Collagen on Poly(L-Lactic Acid) by Gamma Irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 207 (2003) 165–174.
- [30] Yan Feng Luo, Yuan Liang Wang, Xu Feng Niu, Jun Pan, Liang Ping Shi. Synthesis and Characterization of a Novel Biomaterial: Maleic Anhydride-Modified Poly(DL-Lactic Acid). *Chinese Chemical Letters* Vol. 15. No. 5. Pp 521-524. 2004.
- [31] Jun Pan, Yuan Liang Wang, Suhua Qin, Bingbing Zhang, Yanfeng Luo. Grafting Reaction of Poly(DL)Lactic Acid with Maleic Anhydride and Hexanediamine to Introduce More Reactive Groups in its Bulk. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 74b: 476–480. 2005.
- [32] Xu Feng Niu, Yuan Liang Wang, Yan Feng Luo, Jun Pan, Juan Fang Shang, Li Xia Guo. Synthesis of the Biomimetic Polymer: Aliphatic Diamine and RGDS Modified Poly(DL-Lactic Acid). *Chinese Chemical Letters* Vol. 16. No. 8. Pp 1035-1038. 2005.
- [33] Catherine P. Barnes, Scott A. Sell, Eugene D. Boland, David G. Simpson, Gary L. Bowlin. Nanofiber Technology: Designing the Next Generation of Tissue Engineering Scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 1413–1433.
- [34] L.A. Smith, P.X. Ma. Nano-Fibrous Scaffolds For Tissue Engineering, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 39 (2004) 125–13.
- [35] S. Kidoaki, I.K. Kwon, T. Matsuda. Mesoscopic Spatial Designs of Nano- and Microfiber Meshes For Tissue-Engineering Matrix and Scaffold Based on Newly Devised Multilayering And Mixing Electrospinning Techniques. *Biomaterials* 26 (2005) 37–46.
- [36] K. Shields, et al. Mechanical Properties and Cellular Proliferation of Electrospun Collagen Type II. *Tissue Engineering* 10 (2004) 1510–1517.
- [37] W. M. Saltzman. *Tissue Engineering: Engineering Principles for the Design of Replacement Organs and Tissues*. Oxford University Press (2004) P 7-12.

- [38] B. Palsson, J. A. Hubbell, R. Plonsey, J. D. Bronzino. Principles and Applications in Engineering Series: Tissue Engineering. CRC Press LLC (2003) P 165-173.
- [39] S. Dumitriu. Polymeric Biomaterials. Segunda Edición. Marcel Dekker, Inc. (2001).
- [40] K. Gelse, E. Poschl, T. Aigner, Collagens—Structure, Function and Biosynthesis. Advanced Drug Delivery Reviews 55 (2003) 1531–1546.
- [41] Chi H. Lee, A. Singla, Y. Lee. Biomedical Applications of Collagen. International Journal of Pharmaceutics 221 (2001) 1–22.
- [42] J. M. Pasquet, L. Quek, S. Pasquet, A. Poole, J. R. Matthews, C. Lowell, S. P. Watson. Evidence of a Role for Shp-1 in Platelet Activation by the Collagen Receptor Glycoprotein VI. J. Biol. Chem. 275 (2000) 28526–28531.
- [43] D. L. Ellis, I. V. Yannas. Recent Advances in Tissue Synthesis in vivo by use of Collagen–Glycosaminoglycan Copolymers. Biomaterials 17(1996) 291–299.
- [44] S. Nehrer, H. A. Breinan, A. Ramappa, S. Shortkroff, G. Young, T. Minas, C. B. Sledge, I. V. Yannas, M. Spector. Canine Chondrocytes Seeded in Type I And Type II Collagen Implants Investigated in Vitro. J. Biomed. Mater. Res. 38 (1997) 95–104.
- [45] A.P. Gupta, .V. Kumar. New Emerging Trends in Synthetic Biodegradable Polymers–Polylactide: A Critique. European Polymer Journal 43(2007) 4053-4074.
- [46] Middleton J. C., Tipton A. J. Synthetic Biodegradable Polymers as Orthopedic Devices. Biomaterials 21(2000) 2335–46.
- [47] R. Auras, L. Lim, S. Selke, H. Tsuji. Poly(Lactic Acid) Synthesis, Structures, Properties, Processing and Applications. John Wiley & Sons. Inc. Publication (2010).
- [48] Maurus P. B, Kaeding C. C. Bioabsorbable Implant Material Review. Oper Tech Sport Med 12 (2004)158–60.
- [49] Yabin Zhu. Ph. D, Changyou Gao. Ph. D. Prof, Xingyu Liu, M.S, Tao He, Jiacong Shen. Prof. Immobilization of Biomacromolecules onto Aminolyzed Poly(L-Lactic Acid) Toward Acceleration of Endothelium Regeneration. Tissue Engineering. Volume 10. Number 1/2. 2004.
- [50] Zheng-Ming Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna. A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and their Applications in Nanocomposites. Composites Science and Technology 63 (2003) 2223–2253.

- [51] Y.Z. Zhang, B. Su, J. Venugopal, S. Ramakrishna, C.T. Lim. Biomimetic and bioactive Nanofibrous Scaffolds from Electrospun Composite Nanofibers. *International Journal of Nanomedicine* 2(4) (2007) 623–638.
- [52] R. Vasita, Dhirendra S. Katti. Nanofibers and their Applications in Tissue Engineering. *International Journal of Nanomedicine* 1(1) (2006)15–30.
- [53] K. Jayaraman, et al. Recent Advances in Polymer Nanofibers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 4 (2004) 52–65.
- [54] Z. MA, et al. Potential of nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. *Tissue Engineering* 11 (2005) 101–109.
- [55] S. Agarwal, A. Greiner, Joachin H. Wendorff. Electrospinning of Manmade and Biopolymer Nanofibers—Progress in Techniques, Materials and Applications. *Adv. Funct. Mater.* 19 (2009) 2863–2879.
- [56] J. Gunn, M. Zhang. Polyblend Nanofibers for Biomedical Applications: Perspectives and Challenges. *Trends in Biotechnology* 28 (4) (2010) 189-197.
- [57] Ji-Huan He, Yong Liu, Lu-Feng Mo, Yu-Qin Wan, Lan Xu. *Electrospun Nanofibres and their Applications*. Ismithers (2008).
- [58] Seeram Ramakrishna, Kazutoshi Fujihara, Wee-Eong Teo, Teik-Cheng Lim, Zuwei, Ma. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. World Scientific (2005).
- [59] Daniel J. Pasto, Carl R. Johnson. *Determinación de Estructuras Organicas*. Editorial Reverte. S.A. (1981).
- [60] H. Manfred, M. Herbert, Z. Bernd. *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica*. Segunda Edición. Síntesis Editorial (2000).
- [61] D.A. Skoog, et al. *Principios de Análisis Instrumental*. Mc Graw Hill. Madrid (2002).
- [62] G. Beamson, D. Briggs. *High Resolution XPS of Organic Polymers*. Wiley and Sons Ltd. London (1992).
- [63] T. Hatakeyama, F. X. Quinn. *Thermal Analysis Fundamentals and Applications to Polymer Science*. Segunda Edición. John Wiley & Sons. New Jersey (1999).
- [64] L. Savov. Wettability of Solids by Molten Metals and Alloys. *Metall.* 51(9) (1997) P 475-485.
- [65] Hearle. J. W. S., Sparrow. E. *The Use of the Scanning Electron Microscope*. Pergamon Press. (1972).

- [66] Linda C. Sawyer, David T. Grubb. *Polymer Microscopy*. Chapman and Hall Ltd. London (1987).
- [67] James F. Shackelford. *Ciencia de Materiales para Ingenieros*. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México (1995).
- [68] Lawrence E. Nielsen, Robert F. Landel. *Mechanical Properties of Polymers and Composites*. Marcel Dekker, Inc. New York (1994)
- [69] Donal R. Askeland. *Ciencia e Ingeniería de los Materiales*. International Thomson Editores. México (1998).
- [70] William D. Callister, Jr. *Introducción Ciencia e Ingeniería de los Materiales*. Editorial Reverté S.A. México (1998)
- [71] Kang I., Kwon Bk., Lee J. H., Lee H. B. Immobilization of Proteins on Poly(Methyl Methacrylate) Films. *Biomaterials* 14(1993)787–92.
- [72] Norma ASTM D1708-96. Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics By Use Of Microtensile Specimens.
- [73] Xiao-Tao Li, Jie Sun, Song Chen, Guo-Qiang Chen. In vitro investigation of maleated poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for its biocompatibility to mouse fibroblast L929 and human microvascular endothelial cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 87A(3)(2008).
- [74] Moad. G. The Synthesis of Polyolefin Graft Copolymers by Reactive Extrusion. *Progress in Polymer Science*. 24(1999) 81-142.
- [75] Jacob John, Jian Tang, Zhihong Yang, Mrinal Bhattacharya. Synthesis and Characterization of Anhydride-Functional Polycaprolactone. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 3(6)(1997) 1139-1148.
- [76] R. Mani, M. Bhattacharya, J. Tang. Functionalization of Polyesters with Maleic Anhydride by Reactive Extrusion. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 37(1999) 1693–1702.
- [77] Anthony L. Andradý. *Science and Technology of Polymer Nanofibers*. John Wiley & Sons. New Jersey (2008).
- [78] Jamil A. Matthews, Gary E. Wnek, David G. Simpson, and Gary L. Bowlin, Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules* 3(2002) 232-238.