



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

“OBTENCIÓN DE NANOFIBRAS MODIFICADAS DE POLI(ϵ -CAPROLACTONA) POR ELECTROHILADO PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:
Q. SELENE ALCÁNTARA BARRERA

TUTOR
DR. RICARDO VERA GRAZIANO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

COMITÉ TUTOR
DRA. SANDRA ELIZABETH RODIL POSADA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES
DRA. ATLÁNTIDA MARGARITA RAYA RIVERA
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

MÉXICO, D.F.

ENERO 2014



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 la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Investigaciones en Materiales, por la preparación académica que se me impartió y las facilidades prestadas durante mi estancia en esta institución.

Al Dr. Ricardo Vera por su aporte como tutor durante la realización de este proyecto y por integrarme a su grupo de investigación.

A la Dra Sandra E. Rodil Posada y la Dra. Atlántida M. Raya Rivera por su colaboración como parte de mi comité tutor durante la maestría.

Al Dr. Alfredo Maciel por su apoyo y consejos, los cuales fueron de gran importancia durante este proyecto; así como a los demás miembros del jurado; Dra. María Mónica Castillo Ortega, Dra. María Josefa Bernad Bernad y Dr. Federico H. Barceló Santana, por el tiempo dedicado para la revisión de la tesis y por sus valiosas aportaciones a la misma.

A mis compañeros y a los Doctores que forman parte del grupo de investigación, por sus aportaciones para la realización de mi proyecto de investigación y por brindarme su amistad durante este tiempo.

Al Dr. Omar Novelo Peralta y la Dra. Guillermina González Mancera, por su colaboración en las sesiones de microscopía electrónica de barrido.

Al M en C. Salvador López Morales, por la caracterización de los materiales mediante GPC.

Al Q. Miguel Ángel Canseco Martínez y al Dr. Emilio Bucio Carrillo, por los análisis de FTIR.

Al Ing. Gerardo Cedillo Valverde, por la caracterización de ^1H -RMN.

A la Q.F.B. Damaris Cabrero Palomino, por su apoyo con los análisis térmicos (DSC y TGA).

Al Ing. Ernesto Sánchez Colín, por los ensayos mecánicos en tensión.

Al Dr. Filiberto Rivera Torres y a la Q.F.B. Maricela Bermúdez Hernández, por su colaboración en las pruebas de ángulo de contacto.

Al CONACyT por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Al COMECyT por la beca Tesis de Maestría que se me concedió.

Al Dr. Luis Felipe Del Castillo Dávila y al personal de la Coordinación del PCeIM, a Esther Carrillo e Isabel Gómez, por su apoyo durante mi estancia en el IIM.

DEDICATORIA

A mis padres, por su confianza incondicional y aliento para emprender esta etapa que hoy se ve culminada, porque esto no sería posible sin ustedes.

A mis hermanos, por ser mi más grande apoyo en esta vida, gracias por brindarme siempre su cariño y por los increíbles momentos compartidos, ¡¡son los mejores!!.

A mis amigos, por estar a mi lado durante este tiempo, en los buenos y malos momentos, porque el camino es más fácil cuando tienes a tu lado gente como ustedes.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por brindarme no sólo sus consejos, sino su amistad, fue un gusto compartir con ustedes esta etapa y sentir los logros de cada uno como si fuesen propios.

A las personas que contribuyeron de alguna forma a la realización de este trabajo, gracias por ser parte de este gran logro.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA	iii
ÍNDICE	iv
Lista de abreviaturas.	viii
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xii
RESUMEN	xiii
CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Antecedentes.</i>	1
1.2. <i>Justificación.</i>	2
1.3. <i>Objetivos.</i>	4
CAPÍTULO 2	
FUNDAMENTO TEÓRICO.....	5
2.1. <i>Ingeniería de tejidos.</i>	5
2.2. <i>Andamios para regeneración de tejidos.</i>	6
2.3. <i>Tejido óseo.</i>	9
2.3.1. <i>Anatomía del hueso.</i>	10
2.3.2. <i>Regeneración de tejido óseo.</i>	11
2.4. <i>Biomateriales para regeneración de tejidos.</i>	12
2.5. <i>Técnicas para fabricar andamios.</i>	15
2.5.1. <i>Electrohilado.</i>	15
2.5.2. <i>Moldeo con disolvente (solvent casting).</i>	18

2.5.3.	<i>Lixiviado de partículas (particulate leaching).</i>	18
2.5.4.	<i>Espumado por gas (gas foaming).</i>	19
2.5.5.	<i>Separación de fases.</i>	19
2.5.6.	<i>Impresión en 3 dimensiones (3D printing).</i>	20
2.5.7.	<i>Depósito en fundido (fused deposition).</i>	20
2.6.	<i>Poli(ϵ-caprolactona).</i>	21
2.6.1.	<i>Generalidades.</i>	21
2.6.2.	<i>Propiedades de la poli(ϵ-caprolactona).</i>	22
2.6.3.	<i>Aplicaciones biomédicas.</i>	23
2.7.	<i>Celulosa.</i>	24
2.7.1.	<i>Generalidades.</i>	24
2.7.2.	<i>Propiedades de la celulosa.</i>	25
2.7.3.	<i>Aplicaciones biomédicas.</i>	28
2.8.	<i>Modificación superficial de poli(ϵ-caprolactona).</i>	29
2.8.1.	<i>Tratamiento con Plasma.</i>	29
2.8.2.	<i>Adsorción.</i>	30
2.8.3.	<i>Injerto.</i>	30
CAPÍTULO 3		
MATERIALES Y METODOLOGÍA		32
3.1.	<i>Material y reactivos.</i>	32
3.1.1.	<i>Reactivos para fabricación de andamios modificados.</i>	32

3.2. Metodología.....	33
3.2.1. Preparación de soluciones para electrohilado.	33
3.2.2. Electrohilado de soluciones de PCL.	34
3.2.2.1. Optimización de parámetros de electrohilado de PCL.....	34
3.2.3. Funcionalización de poli(ϵ-caprolactona) con anhídrido maleico.....	35
3.2.4. Cálculo del porcentaje de funcionalización.	36
3.2.5. Modificación superficial de andamios con celulosa.	37
3.2.5.1. Preparación de la solución de celulosa.	37
3.2.5.2. Fabricación de andamios PCL-Cel.	37
3.2.5.3. Fabricación de andamios PCL-AM-Cel.....	37
3.2.6. Técnicas de caracterización de andamios.	38
3.2.6.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	38
3.2.6.2. Cromatografía de Permeación en Gel (GPC).	38
3.2.6.3. Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR).	38
3.2.6.4. Resonancia Magnética Nuclear de Protón ($^1\text{H-RMN}$).	39
3.2.6.5. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	39
3.2.6.6. Análisis Termogravimétrico (TGA).....	39
3.2.6.7. Ensayo mecánico en tensión.....	40
3.2.6.8. Ángulo de contacto.	40
CAPÍTULO 4	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41

4.1.	<i>Optimización de parámetros de electrohilado de PCL.....</i>	<i>41</i>
4.1.1.	<i>Efecto los parámetros de electrohilado en la morfología y diámetro de las fibras.....</i>	<i>41</i>
4.2.	<i>Caracterización de andamios funcionalizados (PCL-AM).....</i>	<i>49</i>
4.2.1.	<i>Efecto de la funcionalización con AM en el peso molecular de PCL.....</i>	<i>49</i>
4.2.2.	<i>Evaluación de la reacción de funcionalización de PCL con AM.....</i>	<i>51</i>
	<i>Análisis por Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR).....</i>	<i>51</i>
	<i>Análisis por Resonancia Magnética Nuclear de Protón (1H-RMN).....</i>	<i>57</i>
	<i>Determinación del porcentaje de AM funcionalizado.....</i>	<i>60</i>
4.2.3.	<i>Optimización de las condiciones de electrohilado del polímero funcionalizado.....</i>	<i>61</i>
4.2.4.	<i>Efecto de la funcionalización de PCL con AM.....</i>	<i>63</i>
4.3.	<i>Modificación superficial de andamios con celulosa.....</i>	<i>69</i>
4.3.1.	<i>Morfología de los Andamios con Celulosa.....</i>	<i>69</i>
4.3.2.	<i>Análisis elemental por EDS.....</i>	<i>70</i>
4.3.3.	<i>Propiedades Mecánicas de los andamios de PCL y PCL-AM.....</i>	<i>72</i>
4.3.4.	<i>Hidrofiliidad de las Fibras (ángulo de contacto).....</i>	<i>74</i>
 CAPÍTULO 5		
	CONCLUSIONES.....	77
	RECOMENDACIONES.....	79
	REFERENCIAS.....	80
	ANEXOS.....	84
	<i>Anexo 1. Técnicas y Métodos de Caracterización.....</i>	<i>84</i>
	<i>Anexo 2. Espectros.....</i>	<i>92</i>

Lista de abreviaturas.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AM: Anhídrido Maleico

ATRP: Atomic Transfer Radical Polymerization (Polimerización por Transferencia de Radicales a Átomos)

BPO: Benzoyl Peroxide (Peróxido de Benzoilo)

BSA: Bovine serum albumin (Albúmina de Suero Bovina)

Cel: Celulosa

CF: Cloroformo

DCM: Diclorometano

DMF: N,N-Dimetilformamida

DSC: Differential Scanning Calorimetry (Calorimetría Diferencial de Barrido)

ECM: Extracellular Matrix (Matriz Extracelular)

FDA: Food and Drug Administration (Agencia de Alimentos y Medicamentos)

FTIR-ATR: Infarrojo por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada.

GPC: Gel Permeation Chromatography (Cromatografía de Permeación en Gel)

H&E: Hematoxilina-Eosina

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución)

IP: Índice de Polidispersidad

MEB: Microscopía Electrónica de Barrido

MeOH: Metanol

Mn: Peso molecular promedio en número

Mw: Peso molecular promedio en masa

NaOH: Hidróxido de sodio

PBS-T: Phosphate Buffered Saline with Tween 20 (Buffer Salino de Fosfato con Tween 20)

PC: Policarbonato

PCL: Poli(ϵ -caprolactona)

PEO: Poly(ethylene oxide) (Poli(óxido de etileno))

PHA: poli(hidroxi alcanoato)

PLA: Poli(ácido láctico)

PP: Polipropileno

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ROP: Ring Opening Polymerization (Polimerización por Apertura de Anillo)

Tg: Temperatura de Transición vítrea

TGA: Thermogravimetric Analysis (Análisis Termogravimétrico)

THF: Tetrahidrofurano

TMS: Tetrametilsilano

UV: Ultravioleta

Lista de figuras.

Figura 1. Células óseas.	10
Figura 2. Anatomía del hueso.	11
Figura 3. Esquema del proceso de electrohilado, donde Q es el flujo, V el voltaje y d la distancia aguja-colector.	15
Figura 4. Etapas en la formación del cono de Taylor.	16
Figura 5. Estructura de la poli(ϵ -caprolactona).	21
Figura 6. Mecanismo de degradación de PCL.	21
Figura 7. Molécula de celulosa.	25
Figura 8. Estructura de la celulosa.	27
Figura 9. Obtención de los diferentes tipos de celulosa.	28
Figura 10. Esquema del sistema donde se efectúa la funcionalización de PCL.	35
Figura 11. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/CF (a) al 10 % p/v y (b) al 12 % p/v; aumento de 2500x.	42
Figura 12. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/CF-MeOH (70:30) al 12 % p/v, con flujos de (a) 0.5 mL/h, (b) 1mL/h y (c) 2 mL/h; aumento de 2500x.	43
Figura 13. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/CF-MeOH (80:20) al 12 % p/v, con voltajes de (a) 15 kV y (b) 20 kV; aumento de 2500x.	44
Figura 14. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/CF-DMF (75:25) al 12 % p/v, con flujos de (a) 0.5 mL/h y (b) 1mL/h; aumento de 2500x.	45
Figura 15. Micrografía de MEB de los andamios de PCL/DCM al 12 % p/v, con flujo de (a) 2 mL/h y (b) 4 mL/h; aumento de 1000x.	45
Figura 16. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/DCM-MeOH (80:20) al 12 % p/v, con flujos de (a) 1 mL/h, (b) 2mL/h y (c) 4 mL/h; aumento de 2500x.	46
Figura 17. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/DCM-MeOH (80:20) al 10 % p/v, con flujos de (a) 0.5mL/h y (b) 1mL/h; aumento de 5000x.	47
Figura 18. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/DCM-DMF (80:20) al 12% p/v, con flujos de (a) 0.5 mL/h y (b) 1mL/h; aumento de 2500x.	47
Figura 19. Micrografías de MEB de los andamios de (a) PCL/CF-DMF (70:30) y (b) PCL/DCM-DMF (80:20); aumento de 5000x.	49
Figura 20. Posible mecanismo de funcionalización de PCL con AM.	50
Figura 21. Espectro FTIR de PCL.	51
Figura 22. Espectros FTIR de PCL, AM y BPO.	52
Figura 23. Espectros FTIR de PCL y PCL injertada con AM (PCL-AM3).	53
Figura 24. Espectros FTIR de PCL y PCL injertada con AM (PCL-AM5 y PCL-AM6).	54

Figura 25. Espectros de FTIR de PCL y PCL funcionalizada con AM (PCL-AM7).....	55
Figura 26. Espectros FTIR de AM y PCL-AM7 (funcionalizada).....	56
Figura 27. Espectro 1H-RMN de PCL.	57
Figura 28. Espectro de 1H-RMN de PCL-AM2 y PCL-AM3.....	58
Figura 29. Espectros de 1H-RMN de PCL-AM6 y PCL-AM7.	59
Figura 30. Espectro de 1H-RMN de PCL-AM6, con las áreas de cada pico.	60
Figura 31. Espectro de 1H-RMN de PCL-AM7, con las áreas de cada pico.	61
Figura 32. Micrografías de MEB de los andamios de PCL con AM. (a) PCL-AM5 y (b) PCL-AM6; aumento de 2500x.....	62
Figura 33. Micrografía de MEB del andamio PCL-AM7; aumento de 2500x.....	62
Figura 34. Comparativo de los termogramas de DSC de PCL y PCL-AM (funcionalizada).....	64
Figura 35. Termograma de TGA de PCL.	65
Figura 36. Termograma de TGA de PCL injertada (PCL-AM7).	66
Figura 37. Termograma de dTGA de PCL-AM7, primera derivada del peso.	67
Figura 38. Comparativo de los termogramas de dTGA.....	68
Figura 39. Andamios de PCL (a) sin celulosa adsorbida y (b) con celulosa adsorbida, aumento de 1000x.	69
Figura 40. Andamio de PCL con celulosa asperjada, aumento de 1000x.....	70
Figura 41. EDS de andamio de PCL con celulosa asperjada.	71
Figura 42. EDS de andamio de PCL con celulosa asperjada, después del lavado con vapores de HCl.....	72
Figura 43. Diagrama de esfuerzo vs deformación.....	73
Figura 44. Medición de ángulo de contacto vs tiempo para PCL y PCL-AM (funcionalizada).	75
Figura 45. Ángulo de contacto para PCL y PCL-AM sin celulosa y con celulosa.	76

Lista de tablas.

Tabla 1. Peso molecular y propiedades de PCL.....	22
Tabla 2. Propiedades de PCL comercial.....	23
Tabla 3. Fuentes de celulosa y cristalinidad.....	26
Tabla 4. Soluciones para electrohilado.....	33
Tabla 5. Parámetros propuestos para electrohilado de PCL.....	34
Tabla 6. Reacciones de funcionalización de PCL-AM.....	36
Tabla 7. Constante dieléctrica de los disolventes y sistemas de disolventes.....	42
Tabla 8. Resultados obtenidos con cloroformo como disolvente.	48
Tabla 9. Resultados obtenidos con diclorometano como disolvente.....	48
Tabla 10. Parámetros óptimos de electrohilado de PCL.....	49
Tabla 11. Resultados de GPC.	49
Tabla 12. Bandas características de PCL y PCL-AM obtenidas por FT-IR.	56
Tabla 13. Desplazamientos característicos de PCL y PCL-AM.	59
Tabla 14. Resultados de DSC para PCL y PCL-AM.....	64
Tabla 15. Resultados de TGA para PCL y PCL-AM.	68

RESUMEN

En años recientes ha cobrado auge la ingeniería de tejidos, que es un área interdisciplinaria, donde una parte importante es la obtención de andamios poliméricos para diversas aplicaciones biomédicas. Para ello, se requiere que las estructuras en cuestión simulen el ambiente natural en el cual se da el crecimiento celular, de tal forma que las estructuras brinden soporte al tejido en crecimiento y, favorezcan la adhesión y crecimiento celular.

El polímero elegido para este proyecto es la poli(ϵ -caprolactona) (PCL), debido a que es un material versátil, con un tiempo de biodegradación de 2 a 4 años, lo que lo hace apropiado para crecimiento de tejido óseo; la principal desventaja de este material radica en su alto carácter hidrofóbico, lo cual inhibe la proliferación celular sobre él. El objetivo de este trabajo fue la modificación superficial de andamios de PCL mediante funcionalización del polímero y adición de celulosa, a fin de obtener cierto grado de hidrofiliidad.

En esta investigación se optimizaron los parámetros de electrohilado de PCL, a fin de obtener andamios homogéneos y con fibras de diámetros pequeños; además, se funcionalizó la PCL con anhídrido maleico (AM), para finalmente asperjar una solución de celulosa sobre los andamios de PCL pura y funcionalizada, a fin de comparar las características de éstos. La presencia de AM unido al polímero se demostró mediante análisis térmicos (DSC y TGA) y espectroscópicos (FTIR y RMN), con estos últimos se detectó el AM y se cuantificó el porcentaje de injerto; además, la microscopía electrónica de barrido (MEB) sirvió de guía durante todo el proceso.

Los resultados mostraron que al funcionalizar la PCL con AM se redujo el peso molecular del polímero, de manera proporcional a la cantidad de anhídrido adicionado; además, en los termogramas hubo un ligero incremento en las temperaturas de las transiciones, lo que indica un cambio estructural y mayor rigidez en el material. Por otro lado, en el caso de PCL-AM (funcionalizada), disminuyó la resistencia a la tensión y elongación y se duplicó el valor del módulo de Young; en cuanto al carácter hidrofóbico del material, después de la reacción el ángulo de contacto de PCL disminuyó de forma importante, y con la adición de celulosa a los andamios de PCL y PCL-AM, se logró un mojado completo del andamio, lo que es indicativo de la alta hidrofiliidad de su superficie y, lo hace adecuado para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

Del trabajo realizado se concluye que el mejor sistema de disolventes para electrohilado de la PCL es diclorometano/DMF (80:20) y los parámetros óptimos son: concentración de 12 % p/v, flujo de inyección de 0.5 mL/h, voltaje de 8 kV y distancia aguja-colector de 25 cm. Además, el mayor grado de funcionalización de la PCL con AM se logró usando 10 % de anhídrido respecto a PCL y 5 % del iniciador (BPO) respecto a AM; con esta modificación disminuye el ángulo de contacto del polímero en un 35 % y, se propicia la adsorción de celulosa en su superficie, con lo cual se logra un andamio altamente hidrofílico, con lo cual se puede favorecer la adhesión y la proliferación celular.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes.

La fabricación y uso de andamios porosos basados en nanofibras han cobrado interés recientemente para aplicaciones biomédicas, especialmente para ingeniería de tejidos, cuyo objetivo es crear estructuras biodegradables y biocompatibles con propiedades mecánicas y biológicas similares a la matriz extracelular (ECM), además de facilitar los implantes quirúrgicos y promover la regeneración tisular. Para ello, se han examinado polímeros naturales y sintéticos que incluyen colágeno, quitosano, ácido hialurónico y poliésteres biodegradables como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y policaprolactona, entre otros. [1]

La poli(ϵ -caprolactona) (PCL) es un polímero semicristalino, biodegradable que se ha empleado desde hace varias décadas para ingeniería de tejidos, se trata de un material con buenas propiedades mecánicas, fácil de procesar, compatible tanto con tejidos duros como blandos y aceptado por la FDA. La PCL es útil en la producción de fibras electrohiladas que simulan la matriz extracelular. Sin embargo, su hidrofobicidad limita la adhesión y proliferación celular.

Con la finalidad de modificar sus propiedades superficiales, frecuentemente se preparan mezclas de PCL con polímeros hidrofílicos que facilitan la adhesión de células, pero se han desarrollado varios métodos para modificar la superficie de los andamios y promover su biocompatibilidad. Entre ellos está la modificación de los polímeros sintéticos con materiales naturales, la cual es una forma eficiente para preparar andamios híbridos que combinan las ventajas de ambos componentes. [1], [2]

Por otra parte, puede obtenerse un incremento en las propiedades mecánicas y térmicas de los andamios basados en la PCL, mediante reforzamiento con fibras o partículas, por lo que recientemente, los esfuerzos por incrementar las propiedades mecánicas de las redes de nanofibras de PCL han llevado al uso de nanotubos de carbono y materiales biológicos a fin de

reforzar al polímero. J. O. Zoppe et al. [1] mostraron que la incorporación de nanocristales de celulosa en las fibras poliméricas presenta ventajas sobre otro tipo de materiales, como los nanotubos de carbono, debido a que la celulosa se puede obtener de las plantas, que son una fuente biológica abundante; además, es barata, fácil de producir y, lo más importante, biocompatible y biodegradable. [1], [2]

Investigaciones recientes de N. Lin et al. incluyen el uso de nanocristales de celulosa funcionalizados con policaprolactona, los cuales se adicionaron a poli(ácido láctico) (PLA) para mejorar sus propiedades mecánicas. La PCL injertada presenta buena miscibilidad cuando se adiciona al PLA y con ello se mejora la asociación entre las nanopartículas del relleno y la matriz polimérica. [3]

A pesar de las ventajas de usar fibras de celulosa para reforzar los biocompositos, hay algunas desventajas; la más importante es la pobre compatibilidad entre la celulosa hidrofílica y la matriz polimérica hidrofóbica. Para mejorar la compatibilidad entre las dos fases, la celulosa puede modificarse física o químicamente. Un método efectivo empleado por H. Lönnberg et al. para alterar la celulosa es hacer crecer polímeros o ligantes sobre su superficie, mediante la técnica de “injerto desde” (en inglés grafting-from). Mediante esta técnica los polímeros pueden injertarse exitosamente en celulosa y derivados de ella, a través de una amplia variedad de técnicas de polimerización. [4]

1.2. Justificación.

Los andamios de PCL tienen una velocidad de degradación de 3 a 4 años, lo que los hace adecuados para aplicaciones biomédicas que requieran un tiempo prolongado para la regeneración de tejidos; sin embargo, la hidrofobicidad de la PCL limita el crecimiento celular en su superficie, por lo que la modificación superficial de las nanofibras representa una buena alternativa para mejorar la adhesión y proliferación celular. [5]

Por su parte, la celulosa ha demostrado ser una molécula adecuada para el crecimiento celular, capaz de favorecer la proliferación en los andamios y brindar mayor soporte sin efectos adversos; los biomateriales basados en celulosa y sus derivados se han empleado para hacer membranas de hemodiálisis, de difusión controlada y para inmovilización de enzimas y

biosensores, como materiales para recubrir fármacos y andamios para su liberación controlada. Recientemente se han reportado estudios sobre la aplicación de celulosa para cultivos celulares e implantes, aplicables en regeneración de hueso y cultivo de hepatocitos para generar un hígado artificial. [6]

Los métodos desarrollados para modificar la superficie de los andamios pueden ser físicos o químicos y consisten, principalmente, en alterar las moléculas que se encuentran en la superficie de las nanofibras o recubrirlas con cierto material, con la finalidad de promover la biocompatibilidad; entre ellos están las mezclas de polímeros sintéticos y naturales, las cuales disminuyen las propiedades mecánicas del material compuesto, debido a que se tiene una pobre adhesión entre los componentes, es decir, entre el polímero hidrofóbico y un biopolímero hidrofílico. Afortunadamente, la afinidad entre ellos puede mejorarse mediante la adición de un compatibilizante para favorecer la interacción entre los dos materiales y mejorar las propiedades mecánicas del compuesto. [2], [3], [7]

Con base en estas ideas, se realizó el presente estudio, el cual consiste en obtener por electrohilado andamios de PCL y PCL funcionalizada con anhídrido maleico y, realizar una modificación superficial de las nanofibras mediante adsorción de celulosa en el andamio, a fin de evaluar las propiedades de ambos tipos de materiales. Con la adición de celulosa se espera disminuir la hidrofobicidad de la PCL, favorecer la adhesión celular y mantener la biocompatibilidad del polímero.

La hipótesis de trabajo es que la funcionalización de la PCL y la posterior adición de un biopolímero como la celulosa generará un producto con buenas propiedades mecánicas, adecuado para regeneración de tejidos duros, los cuales requieren un tiempo prolongado para regenerarse.

1.3. Objetivos.

1.3.1. General.

Obtener andamios de nanofibras de poli(ϵ -caprolactona) modificadas con celulosa, para mejorar su hidrofiliidad y favorecer sus aplicaciones en ingeniería de tejidos.

1.3.2. Específicos.

- Optimizar los parámetros de electrohilado para la obtención de nanofibras de poli(ϵ -caprolactona).
- Modificar superficialmente las nanofibras de PCL con celulosa por los métodos de adsorción física y/o funcionalización.
- Evaluar la adsorción y funcionalización de las nanofibras de PCL con celulosa y analizar su distribución en el andamio.
- Caracterizar las nanofibras sintetizadas mediante métodos espectroscópicos (FTIR y RMN), microscópicos (MEB), térmicos (DSC y TGA), cromatográficos (GPC) y mecánicos (ensayo de tensión).
- Relacionar las propiedades físicas de los andamios con la adhesión celular.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos se define como un campo de investigación interdisciplinario que involucra a la ingeniería y ciencias de la vida, cuya finalidad es el desarrollo de sustitutos biológicos que permitan restaurar, mantener o mejorar las funciones del tejido. [8]

La ingeniería de tejidos clásica consiste en aislar células específicas mediante una biopsia del paciente, hacerlas crecer *in-vitro* en un andamio biomimético bajo condiciones controladas de cultivo, implantarlo en el tejido del paciente que se quiere regenerar y dirigir el crecimiento de nuevo tejido en el andamio, el cual se debe degradar al mismo ritmo con que se regenera el tejido. Las técnicas actuales se basan en el uso de andamios porosos macroestructurados que actúan como soporte para la adhesión celular y formación de tejidos tanto *in vivo* como *in vitro*. [9]

Los tejidos constan de una matriz, denominada matriz extracelular, y uno o más tipos de células, la matriz constituye un andamio tridimensional que provee a las células de un ambiente y arquitectura específicos para el tipo de tejido, además de actuar como un reservorio de agua, nutrientes y factores de crecimiento; es por ello que para la regeneración tisular se requiere un andamio que actúe como matriz extracelular temporal para la adhesión y proliferación celular y permita el crecimiento, hasta que el nuevo tejido esté totalmente regenerado. [8]

2.2. Andamios para regeneración de tejidos.

Un andamio celular (*scaffold* en inglés) es una estructura que da soporte a las células y crea un microambiente que permite el crecimiento y la regeneración del tejido en cuestión. Cuando se trabaja con tejidos que van a estar sometidos a tensión o esfuerzos, como arterias y válvulas cardíacas, el andamio además de dar soporte, debe resistir la tensión *in vivo* y la carga. [10]

Un andamio para ingeniería de tejidos tiene como funciones primordiales: definir un espacio que formará el tejido regenerado, realizar temporalmente la función del tejido que se está regenerando y facilitar su crecimiento. Esto es, servir como un sustrato para adherir y posiblemente transportar células, proteínas y otros biofactores, como el ADN. Debido a estas funciones, se deben considerar ciertas características cuando se diseña un andamio, en primera instancia, debe tener una estructura tridimensional con una arquitectura definida, forma y volumen; además de que el material debe ser fácilmente procesable en una variedad de formas y tamaños, que incluyen andamios específicos para un paciente.

Para realizar las funciones del tejido que se está regenerando, el andamio debe tener propiedades mecánicas semejantes a las de la matriz extracelular natural, a fin de ser capaz de cumplir con la función de soporte. Para algunas aplicaciones el andamio además debe ser biodegradable y bioresorbible, con una velocidad de biodegradación adecuada para el crecimiento de la célula o tejido *in vitro* y/o *in vivo*. Los biomateriales con una biodegradación controlable son de gran interés en aplicaciones para ingeniería de tejidos.

Finalmente, el andamio debe permitir una bioquímica superficial adecuada para la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Además, los productos de degradación de la superficie y del cuerpo del material deben ser biocompatibles y ocasionar mínimas respuestas inflamatorias o inmunes. Se debe considerar también la disponibilidad de los grupos funcionales para acoplar covalentemente o incluir biofactores en los andamios. [11]

La porosidad del andamio genera una estructura interconectada, que permite el transporte de nutrientes y desechos metabólicos. El tamaño de poro debe permitir la migración de células a través del andamio sin bloquear el flujo.

El diseño de un nuevo andamio adecuado para una aplicación en específico, debe considerar una alta relación área superficial interna/volumen a fin de organizar la gran cantidad de células requeridas para reemplazar o restaurar la función del tejido u órgano. Para ello, se debe tener cierto tamaño de poro y área superficial interna, sin perder resistencia mecánica. También está claro que un buen andamio debe mantener un equilibrio entre la función mecánica y la liberación de biofactores. [11]

En cuanto a su estructura, los andamios pueden ser inyectables o prefabricados. Los inyectables, cuyo ejemplo más representativo son los hidrogeles, pueden ser introducidos en forma líquida en la lesión y llevan a cabo el proceso de entrecruzamiento (*cross-linking*) *in situ*. Por lo tanto, la forma del defecto no es una limitante para este tipo de estructuras; si bien es cierto que su implantación es poco invasiva, también puede resultar citotóxica, ya que en muchos casos es necesaria la presencia de iniciadores o la aplicación de luz ultravioleta para llevar a cabo el entrecruzamiento y, debido a que es un proceso exotérmico, puede dañarse el tejido circundante. Otra limitante de los andamios inyectables es que sus propiedades mecánicas son inferiores a las de los prefabricados, y por ello sólo se aplican a ciertas estructuras maxilofaciales o en zonas que soportan poca carga.

Los andamios prefabricados son aquellos que se construyen antes de ser implantados en la zona dañada, estas estructuras poseen diversas ventajas sobre las inyectables, ya que tienen mejores propiedades mecánicas y presentan macroporosidad, lo cual permite un buen nivel de conducción y control de la morfología estructural. Este tipo de andamios se presta para aplicaciones en la regeneración de hueso en zonas de alta demanda mecánica, sus arquitecturas y morfologías son muy variadas, pero las más utilizadas son las esponjas porosas, que se fabrican por medio de diferentes técnicas. Las principales desventajas de los andamios prefabricados son que se implantan a través de procesos invasivos dolorosos y la dificultad para aplicarse en lesiones con formas irregulares. [12]

Lo más común para ingeniería de tejidos es el uso de un andamio poroso bioreabsorbible, el cual sirve como un soporte tridimensional para dirigir la adhesión celular y formación de tejido *in vivo* e *in vitro*. La “bioreabsorbibilidad” del andamio es casi siempre necesaria, debido a que éste debe ser reemplazado gradualmente por células y matriz extracelular producida por éstas,

de tal forma que, eventualmente, se generen tejidos funcionales; de esta manera, el andamio más adecuado debe tener las siguientes características:

- *Porosidad apropiada*: el tamaño de poro y la estructura porosa asegura la nutrición de las células, así como su adhesión y crecimiento en el andamio, al mismo tiempo que provee el ambiente para la regeneración de tejido, vascularización y eliminación de productos de desecho. Se ha sugerido tamaños de poro de 200 a 400 nm para tejido óseo.
- *Fuerza mecánica suficiente*: permite mantener la integridad estructural durante el cultivo, lo cual es de particular importancia en tejidos que van a soportar carga, como el hueso. El material debe ser suficientemente fuerte para aguantar las tensiones fisiológicas y transferir cargas después de ser implantado.
- *Adecuada degradación*: la velocidad de degradación del andamio le permite brindar soporte durante la proliferación celular, pero deja un espacio para el crecimiento de nuevo tejido al degradarse. El andamio ideal debe generar productos de degradación que no sean tóxicos y sean fáciles de excretar por rutas metabólicas, además de que no generen respuestas inmunológicas o químicas, detectables por inflamación en alguna parte del cuerpo.
- *Biocompatible*: el material empleado para elaborar el andamio no debe generar respuesta inflamatoria o inmune una vez que es implantado, sino que debe integrarse con el tejido huésped, facilitar la infiltración vascular, adhesión y formación de células.
- *Proceso apropiado de manufactura*: la técnica debe permitir la obtención de andamios con la forma y tamaño deseados, fáciles de manipular y que estén disponibles para su uso en cirugía a corto tiempo. El proceso de manufactura no debe afectar la compatibilidad del material al incluir químicos residuales del proceso y el método de esterilización no debe causar pérdida significativa de las propiedades mecánicas del polímero o cambios en su biocompatibilidad y degradación. [13]

2.3. Tejido óseo.

El tejido óseo se presenta en el cuerpo de un adulto en 2 formas: trabecular o hueso esponjoso (20 % del esqueleto) y cortical o hueso compacto (80 % restante del esqueleto). El hueso cortical tiene solamente el 10 % de porosidad y constituye a los huesos largos, cortos y planos (cráneo), mientras que el trabecular presenta del 50 % al 90 % de porosidad y se encuentra en algunos huesos largos y vértebras. [8]

El hueso está formado por:

- a) Matriz orgánica. Se conoce también como sustancia osteoide y está compuesta por 95 % de fibras de colágena tipo I y 5 % de proteínas no colágenas, como proteoglicanos y fosfolípidos.
- b) Matriz inorgánica: Se compone de 85 % de cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, los cuales contienen impurezas que promueven el intercambio iónico; además contiene 10 % de carbonato de calcio y 5 % de otros compuestos cálcicos.
- c) Células: son de 3 tipos (figura 1).
 - Osteoclastos: células grandes multinucleadas cuya función es la osteólisis, es decir, que degradan, reabsorben y remodelan los huesos; una vez hecho esto se vuelven mononucleadas.
 - Osteoblastos: células mononucleadas que se encargan de formar la sustancia osteoide, además segregan fosfatasa alcalina, enzima de gran importancia en la calcificación del tejido osteoide. Conforme se acumula la sustancia osteoide, quedan atrapados en ella y se convierten en osteocitos, los que quedan en la superficie se denominan osteoblastos inactivos u osteocitos de superficie.
 - Osteocitos: son osteoblastos que quedan atrapados en la matriz osteoide, se comunican entre sí a través de prolongaciones de la membrana, canales de Volkmann y de Havers. [14]

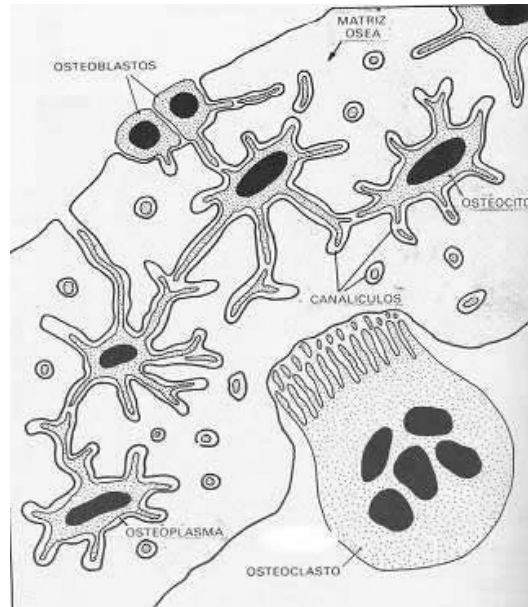


Figura 1. Células óseas.

2.3.1. Anatomía del hueso.

Un hueso compacto está constituido por osteonas, que son unidades básicas formadas por laminillas óseas dispuestas unas dentro de otras como si fueran tubos enchufados entre sí, en su interior hay un canal central denominado “canal de Havers”, a través del cual pasan los vasos y nervios. Las osteonas se comunican entre sí a través de conductos transversales denominados “canales de Volkmann”, periféricamente a las osteonas se disponen unas láminas circunferenciales y por fuera de ellas se sitúa el periostio, mientras que en la médula del hueso encontramos el endostio, que es una membrana muy fina.

Por su parte el hueso esponjoso está constituido por trabéculas, formadas por laminillas y muy pocas osteonas. Las trabéculas se orientan en el espacio de acuerdo con las líneas de fuerza y el área que queda entre ellas está ocupada por la médula ósea (figura 2). [15], [16]

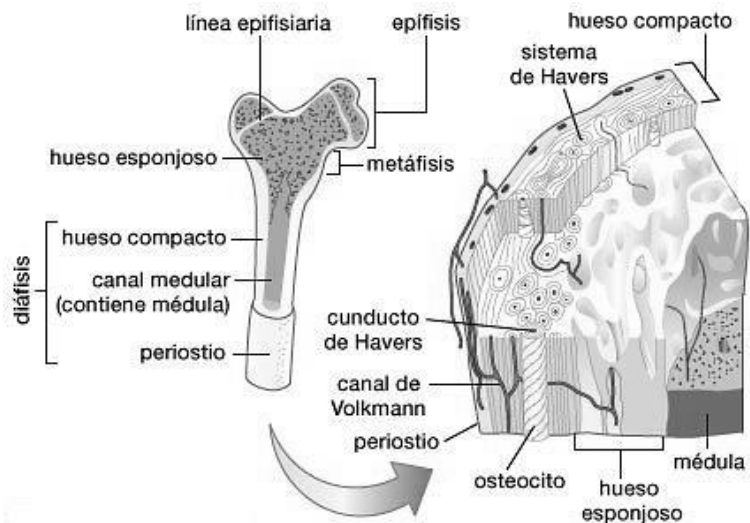


Figura 2. Anatomía del hueso.

2.3.2. Regeneración de tejido óseo.

Una vez formado el hueso se renueva constantemente a lo largo de la vida, lo que le permite acondicionar el esqueleto para soportar cargas y regenerar su estructura. El remodelamiento inicia con la aparición de osteoclastos, los cuales reabsorben hueso y crean una cavidad que es rellenada por osteoblastos con hueso nuevo. El proceso tiene una duración de 200 días, de los cuales 50 son de actividad osteoblástica y 150 osteoclástica, esto ocasiona la alteración constante de la arquitectura ósea y con el tiempo se incrementan el diámetro interno y externo del hueso y la masa trabecular disminuye lentamente. [15]

El tratamiento más común para reparación de tejido óseo se basa en el injerto de hueso, para lo cual se toma éste de alguna parte sana del paciente, o de otra persona, y se coloca donde se desea el remplazo, con el fin de proveer células osteogénicas que contribuyan a la regeneración del tejido. Una alternativa a este procedimiento es el uso de metales y cerámicos, los cuales presentan múltiples desventajas debido a la rigidez que presentan, lo que los hace difíciles de colocar en zonas donde se presenta alta torsión, flexión o esfuerzo, por lo cual se prefiere el uso de polímeros. [8]

Otro tratamiento actual consiste en emplear corales y esponjas marinas como andamios para la regeneración de tejido óseo, éstos materiales son adecuados debido a que se integran fácilmente a la estructura del hueso y su porosidad favorece el crecimiento celular. Para ello la primera etapa consiste en fabricar el andamio de coral o esponja de acuerdo a la cavidad a regenerar, a éste se le adicionan células de médula o células madre mesenquimales, un tiempo después de que éste se coloca en el paciente las células se transforman en óseas. [17]

2.4. Biomateriales para regeneración de tejidos.

El material de los andamios para ingeniería de tejidos debe elegirse de tal forma que tenga una velocidad de degradación y reabsorción que permita conservar su resistencia, hasta que el trasplante esté completamente acoplado y el tejido asuma su función estructural. Una vez que se ha elegido el material más apropiado para cierto tipo de tejido, se determina el proceso que permitirá lograr dichas propiedades. [8], [9]

Los biomateriales se han definido como sustancias que no son alimentos o fármacos y están contenidas en sistemas terapéuticos o diagnósticos. Los implantes utilizados en aplicaciones médicas hacen uso de cerámicos, metales y polímeros para su fabricación.

La biocompatibilidad se define como la capacidad de un material para generar en un huésped una respuesta apropiada para cierta aplicación. En general, se han diseñado dos estrategias para mejorar la biocompatibilidad de un implante. La primera consiste en aplicar una capa biocompatible sobre el implante y la segunda es emplear un material biocompatible para su fabricación. [11]

La regeneración de tejido óseo ha empleado diversos materiales para la construcción de andamios, tal es el caso de metales, cerámicos y polímeros tanto naturales como sintéticos. Sin embargo, la mayoría de los metales y cerámicos son no- biodegradables, por lo que se prefiere usar algunos cerámicos y polímeros biodegradables. [8]

Los requisitos para un andamio orientado a aplicaciones óseas no se limitan a su interacción con las células, el material del andamio debe ser biodegradable para permitir la formación de tejido óseo y que al final del proceso no haya un implante, sino hueso nuevo. Además de esto,

el andamio debe ser biocompatible y tener poros interconectados que faciliten la proliferación celular.

2.4.1. Metales.

Los materiales metálicos y sus aleaciones presentan propiedades mecánicas que los hacen adecuados para aplicaciones estructurales como prótesis articulares, placas de osteosíntesis, tornillos de fijación e implantes dentales; sin embargo, en ocasiones son rechazados por el organismo, debido a que presentan citotoxicidad por la liberación de iones metálicos. Las aleaciones metálicas son las más empleadas, ya que no se oxidan, lo cual mejora su aceptación por el organismo.

Los tejidos permiten la presencia de metales por periodos cortos, ya que después se inicia la corrosión y liberan sustancias incompatibles con ellos, por lo que se debe tener precaución con el uso de este tipo de materiales.

2.4.2. Cerámicos.

Los cerámicos han sido ampliamente usados para la regeneración y/o sustitución de hueso. Lo más interesante de estos materiales son sus propiedades osteoconductoras y osteoinductivas, las cuales permiten obtener buenos resultados en la regeneración de tejido óseo. Sin embargo, su principal desventaja es la fragilidad y baja estabilidad mecánica, lo cual dificulta su uso para huesos largos; además, en condiciones *in vivo* hay una variabilidad en la forma en la cual se degradan, por lo que las propiedades mecánicas se pierden rápidamente y posiblemente liberan grandes cantidades de calcio, lo cual puede ser letal para las células. [8]

2.4.3. Polímeros.

Los polímeros que se emplean para la fabricación de andamios son biodegradables y se dividen en naturales y sintéticos: los naturales pueden obtenerse de fuentes animales o vegetales, como el colágeno, el fibrinógeno, el quitosano, el almidón, el ácido hialurónico y el poli(hidroxibutirato). Estos polímeros son altamente biocompatibles y presentan muy baja

respuesta inmune, además de que algunos de ellos tienen gran disponibilidad debido a la fuente de la cual provienen. Una de las ventajas de estos compuestos es que simulan los ambientes celulares nativos, especialmente cuando están presentes de forma natural en la matriz extracelular y son fácilmente degradables por un mecanismo enzimático o hidrolítico. [11]

Los polímeros sintéticos se han usado ampliamente en ingeniería de tejidos, sin embargo, su versatilidad y capacidad de procesamiento dependen en gran medida de la estructura y naturaleza del material, los más usados son los poli(α -hidroxiácidos), poli(ϵ -caprolactona), poli(propilén fumaratos), policarbonatos, polifosfacenos y polianhídridos. Este tipo de polímeros pueden hacerse a la medida, con las propiedades requeridas para una aplicación específica, las cuales pueden correlacionarse con la composición, método de fabricación y modificaciones debidas a reacciones de post-polimerización. [8], [11]

2.4.4. Materiales compuestos.

Los materiales compuestos empleados para reemplazo de hueso están constituidos usualmente por una fase inorgánica (relleno) y otra polimérica; las fases son insolubles entre sí. Los polímeros tienen típicamente más bajo módulo y resistencia a la deformación que la fase inorgánica, por lo que se pretende ajustar las propiedades mecánicas de los materiales poliméricos para hacerlas semejantes a las del hueso, mediante una estructura compuesta. De hecho, en la matriz se efectúa una complicada interacción entre las propiedades de ésta, los componentes inorgánicos y la región entre las dos fases.

Los materiales compuestos asemejan mejor la estructura del hueso y pueden ajustarse más fácilmente a los requerimientos del tejido óseo que los cerámicos o metales. Los materiales biocompuestos producidos mediante la combinación de fibras naturales y polímeros sintéticos o biodegradables han cobrado gran demanda en los últimos años, las ventajas de las fibras naturales son su bajo costo, baja densidad, sustentabilidad, capacidad de reciclaje y propiedades mecánicas competitivas. Entre los poliésteres biodegradables se distinguen la PCL, el PLA y el PHA; éstos se han usado como matriz de materiales compuestos que contienen celulosa, con la desventaja de que presentan bajo grado de adhesión fibra-matriz debido a la

diferencia en las propiedades superficiales de sus componentes ocasionada por la hidrofiliidad de la celulosa, que contiene gran cantidad de grupos hidroxilo, la cual contrasta con la hidrofobicidad del polímero. [18], [19]

2.5. Técnicas para fabricar andamios.

2.5.1. Electrohilado.

Es una técnica que permite la obtención de nanofibras y se emplea principalmente para crear andamios útiles para ingeniería de tejidos. El proceso consiste en la aplicación de un alto voltaje a una solución polimérica contenida en una jeringa, el cual genera un campo electrostático entre la aguja de la jeringa y un colector metálico aterrizado (ver figura 3). Como resultado del campo la gota de solución que queda en la punta de la jeringa se alarga y forma fibras delgadas, que se depositan sobre el colector. Las fibras que se colectan en la placa forman una malla con orientación aleatoria y propiedades mecánicas específicas, adecuada para el crecimiento celular; esta técnica permite crear andamios de diversos tipos de polímeros. [9]

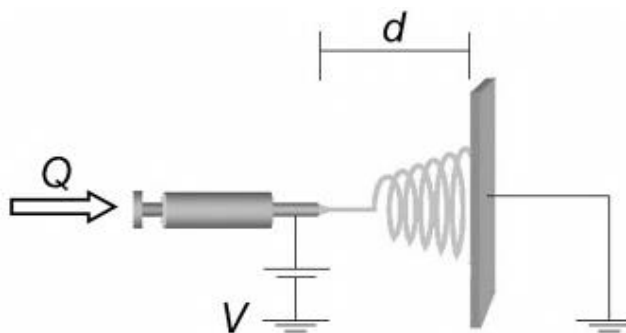


Figura 3. Esquema del proceso de electrohilado, donde Q es el flujo, V el voltaje y d la distancia aguja-colector.

Durante el proceso de electrohilado, la gota de la solución polimérica que se tiene al final del capilar forma una especie de cono cuando se somete al campo eléctrico, debido a que la tensión superficial de la solución es superada por las fuerzas electrostáticas presentes. A este fenómeno se le denomina *cono de Taylor* en honor a su descubridor, quien encontró que el chorro que forma las fibras surge del vértice del cono y, debido a ello, con el proceso de

electrohilado se pueden generar fibras con diámetros mucho más pequeños que el del capilar del cual provienen. El proceso de formación del cono de Taylor se muestra en la figura 4, donde en una primera etapa (A) se forma la gota en la punta de la aguja, a continuación, la solución polimérica sale de la aguja, pero se mantiene el equilibrio entre la tensión superficial y las cargas electrostáticas (B) y, finalmente, el campo eléctrico aplicado supera a la tensión y se da la formación del cono de Taylor (C), de cuyo extremo surge una fibra muy delgada. [20]

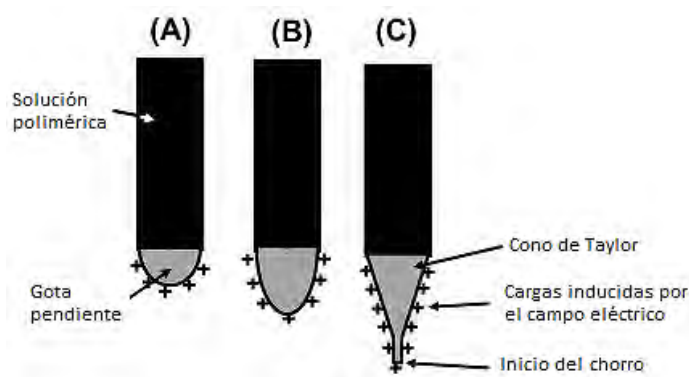


Figura 4. Etapas en la formación del cono de Taylor.

Durante el proceso de electrohilado hay varios factores que influyen notablemente en la morfología de las fibras obtenidas, como son:

- I. Parámetros de procesamiento.
 - a. *Voltaje aplicado*: La intensidad del voltaje aplicado permite controlar la formación de fibras con diámetros desde nanómetros hasta micras, ya que el incremento del voltaje altera la forma del cono de Taylor y modifica el chorro que sale de la aguja, lo que puede generar fibras con defectos. A mayor voltaje se forman fibras de menor diámetro, pero éstas pueden tener diámetros diferentes entre sí.
 - b. *Velocidad de flujo*: La velocidad a la que se inyecta la solución polimérica puede influir en la porosidad y forma de las fibras, a mayor flujo se empiezan a generar defectos, debido a que el disolvente no se evapora completamente antes de que las fibras lleguen al colector.
 - c. *Distancia aguja-colector*: Es un parámetro de gran importancia, ya que puede hacer la diferencia entre electrohilado y electro-atomizado, es decir, durante el proceso se pueden

obtener fibras o esferas poliméricas. Además, este parámetro tiene gran influencia en la morfología de las fibras obtenidas. Las fibras tienen diámetros con diferencia de hasta 2 órdenes de magnitud; en general, el diámetro disminuye al incrementarse la distancia.

- d. *Tipo de colector*: El uso de un colector estático o uno rotatorio tiene influencia en el diámetro de las fibras obtenidas, ya que el rotatorio permite obtener menores tamaños debido a la velocidad de giro, además de que se logran andamios de fibras orientadas en cierta dirección preferencial, útiles para algunas aplicaciones.

II. Parámetros de la solución.

- a. *Tipo de disolvente*: El disolvente, o mezcla de disolventes, debe ser afín al polímero; es decir, tener un parámetro de solubilidad cercano al polímero, de manera que permita formar una solución homogénea, lo cual es indispensable para obtener fibras de alta calidad.
- b. *Concentración de polímero*: La solución debe tener la concentración suficiente para que se logren anudar las cadenas poliméricas, sin estar demasiado diluida o concentrada, ya que una solución muy diluida formará gotas y si está muy concentrada su alta viscosidad ocasionará dificultades para inyectarla y mantener el flujo constante; a mayor concentración se incrementa el diámetro de las fibras.
- c. *Volatilidad del disolvente*: Se debe emplear un disolvente volátil, ya que se requiere que se evapore durante el trayecto entre la aguja y el colector: a mayor volatilidad, las fibras pueden presentar microtextura (poros en su superficie). Cuando se usan mezclas de un disolvente con un no-disolvente del polímero, al incrementar la cantidad de este último disminuye la viscosidad de la solución y se incrementa el grosor de las fibras electrohiladas.
- d. *Conductividad de la solución*: Las soluciones con alta conductividad tienen mayor capacidad de transporte de carga. El diámetro de las fibras poliméricas está inversamente relacionado con la conductividad de la solución, y puede tener una amplia distribución de diámetros. Este parámetro puede influir hasta en 2 órdenes de magnitud en el tamaño de las fibras. [20]

III. Parámetros ambientales.

a. *Temperatura y humedad*: Son factores ambientales que tienen influencia en la morfología de las nanofibras obtenidas, pueden ocasionar defectos en éstas, e incluso afectar la capacidad de electrohilado de las soluciones cuando las condiciones se modifican de forma radical.

La variación en los parámetros antes mencionados puede ser determinante y ocasionar la presencia de imperfecciones o diámetros no homogéneos en las fibras, por lo que es importante su optimización, para poder electrohilar la solución del polímero con la cual se va a trabajar. [21]

2.5.2. Moldeo con disolvente (solvent casting).

Se trata de una técnica simple, fácil y barata, que se basa en la evaporación de un disolvente para formar los andamios por 2 técnicas: en una se sumerge un molde en la solución polimérica y después se deja suficiente tiempo para que se evapore el disolvente, de tal modo que se forme una película y la otra consiste en vaciar solución polimérica en un molde y esperar a que se evapore el disolvente y se forme una película dentro de éste. La principal desventaja de este método es que pueden quedar residuos de disolventes tóxicos en el andamio, para lo cual se debe secar a vacío. [10]

2.5.3. Lixiviado de partículas (particulate leaching).

Es uno de los métodos más empleados en la fabricación de andamios para regeneración de tejidos. En éste se emplea sal, azúcar o cera como porógeno y la técnica consiste en colocar en un molde partículas de porógeno de cierto tamaño, adicionar una solución polimérica y, una vez que se evapora el disolvente, agregar agua para disolver las partículas o aplicar calor para disolver la cera, y con ello formar los poros de la membrana. Una de sus ventajas es que se emplea poco polímero, pero hay variables como el tamaño de poro y la conectividad entre ellos que son difíciles de controlar. Esto se debe a que la distribución del porógeno dentro de la solución no es homogénea, debido a la diferencia de densidades entre la solución polimérica y el sólido, además de que el grado de contacto directo entre las partículas de sal no se puede controlar bien y las partículas de porógeno frecuentemente quedan rodeadas por la solución polimérica, por lo que son difíciles de lixiviar.

La mayoría de los andamios porosos preparados mediante esta técnica están limitados a un grosor máximo de 4 mm y tienen una porosidad de más del 90 %, con un tamaño de poro de 5 μm a 600 μm . [10], [22]

2.5.4. Espumado por gas (gas foaming).

Se basa en el uso de un agente espumante como el bicarbonato de sodio dentro de la fase polimérica, para generar un gas inerte como nitrógeno o dióxido de carbono cuando se expone a soluciones ácidas. Cuando las partículas se transforman en gas al exponerse a soluciones ácidas, se genera una estructura porosa. Durante la formación de la espuma polimérica, la fase líquida tiende a drenarse e irse hacia el fondo, mientras que el gas se va hacia arriba, lo cual genera una espuma no homogénea compuesta por una capa inferior no porosa y una superficie altamente porosa en la parte superior. La porosidad de la estructura está determinada por la cantidad de gas disuelto en el polímero y la técnica permite obtener estructuras porosas tridimensionales. [10], [22]

2.5.5. Separación de fases.

Esta técnica se emplea para preparar andamios a los cuales se les van a incorporar moléculas bioactivas, para efectuarse se requiere un cambio de temperatura que separa la solución polimérica en dos fases, una con baja concentración de polímero y otra con alta concentración; una apropiada separación de fases líquido- líquido es crítica en la preparación de nanofibras, por lo que la elección del disolvente y la temperatura son cruciales para el proceso. La ventaja de esta técnica es que puede combinarse con otras y permite crear estructuras tridimensionales con adecuado control de la porosidad y distribución uniforme de los poros, con diámetros de 50 μm a 600 μm y teniéndose porosidades mayores al 87 %, dependiendo de la concentración de la solución. La desventaja de este método es que el uso de disolventes orgánicos presenta efectos nocivos en las células. [10], [22]

2.5.6. Impresión en 3 dimensiones (3D printing).

Es un proceso que permite obtener sólidos con formas variables mediante impresión tipo inyección de tinta de un material, esta tecnología se creó en el Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT) y consiste en crear por computadora un modelo de la pieza y una vez que se tiene éste, colocar una capa de material en polvo y, mediante algoritmos computacionales, aglomerar e imprimir cada capa acorde a la forma deseada; la densidad de empaque tiene un gran impacto en la capacidad de adhesión del material obtenido y afecta sus propiedades mecánicas. [10]

2.5.7. Depósito en fundido (fused deposition).

El proceso se inicia con la creación de un modelo geométrico por computadora, el diseño consta de rebanadas horizontales del modelo y se trabaja con un extrusor de depósito en fundido, que consiste de una plataforma que trabaja en los ejes x y y , así como de un cabezal que se desplaza en el eje z ; de esta forma, el sistema dibuja la estructura (andamio) y hace una capa a la vez. [10]

Esta tecnología es un método atractivo para fabricar andamios para aplicaciones en ingeniería de tejidos, debido a que no usa disolventes que podrían resultar tóxicos. El tamaño de poro de los andamios obtenidos puede controlarse al variar el diámetro de la boquilla usada para depositar las fibras poliméricas, la porosidad obtenida es por lo regular más de 80 % y el tamaño de poro está en el intervalo de 100 μm a 2000 μm . [22]

2.6. Poli(ϵ -caprolactona).

2.6.1. Generalidades.

La poli(ϵ -caprolactona) (PCL) se obtiene mediante polimerización por apertura de anillo (ROP, por sus siglas en inglés) de la ϵ -caprolactona, en el proceso se emplea octoato de estaño como catalizador y alcoholes de cadena corta para controlar el peso molecular del polímero.

La PCL (ver figura 5) tiene un alto grado de permeabilidad a muchas sustancias y es de gran interés en el área médica y de agricultura, recientemente se ha empleado para aplicaciones como películas agrícolas, contenedores para plantas, sistemas de liberación de fármacos y matrices para liberación controlada de pesticidas, herbicidas y fertilizantes, debido a que es biocompatible y puede tardar de 3 a 4 años en degradarse. [23]

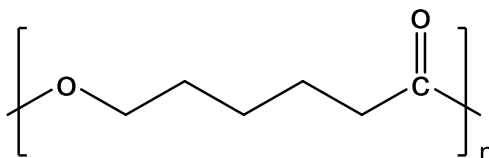


Figura 5. Estructura de la poli(ϵ -caprolactona)

El mecanismo de biodegradación de PCL (figura 6) se inicia con la hidrólisis abiótica del polímero, para generar ácido ϵ -hidroxi caproico (ácido graso), el cual sufre una β -oxidación para convertirse en acetil coenzima A y, finalmente, se genera dióxido de carbono mediante el ciclo del ácido tricarbóxico, efectuado por microorganismos como *Pseudomonas* y *penicillium*. [24]

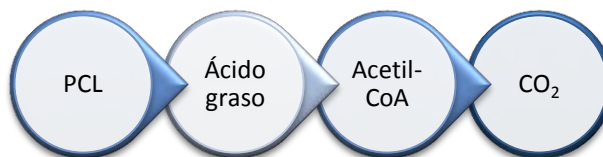


Figura 6. Mecanismo de degradación de PCL.

2.6.2. Propiedades de la poli(ϵ -caprolactona).

La PCL es un poliéster semicristalino con temperatura de transición vítrea (T_g) de $-60\text{ }^\circ\text{C}$ y temperatura de fusión de entre $59\text{ }^\circ\text{C}$ y $64\text{ }^\circ\text{C}$, los pesos moleculares del polímero varían desde 3,000 hasta 80,000 g/mol y, de acuerdo con su peso molecular, puede ser un sólido ceroso (M_w de varios miles) o un polímero sólido (M_w mayor de 20,000); la PCL cerosa se emplea usualmente como aditivo y la de alto peso molecular tiene propiedades similares al polietileno, con una fuerza de tracción de 12 MPa a 30 MPa y extensión a la ruptura de 400 % a 900 %. En la tabla 1 se presentan algunas propiedades de PCL con diferentes pesos moleculares, las cuales muestran fuerte dependencia con éste. [25]

Tabla 1. Peso molecular y propiedades de PCL.

PROPIEDAD	PCL 1	PCL 2	PCL 3
Peso molecular (g/mol)	37,000	50,000	80,000
Temperatura de fusión ($^\circ\text{C}$)	58-60	58-60	60-62
Esfuerzo a la tensión (kg/cm^2)	140	360	580
Elongación a la ruptura (%)	660	800	900

La PCL muestra flexibilidad en las cadenas de alto peso molecular y muy buena procesabilidad, puede hilarse en forma de fibras o formar películas por soplado o extrusión-soplado por debajo de los $200\text{ }^\circ\text{C}$, sin sufrir degradación térmica. La desventaja de la PCL es su bajo punto de fusión (alrededor de $60\text{ }^\circ\text{C}$) y baja temperatura de transición vítrea (de $-60\text{ }^\circ\text{C}$), la cual impide su uso para aplicaciones que requieran alta temperatura.

Las mezclas de PCL con otros polímeros como polipropileno (PP), policarbonato (PC), poli(óxido de etileno) (PEO) y almidón se usan frecuentemente para producir compuestos con propiedades específicas. Los mayores productores de PCL incluyen Dow Chemical en Estados Unidos, Solvay en Europa y Daicel Chemical Industries en Japón; se comercializa principalmente bajo el nombre de "TONE" y "CAPA" y se usa ampliamente para empaques de comida e ingeniería de tejidos, las propiedades de estos polímeros se presentan en la tabla 2. [24], [25]

Tabla 2. Propiedades de PCL comercial.

NOMBRE COMERCIAL	CAPA 650	CAPA 680	TONE P767	TONE P787
<i>Productor</i>	Solvay Interlox	Solvay Interlox	Union Carbide	Union Carbide
<i>Tg (°C)</i>	-60	-60	-60	-60
<i>Temp. de fusión (°C)</i>	60-62	60-62	60	60
<i>Esfuerzo a la tensión (MPa)</i>			21-26	39-42
<i>Elongación (%)</i>	>700	920	600-1000	750-1000
<i>Módulo (MPa)</i>	430-470	440-500	435	386
<i>Cristalinidad</i>	56	56		
<i>Peso molecular (g/mol)</i>	47500 ± 2000	69000 ± 1500		
<i>Esfuerzo a la cedencia</i>	17.2-17.5	14-16		
<i>Esfuerzo a la fractura</i>	29 ± 11	54		

2.6.3. Aplicaciones biomédicas.

Algunas de las aplicaciones de la PCL en el área médica incluyen:

- Suturas: se usa un copolímero en bloque de PCL con glicólido, el cual presenta menor rigidez que el poliglicólido puro, el copolímero se comercializa como un monofilamento bajo el nombre de Monacryl®.
- Vendajes para heridas: se ha empleado una película ultra delgada para los vendajes de heridas cutáneas y como vehículo de liberación de antisépticos.
- Dispositivos anticonceptivos: PCL es uno de los mejores candidatos para esta aplicación debido a que se degrada lentamente, es biocompatible y está aprobado por la FDA; se han preparado y caracterizado microesferas de este polímero que funcionan como implante inyectable para la liberación controlada de esteroides anticonceptivos.
- Dispositivos de fijación: se han realizado estudios en los que se emplean materiales compuestos de PCL como dispositivos de fijación y como sustitutos de acero inoxidable.
- Odontología: se usa en implantes dentales. [23]

En cuanto a sus aplicaciones en ingeniería de tejidos la PCL tiene varios usos [23]:

- Hueso (andamios al azar y con fibras alineadas).
- Cartílago.

- Tendón y ligamentos.
- Cardiovascular (válvulas cardíacas).
- Vasos sanguíneos.
- Piel.
- Nervios.

La PCL es un polímero bioreabsorbible con potenciales aplicaciones para reparación de hueso y cartílago, debido a que presenta ciertas ventajas con respecto a otros polímeros, entre ellas destacan su estabilidad en condiciones ambientales, bajo costo y disponibilidad en grandes cantidades, lo que ha incrementado su uso como material compuesto, combinado con algunos polímeros tanto naturales como sintéticos. [26]

2.7. Celulosa.

2.7.1. Generalidades.

La celulosa es el componente principal de la pared celular de las plantas, aunque también la producen algunas algas, bacterias, hongos y protozoarios. Esta molécula es un polisacárido que se encuentra en mayor cantidad que cualquier otra en la biosfera.

La celulosa es un polímero lineal de unidades de D-anhidroglucopiranosas, unidas mediante enlaces β -1,4-glucosídicos (figura 7). Es decir, se trata de un β -1,4-D-glucano (poliglucosa); presenta diferentes grados de polimerización dependiendo de la fuente y tratamiento, la celulosa en polvo (obtenida mediante molienda y fraccionado de pulpa) está en el intervalo de 100 a 300, mientras que la de algodón va de 20,000 a 40,000. En general, la celulosa nativa tiene mayor grado de polimerización que la regenerada (200 a 500) y los procesos de purificación disminuyen el grado hasta alrededor de 2,500. [27]

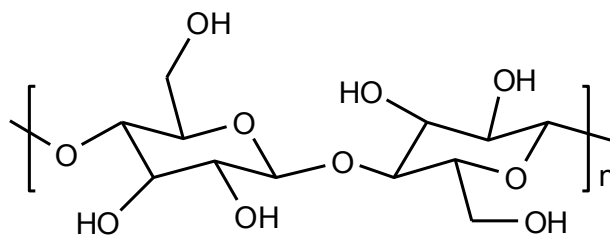


Figura 7. Molécula de celulosa.

La celulosa es un material biodegradable y no tóxico para los organismos vivos, su biodegradación es un paso esencial en el ciclo del carbono y asegura el balance del carbono en la biósfera. Las enzimas que rompen los enlaces β -1,4 de la celulosa se conocen como celulasas y son producidas mayoritariamente por bacterias y hongos, al igual que por plantas y algunos animales invertebrados; las celulasas se dividen en dos grupos: endoglucanasas y exoglucanasas (o celobiohidrolasas), de acuerdo a su capacidad para romper la celulosa internamente o por uno de sus extremos. Además, las enzimas son capaces de romper la celobiosa en glucosa.

La degradación eficiente de la celulosa generalmente requiere sistemas multienzimas, los cuales incluyen celulasas libres y/o complejos multicomponente llamados celulosomas; de esta forma, la rápida degradación de la celulosa la convierte en un material con gran potencial comercial. [27]

2.7.2. Propiedades de la celulosa.

La celulosa es un polímero cristalino no termoplástico (no funde ni se disuelve), su degradación térmica inicia alrededor de los 180 °C y arriba de esta temperatura las regiones amorfas se encuentran en estado viscoelástico, sin movimiento molecular a gran escala, lo que mantiene sus propiedades mecánicas.

La estructura morfológica de la celulosa consiste en la organización de los cristales en microfibrillas, láminas, fibras o tejidos; la celulosa nativa generalmente se presenta en forma de fibras, mientras que la regenerada puede manufacturarse como fibras, películas o cualquier otra forma. La cristalinidad de la celulosa varía dependiendo del origen, como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Fuentes de celulosa y cristalinidad.

SUSTRATO DE LA CELULOSA	INTERVALO DE CRISTALINIDAD (%)
Plantas superiores	50-75
Alga <i>Valonia</i>	90
Bacterial	40-63
Fibras sintéticas	25-40

En cuanto a sus propiedades, la celulosa es un polímero biodegradable no tóxico, insoluble en agua y en disolventes orgánicos; sin embargo, el polímero se hincha en muchos disolventes polares, funciona como sustrato higroscópico y absorbe de 8 % a 14 % de agua a 20 °C.

Las fibras de celulosa tienen una estructura jerárquica compleja de tipo laminar, que consiste en una delgada pared primaria rodeada por una pared secundaria, la cual está formada por tres capas; el grosor de la capa intermedia determina las propiedades mecánicas de la fibra. La capa intermedia consiste en una serie de microfibrillas helicoidales formadas por grandes cadenas de celulosa, las microfibrillas tienen un diámetro promedio de 10 a 30 nm y están formadas por 30 a 100 moléculas de celulosa en conformación de cadena extendida, las cuales proveen resistencia mecánica a la fibra (figura 8). [28]

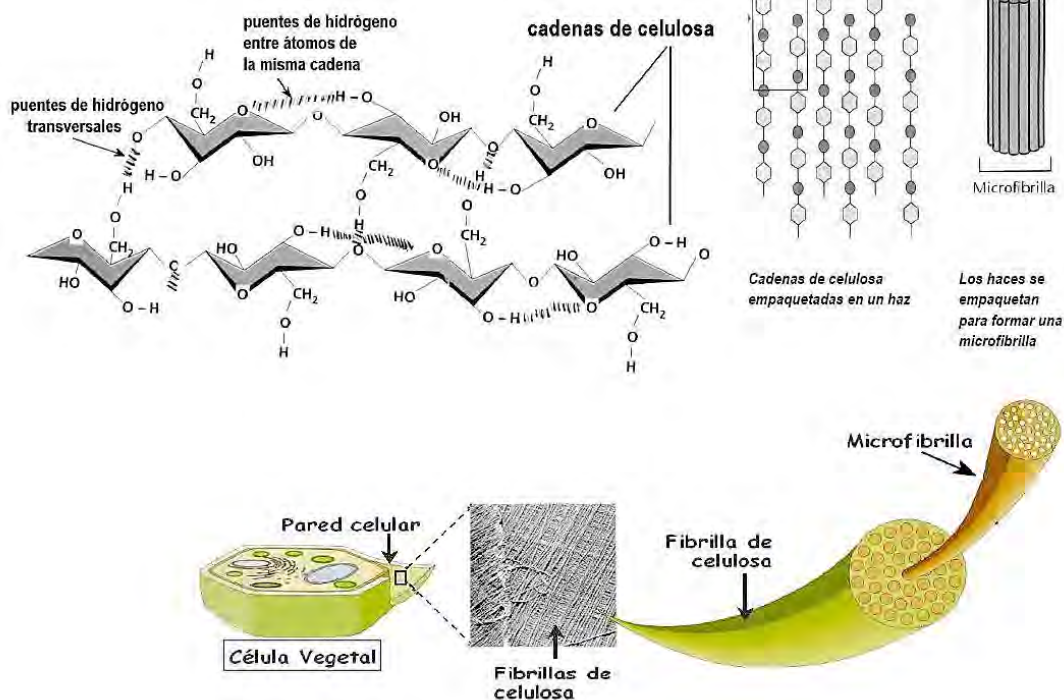


Figura 8. Estructura de la celulosa.

La celulosa se presenta en diversas conformaciones cristalinas, la celulosa nativa se conoce como celulosa I y se presenta en forma de fibras paralelas sin puentes de hidrógeno entre las láminas, la celulosa II es más estable termodinámicamente y está constituida por cadenas antiparalelas con puentes de hidrógeno entre láminas (figura 9 (a)). Cuando se da un tratamiento con aminas a la celulosa I ó II se obtiene la denominada celulosa III, que es una forma amorfa del material y, mediante un tratamiento de ésta con glicerol a alta temperatura, se genera la celulosa IV (figura 9 (b)). [28]

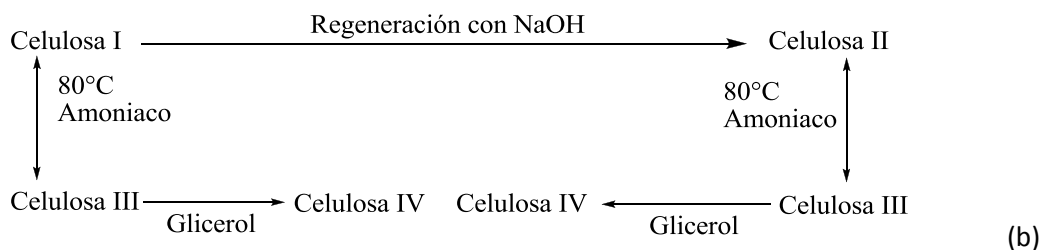
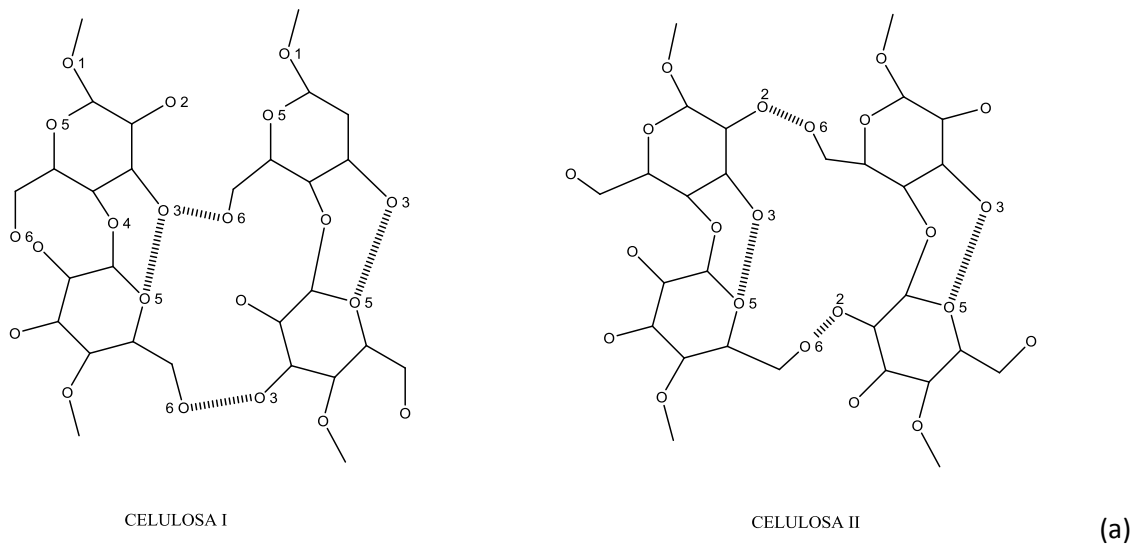


Figura 9. Obtención de los diferentes tipos de celulosa.

2.7.3. Aplicaciones biomédicas.

La celulosa es un material versátil que puede emplearse en gran variedad de aplicaciones biomédicas, desde vendajes tópicos hasta andamios para ingeniería de tejidos. Recientes estudios indican que la celulosa bacteriana es uno de los mejores candidatos para ingeniería de tejidos, porque es durable y biocompatible. [29]

La celulosa es un polisacárido que puede ser sintetizado por la bacteria *Acetobacter xylinum* y se ha empleado para cicatrización de heridas, lo que la hace un producto biotecnológico valioso. La celulosa generada por las plantas se ha usado en aplicaciones médicas durante años, principalmente para detener sangrados; por su parte, los hidrogeles de celulosa han demostrado ser biocompatibles con la formación de tejido conectivo y tener gran estabilidad

térmica, además de promover la adhesión de células óseas y su proliferación, por lo que se trata de un material adecuado para aplicaciones ortopédicas. [29]

2.8. Modificación superficial de poli(ϵ -caprolactona).

La finalidad de realizar una modificación superficial es mantener las propiedades del material en sólido mientras se altera su superficie para mejorar la biocompatibilidad, las técnicas pueden ser físicas o químicas y consisten en alterar las moléculas superficiales o recubrir la superficie con un material diferente. [23]

El tamaño y orientación de las nanofibras pueden usarse para alterar las funciones celulares, pero se puede lograr aún mayor influencia cuando se fijan moléculas bioactivas en las nanofibras. Hay estudios sobre el efecto de varias moléculas: la secuencia peptídica corta RGD, gelatina, perlecano y ácido acrílico, las cuales mejoran la adhesión, desarrollo y proliferación celular, comparado con las nanofibras sin modificar. La modificación superficial de andamios de nanofibras puede emplearse para mejorar las interacciones entre las células y el material del andamio. [20]

2.8.1. Tratamiento con Plasma.

El tratamiento con plasma de los sustratos poliméricos se emplea para mejorar la adhesión y propiedades de mojado mediante un cambio en su superficie. El procedimiento se realiza con plasma de aire o argón y se aplica para la modificación de muchos biomateriales, debido a que la hidrofiliidad de la superficie del material se incrementa notablemente al eliminar los contaminantes presentes.

Cuando las nanofibras de PCL se tratan con plasma de argón, en su exterior se genera gran cantidad de grupos carboxílicos, los cuales favorecen la mineralización del andamio al someterlo a una solución que simula los fluidos corporales. Este proceso conlleva a una mejora en la humectabilidad y hace que las fibras sean adecuadas para aplicaciones en regeneración de tejidos duros como el hueso. [30]

2.8.2. Adsorción.

El método más sencillo para cargar biomoléculas en andamios electrohilados es sumergirlos en una fase acuosa que las contenga, éstas pueden estar en una solución o emulsión y se adsorben a los andamios mediante fuerzas electrostáticas, como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals. Este proceso genera poca interferencia en la actividad de las biomoléculas cargadas y se emplea frecuentemente para adicionar proteínas o genes en andamios electrohilados. [31]

Los andamios de nanofibras de PCL modificadas superficialmente se han usado como una barrera para prevenir la adhesión postquirúrgica, para lo cual se adsorbe un antibiótico en el andamio electrohilado, lo que permite la liberación controlada del fármaco. [30]

2.8.3. Injerto.

La modificación superficial por injerto se ha empleado no sólo para conferir hidrofiliidad a la superficie, sino para adicionar moléculas bioactivas, las cuales mejoran la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Este tipo de reacción se puede iniciar por plasma o radiación UV, lo cual genera los radicales libres necesarios para que el injerto se efectúe. [30]

El proceso de injerto por métodos químicos se efectúa a través de dos rutas: radicales libres o iónica. En estos procesos, el papel del iniciador es determinante para el proceso. Además del mecanismo general de radicales libres, hay otras técnicas como el injerto en fundido y la polimerización por transferencia de radicales a átomos (ATRP, por sus siglas en inglés), las cuales permiten llevar a cabo este proceso.

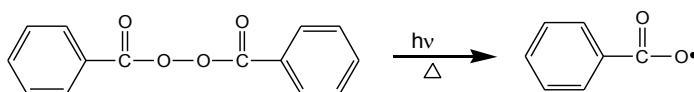
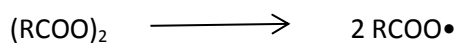
La polimerización por radicales libres en fundido implica que la cadena de polímero, el monómero e iniciadores forman una mezcla a alta temperatura, de tal manera que el injerto ocurre en fundido. Esta técnica permite modificar las propiedades químicas y reactividad del polímero, lo que mantiene inalteradas sus propiedades mecánicas; por ejemplo, en la modificación de polipropileno (PP) se emplean monómeros funcionales como anhídrido maleico, metacrilato de glicidilo, ácido metacrílico y sus derivados, oxazolona y silanos, monómeros en cadenas conjugadas (ácido oleico y ácido undecilénico), además de mezclas de

monómeros como anhídrido maleico con estireno, estireno con ácido acrílico y acetato de vinilo con cloruro de vinilo.

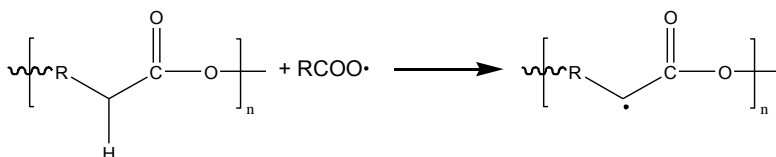
Las variables que hay que controlar durante el proceso de injerto incluyen principalmente la naturaleza de la cadena polimérica, el monómero, el disolvente, el iniciador, los aditivos y la temperatura. [32]

La reacción de injerto (funcionalización) de un polímero con anhídrido maleico (AM) transcurre mediante radicales libres, con la participación de un peróxido como generador de radicales. La reacción se efectúa en las siguientes etapas:

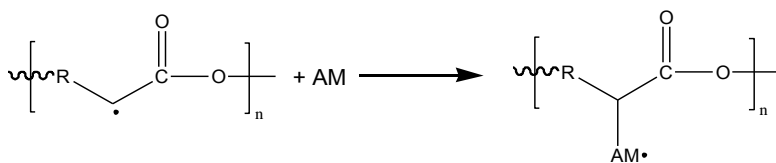
1. Generación de radicales libres del peróxido (iniciación).



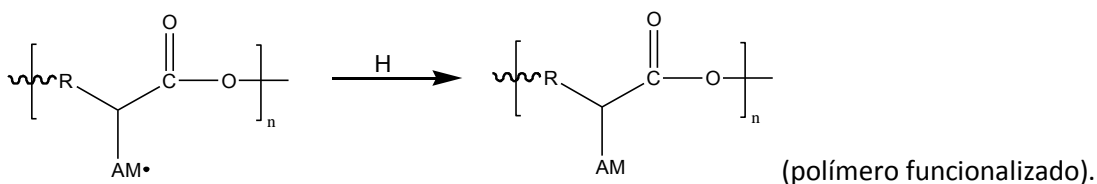
2. Extracción de hidrógeno del polímero.



3. Reacción del radical de polímero con AM (propagación).



4. Captura de hidrógeno por el radical (terminación).



CAPÍTULO 3

MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. Material y reactivos.

3.1.1. Reactivos para fabricación de andamios modificados.

- a) Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) con peso molecular de 70000 a 90000 g/mol, Aldrich.
- b) Cloroformo (CF) grado reactivo ACS, con 99.98 % de pureza, J.T.Baker.
- c) Diclorometano (DCM) grado reactivo ACS, con pureza ≥ 99.5 %, Sigma-Aldrich.
- d) Metanol (MeOH) grado reactivo ACS, con 99.8 % de pureza, J.T.Baker.
- e) N,N-Dimetilformamida (DMF) grado reactivo ACS, con pureza ≥ 99.8 %, Sigma Aldrich
- f) Peróxido de benzoilo (BPO) grado reactivo con pureza ≥ 98 %, Aldrich.
- g) Anhídrido maleico (AM) con pureza > 99 %, Aldrich.
- h) Tetrahidrofurano (THF) grado HPLC con pureza ≥ 99.9 %, Sigma Aldrich.
- i) Hidróxido de sodio (NaOH) grado reactivo ACS, con 99.8 % de pureza, Sigma Aldrich.
- j) Celulosa (Cel) Sigmacell type 101, fibras de alta pureza, Sigma Aldrich.
- k) Ácido clorhídrico (HCl), grado reactivo ACS, al 37%, Sigma Aldrich.
- l) Agua desionizada.

Todos los reactivos y disolventes se utilizaron sin purificación adicional.

3.2. Metodología.

3.2.1. Preparación de soluciones para electrohilado.

Se decidió probar varios disolventes y mezclas disolvente- no disolvente para preparar las soluciones de PCL, a fin de observar la morfología obtenida con cada uno de ellos, estos fueron: CF, DCM, CF-MeOH, DCM-MeOH, CF-DMF y DCM-DMF. Durante la experimentación se prepararon soluciones con distintas fracciones disolvente- no disolvente, las cuales se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Soluciones para electrohilado.

SOLUCIÓN	FRACCIÓN DE DISOLVENTE	FRACCIÓN DE NO- DISOLVENTE	CLAVE DE MUESTRA
10 % PCL/CF	100	0	CF-10
12 % PCL/CF	100	0	CF-12
12 % PCL/DCM	100	0	DCM-12
12 % PCL/ CF-MeOH	60	40	CFM-60
	70	30	CFM-70
	80	20	CFM-80
12 % PCL/ DCM-MeOH	70	30	DCM-70
	80	20	DCM-80
12 % PCL/ CF-DMF	75	25	CFD-75
	70	30	CFD-70
12 % PCL/ DCM-DMF	85	15	DCD-85
	80	20	DCD-80
	75	25	DCD-75
	70	30	DCD-70
	50	50	DCD-50

3.2.2. Electrohilado de soluciones de PCL.

El proceso de electrohilado consta de los siguientes pasos:

1. Pesar la cantidad adecuada de PCL y colocarla en un matraz volumétrico de 5 mL. Posteriormente, aforar con el disolvente o mezcla de disolventes elegidos.
2. Colocar en una jeringa de 5 mL, con aguja de punta roma de calibre 21G (0.8 mm), la solución de PCL a inyectar y eliminar las burbujas de aire contenidas en ella.
3. Fijar la jeringa en el inyector, programar el flujo a emplear y el volumen deseado de solución polimérica.
4. Colocar el colector de aluminio en su base y fijarlo a la distancia aguja-colector establecida.
5. Conectar un electrodo a la aguja y el otro al colector.
6. Encender la fuente de poder y aplicar la cantidad establecida de voltaje al sistema.
7. Inyectar la solución de PCL y con ello iniciar el proceso de electrohilado.
8. Una vez recubierta la placa de aluminio con el andamio polimérico, desprender la placa de la base, etiquetar y guardar para su posterior caracterización.

3.2.2.1. Optimización de parámetros de electrohilado de PCL.

Se propone un diseño de experimentos (tabla 5) que involucra varios parámetros: concentración de PCL, flujo, voltaje y distancia aguja-colector, cada uno de ellos con distintos niveles, con la finalidad de encontrar las condiciones más adecuadas para obtener fibras con grosor homogéneo y el menor diámetro posible.

Tabla 5. Parámetros propuestos para electrohilado de PCL.

PARÁMETRO	VALORES PROPUESTOS
Concentración (% p/v)	10, 12
Flujo (mL/h)	0.5, 1.0, 2.0, 4.0
Voltaje (kV)	8, 10, 15, 20
Distancia (cm)	10, 20, 25, 30

3.2.3. Funcionalización de poli(ϵ -caprolactona) con anhídrido maleico.

La reacción consta de las siguientes etapas:

1. Pesarse 5 g de PCL y las cantidades establecidas de anhídrido maleico (AM) y peróxido de benzoilo (BPO) y colocarlos en un matraz Schlenk.
2. Poner atmósfera de nitrógeno dentro del matraz y colocarle un tapón para que quede sellado herméticamente.
3. Inyectar dentro del matraz 20 mL de disolvente, con agitación y atmósfera inerte hasta solubilizar la mezcla.
4. Extraer el disolvente con una bomba de vacío.
5. Colocar el matraz Schlenk que contiene la mezcla de PCL, AM y BPO en baño de aceite a 110 °C, con atmósfera de nitrógeno dentro del recipiente durante la reacción (figura 10). El proceso se mantiene durante 15 h.
6. Retirar del baño de aceite el matraz, dejar enfriar y disolver el polímero funcionalizado (PCL-AM) con THF.
7. Precipitar la PCL-AM con metanol, a fin de que el AM y BPO no reaccionados se queden en el disolvente.
8. Filtrar el polímero y secar a temperatura ambiente.
9. Caracterizar el material.

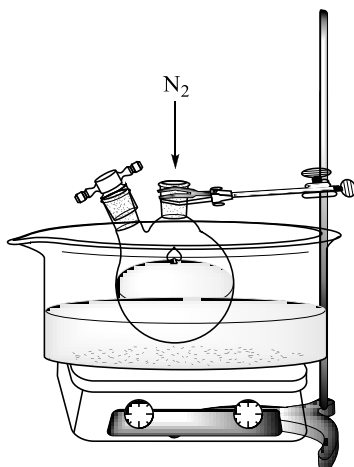


Figura 10. Esquema del sistema donde se efectúa la funcionalización de PCL.

Durante la reacción de funcionalización, se varió el disolvente y la cantidad de reactivos empleados durante ésta, como se muestra en la tabla 6. El porcentaje de AM se calculó con base en el peso de PCL y la cantidad de BPO con base en el peso de AM.

Tabla 6. Reacciones de funcionalización de PCL-AM.

MATERIAL	CLAVE	DISOLVENTE	AM (%)	BPO (%)
1	PCL-AM1	THF	10	2
2	PCL-AM2	THF	10	2
3	PCL-AM3	DCM	10	2
4	PCL-AM5	DCM	10	5
5	PCL-AM6	DCM	10	5
6	PCL-AM7	DCM	20	5

Las condiciones iniciales se establecieron con base en el trabajo realizado por D. Muenprasat et al. [33], en el cual se establecieron las cantidades de AM y BPO, así como el tiempo y temperatura de reacción para la funcionalización de PLA con AM.

3.2.4. Cálculo del porcentaje de funcionalización.

El porcentaje de funcionalización se calcula mediante las áreas de los picos obtenidas en el espectro de ¹H-RMN, donde se consideran básicamente un pico que corresponde a los protones del metileno de la PCL y otro debido a los protones del anhídrido funcionalizado. De acuerdo con C.-H. Kim et al. [34], a partir del área relativa del protón del metileno del átomo de carbono alfa al carbonilo de la PCL y la de los protones del anhídrido maleico, se puede calcular la cantidad de anhídrido unido al polímero.

3.2.5. Modificación superficial de andamios con celulosa.

3.2.5.1. Preparación de la solución de celulosa.

El método empleado se basó en el utilizado por H. Qi et al. [35], pero en este caso se omitió la adición de urea y se variaron las cantidades de los reactivos, el procedimiento fue el siguiente:

- 1) Colocar 0.3 g de celulosa en 10 mL de solución de NaOH [3 %] preenfriada a 0 °C. Agitar la mezcla a 150 rpm para incorporar la celulosa y formar una suspensión homogénea.
- 2) Llevar la suspensión a temperatura ambiente.
- 3) Mantener la agitación constante durante 24 h a temperatura ambiente, hasta formar una suspensión homogénea.
- 4) Centrifugar a 8000 rpm, durante 20 min a 10 °C y recuperar la fracción líquida.

3.2.5.2. Fabricación de andamios PCL-Cel.

El método a emplear consiste en la adsorción de celulosa en la superficie de las nanofibras de PCL que integran al andamio, para lo cual se coloca éste en la solución de celulosa (sin desprenderlo de su placa de aluminio) durante un par de horas, transcurrido ese tiempo se retira el material de la solución, se deja secar a temperatura ambiente y se caracteriza el andamio.

3.2.5.3. Fabricación de andamios PCL-AM-Cel.

Este método consiste en la adsorción de celulosa en el andamio de PCL-AM (el cual tiene injertadas moléculas de AM), para ello se coloca éste en una solución de celulosa (sin desprenderlo de su placa de aluminio) durante un par de horas, una vez transcurrido este tiempo se retira el material de la solución donde está inmerso, se deja secar a temperatura ambiente y se caracteriza el andamio.

3.2.6. Técnicas de caracterización de andamios.

3.2.6.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Los andamios se caracterizan mediante microscopía electrónica de barrido (MEB ó SEM en inglés) a fin de ver la morfología y homogeneidad en el diámetro de las fibras, así como la porosidad (volumen libre). Para el análisis se coloca el material en un portamuestras cilíndrico de aluminio, se recubre con oro mediante un equipo *JEOL JPC-1100* y se observa en el microscopio *JEOL Field emission JSM-7600F*, con electrones retrodispersados (detector LBE). La medición de diámetros y porosidad se realiza con el programa ImageJ®, de acuerdo con el procedimiento mostrado en el Anexo 1.1.

3.2.6.2. Cromatografía de Permeación en Gel (GPC).

Las fibras de PCL se analizan por GPC, a fin de determinar el peso molecular y la polidispersidad de la PCL que las integra; además, la técnica permite observar los cambios en pesos moleculares de la PCL debido a la reacción de funcionalización y detectar posible degradación del material durante el procedimiento.

Para este análisis se preparan soluciones con concentración de 2 mg/mL, con THF como disolvente. Las muestras se analizan en un cromatógrafo *HPLC Perkin Elmer serie 200*, con estándares de poliestireno para la curva de calibración y THF como fase móvil. Se reporta el peso molecular M_n , el M_w y el índice de polidispersidad (IP) de cada muestra.

3.2.6.3. Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR).

Mediante esta técnica se puede observar la presencia de anhídrido maleico en la cadena polimérica de PCL. Las muestras se analizan en un equipo de infrarrojo con transformada de Fourier y reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) *Thermo Scientific, Nicolet 6700*, por lo que no se requiere preparación previa de la muestra, el análisis se efectúa en el intervalo de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} .

3.2.6.4. Resonancia Magnética Nuclear de Protón (1H-RMN).

La técnica permite detectar y cuantificar el anhídrido maleico en la cadena de PCL. Para efectuar el análisis, se preparan soluciones de PCL o PCL-AM; para ello se disuelven de 15 mg a 20 mg de polímero en 1 mL de cloroformo deuterado (CDCl₃) grado HPLC. Las muestras se analizan en sonda de líquidos en un equipo *Bruker Avance III microbay* a 400 MHz y se empleó TMS (tetrametilsilano) como estándar interno.

3.2.6.5. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Esta técnica permite observar la temperatura a la cual se dan las transiciones más significativas del polímero, debidas a cambios a nivel microscópico, tal como temperatura de transición vítrea, fusión y cristalización, así como degradación del material. El análisis posibilita la comparación entre PCL pura y los polímeros funcionalizados (PCL-AM), detectándose cambios en las transiciones cuando se modifican los polímeros.

Para efectuar el análisis se emplea un equipo *TA Instruments DSC Q100*, se coloca la muestra en una charola de aluminio para DSC y las mediciones se realizan de -100 °C a 100 °C, con velocidad de calentamiento de 10 °C/min y atmósfera de nitrógeno. Los termogramas obtenidos se analizan mediante el software *TA Universal Analysis*.

3.2.6.6. Análisis Termogravimétrico (TGA).

El análisis térmico permite detectar las temperaturas a las cuales se degrada el material y observar las disminuciones en masa, debido a la pérdida de componentes de la muestra con el incremento de temperatura; las transiciones y la cantidad de masa perdida en cada etapa puede dar una clara idea de la composición de la muestra.

Para el análisis se colocan de 10 mg a 15 mg del andamio en una charola para TGA, la corrida se realiza de 25 °C a 600 °C, con velocidad de calentamiento de 10 °C/min y atmósfera de nitrógeno, en un equipo *TA Instruments SDT Q600 Module DSC-TGA Standard*. Los termogramas obtenidos se analizan mediante el software *TA Universal Analysis*.

3.2.6.7. Ensayo mecánico en tensión.

Los ensayos mecánicos en tensión efectuados a los andamios de PCL y PCL-AM (funcionalizada), son un indicador de la capacidad de éstos para soportar el crecimiento celular, ya que mediante los valores del módulo elástico y resistencia a la tensión se puede determinar si un andamio ha mejorado sus propiedades mecánicas. Para estas pruebas se emplean andamios con grosor aproximado de 0.2 mm, se requieren 5 probetas de cada material, las cuales se cortan con las medidas especificadas en la norma ASTM D1708-96 [36] y se analizan en una máquina universal de pruebas mecánicas *Instron 5500R*, con una celda de carga de 500 N y velocidad de deformación de 10 mm/min a 25°C. Durante el análisis se introducen en el equipo los datos del grosor y ancho del área de prueba de cada probeta.

Una vez obtenidos los resultados se comparan los valores correspondientes a cada muestra y se relacionan estos resultados con las características del material.

3.2.6.8. Ángulo de contacto.

Se emplea un goniómetro *Ramé-hart, inc. modelo 100-07-00*, ajustado con un sistema óptico, para observar la interacción del agua con la superficie de los andamios de PCL y PCL-AM, con y sin celulosa. Se graba un video de 3 min partiendo del momento en el que se deposita una gota de agua desionizada (16 µl) sobre el andamio con una jeringa sin punta y, a partir de las imágenes obtenidas para cada muestra, con ayuda del programa *ImageJ®*, se determina la curvatura de la gota y el ángulo de contacto y se hace un análisis estadístico para determinar el valor final. Se usan 3 especímenes de cada material y se depositan 5 gotas en cada muestra.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización de parámetros de electrohilado de PCL.

La optimización de los parámetros de electrohilado se realizó a partir del diseño de experimentos mostrado en la tabla 5 de la sección 3.2.2.1; para ello se consideraron varios sistemas de disolventes y cuatro variables con distintos valores, a fin de obtener fibras homogéneas con el menor diámetro posible.

4.1.1. Efecto los parámetros de electrohilado en la morfología y diámetro de las fibras.

Uno de los parámetros que mayor influencia tiene sobre la morfología y diámetro de las fibras es el disolvente empleado, por lo que durante esta etapa se trabajó con soluciones de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) en cloroformo (CF) y diclorometano (DCM), además de sistemas disolvente-no disolvente, para lo que se emplearon metanol (MeOH) y dimetilformamida (DMF). La adición de MeOH y DMF incrementó la capacidad de polarización y así la conductividad de la solución, lo que favoreció el proceso de electrohilado.

El cálculo del diámetro promedio de las fibras y el porcentaje de porosidad del andamio se realizó a partir de las micrografías de MEB, mediante el programa ImageJ®, de acuerdo con el método descrito en el Anexo 1.11.1.1.

En la tabla 7 se presentan los disolventes usados para preparar las soluciones que se sometieron a electrohilado con su correspondiente constante dieléctrica, y la constante dieléctrica teórica en el caso de las mezclas de disolventes, el cálculo se muestra en el Anexo 1.9.

Tabla 7. Constante dieléctrica de los disolventes y sistemas de disolventes.

DISOLVENTE(S)	CONSTANTE DIELÉCTRICA
Cloroformo	4.9
Diclorometano	8.93
Metanol	33
DMF	36.7
CF-MeOH (80:20)	10.52
CF-MeOH (70:30)	13.33
CF- DMF (70:30)	14.44
DCM-MeOH (80:20)	13.74
DCM-DMF (80:20)	14.48

A) Sistema de disolventes con cloroformo.

Las soluciones de PCL en cloroformo permitieron detectar la influencia de la concentración del polímero en la morfología de las fibras obtenidas, cuando se trabajó con la solución de PCL/CF al 10 % p/v, con flujo de 1 mL/h, se observó la presencia de bulbos porosos con algunas fibras de diámetro pequeño, como se muestra en la figura 11(a). A una concentración de 12 % p/v, se obtuvieron fibras porosas con diámetro promedio de 5.36 μm y desviación estándar de 0.633 μm , como se aprecia en la figura 11 (b).

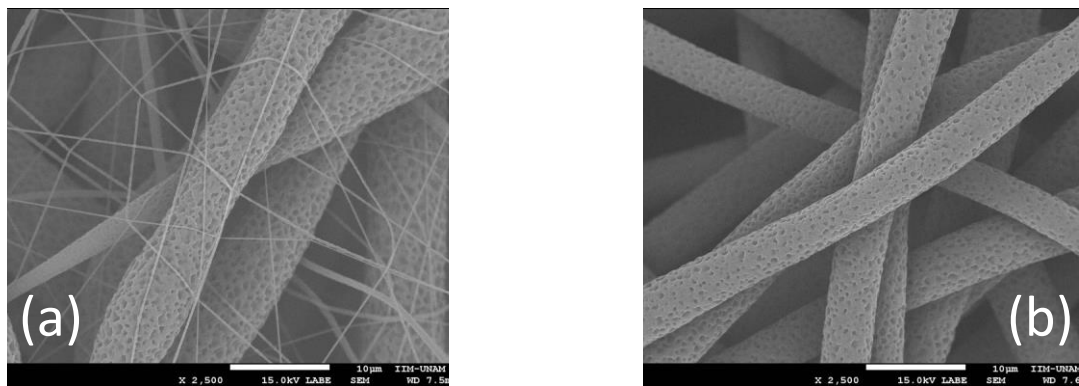


Figura 11. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/CF (a) al 10 % p/v y (b) al 12 % p/v; aumento de 2500x.

Con la finalidad de reducir el grosor de las fibras obtenidas, se adicionaron diferentes fracciones de MeOH para incrementar la conductividad del disolvente, se prepararon

soluciones de PCL en CF-MeOH y se observó el efecto en la morfología y los diámetros de las fibras; en esta etapa se analizó, en primer lugar, el efecto del flujo. Las micrografías de la figura 12 presentan los andamios obtenidos a partir de la solución CF-MeOH (70:30) al 12 % p/v, con flujos de 0.5, 1 y 2 mL/h, con un voltaje de 10 kV.

Las micrografías de las nanofibras muestran que a flujo bajo se generan andamios con una amplia distribución de diámetros (figura 12(a)), cuando se trabaja con flujo de 1 mL/h se obtienen fibras con diámetro promedio de $1.89 \mu\text{m}$ y desviación estándar de $0.195 \mu\text{m}$ (figura 12(b)), que es el más adecuado en este caso, y si se incrementa el flujo hasta 2 mL/h, el diámetro de las fibras aumenta a $2.38 \mu\text{m}$, con desviación estándar de $0.279 \mu\text{m}$ (figura 12(c)).

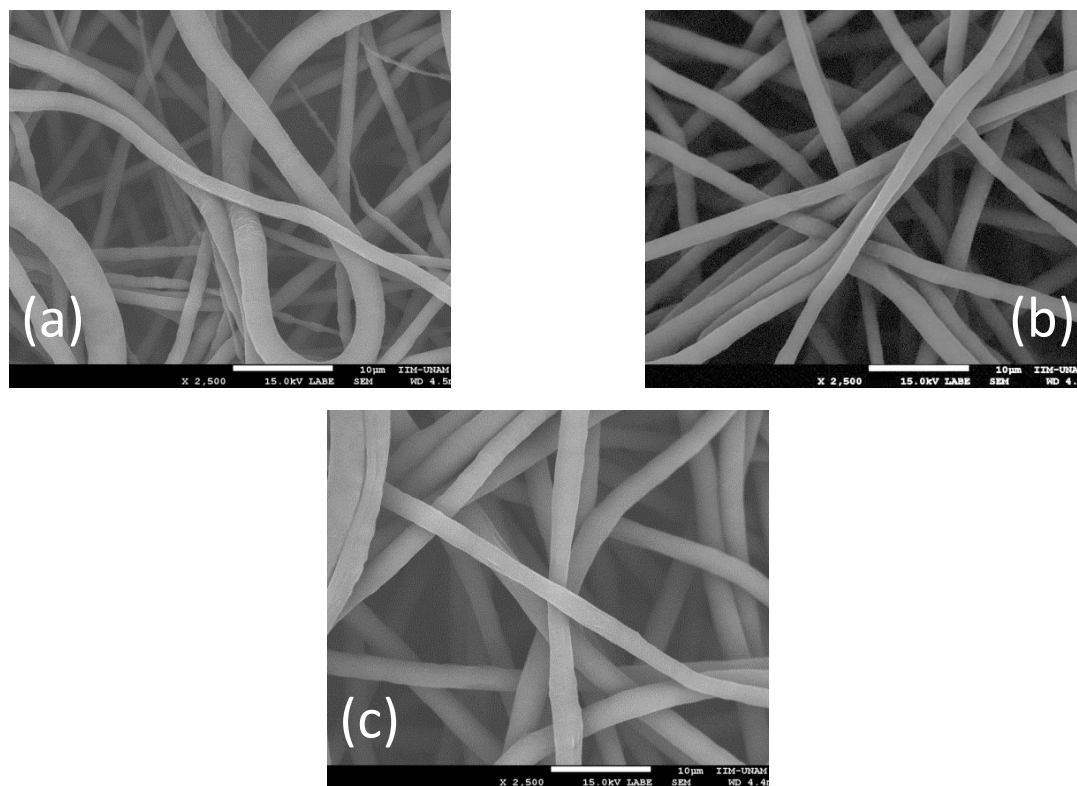


Figura 12. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/CF-MeOH (70:30) al 12 % p/v, con flujos de (a) 0.5 mL/h, (b) 1 mL/h y (c) 2 mL/h; aumento de 2500x.

La variación en el flujo de las soluciones CF-MeOH no permitió una reducción considerable del diámetro de las nanofibras poliméricas, por lo que se decidió variar el voltaje durante el proceso, con un flujo constante de 2 mL/h; el efecto de la modificación de este parámetro dio

como resultado los andamios mostrados en la figura 13, en los cuales se hizo evidente que a mayor voltaje el andamio mostraba fibras con diámetros poco homogéneos, por lo que no se consideró una buena opción para reducir el diámetro de las nanofibras.

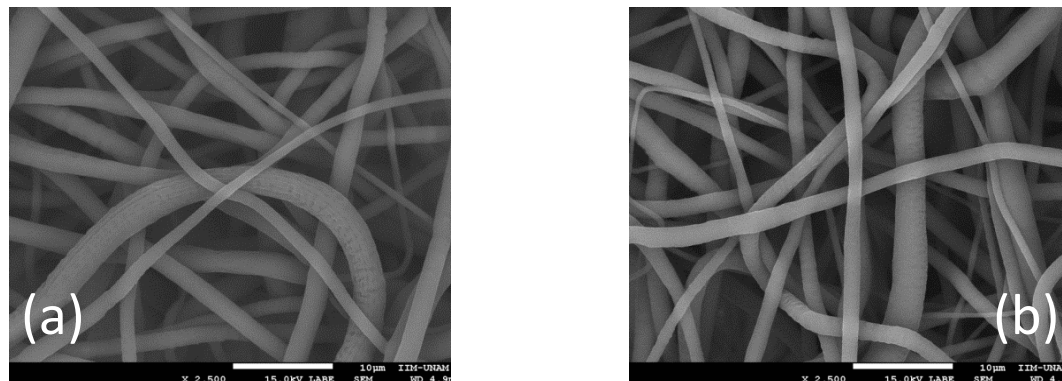


Figura 13. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/CF-MeOH (80:20) al 12 % p/v, con voltajes de (a) 15 kV y (b) 20 kV; aumento de 2500x.

La adición de un disolvente con constante dieléctrica más elevada a la solución polimérica favorece el proceso de electrohilado, por lo que se decidió preparar mezclas de cloroformo con N,N-dimetilformamida (DMF), la cual tiene una constante dieléctrica mayor que la del MeOH. Inicialmente se trabajó con flujo de 1 mL/h, con éste se obtuvieron fibras de varios diámetros (figura 14(b)), por lo que fue necesario reducir el flujo de inyección a 0.5 mL/h, para obtener fibras con una distribución de diámetros más homogénea, como se observa en la figura 14(a).

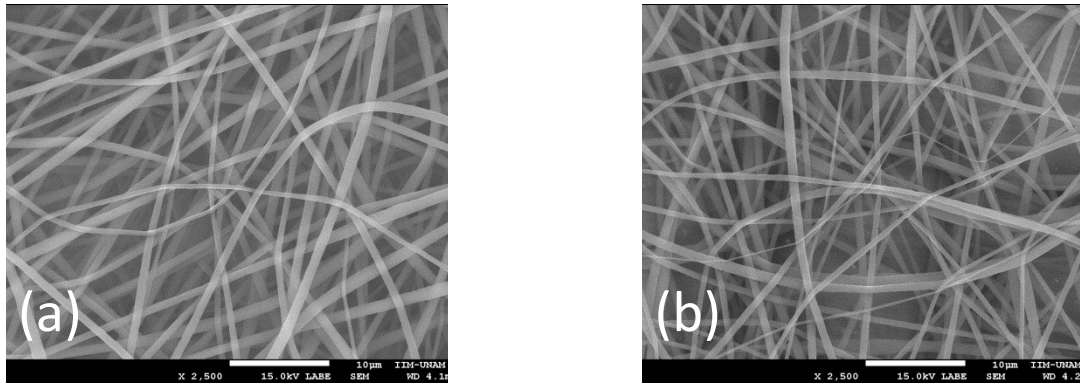


Figura 14. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/CF-DMF (75:25) al 12 % p/v, con flujos de (a) 0.5 mL/h y (b) 1mL/h; aumento de 2500x.

B) Sistema de disolventes con diclorometano.

Debido a que el uso de cloroformo en materiales para aplicaciones médicas se ha restringido, se decidió preparar soluciones de PCL con otro disolvente, para lo cual se eligió diclorometano (DCM), el cual es parecido al cloroformo y no está restringido. A una concentración de 12 % p/v la solución generó bulbos porosos con algunas fibras de diámetro nanométrico, como se observa en la figura 15, sin verse alterada esta morfología con el incremento del flujo durante el proceso.

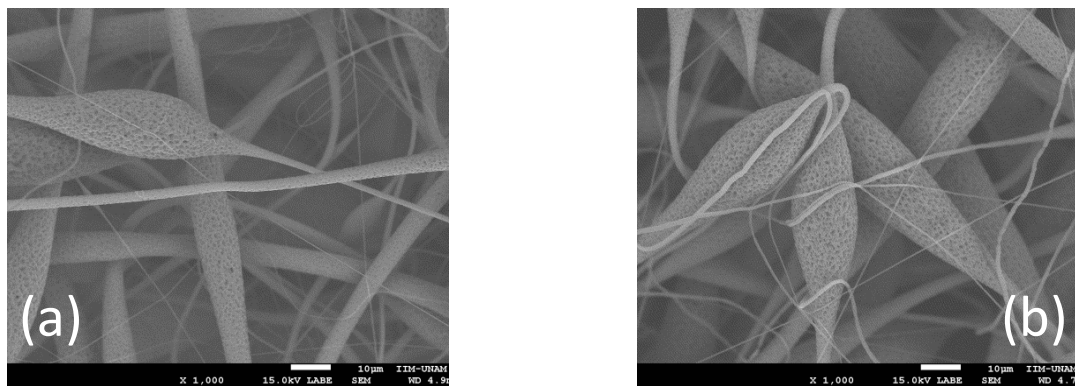


Figura 15. Micrografía de MEB de los andamios de PCL/DCM al 12 % p/v, con flujo de (a) 2 mL/h y (b) 4 mL/h; aumento de 1000x.

El electrohilado de la solución PCL/DCM-MeOH (80:20) con flujo de 1 mL/h generó fibras con diámetro promedio de 1.39 μm y desviación estándar de 0.389 μm , cuando se incrementó el flujo a 2 mL/h, el diámetro aumentó hasta 1.84 μm con desviación estándar de 0.281 μm y al elevar el flujo a 4 mL/h, el diámetro fue de 2.68 μm , con desviación estándar de 0.472 μm ; de las micrografías obtenidas (figura 16) se deduce que el incremento de este parámetro le confiere mayor grosor a las fibras y se incrementa la distribución de diámetros en el andamio.

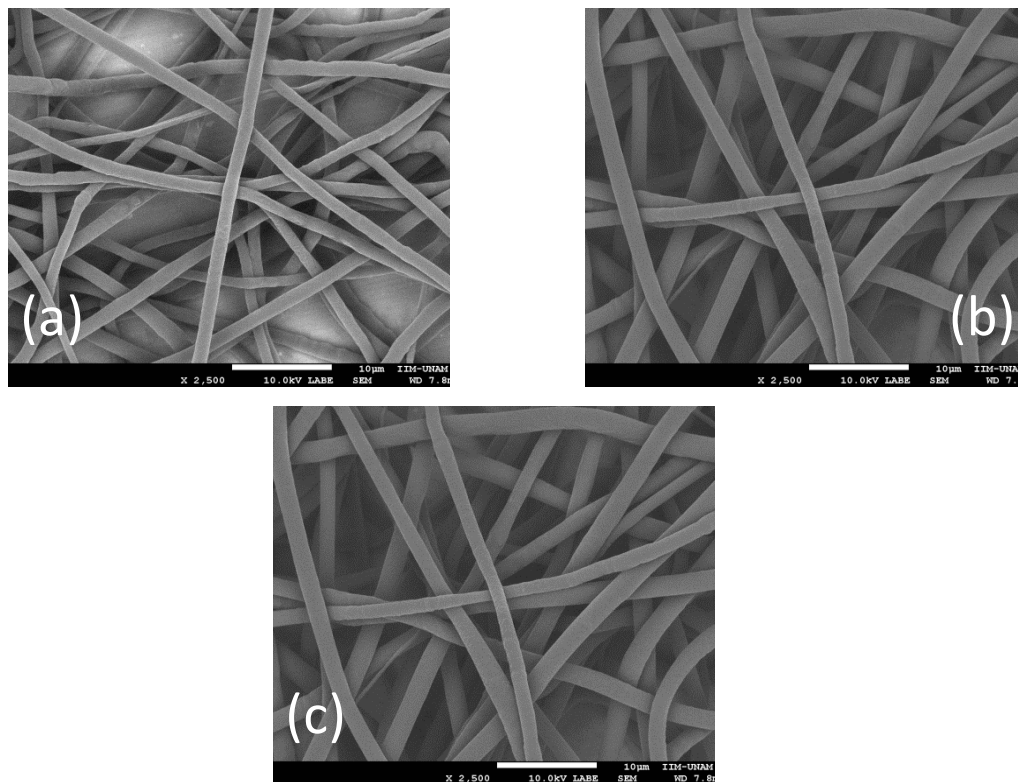


Figura 16. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/DCM-MeOH (80:20) al 12 % p/v, con flujos de (a) 1 mL/h, (b) 2 mL/h y (c) 4 mL/h; aumento de 2500x.

La solución de PCL en DCM-MeOH (80:20) al 10 % con flujo de 0.5 mL/h permitió obtener fibras no homogéneas con diámetro promedio de 0.61 μm y desviación estándar de 0.199 μm ; cuando se incrementó el flujo a 1 mL/h se generaron fibras no homogéneas con diámetro de 0.59 μm y desviación estándar de 0.194 μm (ver figura 17). Con la finalidad de reducir el diámetro de las fibras se decidió preparar soluciones de DCM con DMF como no-disolvente.

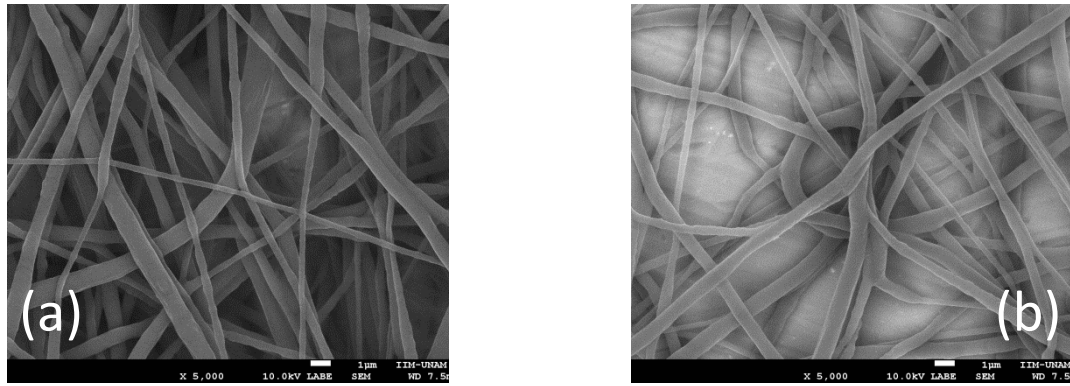


Figura 17. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/DCM-MeOH (80:20) al 10 % p/v, con flujos de (a) 0.5mL/h y (b) 1mL/h; aumento de 5000x.

La solución de PCL/DCM-DMF (80:20) al 12 % PCL se sometió a electrohilado con flujo de 0.5 mL/h y generó fibras con diámetro promedio de $0.91 \mu\text{m}$ y desviación estándar de $0.146 \mu\text{m}$, cuando se incrementó el flujo a 1 mL/h se obtuvieron fibras con diámetro de $1.02 \mu\text{m}$ y desviación estándar de $0.491 \mu\text{m}$, como se observa en la figura 18.

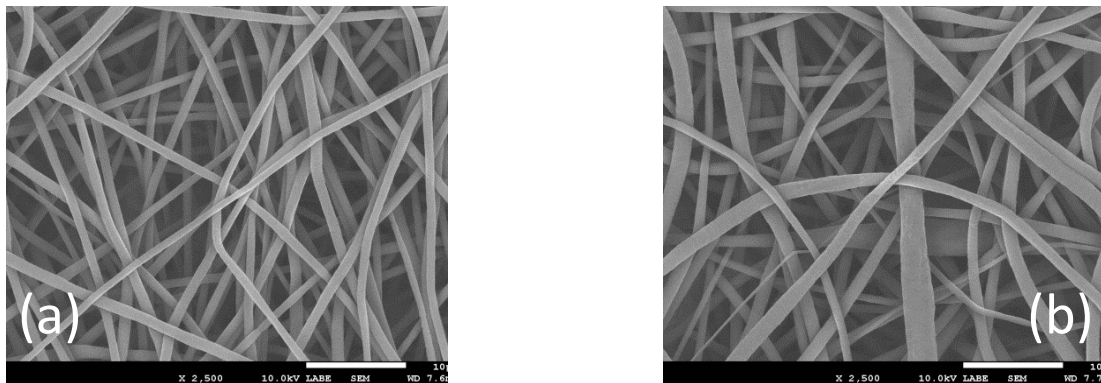


Figura 18. Micrografías de MEB de los andamios de PCL/DCM-DMF (80:20) al 12% p/v, con flujos de (a) 0.5 mL/h y (b) 1mL/h; aumento de 2500x.

Efecto del sistema de disolventes.

Las soluciones que contenían cloroformo como disolvente y mezclas de este con MeOH y DMF generaron los resultados mostrados en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados obtenidos con cloroformo como disolvente.

SISTEMA DE DISOLVENTES	DIÁMETRO DE FIBRAS (μm)
Cloroformo	5.36 ± 0.633
CF-MeOH (80:20)	1.79 ± 0.377
CF-MeOH (70:30)	1.89 ± 0.195
CF- DMF (70:30)	0.74 ± 0.126

El sistema que dio mejores resultados fue el de PCL/ CF-DMF (70:30) al 12 % p/v, con flujo de 0.5 mL/h y voltaje de 8 kV, a una distancia de 25 cm; con dichos parámetros se obtuvieron fibras homogéneas, como se observa en la figura 19 (a), con diámetro promedio de 0.74 μm , desviación estándar de 0.126 μm y porosidad relativa (volumen libre) de 34.37 % (tabla 8). Además, se detectó que el incremento en la conductividad de la solución favorece la formación de fibras homogéneas con menor diámetro.

Los resultados obtenidos al trabajar con soluciones de PCL en DCM y sistemas de DCM-MeOH y DCM-DMF se encuentran en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados obtenidos con diclorometano como disolvente.

SISTEMA DE DISOLVENTES	DIÁMETRO DE FIBRAS (μm)
DCM	Genera bulbos
DCM-MeOH (80:20)	1.39 ± 0.389
DCM-DMF (80:20)	0.91 ± 0.146

El sistema PCL/DCM-DMF (80:20) al 12 % p/v, con flujo de 0.5 mL/h y voltaje de 8 kV, a una distancia de 25 cm permitió obtener fibras homogéneas (ver figura 19 (b)) con diámetro promedio de 0.91 μm , desviación estándar de 0.146 μm y porosidad relativa (volumen libre) de 29.44 %, por lo que se decidió usar estos parámetros para fabricar los andamios.

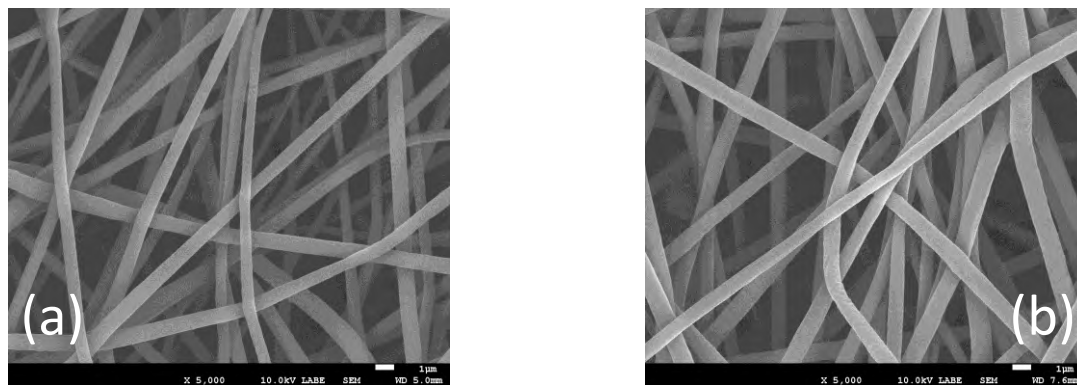


Figura 19. Micrografías de MEB de los andamios de (a) PCL/CF-DMF (70:30) y (b) PCL/DCM-DMF (80:20); aumento de 5000x.

En resumen, los parámetros óptimos para el electrohilado de fibras de PCL con el sistema de disolventes DCM-DMF (80:20) son los mostrados en la tabla 10.

Tabla 10. Parámetros óptimos de electrohilado de PCL.

PARÁMETRO	VALOR ÓPTIMO
Concentración (% p/v)	12
Flujo (mL/h)	0.5
Voltaje (kV)	8
Distancia (cm)	25

4.2. Caracterización de andamios funcionalizados (PCL-AM).

4.2.1. Efecto de la funcionalización con AM en el peso molecular de PCL.

Se realizó la determinación de peso molecular por cromatografía de permeación en gel (GPC), con THF como fase móvil y estándares de poliestireno para la curva de calibración, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Resultados de GPC.

MUESTRA	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	IP	% área
PCL	103590	190547	1.84	96.53
	462	792	1.71	3.47
PCL-AM6	40067	87015	2.17	99.72
PCL-AM7	30573	63150	2.07	99.95

De los resultados obtenidos se hace evidente que la PCL comercial contiene una fracción de oligómero ($M_n = 462$ g/mol) de alrededor del 3 %, la cual se elimina durante el proceso de funcionalización del polímero, ya que en las muestras funcionalizadas se presenta en cantidades menores al 1 %. Además, durante la reacción con AM se da la ruptura de cadenas del polímero, de acuerdo con el mecanismo propuesto por J. John et al. [37], el cual se aprecia en la figura 20.

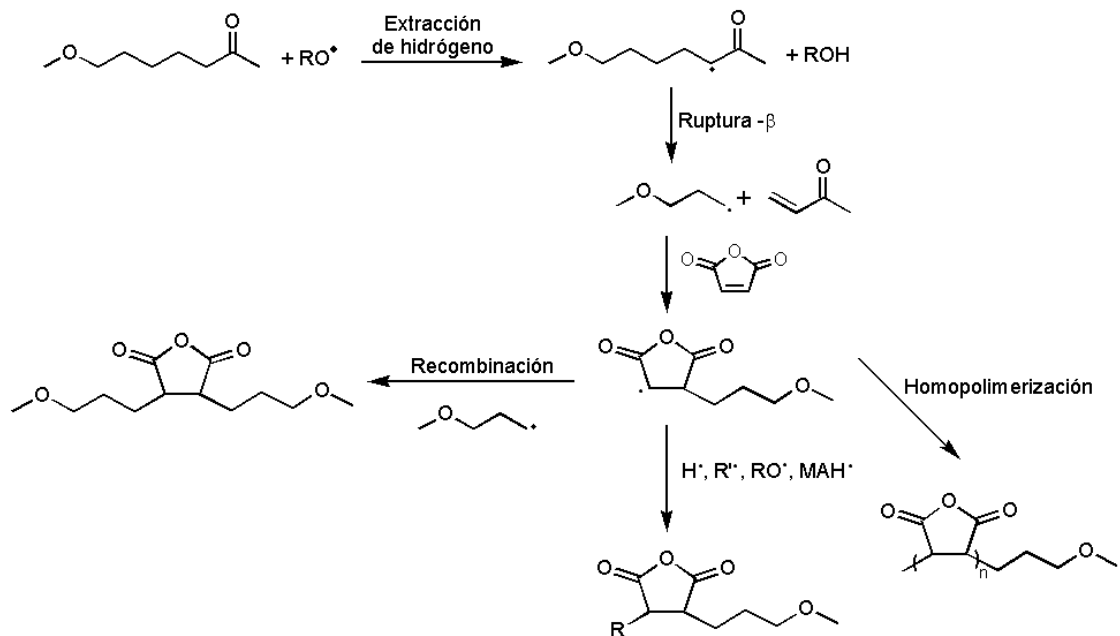


Figura 20. Posible mecanismo de funcionalización de PCL con AM.

El peso molecular de las cadenas disminuye de acuerdo con la cantidad de AM adicionado, como lo habían establecido D. Muenprasat et al. [33] para la funcionalización de PLA con AM; en el caso de PCL-AM6, se agregó 10 % de AM y en PCL-AM7 20 %, haciéndose notorio que a mayor contenido de anhídrido se favorece la ruptura de cadenas y hay un ligero incremento en la polidispersidad (IP) del material (ver tabla 11).

4.2.2. Evaluación de la reacción de funcionalización de PCL con AM.

Análisis por Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR).

La figura 21 muestra el espectro de FT-IR de PCL, con las bandas características de este polímero, el interés en este caso se centró en la banda que está en 1722 cm^{-1} , ya que es en esta región donde se presentan los cambios debidos a la funcionalización con anhídrido, de acuerdo con lo reportado por C.-S. Wu [7] para una reacción de PCL con ácido acrílico.

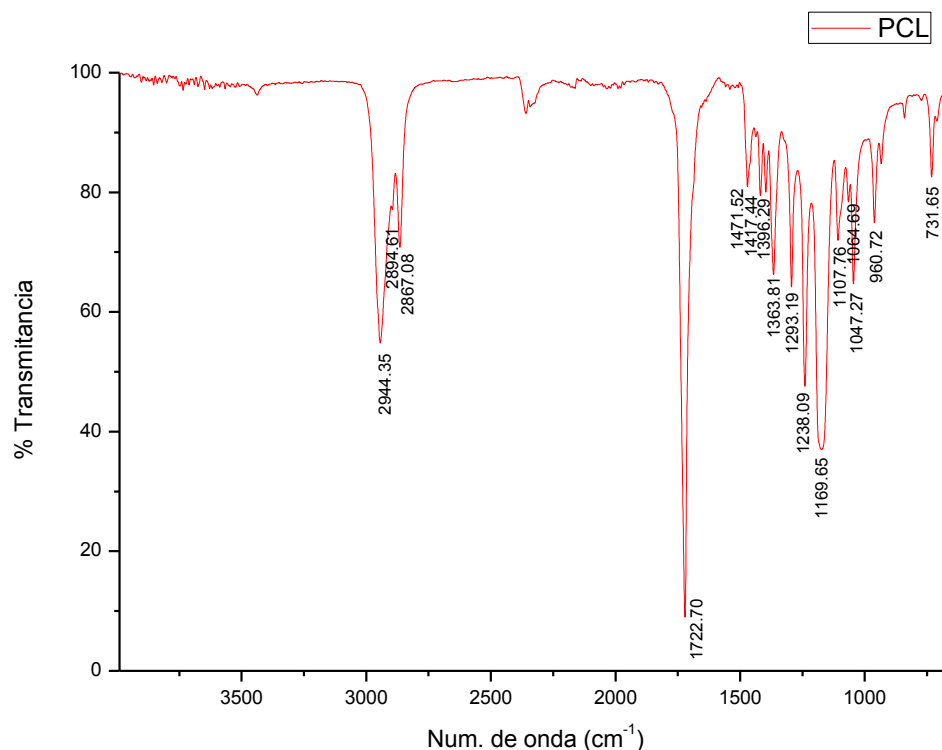


Figura 21. Espectro FTIR de PCL.

Los espectros de FT-IR de los reactivos empleados en la reacción de funcionalización de PCL con AM se muestran en la figura 22, donde se observa que la mayoría de las bandas de PCL y AM se encuentran en la zona de 1400 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} , por lo que se debe poner particular interés a esta área de los espectros.

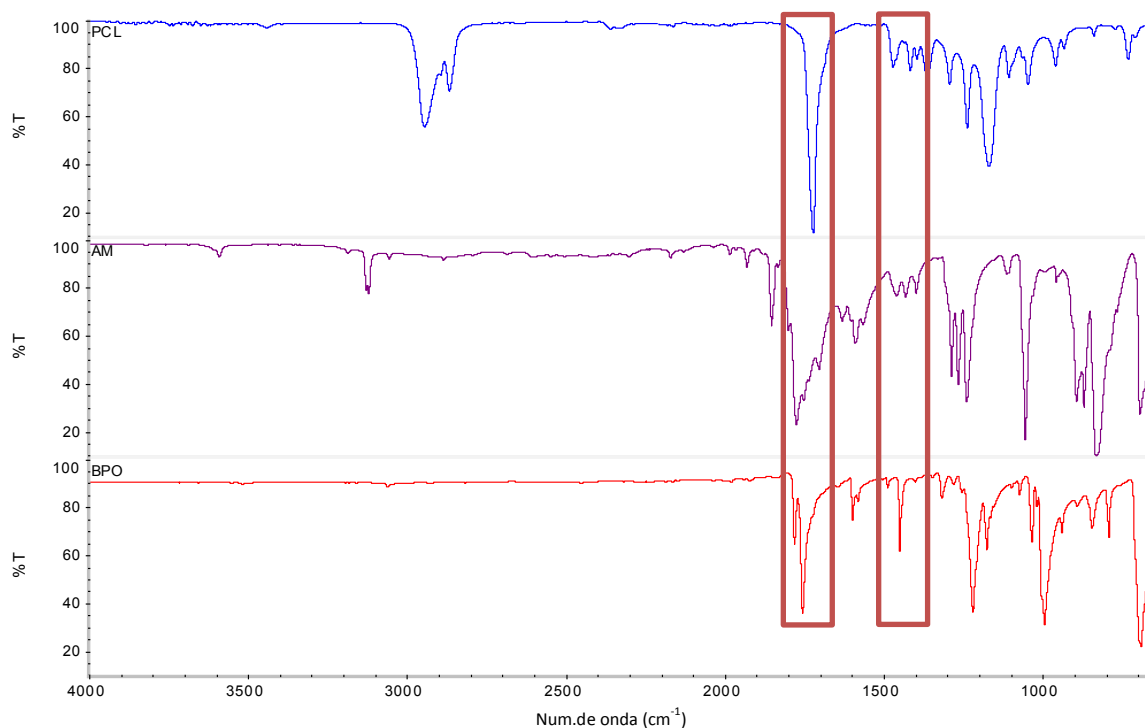


Figura 22. Espectros FTIR de PCL, AM y BPO.

La reacción de funcionalización de PCL con AM se realizó con THF como disolvente y se usó 10 % en peso de AM con respecto a PCL y 2 % en peso de BPO respecto a AM, los reactivos se disolvieron y después se retiró el THF mediante vacío, la reacción se realizó en masa con atmósfera inerte de nitrógeno y se efectuó por duplicado. Al observar los espectros de FTIR de PCL-AM1, PCL-AM2 y PCL-AM3 (este último se muestra en la figura 23), no se detectó la presencia de una doble banda en el carbonilo (1722 cm^{-1}), la cual sería indicativa de la presencia de funcionalización en el polímero.

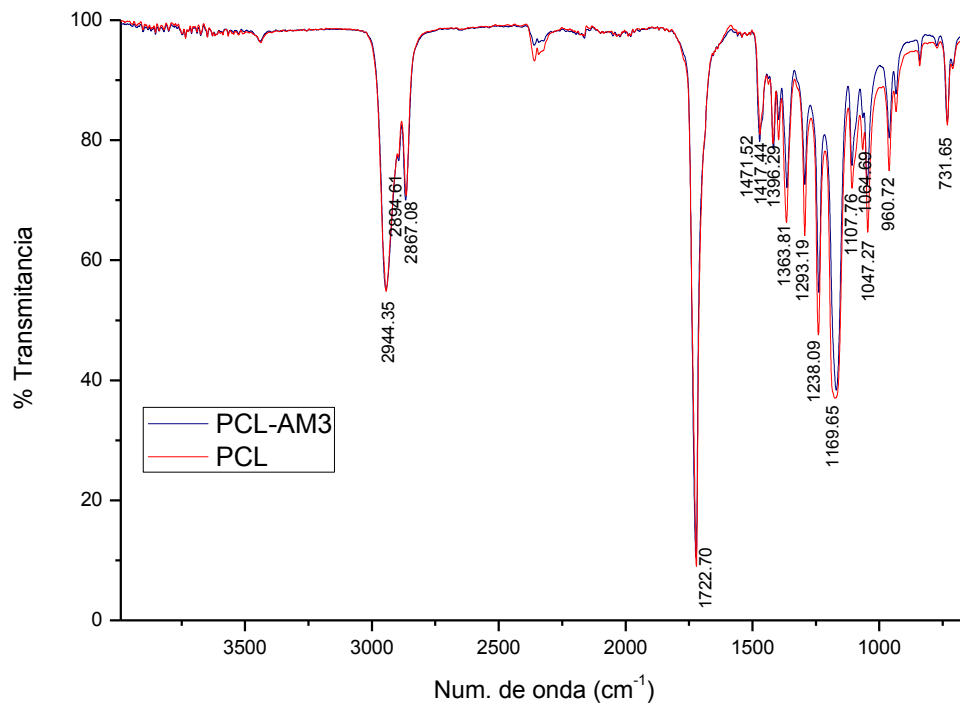


Figura 23. Espectros FTIR de PCL y PCL injertada con AM (PCL-AM3).

Se realizó nuevamente la reacción de funcionalización en atmósfera inerte (nitrógeno) durante todo el proceso y se incrementó la cantidad de BPO al 5 % en peso respecto a AM; los espectros del material (figura 24) mostraron un hombro en 1653 cm⁻¹, el cual probablemente se debe a la presencia de anhídrido maleico en el polímero. La reacción se realizó por duplicado (PCL-AM5 y PCL-AM6) y en ambos casos el espectro de FT-IR presentó únicamente esa banda adicional a las mostradas por la PCL sin injertar.

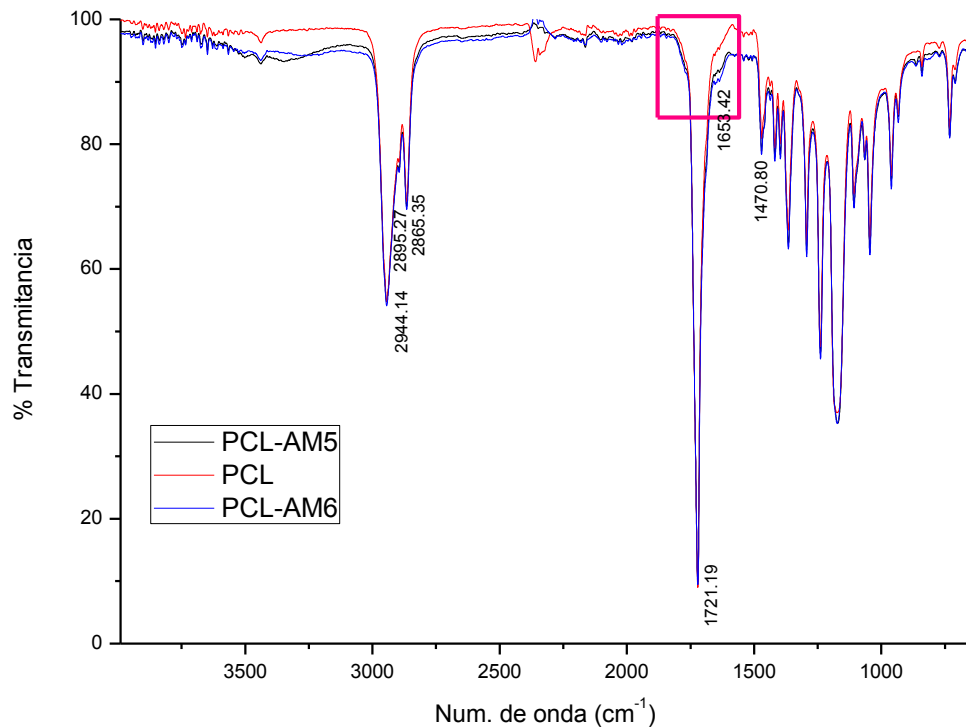


Figura 24. Espectros FTIR de PCL y PCL injertada con AM (PCL-AM5 y PCL-AM6).

Con la finalidad de incrementar el porcentaje de funcionalización en el polímero se repitió la reacción, en esta ocasión se duplicó la cantidad de anhídrido maleico (20% en peso de AM respecto a PCL) y se mantuvo el contenido de BPO en 5 % en peso respecto a AM.

El espectro generado tras efectuar la reacción con mayor cantidad de AM se muestra en la figura 25, donde se hace evidente que además del hombro que mostraban los polímeros PCL-AM5 y PCL-AM6, que en este caso se encuentra en 1648 cm⁻¹, existe una banda en 1779 cm⁻¹, debida posiblemente al AM presente en la cadena polimérica.

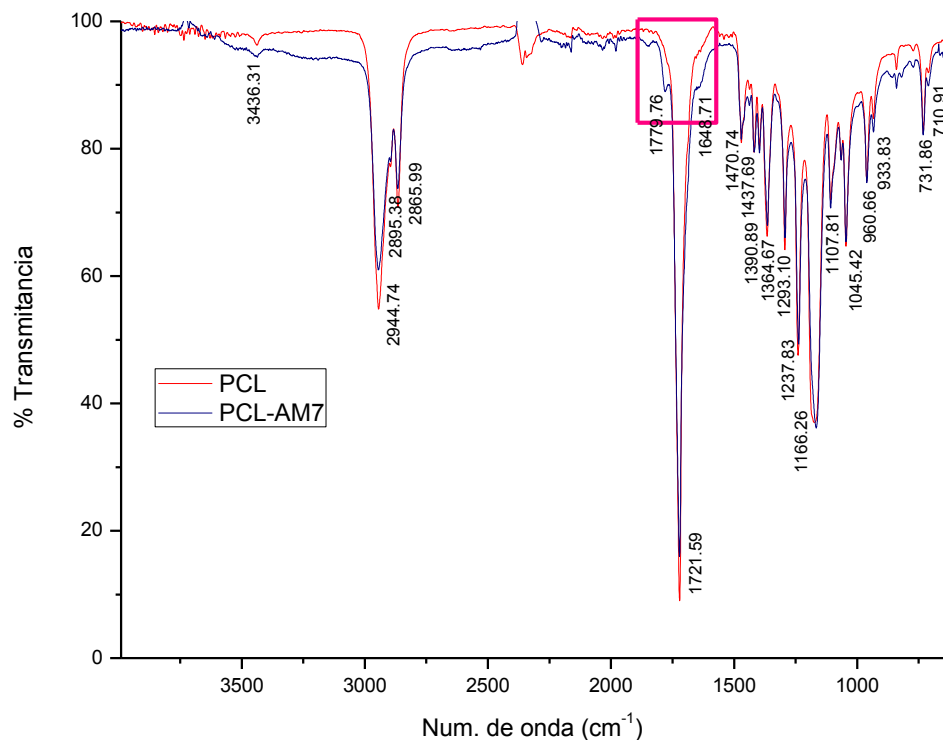


Figura 25. Espectros de FTIR de PCL y PCL funcionalizada con AM (PCL-AM7).

El espectro de FTIR del polímero funcionalizado (PCL-AM7) se comparó con el del AM, y se establecieron las señales características del anhídrido en el intervalo de 1855 cm⁻¹ a 1631 cm⁻¹, como se observa en la figura 26, las cuales coinciden con las señales presentes en el material obtenido tras la reacción, lo cual es un indicativo de que la cantidad de anhídrido empleado modificó al polímero en una fracción suficiente para ser perceptible mediante este análisis.

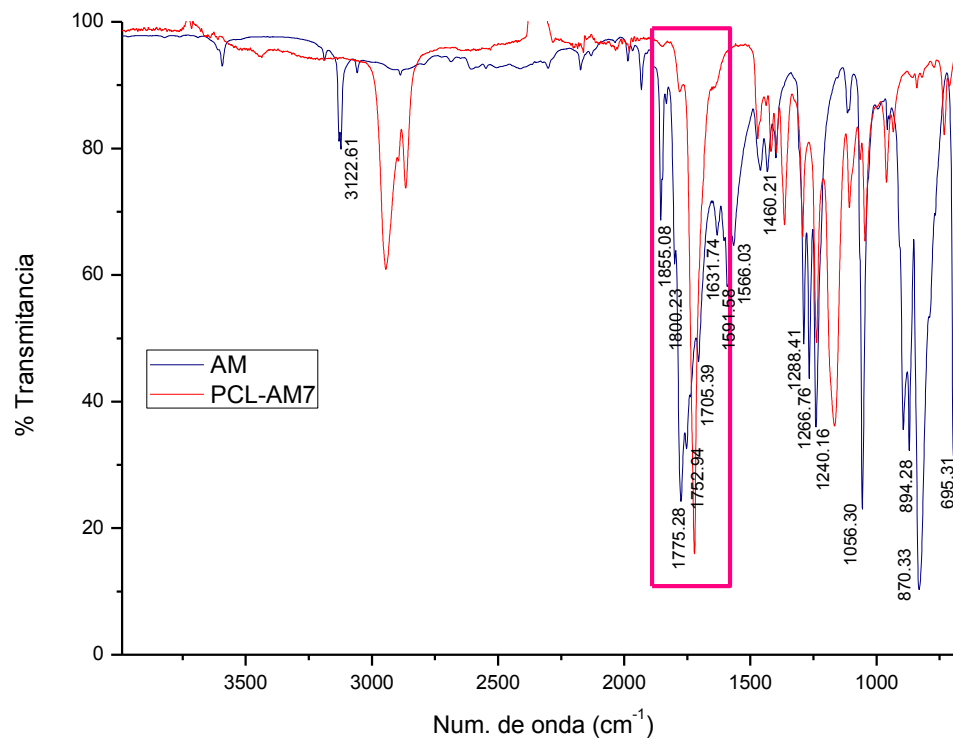


Figura 26. Espectros FTIR de AM y PCL-AM7 (funcionalizada).

En la tabla 12 se enumeran las bandas presentes en el espectro de PCL y se relacionan con los grupos funcionales correspondientes a ellas y en la tercer columna se muestran las bandas atribuidas a PCL-AM.

Tabla 12. Bandas características de PCL y PCL-AM obtenidas por FT-IR.

Vibración	Bandas (cm ⁻¹) PCL	Bandas (cm ⁻¹) PCL-AM
CH ₂ extensión asimétrica	2944	2944
CH ₂ extensión simétrica	2864	2866
C=O extensión	1722	1779, 1721, 1648
C-O y C-C extensión	1293	1293
C-O-C extensión asimétrica	1239	1238
C-O-C extensión simétrica	1136, 1107, 1065, 1035	1107, 1065, 1045

Análisis por Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H -RMN).

El espectro mostrado en la figura 27 corresponde a la PCL y en él se aprecian 4 picos característicos en 4.00, 2.25, 1.59 y 1.32 ppm, además del correspondiente al estándar (TMS), que está en 0 ppm y el del disolvente (cloroformo deuterado, CDCl_3) en 7.21 ppm; lo cual concuerda con lo encontrado por C.-H. Kim et al. [34], en cuyos espectros las bandas propias de la PCL aparecen alrededor de 4.15, 2.25, 1.7 y 1.25 ppm, respectivamente. De forma adicional a lo reportado se nota un pequeño pico en 1.88 ppm, el cual puede atribuirse a algún subproducto de la polimerización de la PCL.

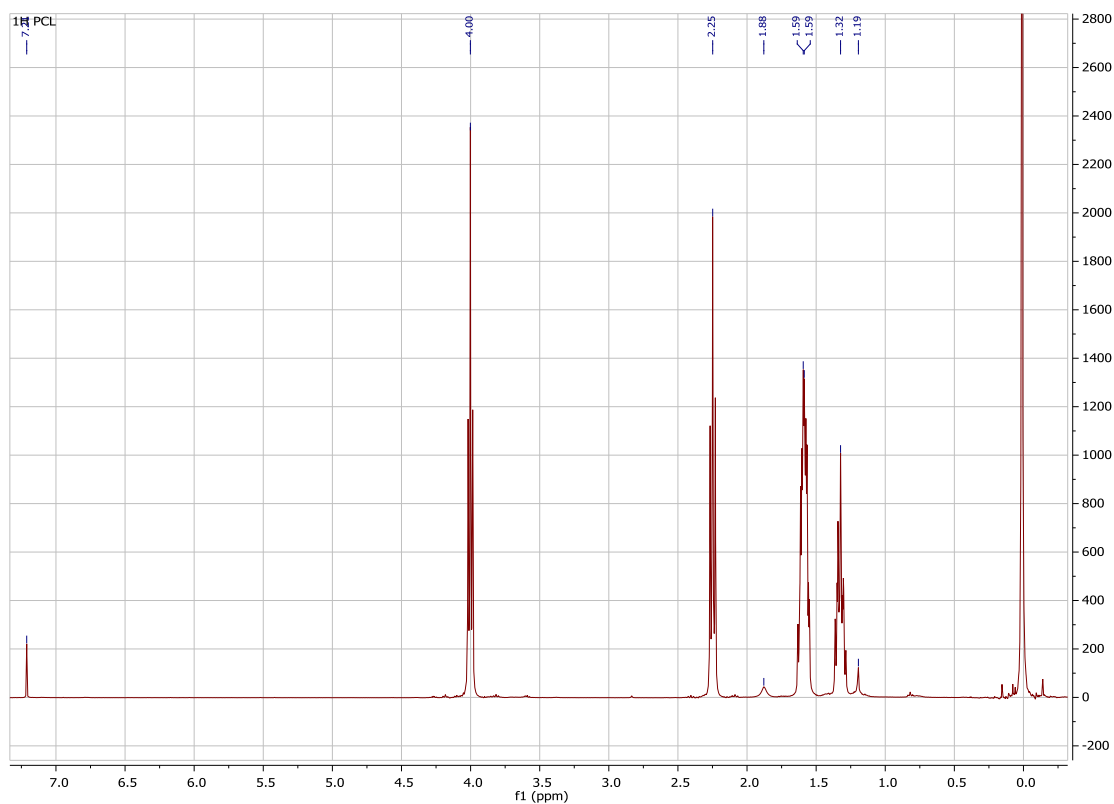


Figura 27. Espectro ^1H -RMN de PCL.

Los espectros de los polímeros denominados PCL-AM2 y PCL-AM3 se muestran en la figura 28, donde se observa que los materiales presentan únicamente los picos correspondientes a PCL, por lo que se descarta la presencia de anhídrido maleico unido al polímero, al menos en

cantidades detectables por esta técnica. Además, se observa la desaparición del pequeño pico en 1.88 ppm, que se observaba en el espectro de la PCL.

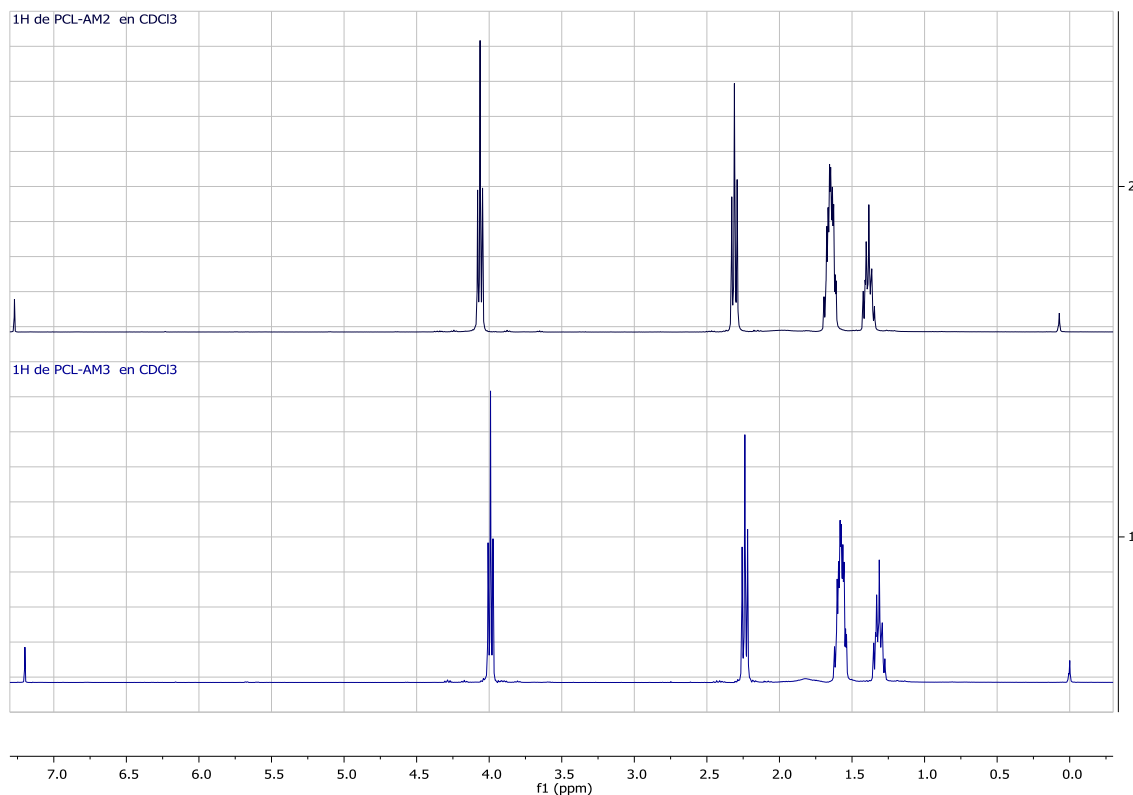


Figura 28. Espectro de ¹H-RMN de PCL-AM2 y PCL-AM3.

Los espectros de ¹H-RMN de PCL-AM6 y PCL-AM7 se presentan en la figura 29, éstos muestran los picos característicos de PCL y un pico más de poca intensidad en 3.85 ppm, ocasionado posiblemente por la unión del AM al polímero, la cual pudo lograrse debido a que la reacción se efectuó en atmósfera inerte y a que se incrementó la cantidad de iniciador adicionado. En el caso de PCL-AM7, la intensidad del pico en 3.85 ppm tuvo un incremento, debido a que se duplicó la cantidad de AM durante la reacción, lo que favoreció el proceso de funcionalización.

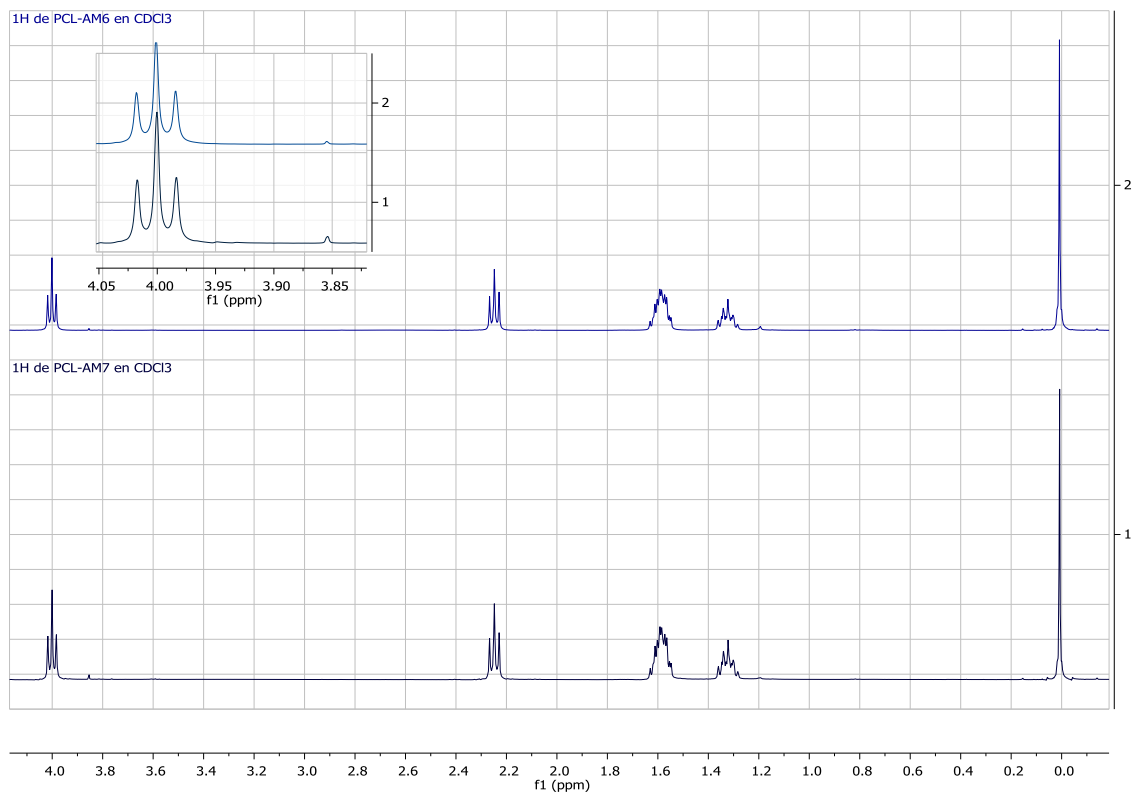


Figura 29. Espectros de 1H-RMN de PCL-AM6 y PCL-AM7.

En la tabla 13 se muestran los desplazamientos en RMN de protón para PCL y PCL-AM (funcionalizada), y se les relaciona con los grupos atribuidos a cada desplazamiento.

Tabla 13. Desplazamientos característicos de PCL y PCL-AM.

DESPLAZAMIENTO	PCL (ppm)	PCL-AM6 (ppm)	PCL-AM7 (ppm)
CDCl ₃	7.271	7.21	7.21
-CH ₂ -CH-O-	4.00	4.00	4.00
-CH- (anhídrido)	--	3.85	3.85
RCOO-CH	2.25	2.25	2.25
R-CH ₂ - (alcano)	1.59, 1.32, 1.19	1.59, 1.32, 1.19	1.59, 1.32, 1.19
TMS	0	0	0

Determinación del porcentaje de AM funcionalizado.

A partir de los espectros de ^1H -RMN obtenidos, se atribuye al AM funcionalizado el pico en 3.85 ppm, debido a que en el espectro de la PCL no se detecta, y a partir del área de éste se determina el porcentaje de funcionalización en el polímero. La cuantificación de las áreas debajo de los picos en 3.85 ppm fue de 0.004 para PCL-AM6 (figura 30), y 0.012 para el polímero denominado PCL-AM7 (figura 31), el incremento se debe a que en esta última reacción se duplicó la cantidad de AM adicionado. Los cálculos del porcentaje de funcionalización para ambos polímeros indican 0.716 % y 2.147 % de AM unido, respectivamente.

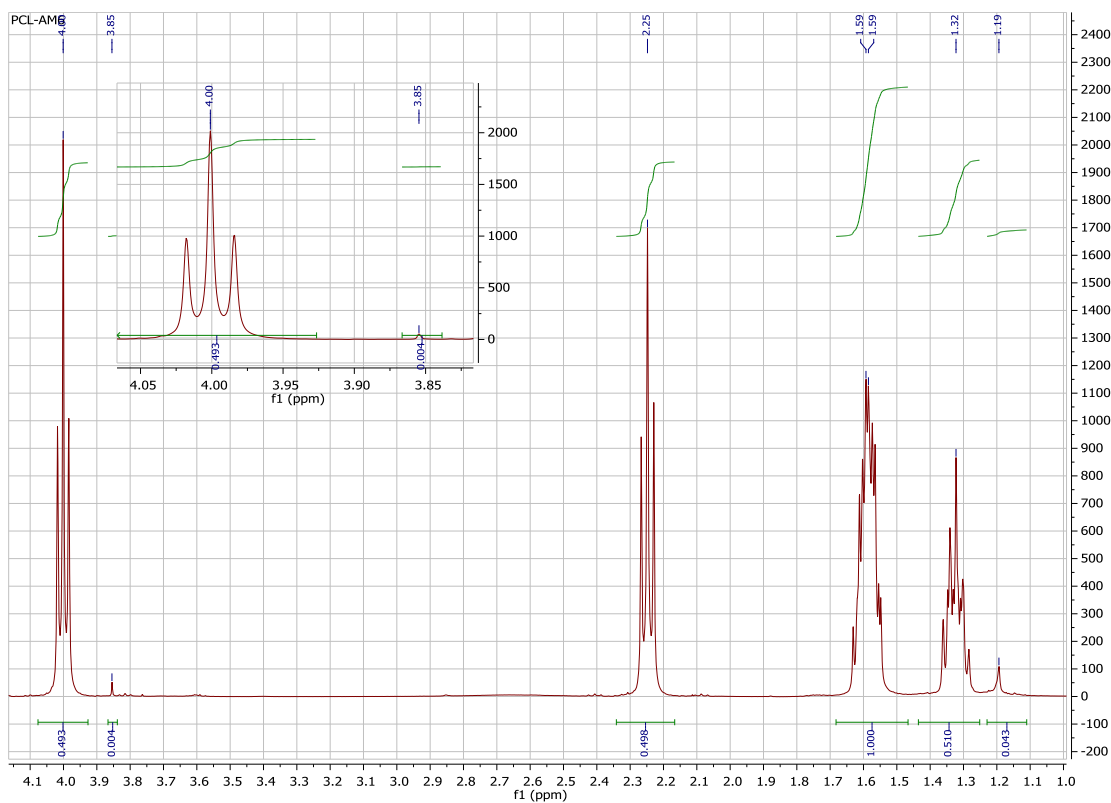


Figura 30. Espectro de ^1H -RMN de PCL-AM6, con las áreas de cada pico.

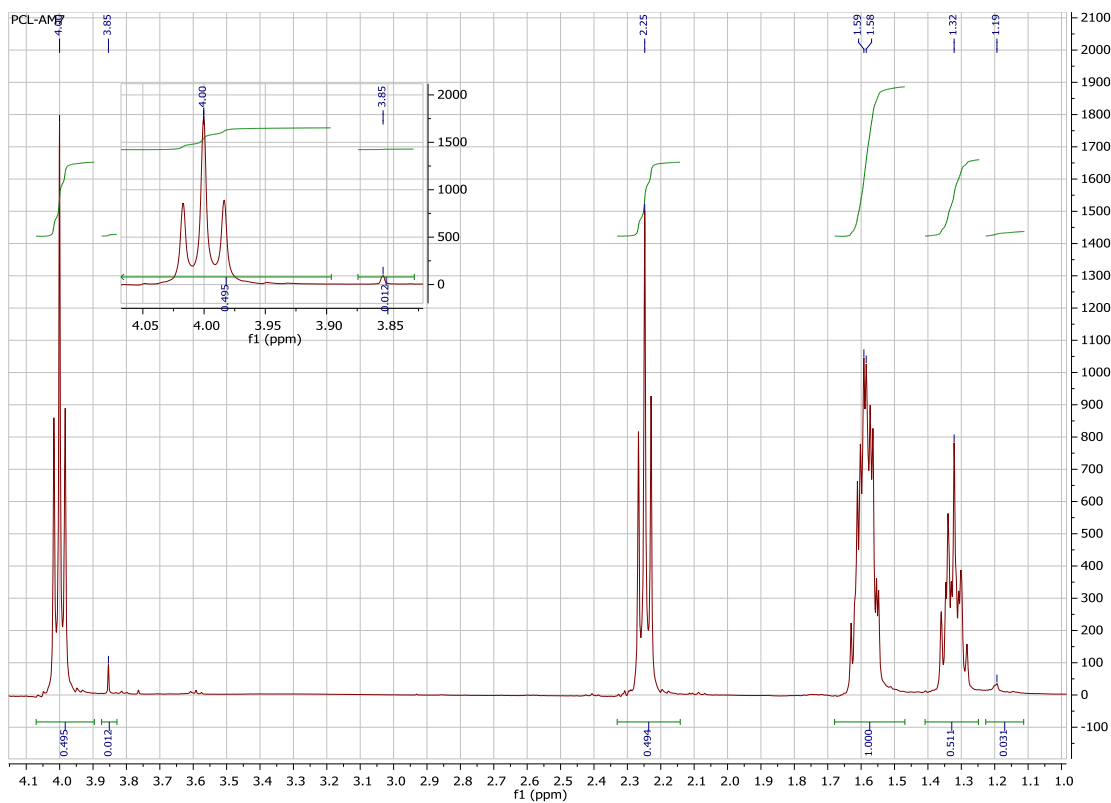


Figura 31. Espectro de ^1H -RMN de PCL-AM7, con las áreas de cada pico.

De los resultados obtenidos tras caracterizar la PCL-AM se deduce que las mejores condiciones para efectuar la reacción de funcionalización se logran con atmósfera inerte durante todo el proceso, 10 % en peso de AM con respecto a PCL y 5 % en peso de BPO respecto a AM; con éstas se logra un mayor grado de funcionalización de la PCL, sin embargo, la ruptura de cadenas se incrementa de manera proporcional al contenido de AM utilizado.

4.2.3. Optimización de las condiciones de electrohilado del polímero funcionalizado.

Se realizaron pruebas de electrohilado de los polímeros funcionalizados, para ello se usó la mezcla de disolventes DCM-DMF (80:20) y se modificaron ligeramente los parámetros de electrohilado de PCL con este sistema, encontrados durante la primera etapa de la experimentación (sección 4.1).

La solución del polímero PCL-AM5 al 12 % se inyectó con flujo de 0.5 mL/h y voltaje de 8.5 kV, con lo cual se obtuvieron fibras con diámetro promedio de 553 nm y desviación estándar de 122 nm, como se observa en la figura 32 (a). El polímero PCL-AM6 se sometió a electrohilado con flujo de 0.5 mL/h y voltaje de 8.5 kV, con ello se generaron fibras con diámetro de 711 nm y desviación estándar de 362 nm, el andamio se presenta en la figura 32 (b).

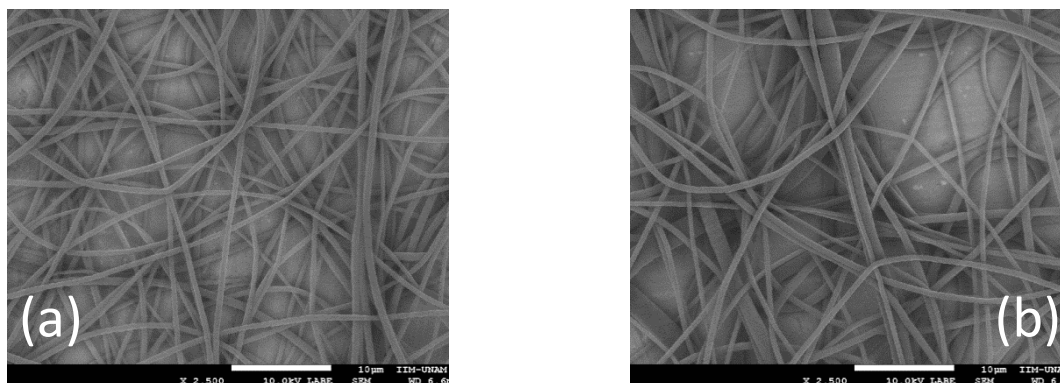


Figura 32. Micrografías de MEB de los andamios de PCL con AM. (a) PCL-AM5 y (b) PCL-AM6; aumento de 2500x.

Con el polímero funcionalizado PCL-AM7 se preparó una solución al 12 %, la cual se inyectó con flujo de 0.5 mL/h, voltaje de 9 kV y distancia de 25 cm, tras lo cual generó fibras de 482 nm de diámetro, con desviación estándar de 209 nm, como se observa en la figura 33.

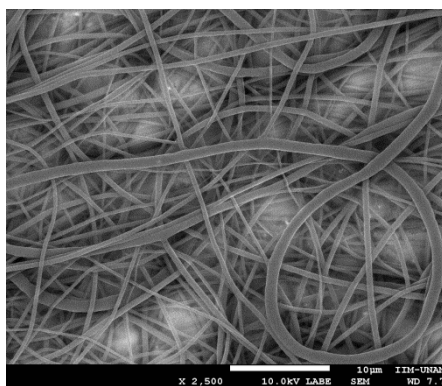


Figura 33. Micrografía de MEB del andamio PCL-AM7; aumento de 2500x.

Después de observar la morfología de los andamios de PCL funcionalizada, obtenidos por electrohilado, se dedujo que debido a la reducción de peso molecular del polímero durante la

reacción con AM y a la disminución en la viscosidad de las soluciones poliméricas, se facilitó el proceso de electrohilado y las fibras presentaron menor diámetro que en el caso de PCL, aunque el andamio mostró una distribución de diámetros de las fibras ligeramente mayor que la del polímero sin funcionalizar.

4.2.4. Efecto de la funcionalización de PCL con AM.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Los termogramas de DSC contenidos en la figura 34, muestran dos transiciones para la PCL: temperatura de transición vítrea (T_g) en $-69.18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y temperatura de fusión en $55.70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los polímeros funcionalizados (PCL-AM6 y PCL-AM7) presentan una disminución considerable de la T_g con respecto a la PCL pura, en ellos las transiciones vítreas aparecen en $-51.75\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-51.69\text{ }^{\circ}\text{C}$ y los picos debidos a la fusión se encuentran en $69.18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $65.38\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

El cambio en las temperaturas a las cuales se dan las transiciones, se debe posiblemente, a que el polímero adquiere cierta rigidez al funcionalizarlo con anhídrido maleico y se reduce el peso molecular; debido a ello sus transiciones térmicas se dan a mayor temperatura que en el caso de la PCL pura. En la figura 34 se muestran los termogramas correspondientes a PCL, PCL-AM6 y PCL-AM7.

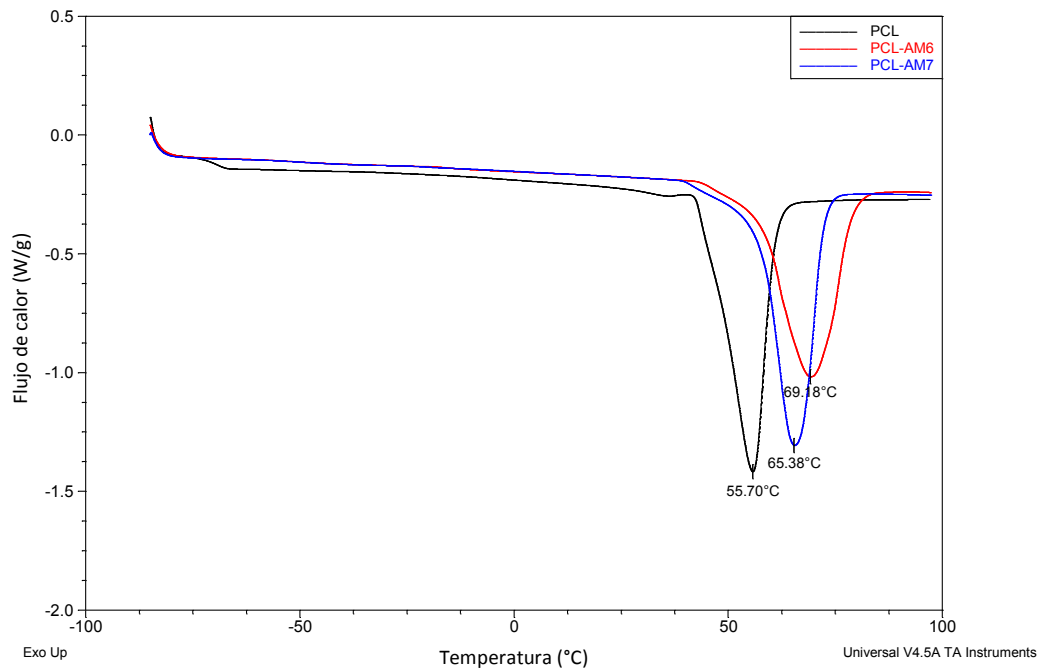


Figura 34. Comparativo de los termogramas de DSC de PCL y PCL-AM (funcionalizada).

En la tabla 14 se resumen las transiciones encontradas mediante DSC para PCL y PCL funcionalizada (PCL-AM).

Tabla 14. Resultados de DSC para PCL y PCL-AM.

MUESTRA	T _g (°C)	T _{fusión} (°C)
PCL	-69.18	55.70
PCL-AM6	-51.75	69.18
PCL-AM7	-51.69	65.38

Análisis Termogravimétrico (TGA).

El termograma de TGA (figura 35) de PCL muestra únicamente una pérdida de peso de 99.73 % que inicia a una temperatura de alrededor de 300 °C y termina alrededor de 560°C, la cual es indicativa de la degradación del polímero. Esto significa que la PCL se degrada en una sola etapa y de forma casi total.

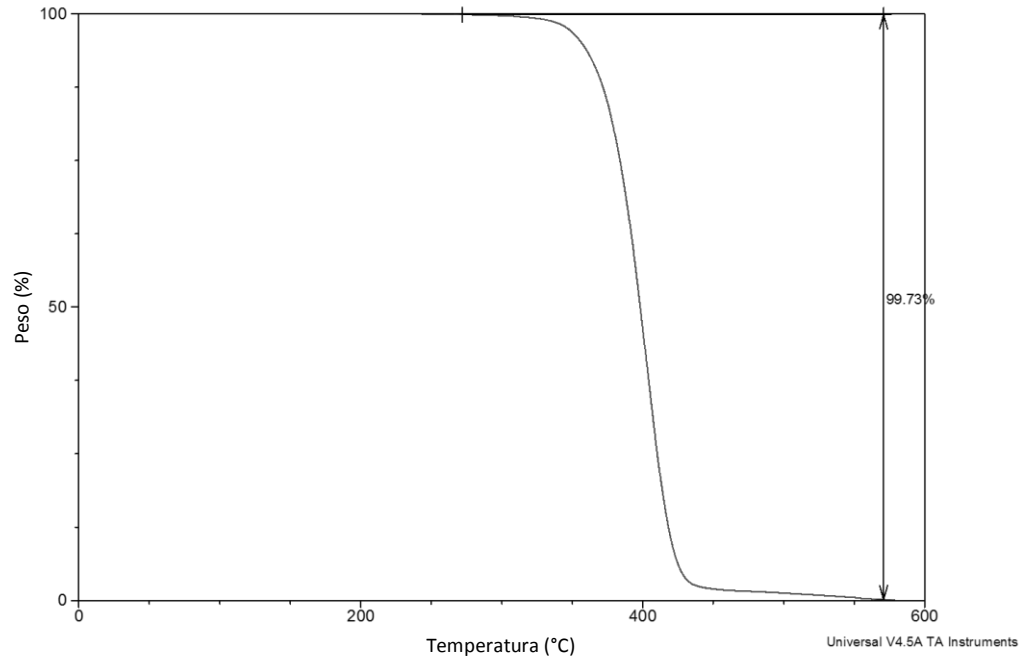


Figura 35. Termograma de TGA de PCL.

El termograma del polímero funcionalizado (PCL-AM7) muestra una primer pérdida de peso de 2.895 % que inicia alrededor de los 50 °C y termina en 300 °C, debida posiblemente a cadenas poliméricas cortas y/o a la presencia de anhídrido maleico y una segunda de 96.78 % en el intervalo de 320 °C a 550 °C, ocasionada por la descomposición del polímero, como se observa en la figura 36.

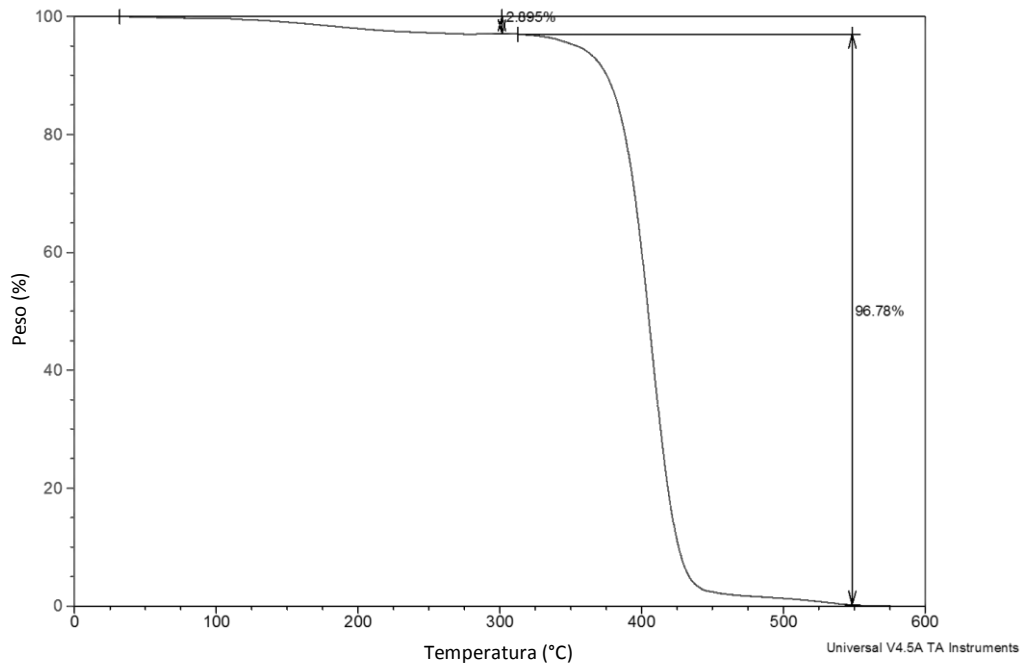


Figura 36. Termograma de TGA de PCL injertada (PCL-AM7).

En el termograma de dTGA de PCL-AM7, alrededor de 320 °C se observan unas pequeñas señales (figura 38), cuando se hace una gráfica de la primera derivada del peso con respecto a la temperatura ($dTGA = dp/dT$) y se calculan las pérdidas de peso para PCL-AM7, se tienen unas transiciones que probablemente se deben a la funcionalización de PCL con anhídrido maleico, estas son: una pérdida de 0.02290 %/°C en 308.80°C, otra de 0.01461 %/°C en 320.89 °C y, por último, una de 0.04625 %/°C en 340.64 °C.

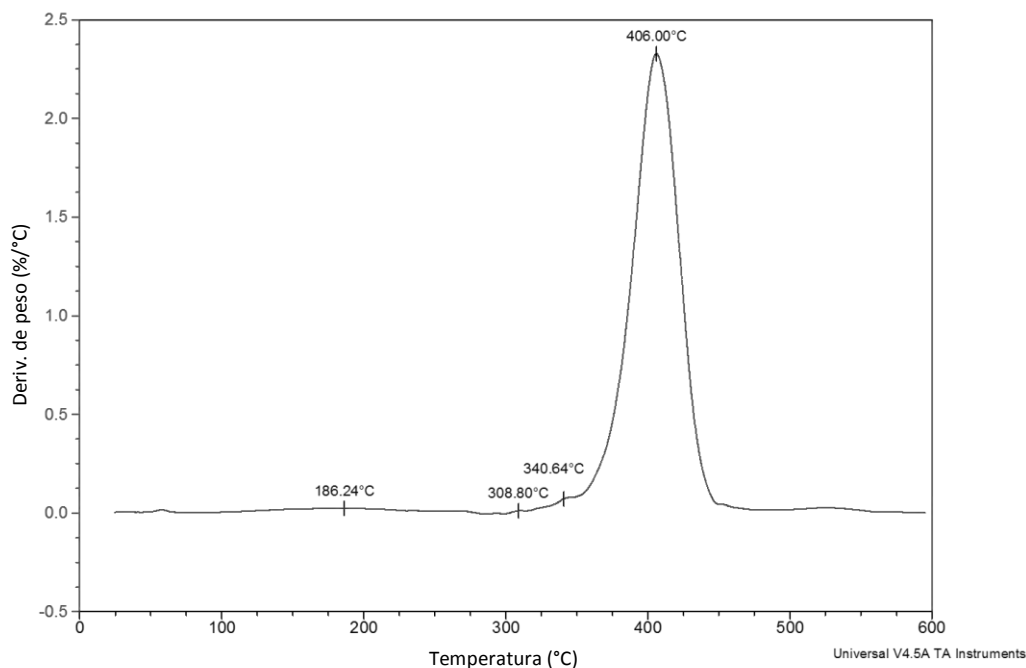


Figura 37. Termograma de dTGA de PCL-AM7, primera derivada del peso.

El comparativo de los termogramas de dTGA de la PCL y los polímeros funcionalizados (PCL-AM6 y PCL-AM7) muestra un comportamiento semejante para todos los materiales, al tener la mayor pérdida de peso entre los 300 °C y 500 °C, como puede observarse en la figura 38. En el caso de la PCL, el pico en la pérdida de peso se da en 402.37°C, mientras que para los polímeros funcionalizados se da en 405.92 °C y 406.75 °C, para PCL-AM6 y PCL-AM7, respectivamente, lo cual indica que se tiene un pequeño incremento en la rigidez del material y éste se degrada a una temperatura ligeramente mayor, debido al cambio estructural generado por la funcionalización con AM.

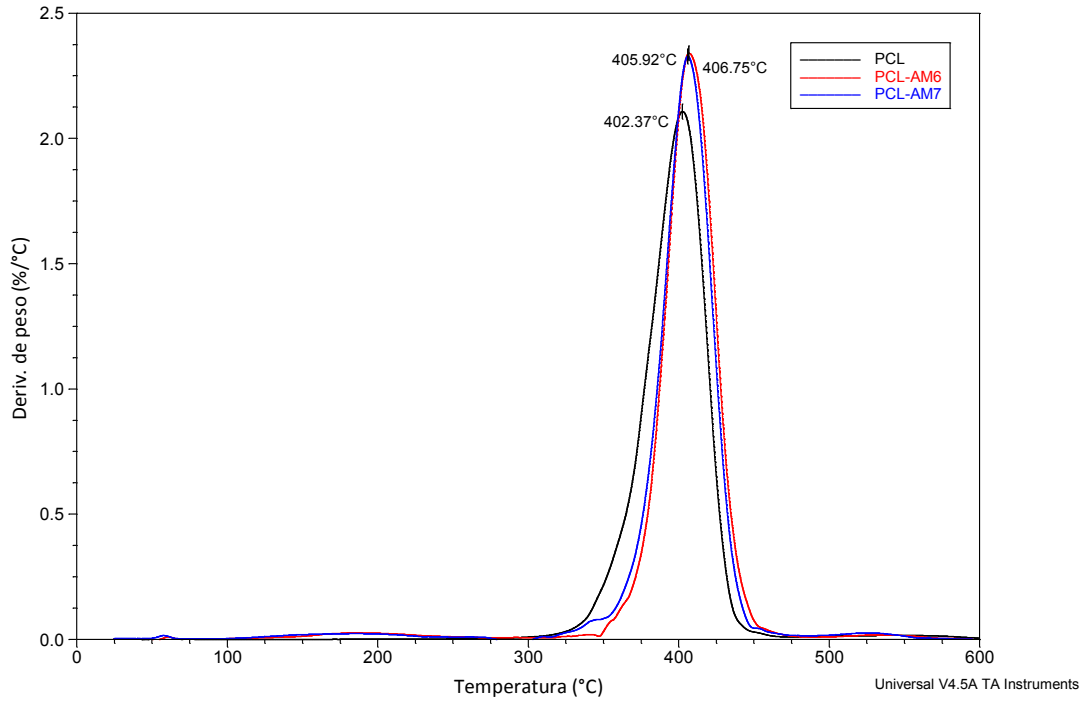


Figura 38. Comparativo de los termogramas de dTGA.

En la tabla 15 se presentan las pérdidas de peso correspondientes a cada polímero, obtenidas mediante los termogramas de TGA.

Tabla 15. Resultados de TGA para PCL y PCL-AM.

Muestra	T _{inicial} (°C)	Pérdida de peso (%)
PCL	230	99.73
PCL-AM6	100	3.559
	320	96.19
PCL-AM7	50	2.895
	320	96.78

4.3. Modificación superficial de andamios con celulosa.

El mecanismo mediante el cual se da la interacción entre PCL y celulosa es por adsorción física, en este se pretende únicamente recubrir las fibras del andamio con celulosa, mediante fuerzas electrostáticas y de Van der Waals, así como mediante puentes de hidrógeno, a fin de impartir hidrofiliidad al polímero. Sin embargo, debido a que la celulosa es un biopolímero altamente hidrofílico, se espera que tenga mayor afinidad por los andamios de PCL-AM (funcionalizados), ya que éstos tienen mayor grado de hidrofiliidad que los del polímero puro.

4.3.1. Morfología de los Andamios con Celulosa.

La primera técnica de adsorción de celulosa en el andamio de PCL propuesta en la sección 3.2.5.2, consistía en la inmersión del andamio en una solución de celulosa. Este proceso generó una película delgada sobre las fibras, lo cual llevó a una pérdida casi total de porosidad de la estructura, como se aprecia en la figura 39.

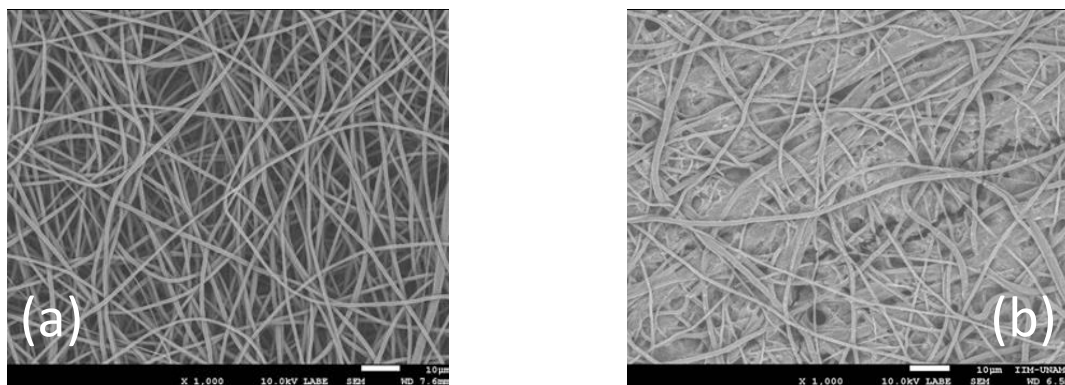


Figura 39. Andamios de PCL (a) sin celulosa adsorbida y (b) con celulosa adsorbida, aumento de 1000x.

La segunda técnica de aplicación de la solución de celulosa, consistió en depositarla por aspersion sobre el andamio de PCL, con lo cual se logró conservar cierto grado de porosidad superficial (alrededor de 10 %), y la celulosa se distribuyó de forma casi homogénea en la superficie de las fibras, como se observa en la figura 40.

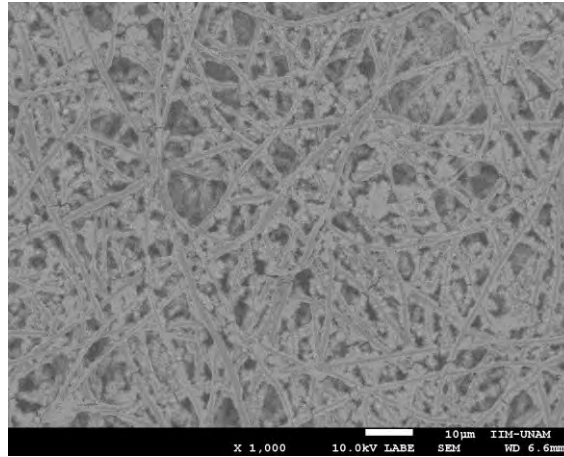
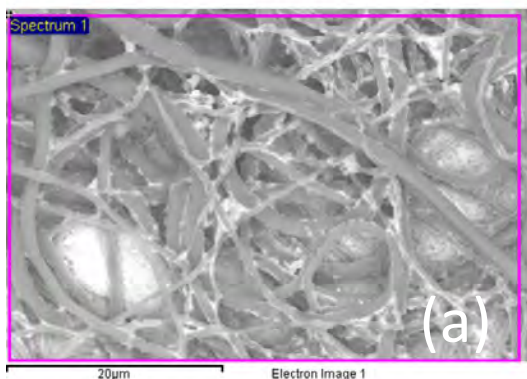


Figura 40. Andamio de PCL con celulosa asperjada, aumento de 1000x.

4.3.2. *Análisis elemental por EDS.*

Se realizó un análisis elemental (EDS) al andamio con celulosa asperjada, cuya micrografía se presenta en la figura 41 (a), debido a que a la solución de celulosa que se aplicó sobre los andamios contenía NaOH, para lograr la disolución. En el EDS se detectó 5.08 % de sodio en la muestra, como se observa en la figura 41 (b); la figura 41 (c) muestra el espectro con los resultados obtenidos del análisis de un área de la muestra.

Se analizaron varias zonas de la muestra y los datos obtenidos indicaron un contenido promedio de NaOH en el andamio de menos de 4 %, además en las micrografías se observa una cantidad pequeña de celulosa sobre el andamio. Cabe mencionar que el pico que se observa en el espectro en 1.5 keV corresponde al aluminio de la placa sobre la cual se encuentra soportado el andamio, así como al portamuestras usado en el análisis.



Elemento	% peso	% atómico
C K	52.11	63.93
O K	25.17	23.19
Na K	5.08	3.26
Total	17.64	9.63

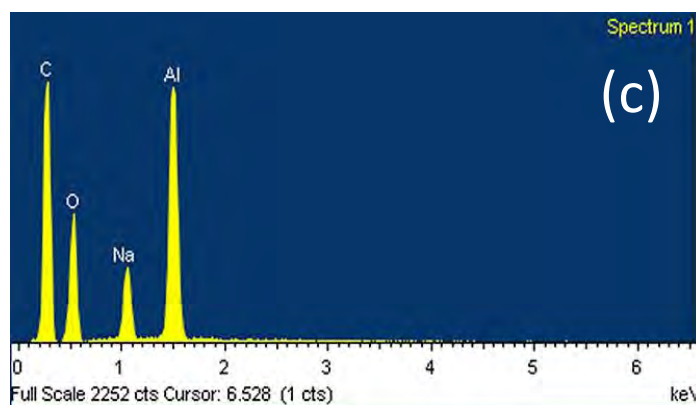
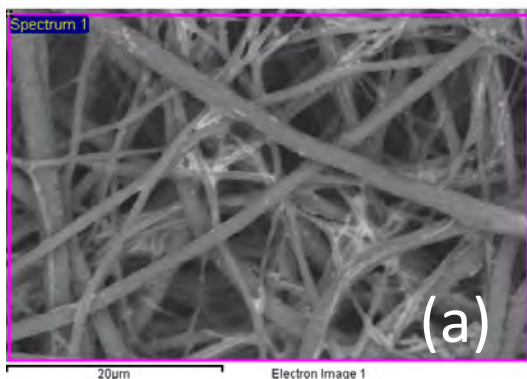


Figura 41. EDS de andamio de PCL con celulosa asperjada.

Con la finalidad de reducir el contenido de NaOH, después de la aspersión de celulosa sobre el andamio, se realizó un lavado de éste con vapores de HCl al 10 % v/v durante 45 min y se analizó por EDS después del proceso (figura 42 (c)). Se observó la formación de cloruro de sodio y se cuantificó el contenido de sodio en varias zonas, el valor promedio fue menor de 1%, con lo cual se consideró al material adecuado para llevarlo a pruebas biológicas. Sin embargo, en las micrografías de MEB se detectó que la distribución de la celulosa después del lavado del andamio era heterogénea, ésta se acumula en ciertas zonas (entre fibras), mientras que en la superficie de las fibras hay poca celulosa, como se aprecia en la figura 42 (a).



Elemento	% peso	% atómico
C K	68.49	77.36
O K	19.67	16.68
Na K	0.58	0.34
Al K	10.86	5.46
Cl K	0.40	0.15
Total	100.00	

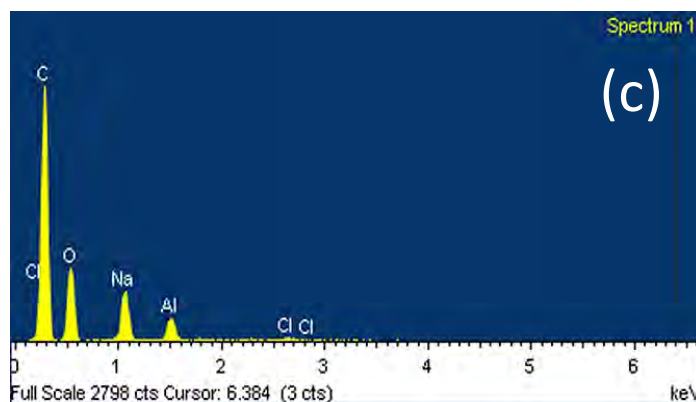


Figura 42. EDS de andamio de PCL con celulosa asperjada, después del lavado con vapores de HCl.

La deposición de celulosa mediante aspersión sobre los andamios presenta como principal problema la eliminación del NaOH, sin embargo, con el lavado de los andamios se espera la desaparición casi completa de éste. Por otra parte, las condiciones en las cuales se efectúa el lavado, pueden favorecer la reacción entre la PCL funcionalizada y la celulosa, ya que el lavado conlleva un periodo largo de calentamiento, lo que podría propiciar el injerto de celulosa en las fibras, pero no se tiene evidencia de esta unión.

4.3.3. Propiedades Mecánicas de los andamios de PCL y PCL-AM.

Se realizaron pruebas de tensión a los andamios de PCL obtenidos por electrohilado, para ello se usó como base la norma ASTM D1708-96 [36] y se determinó un valor de esfuerzo a la tensión de 2.92 MPa, módulo de Young de 5.36 MPa y elongación a la ruptura de 141.2 %; para

andamios electrohilados de PCL se han reportado valores de esfuerzo a la tensión de alrededor de 3 MPa, con elongación a la ruptura de 170 %, aproximadamente, por lo que los datos encontrados experimentalmente se consideran muy próximos a éstos. [38].

Los andamios de PCL funcionalizados con AM presentaron valores de resistencia a la tensión de 0.62 MPa, módulo de Young de 11.2 MPa y elongación a la ruptura de 13.9 %.

En la figura 43 se muestra el comportamiento en pruebas de tensión de PCL y PCL funcionalizada (PCL-AM), observándose una disminución del 78 % en la resistencia a la tensión del polímero que contiene AM, debido a la disminución de su peso molecular y al menor diámetro de las fibras que componen el andamio. Sin embargo, la PCL funcionalizada adquiere mayor elasticidad y su módulo de Young se incrementa más del 100%, lo que hace al material adecuado para aplicaciones en zonas que requieren cierta movilidad durante el proceso de regeneración.

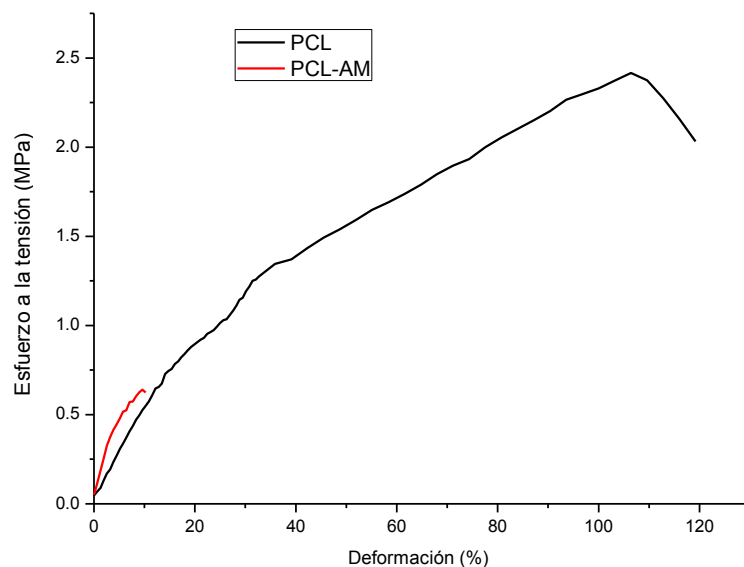


Figura 43. Diagrama de esfuerzo vs deformación.

De los valores de propiedades mecánicas encontrados para PCL-AM se deduce que con la funcionalización se redujo la resistencia a la tensión del polímero y se logró un incremento en la elasticidad, ya que el polímero funcionalizado duplicó el valor del módulo de Young de la PCL pura.

4.3.4. Hidrofilicidad de las Fibras (ángulo de contacto).

La determinación de ángulo de contacto de la PCL arrojó un valor de $115.64^\circ \pm 1.26^\circ$, lo cual confirmó su carácter hidrofóbico; los valores reportados para este polímero puro están en $118^\circ \pm 6^\circ$ [38]. Para la determinación del ángulo de contacto se depositó una gota de agua sobre el andamio y se tomaron imágenes durante 3 min, de las cuales se eligieron 3 tiempos (1, 90 y 180 segundos) para medir los ángulos. Al finalizar el tiempo de análisis el valor del ángulo para PCL permanecía prácticamente constante en $114.94^\circ \pm 1.11^\circ$.

En el caso de la PCL funcionalizada con AM se observó un incremento de alrededor del 35 % en la hidrofilicidad, con respecto a la PCL. Al inicio se tenía un ángulo de $98.56^\circ \pm 4.23^\circ$, a los 90 s disminuyó a $83.26^\circ \pm 4.92^\circ$ y a los 180 s se redujo hasta $73.99^\circ \pm 4.69^\circ$; este valor se mantuvo constante después de dicho tiempo, y la gota se extendió sobre el andamio polimérico. La figura 44 muestra los resultados obtenidos y la desviación estándar donde el valor más grande de la desviación estándar es para PCL-AM, lo cual puede deberse a una distribución poco homogénea del anhídrido en las cadenas poliméricas, lo que ocasiona que las diferentes zonas del andamio presenten comportamientos diversos, ya que las mediciones se realizan en diferentes partes de la muestra.

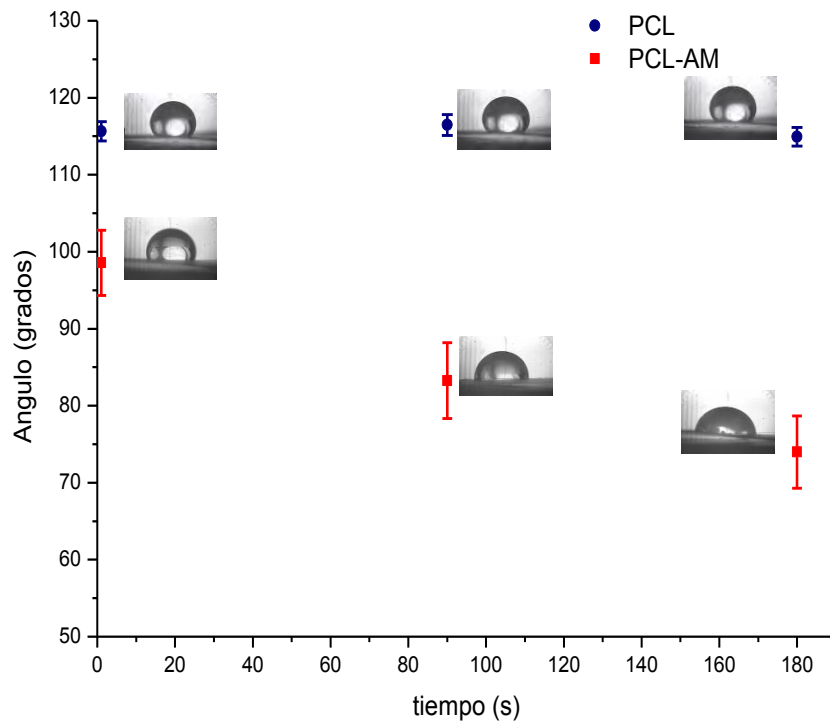


Figura 44. Medición de ángulo de contacto vs tiempo para PCL y PCL-AM (funcionalizada).

La determinación de ángulo de contacto para los andamios de PCL con celulosa adsorbida mostró una alta hidrofiliidad por parte del material, como se ve en la figura 45. Los ángulos iniciales estaban en $29.23^\circ \pm 5.15^\circ$, y éste disminuyó después de 3 minutos de medición a un valor de $12.83^\circ \pm 2.69^\circ$, lo cual indica que la gota se extiende sobre la superficie en función del tiempo, con una disminución en el ángulo del 88 % respecto a la PCL. En el caso de PCL-AM con celulosa injertada, se partió de un ángulo de $23.67^\circ \pm 3.64^\circ$ y, al transcurrir unos segundos, se redujo el ángulo hasta 0° , y en algunas zonas del andamio, desde el inicio se tenía un mojado total (ángulo de 0°), por lo que se deduce que la distribución de celulosa es heterogénea en la estructura. A pesar de ello, se tiene una superficie altamente hidrofílica, con características adecuadas para la adhesión y proliferación celular. La figura 45 muestra las mediciones de ángulo de contacto para los diferentes andamios antes y después de la adición de celulosa, donde se hace evidente que la funcionalización de la PCL favoreció la adsorción de celulosa sobre las fibras poliméricas, lográndose una superficie hidrofílica.

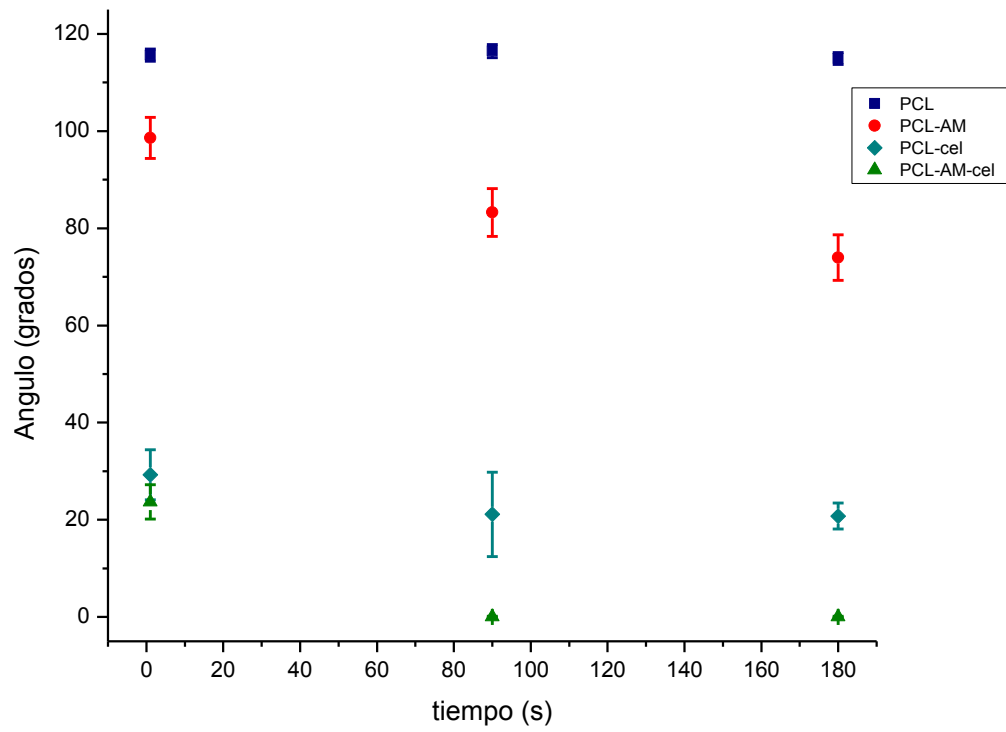


Figura 45. Ángulo de contacto para PCL y PCL-AM sin celulosa y con celulosa.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

La funcionalización de policaprolactona (PCL) con anhídrido maleico (AM) y la posterior modificación superficial de las fibras con celulosa asperjada incrementan notablemente la hidrofiliidad del andamio polimérico, lo cual le confiere las características adecuadas para la adhesión y crecimiento celular, debido a su hidrofiliidad y a la velocidad de degradación del polímero (3 a 4 años), por lo que se sugiere su uso para la regeneración de tejido óseo. La presencia de AM en las cadenas de PCL reduce en un 88 % el ángulo de contacto y contribuye a una mejor adhesión de la celulosa sobre las fibras poliméricas, lo que permite tener una superficie totalmente hidrofílica.

El sistema de disolventes empleado en la preparación de las soluciones poliméricas fue determinante para establecer las condiciones de electrohilado del polímero, y el uso de disolventes con elevada constante dieléctrica favoreció el proceso.

Durante este estudio se encontró que el sistema de disolventes más adecuado para electrohilado de la PCL es diclorometano/N,N-dimetilformamida (80:20) y, los parámetros óptimos fueron: concentración de PCL de 12 % p/v, flujo de inyección de 0.5 mL/h, voltaje de 8 kV y distancia aguja-colector de 25 cm.

Se encontraron evidencias sólidas de la funcionalización de PCL con AM tanto por espectroscopía FTIR, donde se observaron bandas debidas al AM, como por 1H-RMN, con la cual se determinó el porcentaje de AM unido a polímero, lográndose un 2.14% como máximo; asimismo, el análisis térmico (DSC y TGA) mostró una modificación en las transiciones del polímero. El mayor grado de funcionalización de PCL se logró con 10 % de AM con respecto a PCL y 5 % del iniciador (BPO) con respecto a AM.

Durante el proceso fue evidente que el grado de funcionalización se incrementa de forma proporcional a la cantidad de AM adicionado a la mezcla de reacción. Además, se detectó que

conforme aumenta la concentración de anhídrido en la mezcla reaccionante, se favorece la ruptura de las cadenas de PCL.

La técnica de aspersión de celulosa sobre los andamios fue mejor que la de inmersión, ya que la celulosa queda distribuida sobre las fibras de forma casi homogénea y se logra mantener cierta porosidad del andamio, lo que permite conservar las propiedades de la estructura polimérica y puede ser favorable para el crecimiento celular, mientras que con la inmersión se tenía una película de celulosa sobre la estructura. Sin embargo, el método utilizado para disolver la celulosa requiere la adición de hidróxido, lo cual hace necesario un lavado posterior del andamio para eliminarlo.

Las propiedades mecánicas de los andamios de PCL obtenidos por electrohilado presentan valores muy próximos a los reportados en las referencias; los andamios obtenidos a partir de soluciones que contenían DMF, fueron los que presentaron las mejores propiedades mecánicas y, tras la funcionalización del polímero con AM, la resistencia a la tensión se redujo en un 78 %, mientras que el módulo de Young duplicó su valor, lo cual indica mayor elasticidad del material.

RECOMENDACIONES

Realizar pruebas de biocompatibilidad y crecimiento celular a los andamios obtenidos durante este estudio.

Usar disolventes con mayor constante dieléctrica que el diclorometano o el cloroformo, para electrohilado de PCL, para reducir el diámetro de las fibras que constituyen al andamio.

Realizar la reacción de injerto de PCL con anhídrido maleico a temperaturas más bajas, para tratar de incrementar el grado de funcionalización y reducir la ruptura de cadenas del polímero.

Buscar nuevos métodos para disolver celulosa, a fin de evitar el uso de hidróxido de sodio y poder hacer el depósito de celulosa sobre el andamio sin necesidad de un lavado posterior que interfiera en la homogeneidad con que se distribuye ésta.

REFERENCIAS

- [1] J. O. Zoppe, M. S. Peresin, Y. Habibi, R. A. Venditti y O. J. Rojas, «Reinforcing Poly(ϵ -caprolactone) Nanofibers with Cellulose Nanocrystals,» *Applied Materials & Interfaces*, vol. 1, nº 9, pp. 1996-2004, 2009.
- [2] N. Mei, G. Chen, P. Zhou, X. Chen y Z.-Z. Shao, «Biocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) scaffold modified by Chitosan—the Fibroblasts Proliferation in vitro,» *J. Biomater. Application*, vol. 19, pp. 323-339, 2005.
- [3] N. Lin, G. Chen, J. Huang, A. Dufresne y P. R. Chang, «Effects of Polymer-Grafted Natural Nanocrystals on the Structure and Mechanical Properties of Poly(lactic acid): A Case of Cellulose Whisker-graft-Polycaprolactone,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 113, pp. 3417-3425, 2009.
- [4] H. Lönnberg, Q. Zhou, H. Brumer, T. T. Teeri, E. Malmström y A. Hult, «Grafting of Cellulose Fibers with Poly(ϵ -caprolactone) and Poly(L-lactic acid) via Ring-Opening Polymerization,» *Biomacromolecules*, vol. 7, pp. 2178-2185, 2006.
- [5] J.-H. Jang, O. Castano y H.-W. Kim, «Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, pp. 1065-1083, 2009.
- [6] E. Entcheva, H. Bien, L. Yin, C.-Y. Chung, M. Farrell y Y. Kostov, «Functional cardiac cell constructs on cellulose-based scaffolding,» *Biomaterials*, vol. 25, p. 5753–5762, 2004.
- [7] C. S. Wu, «A comparison of the structure, thermal properties, and biodegradability of polycaprolactone/chitosan and acrylic acid grafted polycaprolactone/chitosan,» *Polymer*, vol. 46, pp. 147-155, 2005.
- [8] A. J. Salgado, O. P. Coutinho y R. L. Reis, «Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends,» *Macromol. Biosci.*, vol. 4, p. 743–765, 2004.
- [9] N. Pallua y C. V. Suschek, *Tissue Engineering: From Lab to Clinic*, Londres: Springer, 2011.
- [10] D. W. Hutmacher, «Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - state of the art and future perspectives,» *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, vol. 12, nº 1, p. 107–124, 2001.
- [11] S. J. Barnes y L. P. Harris, *Tissue Engineering: Roles, Materials and Applications*, Nova Science Publishers, 2008.

- [12] J. F. A. Barreto, «Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción,» *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, vol. 1, nº 2, pp. 98-109, 2009.
- [13] C. Choong, J. T. Triffitt y Z. F. Cui, «Polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering. Effects of a Calcium Phosphate Coating Layer on Osteogenic Cells,» *Trans IChemE, Part C, Food and Bioproducts Processing*, vol. 82, nº C2, p. 117–125, 2004.
- [14] U. Welsch y J. Sobotta, *Histología*, 2a ed., Editorial Médica Panamericana S.A., 2009.
- [15] J. Arias, *Enfermería médico-quirúrgica II*, vol. 2, Tebar, 2000.
- [16] «Enciclopedia Médica en Línea,» 2011. [En línea]. Available: <http://www.ferato.com/wiki/index.php/Hueso>. [Último acceso: 26 08 2011].
- [17] «Stanford,» 2012. [En línea]. Available: <http://www.stanford.edu/group/mota/education/Physics%2087N%20Final%20Projects/Group%20Gamma/bone.htm>. [Último acceso: 20 10 2012].
- [18] M. Puska, A. J. Aho y P. Vallittu, «Intechopen,» 2011. [En línea]. Available: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-composite-materials-analysis-of-natural-and-man-made-materials/polymer-composites-for-bone-reconstruction>. [Último acceso: 2011].
- [19] X. Samain, V. Langlois, E. Renard y G. Lorang, «Grafting Biodegradable Polyesters onto Cellulose,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 121, p. 1183–1192, 2011.
- [20] T. J. Sill y H. A. v. Recum, «Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering,» *Biomaterials*, vol. 29, pp. 1989-2006, 2008.
- [21] A. L. Andrady, *Science and Technology of Polymer Nanofibers*, John Wiley & Sons, 2008.
- [22] H. Seyednejad, «Synthetic Scaffolds Based on Biodegradable, Functionalized Polyesters for Tissue Engineering Applications,» Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences (UIPS), Rotterdam, 2012.
- [23] M. A. Woodruff y D. W. Hutmacher, «The return of a forgotten polymer: Polycaprolactone in the 21st century,» *Progress in Polymer Science*, vol. 35, nº 10, p. 1217–1256, 2010.
- [24] G. F. Moore y S. M. Saunders, *Advances in Biodegradable Polymers*, vol. 98, Rapra Technology Ltd., 1997, p. 126.
- [25] M. Kutz, *Applied Plastics Engineering Handbook: Processing and Materials*, W. Andrew, Ed., Elsevier Science, 2011, p. 574.

- [26] J. M. Williams, A. Adewunmi, R. M. Schek, C. L. Flanagan, P. H. Krebsbach, S. E. Feinberg, S. J. Hollister y S. Das, «Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering,» *Biomaterials*, vol. 26, pp. 4817-4827, 2005.
- [27] J.-L. Wertz, O. Bédué y J. P. Mercier, *Cellulose Science and Technology*, Italia: EPFL Press, 2010, p. 364.
- [28] S. Thomas y R. Stephen, *Rubber Nanocomposites: Preparation, Properties and Applications*, John Wiley & Sons, 2010, p. 896.
- [29] W. K. Czaja, D. J. Young, M. Kawecki y R. M. J. Brown, «The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications,» *Biomacromolecules*, vol. 8, nº 1, pp. 1-12, 2007.
- [30] H. S. Yoo, T. G. Kim y T. G. Park, «Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, p. 1033–1042, 2009.
- [31] W. Ji, Y. Sun, F. Yang, J. J. J. P. van den Beucken, M. Fan, Z. Chen y J. A. Jansen, «Bioactive Electrospun Scaffolds Delivering Growth Factors and Genes for Tissue Engineering Applications,» *Pharm Res*, vol. 28, p. 1259–1272, 2011.
- [32] A. Bhattacharya y B. N. Misra, «Grafting: a versatile means to modify polymers. Techniques, factors and applications,» *Prog.Polym. Sci.*, vol. 29, p. 767–814, 2004.
- [33] D. Muenprasat, S. Suttireungwong y C. Tongpin, «Muenprasat, D., SuttireFunctionalization of Poly(Lactic Acid) with Maleic Anhydride for Biomedical Application,» *Journal of Metals, Materials and Minerals*, vol. 20, nº 3, pp. 189-192, 2010.
- [34] C.-H. Kim, K. Cho y J.-K. Park, «Grafting of glycidyl methacrylate onto polycaprolactone: preparation and characterization,» *Polymer*, vol. 42, pp. 5135-5142, 2001.
- [35] H. Qi, Q. Yang, L. Zhang, T. Liebert y T. Heinze, «The dissolution of cellulose in NaOH-based aqueous system by two-step process,» *Cellulose*, vol. 18, pp. 237-245, 2011.
- [36] «ASTM D1708-96. Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics By Use of Microtensile Specimens.»
- [37] J. John, J. Tang, Z. Yang y M. Bhattacharya, «Synthesis and Characterization of Anhydride-Functional Polycaprolactone,» *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 35, nº 6, pp. 1139-1148, 1997.
- [38] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M.-H. Nasr-Esfahani y S. Ramakrishna, «Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering,» *Biomaterials*, p. 4532–4539, 2008.

- [39] D. A. Skoog, F. J. Holler y T. A. Nieman, Principios de Análisis Instrumental, 5a ed., Madrid: McGraw-Hill, 2001, p. 1028.
- [40] R. C. Hibbeler, Mecánica de materiales, 7a ed., Pearson Educación, 2006, p. 876.
- [41] Miravete, A.; Cuartero, J.; Asociación Española de Materiales Compuestos, Materiales Compuestos, Reimpresión ed., vol. 1, Reverte, 2003, p. 953.
- [42] F. Li, O. Castano, Y. Wu y B. Ong, Organic Thin Film Transistor Integration, John Wiley & Sons, 2011, p. 268.
- [43] H. F. Li, H. Li, X. Zhong, X. Li, M. E. Gibril, Y. Zhang, K. Q. Han y M. Yu, «Study on the chemical modification of Cellulose in Ionic Liquid with Maleic Anhydride. , ,,» *Advanced Materials Research*, Vols. %1 de %2581-582, pp. 287-291, 2012.

ANEXOS

Anexo 1. Técnicas y Métodos de Caracterización.

1.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Consiste en barrer mediante un rastreo programado la superficie de un sólido con un haz de electrones de elevada energía y como consecuencia de ello se producen en la superficie diversos tipos de señales. Estas incluyen electrones retrodispersados, secundarios y Auger, fotones debidos a la fluorescencia de rayos X y otros fotones de diversas energías. Todas estas señales se emplean en estudios de superficies, pero las más usuales son las correspondientes a electrones retrodispersados y secundarios.

Cuando un electrón colisiona con un átomo se produce un cambio en la dirección del electrón pero se mantiene intacta la velocidad del mismo, por lo tanto su energía cinética permanece casi constante. Algunos de los electrones pierden energía por colisiones inelásticas y permanecen en el sólido; sin embargo, la mayoría experimenta numerosas colisiones y como resultado acaban saliendo de la superficie como electrones retrodispersados. [39]

1.1.1. Cálculo de diámetro promedio con ImageJ®.

- i. Abrir imagen en el programa ImageJ, para ello se selecciona en el menú *File* la opción *Open...* y el archivo que contiene la micrografía a medir.
- ii. Seleccionar de la barra la herramienta de medición "*Straight*" y con ella trazar una línea de un extremo al otro de la barra de escala de la micrografía.
- iii. Determinar la escala de medición estableciendo la relación micras-píxeles, para ello seleccionar el menú *Analyze*, la opción *Set scale...* y fijar la medida.
- iv. Medir el diámetro de las fibras trazando con la herramienta *Straight* una línea que abarque el ancho de la fibra.

- v. Una vez trazada la línea sobre la fibra, seleccionar el menú *Analyze* y la opción *measure* ó la secuencia *Ctrl+M*, con lo cual se grabará la medida en una ventana de resultados.
- vi. Repetir los pasos iv y v para cada una de las fibras a medir.
Un vez que se tienen todas las mediciones, en la ventana de resultados seleccionar del menú *Results*, la opción *distribution...* y elegir *length*. Esto arrojará una gráfica con la distribución de diámetros.
- vii. Acceder al menú *Results* y seleccionar *Summarize*, para calcular la desviación estándar y otros parámetros estadísticos.
- viii. Copiar los datos de las mediciones y la distribución en una hoja de cálculo.
- ix. Con los datos de la distribución graficar los resultados en la hoja de cálculo.

NOTA: Se miden mínimo 20 fibras por micrografía.

1.2. Cromatografía de Permeación en Gel (GPC).

Es una técnica que se aplica a materiales de elevado peso molecular, los rellenos para las columnas de cromatografía están constituidos por pequeñas partículas poliméricas (10 μm) o de sílice que contienen una red de poros uniforme en los que pueden difundirse las moléculas de soluto y disolvente. Las moléculas son atrapadas eficazmente en los poros y eliminadas del flujo de la fase móvil, el tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las sustancias; las moléculas que son más grandes que el tamaño de los poros del relleno son excluidas y son las primeras que se eluyen, mientras que las moléculas que tienen diámetros significativamente menores que los poros pueden penetrar a través del laberinto que forman estos y así quedan atrapadas durante más tiempo, por lo que son las últimas en salir. [39]

1.3. Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR).

Es una técnica que se aplica a la determinación cualitativa y cuantitativa de especies moleculares de todo tipo, la región más utilizada es la del infrarrojo medio, que se extiende entre 670 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} . Para los análisis cualitativos y cuantitativos se emplean espectros de absorción, reflexión y emisión.

La espectroscopía de reflexión en el infrarrojo ha encontrado aplicaciones en muestras sólidas difíciles de manipular, como películas de polímeros y fibras, alimentos, gomas y productos agrícolas. Los espectros de reflexión son similares a los de absorción y proporcionan la misma información, los espectros de reflectancia se pueden usar tanto para análisis cualitativo como cuantitativo. La reflexión de la radiación es de cuatro tipos: especular, difusa, reflexión interna y reflexión total atenuada.

Cuando un haz de radiación pasa de un medio más denso a otro menos denso se produce una reflexión, la fracción del haz incidente que se refleja es mayor a medida que aumenta el ángulo de incidencia y más allá de cierto ángulo crítico, la reflexión es completa. Durante el proceso de reflexión, el haz se comporta como si penetrara una cierta distancia en el medio menos denso antes de reflejarse, la profundidad de penetración puede variar desde una fracción de longitud de onda hasta varias longitudes de onda y depende de la longitud de onda de la radiación incidente, del índice de refracción de los dos materiales y del ángulo que forma el haz incidente con la interfase. Si el medio menos denso absorbe la radiación, se produce una atenuación del haz en las longitudes de onda de las bandas de absorción, este fenómeno se conoce como reflectancia total atenuada (ATR).

Los espectros de ATR son similares a los de absorción y se observan los mismos picos, pero con intensidades relativas distintas, las absorbancias son independientes del espesor de la muestra, debido a que la radiación sólo penetra unos pocos micrómetros en la muestra. Una de las mayores ventajas de ATR es que con una mínima preparación se pueden obtener espectros de absorción de una gran variedad de muestras, lo cual es útil en el estudio de fibras, hilos y tejidos. [39]

1.4. Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H -RMN).

La espectroscopia de RMN se basa en la medida de la absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias (4 a 900 MHz), en este proceso están involucrados los núcleos de los átomos, para lo cual es necesario colocar la sustancia en un intenso campo magnético a fin de que aparezcan los estados de energía de los núcleos que hagan posible la absorción.

La aplicación más importante de la espectroscopía de RMN de protón es la identificación y elucidación estructural de moléculas orgánicas, organometálicas y bioquímicas. Además este método sirve para la determinación cuantitativa de las especies que absorben y es una herramienta útil para la caracterización de compuestos puros. [39]

1.5. Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC).

Es una técnica térmica en la que se miden las diferencias en la cantidad de calor aportado a una sustancia y una referencia en función de la temperatura de la muestra cuando las dos están sometidas a un programa de temperatura controlado. En calorimetría de barrido diferencial se utilizan dos tipos de métodos, en la DSC de potencia compensada la muestra y el material de referencia se calientan por separado aunque sus temperaturas se mantienen iguales mientras las temperaturas se aumentan (o disminuyen) linealmente. En la DSC de flujo de calor se mide la diferencia en cantidad de calor que fluye hacia la muestra y hacia la referencia cuando la temperatura de la muestra se aumenta (o disminuye) linealmente. [39]

1.6. Análisis Termogravimétrico (TGA).

En este tipo de análisis se registra continuamente la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada, en función de la temperatura o del tiempo al ir aumentando la temperatura de la muestra (normalmente de forma lineal con el tiempo). La representación de la masa o porcentaje de masa en función del tiempo se denomina *termograma* o *curva de descomposición térmica*.

Los instrumentos comerciales modernos empleados en termogravimetría constan de una balanza analítica sensible, un horno, un sistema de gas de purga para proporcionar una atmósfera inerte y un microprocesador/microordenador para el control del instrumento y la adquisición y visualización de datos. La información que proporcionan los métodos termogravimétricos incluye reacciones de descomposición y oxidación y procesos como vaporización, sublimación y desorción; las aplicaciones más importantes se encuentran en el estudio de polímeros, donde los termogramas proporcionan información sobre sus mecanismos de descomposición. [39]

1.7. Pruebas mecánicas (tensión).

La resistencia de un material depende de su capacidad para soportar una carga sin deformación excesiva o falla. Esta propiedad es inherente al material y debe determinarse por experimentación, entre las pruebas más importantes están las de tensión y compresión. A partir de estos análisis pueden obtenerse muchas propiedades mecánicas importantes del material, sin embargo, se utilizan principalmente para determinar la relación entre el esfuerzo normal promedio y la deformación normal unitaria en metales, cerámicos, polímeros o materiales compuestos.

Para llevar a cabo esta prueba se prepara una probeta con forma y tamaño estándar, se miden tanto el área de la sección transversal inicial del espécimen, A_0 , como la longitud calibrada entre dos puntos de la muestra, L_0 . Los extremos de la probeta se sujetan en una máquina de prueba que se usa para estirar la probeta a una velocidad constante muy lenta, hasta alcanzar el punto de ruptura; la máquina permite determinar la carga requerida para mantener el alargamiento uniforme.

A partir de los datos de un ensayo de tensión es posible calcular los valores del esfuerzo y la correspondiente deformación unitaria en la probeta y luego graficar los resultados. La curva resultante se denomina diagrama de esfuerzo-deformación unitaria y hay dos maneras de describirlo.

El diagrama convencional de esfuerzo-deformación unitaria permite determinar el esfuerzo nominal o de ingeniería al dividir la carga P aplicada entre el área A_0 de la sección transversal original del espécimen (ecuación 1). Este cálculo supone que el esfuerzo es constante en la sección transversal y en toda la región entre los puntos establecidos.

$$\sigma = \frac{P}{A_0} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

De la misma manera la deformación nominal o de ingeniería (ecuación 2) se determina al dividir el cambio en la longitud calibrada (δ) entre la longitud calibrada original del espécimen L_0 . Aquí se supone que la deformación unitaria es constante en la región entre los puntos calibrados, entonces:

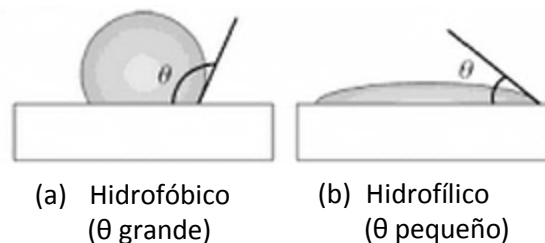
$$\epsilon = \frac{\delta}{L_0} \quad (\text{Ecuación 2})$$

La gráfica de esfuerzos en las ordenadas y deformaciones unitarias en las abscisas se llama diagrama de esfuerzo-deformación unitaria. Este diagrama es muy importante en la ingeniería, ya que permite obtener datos sobre resistencia a la tensión de un material sin considerar el tamaño o forma geométrica del material. Sin embargo, debe ser claro que nunca serán exactamente iguales dos diagramas de esfuerzo-deformación unitaria para un material en particular, ya que los resultados dependen entre otras variables de la composición del material, de imperfecciones microscópicas, de la manera en que esté fabricado, de la velocidad de carga y de la temperatura durante la prueba. [40]

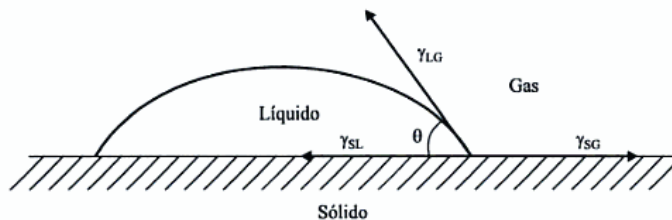
1.8. Ángulo de contacto.

El ángulo de contacto es una medida de la impregnabilidad ó humectabilidad de una superficie, es decir, la capacidad de un líquido para extenderse sobre un sólido. Para ello se considera la tensión superficial de una gota de disolvente en la interfase con una superficie homogénea. Más específicamente, el ángulo de contacto mide la atracción de las moléculas entre sí dentro de una gota, comparado con la atracción o repulsión que experimentan las moléculas de la gota hacia las moléculas superficiales.

El ángulo de contacto se define como el ángulo entre la tangente a la superficie de la gota y la tangente a la superficie en la intersección vapor-líquido-sólido, como se observa en la figura.



Como medida matemática de la impregnabilidad, se puede considerar el ángulo de contacto, θ , que es el que forma el líquido con la superficie sólida, como se muestra en el esquema.



Un ángulo de contacto grande significa que la superficie es hidrofóbica y tiene baja energía superficial, mientras que un ángulo de contacto pequeño entre la superficie del sólido y la gota indica que la superficie es hidrofílica y tiene alta energía superficial. En el caso de que el ángulo formado sea de 180° , la gota es esférica, con un único punto de contacto entre el líquido y el sólido, por lo cual no habrá impregnación. Cuando el ángulo de contacto es de 0° , se produce un impregnado perfecto y, si el ángulo de contacto es mayor de 90° , se considera que el líquido no impregna el sólido. De acuerdo con la geometría y localización de la superficie que se va a analizar, se usan diferentes técnicas para determinar ángulo de contacto, la más común es la estática. [41], [42]

1.8.1. Determinación de ángulo de contacto con ImageJ®.

- i. Grabar un video de 3 minutos a partir de que se deposita la gota sobre el andamio.
- ii. Convertir el video en imágenes en escala de grises.
- iii. Elegir la primer imagen y las correspondientes a 90 y 180 segundos, para cada una de las mediciones realizadas (5 por material).
- iv. Determinar el ángulo de contacto mediante el programa ImageJ® y la aplicación *drop_analysis*.
- v. Realizar el análisis estadístico de los datos para determinar el valor promedio y la desviación estándar en cada uno de los tiempos elegidos.
- vi. Usar la ecuación 3 para determinar el valor del ángulo de contacto:

$$X = \bar{X} \pm U_c(x) \quad (\text{Ecuación 3})$$

En la ecuación 4 se desarrolla $U_c(x)$

$$U_c(x) = \sqrt{U_A^2(x) + U_B^2(x)} \quad (\text{Ecuación 4})$$

A continuación se definen los dos términos que integran la ecuación 4:

$$U_A(x) = \frac{S(x)}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde S(X) es la desviación estándar y n el número de datos.

$$U_B(x) = U(R) = \frac{\Delta X}{2} = 0.5^\circ \quad (\text{Ecuación 6})$$

en la ecuación 6 el factor U(R) es dependiente de la resolución del instrumento, se considera a ΔX como 1° , lo que corresponde a la mínima diferencia detectable durante la medición.

1.9. Cálculo de la constante dieléctrica de las mezclas de disolventes.

El cálculo de la constante dieléctrica de las mezclas de disolventes se efectuó mediante la regla de las fases, para lo cual se tomaron los valores de las constantes de cada disolvente y la fracción de este en la mezcla, a continuación se da un ejemplo y se incluye la tabla con las constantes de cada disolvente.

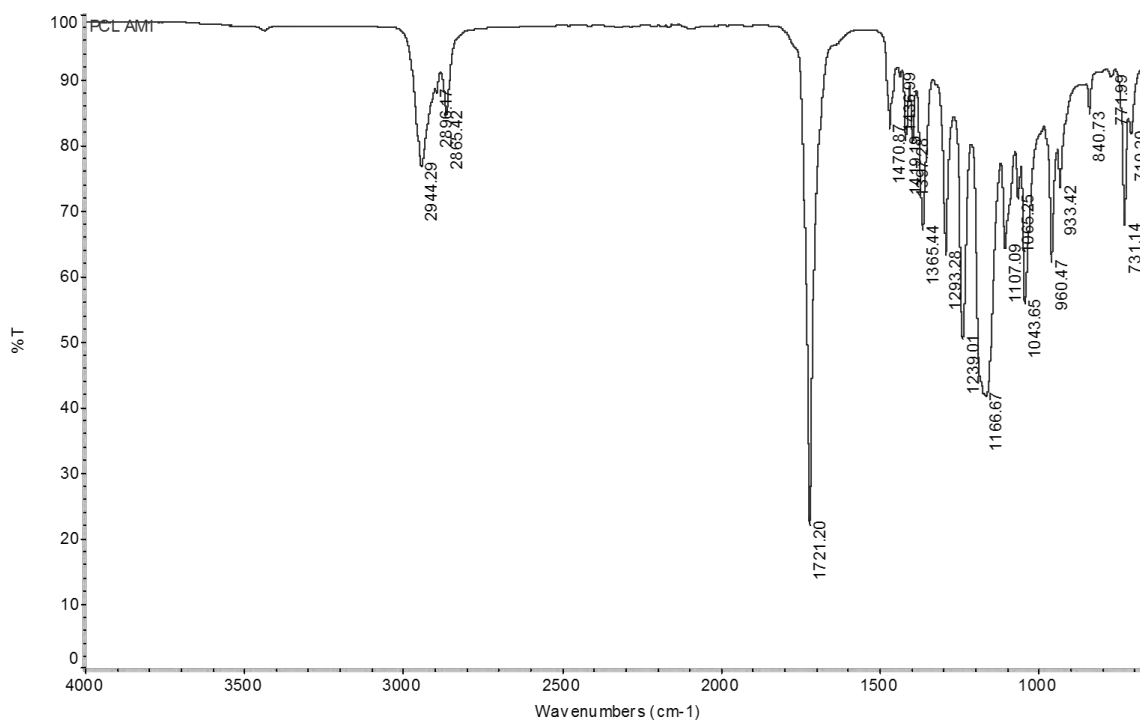
Disolvente	Constante dieléctrica
CF	4.9
DCM	8.93
MeOH	33
DMF	36.7

Para el sistema CF-DMF (70:30) el cálculo se realiza de acuerdo con la ecuación 7.

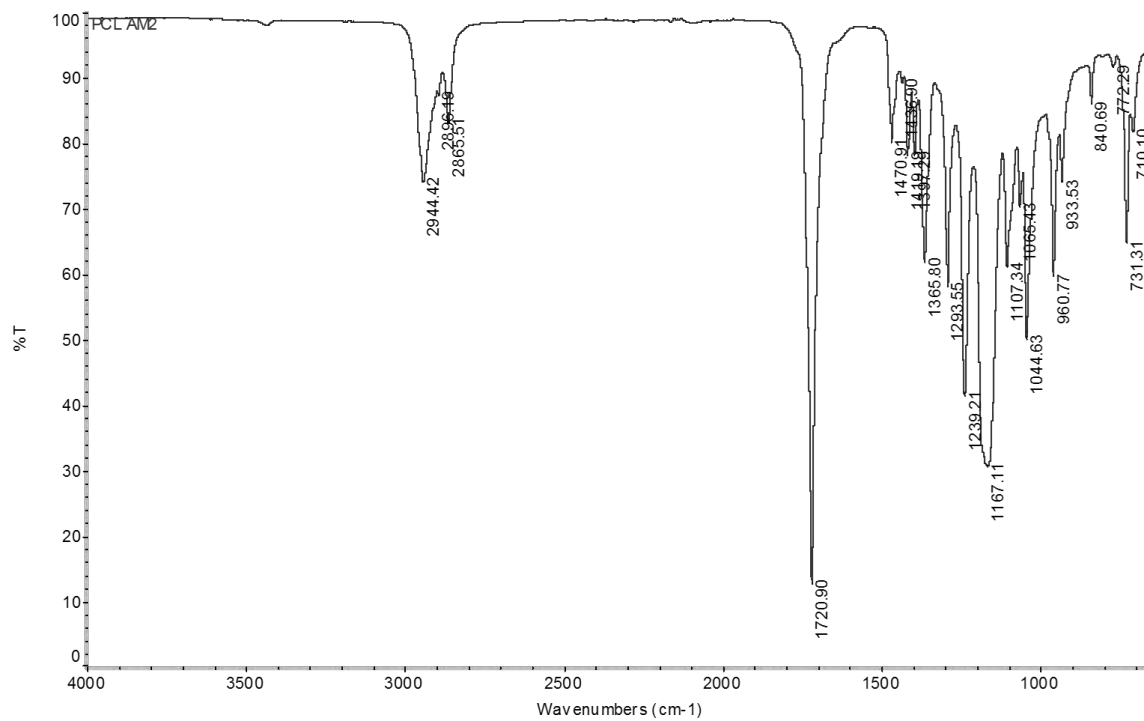
$$Cte\ diel_{mezcla} = (4.9 * 0.7) + (36.7 * 0.3) = 14.44 \quad \text{Ecuación 7}$$

Anexo 2. Espectros.**Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR).**

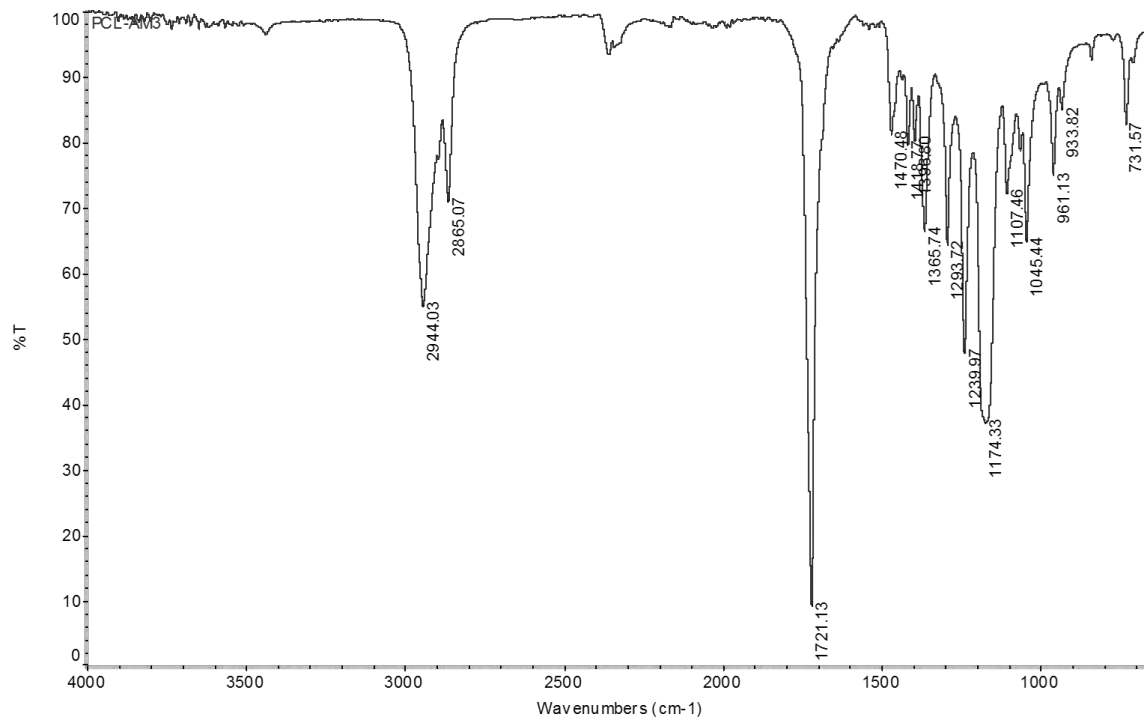
PCL-AM1



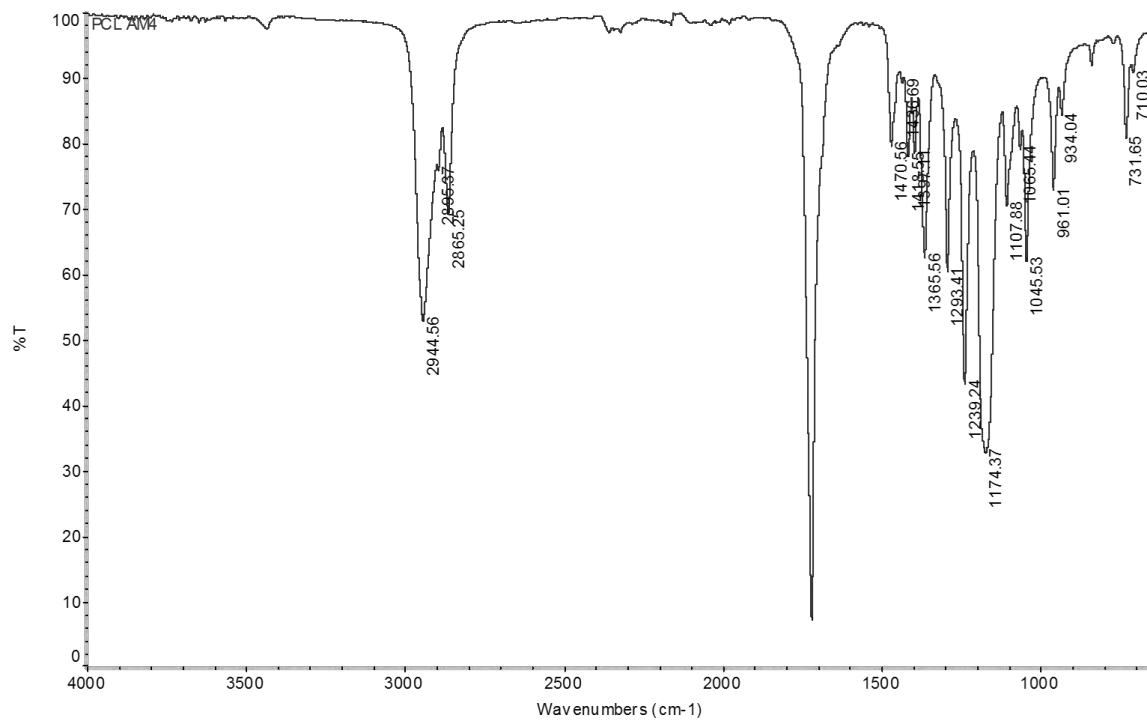
PCL-AM2



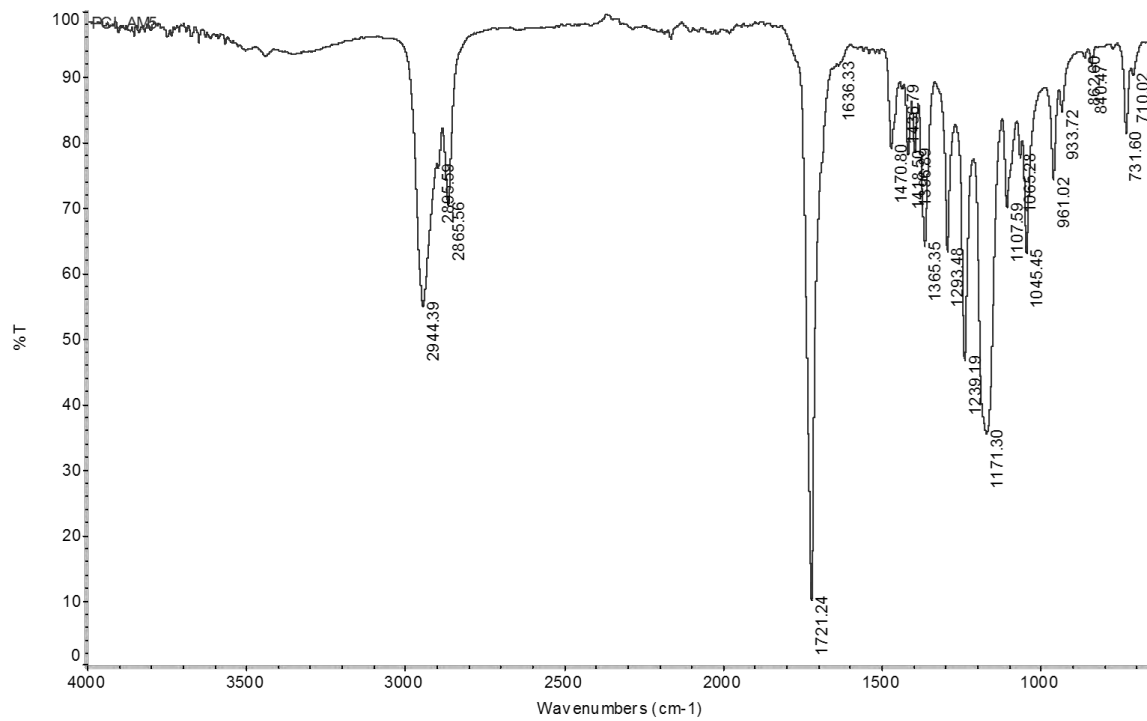
PCL-AM3



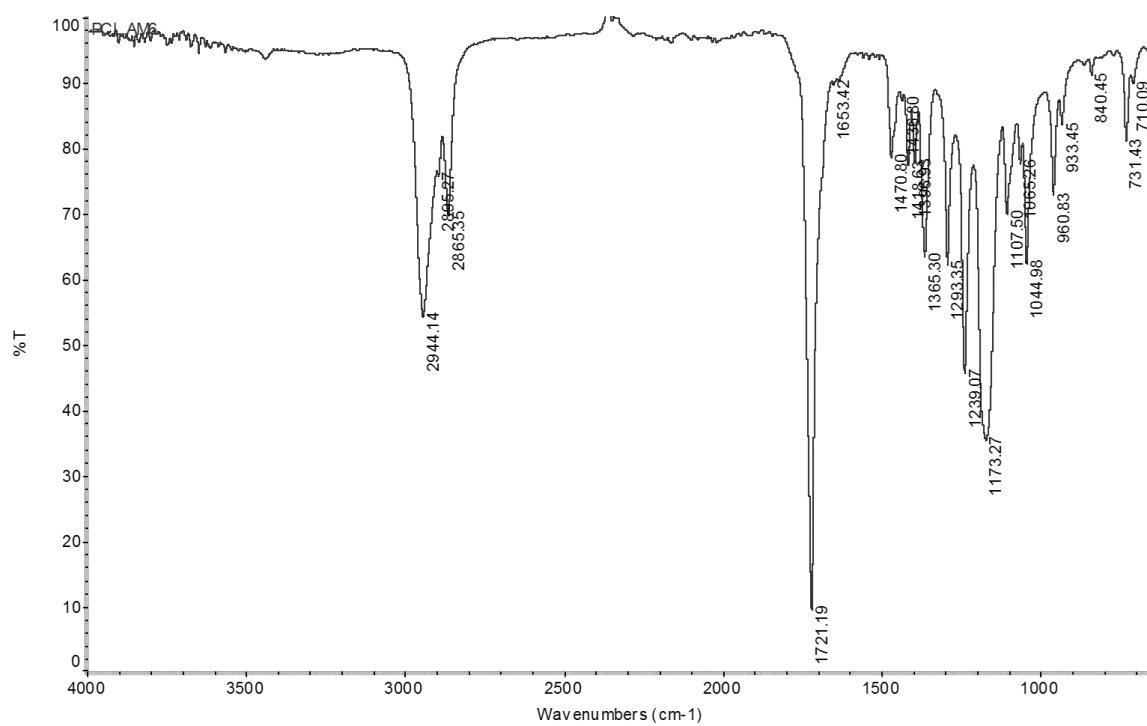
PCL-AM4



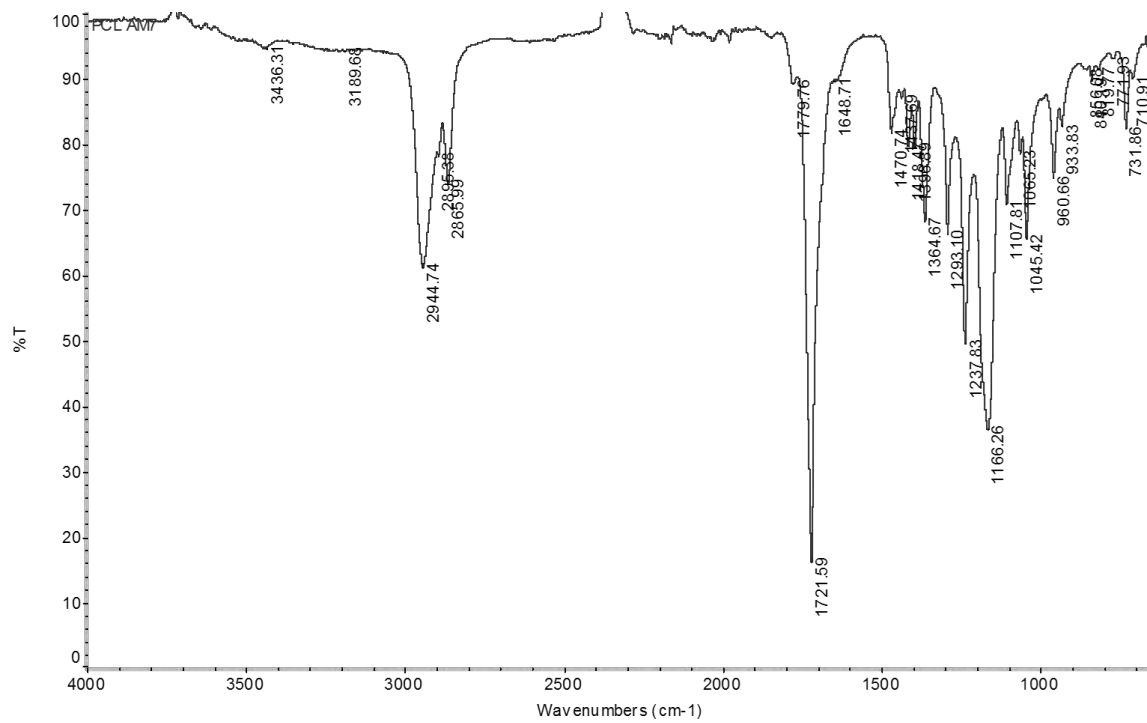
PCL-AM5



PCL-AM6



PCL-AM7

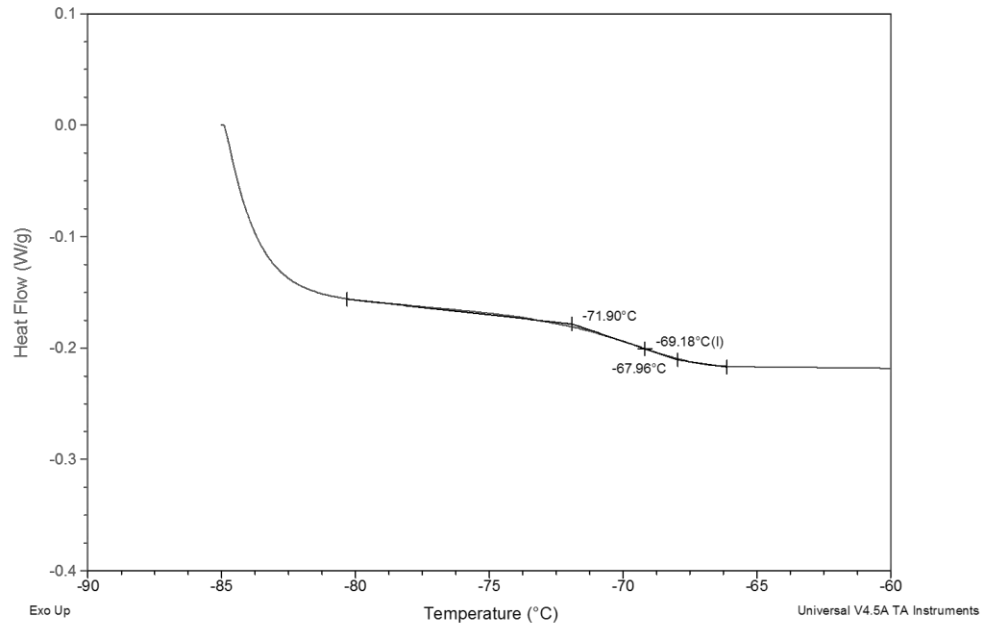


Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC).

PCL

Sample: PCL DSC 10 N2 01ABR13
Size: 23.6000 mg

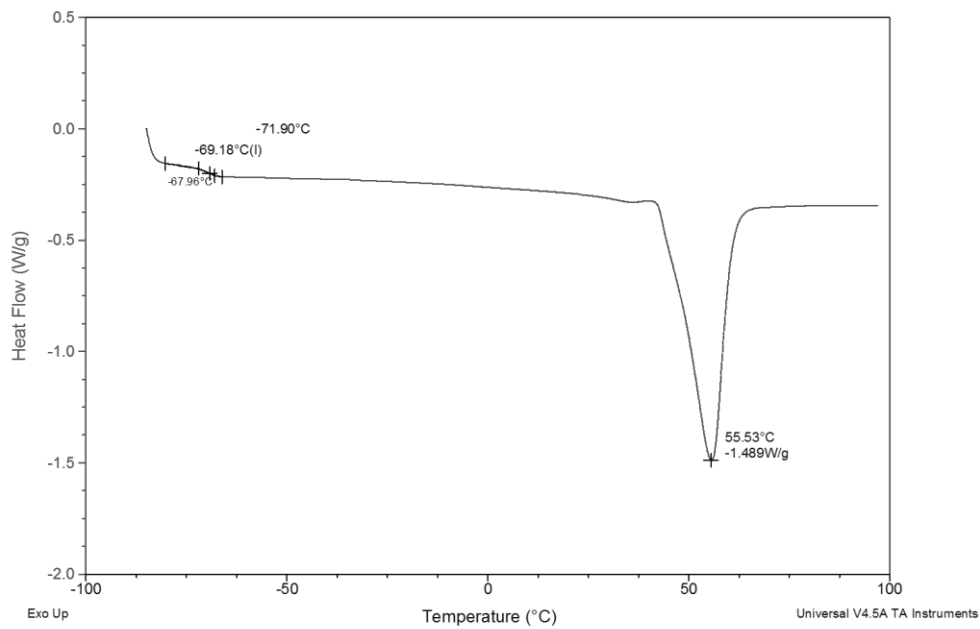
DSC

File: E:\TGA\PCL DSC 10 N2 01ABR13.001
Operator: D. Cabrero
Run Date: 01-Apr-2013 17:09
Instrument: DSC Q100 V9.9 Build 303

Sample: PCL DSC 10 N2 01ABR13
Size: 23.6000 mg

DSC

File: E:\TGA\PCCL DSC 10 N2 01ABR13.001
Operator: D. Cabrero
Run Date: 01-Apr-2013 17:09
Instrument: DSC Q100 V9.9 Build 303

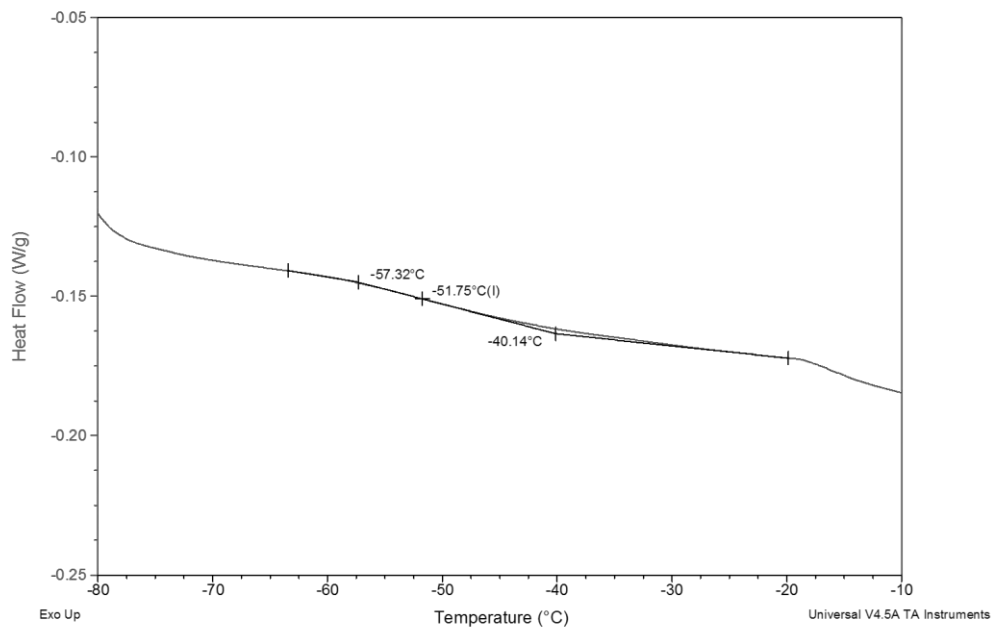


PCL-AM6

Sample: PCL-AM6 DSC 10 N2 03ABR13
Size: 16.0000 mg

DSC

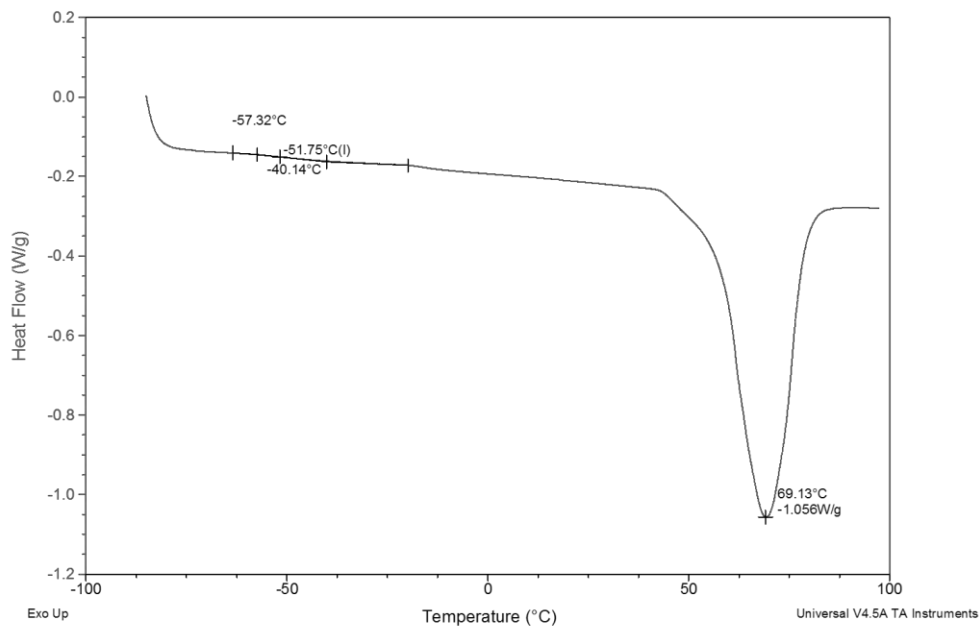
File: E:\TGA\PCCL-AM6 DSC 10 N2 03ABR13.001
Operator: D. Cabrero
Run Date: 03-Apr-2013 09:14
Instrument: DSC Q100 V9.9 Build 303



Sample: PCL-AM6 DSC 10 N2 03ABR13
Size: 16.0000 mg

DSC

File: E:\TGA\PCL-AM6 DSC 10 N2 03ABR13.001
Operator: D. Cabrero
Run Date: 03-Apr-2013 09:14
Instrument: DSC Q100 V9.9 Build 303

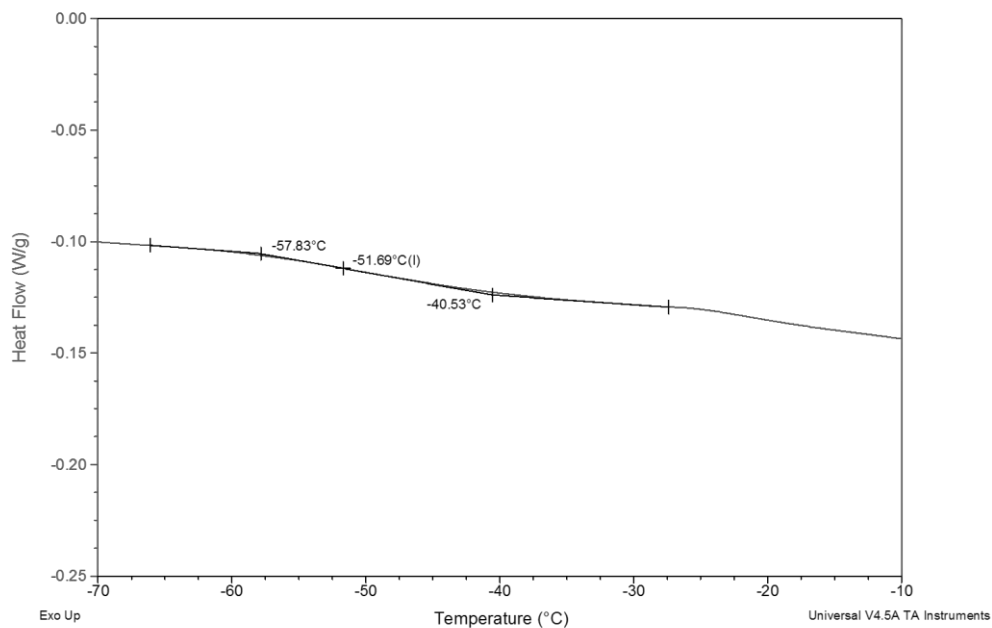


PCL-AM7

Sample: PCL-AM7 DSC 10 N2 03ABR13
Size: 11.0000 mg

DSC

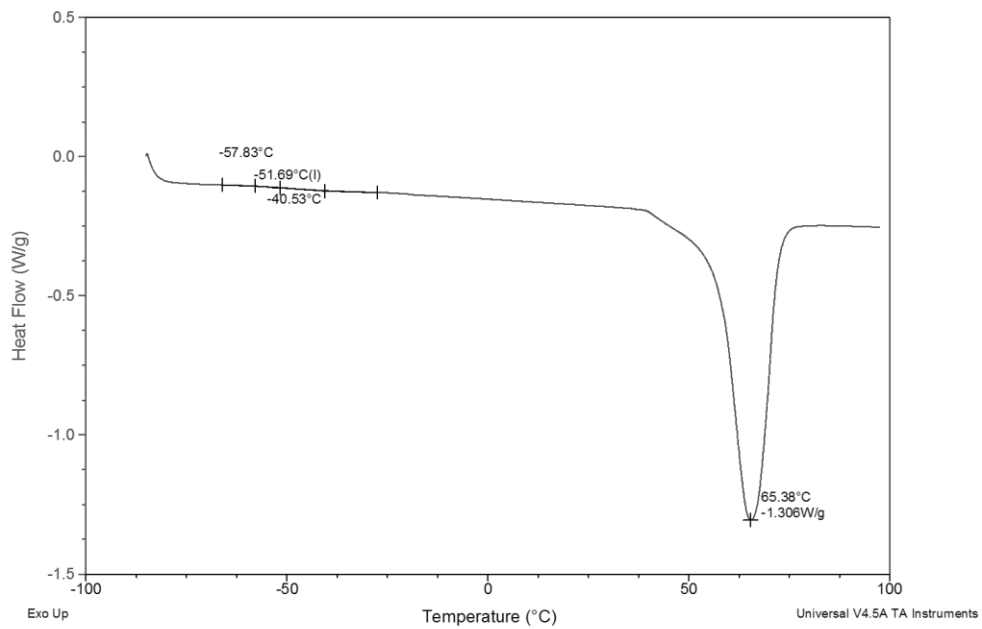
File: E:\TGA\PCL-AM7 DSC 10 N2 03ABR13.001
Operator: D. Cabrero
Run Date: 03-Apr-2013 09:58
Instrument: DSC Q100 V9.9 Build 303



Sample: PCL-AM7 DSC 10 N2 03ABR13
Size: 11.0000 mg

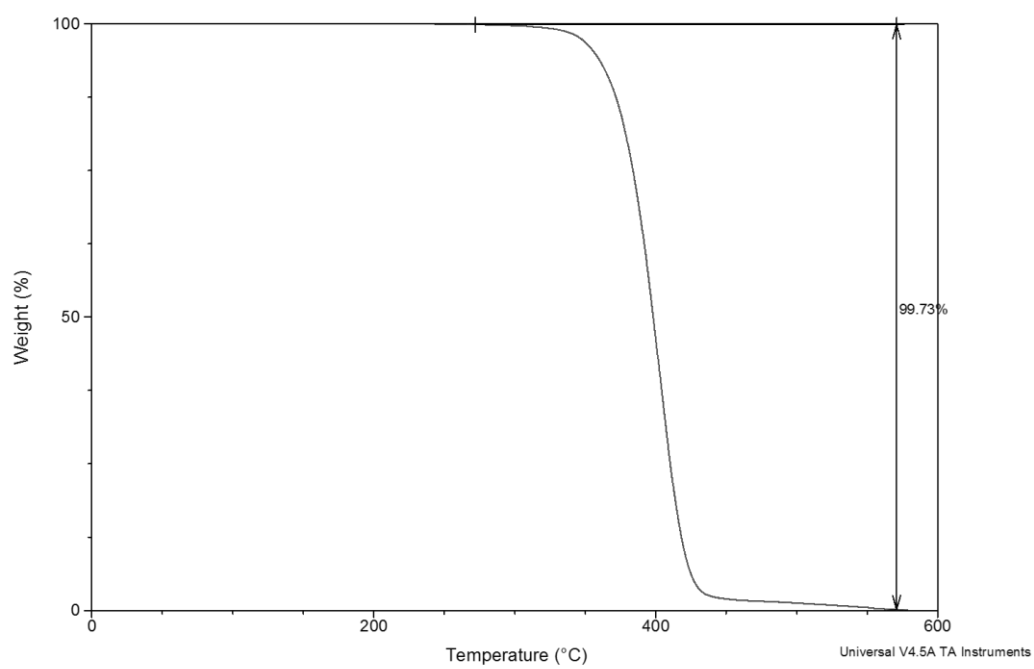
DSC

File: E:\TGA\PCL-AM7 DSC 10 N2 03ABR13.001
Operator: D. Cabrero
Run Date: 03-Apr-2013 09:58
Instrument: DSC Q100 V9.9 Build 303

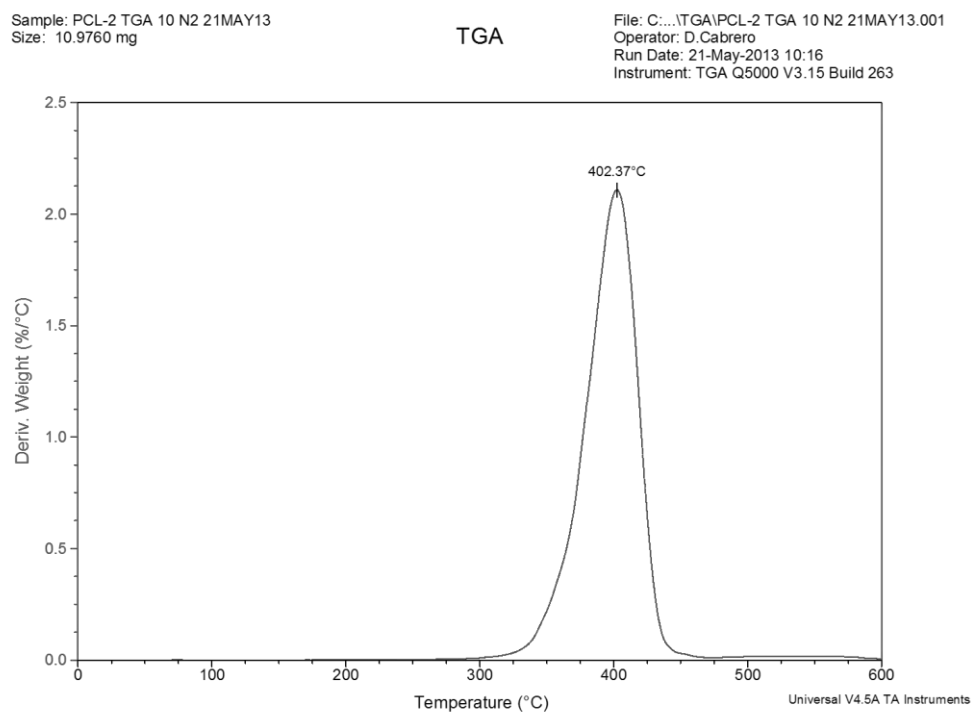


Análisis Termogravimétrico (TGA).

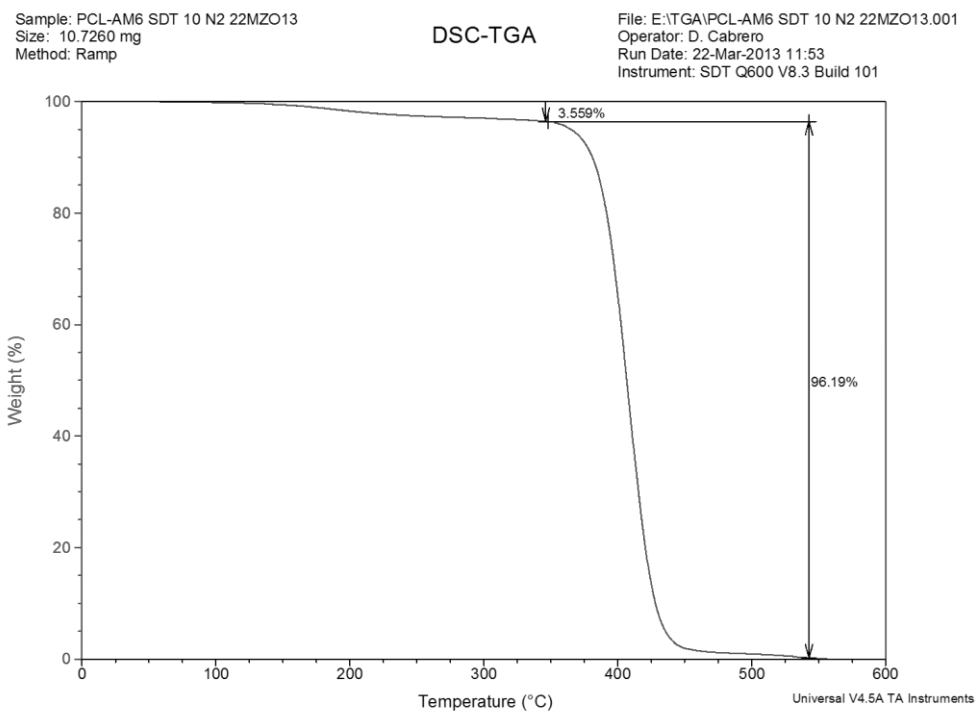
PCL



dTGA de PCL



PCL-AM6

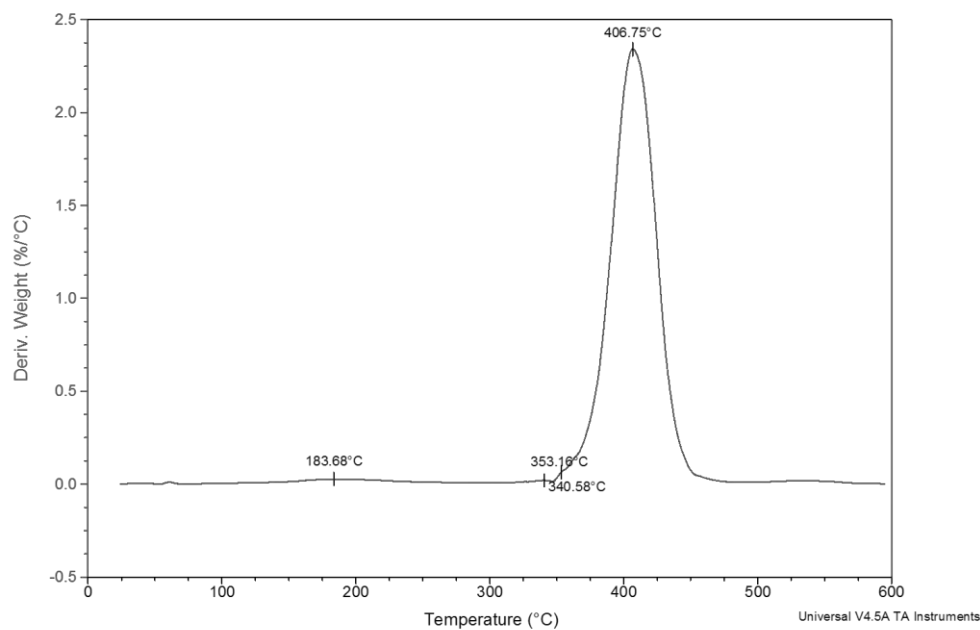


dTGA de PCL-AM6

Sample: PCL-AM6 SDT 10 N2 22MZO13
 Size: 10.7260 mg
 Method: Ramp

DSC-TGA

File: E:\TGA\PCL-AM6 SDT 10 N2 22MZO13.001
 Operator: D. Cabrero
 Run Date: 22-Mar-2013 11:53
 Instrument: SDT Q600 V8.3 Build 101

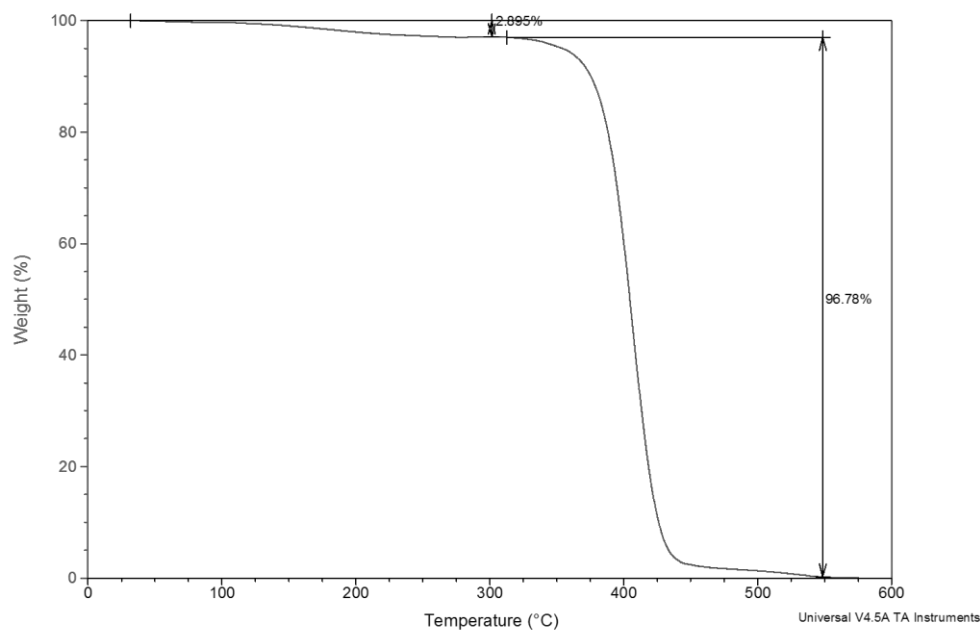


PCL-AM7

Sample: PCL-AM7 SDT 10 N2 22MZO13
 Size: 5.5740 mg
 Method: Ramp

DSC-TGA

File: E:\TGA\PCL-AM7 SDT 10 N2 22MZO13.001
 Operator: D. Cabrero
 Run Date: 22-Mar-2013 13:55
 Instrument: SDT Q600 V8.3 Build 101



dTGA de PCL-AM7

Sample: PCL-AM7 SDT 10 N2 22MZO13
Size: 5.5740 mg
Method: Ramp

DSC-TGA

File: E:\TGA\PCL-AM7 SDT 10 N2 22MZO13.001
Operator: D. Cabrero
Run Date: 22-Mar-2013 13:55
Instrument: SDT Q600 V8.3 Build 101

