



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

“ANDAMIOS TUBULARES DE POLI (CARBONATO-URETANO)  
CON FIBRONECTINA DE PLASMA HUMANO ELABORADOS  
POR LA TÉCNICA DE ELECTROHILADO”

T E S I S  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:  
I. BIOM. LIZETH ÁVILA GUTIÉRREZ

TUTOR  
DR. RICARDO VERA GRAZIANO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

COMITÉ TUTOR  
DRA. ATLÁNTIDA RAYA RIVERA  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO (FEDERICO GÓMEZ)  
DRA. CRISTINA PIÑA BARBA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

MÉXICO, D.F.

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.

# Dedicatoria

---

A mi madre Concepción Gutiérrez  
por su apoyo incondicional,  
consejos y compañía.

A mi familia por creer en mí.

# Mis agradecimientos para:

- El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través de la beca, para la realización de los estudios de maestría.
- Al Programa de Apoyo a la Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo brindado y la beca otorgada a través del proyecto con número IN-108913.
- A la empresa DMS por la muestra de policarbonato uretano brindada para el desarrollo de esta investigación.
- Al Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP), por el apoyo otorgado para asistir a congresos.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) y al Posgrado en Ciencia e Ingeniería en Materiales (UNAM) por las facilidades brindadas para la realización de esta investigación y por la formación académica impartida.
- Al M. en C. Jorge Cárdenas Pérez del Instituto de Química (UNAM), por su apoyo en la realización e interpretación de los espectros de resonancia magnética.
- Al Dr. Humberto Vázquez Torres y Dr. Raúl Montiel Campos de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) por su apoyo incondicional en la realización de análisis térmico y estudios de dispersión de rayos X.
- Al Dr. Francisco Sánchez Arévalo por su apoyo en la realización de las pruebas mecánicas de este trabajo.
- Al Dr. Mikhail Zolotokhin por sus consejos y las facilidades brindadas dentro de su laboratorio y a cada uno de sus estudiantes por su compañerismo.
- Al Dr. Omar Novelo Peralta, la Dra. Guillermina González, la M. en C. Adriana Tejeda Cruz, la Q.F.B Damaris Cabrero Palomino, la C. Maricela Bermúdez Hernández y el M. en C. Salvador López Morales por su colaboración en las determinaciones realizadas en el desarrollo de éste trabajo.

# Agradezco especialmente a:

- A mi familia, especialmente a mi mamá por impulsarme todos los días para ser mejor cada día.
- Al Dr. Ricardo Vera Graziano y la Dra. Atlántida Raya Rivera por su apoyo en la dirección de esta investigación.
- A la Dra. Cristina Piña Barba por formar parte de este comité tutorial.
- Al Dr. Diego Ricardo Esquiliano Rendón y la Bio. Raquel González Pérez del Laboratorio de Ingeniería de tejidos del Hospital Infantil de México (Federico Gómez), por su disposición y colaboración en las pruebas biológicas de esta investigación.
- Al Dr. Raúl Montiel Campos, al Dr. Alfredo Maciel Cerda y Dr. Filiberto Rivera Torres por su asesoría, confianza y apoyo brindado.
- A Javier Reyes Lagos, Jonathan Zamora Mendieta y Rafael Rodríguez Mosqueda por su compañerismo y amistad.
- A mis compañeros de laboratorio por esas charlas y buena atmósfera de trabajo en el laboratorio.

*Lizeth Ávila Gutiérrez*

# ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen.....	1
1. Antecedentes.....	4
1.2 Justificación.....	8
1.3 Preguntas de investigación.....	9
1.4 Objetivos.....	10
1.4.1 Objetivo general.....	10
1.4.2 Objetivos Específicos.....	10
2. Marco teórico.....	11
2.1 Definición de Ingeniería de Tejidos.....	11
2.2 Ingeniería de tejidos y sus aplicaciones en vasos sanguíneos. ....	12
2.3 Estructura de los vasos sanguíneos. ....	14
2.3.1 Arterias.....	16
2.3.2 Venas.....	17
2.4 Hemodinámica.....	18
2.5 Definición de polímero.....	20
2.5.1 Clasificación de los polímeros.....	21
2.6 Policarbonato uretano.....	22
2.7 Moléculas de adhesión.....	25
2.7.1 Integrinas.....	26
2.7.2 Fibronectina.....	26
2.7.2.1 Características generales de la fibronectina.....	27
2.7.2.2 Dominios funcionales de la fibronectina.....	28
2.8 Respuesta inflamatoria e interacción leucocito- endotelio. ....	29
2.9 Técnicas para fabricar fibras poliméricas para ingeniería de tejidos.....	30
2.9.1 Electrohilado.....	31
3. Materiales y Métodos.....	33
3.1 Materiales.....	33
3.2 Metodología experimental.....	33
4. Resultados y discusión.....	53
4.1 Optimización de parámetros de electrohilado.....	53

4.2	Andamios de PCU con fibronectina de plasma humana.....	60
4.3	Análisis por SEM de andamios tubulares de PCU.....	65
4.4	Caracterización físico-química del policarbonato uretano.....	67
4.5	Identificación de fibronectina sobre los andamios.....	78
4.6	Efectos de la fibronectina en los andamios de policarbonato uretano.....	85
4.7	Evaluación de biocompatibilidad.....	92
5.	Conclusiones.....	97
	Bibliografía.....	99
	Anexo 1. Técnicas y métodos de caracterización.....	106
	Anexo 2. Calculo del diámetro promedio de las fibras con ImageJ®.....	123
	Anexo 3. Hoja de especificaciones del policarbonato uretano.....	126

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Polímeros utilizados para aplicaciones cardiovasculares .....	13
Tabla 2	Diferencias estructurales entre arterias y venas .....	15
Tabla 3	Propiedades físicas de cada uno de los vasos sanguíneos en el cuerpo humano. ....	18
Tabla 4	Polímeros en aplicaciones biomédicas .....	22
Tabla 5	Diisocianatos más comunes.....	23
Tabla 6	Condiciones para medir el efecto de la temperatura.....	37
Tabla 7	Condiciones para medir el efecto del calibre de la aguja .....	38
Tabla 8	Condiciones para medir el efecto de la concentración .....	38
Tabla 9	Condiciones para medir el efecto de la mezcla de disolvente a diferentes proporciones.....	39
Tabla 10	Condiciones para medir la velocidad .....	40
Tabla 11	Condiciones para medir el efecto del voltaje .....	40
Tabla 12	Condiciones de electrohilado del PCU y PCU con fibronectina en HFP.....	42
Tabla 13	Presión total del sistema a diferentes proporciones de disolvente .....	56
Tabla 14	Diámetro de las fibras con diferentes proporciones de disolvente DMF:THF .....	57
Tabla 15	Diámetro de las fibras con diferentes proporciones de Yakai Feng.....	59
Tabla 16	Asignaciones y desplazamiento químico del espectro de protones.....	68
Tabla 17	Peso molecular del PCU .....	69
Tabla 18	Tabla de dimensiones interplanares de los segmentos .....	72
Tabla 19	Asignación espectral del PCU .....	75
Tabla 20	Análisis composicional de la muestra de PCU con 10% de fibronectina.....	79
Tabla 21	Ángulo de contacto (agua).....	80
Tabla 22	Temperaturas de descomposición por TGA .....	85
Tabla 23	Densidad óptica de pruebas in-vitro .....	93

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Sistema cardiovascular; el lado derecho del corazón recibe la sangre desoxigenada y el lado izquierdo del corazón bombea la sangre oxigenada a todo el cuerpo.....	15
Figura 2	Estructura histológica de los vasos sanguíneos. Muestra como la túnica media e íntima de las arterias tienen una mayor cantidad de capas celulares, a diferencia de las venas. ....	16
Figura 3	Estructura del poli(estireno) a partir de la unidad repetitiva del estireno .....	20
Figura 4	Estructuras topográficas de los polímeros .....	21
Figura 5	Estructura química del poli(carbonato uretano) PCU.....	23
Figura 6	Integrina conformado de dos subunidades $\alpha$ y $\beta$ .....	26
Figura 7	Estructura y dominios de la fibronectina.....	27
Figura 8	Dominios funcionales de la fibronectina .....	28
Figura 9	Receptores de adhesión entre la fibronectina y el citoesqueleto .....	29
Figura 10	Partes del equipo de electrohilado. (a) Sistema de inyección de 5 jeringas. (b) Colector puede ser plano o rotatorio. (c) Fuente de alto voltaje (1 a 60 Kv). Los conectores de la fuente de poder (+) es conectado a la punta de la aguja y el (-) al colector.....	36
Figura 11	Micrografías de SEM (x1,000) de PCU 14% (p/v) en DMF. Se evaluó el efecto de la temperatura en la morfología de las fibras a: a) 34°C b) 44°C .....	53
Figura 12	Micrografías de SEM (x1,000) de PCU 12% (p/v) en DMF. Se evaluó el efecto del calibre de la aguja en la morfología de las fibras con diferentes diámetros de aguja. a) 0.8 mm. b) 0.6 mm. ....	54
Figura 13	Micrografías de SEM (x10,000) de PCU diferentes concentraciones : a) 10% . b) 12%. c) 14%. d) 16%.....	55
Figura 14	Micrografías de SEM (x10,000) a diferentes proporciones de disolvente de DMF:THF a)Proporción 100:00 concentración 10%. d)Proporción 100:00 concentración 12%. g)Proporción 100:00 concentración 14%. j)Proporción 100:00 concentración 16%. b)Proporción 90:10 concentración 10% e)Proporción 90:00	

concentración 12% h)Proporción 90:10 concentración 14%. k) Proporción 90:10 concentración 16%. c)Proporción 80:20 concentración 10% f)Proporción 80:20 concentración12% i)Proporción 80:20 concentración 14%. l)Proporción 80:20 concentración 16%.....	58
Figura 15 Micrografías de SEM (x10,000) PCU 16%. Se evaluó el efecto de la velocidad a) 0.2 ml/hr b) 0.4 ml/hr .....	59
Figura 16 Micrografías de SEM a x10,000 y aumento a x50,000 de PCU 16%. Se evaluó el efecto del voltaje a) 15 kV y b) 20 kV. ....	60
Figura 17 Micrografías de SEM (x10,000) de PCU 10% en HFP a diferentes condiciones de flujo de inyección y distancia inyector-colector. a) 0.2 ml/hr a 20 cm (b) 0.4 ml/hr a 20 cm (c) 0.2 ml/ a 30 cm (d) 0.4 ml/hr a 30 cm.....	61
Figura 18 Micrografías de SEM (x10,000) de PCU 10% con fibronectina a diferentes condiciones de flujo de inyección y distancia inyector-colector. (a) 0.2 ml/hr a 20 cm (b) 0.4 ml/hr a 20 cm (c) 0.2 ml/ a 30 cm (d) 0.4 ml/hr a 30 cm .....	62
Figura 19 Micrografías de SEM (x10,000) de PCU 10% con fibronectina a diferentes concentraciones de fibronectina. a) PCU sin fibronectina b) andamio con 0.001 gr. de fibronectina c) andamio con 0.01 gr de fibronectina d) andamio con 0.02 gr de fibronectina .....	64
Figura 20 Micrografías de SEM de andamios tubulares a) Andamio tubular. Corte axial del tubo a diferentes aumentos b) x100 c) x250 d) x35. Andamios tubulares a x1,000 e) sin fibronectina f) con fibronectina. ....	66
Figura 21 Espectro de 1H-RMN del policarbonato uretano.....	68
Figura 22 Difractograma de PCU .....	70
Figura 23 Difractograma de WAXS del segmento duro del policarbonato.....	71
Figura 24 Difractograma de SAXS del segmento duro del poliuretano .....	72
Figura 25 Agrupamientos cristalinos y apilamiento laminar de la estructura de PCU .....	73
Figura 26 Espectro de infrarrojo del PCU .....	74
Figura 27 Termogramas de policarbonato uretano y policarbonato uretano electrohilado .....	76
Figura 28 Termogramas de PCU y PCU electrohilado .....	77
Figura 29 Análisis mecánico-dinámico de PCU.....	77

Figura 30	Se observan los difractograma del andamio de PCU electrohilado (negro), el andamio de PCU con 0.5% de fibronectina (rojo), el andamio de PCU con 5% de fibronectina (azul) y el andamio de PCU con 10% de fibronectina (verde). En la figura se ve, como la fase de NaCl y CaCl <sub>2</sub> aumenta en intensidad conforme se incrementa la concentración de fibronectina en los andamios de PCU.....	79
Figura 31	Superficie del a) PCU sin modificar b) PCU con 10% de fibronectina.....	81
Figura 32	Espectro de infrarrojo de la fibronectina de plasma humano.....	82
Figura 33	Identificación de la cadena de aminoácidos de la fibronectina.....	83
Figura 34	Se realizó la identificación del sulfuro de la cadena de fibronectina en el andamio de policarbonato uretano. El espectro de color azul corresponde al policarbonato uretano, el espectro de color rojo al policarbonato uretano con fibronectina de plasma humano y el espectro de color rosa a la fibronectina de plasma humano.....	84
Figura 35	Termogramas del PCU, PCU-FIBRA, PCU-FIB01, PCU-FIB02 y PCU-FIB03.....	86
Figura 36	Identificación de temperaturas de descomposición de la fibronectina sobre los andamios de PCU con 10% de fibronectina.....	87
Figura 37	Curva esfuerzo-deformación obtenida para el andamio de fibras de PCU con 0.5% de fibronectina.....	88
Figura 38	Ajuste lineal entre el modelo y los datos experimentales de las pruebas de tensión.....	89
Figura 39	Cultivo confluyente de células HEK293.....	92
Figura 40	Siembra celular sobre los polímeros en caja de 24 pozos como se observa las dos últimas columnas corresponden a los controles negativos que son andamios sin células sometidos a las mismas condiciones de incubación.....	93
Figura 41	Micrográficas de SEM (x350) y (x 10,000) de cúmulos de células a 3 y 7 días de multiplicación celular sobre andamios de PCU y PCU con fibronectina a diferentes concentraciones de fibronectina.....	95
Figura 42	Tipos de vibraciones.....	106
Figura 43	Spines a) ausencia de campo magnético estos se orientan al azar, cuando se coloca un campo magnético la muestra se orienta en dirección del campo. b) Forma del giro de los momentos magnéticos.....	107

Figura 44	Curvas de DSC y tipos de transiciones. ....	110
Figura 45	Grados de mojabilidad de un sólido por un líquido a) Mojado perfecto. b) Líquido moja al sólido. c) El sistema no moja .....	112
Figura 46	Componentes básicos del SAXS .....	112
Figura 47	Dispersión coherente del haz de rayos X e interferencia constructiva .....	114
Figura 48	Componentes básicos del difractograma de rayos X.....	115
Figura 49	Difractograma de oxalato cálcico monohidrato .....	116
Figura 50	Efecto de la temperatura en las propiedades mecánicas.....	118
Figura 51	Componentes de la gráfica esfuerzo contra deformación .....	119

# ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1	Módulo de elasticidad de las membranas de PCU y PCU con 0.5% de fibronectina .....	90
Gráfica 2	Esfuerzo máximo de las membranas de PCU y PCU con 0.5% de fibronectina .....	91
Gráfica 3	Esfuerzo último de las membranas de PCU y PCU con 0.5% de fibronectina .....	91
Gráfica 4	Proliferación celular de células HEK293 sobre andamios de PCU .....	94

# GLOSARIO

<b>GPC</b>	Cromatografía por permeación en gel.
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido.
<b>SEM-EDS</b>	Espectroscopía de energía dispersiva.
<b>ATR-FTIR</b>	Espectroscopía de infrarrojo con reflexión total atenuada.
<b>DSC</b>	Calorimetría diferencial de barrido.
<b>MDSC</b>	Calorimetría diferencial de barrido modulado.
<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico.
<b>DRX</b>	Difracción de rayos X.
<b>SAXS</b>	Dispersión de rayos X a bajo ángulo.
<b>WAXS</b>	Dispersión de rayos X a ángulo alto
<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.
<b>DMA</b>	Análisis mecánico dinámico.
<b>PCU</b>	Policarbonato uretano.
<b>DMF</b>	Dimetilformamida.
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano.
<b>HFP</b>	1,1,1,3,3,3 hexafluoro 2-propanol.
<b>PBS</b>	Buffer de fosfato.
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino.
<b>HEPES</b>	Acido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina-etanosulfónico
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

## Resumen

La ingeniería vascular es una novedosa y compleja tecnología basada en el uso de combinaciones de células con capacidad regenerativa, materiales biológicos y/o sintéticos, factores de crecimiento y diferenciación celular.

En este trabajo se prepararon y estudiaron andamios de fibras poliméricas de Bionate II (PCU), producto comercializado por DSM, Polymer Technology Group, con el propósito de generar tecnología para la fabricación de arterias delgadas. Se evaluaron los parámetros de electrohilado como: la velocidad de flujo, la concentración de polímero, la variación de temperatura, el diámetro de aguja, el voltaje aplicado, la mezcla de diferentes disolventes como: DMF (dimetilformamida), THF (tetrahidrofurano) y HFP (1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol).

Se disolvió la fibronectina de plasma humano a tres diferentes concentraciones (0.5%, 5% y 10%) con HFP, ya disuelto el material se obtuvieron, con la técnica de electrohilado, andamios de PCU y PCU con fibronectina de plasma humano. Los andamios obtenidos fueron en forma de membrana y de tipo tubular con diámetros internos menores a 2 mm. Se evaluó la biocompatibilidad de las membranas con células HEK 293.

La caracterización del material como su composición química, morfología y propiedades, se apoyó con: cromatografía de permeación en gel (GPC), espectroscopía de infrarrojo con reflexión total atenuada (ATR-FTIR), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), análisis termogravimétrico (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC), dispersión de rayos X de ángulo bajo (SAXS), dispersión de ángulo alto (WAXS) y análisis dinámico mecánico (DMA). La morfología de las fibras se evaluó con microscopía electrónica de barrido (SEM) y finalmente, la identificación de la fibronectina de plasma humano en los andamios se realizó con espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (SEM-EDS) y ángulo de contacto. La biocompatibilidad de las membranas se estudió con ensayos de

multiplicación celular (MTT) y se evaluaron las propiedades mecánicas de los andamios de PCU y PCU con fibronectina.

Los resultados obtenidos mostraron que la mezcla de disolventes como DMF/ THF a diferentes concentraciones permiten obtener fibras de PCU con diámetros de  $0.17\pm 0.17 \mu\text{m}$ ., diámetro menor al reportado por otros autores, que la incorporación de glicoproteínas de adhesión al sistema como la fibronectina de plasma humano mejora la multiplicación celular sobre los andamios y que los andamios de tipo tubular de PCU presentan un arreglo laminar, que en pruebas en vivo podrían emular las paredes de revestimiento de los vasos sanguíneos. Finalmente en este trabajo se generó tecnología para la fabricación de arterias delgadas ya que el diámetro interno de los andamios obtenidos fue de 1.76 mm diámetro menor al reportado por otros autores.



# CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

### 1. Antecedentes

Los avances en el estudio de la ingeniería de tejidos han facilitado la proliferación celular y la regeneración en entornos locales (Yosihiko, 2008), que contribuyen al desarrollo de nuevos biomateriales en el área de ingeniería de tejidos cardiovascular. Se requiere que los tejidos sean diseñados con una alta tasa de permeabilidad hemodinámica y tiempos de degradación (cambios físico y/o químicos) (Kannan Ruben Y., 2004).

El diámetro interno de las arterias coronarias, varía entre 4 a 0.3 mm, según la ubicación, estas suministran sangre a los órganos a alta presión (10-16KPa) (Bouten C.V.C., 2011). Es por eso que la ingeniería vascular se ha centrado en la creación de pequeñas arterias (<6 mm diámetro), como consecuencia de la limitada disponibilidad de autoinjertos y a la acelerada aterosclerosis de algunos injertos existentes.

Bajo la ingeniería de tejidos se ha trabajado en el área de prótesis vasculares de tipo sintético, destinadas a restablecer la circulación arterial o venosa, para reemplazar de forma total o parcial conductos o puentes de derivación en enfermedades vasculares como obstrucción arterial (EVP o aterosclerosis), aneurismas aórticos y aneurismas venosos.

Las prótesis biológicas y sintéticas que son de mayor uso para la regeneración del sistema vascular son: la vena de cordón umbilical humano recubierto con malla de poliéster, las prótesis de dacrón impregnadas de colágeno de origen bovino y el teflón (PTFE). Sin embargo, estas no cumplen con los condiciones de una prótesis idónea, Para fines prácticos, se recomiendan las prótesis de alta porosidad que, aunque

presentan un mayor sangrado, al momento de la implantación, el material presenta una buena incorporación al organismo. En cambio, las prótesis de baja porosidad producen menor sangrado al momento de su implantación, pero provocan engrosamiento importante de la neointima y como consecuencia, una mayor posibilidad de oclusión distal de la prótesis.

Para la formación de tejido vascular la ingeniería de tejidos trabaja bajo tres componentes básicos: las células, los andamios celulares y las señales (humoral y mecánica). En 1988 se demostró que las células musculares lisas de aorta de ratas cultivadas e implantadas sobre andamios biodegradables, muestran un rápido crecimiento celular sobre las paredes de las arterias (Naito Yuji, 2011) (Bin Liu F. X.-Y.-F., 2012).

En los últimos años se ha trabajado con fibras poliméricas fabricadas con la técnica de electrohilado. Esta técnica se basa en la formación de un chorro (jet) que sale por la aguja de una jeringa hacia un colector metálico. La jeringa contiene el polímero en forma líquida (disuelto o fundido). Por medio de una fuente de alto voltaje, cuyos polos se conectan a la punta de la aguja y al colector; se genera una diferencia de potencial (fuerzas de Coulomb) que impulsa al jet hacia el colector. En la punta de la aguja se forma un cono (cono de Taylor) que se alarga, adelgaza y solidifica rápidamente en su trayectoria hacia el colector, este nos da como resultado la formación de las fibras. El tiempo de formación de una fibra es de aproximadamente 0.0125 ms. La inestabilidad por flexión conduce a la formación de fibras uniformes con diámetros en escala nanométrica entre 1000 y 100 nm. (Demir M., 2002).

Trabajos realizados por Sang Jin Lee y sus colaboradores en el Instituto de Medicina Regenerativa Wake Forest, en Carolina del Norte, EU, utilizan la técnica de electrohilado como una herramienta versátil para obtener andamios tubulares a partir de materiales poliméricos sintéticos y naturales. Trabajan con andamios de tipo tubular, con diámetro interno de 4.75 mm y espesor de pared de 0.3 mm. Las fibras de poli- $\epsilon$ (caprolactona) (PCL) y colágeno son recolectadas en un mandril giratorio (100 rpm) a una distancia de 10 cm del inyector. Estos autores reportaron fibras con

diámetro aproximado de  $0.52 \mu\text{m}$ , una resistencia a la tracción de  $4.00 \pm 0.4 \text{ MPa}$  y una elasticidad de  $2.70 \pm 1.2 \text{ MPa}$ . Pruebas biológicas mostraron una importante confluencia celular. (Lee Sang Jin, 2008).

Posteriormente, Young Min Ju diseñó un sistema de andamio tipo bicapa, con la finalidad de ofrecer una mayor versatilidad en tamaño de poros y favorecer una adecuada interacción celular. Se electrohiló una mezcla física de PCL/colágena bajo dos diferentes condiciones: velocidad de flujo ( $3 \text{ mL/h}$ : $10 \text{ mL/h}$ ), concentración de la solución ( $5\%$  :  $15\%$ ), tipo de aguja ( $18\text{G}$ : $16\text{G}$ ) y distancia colector-inyector ( $10\text{cm}$ : $20\text{cm}$ ). La variación de diámetro de las fibras fue de  $0.27 \mu\text{m}$  a  $4.45 \mu\text{m}$  y como consecuencia el andamio obtenido, presentó diferentes tamaños de poros, bajo el fundamento de fibras más gruesas poros más grandes. En este trabajo se evaluó la interacción celular y propiedades mecánicas, lo que mostró una mejor adhesión de las células endoteliales en el material (Young Min Ju, 2010).

Paralelamente, en la Universidad de Shanghai Jiao Tong, China, Ting Ting Daia se estudió andamios prefabricados de poli-ácido glicólico (PGA) envueltos sobre tubos de silicona, a fin de formar estructuras tubulares a partir de células endoteliales linfáticas, con resultados alentadores sobre la biocompatibilidad (in-vitro/in-vivo) y adhesión celular sobre los materiales (Ting ting Daia, 2010). También se reportó un estudio con estimulación pulsátil eléctrica en un biorreactor durante 8 semanas. Se encontró que las células bajo estímulo dinámico pueden producir más colágeno y presentar una mayor orientación, que las células cultivadas bajo un entorno estático. (Chen Wang, 2010)

Es importante destacar la participación de otros polímeros sintéticos y naturales de tipo tubular con potencial aplicación en regeneración en vasos sanguíneos como la combinación de colágeno/quitosano/PLLA-PCL. Estos fueron electrohilados en forma tubular tipo capa y disueltos con 1,1,1,3,3,3 hexafluoro-isopropanol (HFIP) y ácido trifluoroacético. La capa interna y externa del andamio tubular se electrohiló con una mezcla de colágeno/quitosano, mientras que la capa media del andamio con el

copolímero de PLLA-PCL. Los resultados obtenidos mostraron un aumento de viabilidad celular. (Chen Huang, 2012).

También existen trabajos realizados con gelatina y diferentes polímeros sintéticos como la poli- $\epsilon$ (caprolactona) y poliuretano los cuales han reportado resultados alentadores sobre la proliferación de células endoteliales en los andamios. (Hajiali Hadi, 2011). De igual forma la incorporación de la proteína recombinante RGD (PNSR32) en andamios de PCL-gelatina ha tenido excelentes resultados en la ingeniería de tejidos a los 7 días de proliferación in-vitro. (Ping Xiang, 2008). Esto ha dado pauta a la construcción de nuevos andamios híbridos compuestos de heparina y diferentes polímeros, que aumentan la hemocompatibilidad de los andamios. Wang y colaboradores reportaron una disminución en la adhesión de plaquetas en materiales de PU-gelatina-heparina y un incremento en la proliferación de células endoteliales. (Ashoton J., 2011) (Wang H. Y., 2012)

Los poliuretanos usados como biomateriales cardiovasculares han mostrado tener buena compatibilidad y propiedades mecánicas. Gogolewski mostró, que el poli(éster-uretano) es un polímero no apto para implantes a largo plazo, debido a la rápida hidrólisis del poliéster del segmento suave del copolímero (Gololewski S., 1991). Para el caso poli(éter-uretano) que presenta una excelente estabilidad hidrolítica en estudios in-vivo, el segmento suave del éter mostró ser susceptible a la oxidación (Christenson E., 2004), que da como resultado la ruptura de la cadena y entrecruzamiento del segmento de poliuretano. Por otra parte el poli(carbonato-uretano) presenta una mayor estabilidad oxidativa, del segmento suave, tanto en pruebas in-vivo como in-vitro, lo que demuestra una mayor bioestabilidad del material en comparación con el poli(éter-uretano); además de presentar una menor activación plaquetaria y respuesta inflamatoria. (Shan-hui Hsu, 2004)

En estudios in-vivo e in-vitro realizados por Chirstenson y colaboradores en la Universidad de Cleveland, evaluaron los mecanismos de oxidación del poli(carbonato-uretano) (PCU) y poli(éter uretano) (PEU). Los estudios indicaron un alto módulo elástico y reducción de la elongación en el PCU, lo cual se puede atribuir a la reducción

de la flexibilidad del segmento suave del poli(carbonato), comportándose el material como un elastómero semi-rígido (Christenson E., 2003). Aunque el grado de biodegradación se limita a una capa superficial, la biodegradación del material fue significativamente menor a la del PCU que la exhibida por el PEU. Los resultados reportaron una mayor pérdida de peso molecular por parte del PEU a los 24 días de pruebas in-vitro, en comparación con el PCU. Estos resultados se corroboraron con cromatografía de permeación en gel (GPC) .Por otra parte modificaciones en la síntesis del poli(carbonato uretano) pueden mejorar sus propiedades mecánicas en el material. (Szalest-Lewandowska A., 2007)

## 1.2 Justificación

En el área de prótesis vasculares se ha trabajado con materiales de tipo sintético como los tubos rígidos de dacrón, destinados a restablecer la circulación arterial al realizar una arteriectomía. Sin embargo, el uso de tubos rígidos ocasionan cambios en la disparidad del calibre entre los conductos unidos por anastomosis y cambios hemodinámicos en la zona de la sutura que originan una hiperplasia progresiva de la mioíntima en la zona y una oclusión principalmente en tubos rígidos con calibre menor a 6 mm.

Por lo tanto, el concepto de distensibilidad en los últimos trabajos ha tomado gran importancia principalmente en tubos menores a 6 mm. , debido al alto número de complicaciones reportadas como consecuencia de la estenosis distal. Actualmente en ingeniería de tejidos se trabaja en materiales de alta porosidad que permitan una mayor incorporación del material con las células. Trabajos como los de Yakai Feng y colaboradores reportaron haber electrohilado fibras de poli(carbonato uretano) (PCU) con diámetro promedio de 0.43 a 1.79 $\mu$ m con variaciones en la velocidad de flujo (0.6 a 1.8 mL/h) y mezcla de disolvente en diferentes proporciones de N,N-dimetilformamida(DMF) y tetrahidrofurano(THF). Se obtuvieron andamios de aspecto tubular sobre un mandril rotatorio a 100 rpm. y se evaluó la degradación del material

durante 3 meses con buffer salino (PBS) sin observar cambios en la morfología de las fibras. (Yakai Feng, 2011)

A la par trabajos como los de Arjun sobre citocompatibilidad in-vitro en andamios tubulares de PCU de tres diferentes marcas (el bionate, el chronoflex y el carbonate) mostraron que el uso de andamios con un alto porcentaje de porosidad, favorecían la multiplicación celular e incrementaban la concentración de nutrientes y oxígeno. (Arjun G.N., 2011). Las pruebas se evaluaron a los 2 y 6 días con fibroblastos de conejo (L929) y el estudio indicó mejores resultados de viabilidad en el bionate, en comparación con los otros materiales electrohilados.

No obstante, aún con los trabajos realizados, no se ha logrado obtener andamios tubulares de diámetros menores a 4.34 mm reportado por Sang Jin Lee (Sang Jin Lee, 2008) que presenten una mayor porosidad y permitan una mejor multiplicación celular en los andamios, mediante la incorporación de glicoproteínas adhesivas al sistema que favorezcan la interacción de las células endoteliales con el andamio.

## **1.3 Preguntas de investigación**

1. ¿Al modificar la presión de vapor de alguno de los disolventes, el diámetro de las fibras de policarbonato uretano disminuye o aumenta?
2. ¿La incorporación de fibronectina de plasma humano, mejora la multiplicación celular?
3. ¿Es posible obtener andamios tubulares de diámetros menores a 6 mm.?
4. ¿La incorporación de fibronectina de plasma humano a fibras de policarbonato uretano modifica sus propiedades térmicas, morfológicas y de biocompatibilidad de los andamios?

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar las propiedades morfológicas, superficiales, térmicas, mecánicas y de biocompatibilidad de las fibras modificadas de policarbonato uretano con incorporación de fibronectina de plasma humano, para su posible aplicación como andamio celular en la regeneración de vasos sanguíneos.

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

1. Obtener fibras de policarbonato uretano modificado con fibronectina de plasma humano mediante la técnica de electrohilado.
2. Diseñar el andamio tubular que sirva para realizar el cultivo de células endoteliales.
3. Evaluar las propiedades físico-químicas del material modificado.
4. Probar la viabilidad celular en los andamios.

# CAPÍTULO II

## MARCO TEÓRICO

### 2. Marco teórico

#### 2.1 Definición de Ingeniería de Tejidos

La Ingeniería de tejidos, también conocida como medicina regenerativa, es considerada como un campo multidisciplinario que abarca la ingeniería, la ciencia de materiales, la química, la medicina y la biotecnología, para mejorar la salud y la calidad de vida mediante la restauración parcial o total de un tejido u órgano.

Actualmente existen más de 20 tipos de tejidos que han sido estudiados. En donde la Ingeniería de tejidos busca:

- Utilizar una fuente de células apropiado, que puedan ser aisladas y produzcan una cantidad suficiente de células.
- Tener un material biocompatible, que pueda ser utilizado como sustrato celular, que pueda ser aislado o sintetizado. Además que sea fabricado con las dimensiones y propiedades mecánicas ideales. (Langer, 2000)
- Que las células puedan ser sembradas sobre el material y cultivadas en un biorreactor, para facilitar la adhesión celular, proliferación y diferenciación de las mismas. (Robin Ng. Z. Z., 2012)

Es decir, el objetivo de la ingeniería tisular es construir sustitutos funcionales de tejidos y órganos que puedan proporcionar una solución permanente. Por ello, la creciente necesidad de estos biomateriales, han llevado a los investigadores a utilizar células autólogas para la reconstrucción de órganos y tejidos. (Shounfeng Yang, 2001)

### **2.2 Ingeniería de tejidos y sus aplicaciones en vasos sanguíneos.**

En Ingeniería de tejidos actualmente se trabaja en técnicas de micro-fabricación que pueden crear soportes celulares en tres dimensiones (3D), con estructuras micro-porosas, que facilitan la infiltración celular y el transporte de nutrientes, lo que ha dado lugar a la modificación de superficies con moléculas biológicas como factores de crecimiento y proteínas de adhesión que pueden favorecer la adhesión, migración, proliferación, diferenciación y morfogénesis celular. (Naito Yuji, 2011)

Las propiedades del material como tiempos de degradación, cargas iónicas, resistencia mecánica y la conductividad eléctrica, también pueden desempeñar un papel importante en el tejido en desarrollo. Sin embargo, los efectos de estos parámetros como porosidad y tamaño de fibra pueden variar en gran medida con los tipos de células. (Ruben Y. Kannan, 2005)

La ingeniería de tejidos en cirugía cardiovascular representa una gran promesa para mejorar la calidad de vida en pacientes con enfermedades cardiovasculares. Actualmente se utilizan injertos vasculares sintéticos que tienen algunas limitaciones, como la trombosis y el poco crecimiento celular sobre los injertos. (Lian Xue, 2003)

Estudios realizados sobre andamios tubulares biodegradables han mostrado, por ensayos clínicos, que la principal causa de complicación sobre los injertos vasculares es la estenosis, que afecta aproximadamente el 16% de los injertos durante los primeros siete años después de la implantación. (Yuji Naito, 2011) (Schwartz S., 1984)

En la tabla 1 se muestran los trabajos realizados sobre algunos polímeros biodegradables, no biodegradables y mezclas de copolímeros sintéticos o naturales.

# MARCO TEÓRICO

Tabla 1 Polímeros utilizados para aplicaciones cardiovasculares

<b>Polímeros biodegradables</b>	<b>Polímeros no biodegradables</b>	<b>Polímeros sintéticos y naturales</b>	<b>Polímeros biodegradables y no biodegradables</b>
PLA (Sebastien Francois, 2009)	PET (Zuwei Ma, 2005)	PGA-gelatina (Hadi Hajiali, 2011)	PGA-PCL (M.Stekelenburg)
PCL (Jin-Jia Hu, 2013) (Sang Jin Lee, 2008)	PU (Amal Owida, 2011)	PLLA- quitosano/heparina (Bin Liu F. X.-Y.-F., 2012)	PU-PEG (Wang H. Y., 2012)
PGA (Ting ting Daia, 2010) (Chen Wang, 2010)	PTFE (Harris JR, 2002) (Demiri E., 1999)	PLLA/PCL- colágeno/quitosano (Chen Huang, 2012)	PU-PCL (Ashoton J., 2011) (Thi_hiep Nguyen, 2013)
PLLA (Cecilia F.L. Chu, 1999)	PCU (Shan-hui Hsu, 2004) (Christenson E., 2004), (Szalest-Lewandowska A., 2007) (Y. W.Tang, 2001) (Tang Y., 1999) (Arjun G.N., 2011) (Elizabeth M. Christenson, 2003) (Yakai Feng, 2011)	PCL-colágeno (Young Min Ju, 2010) (Bryan W. Tillman, 2009) (Lee Sang Jin, 2008)	
PHA (Guo-Qiang Chen, 2005)		PCL-gelatina (Ping Xianga, 2008)	
		PU-gelatina (Heyun Wang Y. F., 2011)	
		PU-gelatina/heparina (Heyun Wang y. F., 2012)	

PLA , poli(ácido láctico ); PCL, poli(caprolactona); PGA , poli(ácido glicólico); PLLA, poli(L-láctico); PHA , poli(hidroxicanoatos); PET , poli(etilen tereftalato), PU, poli(uretano); PTFE, poli(tetrafluoretileno), , PCU, poli(carbonato uretano), PEG , poli(etililen glicol) .

La adición de moléculas bioactivas como fibronectina, heparina, albúmina y elastina en diferentes sustratos juega un papel importante en la adhesión celular. En la actualidad la identificación de diferentes secuencias peptídicas (M.E Davis, 2005) (E. Genove, 2005) como: YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg), RYVVLPR (Arg-Tyr-Val-Val-Leu-Pro-Arg), TAGSCLRKFSTM (Thr-Val-Val-Gly-Ser-Cys-Leu-Arg-Lys-Phe-Ser-Thr-Met) y la secuencia del péptido RGD (Arg-Gly-Asp) derivado de la molécula de adhesión fibronectina se ha desarrollado en andamios tridimensionales. (Zhu Yabin, 2007) (Ruoshanti E., 1987) (Hersel U., 2003) (Zhu Yabin., 2006)

Estudios realizados con fibroblastos sembrados en PGA, PLGA Y PLLA modificados con ácido carboxílico han demostrado que la superficie se torna más hidrofílica y con aumento de la tasa de adhesión y proliferación celular en comparación con los no modificados. (Xiaohua Liu, 2012)

### **2.3 Estructura de los vasos sanguíneos.**

El aparato circulatorio está conformado por el sistema cardiovascular y el linfático. El sistema cardiovascular abarca el corazón y los vasos sanguíneos (arterias y venas) que configuran una red de transporte de la sangre hacia los distintos tejidos y órganos del corazón. Como se observa en la figura 1, el corazón es funcionalmente una bomba muscular doble. La bomba derecha recibe sangre desoxigenada a través de la vena cava superior e inferior, mientras que la bomba izquierda expulsa la sangre oxigenada por la arteria aorta para su distribución en el cuerpo. (Robin Ng. R. Z.-T., 2012)

El sistema circulatorio funciona de manera paralela con dos tipos de circulación, denominadas circulación menor o pulmonar y circulación mayor o sistémica. La primera tiene como fin recoger la sangre cargada de todos los desechos y transporta la sangre hasta los pulmones para ser nuevamente oxigenada. Por su parte, la circulación sistémica conduce sangre oxigenada por todo el organismo a los diversos órganos.

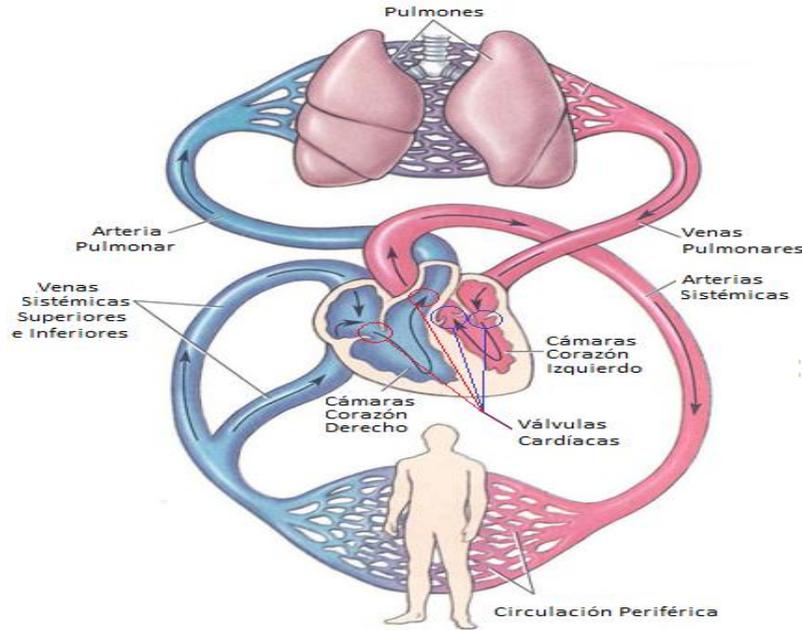


Figura 1 Sistema cardiovascular; el lado derecho del corazón recibe la sangre desoxigenada y el lado izquierdo del corazón bombea la sangre oxigenada a todo el cuerpo.

Las arterias conducen la sangre desde el corazón a los órganos a través de sus ramificaciones llamadas arteriolas y posteriormente por los capilares. En los capilares se da el intercambio de sustancias entre la sangre y las células. La sangre del capilar confluye en las vénulas que a su vez forman las venas pequeñas y estas se unen para formar las grandes venas (Xiaohua Liu, 2012). En la tabla 2 se observan las diferencias morfológicas entre las arterias y venas sistémicas.

Tabla 2 Diferencias estructurales entre arterias y venas

Arterias	Venas
Las arterias sistémicas salen del corazón	Las venas sistémicas llegan al corazón
Presión sanguínea fuerte y veloz	Presión sanguínea débil y lenta
Sus conductos no presentan válvulas	Los conductos tubulares presentan válvulas en su interior
La red es única, es decir sale una arteria	La red del sistema doble, es decir, regresan dos o más venas.

El sistema cardiovascular comienza su desarrollo durante la tercera semana de gestación, donde todos los componentes como el corazón, vasos sanguíneos y hematocitos se derivan de la capa germinal mesodérmica. El sistema cardiovascular es

el primero en funcionar en el embrión y la sangre comienza a fluir y el corazón a latir antes de terminar la tercer semana. (Robin Ng. Z. Z., 2012)

El desarrollo vascular depende de dos mecanismos: la vasculogénesis, en el cual los vasos se forman por coalescencia de angioblastos, y la angiogénesis que consiste en la aparición de esbozos vasculares a partir de vasos existentes. Los vasos de mayor tamaño como la aorta dorsal y las venas cardinales se forman por vasculogénesis y los restantes por angiogénesis. Todo el sistema esta guiado por señalizadores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) y otros factores de crecimiento. (Langer, 2000).

En la figura 2 se puede observar como las paredes de las arterias y venas están conformadas de tres capas (túnica íntima, túnica media y túnica adventicia) mientras que los capilares sólo tienen una capa endotelial.

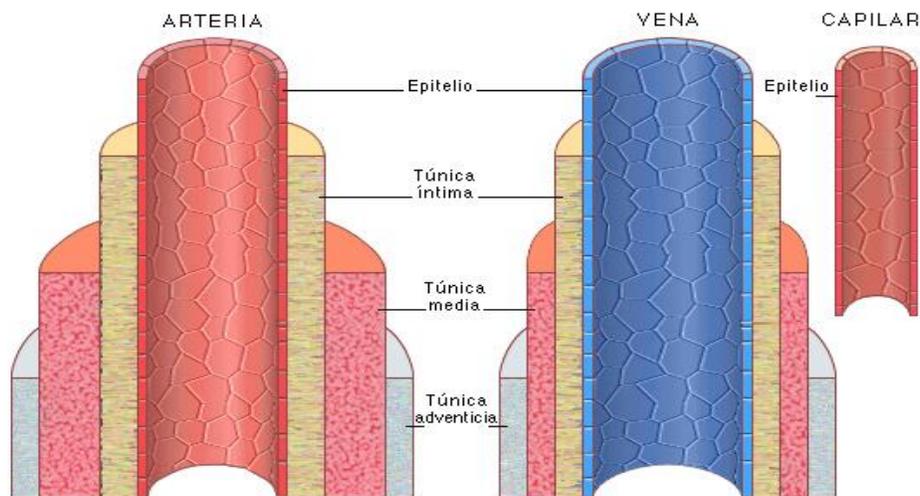


Figura 2 Estructura histológica de los vasos sanguíneos. Muestra como la túnica media e íntima de las arterias tienen una mayor cantidad de capas celulares, a diferencia de las venas.

## 2.3.1 Arterias

Las paredes de las arterias están conformadas por tres capas:

- Capa interna o túnica íntima: esta se compone de epitelio escamoso simple llamado endotelio, una membrana basal y una capa de tejido elástico.

- Capa intermedia o túnica media: es la más gruesa, se compone de una disposición concéntrica de tejido conectivo y células musculares lisas. Debido a la cantidad de fibras elásticas, las arterias son muy distensibles ante los cambios de presión.
- La capa externa o adventicia o túnica externa; es un revestimiento de tejido conectivo, esta se compone de fibras elásticas y colágena. En algunas arterias es posible encontrar una lámina elástica externa entre la túnica media y la externa.

La vasoconstricción del aparato circulatorio es estimulada por la contracción de las fibras del músculo liso, lo que produce un estrechamiento de la luz del vaso sanguíneo. El vaso es innervado por el sistema nervioso autónomo simpático, por lo que al disminuir la estimulación simpática, las fibras del músculo liso se relajan, lo que aumenta el diámetro de los vasos. A este proceso se le conoce como vasodilatación. Existen dos tipos de arterias: las musculares y las elásticas, con diferencias morfológicas e histológicas.

### **2.3.2 Venas**

Las venas conducen la sangre de regreso al corazón, estas poseen paredes más delgadas que las arterias. Su presión venosa es mucho menor y presentan una pared con más tejido conectivo que las arterias.

La pared venosa se compone de tres capas: la túnica íntima, media y adventicia. Pero a diferencia de las arterias estas carece de láminas elásticas interna y externa. Las venas se clasifican en venas grandes, medianas y pequeñas.

## 2.4 Hemodinámica

La mecánica de fluidos del sistema circulatorio es controlada por distintos factores físicos, donde la velocidad de corriente del torrente sanguíneo depende del área transversa del vaso. Las diferencias en la velocidad de corriente varían según el tipo de vaso, en la tabla 3 se presentan los diámetros de diferentes vasos sanguíneos y el espesor de la pared.

Tabla 3 Propiedades físicas de cada uno de los vasos sanguíneos en el cuerpo humano.

Vaso	Diámetro de la luz (cm)	Espesor de la pared (mm)
Aorta	2.5	2
Arterias pequeñas	0.4	1
Arteriolas	0.0030	0.0200
Capilares	0.0005	0.0010
Vénulas	0.0030	0.0020
Venas pequeñas	0.5	0.5000
Vena cava	3	1.5

El concepto de energía total (ET) de un fluido en movimiento es la resultante de la energía potencial (EP) y la energía cinética (EC) del sistema. Para el modelo arterial, la EP está conformada de la energía intravascular (P) generada por la contracción del ventrículo izquierdo y de la energía hidrostática (EG). Por lo tanto, la energía total del sistema (ET) se puede expresar como:

$$ET = P + EG + EC \quad (1)$$

la energía hidrostática se define:  $EG = \rho \cdot h \cdot g \quad (2)$

y la energía cinética:  $EC = \frac{1}{2} \rho v^2 \quad (3)$

al sustituir en la ecuación (1)  $ET = P + \rho \cdot g \cdot h + \frac{1}{2} \rho v^2 \quad (4)$

donde:  $\rho$  = densidad de la sangre  $(1.050 \text{ gr/cm}^3)$

$$g = \text{gravedad} \left( 9.81 \text{ cm/s}^2 \right)$$

$h$  = diferencia de altura entre los dos puntos evaluados.

La energía total del sistema se expresa en ergios por centímetro cúbico ( $\text{erg/cm}^3$ ). Para el caso de la hemodinámica patológica como la aterosclerosis ocurre un endurecimiento de las arterias, lo que produce un estrechamiento (estenosis) de las arterias y genera una disminución de la presión en la arteria, con lo que aumenta la velocidad de flujo. Este incremento se refleja en soplos fisiológicos o gasto cardiaco elevado como consecuencia del flujo sanguíneo turbulento.

El módulo de elasticidad es otro punto importante en la hemodinámica arterial, este se define en función del efecto de Windkessel, que establece que durante la sístole cardiaca, las arterias experimentan el efecto de dilatación longitudinal y elongación transversal, que a su vez se convierte en energía almacenada. Matemáticamente, el módulo de elasticidad varía en función del coeficiente de elasticidad parietal y el grado de resistencia al paso de la sangre.

El módulo de elasticidad ( $E$ ) se define como:

$$E = \tau / \varepsilon \quad (5)$$

donde  $\tau$  es la fuerza aplicada y  $\varepsilon$  la tensión resultante. En el caso de la arteria,  $\tau$  es función de la presión transmural ( $P$ ), que es la diferencia de la presión intra y extravascular, por el radio ( $r$ ) de la circunferencia de luz arterial entre el grosor de la pared arterial ( $\delta$ ).

$$\tau = P \cdot r / \delta \quad (6)$$

Mientras que la tensión resultante se relaciona con el incremento del radio total de la arteria ( $\Delta R$ ) con respecto al radio inicial ( $R$ ).

$$\varepsilon = \Delta R / R \quad (7)$$

Por lo tanto, el módulo de elasticidad de una arteria, establece que es directamente proporcional al gradiente de presión aplicado y a su radio exterior e inversamente proporcional al incremento de este último. Los valores de estos guardan relación con la edad de la persona, la cantidad de elastina y colágeno de las paredes.

La viscosidad sanguínea se define como la fricción o rozamiento que se produce en las paredes del vaso. Así que la resistencia de deformación inducida por la fuerza de interacción molecular del fluido determina parte de su velocidad.

## 2.5 Definición de polímero

La palabra polímero se deriva del griego *poli* que significa *muchos* y *meros* que significa *partes*. Como se observa en la figura 3, los polímeros están formados por pequeñas unidades químicas de bajo peso molecular, conocidas como monómeros que reaccionan químicamente mediante enlaces covalentes para formar una gran molécula de alto peso molecular. (Billmeyer, 2004)

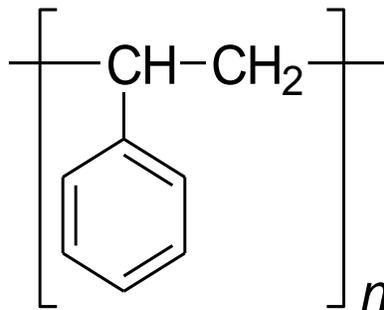


Figura 3 Estructura del poli(estireno) a partir de la unidad repetitiva del estireno

### 2.5.1 Clasificación de los polímeros

Existen distintas formas de catalogar los polímeros, una es por su unidad repetitiva y se clasifican en:

- Homopolímeros: son aquellos compuestos formados de una sola unidad repetitiva de monómero.
- Copolímeros: son compuestos conformados por diferentes unidades de monómeros polimerizados todos en una unidad estructural llamado polímero.

La polimerización es una reacción química en la que los monómeros se unen para formar una cadena polímero, en las cuales un monómero iniciador activa a otro monómero en donde comienza una reacción en cadena. Con esto es posible obtener polímeros con longitudes de cadenas predecibles y controlar sus propiedades a nivel molecular. De esta forma es posible tener polímeros con topologías distintas. De tipo lineal, ramificada, entrecruzada y red como se ve en la figura 4.

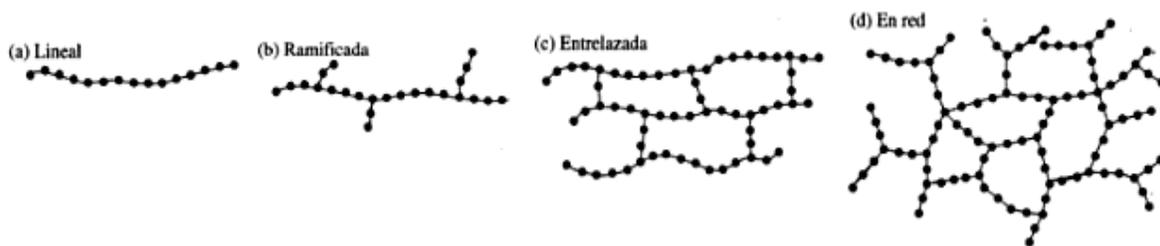


Figura 4 Estructuras topográficas de los polímeros

A diferencia de los polímeros lineales o termoplásticos, los polímeros ramificados presentan un mayor incremento en la resistencia a la deformación y resistencia al agrietamiento por esfuerzo. La densidad de los polímeros ramificados es menor que la de una cadena lineal, porque las ramificaciones interfieren con la eficiencia del empacamiento de las cadenas de polímero. En la figura 4.c y d, el entrecruzamiento tridimensional de las ramas dificulta los movimientos de las cadenas, lo que produce un incremento en la resistencia del material.

Los polímeros se pueden clasificar también por su origen en polímeros naturales o sintéticos.

- **Polímeros naturales:** Este tipo de macromoléculas tienen la ventaja de ser similares a la matriz orgánica. Lo que le permite al medio biológico aceptarlas y metabolizarlas. Ejemplo de polímeros naturales esta: el colágeno, el ácido hialurónico, la elastina, la gelatina, el quitosano y la fibronectina. Estos son polímeros candidatos para la ingeniería de tejidos, ya que favorecen el crecimiento celular. Sin embargo, este tipo de materiales presentan propiedades mecánicas débiles.
- **Polímeros sintéticos:** Son macromoléculas sintetizadas mediante diversas rutas y pueden ser procesados por diferentes técnicas para obtener características de geometría y porosidad. Su morfología puede ser modificada por medio de reacciones químicas y mediante procesos de transformación, para adoptar diferentes geometrías. Su uso ha sido ampliamente utilizado para dispositivos médicos e implantes; ver tabla 4.

Tabla 4 Polímeros en aplicaciones biomédicas

<b>Polímero Sintético</b>	<b>Aplicaciones biomédicas</b>
Poli (L-lactida)	Placa y tornillos para fijación ósea
Poli ácido glicólico	Sutura biodegradable
Nylon	Suturas biodegradables
Siliconas	Implantes mamarios y faciales
Poli(propileno)	Suturas y válvulas cardíacas
Poli(metacrilato de metilo)	Implantes oculares

## 2.6 Policarbonato uretano

Los poliuretanos son utilizados en aplicaciones biomédicas, debido a sus propiedades mecánicas, químicas y de biocompatibilidad desde los años 70s (Tanzi Ma. Cristina, 1996), el policarbonato uretano es un copolímero formado de dos segmentos: uno

blando de policarbonato y otro segmento duro de poliuretano, como se observa en la figura 5 del policarbonato (uretano).

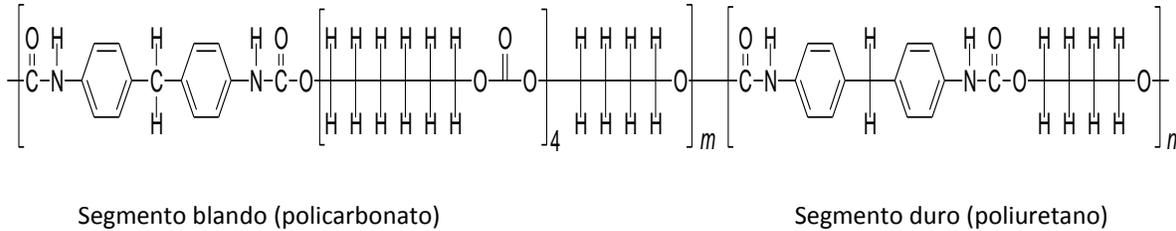
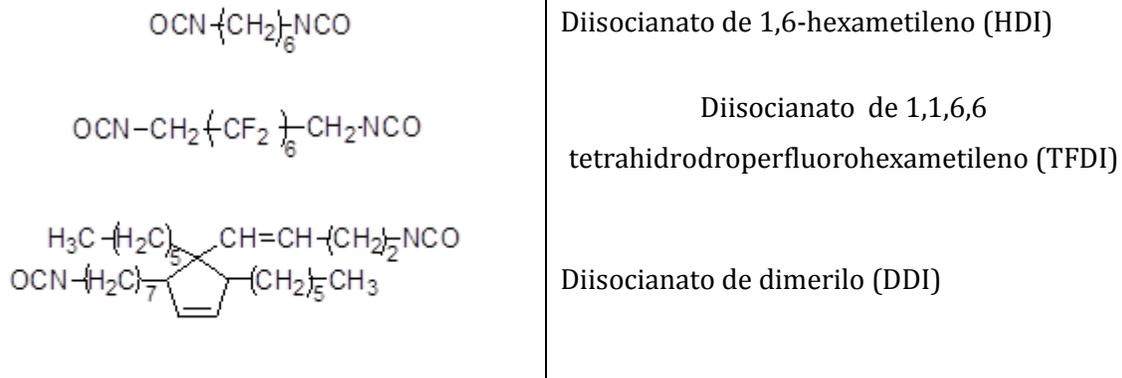


Figura 5 Estructura química del poli(carbonato uretano) PCU

El policarbonato es un termoplástico con excelentes propiedades mecánicas que incluyen alta tenacidad y buena resistencia a la termofluencia. Es uno de los mejores termoplásticos; por su resistencia al calor, puede utilizarse a temperaturas cercanas a los 125°C. El poliuretano se obtiene mediante la reacción de un polioliol y un diisocianato, en la tabla 5 se muestran ejemplos de diisocianatos con los que puede reaccionar el diol para formar el poliuretano. Los poliuretanos se pueden clasificar en termoestables o termoplásticos dependiendo del tipo de estructura química.

Tabla 5 Diisocianatos más comunes

Diisocianato	Nombre (abreviatura)
	Diisocianato de 4,4, difenilmetano (MDI)
	Diisocianato de 2,6 y 2,4 tolueno (TDI)
	Diisocianato de 4, 4 dicitcloheximetano
	Diisocianato de 1,4 ciclohexano (CDI)



El poliuretano ha sido utilizado en los últimos años en implantes cardiovasculares, debido a su buena hemocompatibilidad y sus propiedades mecánicas. El poli(carbonato uretano)(PCU) y el poli(éter uretano)(PEU) se han usado como un remplazo biomédico tradicional. Shan-Huis estudió los microdominios del poliuretano sintetizado con diferentes segmentos suaves evaluando sus propiedades mecánicas y de biocompatibilidad de manera in vitro e in vivo. (Shan-hui Hsu, 2004)

De manera in vitro e in vivo Christenson y colaboradores estudiaron cambios estructurales del segmento suave del PEU, el cual es más susceptible a la ruptura de cadena en comparación con el PCU. Esto se ha observado con espectroscopia de infrarrojo mediante la cual se ha observado un decremento de la intensidad del pico a  $110\text{ cm}^{-1}$ , el cual se atribuye al ataque oxidativo en el segmento suave, como resultado de la ruptura de la cadena. (Christenson E., 2003) (Christenson E., 2004)

Se ha comprobado a través de estudios de biocompatibilidad (cultivos de células de vena umbilical humana) y respuesta inflamatoria (cultivos de monocitos de sangre humana y plasmas ricos en plaquetas) en películas de PCU y PEU, que el poli(carbonato uretano) presenta una menor activación de adhesión plaquetaria y activación de monocitos en comparación con el PEU. Además de presentar una mayor proliferación de células endoteliales en la superficie del PCU. En pruebas dinámicas mecánicas (DMA) el módulo de elasticidad del poli(carbonato uretano) fue más bajo en comparación con el del poli(éter uretano), lo que indica una mayor flexibilidad, por

lo que el PCU es más susceptible a aplicaciones cardiovasculares. (Shan-hui Hsu, 2004)

La incorporación de algunos aditivos como aceite de castor durante el proceso de polimerización del poli(carbonato uretano) han mejorado las propiedades mecánicas como esfuerzo a la tensión y módulo de elasticidad. Sin embargo, la incorporación de este tipo de aditivos ha influenciado en la disminución de la concentración de hemoglobina en plasma en pruebas biológicas. (Szalest-Lewandowska A., 2007)

En estudios comparativos sobre citocompatibilidad en membranas porosas electrohiladas de poli(carbonato uretano), en sus presentaciones comerciales como Bionate (EBN), Chronoflex (ECF) y el Carbonate (ECT) se determinó que el EBN presenta mejores resultados de viabilidad con fibroblastos. En pruebas mecánicas, el EBN presentó un módulo de elasticidad alto ( $16.6 \pm 3$  MPa) en comparación con las otras marcas ECF ( $8.6 \pm 0.3$  MPa) y ECT ( $2.1 \pm 1.3$ ) y resistencia de retención a la sutura. (Arjun G.N., 2011)

### **2.7 Moléculas de adhesión**

Las moléculas de adhesión celular son glicoproteínas que se encuentran en la superficie de la mayoría de las células, que interactúan en la adhesión célula-célula o en la adhesión de la célula con la matriz extracelular, donde los receptores pueden presentar una alta o baja afinidad a sus respectivos ligandos.

Las moléculas de adhesión, al unirse a su ligando o receptor específico, producen un cambio conformacional en el dominio extracelular que afecta la función de las células, lo que produce cambios intracelulares en el citoesqueleto o en su composición (Hatzfeld, 2005). Las moléculas de adhesión se clasifican en cuatro familias:

- Receptores de las integrinas.
- Receptores de inmunoglobulinas.
- Receptores de las selectinas.

- Receptores de la cadherinas

## 2.7.1 Integrinas

Las integrinas son una familia heterodimérica de glicoproteínas, con un rol importante en varios procesos biológicos como agregación plaquetaria, inflamación, función inmune, reparación de tejidos, metástasis celular y migración de tejidos durante la embriogénesis. Como se observa en la figura 6, todas las integrinas poseen dos subunidades de tipo no covalente denominadas alfa y beta. Se han identificado por lo menos 20 subunidades alfa y 8 subunidades beta. Las integrinas se unen, a una amplia variedad de proteínas de la matriz extracelular denominadas ligandos. Los ligandos más importantes son la fibronectina, el fibrinógeno, la trombospondina, lavitronectina y el factor de von Willebrand. Estos ligandos poseen una secuencia de reconocimiento RGD (Arg-Gly-Asp) mediante la cual se unen a las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , y  $\beta 3$  de las integrinas. (D' Souza S., 1998) (D'Souza S., 1991)

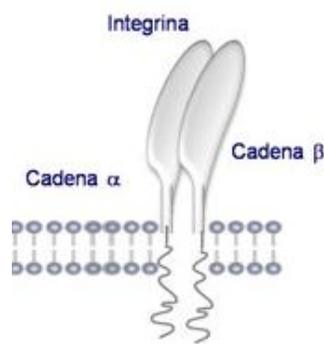


Figura 6 Integrina conformado de dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$

## 2.7.2 Fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína adhesiva, presente en forma soluble en el plasma e insoluble en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos. La concentración de esta proteína en el plasma es de aproximadamente  $300 \pm 100 \mu\text{g/mL}$ . Esta es sintetizada y secretada por una gran variedad de células, por lo tanto es uno de los

componentes de mayor distribución en el cuerpo, participa en las reacciones bioquímicas de diversos procesos fisiológicos y patológicos. Debido a la presencia de dominios multifuncionales en su estructura es capaz de unirse al colágeno, al fibrinógeno, a la fibrina, a la heparina, al factor XII y a las plaquetas. Además de participar en la regulación de procesos de la hemostasia como: adhesión, agregación plaquetaria y cicatrización celular. (Sara Lucena, 2007)

## 2.7.2.1 Características generales de la fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína polipeptídica, formada por una molécula asimétrica que consiste en dos subunidades similares de 220kDa cada una, como se observa en la figura 7. En su estructura encontramos de 1-2 puentes de sulfidrilos y aproximadamente 20 disulfuros por unidad principalmente en la región N-terminal y C-terminal. Estudios bioquímicos han demostrado que la fibronectina plasmática es soluble y la fibronectina celular es insoluble, sin embargo, presentan similitudes en la composición de los aminoácidos, en los carbohidratos y en los dominios estructurales de la unión celular. El punto isoelectrico de la fibronectina es de 5.5 a 6.3.

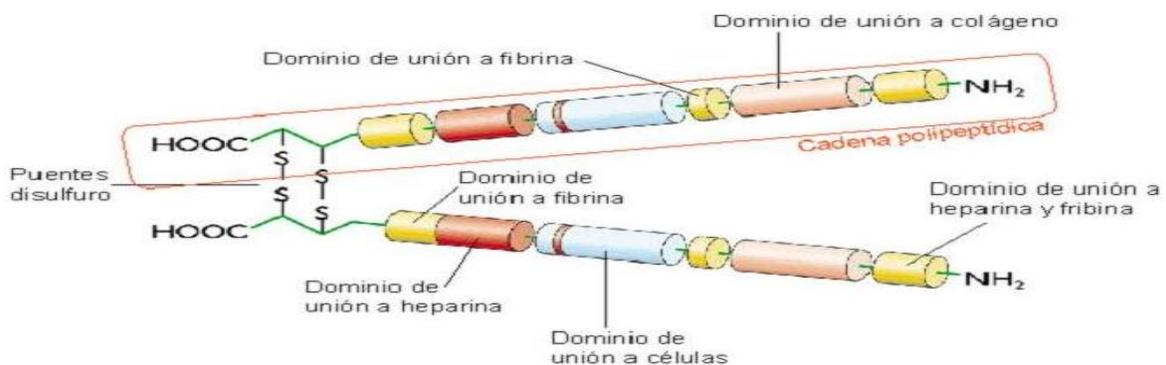


Figura 7 Estructura y dominios de la fibronectina

La fibronectina es una de las principales proteínas del cuerpo, localizadas en la mayoría de los espacios extracelulares de los tejidos en el plasma y en los fluidos amnióticos, seminal, cerebro-espinal y articular. (Makogonenko E., 2002)

### 2.7.2.2 Dominios funcionales de la fibronectina

La fibronectina es una proteína de adhesión que tiene la capacidad de interactuar con una amplia variedad de macromoléculas, como el colágeno, la fibrina, el factor XIII, la heparina y los proteoglicanos.

Como se observa en la figura 8, en la región central de la fibronectina se ha identificado un dominio de unión celular de 105KDa., conformado por una secuencia de péptidos: arginina (R), glicina (G) y ácido aspártico (D) o también conocida como secuencia de reconocimiento RGD.

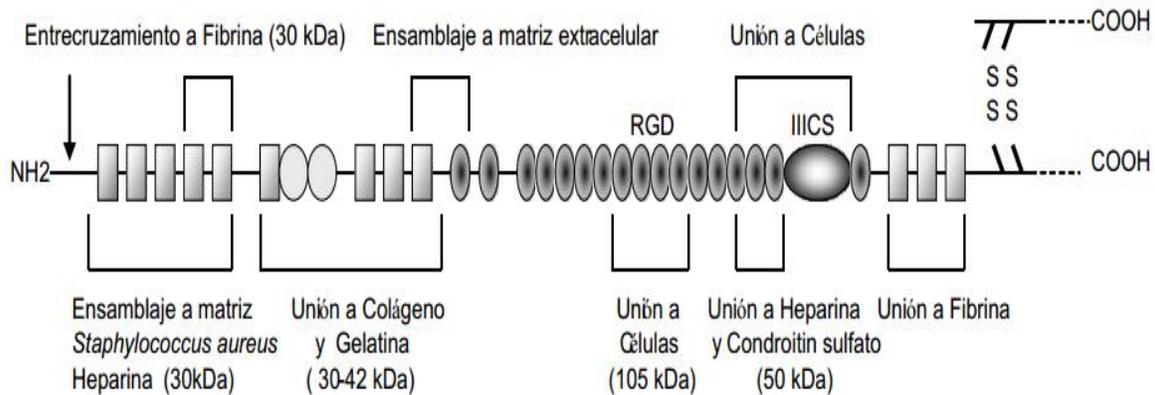


Figura 8 Dominios funcionales de la fibronectina

Esta región central en la fibronectina ayuda a adherir células a la matriz extracelular, a través de su interacción con los receptores de adhesión como la integrina  $\alpha5\beta1$ , (Yamada K M., 1989) los cuales facilitan la unión entre la fibronectina y las moléculas que forman el citoesqueleto (talina, vinculina y filamentos de actina), (Mosher Df., 1984) como se observa en la figura 9.

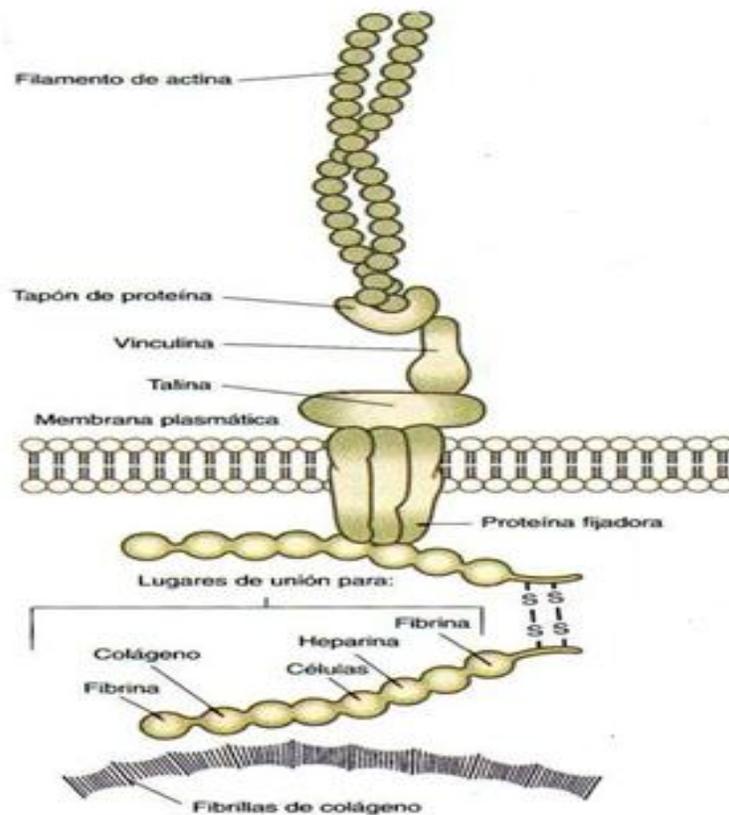


Figura 9 Receptores de adhesión entre la fibronectina y el citoesqueleto

## 2.8 Respuesta inflamatoria e interacción leucocito- endotelio.

El fenómeno inflamatorio es un mecanismo importante de defensa que es desencadenado por diversos factores endógenos y exógenos. El proceso inflamatorio consiste esencialmente en la liberación de líquido y células (linfocitos y monocitos) hacia un sitio definido, en donde ocurre una destrucción de componentes de la matriz extracelular, cuando se realiza una anastomosis como consecuencia de una arteriectomía.

En condiciones fisiológicas los leucocitos del torrente sanguíneo pueden tener contacto con las células endoteliales, pero estos contactos son aleatorios, fugaces y no son consecuencia de la interacción entre moléculas de adhesión. En una condición no fisiológica, cuando se genera un foco inflamatorio, se producen diversas sustancias,

que inducen la activación de sustancias quimiotácticas que favorecen la expresión de moléculas de adhesión tales como las selectinas P y E, la molécula de adhesión intercelular y el receptor de integrinas VCAM-1. La expresión de estas moléculas tiene como consecuencia el incremento de la adherencia de las células endoteliales hacia los leucocitos; de este modo, el contacto inicial entre ambas ya no es aleatorio ni transitorio. Durante este proceso inflamatorio se libera, el factor activador de plaquetas y la histamina que posee una actividad vasodilatadora.

### **2.9 Técnicas para fabricar fibras poliméricas para ingeniería de tejidos.**

Las técnicas convencionales para procesar polímeros en fibras con diámetros menores a las 10  $\mu\text{m}$  presentan grandes dificultades. Por esa razón se han desarrollado varios métodos para la producción de nanofibras que simulen la geometría de la matriz extracelular. En la actualidad existen varias técnicas utilizadas para la producción de fibras poliméricas a escala, como la separación de fases, el auto-ensamble y electrohilado.

La separación de fases consiste en la disolución del polímero para su posterior gelificación, el solvente es extraído del gel mediante un solvente diferente, finalmente, el material es congelado y secado a vacío, lo que da lugar a una espuma porosa a escala nanométrica. El proceso de auto ensamblaje se realiza en impresoras 3D, esta es una máquina capaz de realizar impresiones de diseños de piezas o maquetas volumétricas a partir de un diseño hecho en un ordenador. Este tipo de impresoras inyectan polímeros en estado líquido y son curadas con luz ultravioleta. Se trata de fotopolímeros de base acrílica con diferentes propiedades físico-mecánicas como: variedad de flexibilidades, elongación a la rotura, resistencia mecánica, colores, etc. Se caracteriza por su precisión y acabado de superficie. La técnica de electrohilado, por su parte, es un proceso por el cual la solución polimérica polarizable, es sometida a un campo eléctrico para la generación de fibras a escala micro y nanométrico, que puede ser colectada en diferentes formas y orientaciones. Es por eso que esta técnica ha

despertado gran interés en el área de ingeniería de tejidos por la simplicidad de los procesos y la gran diversidad de geometrías de los andamios fabricados.

### **2.9.1 Electrohilado**

La técnica de electrohilado apareció por primera vez en el electrospray de Rayleigh en 1897, sin embargo fue Formahls quien la patentó en 1934. Formahls inventó el aparato electrostático de electrohilado, donde a una solución polimérica se le aplicó un campo eléctrico proveniente del electrodo de polaridad negativa, para formar fibras delgadas que eran atraídas a un electrodo móvil de polaridad positiva.

Posteriormente, en 1994 a esta técnica se le dio el nombre de electrohilado, término que se deriva de “hilado electrostático”. Esto fue con base en el trabajo de Taylor en 1969 sobre chorros dirigidos a un colector mediante la influencia de un campo eléctrico.

El proceso de electrohilado utiliza fuerzas electrostáticas para generar fibras poliméricas. Al aplicar un campo electrostático de alto voltaje, el polímero disuelto en el capilar es sometido a una inestabilidad debido al alto voltaje con el cual se forman fibras al ser superada la tensión superficial de la gota de la solución polimérica.

Una serie de parámetros deben ser optimizados con el fin de generar fibras en lugar de gotas, tales como la distancia entre la aguja y el colector, el voltaje aplicado, la velocidad de inyección y el tipo de aguja. En recientes trabajos se han estudiado estos parámetros y demás variables del proceso, lo cual ha resultado en la elaboración de nanofibras con diámetros en el intervalo de 100 a 500 nm. Esto ha generado interés en el proceso de electrohilado debido a las aplicaciones biomédicas y liberación de fármacos.

El equipo de electrohilado consiste en un tubo capilar o aguja, a través del cual el líquido es sometido a un campo de alto voltaje con polaridad positiva o negativa por una fuente de alto voltaje y por un colector conectado a tierra. Mediante una bomba

de inyección, la solución polimérica es inyectada de forma controlada a través del capilar y forma una gota colgante en la punta del capilar, al aplicar el alto voltaje, la solución se carga por lo que las fuerzas de repulsión presentes en el líquido y las fuerzas de atracción del colector, generan fuerzas de tensión sobre el líquido. La intensidad del campo eléctrico se incrementa hasta que alcanza el equilibrio entre las fuerzas electrostáticas, esto conduce a la formación del cono de Taylor el cual está dirigido hacia el colector conectado a tierra.

El proceso de electrohilado se lleva a cabo a temperatura ambiente, los polímeros son disueltos en algún solvente volátil para su electrohilado y evaporación durante la trayectoria del inyector al colector. Existen diferentes tipos de arreglos de electrohilado tanto vertical como horizontal.

Las nanofibras resultantes pueden ser alineadas o no alineadas, dependiendo del tipo de colector utilizado. Las fibras no alineadas se caracterizan por tener grandes poros interconectados que pueden ser utilizados para imitar la matriz extracelular. Por otra parte, las fibras alineadas pueden promover la proliferación direccionada.

La preparación de la solución polimérica y los parámetros del equipo de electrohilado pueden afectar las propiedades finales de las nanofibras. Algunos parámetros importantes a considerar durante el proceso de electrohilado son: la influencia de la mezcla de disolventes, del voltaje aplicado, la concentración de la solución, la velocidad de flujo aplicado y el diámetro de la aguja. (Wan Jun Liu, 2013) (Xianfeng Wang, 2013) (Luo C. J., 2012) (Thandavamoorthy Subbiah, 2004) (Demir M.M., 2002) (Franco Edgar, 2008)

# CAPÍTULO III

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Materiales

- Para la construcción de los soportes celulares se utilizó:

Poli (carbonato uretano) (PCU) (Bionate ® II – 55D, DSM), fibronectina de plasma humano (Gibco). Se usaron como disolventes: dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF) y 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFP) (Sigma-Aldrich Chemical Company).

- Para el crecimiento celular.

Buffer de fosfatos salino (PBS, Gibco), solución enzimática de collagenasa tipo II [0.02%] en HEPES, HEPES pH 7.5, gelatina 0.02% en HEPES, medio de cultivo M-199 suplementado: con 5 unidades/ml de heparina, 10% de SFB, factor de crecimiento endotelial 25 µg/ml, hidrocortisona 0.4 µg/ml y antibiótico-antimicótico 1 %.

#### 3.2 Metodología experimental

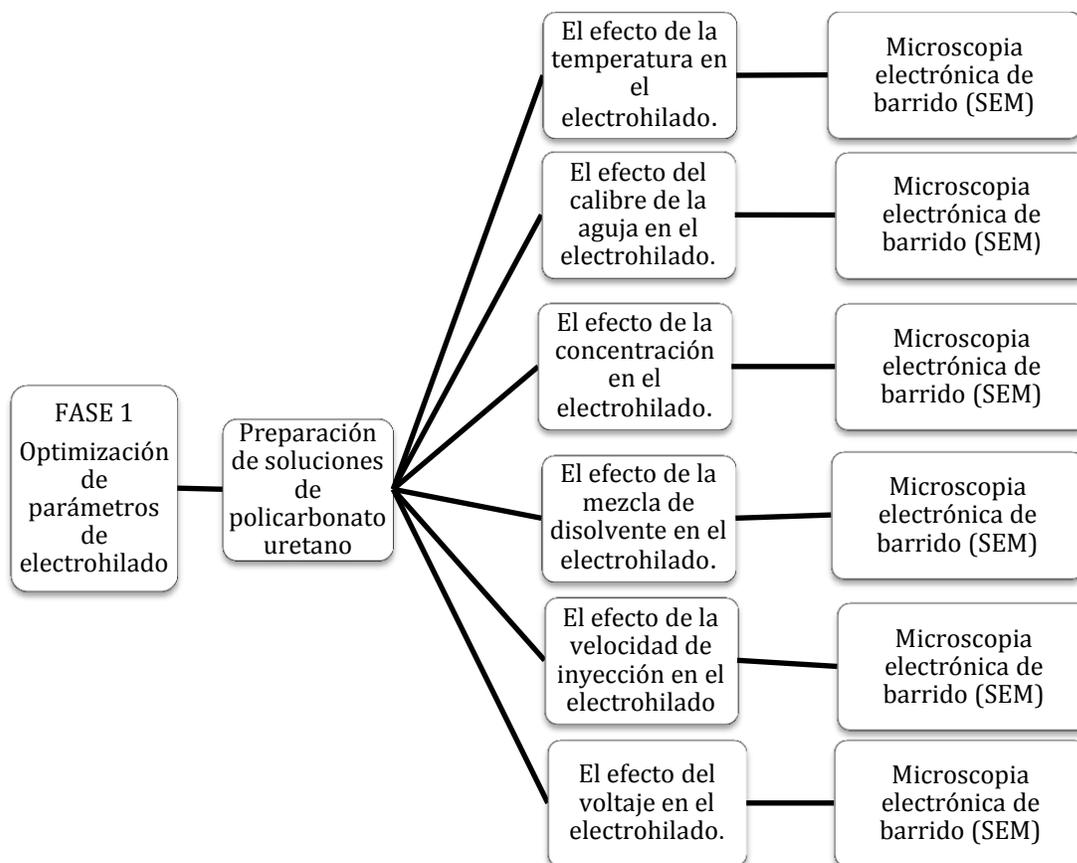
La metodología experimental de este trabajo se desarrolló en 7 fases, con la finalidad de generar tecnología de fabricación de arterias delgadas, para su posible aplicación como andamio celular en la regeneración de vasos sanguíneos:

- Fase 1: Optimización de parámetros de electrohilado.
- Fase 2: Andamios de PCU con fibronectina de plasma humano.
- Fase 3: Análisis por SEM de andamios tubulares

- Fase 4: Caracterización físico-química del policarbonato uretano.
- Fase 5: Identificación de fibronectina sobre los andamios.
- Fase 6: Efecto de la fibronectina en andamios de policarbonato uretano.
- Fase 7: Evaluación de biocompatibilidad.

## Fase 1: Optimización de parámetros de electrohilado.

Para determinar los parámetros óptimos de electrohilado, fue necesario experimentar bajo distintas condiciones como son: la temperatura, el calibre de la aguja, la concentración, la mezcla de disolvente, la velocidad de inyección y el voltaje. El siguiente esquema muestra la metodología realizada para la optimización de los parámetros:



Cada uno de los bloques esquematizados en la metodología de “optimización de parámetros de electrohilado” serán descritos, de manera más detallada a continuación:

### **a. Preparación de soluciones de policarbonato uretano.**

Se prepararon soluciones de PCU, bajo la siguiente metodología:

1. En un vaso de precipitado se preparó la mezcla de disolventes para cada una proporciones del sistema, por ejemplo para la proporción 90:10 se adicionó primero 2.7 ml de DMF (dimetilformamida) y 0.3 ml de THF (tetrahidrofurano):

- 100:0 → 3 ml. DMF
- 90:10 → 2.7 ml. DMF : 0.3 ml. THF
- 80:20 → 2.4 ml. DMF : 0.6 ml. THF
- 70:30 → 2.1 ml. DMF : 0.9 ml. THF
- 60:40 → 1.8 ml. DMF : 1.2 ml. THF
- 50:50 → 1.5 ml. DMF : 1.5 ml. THF
- 40:60 → 1.2 ml. DMF : 1.8 ml. THF

2. Las soluciones se prepararon en diferentes concentraciones al 10%, 12%, 14% y 16% (p/v). Se utilizó un matraz aforado de 2 ml. dependiendo de la concentración, se pesó PCU:

- 0.2 grs. de PCU para la solución PCU 10%.
- 0.24 grs. de PCU para la solución PCU 12%.
- 0.28 grs. de PCU para la solución PCU 14%.
- 0.32 grs. de PCU para la solución PCU 16%.

3. Posteriormente se adicionó la mezcla de disolvente hasta llegar al aforo. Todas las soluciones se dejaron en agitación constante durante 24 hrs., para disolver el polímero y homogeneizar la solución.

Los andamios planos y tubulares de PCU se obtuvieron por la técnica de electrohilado, con el equipo del laboratorio de nanofibras poliméricas del Instituto de Investigaciones en Materiales (UNAM) (Figura 10)

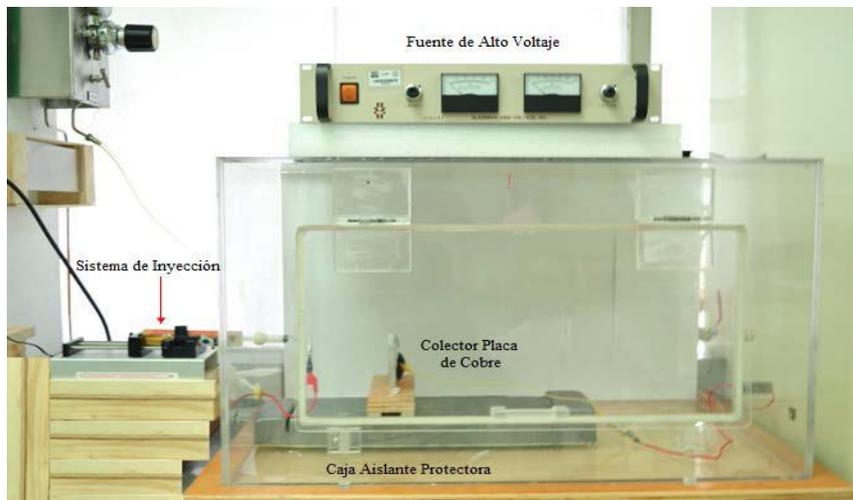


Figura 10 Partes del equipo de electrohilado. (a) Sistema de inyección de 5 jeringas. (b) Colector puede ser plano o rotatorio. (c) Fuente de alto voltaje (1 a 60 Kv). Los conectores de la fuente de poder (+) es conectado a la punta de la aguja y el (-) al colector. (Vera-Graziano R., 2012).

Para electrohilar la solución polimérica se usó un sistema axial. Se utilizó una bomba de inyección para 5 jeringas marca New era pump systems con sistema de control de velocidad de flujo y volumen de inyección. Una fuente de alto voltaje marca Glassman High Voltage, con regulador de voltaje (0 a 60 kV) y de corriente (0 a 1 mA). Los parámetros de velocidad de flujo variaron entre los 0.2 y los 0.4 ml/hr y el voltaje de 15 a 20 kV.

El proceso de electrohilado se realizó de la siguiente forma:

1. Se colocó la solución polimérica en jeringas de 5 ml, sobre la bomba de infusión (inyector) e introdujo la punta de la aguja por un orificio que comunica el exterior de la caja con el interior, en la punta de la aguja se colocó un caimán conectado al polo positivo de la fuente de alto voltaje.
2. En el interior de la caja se colocaron distintos colectores, dependiendo el caso:
  - a. Para los andamios planos, se utilizó una base de acrílico en posición vertical, perpendicular a la punta de la aguja. Sobre esta base de acrílico se colocó una placa de aluminio con dimensiones de 7 cm x 7 cm, con dos

caimanes conectados a los extremos de la placa conectados al polo negativo de la fuente de alto voltaje.

- b. Para los andamios tubulares, se construyó un colector con una varilla giratoria, sobre las cuales se recolectaron fibras a una velocidad de 500 rpm. Se utilizó una varilla de acero inoxidable grado médico ( $3/64=1.1906$  mm) ( $5/64 = 1.98$  mm). La varilla giratoria se conectó al polo negativo de la fuente.

3. Se inyectó un volumen de 0.6 ml de solución en pruebas preliminares y 1.8 ml para los andamios de caracterización y pruebas biológicas.

Los parámetros establecidos para este trabajo fueron seleccionados con base al trabajo realizado por Yakai Feng y colaboradores en el artículo “Electrospinning of polycarbonate-urethane biomaterials”. Con microscopía electrónica de barrido (SEM) se evaluó: el efecto de la temperatura en la cámara de electrohilado, el efecto del calibre de la aguja, el efecto de la concentración de la solución, el efecto de la velocidad de inyección, el efecto del voltaje aplicado y el efecto de la mezcla de disolvente, todo esto en la morfología de las fibras de policarbonato uretano.

## b. Efecto de la temperatura en el electrohilado

El efecto de la temperatura en la cámara de electrohilado se evaluó con el incremento de la temperatura de  $34^{\circ}$  C a  $44^{\circ}$ C, con esto se espera que a mayor temperatura se evapore mayor cantidad de disolvente y tenga efecto en la morfología de las fibras de policarbonato uretano. Las condiciones con las que se evaluó el efecto de la temperatura en la cámara de electrohilado, fueron las siguientes (Tabla 6):

Tabla 6 Condiciones para medir el efecto de la temperatura

Parámetros de electrohilado							
Polímero	Concentración (% p/v)	Disolvente	Velocidad (ml/hr)	Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Calibre aguja	Temperatura ( $^{\circ}$ C)
PCU	14	DMF	0.4	15	30	21	34
PCU	14	DMF	0.4	15	30	21	44

## c. Efecto del calibre de la aguja en el electrohilado

El efecto del calibre de la aguja se evaluó con la disminución del diámetro de la aguja de 0.8 mm. a 0.5 mm. Con esto se espera que al disminuir el diámetro interno de la aguja y aplicar la misma presión al émbolo, la cantidad de volumen de disolvente en la punta de la aguja disminuya y facilite su evaporación. En la Tabla 7 se describen las condiciones de electrohilado para evaluar el efecto en la morfología de las fibras.

Tabla 7 Condiciones para medir el efecto del calibre de la aguja

Parámetros de electrohilado							
Polímero	Concentración (% p/v)	Disolvente	Velocidad (ml/hr)	Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Calibre aguja	Temperatura (°C)
PCU	12	DMF	0.4	15	30	21(0.8 mm)	Ambiente
PCU	12	DMF	0.4	15	30	25(0.6 mm)	Ambiente

## d. Efecto de la concentración en el electrohilado

El efecto de la concentración se evaluó al incrementar la cantidad de polímero a 10%, 12% 14% y 16% con esto se espera, que la cantidad de disolvente dentro del sistema disminuya y facilite su evaporación. En la Tabla 8 se describen las condiciones para medir el efecto de la concentración.

Tabla 8 Condiciones para medir el efecto de la concentración

Parámetros de electrohilado							
Polímero	Concentración (% p/v)	Disolvente	Velocidad (ml/hr)	Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Calibre aguja	Temperatura (°C)
PCU	10	DMF	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	12	DMF	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	14	DMF	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	16	DMF	0.2	15	30	25	Ambiente

## e. Efecto de la mezcla de disolvente en el electrohilado a diferentes proporciones

Se estudió el efecto de diferentes proporciones del DMF y THF como disolvente del PCU e identificaron cambios en el diámetro de las fibras y algunos se correlacionaron con el trabajo realizado por Yakai Feng. Se trabajó en mezclas de disolventes según lo reportado en trabajos previos con PCU electrohilado (Yakai Feng, 2011) (Arjun G.N., 2011). En la Tabla 9 se muestran las proporciones de disolvente en las soluciones que fueron usadas en el electrohilado para evaluar los cambios morfológicos en las fibras de PCU.

Tabla 9 Condiciones para medir el efecto de la mezcla de disolvente a diferentes proporciones.

Parámetros de electrohilado							
Polímero	Concentración (% p/v)	Disolvente proporción	Velocidad (ml/hr)	Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Calibre aguja	Temperatura (°C)
PCU	10	100:0	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	10	90:10	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	10	80:20	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	12	100:0	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	12	90:10	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	12	80:20	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	14	100:0	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	14	90:10	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	14	80:20	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	14	70:30	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	14	60:40	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	14	50:50	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	14	40:60	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	16	100:0	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	16	90:10	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	16	80:20	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	16	70:30	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	16	60:40	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	16	50:50	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	16	60:40	0.2	15	30	25	Ambiente

## f. Efecto de la velocidad de inyección en el electrohilado.

El efecto de la velocidad de inyección se evaluó con el incremento de velocidad de 0.2 a 0.4 ml/hr. En la Tabla 10 se describen las condiciones de electrohilado de inyección en la morfología de las fibras.

Tabla 10 Condiciones para medir la velocidad

Parámetros de electrohilado							
Polímero	Concentración (% p/v)	Disolvente	Velocidad (ml/hr)	Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Calibre aguja	Temperatura (°C)
PCU	16	DMF/THF	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	16	DMF/THF	0.4	15	30	25	Ambiente

Nota: La proporción de disolvente fue 70:30.

## g. Efecto del voltaje en el electrohilado

Dentro de la técnica de electrohilado la aplicación de altos voltajes es uno de los parámetros más importantes, que da como resultado la disminución o aumento del diámetro de la fibra según el caso. Al aplicar un alto voltaje durante el electrohilado, la fibra sufre un mayor estiramiento, mientras solidifica en la trayectoria del inyector al colector. Por el aumento de las fuerzas de coulomb y de la intensidad del campo eléctrico.

En la Tabla 11 se encuentran las condiciones para medir el efecto del aumento de voltaje de 15 Kv a 20 Kv. y determinar los cambios en la morfología de las fibras por SEM.

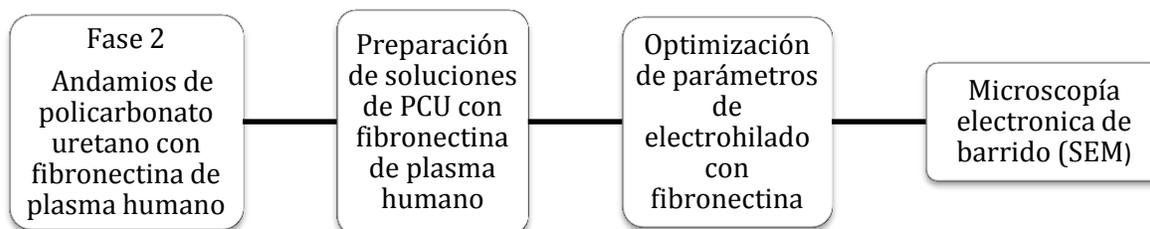
Tabla 11 Condiciones para medir el efecto del voltaje

Parámetros de electrohilado							
Polímero	Concentración (% p/v)	Disolvente	Velocidad (ml/hr)	Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Calibre aguja	Temperatura (°C)
PCU	16	DMF/THF	0.2	15	30	25	Ambiente
PCU	16	DMF/THF	0.2	20	30	25	Ambiente

Nota: proporción de disolvente 60:40.

## **Fase 2: Andamios de policarbonato uretano con fibronectina de plasma humano.**

El siguiente esquema muestra la metodología seguida para la fase 2 que es la obtención de “andamios de policarbonato uretano con fibronectina de plasma humano”, los andamios obtenidos se caracterizaron con microscopía electrónica de barrido (SEM):



Cada uno de los bloques esquematizados en la metodología de la fase 2, serán descritos, de manera más detallada a continuación:

### **a. Preparación de las soluciones de PCU con fibronectina de plasma humano**

Los andamios con fibronectina de plasma humano se prepararon en dos etapas:

#### **I. Solución de PCU con HFP:**

1. En la balanza analítica se pesaron 0.2 grs. de PCU y adicionaron en un matraz aforado de 2 ml., se agregó el HFP al matraz a casi 3/5 partes de la línea de aforo.

#### **II. Solución de fibronectina con HFP:**

1. En la balanza analítica se pesó la fibronectina de plasma humana liofilizada en diferentes concentraciones con respecto al peso del polímero (0.2 gr.):
  - 0.5% de fibronectina → 0.001 gr. de fibronectina
  - 5% de fibronectina → 0.01 gr. de fibronectina
  - 10% de fibronectina → 0.02 gr. de fibronectina

2. Posteriormente se adicionó en un frasco y agregó 0.4 ml de HFP con una pipeta. Ambas soluciones se dejaron en agitación constante durante 24 hrs., para obtener una solución homogénea. Después la solución con fibronectina se incorporó al matraz de 2 ml., donde se preparó la solución de PCU con HFP y aforó. La solución se dejó en agitación constante durante 3 hrs. para homogeneizar la solución y alcanzar una buena incorporación de ambas.

## **b. Optimización de parámetros de electrohilado con fibronectina de plasma humano.**

Se evaluó el efecto en la morfología de las fibras en andamios bidimensionales con mezcla física de fibronectina de plasma humano. Se prepararon dos soluciones:

1. Solución de poli(carbonato uretano) al 10% (p/v) con HFP
2. Solución de poli(carbonato uretano) al 10% (p/v) con fibronectina a una concentración de 0.5% en peso del polímero, todo disuelto con HFP.

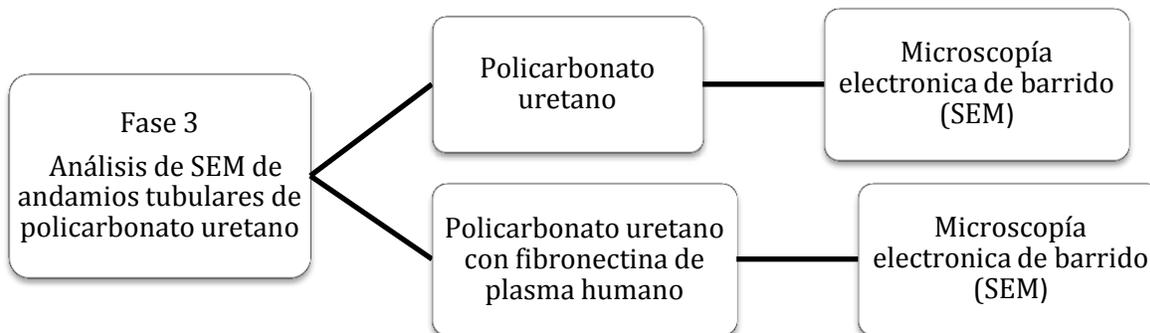
Con estas soluciones se estudió las variaciones en la velocidad de inyección y distancia inyector-colector. En la Tabla 12 se presentan las condiciones de electrohilado para evaluar los cambios en la morfología de la fibra de PCU y PCU con fibronectina. Los andamios obtenidos se evaluaron con microscopía electrónica de barrido (SEM).

Tabla 12 Condiciones de electrohilado del PCU y PCU con fibronectina en HFP

<b>Parámetros de electrohilado</b>							
Polímero	Concentración (% p/v)	Disolvente	Velocidad (ml/hr)	Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Calibre aguja	Temperatura (°C)
PCU	10	0.2	15	30	25	Ambiente	PCU
PCU	10	0.2	15	20	25	Ambiente	PCU
PCU	10	0.4	15	30	25	Ambiente	PCU
PCU	10	0.4	15	20	25	Ambiente	PCU
PCU+Fn	10/0.001 gr Fn	0.2	15	30	25	Ambiente	PCU+Fn
PCU+Fn	10/0.001 gr Fn	0.2	15	20	25	Ambiente	PCU+Fn
PCU+Fn	10/0.001 gr Fn	0.4	15	30	25	Ambiente	PCU+Fn
PCU+Fn	10/0.001 gr Fn	0.4	15	20	25	Ambiente	PCU+Fn

### Fase 3: Análisis por SEM de andamios tubulares de policarbonato uretano.

El siguiente esquema muestra la metodología seguida en la fase 3, para la obtención de “andamios tubulares de policarbonato uretano”, los andamios se caracterizaron con microscopía electrónica de barrido (SEM):



Para la obtención de los andamios tubulares de PCU y PCU con fibronectina, fue necesaria la construcción de un colector circular rotatorio. Se utilizó una varilla de acero inoxidable grado médico sobre la cual fue recolectado el material, ésta se aterrizó al polo negativo de la fuente y se controló la velocidad de rotación (rpm) del motor con una fuente de voltaje regulada marca Mastech modelo HY300-5amp.

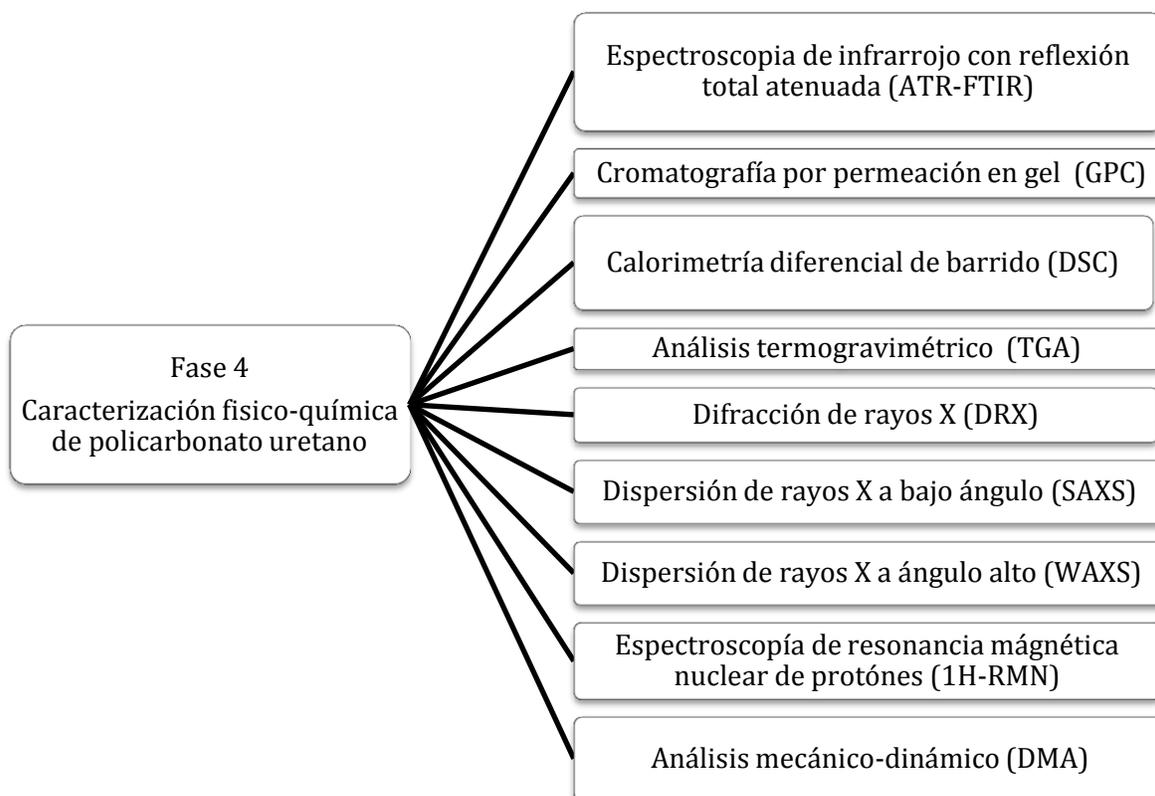
Se obtuvieron andamios tubulares de PCU y PCU a una concentración de fibronectina de 0.5% con HFP. Los andamios se electrohilaban bajo las siguientes condiciones:

- Velocidad de inyección: 0.4 ml/hr
- Voltaje aplicado: 15 kV
- Distancia inyector-colector: 20cm
- Calibre de la aguja: 25 G
- Velocidad del colector: 500 rpm

Los andamios tubulares se observaron por microscopía electrónica de barrido (SEM).

## Fase 4: Caracterización físico-química del policarbonato uretano.

En la siguiente fase se utilizaron diferentes técnicas analíticas para conocer las características físico-químicas del policarbonato uretano. El siguiente esquema muestra las técnicas utilizadas para la caracterización del material:



Cada una de las técnicas analíticas esquematizadas en la metodología de la fase 4, se resumen a continuación y las técnicas analíticas se muestran en el Anexo 1.

### a. Espectroscopia de infrarrojo con reflexión total atenuada (ATR-FTIR)

Los espectros infrarrojo se obtuvieron en un intervalo de 3200 a 1100  $\text{cm}^{-1}$ , con un espectrómetro (FT-IR), Thermo Scientific Nicolet modelo iS10 con módulo de reflexión total atenuada (ATR) Smart Miracle. Para determinar los enlaces de los grupos funcionales característicos del policarbonato uretano. (Y. W.Tang, 2001).

### **b. Cromatografía por permeación en gel (GPC)**

Se determinó el peso molecular promedio en número ( $\overline{Mn}$ ), el peso molecular promedio en peso ( $\overline{Mw}$ ) y el índice de polidispersidad (IP) del material. Para ello se usó un cromatógrafo HPLC Perkin Elmer serie 200, a temperatura ambiente con DMF grado HPLC como disolvente, a una concentración de 2 mg/ml.

### **c. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Se determinó la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del material con un calorímetro diferencial de barrido TA Instruments 2000. La muestra PCU se trabajó en un intervalo de temperatura de -80 a 280°C a una rampa de calentamiento de 10°C/ min.

### **d. Análisis termogravimétrico (TGA)**

Se determinó la estabilidad térmica y la degradación del material por termogravimetría. Los termogramas se obtuvieron en un equipo marca TA Instruments modelo Q5000. El peso aproximado de las muestras fue de 0.9 a 1.2 mg, se determinó su comportamiento desde 0°C hasta 300°C, se utilizó una rampa de calentamiento de 10°C/min, bajo atmosfera de nitrógeno.

### **e. Difracción de rayos X (XRD)**

Los difractogramas se obtuvieron en un equipo modelo Kristalloflex 810, marca siemens. La película fue colocada en el porta muestras del equipo frente al haz de RX, por atracción magnética y utilizó una geometría de Bragg-Bretano ( $\theta$ - $2\theta$ ), con un aditamento de Haz rasante para películas delgadas, un monocromador secundario y un detector de centelleo. Se empleó una radiación  $\kappa\alpha_1$  de Cu, con una longitud de onda 1.5405Å, los intervalos de medición fueron de 0.020s con saltos de 1s. en un intervalo de 1.990° a 69.99°.

### **f. Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)**

Los espectros de difracción se obtuvieron en un equipo modelo Xeuss, marca Xenocs de 3 metros de camino óptico. Se trabajó a un voltaje de 50 kV con una corriente de 0.60 mA. La radiación de rayos X se produjo con un tubo blanco de cobre que produce una longitud de onda de 0.54 nm., a una distancia muestra-detector de 127 cm. El detector es de última generación de pixel híbrido Dectris Pilatus 300K.

Se colocó el material con un espesor de 0.5mm en un porta-muestras circular de acero inoxidable, que a su vez se colocó en la estación de muestras entre el haz incidente y la sección del haz dispersado. Todas las muestras se expusieron a un conteo de 80 seg.

### **g. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (1H-RMN)**

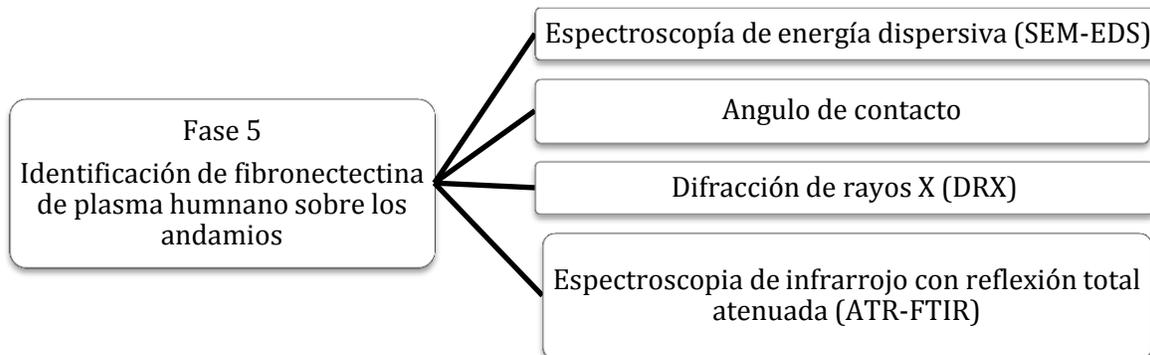
Los espectros de la muestra de PCU se determinaron en solución de DMF- $d_7$  en un espectrómetro Bruker Advance III a 300 MHz para la observación de  $^1\text{H}$  y determinación de la estructura de policarbonato uretano.

### **h. Análisis dinámico mecánico (DMA).**

Se determinó la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del material con un analizador dinámico-mecánico TA Instrument DMA Q800, con rampa de calentamiento  $4^\circ\text{C}/\text{min}$ , frecuencia de 1 Hz y en un intervalo de temperatura de  $-100^\circ\text{C}$  a  $200^\circ\text{C}$ .

## Fase 5: Identificación de fibronectina sobre los andamios.

En la fase 5 se utilizaron diferentes técnicas analíticas para identificar la presencia de fibronectina de plasma humano en los andamios de policarbonato uretano. El siguiente esquema muestra las técnicas utilizadas para la identificación de fibronectina en el material electrohilado:



Cada una de las técnicas analíticas esquematizadas en la metodología serán descritas, a continuación:

### a. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las micrografías obtenidas para el análisis de morfología de las nanofibras se obtuvieron en un microscopio Jeol Field Emission modelo JSM 7600F, equipado con un filamento de tungsteno y con un detector de electrones retrodispersados (LBE). Las muestras fueron previamente recubiertas con oro por medio de una pulverización catódica asistida por plasma, en un equipo marca Jeol modelo JPC-1100. La distribución de diámetros de fibras y porcentaje de volumen libre (%vl) se determinaron a partir de las micrografías, con el programa ImageJ 1.44p.

Los espectros obtenidos por emisión secundaria de radiación X, incidente sobre la muestra (Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X), se obtuvieron en función de la energía y de la cantidad de la intensidad de radiación. Las muestras no fueron

recubiertas con oro. El análisis se realizó sobre las muestras PCU con 10% de fibronectina.

### **b. Ángulo de contacto**

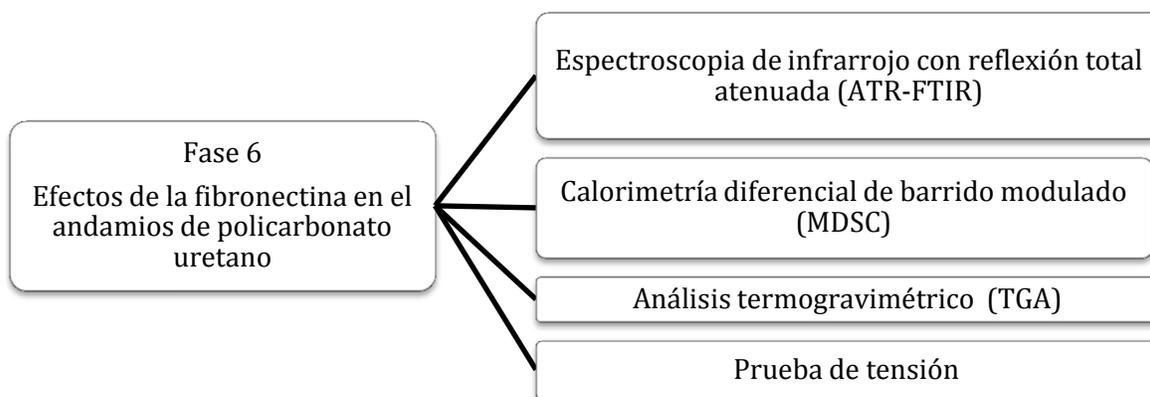
Se empleó un goniómetro Ramé-hart Inc., modelo 100-07-00, ajustado a un sistema óptico, para observar la interacción del agua con la superficie de las películas de PCU, y PCU con 10% de fibronectina. Fue grabado un video de 180 s. de duración, al momento en que se deposita una gota de 16 $\mu$ L de agua destilada sobre las películas, para obtener una serie de imágenes de la gota sobre la muestra.

Se usaron 3 andamios de cada muestra y se depositaron 5 gotas sobre cada muestra del material. El procesamiento de las imágenes se realizó con el programa ImageJ® 1.44p con la aplicación ángulo de contacto. Después de analizar la curvatura de la gota, se obtuvo en ángulo de contacto de las tres condiciones analizadas.

La técnica de difracción de rayos X (DRX) ya fue descrita en la metodología de la fase 4, esta técnica se utilizó para identificar dos nuevas fases; una corresponde al NaCl y la otra al CaCl<sub>2</sub>, sales presentes al reconstituir la fibronectina.

## **Fase 6: Efecto de la fibronectina en andamios de policarbonato uretano.**

En la fase 6 se utilizaron técnicas analíticas como: la espectroscopía de infrarrojo de reflexión total atenuada (ATR-FTIR), la calorimetría diferencial de barrido modulado (MDSC), el análisis termogravimétrico (TGA) y la prueba de tensión, para identificar los efectos de la fibronectina de plasma humano en los andamios de policarbonato uretano. El siguiente esquema se muestra la metodología utilizada:



Cada una de las técnicas analíticas utilizadas en la metodología serán descritas a continuación:

Las técnicas como espectroscopía de infrarrojo de reflexión total atenuada (ATR-FTIR) y análisis termogravimétrico (TGA) ya fueron descritas en la metodología de la fase 4, esta técnicas se utilizaron para identificar los efectos térmicos de la fibronectina en las fibras de policarbonato uretano.

### **a. Ensayo de tensión**

Se utilizó una maquina universal de pruebas mecánicas Instron, para determinar las propiedades mecánicas de las nanofibras, a una velocidad 0.16 mm/min con una celda de 100N a temperatura ambiente. Las probetas fueron cortadas en una prensa manual con un troquel afilado del PCU y PCU-05Fib con medidas de acuerdo a la norma ASTM

D-1708-96. Se utilizaron tres probetas de PCU y PCU con 0.5% de fibronectina para la caracterización en materiales bidimensionales.

### **b. Calorimetría diferencial de barrido modulado (MDSC)**

Se determinaron las transiciones térmicas de desnaturalización de la fibronectina en el material con 10% de fibronectina con un calorímetro diferencial de barrido con modulación de temperatura TA Instruments 2920. La muestra se trabajó en un intervalo de temperatura de -80 a 75°C como primer calentamiento y de -80 a 180°C en la segunda rampa de calentamiento se utilizó una rampa de 10°C/ min.

### **Fase 7: Evaluación de Biocompatibilidad.**

En la fase 7 se evaluó la biocompatibilidad de las membranas de policarbonato uretano con fibronectina de plasma humano a diferentes concentraciones. El siguiente esquema muestra la metodología utilizada para la preparación de muestras biológicas como: la deshidratación y punto crítico. Los ensayos de multiplicación celular de las membranas de PCU y PCU a diferentes concentraciones de fibronectina se evaluaron con la técnica de MTT.



Se utilizó la línea celular HEK293, que consiste en células embrionarias de riñón humano, las cuales se multiplican por serie de pases celulares, se sembraron en cajas de cultivo de 100 mm x 20 mm previamente cubiertas con gelatina al 0.02%, a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/caja en medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% con antibiótico-antimicótico al 1 %, y dejaron en incubación a 37°C, a una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada.

### **a. Deshidratación y punto crítico**

Los andamios cultivados se analizaron estructuralmente por microscopía electrónica de barrido (SEM) a la par de las pruebas de proliferación celular. Para observar las muestras biológicas se prepararon las muestras de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Las muestras se lavaron PBS c/antibiótico-antimicótico y fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante 30 min.
2. Se retiró el fijador y se lavó nuevamente la muestra con PBS c/Antibiótico-Antimicótico e se inició el proceso de deshidratación con alcoholes graduales. Se adicionó primero alcohol al 50%, se dejó reposar durante 3 min. y retiró. El mismo procedimiento se repitió con alcohol al 60%, 70%, 80%, 90% y alcohol absoluto.
3. Después las muestras se desecaron por punto crítico con CO<sub>2</sub>, en un equipo modelo samdri-780A, marca tousimis, el cual consiste en colocar el material en una celda e inyectarle CO<sub>2</sub>. La temperatura dentro de la cámara disminuye a -15°C y posteriormente se incrementa a 42°C.
4. Finalmente el material se recubrió de oro para ser analizado por microscopía electrónica de barrido (SEM).

### **b. Ensayos de multiplicación celular (MTT).**

La viabilidad celular de los andamios de PCU y PCU a las diferentes concentraciones de fibronectina fue determinada por reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, la cual genera un compuesto de color púrpura, que determina la actividad mitocondrial de las células. Los andamios cultivados fueron incubados con el reactivo MTT (1mg/mL) durante 4hrs. y posteriormente se adicionó una solución de isopropanol/ácido clorhídrico para lisar las células y solubilizar los cristales. Las muestras fueron leídas en un lector de placas de Elisa Genios marca tecan modelo Durham NC, a una longitud de onda de 540 nm., se realizó la evaluación

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

por triplicado para cada andamio y obtuvo su desviación estándar para evaluar la viabilidad de los andamios a los 3, 7 y 14 días de multiplicación celular.

# CAPÍTULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4. Resultados y discusión

#### 4.1 Optimización de parámetros de electrohilado

Para determinar los parámetros óptimos de electrohilado, fue necesario experimentar bajo distintas condiciones como son: temperatura, calibre de la aguja, concentración, mezcla de disolvente, velocidad de inyección y voltaje.

- Efecto de la temperatura en el electrohilado

Se evaluó primero el efecto de la temperatura en el electrohilado, el andamio mostrado en la micrografía (a) de la Figura 11 fue electrohilado a una temperatura de 34°C y a 44°C el andamio de la micrografía (b). En ambas micrografías es posible observar la presencia de bulbos como consecuencia del solvente (DMF) remanente cuya temperatura de ebullición es de 153°C. Por lo tanto, el incremento en la temperatura dentro de la cámara de electrohilado, no favorece la evaporación total del disolvente en las fibras.

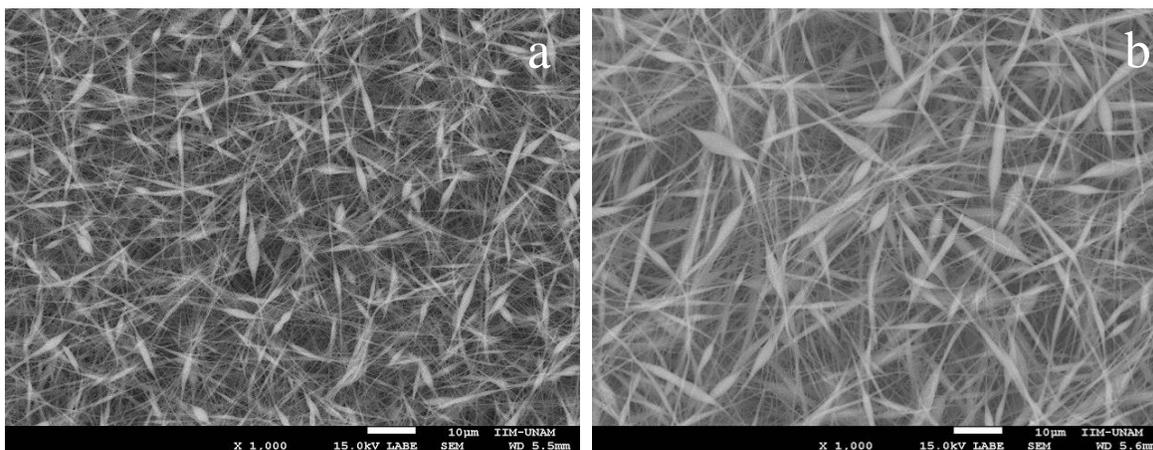


Figura 11. Micrografías de SEM (x1,000) de PCU 14% (p/v) en DMF. Se evaluó el efecto de la temperatura en la morfología de las fibras a: a) 34°C b) 44°C

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ○ Efecto del calibre de la aguja en el electrohilado

Las micrografías de la Figura 12 muestran el efecto del calibre de la aguja en la morfología de las fibras. En ambas micrografías se observa la presencia de bulbos; sin embargo, al disminuir el diámetro de la aguja, el área de los bulbos formados disminuye de  $0.89160 \mu\text{m}^2$  a  $0.2613 \mu\text{m}^2$ .

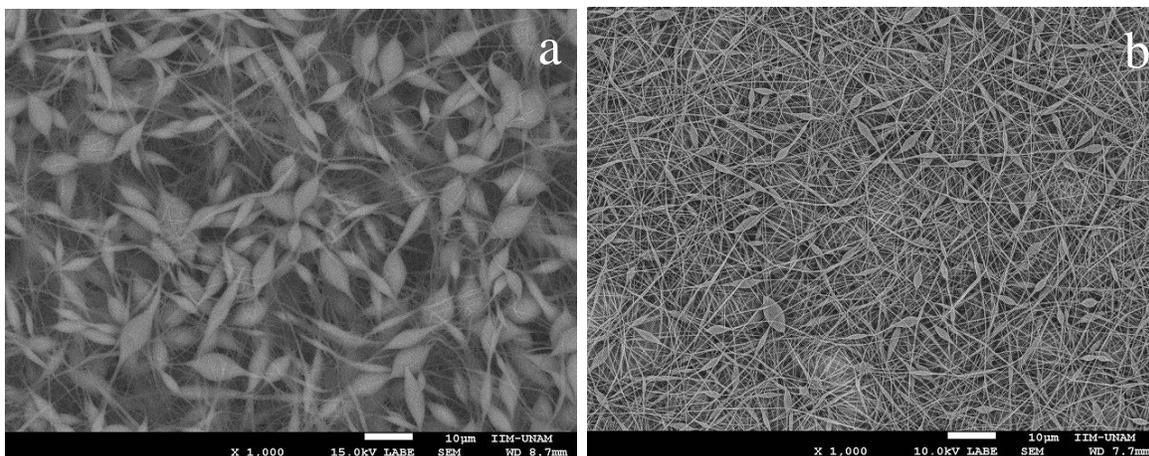


Figura 12 Micrografías de SEM (x1,000) de PCU 12% (p/v) en DMF. Se evaluó el efecto del calibre de la aguja en la morfología de las fibras con diferentes diámetros de aguja. a) 0.8 mm. b) 0.6 mm.

### ○ Efecto de la concentración en el electrohilado

Se analizó el efecto en la morfología de las fibras al incrementar la concentración de polímero en solución. Todo el experimento se desarrolló a la misma distancia inyector-colector, voltaje aplicado y calibre de la aguja, como se observa en las micrografías de la Figura 13 conforme se incrementa la concentración a 16%, la morfología de las fibras comienza a ser más homogénea y libre de bulbos. Por lo tanto al aumentar la concentración de polímero de la solución, la viscosidad de la solución también se incrementa, debido al peso molecular del polímero y de las interacciones del disolvente con el polímero, por lo tanto a mayor concentración, mejor morfología de las fibras.

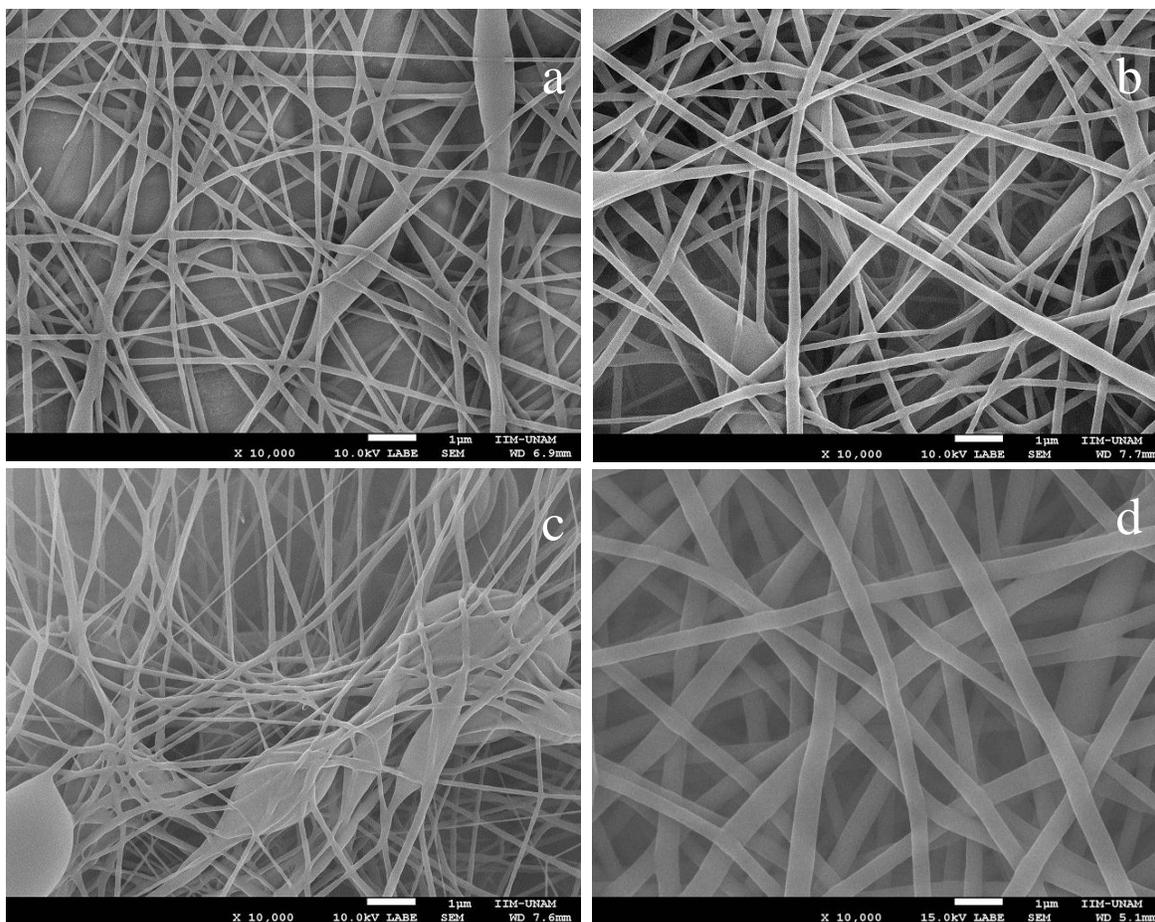


Figura 13 Micrografías de SEM (x10,000) de PCU diferentes concentraciones : a) 10% . b) 12%. c) 14%. d) 16%.

○ Efecto de la mezcla de disolvente en el electrohilado.

Para estudiar el efecto de la mezcla de disolventes en el electrohilado a diferentes proporciones, se modificó la presión de vapor de la DMF, disolvente del PCU. La DMF es un disolvente con presión de vapor de 2.83 mmHg. a 20°C, lo que lo hace menos volátil que el THF que tiene una presión de vapor de 143 mmHg a 20°C. En este caso, la presión de vapor del DMF se puede aumentar al incrementar la temperatura y facilitar así la evaporación del disolvente de las fibras. Previamente se evaluó el efecto de la temperatura de la cámara de electrohilado en la morfología de las fibras; sin embargo, las fibras obtenidas presentaban bulbos.

Es por eso que al variar la proporción de disolvente en la solución, las propiedades coligativas se ven modificadas, en la Tabla 13 se ve que la presión de vapor del

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

sistema comienza a incrementarse conforme se adiciona una mayor cantidad de THF al DMF.

Tabla 13 Presión total del sistema a diferentes proporciones de disolvente

<b>Proporción del disolvente (DMF:THF)</b>	<b>Presión de vapor de la solución (mmHg)</b>	<b>Presión total del sistema (mmHg)</b>
100:0	(1)(2.83) + (0)(129)	2.83
90:10	(0.9)(2.83) + (0.1)(129)	15.447
80:20	(0.8)(2.83) + (0.2)(129)	28.064
70:30	(0.7)(2.83) + (0.3)(129)	40.681
60:40	(0.6)(2.83) + (0.4)(129)	53.298
50:50	(0.5)(2.83) + (0.5)(129)	65.915
40:60	(0.4)(2.83) + (0.6)(129)	78.532

La presión de vapor es una medida de la volatilidad de un disolvente. Si se aplica la Ley de Raoult, en soluciones de solutos volátiles de mezclas hay que considerar los componentes de la mezcla  $X_1, X_2, X_{n+1}$ , así que, para cada componente de la mezcla, la presión de vapor de la solución es igual al producto de la fracción molar del disolvente por la presión de vapor del disolvente puro como se observa:

$$P_1 = (X_1)(P_1^0) \qquad P_2 = (X_2)(P_2^0) \qquad P_{n+1} = (X_{n+1})(P_{n+1}^0)$$

$P_n$  = Presión de vapor de la solución

$X_n$  = Fracción molar del disolvente

$P_n^0$  = Presión de vapor disolvente puro

Así que, la presión de vapor total del sistema será igual a la suma de las presiones de vapor parciales de cada disolvente volátil:

$$P_T = (X_1)(P_1^0) + (X_2)(P_2^0) + (X_{n+1})(P_{n+1}^0)$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De esta forma al incrementar la presión de vapor total del sistema cuando se realiza el electrohilado se ve favorecida la evaporación del disolvente en la fibra durante su trayectoria del inyector al colector, sin la necesidad de incrementar la temperatura del proceso.

Como se puede observar en las micrografías de la Figura 14 a mayor cantidad de THF, la presión de vapor del sistema aumenta, esto favorece la evaporación de disolvente en las fibras como se ve en las micrografías f, g, h, i, j, k y l las se encuentran libres de bulbos. En la Tabla 14 se resumen los diámetros de las fibras y desviación estándar, de las diferentes proporciones de disolvente DMF:THF.

Tabla 14 Diámetro de las fibras con diferentes proporciones de disolvente DMF:THF

Proporciones de disolvente DMF:THF	PCU 10% ( $\mu\text{m}$ )	PCU 12% ( $\mu\text{m}$ )	PCU 14% ( $\mu\text{m}$ )	PCU 16% ( $\mu\text{m}$ )	Presión de vapor del sistema(mmHg)
100:0	Con bulbos	Con bulbos	Con bulbos	0.416 $\pm$ 0.086	2.83
90:10	Con bulbos	Con bulbos	0.207 $\pm$ 0.052	0.17 $\pm$ 0.022	15.447
80:20	Con bulbos	0.492 $\pm$ 0.052	0.361 $\pm$ 0.021	0.199 $\pm$ 0.034	28.064
70:30	No electrohilado	No electrohilado	0.309 $\pm$ 0.055	0.244 $\pm$ 0.02	40.681
60:40	No electrohilado	No electrohilado	0.680 $\pm$ 0.070	0.307 $\pm$ 0.025	53.298
50:50	No electrohilado	No electrohilado	0.451 $\pm$ 0.050	0.683 $\pm$ 0.029	65.915
40:60	No electrohilado	No electrohilado	0.452 $\pm$ 0.042	2.305 $\pm$ 0.495	78.532

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

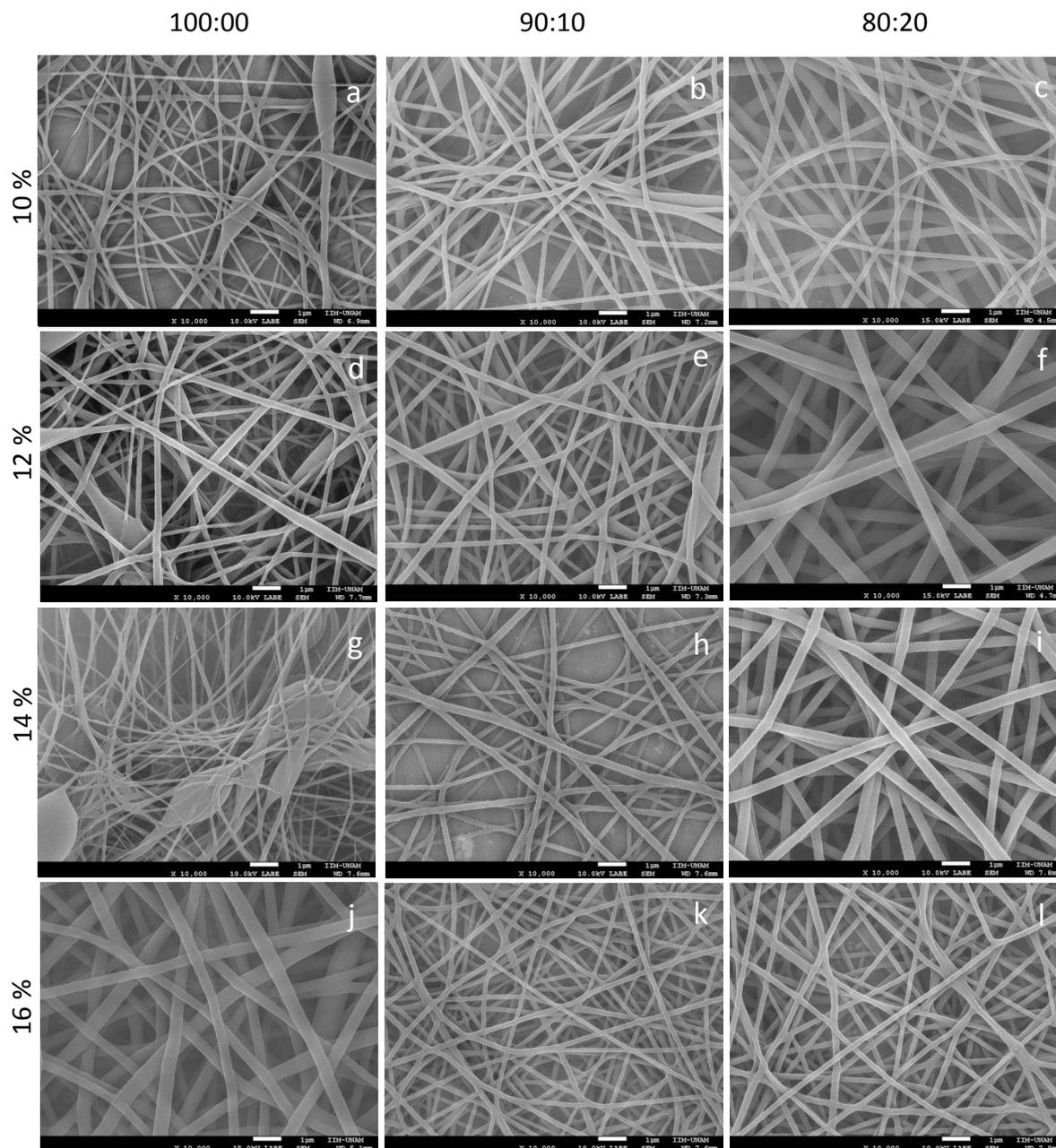


Figura 14 Micrografías de SEM (x10,000) a diferentes proporciones de disolvente de DMF:THF a)Proporción 100:00 concentración 10%. d)Proporción 100:00 concentración 12%. g)Proporción 100:00 concentración 14%. j)Proporción 100:00 concentración 16%. b)Proporción 90:10 concentración 10% e)Proporción 90:00 concentración 12% h)Proporción 90:10 concentración 14%. k)Proporción 90:10 concentración 16%. c)Proporción 80:20 concentración 10% f)Proporción 80:20 concentración12% i)Proporción 80:20 concentración 14%. l)Proporción 80:20 concentración 16%.

En la Tabla 14 se puede ver que a concentraciones del 14% y 16% de PCU y presiones de vapor menores a los 53.298 mmHg, el diámetro de las fibras disminuye al aumentar la concentración del PCU, mientras que a presiones de vapor mayores a los 65.915mmHg el diámetro de las fibras aumenta. Es importante mencionar que el

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

diámetro más pequeño obtenido en este trabajo fue de  $0.17 \pm 0.022 \mu\text{m}$ , que es menor al diámetro más pequeño reportado por Feng, de  $0.72 \pm 0.17 \mu\text{m}$  como se puede ver en la Tabla 15.

Tabla 15 Diámetro de las fibras con diferentes proporciones de Yakai Feng

Disolvente	Diámetro de fibras
1:0 $\rightarrow$ 100:0	Con bulbos
3:1 $\rightarrow$ 75:25	$0.72 \pm 0.17 \mu\text{m}$
1:1 $\rightarrow$ 50:50	$0.92 \pm 0.18 \mu\text{m}$
1:3 $\rightarrow$ 25:75	$1.1 \pm 1.63 \mu\text{m}$

○ Efecto de la velocidad de inyección en el electrohilado.

Se evaluó el efecto en el diámetro de las fibras al incrementar el flujo de inyección de 0.2 ml/hr a 0.4 ml/hr al electrohilar, como se observa en la Figura 15 es claro ver cambios en la homogeneidad de las fibras. Al electrohilar a una velocidad de 0.2 ml/hr se obtienen fibras homogéneas con diámetros de  $0.244 \pm 0.02 \mu\text{m}$ . mientras que al incrementar la velocidad de inyección a 0.4 ml/hr se obtienen fibras de diámetro no uniforme con fibras que presentan variaciones en el diámetro de 2 a  $0.25 \mu\text{m}$ , como se observa en la micrografía b.

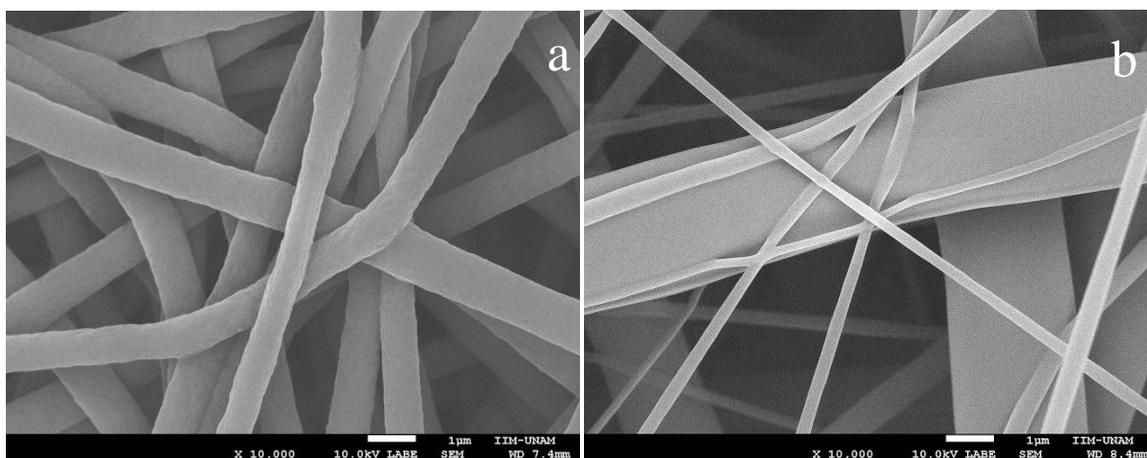


Figura 15 Micrografías de SEM (x10,000) PCU 16%. Se evaluó el efecto de la velocidad a) 0.2 ml/hr b) 0.4 ml/hr

### ○ Efecto del voltaje en el electrohilado.

En la Figura 16 se muestra el efecto de la variación de voltaje en las condiciones de electrohilado. Se preparó una solución de PCU al 16% (p/v) con la mezcla de disolvente DMF:THF, se encontró que al incrementar el voltaje de 15 kV a 20 kV hay una disminución del diámetro de las fibras de PCU de  $0.5\mu\text{m}$  a  $0.2\mu\text{m}$ . Debido al aumento de voltaje aplicado, que incrementa las fuerzas electrostáticas y las fuerzas de repulsión, lo que favorece a la formación de fibras más delgadas. (Mohammad Chowdhury, 2010)

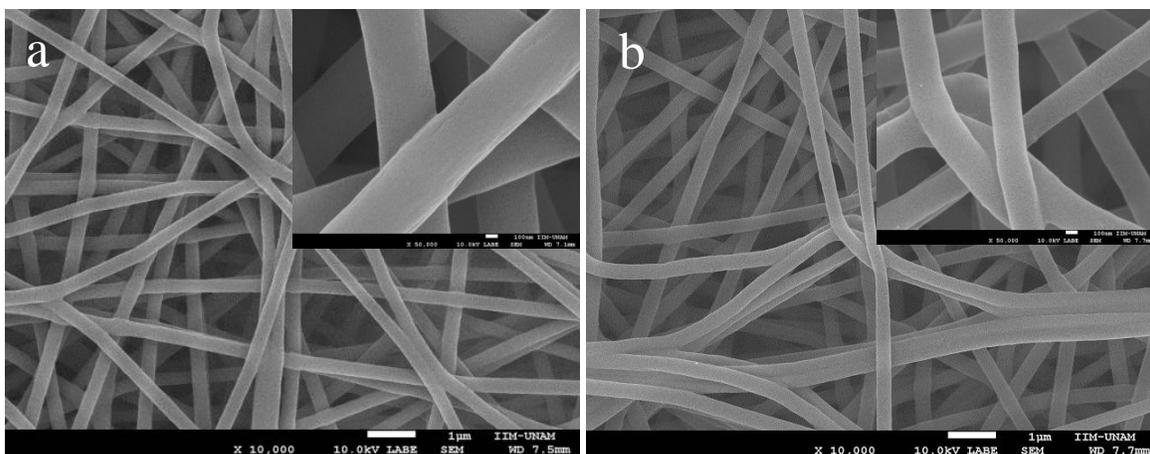


Figura 16 Micrográficas de SEM a  $\times 10,000$  y aumento a  $\times 50,000$  de PCU 16%. Se evaluó el efecto del voltaje a) 15 kV y b) 20 kV.

### **4.2 Andamios de PCU con fibronectina de plasma humano.**

En esta sección se discuten los resultados del efecto en la morfología de las fibras en andamios bidimensionales con mezcla física de fibronectina de plasma humano. Se prepararon dos soluciones:

1. Solución de poli(carbonato uretano) al 10% (p/v) con HFP.
2. Solución de poli(carbonato uretano) al 10% (p/v) con fibronectina a una concentración de 0.5% (0.001 gr. de fibronectina) en peso del polímero todo disuelto con HFP.

Con esto se estudió en efecto en las fibras al variar la velocidad de inyección y distancia inyector-colector con microscopía electrónica de barrido (SEM).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ○ Optimización de parámetros de electrohilado de PCU al 10% con HFP

Se evaluó primero la solución de poli(carbonato uretano) al 10% (p/v) con HFP, en las micrografías a y b de la Figura 17 se puede ver que al incrementar la velocidad de inyección de 0.2 ml/hr a 0.4 ml/hr a la misma distancia de 20 cm del inyector al colector. A una velocidad de inyección de 0.2 ml/hr, el diámetro de las fibras aumenta de  $0.630\pm 0.187\mu\text{m}$  (micrografía a) a  $0.873\pm 0.130\mu\text{m}$  (micrografía b) esto mismo ocurre a una distancia de 30 cm del inyector al colector y a una velocidad de inyección de 0.4 ml/hr donde el diámetro de las fibras aumenta como se observa en la micrografía c ( $0.623\pm 0.133\mu\text{m}$ ) y la micrografía d ( $1.064\pm 0.18\mu\text{m}$ ). En conclusión en este tipo de sistema de PCU con HFP como disolvente, al aumentar la velocidad de inyección durante el electrohilado las fibras aumentan su diámetro.

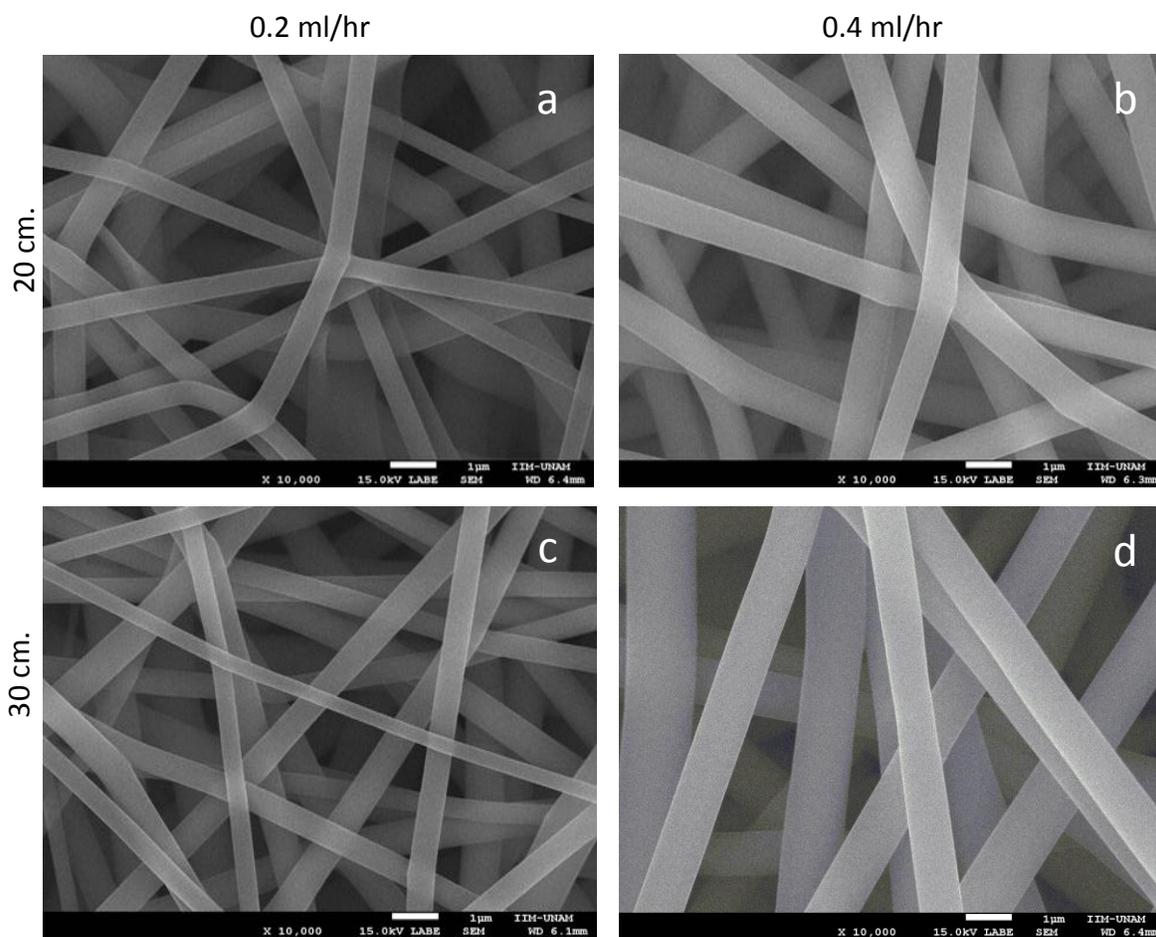


Figura 17 Micrografías de SEM (x10,000) de PCU 10% en HFP a diferentes condiciones de flujo de inyección y distancia inyector-colector. a) 0.2 ml/hr a 20 cm (b) 0.4 ml/hr a 20 cm (c) 0.2 ml/ a 30 cm (d) 0.4 ml/hr a 30 cm

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Optimización de parámetros de electrohilado de PCU al 10% + fibronectina 0.5% con HFP

En Figura 18 se pueden ver las fibras de PCU con fibronectina a diferentes condiciones de electrohilado. En las micrografías a y b podemos observar que al incrementar la velocidad de inyección de 0.2 ml/hr a 0.4 ml/hr a una distancia de 20 cm del inyector al colector el diámetro de las fibras disminuye de  $0.636 \pm 0.208 \mu\text{m}$  a  $0.388 \pm 0.044 \mu\text{m}$ , respectivamente. Esto mismo ocurre a una distancia de 30 cm del inyector al colector al incrementar la velocidad de inyección de 0.2 ml/hr a 0.4 ml/hr, como se ve en las micrografías c y d, el diámetro de las fibras disminuye de  $1.179 \pm 0.188 \mu\text{m}$  a  $0.733 \pm 0.161 \mu\text{m}$ . Es decir que en ambos casos, al electrohilar PCU con fibronectina y al aumentar la velocidad de inyección de la solución, el diámetro de las fibras disminuye.

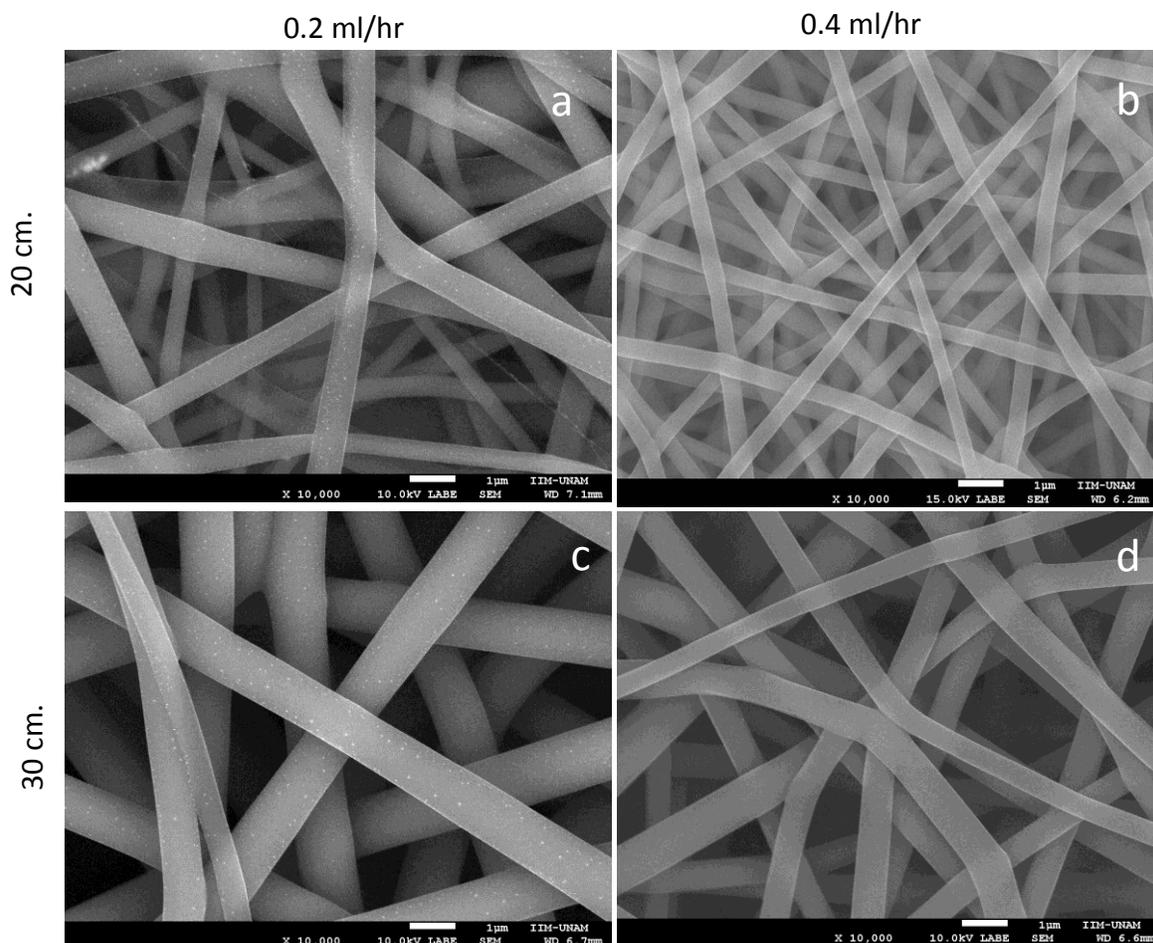


Figura 18 Micrografías de SEM (x10,000) de PCU 10% con fibronectina a diferentes condiciones de flujo de inyección y distancia inyector-colector. (a) 0.2 ml/hr a 20 cm (b) 0.4 ml/hr a 20 cm (c) 0.2 ml/a 30 cm (d) 0.4 ml/hr a 30 cm

Por lo tanto, al comparar las muestras de PCU con las de PCU con fibronectina podemos concluir que al incrementar la velocidad de inyección: en los andamios de PCU el diámetro de las fibras aumenta y para los andamios de PCU con fibronectina el diámetro de las fibras disminuye.

- Andamios electrohilados de PCU al 10% con diferentes proporciones de fibronectina.

Se obtuvieron tres andamios de PCU 10% (p/v) con diferentes proporciones de fibronectina a una velocidad de inyección de 0.4 ml/hr, con voltaje de 15kV y distancia inyector-colector de 20 cm. a temperatura ambiente. En la Figura 19 se muestran las micrográficas de poli(carbonato-uretano) y PCU con los diferentes porcentajes de fibronectina. En la que se ven pequeñas variaciones en la morfología de las fibras conforme se incrementa la concentración de fibronectina en el sistema.

- $\frac{1}{1000}$  → 0.001 gr. de fibronectina → PCU-FIB01
- $\frac{1}{100}$  → 0.01 gr. de fibronectina → PCU-FIB02
- $\frac{1}{50}$  → 0.02 gr de fibronectina → PCU-FIB03

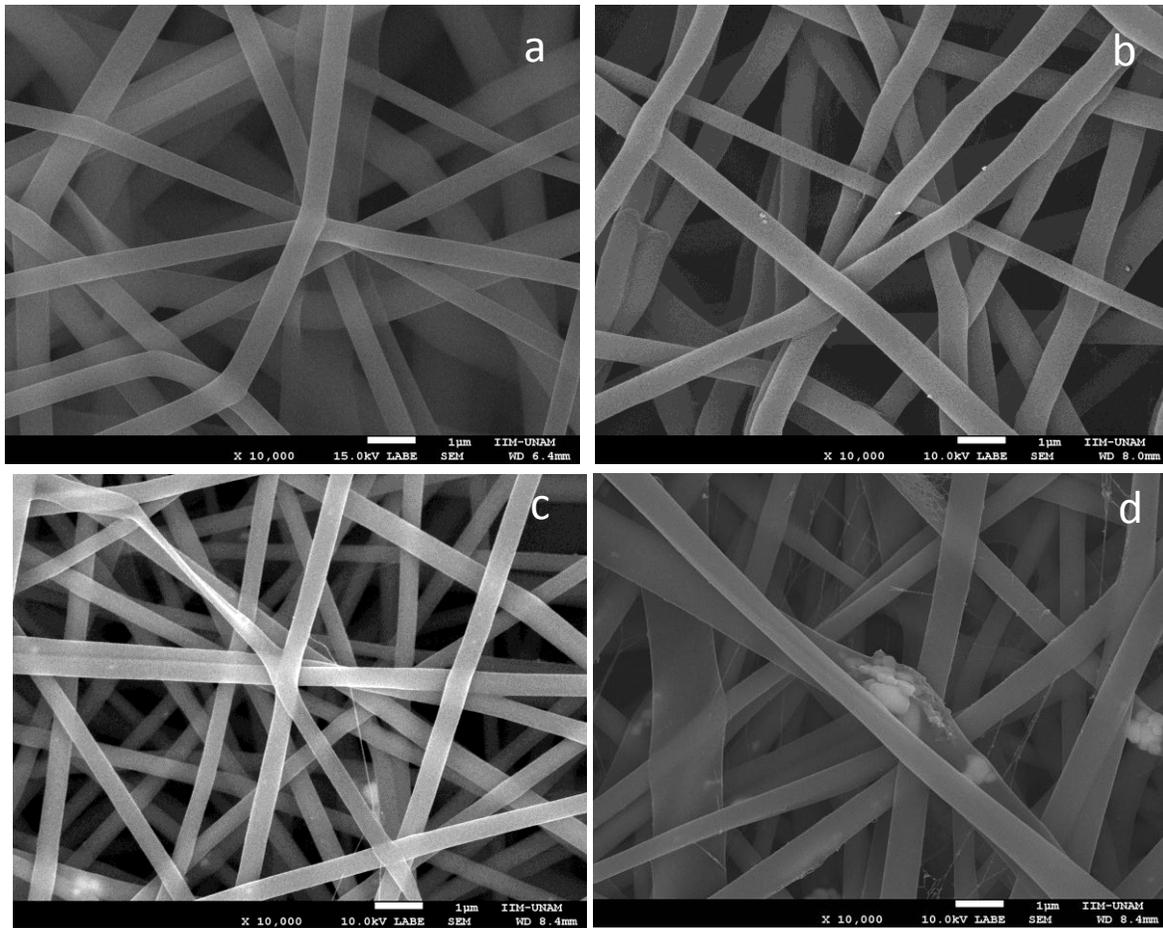


Figura 19 Micrografías de SEM (x10,000) de PCU 10% con fibronectina a diferentes concentraciones de fibronectina. a) PCU sin fibronectina b) andamio con 0.001 gr. de fibronectina c) andamio con 0.01 gr de fibronectina d) andamio con 0.02 gr de fibronectina

### 4.3 Análisis por SEM de andamios tubulares de PCU

En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos por SEM, que corresponden a los andamios tubulares de PCU y PCU con 0.5% de fibronectina. En las microfotografías b, c y d se observan cortes axiales del tubo, en la microfotografía b y c es posible ver un arreglo laminar que conforma la estructura de las paredes del tubo, con este tipo de característica se espera que los andamios simulen a las paredes de revestimiento de los vasos sanguíneos que le confieren características únicas de elasticidad y resistencia. En la microfotografía d se puede observar que el diámetro interno del tubo que es de 1.76 mm. Cabe resaltar que hasta el día de hoy este diámetro es mucho menor a los reportados en la literatura.

Finalmente, las microfotografías e y f pertenecen a los andamios tubulares obtenidos: la microfotografía e pertenece al andamio tubular de PCU al 10% (p/v) sin fibronectina y la microfotografía f corresponde al andamio de PCU al 10% con fibronectina en ambos andamios se observa una morfología homogénea y libre de bulbos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

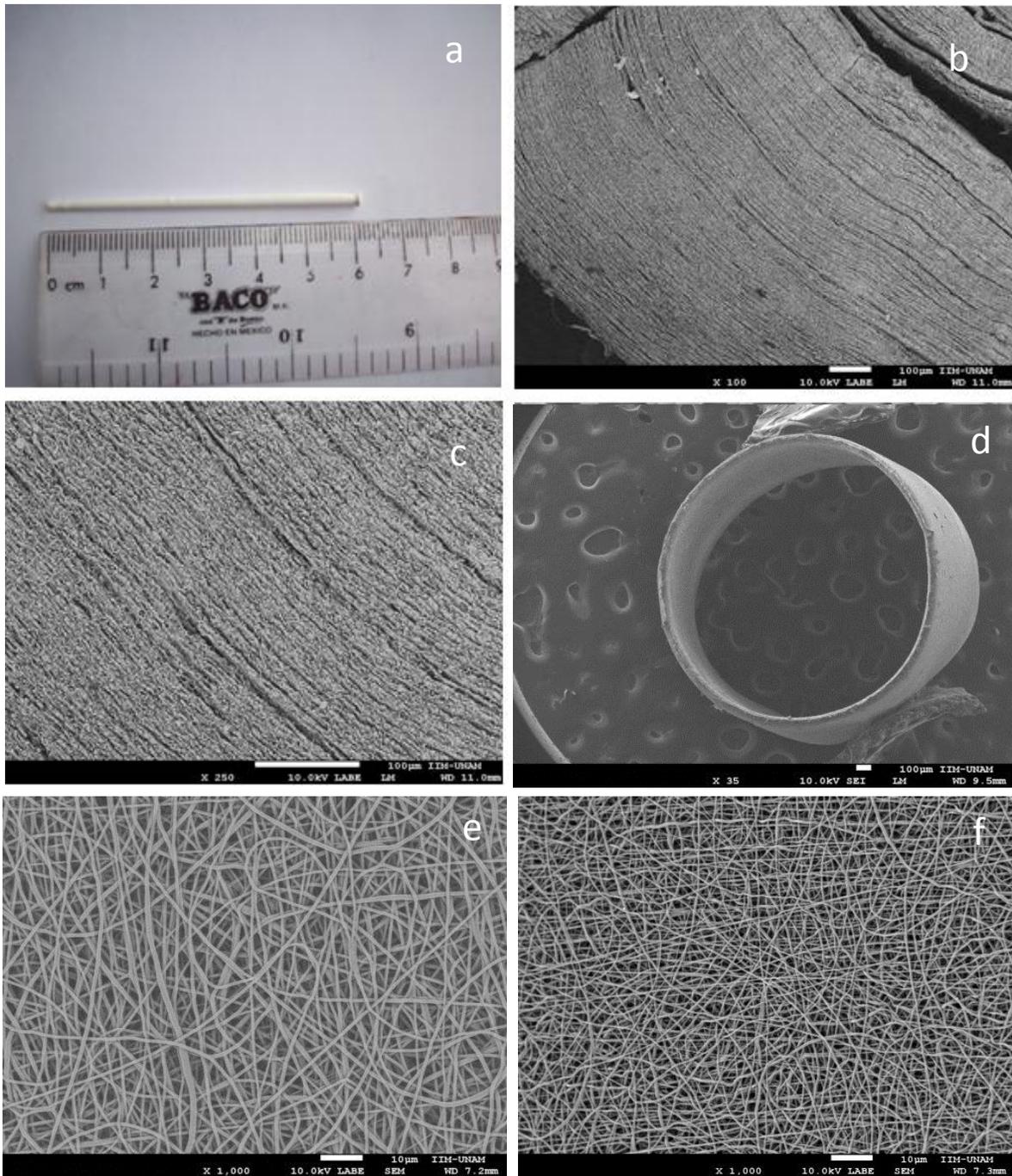


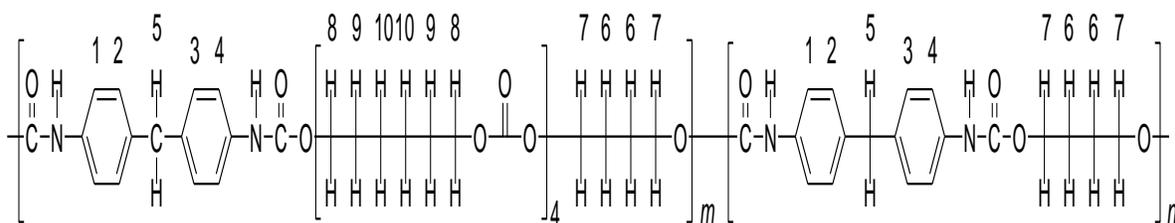
Figura 20 Micrografías de SEM de andamios tubulares a) Andamio tubular. Corte axial del tubo a diferentes aumentos b) x100 c) x250 d) x35. Andamios tubulares a x1,000 e) sin fibronectina f) con fibronectina.

## 4.4 Caracterización físico-química del policarbonato uretano

Se realizó la caracterización del policarbonato uretano, polímero comercializado por DMS, el material se caracterizó con diferentes técnicas analíticas como: espectroscopía de infrarrojo con reflexión total atenuada (ATR-FTIR), cromatografía por permeación en gel (GPC), calorimetría diferencial de barrido modulado (MDSC), análisis termogravimétrico (TGA), difracción de rayos X (DRX), dispersión de rayos x a bajo ángulo (SAXS), dispersión de rayos x a ángulo alto (WAXS), espectroscopía de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN) y análisis dinámico mecánico (DMA). Todo con el fin de conocer las propiedades tanto físicas como químicas del polímero utilizado.

○ Estructura por espectroscopía de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN)

Con espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN), se realizó la asignación de los diferentes protones presentes en la molécula de policarbonato uretano, la Figura 21 corresponde al espectro de resonancia magnética nuclear de protones del PCU. El polímero se disolvió en N, N dimetilformamida deuterada (DMF- $D_7$ ) y a partir de la estructura obtenida se determinaron ambos segmentos del polímero. En la Tabla 17 se muestran las asignaciones de protones y su desplazamiento químico en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN.



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 16 Asignaciones y desplazamiento químico del espectro de protones.

$\delta$ (PPM)	Asignación
9.66	NH
7.69	H1 + H3
7.38	H2 + H4
4.34	H8
4.32	H7
3.66	H5
1.93	H6
1.85	H9
1.59	H10

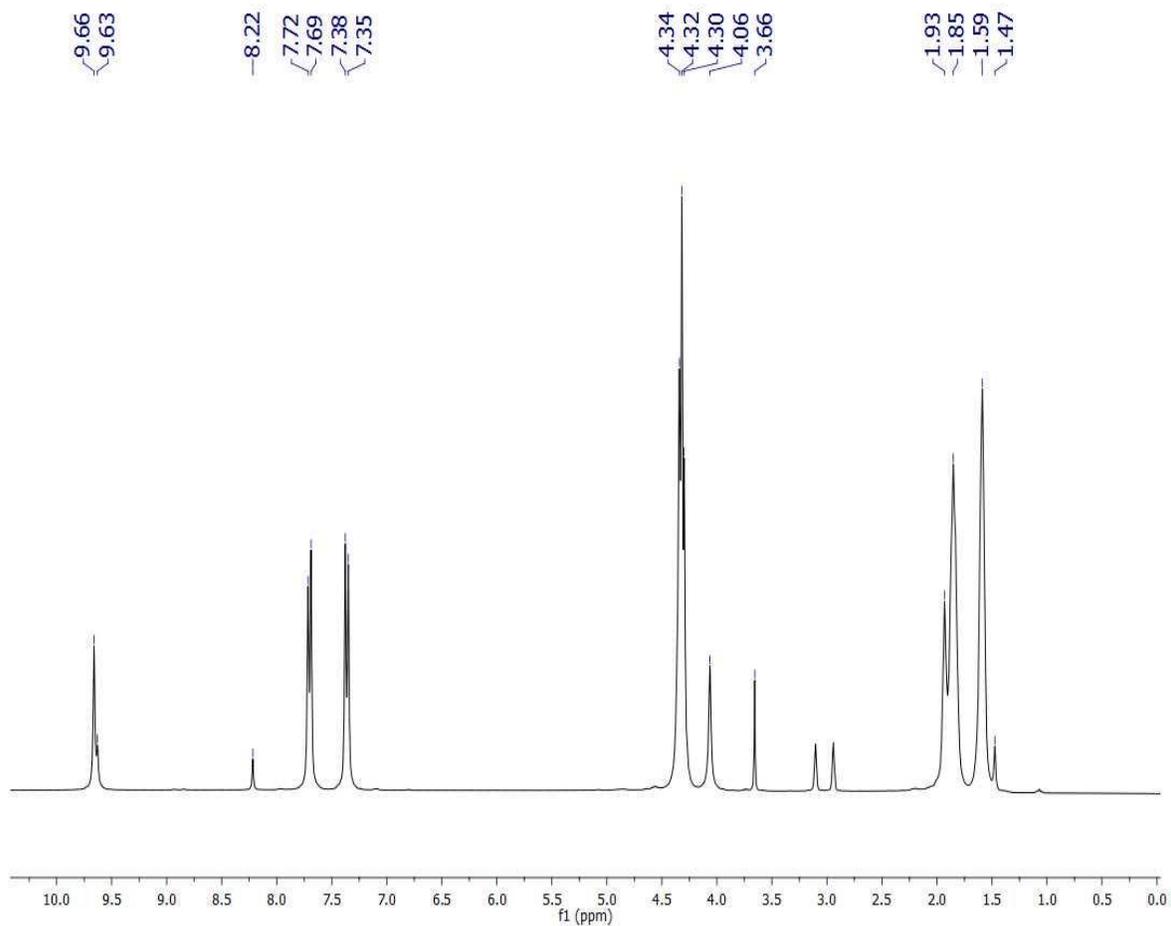
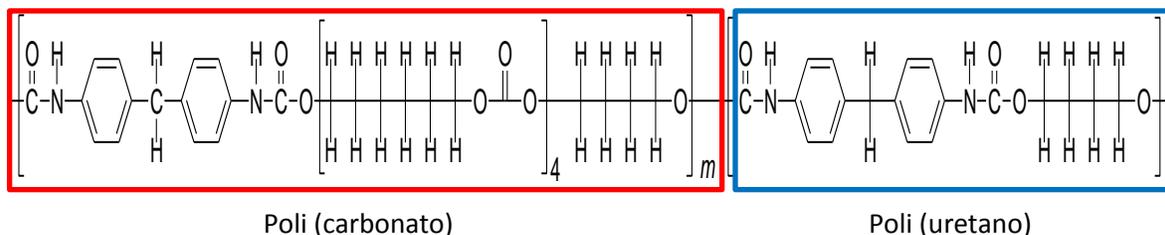


Figura 21 Espectro de 1H-RMN del policarbonato uretano

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron dos segmentos del polímero: el segmento suave (policarbonato) que corresponde a la parte de color rojo y el segmento duro (poliuretano) de color azul.



- Promedio de masas moleculares relativas por cromatografía por permeación en gel (GPC)

Por cromatografía por permeación en gel, se determinó el peso molecular promedio en número ( $\overline{Mn}$ ), el peso molecular promedio en peso ( $\overline{Mw}$ ), el peso molecular promedio ( $\overline{Mz}$ ) y el índice de polidispersidad del material ( $Mw/Mn$ ) del policarbonato uretano, por cromatografía por permeación en gel (GPC), se utilizó como disolvente en fase móvil dimetilformamida grado cromatográfico. En la Tabla 17 se muestran los valores obtenidos de la caracterización:

Tabla 17 Peso molecular del PCU

<b>Poli (carbonato-uretano)</b>			
$\overline{Mn}$ (g/mol)	$\overline{Mw}$ (g/mol)	$\overline{Mz}$ (g/mol)	$(Mw/Mn)$
64,320	76,920	108,600	1.196

- Análisis de cristalinidad por difracción de rayos X (DRX)

Con la técnica de difracción de rayos X se observó si la muestra presenta algún ordenamiento cristalino, el difractograma de la Figura 22 corresponde a la muestra de policarbonato uretano en él es posible observar que se trata de un polímero semi-ordenado, debido al porcentaje de cristalinidad del material.

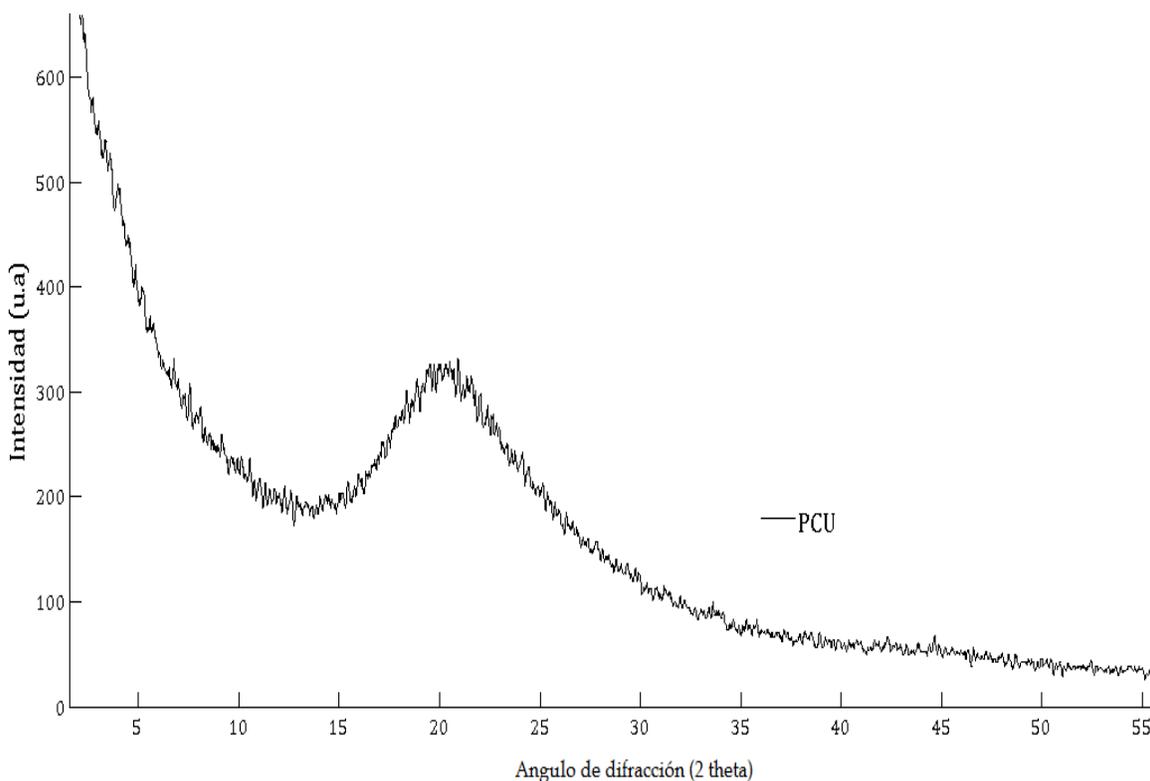


Figura 22 Difractograma de PCU

- Estructura de las fases por dispersión de rayos x a bajo ángulo (SAXS), dispersión de rayos x a ángulo alto (WAXS)

El análisis de dispersión de rayos X por ángulo bajo (SAXS) y ángulo alto (WAXS), se realizó a la muestra de PCU, en SAXS se encontró la morfología y en WAXS la magnitud de los dominios cristalinos, congruentes con los resultados encontrados por otros investigadores (Bonart R. J., 1968) (Hernandez Rebeca, 2008) (Roger Wesley Bass, 2011), sobre la morfología del PCU.

En la Figura 23 y Figura 24 se muestran los difractogramas de WAXS y SAXS de la muestra de PCU electrohilado, los datos obtenidos como son las distancias interlaminares, el tamaño de apilamiento, las dimensiones interplanares y el tamaño de los cristales se determinaron con la fórmula de Debye-Scherrer, en la Tabla 18 se resumen los datos obtenidos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el segmento blando (policarbonato) se calculó:

- Las distancias interlaminares ( $d_D$ )
- Y el tamaño de los apilamientos laminares en el ensamble laminar en el segmento duro ( $\Delta_D$ ).

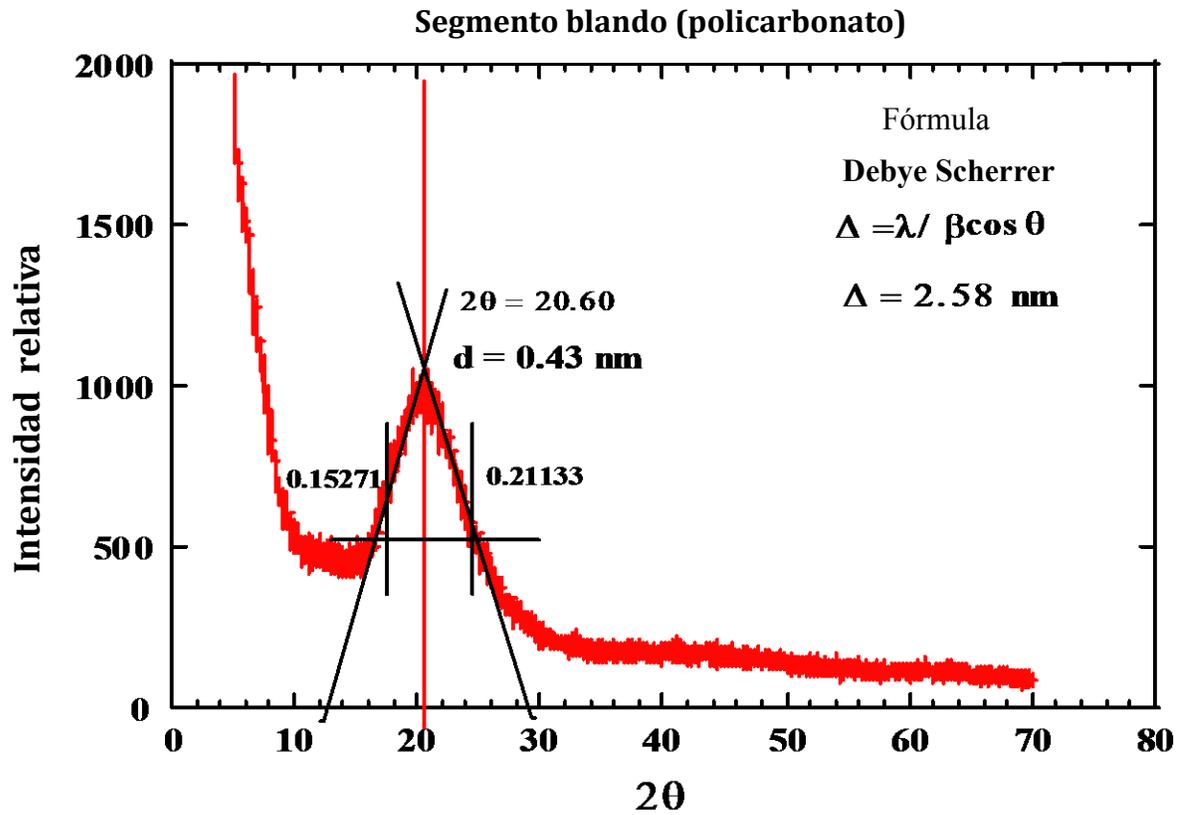


Figura 23 Difractograma de WAXS del segmento duro del policarbonato

Y para el segmento duro (poliuretano) se determinó:

- Las dimensiones interplanares ( $d_B$ ),
- Y el tamaño de los cristales ( $\Delta_B$ )

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

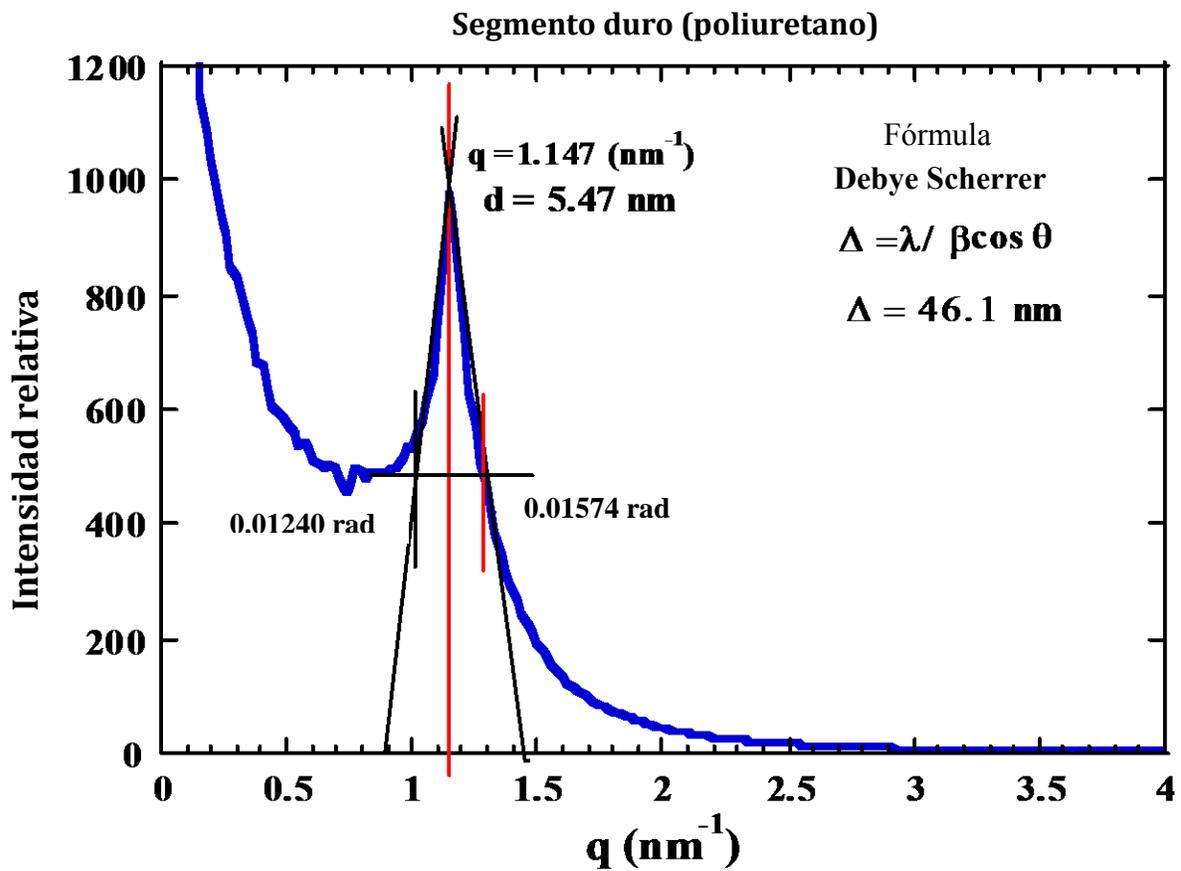


Figura 24 Difractograma de SAXS del segmento duro del poliuretano

Tabla 18 Tabla de dimensiones interplanares de los segmentos

Segmento	d (nm)	$\Delta$ (nm)
Poliuretano	5.47	46.10
Polycarbonato	0.43	2.58

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 25 se resume a que parte de la molécula de PCU corresponde:

- La distancia interlaminar ( $d_D$ )
- El tamaño de los apilamientos laminares ( $\Delta_D$ ).
- Las dimensiones interplanares ( $d_B$ ),
- Y el tamaño de los cristales ( $\Delta_B$ )

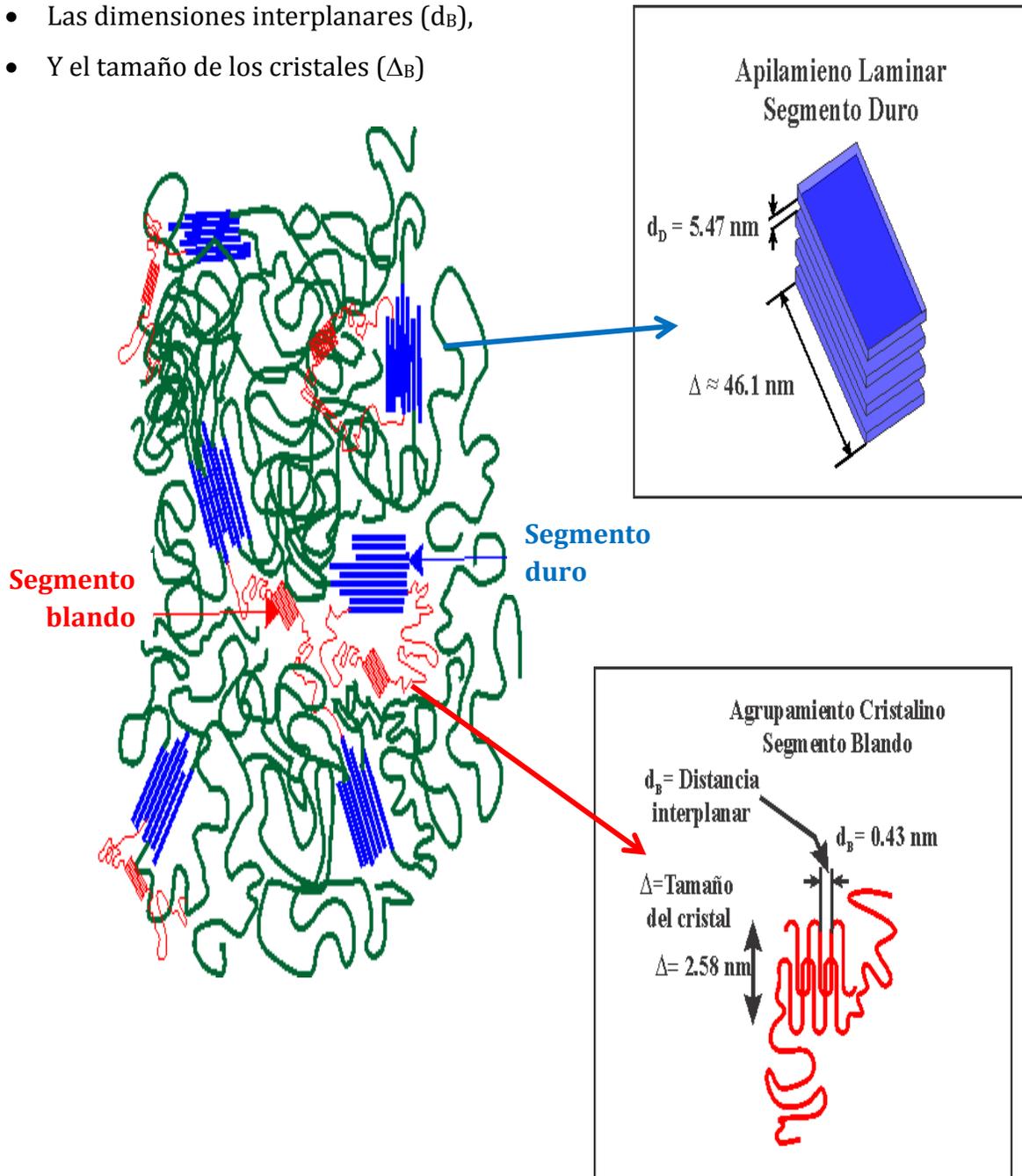


Figura 25 Agrupamientos cristalinos y apilamiento laminar de la estructura de PCU

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Análisis de estructura por espectroscopía de infrarrojo con reflexión total atenuada (ATR-FTIR)

Con espectroscopía de infrarrojo con reflexión total atenuada (ATR-FTIR), se realizó la determinación de las bandas correspondientes a la estructura del PCU (Tabla 19). En la Figura 26 se muestra el espectro obtenido, en esta se observa una banda de absorción a los  $3600\text{ cm}^{-1}$ , banda que nos indica la presencia de enlaces de puentes de hidrógeno que muestran la existencia de humedad en el polímero, causado posiblemente por un mal almacenaje del material.

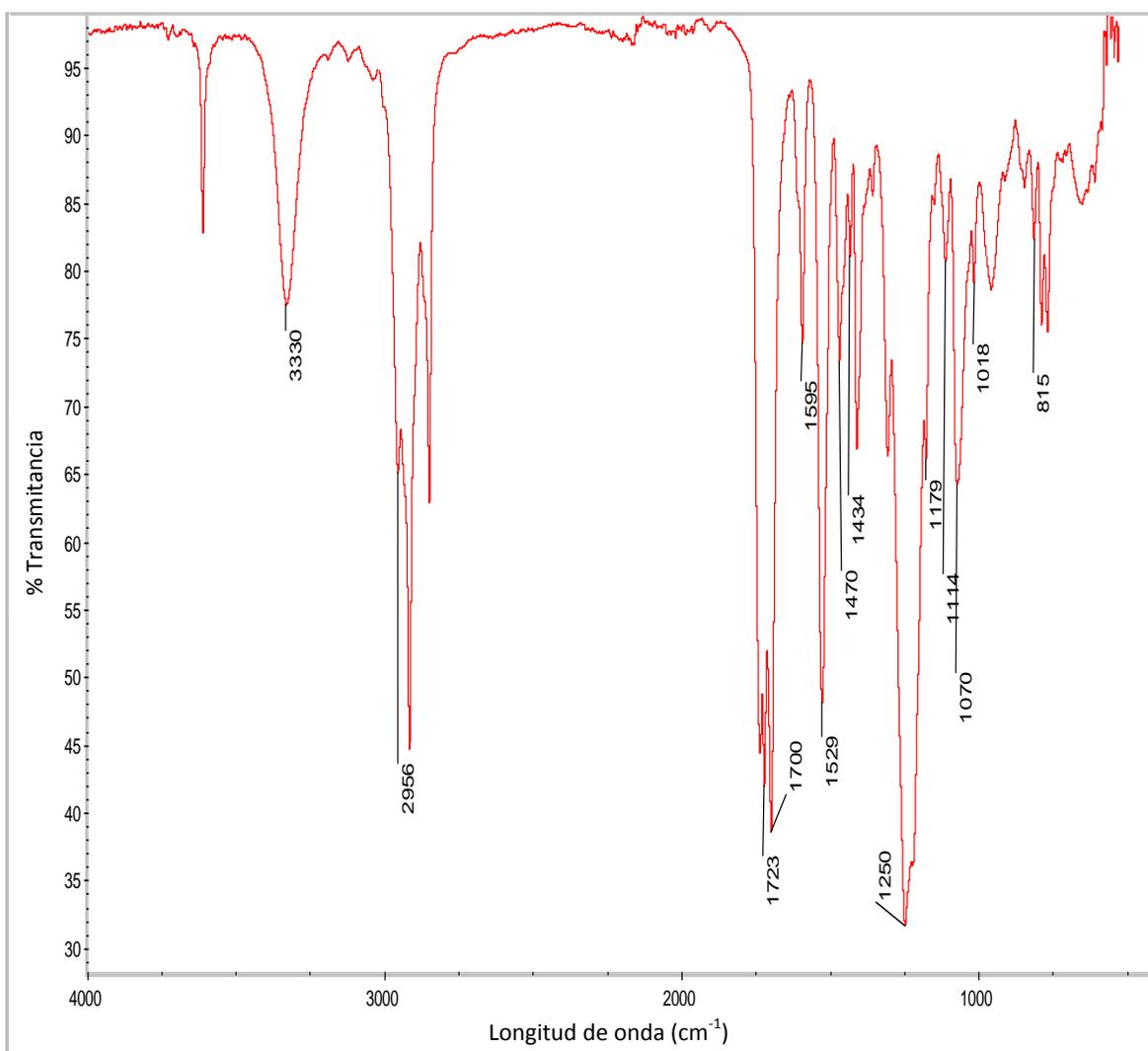


Figura 26 Espectro de infrarrojo del PCU

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 19 Asignación espectral del PCU

<b>Asignación espectral de infrarrojo</b>	
Grupo funcional	Banda (cm <sup>-1</sup> )
C=O	1723 , 1250
N—H	1595, 1179
C=C	1529, 1114, 1018, 816
COO-	1152
C—O—C	1070
CH <sub>2</sub>	2956, 1434
R—NH—CO	3330, 1700, 1470

○ Degradación térmica por análisis termogravimétrico (TGA)

Con la técnica de análisis termogravimétrico (TGA) se determinó la temperatura de descomposición de las muestras de policarbonato uretano en masa (PCU) y de PCU electrohilado (PCU-FIBRA). En la Figura 27 se muestran los termogramas del PCU y del PCU-FIBRA, en los termogramas es posible identificar un decremento de la temperatura entre el material electrohilado (PCU-FIBRA) y el polímero en masa (PCU), esta disminución se observa en el punto de inflexión de las curvas que se modifican de 354.42°C a 299.14°C, esta variación en la temperatura, es causada por el posible ordenamiento de la molécula al momento de formarse las fibras, lo que ocasiona un decremento en la temperatura de descomposición.

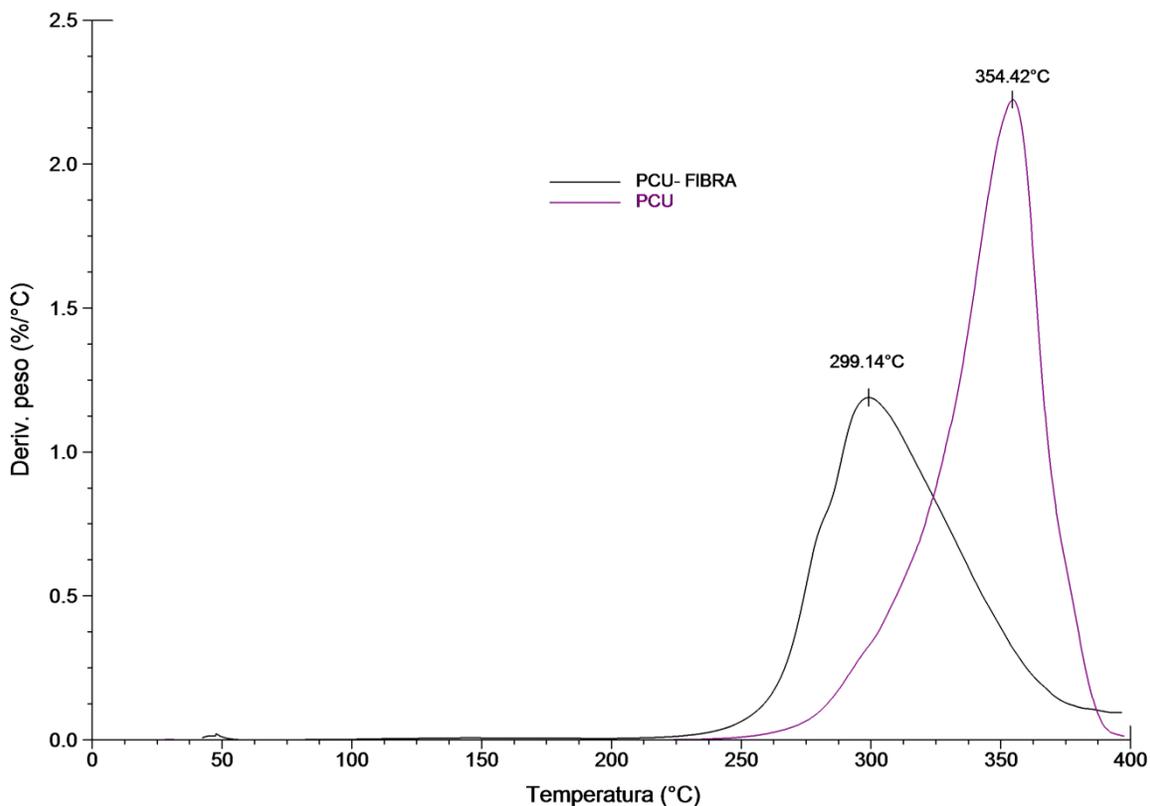


Figura 27 Termogramas de policarbonato uretano y policarbonato uretano electrohilado

- Temperaturas de transición por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y diferenciación de fases por análisis mecánico-dinámico (DMA)

Con la técnica de calorimetría diferencial de barrido se determinó la temperatura de transición vítrea y la temperatura de fusión. La Figura 28 muestra el termograma del PCU, en él se observan dos temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ): la primera temperatura de transición vítrea corresponde al segmento suave ( $T_{gs}$ ) a los  $-22.23^\circ\text{C}$  y la segunda al segmento rígido ( $T_{gr}$ ) a los  $-1.20^\circ\text{C}$ ; la presencia de las dos temperaturas de transición vítrea nos indica, la existencia de una estructura separada en dos microfases esto se corroboró con DMA (figura 29) (Jintang Guo, 2007).

Por arriba de los  $100^\circ\text{C}$  se observan dos temperaturas importantes en el PCU, la temperatura de fusión ( $T_m$ ) a los  $173^\circ\text{C}$  que corresponde a la fusión del segmento suave del polímero (temperatura de fusión del material, anexo 3) y la temperatura de descomposición a los  $215.80^\circ\text{C}$ .

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

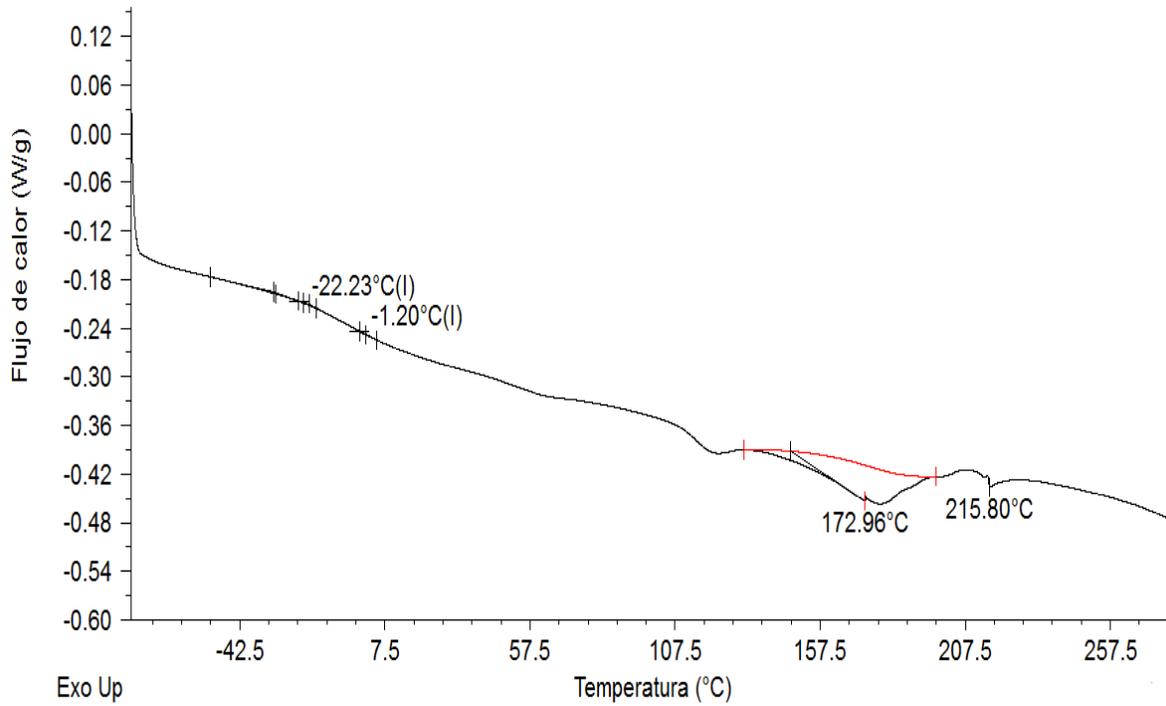


Figura 28 Termogramas de PCU y PCU electrohilado

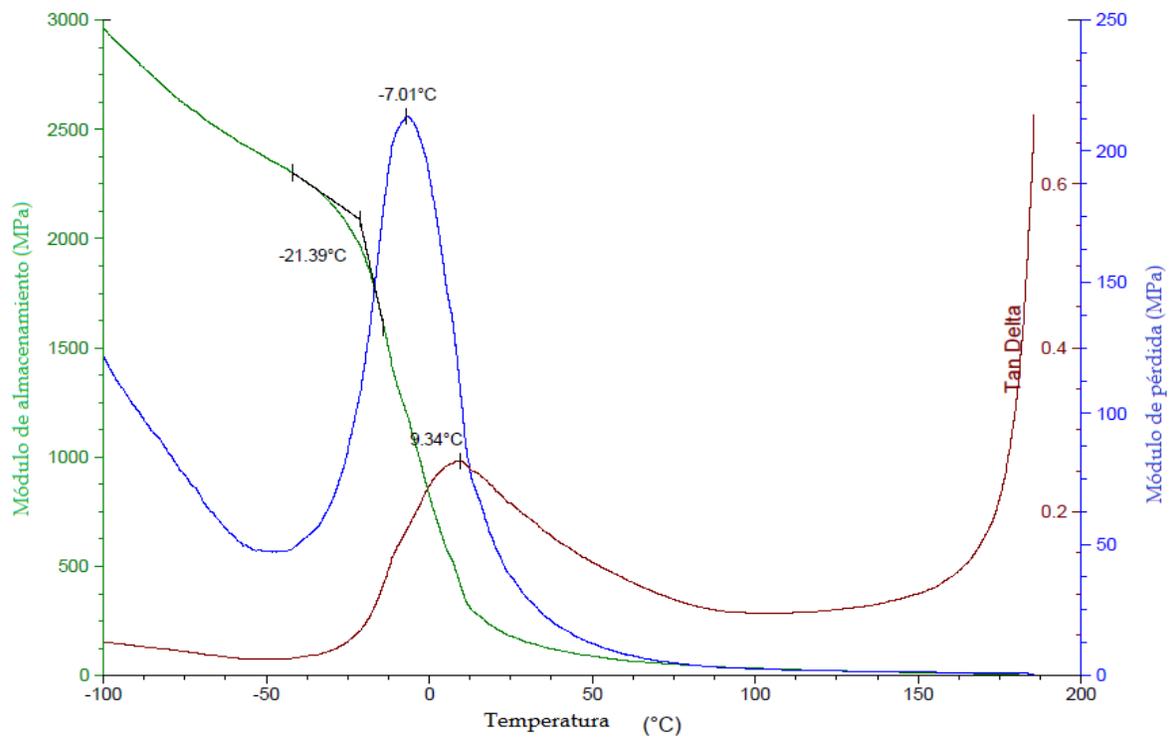


Figura 29 Análisis mecánico-dinámico de PCU. Se detecta la presencia de dos fases a temperaturas similares a las que se presentan las temperaturas de transición vítrea

### 4.5 Identificación de fibronectina sobre los andamios.

Para identificar la presencia de la fibronectina de plasma humano en los andamios de poli (carbonato-uretano) electrohilado, se utilizaron diferentes técnicas como son: espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS), difracción de rayos X (DRX) y ángulo de contacto.

- Composición por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS)

Se utilizó la técnica de SEM-EDS para determinar la presencia de fibronectina en los andamios electrohilados. Se efectuó el análisis en diferentes zonas: uno de tipo puntual y dos de área ( $1488\mu\text{m}^2$ ), para asegurar la homogeneidad de los resultados. En la Tabla 20 se muestran los resultados del análisis de composición de la muestra PCU con 10% de fibronectina obtenidos por EDS.

En el análisis de composición de la muestra, se observa la presencia del azufre (S) elemento presente en los enlaces covalentes de los puentes de disulfuro de las cadenas de fibronectina. El cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) son sales presentes en la solución de reconstitución de la fibronectina. Estas sales se encuentran presentes debido a la purificación de la proteína por lo que la fibronectina empleada, reporta concentraciones para estas sales de: 0.15M NaCl y 1mM de  $\text{CaCl}_2$  por cada 1mg/ml de fibronectina en solución. Por lo que en este trabajo la presencia de los iones Na y Cl se tomaron como una confirmación de la presencia de la fibronectina. Los límites de detección de esta técnica están alrededor de las 100 ppm. es por eso que solo se realizó el análisis de composición al andamio de PCU con 10% de fibronectina (PCU-FIB03).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 20 Análisis composicional de la muestra de PCU con 10% de fibronectina

	Área 1	Área 2	Puntual
Elemento	% en peso	% en peso	% en peso
C	79.29	73.60	74.42
O	15.47	21.96	10.06
Na	2.10	1.88	0.68
S	0.78	0.78	0.81
Cl	2.37	1.77	0.28
N	---	----	13.76
Total	100	100	100

○ Identificación de sales por Difracción de rayos X (DRX)

Con la técnica de DRX se corroboró la presencia de los iones de cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), sales presentes en la reconstitución de la fibronectina. En la Figura 30 observamos los cuatro difractograma que corresponden al:

- Andamio del PCU electrohilado.
- Andamio de PCU con 0.5% de fibronectina.
- Andamio de PCU con 5% de fibronectina.
- Andamio de PCU con 10% de fibronectina.

En la Figura 30 se ven dos fases: una corresponde a la fase del NaCl identificada con la PDF (Powder Diffraction File) con el número 00-005-0628, la cual incrementa su intensidad de reflexión de Bragg en el ángulo  $31.548^\circ$  conforme se aumenta la concentración de fibronectina, esto mismo ocurre para la fase del  $\text{CaCl}_2$  (PDF 00-024-0223) en el ángulo  $29.235^\circ$  en donde también incrementa su intensidad.

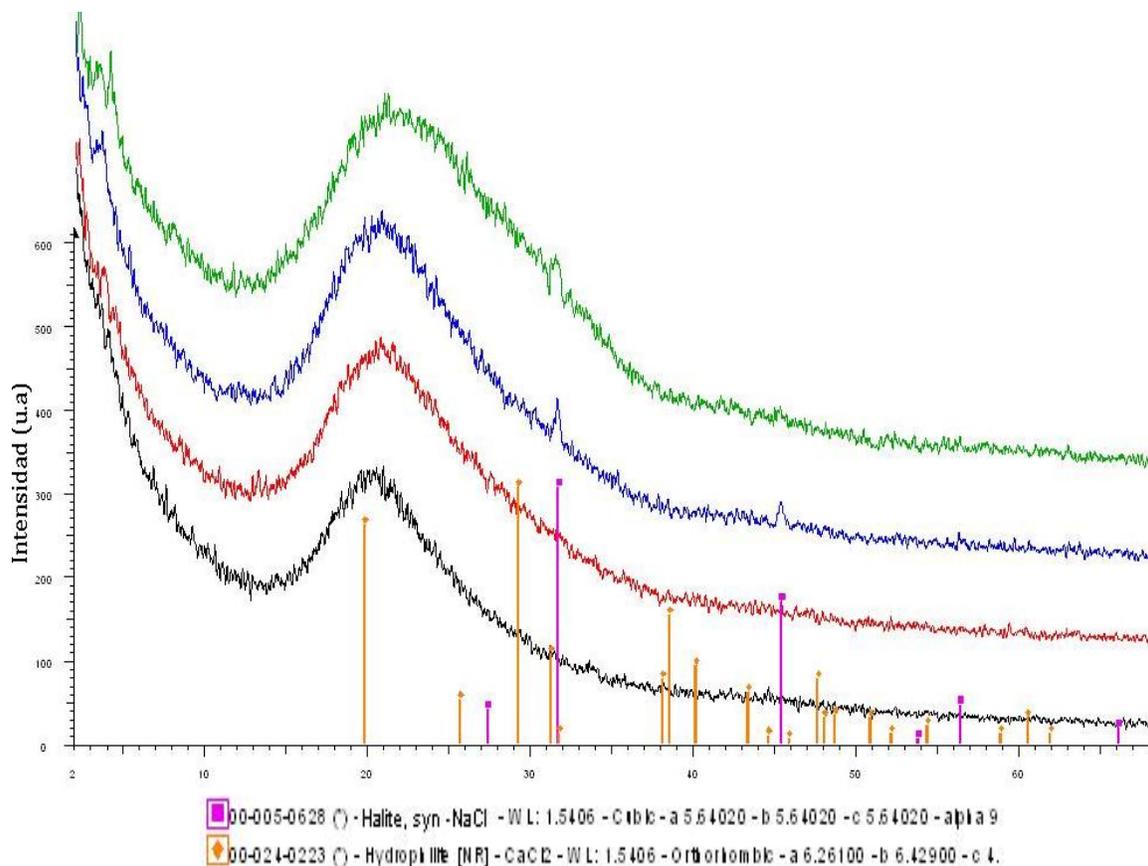


Figura 30 Se observan los difractograma del andamio de PCU electrohilado (negro), el andamio de PCU con 0.5% de fibronectina (rojo), el andamio de PCU con 5% de fibronectina (azul) y el andamio de PCU con 10% de fibronectina (verde). En la figura se ve, como la fase de NaCl y CaCl<sub>2</sub> aumenta en intensidad conforme se incrementa la concentración de fibronectina en los andamios de PCU.

### ○ Análisis de hidrofobicidad por ángulo de contacto

En la tabla 21 se resumen los datos obtenidos de ángulo de contacto para las muestras de PCU electrohilado (PCU-FIBRA) y PCU con 10% de fibronectina (PCU-FIB03).

Tabla 21 Ángulo de contacto (agua)

Muestra	Tipo de superficie	Ángulo de contacto
PCU-FIBRA	Hidrofóbica	125.30± 5.39°
PCU-FIB03	Hidrofóbica	71.61± 7.18°
	Hidrofílica	0°

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 31 se puede observar que en el andamio de PCU electrohilado, el ángulo de contacto obtenido fue de  $125.30 \pm 5.39^\circ$  tratándose de una superficie hidrofóbica, mientras que en el andamio de PCU con 10% de fibronectina la distribución de la glicoproteína (fibronectina) sobre el andamio no fue homogénea, por lo que se puede observar dos tipos de superficie en el andamio: una hidrofóbica ( $71.61 \pm 7.18^\circ$ ) y la otra hidrofílica donde el ángulo obtenido fue de  $0^\circ$  ya que al momento de colocar la gota sobre la muestra era absorbida en su totalidad. Esta disminución en el ángulo de contacto es provocado por la presencia de la fibronectina plasma, que hace que el andamio deje de ser hidrofóbico en las regiones en donde se encuentra la fibronectina. La fibronectina de plasma es de tipo hidrofílica en el dominio FN III<sub>7</sub> lo que permite su reconstitución. Por lo tanto, la identificación de regiones hidrofílicas en el andamio son una confirmación más de la presencia de fibronectina y se espera que el andamio PCU-FIB03 mejore su afinidad celular. (Xiaohua Liu, 2012) (David Craig, 2000)

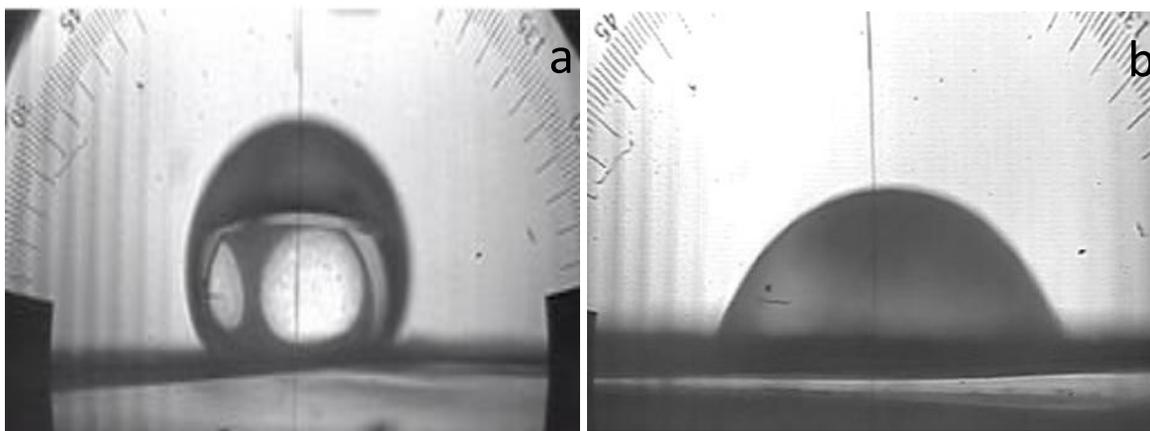


Figura 31 Superficie del a) PCU sin modificar b) PCU con 10% de fibronectina

- Análisis por espectroscopia de reflexión total atenuada

La Figura 32 corresponde al espectro de infrarrojo de la fibronectina de plasma humano, en él es posible identificar las vibraciones de las bandas características amida de las proteínas como: la banda de la amida A ( $\approx 3500 \text{ cm}^{-1}$ ) y la banda de la amida B ( $\approx 3500 \text{ cm}^{-1}$ ), las cuales se asocian a vibraciones de estiramiento del N—H.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las bandas de vibración de la amina I y la amina II son las bandas principales de la proteína, la banda de la amida I se localiza entre los 1600 y 1700  $\text{cm}^{-1}$ , ésta se asocia a la vibración de estiramiento de C=O y se relaciona directamente con la conformación de las proteínas. La amida II resulta de la vibración de flexión entre N—H y de la vibración de estiramiento entre C—N esta banda se localiza en 1580  $\text{cm}^{-1}$ .

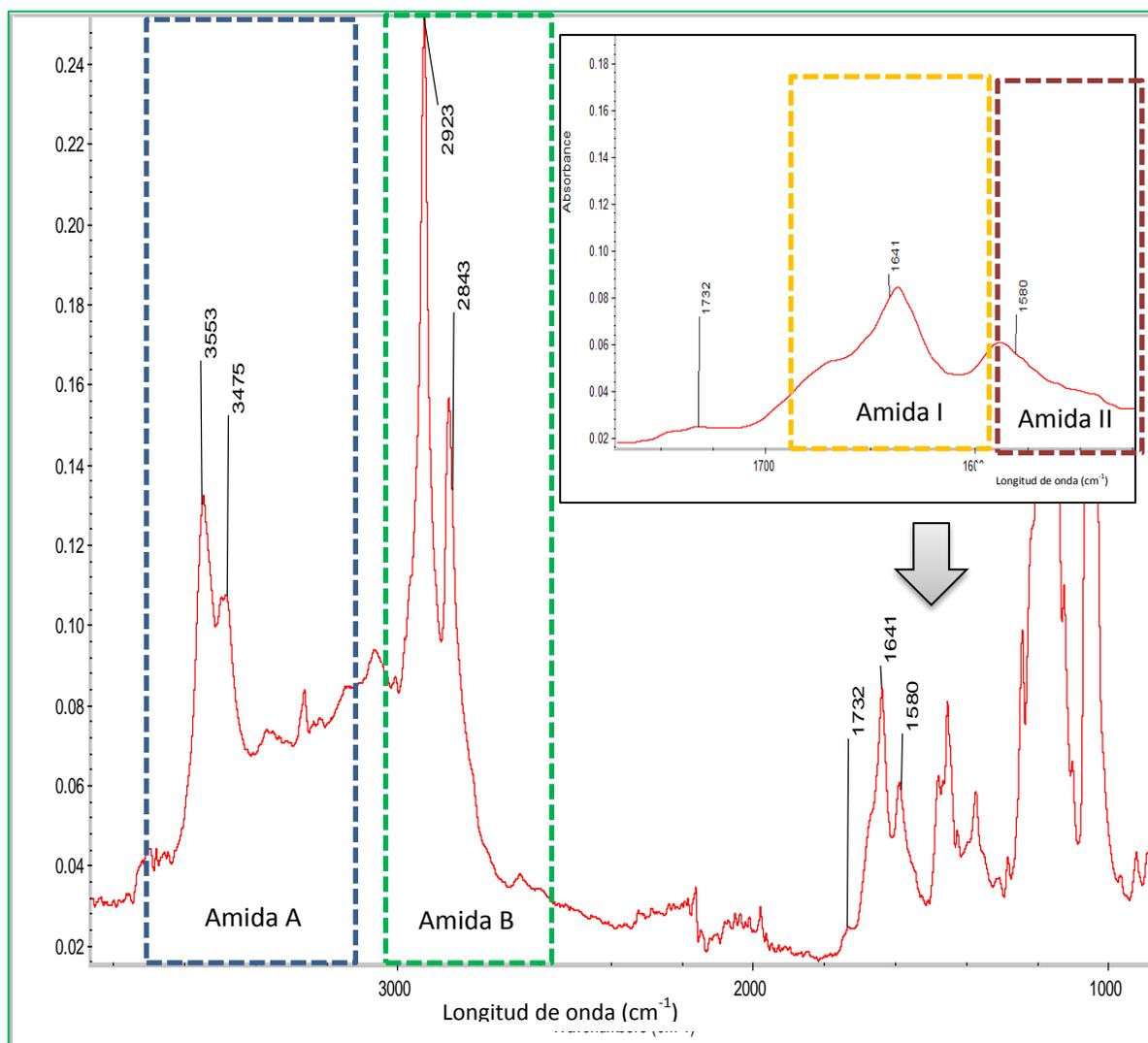


Figura 32 Espectro de infrarrojo de la fibronectina de plasma humano

La forma de la banda de amida I es característica de proteínas globulares de hoja plegada  $\beta$  ( $\beta$ -sheet en inglés), en el caso de la fibronectina presenta cadenas antiparalelas. Sin embargo, la forma de la proteína se debe al posicionamiento paralelo de las dos cadenas de aminoácidos dentro de la proteína, en el que los grupos

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

N—H de las cadenas forman enlaces de hidrógeno con el carboxilo (C=O) de la otra cadena. (Anatoli T. Gudkov, 1978)

Se identificó la presencia de la cadena de aminoácidos, la contribución de estas vibraciones están en la región de la banda amida I y amida II. Como se observa en la Figura 33 la región de absorción de: la arginina (Arg), la tirosina (Tyr), el ácido glutámico (Glu), el ácido aspártico (Asp), la glutamina (Gln) y la asparagina (Asn) está entre los 1500 y 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Con base al artículo “A study of structure of fibronectin” de Koteliansky se realizó la asignación de las bandas de los aminoácidos. Sin embargo, se requiere un estudio más detallado para la deconvolución de picos

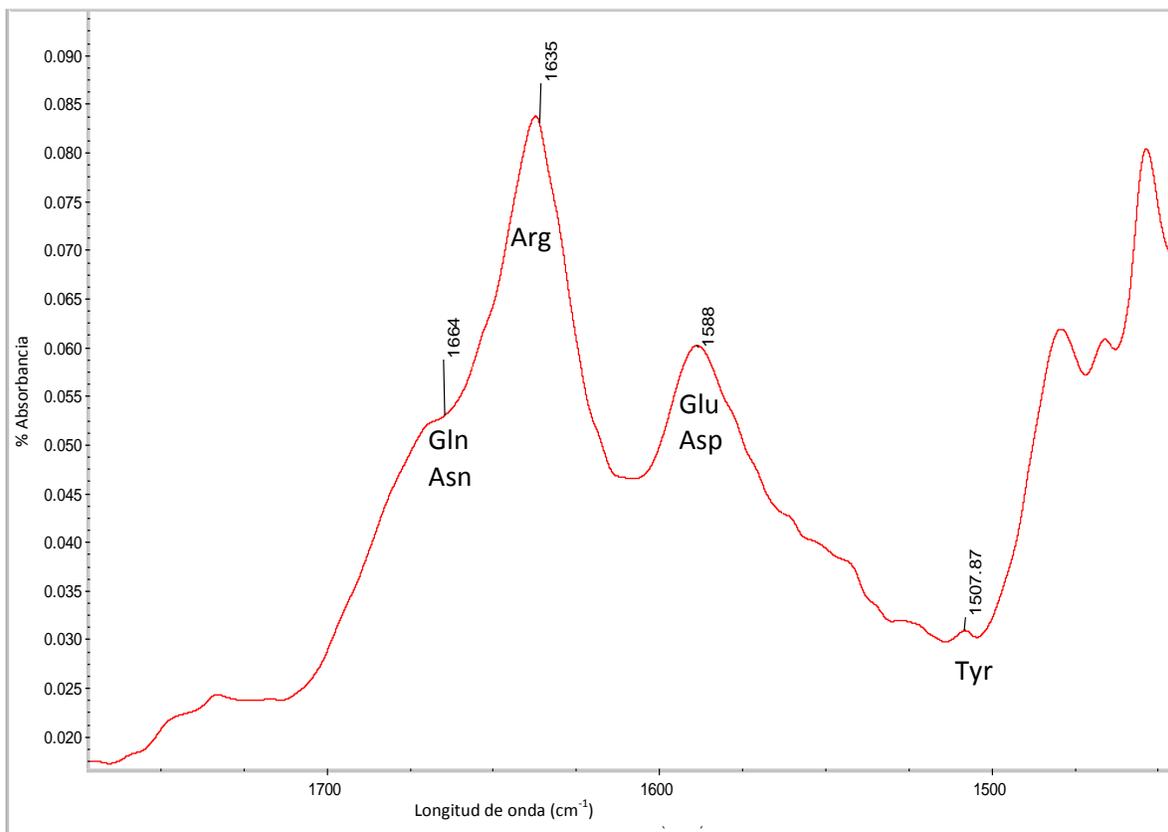


Figura 33 Identificación de la cadena de aminoácidos de la fibronectina

En la Figura 34 se muestran los espectros de FTIR de los andamios de PCU electrohilado (azul), de PCU con 10% de fibronectina (rojo) y de fibronectina de plasma humano (rosa). Se identificó las vibraciones características de los puentes de

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

disulfuro de la cadena de fibronectina ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) en  $\approx 590 \text{ cm}^{-1}$ , dicha banda de absorción aparece en el espectro de PCU con 10% de fibronectina. Esto indica la presencia de fibronectina en los andamios de policarbonato uretano

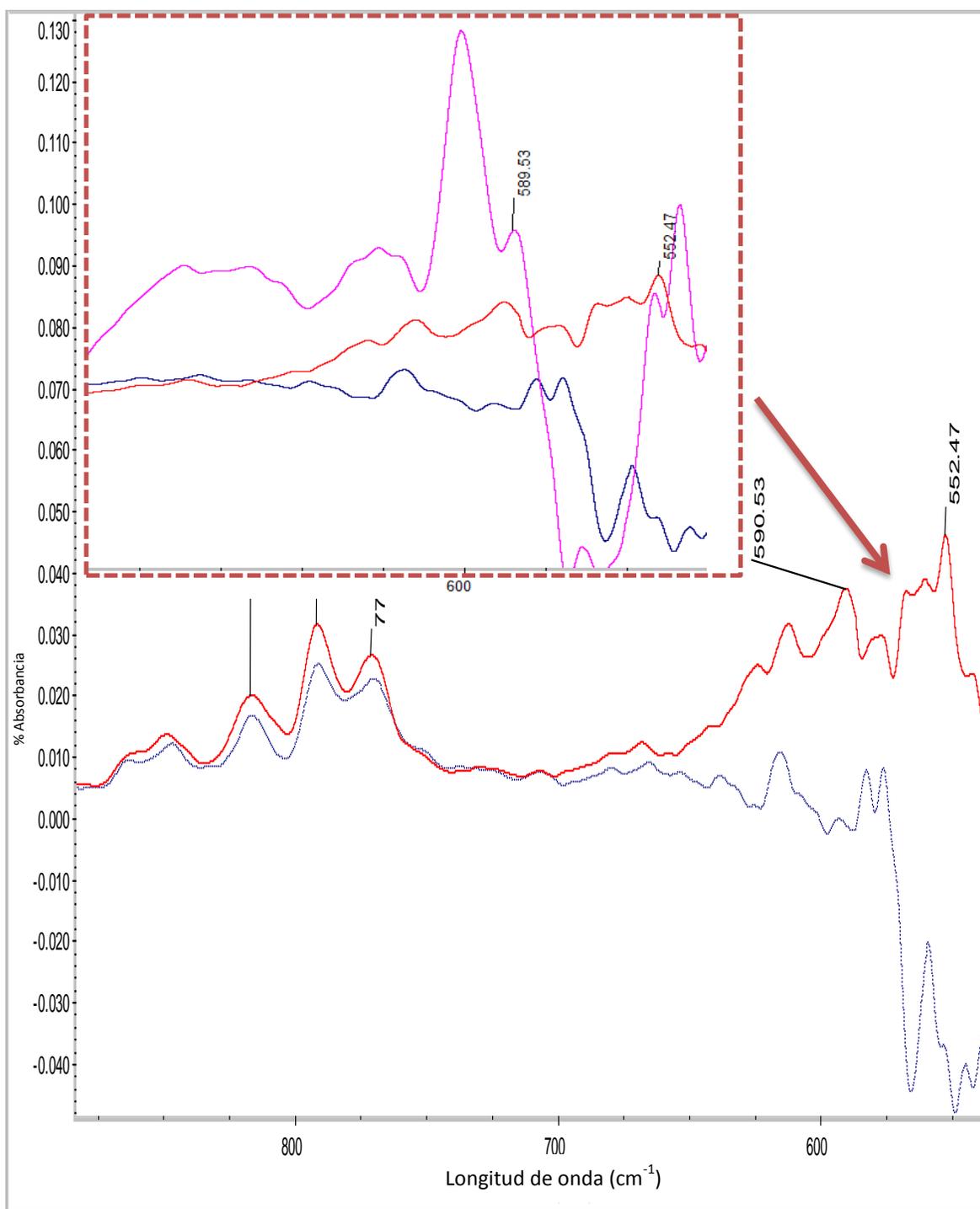


Figura 34 Se realizó la identificación del sulfuro de la cadena de fibronectina en el andamio de policarbonato uretano. El espectro de color azul corresponde al policarbonato uretano, el espectro de color rojo al policarbonato uretano con fibronectina de plasma humano y el espectro de color rosa a la fibronectina de plasma humano.

## 4.6 Efectos de la fibronectina en la membrana de policarbonato uretano.

En la fase 6 se utilizaron técnicas analíticas como: la espectroscopía de infrarrojo de reflexión total atenuada (ATR-FTIR), la calorimetría diferencial de barrido modulado (MDSC), el análisis termogravimétrico (TGA) y la prueba de tensión, para identificar los efectos de la fibronectina de plasma humano en los andamios de policarbonato uretano.

- Efecto térmico de la fibronectina de plasma humano en las muestras de policarbonato uretano por análisis termogravimétrico (TGA).

Con esta técnica se evaluó el comportamiento térmico de las muestras, en la Figura 35 se puede ver los termogramas de: el policarbonato uretano en masa (PCU), el PCU electrohilado (PCU-FIBRA) y los andamios electrohilado a diferentes concentraciones de fibronectina: 0.5% de fibronectina → PCU-FIB01, 5% de fibronectina → PCU-FIB02 y 10% de fibronectina → PCU-FIB03. En los termogramas es posible identificar un decremento de la temperatura entre el material electrohilado (PCU-FIBRA) y el polímero en masa (PCU). Esta disminución se observa en el punto de inflexión de las curvas que se modifican de 354.42°C a 299.14°C al electrohilar el material. Sin embargo, al incorporar la fibronectina se observa un leve decremento de la temperatura a 292.71 °C, que se mantiene constante en las diferentes concentraciones de fibronectina. Por lo tanto no se observan cambios en su estabilidad térmica, en la Tabla 22 se muestra un resumen de las temperaturas de descomposición de las muestras analizadas por TGA.

Tabla 22 Temperaturas de descomposición por TGA

Muestra	Temperatura de descomposición (°C)
PCU	354.42
PCU-FIBRA	299.14
PCU-FIB01	292.71
PCU-FIB02	293.83
PCU-FIB03	292.11

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

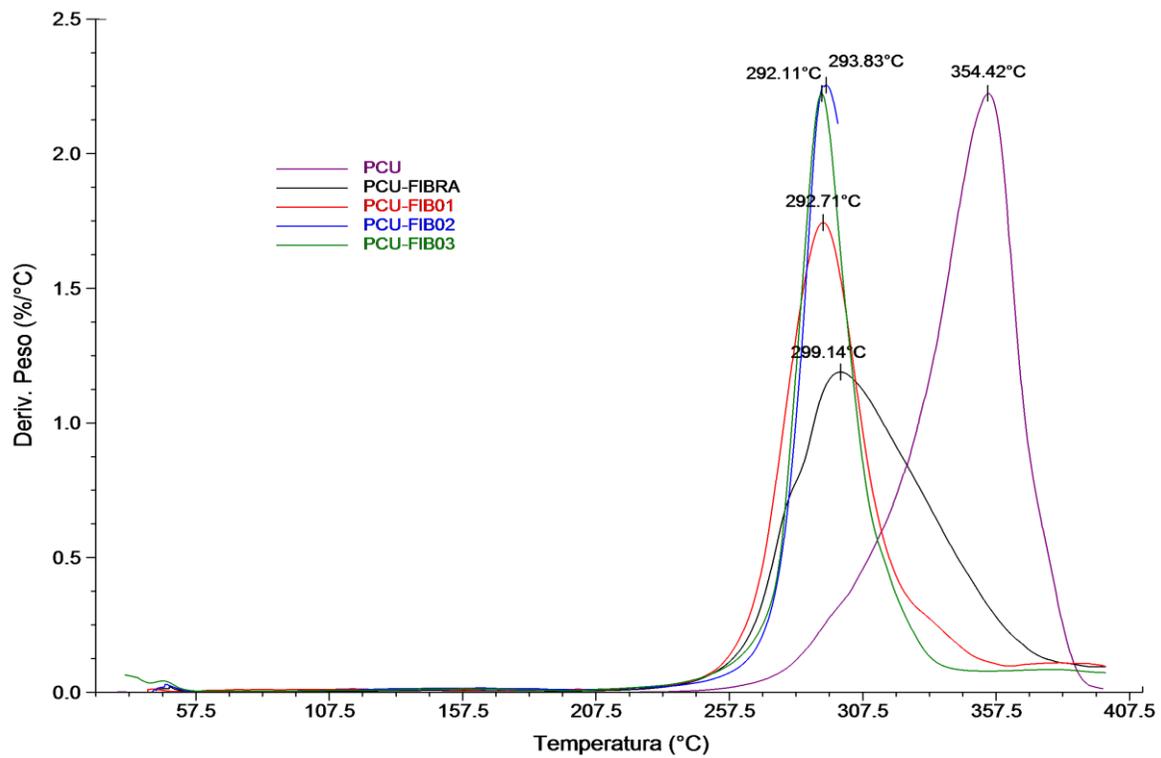
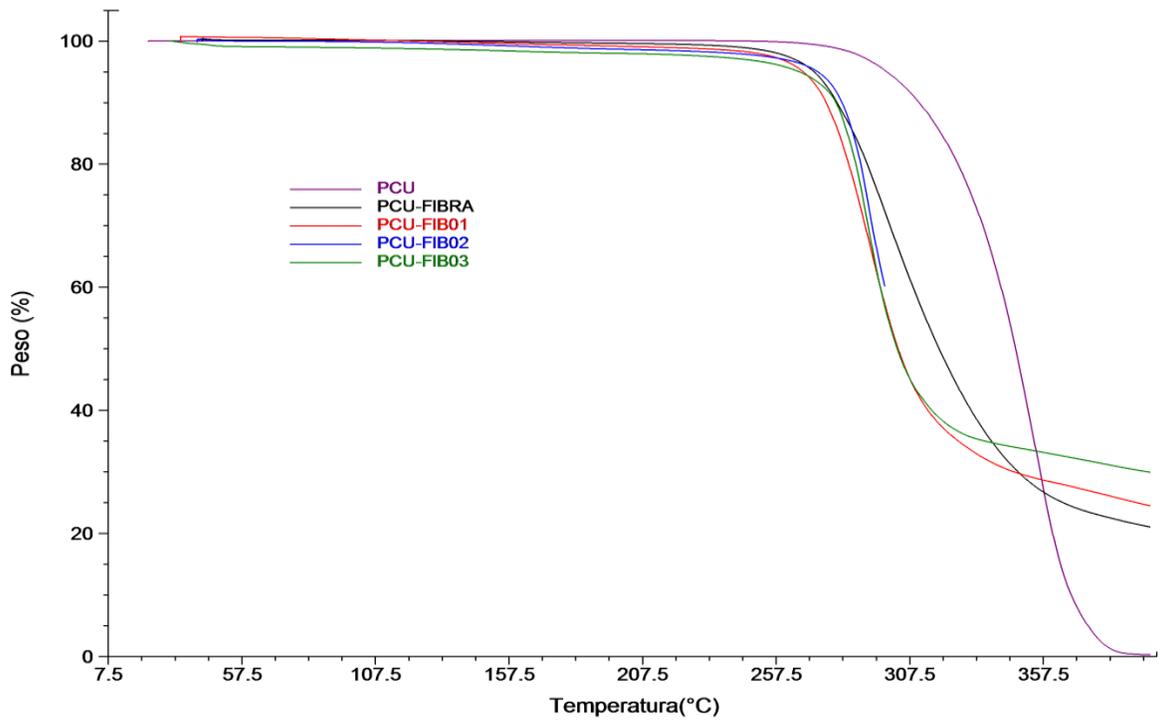


Figura 35 Termogramas del PCU, PCU-FIBRA, PCU-FIB01, PCU-FIB02 y PCU-FIB03

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Temperatura de desnaturalización por calorimetría diferencial de barrido modulado (MDSC).

Con la técnica de calorimetría diferencial de barrido modulado, se determinó la temperatura de desnaturalización de la fibronectina. La Figura 36 representa el termograma de flujo de calor no-reversible del PCU con 10% de fibronectina, en él se identificaron dos transiciones térmicas de desnaturalización de la fibronectina: la primera ocurre a los 58.60°C y la segunda a los 82.99°C. Estas temperaturas se correlacionaron con el trabajo realizado por Wallace y colaboradores (Wallace D.G., 1981) (Niedzwiadek W., 1988) donde reportan una temperatura de desnaturalización de la fibronectina a los 68°C y 82° con una rampa de calentamiento de 10°C/min.

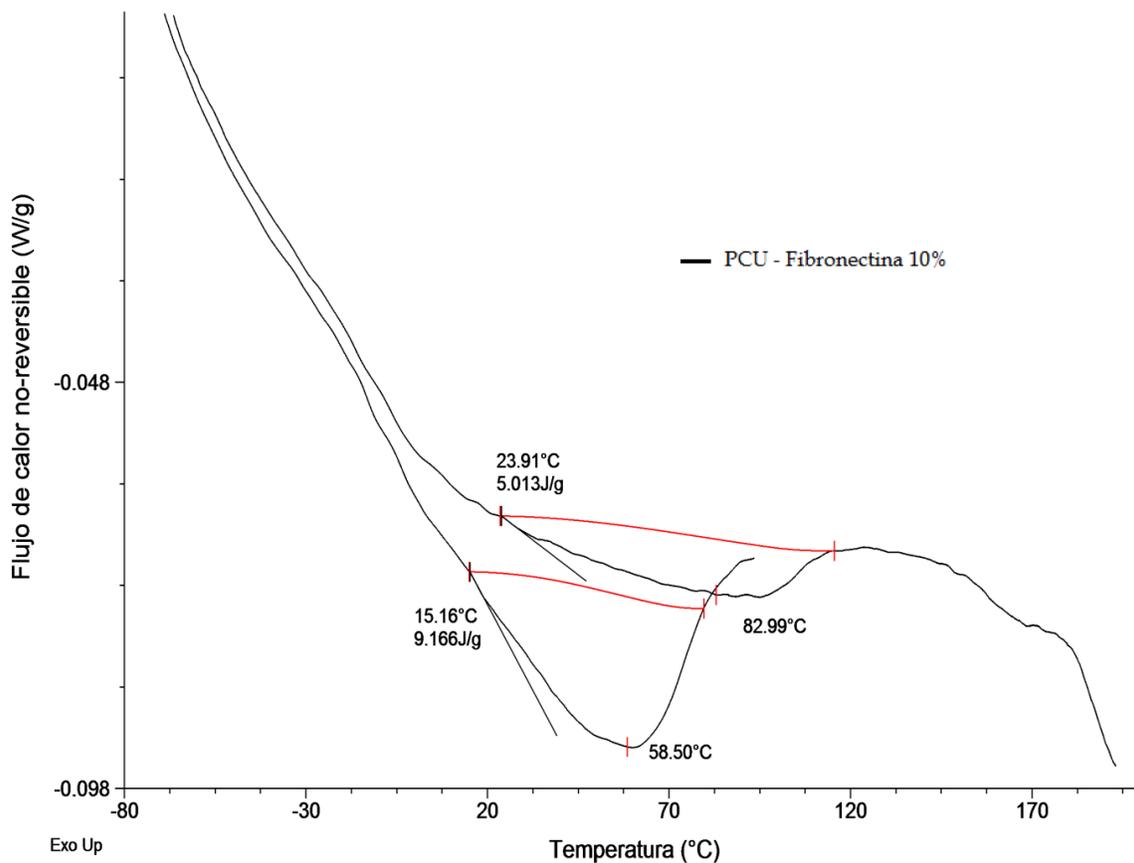


Figura 36 Identificación de temperaturas de descomposición de la fibronectina sobre los andamios de PCU con 10% de fibronectina

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ○ Propiedades mecánicas por prueba de tensión

Los estudios de tensión se realizaron en una máquina de pruebas mecánicas, a una velocidad de 0.16 mm/min a 21°C. Las probetas fueron cortadas de los andamios de PCU y PCU con 0.5% de fibronectina respectivamente en una prensa manual con un troquel afilado de acuerdo a la norma ASTM-D1708. Se utilizaron sólo tres probetas de cada muestra, debido a la dificultad que implica la obtención de los andamios con fibronectina. En la Figura 37 se muestra la curva esfuerzo-deformación obtenida para el andamio de fibras de PCU con 0.5% de fibronectina, se puede observar la zona elástica y plástica del material, en las probetas hay un punto de fluencia donde aparece un cuello en la probeta caracterizado por una disminución de la sección transversa, por lo que en esa zona la carga recibida es mucho mayor como consecuencia de la disminución del área. Posteriormente, en la Figura 37 se observa el punto de esfuerzo máximo y el punto de ruptura de la muestra.

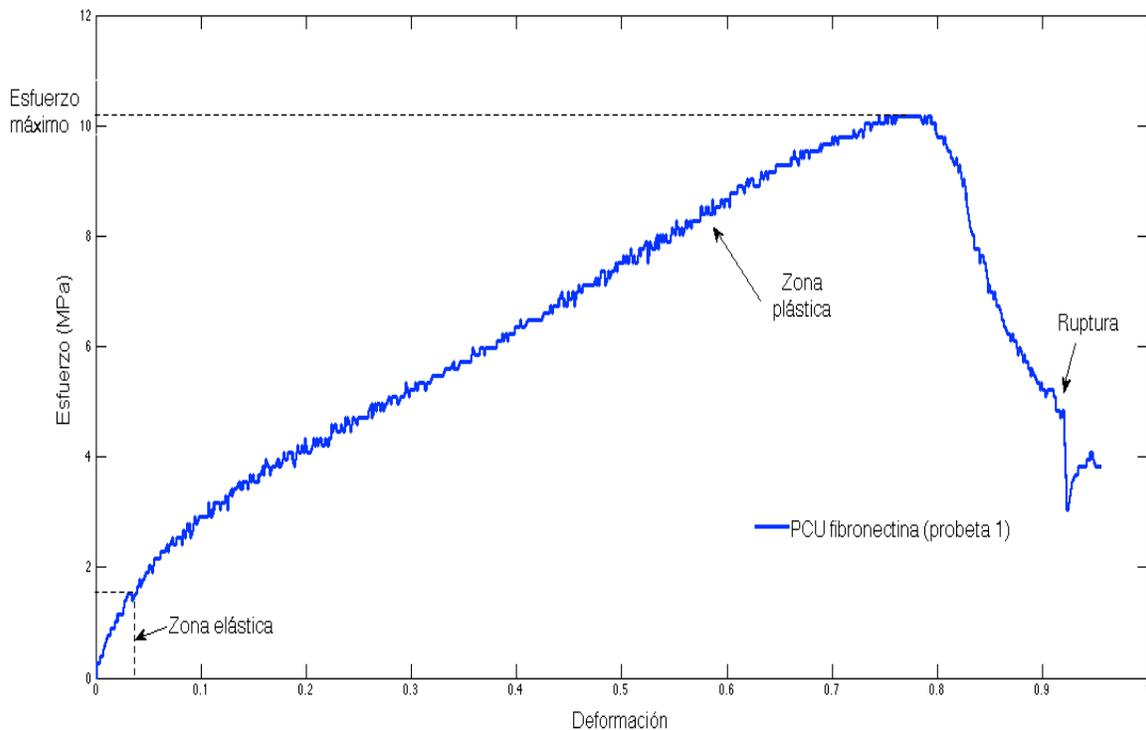


Figura 37 Curva esfuerzo-deformación obtenida para el andamio de fibras de PCU con 0.5% de fibronectina

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó el módulo de elasticidad de los andamios de PCU y PCU con 0.5% de fibronectina a partir de los datos de las gráficas, mediante un ajuste lineal que modela la relación entre la variable dependiente (esfuerzo) y la variable independiente (deformación). En la Figura 38 se observa el ajuste lineal de los datos experimentales.

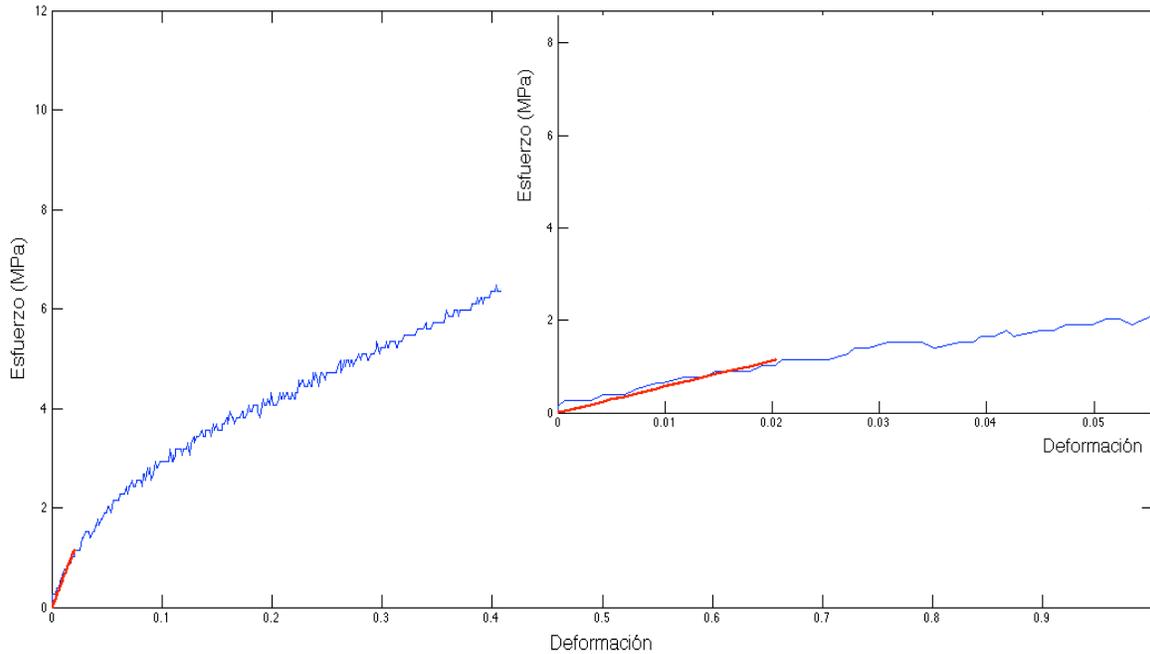
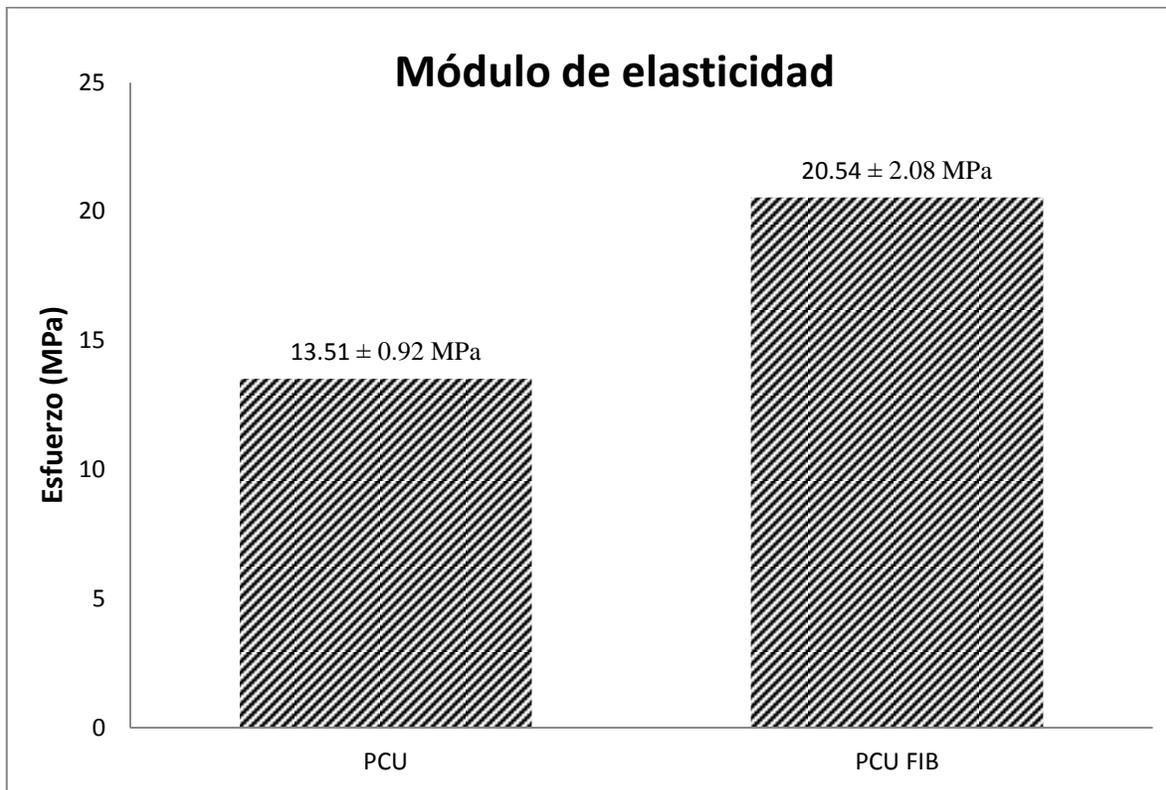


Figura 38 Ajuste lineal entre el modelo y los datos experimentales de las pruebas de tensión.

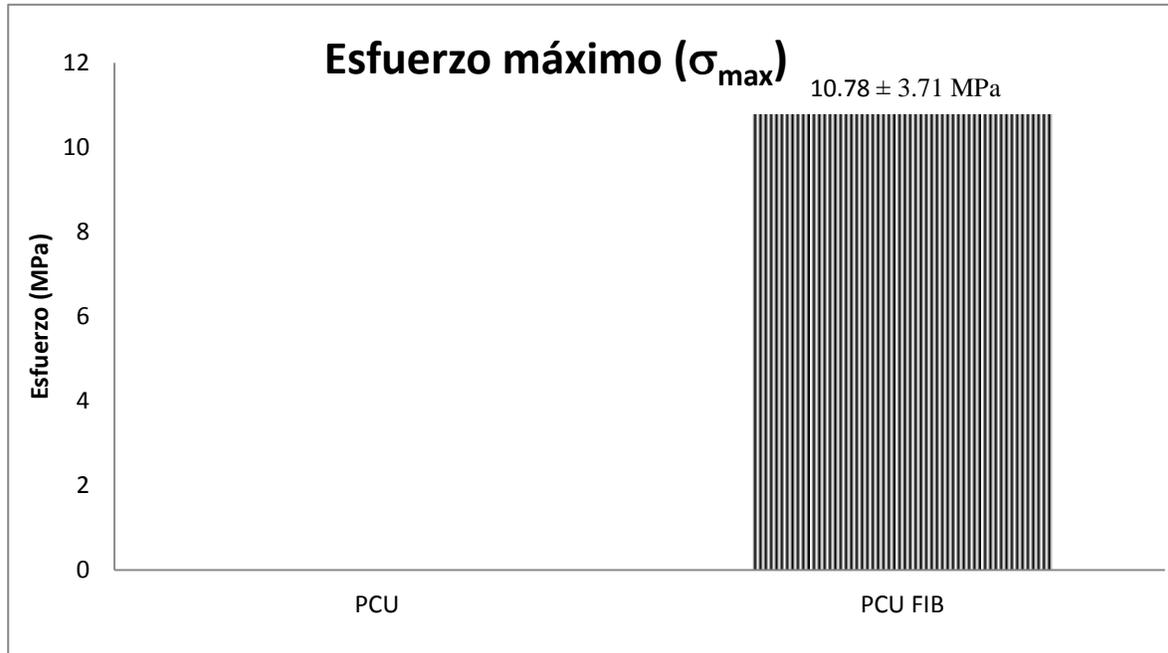
En la Gráfica 1 se presenta el módulo de elasticidad de las membranas de PCU y PCU con 0.5% de fibronectina, como se observa el módulo de elasticidad obtenido de PCU fue de  $13.51 \pm 0.92$  MPa valor muy similar al que reportan otros autores (Arjun G.N., 2011) mientras que para el andamio de PCU con fibronectina el valor obtenido fue de  $20.54 \pm 2.08$  MPa. Este incremento en el módulo de elasticidad es debido a la presencia de fibronectina que se ancla en las fibras y hace que no se deslicen entre ellas, de esta forma disminuye la resistencia a la ruptura y aumenta la rigidez de los andamios.



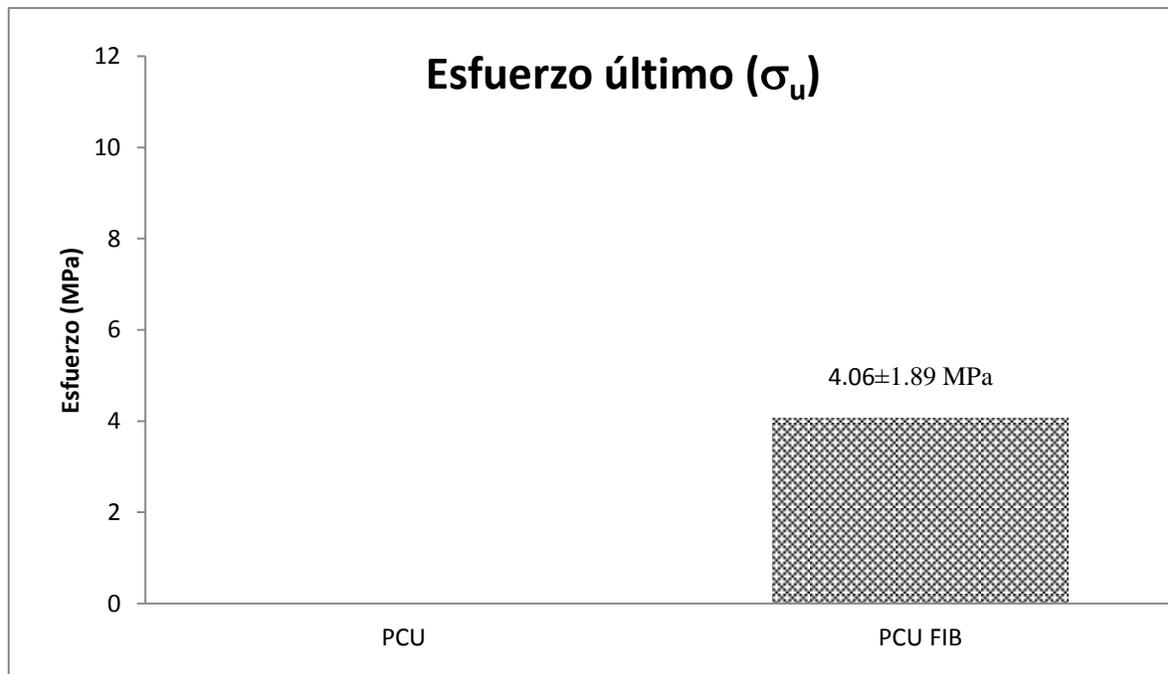
Gráfica 1 Módulo de elasticidad de las membranas de PCU y PCU con 0.5% de fibronectina

De las curvas esfuerzo-deformación no fue posible determinar el esfuerzo máximo ( $\sigma_{max}$ ) y el esfuerzo último ( $\sigma_u$ ) de las probetas de PCU, debido a que el equipo de pruebas mecánicas llegó al límite de la carrera sin romper las muestras, por lo que sólo se determinó el esfuerzo máximo y último de las fibras de PCU con fibronectina, las cuales modificaron su resistencia a la ruptura. En la Gráfica 2 y Gráfica 3 podemos ver los valores de esfuerzo máximo ( $\sigma_{max}$ ) y esfuerzo último ( $\sigma_u$ ) de PCU con fibronectina (PCU FIB) que tuvo un valor de  $10.78 \pm 3.71$  MPa y  $4.06 \pm 1.89$  MPa respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Gráfica 2 Esfuerzo máximo de las membranas de PCU y PCU con 0.5% de fibronectina



Gráfica 3 Esfuerzo último de las membranas de PCU y PCU con 0.5% de fibronectina

### 4.7 Evaluación de biocompatibilidad.

Se utilizó la línea celular HEK 293 (células embrionarias de riñón humano) las cuales se multiplicaron por serie de pases celulares y se sembraron en cajas de cultivo de 100mm x 20 mm a una densidad de  $1 \times 10^5$  células en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, con antibiótico-antimicótico al 1 % y se dejó en incubación a 37°C a una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada hasta su confluencia. En la micrografía óptica (Figura 39) podemos observar el cultivo confluyente de células HEK293, obtenidas con un microscopio óptico invertido.

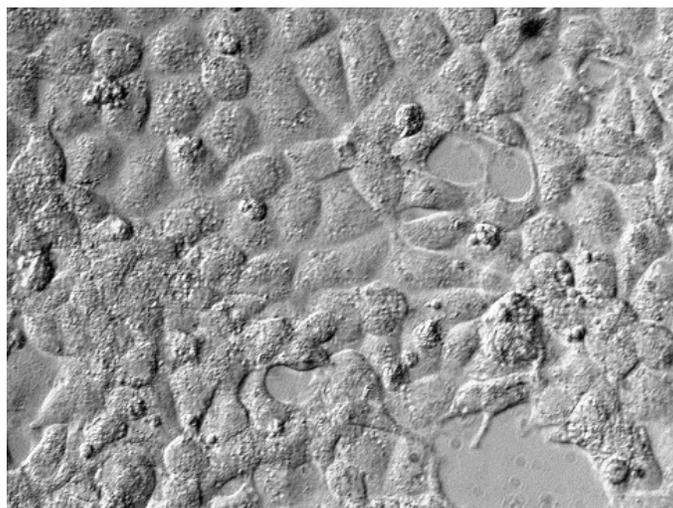


Figura 39 Cultivo confluyente de células HEK293

Los andamios fabricados de PCU y PCU a diferentes concentraciones de fibronectina (0.5%, 5% y 10%) fueron previamente hidratados en una solución salina con gelatina al 0.02% y se mantuvieron durante 24 hrs en incubación a 37°C con atmósfera controlada al 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada. Como se observa en la Figura 40, las células HEK 293 fueron sembradas sobre los andamios a una concentración de 100,000 células/ml en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, con antibiótico-antimicótico al 1 %. Los andamios se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada durante 14 días de evaluación, el medio fue reemplazado cada 48 hrs.

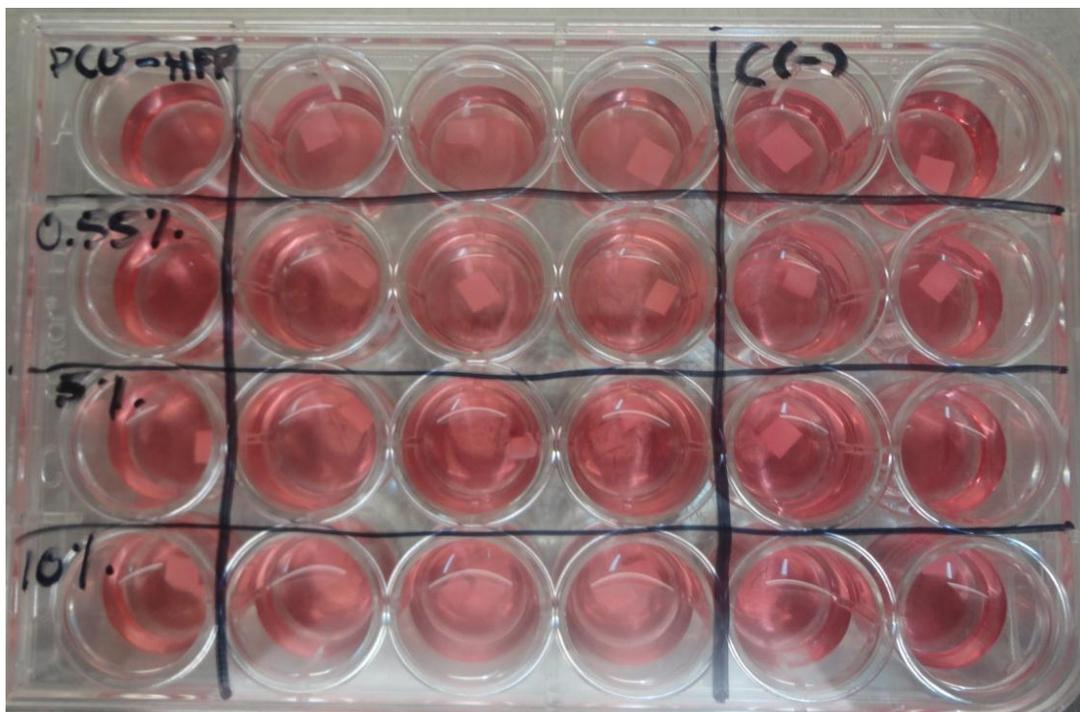


Figura 40 Siembra celular sobre los polímeros en caja de 24 pozos como se observa las dos últimas columnas corresponden a los controles negativos que son andamios sin células sometidos a las mismas condiciones de incubación

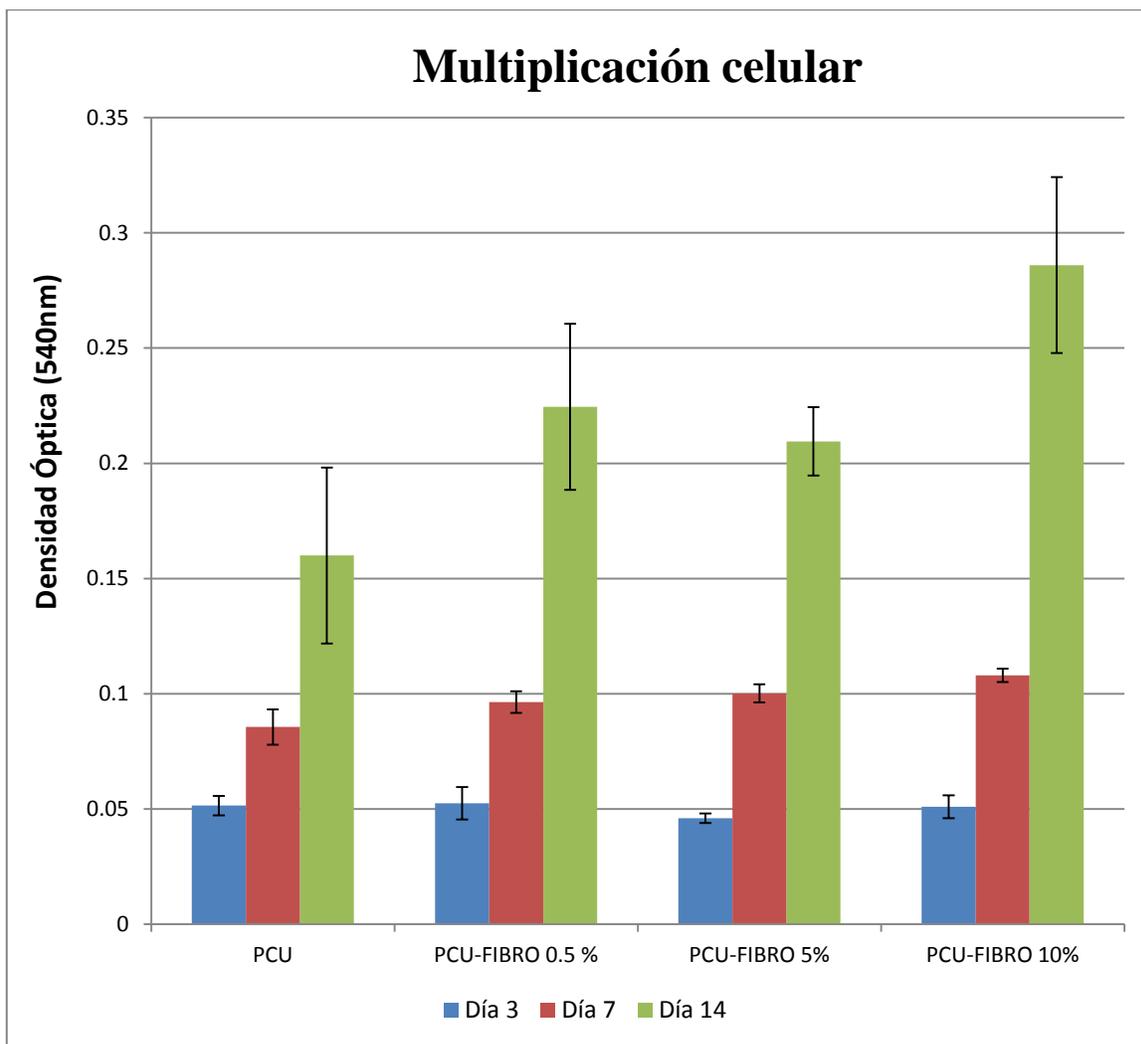
Los ensayos de multiplicación celular (MTT), se realizaron a los 3, 7 y 14 días de iniciar la siembra sobre los andamios. En la prueba de MTT se compararon los andamios de PCU y PCU a diferentes concentraciones de fibronectina (0.5%, 5% y 10%), la densidad óptica fue medida a una longitud de onda de 540 nm. con un lector de ELISA. En la Tabla 23 se observa una mayor densidad óptica a los 14 días en los andamios de PCU con 10% de fibronectina (0.286) en comparación con el andamio de PCU (0.16).

Tabla 23 Densidad óptica de pruebas in-vitro

	<b>PCU</b>	<b>PCU+0.5% de fibronectina</b>	<b>PCU+5% de fibronectina</b>	<b>PCU+10% de fibronectina</b>
3 día	0.0515	0.0525	0.046	0.051
7 día	0.0856	0.0964	0.1002	0.108
14 día	0.16	0.2245	0.2095	0.286

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Gráfica 4 podemos observar que a los 14 días de evaluación, los andamios de PCU con 10% de fibronectina presentan una mejor multiplicación celular en comparación con los otros andamios que tienen una menor concentración de fibronectina. También, al comparar el PCU con 10% de fibronectina con nuestro control de PCU, observamos que la multiplicación celular a los 14 días se incrementa al doble. Con esto se confirma que la incorporación de fibronectina a las fibras de PCU, favorece la adhesión de células HEK293 sobre la superficie del andamio.



Gráfica 4 Proliferación celular de células HEK293 sobre andamios de PCU.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

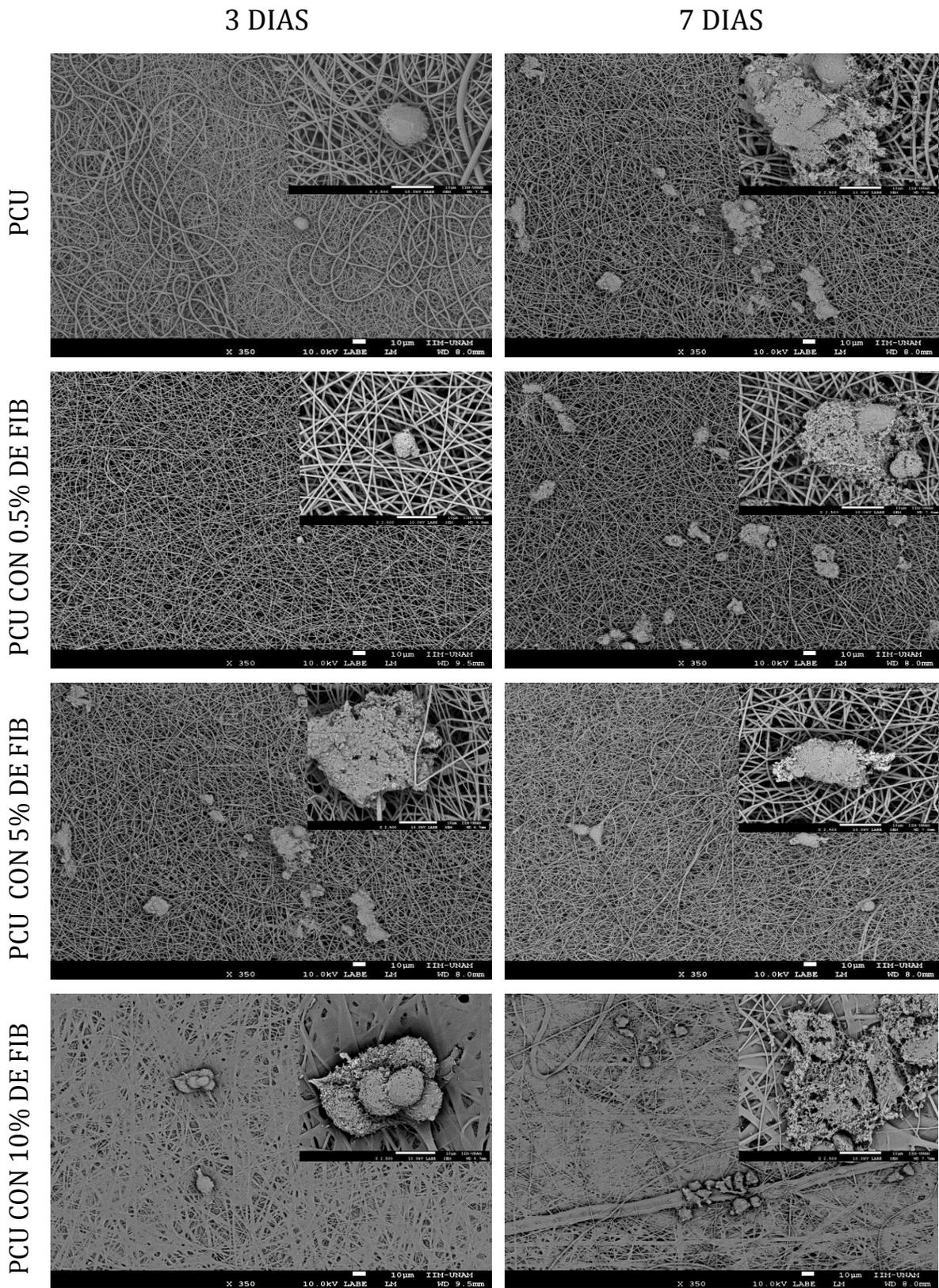


Figura 41 Micrografías de SEM (x350) y (x 10,000) de cúmulos de células a 3 y 7 días de multiplicación celular sobre andamios de PCU y PCU con fibronectina a diferentes concentraciones de fibronectina

Como se observa en las micrografías de SEM de la Figura 41, es posible identificar los cúmulos de células sobre los diferentes andamios a los 3 y 7 días de multiplicación celular, que se hacen evidentes tanto en los andamios de PCU y PCU a las diferentes concentraciones de fibronectina (0.5%, 5% y 10%), lo que confirma que andamios fabricados en este trabajo son viables para la multiplicación de células HEK 293. Sin embargo, el uso de la fibronectina en los andamios incrementa la multiplicación de células (HEK 293), que se confirma con la prueba de MTT que reporta una densidad óptica de 0.286 en el andamio de PCU con 10% de fibronectina, en comparación con el andamio de PCU que reportó un valor de 0.16 a los 14 días de multiplicación celular en ambos casos.

# CAPÍTULO V

## CONCLUSIONES

- Se obtuvieron fibras de policarbonato uretano a partir de mezcla de los disolventes dimetilformamida/tetrahidrofurano y a partir de 1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol, mediante la técnica de electrohilado. La variación en los parámetros del proceso de electrohilado como la concentración, el voltaje, la velocidad de inyección, el calibre de la aguja y la temperatura son factores que influyen sobre la morfología y el diámetro de las fibras.
- La modificación de la presión de vapor de la DMF mediante la incorporación de THF mejora la morfología de las fibras y disminuye el diámetro. Con esta mezcla de disolvente se obtuvieron fibras con diámetro de  $0.17 \pm 0.022 \mu\text{m}$ , menor al reportado por Feng ( $0.72 \pm 0.17 \mu\text{m}$ ).
- Se electrohiló el PCU y el PCU con la fibronectina de plasma humano en mezcla física, ambos se disolvieron con 1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol. Con esto se obtuvieron andamios de PCU y PCU con fibronectina a tres diferentes concentraciones (0.5%, 5% y 10%), para su posible aplicación como andamio celular en la regeneración de arterias delgadas.
- Se construyeron andamios tubulares porosos de PCU y PCU con 0.5% de fibronectina con diámetro interno de 1.76 mm mediante la técnica de electrohilado de PCU y PCU con 0.5% de fibronectina. Los tubos están formados por capas de fibras que pretenden simular las paredes de revestimiento de los vasos sanguíneos.
- Se determinó la estructura química de los segmentos (duro/suave) del policarbonato uretano así como la estructura morfológica de dos fases.
- La presencia de fibronectina en los andamios de PCU se confirmó mediante la identificación de las sales presentes al reconstituir la fibronectina, así como por la presencia del puente  $\text{SO}_4^-$  de la fibronectina y por los cambios en la hidrofobicidad del material.

## CONCLUSIONES

---

- Se mejoró la afinidad celular del andamio mediante la integración de fibronectina de plasma humano en las fibras de PCU. Las pruebas de biocompatibilidad mostraron un incremento en la multiplicación celular en andamios de PCU con 10% de fibronectina, en comparación con el PCU sin fibronectina.

# Bibliografía

- Amal Owida, R. C. (2011). Artery vessel fabrication using the combined fused deposition modeling and electrospinning techniques. *Rapid Prototyping Journal*, 37-44.
- Anatoli T. Gudkov, N. N. (1978). Studies on the Structure of Protein L7/L12 from Escherichia coli Ribosomes. *Eur. J. Biochem*, 313-318.
- Arjun G.N., R. P. (2011). Structural characterization, mechanical properties and in vitro cytocompatibility evaluation of fibrous polycarbonate membranes for biomedical applications. *Society for biomaterials*, 11-18.
- Ashoton J., M. J. (2011). Polymeric endoaortic paving: Mechanical, thermoforming and degradation properties of polycaprolactone/polyurethane blends for cardiovascular applications. *Acta biomaterialia*, 287-294.
- Billmeyer, F. W. (2004). Textbook of polymer science. España: Reverte.
- Bin Liu, F. X.-Y.-F. (2012). Electrospun PLLA fibers coated with chitosan/heparin for scaffold of vascular tissue engineering. *Surface and coatings technology*.
- Bin Liu, F. X.-Y.-F. (2012). Electrospun PLLA fibers coated with chitosan/heparin for scaffold of vasculartissue engineering. *Surface & Coatings Technology*.
- Bonart R. J. (1968). X-ray investigations concerning the physical structure of cross-linking in segmented urethane elastomen. *J. Macromol Sci Phys*, 5-138.
- Bouten C.V.C., D. P.-M. (2011). Substrates for cardiovascular tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 221-241.
- Bozzola J.J., R. L. (1999). *Electron microscopy: Principles and techniques for biologist*. Jones & Barlett Learning.
- Bryan W. Tillman, S. K. (2009). The in vivo stability of electrospun polycarbonate-collagen scaffolds in vascular reconstruction . *Biomaterials* , 583-588.
- Cecilia F.L. Chu, A. L. (1999). Enhanced growth of animal and human endothelial cells on biodegradable polymers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 479-485.
- Chen Huang, X. G.-D.-N. (2012). Preparation of composite tubular grafts for vascular repair via electrospinning. *Progress in Natural Science: Materials International*, 108-114.

- Chen Wang, L. C. (2010). A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polycyclic acid mesh and smooth muscle cell differentiated from adipose derived stem cells. *Biomaterials*, 621-630.
- Christenson, E., Anderson, J. M., & Hiltner, A. (2004). Oxidative mechanisms of poly(carbonate urethane) and poly(ether urethane) biodegradation: in vivo and in vitro correlation. *Wiley InterScience*, 245-255.
- Christenson E., D. M. (2003). Poly(carbonate urethane) and poly(ether urethane): in vivo studies. *Wiley InterScience*, 407-416.
- Christenson E., A. J. (2004). Oxidative mechanisms of poly(carbonate urethane) and poly(ether urethane) biodegradation: in vivo and in vitro correlations. *Wiley Periodicals*.
- D' Souza S., G. M. (1998). Localization of Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science*, 91-93.
- D'Souza S., G. M. (1991). Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci*, 246-250.
- David Craig, A. K. (2000). Comparison of the early stages of forced unfolding for fibronectin type III modules. *Biophysics*, 5590-5595.
- Demir M., I. Y. (2002). Electrospinning of polyurethane. *Polymer*, 3303-3309.
- Demir M.M., Y. I. (2002). Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer*, 3303-3309.
- Demiri E., I. S. (1999). Experimental use of prosthetic grafts in microvascular surgery. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 102-106.
- E. Genove, C. S. (2005). The effect of functionalized self-assembling peptide scaffolds on human aortic endothelial cell function. *Biomaterials*, 3341-3351.
- Earnest, C. (1998). *Compositional analysis by thermogravimetry*. International Baltimore.
- Elizabeth M. Christenson, M. D. (2003). Poly(carbonate urethane) and poly(ether urethane) biodegradation: in vivo studies. *Wiley InterScience*.
- Franco Edgar, D. S. (2008). Caracterización del haz proyectado en el proceso de electrohilado del PVA. *Congreso Iberoamericano de Metalurgia y materiales IBEROMET*.
- Gololewski S. (1991). In vitro and in vivo molecular stability of medical polyurethane: A review. *Trends Polym Sci*, 47-61.
- Guo-Qiang Chen, Q. W. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering material. *Biomaterials*, 6565-6578.

- Hadi Hajiali, S. S.-J. (2011). Electrospun PGA/gelatin nanofibrous scaffolds and their potential application in vascular tissue engineering . *International Journal of nanomedicine*, 2133-2141.
- Hajiali Hadi, S. S.-J. (2011). Electrospun PGA/gelatin nanofibrous scaffold and their potential application in ascular tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 2133-2141.
- Harris JR, S. H. (2002). Evaluation of polytetrafluroethylene micrografts in microvascular surgery . *Journal Otolaryngol*, 89-92.
- Hatakeyama T., Q. F. (1999). *Thermal Analysis Fundamentals and Applications to Polymer Science*. John Wiley and Sons.
- Hatzfeld. (2005). The family of cell adhesion molecular. *Eur J Cell*, 84: 205-214.
- Hernandez Rebeca, J. W. (2008). In vitro oxidation of high polydimethylsiloxane content biomedical polyurethane: correlation with the microestructure. *Wiley InterScience*.
- Hersel U., D. C. (2003). RGD modified polymers biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 4385-4415.
- Heyun Wang, Y. F. (2011). Hemocompatible polyurethane/gelatin-heparin nanofibrous sacffolds formed by bi.layer electrospinning techniques as potential articial blood vessels. *Front. Chem. Sci. Eng.*, 392-400.
- Heyun Wang, y. F. (2012). Elestrospun hemocompatible PU/gelatin-heparin nanofibrous bilayer sacffolds as potential artificial blood vessels. *macromolecular research*, 347-350.
- Jin-Jia Hu, W.-C. C.-Y.-H. (2013). Construction and characterization of an electrospun tubular scaffold for small-diameter tissue-engineered vascular grafts: A scaffold membrane approach. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*.
- Jintang Guo, M. Z. (2007). Study on structure and performance of polycarbonate urethane synthesized via different copolymerization methods. *J Mater Sci*, 5508-5515.
- Kannan Ruben Y., S. H. (2004). Current status of prostheticbypass grafts: a review. *Wiley InterScience*, 570-584.
- Katime I.A. (1994). *Quimica. Física molecular*. Bilbo.
- Langer, R. ( 2000). Tissue Enginneering: Review. *Molecular Therapy*, 12-15.
- Lee Sang Jin, L. J. (2008). Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions. *Biomaterials*, 2891–2898.

- Lian Xue, H. P. (2003). Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *Journal of Vascular surgery*, 472-480.
- Luo C. J., S. D. (2012). Electrospinning versus fibre production methods. *Chem Soc. Rev*, 4708-4735.
- M., H. (2005). The p120 family of cell adhesion molecules. *EUR J Cell*, 84:205-14.
- M.E Davis, P. H. (2005). Custom design of the cardiac microenvironment with biomaterials. *Circ Res*, 8-15.
- M.Stekelenburg, M. R. (s.f.). Structural optimization of tissue engineered blood vessels. *Technische universiteit eindhoven*.
- Makogonenko E., T. G. (2002). Interaction of fibrinogen with fibronectin: Further characterization and localization of the fibronectin binding site. *Biochem*, 7907-7913.
- Manfred Hesse, H. M. (2000). *Métodos espectroscópicos en química orgánica*.
- Mohammad Chowdhury, G. S. (2010). Effect of experimental parameters on the morphology of electrospun nylon 6 fibers. *International Journal of Basic and applied Science*, 70-78.
- Mosher Df. (1984). Physiology of fibronectin. *Ann Rev Med*, 561-575.
- Murayama, T. (1978). Dynamic Mechanical Analysis of Polymeric Material. *Elsevier*.
- Naito Yuji, T. S. (2011). Vascular tissue engineering: Towards the next generation vascular grafts. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 312-323.
- Niesel L.E., L. R. (1994). *Mechanical properties of polymers and composite*. New York: Inc. New York.
- Paar, A. (2006). *A Practical Guide to SAXS*. Austria.
- Pasto Daniel J, C. R. (1981). *Determinación de estructuras orgánicas*. Reverte.
- Ping Xianga, M. ,.-y.-l.-h. (2008). Cytocompatibility of electrospun nanofiber tubular scaffolds for small diameter. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Robin Ng., R. Z.-T. (2012). Three dimensional fibrous scaffold with microstructure and textures for tissue engineering: review. *RSC Advances*, 10110-10124.
- Robin Ng., Z. Z. (2012). Three dimensional fibrous scaffold with microstructures and nanotextures for tissue engineering: review. *RSC Advances*, 10110-10124.
- Roger Wesley Bass. (2011). *Synthesis and characterization of self healing poly(carbonate urethane) carbon-nanotube composite*.

- Ruben Y. Kannan, H. J. (2005). The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials*, 1857-1875.
- Rubinson, K. (2001). *Análisis instrumental*. Pearson Education.
- Ruoshanti E., P. M. (1987). New perspectives in cell-adhesion RGD and integrins. *Science*, 491-497.
- Sang Jin Lee, S. H. (2008). The use of thermal treatments to enhance the mechanical properties of electrospun poly(e-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials*, 1422-1430.
- Sara Lucena, C. L. (2007). Fibronectina. Estructura y funciones asociadas a la hemostasia . Revision . *Invest Clin* , 249-262.
- Schwartz S., R. R. (1984). Cellular proliferation in atherosclerosis and hypertension. *Prog. Cardiovasc. Dis*, 355-372.
- Sebastien Francois, N. C. (2009). A poly(L-Lactic acid) nanofibre mesh scaffold for endothelial cells on vascular prosthesis. *Acta biomaterialia*, 2418-1428.
- Shackelford James F. (1995). *Ciencia de materiales para ingenieros* . México : Prentice Hall Hispanoamericana.
- Shan-hui Hsu, Y.-C. K.-C. (2004). Enhanced biocompatibility in biostable poly(carbonate urethane). *Macromolecule Bioscience*, 464-470.
- Shounfeng Yang, L. Z. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. *Tissue Engineering*, 679-689.
- Skoog D.A, H. J. (2001). *Principios de análisis instrumental* . Mexico : Mc Graw Hill.
- Szalest-Lewandowska A., M. B. (2007). Modified polycarbonate urethane: synthesis, properties and biological investigation in vitro. *Wiley InterScience*, 509-520.
- Tang Y., S. J. (1999). Biodegradation of polycarbonate containing polyurethane: Effect of surface and bulk structure. *25° Annual Meeting of Society for Biomaterials*, 58.
- Tanzi Ma. Cristina, D. M. (1996). Chemical stability of polyether urethanes versus polycarbonate urethane. *Chemical Stability of polyurethanes*, 550-559.
- Thandavamoorthy Subbiah, G. B. (2004). Electrospinning of nanofibers. *Wiley interscience*, 557-569.
- Thi\_hiep Nguyen, A. R. (2013). A hybrid PU/PCL scaffold satisfied the requirements of blood vessel prosthesis in terms of mechanical properties, pore size and biocompatibility. *Journal of biomaterials science polymer*, 1-15.

- Ting ting Daia, Z. h. (2010). Reconstruction of lymph vessel by lymphatic endothelial cells combined with polyglycolic acid scaffolds: A pilot study. *Journal of Biotechnology*, 82–189.
- Turi, E. (1997). Thermal Characterization of Polymeric Materials. En *Academic Press* (pág. 980). Brooklyn, New York.
- Vera-Graziano R, Maciel-Cerda A, Moreno-Rondon EV, Ospina A, Gomez-Pachon EY (2012). Modified polylactide microfiber scaffolds for tissue engineering, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* Vol. 1373, 2012, IMRC 11.1376-s11-09
- Wade, L. (2006). *Organic Chemistry*. Pearson Education.
- Walkenhorst R. (2001). Determination of polymer structure by gel permeation chromatography. *L.C G.C Europe*.
- Wallace D.G., D. J. (1981). *Arch. Biochem Biophys*, 515-524.
- Walter E. Niedzwiadek ., G. T. (1988). A Calorimetric Analysis of Human Plasma Fibronectin : Effects of heparin binding on domain structure. *Biochemistry* , 7116-7124.
- Wan Jun Liu, H. F. (2013). Study on needle and needless electrospinning for nanofibers. *Advance Material Research*, 276-279.
- Wang H. Y., F. Y. (2012). Co-electrospun blends of PU and PEG as potencial biocompatible scaffolds for small-diameter vascular tissue engineering. *Materials Science and Engineering*.
- Xianfeng Wang, B. D. (2013). Electro-spinning/netting: A strategy for the fabrication of tree dimensional polymers nano-fiber/nets. *Progress in Materials Science*, 1173-1243.
- Xiaohua Liu, J. M. (2012). Functionalized synthetic biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering: review. *Macromolecular Bioscience*, 911-919.
- Xiaqin Zhang, K. S. (2011). Structure variation of tensile-deformed amorphous poly(L-lactic acid):Effects of deformation rate and strain. *Polymer*, 4141-4149.
- Y. W.Tang, R. J. (2001). Enzyme-induced biodegradation of polycarbonate urethane:Depence on hard-segment concentration. *Inter Science Wiley*, 516-528.
- Yakai Feng, F. M. (2011). Electrospinning of poly carbonate urethane biomaterials. *Front. Chem. Sci. Eng*, 11-18.
- Yamada K M. (1989 ). Fibronectin domains and receptors . *California: Academic Press* , 47-121.
- Yosihiko, T. (2008). Biomaterial Technology for tissue engineering applications . *Journal of Royal Society Interface*, 1-15.

- Young Min Ju, J. S. (2010). Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels. *Biomaterials*, 4313–432.
- Yuji Naito, T. (2011). Vascular Tissue engineering: Towards the next generation vascular grafts. *Advance Drug Delivery Review*, 312-323.
- Zhu Yabin, M. F.-P. (2007). Esophageal epithelium regeneration on fibronectin grafted poly(L-lactide-co-caprolactone) (PLLC) nanofiber scaffold. *Biomaterials*, 861-868.
- Zhu Yabin., K. S.-P. (2006). Protein bonding on biodegradable poly(L-lactide-co-policabrolactine) membranes for esophageal tissue engineering. *Biomaterials*, 68-78.
- Zuwei Ma, M. K. (2005). Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering. *Biomaterials*, 2527-2536.
- Zuwei Maa, b. M. (2005). Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering. *Biomaterials*, 2527–2536.

# ANEXO 1

## Técnicas analíticas

### 1. Técnicas y métodos de caracterización

#### 1.1 Espectroscopia por infrarrojo (FT-IR)

La espectroscopia infrarroja (FT-IR) es una técnica cuantitativa, que permite obtener información acerca de los procesos de absorción y emisión de las moléculas que se encuentran en la materia. (Wade, 2006) Esta espectroscopía se fundamenta en la absorción de la radiación infrarroja por las moléculas en vibración, una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja, cuando dicha luz incidente sea igual a la necesaria, para que se dé una transición vibracional de la molécula. La molécula comenzará a vibrar de una manera determinada debido a la energía que se le suministra mediante la luz infrarroja. (Skoog D.A, 2001) (Rubinson, 2001)

En la Figura 42 hay dos tipos de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje de enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces.

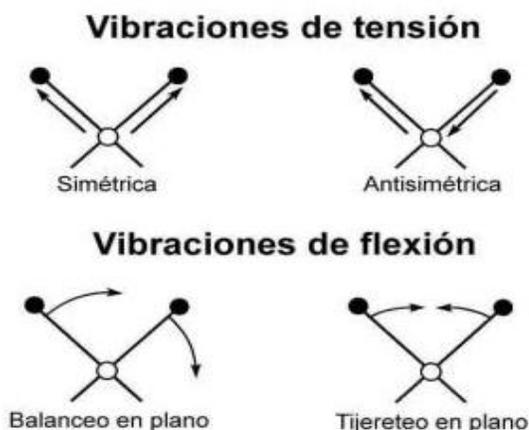


Figura 42 Tipos de vibraciones

## 1.2 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Esta técnica espectroscópica fue utilizada para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o ambos). Esta situación se observa en los isótopos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  entre otros, este tipo de núcleos son magnéticamente activos es decir que poseen un spin con movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. (Pasto Daniel J, 1981)

En la Figura 43 se observa que en ausencia de campo magnético, los spines se orientan al azar. Sin embargo, cuando se coloca una muestra en un campo magnético y el núcleo de un átomo es excitado desde su estado basal al siguiente estado de energía, a través de un pulso de radiofrecuencias. Los núcleos con spin positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un mismo estado de mínima energía denominado spin  $\alpha$  mientras que los núcleos con spin negativo se orientan en la dirección opuesta al campo magnético, en un estado de mayor energía denominado spin  $\beta$ .

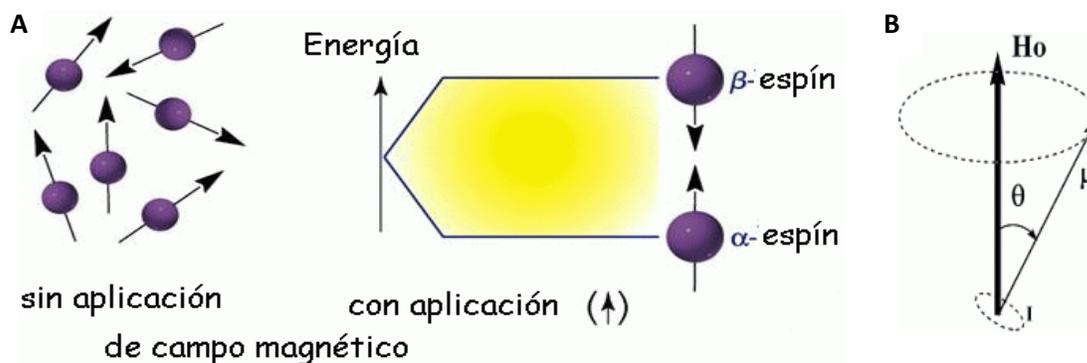


Figura 43 a) Spines en ausencia de campo magnético estos se orientan al azar, cuando se coloca un campo magnético la muestra se orienta en dirección del campo. b) Forma del giro de los momentos magnéticos.

En realidad no es que los momentos magnéticos queden alineados con el campo magnéticos si no que giran como si fueran trompos en dirección al campo u opuesta a él. A una velocidad que depende de la naturaleza y fuerza del campo que puede ser cuantificado con la ecuación de Larmor.

El pulso es generado por un transmisor de radiofrecuencias, donde la señal es recogida por un detector y sometida a un análisis de transformada de Fourier para

recuperar la información de cada frecuencia del pulso y reconstruir el espectro. Los núcleos de sustancias orgánicas más usuales en RMN son los de protones ( $^1\text{H}$ ) y carbono ( $^{13}\text{C}$ ). Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN consiste en un registro de las señales de resonancia de los diferentes tipos de hidrógeno presentes en la muestra en forma de picos cuya posición, ancho y área proporcional al número de protones presentes en la muestra permiten su caracterización. La posición está asociada a los diferentes grupos vecinos de los protones y se expresa como desplazamiento químico en ppm respecto a la señal de referencia. (Manfred Hesse, 2000)

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

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica en la que se monitorea una propiedad física de una sustancia y/o de sus productos de reacción en función de la variación de la temperatura y una atmósfera controlada. Se muestrea en un analizador termogravimétrico y el resultado gráfico se denomina curva de análisis térmico. El análisis termogravimétrico es una técnica analítica en la que se monitorea el peso de una sustancia en función de la temperatura o del tiempo. Existen tres tipos básicos de análisis:

- La TGA dinámico: La muestra se calienta en una atmósfera controlada con una rampa de calentamiento.
- TGA isotérmico: La muestra se mantiene en una temperatura constante y se registran los cambios de peso.

Estas variaciones de temperatura no siempre implican una pérdida en la masa de la muestra, existen cambios térmicos que se acompañan de un cambio de masa, como la descomposición, la sublimación, la reducción, la desorción, la absorción y la vaporización. Algunos materiales pueden aumentar de masa al reaccionar con la atmósfera en el entorno de ensayo. (Hatakeyama T., 1999)

Los resultados pueden mostrar cambios como fusión, solidificación y cristalización. La principal utilización del TGA es la detección de la temperatura inicial de los procesos térmicos y su caracterización cuantitativa. La técnica consiste en colocar la muestra

en un platillo o crisol también conocido como porta-muestras donde se coloca la muestra, próximo a un sensor que detecta la temperatura y sus variaciones durante el experimento. El equipo consta de un termo-balanza que permite medir de forma continua el peso de la muestra en función de la temperatura o tiempo, el porta-muestras es colocado en un horno que se calienta o enfría durante el experimento. El trazo de la primera derivada con respecto al tiempo o la temperatura corresponde a una técnica conocida como termogravimetría derivada (DTG). (Earnest, 1998)

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

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

Cuando en la muestra se produce una transición térmica es decir un cambio físico o químico que da lugar a una liberación o absorción de calor, en este caso se adiciona energía térmica ya sea a la muestra a la referencia, con el objeto de mantener ambas a la misma temperatura a esto se le conoce principio del “balance nulo” de temperatura. En este caso debido a que la energía térmica es exactamente equivalente en magnitud a la energía absorbida o liberada en la transición, el balance de energía es proporcional a una medición calorimétrica directa de la energía de transición. (Hatakeyama T., 1999)

En los materiales poliméricos, las transiciones térmicas más importantes son la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y la temperatura de fusión ( $T_f$ ). En los polímeros amorfos la  $T_g$  aparece como un cambio abrupto de la línea base mientras que, en polímeros cristalinos, la  $T_g$  es difícil de observar debido a la baja proporción de material amorfo en el polímero. Los procesos de fusión y cristalización nos dan información cualitativa sobre la temperatura del pico de fusión y cuantitativa sobre la cristalinidad del polímero (área del pico). Como se observa en la Figura 44

dependiendo del tipo de transformación los picos se manifestaran de tipo endotérmico o exotérmico.

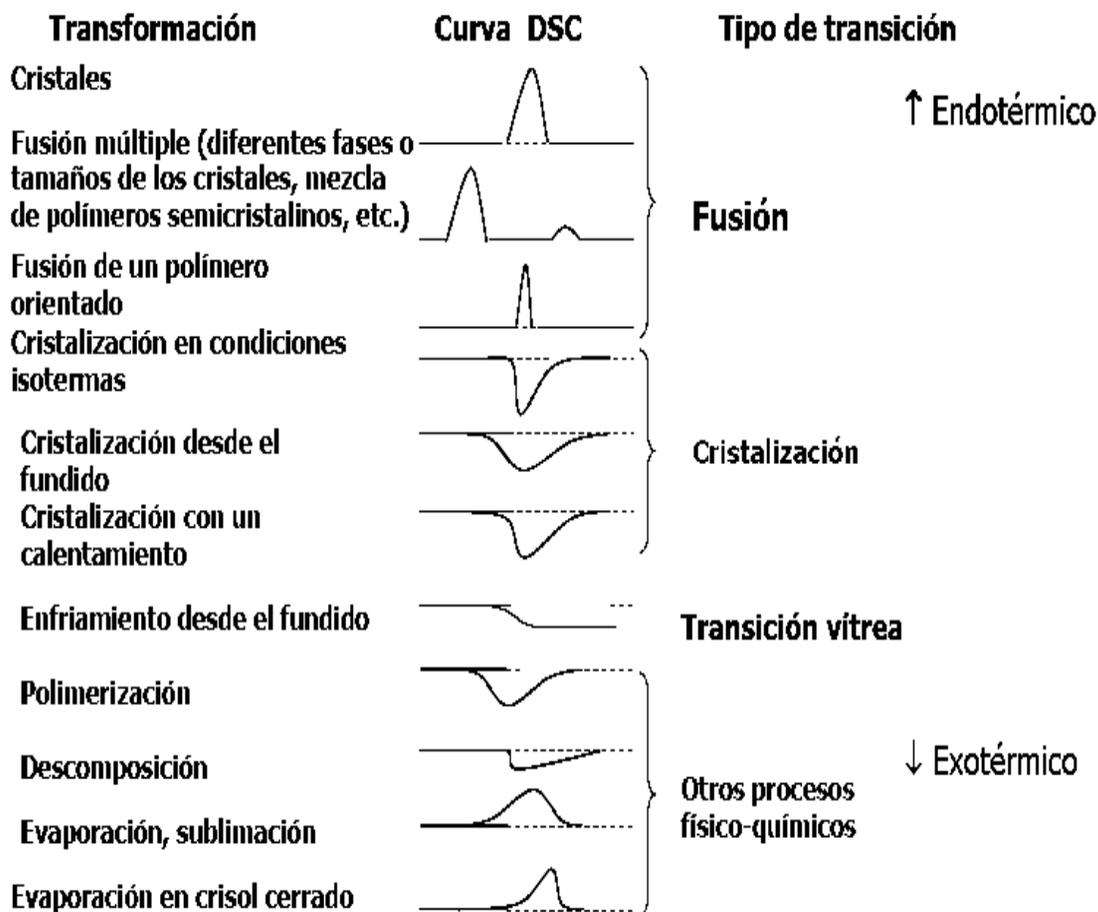


Figura 44 Curvas de DSC y tipos de transiciones.

## 1.5 Cromatografía por permeación en gel (GPC)

La cromatografía de permeación en gel (GPC) es un método empleado en la determinación de pesos moleculares de los polímeros. Comparado con otras técnicas como la osmometría y la dispersión de luz, la técnica de GPC tiene la ventaja de no solo determinar los valores promedios si no la distribución completa de los pesos moleculares. (Katime I.A, 1994)

El método consiste en hacer pasar una muestra líquida donde este contenido el polímero de interés, a través de una columna empacada por una matriz polimérica con diversos tamaños de poro. Los materiales de relleno de la columna son principalmente poliestireno poroso ya sea hinchado o entrecruzado y vidrio poroso de esta manera las moléculas pequeñas penetran en los pequeños conductos del empaque, donde la velocidad de flujo del solvente es menor. Las moléculas grandes que no pueden penetrar en los pequeños conductos del empaque se mueven entre ellas a una velocidad superior. Como consecuencia, las moléculas de mayor peso molecular salen más rápido que las moléculas de menor peso molecular. Las moléculas son separadas de acuerdo a su volumen hidrodinámico, su peso molecular (PM) y distribución de pesos moleculares puede ser determinado a partir del volumen de retención (VR), mediante una curva de calibración ( $\log PM$  vs VR), el cual debe ser fijado mediante un número de estándares de peso molecular conocido. (Walkenhorst R., 2001)

Las partes más importantes de un cromatógrafo son la columna y el detector que puede ser de índice de refracción (IR) o ultravioleta (UV).

## 1.6 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto se define como el ángulo formado por una gota sobre la superficie sólida, el valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación existente entre las fuerzas adhesivas del líquido y del sólido y las fuerzas cohesivas del propio líquido. Cuando una fase líquida y una fase sólida entren en contacto forman una interfase común. La mojabilidad de un sólido por un líquido viene determinado por el ángulo de contacto  $\theta$  en equilibrio en una superficie horizontal en una atmósfera de gas.

Como se observa en el a Figura 45 por convenio cuando  $\theta < 90^\circ$  se dice que el líquido moja al sólido, el sistema no moja cuando  $\theta > 90^\circ$  el líquido no moja al sólido y en un caso extremo cuando  $\theta$  se aproxima a cero, entonces el líquido se expande sobre el líquido y se dice que hay un mojado perfecto. (Martinelli et al)

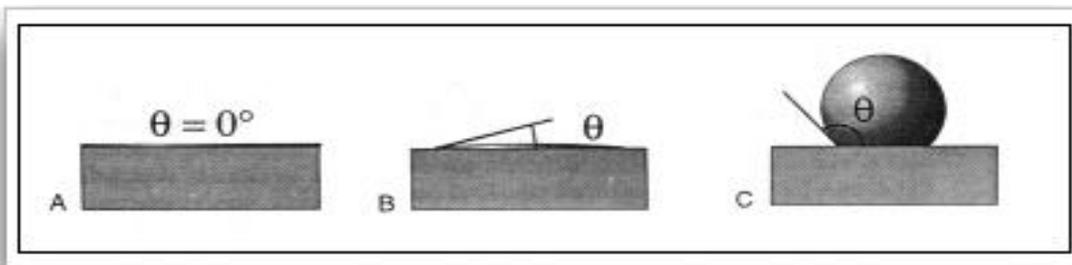


Figura 45 Grados de mojabilidad de un sólido por un líquido A) Mojado perfecto. B) Líquido moja al sólido. C) El sistema no moja

### 1.7 Dispersión de rayos X de ángulo bajo (SAXS).

La dispersión de rayos X de ángulo bajo es un método no destructivo que evalúa el patrón de dispersión de rayos X de las nanopartículas para obtener información sobre la estructura del tamaño promedio y forma. Es un método exacto, no destructivo que usualmente requiere un mínimo de preparación de las muestras y se analizan según los requerimientos del sistema. En la Figura 46 se pueden ver los componentes básicos del SAXS como son: la fuente de rayos X, el sistema de colimadores, la muestra, el detector y el obturador.

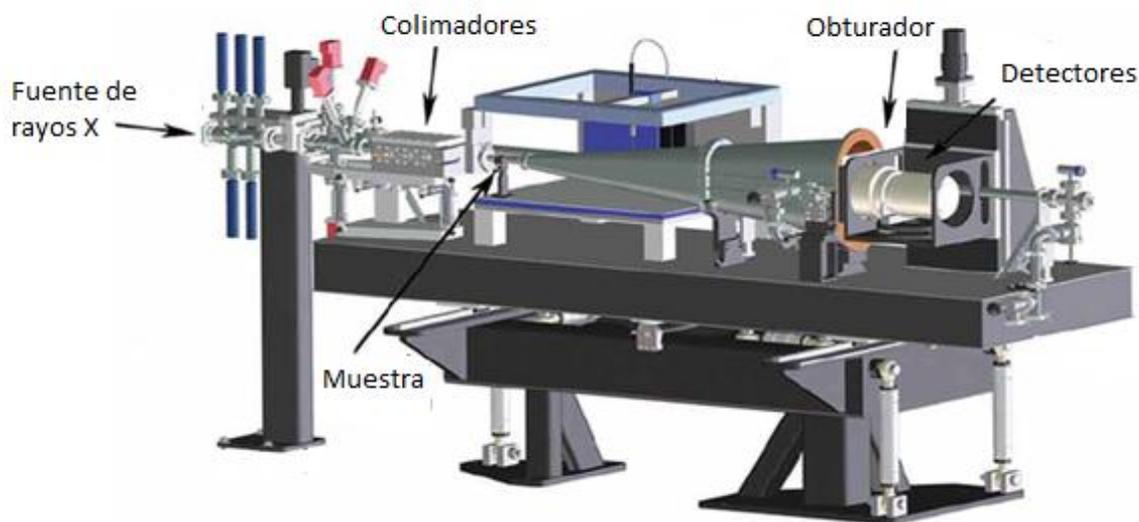


Figura 46 Componentes básicos del SAXS

El método consiste en una fuente de rayos X o un ánodo giratorio que irradia la muestra posteriormente el haz pasa por un sistema de colimadores constituido por un por un sistema de rendijas o agujeros donde el haz pasa a través de ellas y en el orden que lo van haciendo el haz se estrecha, el punto de colimación es de aproximadamente  $0.3 \times 0.3 \text{ mm}^2$ . La dispersión generada es un centro simétrico, distribuido con patrones de detección planos que consisten en círculos concéntricos alrededor de un haz primario, la dispersión generada llega hasta un obturador de haz central, su función es prevenir que toda la intensidad del haz choque con el detector. Existen dos tipos de obturadores un tipo consiste en materiales bloques de plomo o tungsteno y otro tipo de obturador es de un material transparente que atenúa el haz y por lo tanto la intensidad del haz hacia el detector. Existen tres tipos de detectores usados en SAXS:

- El detector de alambre: Donde el fotón de los rayos X que entra en la atmósfera, expulsa al electrón de la molécula de gas. El electrón es acelerado hacia el alambre por la aplicación de un alto voltaje que golpea al electrón al alambre y a su vez un pulso eléctrico es introducido dentro del alambre.
- Cámaras CCD: Este tipo de detector capta los fotones de los rayos X y cuenta los electrones secundarios que se producen dentro de un material semiconductor.
- Placa de imagen: Donde los electrones son atraídos por iluminación con un fotomultiplicador.

La preparación de la muestras puede varias según el tipo de material para líquidos se requieren  $50 \mu\text{L}$  y para sólidos muestras de  $1 \times 1 \text{ mm}^2$ . (Paar, 2006)

## 1.8 Difracción de rayos X (DRX)

La técnica de difracción de rayos X se basa en la dispersión coherente del haz de rayos X por parte de la materia y en la interferencia constructiva de las ondas que están en fase y que se dispersan en determinada dirección del espacio (Figura 47).

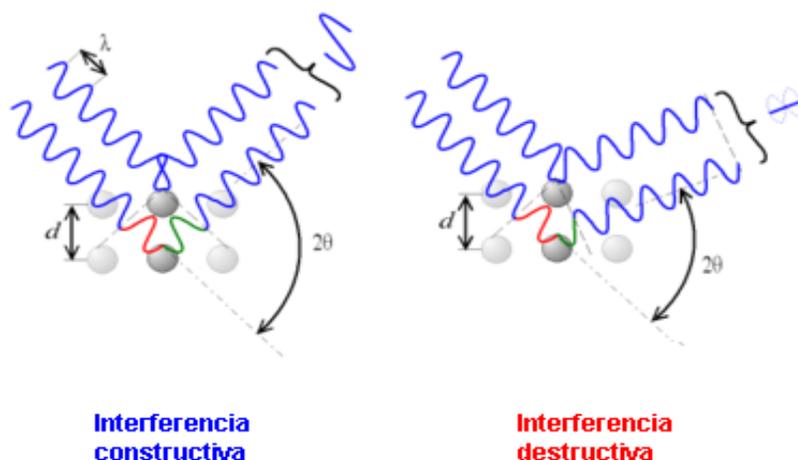


Figura 47 Dispersión coherente del haz de rayos X e interferencia constructiva

El difractómetro de rayos X se compone básicamente de lo siguiente ver Figura 45:

- Un tubo de rayos X, compuesto por la fuente de electrones acelerados (filamento) y una fuente de rayos X (anticátodo de Cu, Co, Fe).
- Colimador.
- Un goniómetro, automatizado con un porta-muestras.
- Monocromador.
- Detector (contador de centelleo).

Como se observa en la Figura 48 los rayos producidos pasan a través de una ranura que orienta el haz, haciéndolo incidir sobre la muestra (colimador), se produce la difracción del haz de rayos X al incidir en un plano de la red cristalina del material irradiado. Los rayos X difractados son filtrados por un cristal (monocromador), el cual absorbe todas las radiaciones que van en distinta longitud de onda. Las radiaciones ya filtradas, son detectadas por el contador electrónico, cuya función es ampliar las radiaciones que sobre él inciden y estas son registradas en una computadora obteniendo un difractograma.

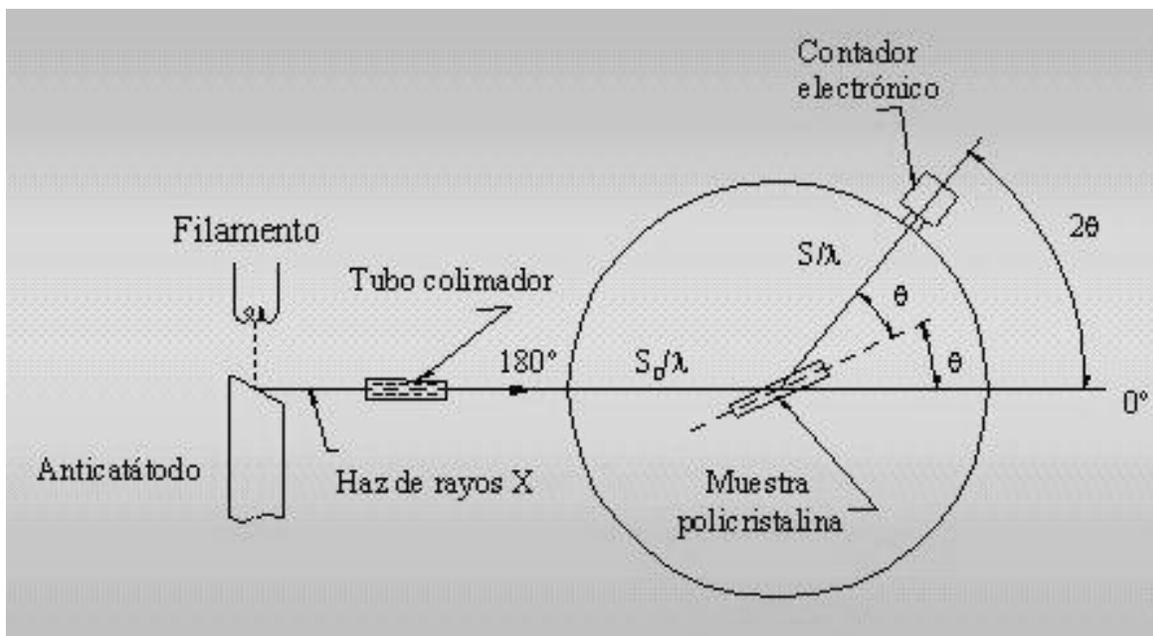


Figura 48 Componentes básicos del difractograma de rayos X.

La interpretación de un difractograma se basa en la disposición de las líneas y de sus intensidades, la cual consiste en una serie de picos, la cual representa cada uno de ellos la distancia interplanar de un cristal, la altura del pico depende de la intensidad de las reflexiones en un determinado ángulo. Como se observa en el difractograma (Figura 49) la interpretación se realiza con la identificación del:

- Fondo del difractograma: es la altura de la base del difractograma que va condicionado por el tipo de material ya sea amorfo o material amorfo con cristales.
- La separación de los picos: Se determinan los valores en grados  $2\theta$ , donde estos valores se traducen a valores de "d" mediante la ecuación de Bragg-Wulf.
- Intensidad del pico: al pico de mayor altura se le asigna un valor de intensidad de 100, dando a los restantes picos una intensidad relativa según su altura con respecto a la del pico de máxima altura.

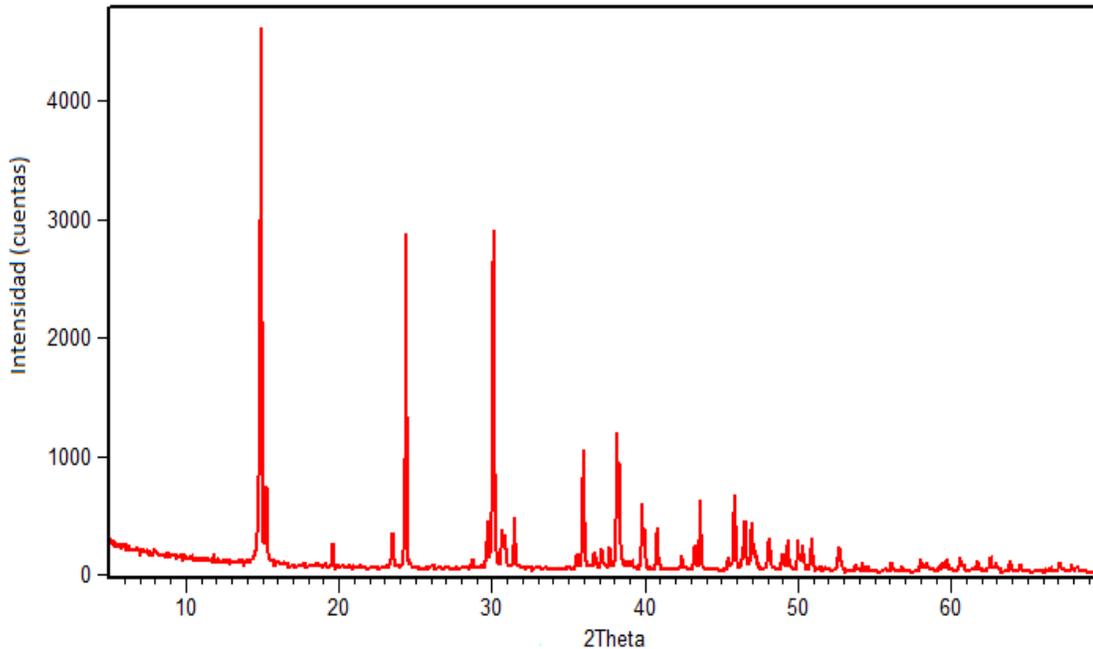


Figura 49 Difractograma de oxalato calcico monohidrato

Las muestras pueden ser molidas para obtener un polvo fino y homogéneo, lo que garantiza la orientación de los cristales en todas las direcciones posibles o películas delgadas

## 1.9 Caracterización mecánica

El estudio de las propiedades mecánicas se refiere a la respuesta de un cuerpo, cuando se somete a una fuerza externa, la cual genera relaciones de tipo tensorial con la deformación que sufre el material. De los diferentes ensayos existentes el más empleado es el ensayo de tensión en una dimensión. El ensayo de tensión consiste en someter al material (probeta) a una velocidad de deformación constante y medir la fuerza necesaria para cada deformación. Esto generalmente se hace hasta que el material se fractura.

Finalmente, el equipo genera una serie de valores, con la cual se grafica en el eje de las abscisas la deformación del material y en el eje de las ordenadas la tensión requerida. Es importante señalar que para no depender de las dimensiones de cada probeta, en

lugar de trabajar con la fuerza (F) se utiliza la tensión o carga ( $\sigma$  en ingles stress) la cual se define como la fuerza aplicada dividida por el área transversal a la deformación (A)

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

El término  $A(t)$  se utiliza para mostrar la dependencia lineal del área con la deformación que sufre el material o durante el proceso de estiramiento con el tiempo. Generalmente es mucho más fácil trabajar con el área inicial, ya que de esta forma se evita medir constantemente las dimensiones de las probetas en este caso a la tensión se le denomina nominal o de ingeniería y a la deformación “deformación nominal o de ingeniería” ( $\varepsilon$ , en ingles strain).

$$\varepsilon = \frac{l - l_0}{l_0}$$

Como se observa en la Figura 50 uno de los problemas que presentan los polímeros desde el punto de vista mecánico es la dependencia que tienen sus propiedades con la temperatura y la velocidad de deformación, lo anterior, es debido a su comportamiento visco-elástico como consecuencia de los altos tiempos de relajación y al alto peso molecular de los polímeros. En la Figura 50 se muestra el comportamiento del polimetil-metacrilato (PMMA) a diferentes temperaturas de ensayo, con lo que se demuestra que por debajo de su temperatura de transición vítrea ( $105^{\circ}\text{C}$ ) el material aumenta su resistencia y por encima de esta disminuye su resistencia y el material se comporta más dúctil

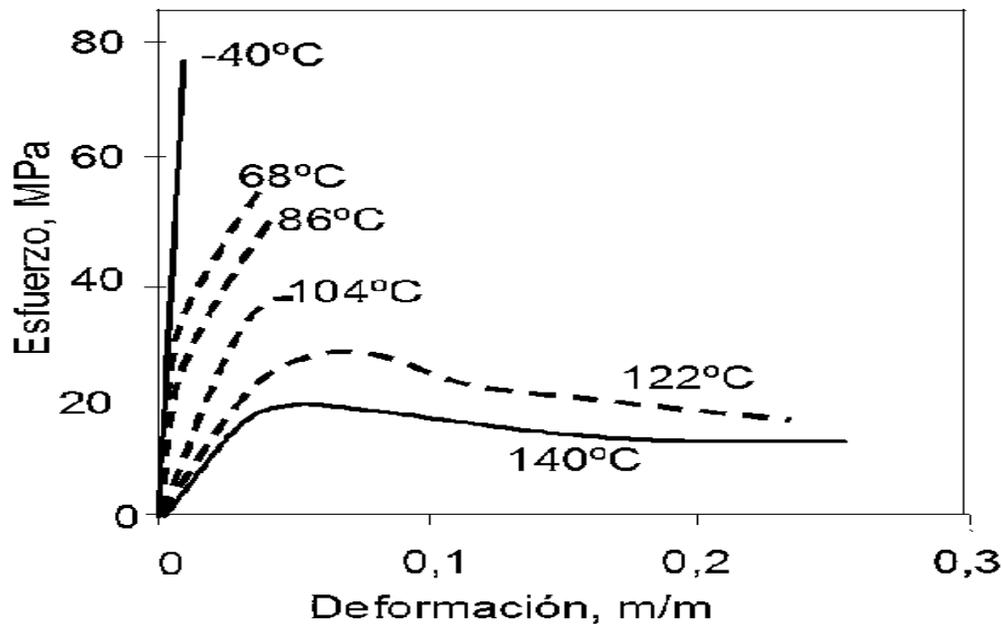


Figura 50 Efecto de la temperatura en las propiedades mecánicas

En la Figura 51 se muestra el gráfico de un ensayo de esfuerzo contra deformación, en este caso se observa que a bajas deformaciones el material sufre una deformación elástica y se trata de un proceso reversible sin embargo, cuando cesa la energía externa el material es capaz de volver a su estado inicial, por lo tanto primero almacena energía y posteriormente la libera. En general, esta zona elástica coincide con la zona lineal de la curva esfuerzo deformación por lo que se cumple en esta zona la Ley de Hooke, valida solo para la zona elástica-lineal.

$$\sigma = E\varepsilon$$

La constante E se denomina módulo de Young y es la constante que relaciona la zona elástica lineal. Un material con alto módulo, es un material rígido el cual no se deforma, mientras que uno con módulo pequeño corresponde a materiales fácilmente deformables. Si se observa la curva cuando esta se desvía de la recta inicial, el material alcanza el punto de fluencia y el material comienza a adquirir una deformación permanente, es decir, parte de la energía que se le entrega al material para ser deformado, no se recupera y a partir de este punto deja de ser válida la ley de Hooke por lo que ha comenzado la zona plástica del ensayo de tensión. Luego de la

fluencia se encuentra una parte de esfuerzo máximo, donde la probeta muestra su punto débil y la deformación se concentra en una zona en la cual se forma un cuello. La deformación en la zona del cuello, provoca que la carga deje de subir y de esta forma se induce la ruptura del material. (Niesel L.E., 1994) (Shackelford James F., 1995)

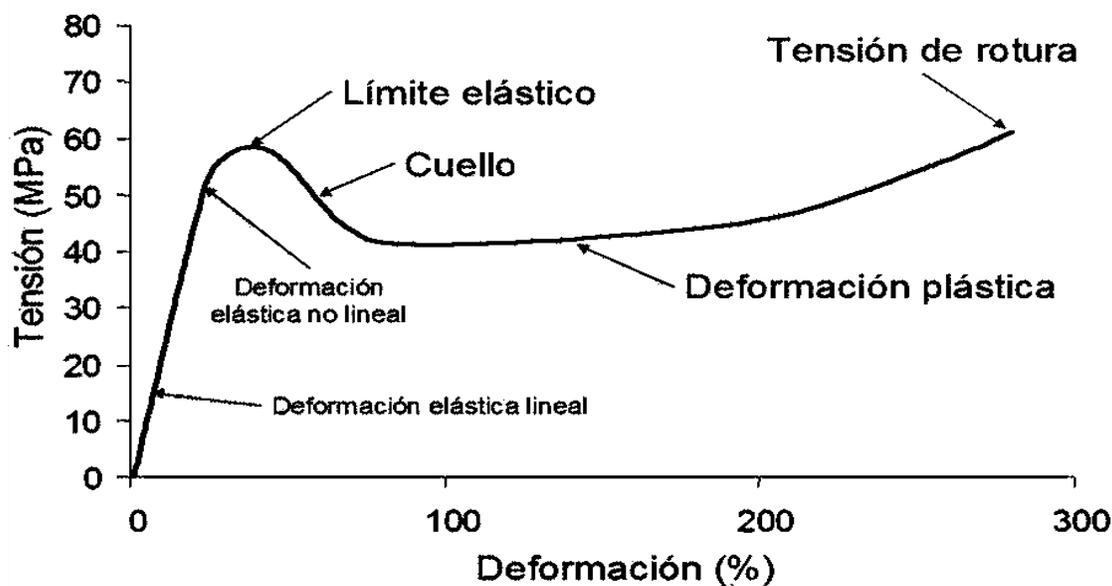


Figura 51 Componentes de la gráfica esfuerzo contra deformación

### 1.10 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido es uno de los instrumentos más versátiles que permiten examinar y análisis las características microestructurales de objetos sólidos. Su principio de funcionamiento consiste en enfocar sobre una muestra un haz fino de electrones acelerado con energía de excitación desde 0.1kV hasta 50kV. El haz se desplaza sobre la superficie de la muestra, se realiza un barrido de forma paralela, interaccionando los electrones del haz y los átomos de la muestra. En la zona de excitación primaria se pueden emitir cinco tipos de señales:

- **Electrones transmitidos:** Electrones que atraviesan la muestra y emergen por su cara inferior.

- **Electrones retrodispersados:** Electrones incidentes que chocan con los núcleos o con electrones de los átomos de la muestra, rebotan y escapan de ella con lo que ocurre una interacción elástica.
- **Electrones secundarios:** Son electrones que colisionan con un electrón de los átomos que constituyen la muestra (colisión inelástica), el átomo se ioniza y a su vez emite electrones, que escapan en diferentes direcciones y pueden recogerse para formar una imagen tridimensional del espécimen.
- **Fotones:** Se generan debido a las colisiones inelásticas.
- **Electrones auger:** Son emitidos cuando un electrón de la capa externa de un átomo de la muestras, pasa a una capa más profunda por efecto de la interacción del átomo con los electrones incidentes o por los retrodispersados.

Las señales generadas como resultado de la interacción del haz de electrones con el espécimen se utiliza para obtener distintos tipos de información (Bozzola J.J., 1999). Las imágenes de SEM se producen colectando los electrones transmitidos como consecuencia de la colisión entre un electrón y un átomo. Existen dos tipos de imágenes:

- **La imagen por electrones secundarios:** Se utiliza para analizar el contraste topográfico, para la visualización de la superficie del espécimen, textura y rugosidad.
- **Imágenes por electrones retrodispersados:** Usado principalmente para la diferenciación de elementos de un espécimen de acuerdo con el número atómico.

### **1.11 Espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (SEM-EDS)**

En esta técnica la energía liberada en forma de rayos X, es característica del átomo que es excitado lo que forma diversos picos en el espectro de energía de acuerdo con la composición del material ya que cada elemento químico tiene una estructura

electrónica única y una respuesta en particular a las ondas electromagnéticas. Por lo tanto esta técnica analítica, no destructiva que permite determinar la composición elemental de un compuesto. (Bozzola J.J., 1999)

### 1.12 Análisis dinámico mecánico

El análisis dinámico mecánico mide las propiedades mecánicas de un material visco-elástico en función de: el tiempo, la temperatura y la frecuencia, mientras el material es sometido a una fuerza oscilatoria periódica (Murayama, 1978). El resultado obtenido se descompone en tres curvas que corresponden al:

- Módulo de almacenamiento (parte real)
- Módulo de pérdida (parte imaginaria)
- $\tan \delta$

El módulo de almacenamiento ( $E'$ ) corresponde al módulo elástico del material que indica la capacidad del material para restablecer la energía suministrada mecánicamente al sistema, el módulo de almacenamiento ( $E''$ ) o módulo viscoso indica la capacidad del material para la disipación de la energía suministrada. Mientras que el factor de pérdidas o tangente del desfase nos indica la capacidad del amortiguamiento del material y su balance visco-elástico y se relaciona como:

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'}$$

La técnica de análisis dinámico-mecánico (DMA) es mucho más sensible que otros métodos y permite medir la temperatura de transición vítrea de materiales con rellenos o capas delgadas de substratos que son difíciles de medir mediante la técnica de DSC. En este caso es posible determinar la temperatura de transición vítrea a partir del: (Turi, 1997):

- Punto de inflexión del módulo de almacenamiento ( $E'$ ): La  $T_g$  se determina a partir del punto de inflexión de la curva del módulo de almacenamiento con la temperatura. Este es el valor más pequeño de la  $T_g$  y se relaciona con el fallo del material.

- Valor máximo del módulo de pérdida ( $E''$ ): Este proporciona un valor intermedio entre los tres métodos utilizados y es el más cercano al punto donde se producen variaciones en las propiedades físicas atribuidas a la transición vítrea en polímeros.

- Valor máximo del factor de pérdida ( $\tan\delta$ ): Este proporciona el valor mayor entre los tres métodos y proporciona información entre el estado vítreo y gomoso del material.

Existen diferentes modos de prueba en el análisis dinámico-mecánico para evaluar las propiedades visco-elásticas de un polímero:

- Barrido en temperatura: es un método de ensayo que mide el módulo complejo a frecuencia constante, mientras hay una variación en la temperatura de la muestra.
- Barrido de frecuencia: este método de ensayo consiste en fijar la temperatura y poner a la frecuencia variable, aquí se pueden observar diferentes tiempo de relajación asociados a los movimientos moleculares.

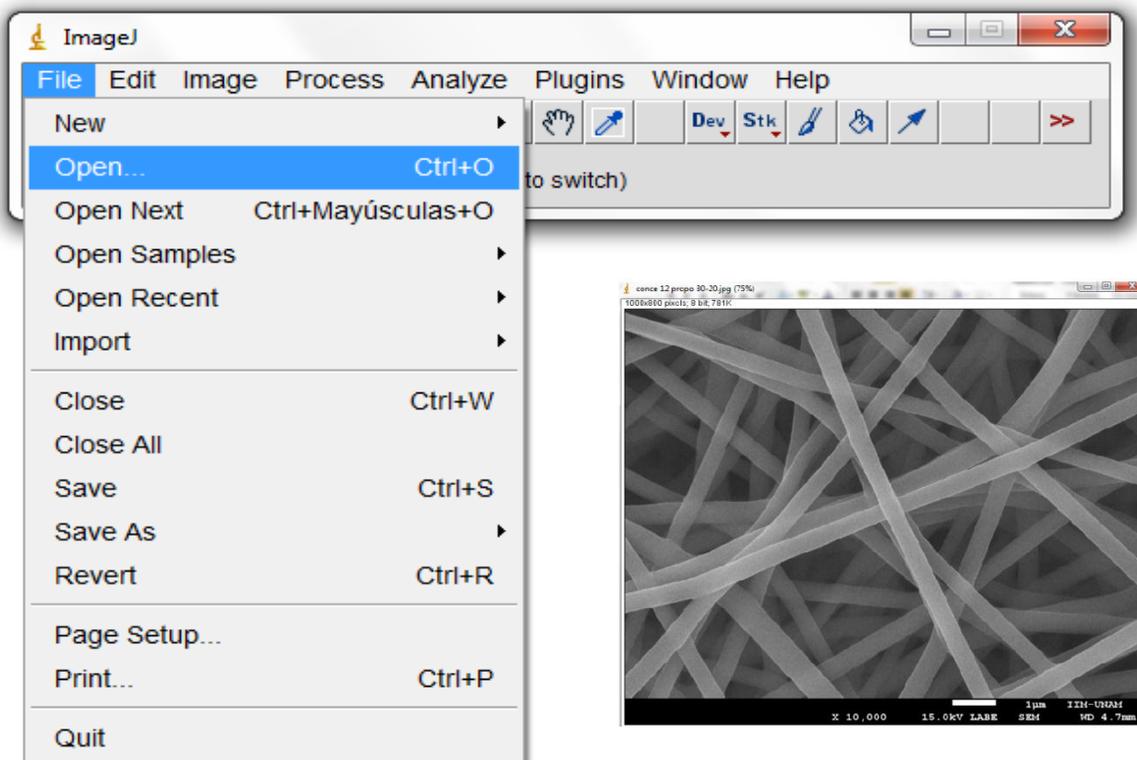
## ANEXO 2

### Cálculo del diámetro promedio con ImageJ®

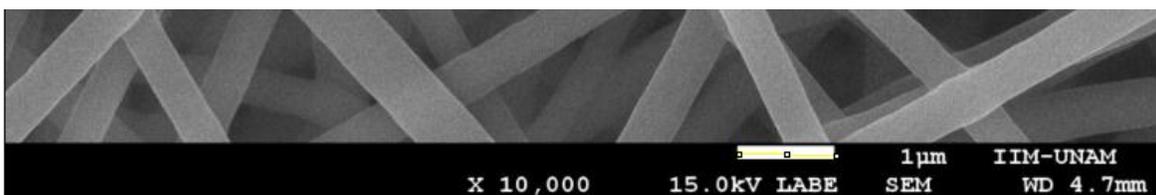
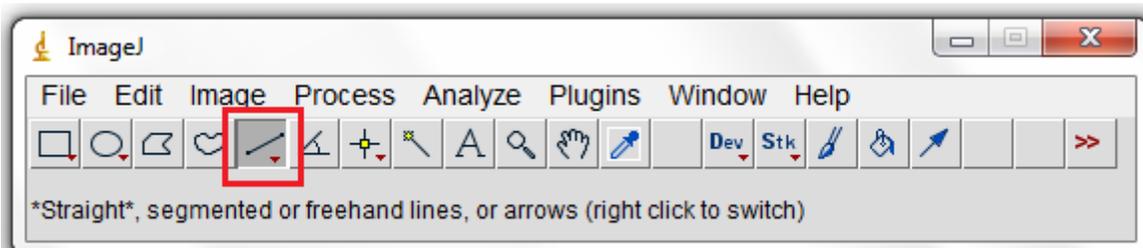
#### 2. Cálculo del diámetro promedio con ImageJ®

Se determinó el diámetro promedio de las fibras de algunas condiciones de electrohilado, al medir 30 fibras de forma aleatoria en imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido. Todas las muestras analizadas se trabajaron bajo las mismas condiciones de aumento (x 10,000) bajo el siguiente procedimiento:

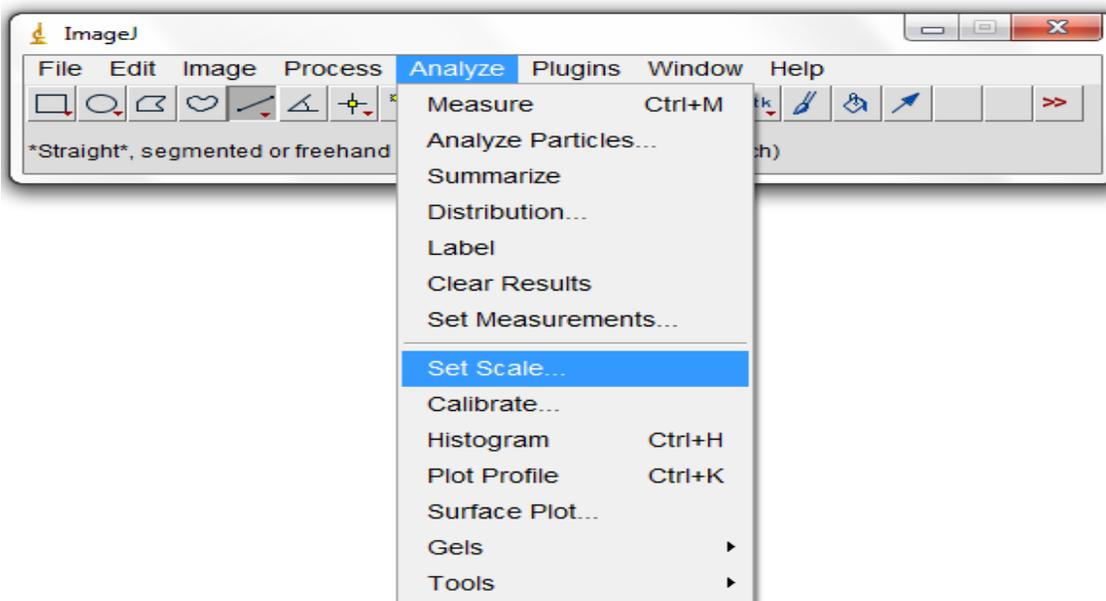
1. Abrir la micrografía de SEM en el programa ImageJ.



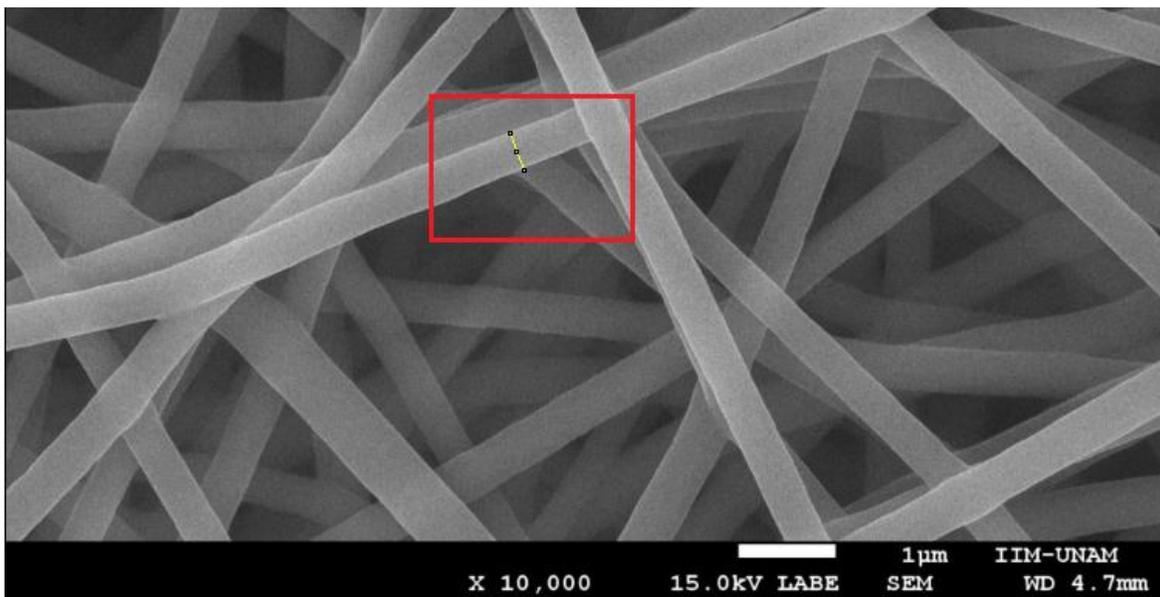
2. Seleccionar de la barra de herramientas de medición *straight* y trazar una línea de un extremo al otro de la barra de escala de micrografía.



3. Determinar la escala de medición, mediante la relación micras pixeles. Seleccionar *Analyze* y dar click en *Set Scale* y fijar la medida.



4. Trazar una línea con la herramienta *Straight* a lo ancho de la fibra. Una vez trazada la línea sobre la fibra seleccionar la secuencia CTRL+M, con lo cual se grabará la medida en una ventana de resultados



5. Y repetir los pasos 3 y 4 para cada una de las fibras a medir. Posteriormente se accede al menú de *Results* y seleccionar *Summarize*, para calcular la desviación estándar y demás datos estadísticos. Este procedimiento se realizó para 30 fibras en cada condición de electrohilado.

## ANEXO 3

### Hoja de especificaciones del policarbonato uretano Bionate II 55-D.

#### Bionate® II PCU Physical Properties

Typical Property	Test Method	Bionate® II PCU		
		80A	90A	55D
Color	Visual	clear to amber colored pellets		
Hardness, Durometer	ASTM D2240	84A	92A	56D
Ultimate Tensile Strength	ASTM D1708	7966 psi / 54.9 MPa	8615 psi / 59.4 MPa	8960 psi / 61.8 MPa
Ultimate Elongation (%)	ASTM 1708	501	385	372
Tensile Stress				
at 50% elongation	ASTM D1708	596 psi / 4.1 MPa	1358 psi / 9.4 MPa	1927 psi / 13.3 MPa
at 100% elongation		852 psi / 5.9 MPa	1909 psi / 13.2 MPa	2635 psi / 18.2 MPa
at 300% elongation		3504 psi / 24.2 MPa	6518 psi / 44.9 MPa	7105 psi / 49.0 MPa
Flexural Modulus, 1% Secant Modulus	ASTM D790	2780 psi / 19.2 MPa	6540 psi / 45.1 MPa	13800 psi / 95.1 MPa
Flexural Stress at 5% Deflection	ASTM D790	137 psi / 0.9 MPa	314 psi / 2.2 MPa	511 psi / 3.5 MPa
Water Absorption (%)	ASTM D750	0.74	0.72	0.54
Dielectric Strength (V/mil)	ASTM D149	425	423	420
Dielectric Constant, K', 60hz	ASTM D150	4.16	3.97	3.71
Coefficient of Friction (Kinetic)	ASTM D1894	0.41	0.43	0.46
Taber Abrasion, 1000gram wt. Weight Loss, mg/1000 cycles	ASTM D4060 H-18 wheel			11
Vicat Softening Temp.				
°C	ASTM D1525	82.5	94.7	106.9
°F		180.5	202.5	224.4
Melt Flow Rate g/10 min at 224°C	ASTM D1238	(1200g) 23	(1200g) 18	(2160g) 35
Glass Transition Temperature, T <sub>g</sub> (°C)	ASTM E1356	-8	-2	1
Melting Point, T <sub>m</sub> (°C)	ASTM E1356	162	177	180
Mold Shrinkage (%)	ASTM D955	.24-3.86	.83-2.71	.8-2.31
Recommended Extrusion Conditions				
°C			180 – 210	
°F			350 – 410	
Recommended Injection Molding Conditions				
°C			225 – 230	
°F			440 – 450	

Note: Typical physical property values are not to be construed as sales specifications.

**Bionate® II PCU Representative Biological Test Results**

<b>Biological test</b>	<b>Results</b>
Genotoxicity	Non-mutagenic
Hemocompatibility	Non-hemolytic
Cytotoxicity	Non-cytotoxic
Systemic Toxicity	No evidence of systemic toxicity
Irritation	No significant irritation or toxicity
Pyrogenicity	Non-pyrogenic
Sensitization	No evidence of sensitization; not considered a sensitizer
Implantation	Non-irritant