



# Universidad Nacional Autónoma de México

Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales

*Andamios fibrosos obtenidos mediante el electrohilado de policaprolactona con nanocristales de celulosa*

## **Tesis**

que para optar por el grado de  
Maestro en Ciencia e Ingeniería de Materiales  
presenta

Daniel Michell Padilla Ramos

Tutor Principal:

Dr. Arturo Barba Pingarrón  
Facultad de Ingeniería (UNAM)

Comité Tutor:

Dra. María Cristina Piña Barba  
Instituto de Investigaciones en Materiales (UNAM)

Dra. Phaedra Suriel Silva Bermúdez  
Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra

Ciudad Universitaria, Cd. de Mx., México, marzo de 2024



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.

**Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales - UNAM  
Acuerdo del Comité Académico del 28 de junio de 2023**

**Declaración de Autoría**

Yo, Daniel Michell Padilla Ramos, hago constar que esta tesis titulada, "Andamios fibrosos obtenidos mediante el electrohilado de policaprolactona con nanocristales de celulosa" y el trabajo presentado en ella son de mi autoría, asimismo,

Yo confirмо que:

Este trabajo fue hecho totalmente durante el periodo de mis estudios de Maestría en el Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales (PCeIM) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Ninguna parte del presente trabajo ha sido usada para algún tipo de grado o certificación en la UNAM, ni en alguna otra Institución.

Cuando se ha citado el trabajo de otros autores, siempre se ha dado la fuente de origen. Con la excepción de dichas citas, la totalidad de la información contenida en el presente trabajo es de mi autoría.

He reconocido todas las fuentes de ayuda usadas en este trabajo.

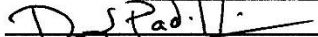
Cuando el trabajo fue hecho en colaboración con otros, he especificado cuáles fueron sus contribuciones.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc., sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía.

Acepto que, en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Nombre Alumno: Daniel Michell Padilla Ramos

Firma: 

Nombre del Tutor: Dr. Arturo Barba Pingarrón

Firma: 

Fecha: 16 de febrero de 2024

# Índice

<b>1.</b>	<b>Agradecimientos institucionales .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Agradecimientos personales .....</b>	<b>2</b>
<b>3.</b>	<b>Resumen.....</b>	<b>3</b>
<b>4.</b>	<b>Abreviaturas .....</b>	<b>5</b>
<b>5.</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>6</b>
<b>6.</b>	<b>Antecedentes.....</b>	<b>8</b>
6.1.	<i>Nanocristales de celulosa.....</i>	<i>8</i>
6.2.	<i>Policaprolactona .....</i>	<i>9</i>
6.3.	<i>Electrohilado.....</i>	<i>11</i>
6.4.	<i>Nanocristales de celulosa en materiales compuestos.....</i>	<i>13</i>
<b>7.</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>15</b>
<b>8.</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>15</b>
8.1.	<i>Objetivo general.....</i>	<i>15</i>
8.2.	<i>Metas.....</i>	<i>15</i>
<b>9.</b>	<b>Metodología .....</b>	<b>17</b>
9.1.	<i>Obtención de los nanocristales de celulosa.....</i>	<i>18</i>
9.2.	<i>Caracterización de los nanocristales de celulosa.....</i>	<i>20</i>
9.2.1.	<i>Análisis de su composición química mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (TFIR).....</i>	<i>20</i>
9.2.2.	<i>Análisis de su cristalinidad mediante difracción de rayos X (DRX) .....</i>	<i>21</i>
9.2.3.	<i>Análisis de su morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) .....</i>	<i>22</i>
9.3.	<i>Obtención de los andamios.....</i>	<i>23</i>
9.3.1.	<i>Preparación de las mezclas.....</i>	<i>23</i>
9.3.2.	<i>Electrohilado de las mezclas .....</i>	<i>25</i>
9.4.	<i>Caracterización de los andamios.....</i>	<i>31</i>
9.4.1.	<i>Análisis de su composición química mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (TFIR).....</i>	<i>31</i>
9.4.2.	<i>Análisis de su cristalinidad mediante difracción de rayos X (DRX) .....</i>	<i>32</i>
9.4.3.	<i>Análisis de su morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) .....</i>	<i>34</i>
9.4.4.	<i>Análisis de su morfología mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).....</i>	<i>35</i>
9.4.5.	<i>Análisis de sus propiedades mecánicas mediante ensayos de tensión uniaxial (ETU) .....</i>	<i>35</i>

9.4.6.	Análisis de su mojabilidad mediante mediciones de ángulos de contacto (MÁC) .....	36
9.4.7.	Evaluación biológica .....	37
<b>10.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>44</b>
10.1.	<i>Caracterización de los nanocristales de celulosa</i> .....	44
10.1.1.	Análisis de su composición química mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (TFIR).....	44
10.1.2.	Análisis de su cristalinidad mediante difracción de rayos X (DRX) .....	45
10.1.3.	Análisis de su morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) .....	47
10.2.	<i>Caracterización de los andamios</i> .....	48
10.2.1.	Análisis de su composición química mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (TFIR).....	48
10.2.2.	Análisis de su cristalinidad mediante difracción de rayos X (DRX) .....	51
10.2.3.	Análisis de su morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) .....	55
10.2.4.	Análisis de su morfología mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	56
10.2.5.	Análisis de sus propiedades mecánicas mediante ensayos de tensión uniaxial (ETU) .....	58
10.2.6.	Análisis de su mojabilidad mediante mediciones de ángulos de contacto (MÁC) .....	66
10.2.7.	Estudio de la viabilidad celular sobre los andamios .....	68
<b>11.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>70</b>
<b>12.</b>	<b>Perspectivas .....</b>	<b>72</b>
<b>13.</b>	<b>Productos académicos.....</b>	<b>73</b>
<b>14.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>74</b>

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigaciones en Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México; en el Laboratorio de Electrohilado del Centro de Ingeniería de Superficies y Acabados de la Facultad de Ingeniería de la misma Universidad; en la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra; en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del Instituto Mexicano del Seguro Social y en laboratorios de caracterización del IIM (UNAM).

## **1. Agradecimientos institucionales**

Este trabajo fue llevado a cabo gracias al apoyo financiero aportado por la DGAPA a través de dos proyectos: *IT200424* y *IT101221*. Asimismo, gracias al soporte dado por el IMSS mediante el programa *IMSS-R-2020-785-167*. Agradezco al CONAHCYT por la ministración de una beca para estos estudios de maestría.

## 2. Agradecimientos personales

Este trabajo no hubiera podido ser llevado a cabo sin la colaboración de muchas personas. Por lo tanto, deseo agradecer sinceramente a la dra. María Cristina Piña Barba, mi maestra, por la supervisión de mis estudios; por la atención y apoyos constantes; y por su guía en este mundo maravilloso: los biomateriales. Asimismo, al dr. Arturo Barba Pingarrón por brindarme la oportunidad de ser su alumno; por escucharme y porque sin su apoyo no hubiera podido dedicarme a esta área que me apasiona. Igualmente, a la dra. Phaedra Suriel Silva Bermúdez por los consejos, recomendaciones y atenciones.

Agradezco mucho a Israel Núñez, cuyo trabajo, ejemplo de disciplina y dedicación, ha sido esencial para este proyecto. También a Ángela Rangel, quien es una persona muy bondadosa cuyas enseñanzas nunca olvidaré. A David Abad, Mercurio Jiménez, Luis Ruiz, Karla Gómez y Jimena Macouzet: su esfuerzo y entrega son inspiradores y motivan a seguir trabajando por el desarrollo de los biomateriales en nuestro país.

Debo mucho a mis profesores: El hecho de haber compartido sus conocimientos conmigo fue primordial. Gracias sinceras al dr. Alfredo Maciel Cerda, a la dra. Yareli Rojas, a la dra. Oyuki Juárez, al dr. Jorge Balmaseda, al dr. Israel Betancourt y al dr. Alejandro Crespo.

Electrohilar es un desafío que llega, incluso, más allá de los laboratorios. Sin embargo, el trabajo colaborativo ayudó siempre a superar los retos. Por lo tanto, deseo agradecer al dr. Miguel Ángel Hernández Gallegos, al dr. Rafael Parra, al dr. Enrique López y al técnico Andrés Sánchez. Por medio de las facilidades proveídas fue posible alcanzar gran parte de los objetivos.

La caracterización de los andamios, identidad de este trabajo, fue gracias al apoyo del ing. Carlos Flores, del maestro Eliézer Hernández, de la maestra Adriana Tejada y del químico Miguel Canseco. Su labor es trascendente en realidad.

La evaluación biológica solo pudo ser llevada a cabo gracias a la apertura, guía y apoyo del dr. José Alvarado Moreno, quien confió en este proyecto desde muy antes de su puesta en marcha. Jénifer Reséndiz, alumna sobresaliente en el cultivo de células, me enseñó técnicas y me apoyó durante el aprendizaje. ¡Gracias!

Agradezco mucho a Ibigen y a sus directores: Nazareth Carbajal y Francisco Minajas, brillantes ingenieros que ha dado México. Gracias por su paciencia y por su confianza.

Mi familia, fuente de ejemplos e inspiraciones, me ha apoyado siempre y se ha preocupado por enseñarme a ser un buen mexicano. Gracias a mi papá, a mi mamá, a mis hermanitas, a mis abuelitos, a mis tíos y a mis primos. Siempre están en mí. Los quiero.

A usted, lector, por tomarse la molestia de revisar este trabajo, en el cual he puesto mi empeño y mi amor.

A Andrés y a María por haberme mostrado el camino.

A Pamelita

Por México

### 3. Resumen

En este trabajo se presenta el estudio de **andamios** fibrosos constituidos por poli ( $\epsilon$ -caprolactona) con nanocristales de celulosa (NCC). Se utilizó el **electrohilado** como técnica de manufactura de los andamios. Los NCC fueron obtenidos mediante la hidrólisis parcial ácida de fibras de celulosa vegetal. La composición química, la cristalinidad y la morfología de los NCC fueron estudiadas mediante las técnicas de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (TFIR), difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de transmisión (MET), respectivamente. Los resultados mostraron que los NCC exhibieron nanoestructuras alargadas compuestas por celulosa tipo I $\beta$ . Dichas nanopartículas fueron incorporadas a una matriz de poli ( $\epsilon$ -caprolactona), el polímero de base. Posteriormente, las mezclas fueron electrohiladas con el propósito de producir fibras delgadas que, en conjunto, formaron una membrana, o andamio, de cierto espesor. Es importante destacar que el TFE fue el único disolvente utilizado en el proceso de electrohilado. Se obtuvieron tres muestras: la primera consistió en una membrana de fibras de PCL exclusivamente; la segunda, en fibras de PCL con el 5 %p/p de NCC; y la tercera, en fibras de PCL con el 10 %p/p de NCC. Finalmente, las membranas obtenidas fueron caracterizadas como sigue: la composición química se analizó mediante TFIR, mientras que la cristalinidad se estudió a través de DRX. Por otro lado, la morfología de las fibras formadoras de los andamios se exploró utilizando técnicas de microscopía electrónica. Las propiedades mecánicas y la mojabilidad de las membranas fueron caracterizadas a partir de ensayos de tensión



uniaxial (ETU) y de mediciones de ángulos de contacto (MÁC), respectivamente. Por último, con base en evaluaciones con *MTT* se calculó la viabilidad de células endoteliales del cordón umbilical humano (*HUVEC*) sobre los andamios. En las membranas con NCC, los resultados exhibieron incrementos de entre el 50 y el 150 % en las intensidades de sus picos de difracción, con respecto de los de la membrana de PCL exclusivamente. Por otra parte, mientras que la microscopía electrónica de barrido reveló la composición fibrilar de las membranas, la MET permitió observar los NCC incorporados en las fibras. A su vez, los ETU mostraron, entre otras características, que la membrana con el 5 %p/p de NCC, presentó la mayor deformación: 360 %, aproximadamente. Las MÁC hicieron notar que los NCC contribuyeron débilmente a la disminución de la hidrofobicidad de los andamios. Finalmente, mediante la evaluación biológica, se encontró que la viabilidad de células *HUVEC* sobre los andamios tendió a incrementar a medida que aumentaba el contenido de NCC en aquellos. Sin embargo, debe mencionarse que las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

## 4. Abreviaturas

<i>5NCC/PCL</i>	Membrana de PCL más el 5 %p/p de NCC
<i>10NCC/PCL</i>	Membrana de PCL más el 10 %p/p de NCC
<i>ASTM</i>	Sociedad Estadounidense para Pruebas y Materiales
<i>AWG</i>	Calibre estadounidense de alambre
Col.	Colágena
<i>Cryostor</i>	Medio de criopreservación
<i>Cryovial</i>	Frasco de criopreservación
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difracción de rayos X
<i>EBM-2</i>	Medio basal endotelial
<i>EGM-2</i>	Medio basal endotelial con factores de crecimiento
ETU	Ensayo de tensión uniaxial
<i>FBS</i>	Suero fetal bovino
<i>FWHM</i>	Ancho total a la mitad de la altura máxima
Ga	Gauge (unidad de medida)
<i>HUVEC</i>	Células endoteliales del cordón umbilical humano
IIM	Instituto de Investigaciones en Materiales
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INR	Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
MÁC	Medición de ángulo de contacto
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MET	Microscopía electrónica de transmisión
<i>Mn</i>	Masa molecular promedio
<i>MTT</i>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NCC	Nanocristales de celulosa
NFC	Nanofibras de celulosa
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volumen
PB	Pruebas biológicas
PCL	Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)
<i>PCL</i>	Membrana de PCL exclusivamente
rpm	Revoluciones por minuto
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TFIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

## 5. Introducción

Ante la importancia de contar con estructuras que contribuyan a la reparación de tejidos y órganos, la obtención de andamios celulares ha sido objeto de muy amplia investigación. Dichas arquitecturas podrían ser obtenidas mediante diversas técnicas de manufactura; por ejemplo, la descelularización y la impresión en tercera dimensión. Sin embargo, tomando en cuenta la necesidad de materiales biocompatibles en forma de membranas microfibrilares que emulen la arquitectura de la matriz extracelular, las ventajas podrían ser presentadas por una técnica en especial: el electrohilado.

Entre el extenso catálogo de polímeros y nanopartículas biocompatibles se encuentran la poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) y los nanocristales de celulosa (NCC), respectivamente. Para los propósitos de este trabajo, *nanocristales de celulosa* se referirá a aquellas partículas obtenidas tras la deconstrucción de fibras de celulosa, las cuales originalmente están constituidas por la unión alternada de regiones cristalinas (partes preservadas) y amorfas.

Es sabido que mientras que los NCC son materiales hidrófilos y biocompatibles, la PCL manifiesta cierto comportamiento hidrofóbico. Por lo tanto, podría advertirse que la interacción entre ambos materiales no sería solamente difícil, sino inviable también. De hecho, en diversas investigaciones se ha reportado que la incorporación de NCC en matrices no polares es obstaculizada por la alta polaridad de aquellos, así como por su tendencia a la aglomeración y agregación irreversibles [1], [2]. Sin embargo, la inclusión de NCC en PCL ha sido reportada

de forma escasa. Todo lo anterior conlleva a cuestionar si la incorporación de ambos materiales podría permitir aprovechar sus ventajas particulares en una matriz de fibras.

Si bien es cierto que en algunas investigaciones se ha reportado que la PCL es utilizada en andamios para células endoteliales [3], [4], hasta donde llega nuestro conocimiento, no ha sido estudiado cómo los NCC podrían afectar la viabilidad de células endoteliales del cordón umbilical humano (*HUVEC*) sobre andamios conformados por ambos materiales (PCL y NCC). Allí radicó la motivación por incorporar dichas células en el diseño experimental que se presentará.

En este trabajo se estudiarán las propiedades de andamios fibrosos obtenidos a través del electrohilado de mezclas de PCL con cierta cantidad de NCC. Se tratarán primero los temas relacionados con la obtención y la caracterización de los NCC. Enseguida se hablará sobre los retos y desafíos presentados ante los esfuerzos por electrohilar PCL con NCC. Finalmente, se explorarán las propiedades de los andamios desde los puntos de vista químico, físico, mecánico y biológico.

## 6. Antecedentes

### 6.1. Nanocristales de celulosa

La celulosa es un polisacárido de cadena larga compuesto por D-glucosa con celobiosa, la cual está conformada por dos residuos de glucosa ligados mediante un enlace  $\beta$ -1,4 glucosídico [1]. A su vez, las moléculas de celulosa están unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. De esta manera se forman pequeñas estructuras fibrilares que, empacadas, dan lugar a fibras más largas cuya longitud es micrométrica [1]. Dichas microfibras presentan regiones cristalinas y regiones amorfas alternadamente. Mediante un procesamiento adecuado, las partes cristalinas pueden ser aisladas y extraídas. Reciben entonces el nombre de *nanocristales de celulosa* [5] (NCC).

El aislamiento de NCC mediante la hidrólisis parcial de fibras de celulosa ha sido reportado desde hace setenta años, aproximadamente [6]. El principio de este método consiste en que mientras que las regiones amorfas son preferentemente hidrolizadas, las regiones cristalinas poseen una mayor resistencia ante el ataque del ácido y, por lo tanto, permanecen intactas. Así son obtenidas nanopartículas con forma de varilla [5]. Ver la figura 1.

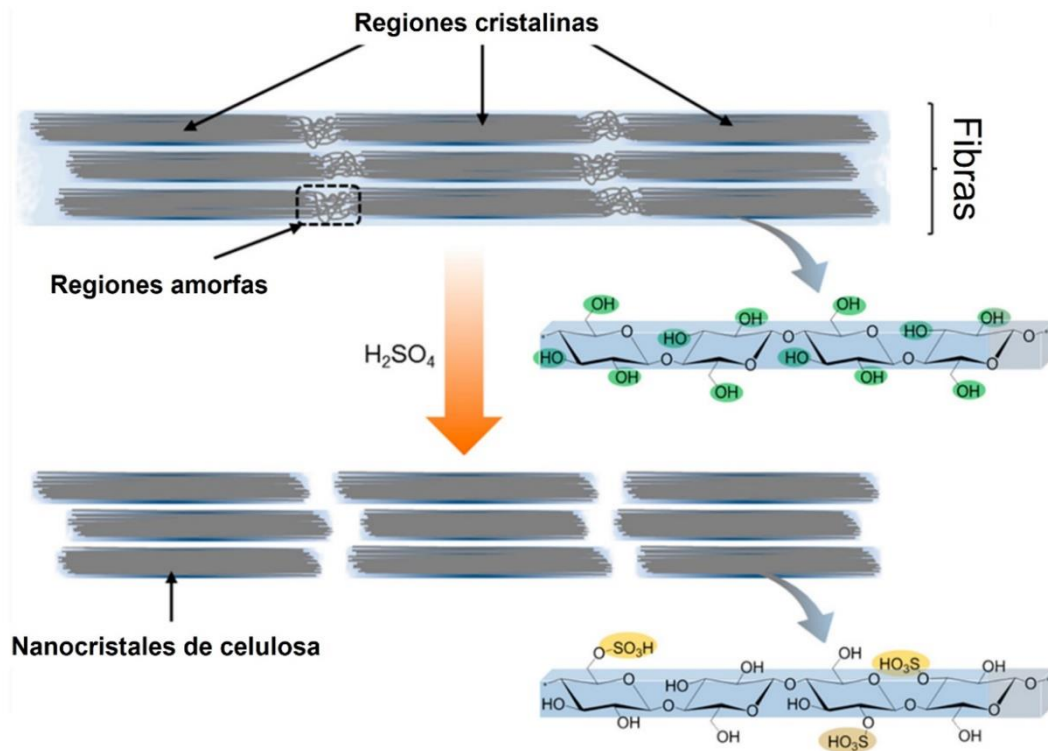


Figura 1. Esquemática de los NCC obtenidos tras la hidrólisis ácida de las regiones amorfas de la celulosa. Imagen modificada de la referencia [1].

## 6.2. Policaprolactona

La poli ( $\epsilon$ -caprolactona) [en adelante, *policaprolactona* (PCL)] es un material polimérico e hidrofóbico obtenido mediante la polimerización con apertura de anillo del monómero  $\epsilon$ -caprolactona [7]. Ver la figura 2. Las aplicaciones potenciales de este material han sido ampliamente estudiadas. De hecho, sus usos en Ingeniería de Tejidos y en biomateriales implantables han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos [8], [9].

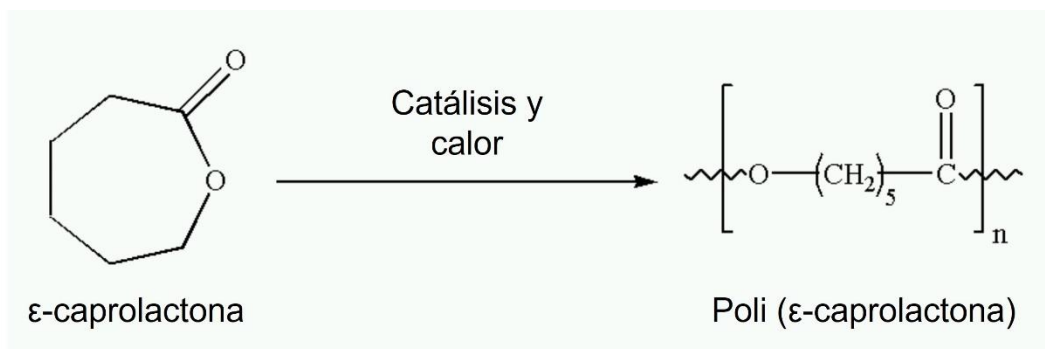


Figura 2. Polimerización de la ( $\epsilon$ -caprolactona) a partir de la apertura de su anillo. Imagen modificada de Wikimedia.

Debido a su temperatura de transición vítrea ( $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a su temperatura de fusión ( $59 - 64\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [7] y a su naturaleza semicristalina, la PCL presenta suficiente tenacidad y rigidez ante condiciones fisiológicas. Además, es biocompatible y permite la diferenciación de ciertas células [10]. Por otro lado, su capacidad de ser mezclada con diversos polímeros o con compuestos biológicos la vuelve candidata a ser utilizada en terapias regenerativas [8].

La PCL es soluble en una extensa variedad de disolventes orgánicos. Por lo tanto, su propiedad de formar mezclas miscibles con otros polímeros es alta [11]. Algunas sustancias empleadas como disolventes de la PCL son las siguientes: cloroformo, diclorometano, tetracloruro de carbono, benceno, tolueno, ciclohexanona, 2-nitropropano [7], ácido acético [12], 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) [13]. En contraste, la PCL es insoluble en alcohol, éter de petróleo y éter etílico; mientras que presenta baja solubilidad en acetona, etanoato de etilo y dimetilformamida [7]. Entre otros factores, la elección del disolvente adecuado

puede permitir el procesamiento del polímero para obtener constructos mediante, por ejemplo, electrohilado [8].

Dentro del área de Ingeniería de Tejidos, la PCL es un material de interés debido a que sus propiedades reológicas posibilitan que sea utilizada en la fabricación de andamios cuya manufactura es relativamente sencilla [7].

### **6.3. Electrohilado**

El electrohilado debe su nombre a la utilización de campos electrostáticos para producir fibras [14]. Los inicios de la técnica son relativamente antiguos; sin embargo, diversas aplicaciones actuales se alcanzan a partir de cambios o adecuaciones en su configuración básica [14], [15], [16], [17], cuyos fundamentos se exponen a continuación:

Cuatro elementos principales se requieren para conformar un sistema de electrohilado: el colector de fibras (electrodo negativo), la fuente de alto voltaje, la bomba inyectora y la jeringa con aguja (electrodo positivo) [18]. Mientras que la jeringa funciona como un reservorio para la sustancia que se ha de electrohilar, la bomba inyectora dosifica un flujo constante de aquella a través de la aguja [19]. Por otro lado, mediante cables conductores conectados a los electrodos positivo y negativo, la fuente de alto voltaje suministra una carga eléctrica sobre la superficie



de la solución que ya se encuentra a la salida de la aguja. Si la diferencia de potencial entre la aguja y el colector es lo suficientemente grande como para vencer las fuerzas de cohesión de la gota, esta se elonga y forma el *cono de Taylor* [20], cuyo nombre se debe a quien lo modeló matemáticamente [21]. Cuando la tensión superficial de la solución es superada por el campo eléctrico, dicha solución es eyectada, estirada, acelerada y atraída por el colector, el cual está conectado a la tierra. La mayor parte del disolvente de la solución polimérica se evapora durante el recorrido. Por lo tanto, fibras arriban al colector y allí se concentran [14], [20]. Véase la figura 3.

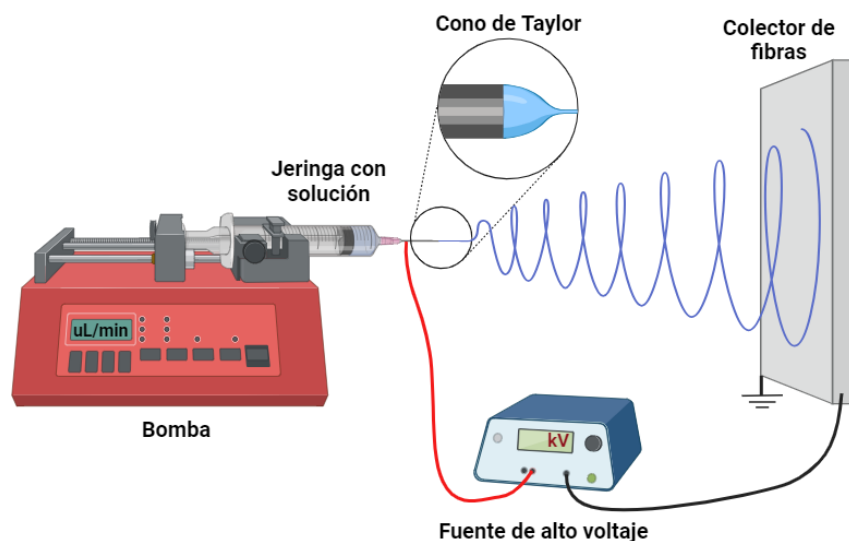


Figura 3. Esquema de la configuración básica de un equipo de electrohilado. Creado con *BioRender.com*.

#### **6.4. Nanocristales de celulosa en materiales compuestos**

La dispersión de NCC en sistemas basados en agua es relativamente sencilla debido al carácter hidrófilo de aquellos. No obstante, cuando el polímero no es soluble en agua, la dispersión de NCC puede presentar diversos retos como su aglomeración y agregación en matrices no polares [1].

El electrohilado de policaprolactona con nanocristales de celulosa ha sido reportado en un número limitado de artículos [22], [23], [24], [25]. Palacios, *et. al.* obtuvieron membranas a partir del electrohilado de PCL con nanofibras de celulosa (NFC) de bagazo de agave. En su trabajo, mientras que las nanopartículas fueron dispersadas en dimetilformamida, la PCL fue disuelta en cloroformo. Posteriormente, la dispersión fue mezclada con la disolución con base en diferentes proporciones. Finalmente, las mezclas fueron electrohiladas para obtener membranas fibrosas. A partir de los resultados de las caracterizaciones llevadas a cabo, los autores concluyeron que la PCL y las NFC mostraron una buena compatibilidad entre sí, ya que las propiedades mecánicas de las membranas de PCL con NFC fueron mayores en términos del esfuerzo máximo y de la deformación. Asimismo, se reportó que las muestras mostraron un decremento en la intensidad de los picos de difracción característicos de la PCL. Este comportamiento estuvo directamente relacionado con el incremento en el contenido de las NFC. Por último, en las micrografías electrónicas de barrido se observa que las membranas estuvieron constituidas por fibras irregulares en su forma [22].

Por otro lado, Hivechi, A., *et. al.* reportaron haber incorporado NCC en una matriz de PCL electrohilada. El disolvente empleado fue una solución de ácido acético, en la cual se encontraban dispersadas las nanopartículas. La concentración máxima de NCC fue del 4 % con respecto del peso del polímero. Con base en sus resultados, los NCC actuaron como agentes *antinucleantes*. Es decir, la fase cristalina de la PCL disminuyó ante la incorporación de los NCC. En relación con el comportamiento mecánico de sus estructuras, dichos autores encontraron que la inclusión del 1 %p/p de NCC en la PCL conllevó a un aumento del 47 % en el módulo elástico, con respecto del módulo de la muestra sin NCC. [24], [25]

A su vez, Zoppe, J., *et. al.* exploraron la utilización de NCC provenientes de ramia como material de refuerzo de fibras de PCL. En su trabajo, los NCC fueron dispersados en dimetilformamida. Posteriormente, esta dispersión fue mezclada con una disolución de PCL en diclorometano. Los autores estudiaron el comportamiento mecánico de cuatro muestras: la primera estuvo constituida por PCL exclusivamente, mientras que las tres restantes incluyeron NCC en su composición a razón del 2.5, 5 y 7.5 % del peso del polímero. Los resultados de esta investigación mostraron módulos elásticos de 3.89, 6.54, 3.94 y 6.26 MPa, respectivamente. [23]

Algunos autores han descrito que la inclusión de nanocristales de celulosa (NCC) en matrices no polares presenta obstáculos debido a que la alta polaridad de los NCC y su tendencia a formar fuertes puentes de hidrógeno, dificultan la dispersión de aquellos en polímeros hidrofóbicos [2] como la PCL. En otras

palabras, la naturaleza hidrófila de los NCC conlleva a su agregación y aglomeración irreversibles en matrices no polares [26].

## **7. Hipótesis**

Una mezcla de nanocristales de celulosa con poli ( $\epsilon$ -caprolactona) en exclusivamente 2,2,2-trifluoroetanol, podrá ser electrohilada para constituir andamios fibrosos.

## **8. Objetivos**

### **8.1. Objetivo general**

Obtener andamios fibrosos a través del electrohilado de mezclas compuestas por NCC y PCL disuelta en TFE; caracterizarlos física, química, mecánica y biológicamente, y evaluar su capacidad de ser utilizados en Ingeniería de Tejidos.

### **8.2. Metas**

- 1.- Obtener nanocristales de celulosa; caracterizar su cristalinidad, composición química y morfología mediante el uso de DRX, TFIR y MET, respectivamente.
- 2.- Determinar las condiciones adecuadas de equipamiento y de composición de las mezclas para realizar el electrohilado uniforme de estas.

3.- Obtener los andamios fibrosos por medio de electrohilado.

4.- Caracterizar los andamios desde los puntos de vista químico, físico, mecánico y biológico mediante las técnicas de TFIR, DRX, MET, MEB, ETU y MÁC, así como PB.

## 9. Metodología

Los reactivos y disolventes empleados fueron suministrados por proveedores comerciales y se utilizaron como fueron recibidos.

### Materiales

- 2, 2, 2 - trifluoroetanol ( $C_2H_3F_3O$ ); TFE; pureza  $\geq 98\%$ ; *Fluka Analytical*
- Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ); pureza: 95.0 - 98.0 %; *MEYER*
- Algodón (100 %); *Medimart*
- Células endoteliales del cordón umbilical humano (*HUVEC*); *CC-2519A*; *LONZA*
- *Cryostor*; *Biolife Solutions*
- *CyQUANT MTT Cell Proliferation Assay Kit*; V13154; *Invitrogen*
- Dimetilsulfóxido ( $(CH_3)_2SO$ ); pureza  $\geq 99.7\%$ ; *Sigma-Aldrich*
- Hidróxido de sodio (NaOH) en *pellets*; grado reactivo,  $\geq 98\%$ ; *Sigma-Aldrich*
- Medio basal endotelial (*EBM-2*); *Clonetics*; *LONZA*
- Membrana para diálisis; *MWCO*: 12 – 14 kDa; *Spectra/Por2 DialysisMembrane*
- Papel; *Parchment Paper*, *Williams-Sonoma*
- Plato de cultivo; *96 well cell culture cluster*, *COSTAR*
- Policaprolactona ( $(C_6H_{10}O_2)_n$ ) en *pellets*; *Mn* 80,000; *Sigma-Aldrich*
- Solución de hipoclorito de sodio; grado reactivo, 10 - 15 %; *Sigma-Aldrich*

### Equipos

- Bomba inyectora; *NE 1000*; *New Era*; *Pump Systems Inc.*
- Cabina de seguridad biológica tipo II, *ESCO*
- Centrífuga; *Rotina 35*; *Hettich*
- Difractómetro; *D500*; *Siemens* ( $CuK\alpha$ ,  $\lambda = 1.5419 \text{ \AA}$ )
- Equipo de medición de ángulos de contacto; *OCA 15EC*; *Dataphysics*
- Espectrofotómetro de luz infrarroja; *Nicolet 6706/Smart Orbit ATR optics*

- Espectrofotómetro de *UV-Vis*; *NANODROP ONE<sup>C</sup>*; *Thermo Fisher Scientific Inc.*
- Fuente de alto voltaje; *CZE 1000R*; *Spellman*
- Incubadora; *UN-4750*; *NUAIRE*
- Liofilizadora; *FreeZone1*, *LABCONCO*
- Máquina universal de pruebas mecánicas; *AGS-X 10KN*; *Shimadzu*
- Microscopio de contraste de fases; *CKX41*; *OLYMPUS*
- Microscopio electrónico de barrido; *JCM6000*; *BENCHTOP SEM*
- Microscopio electrónico de transmisión; *JEM-1200EX*
- Parrilla de agitación; *GUARDIAN 5000*; *OHAUS*
- Probeta de agitación ultrasónica; *VCX 130PB*; *SONICS & MATERIALS INC*
- Tina de agitación ultrasónica; *1510*; *BRANSONIC*

## **9.1. Obtención de los nanocristales de celulosa**

A continuación se describe el procedimiento seguido para obtener nanocristales de celulosa mediante el método de hidrólisis ácida.

Primer paso: Mercerizado. 2.5 g de hidróxido de sodio fueron disueltos en agua destilada para preparar una solución al 5 % p/v. Posteriormente, 10 g de algodón fueron agregados a la solución anterior. La mezcla se mantuvo en agitación (60 rpm) constante y a temperatura ambiental por 24 h. El resultado fue lavado con agua destilada cinco veces.

Segundo paso: Blanqueamiento. Se prepararon 500 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 5 %. En ella se agregó el algodón del paso anterior. La mezcla

se mantuvo en agitación (60rpm) constante y a temperatura ambiental por 24 h. El resultado fue lavado con agua destilada cinco veces.

Tercer paso: Hidrólisis ácida. En un baño de hielo se prepararon 60 mL de una solución de ácido sulfúrico (64 %v/v). A la solución fría se le agregó paulatinamente el algodón del paso anterior. Una vez agregado todo el algodón, la mezcla se retiró del baño de hielo y se mantuvo en agitación (300 rpm) constante por 3 h, sin calor adicional.

Cuarto paso: Término de la reacción. Con el fin de detener el proceso de hidrólisis, la mezcla del paso anterior se retiró del agitador y se agregó a 500 mL de agua a 4 °C. La mezcla quedó en reposo por 24 h a 4 °C. Después de este tiempo, se retiró el líquido superficial y al sedimento se le agregó agua hasta aforar 500 mL. Este mismo proceso se repitió una vez más para eliminar la mayor cantidad posible de ácido. El sedimento fue agitado por una hora mediante ultrasonido.

Quinto paso: Diálisis. Se utilizaron trozos de membrana para diálisis (*MWCO: 12 – 14 kDa; Spectra/Por2 Dialysis Membrane*). Se hidrataron y se anudó un extremo de cada trozo para formar bolsas. El producto del paso anterior se vació dentro de dichas bolsas y estas fueron selladas para formar bulbos, los cuales se colocaron dentro de un vaso de precipitados y se cubrieron con agua destilada. El sistema se mantuvo en reposo para permitir el paso del ácido residual a través de los poros de la membrana. El agua destilada se sustituyó cada 24 h hasta que el pH del agua del sistema fue igual que el pH del agua destilada de recambio. Esto ocurrió aproximadamente después de seis días.



Sexto paso: Liofilización. El contenido de las bolsas de diálisis fue vaciado en tubos cónicos de 50 mL de capacidad y congelado a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, mediante un equipo *FreeZone1*, LABCONCO, la mezcla fue liofilizada durante 24 h para obtener finalmente los nanocristales de celulosa. El proceso ocurrió a 0.044 mBar y a  $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El producto fue almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## **9.2. Caracterización de los nanocristales de celulosa**

### **9.2.1. Análisis de su composición química mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (TFIR)**

Se utilizó un espectrofotómetro de luz infrarroja (*Nicolet 6706/Smart Orbit ATR optics*) para determinar los modos vibracionales presentes en los NCC, los cuales fueron colocados en forma de polvo sobre el *portamuestras* del equipo. Se estableció un intervalo entre  $4000$  y  $500\text{ cm}^{-1}$  para la adquisición de los datos, los cuales se obtuvieron tras 32 muestreos a una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Las mediciones fueron llevadas a cabo en condiciones ambientales de temperatura. En el programa *OriginPro* se procesó la información obtenida. Bajo las mismas condiciones se obtuvo el espectro de TFIR de una muestra de algodón. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Espectroscopía del IIM.

### 9.2.2. Análisis de su cristalinidad mediante difracción de rayos X (DRX)

Para determinar parámetros cristalográficos de los NCC se utilizó la técnica de DRX de polvos. Primero, la muestra fue colocada en un *portaobjetos* para polvos. Posteriormente se inició el proceso de caracterización, cuya duración fue de doce horas, aproximadamente. El corrimiento fue de  $2\theta = 10^\circ$  a  $2\theta = 40^\circ$  con incrementos de  $0.002^\circ$ . Se utilizó un difractómetro *D500; Siemens* ( $\text{CuK}\alpha$ ,  $\lambda=1.5419 \text{ \AA}$ ) ubicado en el Laboratorio de Rayos X del IIM (UNAM). La información obtenida fue procesada en *OriginPro*. Se utilizó la ecuación de Scherrer para calcular el tamaño transversal promedio de los cristalitas [27], como se presenta enseguida:

$$L = \frac{k \times h}{\beta \cos \theta} \quad (1)$$

$L$  representa el tamaño transversal promedio del cristalito en nanómetros. El valor de la constante  $k$  es de 0.89. La longitud de onda de los rayos X está denotada como  $h$ .  $\beta$  es el ancho total a la mitad de la altura máxima (*FWHM*) del pico principal de difracción. El valor de *FWHM* fue calculado mediante el programa *OriginPro*.

El índice de cristalinidad de los NCC fue calculado con base en el método de Segal [28], [29] utilizando la ecuación siguiente:

$$X_c \% = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \times 100 \quad (2)$$

$I_{200}$  es la intensidad máxima del plano de difracción (200). Por otro lado,  $I_{am}$  es la intensidad del pico de difracción en  $2\theta = 18^\circ$  [28], [30].

### **9.2.3. Análisis de su morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)**

La estructura en forma de varilla de los NCC fue corroborada mediante el uso de un microscopio electrónico de transmisión en el Laboratorio de Microscopía del IIM (UNAM). Las muestras se prepararon de la siguiente manera: primero, 0.1 g de NCC se agregaron a 3 mL de acetona. Posteriormente, la mezcla fue agitada mediante ultrasonido por una hora. Enseguida, una gota de la suspensión obtenida se depositó sobre una rejilla de cobre para MET. El disolvente se evaporó a temperatura ambiental, por lo que los NCC quedaron depositados sobre dicha rejilla. No se utilizaron recubrimientos ni procedimientos adicionales para preparar la muestra. Los NCC fueron finalmente observados mediante un microscopio electrónico de transmisión *JEM-1200EX*, cuyo voltaje de trabajo se estableció en 100 kV. Las micrografías fueron analizadas mediante el programa *ImageJ*. Los histogramas de las frecuencias de las dimensiones fueron elaborados a partir de la información de cien estructuras.

## 9.3. Obtención de los andamios

### 9.3.1. Preparación de las mezclas

Las concentraciones específicas para cada preparación se presentan en la tabla I.

#### 9.3.1.1. *PCL*

Se utilizaron *pellets* de PCL (*Mn* 80,000; *Sigma-Aldrich*) y 2,2,2-trifluoroetanol (TFE; pureza  $\geq 99\%$ ; *Fluka Analytical*) para preparar 10 mL de una solución cuya concentración de PCL fue del 10 %p/p. Después de haber sido incorporados ambos reactivos dentro de un matraz aforado, la mezcla permaneció en agitación mecánica (300 rpm) por doce horas o hasta que se alcanzó una solución transparente. Este proceso se llevó a cabo en condiciones ambientales de temperatura. La disolución obtenida en este paso se denominó *PCL* y conformó la primera muestra estudiada.

#### 9.3.1.2. *5NCC/PCL*; *10NCC/PCL*

Se utilizó un frasco de vidrio a cuya tapa plástica se le realizó en el centro una perforación de 6 mm de diámetro. Las concentraciones específicas para la preparación de cada una de las dos muestras se presentan en la tabla I. El volumen necesario de TFE fue depositado dentro del frasco. Posteriormente se agregó la cantidad necesaria de NCC. Después, el frasco fue colocado dentro de un baño de agua helada. Este sistema se montó en el suelo de una cabina de agitación

ultrasónica. Posteriormente, la probeta del dispositivo (*VCX 130PB, SONICS & MATERIALS INC*) se instaló dentro del frasco a través de la perforación realizada en la tapa. Mediante una hora de agitación ultrasónica (a 20 kHz y con una amplitud del 70 %) se dispersaron los NCC en el TFE y se conservó el volumen de este al prevenir su evaporación. Ver la figura 4.

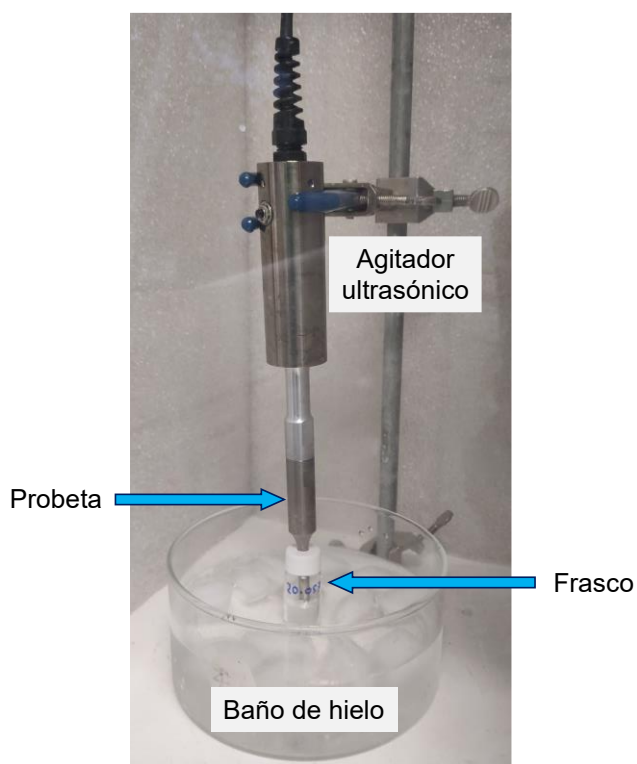


Figura 4. Sistema ultrasónico para dispersar los NCC en el TFE.

El TFE y los NCC dispersados formaron el disolvente para la PCL, la cual fue agregada enseguida con base en las concentraciones propuestas. Finalmente, mediante doce horas de agitación mecánica a razón de 300 rpm, se disolvió la PCL en el TFE con NCC. Con base en este procedimiento fueron preparadas las mezclas

5NCC/PCL y 10NCC/PCL. Es muy importante subrayar que los NCC fueron dispersados en el TFE antes de ser agregada la PCL. De esta forma se evitó que la viscosidad dificultara la dispersión de los NCC en la disolución.

Tabla I

*Concentraciones*

Nomenclatura	Concentración de PCL en TFE	Concentración de NCC en la solución
<i>PCL</i>	10 %p/p	0 %
<i>5NCC/PCL</i>	10 %p/p	5 % del peso de PCL
<i>10NCC/PCL</i>	10 %p/p	10 % del peso de PCL

### 9.3.2. Electrohilado de las mezclas

#### 9.3.2.1. El colector de fibras

Con el objetivo de obtener suficientes especímenes para llevar a cabo la totalidad de las caracterizaciones, se construyó un colector de fibras capaz de proveer membranas de 25 cm de largo por 8 cm de ancho, aproximadamente. Este sistema consistió en un tambor diseñado para girar sobre su propio eje longitudinal a razón de 15 rpm. Dicho tambor se recubrió con aluminio y este se conectó a la tierra. Sobre el aluminio se fijó temporalmente un sustrato de papel (*Parchment Paper, Williams-Sonoma*). En conjunto, el sistema conformó un *colector de tambor rotatorio de bajas revoluciones*. Ver la figura 5. Una vez depositadas las fibras sobre

el sustrato, este fue recortado paralelamente al eje longitudinal del tambor y luego se desdobló. Cuidadosamente se retiró la membrana de su sustrato. Así fue obtenida una superficie membranal con fibras orientadas aleatoriamente.

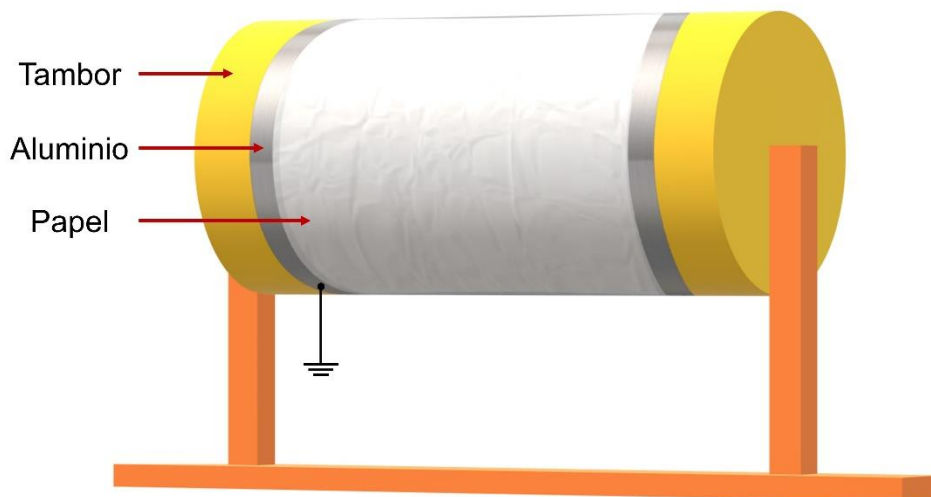


Figura 5. Esquema del colector rotatorio.

#### 9.3.2.2. *El agitador invertido*

La pobre interacción química entre los NCC y la PCL fue corroborada durante los primeros ensayos de electrohilado. En el fondo de la jeringa mostrada en la figura 6 se aprecia un sedimento formado por NCC, los cuales paulatinamente se precipitaron después de algunas horas de haber sido mezclados con la solución de PCL en TFE.

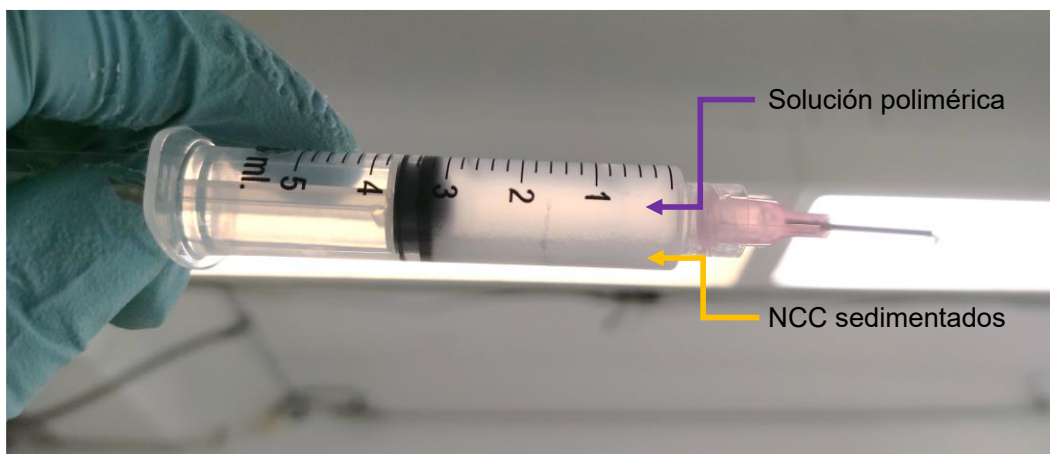


Figura 6. NCC sedimentados en el fondo de una jeringa.

Con el propósito de mantener a los NCC en suspensión mientras se llevaba a cabo el proceso de electrohilado, se diseñó un sistema que permitió electrohilar y agitar la mezcla simultáneamente. El dispositivo se denominó *agitador invertido* (véase la figura 7) ya que, para su incorporación al sistema, se requirió que la jeringa se encontrara debajo de aquel. Una pequeña barra magnética de 3mm × 3mm × 7mm se colocó dentro de la jeringa cargada con la mezcla. Posteriormente se puso en marcha el agitador. De esta forma las nanopartículas se mantuvieron en suspensión durante el electrohilado.



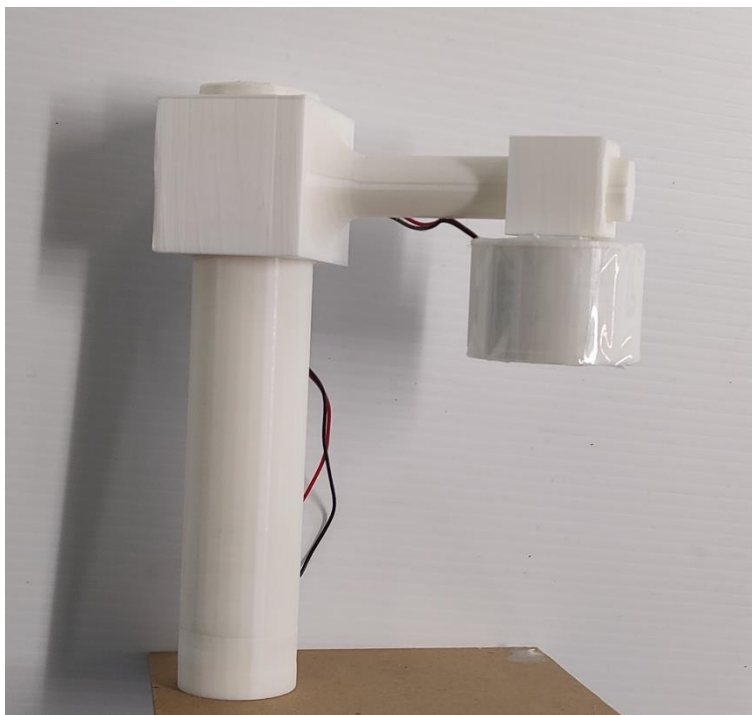


Figura 7. Agitador invertido.

### 9.3.2.3. *El sistema de electrohilado en su conjunto*

El electrohilado de las mezclas fue llevado a cabo como se describe a continuación:

Se utilizó una cabina plástica de 60 cm de largo, 45 cm de ancho y 45 cm de alto. Dentro de dicha cabina se instaló una bomba inyectora (*NE 1000; New Era; Pump Systems Inc.*) y la estructura metálica externa de esta se conectó a la tierra física como medida de seguridad. En el receptáculo de la bomba se colocó una jeringa cargada con 15 mL de la mezcla de interés. El hilador utilizado fue una aguja de 20 Ga en su diámetro interno. Luego se vinculó este primer sistema con el agitador invertido como se describió en la sección anterior. En el lado opuesto se

dispuso el colector rotatorio cuya superficie había sido previamente acondicionada, como se menciona en *El colector de fibras*. Quince centímetros separaron a la aguja y a la superficie del colector entre sí. Mediante cables de calibre 8 (AWG), la fuente de alto voltaje (CZE 1000R; Spellman) fue conectada con la aguja (electrodo positivo) y con el colector (electrodo negativo). Una vez puesto este en marcha, la jeringa fue purgada hasta que una primera gota se hizo visible a la salida de la aguja. En ese momento se inició la dosificación automática de la mezcla a razón de 38  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Veinte kilovolts fueron posteriormente suministrados al sistema. En tal instante comenzó el proceso de electrohilado. En la tabla II se resumen sus parámetros. Esporádicamente y por algunos segundos se incidía una luz verde proveniente de un láser sobre las zonas estable e inestable. De esta forma se revelaban las normalmente invisibles geometrías del cono de Taylor, del *jet* y de las fibras que rápidamente se dirigían al colector. En la figura 8 se esquematiza el sistema de electrohilado en su conjunto. Después de dos horas y media, aproximadamente cinco mililitros de la mezcla habían sido electrohilados. La fuente de alto voltaje fue apagada para desenergizar al sistema y posteriormente se puso en funcionamiento el extractor de gases. Finalmente se retiró el sustrato (papel) del colector y se desprendió de él el producto (figura 9). Así fue obtenida una membrana de superficie amplia bajo condiciones de temperatura y humedad ambientales. El proceso descrito fue llevado a cabo similarmente para las tres muestras (*PCL*, *5NCC/PCL*, *10NCC/PCL*). Sin embargo, durante el electrohilado de *PCL* no se utilizó el agitador invertido. Esto se debió a que aquella mezcla no contenía nanopartículas, por tal motivo no lo requería.

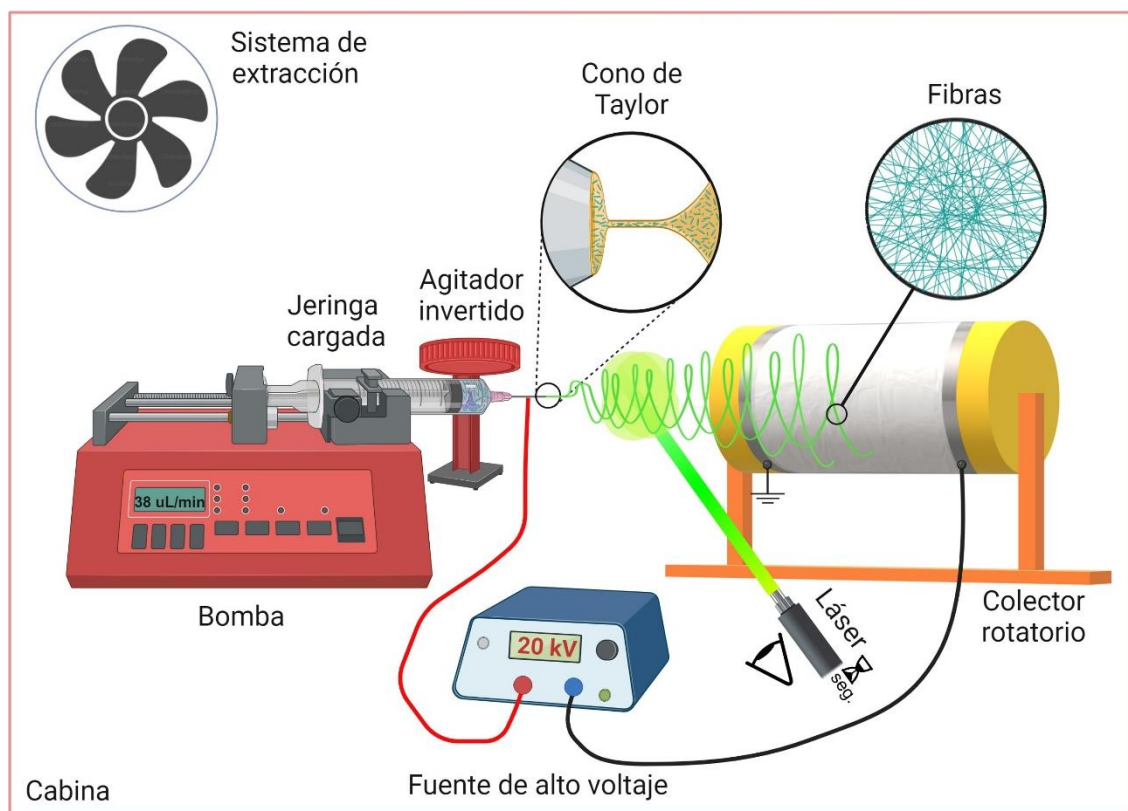


Figura 8. Esquema de la configuración completa del sistema de electrohilado. Creado con *BioRender.com*

Tabla II

*Parámetros*

Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Flujo ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Diámetro interno de la aguja (Ga)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Humedad relativa (%)
20	15	38	20	~ 25	~ 40



Figura 9. Colector y membrana.

## 9.4. Caracterización de los andamios

### 9.4.1. Análisis de su composición química mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (TFIR)

Los modos vibracionales expuestos por las muestras *PCL*, *5NCC/PCL* y *10NCC/PCL* fueron determinados mediante el uso de un espectrofotómetro de luz infrarroja (*Nicolet 6706/Smart Orbit ATR optics*) ubicado en el Laboratorio de Espectroscopía del IIM. Se estableció un intervalo de entre  $4000$  y  $500\text{ cm}^{-1}$  para la adquisición de los datos, los cuales se obtuvieron tras 32 muestreos a una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Las mediciones fueron llevadas a cabo en condiciones ambientales de temperatura. En el programa *OriginPro* se procesó la información obtenida.

#### 9.4.2. Análisis de su cristalinidad mediante difracción de rayos X (DRX)

Mediante la técnica de DRX de haz rasante se obtuvieron los patrones de difracción de los andamios *PCL*, *5NCC/PCL* y *10NCC/PCL*. Los datos fueron obtenidos mediante un difractómetro *D5000 Siemens*. Se utilizó una lámpara de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1.5419 \text{ \AA}$ ). Se estableció un incremento de  $0.002^\circ$  por paso, y cada uno tuvo una duración de 3.2 segundos.

Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera: En la superficie del colector rotatorio se fijó un sustrato rectangular de vidrio. El sistema se puso en marcha y paulatinamente el sustrato fue recubierto por las fibras (figura 10). Después de dos horas y media, una membrana quedó formada sobre aquel. Cuidadosamente se desmontó el sistema para separar el sustrato del colector. Sobre un *portamuestras* para películas se instaló el sustrato (figura 11). El mismo procedimiento fue seguido para preparar todas las muestras de interés.

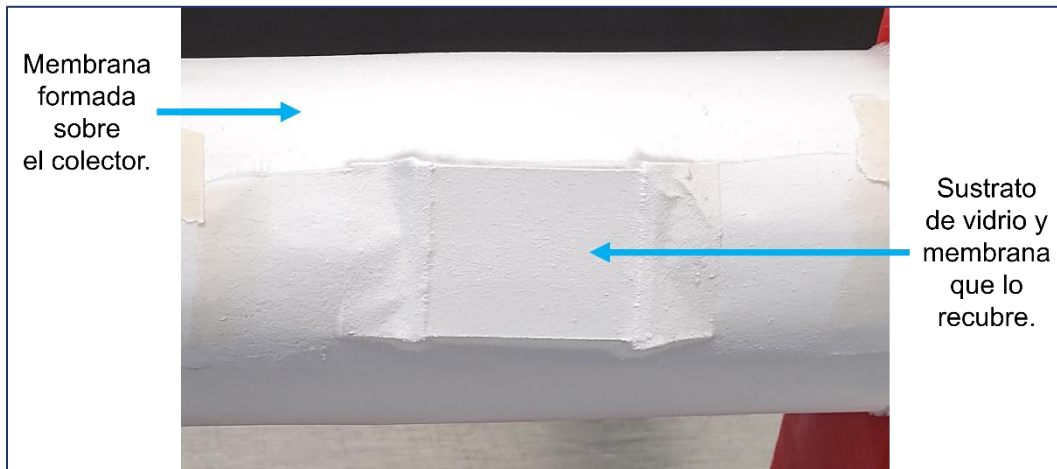


Figura 10. Sistema compuesto por el colector de fibras y el sustrato para obtener muestras para DRX.

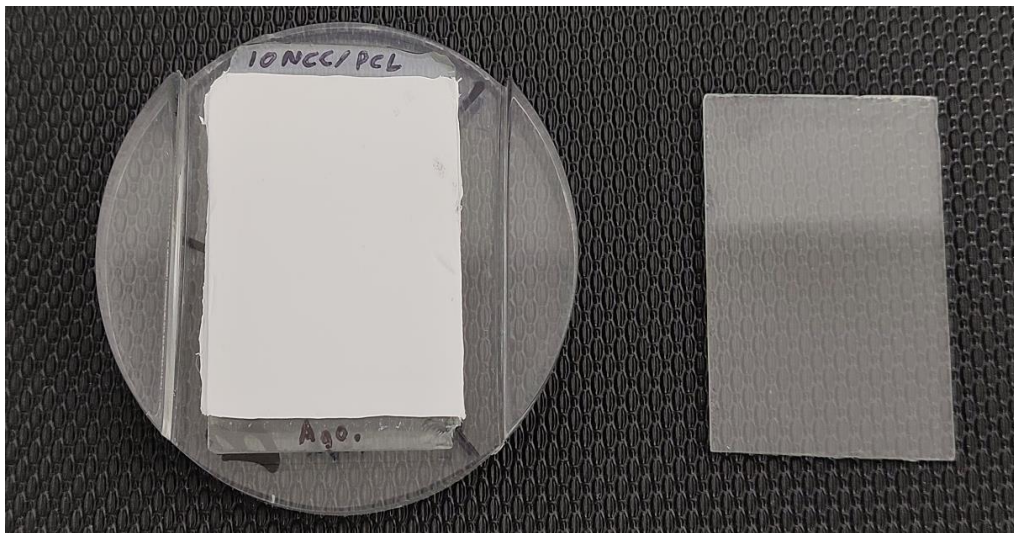


Figura 11. A la izquierda, un portamuestras con un sustrato de vidrio y una membrana sobre este; a la derecha, solo el sustrato.

#### 9.4.3. Análisis de su morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

Se obtuvieron mediante MET micrografías representativas de las fibras de la muestra *10NCC/PCL*, con el propósito de revelar la presencia de NCC y la localización de estos en las fibras.

Las muestras fueron preparadas como sigue: sobre un pequeño sustrato de vidrio se fijó una rejilla de MET (figura 12). Posteriormente, el sustrato se colocó sobre la superficie del colector, tras lo cual se inició el electrohilado de la mezcla de interés. Después de cinco minutos, el proceso fue puesto en pausa para retirar la rejilla, cuya superficie había sido ya recubierta por una delgada membrana fibrosa. Para la observación se utilizó un microscopio electrónico de transmisión *JEM-1200EX*, cuyo voltaje de trabajo se estableció en 100 kV.

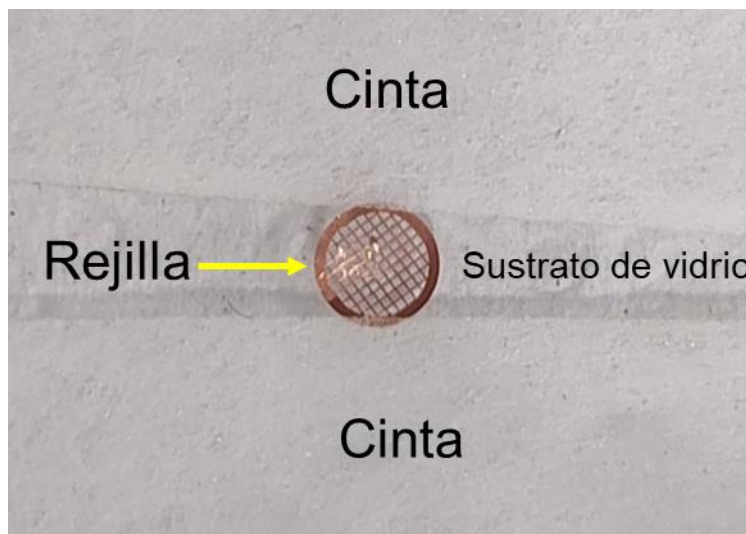


Figura 12. Sistema para obtener muestras para MET. En el centro, una rejilla que permanece fija sobre un sustrato de vidrio mediante cintas.

#### **9.4.4. Análisis de su morfología mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)**

El análisis morfológico de las fibras de los andamios se llevó a cabo mediante MEB con un equipo *JCM6000; BENCHTOP SEM* en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del IIM. Para esto, círculos pequeños (1 cm de diámetro) de las membranas obtenidas fueron colocados en los *portamuestras*. Posteriormente, mediante deposición por pulverización catódica, las muestras fueron recubiertas con oro. Durante la observación se trabajó con un voltaje de 15 kV. A través del programa *ImageJ*, por lo menos el diámetro de cien fibras por cada membrana fue medido a fin de construir los histogramas de frecuencia.

#### **9.4.5. Análisis de sus propiedades mecánicas mediante ensayos de tensión uniaxial (ETU)**

La caracterización mecánica de las membranas fue llevada a cabo mediante ensayos de tensión uniaxial, con base en las normas *ASTM Standards D638* y *D1708*. Se obtuvieron mediante troquelado cinco especímenes (probetas) por cada muestra de interés. Es decir, quince probetas fueron analizadas durante el procedimiento. El espesor de cada probeta fue medido con un indicador de altura *Mitutoyo*. Se utilizó una máquina universal *AGS-X 10KN; Shimadzu* para las pruebas. Se estableció una celda de carga de 100 N y una velocidad de ensayo de 10 mm/min. Ver la figura 13. Así fueron obtenidas las curvas de esfuerzo contra



deformación, los valores correspondientes con el módulo de Young, el máximo esfuerzo ante la rotura y la deformación máxima ante la rotura de cada espécimen. Las pruebas fueron realizadas en el Laboratorio de Pruebas Mecánicas del IIM. La información fue procesada y graficada en *OriginPro*.

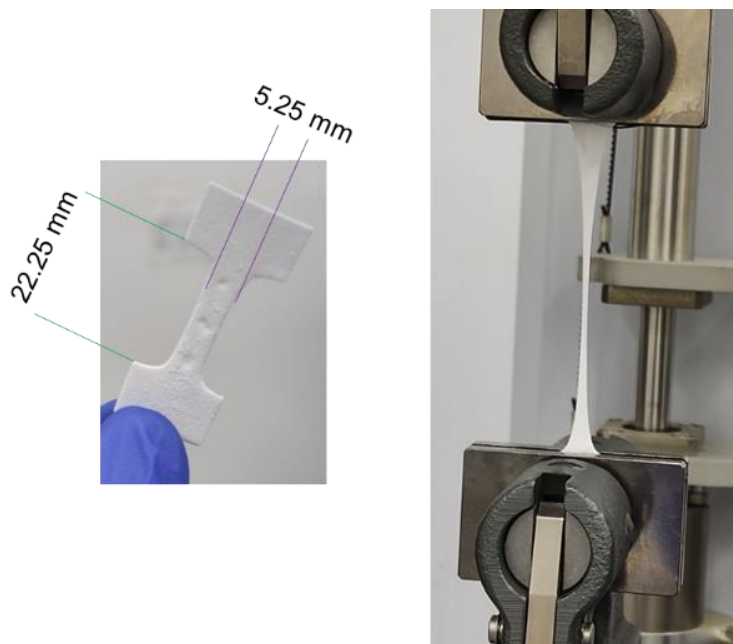


Figura 13. A la izquierda, una probeta representativa; a la derecha, una probeta siendo ensayada

#### 9.4.6. Análisis de su mojabilidad mediante mediciones de ángulos de contacto (MÁC)

Con el propósito de estudiar el comportamiento hidrofóbico o hidrófilo de las muestras, se llevaron a cabo mediciones del ángulo de contacto entre gotas de 0.4  $\mu\text{L}$  de agua destilada y las superficies de las tres membranas de interés (*PCL*, *5NCC/PCL*, *10NCC/PCL*). Cada ensayo tuvo una duración de diez segundos. Las muestras fueron preparadas siguiendo un proceso similar al llevado a cabo para el

estudio de DRX. Es decir, las fibras se depositaron sobre sustratos rectangulares de vidrio. De esta forma fueron obtenidas superficies membranales planas cuya manipulación fue sencilla. Se utilizó un equipo *OCA 15EC; Dataphysics* para realizar cinco estudios por cada membrana. La información fue procesada en el programa *OCA202*, propio del equipo. Las mediciones fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Biomateriales del INR.

#### **9.4.7. Evaluación biológica**

##### *9.4.7.1. Cultivo de células endoteliales del cordón umbilical humano*

La viabilidad celular sobre los andamios fue evaluada con células endoteliales del cordón umbilical humano (*HUVEC; CC-2519A; LONZA*), las cuales fueron generosamente proveídas por la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Las células *HUVEC* que inicialmente habían estado siendo conservadas a -70 °C en *crioviales* con *cryostor* (sustancia preservante), fueron descongeladas con base en el siguiente procedimiento: bajo condiciones de esterilidad (proveídas por una cabina de seguridad biológica tipo II, *ESCO*), dentro de un tubo cónico de 15 mL se preparó una mezcla compuesta por 500 µL de suero fetal bovino (*FBS*) y 5 mL de medio de cultivo [*Endothelial Cell Basal Medium-2 (EBM-2)*]. Posteriormente, el contenido de un *criovial* fue depositado en la mezcla anterior y enseguida el tubo

se agitó manualmente. Después de haber sido integradas las mezclas, el sistema fue centrifugado (mediante un equipo *Rotina 35; Hettich*) por cinco minutos a razón de 2000 rpm. Después de este tiempo, lo sobrenadante fue descartado para conservar únicamente el botón conformado por células sedimentadas. Dicho botón fue resuspendido en 1 mL de medio de cultivo *EBM-2* fresco. Enseguida se tomó una muestra de 10  $\mu$ L de esta suspensión y se mezcló con 90  $\mu$ L de *azul de tripano*. 10  $\mu$ L de esta mezcla se colocaron en una *cámara de Neubauer* y mediante un microscopio de contraste de fases (*CKX41; OLYMPUS*) se determinó el número de células por cuadrante. Con base en la ecuación siguiente se determinó el número total de células vivas:

$$\# \text{ total\_células} = \left( \frac{\# \text{ células\_vivas}}{4} \right) (200,000)(\text{vol.}) \quad (3)$$

$\# \text{ total\_células}$  correspondió con la cantidad de células vivas que se encontraron en la suspensión, mientras que  $\# \text{ células\_vivas}$  se refirió a la cantidad de células vivas en los cuatro cuadrantes. Finalmente, *vol.* fue el volumen total de medio de cultivo en el que se encontraban suspendidas las células.

Con base en las proporciones anteriores, 300,000 células *HUVEC* fueron distribuidas y sembradas en una placa de seis pozos, cuyos fondos fueron recubiertos previamente con una delgada capa de colágena. Posteriormente se agregó 1 mL de medio de cultivo *EGM-2* (medio *EBM-2* enriquecido con factores de

crecimiento) a cada pozo. Mediante un equipo *UN-4750; NUAIRE* las células se incubaron a 37 °C en un ambiente con el 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de haber transcurrido 24 h se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio fresco. Los siguientes cambios de medio de cultivo ocurrieron cada cuatro días. Ver la figura 14. Con base en este procedimiento se alcanzó una confluencia celular de entre el 90 y el 100 % (figura 15) en cada pozo. Esto permitió disponer de suficientes células tanto para la experimentación como para almacenar en congelamiento.

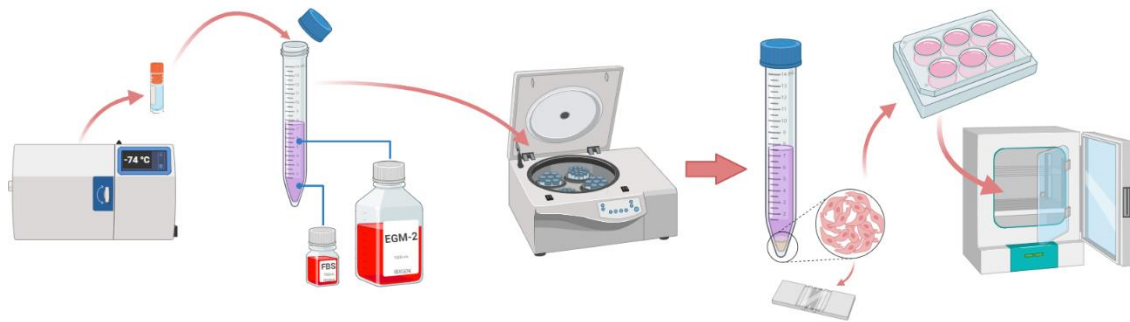


Figura 14. Proceso de descongelamiento y siembra de células *HUVEC*. Creado con *BioRender.com*

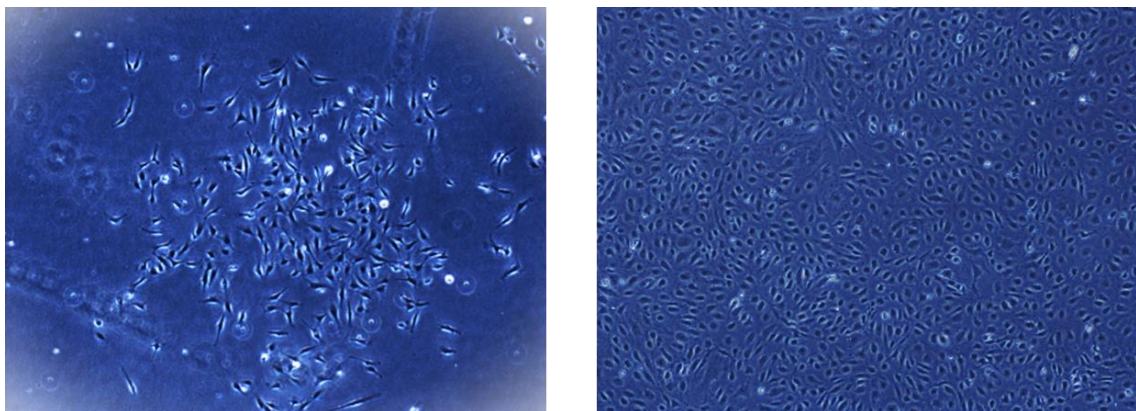


Figura 15. Imágenes de microscopía de contraste de fases de células *HUVEC* al 10 (izquierda) y al 100 % (derecha) de confluencia.

#### 9.4.7.2. Estudio de viabilidad celular con «MTT»

Se obtuvieron mediante troquelado diez círculos de 6.3 mm de diámetro a partir de cada una de las tres muestras (*PCL*, *5NCC/PCL*, *10NCC/PCL*). Posteriormente, los treinta especímenes fueron agrupados, lavados con *PBS* y sumergidos en etanol durante treinta minutos. Dentro de una campana de seguridad biológica (cabina de seguridad biológica tipo II, *ESCO*) se permitió el secado a temperatura ambiental de los andamios. Finalmente, los andamios fueron expuestos ante luz ultravioleta durante quince minutos por cada lado. Así fueron obtenidos; desinfectados y esterilizados los especímenes. Cada uno de ellos fue colocado en el fondo de pozos de placas de cultivo (*96 well cell culture cluster*, *COSTAR*) con base en el orden presentado en la figura 16. Es importante destacar que el diámetro de los especímenes permitió que, mediante presión, por sí solos permanecieran fijos en el fondo de los pozos.

Con base en un procedimiento similar al llevado a cabo anteriormente, cinco mil células *HUVEC* suspendidas en 100  $\mu$ L de medio de cultivo *EGM-2* fueron depositadas en cada pozo con membrana. Posteriormente, 100  $\mu$ L más de medio de cultivo fueron depositados en los pozos. Finalmente, las células fueron incubadas a 37 °C en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5 %. Mientras que los andamios *PCL* conformaron el grupo *control*, pozos sin células y con medio de cultivo fueron establecidos como *controles negativos*. Por otro lado, los *controles positivos* consistieron en células sembradas sobre una ligera capa de colágena que había sido dispuesta previamente en los pozos correspondientes. Los *controles negativos* fueron

utilizados para evaluar si los cambios observados fueron atribuibles a las variables de interés. Por otro lado, los *controles positivos* permitieron validar el diseño experimental propuesto. En total, dos placas fueron preparadas: una se utilizó en el primer ensayo; la otra, en el segundo.

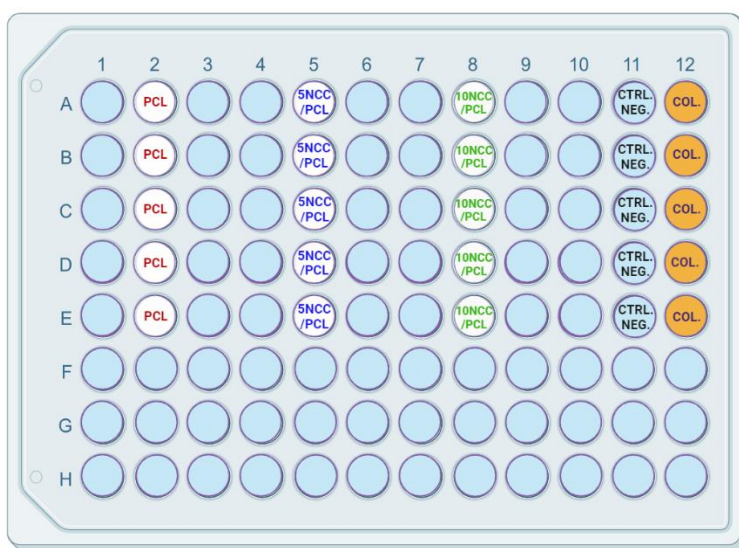


Figura 16. Distribución de los especímenes en los pozos de la placa de cultivo: **PCL** [2A:2E]; **5NCC/PCL** [5A:5E]; **10NCC/PCL** [8A:8E]; **control negativo** [11A:11E] y **control positivo** (colágena) [12A:12E]. Creado con *BioRender.com*

El primer ensayo de viabilidad celular con *MTT* se llevó a cabo después de 72 h (tres días) de haber sido sembradas las células sobre los andamios; el segundo, después de 168 h (siete días). Los ensayos consistieron en lo siguiente: se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pozos y se sustituyó por medio de cultivo *EGM-2* fresco (100  $\mu$ L/pozo). Enseguida se añadieron 10  $\mu$ L de solución de *MTT* a cada pozo. Posteriormente, el sistema se incubó por cuatro horas a una temperatura de 37 °C. Después de haber transcurrido este tiempo, se removió el

medio de cultivo de los pozos y se agregaron 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada uno. Con ayuda de una pipeta mecánica, los cristales de formazán (consecuencia del metabolismo de las células) fueron disueltos en el DMSO. Enseguida se tomaron alícuotas de las soluciones obtenidas. Finalmente, la absorbancia de aquellas fue leída a 540 nm [según la guía del *protocolo rápido* con el *CyQUANT MTT Cell Proliferation Assay Kit (V13154, Invitrogen)*] en un espectrofotómetro de *UV-Vis NANODROP ONE<sup>C</sup>; Thermo Fisher Scientific Inc.* Un resumen gráfico de este proceso se presenta en la figura 17. A partir de la información obtenida y con base en la ecuación siguiente se construyeron las gráficas de viabilidad celular.

$$\% VC = \frac{D.O. \text{ muestra}}{D.O. \text{ control}} \times 100 \quad (4)$$

El porcentaje de viabilidad celular se representó en la ecuación anterior como %VC. Por otra parte, *D. O. muestra* representó la absorbancia de cada una de las alícuotas correspondientes con las muestras estudiadas. Finalmente, *D.O. control* se refirió a la absorbancia de las alícuotas relacionadas con la muestra *PCL*.

El *software OriginPro* permitió procesar los datos de viabilidad celular mediante un análisis de varianza de una dirección (*Anova*) y una prueba de comparaciones múltiples *Tukey*. Se consideraron como valores estadísticamente

significativos aquellos en los que  $p$  fue menor o igual que 0.05. Esto es, \*  $p \leq 0.05$ ;

\*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; ns: no significativo.

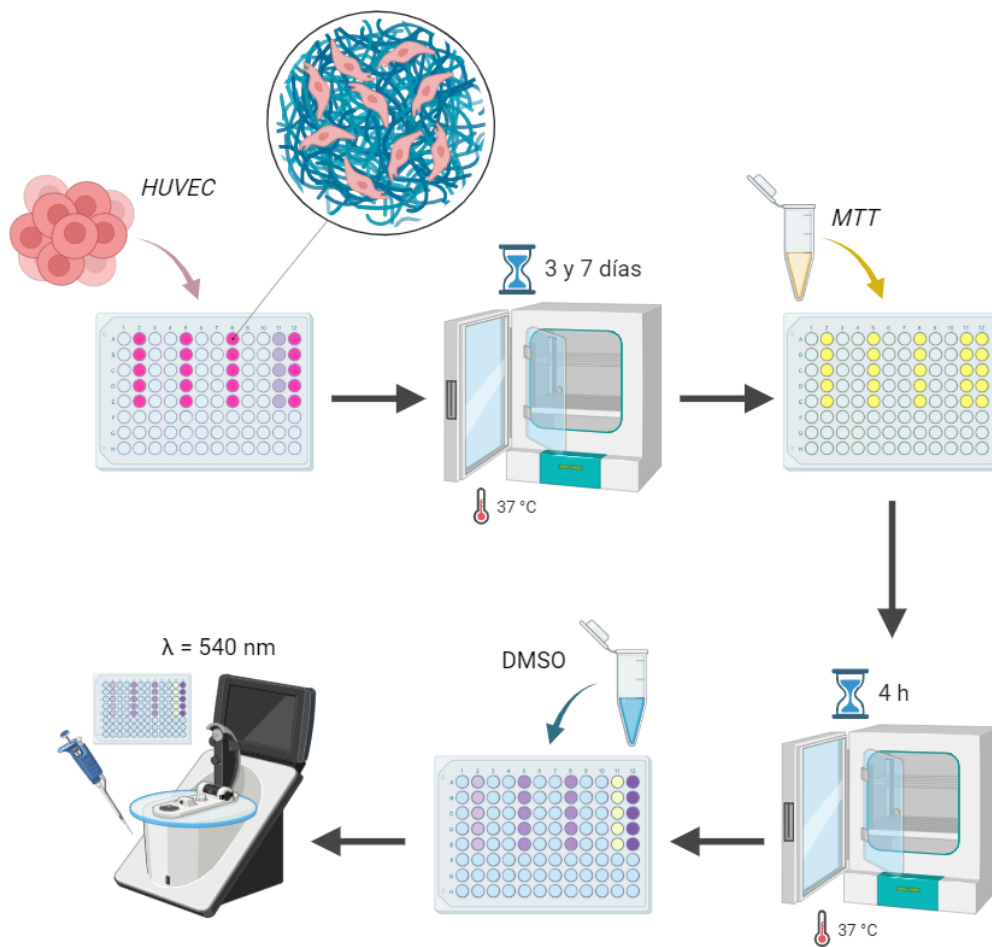


Figura 17. Resumen gráfico del ensayo con MTT. Creado con BioRender.com.



## 10. Resultados y discusión

### 10.1. Caracterización de los nanocristales de celulosa

#### 10.1.1. Análisis de su composición química mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (TFIR)

Los modos vibracionales típicos de la celulosa exhibieron picos tanto en el espectro de la muestra de algodón como en el de NCC (figura 18). Por ejemplo, en la región que se encuentra alrededor de  $3310\text{ cm}^{-1}$  pudo apreciarse la banda correspondiente con el grupo -OH de la celulosa, mientras que en  $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$  se encontró la banda relacionada con las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-H. Por otra parte, en la región comprendida entre  $\sim 1800$  y  $\sim 800\text{ cm}^{-1}$  se apreciaron las vibraciones correspondientes con la deformación, el balanceo y la flexión de unidades de anhidroglucopiranososa [28]. A su vez, alrededor de  $898\text{ nm}^{-1}$  se presentó la banda correspondiente con los enlaces  $\beta$ -glucosídicos de la celulosa [28], [31]. Esta información permite sostener que todos los picos del espectro de los NCC están relacionados con la estructura de la celulosa. Por lo tanto, el método de hidrólisis parcial ácida es efectivo para preservar la composición química de la celulosa en las nanopartículas.

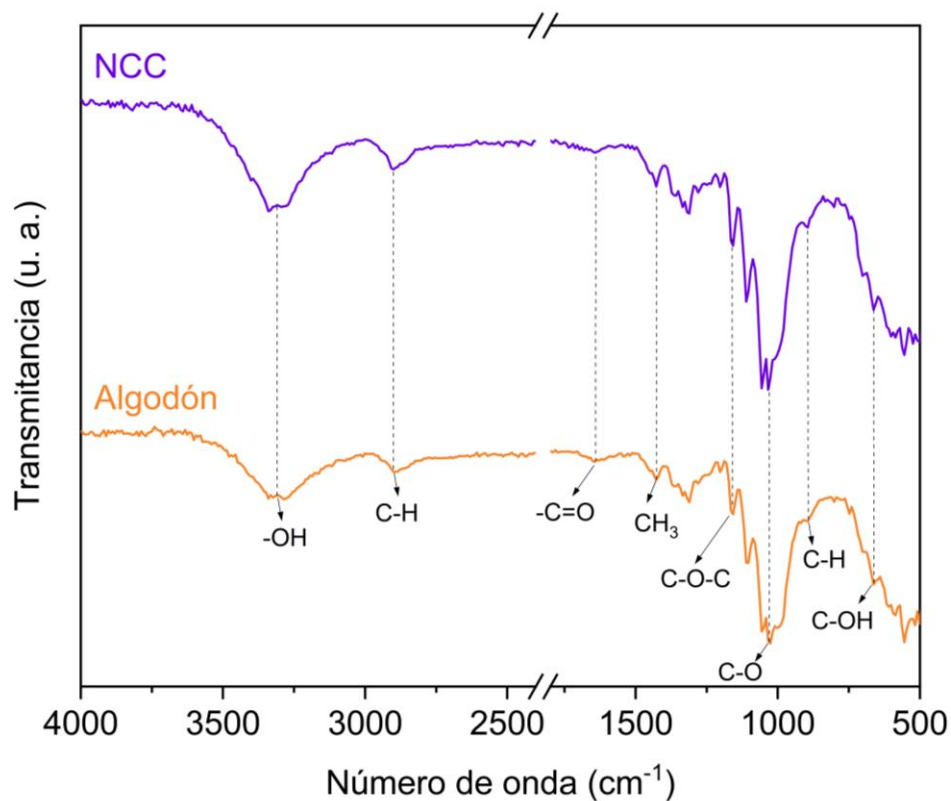


Figura 18. Espectros de TFIR del algodón y de los NCC.

### 10.1.2. Análisis de su cristalinidad mediante difracción de rayos X (DRX)

El difractograma de rayos X de los NCC se muestra en la figura 19. Como se observa, los picos de difracción se encuentran en  $2\theta = 16.5^\circ$ ,  $22.7^\circ$  y  $34.2^\circ$ , los cuales corresponden con los planos cristalinos (110), (200) y (004), respectivamente. Con base en el hecho de que la celulosa nativa exhibe estos picos de difracción en su estructura cristalina subalomorfa I $\beta$  (de celda unitaria monoclinica), puede establecerse que dicha estructura fue conservada aun después de haber ocurrido un tratamiento ácido de extracción [5], [27].

A partir de la ecuación de Scherrer (ec. 1) se determinó el tamaño transversal promedio de los cristalitas de la muestra en forma de polvo de NCC. El valor de *FWHM* se calculó mediante el programa *OriginPro*, y fue de 1.5862. Por lo tanto, se encontró que el tamaño transversal promedio de los cristalitas fue de  $L = 4.88$  nm. Por otro lado, utilizando la ec. 2, la muestra estudiada presentó un índice de cristalinidad de alrededor del 75 %. Tal valor es coherente con lo encontrado en diversas investigaciones cuyo fundamento de obtención de NCC es la hidrólisis ácida parcial de celulosa vegetal [27], [28], [31].

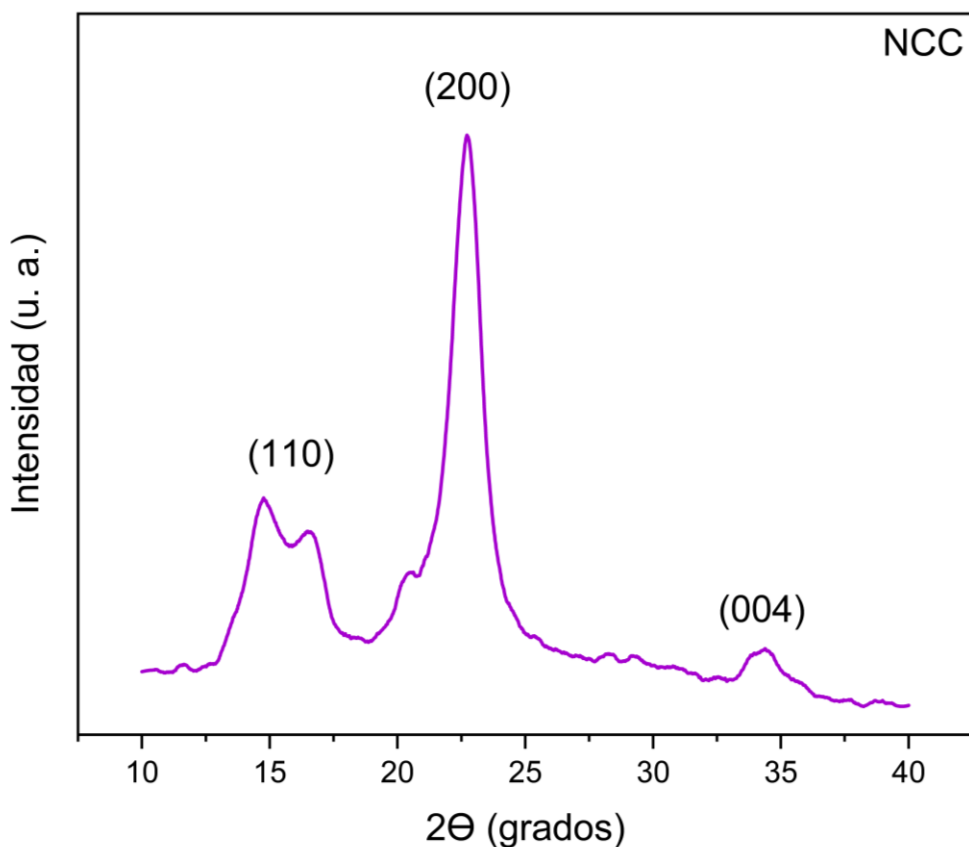


Figura 19. Difractograma de rayos X de los NCC.

### 10.1.3. Análisis de su morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

Como puede observarse en la figura 20, mediante la técnica de MET fue corroborada y examinada la típica forma de varilla de los NCC. Para estudiar su tamaño se analizó tanto su anchura como su longitud. En promedio, los NCC midieron  $40.0 \pm 13.0$  nm de ancho y  $169.8 \pm 82.8$  nm de largo (figura 21). No obstante este último valor, las partículas fueron de hecho nanomateriales porque se alinearon con la definición respectiva: *Los nanomateriales son aquellas estructuras cuyo tamaño se encuentra entre 1 y 100 nm en al menos una de sus dimensiones* [32], [33]. En promedio, la relación de aspecto de los NCC fue de 4.24. Es decir, las estructuras fueron más largas que anchas.

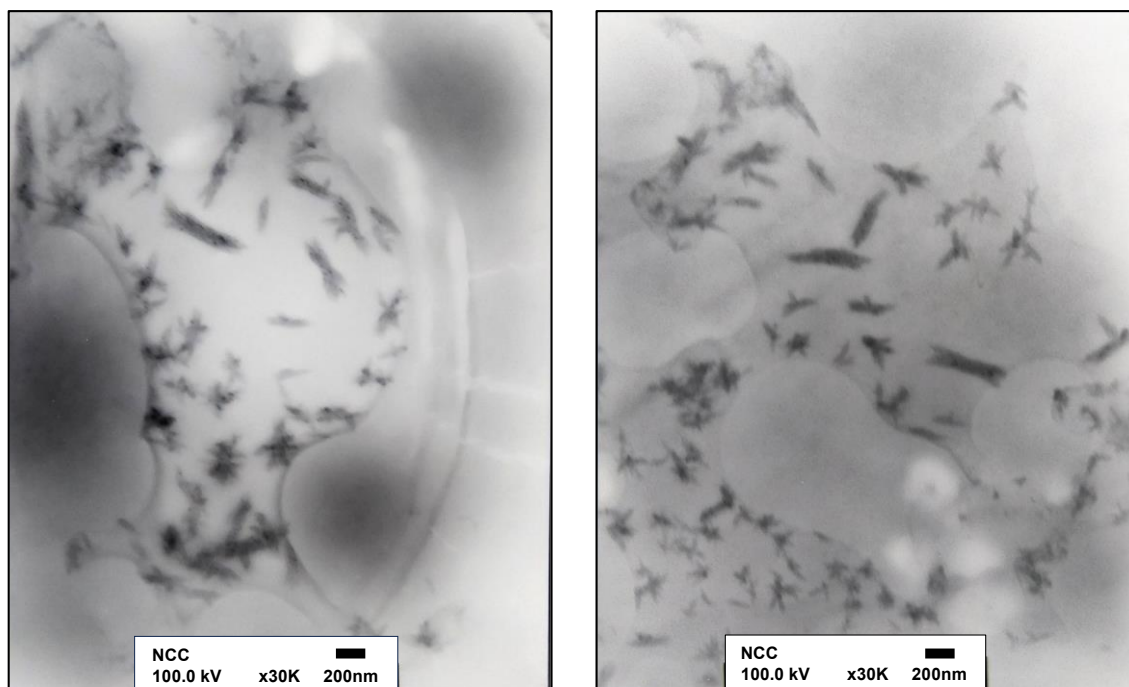


Figura 20. Micrografía obtenida mediante MET de los NCC.

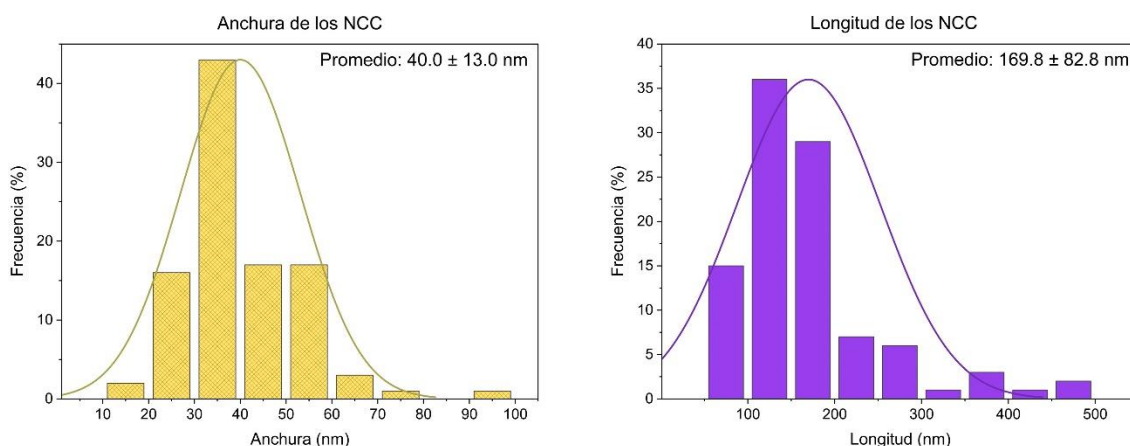


Figura 21. Histogramas de frecuencia de anchura y longitud de los NCC.

## 10.2. Caracterización de los andamios

### 10.2.1. Análisis de su composición química mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (TFIR)

Con base en los espectros obtenidos mediante TFIR se estudió la composición química de los andamios. En la figura 22 se observan fuertes bandas características de la PCL en las muestras *PCL*, *5NCC/PCL* y *10NCC/PCL*. Por ejemplo, alrededor de  $2946\text{ cm}^{-1}$  y de  $2865\text{ cm}^{-1}$  se presentaron los picos referentes a los modos vibracionales del estiramiento asimétrico y simétrico, respectivamente, del grupo  $\text{CH}_2$ . A su vez, en  $1725\text{ cm}^{-1}$  se identificó el estiramiento del grupo carbonilo y en  $1296\text{ cm}^{-1}$  se encontró el estiramiento del grupo C-C. Por otra parte, alrededor de  $1240\text{ cm}^{-1}$  y de  $1170\text{ cm}^{-1}$  se exhibieron los picos correspondientes con el estiramiento asimétrico y simétrico, respectivamente, del grupo C-O-C. [12], [34]

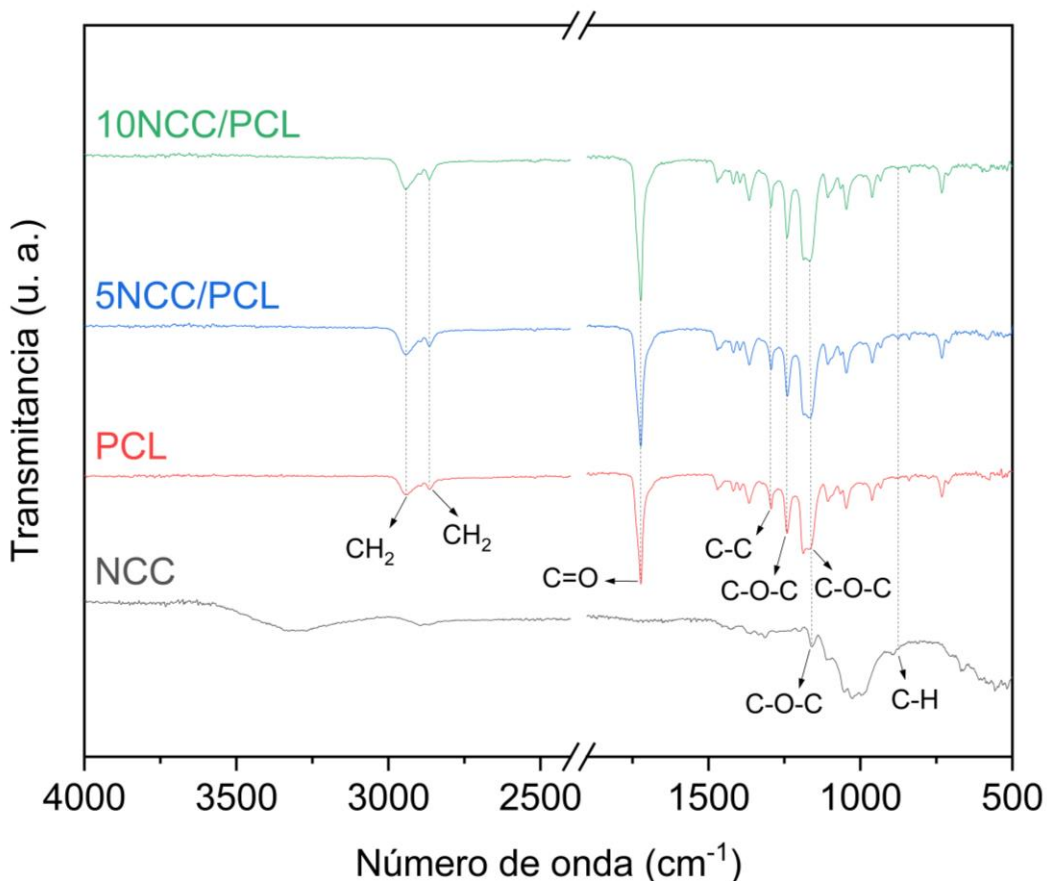


Figura 22. Espectros de TFIR de los NCC y de las muestras *PCL*, *5NCC/PCL* y *10NCC/PCL*.

En contraste, los picos típicos relacionados con los modos vibracionales de los NCC no fueron fácilmente apreciables en el espectro de *5NCC/PCL* ni en el de *10NCC/PCL*. Este comportamiento probablemente se debió a que las intensas bandas relacionadas con los modos vibracionales de la PCL pudieron haber enmascarado a las de los NCC, toda vez que las concentraciones de estos en las mezclas fueron bajas. No obstante, la principal contribución de los NCC se encontró alrededor de  $1170\text{ cm}^{-1}$ . Dicha banda corresponde con el estiramiento simétrico del grupo C-O-C de la celulosa. Ver la figura 23. Con base en esto, puede sostenerse

que no ocurrieron reacciones químicas entre los NCC y la PCL. Además, es posible afirmar que las nanopartículas fueron efectivamente incorporadas a la matriz polimérica.

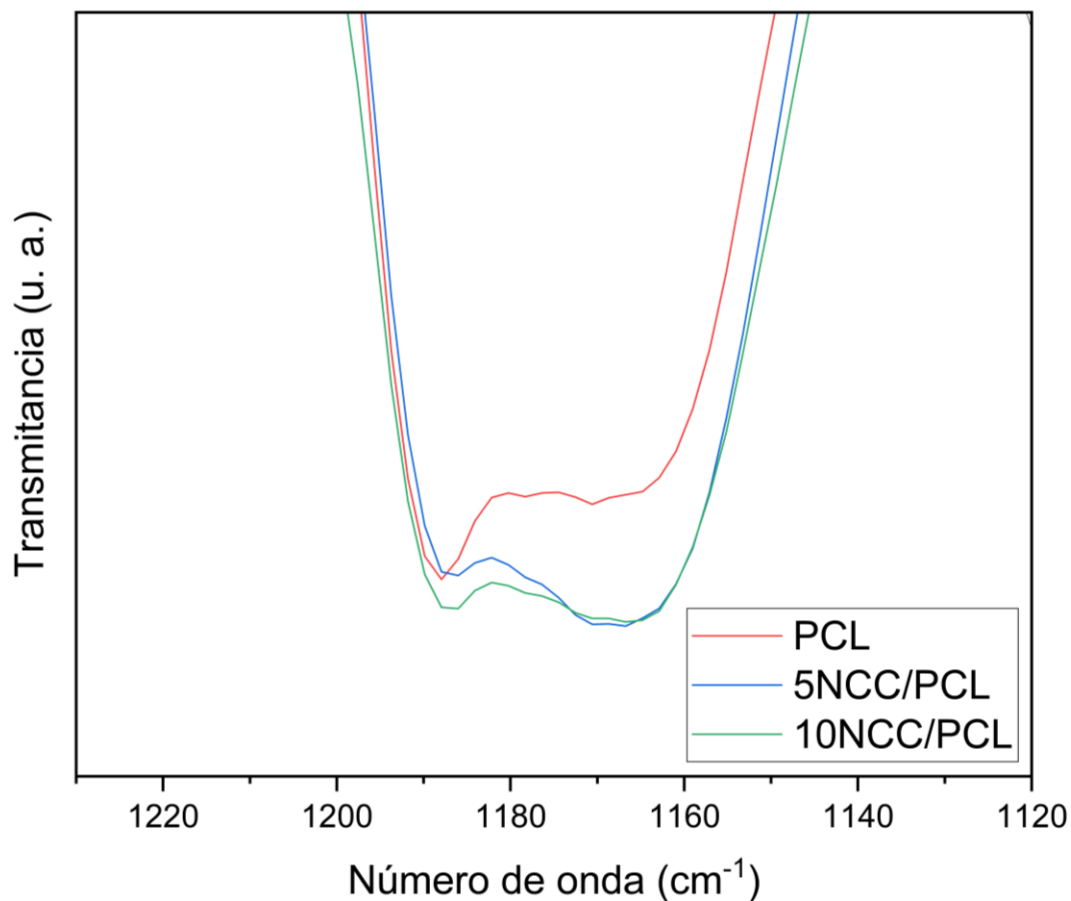


Figura 23. Espectros de TFIR de *PCL*, *5NCC/PCL* y *10NCC/PCL* entre 1230 y 1120  $\text{cm}^{-1}$ .

### 10.2.2. Análisis de su cristalinidad mediante difracción de rayos X (DRX)

En la figura 24 se muestran los difractogramas de rayos X de las tres muestras estudiadas (*PCL*, *5NCC/PCL*, *10NCC/PCL*), cuyos picos de difracción correspondieron con los picos típicos de la policaprolactona. No obstante, el siguiente comportamiento fue encontrado durante la examinación:

Mientras que en *PCL* los picos de difracción se encontraron en  $2\Theta = 21.70^\circ$ ,  $24.06^\circ$  y  $30.16^\circ$ , correspondientes con los planos cristalográficos (100), (200) y (006) [carta cristalográfica *PDF CARD 00-062-1286*], en *5NCC/PCL* y en *10NCC/PCL* los picos de difracción se encontraron desplazados hacia la izquierda con respecto de la posición de los picos de *PCL*. Es decir, en la muestra *5NCC/PCL* los picos se exhibieron en  $2\Theta = 21.27^\circ$  y  $23.62^\circ$ . A su vez, los de *10NCC/PCL* se presentaron en  $2\Theta = 21.41^\circ$  y  $23.77^\circ$ .



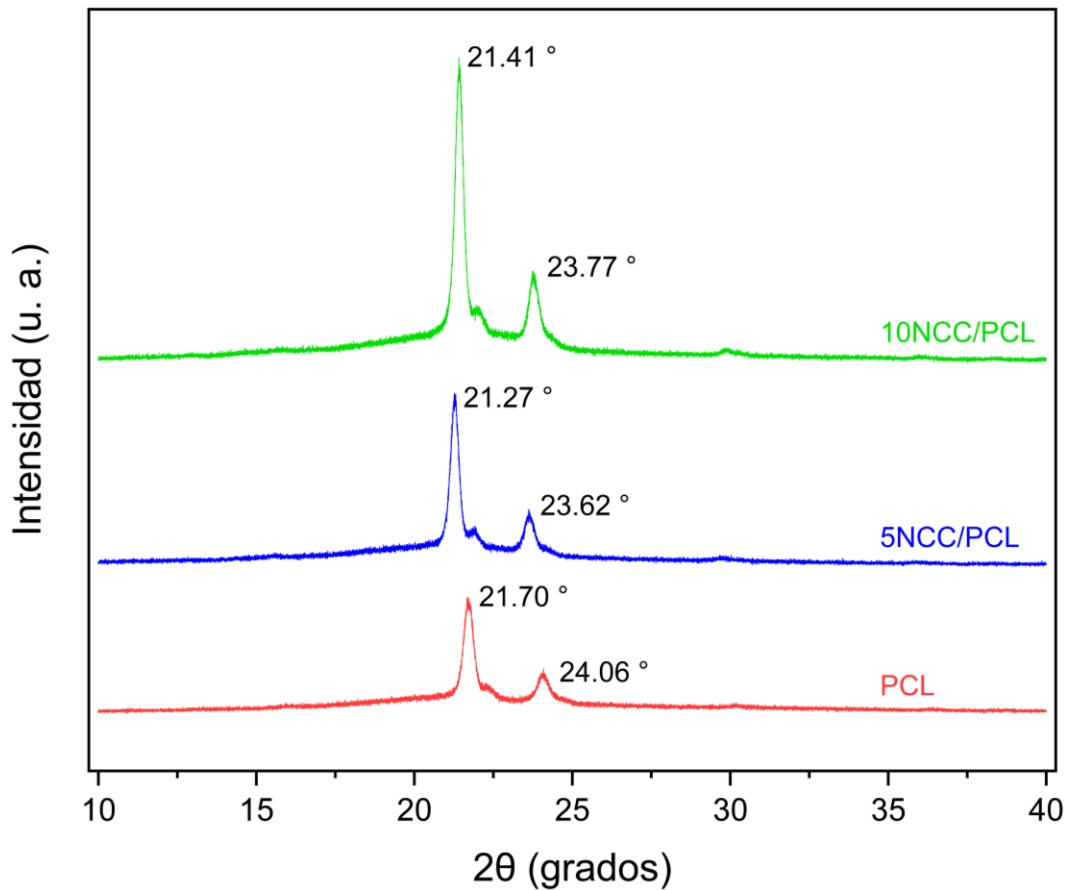


Figura 24. Difractogramas de rayos X de las muestras *PCL*, *5NCC/PCL* y *10NCC/PCL*.

Por otro lado, al analizar detalladamente los difractogramas presentados en la figura 25, se encontraron incrementos en las intensidades de los picos de difracción de cada muestra. Este comportamiento indica una relación directa entre la intensidad de los picos y la concentración de NCC en los especímenes. Con respecto de los picos de *PCL*, la intensidad de los de *10NCC/PCL* aumentó un 156 %; los de *5NCC/PCL*, un 51 %. Además, al calcular los parámetros de red de las estructuras cristalinas ortorrómbicas teóricas de la PCL, se encontró que los

volúmenes de las celdas tendieron a incrementar ante la incorporación de NCC en la matriz polimérica, como se ve en la tabla III.

Tabla III

*Parámetros de red*

Muestra	a (Å)	b (Å)	c (Å)	Volumen (Å <sup>3</sup> )
<i>PCL</i>	7.397	4.924	17.779	647.732
<i>5NCC/PCL</i>	7.533	5.016	17.930	677.646
<i>10NCC/PCL</i>	7.486	4.990	17.954	670.778

La información obtenida permite sostener que los cambios en la intensidad de los picos de difracción probablemente fueron consecuencias de una acción *nucleante* aportada por los NCC [35], [36], [37]. Es decir, posiblemente durante la solidificación de la PCL tras el electrohilado, las superficies cristalinas de los NCC incorporados en las muestras *5NCC/PCL* y *10NCC/PCL* aportaron puntos de inicio (o agentes *nucleantes*) para la cristalización del polímero de base [38]. Como consecuencia, picos más intensos se encontraron en los difractogramas correspondientes con cada muestra. Además, las dos muestras compuestas por PCL y NCC presentaron un corrimiento en sus picos de difracción con respecto de la muestra que contenía PCL exclusivamente.

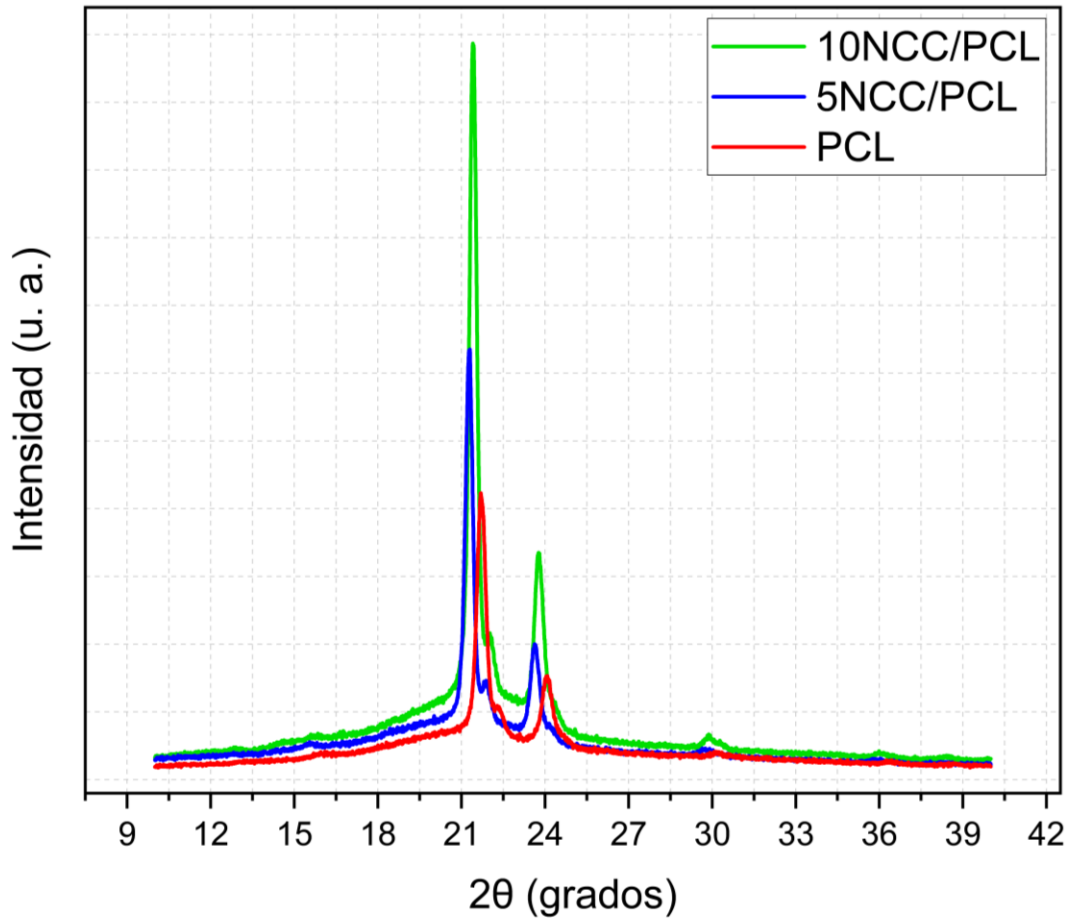


Figura 25. Comparación de las intensidades de los picos de difracción de rayos X de las muestras *PCL*, *5NCC/PCL* y *10NCC/PCL*.

Los resultados obtenidos contradicen los encontrados por Hivechi A., *et. al.* [25] toda vez que concluyeron que los NCC se comportaron como agentes *antinucleantes* en una matriz de PCL. Aunque los NCC utilizados en el trabajo mencionado provinieron de algodón, cabe mencionar que el diseño experimental propuesto por los autores difiere, entre otros aspectos, en el tipo de disolvente para la PCL, los parámetros de electrohilado y en las concentraciones de los materiales. Ver *Antecedentes*.

### 10.2.3. Análisis de su morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las imágenes de MET de la muestra **10NCC/PCL** revelaron la presencia de los NCC, los cuales se señalan con flechas en la figura 26. Como puede apreciarse, las nanopartículas se ubicaron en la superficie de las fibras. Este comportamiento probablemente se debió a que las moléculas de la PCL son polarizadas durante el electrohilado de esta. Es decir, mientras que la superficie del chorro de la solución posee carga positiva, la de su centro es negativa [39]. Como consecuencia de la carga negativa de los NCC, estos son atraídos hacia el exterior, el cual está cargado positivamente. Como ya se ha explicado anteriormente, los NCC tienden a aglomerarse. Por esta razón, un tamaño desigual de partículas se encontró en las fibras.

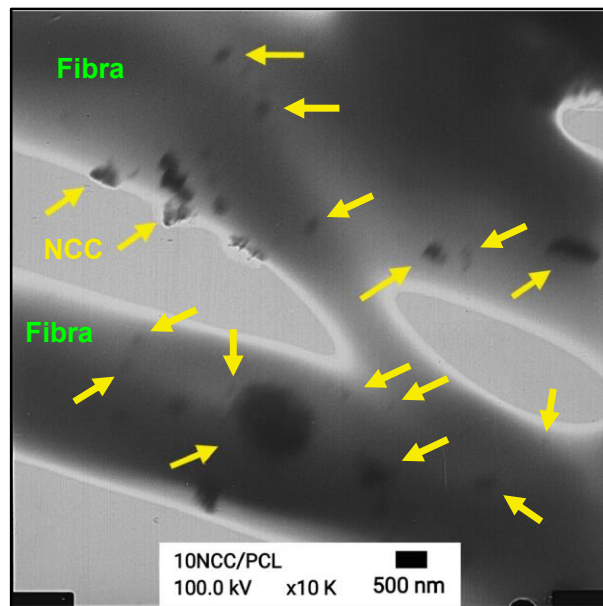


Figura 26. Micrografía electrónica de transmisión de fibras con NCC (destacados mediante flechas amarillas) en su superficie. Muestra: **10NCC/PCL**.

#### 10.2.4. Análisis de su morfología mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

El análisis morfológico de las membranas mediante MEB permitió constatar la composición fibrilar de las muestras. Como se observa en la figura 27, los andamios resultantes estuvieron conformados por fibras con orientación aleatoria. Este comportamiento fue una consecuencia del método de recolección, toda vez que la velocidad de sistema colector fue relativamente baja. Por otro lado, en todas las muestras hubo visibles *poros* interconectados formados por la intersección entre las fibras. Sin embargo, una magnificación mayor se requiere para estudiar la porosidad propia de cada fibra. Otra característica notable es el diámetro fibrilar en cada una de las membranas: como se aprecia en los histogramas correspondientes, para *PCL*, *5NCC/PCL* y *10NCC/PCL*, el diámetro promedio de las fibras fue de  $1.770 \pm 0.350 \mu\text{m}$ ,  $1.371 \pm 0.537 \mu\text{m}$  y  $1.136 \pm 0.489 \mu\text{m}$ , respectivamente. Es decir, ante el aumento de la concentración de NCC en las membranas se obtuvieron fibras más delgadas. Esta tendencia decreciente en cada muestra pudo haber sido debida a los efectos sinérgicos de los NCC en la conductividad eléctrica, la tensión superficial y la viscosidad de las mezclas electrohiladas [40], [41].

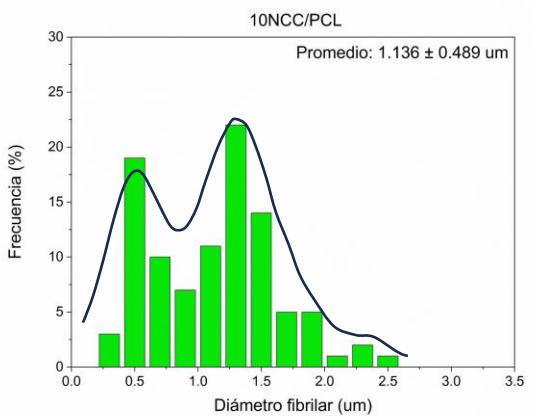
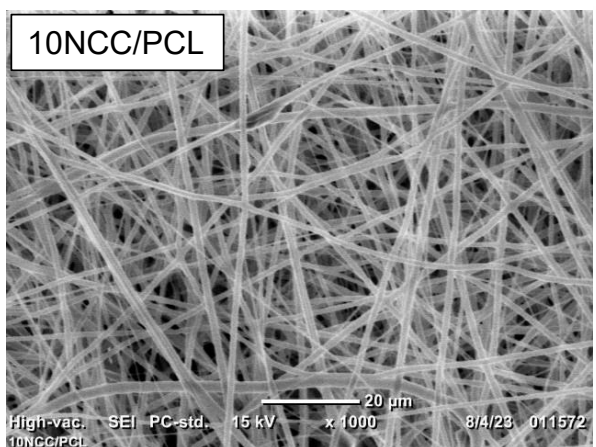
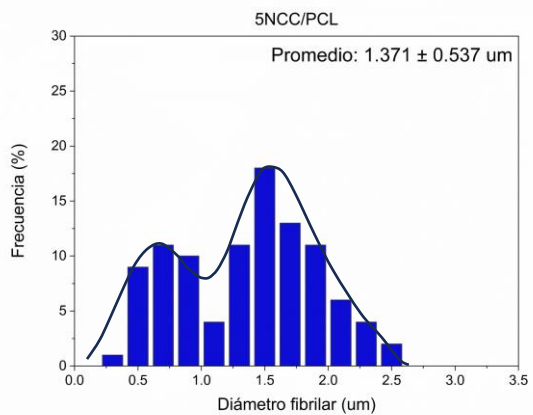
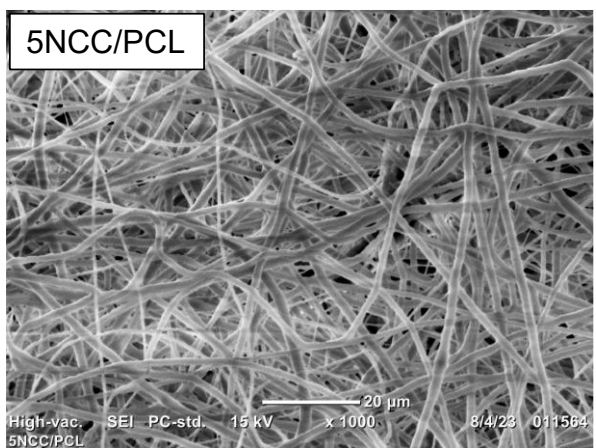
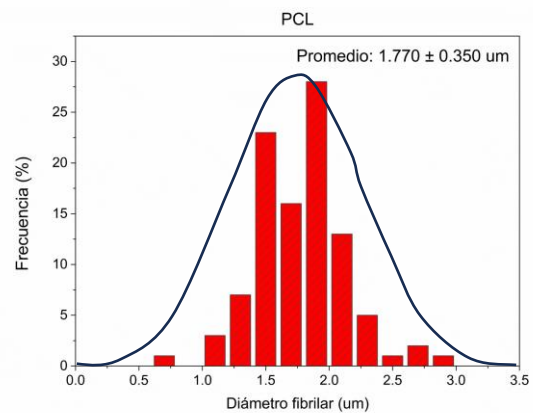
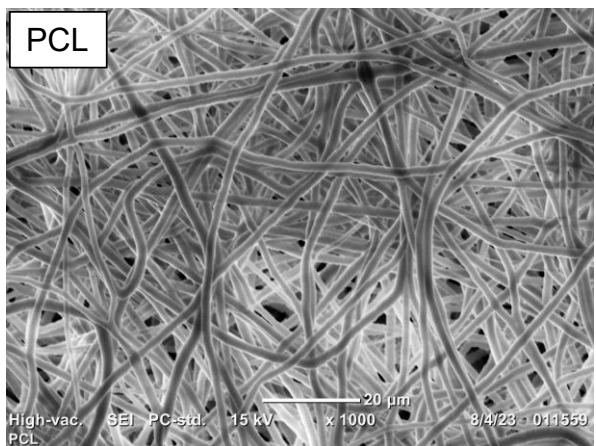


Figura 27. Imágenes representativas de MEB de las membranas *PCL*, *5NCC/PCL* y *10NCC/PCL* y sus respectivos histogramas de frecuencia de diámetro fibrilar.

### 10.2.5. Análisis de sus propiedades mecánicas mediante ensayos de tensión uniaxial (ETU)

Mediante ensayos de tensión uniaxial a cinco especímenes por cada muestra, fueron obtenidas las curvas de esfuerzo contra deformación que se presentan en las secciones A (*PCL*), B (*5NCC/PCL*) y C (*10NCC/PCL*) de la figura 28. Como se aprecia, comportamientos semejantes se presentaron en cada grupo de curvas. Por lo tanto, se sugiere que las muestras fueron consistentes en términos de homogeneidad constitutiva [42], no obstante los diámetros variables de sus fibras ni la orientación aleatoria de estas. Además, al ser los ensayos realizados bajo condiciones controladas, pudo observarse reproducibilidad en los experimentos.

Las curvas de esfuerzo contra deformación de la muestra *PCL* presentaron un esfuerzo relativamente alto debido a la naturaleza semicristalina del polímero que la constituyó. Esto concuerda con el hecho de que si un polímero posee características cristalinas, generalmente presenta una mejor resistencia [42]. Por otro lado, debido a la baja velocidad de rotación del colector durante el electrohilado, las fibras resultantes se encontraron aleatoriamente distribuidas. Esto podría conllevar a sugerir que las propiedades mecánicas de las membranas ensayadas fueron isotrópicas. Por lo tanto, podría sostenerse que la rigidez de la muestra es igual en todas las direcciones [43].

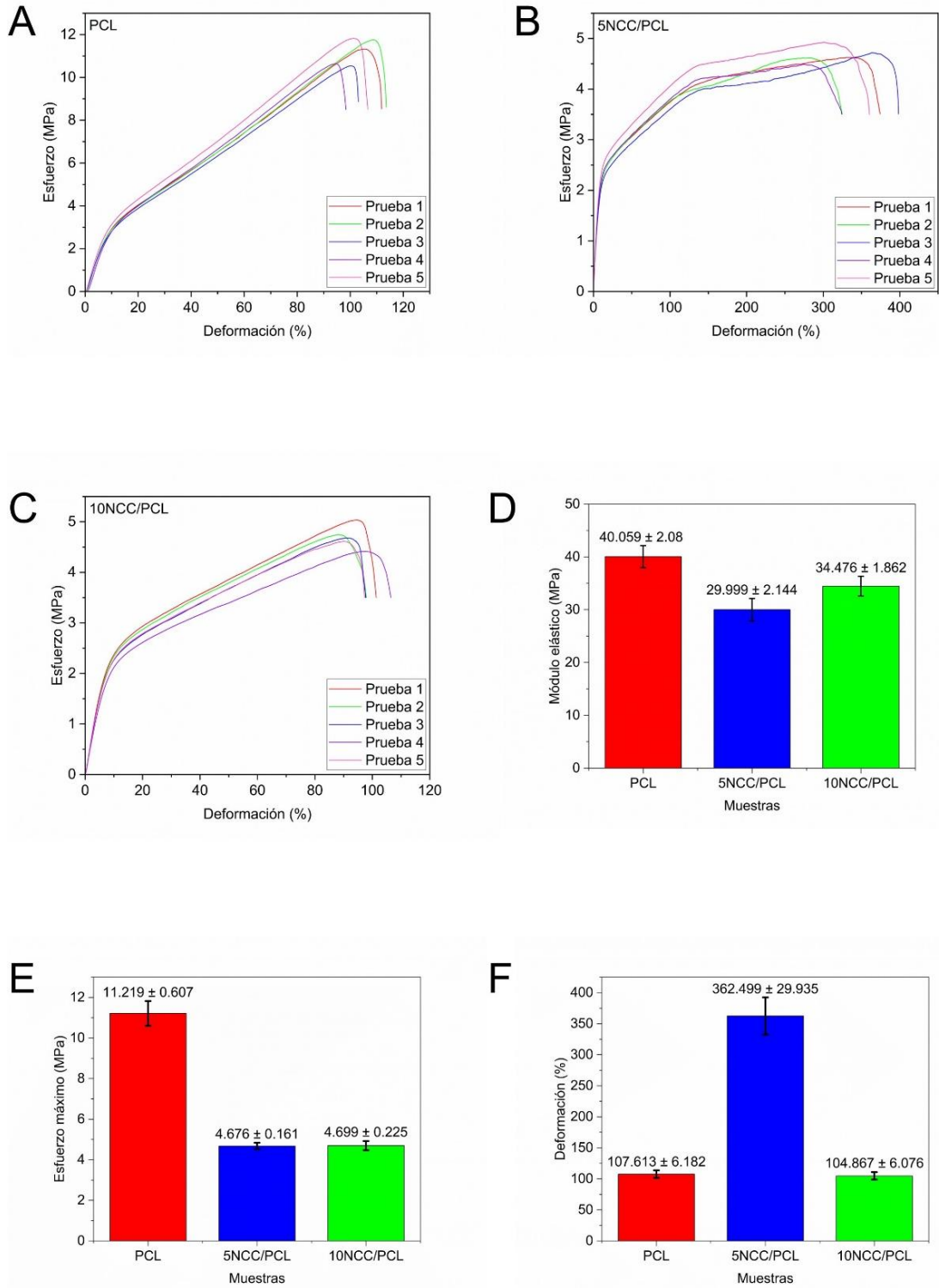


Figura 28. Diagramas de esfuerzo contra deformación de *PCL* (A), *5NCC/PCL* (B) y *10NCC/PCL* (C); módulos elásticos (D); esfuerzos máximos (E) y deformaciones (F).



Las curvas de esfuerzo contra deformación de *PCL* y de *10NCC/PCL* mostraron un comportamiento parecido al de los materiales dúctiles [42]. Sin embargo, mientras que el esfuerzo máximo de *PCL* fue de 11.219 MPa, el esfuerzo máximo de *10NCC/PCL* fue de menos de la mitad: 4.699 MPa. Este comportamiento fue probablemente debido a que los NCC, en alta concentración, saturaron a la matriz polimérica y, aglomerados [44], actuaron como concentradores de esfuerzo [24] que devinieron en la rotura de las probetas correspondientes con la muestra *10NCC/PCL*. Aun considerando lo anterior, los porcentajes de deformación que presentaron ambas muestras fueron cercanos entre sí: 107.613 % en *PCL* y 104.867 % en *10NCC/PCL*. Este efecto posiblemente se debió a la transferencia del esfuerzo desde las fibras de policaprolactona hacia los NCC [41]. Por otro lado, una pequeña disminución en el módulo elástico de *10NCC/PCL* ( $34.476 \pm 1.862$  MPa) se observó con respecto de *PCL* ( $40.059 \pm 2.080$  MPa). Esto indica que *10NCC/PCL* es más frágil que *PCL*. En *D*, *E*, y *F* de la figura 28 y en la tabla IV se resumen los parámetros presentados en este párrafo. Más adelante se discutirá ampliamente el comportamiento mecánico de *5NCC/PCL*.

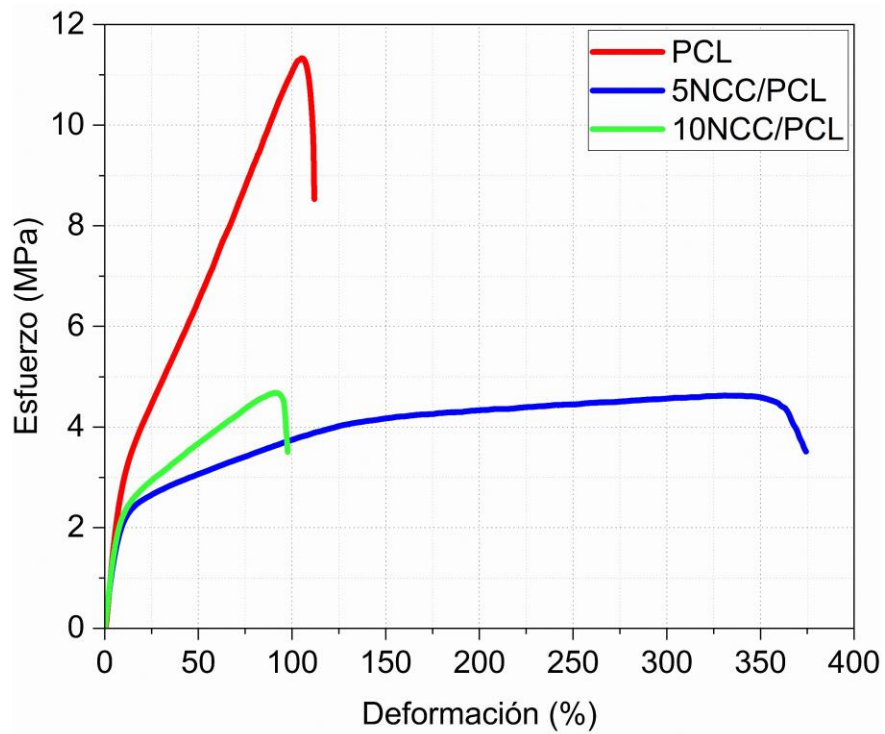


Figura 29. Resumen de los diagramas de esfuerzo contra deformación de las muestras ensayadas.

Tabla IV

*Parámetros mecánicos*

Muestra	Módulo elástico (Mpa)	Esfuerzo máximo ante la rotura (Mpa)	Deformación a la rotura (%)
<i>PCL</i>	40.059 ± 2.080	11.219 ± 0.607	107.613 ± 6.182
<i>5NCC/PCL</i>	29.999 ± 2.144	4.676 ± 0.161	362.499 ± 29.935
<i>10NCC/PCL</i>	34.476 ± 1.862	4.699 ± 0.225	104.867 ± 6.076

En la gráfica de esfuerzo contra deformación de la muestra *5NCC/PCL* se observan por lo menos dos comportamientos diferentes en la zona de deformación plástica. Ver la figura 30. Debido a que la PCL es un polímero semicristalino, sus regiones amorfas contribuyen durante la deformación elástica debido al movimiento de aquellas ante la tracción ejercida. A su vez, la deformación plástica está dada como consecuencia de las interacciones entre las regiones amorfas y las cristalinas. Ver la figura 31. La membrana *5NCC/PCL* (aun siendo más cristalina que la membrana *PCL*) presentó la mayor elongación de todas las muestras ensayadas. No obstante esta característica, la membrana *10NCC/PCL*, cuya cristalinidad fue la más alta, presentó la menor deformación. Como se mencionó anteriormente, en *10NCC/PCL* los NCC actuaron principalmente como concentradores de esfuerzo (figura 33); sin embargo, en *5NCC/PCL* probablemente ocurrió lo siguiente: una vez iniciado el ensayo, las cadenas moleculares de las regiones amorfas de la PCL comenzaron a ser alineadas en la dirección de la tracción ejercida. Por lo tanto, la zona de deformación elástica en el diagrama de esfuerzo contra deformación de la muestra *5NCC/PCL* (y de las tres muestras en general) pudo haber sido una contribución de la alineación de las cadenas moleculares en las regiones amorfas del polímero. Probablemente, dichas cadenas continuaban siendo alineadas a medida que avanzaba el ensayo; sin embargo, en cierto momento posiblemente comenzaron a ocurrir cambios en las regiones amorfas y cristalinas debido al estiramiento de estas últimas. Esto es, los fuertes enlaces covalentes dentro de las cadenas laminares cristalinas paulatinamente estarían siendo estirados. Como consecuencia, el espesor de aquellas zonas pudo haber incrementado ligeramente.

Al continuar el ensayo se presentó la transición hacia la deformación plástica, la cual pudo ser debida a que las moléculas poliméricas laminares de las regiones cristalinas se estarían deslizando unas sobre otras. Por lo tanto, en algún momento bloques cristalinos fueron desasociados del conjunto de laminillas. No obstante, se mantuvieron unidos entre sí por más cadenas poliméricas [42], [43]. Ya que *5NCC/PCL* contenía NCC en menor concentración, una vez que las regiones amorfas y cristalinas hubieron aportado la deformación elástica y la plástica, respectivamente, los NCC probablemente comenzaron a ser estirados. Por lo tanto, habría ocurrido un desplazamiento de ellos que, en general, aportó deformación durante el ensayo. De forma breve, *5NCC/PCL* presentó mayor deformación ya que los NCC probablemente se deslizaban unos sobre otros; sin embargo, se mantenían unidos al sistema mediante más fibras de PCL. Ver la figura 32.

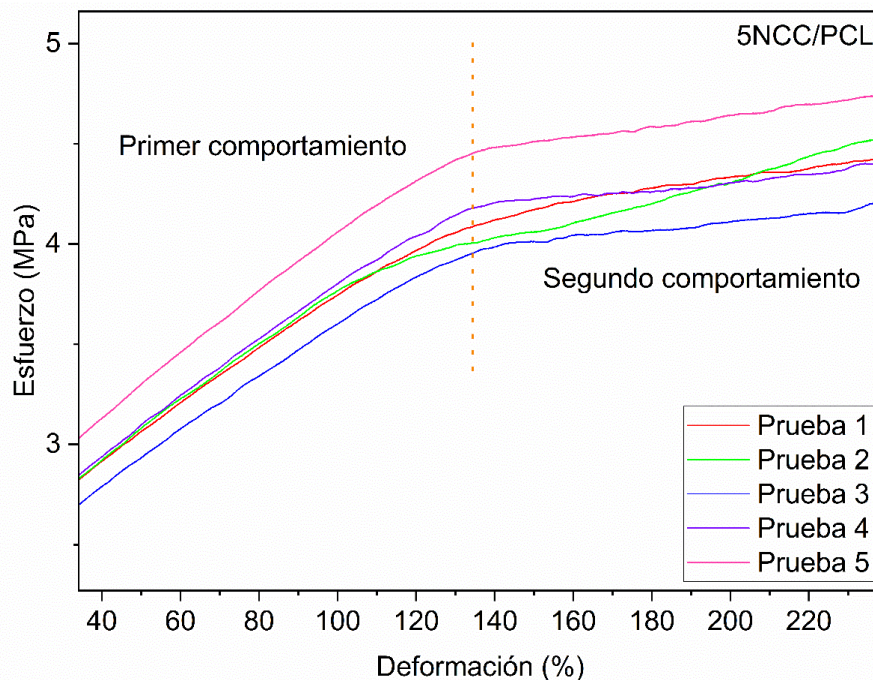


Figura 30. Diagrama de esfuerzo contra deformación de la muestra *5NCC/PCL*.

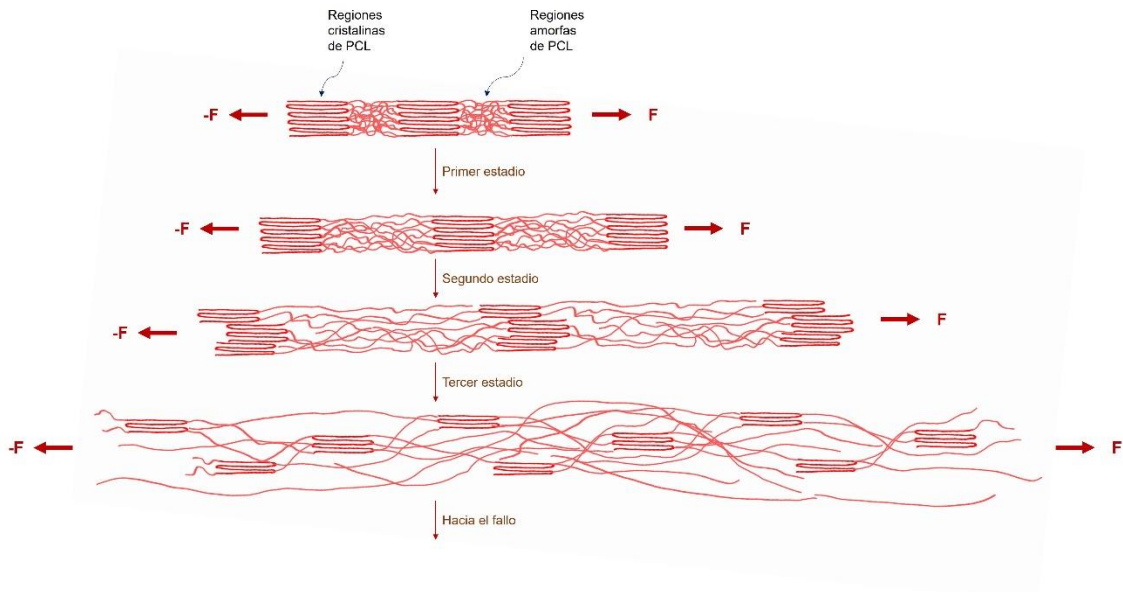


Figura 31. Estadios del comportamiento mecánico relacionado con la deformación elástica y plástica de la policaprolactona de la muestra **PCL**. Mientras que los paquetes lamelares representan las regiones cristalinas de las cadenas moleculares del polímero, las zonas intermedias se refieren a las amorfas. A medida que avanza el ensayo de tensión, las cadenas de las regiones amorfas son estiradas en la misma dirección que la de la fuerza ejercida. Luego, segmentos de los bloques cristalinos comienzan a ser estirados y separados de los bloques originales. Creado con *Samsung Notes*.

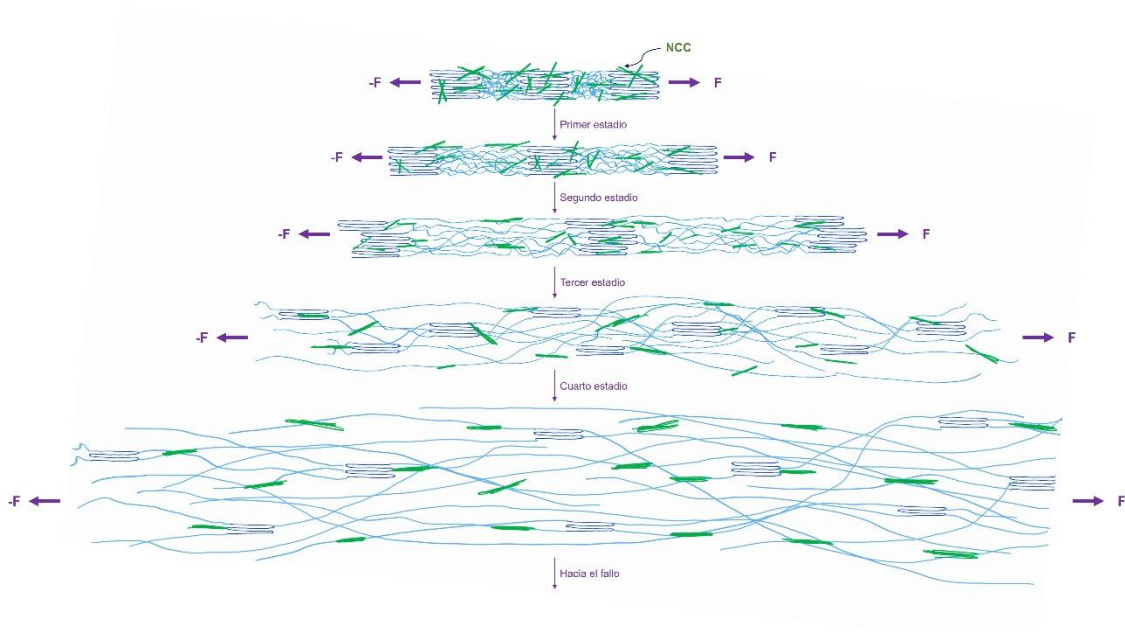


Figura 32. Estadios del comportamiento mecánico relacionado con la deformación elástica y plástica de la muestra **5NCC/PCL**. Similarmente al comportamiento de la muestra **PCL**, las regiones amorfas y cristalinas de las cadenas moleculares de la policaprolactona contribuyen durante la deformación elástica y plástica, respectivamente. Sin embargo, hacia el cuarto estadio, los NCC aportan deformación plástica al permitir elongación más allá de la presentada por la muestra compuesta por PCL de forma exclusiva. Creado con *Samsung Notes*.

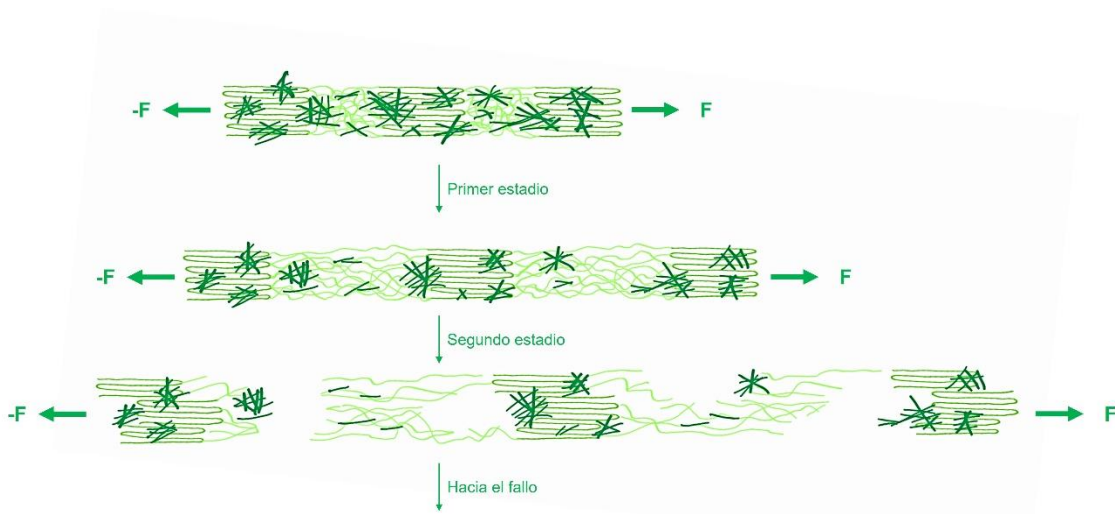


Figura 33. Estadios del comportamiento mecánico relacionado con la deformación elástica y plástica de la muestra **10NCC/PCL**. Debido al relativamente mayor contenido de NCC en la matriz polimérica y a la fuerte unión entre ellos, concentradores de esfuerzo se presentan en los especímenes y devienen en el rápido fallo de estos. Creado con *Samsung Notes*.

En su investigación, Hivechi, A., *et. al.* [24], mostraron que los andamios de PCL y de PCL con NCC exhibieron módulos elásticos variables en función de la muestra. Dichos valores se encontraron entre 23.4 y 43.8 MPa. En comparación con los resultados encontrados en el presente trabajo, el mayor módulo elástico lo mostró *PCL* ( $40.059 \pm 2.080$ ); el menor, *5NCC/PCL* ( $29.999 \pm 2.144$ ). En un trabajo posterior, Hivechi, A., *et. al.* [25] expuso que los andamios pudieron ser utilizados como implantes sobre heridas de espesor completo en ratas. Dicha experimentación tuvo una duración de catorce días.

#### **10.2.6. Análisis de su mojabilidad mediante mediciones de ángulos de contacto (MÁC)**

La información obtenida mediante MÁC hizo notar el comportamiento hidrofóbico ( $\Theta > 90^\circ$ ) de todas las muestras, incluidas aquellas con NCC. Sin embargo, como se observa en la figura 34, se apreció una tendencia decreciente en el ángulo de contacto ante el aumento de la concentración de NCC en cada mezcla electrohilada. Así, la muestra *10NCC/PCL* presentó la mayor disminución en cuanto a su hidrofobicidad, en relación con la muestra *PCL*. Esto es, el ángulo de contacto con *10NCC/PCL* fue de  $118.46^\circ \pm 7.028$ , mientras que con *PCL* fue de  $130.9^\circ \pm 1.124$ . A su vez, el ángulo de contacto con *5NCC/PCL* fue de  $128.36^\circ \pm 1.880$ . Ver la tabla V. Este comportamiento está directamente relacionado con la cantidad de NCC presente en las membranas; con la naturaleza hidrófila de aquellos y con su ubicación superficial en las fibras, como reveló la MET.



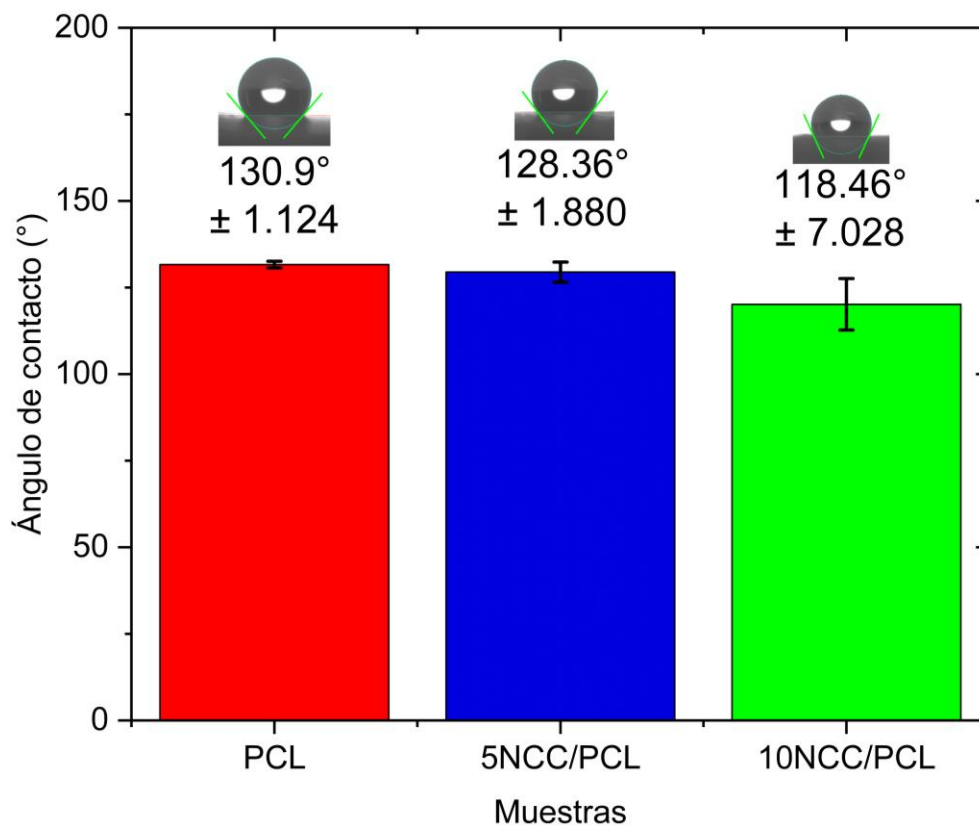


Figura 34. Ángulos de contacto de gotas de agua con las muestras estudiadas.

Tabla V

*Ángulos de contacto promedio*

Muestra	Ángulo de contacto (°)
<i>PCL</i>	130.9 ± 1.124
<i>5NCC/PCL</i>	128.36 ± 1.880
<i>10NCC/PCL</i>	118.46 ± 7.028



### 10.2.7. Estudio de la viabilidad celular sobre los andamios

Los resultados del ensayo con MTT se presentan en la figura 35. Se observa que después de haber transcurrido tres días (72 h) desde la siembra, los andamios *5NCC/PCL* y *10NCC/PCL* permitieron una mayor viabilidad de células *HUVEC* con respecto del *control (PCL)*. Sin embargo, estadísticamente los incrementos no fueron significativos. Los resultados obtenidos después de siete días (168 h) exhibieron un comportamiento similar al anterior. No obstante, la información obtenida evidencia una viabilidad ligeramente mayor en el andamio *10NCC/PCL* que en *5NCC/PCL*. Esto probablemente se debió a la contribución hidrófila de los NCC, la cual, aunque fue pequeña, pudo haber permitido un mejor transporte nutrimental desde el medio de cultivo. Asimismo, es posible que la forma local de las fibras (consecuencia de la morfología y la localización de los NCC), aportara mayores sitios de adhesión para las células.

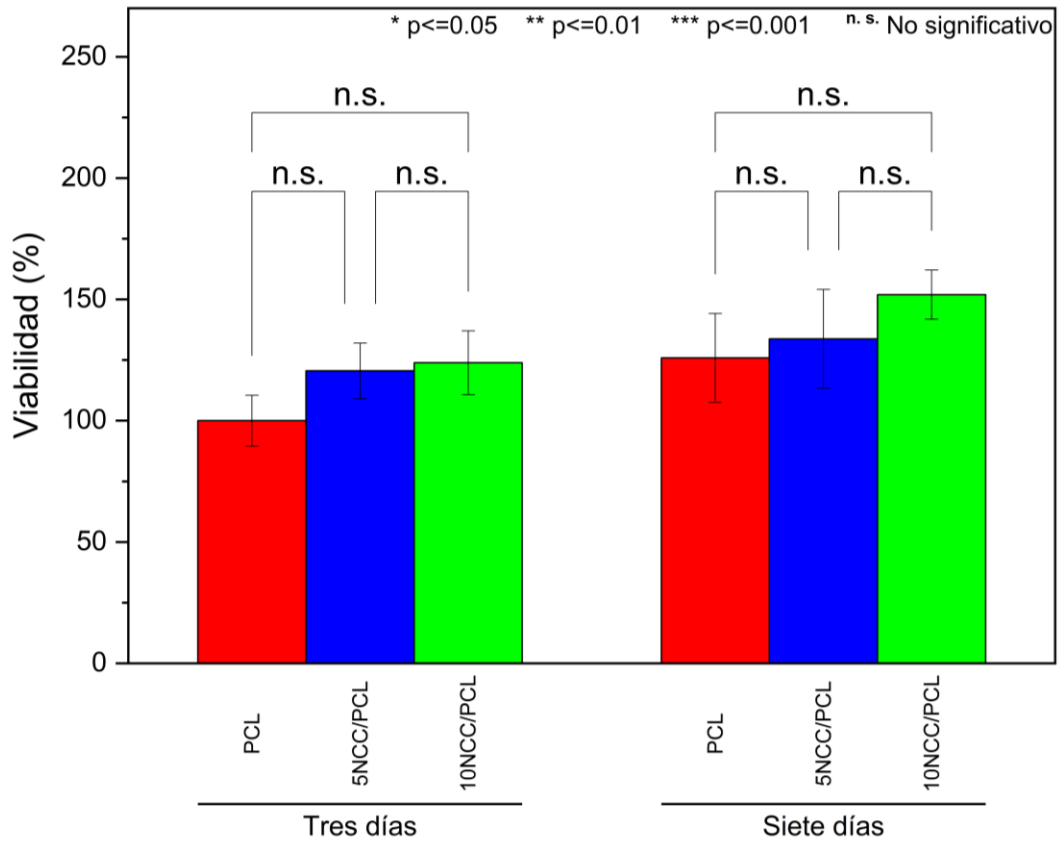


Figura 35. Porcentajes de viabilidad de células *HUVEC* cultivadas sobre los andamios *PCL* (rojo), *5NCC/PCL* (azul) y *10NCC/PCL* (verde). Los cálculos se realizaron con base en los resultados de los ensayos con *MTT*, los cuales se llevaron a cabo después de tres y siete días de haber sido sembradas las células.

## 11. Conclusiones

Fueron electrohiladas exitosamente dos mezclas distintas de NCC con PCL. Así fueron obtenidos dos modelos diferentes de andamio fibroso. Se utilizó exclusivamente TFE tanto para dispersar las nanopartículas como para disolver el polímero.

Con base en los resultados de DRX, TFIR y MET, los NCC obtenidos fueron nanopartículas en forma de varilla constituidas por celulosa tipo I $\beta$ . Por lo tanto, la hidrólisis ácida parcial de celulosa vegetal es un método eficaz de obtención de NCC.

La naturaleza de los NCC causa diversos efectos en las matrices de policaprolactona. Más importante es señalar que la concentración de aquellos modifica de manera directa las propiedades químicas, físicas, mecánicas y biológicas de los andamios.

Los resultados de las caracterizaciones llevadas a cabo mediante TFIR, DRX, MET y ETU permiten sostener que los NCC fueron eficazmente incorporados a las matrices poliméricas. Además, el control de los parámetros de electrohilado permitió obtener estructuras cuya morfología constituyó andamios de fibras regulares.

Con base en la información de los difractogramas de rayos X, puede afirmarse que la cristalinidad de los andamios incrementó proporcionalmente a sus contenidos de NCC. Por lo tanto, un efecto *nucleante* fue aportado por las superficies cristalinas de ellos.

Los resultados de las pruebas mecánicas demuestran que los tres andamios poseen suficiente resistencia mecánica para ser manipulados y perdurar ante su uso en ingeniería de tejidos suaves. De forma específica, *PCL* demostró el mayor esfuerzo; *5NCC/PCL*, la mayor deformación; y *10NCC/PCL*, esfuerzo y deformación menores.

Aunque la evaluación biológica no permite sustentar que la incorporación de NCC promueve una mayor viabilidad de células *HUVEC* en los andamios, los resultados evidencian que *10NCC/PCL* permitió el mayor porcentaje de viabilidad celular con respecto de las muestras *PCL* y *5NCC/PCL*.

No obstante el comportamiento hidrófilo de los NCC, puede decirse que su contribución en cuanto a la disminución de la hidrofobicidad de los andamios fue muy débil.

## **12. Perspectivas**

- Es necesario estudiar la curvatura o rectitud de las fibras en cada muestra, y relacionar tal información con la cristalinidad de los andamios y la morfología de los NCC.
- Es importante analizar la macroporosidad y la microporosidad de las fibras.
- Las pruebas biológicas podrían aportar aún más información si se realizan tras catorce días de cultivo.
- Podrían explorarse las propiedades de membranas cuya concentración de NCC se encuentre alrededor del 5 %.

### 13. Productos académicos

Daniel Michell Padilla Ramos, Israel Alfonso Núñez Tapia, Phaedra Suriel Silva Bermúdez, Arturo Barba Pingarrón, Cristina Piña Barba. *31st International Materials Research Congress* en Cancún, Quintana Roo, del 13 al 18 de agosto de 2023. Trabajo presentado: *Electrospun polycaprolactone with cellulose nanocrystals* en la modalidad de cartel en el simposio F3 (Biomaterials for Health Applications).

Daniel Michell Padilla Ramos, Israel Alfonso Núñez Tapia, Phaedra Suriel Silva Bermúdez, Arturo Barba Pingarrón, Cristina Piña Barba. *Décimo Congreso Internacional de Biomateriales e Ingeniería de Órganos y Tejidos*, en la UJED de Durango, del 27 al 29 de septiembre de 2023. Trabajo presentado: *Estudio de las propiedades mecánicas de andamios microfibrilares obtenidos a través del electrohilado de policaprolactona con nanocristales de celulosa*, en la modalidad de cartel por vía remota.

Daniel Michell Padilla Ramos, Israel Alfonso Núñez Tapia, Phaedra Suriel Silva Bermúdez, Arturo Barba Pingarrón, Cristina Piña Barba. Primer Congreso de Ciencia, Tecnología y Vinculación, en el Hospital General de México, del 16 al 17 de noviembre de 2023. Trabajo presentado: *Análisis de los efectos de nanocristales de celulosa en las propiedades de membranas fibrosas obtenidas mediante el electrohilado de policaprolactona*, en la modalidad de cartel.

## 14. Referencias

- [1] R. M. A. Domingues, M. E. Gomes, and R. L. Reis, “The potential of cellulose nanocrystals in tissue engineering strategies,” *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 7. American Chemical Society, pp. 2327–2346, Jul. 14, 2014. doi: 10.1021/bm500524s.
- [2] Y. Li, F. K. Ko, and W. Y. Hamad, “Effects of emulsion droplet size on the structure of electrospun ultrafine biocomposite fibers with cellulose nanocrystals,” *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 11, pp. 3801–3807, Nov. 2013, doi: 10.1021/bm400540v.
- [3] J. A. Reid, A. McDonald, and A. Callanan, “Modulating electrospun polycaprolactone scaffold morphology and composition to alter endothelial cell proliferation and angiogenic gene response,” *PLoS One*, vol. 15, no. 10 October, Oct. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0240332.
- [4] B. Zavan *et al.*, “Electrospun pcl-based vascular grafts: In vitro tests,” *Nanomaterials*, vol. 11, no. 3, pp. 1–16, Mar. 2021, doi: 10.3390/nano11030751.
- [5] Y. Habibi, L. A. Lucia, and O. J. Rojas, “Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications,” *Chem Rev*, vol. 110, no. 6, pp. 3479–3500, Jun. 2010, doi: 10.1021/cr900339w.
- [6] B. G. Rånby, “Fibrous macromolecular systems. Cellulose and muscle. The colloidal properties of cellulose micelles,” *Discuss Faraday Soc*, vol. 11, no. 0, pp. 158–164, 1951, doi: 10.1039/DF9511100158.
- [7] M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, “The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century,” *Progress in Polymer Science (Oxford)*, vol. 35, no. 10. Elsevier Ltd, pp. 1217–1256, 2010. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
- [8] A. Azari, A. Golchin, M. M. Maymand, F. Mansouri, and A. Ardeshirylajimi, “Electrospun Polycaprolactone Nanofibers: Current Research and Applications in Biomedical Application,” *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, vol. 12, no. 4. Tabriz University of Medical Sciences, pp. 658–672, 2022. doi: 10.34172/apb.2022.070.
- [9] M. Argentieri, D. Kommala, and C. N. Schabowsky, “ECRI Corporate Governance. MEDICAL DEVICE MATERIAL PERFORMANCE STUDY. Polycaprolactone (PCL) Safety Profile,” Dec. 2021.
- [10] N. Siddiqui *et al.*, “Electrospun Polycaprolactone Fibres in Bone Tissue Engineering: A Review,” *Molecular Biotechnology*, vol. 63, no. 5. Humana Press Inc., pp. 363–388, May 01, 2021. doi: 10.1007/s12033-021-00311-0.

- [11] L. S. Nair and C. T. Laurencin, “Biodegradable polymers as biomaterials,” *Progress in Polymer Science (Oxford)*, vol. 32, no. 8–9, pp. 762–798, Aug. 2007. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.
- [12] G. Prado-Prone *et al.*, “Single-step, acid-based fabrication of homogeneous gelatin-polycaprolactone fibrillar scaffolds intended for skin tissue engineering,” *Biomedical Materials (Bristol)*, vol. 15, no. 3, 2020, doi: 10.1088/1748-605X/ab673b.
- [13] Y. C. Jiang, L. Jiang, A. Huang, X. F. Wang, Q. Li, and L. S. Turng, “Electrospun polycaprolactone/gelatin composites with enhanced cell–matrix interactions as blood vessel endothelial layer scaffolds,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 71, pp. 901–908, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2016.10.083.
- [14] S. Kumar Tiwari Kashma Sharma Vishal Sharma Vijay Kumar Editors, “Springer Series on Polymer and Composite Materials Electrospun Nanofibers Fabrication, Functionalisation and Applications.” [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/13173>
- [15] X. Wang, B. Ding, G. Sun, M. Wang, and J. Yu, “Electro-spinning/netting: A strategy for the fabrication of three-dimensional polymer nano-fiber/nets,” *Progress in Materials Science*, vol. 58, no. 8. Elsevier Ltd, pp. 1173–1243, 2013. doi: 10.1016/j.pmatsci.2013.05.001.
- [16] B. Ding, J. Lin, X. Wang, J. Yu, J. Yang, and Y. Cai, “Investigation of silica nanoparticle distribution in nanoporous polystyrene fibers,” *Soft Matter*, vol. 7, no. 18, pp. 8376–8383, Sep. 2011, doi: 10.1039/c1sm05791j.
- [17] G. Prado-Prone *et al.*, “Antibacterial composite membranes of polycaprolactone/gelatin loaded with zinc oxide nanoparticles for guided tissue regeneration,” *Biomedical Materials (Bristol)*, vol. 15, no. 3, 2020, doi: 10.1088/1748-605X/ab70ef.
- [18] A. Vaseashta and N. Bölgén, *Electrospun Nanofibers: Principles, Technology and Novel Applications*. Springer International Publishing, 2022. doi: 10.1007/978-3-030-99958-2.
- [19] R. Jayakumar Editor, “Advances in Polymer Science 291 Electrospun Polymeric Nanofibers Insight into Fabrication Techniques and Biomedical Applications.”
- [20] S. Przyborski, *Technology platforms for 3D cell culture: a user’s guide*. John Wiley & Sons Ltd., 2017.
- [21] N. Tucker, J. J. Stanger, M. P. Staiger, H. Razzaq, and K. Hofman, “The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995,” 2012. [Online]. Available: <http://www.jeffjournal.org>



- [22] H. P. Hinestroza, H. Urena-Saborio, F. Zurita, A. A. G. de León, G. Sundaram, and B. Sulbarán-Rangel, “Nanocellulose and polycaprolactone nanospun composite membranes and their potential for the removal of pollutants from water,” *Molecules*, vol. 25, no. 3, Feb. 2020, doi: 10.3390/molecules25030683.
- [23] J. O. Zoppe, M. S. Peresin, Y. Habibi, R. A. Venditti, and O. J. Rojas, “Reinforcing poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers with cellulose nanocrystals,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 1, no. 9, pp. 1996–2004, Sep. 2009, doi: 10.1021/am9003705.
- [24] A. Hivechi, S. H. Bahrami, and R. A. Siegel, “Drug release and biodegradability of electrospun cellulose nanocrystal reinforced polycaprolactone,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 94, pp. 929–937, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2018.10.037.
- [25] A. Hivechi *et al.*, “Cellulose nanocrystal effect on crystallization kinetics and biological properties of electrospun polycaprolactone,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 121, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111855.
- [26] E. M. Fernandes, R. A. Pires, J. F. Mano, and R. L. Reis, “Bionanocomposites from lignocellulosic resources: Properties, applications and future trends for their use in the biomedical field,” *Progress in Polymer Science*, vol. 38, no. 10–11. Elsevier Ltd, pp. 1415–1441, 2013. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.05.013.
- [27] M. Raza, B. Abu-Jdayil, F. Banat, and A. H. Al-Marzouqi, “Isolation and Characterization of Cellulose Nanocrystals from Date Palm Waste,” *ACS Omega*, vol. 7, no. 29, pp. 25366–25379, Jul. 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c02333.
- [28] S. C. Pech-Cohuo, G. Canche-Escamilla, A. Valadez-González, V. V. A. Fernández-Escamilla, and J. Uribe-Calderon, “Production and Modification of Cellulose Nanocrystals from Agave tequilana Weber Waste and Its Effect on the Melt Rheology of PLA,” *Int J Polym Sci*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/3567901.
- [29] A. D. French and M. Santiago Cintrón, “Cellulose polymorphy, crystallite size, and the Segal Crystallinity Index,” *Cellulose*, vol. 20, no. 1, pp. 583–588, Feb. 2013, doi: 10.1007/s10570-012-9833-y.
- [30] A. Kljun, T. A. S. Benians, F. Goubet, F. Meulewaeter, J. P. Knox, and R. S. Blackburn, “Comparative analysis of crystallinity changes in cellulose i polymers using ATR-FTIR, X-ray diffraction, and carbohydrate-binding module probes,” *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 11, pp. 4121–4126, Nov. 2011, doi: 10.1021/bm201176m.
- [31] M. X. Ruiz-Caldas, J. Carlsson, I. Sadiktsis, A. Jaworski, U. Nilsson, and A. P. Mathew, “Cellulose Nanocrystals from Postconsumer Cotton and Blended Fabrics: A Study on Their Properties, Chemical Composition, and Process Efficiency,” *ACS*

- Sustain Chem Eng*, vol. 10, no. 11, pp. 3787–3798, Mar. 2022, doi: 10.1021/acssuschemeng.2c00797.
- [32] O. C. Farokhzad and R. Langer, “Impact of nanotechnology on drug delivery,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 1, pp. 16–20, Jan. 2009, doi: 10.1021/nn900002m.
- [33] D. Bobo, K. J. Robinson, J. Islam, K. J. Thurecht, and S. R. Corrie, “Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date,” *Pharmaceutical Research*, vol. 33, no. 10. Springer New York LLC, pp. 2373–2387, Oct. 01, 2016. doi: 10.1007/s11095-016-1958-5.
- [34] T. Elzein, M. Nasser-Eddine, C. Delaite, S. Bistac, and P. Dumas, “FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces,” *J Colloid Interface Sci*, vol. 273, no. 2, pp. 381–387, May 2004, doi: 10.1016/j.jcis.2004.02.001.
- [35] Q. Lv, C. Xu, D. Wu, Z. Wang, R. Lan, and L. Wu, “The role of nanocrystalline cellulose during crystallization of poly( $\epsilon$ -caprolactone) composites: Nucleation agent or not?,” *Compos Part A Appl Sci Manuf*, vol. 92, pp. 17–26, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.compositesa.2016.10.035.
- [36] N. Candau, J. P. C. Fernandes, E. Vasmer, and M. L. Maspocho, “Cellulose nanocrystals as nucleating agents for the strain induced crystallization in natural rubber,” *Soft Matter*, vol. 18, no. 45, pp. 8663–8674, Oct. 2022, doi: 10.1039/d2sm01291j.
- [37] A. Pei, Q. Zhou, and L. A. Berglund, “Functionalized cellulose nanocrystals as biobased nucleation agents in poly(l-lactide) (PLLA) - Crystallization and mechanical property effects,” *Compos Sci Technol*, vol. 70, no. 5, pp. 815–821, May 2010, doi: 10.1016/j.compscitech.2010.01.018.
- [38] S. Cesur, B. Alp, Y. Küçüköksel, T. Kahraman, and D. Balköse, “Crystallization kinetics and affecting parameters on polycaprolactone composites with inorganic and organic additives,” in *Journal of Vinyl and Additive Technology*, John Wiley and Sons Ltd, Sep. 2015, pp. 174–182. doi: 10.1002/vnl.21399.
- [39] G. Prado, M. Velasquillo, A. Franco, and M. Piña, “Desarrollo y caracterización de materiales compuestos basados en polímeros biocompatibles y nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) fabricados mediante la técnica de electrohilado, para potenciales aplicaciones en el tratamiento de quemaduras,” Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2018.
- [40] S. Huan, L. Bai, W. Cheng, and G. Han, “Manufacture of electrospun all-aqueous poly(vinyl alcohol)/cellulose nanocrystal composite nanofibrous mats with enhanced properties through controlling fibers arrangement and microstructure,” *Polymer (Guildf)*, vol. 92, pp. 25–35, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.polymer.2016.03.082.

- [41] S. Shafizah, A. R. S. Izwan, F. Fatirah, and M. N. N. Hasraf, "Review on cellulose nanocrystals (CNCs) as reinforced agent on electrospun nanofibers: Mechanical and thermal properties," in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Institute of Physics Publishing, Oct. 2018. doi: 10.1088/1757-899X/440/1/012011.
- [42] W. Callister and D. Rethwisch, *Materials Science and Engineering: an introduction*, Tenth Edition. Hoboken: Wiley, 2018.
- [43] J. Bronzino and D. Peterson, *THE BIOMEDICAL ENGINEERING HANDBOOK: Biomedical Engineering Fundamentals*, Fourth Edition. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2015.
- [44] L. Ge, J. Yin, D. Yan, W. Hong, and T. Jiao, "Construction of Nanocrystalline Cellulose-Based Composite Fiber Films with Excellent Porosity Performances via an Electrospinning Strategy," *ACS Omega*, vol. 6, no. 7, pp. 4958–4967, Feb. 2021, doi: 10.1021/acsomega.0c06002.