



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

ANDAMIO A BASE DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO – CO- GLICÓLICO), COLÁGENO
Y QUITOSANO, PARA REGENERACIÓN DE PIEL

TESIS

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

I.Q. MARÍA EUGENIA TREJO CABALLERO

TUTOR PRINCIPAL: DR. RICARDO VERA GRAZIANO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ALFREDO MACIEL CERDA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES
DR. RAFAEL HERRERA NÁJERA
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO D.F., DICIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) y al Posgrado en Ciencia e Ingeniería en Materiales (PCeIM), por las oportunidades brindadas para la realización de este proyecto y por la formación académica impartida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para la realización de los estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo brindado, proyecto DGAPA-UNAM IN198913 y al CONACYT, Proyecto CNPq 174247.

Al Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado (PAEP), por el apoyo para asistir a congresos para presentar avances de mi investigación.

Al Dr. Ricardo Vera Graziano por aceptarme como su alumna y permitirme ser parte de su grupo de investigación, por apoyarme con sus conocimientos y tiempo, así como con sus consejos y accesibilidad.

Al Dr. Alfredo Maciel Cerda por sus observaciones, accesibilidad y consejos durante el desarrollo del proyecto y al Dr. Rafael Herrera Nájera por su asesoramiento y comentarios que mejoraron este trabajo y a ambos por su colaboración como parte de mi comité tutor durante la maestría.

Al Dr. Andrés Castell por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, así como a la M. en C. Nadia Adriana Vázquez Torres por el apoyo en los cultivos celulares, por tomarse el tiempo en enseñarme las técnicas que me eran ajenas.

A la Dra. Cristina Velasquillo por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y sus comentarios que enriquecieron este trabajo, así como a su grupo, que colaboraron en la realización de las pruebas de degradación e hinchamiento.

Al Dr. Filiberto Rivera Torres, por su asesoría en la medida de ángulo de contacto de mis materiales, así como sus comentarios durante los seminarios de investigación del grupo de trabajo.

A los demás miembros del jurado Dra. Margarita V. García Garduño, Dr. Mikhail Zolotukhin y Dr. Antonio Martínez Richa por el tiempo brindado en la revisión de mi tesis.

A los integrantes del grupo de investigación y compañeros del PCeIM, por sus consejos y ayuda en la realización de mi proyecto de investigación.

Al Dr. Omar Novelo Peralta y al Fis. Josué Esaú Romero Ibarra, por sus colaboraciones en las sesiones de microscopía electrónica de barrido, al Q. Miguel Ángel Canseco Martínez por los análisis de FTIR, a la Q.F.B. Damaris Cabrero Palomino, por su apoyo con los análisis térmicos (DSC y TGA) y al Ing. Ernesto Sánchez Colín, por los ensayos mecánicos de tensión.

Al personal administrativo de la coordinación del PCeIM, por su apoyo durante mi estancia.

DEDICATORIA

A mi familia que hizo todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

ÍNDICE

	Pág.
Agradecimientos	i
Dedicatoria	iv
Tablas	viii
Figuras	ix
Resumen	1
1 Introducción	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Justificación	7
1.3 Objetivos de investigación	8
1.3.1 General	8
1.3.2 Específicos	8
1.4 Hipótesis	8
2 Fundamento Teórico	9
2.1 Ingeniería de tejidos	9
2.2 Andamio	10
2.3 Materiales para la fabricación de andamios	11
2.4 Polímeros	12
2.4.1 Polímeros naturales	12
2.4.1.1 Quitosano	13
2.4.1.1.1 Generalidades	13
2.4.1.1.2 Propiedades del quitosano	14
2.4.1.1.3 Aplicaciones del quitosano	15
2.4.1.2 Colágeno Hidrolizado tipo I	15
2.4.1.2.1 Generalidades	15
2.4.1.2.2 Propiedades del colágeno hidrolizado tipo I	16
2.4.1.2.3 Aplicaciones biomédicas del colágeno	17
2.4.2 Polímeros sintéticos	18
2.4.2.1 Copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA)	18
2.4.2.1.1 Generalidades	18
2.4.2.1.2 Propiedades del PLGA	19
2.5 Nanotecnología en ingeniería de tejidos	22
2.5.1 Técnicas de fabricación de andamios	22
2.5.2 Técnica de Electrohilado en solución	24
2.5.2.1 Generalidades	24
2.5.2.2 Equipo de electrohilado	25
2.6 Ingeniería de tejidos y su aplicación en piel	28
2.6.1 La piel	28
2.6.1 Anatomía de la piel	29
2.6.2 Propiedades mecánicas de la piel	31
2.7 Técnicas analíticas de caracterización	32
2.7.1 Espectroscopía de Infrarrojo (IR)	32
2.7.2 Análisis Termogravimétrico (TGA)	32

	Pág.	
2.7.3	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	33
2.7.4	Ángulo de contacto	34
2.7.5	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	35
2.7.6	Ensayo de Tensión	37
3	Materiales y Metodología	39
3.1	Materiales y Reactivos	39
3.2	Metodología	40
3.2.1	Pruebas preliminares: Preparación de las soluciones	40
3.2.2	Electrohilado de las soluciones	41
3.2.3	Técnicas de caracterización	44
3.2.3.1	Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR)	44
3.2.3.2	Análisis Termogravimétrico (TGA)	44
3.2.3.3	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	44
3.2.3.4	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	45
3.2.3.5	Ensayo mecánico en tensión	45
3.2.3.6	Ángulo de contacto	46
3.2.3.7	Prueba de Hinchamiento	46
3.2.3.8	Prueba de Degradación	47
3.2.4	Pruebas de viabilidad celular con fibroblastos mediante el método de calceína AM	48
3.2.4.1	Preparación de los polímeros	48
3.2.4.2	Sembrado de células en los andamios.	48
3.2.4.3	Prueba con calceína (adhesión y viabilidad)	48
4	Resultados y Análisis	49
4.1	Pruebas preliminares	49
4.1.1	Preparación de las soluciones	49
4.1.2	Caracterización de las materias primas	50
4.1.2.1	Grupos funcionales por Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR)	50
4.1.2.2	Caracterización Térmica	54
4.1.2.2.1	Análisis Termogravimétrico (TGA)	54
4.1.2.2.2	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	56
4.2	Morfología de los andamios	57
4.2.1	Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	57
4.2.1.1	Efecto de los parámetros de electrohilado en el diámetro de las nanofibras	57
4.2.1.1.1	Análisis de los parámetros de la solución y de proceso para los andamios de PLGA	58
4.2.1.1.2	Análisis de los andamios de colágeno hidrolizado tipo I	61
4.2.1.1.3	Análisis de los andamios de mezclas de PLGA: Colágeno	62
4.2.1.1.4	Análisis de los andamios de mezclas de PLGA: Quitosano	64
4.2.1.1.5	Análisis de los andamios de mezclas de PLGA: Colágeno: Quitosano	65
4.3	Caracterización físico-química de los andamios electrohilados	66
4.3.1	Análisis de grupos funcionales por espectroscopía de infrarrojo (FT-IR)	66
4.3.2	Análisis de temperaturas de degradación y transición	68
4.3.2.1	Análisis de la pérdida de masa por termogravimetría (TGA)	68

	Pág.
4.3.2.2	Análisis de temperaturas de transición por calorimetría diferencial de barrido (DSC) 70
4.3.3	Análisis de hidrofiliidad por ángulo de contacto 72
4.3.4	Análisis de Porosidad 73
4.3.5	Análisis de propiedades mecánicas en tensión uniaxial 74
4.3.6	Prueba de hinchamiento 76
4.3.7	Prueba de degradación 77
4.4	Pruebas de viabilidad celular con fibroblastos mediante el método de calceína AM. 79
5	Discusión de resultados 85
6	Conclusiones 89
7	Perspectivas 91
8	Referencias 92
Anexo	96

TABLAS

	Pág.
1) Resumen de estudios reportados con diferentes materiales para aplicaciones médicas.	5
2) Estudios reportados de andamios celulares a base de quitosano, colágeno y PLGA.	6
3) Propiedades del Quitosano.....	14
4) Propiedades del Colágeno hidrolizado tipo I.....	16
5) Materiales utilizados en ingeniería de tejidos basados en colágeno.....	17
6) Técnicas de fabricación de andamios.....	22
7) Parámetros involucrados en el electrohilado y efectos en la formación de fibras.....	27
8) Funciones de la piel.....	28
9) Capas de la epidermis.....	30
10) Electrohilado de PLGA.....	42
11) Electrohilado de Colágeno.....	43
12) Electrohilado PLGA: Colágeno.....	43
13) Electrohilado PLGA: Quitosano.....	43
14) Electrohilado PLGA: Colágeno: Quitosano.....	43
15) Resultados de las pruebas de solubilidad.....	49
16) Bandas características de quitosano.....	51
17) Bandas características de colágeno hidrolizado tipo I.....	52
18) Bandas características de PLGA.....	53
19) Condiciones seleccionadas para la obtención de nanofibras de PLGA.....	60
20) Diámetros de las fibras de los andamios de las mezclas de PLGA: Colágeno.....	62
21) Imágenes de Angulo de Contacto para mezclas electrohiladas de PLGA: Colágeno.	72
22) Imágenes de Angulo de Contacto para mezclas electrohiladas de PLGA: Colágeno: Quitosano.....	72
23) Porcentaje de hinchamiento para las muestras en proporciones de PLGA: Colágeno: Quitosano.....	77
24) Porcentaje de pérdida de masa para las muestras en proporciones de PLGA: Colágeno: Quitosano.....	78

FIGURAS

	Pág.
1) Proceso general de la Ingeniería de Tejidos.....	11
2) Estructura química del quitosano	13
3) Estructura química del colágeno tipo I	16
4) Estructura química del PLGA	18
5) Equipo de electrohilado	26
6) Anatomía de la piel humana	29
7) Tipos de vibraciones.....	32
8) Esquema del ángulo de contacto, y de las tensiones que actúan en la línea de contacto entre sólido, líquido y aire	35
9) Esquema de las partes de un microscopio electrónico de barrido.....	36
10) Representación esquemática del equipo usado para la realización de un ensayo de tensión	37
11) Comportamiento de una curva esfuerzo –deformación para materiales: Frágiles (curva A), Dúctiles (curva B) y Altamente elásticos (elastómeros) polímeros (curva C)	38
12) Curva de esfuerzo-deformación esquemática para un polímero semicristalino. Aquí son presentados varios estados de deformación de la probeta de acuerdo al esfuerzo aplicado.....	38
13) Equipo de electrohilado empleado.....	41
14) Espectro de infrarrojo de quitosano.....	50
15) Espectro de infrarrojo de colágeno hidrolizado tipo I.....	52
16) Espectro de infrarrojo de PLGA.....	53
17) Termograma Quitosano a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.....	54
18) Termograma Colágeno a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.....	55
19) Termograma PLGA a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.....	56
20) Termogramas de DSC de PLGA, Colágeno y Quitosano.....	57
21) Micrografías de MEB (2,500x) de PLGA 10% (p/v), se evaluó el efecto del disolvente, de electrohiló a condiciones de 0.5ml/h, 15cm, 12kV, para ambos casos. a) HFP y b) TFE	58
22) Micrografías de MEB (2, 500x) de PLGA 10% (p/v) disuelto en HFP, se evaluó el efecto de la velocidad de inyección, se electrohiló a condiciones de 15cm, 12kV ⁷ , para ambos casos. a) 0.25ml/h y b) 0.5ml/h	59
23) Micrografías de MEB (2, 500x) de PLGA disuelto en HFP, a diferentes concentraciones, se electrohiló a condiciones de 0.25ml/h, 15cm, 12kV ⁷ , para todos los casos. a) 10%, b) 15% y c) 20% (p/v)	60
24) Micrografía de MEB (10, 000x) del andamio electrohilado de nanofibras PLGA al 20%, a 10,000X, diámetro promedio de 470±118 nm	61

25) Micrografías de MEB (10,000x) de Colágeno Hidrolizado Tipo I al 40% (p/v) disuelto en HFP, se evaluó el efecto de la velocidad de inyección, se electrohiló a condiciones de 10cm, 12kV, para ambos casos. a) 0.25ml/h y b) 0.5ml/h.....	61
26) Micrografías de MEB de andamios electrohilados de mezclas de PLGA: Colágeno a las condiciones de acuerdo a la Tabla 19, donde: a) 9:1, b) 8:2, c) 7:3, d) 6:4 y e) 5:5	63
27) Micrografías de MEB (2,500x) de PLGA; Quitosano disuelto en HFP y Ácido Acético respectivamente, a diferentes proporciones, se electrohiló a condiciones de 0.25ml/h, 15cm, 12kv, para todos los casos. a) 10:1, b) 15:1 y c) 20:1.....	64
28) Micrografías de MEB (10, 000x) de PLGA: Colágeno: Quitosano, se electrohiló a condiciones de 0.25ml/h, 15cm, 12kV ⁷ , para ambos casos. a) 25:5:1 con diámetro de fibra de 359±77 nm y b) 27:3:1 cuyo diámetro de fibra es 342±108.....	65
29) Espectro de infrarrojo de PLGA materia prima y el andamio de PLGA.....	66
30) Espectro de infrarrojo de los andamios electrohilados de PLGA: Colágeno.....	67
31) Espectro de infrarrojo de los andamios electrohilados de PLGA: Colágeno: Quitosano	68
32) Termogramas Andamios electrohilados de PLGA: Colágeno.....	69
33) Termogramas Andamios electrohilados de PLGA: Colágeno: Quitosano.....	69
34) Termogramas de DSC de andamios electrohilados de PLGA: Colágeno.....	70
35) Termogramas de DSC de andamios electrohilados de PLGA: Colágeno: Quitosano	71
36) Micrografías de MEB (10,000x) de nanofibras electrohiladas (PLGA: Colágeno: Quitosano) con análisis de porosidad (% ϕ).....	73
37) Módulo de elasticidad de los andamios electrohilados en proporciones de PLGA: Colágeno: Quitosano	74
38) Resistencia a la tensión de los andamios electrohilados en proporciones de PLGA: Colágeno: Quitosano.....	75
39) Deformación de los andamios electrohilados en proporciones de PLGA: Colágeno: Quitosano.....	75
40) Tendencia del porcentaje de pérdida de masa con el tiempo de las muestras electrohiladas.....	78
41) Sembrado celular de fibroblastos sobre los polímeros en caja Petri, lado izquierdo previo al sembrado y lado derecho materiales ya sembrados.....	79
42) Micrografías de los andamios electrohilados a 2 días de sembrado con fibroblastos humanos, mediante el método de calceína-AM, donde, a)20:0:0, b)20:2:0, c)20:9:0, d)20:20:0, e) 20:0:1, f)20:5:0.5 y g)20:10:0.5, con aumento 20x	81
43) Micrografías de los andamios electrohilados a 7 días de sembrado con fibroblastos humanos, mediante el método de calceína-AM, donde, a)20:0:0, b)20:2:0, c)20:9:0, d)20:20:0, e) 20:0:1, f)20:5:0.5 y g)20:10:0.5, con aumento 20x	82
44) Micrografías de los andamios electrohilados a 15 días de sembrado con fibroblastos humanos, mediante el método de calceína-AM, donde, a)20:0:0, b)20:2:0, c)20:9:0, d)20:20:0, e) 20:0:1, f)20:5:0.5 y g)20:10:0.5, con aumento 20x	83

RESUMEN

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y desempeña funciones de protección tanto de radiación UV como de microorganismos, regulación de temperatura, recepción de sensaciones, excreción, entre otras. Sin embargo cuando se daña la piel, estas funciones se ven comprometidas. Las lesiones más frecuentes en la piel son causadas por las quemaduras, las cuales requieren de ciertos tratamientos que no se encuentran al alcance de la población afectada. La ingeniería de tejidos combina andamios y células que pueden favorecer la regeneración tisular de estas lesiones, por lo que es fundamental el diseño de andamios que cuenten con características adecuadas para cumplir este fin.

De ahí que en este trabajo se hayan preparado y estudiado andamios de fibras poliméricas de diferentes combinaciones de poliácido láctico- co- glicólico (PLGA), colágeno y quitosano con el propósito de conseguir características y propiedades adecuadas para inducir la adhesión y diferenciación celular de fibroblastos. Estos andamios fueron fabricados por la técnica de electrohilado, se evaluaron los parámetros de este proceso, como: velocidad de inyección, distancia aguja-colector, diferencia de potencial aplicado, concentración del polímero en solución, así mismo se evaluaron dos diferentes disolventes el Trifluoroetanol (TFE) Y el 1, 1, 1, 3, 3, 3-Hexafluoro-2-Propanol (HFP).

Una vez seleccionado el disolvente el PLGA se disolvió en HFP al 20% (p/v), ya disuelto se electrohiló a diferentes combinaciones de PLGA: Colágeno, PLGA: Quitosano y PLGA: Colágeno: Quitosano, bajo los mismos parámetros de electrohilado en todos los casos, se obtuvieron andamios como matrices porosas de diámetros de cientos de nanómetros. Se evaluó la viabilidad de fibroblastos humanos en los andamios obtenidos. La caracterización de las propiedades fisicoquímicas del material, se apoyó con: espectroscopia de infrarrojo con reflexión total atenuada (ATR.FTIR), análisis termogravimétrico (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC). La morfología de las fibras se evaluó con microscopia electrónica de barrido (MEB).

Así mismo se evaluaron las propiedades mecánicas de las fibras con un ensayo de tensión uniaxial. Se estudió el cambio de hidrofiliidad de las fibras al contener colágeno y quitosano mediante la medición del ángulo y con pruebas de hinchamiento. Finalmente se evaluó la degradabilidad, de los andamios obtenidos. La biocompatibilidad de los andamios se estudió con ensayos de viabilidad de fibroblastos sobre estos materiales, se evaluó mediante el método de calceína.

Los resultados obtenidos mostraron que se logró la formación de fibras de calidad con diámetros de desde 200 hasta 600 nm, donde se observó que conforme se incrementaba la proporción de colágeno hidrolizado en la matriz se disminuía el diámetro de las fibras. Las fibras no descomponen a la temperatura corporal, los componentes no presentan cambios durante el proceso de electrohilado. Así mismo al incrementar la proporción de colágeno se incrementaba la hidrofiliidad, las propiedades mecánicas decrecían y el tiempo de degradación disminuía, lo cual favoreció la viabilidad de fibroblastos en estos materiales.

Se observó que la presencia de quitosano en los andamios disminuía de igual forma el diámetro de las fibras, pero mejoraba sus propiedades mecánicas en contraste con el colágeno hidrolizado, debido a ello los andamios que contenían quitosano presentaron las mejores propiedades mecánicas, además presentaron un mayor porcentaje de deformación a un menor esfuerzo aplicado. En general la adición de polímeros naturales mejoró la multiplicación celular de fibroblastos humanos sobre los andamios. En base a estos resultados se puede afirmar que los andamios electrohilados al contener colágeno hidrolizado y quitosano mejoran las propiedades del PLGA, para su uso potencial en regeneración en piel.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

El electrohilado es una técnica que ha sido reconocida por su eficacia para la fabricación de nanofibras poliméricas, la generación de entramados de fibras poliméricas (andamios) que permiten mimetizar la matriz extracelular, dichos andamios tienen gran área superficial, alta facilidad de funcionalización y pueden presentar propiedades mecánicas adecuadas. Además, la posibilidad de producirse a gran escala combinada con la simplicidad del proceso hace al electrohilado una técnica muy atractiva para muchas aplicaciones diversas. Respecto a aplicaciones biomédicas, los andamios electrohilados se emplean principalmente en liberación de fármacos, ingeniería de tejidos, vendaje de heridas, inmovilización de enzimas, etc. (Agarwal *et al.*, 2008).

Las alternativas más usadas para las lesiones de la piel son los auto-injertos y alo-injertos, los cuales son efectivos, pero su uso es limitado debido a la dificultad de abastecimiento y alto costo. Asimismo los apósitos para heridas actuales son fabricados de diferentes fuentes de materiales naturales y sintéticos, muchos injertos de piel exitosos utilizan proteínas naturales de la matriz extracelular, por ejemplo el colágeno en particular ha sido usado ampliamente en muchos apósitos de heridas exitosos.

Algunos apósitos ya comercializados:

- Alloderm™ es un alo-injerto que usa la matriz sin células cultivada de los cadáveres.
- Integra™ es un apósito temporal compuesto de colágeno I y glicosaminoglicanos (sulfato de condroitina 6).
- Dermagraft™ y TransCyte™, ambos son cultivados con fibroblastos de prepucio neonatal sobre fibras sintéticas de poliglactina y nailon, respectivamente.

- ApligrafTM y OrcelTM ambos son equivalentes a la piel hechos de colágeno bovino.

A pesar del éxito de estos apósitos, muchos de estos tratamientos son costosos y no reemplazan totalmente la piel muy dañada, de ahí que es necesario realizar innovaciones para la solución óptima de estos problemas (Sell *et al*, 2007).

Es importante resaltar que actualmente en México se han hecho esfuerzos para crear unidades especializadas en pacientes con quemaduras, impartir capacitación al personal y equipar las salas para la atención de este tipo de pacientes, ya que la atención que se presta al paciente quemado en México se encuentra limitado a unos pocos centros de salud en el país, algunos de ellos son el IMSS, la Secretaria de Salud, la Cruz Roja Mexicana, los servicios médicos del Desarrollo Integral para la Familia (DIF), Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), Petróleos Mexicanos (Pemex), de los hospitales universitarios de Puebla y Monterrey y se cuenta con el Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ) del Instituto de Rehabilitación Nacional (INR).

En la actualidad existen numerosos materiales poliméricos tanto naturales como sintéticos, para aplicaciones en ingeniería de tejidos, se detalla a continuación en la Tabla 1 y 2 se muestra una lista de investigaciones recientes relacionadas con el uso de la técnica de electrohilado:

Tabla 1. Resumen de estudios reportados con diferentes materiales para aplicaciones médicas.

Referencia	Polímero Natural	Polímero Sintético	Solvente	Diámetro de las fibras (nm)	Aplicaciones
Bhattacharai, N. <i>et al.</i> (2005) Bhattacharai, N. <i>et al.</i> (2009) Ohkawa, K. <i>et al.</i> (2004) Chen, F. <i>et al.</i> (2008)	Quitosano	PEO, PVA, PCL, PLLA-CL	Ácido acético/DMF/DMSO. TFA/DCM. TFA/TFE, HFP	40 micras aprox. 100- 400nm	Apósitos de heridas, liberación de fármacos, regeneración de nervio periférico e ingeniería de tejidos.
Park, K. <i>et al.</i> (2006)	Quitina	PGA	HFP	50-350nm	Piel
Powell, H.M. and Boyce, S.T. (2009)	Colágeno	PCL	HFP	600-900	Piel
Huang, L. <i>et al.</i> (2001)		PEO	Agua	100-150	Apósitos de heridas
Li, M. <i>et al.</i> (2006)	Gelatina y elastina	PLGA	HFP	~ 380	Tejido vascular y pulmonar
Jiang, H. <i>et al.</i> (2004) Pan, H. <i>et al.</i> (2006)	Dextrina	PLGA	DMSO:DMF	~1000	Ingeniería de tejidos
Shin, H.J. <i>et al.</i> (2006)	PLGA		DMF:THF	~ 550	Reconstrucción de cartílago
Luu, Y.K. <i>et al.</i> (2003)	PLGA	PLA-PEG	Agua	250-5000	Regeneración de piel y cartílago
Chen, Z.G. <i>et al.</i> (2010)	Colágeno	Quitosano	HFP	300-700	Ingeniería de tejidos (tejido nervioso y vascular)

Tabla 2. Estudios reportados de andamios celulares a base de quitosano, colágeno y PLGA.

Referencia	Material utilizado	Entrecruzamiento o modificación del material	Resultado
• Arpornmaeklong <i>et al</i> , (2007)	Quitosano y colágeno bovino.	Unión mediante liofilización con dos proporciones (1:1 y 1:2).	Tamaño de poro promedio: 80-100 μm . Este andamio promovió el crecimiento y diferenciación de los osteoblastos.
• Ding <i>et al</i> , (2007)	Quitosano y colágeno bovino.	Entrecruzamiento de los materiales.	Tamaño de poro promedio: $255 \pm 56 \mu\text{m}$ y una porosidad de $88.6 \pm 4.1\%$. Se utilizó un sistema de cultivo de células de fibroblastos dérmicos humanos.
• Wang <i>et al</i> , 2008 • Ben-shalom <i>et al</i> , 2009 • Zhang <i>et al</i> , 2011 • Lee <i>et al</i> , 2012	Quitosano	<ul style="list-style-type: none"> • Quitosano-colágeno entrecruzados • Quitosano con diferentes grados de de-acetilación. • Hidrogel de quitosano-dextrina • Hidrogel quitosano-alginato-poliácido glutámico 	Se mejoró la cicatrización de heridas. Estimulo el depósito de colágeno y la epitelización de la piel fue promovida. Mostró propiedades antibacterianas.
• Kawai <i>et al</i> , 2005 • Singh <i>et al</i> , 2011 • Kanda <i>et al</i> , 2012	Colágeno /Gelatina	<ul style="list-style-type: none"> • Micro esferas de gelatina • Apósitos de Colágeno • Espuma de colágeno-gelatina 	La proliferación de fibroblastos se aceleró. Aceleró la formación de tejido de la dermis y aumentó el número de nuevos capilares.
• Dong <i>et al</i> , 2008 • Yang <i>et al</i> , 2011	PLGA	<ul style="list-style-type: none"> • Microesferas de PLGA • Nanopartículas de PLGA 	Mejoró la tasa de crecimiento de los fibroblastos y la herida sanó de manera más eficiente. Mayor tasa de recuperación de la herida con la reepitelización completa.
• Wu <i>et al</i> . (2008)	Quitosano y PLGA	Co-electrohilado y coaxial electrohilado	Tamaño de poro aproximado de 259-674 nm, con una distribución de 200–350 nm

1.2 JUSTIFICACIÓN

Las quemaduras son un problema de salud pública, La Secretaría de Salud, en México en los últimos seis años, se ha registrado un promedio anual de 115 mil personas con quemaduras, donde 13 mil requieren de hospitalización y seis mil presentan lesiones severas. Las quemaduras producen la desnaturalización de las proteínas, edema y pérdida de líquido intravascular debido a un aumento de la permeabilidad vascular (Secretaría de Salud, 2009). Los tratamientos de las heridas causadas por una quemadura son principalmente injertos de piel y cultivos celulares, donde estos últimos son una medida no disponible para la mayoría de la población, ya que su costo es alto y actualmente no se cuentan con materiales cuya tecnología haya sido desarrollada en nuestro país.¹

Ante este panorama surge la necesidad de desarrollar una alternativa de solución a esta problemática. Con el uso de distintos materiales poliméricos se realizó una combinación de polímeros naturales, el quitosano y el colágeno, con un polímero sintético de PLGA, dicha combinación permitió la construcción de un andamio polimérico. El quitosano es un material biocompatible y de nula toxicidad y al igual que el colágeno es biocompatible y aumenta la hidrofiliidad de la matriz que lo contiene. Ambos proporcionan un ambiente propicio para el crecimiento celular, más aún en conjunto con un polímero sintético de PLGA, se facilitó la producción de fibras por medio de la técnica de electrohilado. Se generó una matriz porosa que biomimetiza la matriz extracelular de la piel. Con dicha combinación de materiales se lograron tener un andamio biocompatible que permitió el crecimiento de fibroblastos, por lo que se tiene una alternativa viable para la regeneración de piel.

¹ www.redmedia.com.mx/medicina/quemado.html

1.3 OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

1.3.1 General

Desarrollar andamios de nanofibras de PLGA, colágeno y quitosano, con la técnica de electrohilado, para obtener una matriz de nanofibras porosa biocompatible con uso potencial en regeneración de la piel.

1.3.2 Específicos

Obtener un andamio por mezcla física de PLGA, colágeno hidrolizado tipo I y quitosano, por medio de la técnica de electrohilado

Caracterizar las propiedades físicas y químicas de los andamios obtenidos.

Evaluar la viabilidad celular de los andamios obtenidos.

1.4 HIPÓTESIS

La combinación de características físicas y químicas del poliácido láctico-co-glicólico (PLGA), del colágeno hidrolizado tipo I y del quitosano permitirán obtener un andamio por medio de la técnica de electrohilado, con las características necesarias de adhesión y crecimiento de células para regeneración de piel.

2 FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos constituye una disciplina relativamente nueva y un campo de investigación y desarrollo interdisciplinario que aplica los conocimientos de la bioingeniería, la ciencia de materiales, las ciencias de la vida, la química, la física y la biología, que a la vez combina un conjunto de técnicas avanzadas como: la tecnología de cultivo celular, la ingeniería de materiales y los factores bioquímicos. Asimismo, la ingeniería de tejidos consiste en conseguir el crecimiento de determinadas células animales o humanas hasta dar lugar a tejidos completos, los cuales puedan ser implantados en el cuerpo humano, para resolver problemas clínicos y quirúrgicos asociados a la pérdida de tejido o fallo funcional de órganos. (Patrick *et al*, 1998 y Kelleher *et al*, 2010).

La meta de la ingeniería de tejidos es reparar, reemplazar y mantener la función de un tejido u órgano en particular, de manera que se superen los límites de los tratamientos convencionales basados en el trasplante de órganos e implantación de biomateriales, así se busca una solución permanente, para el tejido u órgano dañado, sin necesidad de terapias complementarias, es decir, tener un tratamiento eficaz a largo plazo y para lograrlo, no solo se requiere de células, sino también de un andamio que mimetice la matriz extracelular, para la adherencia y proliferación celular y recrear el tejido dañado (Langer *et al*, 1993 y Patrick *et al*, 1998).

2.2 ANDAMIO

Para obtener un buen sustituto de piel se requiere de un andamio, es decir, un componente indispensable para la ingeniería de tejidos. Se enlistan a continuación algunos requerimientos que han sido identificados como cruciales para la producción de andamios para la ingeniería de tejidos. (Hutmacher, 2001)

1. Poseer poros interconectados de escala apropiada para favorecer la integración del tejido y vascularización,
2. Estar construido de un material con biodegradabilidad controlada o bioreabsorbible, de ahí que el tejido eventualmente reemplace el andamio.
3. Tener propiedades fisicoquímicas adecuadas para favorecer la adhesión, diferenciación y proliferación celular.
4. Poseer propiedades mecánicas similares a las del sitio previsto para la implementación y manipulación del andamio.
5. No presentar alguna reacción adversa y
6. Ser fabricado fácilmente dentro de una variedad de formas y tamaños.

De acuerdo a los requerimientos antes mencionados, algunos materiales han sido adoptados para la síntesis o fabricación en andamios. De esta manera, la posibilidad de crear órganos o tejidos artificiales, para regenerar los tejido dañados sea hecho realidad, el sembrar células en ellos para su crecimiento *in vitro* y que finalmente puedan ser implantados en el cuerpo del paciente como una prótesis biológica (Langer *et al*, 1993 & Rabkin *et al*, 2002). El proceso general de la ingeniería de tejidos se muestra en la Figura 1.

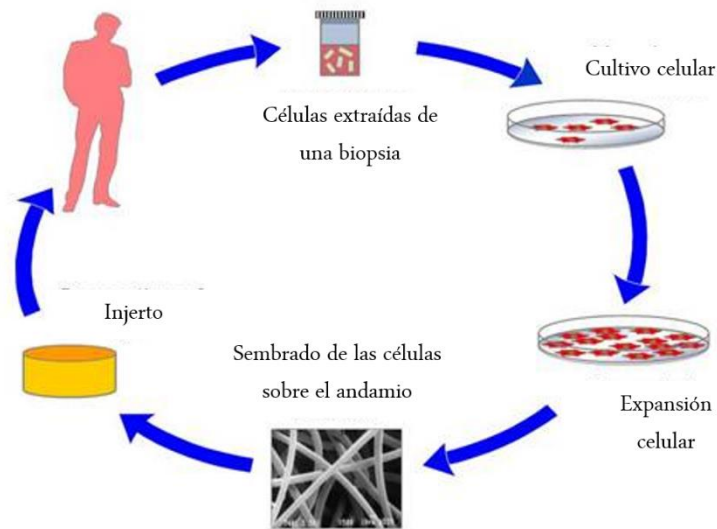


Figura 1. Proceso general de la Ingeniería de Tejidos.®

2.3 MATERIALES PARA LA FABRICACIÓN DE ANDAMIOS

Los materiales como tales, existen desde el principio de la humanidad, las tres clases de materiales usuales son cerámicas, metales y polímeros, que siempre han existido (Chalmers *et al*, 2008).

Los polímeros son los materiales más frecuentemente investigados en aplicaciones para el área de ingeniería de tejidos, seguido de los cerámicos. Con frecuencia estos materiales se han utilizado para formar materiales compuestos (Liu *et al*, 2013).

Los materiales cerámicos se han tomado como un materiales adecuados para construir tejidos duros (Burg *et al*, 2000). Esto es debido a que estos materiales cerámicos son parecidos a los componentes naturales inorgánicos con propiedades osteoconductoras. (LeGeros, 2002). Sin embargo, estos cerámicos son inherentemente frágiles y no pueden relacionarse directamente a las propiedades mecánicas de los tejidos duros.

® <http://textile.iitd.ac.in/highlights/fo18/01.htm>

2.4 POLÍMEROS

La palabra polímero por primera vez propuesto por Berzelio en 1833, está formada por las raíces “poly” del griego antiguo “ πολυζ” que significa muchos y “μεροζ” lo cual significa parte. Los polímeros son moléculas construidas de unidades químicas idénticas repetidas espacialmente para formar una cadena polimérica. (Chalmers *et al*, 2008).

Los polímeros naturales son materiales muy complejos, son productos de la vida como la celulosa o las proteínas, aminoácidos o como el DNA Algunos polímeros naturales como la madera, el hueso, el marfil, entre otros, fueron útiles para nuestros ancestros constituyeron las bases de las primeras herramientas humanas. Los polímeros sintéticos son materiales recientes, que el humano ha descubierto, lo cual data de hace un poco más de un siglo. El conocimiento y el entendimiento de sus propiedades pertenece al campo de la ciencia de los materiales, el estudio y entendimiento de su formación, propiedades y características involucran la química, la fisicoquímica y la física (Chalmers *et al*, 2008). Los polímeros sintéticos y naturales son una alternativa atractiva y versátil en su aplicación en el crecimiento de la mayoría de los tejidos (Albella *et al*, 1993).

2.4.1 Polímeros naturales

Los polímeros naturales también han sido empleados como biomateriales, tales como las proteínas producidas naturalmente o los polímeros de carbohidratos han sido usados como andamios para el crecimiento de varios tipos de tejidos. Algunos polímeros naturales como el colágeno, el quitosano, el ácido hialurónico tienen bajo potencial inmunogénico y un potencial bioactivo capaz de interactuar con el tejido huésped (Liu *et al*, 2013).

2.4.1.1 Quitosano

2.4.1.1.1 Generalidades

El quitosano un biomaterial prometedor, es derivado del segundo polímero natural más abundante en la naturaleza, la quitina, ya que cuenta con excelentes propiedades biológicas, merece una atención especial (Mizuno *et al*, 2003). El quitosano es un polímero lineal N-desacetilado derivado de la quitina (Figura 2), cuyas unidades de glucosamina se encuentran unidas mediante enlaces glucosídicos α -1-4 (Shahidi *et al*, 1999). De esta manera que cuando el número de grupos N-acetil glucosamina es mayor a 50%, se considera quitina y sí el número de unidades de glucosamina es menor entonces se trata de quitosano (Khor, 2003).

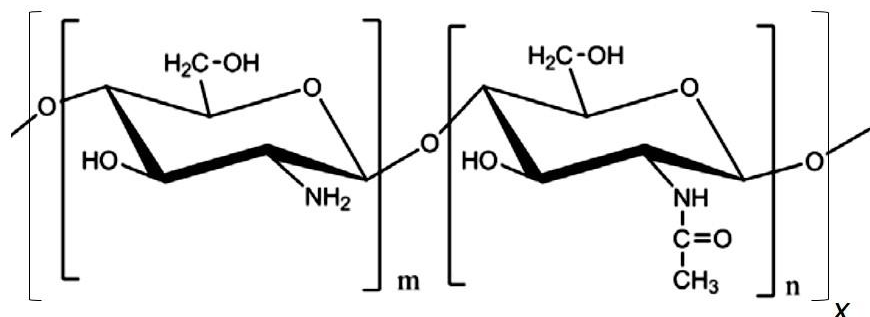


Figura 2. Estructura química del quitosano.

La mayor fuente de quitina a nivel industrial son los exoesqueletos de crustáceos, ya que se encuentran como desechos de la industria marisquera, El exoesqueleto de los crustáceos contiene de un 15-40% de proteínas y de un 20-50% de carbonato de calcio. También contiene otros componentes como: pigmentos, lípidos y otras sales (Brück, 2010).

2.4.1.1.2 Propiedades del quitosano

- Propiedades fisicoquímicas.

El quitosano es soluble en soluciones acuosas o alcohólicas de ácidos orgánicos e inorgánicos pH < 6. Es muy estable y poco sensible a la humedad, se descompone a temperaturas mayores de 185°C (Rabea *et al*, 2003). Tiene tres grupos funcionales reactivos: el grupo amino y dos hidroxilos del C-3 y C-6 (Hirano, 1999; Torres *et al*, 2012). El quitosano es una sustancia biodegradable, biocompatible y presenta actividad antimicrobiana (Rabea *et al*, 2003). Su pureza, grado de desacetilación, peso molecular (PM), viscosidad y estructura polimórfica varían de acuerdo con su proceso de producción, algunas de sus propiedades se presentan en la tabla 3 (Goosen, 1997).

Tabla 3. Propiedades del Quitosano

Propiedad	Valor	Unidad
PM ² (Mw)	200,000	Da
Viscosidad ³ (1% @ 25°C)	20 - 300	cps
Modulo de Young	32.6	MPa
Densidad en masa	0.40 – 0.66	g/cm ³

- Propiedades antimicrobianas del quitosano

El quitosano se ha utilizado como agente antimicrobiano de manera satisfactoria sobre: *Botritis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechtera sorokiana*, *Micronectriella nivallis*, *Piricularia orizae*, *Rhizoctonia solanii*, *Trichophyton equinum*, algas y algunas bacterias patógenas, Gram positivas y negativas como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*. (Rabea *et al*, 2003; Andres *et al*, 2010). La acción antimicrobiana está influenciada por factores intrínsecos como: tipo de quitosano, peso molecular, pH del medio de cultivo, condiciones ambientales, el hospedero, la composición química y nutritiva del sustrato, el grado de despolimerización y la presencia o

² Peso Molecular

³ Disolución de Ácido Acético al 1% en concentración al 1%.

ausencia de sustancias que interfieran, como lípidos y proteínas. Se ha demostrado que la actividad inhibitoria del quitosano contra hongos fitopatógenos es mejor a pH de 6 o menor que a pH de 7.5 o mayor, esto debido a que a pH más ácidos los grupos aminos se encuentran protonados y por lo tanto, con carga positiva (Rabea *et al*, 2003).

2.4.1.1.3 Aplicaciones del quitosano

El quitosano es un biomaterial de gran aplicación actual, las principales aplicaciones son:

- En la industria de alimentos: preservación de alimentos, suplementos alimenticios, considerado hipocolesterolémico, antioxidante, entre otras.
- Ciencia de los materiales: empaques, membranas, biosensores, hidrocolodes, cosméticos y textiles.
- Ciencia médica: ingeniería de tejidos, liberación de fármacos, apósitos para heridas, lentes de contacto, suturas, anticoagulante, aplicaciones ortopédicas y periodontales.
- Agricultura: protección de semillas, liberación de fertilizantes y fungicidas.
- Diversas: tratamiento de agua, nanopartículas en fotografías, alimento para animales, etc. (Prashanth *et al*, 2007).

2.4.1.2 Colágeno Hidrolizado tipo I

2.4.1.2.1 Generalidades

El colágeno es una fibra del tejido conjuntivo y representa cerca del 30% de la materia proteica animal. Es una proteína fundamental en el cuerpo que garantiza la cohesión, elasticidad y regeneración de la piel, cartílagos y huesos. Hay diferentes tipos de colágeno, el cual cambia de acuerdo al tipo de tejido del cual es extraído y de su tratamiento. El colágeno es una proteína fibrosa con estructura tridimensional, rica en glicina y prolina (Ver Figura 3); consta de tres cadenas polipeptídicas largas, cada una contiene el aminoácido glicina en cada tres posiciones, lo que permite que las cadenas se enrollen unas en torno a

las otras, lo cual genera una triple hélice regular. La glicina por su tamaño pequeño es el único aminoácido que se puede colocar en el centro de la hélice (Alberts, 2004).

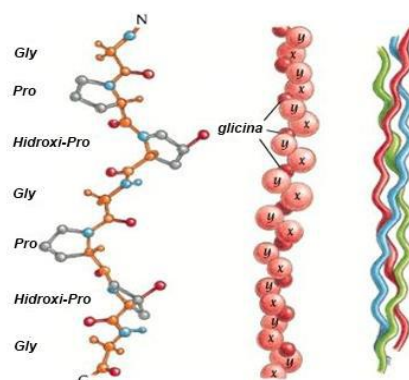


Figura 3. Estructura química del colágeno tipo I (Lehninger *et al*, 1995).

Varias moléculas de tropocolágeno se unen unas con otras, por sus extremos, lo cual da lugar a sistemas de fibrillas resistentes que mantienen unidos a los tejidos. Es el componente mayoritario de la matriz extracelular y del tejido conjuntivo, el cual constituye el 25% de la masa total de proteínas de los mamíferos. En el tejido conjuntivo se encuentran los tipos: I, II, III, V y XI, donde el tipo I es el componente principal de la piel y huesos (Campos, 2011).

2.4.1.2.2 Propiedades del colágeno hidrolizado tipo I

Tabla 4. Propiedades del Colágeno Hidrolizado tipo I

Propiedad	Valor	UNIDAD
PM ² (Mw)	5,000	Da
Contenido Proteico	≥ 90	%
Viscosidad ⁴ (20% @ 25°C)	5.5 – 7.5	mPa.s
pH (6.65% @ 45°C)	5.0 – 6.5	
Densidad ⁴	0.40 – 0.55	g/cm ³

⁴ Disolución en agua desionizada.

2.4.1.2.3 Aplicaciones biomédicas del colágeno

El colágeno se ha utilizado en la medicina como soporte para la liberación de fármacos y como andamio celular, ya sea solo o ligado con alguna otra molécula para mejorar sus propiedades mecánicas y/o biológicas, los estudios relevantes para este trabajo se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Materiales utilizados en ingeniería de tejidos basados en el colágeno.

Referencia	Material	Entrecruzamiento o modificación del material.	Resultado
Eun <i>et al</i> , (2006)	Colágeno extraído de medusa.	Entrecruzado con hidrocioruro/N-hidroxisuccinamida 1-etil-(3-3-dimetilaminopropil) carbodiamida, mediante liofilización.	Mayor viabilidad celular que el colágeno bovino, la gelatina, el ácido hialurónico y el glucano. Obtuvo mayor porosidad y una estructura más interconectada, por lo que tuvo mayor densidad celular. No indujo ninguna respuesta inmune.
Lyons <i>et al</i> , (2010)	Colágeno bovino	Dos formulaciones: 1. glicosaminoglucano 2. fosfato de calcio.	Ambas formulaciones presentaron excelente poder de cicatrización de hueso, comparados con heridas sin tratamiento.
He <i>et al</i> , (2010)	Colágeno bovino		Los grupos sulfhidrilos unieron el andamio y hubo crecimiento vascular endotelial.

2.4.2 Polímeros sintéticos

Los poliésteres alifáticos como el poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) (PLLA), sus copolímeros (por ejemplo PLGA) y poli (ϵ -caprolactona) (PCL) son los más usados en la fabricación de andamios para la aplicación en ingeniería de tejidos. (Agarwal et al, 2008; Hutmacher, 2001). Los productos de degradación de estos polímeros (ácido láctico y ácido glicólico) están presentes en el cuerpo humano y son removidos por las vías metabólicas naturales. Los polímeros biodegradables han sido usados extensamente en la ingeniería de tejidos, la principal ventaja de usar este tipo de polímeros es la capacidad de soportar el crecimiento de tejido. (Liu *et al.*, 2013).

2.4.2.1 Copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA)

2.4.2.1.1 Generalidades

El poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) está compuesto por dos monómeros: el ácido láctico y el ácido glicólico, ver Figura 4. La proporción de los monómeros y el peso molecular establecen la identidad y propiedades del copolímero. Por ejemplo, el PLGA 88:12 significa que el copolímero contiene 88% de ácido láctico y 12% de ácido glicólico. Así a mayor proporción de ácido láctico, mayor es el tiempo que tarda en degradarse el polímero en medio acuoso. Mientras más alto el peso molecular, mayores serán sus propiedades mecánicas.

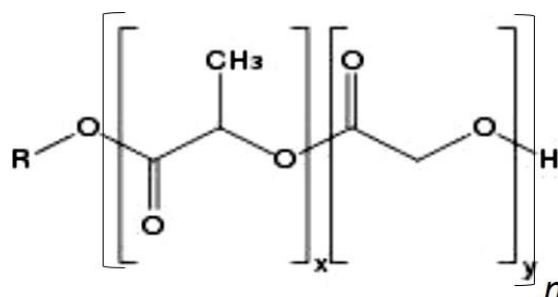


Figura 4. Estructura Química del PLGA.

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) ha aprobado el PLGA para micro y nano partículas y para muchos dispositivos, tales como: injertos, suturas, implantes y dispositivos protésicos. El PLGA es un polímero biodegradable y biocompatible debido a que monómeros que lo forman se producen de forma natural y tienen una toxicidad mínima. El PLGA es naturalmente amorfo. Mientras los ácidos láctico y glicólico son pobremente solubles en la mayoría de los solventes, el PLGA se disuelve en muchos solventes comunes como: tetrahidrofurano, acetona, acetato de etilo y solventes clorados.

2.4.2.1.2 Propiedades del PLGA

- Propiedades fisicoquímicas del PLGA

El PLGA está compuesto de poli (D, L-ácido láctico) y poliacidoglicólico (PGA). El poli (L-ácido láctico) y poli (D-ácido láctico) son semicristalinos, mientras que poli (D, L-ácido láctico) y PGA son de naturaleza amorfa. Se ha encontrado que los PLGAs que contienen más del 70% de glicólida son de naturaleza amorfa. El grado de cristalización y el punto de fusión de los polímeros están directamente relacionados con el peso molecular de los polímeros (Li *et al*, 1999).

Las propiedades físicas afectan las propiedades mecánicas de los polímeros y de ello depende si puede ser formulado como un dispositivo de liberación de medicamentos. También estas propiedades pueden controlar la velocidad de la degradación- Comercialmente este polímero se puede identificar por su viscosidad intrínseca, la cual está directamente relacionada con el peso molecular (Li *et al*, 1999).

El esfuerzo mecánico, el hinchamiento y la velocidad de biodegradación son directamente influenciadas por la cristalinidad del PLGA, el cual, sí contiene una proporción 50:50, de

láctica: glicólida, es hidrolizado mucho más rápido que los que contienen una proporción mayor de cualquiera de los dos monómeros (Gilding *et al*, 1979 & Li *et al*, 1999).

El ácido láctico es más hidrofóbico que el ácido glicólico, por lo que el PLGA rico en lactida es menos hidrofílico, absorbe menos agua, y consecuentemente, se degrada más lentamente. El PLGA tiene una viscosidad inherente de 0.5-0.8 mPa en promedio. Las temperaturas de transición vítrea (T_v) de los copolímeros de PLGA son aproximadamente de 45°C, por lo que son vítreos a la temperatura fisiológica de 37°C, debido a que sus cadenas son rígidas, lo cual les otorga una resistencia mecánica significativa, para ser formulado como dispositivo degradable. Ha sido reportado que la T_v de PLGA decrece con la disminución del contenido de láctida en el copolímero y con la disminución del peso molecular (Gilding *et al*, 1979 & Li *et al*, 1999).

Para elegir los copolímeros de PLGA se deben considerar sus propiedades físicas y mecánicas, las que dependen de diferentes factores, tales como el PM, la proporción láctida/glicólida del copolímero, la cristalinidad y el grado de regularidad geométrica de cadenas individuales (Li *et al*, 1999).

- Biodegradación de PLGA

Tanto *in vitro* como *in vivo*, la degradación del copolímero PLGA en medio acuoso (degradación hidrolítica o biodegradación) se da a través de la escisión de sus enlaces éster de la cadena. La degradación de las cadenas poliméricas de PLGA generalmente ocurre a una velocidad uniforme. Se ha registrado que la biodegradación del PLGA se produce a través de escisiones hidrolíticas aleatorias en la cadena del polímero una vez que se ha hinchado por efecto del agua. Los grupos terminales carboxílicos presentes en las cadenas de PLGA aumentan en número al escindirse durante el proceso de biodegradación. Estos grupos catalizan el proceso de biodegradación. También se ha reportado que los fragmentos grandes se degradan más rápido internamente y que las regiones amorfas se degradan más

rápidamente que las regiones cristalinas, ya que absorben agua más rápidamente. Las tasas de biodegradación de los copolímeros de PLGA dependen de la relación molar del ácido láctico y del glicólico en la cadena polimérica, del peso molecular del polímero, del grado de cristalinidad y de la T_v del copolímero. (Lewis, 1990 & Göpferich *et al*, 1996).

- Biocompatibilidad de PLGA

El PLGA tiene varias ventajas, tales como: buenas propiedades mecánicas, baja inmunogenicidad y toxicidad, excelente biocompatibilidad y cinética de biodegradación predecible. La amplia aceptación de co-polímeros de láctida/glicólida como materiales de sutura los hace candidatos atractivos para aplicaciones biomédicas como reconstrucción de ligamentos, remplazo para tráquea, apósitos quirúrgicos, injertos vasculares y nervios, reparaciones de fracturas dentales. (Lewis *et al*, 1990 & Visscher *et al*, 1988).

Las microesferas de PLGA (aproximadamente de tamaño de 30 μ m), aunque han sido reportados como compatibles, inducen una leve reacción a cuerpo extraño (Visscher *et al*, 1988). El volumen de microesferas inyectadas dentro del tejido puede ser considerado como un implante poroso abierto, el cual induce una respuesta inflamatoria caracterizada por una infiltración de macrófagos, neutrófilos, linfocitos y por la formación de fibrina, células gigantes y nuevos vasos sanguíneos (Ziats *et al*, 1988 & Ward, 1997).

2.5 NANOTECNOLOGÍA EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

2.5.1 Técnicas de fabricación de andamios

Varias técnicas han sido desarrolladas para obtener andamios de estructuras porosas de materiales sintéticos y naturales. Estas técnicas de fabricación de andamios convencionales están definidas como el proceso para crear andamios con estructuras de poro continuo e interrumpido, que carece de cualquier microarquitectura de canales de largo alcance.

En la tabla 6 se presentan las ventajas y desventajas de algunas técnicas.

Tabla 6. Técnicas de fabricación de andamios (Lanza *et al*, 2014).

Técnica	Descripción	Ventajas	Desventajas
Impresión 3D	Consiste en un modelado en tres dimensiones de la deposición del material y/o las células, formado capa a capa para crear un andamio por medio de impresión.	Se pueden utilizar un amplia variedad de materiales, otorga alta porosidad y arquitectura definidas, repetitividad exacta, permite incorporar moléculas bioactivas y células.	Al fabricarse no dispone de un alto rendimiento, requiere de un alto tiempo de consumo.
Unión de fibras	Las fibras de polímero son calentadas, para ser fundidas en los puntos de intersección.	Es un procedimiento sencillo, otorga gran área superficial al radio del volumen, promueve la adhesión celular.	Requiere de altas temperaturas de proceso, se tiene un control limitado de la porosidad.
Electrohilado	Requiere de la aplicación de una diferencia de potencial para formar una matriz no tejida de fibras de polímero.	Se pueden obtener diámetros de fibras del orden de nanómetros.	Tiene un limitado control de la deposición de las fibras y de la porosidad, además pobre integridad mecánica.
Solvent casting/ particulate leaching	El porógeno se incorpora dentro del polímero y se solidifica, posteriormente el porógeno se disuelve y se lixivía.	Requiere de una mínima cantidad de material para el procedimiento, otorga alta porosidad y permite adicionar materiales compuestos.	Genera estructuras porosas no interconectadas, pueden quedar residuos de porógenos y solventes, los cuales perjudican la bioactividad.

Continuación Tabla 6. Técnicas de fabricación de andamios (Lanza *et al*, 2014).

Técnica	Descripción	Ventajas	Desventajas
Moldeo por fundido	El polímero y el porógeno son calentados, se colocan en un molde. Al solidificarse se remueve del molde, el porógeno se lixivia.	Se tiene un control de la forma con el molde, la geometría es flexible y permite incorporar materiales compuestos.	Requiere de altas temperaturas de proceso, los poros tiene poca interconectividad.
Laminación de membranas	Se forman capas delgadas porosas del polímero, las cuales son fusionadas químicamente.	Se obtienen contornos y geometrías definidas, las fronteras entre las capas no son visibles.	Es necesario definir la forma de cada capa, el tiempo del proceso es alto, los solventes son citotóxicos.
Extrusión	El polímero es calentado y forzado a pasar por un dado, forma perfiles en tres dimensiones de área transversal.	Disponibilidad para fabricar estructuras tubulares.	El proceso necesita altas presiones y temperaturas.
Secado en frío (Freeze-drying)	La solución de polímero es emulsificada, la cual es colocada en un molde y congelada.	Genera cierta interconectividad de los poros.	Se obtienen materiales con poca porosidad, pero mayor que en otros procedimientos.
Separación de fases	El polímero es disuelto en un solvente, las moléculas bioactivas son adicionadas para formar una mezcla homogénea, se enfría y congela consecutivamente, lo cual separa las fases y el solvente se sublima.	Aplicación potencial en liberación de fármacos; las moléculas bioactivas no son dañadas por los solventes.	Se puede tener solvente residual. Los tamaños de poro son limitados.
Emulsión de alta fase interna (high-internal-phase emulsion)	Se realiza una emulsión de agua en aceite, de acuerdo a los estándares de HIPE, los monómeros de la fase orgánica son usados para sintetizar y entrecruzar el andamio polimérico poroso.	Tiene la capacidad de ser inyectable, genera buena morfología de los poros, los polímeros biodegradables pueden ser usados.	Los tipos de polímeros que se pueden emplear son limitados y requiere de altas temperaturas de proceso.

Continuación Tabla 6. Técnicas de fabricación de andamios (Lanza *et al*, 2014).

Técnica	Descripción	Ventajas	Desventajas
Espumado con gas (Gas foaming)	El polímero es comprimido y expuesto a altas presiones de gas, los poros se forman al disminuir la presión.	Elimina la necesidad de solventes orgánicos y mejora la adhesión celular.	Resulta un material sin interconectividad de poros y el tamaño de los poros es limitado.
Autoensamblado de péptidos	Formas de péptidos diseñados en geometrías complejas (esferas, fibras, hojas,...) vía interacciones hidrofóbicas-hidrofilicas.	Puede ser diseñado para promover varios comportamientos celulares, compatible con el cultivo in vitro.	Materiales caros, conocimientos de diseño son necesarios, se tiene un tamaño del andamio limitado.
Polimerización in situ	El polímero es inyectado en el lugar y polimeriza o entrecruza después de la implantación.	Es posible la implantación inmediatamente y las necesidades del proceso son mínimas.	Se obtienen propiedades mecánicas limitadas, poca porosidad, pueden tenerse subproductos de la polimerización, los cuales son dañinos.

2.5.2 Técnica de Electrohilado en solución

2.5.2.1 Generalidades

La técnica de electrohilado para producir andamios es relativamente reciente, pero ha sido ampliamente estudiada en los últimos 20 años, gracias a la posibilidad de crear fibras en escala micro y nanométrica para una gran variedad de aplicaciones. Esta técnica aporta a los elementos desarrollados diversas características como: amplia área superficial, porosidad y buenas propiedades mecánicas, por lo cual es una técnica muy atractiva a nivel biotecnológico. La técnica es simple, barata, versátil, capaz de formar estructuras que mimetizan la estructura de la matriz extracelular, lo que ha permitido procesar una gran variedad de polímeros en los últimos años. Sin embargo, durante el desarrollo del proceso existen variables que influyen en las características de los elementos obtenidos, ya sea porque

están ligadas a las características del material base o porque su desempeño está relacionado con los parámetros inherentes al proceso. (Duque *et al*, 2013 & Khorshidi *et al*, 2015).

El proceso de electrohilado en solución requiere de disolver el polímero en un líquido volátil de alta constante dieléctrica. Permite obtener fibras por medio del estiramiento coaxial de una solución viscoelástica (Teo *et al*, 2006), estas fibras poseen diámetros que van a rangos de las sub micras a los nanómetros, donde es posible encontrar características únicas, como: un área superficial muy alta en relación al volumen (Tong *et al*, 2012) flexibilidad de la superficie, alta porosidad (Li *et al*, 2002), poros interconectados. Estas características hacen de las nanofibras óptimos candidatos para una gran variedad de aplicaciones biomédicas, entre ellas: la ingeniería de tejidos, los textiles, elementos para cubrir heridas, medios de filtración, membranas especiales y diversas aplicaciones médicas, tales como reemplazo de huesos, implantes dentales, sistemas de liberación de fármacos, injertos vasculares y vasos sanguíneos artificiales, entre otras.

La técnica se basa en aplicar una diferencia de potencial tal que supere las fuerzas de tensión superficial de una gota de solución polimérica en la punta del inyector (generalmente la aguja de una jeringa). De esta forma, a un voltaje determinado, un fino hilo de solución es expulsado desde la punta de la aguja (capilar) hasta el colector que recibe las fibras libres de solvente. El hilo se mueve en la dirección del campo eléctrico, se estira de acuerdo a las fuerzas externas e internas, aunque experimenta inestabilidad en algunas ocasiones. El disolvente se evapora en el trayecto entre el capilar y el colector, así los segmentos de fibras son depositados en el colector. (Duque *et al*, 2013).

2.5.2.2 Equipo de electrohilado

El típico montaje para la ejecución de la técnica de electrohilado se muestra en la Figura 5. Consta de un capilar a través del cual debe ser expulsada la solución polimérica (aguja, cono, etc.); una fuente de alto voltaje que posee dos electrodos los cuales deben conectarse uno al

capilar de salida de la solución y otro directamente al plato colector (lamina de metal conductor, mandril rotativo, etc.) (Still *et al*, 2008 & Fang *et al*, 2008) donde se depositan las fibras y se acaba de evaporar el disolvente.

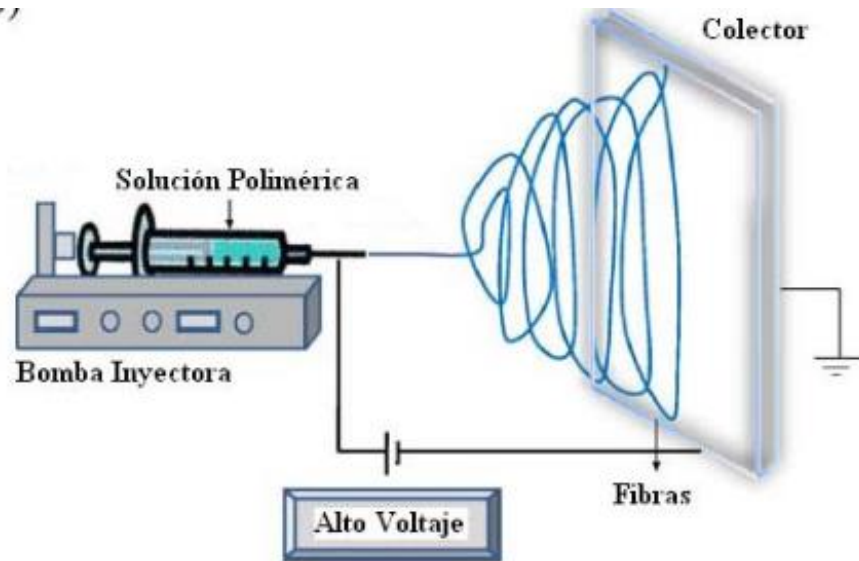


Figura 5. Equipo de electrohilado (Duque *et al*, 2013).

Esta técnica involucra distintos parámetros, los cuales influyen en la formación y características de las fibras. Dichos parámetros se mencionan a continuación (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros involucrados en el electrohilado y sus efectos en la formación de fibras. (Duque *et al*, 2013).

Parámetro		Características que aporta
Concentración de la Solución de polímero	↑	Dificulta el paso de la solución a través del capilar.
	↓	Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al plato colector.
Tensión superficial	↑	Aparición de defectos en las fibras.
	↓	Obtención de fibras lisas, para disminuir la tensión superficial se pueden adicionar solventes con baja tensión, como el etanol.
Conductividad de la solución	↑	Mayor transporte de cargas, mayor estiramiento de la solución, fibras más delgadas.
	↓	Menor transporte de cargas, menor estiramiento de la solución fibras más gruesas.
Voltaje	↑	Fibras gruesas, distorsión del jet, aparición de defectos.
	↓	Poco impulso para llegada de la solución al plato colector.
Flujo de Salida	↑	Fibras más gruesas, defectos con mayor tamaño.
	↓	Mayor tiempo para la evaporación del solvente, fibras sin defectos.
Distancia aguja-colector	↑	Las fibras pueden romperse debido a su propio peso. Mayor estiramiento de la solución, obtención de fibras delgadas.
	↑↑	Aparición de defectos (gotas) en las fibras al trabajar con muy altas o muy bajas distancias.
	↓↓	
	↓	Poco tiempo para la evaporación del solvente por tanto, las fibras llegan húmedas al colector
Humedad Relativa	↑	Aparición de poros en las fibras

2.6 INGENIERÍA DE TEJIDOS Y SU APLICACIÓN EN PIEL

2.6.1 La piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo, el cual tiene una superficie media de 1,6 m² y un peso de aproximadamente 4 Kg. La piel tiene múltiples funciones (Tabla 8) que son desarrolladas por las diferentes estructuras, células y demás componentes que la forman. La piel cubre toda la superficie externa del cuerpo humano y es el sitio principal de interacción con el mundo circundante. Sirve como una barrera protectora que impide la exposición de los tejidos internos a un trauma, a la radiación ultravioleta (UV), a temperaturas extremas, a toxinas y bacterias. Otras funciones importantes incluyen la percepción sensorial, la vigilancia inmunológica, la termorregulación y el control de la pérdida de líquido insensible (Burns *et al*, 2004).

Tabla 8. Funciones de la piel.

Función	Mecanismo	Acción
Inmune	Inmunidad natural, adoptiva	Prevenir infecciones fúngicas, bacterianas, víricas, enfermedades autoinmunes.
Barrera	Estrato córneo, epidermis, melanina	Prevenir la infección, absorción y deshidratación
Secreción, excreción	Glándulas	Función glandular
Percepción	Fibras nerviosas	Calor, frío, dolor y presión.
Síntesis	Melacinocitos, queratinocitos	Vitamina D, queratina y melanina

2.6.1 Anatomía de la piel

La piel es un orgánulo pluriestratificado, compuesto por tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis, como se observan en la Figura 6.

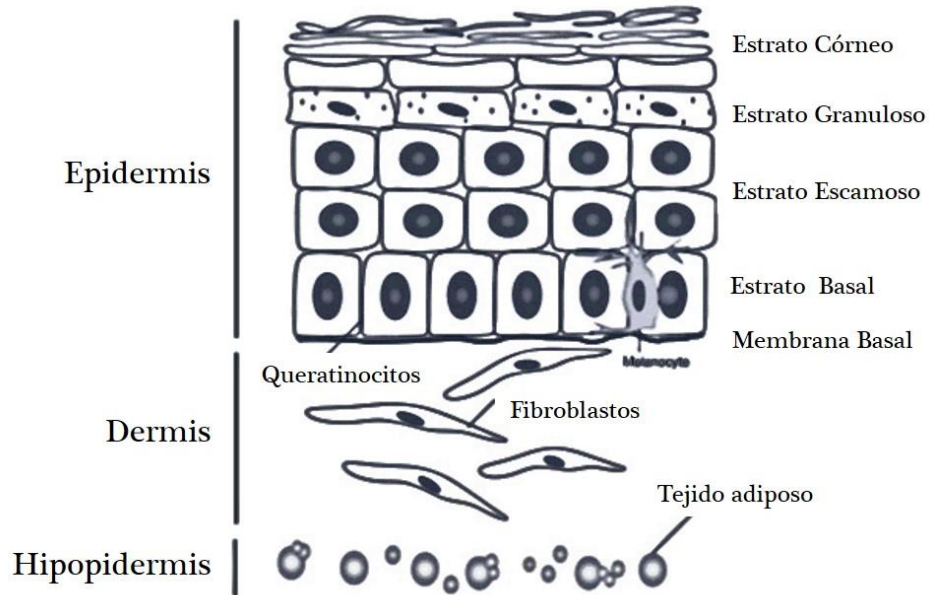


Figura 6. Anatomía de la piel humana (Brohem *et al*, 2010).

Epidermis: es el epitelio estratificado que se extiende por la parte más externa, presenta un grosor variable con un valor medio de 0.1mm, se puede alcanzar en zonas como las palmas de las manos y las plantas de los pies de 1.0 a 2.0mm. Consta de queratinocitos, melanocitos, células Langerhans y células Merkel. La epidermis de la piel gruesa está formada por cinco estratos: basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo (Tabla 9). Sin embargo, en el caso de la piel delgada cuenta con un estrato córneo delgado, carece de estrato lucido y el estrato granuloso no es aparente (Gartner *et al*, 2002).

Tabla 9. Capas de la epidermis (Gartner *et al*, 2002).

Estrato	Características
Basal	Capa más profunda de la epidermis, se encuentra una membrana basal que limita la dermis de la epidermis. Los melanocitos se encuentran en este estrato. Las células presentes en este son las responsables de la renovación celular de la epidermis.
Espinoso	Es la capa más gruesa de la epidermis, está compuesta por células poliédricas a aplanadas, los queratinocitos localizados en esta capa también pueden tener actividad mitótica.
Granuloso	Consiste en capas de queratinocitos aplanados es la capa más superficial de la epidermis en la que las células aún tienen núcleo por la liberación de lípidos por los gránulos que forman el estrato, conforman una capa impermeable, la cual no permite que el líquido tisular y el agua del medio externo pasen por el espacio intercelular.
Lúcido	Una de las capas de la epidermis, situada inmediatamente por debajo del estrato córneo y presente solamente en la gruesa piel de las palmas de las manos y las plantas de los pies. Es el estrato delgado superficial al estrato granuloso. Capa formada por muchos estratos de queratinocitos muertos con sus contornos poco definidos.
Córneo	Es la capa más superficial de la epidermis, se compone de capas de células cornificadas, aplanadas y muertas. Estas células carecen de núcleo y están llenas de filamentos de queratina. Forma una barrera muy eficaz que protege al organismo de los agentes del medio externo.

Dermis: es el tejido conjuntivo rico en colágena. Es atravesada por vasos y nervios, es el responsable de la mayoría de las funciones de sostén. Es el tejido especializado característico de la piel y presenta un grosor de 5mm como máximo. La función principal de la dermis es sostener y apoyar a la epidermis. La dermis es una estructura más compleja y se compone de 2 capas, la dermis papilar más superficial y la dermis profunda reticular. La dermis papilar

es más delgada, que consiste en tejido que contiene capilares sueltos conectivos, fibras elásticas, fibras reticulares, y algunos de colágeno. La dermis reticular se compone de una capa más gruesa de tejido conectivo denso que contiene vasos sanguíneos más grandes, las fibras elásticas estrechamente entrelazadas, y haces gruesos de fibras de colágeno dispuestas en capas paralelas a la superficie. El fibroblasto es el principal tipo de células de la dermis. Estas células producen y secretan procolágeno y fibras elásticas.

Hipodermis: es la capa subcutánea subyacente rica en tejido adiposo localizada debajo de la dermis. El tejido hipodérmico actúa como aislante del cuerpo, sirve como reservorio energético, funciona como amortiguador de la piel y su grosor depende de varios factores como peso de la persona, edad, alimentación, etcétera (Chu *et al*, 2005).

2.6.2 Propiedades mecánicas de la piel

Las propiedades de la piel varían con la edad de la persona y ubicación del tejido. Aunque la epidermis es más rígida que la dermis. Se considera que las propiedades biomecánicas determinadas a partir de pruebas realizadas a la piel en su conjunto se deben principalmente al efecto del colágeno dérmico, ya que se obtienen resultados similares a partir de ensayos de colágeno. En la literatura, el módulo de Young de la piel, varía entre 0.42MPa y 0.85MPa para ensayos de torsión, 4.6MPa y 20MPa para ensayos de tensión (Manschot *et al*, 1986). Las fibras de colágeno son el constituyente principal de la dermis (77% del peso seco libre de grasa) y forman una red irregular de fibras onduladas en espiral en dirección casi paralela con la superficie de la piel. De acuerdo a Wilkes *et al*, las fibras están separadas unas de otras a lo largo de la mayor parte de su longitud. El colágeno se caracteriza por su alta resistencia a la tensión (1.5-3.5 MPa), baja extensibilidad (ruptura en probetas, del orden de 5-6%), y una elevada rigidez (módulo de Young de aproximadamente 0,1 GPa a 1 GPa en la región lineal) (Manschot *et al*, 1986).

2.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE CARACTERIZACIÓN

2.7.1 Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

La espectroscopía infrarroja (FT-IR) es una técnica cuantitativa, que permite obtener información acerca de los procesos de absorción y emisión de las moléculas que se encuentran en la materia (Wade, 2006). Esta espectroscopía se fundamenta en la absorción de la radiación infrarroja por las moléculas en vibración, una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja, cuando dicha luz incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. La molécula comenzará a vibrar de una manera determinada debido a la energía que se suministra mediante la luz infrarroja (Skoog, 2002). En la figura 7 hay dos tipos de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces.



Figura 7. Tipos de vibraciones.

2.7.2 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica que monitorea una propiedad física de una sustancia y/o de sus productos de reacción en función de la variación de la temperatura bajo una atmósfera controlada. Se muestra en un analizador termogravimétrico y el resultado gráfico se denomina curva de análisis térmico. El análisis termogravimétrico es

una técnica que monitorea el cambio del peso de la sustancia en función de la temperatura o del tiempo. Existe el TGA dinámico, donde la muestra se calienta en una atmósfera controlada con una rampa de calentamiento y el TGA isotérmico, donde la muestra se mantiene en una temperatura constante y se registran las variaciones de peso. Estas variaciones de temperatura no siempre implican una pérdida en la masa de la muestra, sino existen cambios térmicos que se acompañan de un cambio de masa, como la descomposición, la sublimación, la reducción, la desorción, la absorción y la vaporización. Algunos materiales pueden aumentar su masa al reaccionar con la atmósfera en el entorno de ensayo (Hatakeyama, 1999).

Los resultados pueden mostrar cambios como fusión, solidificación y cristalización. El uso principal del TGA es la detección de la temperatura inicial de los procesos térmicos y su caracterización cuantitativa. La técnica consiste en colocar la muestra en un platillo o crisol también conocido como portamuestra donde se coloca la muestra, próximo a un sensor que detecta la temperatura y sus variaciones durante el experimento. El equipo consta de una termobalanza, la cual mide de manera continua el peso de la muestra en función de la temperatura o tiempo, un horno: Intervalo de T (RT – 1500 °C), velocidad de calentamiento (0–200°C/min), Balanza aislada térmicamente del horno y un sistema de gas de purga: Gases de purga (N₂, Ar, O₂: depende del análisis).

2.7.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica como puede ser la determinación de calores específicos, puntos de ebullición y cristalización, pureza de compuestos cristalinos, entalpías de reacción y determinación de otras transiciones de primero y segundo orden.

- El DSC puede trabajar en un intervalo de temperaturas que va desde la temperatura del nitrógeno líquido hasta unos 600 °C, con rampas de temperaturas de 10 a 20 °C /min.

- En el campo de los polímeros pueden determinarse transiciones térmicas como la temperatura de transición vítrea T_v , la temperatura de fusión T_f , también se pueden hacer estudios de compatibilidad de polímeros, reacciones de polimerización y procesos de curado. Cualquier reacción polimérica acompañada por un cambio entálpico puede ser seguida por DSC.
- Esta técnica es ampliamente utilizada para el estudio de reacciones de polimerizaciones. La velocidad con que se desprende este calor está relacionada con el desarrollo de la reacción, lo que permite el estudio de la cinética de polimerización (Llorente, 1991).

La finalidad de la calorimetría diferencial de barrido es registrar la diferencia en el cambio de entalpía que tiene lugar entre la muestra y un material inerte de referencia en función de la temperatura o del tiempo, cuando ambos están sometidos a un programa controlado de temperaturas. Esto hace posible emplear el principio de “balance nulo” de temperatura. Cuando en la muestra se produce una transición térmica (un cambio físico o químico que da lugar a una liberación o absorción de calor), se adiciona energía térmica bien sea a la muestra o a la referencia, con objeto de mantener ambas a la misma temperatura. Debido a que la energía térmica es exactamente equivalente en magnitud a la energía absorbida o liberada en la transición, el balance de energía proporciona una medición calorimétrica directa de la energía de la transición.

2.7.4 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto (Figura 8) es un parámetro fundamental para caracterizar la hidrofiliicidad, la humectación y la biocompatibilidad en los materiales. La expresión que liga el ángulo de contacto de un líquido sobre un sólido con las tensiones superficiales del sólido (γ_s), del líquido (γ_L) e interfacial sólido/líquido ($\gamma_{s/L}$), está dada por:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_s - \gamma_{s/L}}{\gamma_L} \quad \dots (1)$$

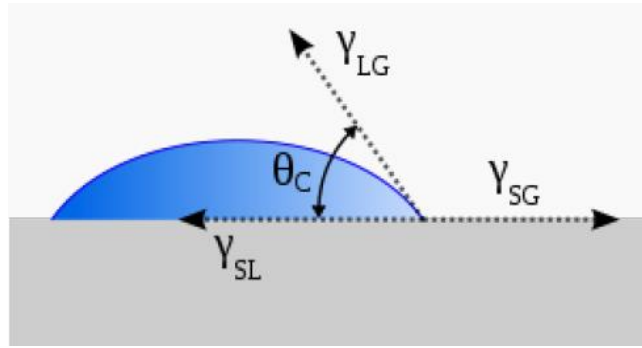


Figura 8. Esquema del ángulo de contacto, y de las tensiones que actúan en la línea de contacto entre sólido, líquido y aire.

Un aumento de la humectabilidad puede conseguirse al realizar que la superficie sea más hidrofílica, lo cual a la vez conlleva un aumento de γ_S , también suele ocurrir una disminución de $\gamma_{S/L}$. Por otro lado, para un aumento de la humectabilidad también puede buscarse una disminución de γ_L , lo cual se consigue con la introducción de humectantes en las soluciones de acondicionamiento; estas sustancias también suelen producir una disminución de $\gamma_{S/L}$, y por tanto, contribuyen a un aumento de la humectación (Torrent, 1992).

2.7.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

En 1938 Ardenne Von M. construyó el primer microscopio electrónico de barrido, cuyo principio se basa en un haz de electrones que focaliza y rastrea la superficie del espécimen, de tal manera que los electrones no atraviesan la muestra, sino que son absorbidos por la superficie de la misma. Esto produce una emisión secundaria de electrones que son captados por un sistema integrador y transductor de imagen, para hacerla observable en un monitor similar a los empleados en un televisor (Hearle *et al*, 1974).

La preparación de las muestras es relativamente fácil, ya que la mayoría de los SEM sólo requieren que estas sean conductoras. De esta forma, la muestra generalmente es recubierta con una capa de carbono o una capa delgada de un metal como el oro para conferirle carácter

conductor. Posteriormente se barre la superficie con electrones acelerados que viajan a través del cañón. Un detector formado por lentes basadas en electroimanes, mide la cantidad e intensidad de electrones que devuelve la muestra, capaz de mostrar figuras en tres dimensiones mediante imagen digital. Su resolución está entre 4 y 20 nm, lo cual depende del microscopio. El esquema general de un microscopio electrónico de barrido se muestra en la figura 9.

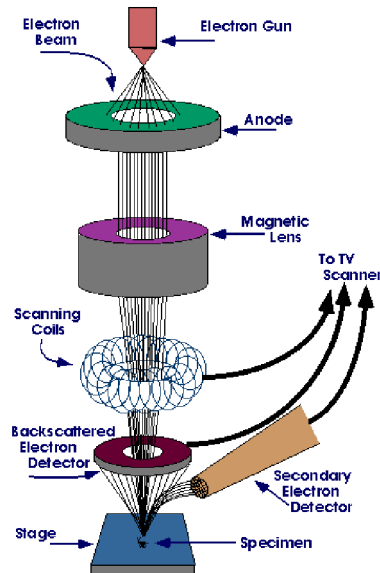


Figura 9. Esquema de las partes de un microscopio electrónico de barrido.

El microscopio electrónico de barrido proporciona información morfológica y topográfica sobre la superficie de los sólidos, que son normalmente necesarias para entender el comportamiento de la superficie. Así mismo se utiliza ampliamente en la biología celular. Aunque permite una menor capacidad de aumento que el microscopio electrónico de transmisión, éste permite apreciar con mayor facilidad texturas y objetos en tres dimensiones que se hayan pulverizado metálicamente antes de su observación. Por esta razón solamente pueden observarse organismos muertos, y no se puede ir más allá de la textura externa que se quiera ver. Los microscopios electrónicos sólo pueden ofrecer imágenes en blanco y negro puesto que no utilizan la luz visible. Este instrumento permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, proporciona información morfológica del material analizado. A partir de él se producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características. Con él

se pueden observar los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de diversos materiales, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas.

2.7.6 Ensayo de Tensión

El estudio de las propiedades mecánicas se refiere a la respuesta de un cuerpo cuando se le somete a una fuerza externa, la cual genera relaciones del tipo tensorial con la deformación que sufre este material. De los diferentes ensayos existentes, el más empleado es el ensayo de tensión en una dimensión, el cual proporciona la mayoría de los datos relevantes para el primer estudio mecánicos, de dichos materiales (James *et al*, 1995).

Normalmente, una probeta preparada es sometida a una carga uniaxial gradualmente creciente (estática) hasta que ocurre la falla. En un ensayo de tensión simple, las muestras se sujetan por sus extremos opuestos y se aplica una fuerza, que tiende a separar el material. De acuerdo a la figura 10, la probeta se alarga en una dirección paralela a la carga aplicada, debido al movimiento del cabezal. La celda de carga y el extensómetro miden la magnitud de la carga aplicada y la elongación, respectivamente (Riley, 2001).

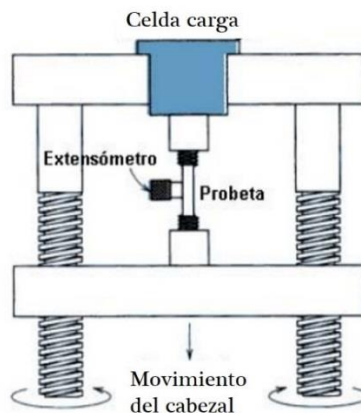


Figura 10. Representación esquemática del equipo usado para la realización de un ensayo de tensión.

La curva tensión-deformación resultante del ensayo se construye con los datos de la prueba de tensión, que es la razón de la fuerza aplicada a la sección transversal inicial de la probeta

(L_0), frente al alargamiento, que se define como la extensión porcentual referida a la longitud inicial. $\frac{L-L_0}{L_0} \times 100$. En la Figura 11 se observa el comportamiento de dicha curva para materiales frágiles, dúctiles y elásticos donde se encuentran los elastómeros.

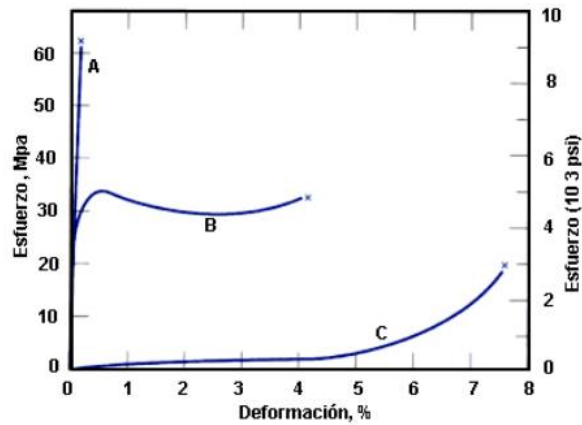


Figura 11. Comportamiento de una curva esfuerzo –deformación para materiales: Frágiles (curva A), Dúctiles (curva B) y Altamente elásticos (elastómeros) polímeros (curva C).

En la Figura 12 se muestra un comportamiento característico de los polímeros semicritalinicos en etapas, se observa claramente la zona elástica y la zona plástica del material. Al terminar la zona elástica se presenta el punto de fluencia e inicia la formación de un cuello a la probeta, caracterizado por la disminución de su sección transversa. Al disminuir esta área se concentra en ella una carga mucho mayor a la que se presenta en la gráfica, tensión nominal, debida de la disminución de área en ese punto. Posteriormente se observa el punto de carga máxima y el punto de ruptura de la probeta.

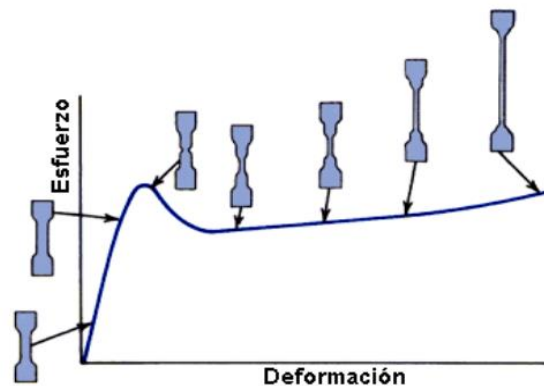


Figura 12. Curva de esfuerzo-deformación esquemática para un polímero semicristalino. Aquí se presentan varios estados de deformación de la probeta de acuerdo al esfuerzo aplicado.

3 MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

La parte experimental de preparación de los materiales del proyecto se realizó en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM. Asimismo se hizo uso de los diferentes laboratorios de análisis, para la caracterización de los andamios obtenidos. Adicionalmente se realizaron las pruebas de viabilidad de fibroblastos en los andamios en el Laboratorio del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM y en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).

Polímeros empleados:

- Poli (ácido D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA) 50:50 (poliácido láctico: poliácido glicólico) de Sigma Aldrich Co., PM: 38,000 – 54,000 Da.
- Colágeno tipo I hidrolizado, de Russelott®, PM: 5000 Da,
- Quitosano de bajo peso molecular, de Sigma Aldrich Co., PM: 50,000–190,000 Da.

Disolventes:

- 1, 1, 1, 3, 3, 3-Hexafluoro-2-Propanol, Sigma Aldrich Chemical Company (HFP)
- Ácido Acético con pureza de 99% J. T. Baker (AC).
- Trifluoroetanol Sigma Aldrich Chemical Company (TFE).
- Agua desionizada.

Todos los reactivos se utilizaron sin ningún tratamiento previo.

Materiales

- Láminas de Aluminio 7x7cm (Colector).
- Equipo de electrohilado.

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Pruebas preliminares: Preparación de las soluciones

- Soluciones de PLGA:

Las soluciones de PLGA se prepararon al 10% p/v en un matraz volumétrico de 5ml, se utilizaron dos sistemas de disolventes: uno con TFE y el otro con HFP. Las soluciones se dejaron 24 horas en agitación, para posteriormente ser utilizadas para electrohilar. Una vez seleccionado el disolvente se prepararon mezclas al 15% y 20% p/v de PLGA disueltas en HFP, con el mismo procedimiento se realizaron las soluciones correspondientes y se electrohilaron de acuerdo a la Tabla 11.

- Soluciones de Colágeno:

Se preparó una solución de 40% p/v, de colágeno disuelto en TFE, para poder electrohilar el colágeno solo. Asimismo se preparó una solución al 10% de colágeno en HFP, para realizar mezclas de proporciones de PLGA: Colágeno de 20:2, 20:5, 20:9, 20:13 y 20:20.

- Soluciones de Quitosano:

Se preparó una solución al 1% p/v de quitosano, disuelto en una solución de ácido acético al 80% v/v (ácido acético/agua desionizada), para mezclar PLGA con quitosano, en proporciones de 10:1, 15:1 y 20:1 de PLGA: Quitosano.

- Soluciones de PLGA: Colágeno: Quitosano

Además se prepararon mezclas de los tres componentes, disueltos como anteriormente se menciona, en las proporciones de 20:5:0.5 y 20:10:0.5, de PLGA: Colágeno: Quitosano.

3.2.2 Electrohilado de las soluciones

Para la elaboración de los andamios electrohilados, las soluciones de PLGA, colágeno y quitosano se procesaron en el equipo de electrohilado, el cual fue construido en el IIM, el cual se muestra en la Figura 13, donde se observan los principales componentes del equipo de electrohilado: la bomba de inyección (lado izquierdo), en la cual se posiciona la jeringa con la solución polimérica a electrohilar, la fuente de poder (lado derecho) y en el centro se observa un contenedor con el colector para la deposición de las fibras.

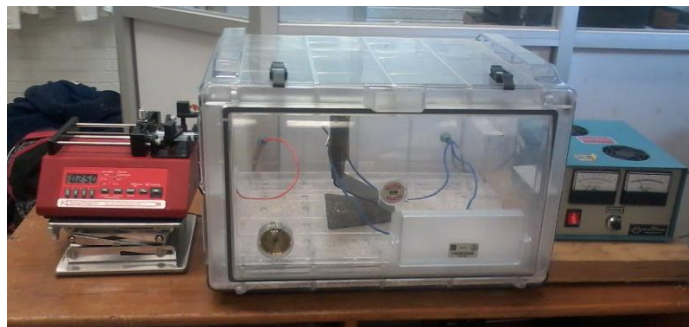


Figura 13. Equipo de electrohilado empleado.

- Parámetros para electrohilar:

La técnica de electrohilado involucra varios parámetros que se tienen que controlar para lograr obtener andamios. De ahí que se dio a la tarea de buscar los parámetros más adecuados, por lo que se varió el tipo de disolvente, la diferencia de potencial aplicada, la distancia aguja-colector, la concentración de la solución de PLGA y la velocidad de inyección, con el fin de obtener andamios con fibras de tamaño nanométrico, para mimetizar la matriz extracelular.

Se realizó dicho procedimiento a temperatura ambiente y se consideraron los siguientes parámetros:

- Concentración de la solución (% p/v)
- Tipo de disolvente
- Velocidad de inyección (ml/h)
- Diferencia de potencial aplicado en kV (DC)
- Distancia aguja-colector (cm)
- Humedad relativa (%HR)

El procedimiento de electrohilado se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Las soluciones poliméricas se introdujeron en jeringas de plástico de 5ml y con agujas de 0.8mm de diámetro. La jeringa se posicionó en la bomba de inyección. Con la bomba de inyección se programó la velocidad de inyección y el volumen de solución polimérica a inyectar.
2. Posteriormente se midió la distancia a partir de la salida de la solución polimérica, la punta de la aguja de la jeringa, hasta el colector.
3. Se utilizó como colector una placa de aluminio de 7 cm por 7 cm.
4. Se colocó un electrodo en la aguja y el otro en el colector.
5. Se encendió la fuente de voltaje, se programó la diferencia de potencial requerida para electrohilar y se inició la inyección de la solución polimérica.
6. Finalmente, una vez depositado el andamio en la placa de aluminio, ésta se almacenó en un desecador hasta su caracterización.

A continuación, para la obtención de las nanofibras, se presentan las condiciones que se utilizaron para realizar las pruebas de electrohilado.

Tabla 10. Electrohilado de PLGA.

Muestra	Concentración (%p/v)	Disolvente	Velocidad (ml/h)	%HR
PLGA	10, 15, 20	TFE y HFP	0.25 , 0.5	30-50

Las distancias aguja-colector que se evaluaron fueron 10 y 15 cm y las diferencias de potencial aplicadas que se evaluaron fueron de 8 y 12 kV. Ambos parámetros se establecieron

como fijos preliminarmente, con pruebas en el laboratorio mediante el análisis de los andamios electrohilados por microscopia óptica, como se presenta en el anexo A. Se establecieron como las mejores, una distancia aguja colector de 15cm y una diferencial de potencial de 12kV, se establecieron estos parámetros como fijos para todas las muestras electrohiladas. Se trabajó a temperatura ambiente de 22-25°C y a humedad relativa de 30-55%H.

Tabla 11. Electrohilado de Colágeno

Muestra	Concentración (%p/v)	Disolvente	Velocidad (ml/h)
Colágeno	40	TFE	0.25 , 0.5

Tabla 12. Electrohilado PLGA: Colágeno

Muestra PLGA: Colágeno	Concentración (%p/v)	Disolvente	Velocidad (ml/h)
20:2	20%	HFP	0.25
20:5	20%	HFP	0.25
20:9	20%	HFP	0.25
20:13	20%	HFP	0.25
20:20	20%	HFP	0.25

Tabla 13. Electrohilado PLGA: Quitosano

Muestra PLGA: Quitosano	Concentración (%p/v)	Disolvente	Velocidad (ml/h)
10:1	20	HFP: AC	0.25
15:1	20	HFP: AC	0.25
20:1	20	HFP: AC	0.25

Tabla 14. Electrohilado PLGA: Colágeno: Quitosano

Muestra	Concentración (%p/v)	Disolvente	Velocidad (ml/h)
20:5:0.5	20	HFP	0.25
20:10:0.5	20	HFP	0.25

3.2.3 Técnicas de caracterización

3.2.3.1 Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR)

Esta técnica se utilizó para poder observar los grupos funcionales característicos del PLGA, del colágeno hidrolizado tipo I y del quitosano, como materia prima. Además se empleó para corroborar la presencia de los mismos grupos funcionales en los andamios electrohilados. Las muestras se analizaron con un espectrómetro de infrarrojo, Thermo Scientific, Nicolet 6700. El proceso para el análisis de las muestras consistió en colocar en el portamuestras alrededor de 10 mg de muestra y se ajustó por medio del tornillo la señal de CO₂, que se presenta debido al contacto de la muestra con el aire, para realizar la medición. El análisis se efectuó en un intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm⁻¹.

3.2.3.2 Análisis Termogravimétrico (TGA)

Esta técnica se realizó para determinar la pérdida de masa del PLGA, del colágeno y del quitosano en función de la temperatura, para observar su temperatura de descomposición. Asimismo se empleó para observar si se presentaban cambios en la temperatura de descomposición en los andamios electrohilados. Se realizó el estudio en un equipo TA Instruments STD Q600 Module DSC-TGA Standard. Las muestras de 5 a 10 mg fueron sometidas a un calentamiento de temperatura ambiente hasta 600°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min, en una atmósfera de nitrógeno. Los termogramas obtenidos se analizaron con el programa TA Universal Analysis.

3.2.3.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Mediante esta técnica se determinaron la temperatura de transición vítrea (T_v) del PLGA y la temperatura de deshidratación (T_d) del colágeno y del quitosano, tanto de las muestras de materias primas como de los andamios electrohilados, únicamente de manera comparativa. El método consistió en colocar alrededor de 10mg de muestra en una charola para DSC, se calentó en un intervalo de temperatura de 0 a 200°C con una rampa de calentamiento de 10°C/min y bajo una atmósfera controlada de nitrógeno, para ello se empleó el equipo TA

Instruments DSC Q100. Los resultados fueron analizados por el software TA Universal Analysis.

3.2.3.4 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Los estudios por microscopía electrónica de barrido se llevaron a cabo en el microscopio de emisión de campo JEOL JSM 7600F, para observar la morfología de las fibras electrohiladas y la porosidad de estas. Las muestras de los andamios electrohilados se seleccionó del centro de las muestras de los andamios de 5 mm de ancho por 5mm de largo, aproximadamente. Posteriormente para realizar el análisis las secciones de las muestras se colocaron en portamuestras metálico, se adhirieron con cinta de carbono y se recubrieron con oro por medio de pulverización catódica asistida por plasma, para ser observadas posteriormente por MEB por electrones retrodispersados.

Para obtener la medición de diámetro promedio de las fibras de cada andamio electrohilado fue necesario emplear el programa de ImageJ (National Institute of Health, USA). Con este programa se analizaron las micrografías a 5,000 aumentos de cada andamio electrohilado, de dichas imágenes se realizaron de 30 a 50 mediciones de diámetros de las fibras que se observaban en las micrografías, para obtener una distribución del promedio de los diámetros de las fibras de cada andamio.

La porosidad relativa o espacio libre se calculó con el programa ImageJ. Se midió el espacio libre por medio de contrastes de colores sobre las micrografías de los andamios. En la micrografía se realizó la medición del área del espacio libre de la red de fibras que se encuentra en primer plano de la micrografía. Las micrografías empleadas para realizar esta medición fueron tomadas a 10000 ampliaciones.

3.2.3.5 Ensayo mecánico en tensión

Los andamios fueron caracterizados mecánicamente en un ensayo de tensión, uniaxial, mediante el uso de la maquina universal de pruebas mecánicas Instron 5500R, equipada con una celda de carga de 500N. Se determinó el módulo de Young (E), la resistencia a la tensión

(σ) y el porcentaje de deformación (%). El ensayo se realizó a una velocidad de deformación de 10mm/min a temperatura ambiente. Para realizar esta prueba, fue necesario elaborar andamios con espesor de 0.1mm en promedio. Las probetas ensayadas fueron cortadas de los andamios electrohilados, de la zona central, con un suaje afilado con medidas de acuerdo a la norma ASTM D-1708-96. Esta norma se emplea para determinar las propiedades de resistencia a la tensión de materiales plásticos de películas de espesor hasta 1mm. Se realizó la prueba 5 veces por muestra, con diferentes probetas.

3.2.3.6 Ángulo de contacto

Se ha demostrado, en la ingeniería de tejidos que los andamios con propiedades hidrofílicas pueden favorecer el crecimiento y adhesión celular. De esta manera, para determinar la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica de los andamios, fue necesario realizar la medición de ángulos de contacto, para lo cual se empleó un goniómetro Rame-hart, Inc modelo 100-07-00, el cual está acoplado a un sistema óptico para observar la interacción del agua con la superficie de los andamios electrohilados previamente.

Para medir el ángulo de contacto, una gota de agua desionizada con un volumen de 6 μ l se depositó en la superficie de una muestra del andamio, el cual no fue retirado de la placa de aluminio. La imagen de la gota fue captada por una cámara de video durante 2 minutos. El ángulo de contacto se midió a los 30 segundos para todas las muestras. En esta prueba se ensayaron 3 muestras de 1.5 por 1.5 cm, por cada muestra se realizaron 5 mediciones en diferentes puntos de la muestra. Las mediciones de los ángulos de contacto se realizaron con el programa de ImageJ. Con este programa se pueden procesar imágenes digitales para realizar la medición.

3.2.3.7 Prueba de Hinchamiento

Adicional a la medición del ángulo de contacto, para determinar la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica de los andamios, se hizo la prueba de hinchamiento, bajo la premisa de que mientras mayor capacidad tenga para captar agua, mayor será su hidrofílicidad. Para realizar

esta prueba se cortaron los andamios electrohilados secos en cuadrados de 1.0 por 1.0 cm y se registró el peso inicial (W_0). Se introdujo la muestra en una placa de 6 pozos y se añadieron 3mL de agua destilada, se dejó a temperatura ambiente, posterior a 24 horas se retiraron las muestras de la placa, se les quitó el exceso de agua con ayuda de un papel absorbente y se registró el peso de cada muestra (W_h). El porcentaje de hinchamiento a un tiempo t se calculó a partir de la ecuación.

$$\%H_t = \frac{W_h - W_0}{W_0} \times 100$$

Donde $\%H_t$ fue el porcentaje de hinchamiento a un tiempo t ; W_h fue el peso de la muestra húmeda a un tiempo t y W_0 fue el peso de la muestra seca.

3.2.3.8 Prueba de Degradación

Una medida indirecta de la degradación de los andamios es la medición de la pérdida de masa. Este proceso se realizó bajo condiciones fisiológicas, a las cuales el andamio estaría sometido al implantarse en el cuerpo humano. Para realizar esta prueba a los andamios, se cortaron muestras circulares de 8mm de diámetro, las cuales se pesaron y se registró su peso inicial (W_0). Las muestras se colocaron en una placa de 48 pozos y se añadieron 400 μ L de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado (10% de suero fetal bovino y 1% de antimicótico-antibiótico), la cual fue previamente acondicionada a 37°C. Se colocaron las placas de pozos en una incubadora a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂. Cada determinado tiempo se sacó de la incubadora una muestra, se lavó con agua destilada y se secó el exceso de agua. Posteriormente se registró el peso (W_f).

El porcentaje de pérdida de masa a un tiempo t se obtuvo a partir de la ecuación.

$$\% \text{ Pérdida de masa} = \frac{W_f - W_0}{W_0} \times 100$$

Donde $\%$ pérdida de masa es el porcentaje de degradación a un tiempo, W_0 es el peso inicial de la muestra seca y W_f es el peso final de la muestra seca.

3.2.4 Pruebas de viabilidad celular con fibroblastos mediante el método de calceína AM

3.2.4.1 Preparación de los polímeros

Los andamios se cortaron en círculos de aproximadamente 8mm de diámetro. Se esterilizaron por radiación UV en el equipo crosslinker BLX-254 (Vilber Lourmat), por ambas caras de los materiales durante 10 min cada una.

3.2.4.2 Sembrado de células en los andamios.

Se trataron muestras de fibroblastos humanos, se cultivaron en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal y antibiótico (Anti-Anti 100X de Gibco) por una semana. Posteriormente, las células fueron recuperadas de las cajas y se sembraron aproximadamente 16 μ L de esta suspensión, para obtener una densidad celular de 15x10³células/ml en los materiales, se colocaron en una caja Petri, debidamente identificada con los andamios a estudiar. Se agregaron 30 μ L de medio DMEM y se dejaron incubar a 37°C, 80% de humedad relativa y 5% de CO₂.

3.2.4.3 Prueba con calceína (adhesión y viabilidad)

Después de 2, 7 y 15 días de incubación, los polímeros se sacaron de los pozos y se lavaron dos veces con PBS, se agregó medio Hanks/Fenol con calceína y homodímero de etidio y se incubaron a 37°C por 45min (Invitrogen, 2005). Posteriormente se retiró la solución y se lavó dos veces con PBS y se observó en un microscopio óptico confocal, Nikon Eclipse 80i.

4 RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 PRUEBAS PRELIMINARES

4.1.1 Preparación de las soluciones

Tabla 15. Resultados de las pruebas de solubilidad.

QUITOSANO		
<i>Solvente</i>	<i>Concentración</i>	<i>Observaciones</i>
Ácido Acético al 80, 85 y 90%	0.5% - 3.0%	A partir de la concentración del 2%, se gelatiniza, al bajar la concentración del ácido solubiliza mejor.
TFA	1% - 3%	Se solubiliza, pero al paso de 24 horas se torna rojiza la solución, despiden mal aroma y se forman cristales.
HFP	0.5%	Solubilizó
THF	0.25%	No solubilizó
TFE	0.5%	No solubilizó
DCM:TFA a 70:30	2%	Se solubiliza, pero al paso de 24 horas se torna rojiza la solución y desprende aroma ácido.
COLÁGENO HIDROLIZADO		
<i>Solvente</i>	<i>Concentración</i>	<i>Observaciones</i>
Ácido Acético al 80%	2 %	Solubilizó
HFP	2-10%	Solubilizó
THF	0.25%	No solubilizó
TFE	10 - 40%	Solubilizó y se tornó ligeramente más amarillo, conforme aumento la concentración.
PLGA		
<i>Solvente</i>	<i>Concentración</i>	<i>Observaciones</i>
Ácido Acético al 80%	5 %	No Solubilizó
HFP	10-20%	Solubilizó
THF	1%	Solubilizó
TFE	10 - 40%	Solubilizó

De acuerdo a la tabla 15, donde se resumen las pruebas de solubilidad de los polímeros, se seleccionó el HFP y TFE para colágeno y PLGA, en el caso de quitosano se optó por el ácido acético al 80% v/v en agua desionizada.

4.1.2 Caracterización de las materias primas

4.1.2.1 Grupos funcionales por Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR)

- Quitosano

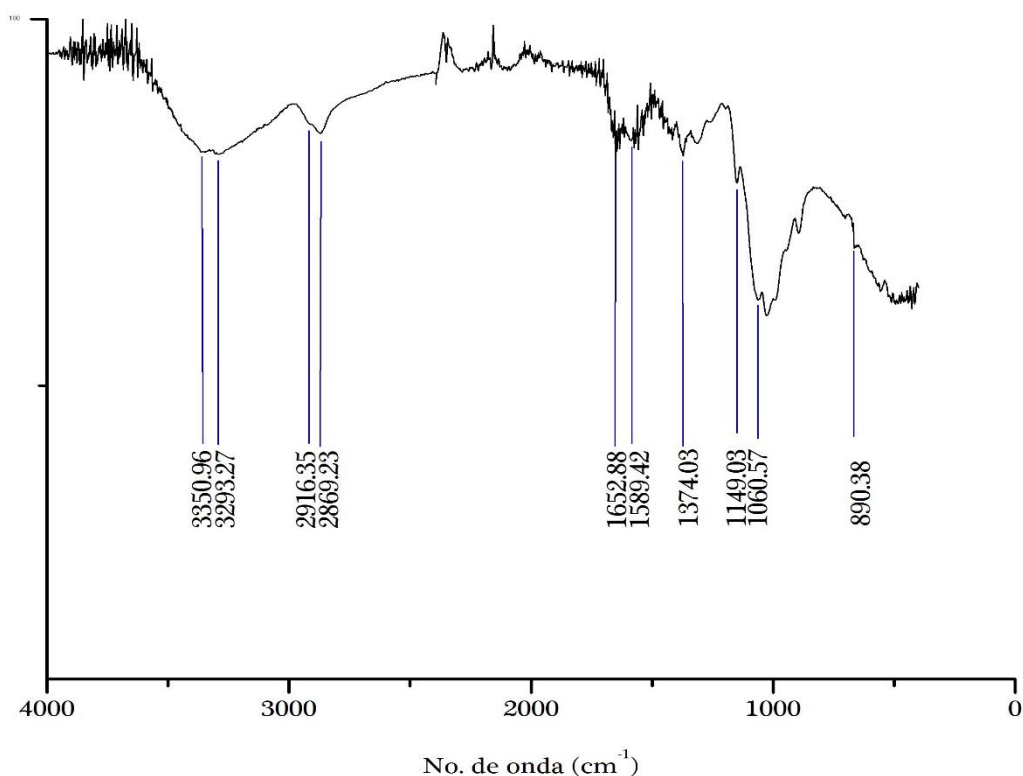


Figura 14. Espectro infrarrojo de quitosano.

El espectro infrarrojo del quitosano empleado se muestra en la Figura 14. Se observaron las bandas correspondientes a los grupos funcionales del quitosano, las que se identifican en la tabla 16.

Tabla 16. Bandas características de quitosano.

No. de onda (1/cm)	Grupo funcional
3350.96	Estiramiento de -OH
3293.27	Amina primaria -NH
2916.35	Estiramiento C-H
1652.88	Enlace C=O de la amida primaria.
1589.42	Amina secundaria -NH ₂
1374.04	-CH ₃ y C-CH ₃
1149.04	Éter cíclico C-O-C
1060.58	Estiramiento simétrico C-O
890.38	Estiramiento -O-C glucosídico

Las bandas características del quitosano empleado son los picos entre 3350.96 y 3293.27 cm^{-1} , que corresponden a las vibraciones de OH (alcohol) y NH (amina primaria), respectivamente. Asimismo la banda localizada en 1589.42 cm^{-1} , es la banda principal que distingue al quitosano, la cual corresponde al grupo funcional -NH₂. Dichos resultados concuerdan con lo reportado por Flores *et al*, 2005.

- Colágeno hidrolizado tipo I

Las bandas de absorción presentes en el colágeno se presentan en la Tabla 17, las bandas características que distinguen al colágeno corresponden a los grupos funcionales de las amidas. En el espectro de infrarrojo del colágeno (Figura 15) muestra las bandas de absorción a 1631.19, 1521.20 y 1236.39 cm^{-1} , las cuales representan a las amidas I, II y III, respectivamente. De acuerdo a lo reportado por Sionkowska *et al*, 2004, la banda de absorción principal del colágeno corresponde a la amida III, la cual se presenta a 1236.39 cm^{-1} , con otro pico en 1331.60 cm^{-1} que la confirma.

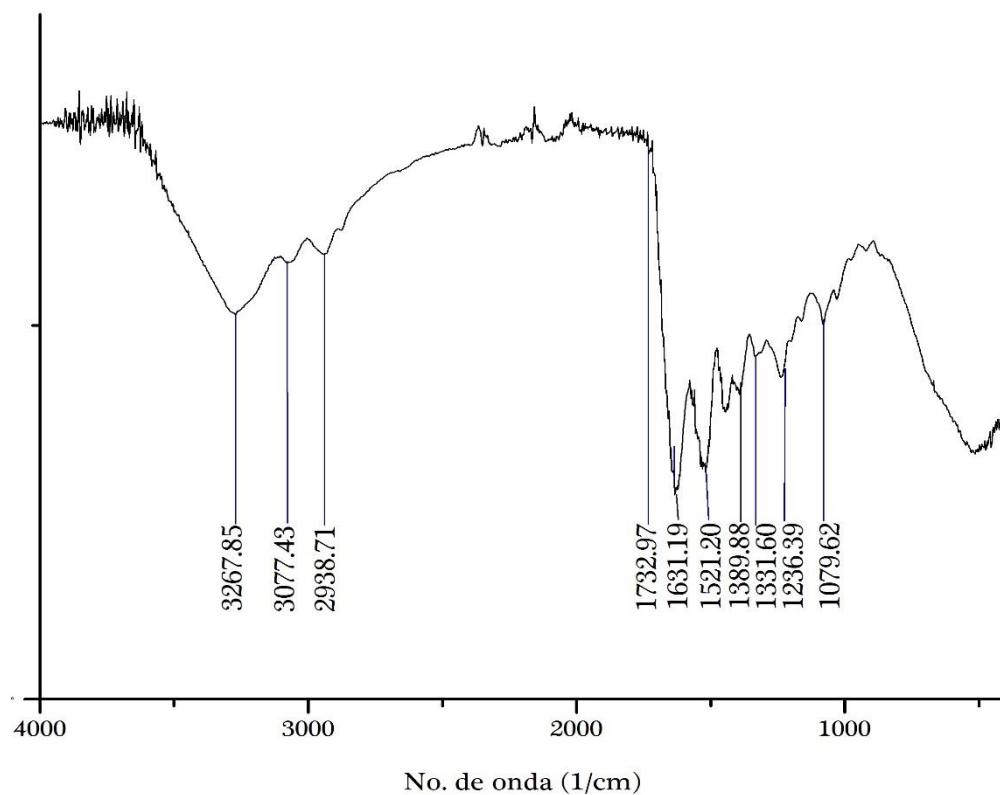


Figura 15. Espectro de infrarrojo de colágeno hidrolizado tipo I.

Tabla 17. Bandas características de colágeno hidrolizado tipo I.

No. de onda (1/cm)	Grupo funcional
3267.85	Amida A, estiramiento N-H
3077.43	Amida B, estiramiento N-H
2938.71	Amida B
1732.97	Carbonilo C=O
1631.19	Amida I, estiramiento de C=O
1521.20	Amida II, vibración N-H
1389.88	C-H
1331.60	Amida III
1236.39	Amida III, estiramiento C-N
1079.62	CH ₂ -CH ₃

- Copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA)

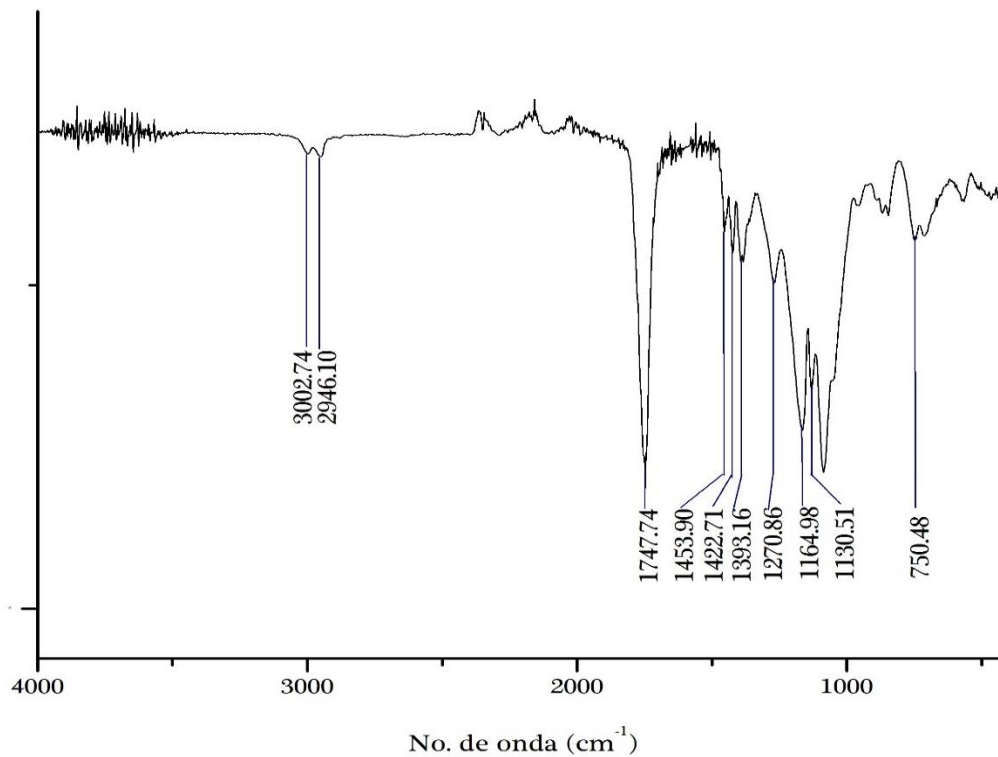


Figura 16. Espectro infrarrojo de PLGA.

Tabla 18. Bandas características de PLGA.

No. de onda (1/cm)	Grupo funcional
3002.74	CH ₂ -CH ₃
2946.10	CH ₂ -CH ₃
1747.74	C=O Ester
1453.89	CH ₃
1422.70	CH ₃
1393.16	CH ₃
1270.86	Metilo
1164.98	Éter
1130.51	C-O
750.48	C-H

Las principales bandas de absorción del PLGA, son en el pico 1747.74 cm^{-1} ; se atribuye a la vibración de tensión del enlace carbonilo (C=O), el pico presente en 1164.9 cm^{-1} , es asignado al grupo éter (C-O-C) y las bandas en 1130.50 y 1453.89 cm^{-1} corresponden al enlace C-O y C-H del PLGA, respectivamente, las que concuerdan con lo reportado por Jose *et al*, 2009, dichas bandas se pueden observar en la Figura 16 y la Tabla 18.

4.1.2.2 Caracterización Térmica

4.1.2.2.1 Análisis Termogravimétrico (TGA)

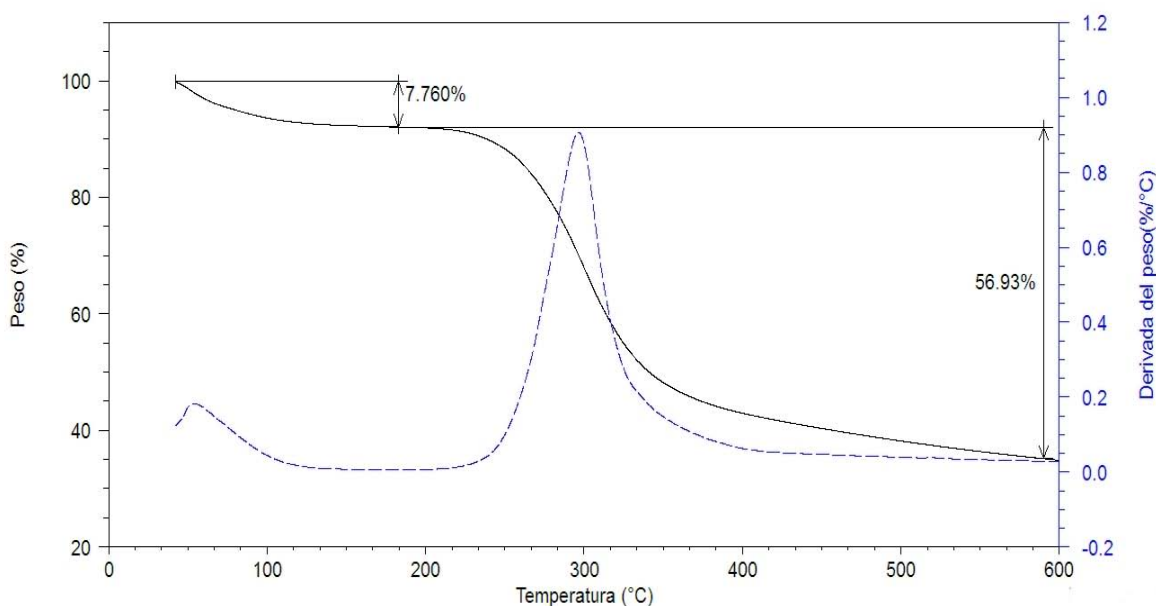


Figura 17. Termograma del quitosano a una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Se presenta el termograma de pérdida de masa en función de la temperatura y la derivada del mismo en la Figura 17. Se observa que el quitosano presenta una pérdida de masa de 7.76% a partir de la temperatura de los 42°C hasta los 112°C , la cual corresponde a la evaporación de agua absorbida por la estructura del quitosano. Posteriormente, a partir de los 230°C y hasta los 600°C , se tiene una pérdida de masa de 56.93%, lo que involucra la degradación térmica del material. Sin embargo, queda un remanente de aproximadamente

del 35%, pero se observa que aún no se mantiene constante la pérdida de masa, por lo que para que se tenga una pérdida de masa mayor se requiere una mayor temperatura, estos resultados concuerdan con lo encontrado por Dhawade *et al*, 2012.

EL termograma de pérdida de masa y su derivada del colágeno hidrolizado tipo I corresponde a la Figura 18. Se observa una pérdida de masa de 8.992% entre 42°C y 150°C, la cual corresponde a la evaporación de agua absorbida por la estructura del colágeno, se presenta un comportamiento similar al quitosano. A partir de los 210°C y hasta los 600°C, se tiene una pérdida de masa de 69.53% por degradación térmica del material.

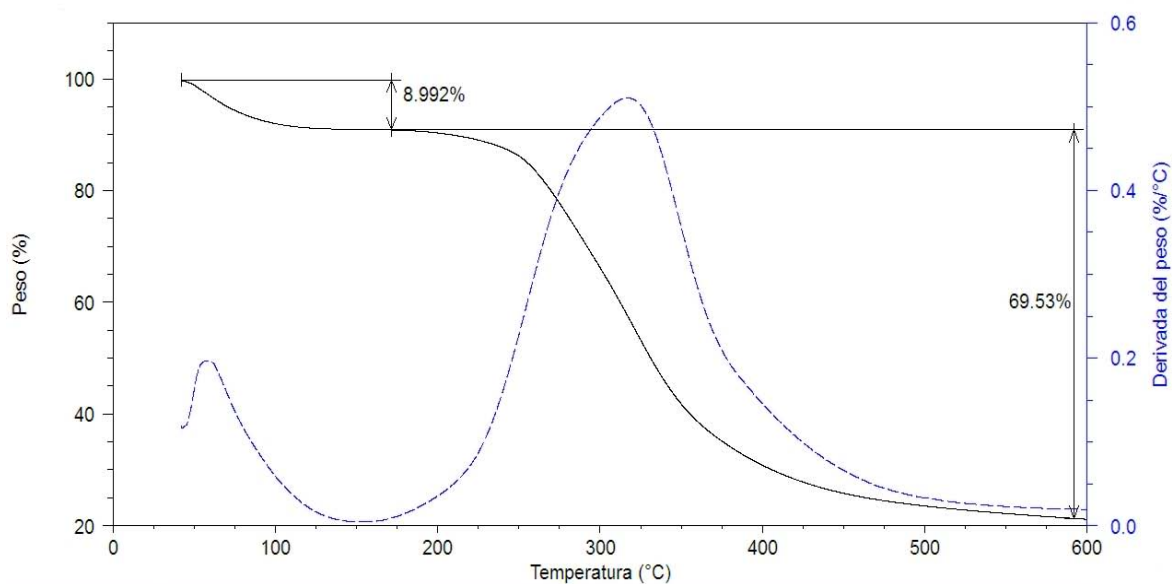


Figura 18. Termograma del colágeno a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

En la Figura 19 se presenta el termograma del PLGA, donde se observa una pérdida de masa de 99.97%, la cual inicia alrededor de los 210°C y termina alrededor de los 350°C con la degradación térmica del material. Con base al TGA podemos determinar que ninguno de los materiales empleados presenta pérdida de masa por abajo de los 50 °C, por lo que son materiales viables en aplicaciones biomédicas en el rango de la temperatura corporal media (37 °C).

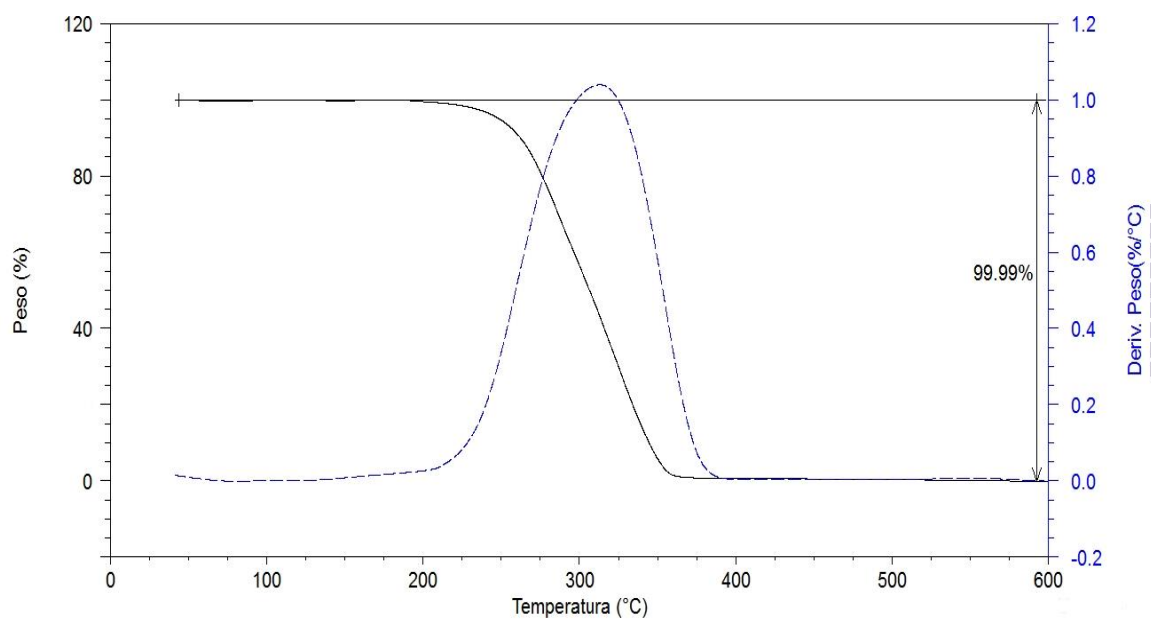


Figura 19. Termograma del PLGA a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

4.1.2.2.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los termogramas de calorimetría diferencial de barrido de los tres materiales empleados se presentan en la Figura 20. Se observa la temperatura de transición vítrea (T_v) del PLGA alrededor de 47°C. Sin embargo no hay evidencia de ningún pico endotérmico correspondiente a la fusión.

Debido a que el colágeno y el quitosano pueden ser deshidratados o desnaturalizados al calentarse, ambos presentan picos endotérmicos, los cuales son correspondientes a la temperatura de deshidratación (T_D) y el área de los picos corresponde a la entalpía de deshidratación (ΔH_D), de acuerdo a lo reportado por Chen *et al*, 2008. En el caso del colágeno la T_D es de 84.69°C y la ΔH_D de 338.8 J/g. En cuanto al quitosano la T_D es 83.28°C y la ΔH_D de 202 J/g, corresponde en la curva entre 50 y 110°C, el cual es atribuido a la humedad contenida en la cadena del polisacárido. Como se señaló antes, el PLGA no tiene agua absorbida, por lo que no presenta pico endotérmico.

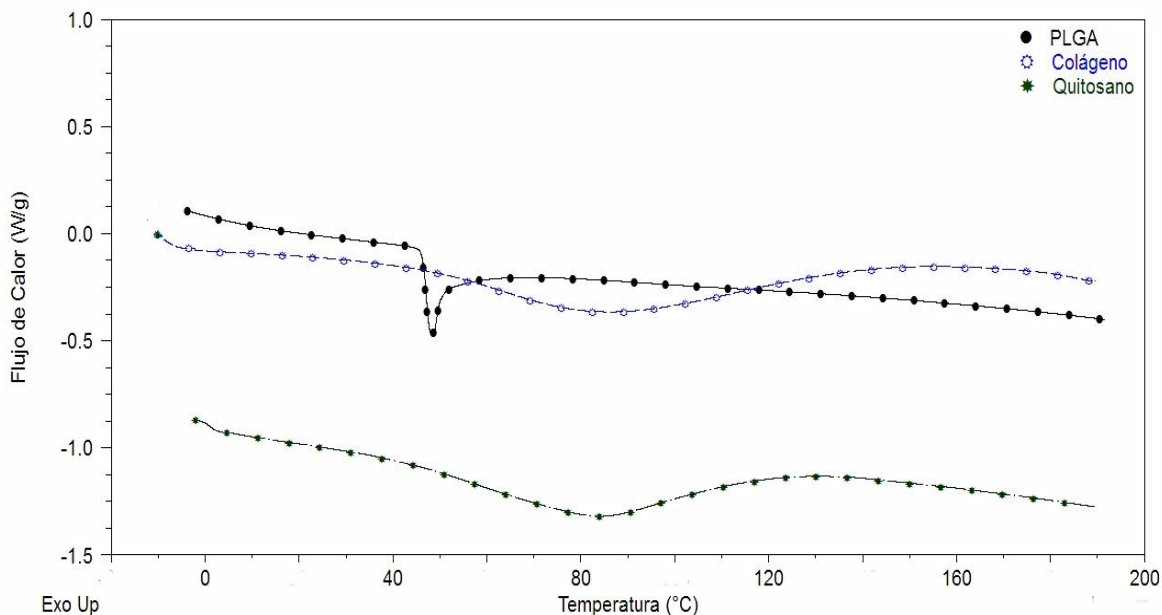


Figura 20. Termogramas de DSC del PLGA, del Colágeno y del Quitosano.

4.2 MORFOLOGÍA DE LOS ANDAMIOS

4.2.1 *Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)*

4.2.1.1 *Efecto de los parámetros de electrohilado en el diámetro de las nanofibras*

Las soluciones de PLGA, PLGA: Quitosano, PLGA: Colágeno y PLGA: Colágeno: Quitosano, se prepararon de acuerdo a lo establecido en el capítulo anterior. Para determinar los parámetros óptimos de electrohilado, fue necesario experimentar bajo diferentes condiciones, tales como: concentración, tipo de solvente, velocidad de inyección, distancia aguja-colector y diferencia de potencial aplicada, que se mencionan en la tabla 11 del apartado 3.2.2. En cuanto a los parámetros de distancia aguja-colector y diferencia de potencial aplicado del proceso de electrohilado, preliminarmente en el laboratorio mediante el uso del microscopio óptico a 20x, se encontró que una distancia de 15cm y una diferencia de potencial de 12kV son los mejores (Ver anexo A).

4.2.1.1.1 Análisis de los parámetros de la solución y de proceso para los andamios de PLGA

- **Efecto solvente:** se prepararon soluciones de PLGA al 10%(p/v), con dos disolventes, el TFE y el HFP. El polímero se solubilizó perfectamente en ambos, pero al analizar los andamios electrohilados se observaron morfologías diferentes. En la Figura 21 a. se observa una mejora, ya que hay menos bulbos y mayor cantidad de fibras, la cual corresponde a la prueba realizada con HFP. En cambio en el caso del TFE, difícilmente se formaron fibras, tal como se muestra en la micrografía de la Figura 21 b. la cual muestra demasiados bulbos y un electrohilado pobre. Esto es debido a que la presión de vapor del HFP es de 201.766 mm Hg a 25°C, la cual es mayor que la del TFE (70 mm Hg a 25°C), es decir, el HFP es un solvente más volátil, lo que favorece el electrohilado, ya que se requiere menos tiempo para que se evapore el disolvente y formar las fibras con menos defectos. De ahí que se seleccionó el solvente HFP para elaborar los andamios de PLGA (Duque *et al*, 2013).

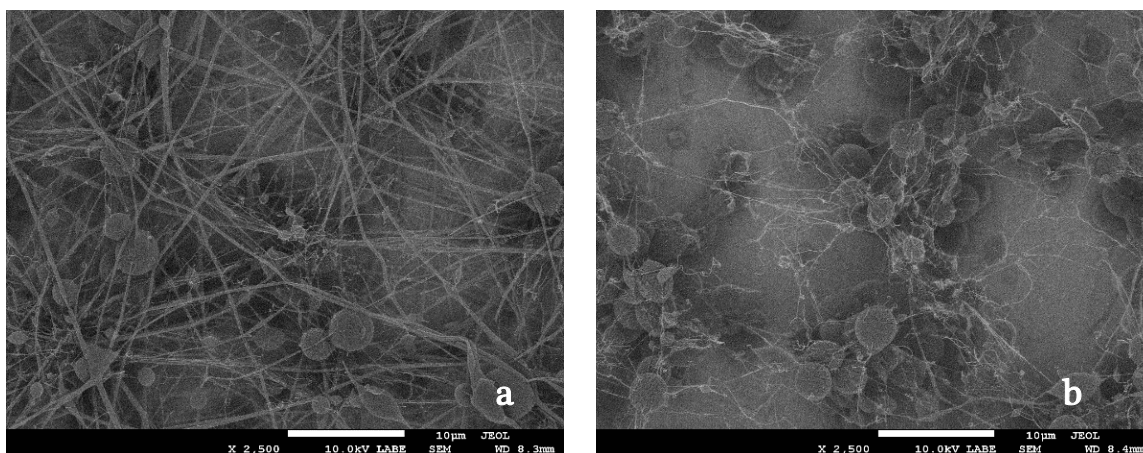


Figura 21. Micrografías de MEB (2, 500x) de PLGA 10% (p/v). Se evaluó el efecto del disolvente- Se electrohiló a condiciones de 0.5ml/h, 15cm, 12kV⁵, para ambos casos. a) HFP y b) TFE.

⁵ Se refiere a velocidad de inyección (ml/h), distancia aguja-colector (cm) y diferencia de potencial aplicado (kV).

- **Efecto de la velocidad de inyección.** Se preparó una solución de PLGA al 10%(p/v) en el HFP. El proceso de electrohilado se llevó a cabo a dos diferentes velocidades de inyección, 0.25ml/h y 0.5ml/h, con los otros parámetros de electrohilado fijos e iguales en ambos casos. A menor velocidad de inyección hay menos masa de solvente por evaporar a tiempos iguales, se redujo así la formación de bulbos. Es mejor mantener una velocidad de inyección baja para mantener estable el cono de Taylor durante todo el proceso de electrohilado (Teo *et al*, 2006). Al tener un flujo alto las fibras se rompen (Figura 22 b) y se forman bulbos en el colector, debido a que el tiempo de vuelo (de recorrido capilar – colector) es insuficiente para evaporar completamente el solvente. En contraste, como se aprecia en la Figura 22 a, al disminuir el flujo a 0.25ml/h, casi no se forman bulbos y las fibras son regulares y continuas.

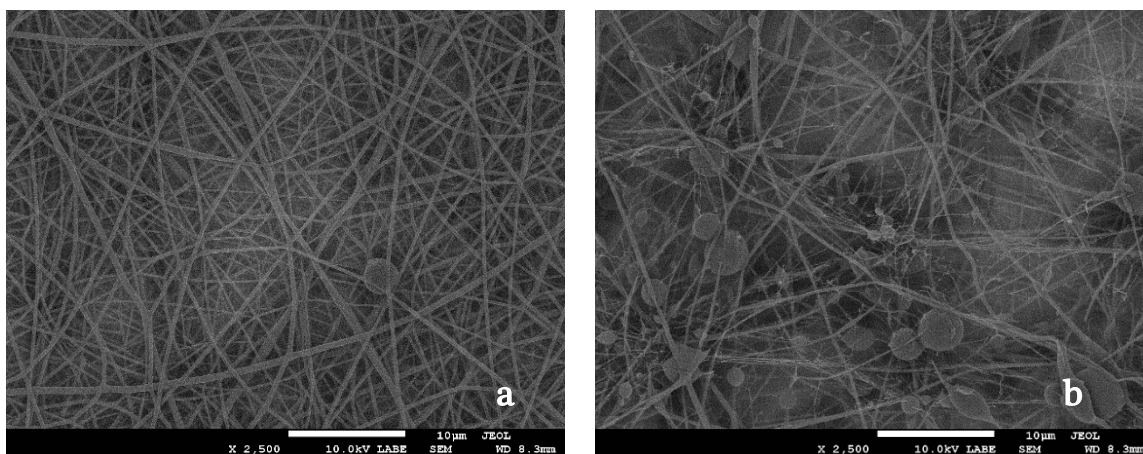


Figura 22. Micrografías de MEB (2, 500x) de PLGA 10% (p/v) disuelto en HFP, se evaluó el efecto de la velocidad de inyección, se electrohiló a condiciones de 15cm, 12kV⁷, para ambos casos. a) 0.25ml/h y b) 0.5ml/h.

- **Efecto de la concentración:** Se prepararon soluciones de PLGA en HFP, a tres diferentes concentraciones 10%, 15% y 20% (p/v), se mantuvieron constantes los demás parámetros de electrohilado en los 3 casos. De acuerdo a la Figura 23, conforme aumenta la concentración del polímero en solución se observa de manera cualitativa que la morfología de las fibras comienza a ser más homogénea, aunque de mayor diámetro y se reduce la formación de bulbos. La viscosidad de la solución aumenta con la concentración del polímero, lo que tiende a mejorar la morfología de las fibras.

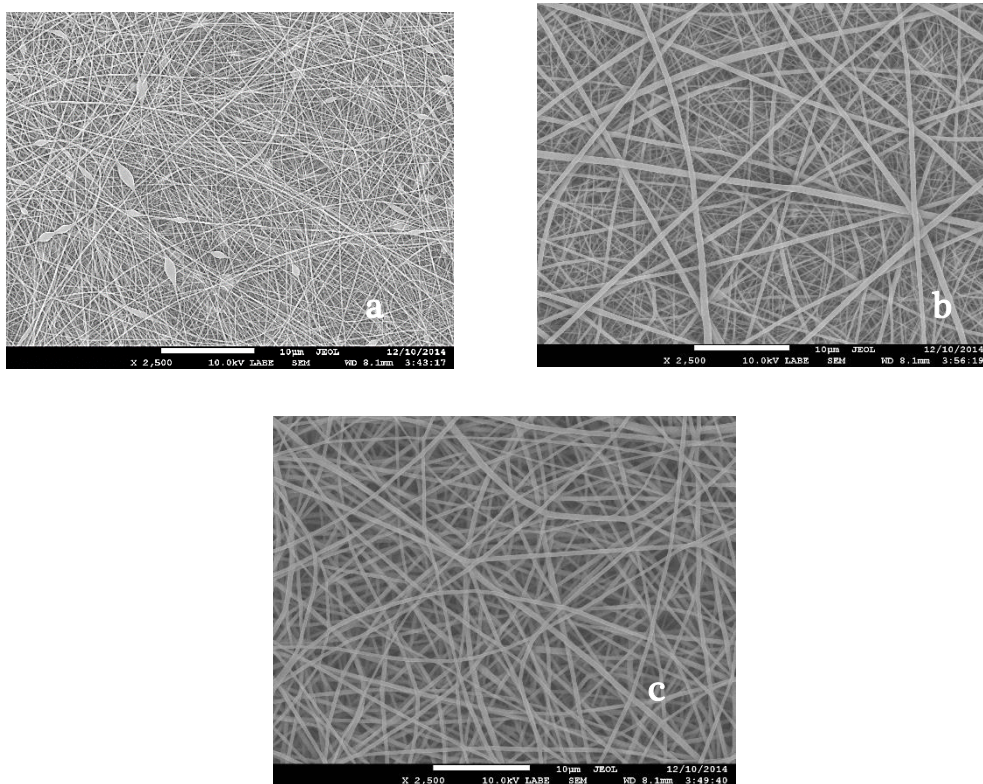


Figura 23. Micrograffías de MEB (2, 500x) de PLGA disuelto en HFP, a diferentes concentraciones: a) 10%, b) 15% y c) 20% (p/v). Se electrohiló a condiciones de 0.25ml/h, 15cm, 12kv⁷, para todos los casos.

Los resultados obtenidos permitieron seleccionar el mejor solvente (HFP), fijar los parámetros de la solución y de proceso de electrohilado para obtener nanofibras de PLGA, los cuales se presentan en la Tabla 19, dichas condiciones se utilizaron para los experimentos posteriores.

Tabla 19. Condiciones seleccionadas para la obtención de nanofibras de PLGA.

Variable	PLGA
Concentración % (p/v)	20
Solvente	HFP
Velocidad de inyección (ml/h)	0.25
Diferencia de potencial aplicado (kV)	12
Distancia aguja-colector (cm)	15

Las pruebas de electrohilado se realizaron a temperatura ambiente, 23 – 25°C, a una humedad relativa entre 30-55%. En la Figura 24 se muestra un andamio electrohilado de

PLGA a las condiciones establecidas en la tabla 19. La morfología de estas fibras concuerda con lo reportado por Duan *et al*, 2007. Sin embargo los diámetros de las fibras que obtuvieron son menores, debido a que en ese trabajo la concentración de la solución polimérica empleada es menor.

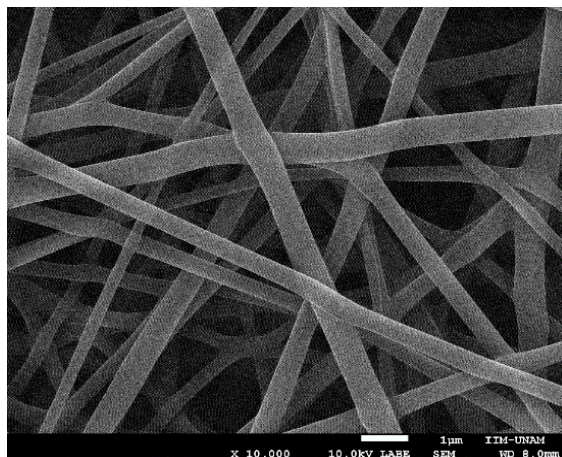


Figura 24. Micrografía de MEB (10, 000x) del andamio electrohilado de nanofibras PLGA al 20%, diámetro promedio de 470 ± 118 nm.

4.2.1.1.2 Análisis de los andamios de colágeno hidrolizado tipo I

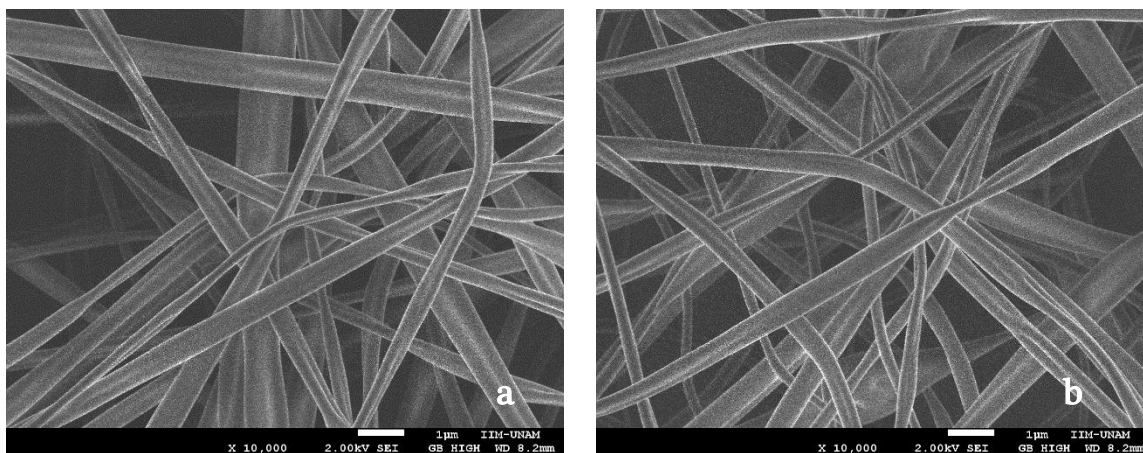


Figura 25. Micrografías de MEB (10, 000x) de colágeno hidrolizado tipo I al 40% (p/v) disuelto en TFE. Se evaluó el efecto de la velocidad de inyección: a) 0.25ml/h y b) 0.5ml/h. Se electrohiló a condiciones de 10cm, 12kV⁷, para ambos casos.

En la Figura 25 se puede apreciar que fue posible electrohilar el colágeno hidrolizado tipo I, pero se requirió una concentración muy alta del polímero (40% p/v) para poder realizarlo.

Además no fue posible despegar el andamio del colector, debido a la fragilidad de las fibras, al romperse se formaron partículas en el colector, a pesar del diámetro de las fibras, aproximadamente de 556 ± 256 nm, la morfología es de fibras aplanadas como listones, que a lo largo de cada fibra tienen diferentes diámetros.

4.2.1.1.3 Análisis de los andamios de mezclas de PLGA: Colágeno

Se prepararon soluciones de PLGA al 20% y de Colágeno al 10%, ambas disueltas en HFP, se mezclaron en proporciones 20:2, 20:5, 20:9, 20:13 y 20:20 de PLGA: Colágeno, las cuales se electrohilieron de acuerdo a las condiciones establecidas en la tabla 20.

La morfología y dimensiones de las fibras presentan un comportamiento similar a lo que reporta Lee *et al*, 2015, a pesar de que en este trabajo se emplea colágeno bovino, sin hidrolizar. Así mismo se presentó una disminución de los diámetros de las fibras conforme se incrementaba la concentración de colágeno en los andamios, como se puede apreciar en la Figura 26 y en la Tabla 20. Una posible explicación es que el incremento de la concentración de colágeno reduce la viscosidad de la solución. Asimismo los aminoácidos del colágeno mejoran la fuerza de estiramiento y de auto-repulsión de acuerdo a lo encontrado por Kown *et al*, 2005.

Tabla 20. Diámetros de las fibras de los andamios de las mezclas de PLGA: Colágeno.

Proporción PLGA: Colágeno	Diámetro (nm)
20:2	426 ± 154
20:5	366 ± 131
20:9	315 ± 83
20:13	224 ± 59
20:20	199 ± 44

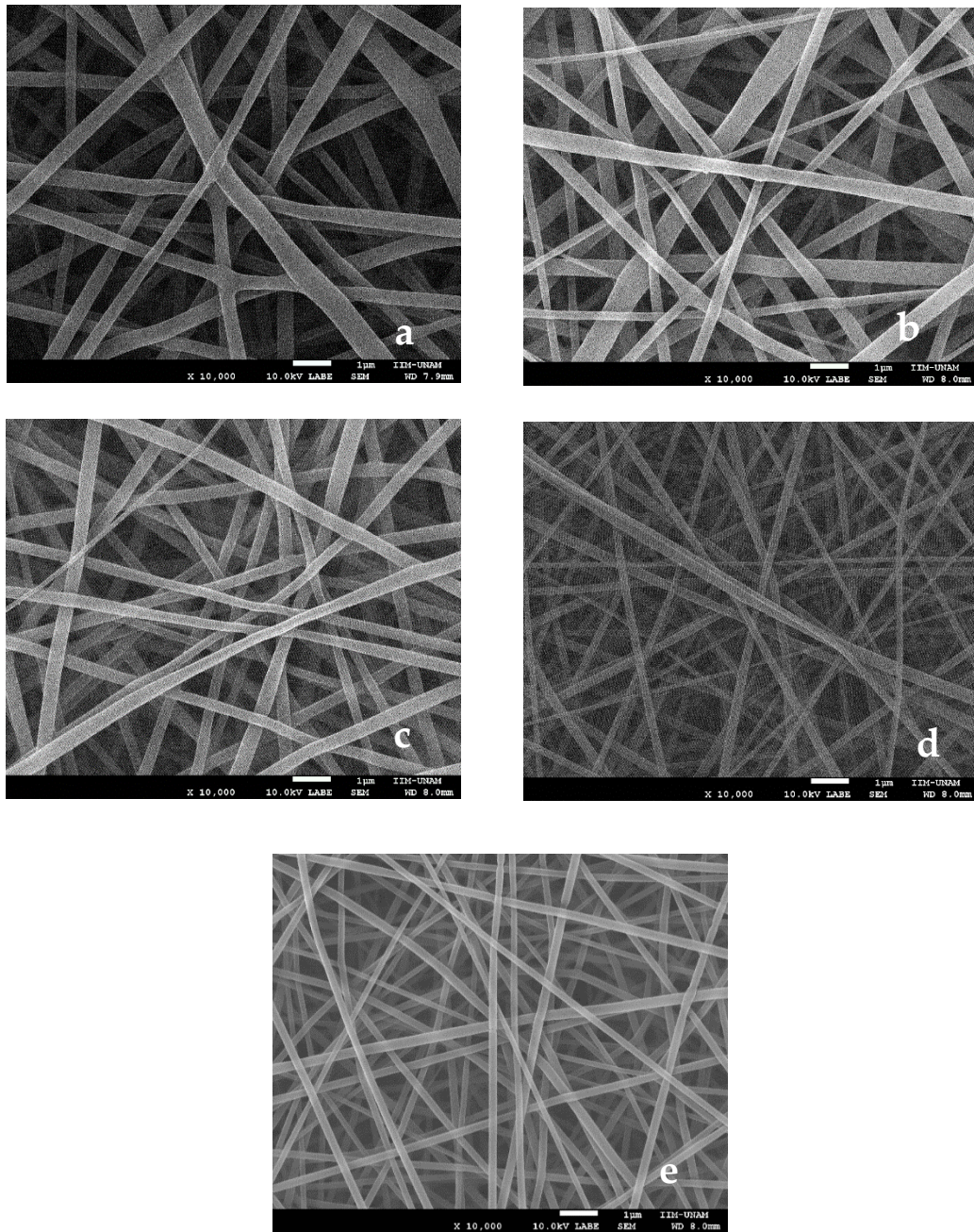


Figura 26. Micrografías de MEB de andamios electrohilados de mezclas de PLGA: Colágeno, a las condiciones de acuerdo a la Tabla 19, donde: a) 20:2, b) 20:5, c) 20:9, d) 20:13 y e) 20:20 (10, 000x).

4.2.1.1.4 Análisis de los andamios de mezclas de PLGA: Quitosano

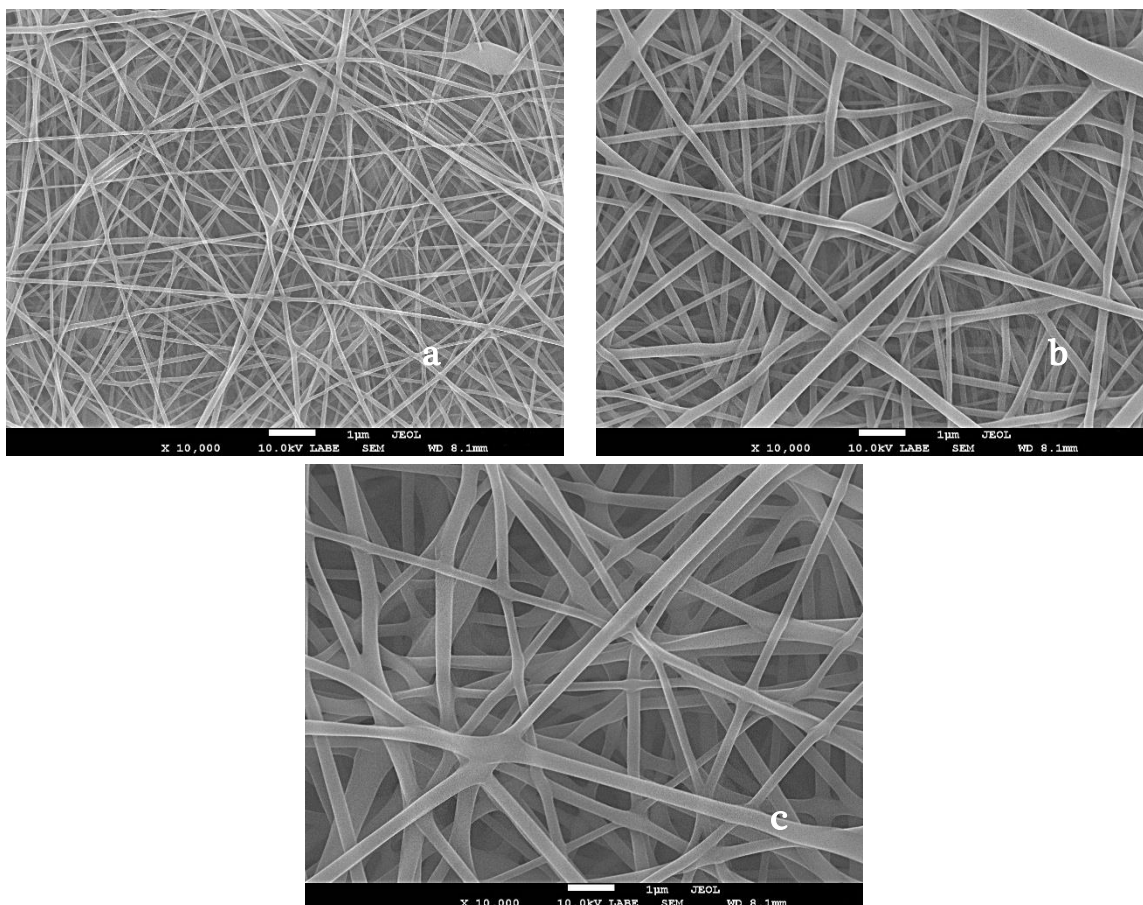


Figura 27. Micrografías de MEB (2, 500x) de PLGA; Quitosano disuelto en HFP y AC respectivamente, a diferentes proporciones. Se electrohiló a condiciones de 0.25ml/h, 15cm, 12kv⁷, para todos los casos. a) 10:1, b) 15:1 y c) 20:1.

De acuerdo a las micrografías de la Figura 27, las micrografías 27 a. y 27 b., corresponden a las proporciones de PLGA: Quitosano de 10:1 y 15:1, respectivamente, se aprecia que tienen bulbos y las fibras no son homogéneas, Sin embargo se puede apreciar que la Figura 28 c, la cual corresponde a la proporción 20:1, de PLGA: Quitosano, ya no presenta defectos y muestra fibras de mejor morfología, a consecuencia de ello esta proporción se seleccionó. Las fibras de proporción de PLGA: Quitosano, 20:1, tuvieron un diámetro promedio de 271 ± 101 nm, lo que concuerda con lo reportado por Duan *et al*, 2007, reporta diámetros de fibras de alrededor de 280 nm, para andamios electrohilados de PLGA: Quitosano.

4.2.1.1.5 Análisis de los andamios de mezclas de PLGA: Colágeno: Quitosano

Se prepararon soluciones al 20% en HFP de PLGA, colágeno al 10% en HFP y quitosano 1% en ácido acético al 80%. Se mezclaron en proporciones de 20:10:0.5 y 20:5:0.5 de PLGA: Colágeno: Quitosano. Se electrohiló a condiciones: 0.25 ml/h, 15 cm 12kV, 22-24°C, %HR: 30-45. Los diámetros de las fibras correspondientes no muestran diferencia al aumentar ligeramente la proporción de colágeno; se encuentran dentro del mismo rango de magnitud. De la misma manera se observa una morfología similar para ambos andamios, los cuales presentan fusión en el traslape de algunas fibras, aunque sí se observa mayor homogeneidad en las fibras del andamio con una proporción de colágeno ligeramente mayor, como se observa en la Figura 28.

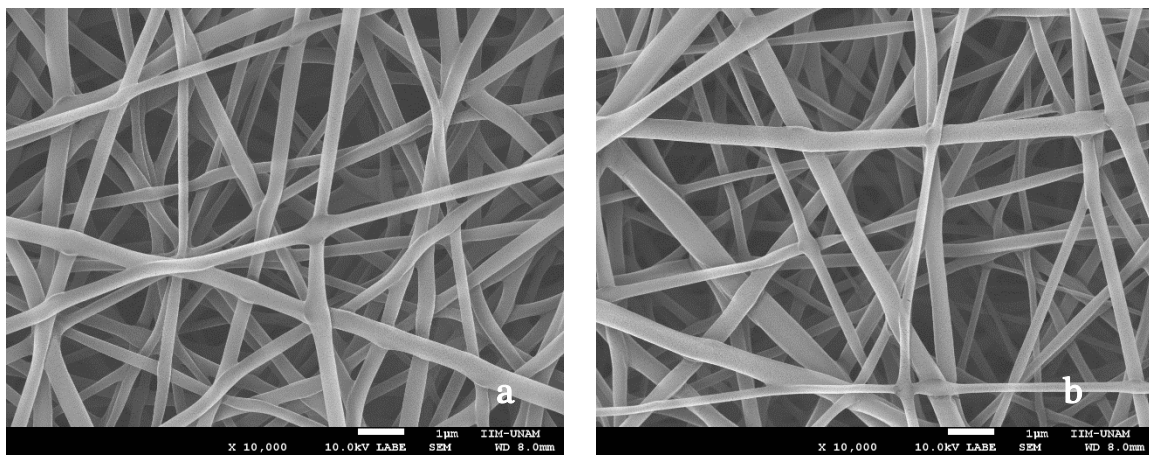


Figura 28. Micrografías de MEB (10, 000x) de PLGA: Colágeno: Quitosano, se electrohiló a condiciones de 0.25ml/h, 15cm, 12kV⁷, para ambos casos. a) 20:10:0.5 con diámetro de fibra de 359±77 nm y b) 20:5:0.5 cuyo diámetro de fibra es 342±108.

4.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS ANDAMIOS ELECTROHILADOS

4.3.1 Análisis de grupos funcionales por espectroscopía de infrarrojo (FT-IR)

Los espectros de infrarrojo para el PLGA se muestran en la Figura 29. El análisis se llevó a cabo en el PLGA sin electrohilar y una vez electrohilado. Como se puede observar, presentan los mismos picos característicos, que se describen en la Tabla 18, por lo que se desprende que el proceso de electrohilado no modificó al polímero empleado.

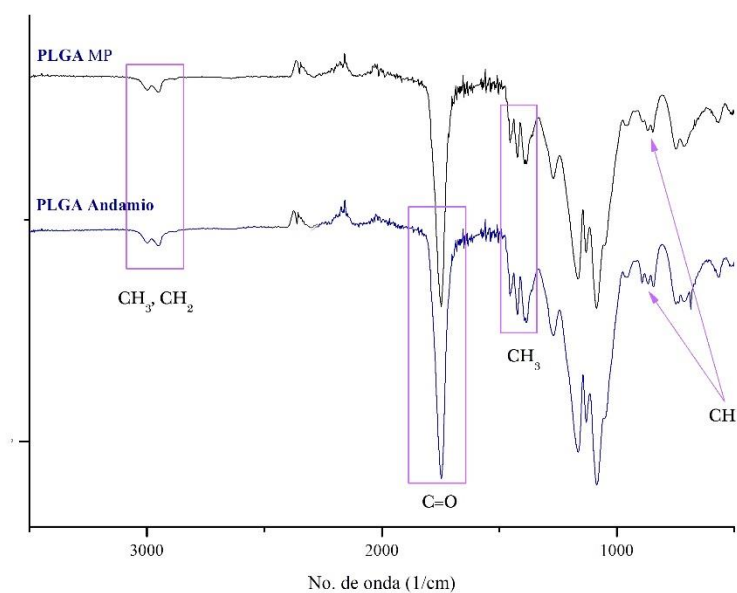


Figura 29. Espectro de infrarrojo de PLGA materia prima y el andamio de PLGA.

En la Figura 30, se muestran los espectros correspondientes a las muestras electrohiladas de las mezclas de PLGA: Colágeno, a diferentes concentraciones de colágeno. Con referencia al espectro de infrarrojo del colágeno (Ver Figura 15) que muestra las bandas de absorción a 1650 y 1540 cm^{-1} , las cuales corresponden a las amidas I y II, respectivamente. Asimismo en la Figura 30 se encuentra resaltada con un recuadro la zona entre 1,700-1,500 cm^{-1} , que permite distinguir como al incrementarse la concentración de colágeno en el andamio se intensifica la señal de los picos de la amida, únicamente se nota a proporciones muy altas del colágeno, lo cual verifica la presencia del colágeno en los andamios.

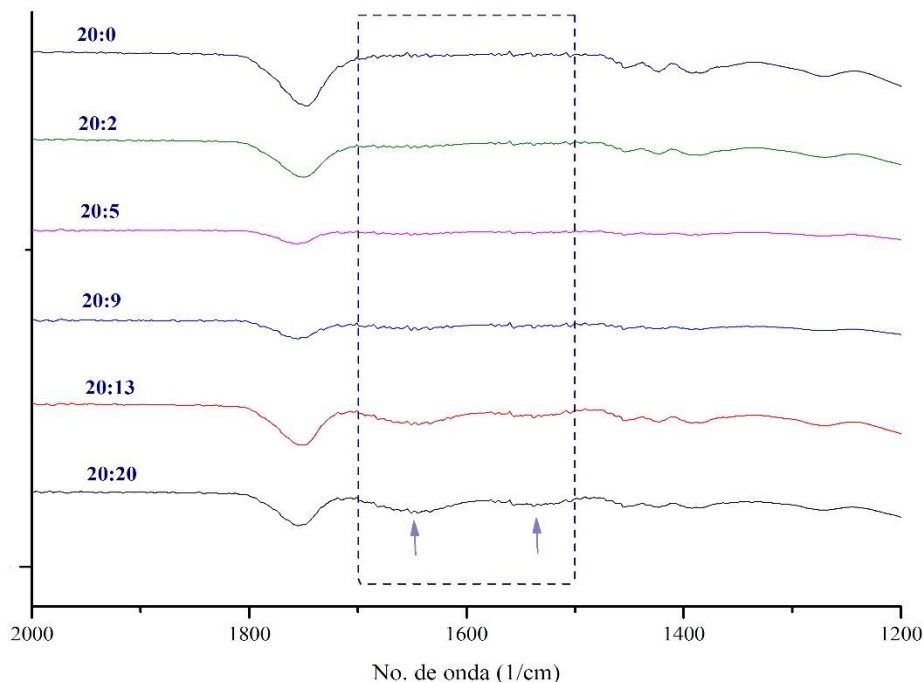


Figura 30. Espectro de infrarrojo de los andamios electrohilados de PLGA: Colágeno.

Adicionalmente, en la Figura 31 se muestran los espectros de los andamios que contienen quitosano en diferentes proporciones PLGA: Colágeno: Quitosano. Las bandas de absorción características de los grupos sacáridos, alrededor de los 890 y 1150 cm^{-1} no se pudieron observar en la figura, debido a que se traslapan con las bandas del grupo metilo del PLGA, y debido a que la concentración de quitosano es baja, las bandas se presentaron muy débiles o nulas. Adicionalmente en la región alrededor de 1500 a 1700 cm^{-1} , aparecen tanto el enlace de $\text{C}=\text{O}$ del quitosano, como a la amida I del colágeno. Dicha banda está resaltada en la Figura 31, con un recuadro, en los espectros se observa que se enfatizan los picos conforme aumenta la presencia de colágeno y en el caso de la proporción que solo contiene quitosano ($20:0:1$) no se presenta gran diferencia con respecto al andamio de puro PLGA ($20:0:0$), debido a la baja concentración en la que se encuentra. De acuerdo a esto se comprueba la presencia de colágeno en los andamios electrohilados de estas mezclas.

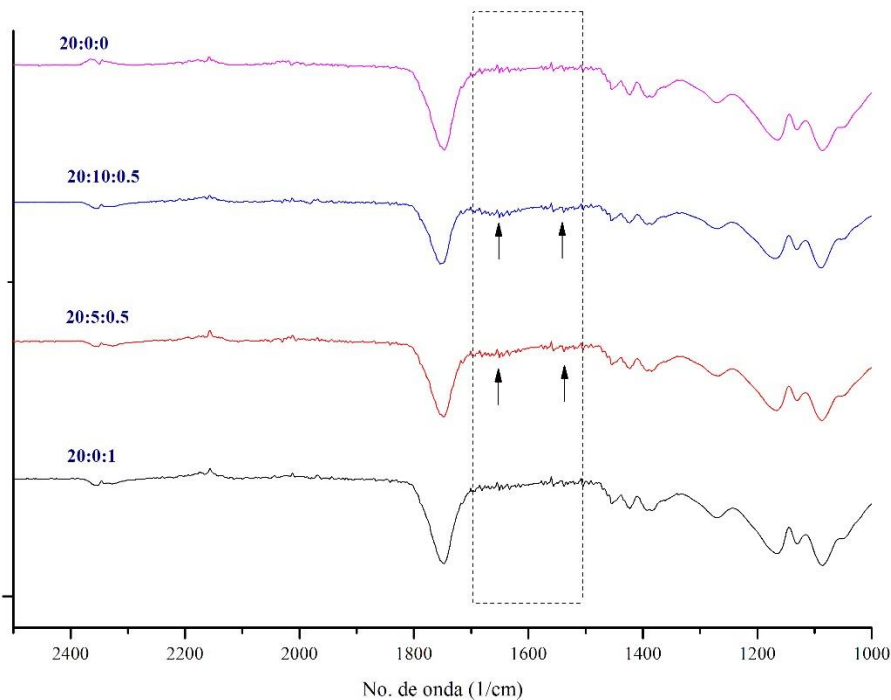


Figura 31. Espectro de infrarrojo de los andamios electrohilados de PLGA: Colágeno: Quitosano.

4.3.2 *Análisis de temperaturas de degradación y transición*

4.3.2.1 *Análisis de la pérdida de masa por termogravimetría (TGA)*

Los termogramas para los andamios PLGA: Colágeno en diferentes proporciones se presentan en la Figura 32. El análisis termogravimétrico muestra la pérdida de agua entre 50 y 100 °C en las mezclas. Se observa también que el PLGA se descompone a una mayor temperatura, de 270°C, que en las mezclas. Al aumentar la proporción de colágeno la degradación se inicia a menor temperatura. En el caso de los andamios a diferentes proporciones de PLGA: Colágeno: Quitosano (Figura 33), se observa que el PLGA y después el quitosano son los más estables térmicamente. Como en el caso anterior, se observa una disminución de la temperatura de descomposición al aumentar la proporción de colágeno, es decir, se asemeja más a la del colágeno, esto se puede observar en la zona entre los 200 y

los 300 °C, donde comienza la pérdida de peso a una menor temperatura cuando se tiene mayor contenido de colágeno.

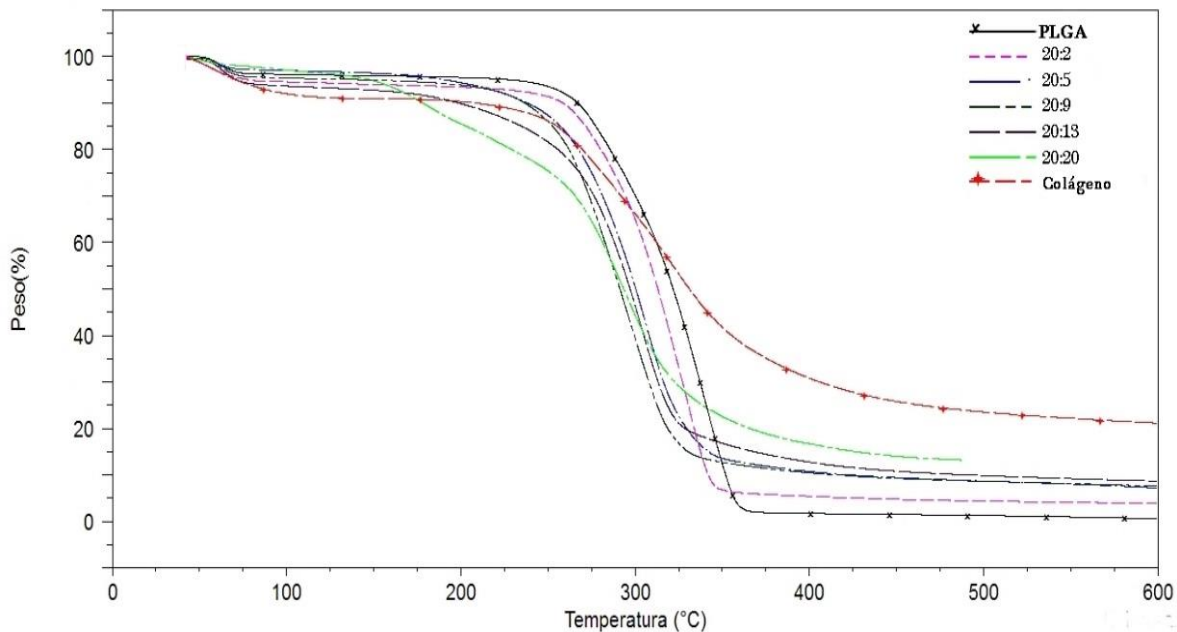


Figura 32. Termogramas de andamios electrohilados de PLGA: Colágeno.

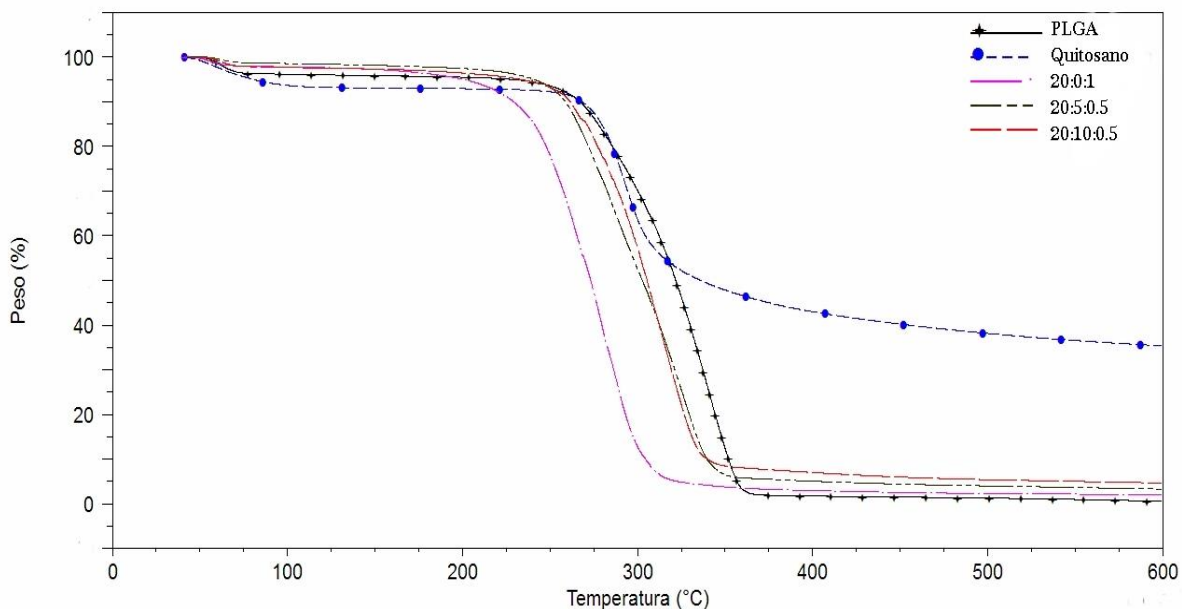


Figura 33. Termogramas de andamios electrohilados de PLGA: Colágeno: Quitosano.

4.3.2.2 Análisis de temperaturas de transición por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la Figura 34 se presentan los termogramas de DSC de los andamios de PLGA: Colágeno, se puede observar que al aumentar la proporción de colágeno la T_v disminuye ligeramente desde los 47°C, que corresponde a la T_v del PLGA puro, hasta 38 °C. Así mismo se observa que el cambio de pendiente correspondiente a la T_v es menos visible. Esto se puede deber a la mayor movilidad en la cadena de colágeno, lo cual genera una disminución de la T_v . Además se puede observar que el pico endotérmico correspondiente a la deshidratación del colágeno alrededor de los 85°C, que define Cheng *et al*, 2008, no se observa claramente en la Figura 24,, pero conforme se incrementa la concentración del colágeno en el andamio, se observa un ligero cambio de base, se forma una ligera onda en esos termogramas, alrededor de 140°C, que corresponden al agua que contiene el colágeno.

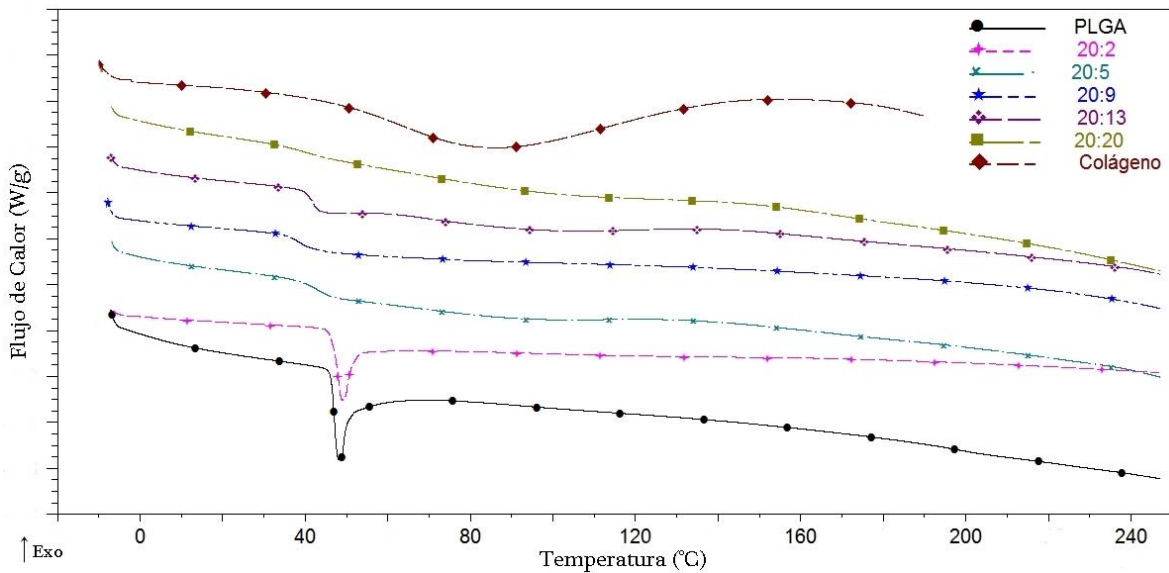


Figura 34. Termogramas de DSC de andamios electrohilados de PLGA: Colágeno a diferentes proporciones.

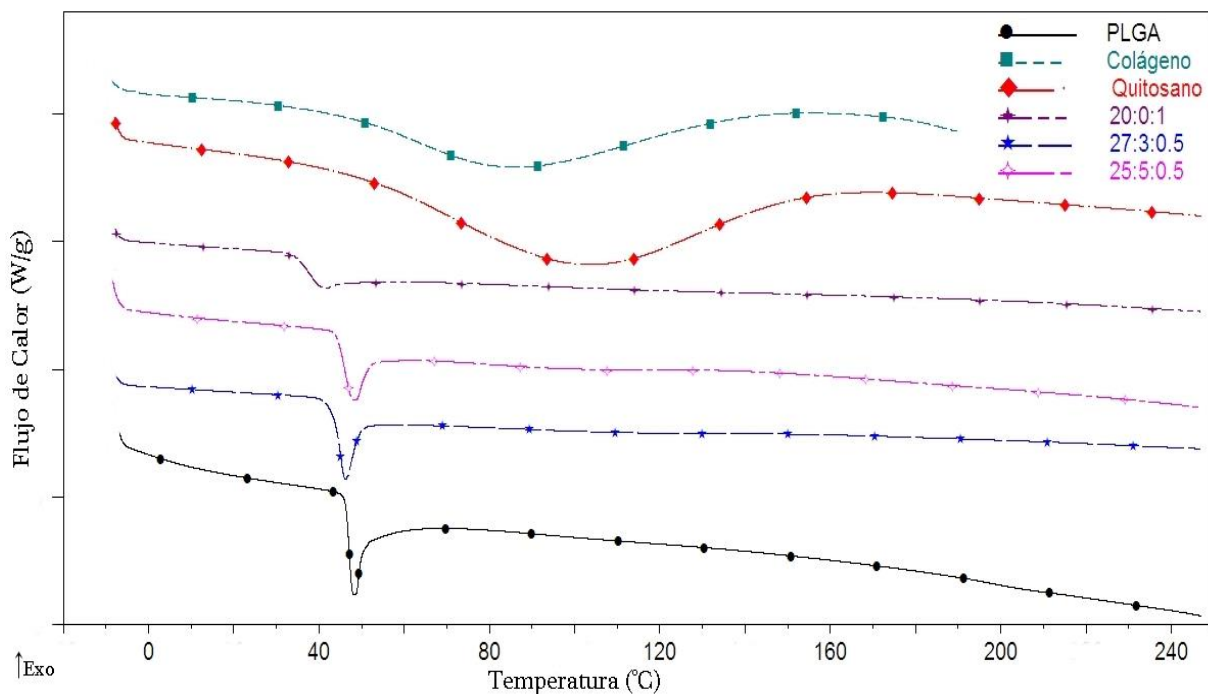


Figura 35. Termogramas de DSC de andamios electrohilados de PLGA: Colágeno: Quitosano.

Al analizar los termogramas de los andamios de PLGA: Colágeno: Quitosano (Figura 35) se presenta un comportamiento similar al anterior, donde la T_v del PLGA se ve modificada ligeramente por la presencia del colágeno y del quitosano en los andamios, donde se observa que el andamio en proporción 20:0:1, a pesar de la baja proporción de quitosano que contiene, modifica en gran medida la T_v , disminuye hasta 38°C, respecto a la T_v que se encontró del PLGA, alrededor de los 47°C, pero se observan de manera alargada y delgados los picos, debido a que se presenta una relajación entálpica, es decir, se encuentra en un estado de no-equilibrio, el cual origina una serie de cambios en la organización de las cadenas del material que tienen a adquirir sus configuraciones de equilibrio. En cuanto a la deshidratación del colágeno y/o quitosano no se puede observar claramente, pero se distingue levemente la presencia del pico endotérmico que lo define, alrededor de los 100°C. De acuerdo a los resultados de la caracterización térmica se comprueba la presencia de colágeno y quitosano en los andamios electrohilados de estas mezclas.

4.3.3 Análisis de hidrofiliidad por ángulo de contacto

La hidrofiliidad es un factor importante en la ingeniería de tejidos, debido a que una superficie o andamio con esta cualidad promueve la viabilidad y proliferación celular. Los datos obtenidos de ángulos de contacto y las imágenes de gotas de agua sobre muestras de PLGA y sus combinaciones con colágeno y/o quitosano se muestran en las Tablas 21 y 22. Se puede apreciar que, en el andamio de PLGA el ángulo de contacto obtenido fue de $118.9 \pm 1.03^\circ$, lo que revela una superficie hidrofóbica. De acuerdo a lo reportado por Wu *et al*, 2008, dicho ángulo es de $128.2 \pm 6.8.3^\circ$, por lo que los datos obtenidos son congruentes con los reportados. En cuanto a los andamios de PLGA: Colágeno, se observa que conforme aumenta la composición de colágeno, disminuye el ángulo de contacto. Es decir, aumentaba la hidrofiliidad, debido a que el colágeno es totalmente hidrofílico, ya que contiene en su estructura grupos funcionales amino y carboxilo (Chen *et al*, 2008).

Tabla 21. Imágenes de Angulo de Contacto para mezclas electrohiladas de PLGA: Colágeno.

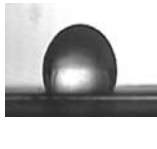
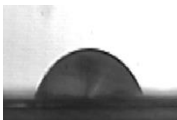




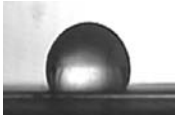
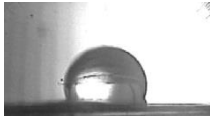
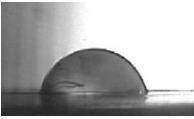
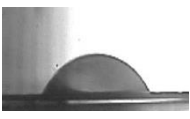
20:0	20:2	20:5	20:9	20:13	20:20
					
$\theta=118.94 \pm 1.03^\circ$	$\theta=63.50 \pm 1.16^\circ$	$\theta=51.36 \pm 1.15^\circ$	$\theta=37.96 \pm 1.13^\circ$	$\theta=24.08 \pm 0.88^\circ$	$\theta=18.50 \pm 0.98^\circ$

Tabla 22. Imágenes de Angulo de Contacto para mezclas electrohiladas de PLGA: Colágeno: Quitosano.

20:0:0	20:0:1	20:5:0.5	20:10:0.5
			
$\theta=118.94 \pm 1.03^\circ$	$\theta=107.46 \pm 1.20^\circ$	$\theta=68.99 \pm 1.07^\circ$	$\theta=58.22 \pm 1.16^\circ$

Meng *et al*, 2010, encontró que a una proporción de 7:3 de PLGA: Quitosano, el ángulo de contacto disminuyó casi a un 50% del ángulo del PLGA, debido a las características

hidrofílicas del quitosano, pero debido a que en este trabajo se empleó una concentración relativamente baja, la presencia de quitosano no ejerció un cambio significativo en los valores determinados del ángulo de contacto. Sin embargo, al mezclar los tres componentes se observa que se tiene un aumento significativo en la hidrofílicidad, debido a la presencia de colágeno en ellos.

4.3.4 *Análisis de Porosidad*

Se determinó el porcentaje de área porosa de los andamios ($\% \varphi$) con ayuda del software ImageJ en las micrografías de proporciones de PLGA: Colágeno: Quitosano mostradas en la Figura 36.

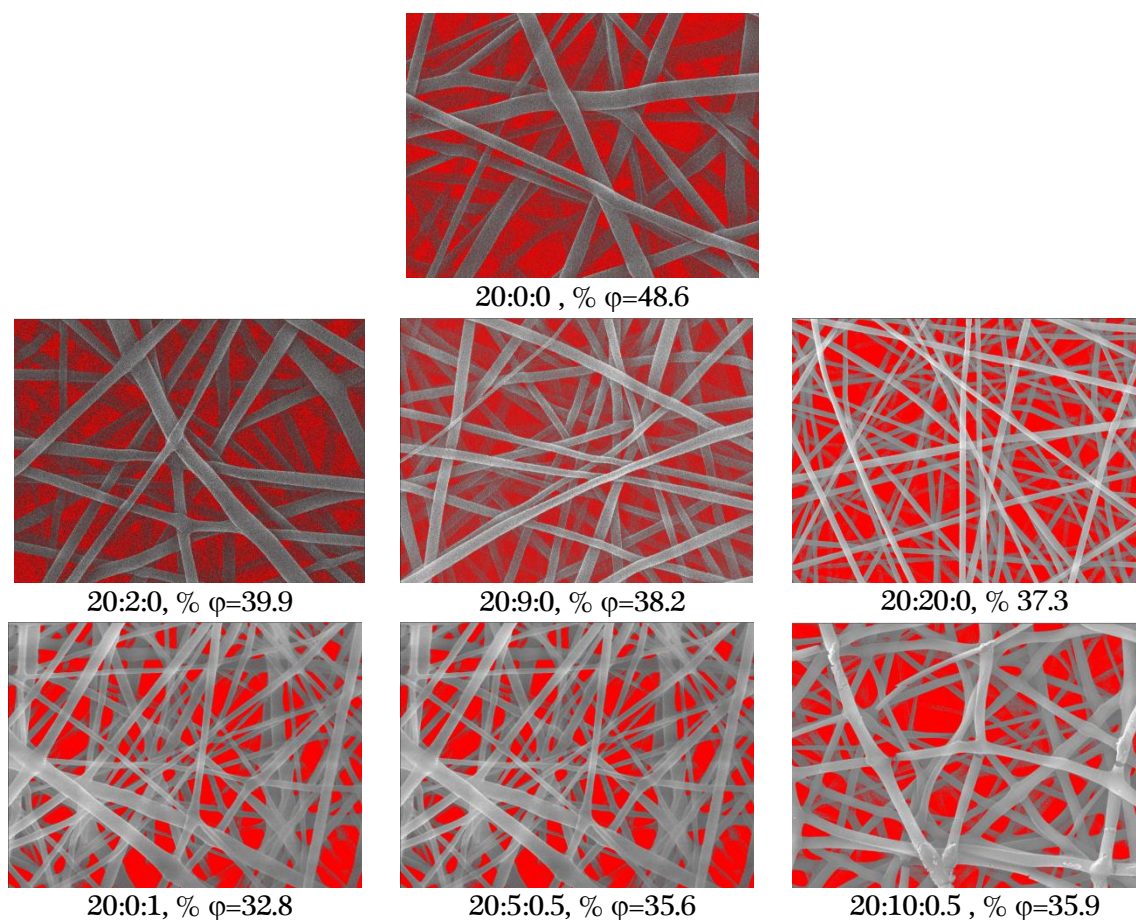


Figura 36. Micrografías de MEB (10,000x) de nanofibras electrohiladas (PLGA: Colágeno: Quitosano) con los datos de porosidad ($\% \varphi$).

Los resultados del porcentaje de área porosa mostrados en la Figura 36 resultaron no tener gran variación en su valor, a excepción de las fibras originales de PLGA. Este andamio presenta una porosidad mayor de 48.6%, lo cual puede favorecer su proliferación celular. La presencia de colágeno o quitosano en los andamios redujo ligeramente la porosidad, esto es debido a la disminución en el diámetro de las fibras con la presencia de estos materiales.

4.3.5 *Análisis de propiedades mecánicas en tensión uniaxial*

Los andamios fueron sometidos a la prueba de tensión uniaxial, la cual se realizó bajo la norma ASTM D1708. Se usaron 5 probetas de cada andamio; de esta prueba se obtuvieron resultados de módulo de Young (E), resistencia a la tensión (σ) y porcentaje de deformación a la ruptura (% deformación).

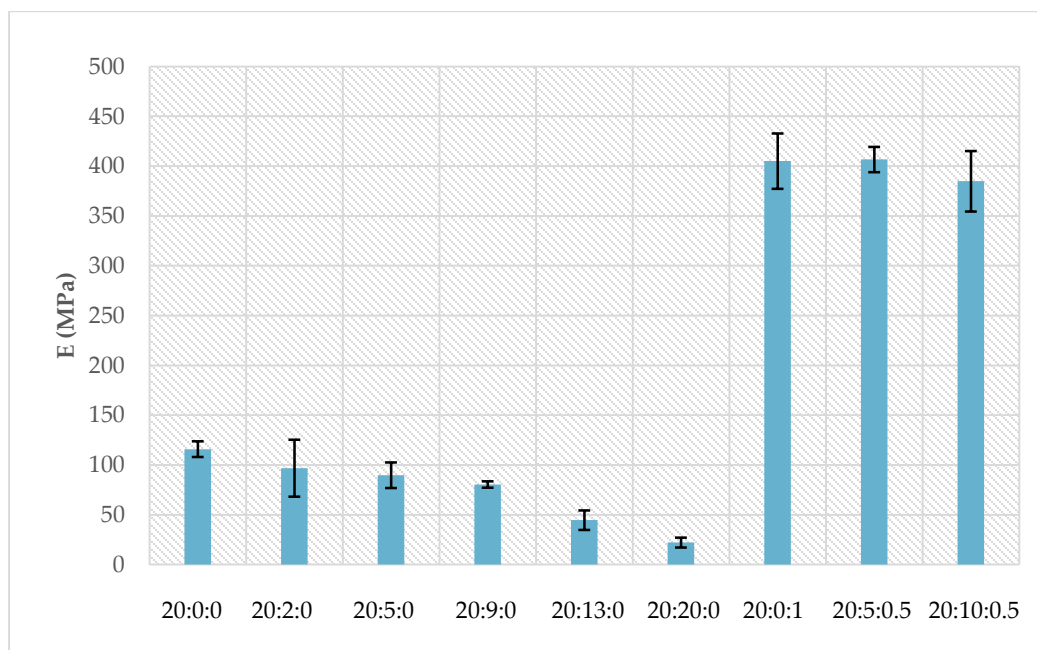


Figura 37. Módulo de elasticidad de los andamios electrohilados en proporciones de PLGA: Colágeno: Quitosano.

Los andamios electrohilados con PLGA se han reportado con valores de módulo de Young de alrededor de 80 MPa, un esfuerzo a la tensión de alrededor de 2.5 MPa, con deformación a la ruptura de 43% por Duan *et al*, 2007, los datos obtenidos en los andamios del PLGA, corresponden a un módulo de Young de 115.9 ± 7.9 MPa, una resistencia a la tensión de 5.8 ± 0.07 MPa y un porcentaje de deformación antes de la ruptura de 50.7 ± 2.0 , por lo que se

puede notar que se obtuvieron propiedades mecánicas superiores a las reportadas, debido a que la concentración a la que se trabajó en este proyecto es 3 veces mayor a la concentración empleada por Duan *et al.*

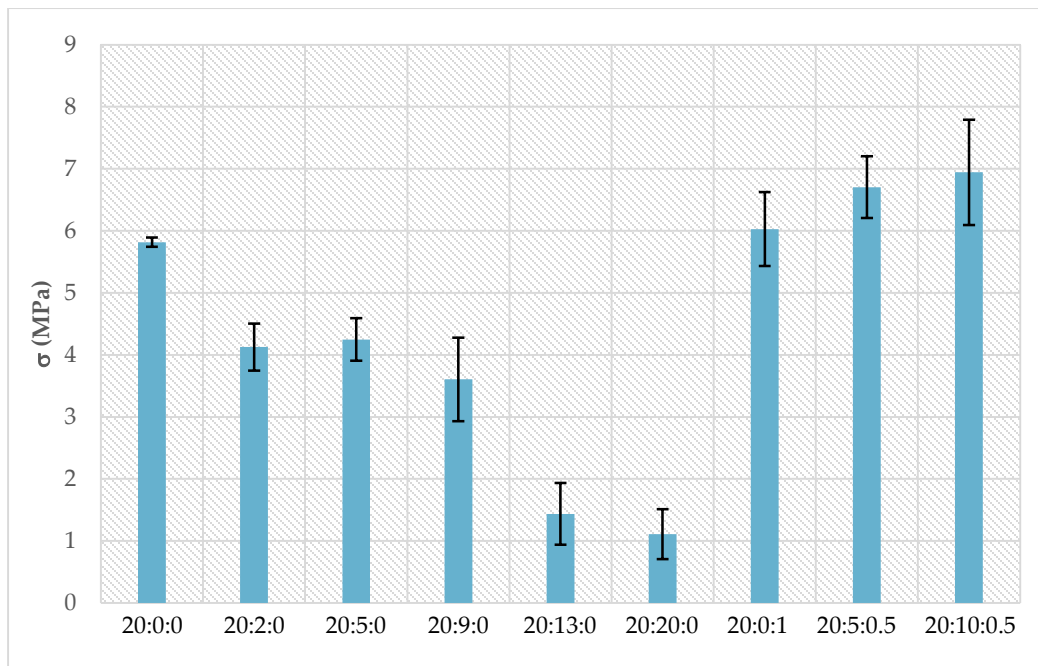


Figura 38. Resistencia a la tensión de los andamios electrohilados en proporciones de PLGA: Colágeno: Quitosano.

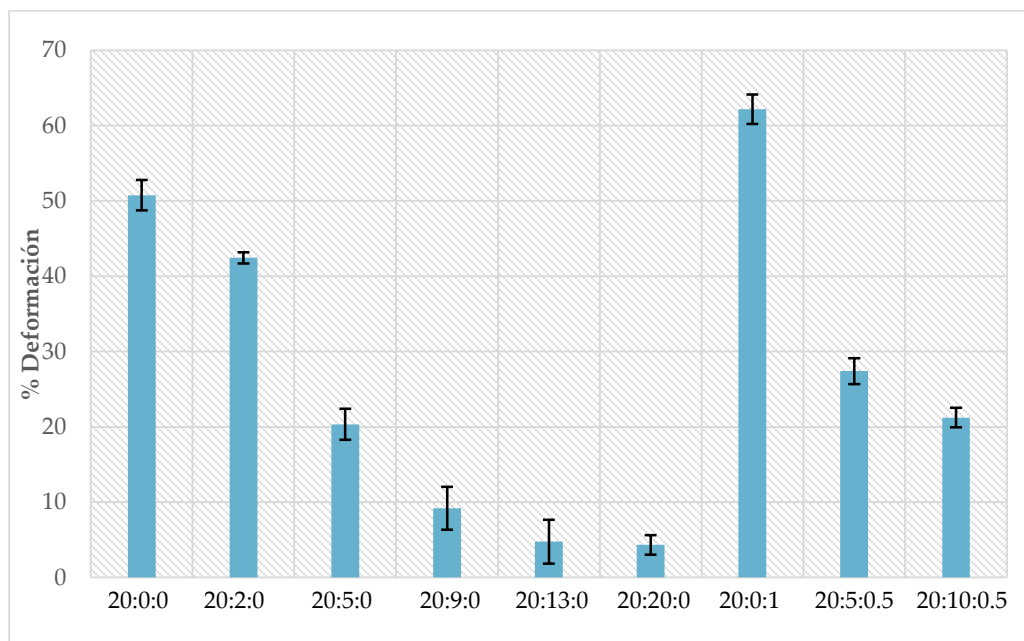


Figura 39. Deformación de los andamios electrohilados en proporciones de PLGA: Colágeno: Quitosano.

De acuerdo a los resultados mostrados en las Figuras 37, 38 y 39, se observa que las andamios que contienen colágeno, decrece de manera proporcional sus propiedades mecánicas conforme se incrementa la proporción de colágeno. Esto debido a que el colágeno tiene propiedades mecánicas muy pobres, también a que el proceso de preparación del material a electrohilar solo se llevó a cabo mediante un mezclado físico. Para el andamio que contienen mayor cantidad de colágeno, 20:20:0, el módulo de Young y la resistencia a la tensión decrecen a una quinta parte de los valores del andamio formado por puro PLGA, 20:0:0. Así mismo, el porcentaje de deformación decrece a menos de una décima parte del andamio de puro PLGA, esto debido a que se trata de colágeno hidrolizado, el cual tiene propiedades mecánicas muy pobres.

Por su parte la presencia de quitosano en las fibras mejoró considerablemente las propiedades mecánicas; se incrementa el módulo de elasticidad casi 4 veces el valor de las fibras de PLGA, proporción 20:20:0, como se observa en la Figura 38 y 39. Se requirió ligeramente más tensión para poder ser deformado y sufrió mayor deformación antes de llegar a la ruptura. Por ejemplo, en los andamios formados por los tres componentes, al comparar las proporciones 20:5:0 vs 20:5:0 y 20:9:0 vs 20:10:0.5 se puede observar que se tiene un módulo de Young de más de 4 veces cuando se adiciona quitosano. Así mismo, se requiere una carga mayor para deformarlo, alrededor de 20% de su valor sin quitosano y se tuvo un porcentaje de deformación mucho mayor. Por lo que al adicionar este polímero en la matriz contribuyó considerablemente a mejorar sus propiedades mecánicas, en todos los casos que lo contienen.

4.3.6 Prueba de hinchamiento

Se realizaron las pruebas de hinchamiento para las muestras electrohiladas en agua destilada a temperatura ambiente, a un tiempo de 24 horas. Dichos resultados se muestran en la Tabla 23. Se puede apreciar que la presencia del colágeno, aumenta el porcentaje de hinchamiento, debido a que su hidrofiliidad, lo cual se coincide con las pruebas de ángulo de contacto discutidas en el apartado 5.3.3, donde se aprecia que la presencia del colágeno disminuye

sensiblemente la hidrofobicidad. Este atributo es debido a los grupos amino y carbonilo presentes en la estructura del colágeno, dichos resultados concuerdan con los trabajos reportados por Meng *et al.*

Tabla 23. Porcentaje de hinchamiento para las muestras en proporciones de PLGA: Colágeno: Quitosano.

Muestra	% Hinchamiento
20:0:0	90.9
20:9:0	255.6
20:20:0	262.8
20:0:1	93.5
20:5:0.5	236.7
20:10:0.5	241.7

4.3.7 Prueba de degradación

Las pruebas de degradación se llevaron a cabo durante 15 días. Se sumergieron en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado y se colocaron en incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, para simular las condiciones del cuerpo humano. Al estar en incubación las muestras se les cambió el medio cada dos días, lo cual es una práctica común, sin embargo también se realizó debido a que los materiales sumergidos en este medio modificaban ligeramente el pH; éste disminuyó en las pruebas entre 6 y 6.5, el cual debería ser neutro. El comportamiento de la degradación de estos materiales se puede apreciar en la Figura 40; que el material que presento menos porcentaje de pérdida de material es el que está compuesto cien por ciento de PLGA, pero para los 15 días ya contaba con una pérdida de aproximadamente de 25% (Ver Tabla 24), lo cual concuerda con los datos reportados en la hoja técnica del proveedor, que el material tiene un tiempo de degradación de aproximadamente dos meses. Como se puede observar la Figura 40, para el andamio 20:20:0, muestra una línea de tendencia, ya que se tuvo que extrapolar cuál sería su comportamiento, debido a que desde los 8 días se fragilizo demasiado que era muy

complicado poder extraer la muestra de incubación, la cual se rompía y no se podía medir adecuadamente el peso.

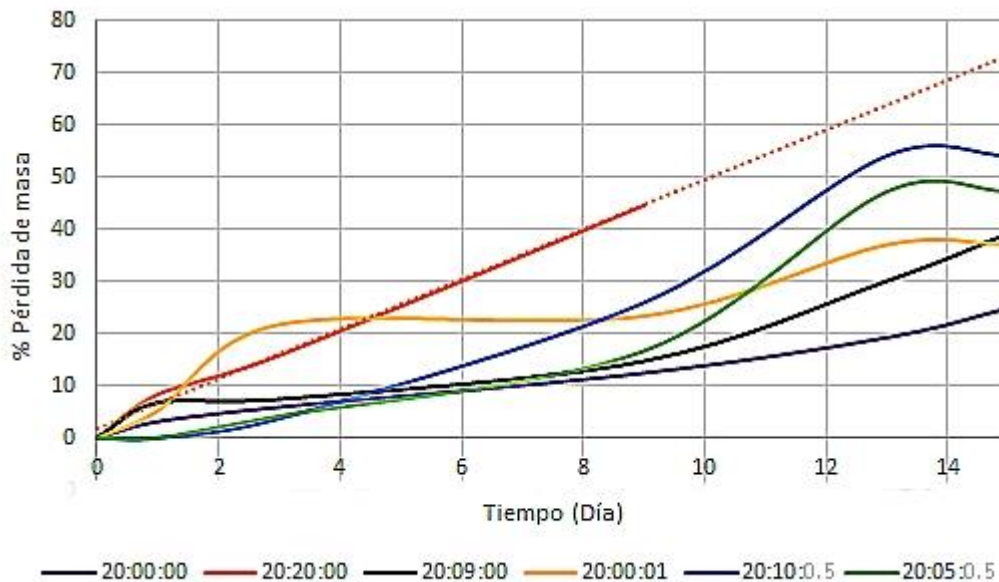


Figura 40. Tendencia del porcentaje de pérdida de masa con el tiempo de las muestras electrohiladas.

Tabla 24. Porcentaje de pérdida de masa para las muestras en proporciones de PLGA: Colágeno: Quitosano a los 15 días.

Muestra	% Pérdida
20:0:0	24.8
20:9:0	39.2
20:20:0	≈75
20:0:1	37.1
20:10:0.5	54.1
20:5:0.5	47.2

Los resultados del porcentaje de degradación máxima observada a los 15 días se muestran en la tabla 24, donde se puede apreciar que los materiales que contienen quitosano y colágeno aumentaron su porcentaje de pérdida, en gran medida, debido a que son más afines al medio acuoso, lo cual concuerda con la medida del ángulo de contacto y las pruebas de hinchamiento, de manera que los materiales más hidrofílicos son más altamente degradables en este medio.

4.4 PRUEBAS DE VIABILIDAD CELULAR CON FIBROBLASTOS MEDIANTE EL MÉTODO DE CALCEÍNA AM.

Se utilizaron fibroblastos humanos, las cuales se multiplicaron por serie de pases celulares y se sembraron en cajas de cultivo T-25, con 1×10^4 células/cm² en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado, es decir, el suero contenía 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico-antimicótico. Se colocaron en incubación a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂, hasta que las cajas se llenaron y las células estuvieron en confluencia.

Los andamios con proporciones de PLGA: Colágeno: Quitosano que se evaluaron fueron: 20:0:0, 20:2:0, 20:9:0, 20:20:0, 20:0:1, 20:10:0.5 y 20:10:0.5, para lo cual fueron cortados en círculos de 8mm de diámetro. Posteriormente fueron esterilizados mediante radiación UV durante 10 min por cada cara del material, como se observa en la Figura 41 se colocaron en una caja Petri, se realizó este procedimiento por duplicado. Así mismo, se preparó otra caja Petri con las muestras de los materiales, para llevar a cabo los controles negativos, es decir, sin sembrado celular. Se sembraron 15,000 fibroblastos/cm² sobre los materiales, en medio DMEM suplementado. Dichos materiales sembrados se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%; el medio fue cambiado cada dos días (Figura 41).

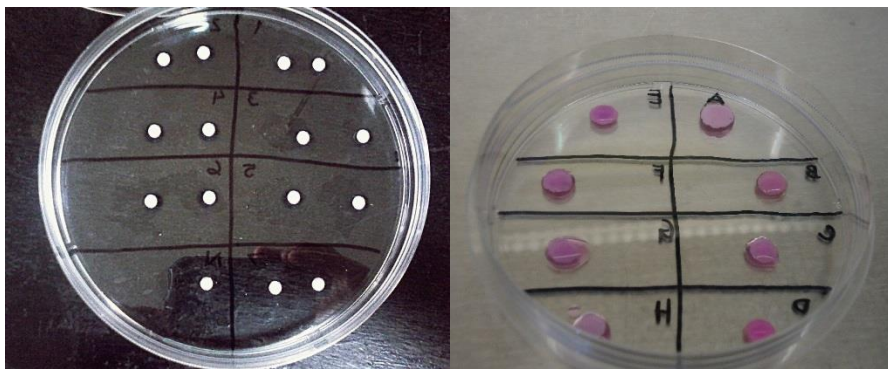


Figura 41. Sembrado celular de fibroblastos sobre los polímeros en caja Petri, lado izquierdo previo al sembrado y lado derecho materiales ya sembrados.

Los ensayos de viabilidad celular de calceína se realizaron a 2, 7 y 15 días de iniciar la siembra sobre los andamios. En esta prueba se compararon los andamios con diferentes concentraciones de colágeno y quitosano. Las muestras fueron preparadas de acuerdo al procedimiento descrito en el capítulo 4 y las imágenes fueron tomadas en el microscopio óptico confocal. Cabe mencionar que en este caso no se realizó la cuenta de células, debido a la formación de cúmulos de células, los cuales al realizar el conteo y la comparación no serían significativos, por lo que solo se hizo un análisis cualitativo basado en las imágenes de los fibroblastos sobre el material en estudio.

Las Figuras 42, 43 y 44, muestran las micrografías de los andamios evaluados, a un aumento de 20x, las cuales corresponden a los controles positivos, es decir las muestras sembradas, se observa la proliferación de los fibroblastos humanos sobre los materiales sintetizados. En todos los casos se puede observar que hay viabilidad, se concluye esto debido a que se observa gran cantidad de células que fluorescen en verde, es decir, son células vivas. En casi ningún caso se observa puntos rojos, que corresponderían a las células muertas, de ahí que los andamios electrohilados presentaron alta viabilidad y con ello se puede inferir que los materiales empleados no son citotóxicos.

La Figura 42 corresponde a las imágenes de los andamios a dos días de haberse sembrado. En todos los casos se puede observar que se tuvo adherencia y proliferación de los fibroblastos en la superficie de los materiales. En el caso del andamio de puro PLGA, que corresponde a la Figura 42 a se observa menor cantidad de células. Además, estas células presentan la morfología inicial, esférica, lo que implica que aún no adquieren su morfología característica alargada, la cual si se presenta en una etapa inicial, en los materiales que contienen colágeno y quitosano, es decir la Figura 42 b, c, d y e, principalmente, ya que en el caso de la figura 42 f y g se observa un comportamiento muy similar al andamio de puro PLGA, dichas imágenes son los andamios que contienen los tres materiales. De acuerdo a lo observado la figura 42 c. presenta mayor crecimiento celular, la cual es la que tiene mayor contenido de quitosano.

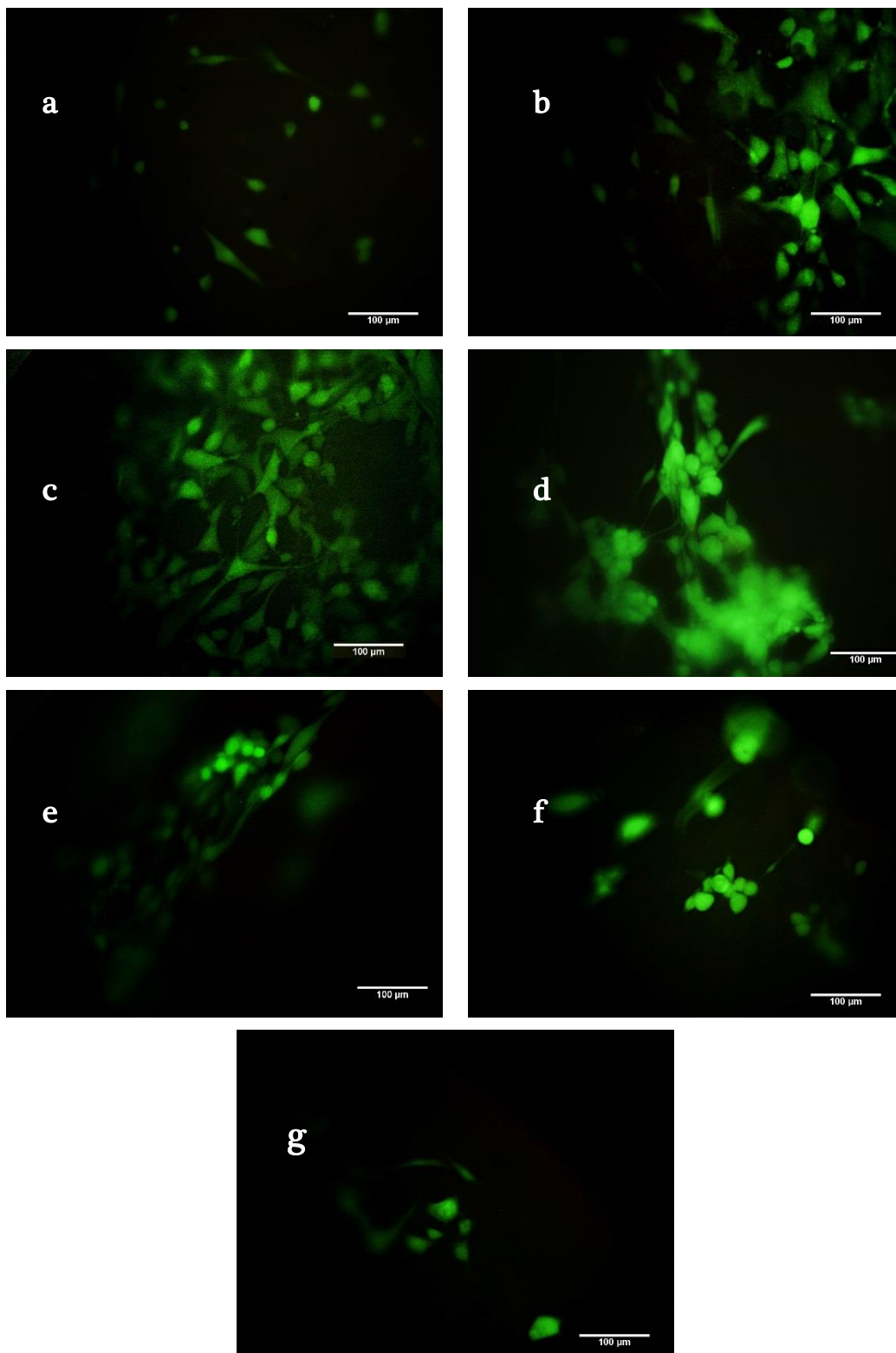


Figura 42. Micrografías de los andamios electrohilados a 2 días de sembrado con fibroblastos humanos, mediante el método de calceína-AM, donde, a) 20:0:0, b) 20:2:0, c) 20:9:0, d) 20:20:0, e) 20:0:1, f) 20:5:0.5 y g) 20:10:0.5, con aumento 20x.

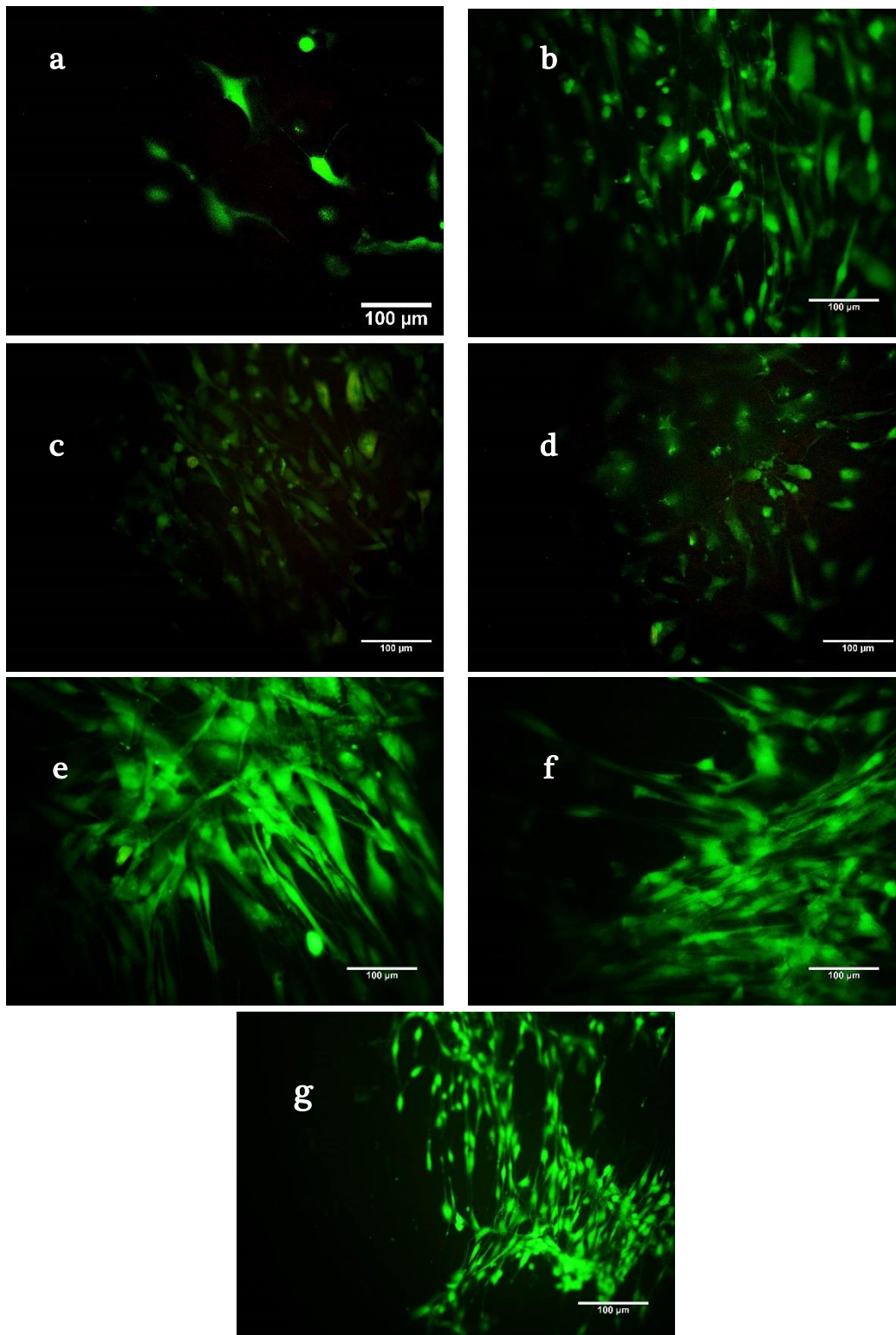


Figura 43. Micrografías de los andamios electrohilados a 7 días de sembrado con fibroblastos humanos, mediante el método de calceína-AM, donde, a) 20:0:0, b) 20:2:0, c) 20:9:0, d) 20:20:0, e) 20:0:1, f) 20:5:0.5 y g) 20:10:0.5, con aumento 20x.

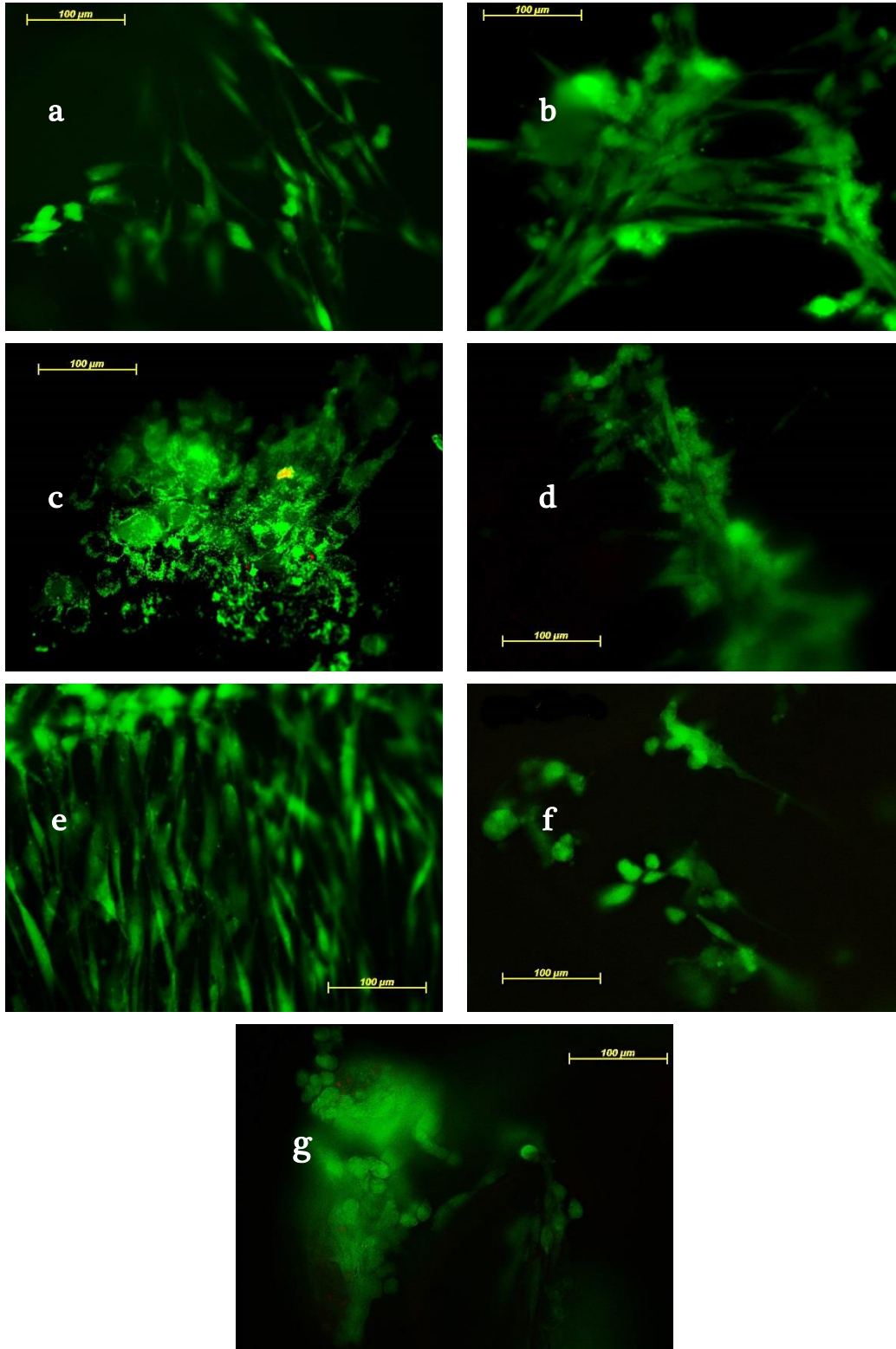


Figura 44. Micrografías de los andamios electrohilados a 15 días de sembrado con fibroblastos humanos, mediante el método de calceína-AM, donde, a) 20:0:0, b) 20:2:0, c) 20:9:0, d) 20:20:0, e) 20:0:1, f) 20:5:0.5 y g) 20:10:0.5, con aumento 20x.

A los 7 días de sembrado de los fibroblastos, Figura 43, se observan que los fibroblastos proliferaron en los andamios. Las células se encuentran más alargadas, lo cual corresponde a su morfología característica, se puede observar, en los andamios que contienen quitosano, un alargamiento mayor de los fibroblastos, es decir en la Figura 43 e, f y g se observa mayor cantidad de células en estos mismo andamios. En todos los casos, no de igual manera, comienza a observarse hilos de comunicación entre célula y célula, es decir, las células comenzaron a estar en confluencia.

La presencia de células alargadas en los materiales con quitosano se puede explicar debido al bajo peso molecular del quitosano, ya que si el polímero tiene menor peso molecular puede ser degradado con mayor facilidad, pues se producen oligómeros que aumentan la producción de enzimas y proliferación celular, de acuerdo a lo que encontró Minagawa *et al*, 2007. Asimismo bajo esta misma afirmación, se puede explicar el hecho de que un material hidrófobo, como lo es el PLGA, tuvo viabilidad celular, ya que el material empleado a 50:50 de poliácido láctico: poliácido glicólico lo hace amorfo, adicionalmente se trata de un bajo peso molecular inferior a 50, 000 Da, lo cual contribuyó a que existiera la viabilidad de fibroblastos en este material.

La Figura 44, muestra las micrografías de los andamios después de 15 días de sembrado de los fibroblastos. Las células se observan más alargadas en todos los casos comparado a las pruebas de dos y siete días de cultivo, únicamente en la Figura 44 c se observa un agregado, el cual corresponde a un cumulo de células, puede deberse a la mala manipulación del andamio al realizar el sembrado de las células, o bien algunos materiales presentaron dobleces, lo cual hizo que las células prefirieran estar acumuladas en estos. En la mayoría de las micrografías se observa que las células están en confluencia y comenzaron a tener hilos de unión, por lo que la viabilidad se incrementó conforme el paso del tiempo de sembrado.

5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se lograron obtener andamios de nanofibras de PLGA disuelto en HFP, mediante la técnica de electrohilado. Los diferentes parámetros de operación que conllevan esta técnica, tales como: concentración del polímero en solución, velocidad de inyección, diferencia de potencial aplicado y distancia aguja colector, influyen en la morfología de las fibras. Se evidenció que el aumento de la concentración del polímero en solución incrementa el diámetro de las fibras, así como la desviación de los diámetros se ve incrementada a mayor velocidad de inyección. Las mejores condiciones determinadas fueron: una concentración del 20% (p/v) del PLGA en solución, una velocidad de inyección de 0.25ml/h, una diferencia de potencial aplicado de 12 kV y una distancia aguja colector de 15 cm, se trabajó a temperatura ambiente de 22-25 °C y a humedad relativa de 30-55%H.

Asimismo se obtuvieron andamios de combinaciones de PLGA: Colágeno, PLGA: Quitosano y PLGA: Quitosano: Colágeno, donde se evidencio que al aumentar la proporción del colágeno o quitosano, el diámetro de las fibras se veía disminuido, bajo las mismas condiciones de electrohilado, lo cual favorece al aumento del área superficial del andamio. Los andamios, al aumentar la proporción de colágeno, presentaron disminución de los diámetros de las fibras. Además se pudo observar que se obtenían fibras más homogéneas, conforme disminuían los diámetros. En cuanto a los materiales que contenían quitosano, se puede observar que diámetros decrecen por la presencia de este material. Todas las combinaciones de PLGA y/o colágeno y/o quitosano se realizaron únicamente por mezcla física, se muestra que fueron parcialmente miscibles entre sí, ya que en las micrografías no se observan precipitados de algunos de los polímeros empleados.

El ángulo de contacto disminuyó al aumentar la proporción de colágeno en los andamios evaluados, es decir, los materiales aumentaron su hidrofiliidad. Además de acuerdo a las pruebas de hinchamiento, los materiales evaluados que contenían colágeno, favorecían la

absorción de agua, lo cual concuerda con las medidas del ángulo de contacto. De esta manera se favoreció la viabilidad de fibroblastos en los materiales evaluados que contenían colágeno.

El porcentaje de área porosa disminuyó ligeramente al realizar las combinaciones del PLGA con el quitosano y colágeno, respecto al andamio electrohilado obtenido a partir de PLGA, debido a que se tuvo una disminución del diámetro de las fibras conforme se aumentaba la proporción de colágeno y/o quitosano. En el caso del PLGA, al tener una porosidad de casi el 50%, presentó una considerable viabilidad celular de fibroblastos, mayor a lo esperado para un material hidrófobo.

De acuerdo a las propiedades térmicas, en el análisis termogravimétrico de los andamios electrohilados de PLGA y sus combinaciones con el quitosano y el colágeno, no mostraron variaciones considerables, únicamente se observa una disminución de la temperatura de descomposición al aumentar la proporción de colágeno. En los análisis por DSC de los andamios electrohilados, la T_v del PLGA se ve modificada ligeramente por la presencia del colágeno y del quitosano en los andamios, la cual disminuye gradualmente al aumentar la proporción de colágeno.

El análisis de los grupos funcionales, por espectroscopía de infrarrojo, no mostró la presencia de ninguna banda nueva, al realizar las mezclas electrohiladas de los materiales empleados, por lo que aparentemente se deduce que los materiales no se modifican.

Los materiales con mayor módulo de Young fueron los que contenían quitosano. Por lo tanto dichos materiales son más rígidos. Además los materiales que presentaron mayor porcentaje de deformación, fueron las mezclas de PLGA: Colágeno: Quitosano de 20:0:1, 20:2:0 y la muestra del polímero de PLGA, por lo que estos materiales son ligeramente más flexibles que los demás andamios electrohilados. En el caso de la resistencia a la tensión para los materiales que contenían el quitosano se requirió una mayor carga. Por lo tanto, las propiedades mecánicas de los andamios evaluados presentaron mejoría considerable cuando

se encontraba presente el quitosano. En cambio, al aumentar la proporción de colágeno en los andamios, las propiedades mecánicas decrecían en gran medida. De acuerdo a lo reportado por Manschot *et al*, 1986, que menciona que el módulo de Young de la piel corresponde a un valor de 5 hasta 20 MPa, el andamio que tiene un valor similar es la muestra 20:20:0, es decir, el de menor modulo y con mayor cantidad de colágeno. Sin embargo, como es de esperarse las propiedades mecánicas que se requieren de estos andamios no solo deben ser semejantes a las del tejido a sustituir, sino mayores para que conforme se degraden se forme el nuevo tejido y este al constituirse pueda tener las propiedades mecánicas inherentes del tejido a sustituir.

La variación que presentaron las propiedades mecánicas se puede relacionar con las pruebas de degradación de los materiales a condiciones fisiológicas. Se observó que se tenía mayor pérdida de masa en los materiales que contenían colágeno, casi hasta del 75% para el material que contenía 50% de colágeno a los 15 días de evaluación, lo cual se refleja en propiedades mecánicas más pobres. En contraste con los materiales que contenían quitosano, se tuvo una pérdida de masa de alrededor del 40% a ese mismo tiempo de evaluación, debido a que se tienen mejores propiedades mecánicas, es decir materiales más resistentes.

Las pruebas de viabilidad de fibroblastos sobre los andamios evaluados fue satisfactoria, ya que se puede observar que se tienen materiales con alta viabilidad, lo cual hace los hace materiales con un alto potencial para ser usados en aplicaciones para regeneración de piel. En el caso del material que estaba compuesto por puro PLGA (20:0:0), se puede observar que a pesar de que se trata de un material hidrófobo, presento cierta viabilidad, lo cual se debió a que al electrohilarse se tenía una porosidad de casi un 50%, además de que el peso molecular de este material era considerado bajo, de 38,000 – 54,000 Da. Estas características favorecieron la adhesión y crecimiento de fibroblastos en la superficie del material. Los materiales que contenían quitosano a los que se les evaluó la viabilidad de fibroblastos, a los dos días no presentaron una alta viabilidad, de manera cualitativa. Sin embargo, a las evaluaciones posteriores se observa que las células se adhirieron y crecieron en el material.

Para el caso de los materiales que contenían colágeno se aprecia que desde un inicio se tiene cierta viabilidad considerable. De manera que la presencia de quitosano y/o colágeno favorecieron la viabilidad de fibroblastos en estos materiales. Los materiales que tuvieron mayor viabilidad de manera cualitativa son los andamios de proporción 20:0:1, el que tuvo la mayor viabilidad, seguido de 20:2:0, 20:20:0. Sin embargo, los andamios de proporciones 20:5:0.5 y 20:10:0.5, mostraron también alta viabilidad, aunque a los dos días no parecía que fueran prometedores, las imágenes de los 7 días muestran que las células se adhirieron y crecieron con su morfología característica. Cabe mencionar que se requiere realizar un estudio más detallado, donde se evalúe de manera cualitativa la viabilidad, para discernir que material es el más adecuado para emplearse. Pero se concluye que se obtuvieron materiales con características muy favorables para ser potencialmente empleados en la regeneración de piel.

6 CONCLUSIONES

Por medio de la técnica de electrohilado se obtuvieron andamios a base de PLGA, colágeno y quitosano, por mezcla física y se realizó la caracterización de sus propiedades físicas y químicas de los mismos. Durante el estudio se encontró que un disolvente adecuado para el electrohilado del PLGA es el HFP y, los parámetros de proceso más adecuados fueron: concentración de PLGA de 20% p/v, velocidad de inyección de 0.25ml/h, diferencia de potencial aplicada de 12 kV y una distancia aguja-colector de 15 cm.

El empleo de colágeno hidrolizado tipo I redujo hasta aproximadamente un 85% el ángulo de contacto y aumento hasta casi tres veces el porcentaje de hinchamiento con respecto al andamio formado en su totalidad por PLGA, es decir, incrementa notablemente la hidrofiliidad del andamio polimérico que lo contiene, lo cual confiere las características adecuadas para la adhesión y crecimiento celular.

En el caso del quitosano el principal atributo que mejoró en los andamios que se electrohilieron fueron las propiedades mecánicas. Se incrementó el módulo de Young casi a 4 veces al valor del andamio conformado en su totalidad por PLGA, lo cual indica mayor elasticidad del material y se incrementó su porcentaje de deformación hasta 20% más, es decir que el quitosano consolida el andamio lo cual permite que se deforme más antes de llegar a la ruptura.

Con base a las propiedades térmicas podemos determinar que ninguno de los materiales empleados presenta pérdida de masa por abajo de los 50 °C, por lo que son materiales viables en aplicaciones biomédicas en el rango de la temperatura corporal media (37 °C).

Asimismo se evaluó la viabilidad de fibroblastos humanos de los andamios obtenidos, donde se observó una alta viabilidad y nula citotoxicidad.

El PLGA mostró viabilidad de fibroblastos a pesar de tratarse de una material hidrofóbico, debido a su bajo peso molecular y por ser amorfo, lo cual favorece la capacidad biológica.

Los resultados del presente trabajo demuestran que el empleo de PLGA, colágeno hidrolizado tipo I y quitosano, para el desarrollo de un andamio electrohilado con propiedades morfológicas, mecánicas y químicas adecuadas para aplicación en regeneración de piel, es viable. Por lo tanto, se considera que se lograron satisfactoriamente los objetivos y se comprueba la hipótesis planteados en este trabajo.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar pruebas de crecimiento celular *in vitro* complementarias para realizar un estudio de manera cuantitativo, así mismo realizar pruebas *in vivo*, para los andamios obtenidos y estudiar el comportamiento de estos en el campo de la ingeniería de tejidos, tanto de piel como de otros tejidos.

8 REFERENCIAS

- Agarwal, S., Wendorff, J., Greiner, A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 49 (2008) 5603–5621.
- Albella, J. M., Cintas, A. M., Miranda, T., Serratos, J. M. Introducción a la ciencia de materiales. *C.S.I.C.* 20 (1993) 749.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. Molecular Biology of the Cell. United States of America, 4a ed. *Garland Science USA* (2004).
- Andres, Y., Giraud, L., Gerente, C., Le Cloirec, P. Antibacterial effects of chitosan powder: Mechanisms of action. *Environmental Technology* 28 (12) (2007) 1357-1363.
- Burg, K. J. L., Porter, S., Kellam, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21 (2000) 2347-2359.
- Burns, D. A., Breathnach, S. M., Cox, N., Griffiths, C. E. Rook's: Textbook of Dermatology. *Malden, Ma: Blackwell Science* 7 (2004) 30.
- Brohem, C., da Silva, C., Tiago, M., Soengas, M., de Moraes, S. y Maria-Engler, S. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24 (2010) 35-50.
- Brück, W., Slater, J. W., Carney, B. Chitin and chitosan from marine organisms. En: Se-Know Kim Editores. Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: Biological activities and applications. *USA: CRC Press* (2010) 12-19.
- Campos, B., Mello, M. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron* 42 (2011) 283-289.
- Chalmers, J. M., Meier, R. J. Molecular Characterization and analysis of polymers. Wilson & Wilson's. *Elsevier* 53 (2008) 784.
- Chen, F., Li, X., Mo, X. Electrospun chitosan-P(LLA-CL) nanofibers for biomimetic extracellular matrix. *J. Biomater. Sci. Polym* 19 (2008) 677–691.
- Chen, Z. G., Mo, X. M., He, C. L., Wang, H. S. Intermolecular interactions in electrospun collagen–chitosan complex nanofibers. *Carbohydr Polym* 72 (2008) 410–418.
- Chen, Z. G., Wang, P. W., Wei, B., Mo, X. M., Cui, F. Z. Electrospun collagen-chitosan nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell. *Acta Biomater* 6 (2010) 372–382.
- Chu, D. V., Haake, R. A., Holbrook, K. Estructura y desarrollo de la piel. *Fitzpatrick Dermatología en Medicina General*. Vol 1. 7a ed. Buenos Aires (2005) 64-88.
- Cowie, J. M. G. Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials. 2a ed. USA (2001) 620.
- Dhwade, P., Jagtap, R. Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry. *Adv. Appl. Sci. Res.* 3 (2012) 1372-1382.
- Duan, B., Wu, L., Yuan, X., Hu, Z., Li, X., Zhang, Y., Yao, K., Wang, M. Hybrid nanofibrous membranes of PLGA/chitosan fabricated via an electrospinning array. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2007) 869-878.
- Duque, L. M., Rodríguez, L., López, M. Electrospinning: La era de las nanofibras. *Rev. Iber. Polímeros* 14 (2013) 10-27.
- Flores-Ramírez, N., Elizalde-Peña, E., Vásquez-García, S., González-Hernández, J., Martínez-Ruvalcaba, A., Sanchez, I., Luna-Bárceñas, G., Gupta, R. Characterization and degradation of functionalized chitosan with glycidyl methacrylate. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 16:4 (2005) 473-488.
- Gartner L. Hiatt J. Texto atlas histología 2a edición Mexico. *Mc Graw Hill Interamericana* (2002) 311-319.
- Gilding, D. K., Reed, A. M. Biodegradable polymers for use in surgery. Polyglycolic/poly (lactic acid) homo- and copolymers: 1. *Polymer* 20 (1979) 1459-1464.

- Goosen, M. Applications of chitin and chitosan. United States of America, *Ed. Technomic Publishing; Lancaster, USA* (1997) 320.
- Göpferich, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 42 (1996) 1-11.
- Hendriks, F. M., Baaijens, F. P. T., Bader, D. L., Oomens, C. W. J. Mechanical behaviour of human epidermal and dermal layers in vivo. *Technische Universiteit Eindhoven* (2005) 119.
- Hearle, J. W. S., Sparrow, E. The use of the Scanning Electron Microscope. *J. Appl. Cryst.* 7 (1974) 513-514.
- Hirano, S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International* 48 (8) (1999) 732-734.
- Homayoni, H., Hosseini, S., Valizadeh, M. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers* (2009) 656-661.
- Huang, L., Nagapudi, K., Apkarian, R. P., Chaikof, E. L. Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics. *J. Biomater. Sci. Polym* 12 (2001) 979-993.
- Hutmacher, D. W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives. *J. Biomat Sci-Polym E* 12 (2001) 107-124.
- James, F., Shackerford. Ciencia de materiales para ingenieros. 3a ed. *Prentice Hall* Hispanoamericana S.A. México (1995).
- Jiang, H. *et al.* Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning. *Biomacromolecules* 5 (2004) 326-333.
- Jiang, T., Deng, M., James, R., Nair, L., Laurencin, C. Review: Micro- and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering. *Acta Biomaterialia* (2013).
- Jose, M. V., Thomas, D.R., Dean, E. Nyairo. Fabrication and characterization of aligned nanofibrous PLGA/Collagen blends as bone tissue scaffolds. *Polymer* 50 (2009) 3778.
- Katime, I. Introducción a la ciencia de los materiales polímeros: Síntesis y Caracterización. *Argitalpen Zerbitzua* (2010).
- Kelleher, C. M., Vacanti, J. P. Engineering extracellular matrix through nanotechnology. *Interface* 7 (2010) 717-729.
- Khor, E., Yong, L. Implementable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24 (2003) 2339-2349.
- Khorshidi, S., Solouk, A., Mirzadeh, H., Mazinani, S., Lagaron, J.M., Sharifi, S., Ramakrishna, S. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. *J. Tissue Eng Regen Med.* (2015).
- Kown, I. K., Matsuda, T. Co-electrospun nanofiber fabrics of poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) with type I collagen or heparin. *Biomacromolecules* 6 (2005) 2096.
- Langer, R., Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* 260 (1993) 920-926.
- Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. *Principles of Tissue Engineering*. 4a ed. The United States of America: *Academic Press* (2014).
- Lee, C. H., Chang, S. H., Chen, W. J., Hung, K. C., Lin, Y. H., Liu, S. J., Hsieh, M. J., Pang, J. H., Juang, J. H. Augmentation of diabetic wound healing and enhancement of collagen content using nanofibrous glucophage-loaded collagen/PLGA scaffold membranes. *J. of Colloid and Interface Science* 439 (2015) 88-97.
- LeGeros, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 395 (2002) 81-98.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson., M. M. Cox. Principios de Bioquímica. 2da ed. Barcelona, España: *Omega* (1995).
- Lewis, D. D. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polyesters. En: Chasin M, Langer R, *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*. New York, *Marcel Dekker* (1990) 1-41.

- Li, M., Mondrinos, M. J., Chen, X., Gandhi, M. R., Ko, F. K., Lelkes, P. I. Co-electrospun poly(lactide-co-glycolide), gelatin, and elastin blends for tissue engineering scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* 79 (2006) 963–973
- Li, S., McCarthy, S. P. Influence of crystallinity and stereochemistry on the enzymatic degradation of poly(lactide)s. *Macromolecules* 32 (1999) 4454-56.
- Li, W., Cater son, E., Tuan, R., Ko, F. Electrospun Nanofibrous Structure, a Novel Scaffold for Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res*, 60 (2002) 613.
- Liu, Y., Lim, J. & Teoh, S. Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularized bone tissue engineering. *Biotechnology Advances* 31 (2013) 688–705
- Llorente, M., Horta, A. Técnicas de caracterización de Polímeros. 1a ed. *UNED Madrid* (1991) 378.
- Luu, Y. K., Kim, K., Hsiao, B. S., Chu, B., Hadjiargyrou, M. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *J. Control. Release* 89 (2003) 341–353
- Manschot, J. F. M. y Brakkee, A. J. M. The measurement and modelling of the mechanical properties of human skin in vivo II. *J. of Biomechanics* 19 (1986) 517-521.
- Minagawa, T., Okamura, Y., Shigemasa, Y., Minami, S., Okamoto, Y. Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydrate polymers* 67 (2007) 640-644.
- Mizuno, K., Yamamura, K., Yano, K., Osada, T., Saeki, S., Takimoto, N., Sakurai, T., Nimura, Y. Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice. *J. of Biomedical Materials Research. Part A* 64 (2003) 177–181.
- Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A., Yamamoto, H. Electrospinning of chitosan. *Macromol. Rapid Commun.* 25 (2004) 1600–1605.
- Pan, H., Jiang, H., Chen, W. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-coglycolide. *Biomaterials* 27 (2006) 3209–3220.
- Park, K., Kang, H., Lee, S., Min, B., Park, W. Biomimetic nanofibrous scaffolds: preparation and characterization of PGA/chitin blend nanofibers. *Biomacromolecules* 7 (2006) 635–643.
- Patrick, C. W., Mikos, A. G., McIntire, L. V. Prospects of tissue engineering. In: *frontiers in Tissue Engineering*. Patrick C W, Mikos A G, McIntire LV, eds. *Elsevier Science Ltd, Oxford* (1998) 3-11.
- Powell, H. M., Boyce, S. T. Engineered human skin fabricated using electrospun collagen-PCL blends: morphogenesis and mechanical properties. *Tissue Eng. Part A* 15 (2009) 2177–2187.
- Prashanth, H., Tharanathan, R. Chitin/Chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science and Technology* 18 (2007) 117-131.
- Rabea, E., Badawy, M., Stevens, C., Smagghe, G., Steurbaut, W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4(6) (2003) 1457-1465.
- Rabkin, E., Schoen, F. Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovascular Pathology* 11 (2002) 305-317.
- Ravivarapu, H. B., Burton, K., DeLuca, P. P. Polymer and microsphere blending to alter the release of a peptide from PLGA microspheres. *Eur J Pharm Biopharm* 50 (2000) 263-70.
- Riley, W. Mecánica de materiales. 1a reimpresión *Limusa* (2001) 708.
- Sell, S., Barnes, C., Smith, M., McClure, M., Madurantakam, P., Grant, J., McManus, M., Bowlin, G. Review Extracellular matrix regenerated: tissue engineering via electrospun biomimetic nanofibers. *Polymer International* 56 (1) (2007) 12.
- Shalak, R., Fox, C. F. Preface. In: *Tissue Engineering*. Shalak R, Fox CF, eds. Alan R. Liss, New York. (1988) 26-29.

- Shin, H.J., Lee, C. H., Cho, I. C. Electrospun PLGA nanofiber scaffolds for articular cartilage reconstruction: mechanical stability, degradation and cellular responses under mechanical stimulation in vitro. *J. Biomater. Sci. Polym.* 17 (2006) 103–119.
- Sionkowska, A., Wisniewski, M., Skopinska, J., Kennedy, C. J., Wess, T. J. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials* 25 (2004) 795–801.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill, Madrid (2002).
- Teo, W. E., Ramakrishna, S. A. Review on Electrospinning Design And Nanofiber Assemblies. *Nanotechnology* 17 (2006) 89.
- Tong, H. W., Zhang, X., Wang, M. A New Nanofiber Fabrication Technique Based on Coaxial Electrospinning. *Mater. Lett.* 66 (2012) 257.
- Torrent, J. Química de superficies, Tratamientos superficiales. Publicaciones de la EUOOT. *Terrasa* (1992).
- Torres, E., Marín, V., Aburto, J., Beltrán, H. I. Shirai, K., Villanueva, S., Sandoval, G. Enzymatic modification of chitosan with quercetin and its application as antioxidant edible films. *Applied Biochemistry and Microbiology* 48(2) (2012) 149-156.
- Visscher, G. E., Pearson, J. E., Fong, J. W., Argentieri, G. J., Robison, R. L., Maulding, H. V. Effect of particle size on the in vitro and in vivo degradation rates of poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J. Biomed Mater Res* 22 (1988) 733-46.
- Ward, P. A. Recruitment of inflammatory cells into lung: Roles of cytokines, adhesion molecules, and complement. *J. Lab Clin Med* 129 (1997) 400-04.
- Wilkes, G. L., Brown, I. A., Wildnauer, R. H. The biomechanical properties of skin. *CRC Crit Rev Bioeng* 1(4) (1973) 453-495.
- Wu, L., Li, H., Li, S., Li, X., Yuan, X., Li, X., Zhang, Y. Composite fibrous membranes of PLGA and chitosan prepared by electrospinning and coaxial electrospinning. *J. of Biomedical Materials Research Part A* (2008) 563-574.
- Ziats, N. P., Miller, K. M., Anderson, J. M. In vivo and in vitro interaction of cells with biomaterials. *Biomaterials* 9 (1988) 5-3.

ANEXO

ANEXO A

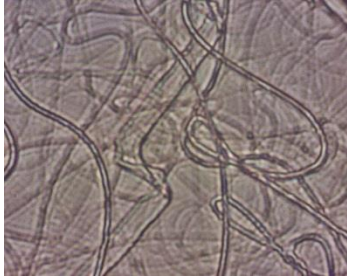
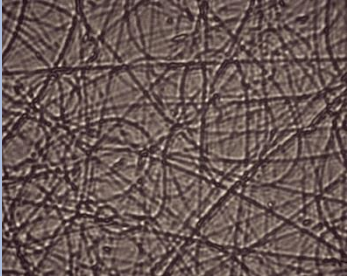
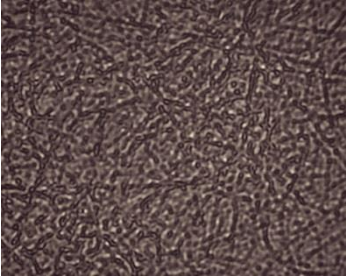
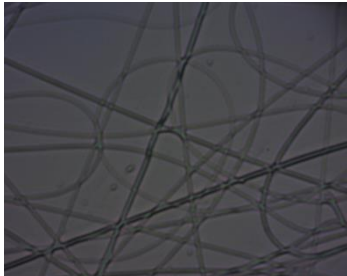
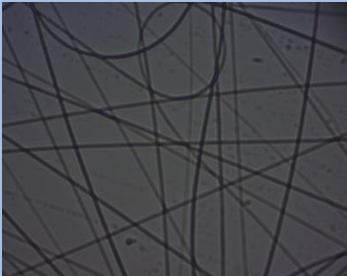
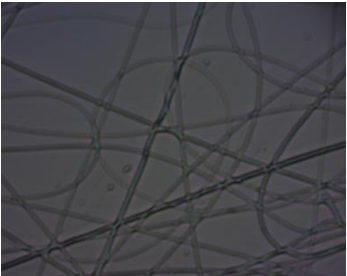
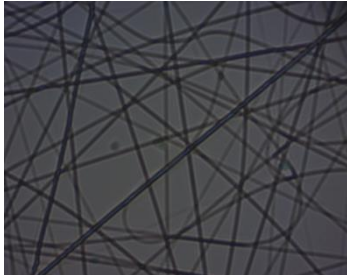


Efecto de la distancia

Condiciones: Solución de PLGA al 10% (p/v) en HFP.

Diferencia de potencial: 12kV

Temperatura: 23-25°C

%HR: 30-45

Velocidad de inyección:	Distancia aguja-colector		
	10 cm	15 cm	20 cm
0.05ml/h			
0.5ml/h			
0.25ml/h			

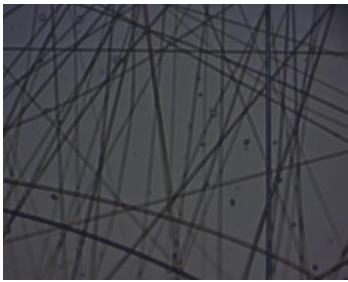
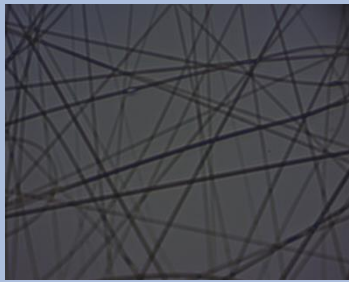
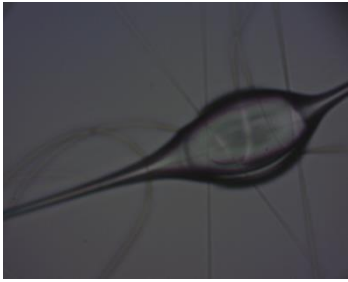
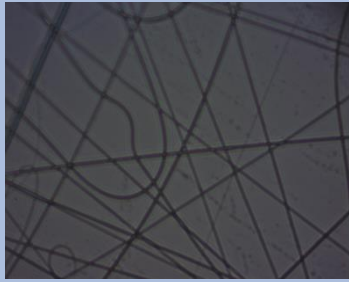
Efecto del voltaje

Condiciones: Solución de PLGA al 10% (p/v) en HFP.

Velocidad de inyección: 0.25ml/h

Temperatura: 23-25°C

%HR: 30-45

Distancia aguja- colector	Diferencia de potencial aplicado	
	8 kV	12 kV
10cm		
15cm		
20cm	