



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE ANDAMIOS 3D
NANOESTRUCTURADOS DE POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO), MODIFICADOS POR
RADIACIONES DE PLASMA PARA CRECIMIENTO DE
FIBROBLASTOS**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA
ADRIÁN CAMACHO LÓPEZ

CD. MX.

2021





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: CARLOS GUZMAN DE LAS CASAS

VOCAL: CARMINA MONTIEL PACHECO

SECRETARIO: MAYKEL GONZÁLEZ TORRES

1º SUPLENTE: YAMILETH YAZMIN MARTINEZ VEGA

2º SUPLENTE: GERARDO LEYVA GOMEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA

ASESOR DEL TEMA

DR. MAYKEL GONZÁLEZ TORRES

SUSTENTANTE

ADRIÁN CAMACHO LÓPEZ

AGRADECIMIENTOS

Emoción, felicidad, enojo, frustración, preocupación, temor, confusión y un gran número de emociones que no sé describir, es lo que todo tesista ha experimentado al realizar este tipo de trabajo. Por eso las personas que nos han favorecido académica, emocional y moralmente mientras terminábamos esta difícil tarea merecen un reconocimiento especial por todo su apoyo.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi madre, Rosa María López, por el amor, la pasión, el tiempo y la paciencia (sobre todo la paciencia) con la que me ha educado y enseñado desde mi primer día de vida. Gracias por todas las consultas académicas a lo largo de este trabajo, por enseñarme el arte de razonar, a pesar de no querer saber nada sobre filosofía de la ciencia, por enseñarme que en la vida profesional no se deben dejar cabos sueltos en un proyecto y que es fundamental tener todo bien digerido analizado y entendido pues solo así podemos cumplir nuestra misión como científicos. Gracias por enseñarme lo importante que es siempre remitirnos a nuestros valores cuando nos sentimos perdidos o en una situación complicada porque solo así estaremos haciendo lo correcto. Te amo y no alcanzarían las palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí y espero que estés muy orgullosa.

Quiero agradecer de igual forma a mi padre, Juan Luis Camacho, por todo su apoyo, su amor y su paciencia, espero que tú también estés orgulloso de la persona en la que me he convertido, así como de este logro. Agradezco

también la confianza y la oportunidad que me diste para poder madurar, he aprendido mucho viviendo solo.

Hago un agradecimiento especial a estas dos mujeres que después de mi madre son las más importantes en mi vida y quienes han dejado una gran huella en mí. Mis abuelas Josefa Flores y Eulalia Heredia, sé que ya no están para leer esto; y si pudiera tenerlas enfrente de mí una vez más quisiera que supieran lo mucho que las extraño. Espero traer honor a su memoria con cada uno de mis proyectos pues gracias a ustedes y a mis padres he aprendido lo importante que es luchar por los sueños y que siempre podemos crecer hacia un futuro mejor.

Agradezco a mi abuelo Juan Camacho por todo su amor y su apoyo, por enseñarme la importancia de la familia, por enseñarme como mis padres y mis abuelas que hay que trabajar duro por los sueños, aunque las circunstancias no sean favorables.

Doy un especial agradecimiento a mi hermano Andrés Camacho (te deseo mucho éxito en el camino de la Física, que no es nada fácil), a mis tíos Araceli, Carlos, Rubén, Carolina, Rocío, Miguel y Richard, a mis primas Rebecca, Adriana, Karla, Andrea y Ximena y a mi Madrina Griselda por todo su amor y apoyo.

También quiero agradecer a Vicente Parra por todo su apoyo incondicional y por motivarme a seguir escribiendo y procurar sacarme una sonrisa por muy harto y estresado que estuviera algunos días. Espero servirte de inspiración en tu camino a ser el gran abogado que estas destinado a ser.

Al Dr. Maykel González Torres le agradezco la oportunidad la paciencia y la confianza que me brindó para trabajar en este proyecto y guiarme en mi formación dentro de la ingeniería de tejidos y por enseñarme que a pesar de tener un doctorado hay que se humildes, estar abierto a nuevas ideas y recomendaciones de donde quiera que estas vengan, así como no dejarse intimidar y permanecer siempre en calma y dar contestaciones diplomáticas cuando la situación no es favorable.

A mis amigos Esmeralda Sánchez, Gustavo y Tatiana Camacho, Rocío Ramírez y Patricia Rodríguez y Rosa y Guadalupe Sánchez. Por tantos años de amistad y por estar ahí en las buenas en las malas y en las peores, por su apoyo, por todos los momentos, los consejos y las aventuras Gracias.

A esas personas tan importantes que conocí en la facultad que me han brindado su apoyo, su amistad, su tiempo, su sabiduría, las lágrimas, las risas y todo lo demás a lo largo de la carrera: Rebeca Martel, Blanca Corona, Jerónimo García, Iyara Luna, Angélica Figueroa, Brenda Cervantes, Vanessa Saavedra, Karen Lechuga, Fátima Orozco, Angélica Bautista, Mónica Montoya, Cecilia Ibarreche, Fanny Avilez, Vitoria Nito, al equipo Sus-teck: Juan Espino, Gabriela Santibáñez, Fernanda Prieto y Ernesto Ferat.

Agradezco a la Facultad de Química por permitirme formarme como un profesionista, especialmente agradezco a Rafael Herrera, Adela Castillejos, Jaime Noriega, Nayeli Balbiaux, Rolando Bernal, Yamileth Martínez, Alejandro Anaya, María de los Ángeles Olvera y María Elena Rodríguez.

Quiero expresar mi agradecimiento a todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología del Instituto Nacional de Rehabilitación LGII; al Dr. Yaaziel Melgarejo, responsable del laboratorio de Biotecnología; al Dr. Roberto Sánchez, al Dr. Alejandro Cabrera y a la Dra. Cristina Velasquillo. Agradezco el apoyo del director de investigación Dr. Javier Pérez Orive y al director general Dr. Clemente Ibarra.

Esta investigación fue apoyada por Cátedras de Conacyt 2019 (Conacyt-México) y el proyecto 75/15 por el INR LGII. También agradezco la asistencia del cirujano veterinario Hugo Lecona Butrón en cirugía veterinaria en ratones, al MSc. Lenin Tamay de Dios por su ayuda con imágenes de microscopio de epifluorescencia (invertido), y al Dr. Arturo Mendoza Nieto por su valiosa asistencia con las mediciones BET.

Si he olvidado mencionar algún nombre, te pido una disculpa de ante mano por mi mala memoria y agradezco mucho tu apoyo y el de todas las buenas personas que la vida ha puesto en mi camino y me han ayudado a mejorar. Espero que este trabajo contribuya positivamente a la sociedad mexicana y les traiga bien.

Desde el fondo de mi corazón. Gracias
Adrián Camacho López

A mis padres y a mi

Por tanta paciencia

A mis abuelitas Josefa, Eulalia y mi abuelito Juan

Por todo su amor y su legado

A mis hermanos
Prometo hacer cosas interesantes con mi vida

ÍNDICE

| | | |
|---------|---|----|
| 0 | Resumen | 2 |
| 1 | Antecedentes | 4 |
| 1.1 | Polímeros | 4 |
| 1.1.1.1 | Por su comportamiento con la temperatura | 4 |
| 1.1.1.2 | Por su estructura | 5 |
| 1.1.1.3 | Por su tipo de síntesis | 7 |
| 1.1.2 | Polihidroxialcanoatos [PHA] | 8 |
| 1.1.3 | Poli(3-hidroxitirato) [P(3HB)] | 9 |
| 1.1.4 | Materiales compuestos con P(3HB) | 12 |
| 1.1.5 | Poliéster-uretanos | 13 |
| 1.1.6 | Poli (N-ispropilacrilamida) [PNIPAAm] | 15 |
| 1.2 | Plasma | 16 |
| 1.2.1 | Polimerización por plasma | 17 |
| 1.3 | Biomateriales | 18 |
| 1.4 | Ingeniería de tejidos | 21 |
| 1.4.1.1 | Andamios | 22 |
| 1.4.1.2 | Células | 25 |
| 1.5 | Biocapas | 27 |
| 1.5.1 | Superficies antibacterianas | 29 |
| 1.5.2 | Recubrimientos antiadherentes y antibacterianos | 30 |
| 1.5.2.1 | Modificaciones químicas | 30 |
| 2 | Justificación | 32 |
| 3 | Planteamiento del problema | 34 |
| 4 | Hipótesis | 35 |
| 5 | Objetivos | 35 |
| 5.1 | Objetivo general | 35 |
| 5.2 | Objetivos particulares | 35 |
| 6 | Desarrollo experimental | 36 |
| 6.1 | Materiales | 36 |
| 6.2 | Metodología | 37 |
| 6.2.1 | Preparación de los andamios | 37 |
| 6.2.2 | Modificación superficial | 37 |
| 6.2.3.1 | Análisis por espectroscopia FTIR | 39 |
| 6.2.3.3 | Microscopía de fuerza atómica | 39 |

| | | |
|---------|---|-----------|
| 6.2.3.4 | Análisis por goniometría | 39 |
| 6.2.3.5 | Análisis de porosidad | 40 |
| 6.2.3.6 | Estudio de citotoxicidad | 40 |
| 6.2.3.7 | Estudio de viabilidad celular | 41 |
| 6.2.3.8 | Estudio de biocompatibilidad | 42 |
| 7 | Resultados y análisis de resultados | 44 |
| 7.1 | Caracterización fisicoquímica | 48 |
| 7.1.1 | Espectroscopia de infrarrojo | 48 |
| 7.1.2 | Estudio de microscopía sem | 53 |
| 7.1.3 | Estudio de microscopía afm | 55 |
| 7.1.4 | Porcentaje de nipaam injertado | 56 |
| 7.1.5 | Goniometría | 58 |
| 7.1.6 | Estudio de porosidad bet | 60 |
| 7.2 | Caracterización biológica | 63 |
| 7.2.1 | Estudio <i>in vitro</i> (citotoxicidad) | 63 |
| 7.2.2 | Estudio de biocompatibilidad <i>in vivo</i> | 67 |
| 8 | Conclusiones | 69 |
| 9 | Perspectivas | 71 |
| 10 | Anexo I | 73 |
| 10.1 | Microscopía electrónica de barrido | 73 |
| 10.2 | Microscopía de fuerza atómica | 74 |
| 10.3 | Funcionamiento del afm | 75 |
| 10.4 | Espectroscopia FTIR | 77 |
| 10.5 | Método de owens-wendt | 78 |
| 10.6 | Goniometría | 80 |
| 10.7 | Isoterma de BET | 80 |
| 10.8 | Técnica histológica | 81 |
| 11 | Anexo II Hojas de Seguridad | 84 |
| 12. | Referencias Bibliográficas | 91 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. ESTRUCTURAS QUE PUEDEN ADOPTAR LOS POLÍMEROS | 6 |
| FIGURA 2. REACCIÓN DE CONDENSACIÓN. | 7 |
| FIGURA 3. ESTRUCTURA GENERAL DE LOS PHA. | 9 |
| FIGURA 4. ESTRUCTURA DEL ÁCIDO HIDROXIBUTÍRICO Y DEL [P(3HB)] | 11 |
| FIGURA 5. PRINCIPALES FACTORES DE LA INGENIERÍA DE TEJIDOS. | 22 |
| FIGURA 6. FACTORES QUE AFECTAN A LOS ANDAMIOS. | 23 |
| FIGURA 7. ESQUEMA DE FORMACIÓN DE UNA BIOCAPA. | 28 |
| FIGURA 8. DIMENSIONES Y GEOMETRÍA DE LOS ANDAMIOS. | 37 |
| FIGURA 9. GENERADOR DE PLASMA DE ARGÓN. | 38 |
| FIGURA 10. MECANISMO DE REACCIÓN PROPUESTO PARA LA SÍNTESIS DE LOS ANDAMIOS. | 46 |
| FIGURA 11. SITIOS DONDE ES POSIBLE INJERTAR [PNIPAAM]..... | 47 |
| FIGURA 12. ESTRUCTURA DEL COMPUESTO PU/P(3HB) INJERTADO. | 48 |
| FIGURA 13. ESPECTROS INFRARROJOS DE LAS MUESTRAS | 49 |
| FIGURA 14. ESPECTRO INFRARROJO PARA EL (NIPAAM) | 50 |
| FIGURA 15. ESPECTRO INFRARROJO PARA LA MUESTRA NPO | 51 |
| FIGURA 16. MICROGRAFÍAS SEM DE LAS MUESTRAS NPO A NP4. | 54 |
| FIGURA 17. MICROGRAFÍA SEM DEL TRABAJO DE GONZÁLEZ ET AL. | 54 |
| FIGURA 18. IMÁGENES AFM DE LAS MUESTRAS NPO A NP4..... | 55 |
| FIGURA 19. GRÁFICA DE GRADO DE INJERTO PARA CADA MUESTRA | 56 |
| FIGURA 20. ESTUDIO DE GONIOMETRÍA. | 58 |
| FIGURA 21. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN | 60 |
| FIGURA 22. DISTRIBUCIONES DE TAMAÑO DE PORO DE LOS ANDAMIOS. ... | 61 |
| FIGURA 23. MICROGRAFÍAS DE FLUORESCENCIA..... | 63 |
| FIGURA 24. GRÁFICA DEL ENSAYO DE MTT | 64 |
| FIGURA 25. ANÁLISIS DE VIABILIDAD CELULAR. | 65 |
| FIGURA 26. GRÁFICA DEL NÚMERO DE HDF POR CAMPO MICROSCÓPICO. . | 66 |
| FIGURA 27. TINCIÓN HISTOLÓGICA DE LAS MUESTRAS NPO Y NP1. | 67 |
| FIGURA 28. MICROSCOPIO DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM). | 74 |
| FIGURA 29. COMPONENTES DE LAS FUERZAS EN UNA GOTA SOBRE UNA SUPERFICIE..... | 78 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| TABLA 1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL TRATAMIENTO POR PLASMA. | 18 |
| TABLA 2. PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE SUPERFICIES ANTIADHERENTES Y BACTERICIDAS. | 30 |
| TABLA 3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE GONIOMETRÍA. | 59 |
| TABLA 4. RESULTADOS DEL ESTUDIO BET. | 61 |
| TABLA 5. CARACTERÍSTICAS, VENTAJAS Y DESVENTAJAS SOBRE EL AFM. | 75 |
| TABLA 6. VENTAJAS Y DESVENTAJAS SOBRE LA ESPECTROSCOPIA FTIR. | 77 |
| TABLA 7. CONDENSADO DE LA HOJA DE SEGURIDAD PARA EL P(3HB). | 84 |
| TABLA 8. CONDENSADO DE LA HOJA DE SEGURIDAD PARA EL NIPAAM. | 85 |
| TABLA 9. CONDENSADO DE LA HOJA DE SEGURIDAD PARA EL ACETATO DE SODIO. | 86 |
| TABLA 10. CONDENSADO DE LA HOJA DE SEGURIDAD PARA EL TRÍMERO DE HDMI. | 87 |
| TABLA 11. CONDENSADO DE LA HOJA DE SEGURIDAD PARA LAS NANOPARTÍCULAS DE SILICE. | 88 |
| TABLA 12. CONDENSADO DE LA HOJA DE SEGURIDAD PARA EL METANOL. | 89 |
| TABLA 13. CONDENSADO PARA LA HOJA DE SEGURIDAD DE LA RESINA HIDROXILADA. | 90 |

Glosario

Adsorción: Un aumento en la concentración de una sustancia disuelta en la interfaz de una fase condensada y una líquida debido al funcionamiento de las fuerzas superficiales.

Aloinjerto: Tejido que se trasplanta de una persona a otra.

Autoinjerto: Injerto realizado en una persona con tejidos de su propio organismo.

Biocompatible: Es la capacidad de un material para actuar con una respuesta adecuada del medio biológico en el cual son utilizados (un ser humano u otro ser vivo).

Biodegradable: Descomposición de una sustancia catalizada por enzimas in vitro o in vivo.

Citotóxico: Sustancias que son tóxicas para las células.

Desorción: Lo contrario de la adsorción, es decir, la disminución en la cantidad de sustancia adsorbida.

Exógeno: Que se forma o nace en el exterior de otro.

Hidrofílico: La capacidad de una entidad molecular o de un sustituyente para interactuar con disolventes polares, en particular con agua, o con otros grupos polares.

Hidrofóbico: La tendencia de los hidrocarburos (o de los grupos lipófilos similares a los hidrocarburos en los solutos) a formar agregados intermoleculares en un medio acuoso e interacciones intramoleculares análogas.

Histéresis: La histéresis de adsorción ocurre cuando los valores de adsorción y desorción se desvían entre sí.

Matriz Extracelular: Conjunto de materiales extracelulares que forman parte de un tejido. La MEC es un medio de integración fisiológico, de naturaleza bioquímica compleja, en el que están "inmersas" las células. Así la MEC es la sustancia del medio intersticial (intercelular).

Monómero: Molécula que puede someterse a polimerización, contribuyendo así con unidades constitucionales a la estructura esencial de una macromolécula.

Nanoestructurado: material que tiene propiedades únicas o nuevas, debido a la estructuración a escala nanométrica. Estos se forman mediante la incorporación o la estructuración del nanomaterial.

Poro: Huecos de aire que pueden encontrarse en un material.

Xenogénico: Que procede de un individuo de distinta especie.

Xenoinjerto: Trasplante de un órgano, un tejido o células a un individuo de otra especie.

INDICE DE ABREVIATURAS

AFM: Microscopía de fuerza atómica
DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco
D_p: Diámetro de poro
Da: Dalton [1 Da = 1 g/mol]
EthD-1: Homodimero de etidio-1
FDH: Fibroblastos dérmicos humanos
FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
LCST: Temperatura inferior de solubilidad
mf: masa del andamio después del tratamiento con plasma
mi: masa del andamio antes del tratamiento
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NIPAAm: N-isopropilacrilamida
P: Porcentaje de porosidad
P(3HB): Poli-3-hidroxi butirato
PA: Polialcohol
PBS: Disolución buffer de fosfatos
PHA: Polihidroxi alcanoatos
PNIPAAm: Poli-N-isopropilacrilamida
PU-P(3HB): Agregado poli- (éster uretano)
RMS: Rugosidad media de la superficial
R_p: Radio promedio de la sección transversal de adsorción
S_{BET}: Es el área superficial
SEM: Microscopia electrónica de barrido
TMHDI: Trímero de hexametildiisocianato
V_p: Volumen de macroporo
V_μ: Volumen de microporo
γ_{LG} : Tensión superficial líquido/gas
γ_{SG} : Tensión superficial sólido/gas
γ_{SL} : Tensión superficial sólido/líquido
π_e : Presión de equilibrio
θ : Ángulo formado entre la gota y la superficie



Plasma-induced customizable poly(ester-urethane) surface for cell culture platforms

Maykel González-Torres^{a,*}, Cristina Velasquillo^a, Adrián Camacho-López^b, Margarita Rivera^c, Roberto Sánchez-Sánchez^d, Gerardo Leyva-Gómez^b, Yaaziel Melgarejo-Ramírez^a, Clemente Ibarra^d, Susana Vargas-Muñoz^e, Rogelio Rodríguez Talavera^e, Enrique Lima^f, José González-Valdez^{g,*}

^a Conacyt-Laboratorio de Biotecnología, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Ciudad de México, 14389, Mexico

^b Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, Mexico

^c Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, Mexico

^d Unidad de Ingeniería de Tejidos Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Ciudad de México, 14389, Mexico

^e Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, 76230, Mexico

^f Laboratorio de Fisicoquímica y Reactividad de Superficies (LaFRoS), Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, Mexico

^g Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey, 64849, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Tissue engineering
Scaffolds
Plasma
Cytotoxicity
Surface properties
Chemical synthesis

ABSTRACT

This work aims to study the bio-interfacial properties of poly(ester-urethane) composite scaffolds based on poly(3-hydroxybutyrate) [PHB] and modified by surface plasma-radiation-induced graft polymerization of N-isopropylacrylamide (NIPAAm). The delivering power of the Argon radio-frequency plasma was increased from 5–20 W. The yields over the polyurethane surface, grafting density, topographical dimensions, architecture, surface energy, and wettability were surveyed in the established plasma regimes. Successful grafting of NIPAAm was verified by Fourier-transform infrared spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy analysis. Characterization using atomic force microscopy revealed that the surface of the scaffolds is more uniform in lower plasma delivering powers. The results show a high grafting density surface with a low degree of grafting (3–9 %). The contact angles decreased, and the surface energy rose with increasing delivering power. The surface area, total pore volumes are similar between the samples. The porosity percentage and the average pore diameter hinted at a decrease in the treated composite as compared to the pristine scaffold. Although all the composites showed to be non-toxic and highly viable (>90 %) for human dermal fibroblasts, the results showed better attachment, spreading, and growth of fibroblasts on scaffolds with moderate hydrophilicity (5 W). The *in vivo* experiments revealed that the plasma-treated scaffolds diminished the inflammatory infiltrate, which means an improved acceptance as compared with untreated PHB polyurethane.

1. Introduction

Special attention has been paid to the development of bacterial biopolymers [polyhydroxyalkanoates (PHA)] in recent decades [1]. These green and natural polyesters are produced by a large number of microorganisms [2]. Genetic engineering tools have been used to upgrade bacterial species' performance to enhance commercial polymers' production process [3]. Poly(3-hydroxybutyrate) [PHB] is the most

studied PHA so far [4]. The biodegradability, thermoplasticity, non-toxicity, and biocompatibility of PHB are potential benefits for regenerative medicine [5]. The high degree of crystallinity, the narrow window of processability, the toughness, and the thermoplastic hydrophobicity are drawbacks that can be improved by chemical modification of the macromolecule [6]. PHB has become a considerable driving force for extensive studies on preparing environmentally friendly materials for wound dressings and tissue engineering scaffolds [7]. Short

* Corresponding authors.

E-mail addresses: maykel.gonzales@conacyt.mx (M. González-Torres), jose.gonzales@tec.mx (J. González-Valdez).

<https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101891>

Received 15 July 2020; Received in revised form 6 November 2020; Accepted 16 November 2020

Available online 19 November 2020

2352-4928/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

0 Resumen

Las propiedades bio-interfaciales de los andamios compuestos de poli (éster-uretano) basados en poli (3-hidroxitbutirato) [P(3HB)] se modificaron mediante la polimerización de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) inducida por radiación de plasma de superficie. El poder de suministro del plasma de radiofrecuencia de Argón se incrementó de 5-20 W. El porcentaje de injerto sobre la superficie de poliuretano, las dimensiones topográficas, la arquitectura, la energía superficial y la humectabilidad se examinaron conforme a las variaciones en potencia del plasma. El injerto exitoso de NIPAAm se verificó mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. La caracterización por microscopía de fuerza atómica reveló que la superficie de los andamios es más uniforme a potencias de plasma más bajas. Los ángulos de contacto disminuyeron y la energía de la superficie aumentó con la potencia del plasma. El área de la superficie, los volúmenes totales de poros son similares entre las muestras. El porcentaje de porosidad y el diámetro de poro promedio indican una disminución en el material compuesto tratado, en comparación con el andamio sin tratamiento. Aunque todos los compuestos mostraron ser no tóxicos y altamente viables (>98%) para los fibroblastos dérmicos humanos, los resultados mostraron una mejor fijación, diseminación y crecimiento de los fibroblastos en andamios con hidrofilia moderada (5W). Los experimentos *in vivo* revelaron que los andamios tratados con plasma disminuyeron el infiltrado inflamatorio, lo que significa una aceptación mejorada en comparación con el poliuretano P(3HB) no tratado.

Abstract

The bio-interfacial properties of poly(ester-urethane) composite scaffolds based on poly (3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] were modified by surface plasma-radiation-induced graft polymerization of N-isopropylacrylamide (NIPAAm). The delivering power of the Argon radio-frequency plasma was increased from 5-20 W. The yields over the polyurethane surface, topographical dimensions, architecture, surface energy, and wettability were surveyed in the established plasma regimes. Successful grafting of NIPAAm was verified by Fourier-transform infrared spectroscopy. Characterization using atomic force microscopy revealed that the surface of the scaffolds is more uniform in lower plasma delivering powers. The yields were found to be small (3-9 %). The contact angles decreased, and the surface energy rose with increasing delivering power. The surface area, total pore volumes are similar between the samples. The porosity percentage and the average pore diameter hinted at a decrease in the treated composite as compared to the pristine scaffold. Although all the composites showed to be non-toxic and highly viable (>98%) for human dermal fibroblasts, the results showed better attachment, spreading, and growth of fibroblasts on scaffolds with moderate hydrophilicity (5W). The *in vivo* experiments revealed that the plasma-treated scaffolds diminished the inflammatory infiltrate, which means an improved acceptance as compared with untreated P(3HB) polyurethane.

1 Antecedentes

1.1 Polímeros

Para poder profundizar sobre los biopolímeros, más específicamente sobre el poli (3-hidroxitirato) [P(3HB)], y la poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAAm), es necesario conocer previamente el concepto de polímero, el cual fue introducido por el químico sueco J. J. Berzelius en los años 20's¹. La palabra polímero viene de las raíces griegas πολυς "mucho" y μέρος "parte" o "segmento", dicho de otra forma, un polímero es una molécula de cadena larga, que se compone de un gran número de unidades repetitivas de estructura idéntica².

Los polímeros se encuentran en nuestra vida cotidiana, ya sean como materiales sintéticos, plásticos, fibras en nuestra ropa, teléfonos, o en forma de empaques. Por otro lado, también existen polímeros biológicos como el ADN, las proteínas o los polisacáridos que forman las paredes celulares de todos los seres vivos.

1.1.1 Clasificación

Debido a la gran presencia y aplicación de los polímeros es necesario clasificarlos, ya sea por su estructura química, su reacción a la temperatura o por los procesos por los cuales son producidos, tal como se muestra a continuación.

1.1.1.1 Por su comportamiento con la temperatura

Esta clasificación fue la primera en utilizarse, incluso antes de conocer su estructura molecular y fue puramente fenomenológica, basada en su comportamiento al calentamiento y enfriamiento³, los polímeros se clasifican como termoplásticos y termofijos.

1.1.1.1.1 Termoplásticos

Son aquellos polímeros que al ser calentados se vuelven suaves y debido a un esfuerzo son capaces de fluir. Los residuos de estos plásticos pueden recuperarse y ser moldeados nuevamente al aplicar calor y presión², en el grupo de los termoplásticos podemos agrupar al poliestireno, polipropileno, PVC y polietileno.

1.1.1.1.2 Termofijos

Son aquellos que no pueden ser térmicamente procesados después de que sus moléculas forman redes de enlaces covalentes entre ellas (a esto se le conoce como entrecruzamiento)³ por lo que solo resisten fluir bajo estrés una sola vez, el calentamiento posterior al entrecruzado termina por conducir al material a su degradación³. Como ejemplo de este tipo de polímeros tenemos las resinas epóxicas y poliésteres insaturados.

1.1.1.2 Por su estructura

También es posible diferenciar a los polímeros de acuerdo con su estructura molecular en lineales, ramificados o entrecruzados (Figura 1).

1.1.1.2.1 Lineales

Son aquellos que se componen estrictamente por monómeros bifuncionales (esto quiere decir que cada monómero posee dos enlaces activos o capaces de polimerizar)³. A pesar de que se llamen lineales, esto no quiere decir que el polímero asuma la forma geométrica de una línea recta³, como analogía podemos decir que estas macromoléculas adoptan la forma de un plato de espagueti o un ovillo de estambre³.

1.1.1.2.2 Ramificados

Se forman cuando los monómeros de los que están compuestos presentan una funcionalidad igual o mayor que tres, lo que dará como resultado ramificaciones a lo largo de la molécula³.

1.1.1.2.3 Entrecruzados (Crosslinked)

El entrecruzamiento ocurre conforme aumenta el tamaño y frecuencia de las ramificaciones en las cadenas de polímero y la probabilidad de que dos partes de la misma o diferente cadena se unan aumenta, esto da como resultado una red donde las cadenas están unidas entre sí por medio de enlaces covalentes³. Como resultado de esto se obtiene un polímero tridimensional entrecruzado y cuya masa corresponde a una única y enorme molécula³.

El polímero entrecruzado puede formarse de dos maneras:

- Al hacer reaccionar especies con funcionalidad igual o mayor a tres
- Al hacer reaccionar químicamente moléculas lineales o ramificadas que ya están formadas³.



Figura 1. Estructuras tridimensionales que pueden adoptar los polímeros

1.1.1.3 Por su tipo de síntesis

En 1929, Carothers clasificó a los polímeros sintéticos acuerdo con el método de obtención, en polímeros de condensación y polímeros de adición⁴.

1.1.1.3.1 Polimerización por condensación

Estos polímeros se forman por reacciones orgánicas de condensación, en las cuales se elimina una molécula pequeña, generalmente agua, para dar origen al producto³. Por ejemplo, al reaccionar un ácido orgánico con un alcohol se forma un éster tal como se muestra en la Figura 2.

Dentro de este grupo se encuentran los poliésteres, poliamidas (Nylons), poliimidas y policarbonatos.

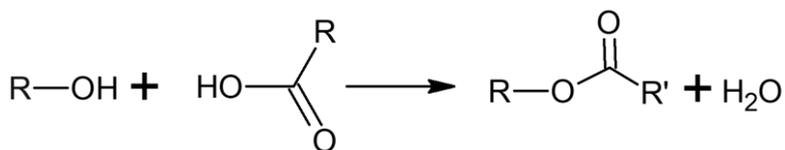


Figura 2. Reacción de condensación entre un alcohol y un ácido para formar un poliéster.

1.1.1.3.2 Polimerización por adición

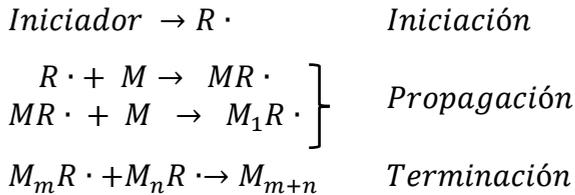
Este tipo de polimerización tiene dos características principales³:

1. En este tipo de polimerización no se obtiene ningún condensado, por lo que la unidad repetida, tiene la misma fórmula condensada que el monómero.
2. La reacción de polimerización involucra la apertura de un doble enlace.

Existen varias maneras de llevar a cabo una polimerización vía radicales libres, por ejemplo: polimerización por

precipitación, en solución, en emulsión, en suspensión entre otros.

El esquema general para una reacción de polimerización por radicales libres puede expresarse de la siguiente manera⁴:



Donde M representa el monómero y $R \cdot$ un radical libre, un anión o un catión producido en la etapa inicial.

Para este tipo de polímeros, la mayoría de los iniciadores son peróxidos y compuestos azo alifáticos como por ejemplo el persulfato de potasio ⁴.

1.1.2 Polihidroxicanoatos [PHA]

Los polihidroxicanoatos, son un grupo prometedor de poliésteres biodegradables y con buena biocompatibilidad⁵, al cual pertenece el P(3HB), que es el primer miembro de esta familia. Estos polímeros han llamado mucho la atención en los últimos años, ya que son producidos por vía biotecnológica, a partir de sustratos renovables por una gran cantidad de microorganismos⁶, tales como: *Zoogloea ramigera*, *Ralstonia eutrophas*, *Methylobacterium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas acidophilia*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* y *Azotobacter vinelandii*⁷⁻⁹. También se ha reportado que los PHA pueden ser producidos por plantas transgénicas tales como *Arabidopsis thaliana*, *Gossypium*

hirsutum (algodón), y *Zea mays* (maíz)⁹. Por otro lado, los PHA tienen la ventaja de ser degradados por una gran cantidad de microorganismos aerobios y anaerobios tales como hongos y bacterias⁹.

Por medio de la ingeniería genética y metabólica, así como el control de las condiciones de cultivo y el sustrato nutritivo, se han logrado detectar alrededor de 100 ácidos hidroxialcanoicos como constituyentes monoméricos de los PHA biosintéticos^{8,10}. Sin embargo actualmente solo dos PHA están comercialmente disponibles: el P(3HB) y el poli(hidroxibutirato-co-valerato) (P(3HB)-co-3HV)⁸.

En general los PHA presentan una gran versatilidad en sus aplicaciones, ya que dependiendo de los requerimientos de las diferentes aplicaciones, pueden ser mezclados, modificados superficialmente o combinados con otros polímeros, enzimas y hasta con materiales inorgánicos¹¹ como la hidroxiapatita, esto con el fin de modificar o mejorar sus propiedades mecánicas y su biocompatibilidad⁵.

La estructura química general de estos biopolímeros se representa en la Figura 3.

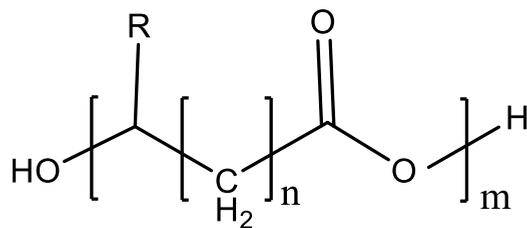


Figura 3. Estructura general de los polihidroxialcanoatos.

1.1.3 Poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)]

Este biopolímero es uno de los principales componentes de los andamios que se presentan en esta tesis y fue

descubierto en 1926 por Lemoigne, es el miembro más simple y común de la familia de los polihidroxicanoatos^{9,10}, así como el más estudiado¹². Algunas de las aplicaciones del P(3HB) son las siguientes: aditivos para comida

Este biopolímero se ha utilizado para la fabricación de materiales debido a su disponibilidad comercial y sus propiedades químicas y mecánicas¹⁰, las cuales son similares a las del polipropileno y polietileno. Sin embargo, el P(3HB) tiene mayor grado de cristalinidad (cadenas poliméricas dispuestas de modo perfectamente ordenado) así como una mayor rapidez de cristalización, lo que lo hace frágil y con un punto de elongación bajo⁹. El P(3HB) como homopolímero también presenta alta hidrofobicidad (lo que impide la adhesión y el crecimiento celular en los dispositivos hechos con éste, material¹¹), biodegradabilidad a largo plazo y baja plasticidad es por esto que en algunos casos limita su aplicación como material para bioingeniería¹¹. Sin embargo, ya que este biopolímero es capaz de formar materiales compuestos con una variedad de polímeros sintéticos y materiales inorgánicos¹¹, es posible mejorar las propiedades de P(3HB) por medio del desarrollo de mezclas con materiales hidrofílicos o de la síntesis de copolímeros¹¹ de los cuales hablaremos posteriormente.

Este termoplástico ha sido muy investigado en gran medida debido a que ha demostrado en numerosos ensayos *in vitro* que es compatible con numerosas líneas celulares, tales como la osteoblástica y la epitelial^{18,19}.

El P(3HB) es un biopolímero presente tanto en el citoplasma y fluidos internos, como en membranas y lipoproteínas tanto en bacterias como en organismos eucariontes y pluricelulares^{10,17} y de acuerdo con el trabajo

de Rossetta N. Reusch está involucrado en funciones fisiológicas importantes, tales como almacenamiento y canal para el calcio, bomba de calcio-fosfato y canal para el ADN¹⁷. El P(3HB) no se encuentra puro en los organismos vivos, sino que forma complejos con otras moléculas. Estos complejos se dividen en dos categorías¹⁸:

1. Complejos con lípidos o proteínas, tales como la albúmina, por medio de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.
2. Complejos con sales de aniones poliméricos por medio de enlaces de coordinación con grupos catiónicos, tales como el complejo PHB-Ca²⁺-Pirofosfato.

Por otro lado se sabe que existen cantidades de P(3HB) de bajo peso molecular (130-170 unidades ^{18,19}) en la sangre humana el cual se descompone en ácido 3-hidroxi-butírico¹⁰(Figura 4), lo que proporciona evidencia adicional de una alta biocompatibilidad y no toxicidad de éste material^{5,10}. Esto es una de las características más importantes por las cuales el P(3HB) es un candidato excepcional para aplicaciones en ingeniería de tejidos, ya que es probable que los productos de degradación no sean tóxicos, pues están presentes en el cuerpo humano.

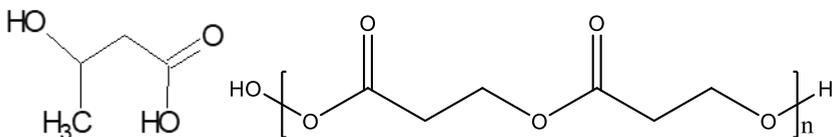


Figura 4. Estructura química del ácido hidroxibutírico (izquierda) y del poli (3- hidroxi-butirato) [P(3HB)] (derecha).

1.1.4 Materiales compuestos con P(3HB)

Los polímeros pueden procesarse de tal manera para lograr estructuras y formas complejas que con frecuencia son demasiado flexibles y endebles para cumplir con las necesidades mecánicas en el ambiente fisiológico¹⁰. Estas son algunas de las razones para la combinación de polímeros biodegradables con vidrios o cerámicas bioactivos¹⁰. Mucha de la investigación actual en este campo se enfoca en el desarrollo de materiales bioactivos compuestos y biodegradables, que sean tanto densos como porosos y que incorporen una fase inorgánica bioactiva ya sea como parte del seno del material, como recubrimiento o ambos a una matriz biodegradable de polímero¹⁰.

Los materiales compuestos resultan de incluir una fase inorgánica como la hidroxiapatita o vidrios bioactivos, en forma de partículas o fibras a un polímero biodegradable. Los vidrios bioactivos son un grupo de materiales de silicato o fosfato, tales como el 45S5Bioglass, los cuales tienen una variedad de aplicaciones en la medicina y odontología como andamios para ingeniería de tejidos óseos¹⁰. Esto se debe principalmente a la mejora en las propiedades físicas, mecánicas, biológicas y en especial a la capacidad para controlar su estructura y tiempos de degradación específicos de acuerdo con el sitio de implante¹⁰.

Dentro de los numerosos estudios que se han hecho, se ha demostrado que ciertos tipos de vidrios como el 45S5Bioglass contribuyen en procesos fisiológicos importantes, en el caso específico del 45S5Bioglass, este vidrio promueve la diferenciación osteoblástica permitiendo la regeneración del hueso. Es por esto que en las

aplicaciones donde se requiere una alta bioactividad del material, los vidrios bioactivos son una excelente alternativa en comparación con la hidroxiapatita para el desarrollo de andamios^{10,20}.

1.1.5 Poliéster-Uretanos

Los poliuretanos son un grupo grande y muy diverso de polímeros, el cual incluye elastómeros, materiales termoplásticos, espumas e ionómeros²¹, los cuales gracias a su versatilidad tienen una gran aplicación en diferentes industrias tales como la automotriz, textil, constructora, entre otras. La carrera de los poliuretanos en la medicina comenzó en los años 60's cuando los implantes para senos fueron patentados por primera vez. Y a partir de ahí han sido muy utilizados debido a sus propiedades biocompatibles, bio-estáticas y biodegradables²¹.

Uno de los usos más importantes de los poliuretanos en medicina es la preparación de implantes para enfermedades cardiovasculares, para los cuales las propiedades específicas de los poliuretanos (alta resistencia mecánica, dureza y flexibilidad sin la adición de modificadores, y buena hemo-compatibilidad; resultante del equilibrio hidrofílico-hidrofóbico en la superficie) son muy importantes²¹.

Sin embargo, para poder producir poliuretanos biodegradables, es necesario el uso de monómeros que sean susceptibles a factores ambientales tales como PCL²²⁻²⁵, PHA²⁶⁻³⁴, PBS³⁵, PLLA²², PLGA³⁵, entre otros, los cuales contienen grupos éster y junto con polioles como el PEG son sensibles a la hidrólisis y son introducidos en la estructura del poliuretano para construir segmentos llamados blandos (siendo las partes de los isocianatos los segmentos duros)²¹.

Al momento de degradarse los poliéster-uretanos pueden sufrir una escisión de la cadena en dos puntos: el enlace de uretano y el enlace de éster. Se ha señalado que el enlace éster es el sitio primario de hidrólisis en los poliéster-uretanos²⁶. También se sabe que el proceso de degradación de un polímero implica tres fases básicas³⁶:

1. Incubación: en esta etapa no hay cambios en el peso ni en la masa molecular, en este intervalo de tiempo se da la penetración de agua hacia la matriz del polímero.
2. Inducción: en este momento hay una disminución en el peso molecular y un rápido aumento en el grado de hidratación.
3. Erosión: comienza la erosión del polímero (pérdida de peso) y puede haber cambios en la tasa de escisión de la cadena.

Aunque este mecanismo no siempre se da así, pues recientemente se ha informado que los constructos de poliésteres biodegradables grandes se degradan mediante un mecanismo heterogéneo es decir, la degradación se produce más rápidamente en el centro que en la superficie³⁶. Esto se atribuye a la acción autocatalítica de los grupos terminales de ácido carboxílico pertenecientes a los productos de degradación que están atrapados en la matriz³⁶.

Por otro lado a pesar de las dificultades que se tienen para estudiar la degradación del P(3HB) debido a su gran estabilidad en condiciones fisiológicas, en el trabajo de X. Loh et al.²⁶ reportaron que el segmento blando formado por P(3HB) con un Mn = 1760 y PEG con Mn = 2000, 3400, 4600 y 8000 fueron degradados en ácido 3-hidroxi-butírico, ácido crotonico y tetrámeros de PEG

después de 14 semanas. Otros trabajos como el de Xue et al.³⁰ han demostrado que es posible controlar el grado de hidrólisis del poliéster-uretano, así como sus propiedades mecánicas al variar las cantidades de P(3HB) y PEG .

Una ventaja adicional de estos materiales es que se pueden obtener diversas morfologías de acuerdo con el método que se utilice para su obtención, por ejemplo Kiziltay et al²⁵.obtuvieron una estructura altamente porosa y nanoestructurada por lixiviación de sal y una especie de red ordenada por medio de la impresión 3D de policaprolactona. Por otro lado, Liu et al.²⁷ obtuvieron andamios nano fibrosos utilizando la técnica de electro hilado.

Gracias a que estos materiales ofrecen una serie de ventajas, no solo en los métodos de obtención sino también en sus propiedades biodegradables, mecánicas y biocompatibles, se decidió estudiar este nuevo poliéster-uretano de P(3HB) como un posible candidato para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

1.1.6 Poli (N- ispropilacrilamida) [PNIPAAm]

Es uno de los polímeros termosensibles más estudiados,³⁷⁻⁴⁰ debido a que posee propiedades de desprendimiento bacteriano, esto sucede porque las bacterias requieren superficies hidrofílicas para poder adherirse. Sin embargo cuando la temperatura está por arriba de los valores del LCST ^{37,41}, el PNIPAAm, sufre una transición de fase ya que se rompen los puentes de hidrógeno con el agua, volviéndose hidrofóbico y evitando con esto la adhesión bacteriana. La temperatura de transición en copolímeros de PNIPAAm puede ser fácilmente controlada variando la proporción de los monómeros que lo componen⁴².

1.2 Plasma

Debido a que la modificación superficial de los andamios con el PNIPAAm se hará por medio de polimerización por plasma, es necesario conocer un poco sobre este estado de la materia antes de hablar sobre la técnica de modificación de superficies.

El plasma se define como el cuarto estado de la materia en la secuencia: sólido, líquido, gas y plasma y se forma generalmente cuando átomos gaseosos son sometidos a altas condiciones de energía térmica o eléctrica⁴³ lo que da como resultado una mezcla de especies neutras, iones (positivos y negativos), especies excitadas y fotones⁴⁴.

Existen dos tipos de plasma de acuerdo con las temperaturas relativas de los electrones, iones y especies neutras⁴³

1. Plasmas calientes o térmicos: son aquellos en los que la temperatura tanto de los electrones como de las especies pesadas (iones, átomos y moléculas) es la misma⁴⁵.
2. Plasmas fríos o no térmicos: Se caracterizan por el hecho de que las energías de los electrones libres y de las especies pesadas son muy distintas. En el plasma frío, la temperatura de las especies pesadas permanece siempre cercana a la ambiente⁴⁵. Este tipo de plasma es el que más se usa en el campo de la polimerización, debido a que la mayoría de las veces se ven involucrados materiales sensibles al calor^{43,46} y será el método por el cual se modificará la superficie de nuestro material.

1.2.1 Polimerización por plasma

Se entiende como polimerización por plasma a la formación de materiales poliméricos bajo la influencia del plasma⁴⁷. El tratamiento de la superficie con plasma consiste, en la generación de radicales en la superficie de un polímero con radiaciones de alta energía formadas al ionizar el gas argón utilizando radiofrecuencia. Este fenómeno permite realizar polimerizaciones por injerto de monómeros sobre diferentes materiales. Adicionalmente, esta reacción provoca cambios estructurales en las superficies, lo que afecta las propiedades bio-interfaciales del sustrato. A su vez, los cambios generados permiten incrementar la ventana de aplicaciones de los polímeros debido a la variación de la hidrofiliidad, porosidad, rugosidad, funcionalidad química y topografía de los materiales.⁴⁸.

Debido a que las especies ionizadas del plasma poseen una alta cantidad de energía, son capaces de formar radicales libres, por lo que ya no es necesario un iniciador que ayude a la formación de los mismos, obteniendo con esto reacciones muy limpias y una modificación exclusiva en la superficie, estas son solo algunas de las ventajas (las cuales se describen ampliamente en la Tabla 1) que tiene este método de modificación de la superficie y a pesar de sus pormenores los resultados obtenidos a través de éste método son satisfactorios tal y como veremos más adelante en la sección de resultados.

Tabla 1. Se muestran las ventajas y desventajas del tratamiento por plasma.

| <i>Ventajas</i> | <i>Desventajas</i> |
|---|---|
| 1) Formación de capas ultradelgadas. | 1) Dependencia del sistema. |
| 2) Buena adhesión al sustrato, la deposición es independiente de la estructura o tipo de sustrato. | 2) Escalar y convertir a un proceso continuo puede presentar desafíos técnicos importantes. |
| 3) Buena estabilidad química y durabilidad. | 3) Los roles específicos de cada componente del plasma son difíciles de separar analizar. |
| 4) Es posible escoger una serie de precursores que dan como resultado un vasto arreglo de la funcionalización de las capas. | 4) Es difícil predecir las características exactas del polímero resultante, especialmente cuando se usan moléculas complejas. |
| 5) Muchos parámetros de proceso se pueden usar para proveer una gran diversidad de modificaciones superficiales. | 5) La multifuncionalidad de la capa puede ser un problema. |
| 6) Las capas obtenidas son más o menos uniformes. | 6) Todo aquello en el rango del plasma pasará a formar parte de la capa. |

1.3 Biomateriales

De acuerdo con la Sociedad Europea para Biomateriales (ESB, por sus siglas en inglés), un biomaterial es una interfaz entre sistemas biológicos que tiene el fin de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo⁴⁹⁻⁵¹. Los biomateriales pueden ser cerámicos; por ejemplo, la hidroxiapatita o el fosfato de tri calcio (TCP, por sus siglas en inglés); polímeros sintéticos como el ácido poli -L- láctico (PLLA, por sus

siglas en inglés), el ácido poli glicólico (PGA, por sus siglas en inglés), el ácido poli -L, D-láctico glicólico (PLGA, por sus siglas en inglés) o el poli-3-hidroxybutirato [P(3HB)].

Los seres vivos estamos formados de una gran variedad de materiales⁵¹, los cuales no solo están organizados en estructuras tridimensionales, sino que también forman parte del medio externo proveyendo señales a las células residentes⁵¹. De igual forma los biomateriales son componentes esenciales de tejidos bioartificiales⁵¹(por ejemplo injertos de hueso de P(3HB) o hidroxiapatita). En este caso pueden ser moléculas de matrices extracelulares naturales como por ejemplo colágeno o bien polímeros con o sin modificaciones superficiales⁵¹. Los biomateriales tienen una gran cantidad de funciones, tales como la interacción con el tejido circundante del huésped con las células del constructo bioartificial, por lo que los requerimientos del biomaterial para su desempeño y función pueden ser diferentes, por ejemplo, para los materiales que sirven como interfase entre el implante y el huésped un requerimiento común es que sean inertes o que no exista respuesta inflamatoria después de ser implantado⁵¹. Los biomateriales pueden ser requeridos para brindar protección inmunológica a un implante o para promover la vascularización del constructo bioartificial, tal es el caso de los vidrios bioactivos, también son utilizados para mejorar el transporte de oxígeno y nutrientes⁵¹. Aquellos biomateriales que deban estar en contacto con la sangre no deben causar coagulación o mejor aún, podrían evitarla activamente liberando agentes trombolíticos⁵¹. Esta tendencia al uso de materiales inteligentes que provocan respuestas predecibles y controladas involucra

en general biomateriales que deben estar en contacto con varios tejidos⁵¹.

Los biomateriales como sustitutos de un tejido en ingeniería tisular, sirven como un componente estructural y proveen una arquitectura tridimensional adecuada para el constructo⁵¹. Además, proveen una matriz tridimensional que sirve para la proliferación celular guiada y el control de la forma del dispositivo bioartificial⁵¹. Cuando un tejido bioartificial interactúa con células, los polímeros usados ya sean naturales o sintéticos, son importantes para mantener y promover la diferenciación celular⁵¹, por ejemplo, cuando se necesita inducir la neovascularización en la matriz extracelular o bien cuando la matriz se degrada con el tiempo y es remplazada por la matriz de las propias células⁵¹.

En el campo de los biomateriales, se han hecho numerosos estudios tanto en la derivatización como en las uniones covalentes de polímeros y péptidos de adhesión⁵¹⁻⁵³. Este enfoque desea producir superficies que tengan diferentes compatibilidades de adhesión a tipos de células específicas⁵¹. Estos materiales resultan muy útiles para los diferentes requerimientos de los sistemas de ingeniería tisular⁵¹.

Los biomateriales, juegan un rol crucial en la tecnología de encapsulación celular, ya que este método permite implantar exitosamente células que podrían ser rechazadas por huéspedes inmunosuprimidos⁵¹. Los sistemas celulares encapsulados tienen un gran potencial en el tratamiento de desórdenes metabólicos, resultado de una producción patológica deficiente de polipéptidos relativamente pequeños, como la insulina en el caso de la diabetes mellitus⁵¹. Las células están rodeadas de una

membrana semipermeable que permite a los nutrientes y metabolitos, incluyendo a los polipéptidos bioactivos difundirse, pero excluyendo anticuerpos de gran tamaño y células citotóxicas del paciente⁵¹. El mayor potencial de éste enfoque con función restauradora, se ha mostrado en dispositivos que contienen células de pituitaria, paratiroides, timo y más comúnmente islotes pancreáticos⁵¹. También se ha investigado el implante de células secretoras de péptidos opioides y catecolaminas para el tratamiento de dolores crónicos⁵¹.

La ingeniería de tejidos requiere con frecuencia biomateriales diferentes a los que se utilizan actualmente en la medicina, la reconstrucción dirigida a tejidos biológicos debe ser estimulada implementando factores de crecimiento, citocinas y biopolímeros de la matriz extracelular. Estos materiales deben ser biodegradables para poder proveer de espacio a las estructuras biológicas que se producen en el proceso de regeneración deseado^{8,11}.

1.4 Ingeniería de Tejidos

Para poder diseñar un andamio que sea capaz de cumplir sus funciones es necesario comprender, qué es la ingeniería de tejidos, cuáles son sus principales componentes y qué relaciones que guardan entre sí.

La ingeniería de tejidos o tisular es una rama de la biotecnología que aplica principios y métodos de las ciencias de la vida e ingeniería a través del entendimiento fundamental de la relación estructura-función en tejidos de mamíferos (normales y patológicos) para el desarrollo de substitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar las funciones del tejido^{49,51}.

1.4.1 Pilares de la ingeniería de tejidos

Existen tres pilares de la ingeniería de tejidos, también llamados triada de la ingeniería de tejidos. Los cuales son las células, los factores de crecimiento o biorreactores y los andamios o scaffolds como se muestra en la Figura 5.

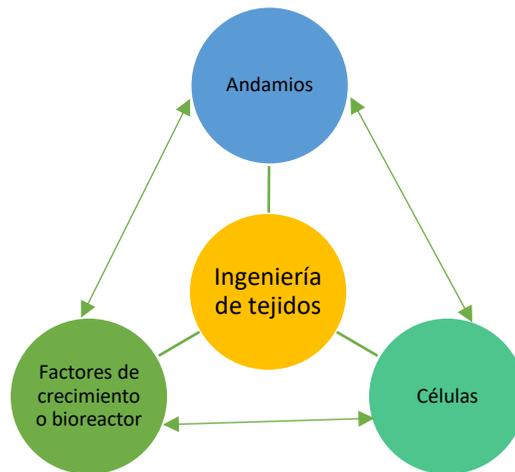


Figura 5. Mapa conceptual sobre los principales factores de la ingeniería de tejidos.

1.4.1.1 Andamios (Scaffolds)

Son estructuras tridimensionales altamente porosas que funcionan como soporte para el desarrollo y crecimiento del tejido, los cuales son reabsorbidos y degradados en intervalos definidos⁵⁴.

Al ser una parte tan importante de la triada, los scaffolds deben cumplir con ciertas consideraciones para su elaboración, las cuales describiremos a continuación^{20,49}. En la Figura 6 se resumen los factores que afectan las propiedades de los andamios en un cuadro sinóptico.

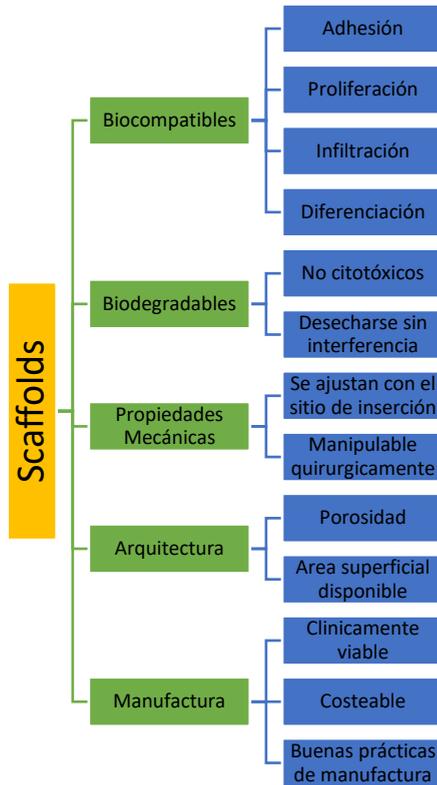


Figura 6. Cuadro sinóptico sobre los factores que afectan a los andamios.

1. Biocompatibilidad

Las células deben adherirse para funcionar con normalidad y migrar desde la superficie a través del andamio y proliferar antes de descansar en su nueva matriz. El scaffold no debe provocar reacciones inmunes⁴⁹ en el lugar de aplicación.

2. Biodegradabilidad

Debido a que los andamios no son implantes permanentes, estos deben ser biodegradables, para permitir a las células

producir su propia matriz extracelular⁵⁵. Los productos de degradación, no deben ser tóxicos y deben poder salir del organismo sin interferir con otros órganos.

3. Propiedades mecánicas

El andamio debe tener propiedades mecánicas consistentes con el sitio de inserción y debe ser suficientemente fuerte para permitir la manipulación quirúrgica.⁵⁶ Es importante lograr un equilibrio entre la arquitectura porosa y las propiedades mecánicas del andamio para permitir la vascularización y la infiltración celular, esto es clave para el éxito de un andamio.

4. Arquitectura del andamio

Los andamios deben tener una estructura altamente porosa e interconectada para asegurar la penetración celular y la difusión adecuada de los nutrientes a las células, así como los productos de desecho y los de degradación. El tamaño de poro es un componente muy importante, pues las células interactúan con los andamios vía ligandos en la superficie del material⁵⁷ y cuya densidad está influenciada por el área superficial específica que es el área superficial disponible a la cual las células pueden adherirse.

Para cada andamio existe un rango crítico de tamaño de poro el cual varía con el tipo de célula y el tejido, por ejemplo, los fibroblastos que miden entre 50 y 100 micras, requerirán una porosidad mayor que un osteoblasto, los cuales miden entre 20 y 20 micras.

5. Tecnología de manufactura

Deben ser clínica y comercialmente viable, de la misma manera debe ser costeable y escalable con buenas prácticas de manufactura y almacenamiento.

1.4.1.2 Células

El elemento funcional más importante de un sustituto o constructo en la ingeniería de tejidos es la vida, o sea células funcionales⁵¹. La función celular deseada es específica de un sistema y puede involucrar uno a más de los siguientes puntos⁵¹:

- ✓ Secreción de una matriz extracelular.
- ✓ Asociación de las células entre sí o exógenas.
- ✓ Polímeros extracelulares en estructuras de arquitectura tridimensional específica.
- ✓ Biosíntesis y secreción de proteínas en respuesta a estímulos específicos.
- ✓ Actividades metabólicas específicas.

Las funciones celulares, deben mantenerse por un buen periodo de tiempo, especialmente si el constructo bioartificial pretende ser implantado⁵¹. A través de diferentes procedimientos, las células deben estar disponibles en cantidades suficientes tanto para la fabricación de tejidos bioartificiales como para estudios y eventualmente para su aplicación clínica⁵¹. Por otro lado, las células no deben causar reacciones inmunes adversas al ser implantadas ya sea debido a que son o se hicieron inmunocompatibles o porque fueron aisladas del sistema inmune del huésped⁵¹.

Las fuentes de obtención de las células pueden ser tanto de humanos como de animales. Sin embargo, la dificultad de obtención de las células depende en gran medida del tipo de células que se deseen⁵¹. Por ejemplo, las células hepáticas son más fáciles de obtener que los islotes pancreáticos, ya que estas están distribuidas por toda la glándula pancreática y representan solamente el 2% de su

masa⁵¹. Adicionalmente, la disponibilidad de las células depende de cuales de las células aisladas son capaces de cultivarse. Por otro lado, identificar y suministrar los factores de crecimiento necesarios puede ser una tarea complicada⁵¹ ya que el crecimiento celular depende de igual forma en el estado de la diferenciación en el que se encuentren las células. A pesar de que las células no diferenciadas como los fibroblastos de la piel pueden ser amplificadas en un cultivo, este no es el caso de células con una diferenciación terminal como es el caso de aquellas células endócrinas altamente especializadas⁵¹. Controlar la diferenciación en un cultivo puede llegar a ser desafiante, debido a que los mecanismos y rutas de diferenciación tienen varios puntos de bifurcación, los cuales no están del todo definidos⁵¹.

Las células humanas tienen la ventaja de tener una buena inmunocompatibilidad, especialmente si se utilizan células del mismo paciente después de ser aisladas de otra parte del cuerpo para ser cultivadas posteriormente⁵¹.

Las células obtenidas de animales proveen teóricamente un suministro ilimitado de células para tejidos bioartificiales, aún si el crecimiento celular no se da en un cultivo, sin embargo, las células xenogénicas suelen ser rechazadas por el sistema inmune⁵¹.

Las células modificadas genéticamente también se consideran en las aplicaciones de ingeniería de tejidos⁵¹, por ejemplo: tomando células humanas del propio paciente, las cuales pueden ser modificadas genéticamente *ex vivo*, y reinsertadas en un constructo vía ingeniería de tejidos⁵¹.

1.5 Biocapas

Se definen como una matriz cerrada de poblaciones bacterianas, que se adhieren una a la otra y/o a una superficie o interfase. Esta definición incluye flóculos y agregados microbianos, así como poblaciones que se adhieren a los espacios porosos.^{58,59} La formación de estas estructuras representa una estrategia de supervivencia, incrementan la probabilidad de aumentar el intercambio genético y la matriz protege a los microorganismos contra la desecación, depredadores y toxinas⁵⁹. Las micro colonias formadas son la estructura unitaria de las biocapas, estas son una matriz cerrada de comunidades bacterianas que pueden ser de una o varias especies^{58,60}. La formación de las biocapas consta de 5 fases^{58,60,61}, las cuales se describen a continuación y se ejemplifican en la Figura 7:

- 1) Fase de Adhesión: En esta etapa las bacterias se adhieren a la superficie utilizando sus flagelos o fimbrias, tal es el caso de (*P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *E. coli* y *S. enterica*) o mediante el uso de proteínas de superficie, como en el caso de los estafilo, estreptococos y micobacterias.
- 2) Fase de proliferación: Una vez adherida a la superficie, la bacteria comienza a dividirse formando una micro colonia.
- 3) Fase de formación de la matriz: En este punto la bacteria comienza a secretar un exo-polisacárido cuya composición varía con el tipo de bacteria, por ejemplo, *P. aeruginosa* produce una matriz rica en alginato, mientras que la matriz de *S. typhimurium* es rica en celulosa y la de *S. aureus* en polo-N-acetil glucosamina.

- 4) Fase de liberación: Por medio de un mecanismo de supresión genética la colonia que forma la biocapa, crea individuos que no son capaces de generar el exopolisacárido (con frecuencia aproximada de 1 en 1,000,000) lo que les permite escapar de la biocapa y formar una nueva colonia. Aunque ciertas bacterias también son capaces de generar enzimas que digieran la matriz, obteniendo con esto un mecanismo de liberación controlada de las bacterias de la biocapa.
- 5) Fase de propagación: Una vez liberada la bacteria de la biocapa, esta busca una nueva superficie para colonizar.

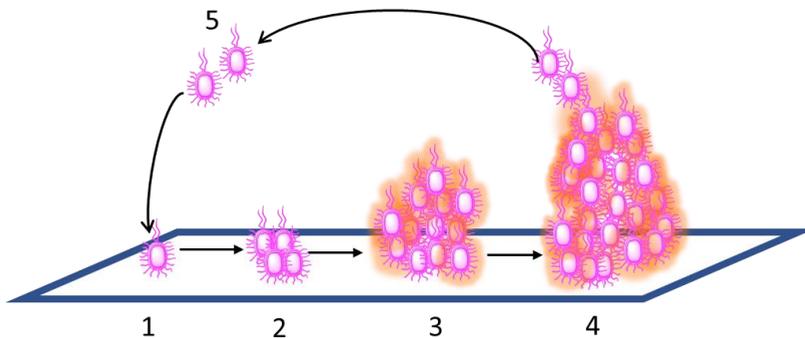


Figura 7. Esquema de formación de una biocapa.

A pesar de que las biocapas están relacionadas frecuentemente con procesos infecciosos, no son del todo malas por ejemplo, las biocapas de lactobacilos presentes en la vagina fermentan el glucógeno generado por las células epiteliales, logrando con esto disminuir el pH vaginal previniendo así la colonización por microorganismos patógenos⁶¹.

1.5.1 Superficies antibacterianas

Desde 1930 se sabe que la adhesión y proliferación de bacterias en superficies artificiales afecta de manera notable el desempeño de las funciones de las interfases, estas biocapas se han encontrado en implantes médicos⁴⁸, lentes de contacto⁶², sistemas de flujo de agua⁶³ y líneas de petróleo⁶⁴; los cuales son afectados por la formación de estos fenómenos biológicos⁴⁸.

Debido a las complicaciones que estas capas suponen para el desempeño de ciertos sistemas se han desarrollado métodos para eliminar o reducir sustancialmente la adherencia y formación de estas biocapas⁴⁸. Los esfuerzos se han concretado en la fabricación de nuevas superficies o el mejoramiento del desempeño de las superficies antibacterianas existentes, por medio de la aplicación de recubrimientos y modificando o alterando la arquitectura superficial⁴⁸.

Las superficies antibacterianas pueden clasificarse en dos: antiadherentes y bactericidas, cuyas características se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Sobre las principales diferencias entre superficies antiadherentes y superficies bactericidas.

| Superficies antiadherentes | Superficies bactericidas |
|--|---|
| 1) Evitan o previenen la adherencia celular. 2) Topografía desfavorable para las células (superficies lisas). 3) Química superficial perjudicial para las células. | 1) Rompe las membranas celulares. 2) Superficies modificadas con péptidos antimicrobianos rompen la bicapa celular por lisis, formación de poros, ataque al citoplasma, ataque al metabolismo. |

1.5.2 Recubrimientos Antiadherentes y Antibacterianos

La aplicación de recubrimientos superficiales es uno de los métodos de fabricación más utilizados en el desarrollo de superficies antibacterianas⁴⁸. Un recubrimiento superficial, puede definirse como la construcción de un material antibacteriano sobre la superficie de un sustrato⁴⁸. Los recubrimientos son muy utilizados en la industria biomédica cuando los sustratos requieren mantenerse en ambientes complejos por ejemplo en la integración de tejido⁴⁸.

Dentro de las técnicas de modificación de una superficie existen dos tipos principales: Las modificaciones químicas (polimerización, funcionalización y derivatización) y las modificaciones físico-mecánicas (estructuración mecánica-superficial)⁴⁸.

1.5.2.1 Modificaciones químicas

1.5.2.1.1 Modificación de la superficie por polimerización.

Es el proceso donde la superficie es modificada por la polimerización de un agente antimicrobiano en la

superficie⁴⁸. Este tratamiento también se puede clasificar como un recubrimiento superficial, y puede llevarse a cabo por diferentes vías, por ejemplo, unión covalente o transferencia atómica de radicales⁴⁸.

1.5.2.1.2 Funcionalización y derivatización de superficies
Los métodos de modificación superficial se han desarrollado para incrementar la efectividad de superficies antibacterianas, este proceso involucra la introducción de una cadena hidrofóbica larga, cargada positivamente, por ejemplo, polietilenaminas alquiladas o la introducción de un grupo funcional en la superficie vía polimerización con iniciadores, catalizadores, reacciones de condensación o plasma⁴⁸.

2 Justificación

A lo largo de nuestra vida, todos hemos llegado a sufrir una leve quemadura, ya sea por haber tocado algo muy caliente en la cocina o quizás al planchar nuestra camisa favorita o alaciándonos el cabello, sin embargo, no todos corremos con la misma suerte, ya que alrededor de 129,779 mexicanos al año han terminado en el hospital a causa de quemaduras⁶⁵, de las cuales las quemaduras de segundo grado son extremadamente dolorosas debido a que no se destruyen por completo las terminaciones nerviosas. A las personas que sufren de quemaduras de tercer grado les toca la peor parte, puesto que este tipo de lesiones eliminan prácticamente el 100% de las células epiteliales del área afectada, dejando a la persona susceptible a infecciones y sin capacidad de regenerar su piel⁶⁶. Estos lamentables eventos cobraron en México la vida de 109,085 personas tan solo en 2018⁶⁷.

Los científicos comprometidos con esta causa no han parado de buscar alternativas para ayudar a las personas que se encuentran en esta condición. A lo largo de los años se han encontrado una gran variedad de soluciones para mitigar los efectos devastadores de las quemaduras en el cuerpo humano. Los tratamientos actuales van desde múltiples tipos de injertos, por ejemplo: los aloinjertos (piel proveniente de otro ser humano), xeno injertos (injertos provenientes de algún animal, generalmente cerdo), autoinjertos (injertos de piel del propio paciente) y tratamientos tópicos; hasta novedosos biomateriales que reemplazan físicamente tejido duro o blando de las áreas dañadas o destruidas⁵⁰. Sin embargo, estos tratamientos son costosos, por ejemplo el injerto de piel artificial Epicel el cual tiene un costo de 30 a 50 USD por cada centímetro

cuadrado de superficie dérmica⁶⁸, es por esto que es necesario seguir en la búsqueda de alternativas que puedan estar al alcance de las personas que necesitan recurrir a estos tratamientos.

El poli(3-hidroxiбутirato) [P(3HB)] ha sido muy estudiado ultimamente debido a sus propiedades biocompatibles y biodegradables con varias líneas celulares humanas^{5,69-71}, y gracias a su versatilidad para trabajar con otros materiales es una excelente alternativa para enfrentar la necesidad de materiales que tengan una utilidad en la ingeniería de tejidos. Por su parte, la poli-n-isopropilacrilamida (PNIPAAm) se ha catalogado como un polímero inteligente y termo responsivo el cual ayuda a evitar que se formen capas bacterianas en el injerto, evitando con esto inflamaciones e infecciones en el paciente⁷¹⁻⁷³. Se desconoce si el poliuretano de P(3HB) modificado con PNIPAAm por polimerización inducida por radiaciones de plasma es una alternativa viable para la futura preparación de un apósito para pacientes quemados. Por lo anteriormente dicho, en esta tesis se realizarán estudios que nos ayudarán a comprender la naturaleza de este nuevo material, sus propiedades físicas, químicas, y su interacción con células (*in vitro*) y tejidos (*in vivo*), para poder entonces estar en condiciones de sugerir su aplicación biotecnológica.

3 Planteamiento del problema

El poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)], es el primer miembro de la familia de los polihidroxialcanoatos (PHA). Este es un material biodegradable, bio-compatibile, y muy utilizado en ingeniería de tejidos^{11,74,75}. Sin embargo, es un biopolímero relativamente hidrofóbico y quebradizo, por lo que se han reportado múltiples publicaciones sobre su modificación química con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas^{26,39,76-80}. La síntesis de poliuretanos a partir de P(3HB) ha demostrado ser una opción viable para la preparación de andamios tridimensionales nanoestructurados^{11,74,75}. Sin embargo, una desventaja de su aplicación *in vivo* es la formación de bio-películas en la superficie del material una vez implantado⁷¹, lo que hace necesaria la modificación de la superficie. Se han reportado en la literatura numerosos trabajos sobre modificaciones de la superficie de PHA por métodos químicos⁸¹⁻⁸³, con plasma^{8,43,84-87}, con rayos ultravioleta⁸⁸⁻⁹⁰ y con rayos gamma⁹¹⁻⁹³, buscando mejorar la interacción de las células con el material implantado. Se desconoce, si la modificación de la superficie de los poliuretanos de P(3HB) con N-isopropilacrilamida y radiaciones de plasma son una alternativa adecuada para incrementar la biocompatibilidad de éste. Una contribución a la solución de este problema sería un aporte científico de utilidad práctica en la búsqueda de nuevos materiales para ingeniería de tejidos.

¿Será posible desarrollar un nuevo tipo de andamio 3D nanoestructurado, a partir de un poliuretano de poli(3-hidroxibutirato), modificado en su superficie por radiaciones de plasma y N-isopropilacrilamida para su uso en ingeniería de tejidos?

4 Hipótesis

A través de la modificación superficial de un poliuretano de poli(3-hidroxi-butirato), utilizando radiaciones de plasma y n-isopropilacrilamida es posible desarrollar un nuevo tipo de andamio 3D nanoestructurado, cuya composición química permita mejorar sus características para su uso en ingeniería de tejidos.

5 Objetivos

5.1 Objetivo General

Sintetizar y caracterizar un nuevo tipo de andamio tridimensional nanoestructurado mediante la modificación de la superficie con N-isopropilacrilamida injertada utilizando plasma frío, sobre poliuretanos de poli-3-hidroxi-butirato P(3HB).

5.2 Objetivos particulares

- 1) Preparar un andamio tridimensional de PU-P(3HB) y modificar la superficie del andamio con N-isopropilacrilamida, mediante la polimerización inducida por plasma.
- 2) Caracterizar la funcionalización de la superficie por medio de la técnica de FTIR, SEM y AFM para conocer la topografía, morfología y rugosidad del material injertado.
- 3) Caracterizar los andamios modificados con las técnicas BET y Goniometría para conocer la mojabilidad y la arquitectura.
- 4) Evaluar biológicamente los andamios *in vitro* mediante las técnicas de MTT y microscopía de fluorescencia para determinar la citotoxicidad y viabilidad del material,

así como cambios en la morfología y propagación de los fibroblastos en el material modificado.

- 5) Evaluar biológicamente los andamios in vivo en un modelo animal de ratón y por medio del estudio histológico de los infiltrados inflamatorios, conocer la biocompatibilidad del material modificado.

6 Desarrollo Experimental

6.1 Materiales

A continuación, se enlistan las sustancias que fueron utilizadas para el presente trabajo:

Poli[(R)-3-hidroxitirato] [P(3HB)]: CAS 29435-48-1, de Merck (U.S.), origen natural, P.M. 60,000 Da, Lote No. BCBV5095.

N-isopropilacrilamida: $C_6H_{11}NO$, CAS 2210-25-5, calidad Merck (U.S) 99%, P.M. 113.16 g/mol, Lote No. J59632730.

Acetato de sodio: $C_2H_3O_2Na$, CAS 127-09-3, calidad Merck (U.S.) 99%, P.M. 82.03 g/mol, ρ 1.528 g/cm³, p.f. 300°C, Lote No. A93561280

1,6-Hexametilendiisocianato (HMDI): $C_8H_{12}N_2O_2$, CAS 28182-81-2, Polyform Catalizador 250, P.M. 168.19 g/mol, ρ 1.06 g/cm³, p.e. 37.78 °C Lote No.19A0861202.

Nanopartículas de sílica: SiO_2 , CAS 7631-86-9, calidad Merck (U.S.) 99.5%, P.M. 60.08 g/mol, ρ 2.4 g/cm³, p.f. 1600 °C, Lote No. MKCJ0272.

Metanol: CH₄O, CAS 67-56-1, calidad Merck (U.S.) 99%, P.M. 32.04 g/mol, ρ 0.791 g/cm³, p.e. 64.7 °C, Lote No. M86374650.

Resina Hidroxilada: Polyform 11000, Mezcla de polioles, bis(2-etil-hexanoato) de cinc CAS: 136-53-8, ρ 0.99 g/cm³, p.e. 37.78 °C, Lote No. 19A0660503.

6.2 Metodología

6.2.1 Preparación de los andamios (scaffolds)

Para preparar los andamios se mezclaron: 125 mg de P(3HB) previamente tamizado a 25μm, 125 mg de resina hidroxilada, la cual contiene el catalizador de Zn y 82.5 mg del trímero de HMDI para producir una masa homogénea a la que se incluyeron nanopartículas de sílica para una concentración de 3% v/v. Una vez homogénea la mezcla se dividió en partes de 50 mg las cuales se pasaron a un molde para obtener cilindros pequeños de 5 mm de diámetro y 1.4 mm de espesor (Figura 8). Los andamios obtenidos se dejaron reposar durante la noche expuestos a luz UV para esterilizar el andamio.



Figura 8. Se muestran las dimensiones y geometría de los andamios de P(3HB).

6.2.2 Modificación superficial

Se preparó una disolución de NIPAAm/metanol al 65% p/p para lo cual se disolvieron 1.5 g de NIPAAm en 1 ml de metanol. Posteriormente se agregaron dos gotas de la disolución en la superficie de cada scaffold antes de ser expuestas a las radiaciones de plasma. Para el tratamiento

con plasma, se utilizó el equipo Plasma Prep III Plasma Cleaner⁹⁴ (Figura 9) al cual se le modificó el portaobjetos para muestras con éste tipo de geometría. Se usó argón como gas ionizable y el equipo fue operado a una frecuencia de 13.56 MHz y 250 mTorr (0.00025 atm). Cada muestra fue expuesta al plasma por 1 minuto y se ajustó la potencia 4 veces en aumentos de 5 watts quedando los aumentos de potencia de la siguiente manera: P1=5W, P2=10W, P3=15W y P4=20W.



Figura 9. Portaobjetos y generador de plasma para modificaciones de superficies.

Los andamios modificados se nombraron de la siguiente manera: NP0, NP1, NP2, NP3 y NP4 respectivamente, siendo NP0 un andamio del agregado PU-P(3HB) sin modificaciones superficiales y $NPn_{(n=1-4)}$ asignados a los andamios modificados a los diferentes incrementos de potencia. La Poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAAm) que no logró injertarse en la superficie, así como el monómero en exceso y el catalizador que quedó como impureza en la síntesis del andamio, fueron extraídos por medio de un Soxhlet durante dos horas utilizando metanol como solvente.

Para determinar el grado de injerto del PNIPAAm en la superficie, se utilizó la siguiente ecuación:

$$w(\%) = \frac{mf - mi}{mi} \times 100$$

6.2.3 Caracterización

6.2.3.1 Análisis por espectroscopia FTIR

Para identificar las diferencias entre los grupos funcionales presentes en el NIPAAm, la muestra sin modificar (NP0) y las muestras modificadas (NP1-NP4), se utilizó la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. Este análisis se llevó a cabo en un espectrómetro Bruker Vector 33 con reflectancia total atenuada a una resolución de 4 cm⁻¹ y 64 escaneos en modo de transmitancia. Una pequeña cantidad de polímero (1mg aproximadamente) fue colocado en el soporte para que pudiera producir una señal entre 500-4000 cm⁻¹.

6.2.3.2 Microscopía Electrónica de Barrido

Se obtuvieron imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés) con un (JEOL-JSM-6060LV) operado a 15 kV.

6.2.3.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La superficie seca de los andamios NP0 a NP4 fueron observados en el microscopio de fuerza atómica modelo JEOL JSPM 4210 en modo Tapping y las señales fueron traducidas y analizadas gracias el software JEOLW inspm para poder obtener una imagen de la topografía superficial y estimar la rugosidad de la muestra.

6.2.3.4 Análisis por Goniometría

Se midió el ángulo de contacto de una gota de agua en la muestra para obtener el parámetro de mojabilidad de los

andamios, para esto se utilizó el equipo Pocket goniometer-PG3. Este estudio se llevó a cabo a temperatura ambiente, para cada muestra se utilizaron aproximadamente 2 μL (volumen aproximado de una gota) de agua ultra pura (Milli-Q) y diyodometano (CH_2I_2). Los dos microlitros de solvente se dejaron en la superficie con el fin de conocer los ángulos de contacto en un tiempo de dos segundos aproximadamente. En este estudio se midió la variación del ángulo de contacto de una gota de agua hasta que se alcanzó el equilibrio con la superficie del material. La energía libre de la superficie se obtuvo por medio del modelo Owens-Wendt.

6.2.3.5 Análisis de porosidad por BET y BJH.

Para conocer la porosidad de las muestras (NP0 a NP4), se sometieron por un análisis de fisorción de N_2 en el equipo Minisopr II. Antes de realizar el estudio las muestras fueron calentadas a 80°C por 24h y posteriormente se enfriaron lentamente hasta llegar a temperatura ambiente. Posterior a la desgasificación se procedió con la fisorción de nitrógeno (N_2) a 77 K (196.15°C). Para conocer el volumen total de poro, el área superficial y el diámetro promedio de poro, los datos obtenidos se trataron con los modelos de Brunauer-Emmett-Teller (BET) y Barret-Joyner-Halenda (BJH).

6.2.3.6 Estudio de citotoxicidad

El estudio de citotoxicidad para los andamios tridimensionales de PU/P(3HB) se hizo utilizando la línea celular humana de fibroblastos (BJ1). Se cultivaron 3×10^4 células en 250 μL de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) el cual fue enriquecido con 5% antibiótico y 10% de serum bovino fetal a 37°C y a una concentración de CO_2 del 5% por 24h. Posteriormente se adicionaron al medio

preparado 10 μ L de una disolución del 5 μ g/mL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT por sus siglas en inglés). Después de 3 horas de incubación, se removió el sobrenadante y los pozos se lavaron completamente con solución salina.

Se disolvió el precipitado de Formazan con 200 μ L de una solución de dimetil sulfóxido (DMSO)/ 2-propanol (1:1). Finalmente, el producto se caracterizó por colorimetría a 570 nm con el uso del lector de absorbancia de microplaca iMARKTM, Bio-Rad Laboratories, Inc.

6.2.3.7 Estudio de viabilidad celular

Para este estudio se utilizaron fibroblastos dérmicos humanos (cuarto pase) los cuales fueron aislados de una muestra de piel obtenida de una abdominoplastia con previa notificación y consentimiento del paciente. Las células se cultivaron en DMEM/ medio nutritivo F-12 de Ham (Gibco) enriquecido con 10% de serum bovino fetal (FBS, Gibco) y de penicilina/estreptomicina al 1%. Posteriormente se sembraron 10,000 células sobre los andamios y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24h. Posteriormente las células se incubaron con calceína y homodimero de etidio (EthD-01) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Thermo), para que al ser vistas en el microscopio de fluorescencia, sea posible distinguir las células vivas (teñidas en verde por la calceína) de las muertas (teñidas en rojo por el EthD-01) Los fibroblastos sembrados sobre los andamios se incubaron por 1 hora y se lavó con una solución buffer de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés). Posteriormente las células se cultivaron en medio enriquecido y se observaron en el microscopio de epifluorescencia (Zeiss). Aquellas células positivas a la calceína y EthD-1 fueron contabilizadas utilizando el

software ImageJ. Para evaluar diferencias significativas entre las muestras (NP0 y NP4) se hicieron un análisis de varianza ANOVA y la prueba post hoc de Tuckey.

6.2.3.8 Estudio de biocompatibilidad

Para este estudio, se usaron 12 ratones macho los cuales se obtuvieron de la Unidad de Producción y Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL [Cinvestav, México]), de entre 20-25 g. Los ratones se mantuvieron en condiciones standard de laboratorio por dos semanas. Al momento de la operación, los ratones adultos que pesaban entre 40 y 45 g se anestesiaron por inhalación con isoflurano (1% en O₂).

Para la operación se rasuró el lomo de los ratones y éste fue sanitizado con una solución de yodo; posteriormente se procedió a hacer una incisión de aproximadamente 1.5 cm con bisturí. Con las pinzas de disección se separó una porción de la piel formando una especie de bolsa para implantar el andamio, entonces se insertó un andamio de poliuretano de P(3HB) sin modificar del lado izquierdo y uno modificado con PNIPAAm del lado derecho. Luego del implante, se cerró la incisión utilizando suturas 5/0 Dermalon™ (Covidien Lanceta HG, México). Se administró 0.1 ml de una solución de fentanilo (25 µg/ml), como analgésico antes de ser regresados a sus cajas.

Las muestras injertadas se extrajeron a los 3, 7, 14 y 21 días, para lo cual se sacrificaron los ratones por inhalación de CO₂. Los andamios, así como el tejido asociado fueron removidos para el análisis histológico.

Las muestras recolectadas se sometieron al proceso de fijación en solución salina de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) a 4°C durante 72 h. Transcurrido este tiempo las

muestras se deshidrataron progresivamente sumergiéndolas durante 1 hora, con agitación leve, en disoluciones de etanol al 80%, 90%, 95% y 99%. Posteriormente las muestras se sumergieron durante 1 hora en una solución de etanol/xilol en proporción 1:1 y xilol al 100%. Finalmente, las muestras se sumergieron 2 veces en parafina durante 1 hora a 55°C y se incluyeron en un casete de histología en el cual fueron encostradas. Con un micrótopo se cortaron secciones de aproximadamente 5 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina, de esta manera es posible conocer la respuesta inflamatoria y la vascularización del injerto (scaffold).

Este experimento fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INR LGII).

7 Resultados y análisis de resultados

De acuerdo con la literatura, el compuesto P(3HB)-PU se sintetiza de la siguiente manera:

1. El alcohol forma un enlace de coordinación a través del oxígeno con el catalizador organometálico bis (2-etilexanoato) de zinc.
2. El hexametil-diisocianato también se coordina con el zinc a través de nitrógeno del grupo isocianato y uno de los pares electrónicos N=C se va hacia el nitrógeno para ayudarlo a recuperar el octeto.
3. Resultado del paso anterior, queda un carbocatión, el cual se enlaza con el par libre de electrones del oxígeno del alcohol, para recuperar el octeto, y el enlace de coordinación del alcohol con el zinc se recupera para estabilizar al oxígeno. Sin embargo, como el octeto del oxígeno aún no está completo, entonces el mismo atrae la carga del enlace O-H, dejando una carga parcial positiva en dicho enlace, el cual se estabiliza con uno de los pares electrónicos del carbonilo, liberando al hidrógeno, y como consecuencia queda el oxígeno con el par electrónico completado su octeto.
4. Ya que en la especie C=OH, el enlace con el hidrógeno es muy inestable, el oxígeno atrae toda la carga electrónica, y el hidrógeno migra para enlazarse con el nitrógeno, el cual se desenlaza del zinc para recuperar el octeto. Estos pasos se repiten hasta formar una red entrecruzada.
5. Para producir la película antibacteriana el poliuretano de poli(3-hidroxi-butirato) [PU-P(3HB)] es sometido a las radiaciones de plasma en presencia de una disolución del monómero (NIPAAm) en metanol. De esta forma se

forman radicales sobre los segmentos lineales de la cadena polimérica: Los posibles sitios de formación de los radicales se muestran en los sitios marcados por las flechas azules. De la misma forma, el plasma forma radicales de NIPAAm, los cuales reaccionan entre sí, para dar lugar a oligómeros, los cuales reaccionarán con radicales formados en las cadenas del PU-P(3HB) dando lugar a la nueva superficie modificada, tal como se muestra en la Figura 11. La modificación con PNIPAAm es posible debido al bajo punto de fusión del monómero y a la rapidez de reacción.

6. Finalmente se obtiene el andamio modificado el cual debido a la triple funcionalidad del THMDI y la doble funcionalidad del P3(HB) y el PEG se obtiene una red entrecruzada que al ser tratada con el plasma da como resultado una estructura similar a la que se muestra en la Figura 12.

A continuación, se representa el mecanismo de reacción para la síntesis de los andamios en las Figuras 10 y 11.

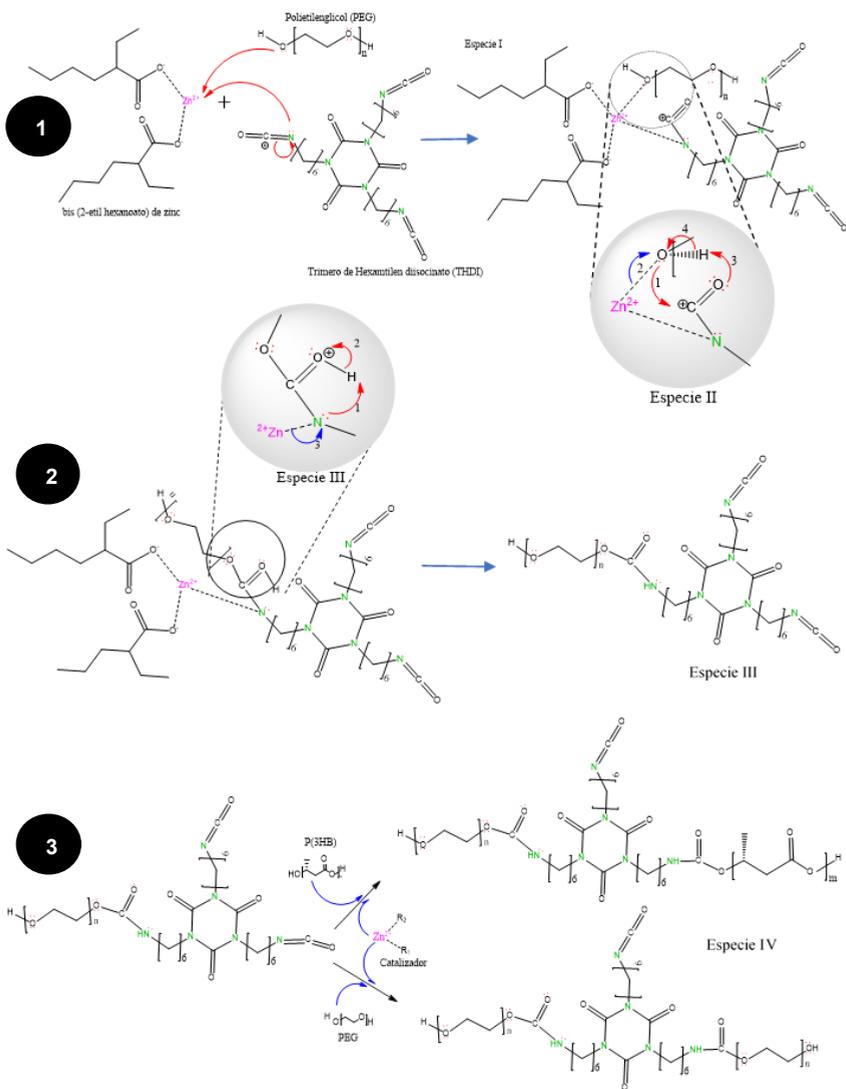


Figura 10. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de los andamios.

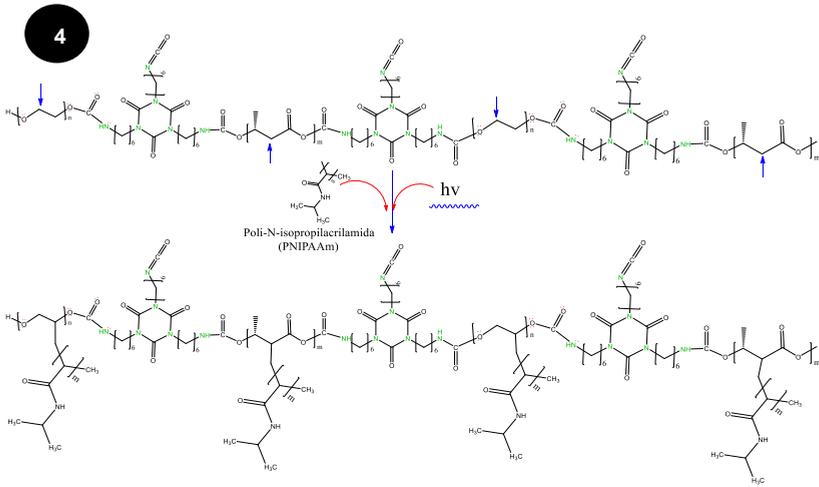


Figura 11. Se muestran con flechas azules los sitios donde es posible injertar la poli-N-isopropilacrilamida [PNIPAAm] al ser sometido al tratamiento por plasma.

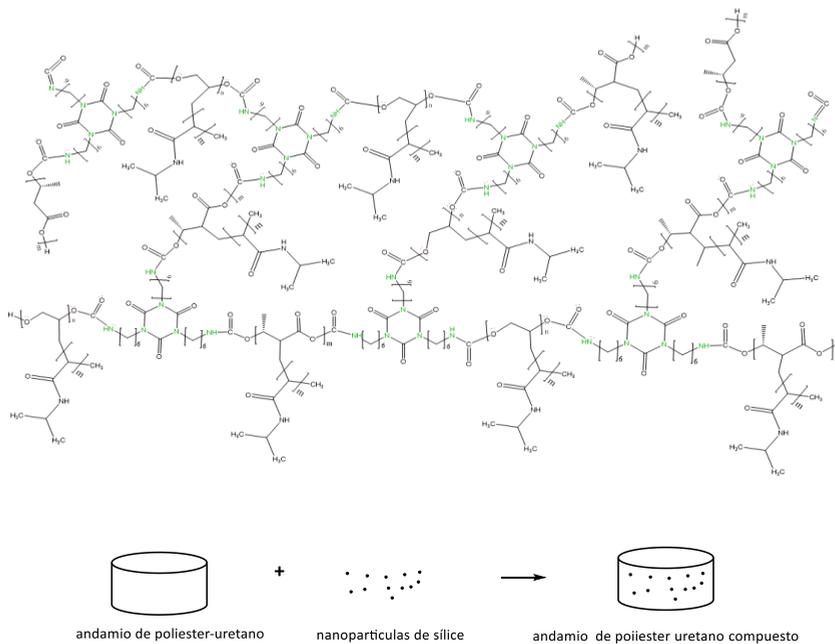


Figura 12. Estructura del compuesto Poliuretano-Poliéster injertado con Poli-n-isopropilacrilamida [PNIPAAm]. También se muestra la forma final del andamio.

Las nanopartículas de sílice se agregan debido a que ayudan a la diferenciación celular de acuerdo con la bibliografía consultada en el apartado de materiales compuestos de P(3HB) en los Antecedentes.

El catalizador que queda como impureza en la síntesis es removido haciendo lavados con metanol con la ayuda de un Soxlet posterior al tratamiento con plasma.

7.1 Caracterización fisicoquímica

7.1.1 Espectroscopia de infrarrojo (FTIR)

Consiste en interpretar las señales de absorbancia o transmitancia, que son arrojadas por una muestra, después

de ser irradiada por un haz de luz infrarroja, esto con el fin de conocer los grupos funcionales de la molécula. A continuación, se muestran los espectros IR para las muestras modificadas (Fig. 13) y sin modificar (Fig. 15), así como el espectro de la especie injertada (NIPAAm) (Fig. 14).

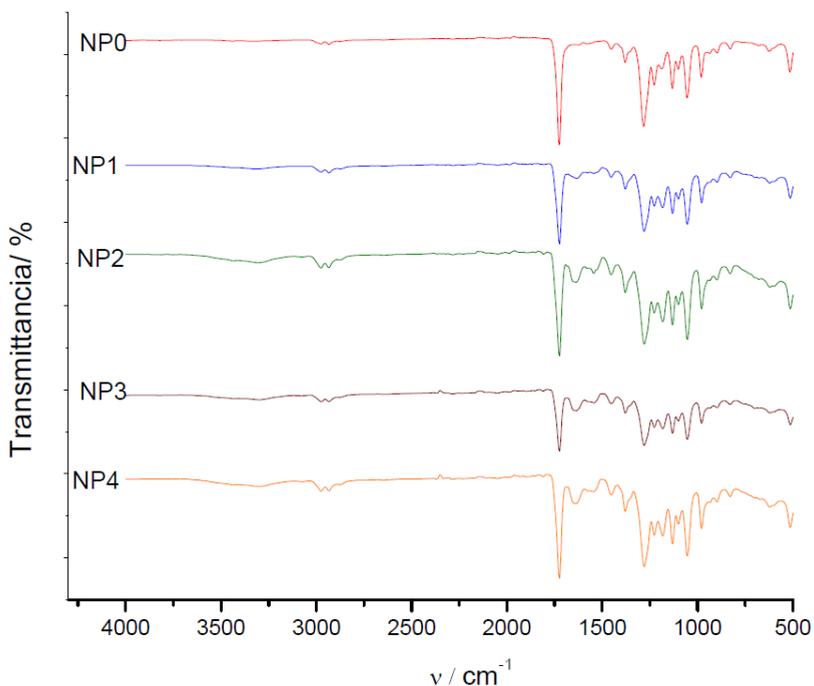


Figura 13. Gráfica donde se muestran los espectros infrarrojos de las muestras modificadas NP1, NP2, NP3 y NP4 comparadas con la muestra no injertada NP0.

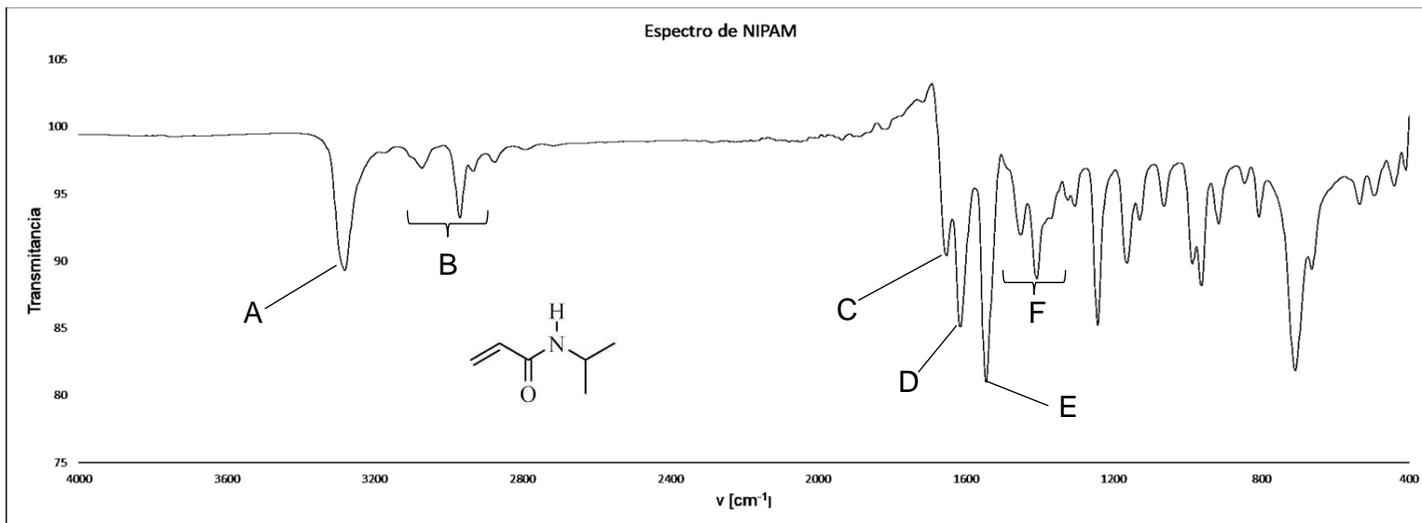


Figura 14. Espectro infrarrojo para el monómero N-Isopropilacrilamida (NIPAAm), se observan las bandas:

- A:** 3281 cm^{-1} , Banda asociada al estiramiento del enlace N-H del grupo amida.
- B:** $3072, 2970, 2877 \text{ cm}^{-1}$, Bandas asociadas al estiramiento del enlace C-H.
- C:** 1660 cm^{-1} , Banda asociada al estiramiento del doble enlace C=C.
- D:** 1621 cm^{-1} , Banda asociada al estiramiento del enlace C=O del grupo carbonilo (Banda I Amida)
- E:** 1542 cm^{-1} , Banda asociada a la flexión del enlace N-H (Banda II amida)
- F:** $1455, 1408 \text{ cm}^{-1}$, Doblete asociado a la flexión del enlace C-H del gem dimetilo

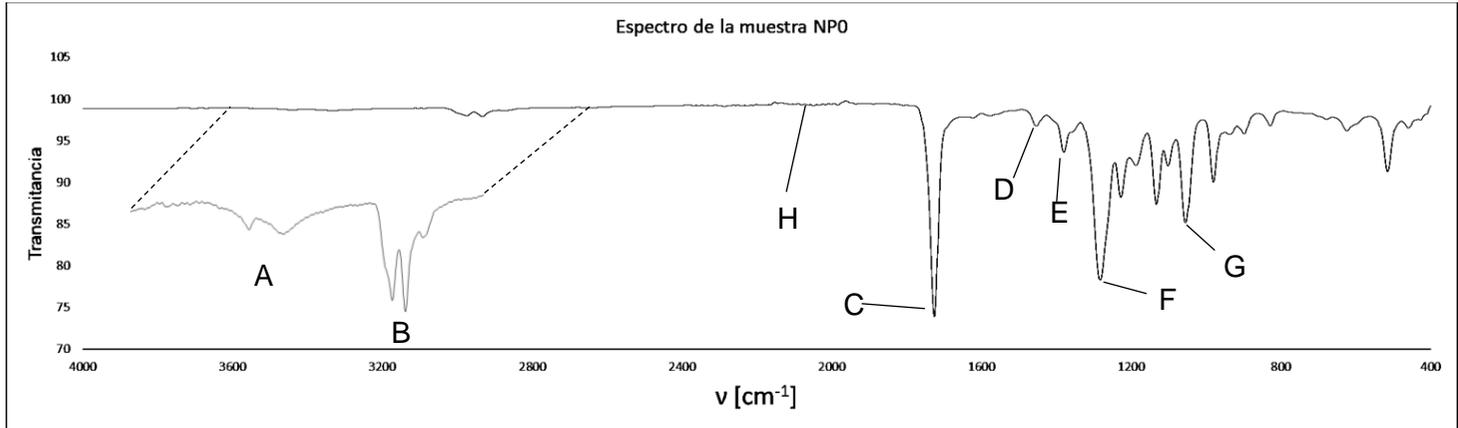


Figura 15. Espectro infrarrojo para la muestra sin modificación de la superficie NP0. se observan las bandas:

A: $3523\text{-}3180\text{ cm}^{-1}$, bandas asociadas al estiramiento del enlace N-H del grupo amida.

B: $2973, 2933\text{ cm}^{-1}$, bandas asociadas al estiramiento del enlace C-H.

C: 1723 cm^{-1} , banda asociada al estiramiento del enlace C=O.

D: 1456 cm^{-1} , banda asociada al estiramiento del enlace C-N del anillo del trímero.

E: 1370 cm^{-1} , banda asociada al estiramiento del enlace C-N del anillo del trímero.

F: 1283 cm^{-1} , banda asociada al estiramiento del enlace C-O del grupo éster.

G: 1051 cm^{-1} : banda asociada al estiramiento del enlace C-O del grupo anhídrido.

H: 2270 cm^{-1} : banda ausente característica del grupo isocianato.

Para confirmar la estructura propuesta, se hizo un análisis espectroscópico de infrarrojo por transformada de Fourier, el cual reveló lo siguiente:

Para los andamios sin modificar (NP0), se encontró una banda intensa en 1723 cm^{-1} que está asociada con el enlace C=O del grupo carbonilo (Figura 15 inciso C), presente en los grupos uretano, éster y anhídrido⁹⁵, también un doblete en $3523\text{-}3180\text{ cm}^{-1}$, asociado al estiramiento del enlace N-H del grupo amida y uretano, este enlace produce una sola señal en 3180 cm^{-1} debido a que se trata de una amida secundaria. Sin embargo el doblete se explica por la formación de una amina primaria⁹⁵ derivada de la reacción del uretano con el agua del ambiente (Figura 15 inciso A).

Las bandas en 1456 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} , pertenecen a las interacciones N-C(=O) y N-C(R') del anillo del trímero (Figura 15 inciso D y E).

Es posible notar una banda en 1051 cm^{-1} , asociada a la formación del grupo anhídrido (Figura 15 inciso G) al reaccionar el PHB con el isocianato y formar el poliester-uretano⁹⁶ deseado. Adicional a esto, la ausencia de la banda en 2270 cm^{-1} la cual es característica del grupo isocianato (N=C=O), prueba que el HMDI reacciona por completo.

Para el monómero N-isopropilacrilamida (NIPAAm), se aprecia una banda en 1660 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones del doble enlace C=C (Figura 14 inciso C). Por otro lado, las señales en 3281 , 1621 y 1542 cm^{-1} corresponden a las vibraciones del grupo amida R-CO-NH₂ (Figura 14 incisos A, D y E) y aquellas bandas en 1455 y 1408 cm^{-1} representan las vibraciones del gem dimetilo (Figura 14 incisos B y F).

Posteriormente para las muestras modificadas (NP1 a NP4) no se observó la banda en 1660 cm^{-1} del enlace C=C del grupo acrilato del monómero y que junto con los resultados del AFM, goniometría, grado de injerto y pruebas in vivo (los cuales explicaremos más adelante) proporcionan evidencia sólida de que el NIPAAm fue injertado exitosamente por medio del plasma.

Por otro lado, la intensidad relativa de la banda en 3180 cm^{-1} , aumenta con respecto a la de 3523 cm^{-1} y la señal del doblete se ve más ancha, esto se puede deber a la formación de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares debido al grupo amida del NIPAAm injertado.

7.1.2 Estudio de microscopía SEM

Esta técnica de microscopía electrónica permite obtener imágenes de alta resolución de una superficie, por medio de las interacciones electrón-materia. A continuación, se presentan microscopías de las muestras NP0 a NP4 (Fig. 16). Aunque no se observaron diferencias importantes en la morfología del andamio, lo cual indica que la estructura porosa se mantiene, esto es bueno ya que la capacidad de proliferación celular dentro del poro no cambia.

Sin embargo estos resultados son diferentes de los que se observan en el trabajo de González et al⁹⁷. (Fig. 17) en el cual se injerta P(3HB-co-3HV) con HEAA y es posible notar que el polímero sin modificación de la superficie es más bien liso (Fig. 17 incisos A, B, C), en cambio al llevarse a cabo el injerto de HEAA por medio del plasma hay un cambio evidente en la morfología superficial del andamio (Fig. 17 D-I). La Figura 17 se cita en este trabajo con la autorización del Dr. González.

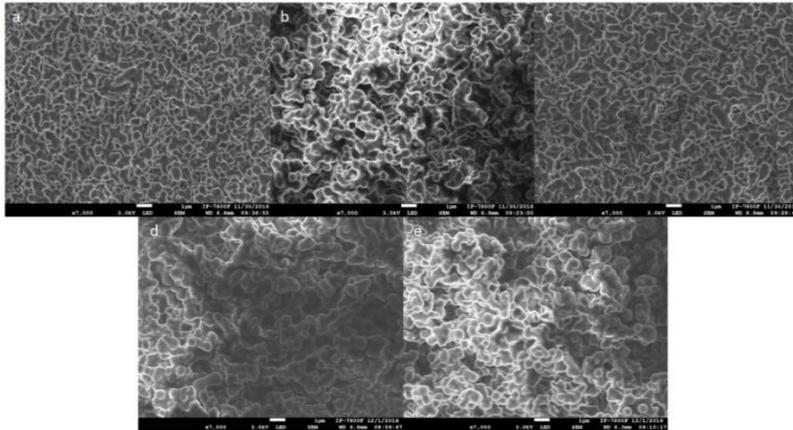


Figura 16. Imágenes SEM de las muestras NP0 a NP4 a 7,000 aumentos. A) NP0, B) NP1, C) NP2, D) NP3 y E) NP4.

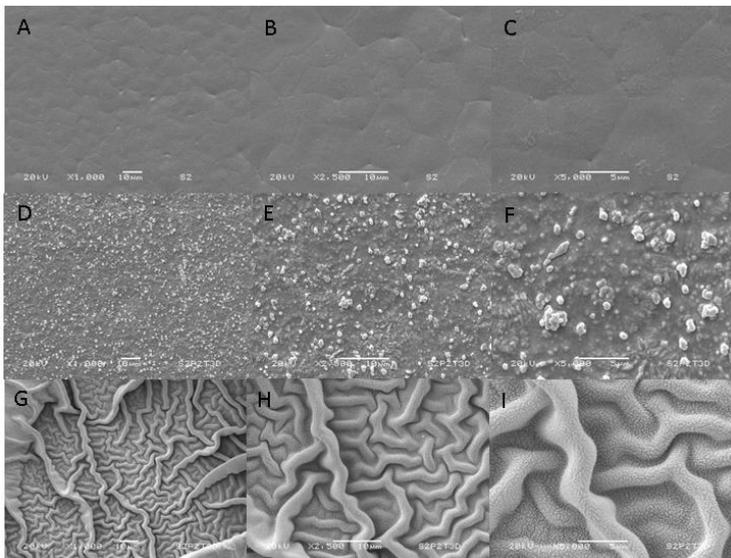


Figura 17. Micrografía SEM del trabajo de González et al⁹⁷. donde muestran el polímero prístino (A, B y C) el polímero sin injertar después del tratamiento con plasma (D, E y F) y el polímero injertado con HEAA por medio del plasma (G, H e I) en aumentos de 1000x, 2500x y 5000x de izquierda a derecha.

7.1.3 Estudio de microscopía AFM

Esta técnica mecánico-óptica, forma imágenes de una superficie gracias a una sonda la cual recorre la muestra línea por línea, escaneando la superficie en función de la posición y generando con esto una imagen de la topografía de la muestra. En la Figura 18 se muestran las imágenes del AFM para las muestras NP0 a NP4.

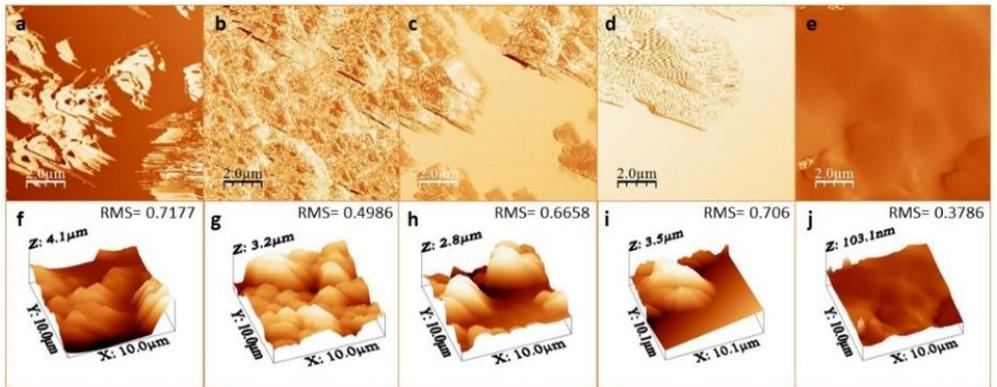


Figura 18. Imágenes AFM de las muestras NP0 (a,f), NP1 (b,g), NP2 (c, h), NP3 (d,i) y NP4 (e,j).

La topografía del material vista por medio del microscopio de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés), nos revela que, en la muestra NP1 se observa una superficie más uniforme con respecto a la muestra sin tratar NP0. Por otro lado, podemos notar que conforme aumenta la potencia del tratamiento con plasma la superficie se vuelve cada vez más irregular tal como se puede apreciar en las muestras NP2 y NP3 adicionalmente podemos observar que a potencias mayores la superficie se alisa, tal es el caso de la muestra NP4, esto se atribuye a la erosión de la superficie debida al plasma.

7.1.4 Porcentaje de NIPAAm injertado

Este análisis consiste en obtener por diferencia de masa la cantidad de polímero injertado, midiendo con una micro balanza la masa del polímero antes del tratamiento con plasma y al final de los lavados Soxlet, a continuación, se presenta una gráfica donde se representa el porcentaje de injerto con cada muestra.

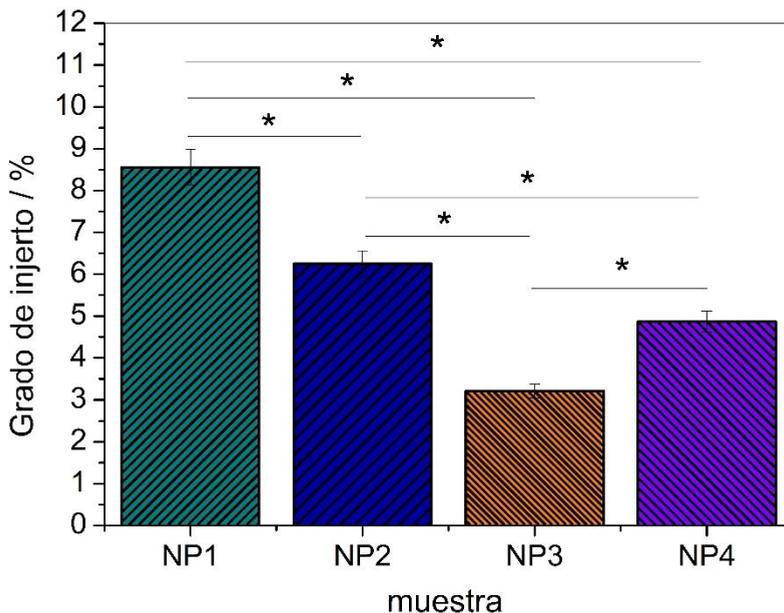


Figura 19. Gráfica de barras donde se ve el grado de injerto de cada una de las muestras.

Los asteriscos (*) en la gráfica son un recurso didáctico que sirven para indicar una comparación entre los valores de cada grupo de resultados.

De la Figura 19 donde se muestra el porcentaje de NIPAAm injertado, por medio del plasma, en la superficie de los andamios a diferentes potencias, se puede observar que el grado de injerto es pequeño comparado con otros trabajos

como el de Keen et al. donde se injertaba PHBV con etilendiamina por medio del tratamiento con plasma, obteniendo rendimientos del 7 al 42 por ciento⁸⁷. Sin embargo el porcentaje de injerto en esta tesis es ligeramente mayor al que se reporta en el trabajo de González et al. donde el grado de injerto presentó valores entre 0.17 y 3.9 %, al injertar P(3HB-co-HV) con HEAA por medio de radiaciones de plasma⁹⁷. Comparado con otras técnicas que involucran ondas de alta energía, el tratamiento de PHBV con HEMA por medio del tratamiento UV presente en el trabajo de Hoi-Kuan et al. presentó rendimientos de hasta 20 %⁸⁸ los cuales son mayores que los presentados con el método de esta tesis. Aunque como podremos ver más adelante a pesar del bajo grado de injerto las pruebas biológicas son prometedoras. También es posible notar que el grado de injerto tiende a disminuir conforme aumenta la potencia, esto se debe a que al aumentar la potencia del plasma la superficie comienza a erosionarse y por lo tanto la cantidad de polímero que logra injertarse es menor, de igual forma es posible observar que todas las muestras difieren significativamente entre sí. NP1 muestra el porcentaje más alto [w (%) = 8.5], seguido de NP2 [w (%) = 6.2], NP4 [w (%) = 4.8] y finalmente NP3 [w (%) = 3.2]. Adicional a esto es posible notar que valor del grado de injerto de la muestra NP4 aumentó ligeramente en comparación con NP3. Este resultado puede explicarse en parte porque w (%) se obtiene por balance de masa, pero no tiene en cuenta la longitud de las cadenas injertadas de PNIPAAm en la superficie ni la distribución de los oligómeros injertados, así como la formación de agregados y la degradación foto-inducida.

7.1.5 Goniometría

Esta técnica consiste en medir el ángulo de contacto entre un líquido (generalmente agua) y la superficie del andamio y de esta manera obtener la mojabilidad de un material, en la Figura 20, se puede apreciar el cambio del ángulo de contacto con respecto a la potencia del plasma con el que fue tratada la muestra y en la Tabla 3 se muestran los datos obtenidos con el método de Owens-Wendt para los andamios de PU-P(3HB).

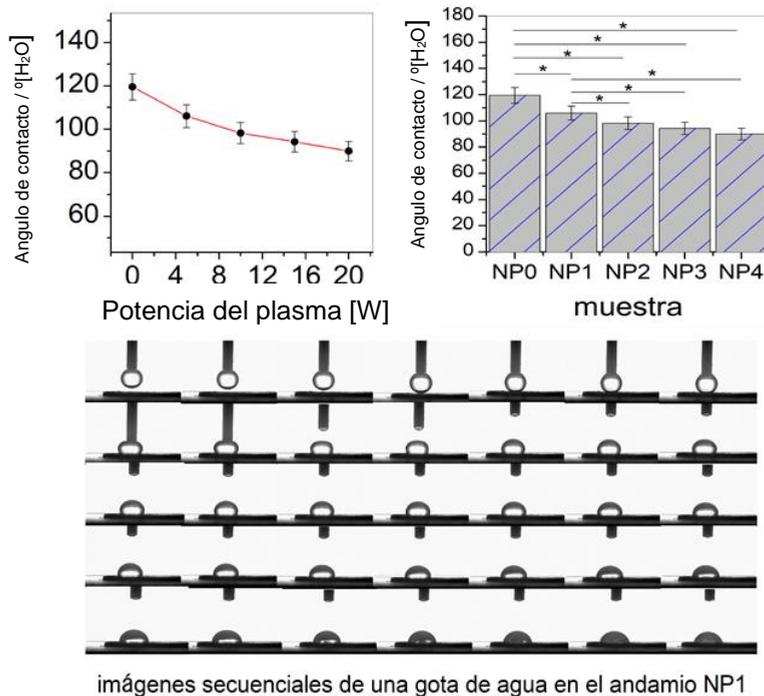


Figura 20. Resultados del estudio de goniometría.

Los asteriscos (*) en la gráfica son un recurso didáctico que sirven para indicar una comparación entre los valores de cada grupo de resultados.

Tabla 3. Ángulo de contacto estáticos y energías de superficie para las muestras NP0-NP4.

| Muestra | $\theta_c(H_2O)[^\circ]$ | $\theta_c(CH_2I_2)$ | γ_s^d | γ_s^p | γ_s |
|---------|--------------------------|---------------------|--------------|--------------|------------|
| NP0 | 119.5±2.4 | 49.8±1.5 | 46.5±0.9 | 2.9±0.1 | 49.4±0.5 |
| NP1 | 106.1±2.2 | 44.3±1.3 | 46.8±1.4 | 4.6±0.2 | 51.4±0.8 |
| NP2 | 98.2±1.9 | 41.2±1.2 | 46.5±1.3 | 5.4±0.3 | 51.9±0.8 |
| NP3 | 83.6 ±1.7 | 34.7±1.2 | 47.3±1.4 | 5.7±0.3 | 53.1±0.6 |
| NP4 | 81.2±1.6 | 33.6±1.3 | 47.8±1.4 | 6.1±0.3 | 53.9±0.6 |

De las medidas de los ángulos de contacto estáticos y las energías de superficie estimados por el modelo de Owens-Wendt que se muestran en la Tabla 3, es posible observar que la muestra NP0 tiene una diferencia significativa en el ángulo de contacto con respecto a las muestras injertadas. También podemos notar que los ángulos de contacto de las muestras injertadas tienen una tendencia a disminuir conforme aumenta la potencia (Figura 20), esto se puede explicar por la hidrofiliidad de la molécula injertada (NIPAAm) y el cambio de topografía tal como se muestra en la imagen de microscopía de AFM (Figura 18) donde se ve que al aumentar la potencia del plasma hay un efecto de alisamiento (degradación foto inducida) en la superficie del andamio (Figura 18 incisos D y E) tendiendo a un régimen tipo Wenzel (en el cual la superficie se moja completamente) por lo que el ángulo de contacto disminuye, mientras que en la muestra NP1 debido a que la topografía de la muestra es más rugosa(Figura 18 incisos A y B), puede tender a un régimen de tipo Cassie-Baxter (presencia de burbujas de aire en las cavidades del material) por lo que el ángulo de contacto es mayor que el del resto de las muestras injertadas. Por lo que podemos

decir que el tratamiento con plasma contribuye a que la superficie aumente su hidrofiliidad, esto se debe tanto a la hidrofiliidad de la molécula injertada (NIPAAm) como al cambio de la topografía.

Podemos notar además, que la tendencia decreciente de los ángulos de contacto y las tendencias crecientes del componente dispersivo (γ^{sd}), el componente polar (γ^{sp}) y los γ^s , son consistentes con el aumento en el grado de hidrofilia.

7.1.6 Estudio de porosidad BET

Este estudio consiste en permitir la adsorción de un gas, generalmente nitrógeno, en una muestra. Con los resultados obtenidos se hacen correlaciones matemáticas por medio de modelos como el de Langmuir, BET, BJH, entre otros, lo que permite conocer la arquitectura porosa del andamio. En las Figuras 21 y 22 se observan las gráficas de adsorción y desorción de Nitrógeno para cada uno de los andamios.

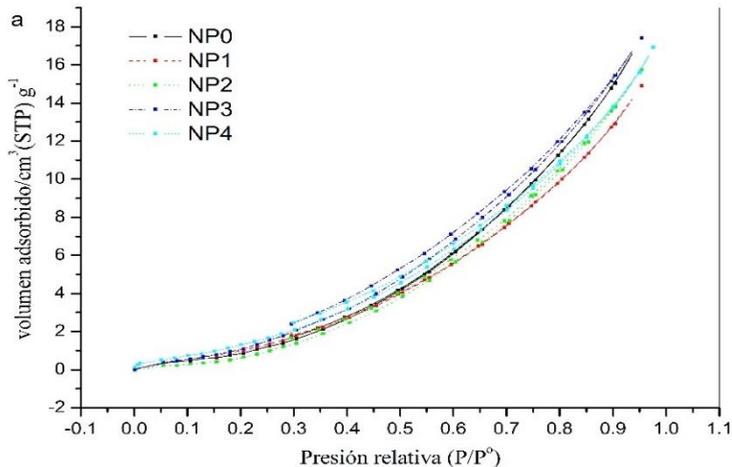


Figura 21. Isoterma de adsorción-desorción de N₂ de las muestras NP0-NP4.

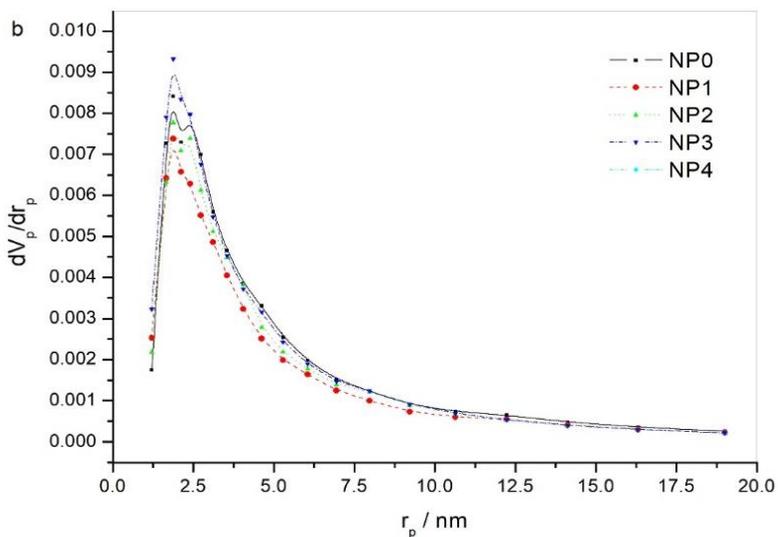


Figura 22. Distribuciones de tamaño de poro de los andamios.

Tabla 4. Donde se muestran: área superficial, volumen de macro y microporo, porcentaje de porosidad y diámetro de poro.

| Muestras | S_{BET} (m^2g^{-1}) | V_p (cm^3g^{-1}) | V_μ (cm^3g^{-1}) |
|----------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| NP0 | 3.15 ± 0.09 | 0.027 ± 0.001 | 0.72 ± 0.001 |
| NP1 | 4.28 ± 0.13 | 0.023 ± 0.001 | 0.98 ± 0.002 |
| NP2 | 3.39 ± 0.10 | 0.024 ± 0.001 | 0.78 ± 0.001 |
| NP3 | 4.21 ± 0.13 | 0.027 ± 0.001 | 0.97 ± 0.001 |
| NP4 | 4.86 ± 0.15 | 0.026 ± 0.001 | 1.12 ± 0.031 |

| Muestras | P (%) | D_p (nm) |
|----------|-----------------|------------------|
| NP0 | 14.2 ± 0.56 | 34.18 ± 1.03 |
| NP1 | 9.6 ± 0.38 | 21.52 ± 0.64 |
| NP2 | 4.5 ± 0.19 | 28.73 ± 0.86 |
| NP3 | 9.8 ± 0.39 | 25.65 ± 0.77 |
| NP4 | 13.1 ± 0.42 | 21.55 ± 0.65 |

Las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno y las distribuciones de tamaño de poro de los andamios compuestos de PU se muestran en las Figura 21 y 22, en las cuales se puede observar que se presenta una isoterma tipo V con un circuito de histéresis tipo H4, lo cual de acuerdo con la IUPAC⁹⁸ indica que la estructura es mesoporosa y que la distribución de tamaño de poro es estrecha. También es podemos notar que la distribución del tamaño de poro es similar para todas las muestras injertadas el cual tiene un valor promedio de 24 nm como se muestra en la Tabla 4 lo que confirma la estructura mesoporosa. Adicionalmente podemos ver que el porcentaje de porosidad y el diámetro de poro sugieren una disminución en el compuesto injertado en comparación con el polímero puro (Tabla 4) esto es de esperarse ya que después del injerto es posible que algunos poros se hayan cerrado o bien que haya disminuido su diámetro debido a las cadenas de NIPAAm injertadas. Sin embargo, esto no es preocupante ya que, a pesar de la disminución en el diámetro, la estructura mesoporosa se mantiene permitiendo la proliferación celular dentro del andamio.

Lo antes mencionado concuerda con lo obtenido en el trabajo de Zhao S.⁹⁹ en el cual se obtuvieron andamios de poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) (P(3HB)P(3HB)HHx) de estructura mesoporosa y se obtuvieron buenos resultados biológicos con este tipo de morfología. El material utilizado por Zhao pertenece a la familia de los PHA tal como el P(3HB) utilizado en el presente trabajo.

7.2 Caracterización Biológica

7.2.1 Estudio *in vitro* (citotoxicidad)

El estudio de viabilidad celular de fibroblastos dérmicos humanos (FDH) sobre los andamios de PU/P(3HB) correspondientes a las muestras NP0-NP4 nos muestran lo siguiente:

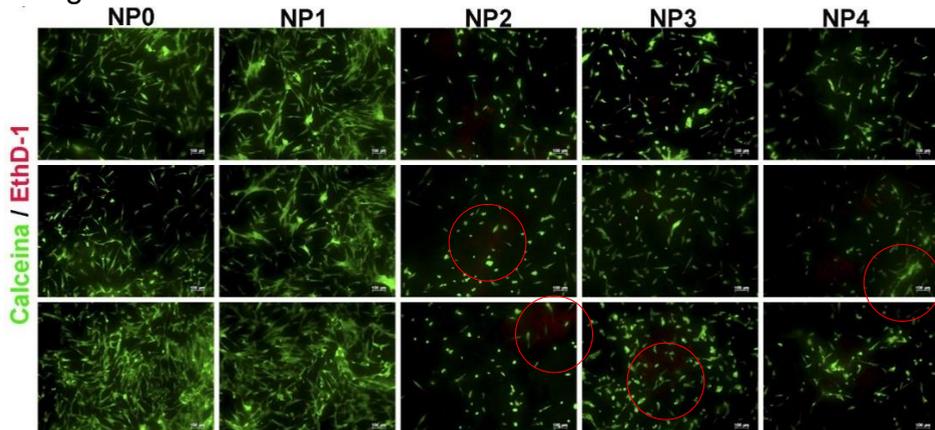


Figura 23. Micrografía de fluorescencia de los ensayos de viabilidad celular sobre polímeros compuestos de PU/P(3HB) para fibroblastos dérmicos humanos después de 24 h de cultivo sobre los andamios modificados, en verde se muestran las células vivas teñidas con calceína y en rojo las muertas teñidas con homodimero de etidio-1. Los círculos en rojo muestran las células muertas en el campo.

Micrografías de fluorescencia

Consisten en teñir las muestras con Calceína y EthD para que al momento de verlas al microscopio sea posible diferenciar las células vivas, las cuales serán pintadas de verde por la calceína, de las muertas, las cuales serán pintadas de rojo por el EthD.

De las micrografías de fluorescencia (Fig. 23) podemos notar que no se observan efectos tóxicos inducidos por las muestras pues la cantidad de células muertas que se

observan es pequeña, estos resultados concuerdan con los de las pruebas de MTT (que se explicarán más adelante). También se observa por las proyecciones citoplasmáticas de los HDF en las muestras NP0 y NP1, que mostraron una morfología extendida (esto quiere decir que los HDF tienen mayor afinidad por la muestra NP1, la cual presenta el mayor porcentaje de injerto), mientras que las células del resto de los compuestos mostraron una apariencia algo redondeada y corta, lo que indica que NP0 y NP1 son más permisivos para la adhesión de las células las cuales se extienden y aplanan de una manera más fácil sobre este tipo de superficies.

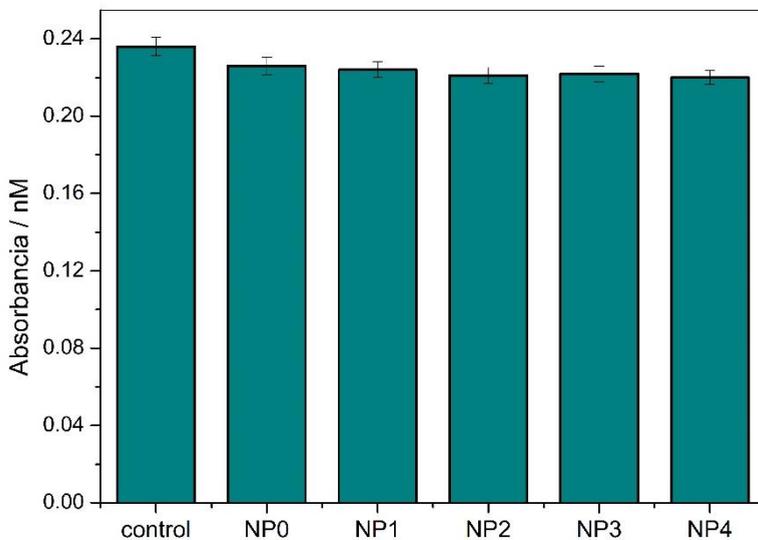


Figura 24. Gráfica del ensayo de MTT de los andamios sin (NP0) y con modificación (NP1-NP4) de la superficie. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando análisis de varianza vía ANOVA.

Del ensayo de citotoxicidad MTT el cual consiste en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-

2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizado por la encima mitocondrial succinato deshidrogenasa, permitiendo así determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas y de esa forma medir la supervivencia celular, podemos observar que el valor de absorbancia de las muestras NP0 a NP4 con respecto al control es casi idéntico, tampoco se encuentran diferencias significativas para el efecto no citotóxico inducido por las muestras, ya sea por el polímero base o por el NIPAAm injertado (Figuras 23-26). Adicionalmente podemos ver que los andamios (NP0 a NP4) permiten el crecimiento de la mayoría de los fibroblastos (> 98%) después de 24 h.

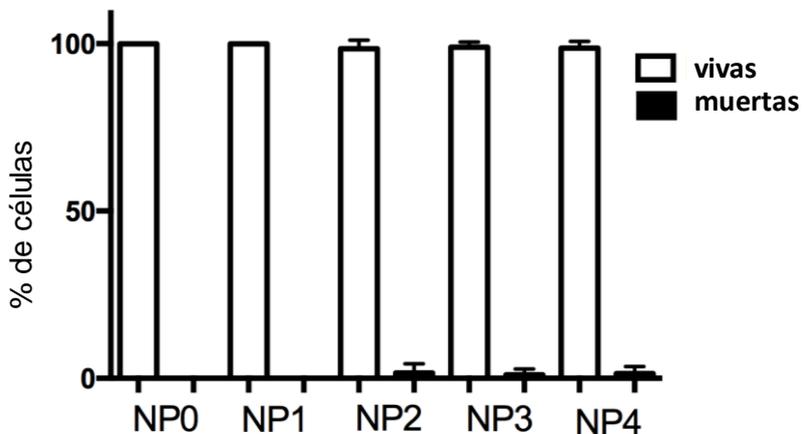


Figura 25. Análisis de viabilidad Celular para los andamios con (NP1-NP4) y sin modificación (NP0) de la superficie. El porcentaje de células vivas y muertas se determinó utilizando el software ImageJ.

El ensayo de viabilidad celular el cual consistió en obtener el porcentaje promedio por campo de células vivas (color verde) y muertas (color rojo) (Fig. 23) observadas en el microscopio de fluorescencia, este ensayo mostró que hay

un pequeño porcentaje de células muertas en las muestras NP2, NP3 y NP4, las cuales se pueden observar en los círculos color rojo de la Figura 23, a pesar de esto, como se observa en la Figura 25, la cantidad de células vivas es mucho mayor que la de células muertas para todas las muestras lo cual concuerda tanto con las micrografías como con el ensayo MTT.

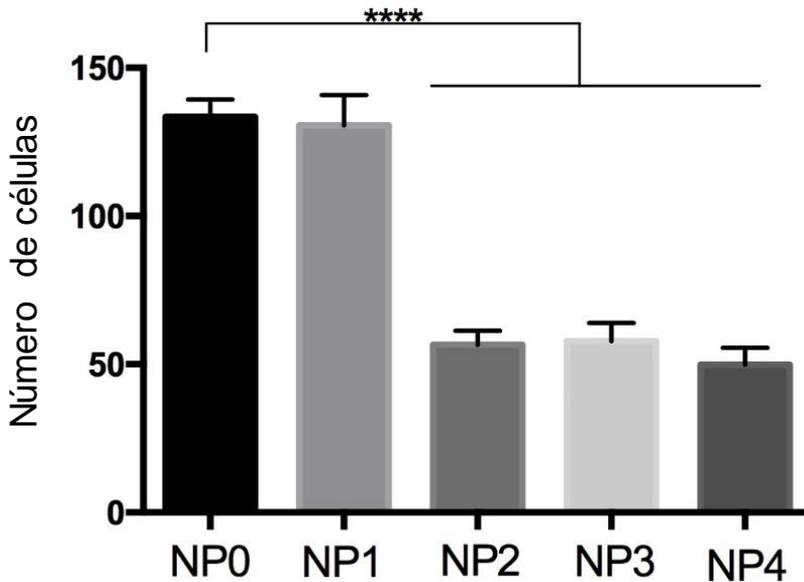


Figura 26. Gráfica del número de fibroblastos dérmicos humanos por campo microscópico en las muestras de NP0-NP4. Los asteriscos (*) en la gráfica son un recurso didáctico que sirven para indicar una comparación entre los valores de cada grupo de resultados.

Otra manera de cuantificar las células vivas y muertas se muestra en la Figura 26 en la cual se muestra el número de células por campo microscópico para cada una de las muestras de esta manera es posible ver que existe una

diferencia significativa en el número promedio de HDF por campo de microscopio entre las muestras tal como se muestra en la Figura 26 siendo que en los andamios NP2, NP3 y NP4 disminuyeron el número de células por campo en comparación con NP0 y NP1. Por otro lado, la muestra NP1 exhibe un ligero aumento en el crecimiento celular con respecto a NP0.

La disminución de la adhesión celular y el crecimiento con el aumento de la hidrofiliidad de la superficie concuerdan con el injerto de acrilamida inducido por la radiación plasmática en poli (3-hidroxi octanoato) así como una mayor interacción con la célula de ovario de hámster chino en el trabajo de Kim H.⁸⁴. Del mismo modo, los sustratos de poli (ácido 3-hidroxibutírico-ácido co-3-hidroxi valérico) tratados con plasma de nitrógeno en el trabajo de Lucchesi C.¹⁰⁰ muestran una mejor fijación, propagación y crecimiento de fibroblastos en matrices con hidrofilia moderada.

7.2.2 Estudio de biocompatibilidad *in vivo*

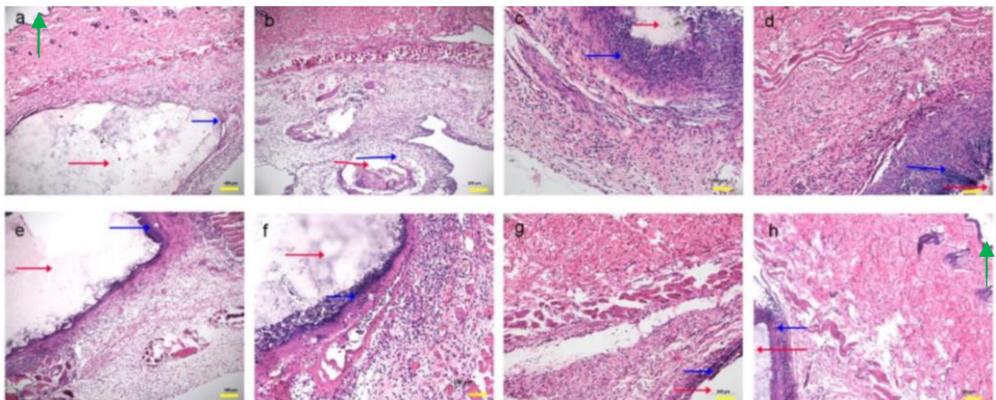


Figura 27. Tinción histológica de las muestras NP0 y NP1.

Las muestras NP0 (incisos a, b, c y d) y NP1(incisos e, f, g y h) fijadas en parafina, a los 3 (incisos a y e), 7 (incisos b y f), 14 (incisos c y g) y 21 días (incisos d y h). Las flechas rojas apuntan a la presencia y homogeneidad estructural de ambos andamios. Las flechas verdes (Figura a y h) muestran la interfaz del tejido y la piel del ratón CD1. Las flechas azules resaltan la aparición de tejido fibroso e infiltrados inflamatorios en la periferia de los polímeros.

A través de las imágenes de la tinción histológica de andamios compuestos de PU-P(3HB) podemos observar que, a los tres días de implantación subcutánea, la muestra NP0 revela una respuesta inflamatoria menos grave en comparación con la muestra NP1 (Figura 27 incisos A y E). Esta tendencia se observa durante tres días subsecuentes a la implantación subcutánea (Figura 27 incisos B y F). Sin embargo, después de 14 días de implantación la muestra NP0 exhibe una respuesta inflamatoria más aguda que NP1 (Figura 27 incisos C a H). Por lo tanto, a largo plazo, las muestras tratadas con plasma tienen una aceptación más amplia por el tejido circundante en comparación con el PU-P(3HB) no tratado. Adicionalmente, la presencia de tejido fibroso que rodea los poliuretanos muestra que las células penetran en los microporos del material.

8 Conclusiones

- a) La superficie de los andamios compuestos de poliuretano P(3HB) puede modificarse con NIPAAm mediante la polimerización de injerto inducida por radiación de plasma
- b) A partir de los resultados obtenidos del FTIR, el cambio del ángulo de contacto, el balance de masa y las diferentes respuestas biológicas es posible deducir que las muestras NP1-NP4 fueron modificadas exitosamente con NIPAAm.
- c) Las propiedades bio-interfaciales de los compuestos están influenciadas por el cambio en los poderes de administración del tratamiento con plasma.
- d) La superficie de los andamios se volvió más hidrofílica después del injerto de PNIPAAm.
- e) Los grupos funcionales determinados por la técnica FTIR corresponden con la estructura molecular propuesta.
- f) Se obtienen bajos grados de injerto (hasta 9%) para los productos.
- g) La superficie de los andamios modificados depende en gran medida de la potencia del plasma de Argón.
- h) Las propiedades hidrofílicas/hidrofóbicas se puede ajustar con la potencia del plasma la cual debe permanecer dentro de un intervalo (5 y 15 W) que no afecte la integridad del andamio.
- i) El análisis de textura mostró que las áreas de superficie BET y los parámetros de poro no cambiaron significativamente después del tratamiento con plasma.

- j) Todos los andamios revelaron ser no tóxicos y con una alta viabilidad de fibroblastos in vitro. Sin embargo, la muestra NP1 ha demostrado una capacidad superior para mejorar la fijación de fibroblastos, la propagación de la adhesión y el crecimiento en comparación con las muestras no tratadas o tratadas con una mayor potencia de suministro de plasma de Argón.
- k) Los resultados de los estudios in vivo sugieren que las estructuras modificadas por plasma son biocompatibles y probablemente impidieron la formación de biopelículas, ya que se ajustan mejor para implantarse por vía subcutánea en el modelo de ratones Cd1. Los materiales modificados lograron una mejor aceptación, como lo demuestra una respuesta inflamatoria menos severa en comparación con los andamios sin modificar a los 21 días de la implantación.

9 Perspectivas

De acuerdo con lo expuesto por este trabajo, es fácil determinar el —¿Qué sigue? — de esta investigación. De acuerdo con los resultados obtenidos, para el mecanismo de reacción, es necesario realizar un análisis de espectrometría de masas para complementar la información acerca de la estructura química del andamio. En cuanto al tratamiento por plasma todas las muestras se sometieron al plasma en intervalos de tiempo iguales (1 min) por lo que se propone hacer pruebas a diferentes tiempos con los valores de potencia (5, 10, 15 y 20 W) fijos para obtener una combinación donde se injerte la mayor cantidad de NIPAAm, sería interesante ver si con una mayor cantidad de injerto ocurren cambios notables en la morfología al ser vista por SEM, como afecta esto la porosidad del andamio y si la respuesta biológica sigue siendo favorable.

Por otro lado al momento de realizar el implante de los andamios en los ratones, el veterinario Hugo Lecona mencionó que los andamios eran un poco duros, lo cual me lleva a reflexionar, que la literatura menciona, que es deseable que los andamios tengan propiedades biomiméticas, por lo que se propone utilizar el HMDI en su forma lineal en lugar de utilizar un trímero, de esta manera evitaríamos la formación de una red entrecruzada, lo cual tendrá un impacto en las propiedades del polímero, otra alternativa sería probar con un isocianato y un poliol diferente. Otra alternativa interesante sería probar diferentes métodos de polimerización como la voltamperometría cíclica o el lixiviado de sales, adicionalmente se podrían probar distintos métodos de moldeado como la impresión 3D o el electro hilado y de esta manera estudiar los efectos en la morfología del

andamio, así como el impacto de estos cambios en las propiedades biológicas del material.

Para los estudios *in vivo*, se propone realizar estudios más largos para ver de esta manera que pasa con la biocompatibilidad del andamio y con su degradación, así como realizar diferentes estudios para conocer cuáles son los productos de degradación que se forman. Adicionalmente el material debería ser probado con diferentes tipos de células para ver sus efectos en diferentes líneas celulares y obtener información sobre las regiones donde sería posible el injerto.

Por último, habiendo tenido todo lo anterior en cuenta, hay que recordar que la meta de este proyecto es crear un material que sea de ayuda para el tratamiento de padecimientos humanos por lo que sería necesario cumplir con las pruebas que piden organismos como la FDA los cuales se pueden ver en la norma ISO-10993-1 “Sobre la evaluación biológica de dispositivos médicos”¹⁰¹ o en la “Guía de Pruebas para Implantes de Polímeros Biodegradables”¹⁰², también se pueden consultar normas como la ASTM en el documento de “Productos Médicos para Ingeniería de Tejidos”¹⁰³ así como las que vienen en el libro “Asuntos Regulatorios para Biomateriales y Dispositivos Médicos”¹⁰⁴ garantizando con esto un material seguro y de calidad para los futuros usuarios.

10 ANEXO (I) Métodos de caracterización fisicoquímica

10.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido o SEM (por sus siglas en inglés) permite la observación y caracterización de materiales heterogéneos orgánicos e inorgánicos a una escala nanométrica o micrométrica¹⁰⁵. El microscopio de barrido electrónico (Figura 28) es capaz de obtener imágenes en 3D de una gran variedad de materiales¹⁰⁵. El mayor uso del SEM es la obtención de imágenes topográficas en un rango de 10 a 10,000x¹⁰⁵.

En esta técnica, el área o el volumen a ser examinados son irradiados con un haz enfocado de electrones, el cual puede ir barriendo a lo largo de la superficie de la muestra para formar imágenes o puede estar estático para obtener un análisis en una posición¹⁰⁵. Los tipos de señales producidas por la interacción entre el haz de electrones y la muestra incluyen electrones secundarios, electrones retro dispersados, rayos-x característicos y fotones de diferente energía¹⁰⁵. Estas señales se obtienen de emisiones específicas, las cuales se utilizan para examinar ciertas características de la muestra, tales como: la topografía superficial, la cristalografía y la composición, entre otras¹⁰⁵.

En la Figura 28 se muestra una imagen del equipo de microscopía utilizado para el estudio SEM.

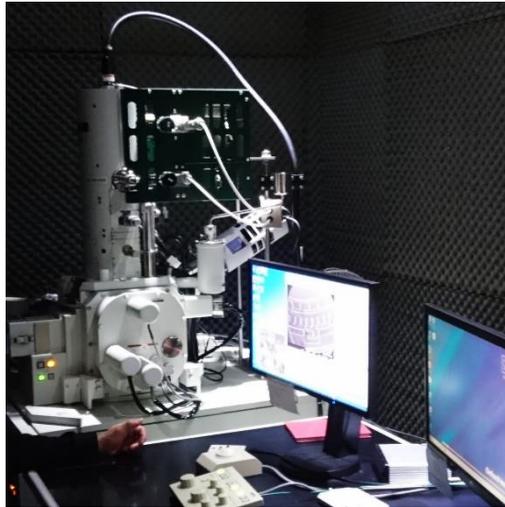


Figura 28. Microscopio electrónico de barrido (SEM).

10.2 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés) es una técnica avanzada para el estudio de las propiedades de los materiales a escala atómica¹⁰⁶. Esta técnica provee un perfil en tercera dimensión de la superficie a escala nanométrica midiendo las fuerzas entre una sonda afilada (<10 nm) y una superficie a una distancia muy corta (0.2-10 nm de separación entre la sonda y la muestra)¹⁰⁷. Esta técnica de microscopía ofrece una serie de ventajas como: buena resolución; posibilidad de detectar algunas propiedades del material mediante una modificación simple al equipo; obtención directa de imágenes 3D de la estructura superficial; la muestra no corre riesgo de sufrir daños por radiación como en el caso de las microscopías SEM y TEM; es una técnica útil para la caracterización de materiales nanocompuestos; entre otras¹⁰⁸.

10.3 Funcionamiento del AFM

La sonda es colocada al final de una viga y la fuerza entre la sonda y la muestra dependerá de la constante de rigidez de un resorte, la cual es descrita por la ley de Hooke¹⁰⁷. El sistema de la viga actúa como un sensor de fuerza, estas fuerzas nos proporciona información sobre la topografía de la muestra¹⁰⁶. Si la sonda y la muestra están demasiado cerca, las fuerzas de atracción desvía la viga hacia la muestra y cuando la punta entra en contacto con la muestra, las fuerzas de repulsión desvía la viga lejos de la muestra, este fenómeno es explicado gracias al principio de exclusión de Pauli¹⁰⁶. Un láser detecta las desviaciones de la viga, esto sucede debido a que el láser incide sobre la superficie de la viga y es reflejada a un detector, cualquier desviación de la viga causará cambios en la dirección en la que se refleja el haz de luz que va hacia el detector de alta resolución. Los cambios pueden ser tanto grandes como pequeños, sin embargo, el detector es suficientemente sensible para amplificar incluso desviaciones muy pequeñas¹⁰⁶.

El microscopio de fuerza atómica puede operar de tres formas distintas^{107,108} las cuales se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 5. Características, ventajas y desventajas sobre los distintos tipos de microscopía de fuerza atómica (AFM).

| Modo | Características | Ventajas | Desventajas |
|----------|--|--|--|
| Contacto | <ul style="list-style-type: none">-La sonda de arrastra por la superficie.-Se supone que el movimiento de la viga | <ul style="list-style-type: none">-Modalidad más sencilla.-Ideal para muestras rígidas.-Escaneo rápido | <ul style="list-style-type: none">-Posibilidad de contaminación de la muestra.-Puede deformarse la muestra. |

| | | | |
|--------------------|---|--|---|
| | <p>corresponde directamente a la topografía superficial.</p> | | <p>-Debido a las fuerzas de arrastre se puede dañar tanto la punta como la muestra</p> |
| <p>No contacto</p> | <p>-La viga vibra cerca de su frecuencia de resonancia (100kHz). -Se separa la punta de la muestra entre 1 y 10 nm. -La frecuencia de resonancia y amplitud de la viga cambia conforme se acerca a la superficie.</p> | <p>- No hay contaminación de la muestra</p> | <p>-Debido a las fuerzas de van der Waals y el alto coeficiente de elasticidad la señal se vuelve pequeña lo que causa lecturas lentas. -Frecuentemente requiere de ultra alto vacío para tener una buena resolución</p> |
| <p>Tapping</p> | <p>- La viga oscila cerca de su frecuencia de resonancia, pero la amplitud es de entre 20 y 200 nm. -Durante cada ciclo de oscilación, la punta hace contacto con la muestra por una ligera fracción de tiempo.</p> | <p>-Es ideal para muestras suaves. -A pesar de que la resolución es similar al modo de contacto, la fuerza aplicada es menor. -Ideal para muestras biológicas.</p> | <p>-Escaneo lento. -Difícil para usar en líquidos.</p> |

10.4 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

La espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) es una técnica de análisis químico que nos permite saber que moléculas están presentes en una muestra y en que concentraciones¹⁰⁹. En esta técnica se hace pasar radiación IR a través de una muestra, parte de esta radiación es absorbida por la muestra y retransmitida¹⁰⁹. El espectro resultante, representa la absorción y transmisión molecular, obteniendo con esto para cada molécula un patrón único, como una huella digital¹⁰⁹. Las bandas de absorción que se tienen corresponden a la frecuencia de vibración de los enlaces atómicos que forman la molécula¹⁰⁹. Esta valiosa técnica de espectroscopia nos permite recabar información sobre los grupos funcionales de una molécula, sin embargo, tiene ciertas limitaciones que se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Ventajas y desventajas sobre la espectroscopia de infrarrojo (FTIR).

| Ventajas | Desventajas |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Se pueden analizar una gran cantidad moléculas.• La información del espectro es vasta.• Relativamente rápida y sencilla.• Poco costosa.• Tiene buena sensibilidad, ya que se pueden detectar hasta picogramos, dependiendo de la técnica que se utilice. | <ul style="list-style-type: none">• No da información sobre la estereoquímica de la molécula.• Poco eficiente en mezclas• Es una técnica mayormente cuantitativa |

10.5 Método de Owens-Wendt

La adhesión es una manifestación de las fuerzas de atracción que existen entre los átomos, las cuales caen en tres diferentes categorías¹¹⁰:

1. Primarias o químicas.
2. Cuasi-químicas o puentes de hidrógeno.
3. Secundarias o de van der Waals.

En la última categoría se encuentran las fuerzas de Keesom que surgen de moléculas con dipolos permanentes, las fuerzas de Debye causadas por una molécula con un dipolo permanente que induce un dipolo en una molécula vecina por polarización, y las fuerzas de dispersión de London que surgen de dipolos instantáneos producidos por el movimiento de electrones dentro de la molécula¹¹⁰. La mojabilidad termodinámica (ángulo de contacto) es una función de cuatro parámetros dados los cuales se muestran en la Figura 29.

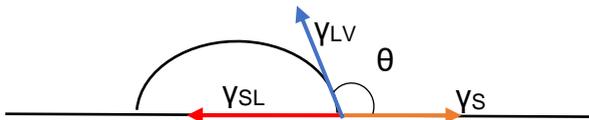


Figura 29. Componentes de las fuerzas que interactúan en una gota en equilibrio termodinámico sobre una superficie.

Estos parámetros están representados por la ecuación de Young:

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \pi_e$$

De acuerdo con Owens la tensión superficial crítica de humectación γ_c , es una cantidad empírica que se define

como el valor de γ_{LV} en la gráfica $\cos \theta$ vs γ_{LV} , cuando $\cos\theta=1$ por lo que la ecuación de Young queda como:

$$\gamma_{LV} \cos \theta = (1)\gamma_C = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \pi_e$$

Adicional a esto, Owens considera que:

1. π_e es 0 cuando θ es cero
2. $\gamma_{LV} = \gamma_L^d + \gamma_L^h$
3. $\gamma_{SL} = \gamma_{SV} + \gamma_{LV} - 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} - 2\sqrt{\gamma_S^h \gamma_L^h}$

De esta manera, la nueva ecuación de Young será:

$$1 + \cos \theta = 2\sqrt{\gamma_S^d} \left(\frac{\sqrt{\gamma_L^d}}{\gamma_{LV}} \right) + 2\sqrt{\gamma_S^h} \left(\frac{\sqrt{\gamma_L^h}}{\gamma_{LV}} \right)$$

El valor de γ_L^h puede ser determinado por medio de valores ya existentes de γ_{LV} y γ_L^d por medio de la consideración 2. Adicionalmente, midiendo el θ entre dos líquidos diferentes contra un sólido, se obtienen ecuaciones simultaneas que pueden ser resueltas para γ_S^d y γ_S^h por lo que es posible obtener una buena aproximación del valor de γ_s por analogía con la consideración 2¹¹⁰.

De esta manera, Owens y Wendt proponen un método para aproximar la energía superficial del sólido midiendo el ángulo de contacto del sólido con agua y con yoduro de metileno para obtener la componentes polares y dispersivas y de esta manera obtener la energía de la superficie. De acuerdo con el artículo, este método se aplica especialmente para la caracterización superficial de sólidos.

10.6 Goniometría

Esta técnica nos permite tener información sobre la mojabilidad de nuestro andamio al medir el ángulo de contacto de una gota de agua que se dispone en la superficie. Cuando una fase líquida y una fase sólida entran en contacto, forman una interfase común. La mojabilidad es la capacidad de los sólidos para formar interfases con los líquidos. La mojabilidad de un determinado sólido por un líquido viene determinada por el ángulo de contacto θ .

Por convenio, cuando $\theta < 90^\circ$ se dice que el líquido moja al sólido o que el sistema moja. El sistema no moja cuando $\theta > 90^\circ$; en este caso, el líquido no moja al sólido. Un caso extremo ocurre cuando θ se aproxima a cero, entonces el líquido se expande sobre el sólido y se dice que el mojado es perfecto.

10.7 Isoterma de Brunauer, Emmett y Teller (BET)

Mediante esta técnica es posible conocer el área superficial de una partícula. El método de BET se basa en el cálculo del número de moléculas del adsorbato, generalmente nitrógeno, adsorbidas en monocapa, es decir el número de moléculas necesario para cubrir la superficie del sólido con una única capa. Al ponerse en contacto un gas con la superficie de un sólido se produce un equilibrio entre las moléculas adsorbidas y las moléculas en fase gaseosa, que depende de la presión del gas y de la temperatura. La relación entre las moléculas adsorbidas y la presión a temperatura constante se puede recoger en una isoterma de adsorción. Estas isotermas informan directamente el volumen adsorbido a una determinada presión y permiten también calcular el área superficial del sólido, el tamaño y forma de poro y su distribución, los calores de adsorción,

etc. Hay seis isothermas de adsorción estándares para gases en sólidos^{98,111}:

El tipo I, se asocia con sólidos micro porosos que tienen superficies externas relativamente pequeñas (por ejemplo, carbón activado, zeolitas moleculares y ciertos tipos de óxidos). La cantidad limitante de adsorción es gobernada por el volumen accesible de microporos en lugar del área superficial interna.

El tipo II, es la forma normal de una isoterma obtenida con un material adsorbente no poroso o macro poroso. Este tipo de isoterma representa una adsorción monocapa-multicapa. El tipo III, no es muy común, pero hay un número de sistemas (por ejemplo, nitrógeno en polietileno) que dan isothermas con curvatura gradual. Indica interacciones adsorbato-adsorbentes débiles. El tipo IV, se caracteriza por una curva de histéresis causada por condensación capilar en mesoporos. Este tipo de isothermas se da en muchos adsorbentes meso-porosos industriales. Una isoterma tipo V no es común. Está relacionada a la isoterma tipo III en donde las interacciones adsorbato-adsorbente son débiles. Se obtiene con ciertos adsorbentes porosos. Una isoterma tipo VI, donde la forma de los escalones depende del sistema y la temperatura, representa una adsorción en multicapas sobre una superficie uniforme no porosa.

10.8 Técnica histológica

Debido a que la mayoría de las sustancias de los componentes biológicos se encuentran en un estado coloidal, lo que hace imposible la práctica de secciones muy finas¹¹², para poder observar dicha sustancia en el microscopio se debe aplicar un proceso para preservar y

lograr la consistencia adecuada para el posterior estudio del tejido. Se denomina técnica histológica al conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico ya sea animal o vegetal para prepararlo y llevarlo a las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través de un microscopio¹¹³. La técnica histológica se divide en los siguientes pasos^{112,113}:



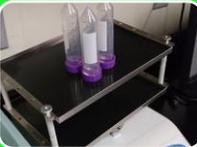
Toma de muestra

- Biopsia (consiste en la toma de un tejido u órgano de un ser vivo)
- Necropsia (los tejidos y órganos se obtienen de seres muertos.)



Fijación

- Es un procedimiento para detener la vida de las células e impedir modificaciones *post mortem* manteniendo la estructura morfológica de células y tejidos.
- EL fijador inmoviliza por coagulación o precipitación las proteínas e inhibe las enzimas.



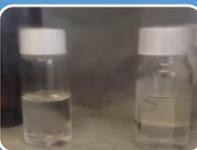
Deshidratación

- Extrae o remueve el agua de los tejidos fijados.
- Debe ser completa para que el bloque de parafina alcance la dureza requerida.



Diafanización

- Rempalzar por un solvente miscible con el alcohol y la parafina.



Inclusión

- Se forma el bloque de parafina.

11 ANEXO (II) HOJAS DE SEGURIDAD

A continuación, se presentan una serie de tablas la cuales contienen la información condensada de las hojas de seguridad para los materiales utilizados, los cuales se mencionan en el apartado 6.1 del presente trabajo.

Tabla 7. Condensado de la hoja de seguridad para el P(3HB).

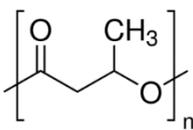
| | | |
|---|--|--|
| Nombre del producto: Poli[(R)-3-hidroxitirato] | |  <p>Estructura</p> |
| Identificación del Producto: Marca: Merck CAS: 29435-48-1 | Equipo de protección Personal (EPP): Lentes Guantes Bata | |
| Propiedades Físicoquímicas: Forma: Polvo Color: Blanco Olor: Inoloro Peso molecular [Da]: 60,000 | | |
| Estabilidad Química: Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas. Materiales incompatibles: Agentes oxidantes fuertes Productos de descomposición peligrosos: Productos de descomposición peligrosos formados en condiciones de incendio. - Óxidos de carbono | | |
| Métodos para el tratamiento de residuos: Producto: Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Envases contaminados: Eliminar como producto no usado. | | |

Tabla 8. Condensado de la hoja de seguridad para el monómero NIPAAm

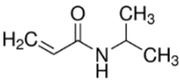
| | | |
|--|---|--|
| Nombre del producto: N -isopropilacrilamida | |  <p>Estructura</p> |
| Identificación del Producto: Marca: Merck CAS: 2210-25-5 Fórmula: C ₆ H ₁₁ NO | Equipo de protección Personal (EPP): Lentes Guantes Bata Respirador de partículas tipo P95 | |
| Propiedades Fisicoquímicas: Forma: Polvo Color: Blanco Peso molecular [g/mol]: 113.16 Punto de Fusión [°C]: 60-63 | | |
| Estabilidad Química: Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas. Materiales incompatibles: Agentes oxidantes fuertes Bases Fuertes Productos de descomposición peligrosos: Productos de descomposición peligrosos formados en condiciones de incendio. - Óxidos de carbono, Óxidos de Nitrógeno (NOx) | | |
| Métodos para el tratamiento de residuos: Producto: Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Envases contaminados: Eliminar como producto no usado. | | |
| Indicaciones de peligro: Nocivo en caso de ingestión Provoca irritación ocular grave | | |

Tabla 9. Condensado de la hoja de seguridad para el acetato de sodio.

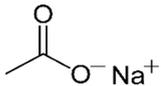
| | | |
|--|---|--|
| Nombre del producto: Acetato de sodio | |  Estructura |
| Identificación del Producto: Marca: Merck CAS: 127-09-3 Fórmula: C ₂ H ₃ NaO ₂ | Equipo de protección Personal (EPP): Lentes Guantes Bata Respirador de partículas tipo N95 | |
| Propiedades Fisicoquímicas: Forma: Sólido Color: Blanco Peso molecular [g/mol]: 82.03 Punto de Fusión [°C]: 300 Densidad [g/cm ³]: 1.53 Solubilidad en agua [g/l]: 1.25 | | |
| Estabilidad Química: Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas. Materiales incompatibles: Agentes oxidantes fuertes Productos de descomposición peligrosos: Productos de descomposición peligrosos formados en condiciones de incendio. - Óxidos de carbono, Óxidos de Sodio | | |
| Métodos para el tratamiento de residuos: Producto: Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Envases contaminados: Eliminar como producto no usado. | | |

Tabla 10. Condensado de la hoja de seguridad para el trimerico de HDMI.

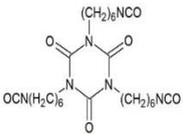
| | | |
|---|---|---|
| Nombre del producto: 1,6-Hexametilendiisocianato | |  <p>Estructura</p> |
| Identificación del Producto: Marca: Comex Nombre del producto: Catalizador 250 CAS: 28182-81-2 Fórmula del monómero: $C_8H_{12}N_2O_2$ | Equipo de protección Personal (EPP): Lentes Guantes Bata Mascarilla con filtro de carbón | |
| Propiedades Fisicoquímicas: Forma: Líquido Color: Transparente Peso molecular del monómero [g/mol]: 168.1931 Punto de Ebullición [°C]: 37.78 Densidad [g/cm ³]: 1.06 | |  <p>Pictogramas SGA</p> |
| Estabilidad Química: Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas. | | |
| Materiales incompatibles: Agentes oxidantes fuertes | | |
| Productos de descomposición peligrosos: Productos de descomposición peligrosos formados en condiciones de incendio. - Óxidos de carbono, Óxidos de Nitrógeno (NOx) | | |
| Métodos para el tratamiento de residuos: Producto: Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Envases contaminados: Eliminar como producto no usado. | | |
| Indicaciones de peligro: Líquido y vapores inflamables Nocivo si se inhala Nocivo en caso de ingestión Irritación ocular y cutánea | | |

Tabla 11 Condensado de la hoja de seguridad para las nanopartículas de silice.

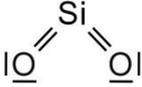
| | | |
|---|--|--|
| Nombre del producto: Dióxido de silicio | |  Estructura |
| Identificación del Producto: Marca: Merck CAS: 7631-86-9 Fórmula: SiO ₂ | Equipo de protección Personal (EPP): Lentes Guantes Bata Respirador para partículas P95 | |
| Propiedades Físicoquímicas: Forma: Polvo Color: Blanco Peso molecular [g/mol]: 60.08 Punto de Fusión [°C]: >1,600 | | |
| Estabilidad Química: Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas. | | |
| Materiales incompatibles: Agentes oxidantes fuertes | | |
| Precauciones: Evite la formación de polvo. Evitar respirar los vapores, la neblina o el gas. Asegúrese una ventilación apropiada. | | |
| Métodos para el tratamiento de residuos: Producto: Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Envases contaminados: Eliminar como producto no usado. | | |
| Indicaciones de peligro: Provoca daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas. No respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol. | | |

Tabla 12. Condensado de la hoja de seguridad para el metanol.

| | | |
|--|---|--|
| Nombre del producto: Metanol | | $ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array} $ <p>Estructura</p>  <p>Pictogramas SGA</p> |
| Identificación del Producto: Marca: Merck CAS: 67-56-1 Fórmula: CH ₄ O Sinónimos: Alcohol metílico | Equipo de protección Personal (EPP): Lentes Guantes Bata Respirador tipo AXBEK | |
| Propiedades Físicoquímicas: Forma: Líquido Color: Transparente Peso molecular [g/mol]: 32.04 Punto de Ebullición [°C]: 64.7 Densidad [g/cm ³]: 0.791 | | |
| Estabilidad Química: Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas. Materiales incompatibles: Magnesio, Zinc, Agentes oxidantes fuertes Posibilidad de reacciones peligrosas: Los vapores pueden formar mezclas explosivas con el aire Productos de descomposición peligrosos: Productos de descomposición peligrosos formados en condiciones de incendio. - Óxidos de carbono | | |
| Métodos para el tratamiento de residuos: Producto: Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Envases contaminados: Eliminar como producto no usado. | | |
| Indicaciones de peligro: Líquido y vapores inflamables Nocivo si se inhala Nocivo en caso de ingestión Causa daño ocular | | |

Tabla 13. Condensado para la hoja de seguridad de la resina hidroxilada.

| | | |
|---|--|---|
| Nombre del producto: Polyform 11,000 | |  <p>Estructura</p> <p>Pictogramas SGA</p> |
| Identificación del Producto: Marca: Comex CAS: 28182-81-2 Mezcla: Resina hidroxilada Acetato de n-butilo Bis-2-etil-hexanoato de zinc | Equipo de protección Personal (EPP): Lentes Guantes Bata | |
| Propiedades Físicoquímicas: Forma: Líquido Color: Transparente Punto de Ebullición [°C]: 37.78 Densidad [g/cm ³]: 0.99 | | |
| Estabilidad Química: Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas. Materiales incompatibles: Agentes oxidantes fuertes Productos de descomposición peligrosos: Productos de descomposición peligrosos formados en condiciones de incendio. - Óxidos de carbono, Óxidos Metálicos. | | |
| Métodos para el tratamiento de residuos: Producto: Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Envases contaminados: Eliminar como producto no usado. | | |
| Indicaciones de peligro: Líquido y vapores inflamables Nocivo si se inhala Nocivo en caso de ingestión Irritación ocular y cutánea | | |

12. Referencias Bibliográficas

1. Feldman, D. Polymer history. *Des. Monomers Polym.* **11**, 1–15 (2008).
2. Joel R. Fried. *Polymer Science and Technology*. (University of Cincinnati, 1995).
3. Christopher S. Brazel; Stephen L. Rosen. *Fundamental Principles of Polymeric Materials*. *John Wiley & Sons, Inc.* **1**, (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
4. Sun, S. F. *Physical Chemistry of Macromolecules*. (2004).
5. Chen, G. Q. & Wu, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **26**, 6565–6578 (2005).
6. Sagong, H., Son, H. F., Choi, S. Y., Lee, S. Y. & Kim, K. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 1–16 (2018).
7. Bonartsev, A. P. *et al.* 3D-Scaffolds from Poly(3-hydroxybutyrate)Poly(ethylene glycol) Copolymer for Tissue Engineering. *J. Biomater. Tissue Eng.* **6**, 42–52 (2016).
8. Nitschke, M. *et al.* Low pressure plasma treatment of poly (3-hydroxybutyrate): Toward tailored polymer surfaces for tissue engineering scaffolds. *J. Biomed. Mater Res.* **59**, 632–638 (2001).
9. Domínguez-díaz, M. *et al.* Thermo-mechanical properties , microstructure and biocompatibility in

poly- b -hydroxybutyrates (PHB) produced by OP and OPN strains of *Azotobacter vinelandii*. *Eur. Polym. J.* **63**, 101–112 (2015).

10. Superb K. Misra,† Sabeel P. Valappil,†,‡ Ipsita Roy, and A. R. B. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* **7**, (2006).
11. Bonartsev, A. P. *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) scaffolds with different microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells. *3 Biotech* **8**, 1–10 (2018).
12. Pradhan, S. Production , ultrasonic extraction , and characterization of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) using *Bacillus megaterium* and *Cupriavidus necator*. *Polym. Adv. Technol.* 1–9 (2018). doi:10.1002/pat.4351
13. E. I. Shishatskaya, T. G. Volova, A. P. Puzyr, O. A. M. Tissue Response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoates sutures.pdf. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **15**, 719–728 (2004).
14. Nagiah, N., Madhavi, L., Anitha, R., Srinivasan, N. T. & Sivagnanam, U. T. Electrospinning of poly (3-hydroxybutyric acid) and gelatin blended thin films: fabrication, characterization, and application in skin regeneration. *Polym. Bull.* **70**, 2337–2358 (2013).
15. C. Swornakumari, S. Meignanalakshmi*, R. L. and A. P. Preparation of microspheres using poly-3-hydroxybutyrate biopolymer and its characterization. *J. Environ. Biol.* **39**, (2018).

16. Shrivastav, A., Kim, H. Y. & Kim, Y. R. Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *Biomed Res. Int.* **2013**, 12 (2013).
17. Reusch, R. N. Low molecular weight complexed poly (3-hydroxybutyrate): a dynamic and versatile molecule in vivo. *Microbiology* **41**, 50–54 (1995).
18. Reusch, R. N. Biological complexes of poly-3-hydroxybutyrate. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**, 119–129 (1992).
19. Sparrow, A. W. Transport of poly-P-hydroxybutyrate in human plasma. *Biochim. Biophys.* (1992).
20. Rezwani, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J. & Roberto, A. Biodegradable and bioactive porous polymer / inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 3413–3431 (2006).
21. Brzeska, J. Synthesis and Properties of Polyurethanes Based on Synthetic Polyhydroxybutyrate for Medical Application. 1–24
22. Seppa, J. V. Synthesis and Characterization of a Biodegradable Thermoplastic Poly (ester - urethane) Elastomer. *Macromolecules* **30**, 2876–2882 (1997).
23. Fang, J., Ye, S., Shankarraman, V., Huang, Y. & Mo, X. Biodegradable poly (ester urethane) urea elastomers with variable amino content for subsequent functionalization with phosphorylcholine. *Acta Biomater.* **10**, 4639–4649 (2014).

24. Hye, J., Jeong, H., Heung, J., Yu, W. & Ho, J. Synthesis and characterization of biodegradable poly (3-caprolactone-co-b-butyrolactone) - based polyurethane. *Polym. Degrad. Stab.* **92**, 1186–1192 (2007).
25. Kiziltay, A. *et al.* Poly (ester-urethane) scaffolds : effect of structure on properties and osteogenic activity of stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1–13 (2013).
26. Loh, X. J., Tan, K. K., Li, X. & Li, J. The in vitro hydrolysis of poly(ester urethane)s consisting of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly(ethylene glycol). *Biomaterials* **27**, 1841–1850 (2006).
27. Liu, K. L. *et al.* Designing Poly [(R)-3-hydroxybutyrate] -Based Polyurethane Block Copolymers for Electrospun Nanofiber Scaffolds with Improved Mechanical Properties and Enhanced Mineralization Capability. *J. Phys. Chem. B* **22**, 7489–7498 (2010).
28. Ou, W., Qiu, H., Chen, Z. & Xu, K. Biomaterials Biodegradable block poly (ester-urethane) s based on poly (3-hydroxybutyrate- co -4-hydroxybutyrate) copolymers. *Biomaterials* **32**, 3178–3188 (2011).
29. Sajkiewicz, P., Brzeska, J., Denis, P. & Sikorska, W. The preliminary studies of a structure and electrospinning of new polyurethanes based on synthetic atactic poly [(R , S) -3-hydroxybutyrate]. *Bull. POLISH Acad. Sci.* **62**, 55–60 (2014).

30. Xue, D., Fan, X., Zhang, Z. & Lv, W. The Synthesis of Hydroxybutyrate-Based Block Polyurethane from Telechelic Diols with Robust Thermal and Mechanical Properties. *J. Chem.* **2016**, 1–10 (2016).
31. Brzeska, J., Dacko, P., Ge, K. & Janik, H. The Structure of Novel Polyurethanes Containing Synthetic Poly [(R , S) -3-hydroxybutyrate]. *J. Appl. Microbiol.* 1–7 (2012). doi:10.1002/app
32. Brzeska, J., Heimowska, A. & Rutkowska, M. Polyurethanes Based on Atactic Poly [(R , S) -3-hydroxybutyrate]: Preliminary Degradation Studies in Simulated Body Fluids. *J. Polym. Environment* **22**, 176–182 (2014).
33. Li, X., Loh, X. J., Wang, K., He, C. & Li, J. Poly (ester urethane) s Consisting of Poly [(R) -3-hydroxybutyrate] and Poly (ethylene glycol) as Candidate Biomaterials: Characterization and Mechanical Property Study. *Biomacromolecules* **6**, 2740–2747 (2005).
34. Abdel Aziz, M. S., Naguib, H. F. & Saad, G. R. Non-isothermal crystallization kinetics of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) in poly(3-hydroxybutyrate-co-butylene adipate) urethanes. *Thermochim. Acta* **591**, 130–139 (2014).
35. KIZILTAY, A. Biodegradable poly(ester-urethane) scaffolds for bone tissue engineering. (MIDDLE EAST TECHNICAL UNIVERSITY, 2011).
36. Lee, J. & Gardella, J. A. In Vitro Hydrolytic Surface Degradation of Poly (glycolic acid): Role of the

- Surface Segregated Amorphous Region in the Induction Period of Bulk Erosion. *Macromolecules* **34**, 3928–3937 (2001).
37. Ista, L. K., Mendez, S., Pérez-Luna, V. H. & López, G. P. Synthesis of Poly(N- isopropylacrylamide) on Initiator-Modified Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **17**, 2552–2555 (2001).
 38. Loh, X. J., Zhang, Z. X., Wu, Y. L., Lee, T. S. & Li, J. Synthesis of novel biodegradable thermoresponsive triblock copolymers based on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly(N-isopropylacrylamide) and their formation of thermoresponsive micelles. *Macromolecules* **42**, 194–202 (2009).
 39. Loh, X. J., Cheong, W. C. D., Li, J. & Ito, Y. Novel poly(N-isopropylacrylamide)-poly[(R)-3-hydroxybutyrate]-poly(N- isopropylacrylamide) triblock copolymer surface as a culture substrate for human mesenchymal stem cells. *Soft Matter* **5**, 2937–2946 (2009).
 40. Loh, X. J. *et al.* Surface coating with a thermoresponsive copolymer for the culture and non-enzymatic recovery of mouse embryonic stem cells. *Macromol. Biosci.* **9**, 1069–1079 (2009).
 41. Yu, Q., Ge, W., Atewologun, A., Stiff-Roberts, A. D. & López, G. P. Antimicrobial and bacteria-releasing multifunctional surfaces: Oligo (p-phenylene-ethynylene)/poly (N-isopropylacrylamide) films deposited by RIR-MAPLE. *Colloids and Surfaces: Biointerfaces* **126**, 328–334 (2015).

42. Cunliffe, D. *et al.* Bacterial adsorption to thermoresponsive polymer surfaces. *Biotechnol. Lett.* **22**, 141–145 (2000).
43. Aziz, G., Ghobeira, R., Morent, R. & Geyter, N. De. Plasma Polymerization for Tissue Engineering Purposes. *Recent Res. Polym.* (2018). doi:10.5772/intechopen.72293
44. Christophorou, L. G. & Olthoff, J. K. Electron interactions with plasma processing gases: present status and future needs. *Appl. Surf. Sci.* **2**, 411–420 (2011).
45. J., G. V. F. Plasmas.pdf. (2019). Available at: <http://www-revista.iaa.es/41/plasmas>.
46. Morent, R., De Geyter, N., Desmet, T., Dubruel, P. & Leys, C. Plasma surface modification of biodegradable polymers: A review. *Plasma Process. Polym.* **8**, 171–190 (2011).
47. Yasuda, H. *Plasma Polymerization*. (1985).
48. Hasan, J., Crawford, R. J. & Ivanova, E. P. Antibacterial surfaces: The quest for a new generation of biomaterials. *Trends Biotechnol.* **31**, 295–304 (2013).
49. O'Brien, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today* **14**, 88–95 (2011).
50. Davis, J. R. Overview of Biomaterials. in *Handbook of Material for medical devices* (ed. International, A.) 315 (2003).

51. Nerem, R. M. & Sambanis, A. Tissue Engineering : From Biology to Biological Substitutes. *Tissue Eng.* **1**, 1–13 (1995).
52. Massia, S. P. & Hubbell, J. A. Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. **25**, 223–242 (1991).
53. Sponchioni, M., Capasso, U. & Moscatelli, D. Thermo-responsive polymers : Applications of smart materials in drug delivery and tissue engineering. *Mater. Sci. Eng.* **102**, 589–605 (2019).
54. Martin, I., Wendt, D. & Heberer, M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* **22**, 10–12 (2004).
55. Babensee, J. E., Anderson, J. M., Mcintire, L. V & Mikos, A. G. Host response to tissue engineered devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **33**, 111–139 (1998).
56. Hutmacher, D. W. *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. The Biomaterials Silver Jubilee Compendium* **21**, (Woodhead Publishing Limited, 2000).
57. Brien, F. J. O., Harley, B. A., Yannas, I. V & Gibson, L. J. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. **26**, 433–441 (2005).
58. Costerton, J. W. Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* **11**, 217–221 (1999).

59. Ista, L. K., Pérez-Luna, V. H. & López, G. P. Surface-grafted, environmentally sensitive polymers for biofilm release. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1603–1609 (1999).
60. Costerton, J. W. *et al.* Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microsc.* **49**, 711–745 (1995).
61. Lasa, I. & Leiva, J. Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navar.* **28**, 163–176 (2005).
62. Stapleton, F., Matheson, M. & Dart, J. K. G. Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 827–838 (1998).
63. Taylor, P. Biofilm accumulation in drinking water distribution systems. *Biofouling* 37–41 (2015). doi:10.1080/08927019309386235
64. Bernard, O. & Michel, M. *Petroleum Microbiology*. (ASM Press, 2005).
65. Eduardo Moctezuma-Paz, L. *et al.* *Epidemiología de las quemaduras en México*. (2014).
66. Ramírez, C. E., Felipe González, L., Ramírez, N., Vélez, K. & Md, B. Fisiopatología del paciente quemado. *Rev. la Univ. Ind. Santander* **42**, 55–65 (2010).
67. Apartado para Quemaduras. in *Boletín epidemiológico* 61 (2018).

68. Schlatter, S. Epicel Skin Grafts. 1 (2019). Available at: <http://www.fda.gov/cdrh/mda/docs/H990002.html>. (Accessed: 11th September 2019)
69. Misra, S. K. *et al.* Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P (3HB)/ Bioglass Ò composites. *Biomaterials* **29**, 1750–1761 (2008).
70. Tezcaner, A., Bugra, K. & Hasirci, V. Retinal pigment epithelium cell culture on surface modified poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) thin films. *Biomaterials* **24**, 4573–4583 (2003).
71. Ke, Y., Liu, C., Zhang, X., Xiao, M. & Wu, G. Surface Modification of Polyhydroxyalkanoates toward Enhancing Cell Compatibility and Antibacterial Activity. *Macromol. Mater. Eng.* **302**, 1–16 (2017).
72. Bryers, J. D. & Ratner, B. D. Biomaterials Approaches to Combating Oral Biofilms and Dental Disease. *BMC Oral Health* **6**, 1–6 (2006).
73. Griesser, H. J., Vasilev, K., Ys, H., Ndi, C. & Griesser, S. S. Protecting polymer surfaces against bacterial adhesion and biofilm formation. *Eur. cells Mater.* (2011).
74. Hazer, D. B., Kiliçay, E. & Hazer, B. Poly(3-hydroxyalkanoate)s: Diversification and biomedical applications: A state of the art review. *Mater. Sci. Eng. C* **32**, 637–647 (2012).

75. Ke, Y., Zhang, X. Y., Ramakrishna, S., He, L. M. & Wu, G. Reactive blends based on polyhydroxyalkanoates: Preparation and biomedical application. *Mater. Sci. Eng. C* **70**, 1107–1119 (2017).
76. Kai, D. & Loh, X. J. Polyhydroxyalkanoates: Chemical modifications toward biomedical applications. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 106–119 (2014).
77. Li, Z. *et al.* Synthesis, characterization and biocompatibility of biodegradable elastomeric poly(ether-ester urethane)s based on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) and poly(ethylene glycol) via melting polymerization. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **20**, 1179–1202 (2009).
78. Loh, X. J., Wang, X., Li, H., Li, X. & Li, J. Compositional study and cytotoxicity of biodegradable poly(ester urethane)s consisting of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly(ethylene glycol). *Mater. Sci. Eng. C* **27**, 267–273 (2007).
79. Loh, X. J., Goh, S. H. & Jun, L. Biodegradable thermogelling poly[(R)-3-hydroxybutyrate]-based block copolymers: Micellization, gelation, and cytotoxicity and cell culture studies. *J. Phys. Chem. B* **113**, 11822–11830 (2009).
80. Wu, Y. *et al.* PHB-Based Gels as Delivery Agents of Chemotherapeutics for the Effective Shrinkage of Tumors. *Adv. Healthc. Mater.* 1–7 (2016).

81. Karahalilo, Z., Ercan, B., Tylor, E. N. & Chung, S. Antibacterial Nanostructured Polyhydroxybutyrate. *J. Biomed. Nanotechnol.* **11**, 2253–2263 (2015).
82. Taylor, P. *et al.* Journal of Biomaterials Science , Adsorption of albumin , collagen , and fibronectin on the surface of poly (hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHB / HV) and of poly (ϵ - caprolactone) (PCL) films modified by an alkaline hydrolysis and of poly (*et. J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **9**, 37–41 (1998).
83. García-García, J. M. *et al.* The surface modification of poly (3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyhexanoate) copolymers to improve the attachment of urothelial cells. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 362–369 (2013).
84. Kim, H. W., Chung, C. W., Kim, S. S., Kim, Y. B. & Rhee, Y. H. Preparation and cell compatibility of acrylamide-grafted poly(3-hydroxyoctanoate). *Int. J. Biol. Macromol.* **30**, 129–135 (2002).
85. Mas, A. *et al.* Modification of poly [(3-hydroxybutyric acid) -co- (3-hydroxyvaleric acid)] film surfaces in an oxygen low pressure plasma. *Macromol. Chemistry Phys.* **2341**, 2331–2341 (1996).
86. Ferreira, B. M. P., Pinheiro, L. M. P., Nascente, P. A. P., Ferreira, M. J. & Duek, E. A. R. Plasma surface treatments of poly (L -lactic acid) (PLLA) and poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV). *Mater. Sci. Eng. C* **29**, 806–813 (2009).

87. Keen, I. *et al.* Introducing Amine Functionalities on a Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Surface : Comparing the Use of Ammonia Plasma Treatment and Ethylenediamine Aminolysis. *Biomacromolecules* **7**, 427–434 (2006).
88. Valle, K., Linossier, I., Lao, H. & Renard, E. Surface Functionalization of PHBV by HEMA Grafting via UV Treatment : Comparison with Thermal Free Radical Polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.* **116**, 288.297 (2009).
89. Wang, Y., Ke, Y., Ren, L., Wu, G. & Chen, X. Photografting Polymerization of Polyacrylamide on Poly (3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) Films . II . Wettability and Crystallization Behaviors graft -Polyacrylamide Films. *J. Appl. Polym. Sci.* **107**, 3765–3772 (2008).
90. Ke, Y. *et al.* Photografting Polymerization of Polyacrylamide on PHBV Films (I). *Jpurnal Appl. Polym. Sci.* **104**, 4088–4095 (2007).
91. Pomery, P. J., Carswell-Pomerantz, T., Hill, D. J. T. & O'Donnerll, J. H. An Electron Spin resonance Study of the Radiation Chemistry of Poly(Hydroxybutirate). *Radiat. Phys. Chem.* **45**, 737–744 (1995).
92. Luo, S. & Netravali, A. N. Effect of 60 Co gamma-Radiation on the Properties of Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate). *J. Appl. Polym. Sci.* 1059–1067 (1999).

93. Yang, H. & Liu, J. Thermal analysis of poly (3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) irradiated under vacuum. *Polym. Int.* **1681**, 1677–1681 (2004).
94. Street, E. G. & Chester, W. SPI Supplies Plasma Prep III Process Controller Operation Manual. 1–18
95. Silverstein, R. M., Webster, F. X. & Kiemle, D. J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds.* (2005).
96. Jamadi, E. S. *et al.* Synthesis of polyester urethane urea and fabrication of elastomeric nanofibrous scaffolds for myocardial regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **63**, 106–116 (2016).
97. González-Torres, M. *et al.* Surface modification of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by direct plasma-radiation-induced graft polymerization of N-hydroxyethyl-acrylamide. *Mater. Lett.* **175**, 252–257 (2016).
98. Thommes, M. *et al.* Physisorption of gases , with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution. *IUPAC Tech. Rep.* 8–13 (2015).
99. Zhao, S. *et al.* Three dimensionally printed mesoporous bioactive glass and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) composite scaffolds for bone regeneration. *J. Mater. Chem. B* **2**, 6106–6118 (2014).

100. Lucchesi, C., Ferreira, B. M. P., Duek, E. A. R., Santos, A. R. & Joazeiro, P. P. Increased response of Vero cells to PHBV matrices treated by plasma. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 635–643 (2008).
101. Goode, J. *Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration 68* (FDA, 2016). doi:<http://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm348890.pdf>
102. *FDA Guidance for Testing Biodegradable Polymer Devices.* 10 (1996).
103. *TEMPS guidance.* 266 (2004).
104. Amato, S. F. & Ezzell Jr, R. M. *Regulatory Affairs for Biomaterials.* (Woodhead Publishing, 2015).
105. Goldstein, J. I. *et al. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis* (Plenum Publishers, 2011).
106. Kyeyune, B. *Atomic Force Microscopy.* (African Institute for Mathematical Sciences, 2017). doi:10.13140/RG.2.2.17356.10887
107. Wilson, R. A. & Bullen, H. A. *Basic Theory Atomic Force Microscopy (AFM).* (2006).

108. Jagtap, R. & Ambre, A. Atomic force microscopy (AFM): Basics and its important applications for polymer characterization. *Indian J. Eng. Mater. Sci.* **13**, 368–384 (2006).
109. Scientific, T. *Introduction to FTIR*. (3013).
110. Owens, D. K. & Wendt, R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **13**, 1741–1747 (1969).
111. Trejo, J. V. Adsorción Absorción. 1–17 (2013).
112. J. Porto y A. Whalter Casal. *Prácticas de Histología*. (López y Etchegoyen Libreros y Editores, 1953).
113. Eduardo, C. & Arenas, M. Técnica histológica. 1–12 (2010).