



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00064

Matricula: 2161801254

MATERIALES NANOESTRUCTURADOS
EMBEBIDOS EN BIOPOLÍMEROS
DEGRADABLES PARA USO EN
INGENIERIA DE TEJIDOS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 14 del mes de junio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ
DR. JOSE ELIAS PEREZ LOPEZ
DR. JUAN MORALES CORONA



ERIKA FRAGOSO PEREZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (FISICA)

DE: ERIKA FRAGOSO PEREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE

DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ

VOCAL

DR. JOSE ELIAS PEREZ LOPEZ

SECRETARIO

DR. JUAN MORALES CORONA



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Posgrado en Física
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Departamento de Física, Área de Polímeros

**MATERIALES NANOESTRUCTURADOS EMBEBIDOS EN
BIOPOLÍMEROS DEGRADABLES PARA SU USO EN
INGENIERÍA DE TEJIDOS**

Tesis presentada por
Erika Fragoso Pérez
Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Física)

Asesor: Dr. Juan Morales Corona

Jurado Calificador:

Presidente: Dr. José Rafael Godínez Fernández

Secretario: Dr. Juan Morales Corona

Vocal: Dr. José Elías Pérez López

Ciudad de México, 14 Junio 2018



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Posgrado en Física
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Departamento de Física, Área de Polímeros

**MATERIALES NANOESTRUCTURADOS EMBEBIDOS EN
BIOPOLÍMEROS DEGRADABLES PARA SU USO EN
INGENIERÍA DE TEJIDOS**

Tesis presentada por
Erika Fragozo Pérez
Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Física)

Asesor: Dr. Juan Morales Corona

Jurado Calificador:

Presidente: Dr. José Rafael Godínez Fernández

Secretario: Dr. Juan Morales Corona

Vocal: Dr. José Elías Pérez López

Ciudad de México, 14 Junio 2018

Agradecimientos

Esta página contiene, el nombre de aquellos que hicieron posible, de alguna u otra manera este proyecto. El tamaño del aporte es irrelevante, lo importante aquí, es recordar su presencia en el momento en que tenía que aparecer y, en algunos casos, reaparecer, fue valioso e imprescindible.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, por la formación académica brindada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgo durante el periodo de estudios en Maestría.

Al Dr. Juan Morales Corona de la UAM-I por el tiempo dedicado a la dirección de esta tesis, por aceptarme a trabajar en este tema de investigación y confiar en mi trabajo, además de sus comentarios y aportaciones brindadas. De antemano, le agradezco mucho el haberme facilitado siempre los medios necesarios para cumplir con los objetivos planteados en la investigación y brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.

Al Dr. Roberto Olayo González de la UAM-I, por el tiempo dedicado en la asesoría de esta tesis, por sus inapreciables aportaciones, críticas y consejos proporcionados como guías importantes para mejorar el desarrollo del proyecto, además de sus invaluable enseñanzas.

A los miembros del jurado de esta tesis por sus valiosas sugerencias a la versión final de este documento.

Al Dr. Roberto Olayo Valles del Laboratorio de Polímeros de la UAM-I, por sus enseñanzas, colaboración en la caracterización de los materiales y dedicación incondicional a este trabajo. Agradezco los comentarios realizados hacía mi persona mostrándome lo importante que es la ciencia y creer en proyectos de esta naturaleza.

A la Dra. G. Mayeli Estrada Villegas del CIQA-Monterrey, por la asesoría durante la realización de esta tesis, por el tiempo dedicado en comentarios, sugerencias y críticas; además por la aportación de conocimientos y ayuda en etapas difíciles del proyecto. Agradezco por los momentos que pasamos juntas, por su amistad y por enseñarme a darle la debida importancia a mí trabajo, pero sobre todo por mostrarme que ciencia es paciencia.

Al Dr. Rafael Godínez Fernández de la UAM-I, por permitirme realizar gran parte del desarrollo experimental de este proyecto en el Laboratorio de Biofísica, además por la valiosa asesoría, enseñanzas, amistad y confianza que me proporcionó, así como también, por su apoyo, colaboración y orientación en los Cultivos Celulares.

A Patricia Castillo Ocampo del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería en la UAM-I, y al Dr. J. David Sepúlveda Sánchez, Mtra. Ma. Cristina Acosta García, Dr.

Jorge Sepúlveda Sánchez, del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Edificio de la Ciencia y Tecnología Ambiental en la UAM-I; por la orientación en el manejo de las muestras y por los análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido para la obtención de imágenes. Agradezco por recibirme de la mejor forma y por la disponibilidad que siempre mostraron.

Al Mtro. X. Herón Gutiérrez García, por su valiosa enseñanza y colaboración en los ensayos mecánicos. De la misma manera agradezco a la Fís. Emma Cortés Ortiz, Ing. Diana M. Osorio Londoño, Ing. E. Jocelyn Alvarado Muñoz, por su valiosa cooperación en la realización de los ensayos mecánicos y recubrimiento de andamios poliméricos mediante Polimerización por Plasma, pero sobre todo por su amistad y sugerencias brindadas en esta etapa de estudios.

Al Dr. Israel Morales Reyes, por su amistad, confianza y apoyo incondicional en momentos difíciles; además por sus comentarios y valiosa colaboración en el cultivo *in vitro* de la línea celular, así como también en los análisis mediante Microscopía Raman. Agradezco su paciencia hacía mi persona, enseñanza y consejos para concluir mi proyecto de tesis.

Al Mtro. Omar E. Uribe Juárez, por su apoyo incondicional en la enseñanza y orientación en todo lo referente a Cultivos celulares, que me sirvió como guía para dar seguimiento a mi proyecto, además de su amistad y confianza que me proporcionó.

Al Dr. Federico González García y Ricardo Rosas Cedillo, por su apoyo en la caracterización de muestras mediante Difracción de Rayos X de ángulo amplio. Agradezco por recibirme de la mejor forma y por la disponibilidad que siempre mostraron.

A L. Pablo Valencia Trejo, quien con su gran apoyo y comprensión, ha sido parte importante para concluir esta etapa.

A mis amigos y compañeros, Dr. Alejandro López Gaona, Quím. Roberto C. Martínez Hernández, Fís. Graciela Ruíz Velasco, Quím. Gabriela León, con quienes he compartido más de cerca mis momentos de alegría, tensión y tristeza, asimismo, les agradezco por brindarme siempre su ayuda desinteresada y hacer más amena mi estancia en el laboratorio.

Dedicatoria

A mis padres Guadalupe Pérez Jiménez y H. Leonel Fragoso Ramírez, por todo el amor que me han brindado, por llevarme de la mano y forjarme a ser la persona que soy ahora, además de ser mi motivación para superarme. Gracias por haberme otorgado la vida y un hogar, por sus cuidados, preocupaciones, comprensión y por estar siempre ahí cuando los necesito, apoyándome incondicionalmente en todo momento y respetando mis decisiones.

La mente que se abre ante una nueva idea, jamás volverá a su tamaño original.

Albert Einstein.

Índice general

Lista de Abreviaturas	XI
Lista de Figuras	XIII
Lista de Símbolos	XVI
Lista de Tablas	XVII
Resumen	1
Introducción	3
1. Fundamentos	5
1.1. Ingeniería de Tejidos	5
1.1.1. Andamios	5
1.1.1.1. Biocompatibilidad	6
1.1.2. Polímeros biodegradables	7
1.1.2.1. Poli(ácido láctico) (PLA)	8
1.2. Técnica de Electrohilado (Electrospinning)	10
1.2.1. Descripción del proceso de Electrohilado	10
1.2.2. Parámetros del proceso de Electrohilado	12
1.3. Nanotecnología	14
1.3.1. Nanotubos de Carbono (NTC)	14
1.3.1.1. Síntesis de Nanotubos de Carbono	15
1.3.1.2. Purificación de Nanotubos de Carbono	15
1.3.1.3. Tipos de Nanotubos de Carbono	16
1.4. Técnicas estándares de caracterización	17
1.4.1. Caracterización morfológica	17
1.4.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	17
1.4.2. Caracterización físico-química y térmica	18
1.4.2.1. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)	19
1.4.2.2. Espectroscopía Raman	20
1.4.2.3. Difracción de Rayos X de ángulo amplio (DRX)	22
1.4.2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)	25
1.4.3. Caracterización mecánica	26
1.4.3.1. Diagrama esfuerzo-deformación	28
1.4.3.2. Módulo de Elasticidad	29
1.4.3.3. Fluencia o cedencia	30
1.4.3.4. Máximo esfuerzo	30
1.4.3.5. Tenacidad	31

1.4.3.6.	Ductilidad	31
1.4.3.7.	Deformación elástica y plástica	31
1.5.	Cultivos celulares	32
1.5.1.	Crecimiento celular en cultivo	33
1.5.2.	Pases de un cultivo celular	33
1.5.3.	Fases de un cultivo celular	34
1.5.4.	Condiciones de cultivo	35
1.5.5.	Caracterización biológica de los Cultivos Celulares	35
Hipótesis		37
Objetivos		37
Objetivo General		37
Objetivos Específicos		37
2. Metodología Experimental		39
2.1.	Materiales	39
2.2.	Procedimiento Experimental	40
2.2.1.	Preparación de soluciones poliméricas	40
2.2.2.	Proceso de Electrohilado	42
2.3.	Caracterización morfológica	45
2.3.1.	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	45
2.4.	Caracterización físico-química	46
2.4.1.	Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier por Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	46
2.4.2.	Microscopía Raman	48
2.4.3.	Difracción de Rayos X de ángulo amplio (DRX)	48
2.5.	Caracterización térmica	49
2.5.1.	Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)	49
2.6.	Pruebas mecánicas	50
2.7.	Pruebas de conductividad eléctrica	51
2.8.	Cultivos celulares	53
2.8.1.	Línea celular: NG 108-15	53
2.8.1.1.	Descongelación y proliferación de línea celular	54
2.8.1.2.	Cultivo de línea celular en los andamios	56
2.8.2.	Prueba de viabilidad celular	57
3. Resultados y Discusión		59
3.1.	Parametrización de variables en el proceso de Electrohilado	59
3.1.1.	Optimizando la concentración polimérica	59
3.1.2.	Optimizando el voltaje aplicado	64
3.1.3.	Optimizando la distancia entre aguja-colector	68
3.1.4.	Optimizando la razón de inyección	72
3.2.	Fabricación de los andamios compuestos de PLA-NTCMP	76
3.3.	Caracterización de los andamios compuestos PLA-NTCMP	77
3.3.1.	Caracterización morfológica	78
3.3.1.1.	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	78
3.3.2.	Caracterización físico-química	85
3.3.2.1.	Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)	85
3.3.2.2.	Espectroscopía Raman	89
3.3.2.3.	Difracción de Rayos X (DRX)	94

3.3.3. Análisis térmico	96
3.3.3.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)	96
3.3.4. Pruebas mecánicas	103
3.3.5. Pruebas de conductividad eléctrica	107
3.4. Cultivos celulares	110
3.4.1. Sembrado y crecimiento del cultivo <i>in vitro</i> : línea celular NG108-15	110
3.4.1.1. Prueba de viabilidad celular	112
Conclusiones y perspectivas	115
Apéndice A. Asepsia y preparación del material para cultivos celulares.	119
Apéndice B. Cultivo celular <i>in vitro</i>	121
Apéndice C. Extracción celular del tejido cardíaco, para un cultivo primario de Cardiomocitos (CMs)	125

Lista de Abreviaturas

IT: Ingeniería de Tejidos.

PLA: Poli(ácido láctico).

NTCMP: Nanotubos de Carbono Multi-Pared.

PLA-NTCMP: Andamios compuestos de poli(ácido láctico y nanotubos de carbono multi-pared).

FTIR: Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, en inglés).

WAXD: Difracción de Rayos X de ángulo amplio (Wide Angle X-ray diffraction, en inglés).

DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido (Differential Scanning Calorimetry, en inglés).

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido (Scanning Electron Microscopy, en inglés).

CMs: Células cardíacas “Cardiomiocitos”.

NG-108: Línea celular derivada de un Neuroblastoma de ratón (N18TG2) y Glioma de rata (C6-BU-1).

PLLA: Poli(ácido-*L*-láctico)

PDLA: Poli(ácido-*D*-láctico)

PDLLA: Copolímero poli(ácido-*D-L*-láctico) ECM: Matriz Extracelular.

PET: Polietiléntereftalato.

PGA: Poliglicólico.

PEG: Polietilenglicol.

PCL: Policaprolactona.

PGA-*co*-PLA: Poli(glicólico-*co*-láctico).

FBS: Suero Bovino Fetal.

TMs: Modos tangenciales.

Lista de Figuras

1.1.	Microfotografías por SEM; vista superior y lateral de un andamio electrohilado de PLA.[1]	6
1.2.	Estructura química del Poli(ácido láctico (PLA).	8
1.3.	Síntesis del PLA de alto peso molecular por polimerización de apertura de anillo.[2]	9
1.4.	Métodos de síntesis para el Poli(ácido láctico) (PLA).[3]	9
1.5.	Aparato electrostático patentado por Formhals.[4]	10
1.6.	Diagrama esquemático del equipo de Electrohilado.	11
1.7.	Ilustración esquemática de la formación del Cono de Taylor.	11
1.8.	Andamios electrohilados.	12
1.9.	Grupos funcionales que contienen oxígeno.	15
1.10.	Esquema de estructuras para diferentes tipos de nanotubos de carbono.	16
1.11.	Representación esquemática de la columna de un microscopio electrónico de Barrido.	18
1.12.	Representación esquemática del funcionamiento de un espectrofotómetro para FTIR.	19
1.13.	Funcionamiento en representación esquemática del dispositivo ATR.	20
1.14.	Diagrama energético mostrando los estados implicados en la señal Raman.	21
1.15.	Espectro con bandas Rayleigh, Raman Stokes y Raman anti-Stokes.	21
1.16.	Configuración esquemática del difractómetro de Rayos X.	23
1.17.	Ubicación de las ventanas y monocromadores en un difractómetro de Rayos X.	23
1.18.	Representación esquemática de la Ley de Bragg.	24
1.19.	Representación esquemática del equipo para CDB.	25
1.20.	Diagrama de temperaturas características en CDB.	26
1.21.	Dispositivos comerciales para pruebas mecánicas de TESTING MACHINES INC.[5]	27
1.22.	Dispositivos comerciales para pruebas mecánicas más sofisticadas.[5]	27
1.23.	Diagrama esfuerzo-deformación del Acero estructural (considerado material dúctil).	29
1.24.	Determinación de la fluencia o cedencia convencional del 0.2 % de deformación.[6]	30
1.25.	Esquema del diagrama esfuerzo-deformación, que muestra una probeta en una prueba mecánica.	32
2.1.	Preparación de soluciones poliméricas de PLA.	41
2.2.	Preparación de soluciones compuestas de PLA-NTCMP.	42
2.3.	Equipo empleado para la técnica de Electrohilado.	43
2.4.	Microscopio Electrónico de Barrido del Laboratorio Central de Microscopía Electrónica.	45
2.5.	Preparación de las muestras para el análisis mediante MEB.	45
2.6.	Microscopio Electrónico de Barrido del Laboratorio de Microscopía Electrónica del CENICA.	46
2.7.	Equipos experimentales empleados para el estudio de la composición química.	47
2.8.	Equipo experimental para Microscopía Raman.	48
2.9.	Equipo experimental de Difracción de Rayos X para muestras.	49
2.10.	Equipo experimental empleado para la caracterización de propiedades térmicas.	50
2.11.	Equipo experimental para pruebas mecánicas.	51
2.12.	Equipo experimental para determinar la conductividad eléctrica en los andamios fabricados.	52
2.13.	Arreglo experimental para la evaluación de conductividad eléctrica.	52

2.14. Imagen de la línea celular NG108-15 reportada por ATCC [®] . [7]	54
2.15. Crio preservación celular.	55
2.16. Cámara de Neubauer, para realizar el conteo celular. [8]	56
3.1. Resultados obtenidos a una concentración del 10 % de PLA.	60
3.2. Resultados obtenidos a una concentración del 12 % de PLA.	61
3.3. Resultados obtenidos a una concentración del 15 % de PLA.	62
3.4. Resultados obtenidos a una concentración del 20 % de PLA.	63
3.5. Diagrama representativo de diámetros promedios a diferentes concentraciones de PLA.	64
3.6. Resultados obtenidos a un voltaje aplicado de 15 kV.	65
3.7. Resultados obtenidos a un voltaje aplicado de 20 kV.	66
3.8. Resultados obtenidos a un voltaje aplicado de 25 kV.	67
3.9. Diagrama representativo de diámetros promedios a diferentes voltajes aplicados en el proceso de Electrohilado.	68
3.10. Resultados obtenidos a una distancia entre aguja-colector de 10 cm.	68
3.11. Resultados obtenidos a una distancia entre aguja-colector de 12 cm.	69
3.12. Resultados obtenidos a una distancia entre aguja-colector de 15 cm.	70
3.13. Resultados obtenidos a una distancia entre aguja-colector de 20 cm.	71
3.14. Diagrama representativo de diámetros promedios a diferentes distancias entre aguja y colector.	71
3.15. Resultados obtenidos a una razón de inyección de 0.1 mL/h.	72
3.16. Resultados obtenidos a una razón de inyección de 0.5 mL/h.	73
3.17. Resultados obtenidos a una razón de inyección de 1 mL/h.	74
3.18. Resultados obtenidos a una razón de inyección de 1.5 mL/h.	75
3.19. Diagrama representativo de diámetros promedios a diferente razón de inyección.	75
3.20. Andamios de PLA-NTCMP, fabricados por Electrohilado.	76
3.21. Microfotografías mediante un microscopio óptico de los andamios fabricados.	77
3.22. Microfotografías obtenidas mediante MEB, de la muestra de NTCMP.	78
3.23. Microfotografías obtenidas mediante MEB, del andamio de PLA.	79
3.24. Microfotografías de los andamios de PLA-NTCMP.	81
3.25. Microfotografías obtenidas por MEB, del andamio de PLA-NTCMP (4%).	82
3.26. Microfotografías de NTCMP observados en el andamio de PLA-NTCMP (4%).	83
3.27. Diagrama representativo de diámetros promedio en las fibras de PLA y las fibras compuestas con NTCMP.	84
3.28. Espectro FTIR-ATR del andamio de PLA.	85
3.29. Espectro FTIR-ATR de los NTCMP en polvo.	86
3.30. Comparación entre los espectros FTIR-ATR de los andamios compuestos de PLA-NTCMP.	88
3.31. Imagen y espectro de la señal Raman correspondiente al andamio de PLA.	90
3.32. Imagen y espectro de la señal Raman correspondiente a la muestra de NTCMP.	91
3.33. Comparación de espectros Raman entre los andamios de PLA y PLA-NCTMP (4%).	92
3.34. Comparación de espectros Raman entre los NTCMP y el andamio de PLA-NCTMP (4%).	93
3.35. Patrón de difracción WAXD del andamio de PLA.	94
3.36. Patrones de difracción de los andamios compuestos PLA-NTCMP.	95
3.37. Termograma del primer calentamiento, mostrando las temperaturas de T_f y T_c del andamio de PLA.	97
3.38. Comparación entre los termogramas de PLA-NTCMP al primer calentamiento.	98
3.39. Termograma de enfriamiento, mostrando la T_c del andamio de PLA.	99
3.40. Termograma del segundo calentamiento, mostrando las temperaturas de T_f y T_c del andamio de PLA.	100
3.41. Comparación entre los termogramas de PLA-NTCMP durante el ciclo de enfriamiento.	101
3.42. Comparación entre los termogramas de PLA-NTCMP al segundo calentamiento.	102
3.43. Curvas de esfuerzo-deformación en la evaluación mecánica de los andamios de PLA y PLA-NTCMP.	104
3.44. Curvas de esfuerzo-deformación en la evaluación mecánica de los andamios de PLA-NTCMP.	105
3.45. Comparación del módulo de Young y el punto de cedencia, en los andamios.	106
3.46. Gráficos de corriente-voltaje en la evaluación eléctrica de los andamios electrohilados.	108

3.47. Comparación de la Resistencia y la Conductividad eléctrica, en los andamios.	109
3.48. Células nerviosas NG108-15 a las 48 horas de ser sembradas.	110
3.49. Células nerviosas NG108-15 a 3 días de cultivo.	110
3.50. Registro fotográfico de la proliferación a 4 y 5 días del cultivo celular.	111
3.51. Prueba de viabilidad realizada en el andamio de PLA.	113
3.52. Prueba de viabilidad realizada en el andamio de PLA-NTCMP.	113
3.53. Molécula de Calceina AM y Calceina.	124
3.54. Rata Wistar de 2 meses de edad, empleada para el cultivo primario de células cardíacas.	127
3.55. Preparación de rata Wistar, para el procedimiento quirúrgico.	127
3.56. Extracción del corazón en rata Wistar.[9]	128
3.57. Ratas Wistar empleadas en el proceso quirúrgico para la extracción celular del tejido cardíaco.	129
3.58. Preparación para el proceso quirúrgico de extracción celular.	130
3.59. Procedimiento quirúrgico para la extracción del corazón.	131
3.60. Obtención del tejido cardíaco ubicado en el ventrículo izquierdo.	132
3.61. Obtención del material celular.	132
3.62. Observación de obtención de células cardíacas (Cardiomiocitos).	133

Lista de Símbolos

nm: nanómetros (10^{-9} m).

μm : micrómetros (10^{-6} m).

h: hora.

mL: mililitro (10^{-3} L).

rpm: revoluciones por minuto.

kV: kiloVolts (10^3 V).

g: gramo.

mg: miligramo (10^{-3} g).

λ : longitud de onda (cm^{-1}).

$^{\circ}\text{C}$: grados Celsius.

T_c : Temperatura de cristalización ($^{\circ}\text{C}$).

T_f o T_m : Temperatura de fusión ($^{\circ}\text{C}$).

T_g : Temperatura de transición vítrea ($^{\circ}\text{C}$).

T_d : Temperatura de descomposición ($^{\circ}\text{C}$).

Ni: Níquel.

Lista de Tablas

2.1.	Propiedades relevantes del poli(ácido láctico).[10]	39
2.2.	Propiedades relevantes del Cloroformo.[11]	40
2.3.	Especificaciones del Alcohol Etilico.[12]	40
2.4.	Composición de las soluciones para estudiar la concentración de PLA.	41
2.5.	Composición de las soluciones para estudiar la concentración de NTCMP.	42
2.6.	Parámetros empleados en el análisis de la concentración polimérica.	43
2.7.	Valores para la optimización de los parámetros en el proceso de Electrohilado.	44
2.8.	Parámetros del proceso de Electrohilado para los andamios de PLA-NTCMP.	44
3.1.	Resumen de las bandas características atribuidas al andamio de PLA mediante FTIR-ATR.	86
3.2.	Resumen de las bandas características atribuidas a la muestra de NTCMP en polvo.[13],[14],[15]	87
3.3.	Resumen de las bandas características atribuidas a los andamios compuestos de PLA-NTCMP.	89
3.4.	Resumen de los desplazamientos Raman y asignación de bandas características del andamio de PLA.	90
3.5.	Resumen de los desplazamientos Raman y asignación de las bandas características de NTCMP.	91
3.6.	Transiciones térmicas de los andamios PLA-NTCMP en el primer calentamiento.	97
3.7.	Temperatura de cristalización en los andamios PLA-NTCMP durante el ciclo de enfriamiento.	100
3.8.	Transiciones térmicas de los andamios PLA-NTCMP en el segundo calentamiento.	103
3.9.	Comparación de los valores obtenidos para el módulo de Young, para los andamios fabricados, con $n=5$.	107
3.10.	Comparación de los valores obtenidos para la Resistencia y Conductividad eléctrica.	107
3.11.	Componentes de preparación para la solución Hank's.	125

Resumen

Partiendo del uso extensivo de polímeros biodegradables en aplicaciones de Ingeniería de Tejidos (IT) se utilizó el poli(ácido láctico) (PLA) para la fabricación de estructuras tipo andamio, por medio de la técnica de Electrohilado para generar matrices continuas con diámetros en escala nanométrica. Una gran ventaja en esta técnica es el control que se puede tener en sus principales parámetros, por lo tanto se optimizaron las variables involucradas en el proceso de fabricación, encontrando los parámetros ideales para la producción de fibras adecuadas, proporcionando estructuras que mimetizan a la Matriz Extracelular (ECM). La parametrización de las variables se realizó mediante un análisis cuantitativo de las distribuciones de diámetros presentes en las fibras, observadas a través de los resultados de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Es muy importante destacar que las condiciones ambientales del proceso como humedad y temperatura también pudieron ser variadas.

Una vez encontrados los parámetros ideales para la fabricación de las fibras de PLA, se continuó con la segunda parte experimental del proyecto, utilizando estos parámetros para la producción de fibras compuestas, lo novedoso en esta fabricación fue el uso de Nanotubos de Carbono Multi-Pared (NTCMP) debido a las propiedades que poseen, además de ser reportados como un buen material para la construcción de andamios neuronales y óseos en IT. Por lo tanto se estudió la variación en la concentración de éstos, para explorar su efecto en las propiedades físico-químicas de andamios compuestos de PLA-NTCMP. Adicionalmente se emplearon técnicas analíticas como Espectroscopía Infrarroja (FTIR), Difracción de Rayos X (DRX), Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) y Microscopía Raman, para establecer las propiedades del material y las interacciones que puedan existir a través de la composición en las fibras. Mediante Microscopía Electrónica se determinó la morfología de los andamios compuestos comprobando que los NTCMP se encuentran embebidos en las fibras del polímero. También se realizaron pruebas mecánicas y de conductividad eléctrica, obteniendo resultados de resistencia y flexibilidad, lo que ayudará a cubrir las necesidades dependiendo del tipo de sustituto que se requiera.

En vista de la posible aplicación en Conexión Neuronal para estos andamios compuestos en el área de IT, se evaluó la respuesta biológica con un cultivo de línea celular (NG108-15) in vitro mediante un protocolo ya establecido, en el cual se manejaron las condiciones apropiadas para realizar cultivo de células neuronales. Este cultivo se hizo por un periodo de dos semanas, donde se observó el crecimiento celular en presencia y ausencia de los NTCMP, analizando la morfología y proliferación de los cultivos neuronales mediante un registro fotográfico y pruebas de viabilidad celular, dando como resultado una interpretación preliminar acerca del potencial de los materiales para la aplicación antes mencionada. Existen aún elementos para mejorar la fabricación de estos andamios compuestos; sin embargo, este estudio revela que es factible la utilización de este material ya que es biocompatible con el cultivo células neuronales.

Como trabajo a futuro, se registrará la actividad eléctrica celular en los andamios, para la evaluación y comprobación de la transmisión de señales bioeléctricas a través de los NTCMP y fibras electrohiladas. Por otra parte se pretende evaluar adicionalmente un cultivo primario de células cardíacas “Cardiomiocitos, CMs” para una posible aplicación en Parches cardíacos.

Introducción

La matriz extracelular (ECM) es un medio de integración fisiológico para el conjunto de materiales extracelulares de naturaleza bioquímica compleja, en el que están inmersas células que interactúan con esta matriz jugando un papel importante en el desarrollo, mantenimiento y dirección de un tejido. Por tal motivo, el daño total/parcial de un tejido y la pérdida de la función de un órgano se encuentran entre los problemas más graves y costosos de la salud humana. Inicialmente, esos problemas se han abordado mediante el trasplante de órganos y tejidos alogénicos, sin embargo, son opciones limitadas que provocan un incremento en el número de pacientes fallecidos.[16]

La creciente necesidad de órganos en la actualidad, ha llevado a realizar un esfuerzo considerable en desarrollar la biomimética dirigida hacia la composición bioquímica, estructura fibrilar y características de la ECM, empleando biomateriales o polímeros biodegradables para reconstrucciones parciales de tejidos.[17] El área encargada para estas reconstrucciones es la Ingeniería de Tejidos, que desde hace algún tiempo ha sido reconocida como una alternativa prometedora a los tejidos donantes y reparaciones parciales de órganos dañados, promoviendo direcciones esenciales para la organización, supervivencia y función celular, a través de matrices tridimensionales (andamio o scaffolds), las cuales deben ser mecánicamente estables y capaces de funcionar biológicamente en el sitio del implante.[18],[17]

Diferentes técnicas se han aplicado para la síntesis y caracterización de las propiedades estructurales y de superficie en los biomateriales empleados para IT, considerando el análisis de las respuestas de estos materiales cuando son sometidos a pruebas biológicas como en el caso de cultivo celular. La tecnología en la técnica de Electrohilado es adecuada para procesar biomateriales a base de polímeros bioabsorbibles con arquitectura potencialmente reorganizable, respondiendo de manera exitosa ante la producción de matrices formadas por fibras de distintos diámetros, que permiten la circulación de nutrientes, induciendo la actividad celular y fomentando un conjunto innato en el montaje y crecimiento de células.[19] Además permite incorporar múltiples bioactivos (factores de crecimientos y diferenciación) que pueden ser usados para incrementar las propiedades mecánicas del sustrato y apoyar la neoformación de tejidos.[17][20]

En base a lo anterior, en la presente investigación se utiliza la técnica de Electrohilado para producir andamios de un material compuesto de Nanotubos de Carbono Multi-Pared (NTCMP) y Poli(ácido láctico) (PLA), en donde los NTCMP se encuentran embebidos en las fibras poliméricas, provocando la reducción de espacios vacíos dentro de la estructura del andamio, además de incrementar las propiedades mecánicas y eléctricas de las fibras, y la interacción de células con dichas matrices de manera activa. El generar este material de PLA-NTCMP es de gran interés para ser utilizado como injerto en un futuro, brindando condiciones necesarias para los esfuerzos a los que están sometidos distintos impulsos bioeléctricos, característica esencial para generar proliferación de células neuronales y cardíacas.[21],[22] Una de las aplicaciones en IT es asociada a la conexión neuronal; gracias a la escala obtenida con la producción de fibras pueden formar parte de los axones presentes en las neuronas a través de un cultivo celular, de tal manera que se pueda guiar la comunicación de una célula a otra, además de tener un enfoque prometedor para su conexión. La otra aplicación relacionada con las células cardíacas, es debido a la lesión de “infarto del miocardio” provocada por la isquemia resultante del desequilibrio entre la demanda y el

aporte del bombeo sanguíneo, presentando la muerte de células cardíacas que ocasionan fisuras en la capa del miocardio; como alternativa para cubrir las lesiones provocadas por la muerte de células, se puede generar un andamio de apósito compuesto de PLA-NTCMP que presente las condiciones necesarias para los esfuerzos e impulsos eléctricos a los que está sometido el músculo cardíaco.

De este modo, el presente manuscrito, se encuentra dividido de la siguiente manera: la revisión bibliográfica consultada y que corresponde a los fundamentos se muestra en el capítulo 1. La metodología experimental empleada para la elaboración, obtención y caracterización de los andamios biodegradables se describe en el capítulo 2. Seguidamente, el capítulo 3 aborda los resultados obtenidos, con su respectiva discusión. Finalmente, se muestran las conclusiones y perspectivas, para luego en el apéndice detallarse alguna información complementaria.

Capítulo 1

Fundamentos

1.1. Ingeniería de Tejidos

En la actualidad la pérdida de algún tejido u órgano, es un problema en la salud del ser humano, básicamente por el escaso número de donantes, por lo tanto en algunos casos se ha tomado como alternativa la cirugía reconstructiva, sin embargo no es considerada la mejor opción debido a su elevado costo monetario. Es importante mencionar que existe una gran cantidad de pacientes que se encuentran en lista de espera para recibir un trasplante sin ser favorecidos, provocando así su fallecimiento. En la búsqueda de solucionar dicho problema investigadores han utilizado células autólogas para la reconstrucción de órganos y tejidos con nueva tecnología para evitar la terapia inmunosupresora, realizando procesos fundamentales como injertos autólogos, prótesis y regeneración tisular, donde es involucrada la Ingeniería de Tejidos (IT) para el desarrollo de sustitutos biológicos que tengan la capacidad de restaurar, mantener y mejorar la función en un tejido.[6]

Esta área de IT, se considera como disciplina relativamente nueva, teniendo un campo de investigación y desarrollo multidisciplinario que aplica los conocimientos de la bioingeniería, química, física y biología, para resolver problemas clínicos y quirúrgicos (reparación, regeneración o reemplazo) asociados a la pérdida de tejidos o al fallo funcional de órganos. Recientemente se ha tenido un mayor interés en esta disciplina gracias a sus importantes ventajas con respecto al trasplante tradicional de órganos.[23] El proceso por el cual se lleva a cabo se reduce a la obtención de un tejido funcional que puede ser reconstruido *in vitro* usando células, factores de crecimiento, factores de estímulo, biomateriales y sistemas con biorreactores designados para mimetizar condiciones presentes en el desarrollo del tejido *in vivo*.

Los puntos claves que considera esta disciplina son los siguientes[6]:

- Prevenir una respuesta inmunológica, ya sea inflamación o rechazo, por muy pequeña que ésta sea.
- Es necesario fabricar un sustrato ideal para la sobrevivencia, desarrollo y diferenciación celular. El agregado de factores de crecimiento y diferenciación celular incrementará potencialmente la calidad del tejido a reemplazar.
- Proveer un ambiente adecuado para el desarrollo celular y tisular, para mantener la función y desarrollo del tejido neoformado.

1.1.1. Andamios

Un tejido normal está constituido por un componente estructural y otro celular; para que dicho tejido pueda llevar a cabo su función, ambos componentes deben estar interrelacionados, de tal manera que uno

le da soporte al otro.[24] Por lo tanto, la arquitectura de un soporte se caracteriza por una estructura de poros interconectados, los cuales se requieren para asegurar la penetración celular y difusión de nutrientes a las células, además de permitir la salida de los productos de desecho.[25]

Existen diferentes técnicas que permiten la fabricación de estructuras tridimensionales que sirven de soporte para la regeneración de un tejido específico, sin embargo una de las técnicas relativamente modernas es el Electrohilado, produciendo fibras con dimensiones de diámetros similar al tamaño de las fibrillas naturales presentes en la ECM, de esta forma se imita el ambiente natural del tejido y se muestra la efectividad que se aporta como sustrato para crecimiento celular. Estos soportes son también conocidos como andamios o *scaffolds* (su análogo en inglés) los cuales se pueden visualizar en la Figura 1.1, estas estructuras deberán desempeñar los siguientes roles:[26]

- Estructura de soporte para la migración celular y sistema de entrega (controlada o prolongada) de fármacos.
- Matriz para adhesión celular, regulando *in vivo* o *in vitro* procesos celulares, mitosis, síntesis y migración.
- Matrices para la absorción selectiva de proteínas de adhesión para la unión celular.
- Estructura reforzada para mantener la forma de la zona afectada evitando distorsión.

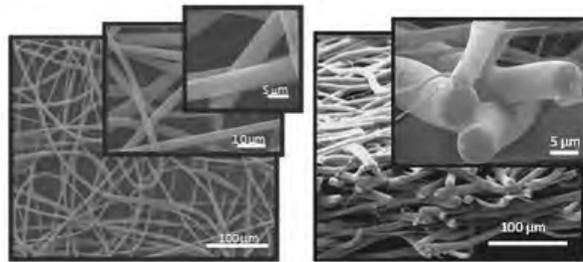


Figura 1.1: Microfotografías por SEM; vista superior y lateral de un andamio electrohilado de PLA.[1]

Sin embargo es primordial tener en cuenta que un andamio no está diseñado como implante permanente, por lo que es muy importante su biodegradabilidad, además de poseer altas propiedades mecánicas en consonancia con el sitio anatómico en el que han de ser implantados y suficientemente resistentes para soportar el manejo quirúrgico durante el implante. Típicamente estos andamios se siembran con células y a menudo con factores de crecimiento para posteriormente ser sometidos a estímulos biofísicos. Los procesos de cultivo pueden ser, *in vitro* para desarrollar tejidos que puedan ser implantados en un sitio de lesión, o bien se implantan directamente en el sitio de la lesión donde la regeneración de los tejidos se induce *in vivo* utilizando sistemas apropiados del cuerpo. La mayoría de los andamios están constituidos por estructuras elaboradas a partir de los llamados Biomateriales.[27]

1.1.1.1. Biocompatibilidad

En un andamio o matriz polimérica fabricada para IT, es de gran importancia considerar la biocompatibilidad, la cual se refiere “a la capacidad de desarrollarse como sustrato para respaldar adecuadamente la actividad celular, incluyendo la facilidad de sistemas de señalización mecánicos y moleculares, con la finalidad de optimizar la regeneración tisular, sin provocar respuestas indeseables, locales o sistemáticas

en el huésped eventual”.[28]

Este término se suele clasificar en biocompatibilidad superficial y estructural. La superficial está asociada con la química del exterior del material; mide la adsorción de moléculas biológicas que regulan las actividades celulares, tales como la adhesión y migración. Esta química depende del tipo de material, los cuales van desde los biopolímeros naturales a polímeros sintéticos. La biocompatibilidad estructural se ve afectada por la morfología física de un andamio; involucra su escala estructural, la rugosidad de la superficie, porosidad interconectada y el tamaño involucrado en las nanofibras. Por lo general para conseguir una biocompatibilidad adecuada, se recomienda utilizar polímeros biodegradables ya que aumentan y mejoran los aspectos biofuncionales.

1.1.2. Polímeros biodegradables

La ciencia macromolecular abarca un campo de investigación enfocado en la creación, el entendimiento y el desarrollo de materiales formados por millones de átomos dentro de moléculas con muy alto peso molecular, dichos materiales son llamados “*polímeros*”. [24] La terminología de esta palabra proviene de dos raíces griegas *poly* (muchos) y *meros* (partes); significado asociado a una molécula construida por la unión de enlaces covalentes de un gran número de unidades estructurales repetitivas (monómeros). [26] Por lo general, los polímeros representan compuestos orgánicos, conteniendo átomos de Carbono junto con Hidrógeno, Oxígeno, Nitrógeno y Halógenos.

Los polímeros biodegradables son considerados los materiales más versátiles por sus numerosas y diversas aplicaciones en el área médica y farmacéutica, entre ellas se puede mencionar; injertos vasculares y membranas de filtración. Además se emplean en sustitución de tejido blando, sistema de suministro de fármacos y como material de andamiaje para IT. [29] Estos materiales generan características o propiedades tanto físicas como químicas apropiadas, con la finalidad de reparar parcial o totalmente el órgano o tejido que se encuentre dañado.

Dentro del grupo numeroso de los polímeros se pueden hacer diferentes clasificaciones considerando diversos criterios que destacan alguna característica especial del material. Una de sus principales clasificaciones es la que se establece según el origen del polímero, es decir, *polímeros naturales* o *polímeros sintéticos*. Los primeros polímeros utilizados fueron productos naturales, este tipo de polímeros tienden a producir un medio más adecuado para el desarrollo, la adhesión y proliferación celular; en esta clasificación se encuentra el algodón, almidón, colágeno, quitosano, alginato, ácido hialurónico, proteínas, los ácidos nucleicos (ADN y ARN), entre otros. Sin embargo algo que predomina en los polímeros naturales es la rapidez que tienen en su degradación, debido a que son blanco fácil de las enzimas del organismo, ocasionando su fácil absorción.

Por otro lado, fue hasta mediados del siglo XIX, cuando los primeros polímeros sintéticos comenzaron a ser producidos a base de la transformación de polímeros naturales como el caucho, seda y algodón. [27] A partir de los años 30's se produjo un desarrollo explosivo en la industria de los polímeros precedida de una intensa investigación, así en 1931 se fabricó el hule sintético (neopreno), en 1933 se descubrió el polietileno en Inglaterra, en 1935 Carothers comenzó con el estudio de polímeros de condensación dando lugar a la producción de poliésteres y poliamidas, y de 1939-1941 Whinfield y Dickson, desarrollaron el Polietilén-tereftalato (PET). Posteriormente, se desarrollaron los catalizadores Ziegler-Natta para la producción de poliolefinas. En la actualidad, los polímeros sintéticos más conocidos, son los poliésteres alifáticos lineales como; Poli(ácido láctico) (PLA), poliglicólico (PGA), polietilenglicol (PEG), policaprolactona (PCL) y sus copolímeros “poli(glicólico-co-láctico) (PGA-co-PLA)”. Una gran ventaja en este tipo de materiales sintéticos es el control en su velocidad de degradación, debido a que se degradan por hidrólisis en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo eliminándose completamente por vías metabólicas, por lo que son

materiales más atractivos para la elaboración de andamios en IT.[30]

Actualmente, es enorme el número de polímeros comercialmente disponibles y el desarrollo de estos materiales sigue su curso, debido a que juegan un papel muy importante en nuestra vida diaria y representan un campo de la ciencia en el que investigadores continúan realizando importantes contribuciones[28], siguiendo esta línea de investigación se emplea el polímero biodegradable PLA como principal material para el desarrollo de andamios nanoestructurados para su uso en IT, por tal motivo se describe a continuación el concepto y las propiedades atribuidas a dicho polímero.

1.1.2.1. Poli(ácido láctico) (PLA)

El PLA, es un polímero termoplástico, semicristalino, biodegradable, biocompatible y pertenece a la familia de los poliésteres alifáticos comúnmente obtenido a partir de α -hidroxiácidos. Una de sus aplicaciones más recientes es en el campo de IT; basada en generar tejidos a partir de células cuyo crecimiento es guiado mediante andamios reabsorbibles. Gracias a su elevada resistencia a la tensión y un alto módulo de Young, es considerado un material idóneo para aplicaciones como la liberación de fármacos, suturas biodegradables y diferentes implantes para la fijación de fracturas.[31],[6],[1]

Entre las principales características de este polímero se encuentran; la cristalinidad con 38%, temperatura de fusión de 175 °C, temperatura de transición vítrea de 63 °C, y su tiempo de absorción cuando está implantado es alrededor de 1.5 años para 50-90 mg.[6] La degradación de los poliésteres alfa, como el PLA, inicia por hidrólisis y puede ser acelerada *in vivo* por la presencia de enzimas, lo cual conlleva a la liberación de sus respectivos monómeros (ácido láctico en este caso). Estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación y da inicio a la ruta metabólica. Con respecto a su composición química, se tiene un ácido orgánico con tres carbonos: en una terminal el átomo de carbón es parte del grupo carboxílico; el otro átomo de carbón terminal es parte de un metilo; y el átomo de carbón central está unido a un grupo alcohol; la estructura química de este polímero puede observarse en la Figura 1.2.

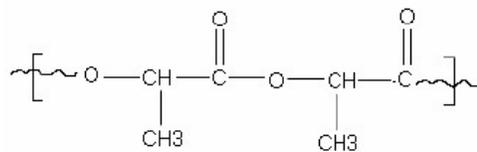


Figura 1.2: Estructura química del Poli(ácido láctico) (PLA).

El ácido láctico no puede ser directamente polimerizado en un producto útil, ya que cada reacción de polimerización genera una molécula de agua, cuya presencia degrada la formación de la cadena polimérica, hasta el punto de sólo obtener pesos moleculares muy bajos. En cambio, dos moléculas de ácido láctico se someten a una esterificación simple y luego catalíticamente se cicla para hacer un éster de dilactato cíclico. A pesar de que la dimerización también genera agua, puede ser separada antes de la polimerización debido a una caída significativa en la polaridad. El PLA de alto peso molecular se produce a partir del éster de dilactato (*lactida*) por polimerización de apertura de anillo (ver Figura 1.3 y 1.4), usando por lo general un octoato de estaño como catalizador (a nivel laboratorio se emplea comúnmente Cloruro de Estaño II), este mecanismo no genera agua adicional, por lo tanto, una amplia gama de pesos moleculares pueden obtenerse.[2]

1.2. Técnica de Electrohilado (Electrospinning)

Las primeras pruebas experimentales que implementaban la técnica de Electrohilado fueron estudiadas en 1914 por Zelenly y años más tarde en 1934 Formahls inventó y patentó un aparato electrostático que explicaba dicha técnica, donde a una solución polimérica se le aplicaba un campo eléctrico proveniente del electrodo de polaridad negativa para formar fibras delgadas que eran atraídas a un electrodo móvil de polaridad positiva, mientras un dispositivo con una cinta segmentada recolectaba las fibras, que luego eran removidas con un cilindro, como lo muestra la Figura 1.5. Posteriormente, se le da el nombre a la técnica como *Electrospinning* en 1994, término que se deriva de “hilado electrostático” [4].

Esta técnica se utiliza para la formación electrostática de membranas electrohiladas, donde se hace uso de fuerzas eléctricas para producir fibras con dimensiones en sus diámetros desde nanómetros (nm) hasta varios micrómetros (μm) a partir de soluciones poliméricas, dichas fibras poseen una proporción superficie-volumen muy alta, una estructura porosa y además se puede tener un control en su composición química; características que han logrado la aplicación de nanofibras exitosamente en diversos campos, tales como, andamios para IT, membranas de filtración, farmacéutica, biotecnología e Ingeniería ambiental. Actualmente, se ha incrementado el interés por las aplicaciones en IT debido a la forma que toman las fibras mimetizando en gran medida a la Matriz Extracelular (ECM) dentro del cuerpo.[32]

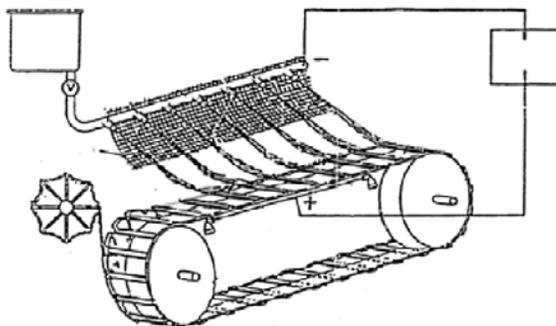


Figura 1.5: Aparato electrostático patentado por Formahls.[4]

1.2.1. Descripción del proceso de Electrohilado

En un sistema de Electrohilado se pueden observar cuatro componentes principales, los cuales se aprecian en la Figura 1.6; una fuente de alto voltaje, un dispositivo tubular delgado (aguja), un colector conectado a tierra y una bomba de inyección. El procedimiento para la fabricación de fibras se lleva a cabo, utilizando la fuente de alto voltaje para cargar con una determinada polaridad a la solución polimérica que posteriormente es dirigida hacia el capilar y finalmente hacia el colector de polaridad opuesta.[33],[34]

Para la preparación de la solución empleada, se solubiliza el polímero en algún solvente volátil adecuado, para obtener una solución homogénea compuesta de polímero-solvente, la cual será suministrada mediante el tubo capilar que se encuentra en la cámara de Electrohilado. Dentro de esta cámara, la solución que depende de su tensión superficial al final del tubo, es sometida a un campo eléctrico y una carga eléctrica es inducida en la superficie del líquido debido al campo. Cuando el voltaje se aplica inicialmente a la solución, la gota en la punta de la boquilla forma una superficie hemisférica; entonces conforme se aumenta el campo, la superficie pasa de una forma hemisférica a una esférica y finalmente a una forma cónica llamada “*Cono de Taylor*”, (ver Figura 1.7). En 1964, Taylor demuestra que a un voltaje crítico,

la forma de equilibrio de la solución suspendida es un cono con un ángulo semi-vertical de 49.3° . [35]

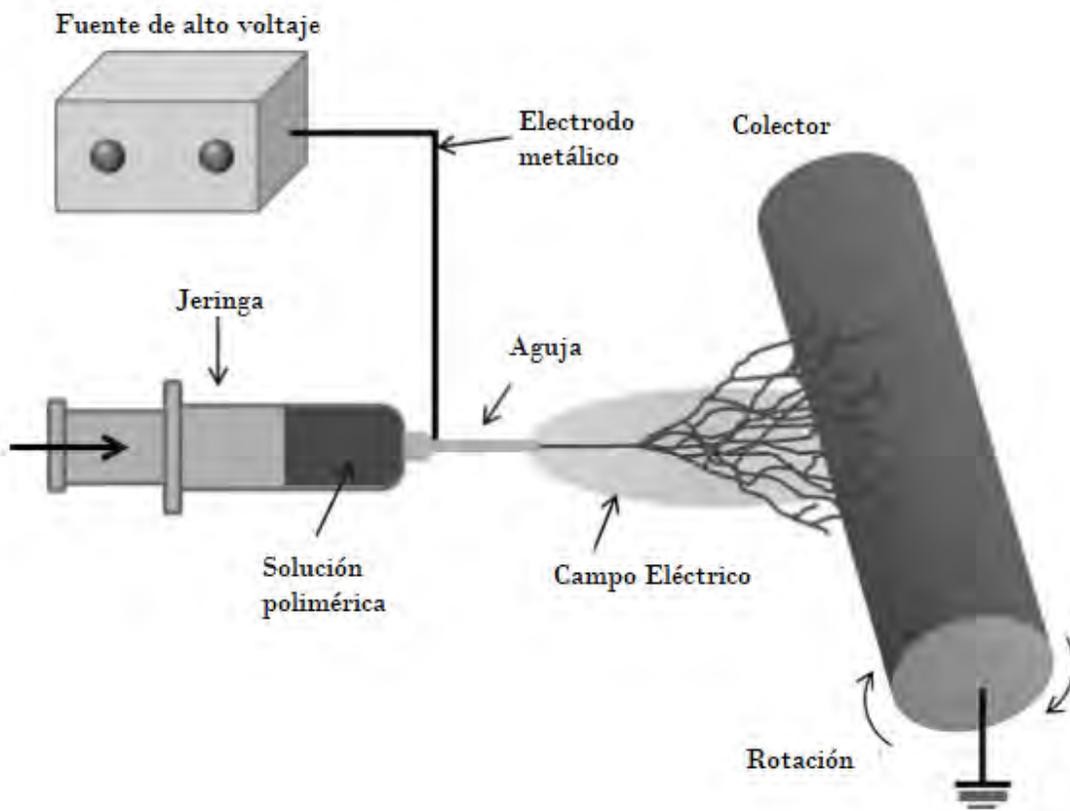


Figura 1.6: Diagrama esquemático del equipo de Electrohilado.

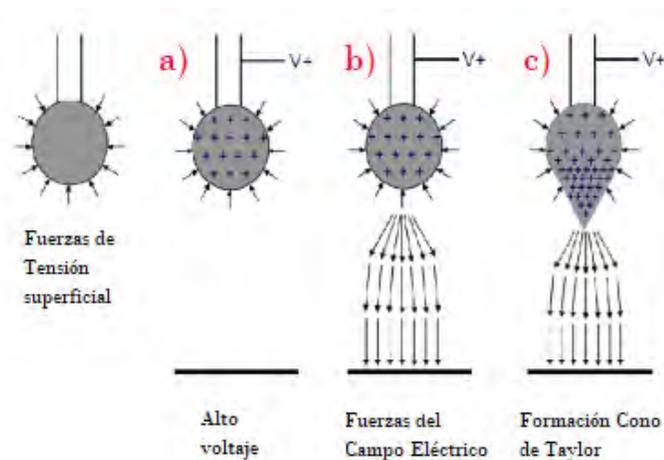


Figura 1.7: Ilustración esquemática de la formación del Cono de Taylor. (a) Las cargas superficiales se inducen en solución de polímero debido al campo eléctrico. (b) Se presenta una elongación en la gota colgante. (c) La deformación en la gota toma la forma del Cono de Taylor. [36]

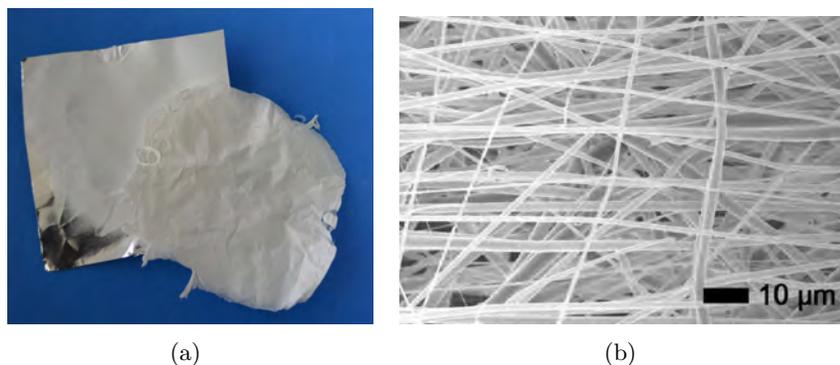


Figura 1.8: Andamios electrohilados. (a) Observación del andamio al finalizar el proceso de fabricación. (b) Imagen obtenida mediante Microscopía SEM de un andamio electrohilado. La barra de escala es de $10\ \mu\text{m}$.

Por último, cuando el campo eléctrico aplicado alcanza un valor crítico, las fuerzas eléctricas repulsivas superan las fuerzas de tensión superficial, con lo que se produce un chorro de la solución cargada, el cual es expulsado de la punta del Cono de Taylor como un rápido batido inestable que ocurre entre el tubo capilar y el colector, el cual es transformado posteriormente en “*jet*”, gracias al voltaje y al campo eléctrico aplicado que permiten la evaporación del solvente dando como resultado fibras de polímero[37]; la solución es solo estable en la punta del capilar e inmediatamente después comienza su inestabilidad. Shin estudia la inestabilidad del jet en función de la fuerza eléctrica del campo y argumenta que el mecanismo esencial del Electrohilado es como viaja rápidamente el fluido para formar el jet.[35] Como resultado final en el proceso de Electrohilado, se obtiene una estructura de fibras reforzadas con una gran cantidad de poros interconectados, formando una estructura tridimensional conocida como “andamio o scaffolds (su análogo en inglés)” (ver Figura 1.8).

1.2.2. Parámetros del proceso de Electrohilado

Existen parámetros que se consideran pertenecientes a la solución, como la concentración, la viscosidad, la conductividad, el peso molecular y la tensión superficial. Mientras que los parámetros a considerar en el proceso de Electrohilado, es la tensión eléctrica aplicada, el campo eléctrico, la distancia del capilar al colector, el tipo de colector y la velocidad de flujo. Mediante la manipulación apropiada de cada uno de estos parámetros se afecta significativamente la morfología presente en las fibras. A continuación se describen algunos de estos parámetros y su aportación que brindan a la morfología de la membrana:

Parámetros en la solución:[38]

1. *Peso molecular*. Tiene un efecto sobre las propiedades reológicas y eléctricas tales como; viscosidad, tensión superficial, conductividad y resistencia dieléctrica. Generalmente se utilizan soluciones de alto peso molecular, ya que proporcionan la viscosidad óptima para la producción de membranas electrohiladas. Investigadores han observado que soluciones de bajo peso molecular tienden a formar perlas unidas por fibras y una solución de alto peso molecular tiende a formar fibras con grandes diámetros.
2. *Concentración*. La relación que han encontrado investigadores entre la concentración polimérica y el diámetro de la fibra, es conocida como “*Ley de Potencia*”, la cual indica que “*Al aumentar la concentración en la solución, aumenta el diámetro de la fibra*”. [39]
3. *Conductividad*. Este parámetro se encuentra determinado principalmente por el tipo de polímero y el solvente empleado. Se ha reportado que al aumentar la conductividad eléctrica de la solución,

existe una disminución en el diámetro de las fibras, mientras que a una baja conductividad, resulta insuficiente el alargamiento del jet por la fuerza eléctrica para producir fibras uniformes.

Parámetros en el proceso de Electrohilado:[38]

1. *Tensión eléctrica aplicada.* Es bien conocido que solamente después de alcanzar la tensión umbral, ocurre la formación de fibras, debido a la afinidad de la solución con el campo eléctrico, dando inicio al proceso de Electrohilado. Por lo tanto, la aplicación de altas tensiones eléctricas facilitara la formación de fibras con menor diámetro, además de provocar la rápida evaporación del solvente.
2. *Razón de inyección.* Característica que influye en la velocidad y reacción del jet. Como resultado se ha reportado que una menor razón de flujo es más deseable, ya que el solvente tendrá un tiempo suficiente para la evaporación.
3. *Tipo de colector.* Existen diferentes tipos de colectores, tales como el papel conductor, tela conductora, mallas de alambre, barras cuadrículadas o alineadas, barras o ruedas giratorias, entre otras. Este parámetro es una herramienta de gran importancia y se utiliza dependiendo de las necesidades de cada aplicación en base a las ventajas y desventajas que ofrece cada uno. Sin embargo se ha reportado que para obtener una orientación privilegiada, es recomendable que las fibras se depositen en un colector giratorio o tambor rotante.[40]
4. *Distancia entre capilar y colector.* Parámetro indispensable para el control en diámetros y morfología. Se debe tener una distancia mínima para dar a las fibras el tiempo suficiente para secarse antes de llegar al colector, de lo contrario existirá la presencia de perlas o aglomeraciones.

De manera general, en soluciones poliméricas de muy alta viscosidad se presenta usualmente mayores tiempos de relajación, lo que puede prevenir la fractura del hilo expulsado durante el proceso. Un aumento en la viscosidad o concentración de la solución origina un mayor y más uniforme diámetro en la fibra. En soluciones de baja viscosidad, la tensión superficial es el factor dominante y solo es posible la formación de grumos o fibras con perlas; mientras que a valores por encima de una concentración crítica se obtiene una estructura fibrosa cuya morfología es afectada por el valor de la concentración. Tan et al., reportan que la variable más importante para minimizar el diámetro de las fibras es el peso molecular promedio y la concentración, así como también la conductividad eléctrica del sistema solvente; obteniendo como parámetro optimizado, que las concentraciones deben ser altas para producir nanofibras uniformes considerando un campo eléctrico bajo. Por lo tanto, se puede entender que el rol del peso molecular y la concentración influyen en las cadenas enredadas que presenta el polímero en la solución.[33] Por otra parte, Doshi y Reneker relatan acerca del proceso de Electrohilado y las propiedades físicas de las nanofibras poliméricas electrohiladas; encontrando que al reducir la tensión superficial, las fibras se producen junto con perlas, sin embargo con alta densidad de carga de la solución, obtuvieron fibras más delgadas sin perlas.[35]

Mientras tanto, además de las ventajas que aporta la técnica de Electrohilado, ésta permite incorporar múltiples polímeros y elementos bioactivos para apoyar la neoformación de tejidos. Tales elementos son factores de crecimiento y de estimulación, como los NTCMP y Nanopartículas Magnéticas, que mejoran ciertas propiedades del material con el que se encuentran interactuando.

Los NTCMP tienen propiedades físicas excepcionales, por ejemplo la capacidad de reducir la cantidad de espacios vacíos dentro de la estructura del andamio, además de incrementar su módulo de Young, tenacidad, fuerza de tensión y conductividad.[33] Por otro lado, las Nanopartículas Magnéticas tienen buena estabilidad química y alta anisotropía, características que ayudan a reconocerlas como un nanomaterial magnético prometedor.[41] Recientes investigaciones reportan la posibilidad de obtener nanofibras por electrohilado a partir de mezclas poliméricas con nanopartículas incorporadas, mencionan además

que dichas mezclas tienen potencial como refuerzo en materiales compuestos[42]; Zong et al., demuestran que nanomateriales pueden ser colocados dentro de fibras, con la adición de una partícula, por lo que el diámetro de la fibra y el diámetro de la distribución entre cada fibra se reduciría, una hipótesis que explica este efecto, es que la adición de la partícula mantiene una mayor densidad de carga uniforme.[40]

Por lo tanto las fibras magnéticas o conductoras de un material en el que factores de estimulación se encuentran embebidos en una matriz polimérica, se pueden producir mediante la técnica de Electrohilado convencional o con un accesorio para Electrohilado Coaxial. Estos métodos son sencillos y versátiles para producir compuestos funcionales, que poseen una gran longitud y diámetro uniforme.

1.3. Nanotecnología

La nanociencia es el estudio del control de sistemas cuyo tamaño es de unos pocos nanómetros (1-100). El prefijo “nano” pertenece al griego y significa “mil millones” (una mil millonésima parte de un metro es la unidad de medida que se usa en el ámbito de la Nanotecnología).[43] Por lo tanto, la palabra “nanotecnología” es la ciencia o ingeniería que involucra materiales o componentes que tienen una organización funcional en la escala nanométrica, y se refiere principalmente al diseño, caracterización y producción de nanoestructuras novedosas (nanoaparatos y nanosistemas), que permiten trabajar y manipular las estructuras, a nivel de átomos y moléculas.[44],[43],[45]

La nanotecnología se caracteriza por ser un campo esencialmente multidisciplinario, y cohesionado exclusivamente por la escala de la materia con la que trabaja. Para comprender el potencial de esta tecnología, es clave saber que las propiedades físicas y químicas de la materia cambian a escala nanométrica, lo cual se debe a efectos cuánticos. La conductividad eléctrica, el calor, la resistencia, la elasticidad, la reactividad, entre otras propiedades, se comportan de manera diferente que en los mismos elementos a mayor escala.[43] La habilidad de manipular la materia a nanoescala, promete un enorme potencial para diversas aplicaciones e innovaciones, involucrando nuevos materiales para áreas como: almacenamiento, producción agrícola, conversión de energía, sistemas de administración de fármacos y tecnologías para la información. Para dichas aplicaciones existen nanomateriales, que son sintetizados y modificados con el fin de mejorar su desempeño en procesos tecnológicos e industrializados, dentro de los nanomateriales con mayor interés se encuentran los nanotubos de carbono y partículas de óxidos metálicos, debido a que tienen estructuras con precisión atómica.[43],[45]

1.3.1. Nanotubos de Carbono (NTC)

Los nanotubos de carbono son las únicas estructuras que poseen elevadas propiedades mecánicas y electrónicas, derivadas de su composición química, la cual es similar a la del grafito, además poseen diámetros que pueden variar desde 1-30 nm y longitudes que van desde algunos nm hasta varios μm . El primer reporte acerca de la observación de filamentos de carbono con dimensiones nanométricas fue realizado por Oberlin en 1976. Posteriormente mediante microscopía electrónica de alta resolución fue posible demostrar que estas estructuras estaban compuestas de capas concéntricas de grafito[46], y a partir de entonces se han llevado a cabo grandes esfuerzos para comprender el origen sus propiedades, y encontrar aplicaciones potenciales para este tipo de nanomateriales en diversas áreas.

Los nanotubos de carbono pueden ser considerados como una red hexagonal de átomos de carbono que ha sido enrollada formando un cilindro hueco, uniendo sus bordes (sin costura), además tienen los extremos cerrados. De esta manera, en una red de nanotubos puede existir una combinación de tubos metálicos como semiconductores, donde la transmisión de electrones entre los nanotubos se debe al contacto que existe entre cada uno de éstos, presentando una contribución a la resistencia total del sistema.[47]

La combinación de dimensiones y estructura posiciona a los nanotubos dentro de un amplio intervalo de propiedades superiores, debido a la formación de enlaces covalentes $C - C$. Otras propiedades dependen de factores como el diámetro y la quiralidad, siendo éste, un término empleado para especificar la arquitectura de un nanotubo.[46] Gracias a sus propiedades electrónicas y mecánicas, se ha reportado su empleo como reforzantes en matrices poliméricas generando materiales nanoestructurados con mejor desempeño mecánico y baja densidad[48], estos nanomateriales son ideales para la fabricación de nanoelectrodos, con dimensiones para trabajar a nivel biomolecular dentro del cuerpo humano como las dendritas o la laminina, que es un componente extracelular clave en el tejido nervioso con dimensiones de aproximadamente $75 \mu\text{m}$.

1.3.1.1. Síntesis de Nanotubos de Carbono

En la actualidad existen distintos métodos para la producción de nanotubos de carbono, ya sea comerciales o a nivel laboratorio, la elección de cada uno de éstos estriba en la cantidad de producto obtenida en un intervalo de tiempo, así como de la pureza del producto y la fuente de carbono empleada. Entre los métodos más populares se encuentran, la ablación por láser y la deposición química de vapores.[46]

En la ablación por láser; una pieza de grafito es vaporizada mediante radiación láser a elevadas temperaturas ($\sim 1200 \text{ }^\circ\text{C}$) en una atmósfera inerte (He-Ar), sin embargo, la calidad y rendimiento de los nanotubos obtenidos va a depender de la temperatura de reacción, y que a bajas temperaturas la calidad disminuye y comienzan a presentarse defectos. Por otra parte, en el método de deposición química de vapores (CVD), se utilizan hidrocarburos en fase gas como fuente de carbono, y un catalizador o mezclas metálicas como Ni/Fe/Co, las cuales actúan como núcleos para el crecimiento de los nanotubos. Dicho proceso se lleva a cabo a menores temperaturas ($500\text{-}1000 \text{ }^\circ\text{C}$) y puede producir nanotubos de pared sencilla, de pared múltiple y nanofibras dependiendo del tipo de catalizador empleado.

1.3.1.2. Purificación de Nanotubos de Carbono

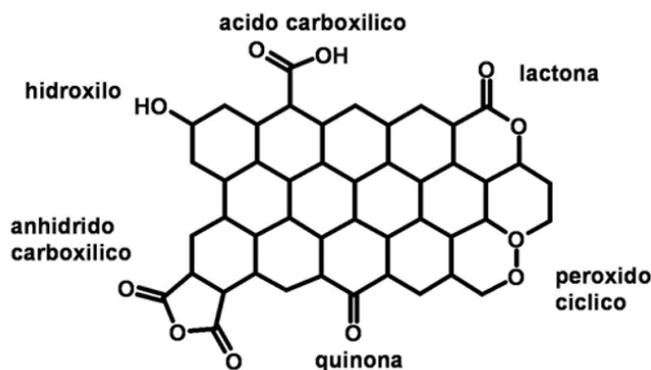


Figura 1.9: Grupos funcionales que contienen oxígeno, formados en la superficie de nanotubos de carbono mediante tratamiento con ácidos concentrados.

Los nanotubos de carbono fabricados por diferentes métodos convencionales, generalmente contienen impurezas o restos de catalizadores, que es necesario removerse para obtener un material puro. Para

esto existen diversos métodos de purificación, el más empleado recurre al tratamiento con ácidos concentrados ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$), sin embargo se ha observado que esta técnica genera defectos y en ocasiones puede dañar la superficie de los nanotubos, a pesar de ello, estos defectos provocan el rompimiento de enlaces que dan lugar a la formación de grupos funcionales que contienen átomos de oxígeno, tales como ácidos carboxílicos, lactonas, cetonas, anhídridos carboxílicos, fenol, entre otros, (ver Figura 1.9).[49] Otro método de purificación, es la grafitización (oxidación), a temperaturas entre 600-700 °C, lo que permite remover restos de carbono amorfo. Una modificación de este proceso, emplea una atmósfera inerte con Ar o He, en la cual se someten los nanotubos a altas temperaturas, del orden de 1800-2600 °C, lo cual permite además de remover el carbón amorfo, eliminar restos de catalizadores como Hierro.[50],[46]

1.3.1.3. Tipos de Nanotubos de Carbono

Existen fundamentalmente dos tipos de nanotubos de carbono en función de las capas de grafito que los conforman: estos pueden ser de pared sencilla (SWCNT, por sus siglas en inglés) y de paredes múltiples (MWCNT por sus siglas en inglés).[8],[46]

En el caso de los nanotubos de pared sencilla; su estructura consiste en una sola hoja de grafito enrollada formando un cilindro hueco, causando la presencia de excepcionales propiedades, derivadas de la perfección cristalina en su estructura y unidimensionalidad. Los átomos de carbono en la hoja de grafito que forman este tipo de nanotubos se encuentran covalentemente enlazados a tres átomos de carbono vecinos mediante una hibridación tipo sp^2 , mientras que el cuarto enlace del carbono queda deslocalizado entre los demás átomos. El diámetro promedio de estos nanotubos varía entre 1.4-2 nm, (ver Figura 1.10a).[51]

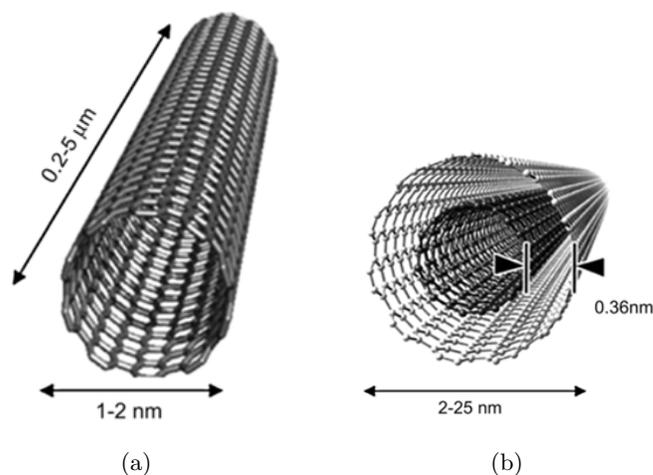


Figura 1.10: Esquema de estructuras para diferentes tipos de nanotubos de carbono. a) Nanotubos de carbono de pared simple NTCPS o SWCNT. b) Nanotubos de carbono multi-pared NTCMP O MWCNT.

Los nanotubos de pared múltiple; consisten en varias hojas de grafito enrolladas concéntricamente, con un espacio de separación de 0.36 nm, (ver Figura 1.10b). Estos nanomateriales, presentan una hibridación tipo sp^2 , similar al caso de los nanotubos con pared simple, sólo que en este caso el cuarto enlace del carbono forma enlaces débiles del tipo van der Waals con las demás hojas de grafito, lo que le confiere también un carácter semiconductor a la estructura formada. En este caso, el diámetro varía entre 10-100 nm, dependiendo de la cantidad de hojas concéntricas, sin embargo se ha reportado que la perfección en

la estructura cristalina de estos nanomateriales, se pierde conforme se aumenta el número de hojas de grafito.[46]

1.4. Técnicas estándares de caracterización

Para entender las características de las fibras electrohiladas, se emplean diversas técnicas en general para el estudio de materiales, sin embargo la elección de éstas va a depender de la información que se desee obtener con respecto a un análisis morfológico, químico, térmico o mecánico.

1.4.1. Caracterización morfológica

La caracterización física es asociada a la estructura y morfología de las nanofibras que conforman la muestra. Las propiedades geométricas de las nanofibras incluyen distribución de diámetros, orientación privilegiada, forma de la sección transversal y la rugosidad en la superficie. Para un análisis de este tipo de propiedades se utiliza frecuentemente la Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).

1.4.1.1. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización de la superficie al proporcionar información morfológica del material analizado, la obtención de imágenes se basa en un patrón de escaneo con un haz de electrones de alta energía. Por lo tanto, es capaz de proporcionar imágenes de muy alta resolución (inferior a 1 nm) en su modo estándar de detección, además es posible aplicar un amplio rango de magnificaciones de 10-500,000 veces. Como requisito para el análisis es importante que las muestras puedan conducir electricidad por lo que es necesario recubrirlas con una capa delgada de oro o platino.

En un microscopio electrónico de barrido se distinguen principalmente un cañón de electrones con un filamento emisor, un sistema de lentes electromagnéticas que focaliza y reduce el haz de electrones proveniente del filamento; un sistema de barrido que hace recorrer sobre la superficie de la muestra al haz de electrones una vez que está focalizado; un método para coleccionar y amplificar los electrones emitidos y transformarlo en una señal eléctrica y un sistema de vacío que mantenga una presión menor a 10-5 Torr.[31]

Su funcionamiento consiste en acelerar los electrones en un campo eléctrico, para aprovechar de esta manera su comportamiento ondulatorio, lo cual se lleva a cabo en la columna del microscopio a alto vacío (superior a 10-5 Torr), donde se aceleran mediante una diferencia de potencial de 1,000 - 30,000 V. Los electrones acelerados salen del cañón, y se enfocan mediante las lentes condensadora y objetiva, cuya función es reducir la imagen del filamento, de manera que incida en la muestra un haz de electrones muy estrecho, lo que ayuda a tener una gran profundidad de campo mostrando una apariencia tridimensional y una mejor resolución espacial de la estructura de la superficie de la muestra. Cuando el haz incide sobre la muestra, las bobinas deflectoras barren este fino haz de electrones sobre la muestra, punto por punto y línea por línea, produciendo diferentes interacciones entre los electrones del mismo haz y los átomos de la muestra, estas interacciones son captadas por detectores, amplificadas y transmitidas a una pantalla, donde se expresan en términos de variación luminosa.[52] Por lo tanto, la energía que pierden los electrones al “chocar” contra la muestra (electrones retrodispersados) pueden hacer que otros electrones salgan disparados (electrones secundarios), produciendo Rayos X característicos para cada uno de los elementos presentes en la muestra, lo que proporciona al MEB una capacidad analítica muy importante;

una representación esquemática del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido se muestra en la Figura 1.11.[52],[31]

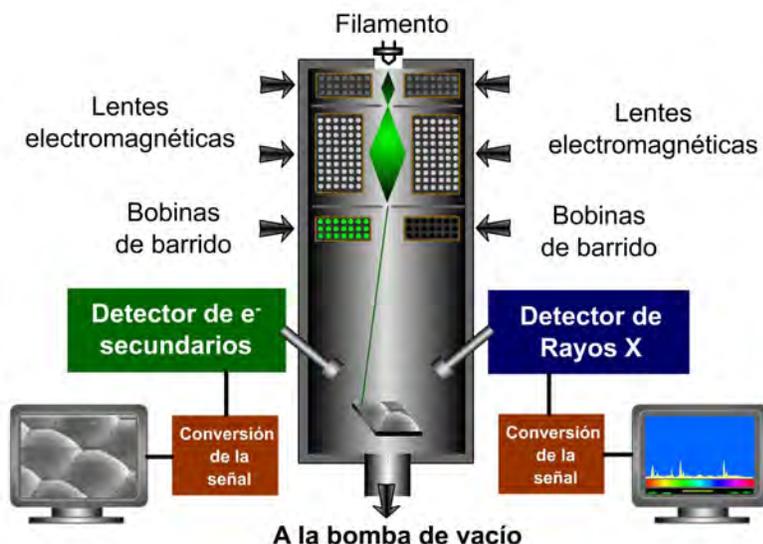


Figura 1.11: Representación esquemática de la columna de un microscopio electrónico de Barrido.

De esta manera, en la Microcopia Electrónica las señales que se generan y tienen mayor interés son[31]:

- *Electrones secundarios* (arrancados de la muestra por el haz primario): los cuales dan información sobre las capas más superficiales de la muestra, originando la imagen propia y característica del SEM, con gran profundidad de foco y un aspecto completamente tridimensional.
- *Electrones retrodispersados* (electrones del haz primario que rebotan en la muestra): su cantidad depende del número atómico de los componentes en la muestra y proporcionan una imagen con expresión química o de composición que puede plasmarse en una gráfica.

Algunas de las ventajas que proporciona esta técnica de Microscopia, es que no disminuye la brillantez, ni hay rotación de la imagen al incrementar la amplificación. Además las fotografías se adquieren en forma externa al sistema de vacío del microscopio, lo cual elimina los posibles contaminantes producidos por la desgasificación de la película fotográfica.

1.4.2. Caracterización físico-química y térmica

La caracterización de la estructura molecular de una nanofibra, puede ser analizada mediante las técnicas de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) y Espectroscopía Raman. Mientras que la estructura supermolecular está relacionada con la configuración de las macromoléculas en una nanofibra, y se caracteriza por la birrefringencia óptica; Difracción de Rayos X de ángulo amplio (DRX) y Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB).

1.4.2.1. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier por Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

La espectroscopía FTIR es una técnica versátil que se aplica a la determinación de grupos funcionales característicos en especies moleculares, particularmente compuestos orgánicos, abarcando la región infrarroja (parte cercana " $\lambda=143,000-4,000 \text{ cm}^{-1}$ ", media " $\lambda=4,000-400 \text{ cm}^{-1}$ " y lejana " $\lambda=400-10 \text{ cm}^{-1}$ ") del espectro electromagnético. El principio de esta técnica se basa en la absorción característica de la radiación infrarroja por las moléculas en vibración. Una molécula absorbe la energía de un haz de luz IR, cuando dicha energía incidente es igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional; por lo tanto la molécula vibra de una cierta forma gracias a la energía que se le suministra mediante luz IR. La posición de absorción en la región infrarroja puede expresarse en función de las longitudes de onda (λ) o del número de onda (cm^{-1}) de la radiación absorbida.[53]

Un espectrofotómetro funciona con una pequeña muestra colocada en una celda, donde es sometida a una fuente de luz infrarroja, la cual hace un barrido en el rango deseado, de modo que la intensidad de la luz transmitida a través de la muestra es medida en cada número de onda, lo que permite que la cantidad de luz absorbida por la muestra sea calculada por la diferencia entre la intensidad de la luz antes y después de pasar por la celda, produciéndose con esto, un espectro de absorción infrarroja (ver Figura 1.12). En dicho espectro se pueden identificar los grupos funcionales de la muestra asociados a los valores de longitud de onda, por lo que es posible encontrar los tipos de vibraciones que se presentan en la molécula, por ejemplo; cuando la energía que excita a las moléculas posee una longitud de onda perteneciente al infrarrojo cercano, las moléculas pueden presentar vibraciones armónicas o sobretonos; si dicha energía se encuentra dentro del infrarrojo medio las vibraciones fundamentales que se presentan son principalmente rotacionales-vibracionales; mientras que en el infrarrojo lejano se presentan vibraciones rotacionales.[54]

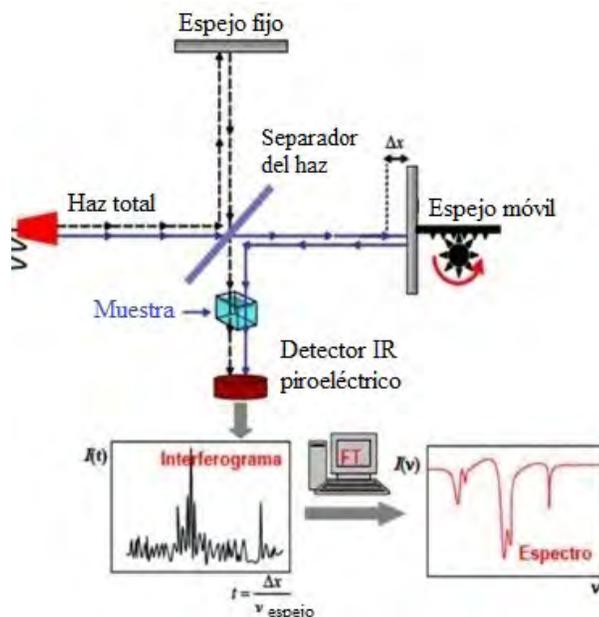


Figura 1.12: Representación esquemática del funcionamiento de un espectrofotómetro para FTIR.

Sin embargo, cuando la muestra presenta un cierto grado de opacidad, no es adecuada para éste análisis convencional, por lo tanto se acoplan accesorios en los equipos FTIR de manera sencilla como es el caso del dispositivo de Reflectancia Total Atenuada (ATR), en el cual el haz infrarrojo se dirige a un cristal denso ópticamente, con un alto índice de refracción en determinado ángulo, provocando una reflectancia

interna que crea una onda evanescente, misma que se extiende más allá de la superficie del cristal hasta la muestra en contacto con el cristal.

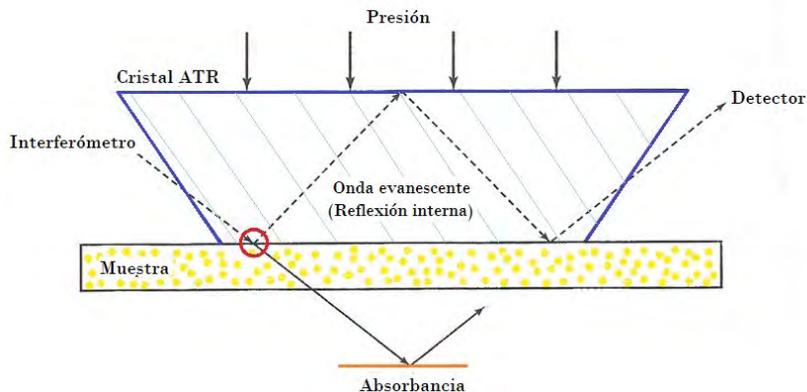


Figura 1.13: Funcionamiento en representación esquemática del dispositivo ATR.

En las regiones del espectro de infrarrojos en las que la muestra absorbe energía, la onda evanescente se atenúa. El haz atenuado vuelve al cristal, sale a continuación por el extremo opuesto del cristal y se dirige al detector en el espectrómetro IR. El detector registra el haz IR atenuado como una señal del interferograma, la cual es primordial para generar el espectro infrarrojo; este funcionamiento se muestra como una representación esquemática en la Figura 1.13.[55]

Por lo tanto, en la técnica de Reflectancia Total Atenuada utilizada en FTIR, es posible medir cambios directamente en la superficie del material, y es ideal para muestras muy absorbentes o gruesas, las cuales suelen producir picos intensos si se miden mediante la transmisión. La técnica funciona bien con estas muestras porque la intensidad de las ondas evanescentes se reduce exponencialmente con la distancia desde la superficie del cristal de ATR, lo que tiene como resultado que la técnica sea en general insensible al grosor de la muestra. Entre las ventajas al emplear el ATR, se encuentra la preparación mínima de las muestras, limpieza rápida y fácil, y el análisis de muestras en su estado natural (no es necesario calentar, aplicar presión para obtener gránulos ni triturar para recopilar los espectros).

1.4.2.2. Espectroscopía Raman

La Espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución, que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto (orgánico y/o inorgánico) permitiendo así su identificación. De esta manera, cuando se combina un espectrómetro Raman dispersivo y un microscopio confocal en un sólo dispositivo, la técnica recibe el nombre de “Microscopia Raman”, permitiendo la obtención del espectro correspondiente a la muestra, junto con su respectiva imagen confocal.

El análisis mediante Espectroscopía Raman se basa en hacer incidir un láser de radiación monocromática visible o infrarroja (con frecuencia ν_0) sobre una muestra cuyas características moleculares se desean determinar, examinando la luz dispersada por dicha muestra. La mayor parte de esta luz presenta la misma frecuencia que la luz incidente pero una fracción muy pequeña experimenta ligeros cambios frecuenciales, resultado de la interacción de la luz con la materia. La luz que mantiene la misma frecuencia ν_0 que la luz incidente se conoce como dispersión Rayleigh y no aporta ninguna información sobre la composición de la

muestra; mientras que, la luz dispersada que presenta frecuencias distintas a la de la radiación incidente, se conoce como dispersión Raman y es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra.[53],[3],[56]

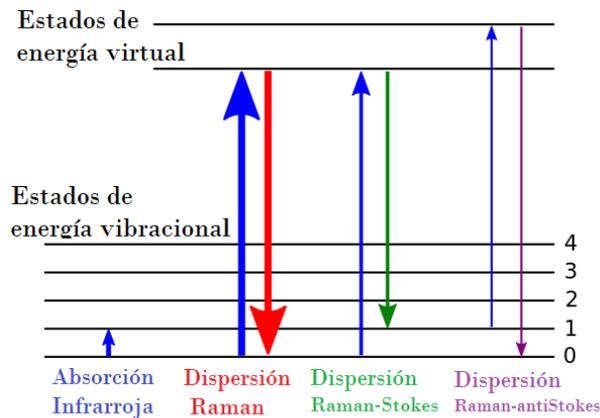


Figura 1.14: Diagrama energético mostrando los estados implicados en la señal Raman.

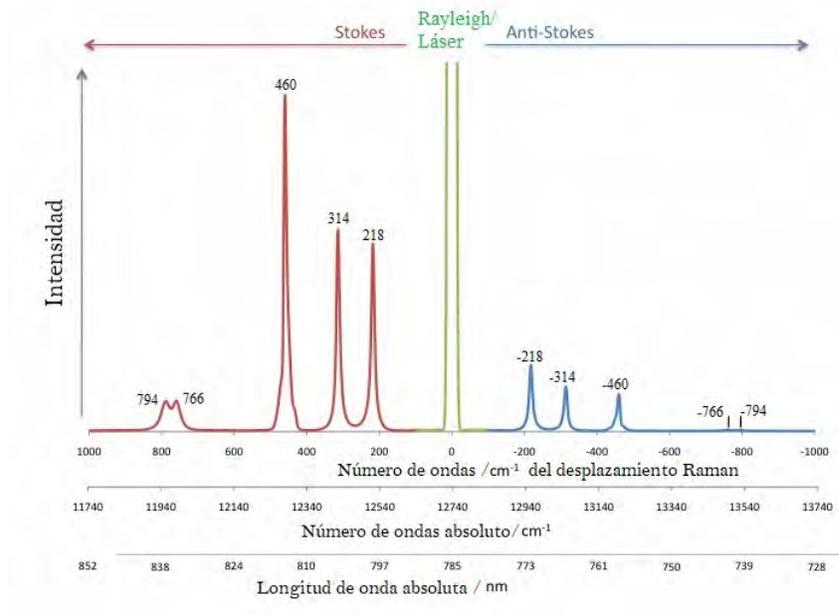


Figura 1.15: Espectro con bandas Rayleigh, Raman Stokes y Raman anti-Stokes.

Las nuevas frecuencias $+\nu_r$ y $-\nu_r$ son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente, las variaciones de frecuencia observadas en este fenómeno de dispersión, son equivalentes a variaciones de energía. Por lo tanto, dicha dispersión puede ser interpretada como el siguiente proceso: el fotón incidente lleva a la molécula transitoriamente a un nivel de energía vibracional (o rotacional) superior no permitido, el cual abandona rápidamente para pasar a uno de los niveles de energía permitidos emitiendo un fotón; la frecuencia a

la cual es liberado este fotón dependerá del salto energético realizado por la molécula. Entre los posibles casos se distinguen los siguientes (ver Figura 1.14)[56],[57]:

1. Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a la misma frecuencia que el fotón incidente, es un choque elástico, ya que ni el fotón ni la molécula sufren variaciones en su estado energético; la molécula vuelve al mismo nivel de energía que tenía antes del choque y el fotón dispersado tiene la misma frecuencia ν_0 que el incidente, dando lugar a la dispersión Rayleigh.
2. Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a una frecuencia distinta del incidente, es un choque inelástico (existe transferencia de energía entre la molécula y el fotón), en este caso pueden darse dos fenómenos:
 - Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la del incidente, se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula, que después de pasar al estado de energía no permitido, vuelve a uno permitido mayor al que tenía inicialmente; el fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 - \nu_r$ y se produce la dispersión Raman-Stokes.
 - Si el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor a la del incidente, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón; significa que la molécula inicialmente antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental sino en uno de mayor energía y después del choque pasa a este estado; el fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 + \nu_r$ y se produce la dispersión Raman anti-Stokes.

El espectro Raman recoge estos fenómenos representando la intensidad óptica dispersada en función del número de onda normalizado ν al que se produce. El número de onda normalizado es una magnitud proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional a la longitud de onda, y se expresa en cm^{-1} , ($\nu = \nu/c = 1/\lambda$). Como se observa en la Figura 1.15 el espectro Raman, está formado por una banda principal o Rayleigh y dos series de bandas secundarias correspondientes a las bandas Raman-Stokes y anti-Stokes, situadas simétricamente a ambos lados de la banda Rayleigh.[56]

Por último, la Microscopía Raman ofrece varias ventajas para su análisis, por ejemplo, las muestras no necesitan ser fijadas o seccionadas, ni de algún tipo de preparación especial, además los espectros pueden ser obtenidos a partir de un volumen muy bajo (1 μm de diámetro), por lo que se considera una técnica no-destructiva.

1.4.2.3. Difracción de Rayos X de ángulo amplio (DRX)

La técnica de Difracción de Rayos X es utilizada en el análisis de estructuras de polímeros semicristalinos y otros compuestos orgánicos que forman cristales. El patrón de difracción generado permite determinar la composición química o fase de la película, así como cuantificar la presencia de sus cristales.[58]

Los Rayos X se generan en un dispositivo conocido como tubo de Rayos-X, que consiste en un cátodo con un filamento incandescente de Tungsteno que emite e^- que son acelerados bajo vacío por un alto voltaje aplicado a lo largo del tubo (del orden de 20-50 kV). El haz de electrones incide sobre un blanco metálico, ánodo o anticátodo (habitualmente Cu o Mo y menos frecuentemente Cr, Fe, Co o Ag).[58],[59] Cuando los electrones penetran en el metal se desaceleran y emiten radiación continua en un intervalo de longitudes de onda (ver Figura 1.16).

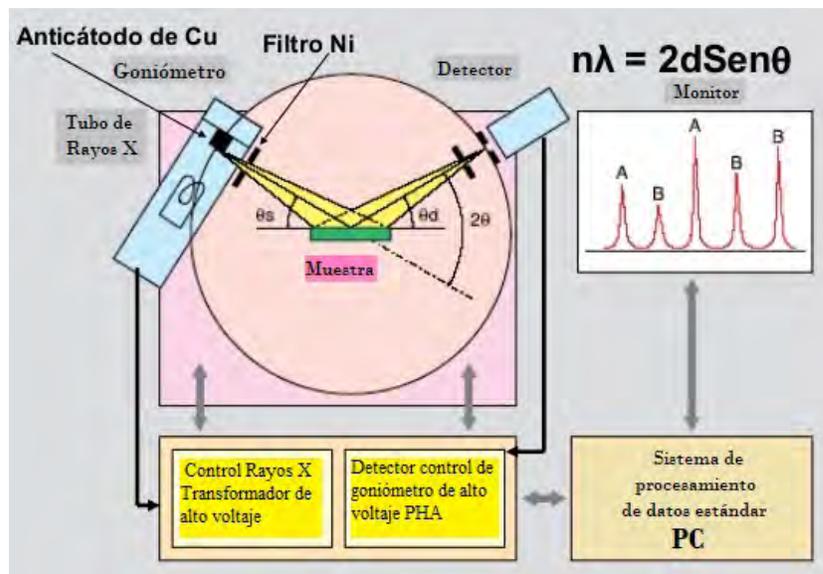


Figura 1.16: Configuración esquemática del difractor de Rayos X.

Una fracción de los electrones incidentes interactúa con los electrones de las capas internas de los átomos, dando lugar a una colisión que expulsa un electrón y a su vez otro electrón de mayor energía desciende al sitio vacante, emitiendo el exceso de energía como un fotón de Rayos X.[60] La interacción de los Rayos-X con la materia esencialmente ocurre mediante dos procesos:

- Algunos fotones del haz incidente son desviados sin pérdida de energía, constituyen la radiación dispersada exactamente con la misma λ que la radiación incidente (es la que origina el fenómeno de la difracción).
- Los fotones pueden sufrir una serie de choques inelásticos al incidir sobre un blanco y su energía incrementa la temperatura de la muestra o da lugar al fenómeno de fluorescencia.

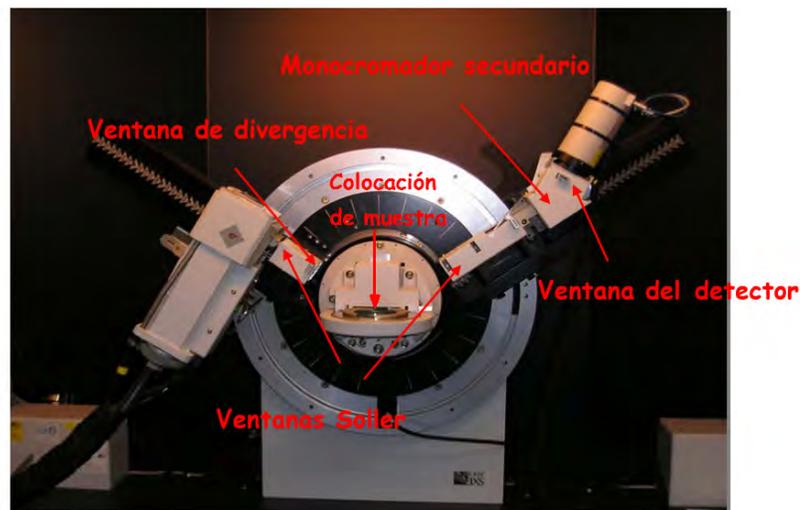


Figura 1.17: Ubicación de las ventanas y monocromadores en un difractor de Rayos X.

Con objeto de obtener una buena resolución al mismo tiempo que una buena intensidad en un difractómetro convencional se utilizan los siguientes dispositivos, en la Figura 1.17 se señala su ubicación;

- *Ventana de divergencia*: se coloca en el camino del haz incidente, antes de la muestra, para limitar la divergencia del haz incidente y por tanto el área “iluminada” en dicha muestra. Su principal función es disminuir el background, aunque en ocasiones también se disminuye la intensidad de los haces difractados.
- *Ventana de dispersión*: se coloca inmediatamente después de la muestra.
- *Ventana del detector*: se coloca antes del detector. Cuanto menor es su abertura mayor es la resolución obtenida, pero menor la intensidad.
- *Ventanas Soller*: consisten en un conjunto de finas placas metálicas paralelas al círculo del difractómetro. Estas placas eliminan una gran proporción de rayos inclinados respecto al plano del círculo del difractómetro.
- *Monocromador secundario*: el más utilizado es de grafito. Consisten en un cristal orientado de manera que la difracción se produce únicamente para una λ determinada. Debe ser mecánicamente resistente, la intensidad difractada debe ser elevada para reducir la pérdida en lo posible, el carácter de mosaico debe ser pequeño para reducir la divergencia. La superficie se curva para enfocar el haz difractado en un área pequeña.

El fenómeno de DRX se produce si existe una disposición ordenada de átomos y sí se cumplen las condiciones que vienen dadas por la Ley de Bragg, si no se cumple esta Ley, la interferencia es de naturaleza no constructiva y el campo del haz difractado es de muy baja intensidad. La ley de Bragg se representa con la siguiente expresión[3]:

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

donde; λ = longitud de onda de los Rayos X

d = distancia interatómica

θ = ángulo de incidencia del haz difractado

n = número entero que corresponde a la diferencia de trayectos (direcciones) entre el haz difractado y el haz transmitido.

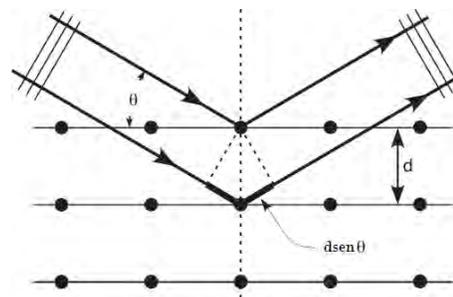


Figura 1.18: Representación esquemática de la Ley de Bragg.

En resumen, la DRX es esencialmente un fenómeno de dispersión, en el que la muestra se escanea en un ángulo amplio de Rayos X y la intensidad de difracción se representa como una función del ángulo 2θ . Cuando los Rayos X se dirigen en los sólidos, se dispersan en patrones predecibles sobre la base de la estructura interna del sólido, provocando la visualización de espacios que pueden ser descritos por planos

imaginarios; la intensidad del patrón de estos espacios es directamente proporcional al número de electrones que se encuentran en los planos imaginarios. Cada sólido cristalino tendrá un patrón único de espacios interplanares, que es una “huella digital” para dicho sólido. De hecho sólidos con la misma composición química pero diferentes fases pueden ser identificadas por su patrón de espacios interplanares.[61] Un difractograma de Rayos-X recoge los datos de intensidad en función del ángulo de difracción (2θ) obteniéndose una serie de picos. Los datos más importantes obtenidos a partir de un difractograma son los siguientes:

- Posición de los picos expresada en valores de θ , 2θ , d ó $q = 1/d^2$.
- Intensidad de pico. Las intensidades se pueden tomar como alturas de los picos o para trabajos de más precisión las áreas. Al pico más intenso se le asigna un valor de 100 y el resto se reescala respecto a éste.
- Perfil de pico. Aunque se utiliza menos que los anteriores la forma de los picos también proporciona información útil sobre la muestra analizada.

1.4.2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)

La Calorimetría Diferencial de Barrido es una técnica experimental termoanalítica en la que se mide la diferencia de cantidad de calor aportado entre una muestra y una referencia, como una función de la temperatura, cuando las dos están sometidas a un ciclo de temperatura controlado.[62],[3] Es decir, CDB nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas.[63] Existen dos modos de operación en CDB, la calorimetría de potencia compensada y la calorimetría de flujo de calor, sin embargo en este estudio nos concentraremos en “calorimetría de flujo de calor”.

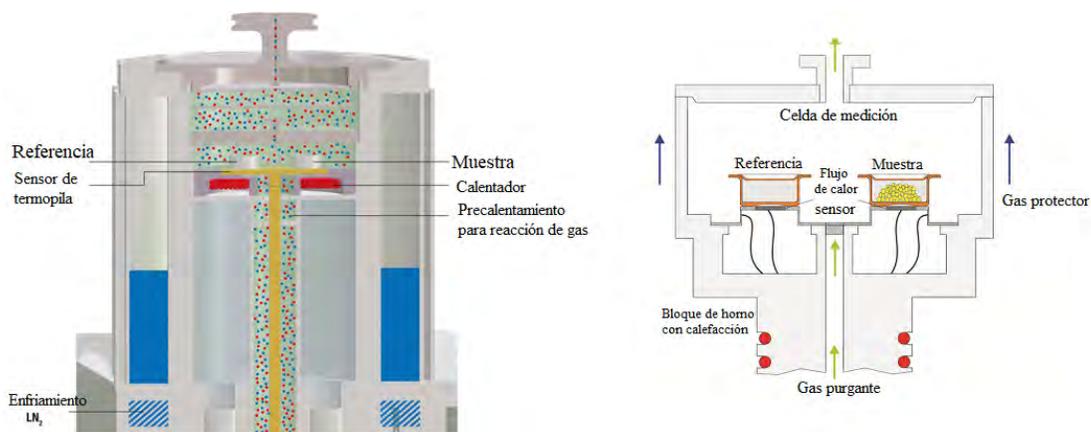


Figura 1.19: Representación esquemática del equipo para CDB.

El proceso de CDB radica en dos cápsulas; una de ellas contiene la muestra a analizar y la otra está generalmente vacía (cápsula de referencia). Durante el procedimiento se usan calefactores individuales para cada cápsula y un sistema de control comprueba si se producen diferencias de temperatura entre la muestra y la referencia (la temperatura aumenta linealmente como función del tiempo). Si se detecta cualquier diferencia, los calefactores se corregirán de tal manera que la temperatura se mantendrá

igual en ambas cápsulas, (ver Figura 1.19). Es decir, cuando tiene lugar un proceso exotérmico o endotérmico, el instrumento compensa la energía necesaria para mantener la misma temperatura en ambas cápsulas, determinando la temperatura de transformación y la entalpía de la muestra, lo que proporciona información cuantitativa y cualitativa conforme a los cambios físicos y químicos involucrados en ambos procesos.[53] Dichas mediciones se registran en un termograma y se requiere de la interpretación en términos de posibles procesos reactivos.

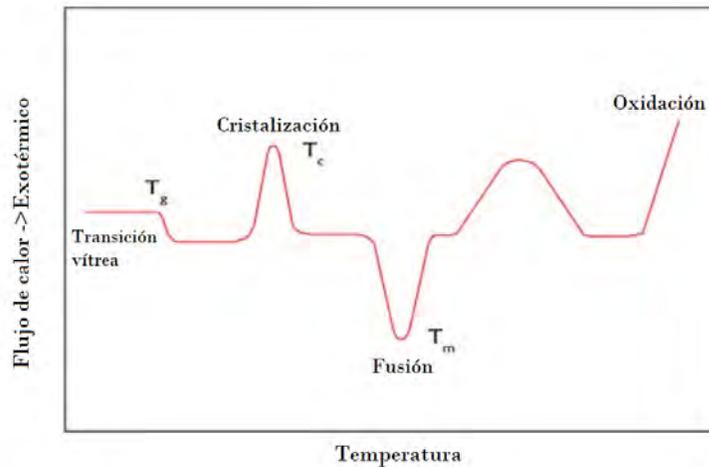


Figura 1.20: Diagrama de temperaturas características en CDB.

Entre las diversas utilidades de CDB se destacan las siguientes[63]:

- Medidas de capacidad calorífica aparente (fenómenos de relajación estructural).
- Determinación de temperaturas características de transformación o de transición tales como: temperatura de transición vítrea (T_g), transición ferro-paramagnética, temperatura de cristalización (T_c), transformaciones polimórficas, temperatura de fusión (T_f o T_m), ebullición, sublimación, temperatura de descomposición (T_d), isomerización (ver Figura 1.20).[53]
- Estabilidad térmica de los materiales.
- Cinética de cristalización de los materiales.

1.4.3. Caracterización mecánica

Un andamio electrohilado debe proporcionar estabilidad mecánica inicial y fomentar una distribución uniforme de células, permitiendo su inmovilización y manteniendo diferenciado al fenotipo celular. Por lo que es de suma importancia, conocer las propiedades mecánicas a las que responde un material (en nuestro caso andamio) cuando se le somete a una fuerza externa, generando relaciones del tipo tensorial con la deformación que sufre dicho material.[6] El diseño de la forma y secciones, para determinar estas propiedades, se debe realizar con criterios específicos, empleando la menor cantidad posible de material y sobre todo evitando que se produzcan fallos mecánicos.

Existen varios tipos de ensayos que permiten identificar la resistencia del material mediante su sometimiento a distintos esfuerzos, por ejemplo; la capacidad que tiene un material para soportar una carga,

puede determinarse mediante una prueba de tensión o compresión, mientras que las pruebas de penetración y rasgado, ayudan a determinar la dureza (resistencia a la penetración o indentación). La técnica de indentación ha sido la más utilizada para medir las propiedades mecánicas de los materiales, debido a la facilidad y velocidad con la que puede llevarse a cabo. Durante las últimas dos décadas, el alcance de las pruebas por indentación, se ha extendido hasta la escala nanométrica, debido al desarrollo de nuevos sensores y actuadores que permiten indentaciones instrumentadas a este tipo de escala.[3] Otras de las pruebas son las de impacto, que determinan la tenacidad de un material, indicando que tan frágil o dúctil puede ser, el proceso se lleva a cabo mediante cargas de choque y variación de temperatura. Las pruebas de fatiga miden el periodo de vida útil de un material que se somete a cargas cíclicas. Para evaluar el comportamiento de un material sometido a una carga y una temperatura elevada, se determinan los valores de fluencia y ruptura. La información obtenida de éstas y otras pruebas más especializadas son de gran utilidad para el diseñador, fabricante o investigador.[5]



Figura 1.21: Dispositivos comerciales para pruebas mecánicas[5]: a)máquina de esfuerzo horizontal de TMI y b)máquina universal 50kN-AT de TMI.

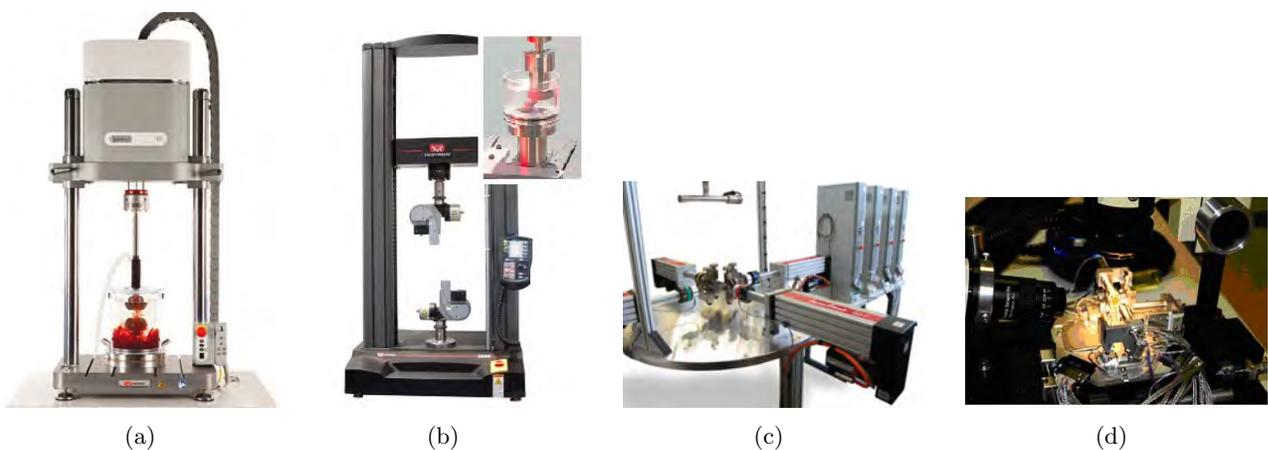


Figura 1.22: Dispositivos comerciales para pruebas mecánicas más sofisticadas.[5] Máquinas universales INSTRON: a)electroPuls E3000 y b)bioPuls. c)Máquina Zwick que permite realizar ensayos biaxiales. d)Máquina Zyvex L100 que cuenta con una cámara CCD, para registrar el desarrollo experimental de la prueba.

Una de las aportaciones que tienen las pruebas mecánicas, es que son consideradas como una herramienta muy útil para determinar ciertas propiedades de los biomateriales, que permitan optimizar su desempeño. Para ésto, existe una gran variedad de productos capaces de realizar una amplia gama de pruebas mecánicas; desde dispositivos comerciales, como máquinas de esfuerzo horizontal (TESTING MACHINES INC, con 500 N/112.4 libras de fuerza máxima, velocidad de 5-120 mm/min y longitud máxima de 180 mm, ver Figura 1.21a) y máquinas universales para pruebas como la que se muestra en Figura 1.21b (Máquina 50 kN-AT, con capacidad de 3 kN, 674.4 libras de fuerza, velocidad de 0.001-1000 mm/min y longitud de 60 mm).[5].

En las máquinas universales para pruebas de INSTRON se encuentran la ElectroPuls E3000 (puede acostarse para realizar pruebas horizontales) y el BioPuls (contiene mordazas neumáticas sumergibles de aluminio recubiertas con teflón), ambos dispositivos se pueden apreciar en la Figura 1.22a y 1.22b, respectivamente. También existen máquinas de ensayos biaxiales mediante la sincronización por software, como es el caso de la Zwick (ver Figura 1.22c), diseñada para realizar esfuerzos biaxiales en probetas de plástico o en materiales biomecánicos, dicha máquina está compuesta con 4 servo-actuadores electro-mecánicos dispuestos de forma horizontal con ángulos de 90° entre ellos. Otro diseño de los sobresalientes para pruebas mecánicas es la máquina Zyvex L100 (ver Figura 1.22d), que es capaz de registrar el desarrollo experimental de una prueba mecánica para su posterior análisis, contando con una cámara CCD (dispositivo de carga acoplada) y un microscopio óptico.[5]

1.4.3.1. Diagrama esfuerzo-deformación

Sin embargo, de los diferentes ensayos existentes, el más empleado es el de tracción en una dimensión, el cual entrega la mayoría de los datos relevantes para un primer estudio mecánico en los materiales. Esta prueba consiste en someter a un material (en forma de probeta y con dimensiones determinadas) a un esfuerzo en la dirección de su eje, hasta romperlo; dicho ensayo se inicia mediante el desplazamiento del cabezal de la máquina en las condiciones definidas, fijando la velocidad de desplazamiento o la velocidad de aplicación de carga, definidos por el usuario. A medida que la probeta se alarga, la máquina universal registra la carga de la fuerza aplicada, y alargamiento de la probeta, hasta su rotura. Los datos obtenidos permiten generar la gráfica tensión/desplazamiento, a partir de las dimensiones iniciales de la probeta, los datos originales de fuerza y alargamiento se transforman en esfuerzo y deformación, que permiten caracterizar las propiedades mecánicas que se derivan de este ensayo. Los resultados del ensayo de tracción quedan reflejados en un diagrama en el que los valores de deformación (alargamientos) producidos se representan en el eje de abscisas, y las tensiones de tracción aplicadas en el eje de ordenadas.[5],[6]

Por lo tanto, con los datos que se obtienen en una prueba de tensión, se genera una gráfica del esfuerzo aplicado vs la deformación unitaria del material, en la cual se aprecia una curva característica de las propiedades del material, que no depende de las dimensiones particulares de la muestra. Si bien este diagrama contiene información útil para el análisis de un material, no puede emplearse directamente para predecir la deformación de una pieza del mismo material pero de diferentes dimensiones. Estos diagramas esfuerzo-deformación varían en forma considerable, debido a los diferentes ensayos de tensión llevados a cabo sobre el mismo material; sin embargo, es posible distinguir algunas características comunes entre dichos diagramas, que permiten clasificar al material como dúctil o frágil.[5]

Los materiales dúctiles, como el acero estructural, así como muchas aleaciones de otros metales, se caracterizan por su capacidad de fluir a temperaturas normales. Al someterse la probeta a una carga que aumenta su deformación, ésta se incrementa primero longitudinalmente, proporcional a la carga y a una tasa muy lenta. Así, la porción inicial del diagrama esfuerzo-deformación es una línea recta con una pendiente pronunciada (ver Figura 1.23). No obstante después de alcanzar un valor crítico (σ_{YP}) del esfuerzo,

la probeta experimenta una gran deformación con un incremento relativamente pequeño de la carga aplicada. Esta deformación es causada por el deslizamiento del material a lo largo de superficies oblicuas y se debe sobre todo a esfuerzos cortantes. Como puede notarse en los diagramas esfuerzo-deformación de los materiales dúctiles típicos (ver Figura 1.23), la elongación de la probeta después de que ha comenzado a fluir puede ser 200 veces más grande que su deformación anterior a la fluencia. Después de haber alcanzado un cierto valor máximo de carga, el diámetro de una porción del espécimen comienza a disminuir, debido a la inestabilidad local, este fenómeno se conoce como estricción. Después de que comienza la estricción, son suficientes cargas algo menores para lograr que la probeta se alargue aún más, hasta que finalmente se fracture.[5]

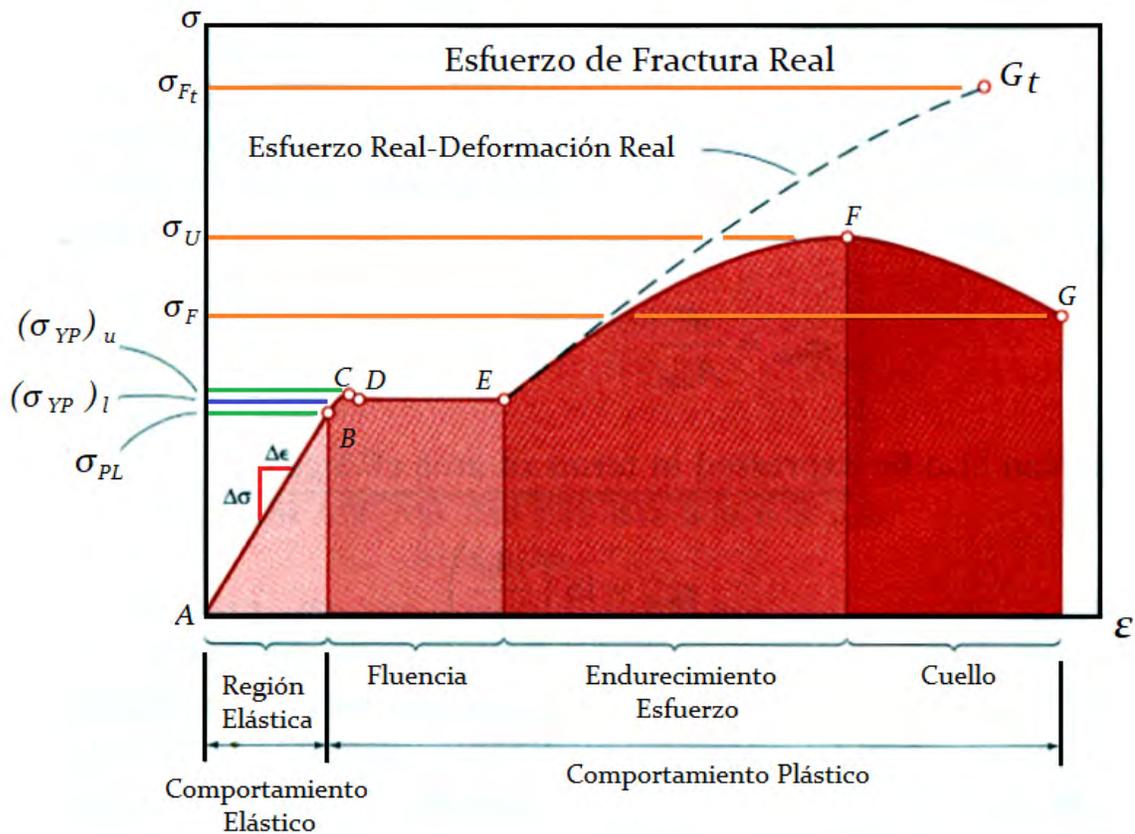


Figura 1.23: Diagrama esfuerzo-deformación del Acero estructural (considerado material dúctil).

El esfuerzo σ_{YP} , donde comienza la fluencia se conoce como resistencia, punto de fluencia ó cedencia del material; mientras que el esfuerzo σ_U corresponde a la máxima carga aplicada al material y se conoce como resistencia última, y por último el esfuerzo σ_F correspondiente a la fractura y se denomina resistencia a la fractura (ver Figura 1.23). Por otro lado, se conoce que la deformación unitaria al momento de la fractura, es menor para los materiales frágiles que para los materiales dúctiles. A continuación se describen a detalle algunos de los resultados que proporciona el diagrama de esfuerzo-deformación.

1.4.3.2. Módulo de Elasticidad

La primera porción que se observa lineal en el diagrama de esfuerzo-deformación (ver Figura 1.23) indica que el esfuerzo (σ) es directamente proporcional a la deformación (ϵ), este comportamiento en el

rango elástico sigue una ley, conocida como “Ley de Hooke”, donde la pendiente en la porción lineal define al Módulo de Young o Módulo de Elasticidad (\mathbf{E}) de un material:[6]

$$\sigma = \mathbf{E} \epsilon$$

Como la ϵ es una cantidad adimensional, el módulo \mathbf{E} se expresa en las mismas unidades que el σ , es decir, en Pascales o en uno de sus múltiplos si se emplean unidades del SI (Pa, kPa, MPa o N/mm²). El máximo valor de esfuerzo para el que se puede emplear la ley de Hooke en un material dado, se conoce como límite de proporcionalidad de ese material. Hay materiales en los que no se puede definir con tanta facilidad, debido a que resulta difícil determinar con exactitud el valor del esfuerzo σ para el que la relación σ y ϵ deja de ser lineal.[5]

1.4.3.3. Fluencia o cedencia

Se define como el punto en el cual el material sufre una deformación plástica, es decir el material pasa de la zona de deformación elástica y queda deformado permanentemente (ver Figura 1.23 y 1.25). El cambio del comportamiento elástico a plástico no se detecta con facilidad, por lo que se determina una fluencia convencional al 0.2 % ($\epsilon=0.002$), refiriéndose a un método calculado por desviación. La forma más común de definir este valor, es por medio de una gráfica que resulta de aplicar una prueba de tensión al material, trazando una línea paralela a la zona elástica, pero con un desplazamiento del 0.2 % sobre el eje X, el punto en el que esta línea se intercepta con la curva, es el valor de esfuerzo de cedencia o resistencia a la cedencia a una desviación del 0.2 % (ver Figura 1.24)[6],[5]

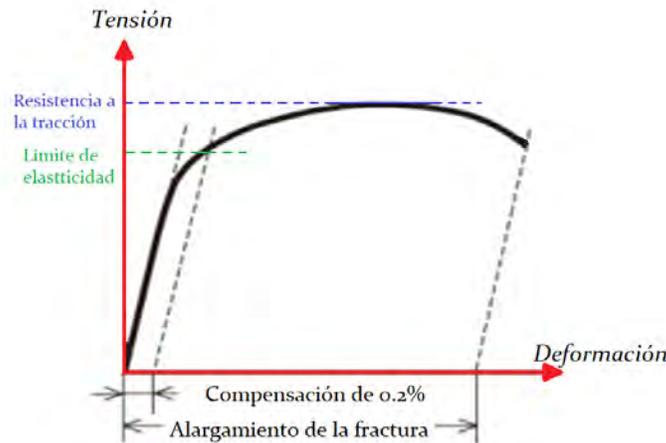


Figura 1.24: Determinación de la fluencia o cedencia convencional del 0.2% de deformación.[6]

1.4.3.4. Máximo esfuerzo

Es la resistencia máxima al material observada en la curva como el punto más alto (F), asociado al esfuerzo σ_U (ver Figura 1.23). Este esfuerzo máximo puede dar alguna indicación de la presencia de defectos, por ejemplo; si el material contiene porosidades o inclusiones, estos defectos pueden causar un decremento mayor al normal de la resistencia máxima del material.[6]

1.4.3.5. Tenacidad

Es una medida de la capacidad del material para absorber energía antes de la fractura, la geometría de la probeta, así como la manera en la que se aplica la carga son importantes para determinarla. Se calcula mediante el área bajo la curva, que genera el diagrama de esfuerzo-deformación (ver Figura 1.23), desde el comienzo del ensayo hasta la fractura del material, sus unidades correspondientes son energía por unidad de volumen (J/mm^3 , MPa).[6]

1.4.3.6. Ductilidad

Es una medida del grado de deformación plástica que puede ser soportada por el material hasta que este se fractura, (ver Figura 1.25), en los casos donde un material experimenta poca o ninguna deformación plástica, se denomina frágil.[6] Existen dos formas para la determinación de la ductilidad, una de ellas es por medio del cálculo en el porcentaje de alargamiento:[5]

$$\text{Porcentaje de alargamiento} = 100 * \frac{L_f - L_0}{L_0}$$

donde;

L_0 Longitud inicial de la probeta.

L_f Longitud final a la ruptura.

Otra medida de ductilidad que es empleada en ocasiones, es el porcentaje de reducción del área:

$$\text{Porcentaje de reducción de área} = 100 * \frac{A_0 - A_f}{A_0}$$

donde;

A_0 Área inicial de la sección transversal de la muestra.

A_f Mínima área de sección transversal a la fractura.

En el caso de que a un material dúctil se le aplique una carga de compresión, la curva de esfuerzo deformación que se obtendrá será esencialmente la misma a lo largo de su porción inicial. Para un acero dado la resistencia a la fluencia es la misma tanto a tensión como a compresión. Para valores mayores de deformación, las curvas de esfuerzo-deformación a tensión y compresión difieren, además de que no existe una estricción a compresión. En la mayoría de los materiales dúctiles, se encuentra que la resistencia última a compresión es mucho mayor que la resistencia última a tensión. Este fenómeno se debe a las fallas que existen en el material, las cuales debilitan a éste durante la prueba de tensión.[5]

1.4.3.7. Deformación elástica y plástica

De manera general, en el diagrama esfuerzo-deformación se puede observar varias regiones, donde se encuentran clasificadas en dos regiones; una región elástica y una plástica (ver Figura 1.23 y 1.25). La región elástica corresponde a la primera parte de la curva y se caracteriza por la inexistencia de deformación residual en el caso de que se produzca la descarga, es decir, la deformación experimentada por la probeta no es permanente, por lo que si se detiene el ensayo la probeta recuperará su longitud inicial. Esta región se encuentra a su vez por dos zonas, las cuales son:

- **Zona proporcional.** Relación de proporcionalidad entre la tensión y la deformación experimentada por la probeta, se cumple con la Ley de Hooke.
- **Zona no proporcional.** Las deformaciones no son permanentes; si se detiene el ensayo y se deja de aplicar una fuerza a la probeta, recuperará su longitud inicial.

La región plástica se encuentra relacionada con los alargamientos permanentes, es decir, si el ensayo se detiene la probeta no recuperará la deformación elástica persistiendo al final una deformación remanente o plástica. Dicha región se distingue por las zonas:

- **Zona de deformación plástica uniforme.** La curva se hace más tendida, por lo que no es necesario un incremento de carga elevado para conseguir grandes alargamientos. La fuerza máxima dividida entre la sección inicial de la probeta determina la resistencia a la tracción, punto en el que finaliza la zona plástica de deformación uniforme.
- **Zona de estricción o de deformación plástica localizada.** La deformación se localiza en una determinada zona de la probeta, la tensión disminuye y la probeta termina por romper dicha zona.

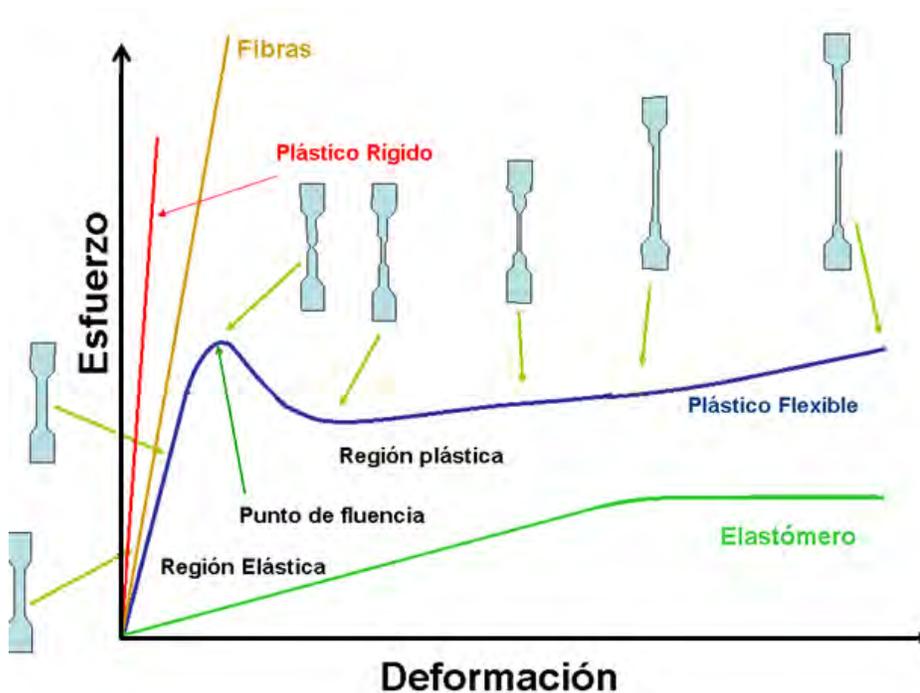


Figura 1.25: Esquema del diagrama esfuerzo-deformación, que muestra el proceso que sufre una probeta al someterse a una prueba mecánica.

1.5. Cultivos celulares

Un cultivo celular es un procedimiento tecnológico de mantenimiento y estudio de las células vivas en un medio artificial que permite reproducir, de forma bastante fiable, las condiciones biológicas que las células tienen en su lugar de origen. Las áreas de aplicación de los cultivos celulares se han ido ampliando

de forma progresiva, por lo que constituyen ya una técnica habitual en muchos procedimientos de investigación.[64]

Potencialmente todas las células son cultivables, pero cada una de ellas tiene peculiaridades y requerimientos específicos.[65] Ellos hacen que existan numerosos modelos diferenciados de cultivo celular. Según su estructura, se pueden diferenciar tres grandes grupos de cultivo celular: cultivo de órgano, cultivo de tejido y cultivo de células aisladas.

La posibilidad de realizar cultivos celulares es relativamente reciente. Harrison[66] y Carrel[67] describieron entre 1885 y 1900 las primeras técnicas de cultivo para intentar mantener neuronas vivas fuera del organismo. En 1944, Gey[68] consiguió el primer cultivo de células tumorales. Las técnicas de separación enzimática de tejido se iniciaron en 1952 cuando Moscona[69] tripsinizó fragmentos de embrión de pollo y consiguió células aisladas capaces de crecer *in vitro* sobre placas de cultivo, técnica que, con mejoras, sigue aún usándose en nuestros días. En los últimos veinte años, y de forma clara sin capacidad de reproducción o división celular se pueden mantener en medios de cultivo de forma limitada y a las que se denominan células terminales.

Tal es el caso de las neuronas o de las células cardíacas; otros tipos celulares como los fibroblastos, células epiteliales y las tumorales se mantienen de forma más prolongada en los medios de cultivo. En los últimos años la aplicación de la tecnología del cultivo celular ha permitido grandes avances en la comprensión de los mecanismos implicados en los procesos intracelulares e intercelulares con el establecimiento de co-cultivos. El cultivo celular es un proceso en el cual las células son capaces de continuar desarrollándose cuando han sido extraídas del tejido original al cual pertenecían, eso siempre y cuando se tengan las condiciones apropiadas, nutrientes y factores de crecimiento necesarios.

Existen dos tipos de cultivo, uno es el llamado cultivo *in vitro* el cual se lleva a cabo en un recipiente externo al animal y el cultivo *in vivo* que da lugar dentro de algún ser vivo; en ambos casos, las células que intervienen son consideradas como unidades independientes, éstas pueden ser genéticamente idénticas, es decir que forman una población homogénea, o pueden ser genéticamente distintas formando una población heterogénea.[31]

1.5.1. Crecimiento celular en cultivo

Algunas células son obtenidas de una colección de cultivos o mediante un aislamiento de tejido al cual pertenecen. Para que la célula se pueda reproducir es necesario que permanezca anclada a un sustrato (en este caso una caja petri); la interacción entre la membrana celular y la superficie de crecimiento envuelven interacciones tipo Van der Waals o electrostáticas donde la adhesión celular tiene lugar mediante cationes divalentes (Ca^{2+}) y diversas proteínas básicas formando una capa entre célula y el sustrato. Las células tienen un límite de crecimiento en el que pasado un cierto tiempo, entran en una fase de envejecimiento y no crecen más. Este límite depende de los nutrientes que hay en el medio, la presencia de sustancias tóxicas provenientes del metabolismo de las células y para ello es recomendable cambiar el medio de cultivo cada dos días aunque se tenga una mayor densidad celular.

1.5.2. Pases de un cultivo celular

Los pasos que se realizan en un cultivo celular deben poseer una nomenclatura para poder distinguir los procesos que han tenido lugar sobre ellos. Como por ejemplo, el cultivo primario es aquel cuyas células proceden directamente del tejido animal y son añadidos al cultivo celular, cuando estas células son capaces de reproducirse con facilidad, ocasionando un mayor crecimiento, se deberá realizarse un nuevo cultivo

celular y para ello se traspasan algunas células al nuevo medio, esta acción es conocida como “pase”, y al nuevo cultivo se le nombra “cultivo secundario”. Por lo tanto, a cada pase se le es asignado un número, correspondiente al número de veces que se prolifera un cultivo celular.

Es importante realizar el número de pases adecuados y diferenciar las células cuando la densidad es tan alta que impide su crecimiento, además la temperatura debe ser 310 °K y el pH de 7.4. Debido a que las células se encuentran ancladas a la base del recipiente en el que fueron depositadas, es necesario despegarlas mediante tripsinización. La tripsina es una enzima proteolítica que descomponen las cadenas que funcionan como enlace entre el sustrato y la célula, esta enzima se añade por un tiempo no muy corto para limpiar las células en el recipiente de cultivo, pero el tiempo tampoco debe ser muy largo, debido a que la tripsina puede dañar a las células.

1.5.3. Fases de un cultivo celular

1. Fase inicial: En esta fase no existe crecimiento de células aparente debido a que apenas se da la formación de los factores de crecimiento, los cuáles son necesarios para poder alcanzar la concentración celular, de lo contrario, el crecimiento celular no se llevara a cabo. El tiempo que dura esta fase depende del medio de cultivo, de la concentración inicial celular y del estado de las células; si la densidad inicial de las células es menor, el tiempo de formación de los factores de crecimiento es mayor.
2. Fase de crecimiento: Durante este período las células aumentan de manera exponencial, como lo expresa la siguiente ecuación:

$$N=N_0 * 2^x$$

donde, N es la concentración final de células.

N_0 es la concentración inicial celular.

x es el número de generaciones de crecimiento celular.

3. Fase estacionaria: Esta fase se da cuando no hay un crecimiento celular mayor por lo cual la velocidad de muerte celular es igual a la velocidad de crecimiento celular. Aunque no crecen, las células continúan siendo activas metabólicamente. El crecimiento celular se puede ver limitado por diversos factores:
 - Los nutrientes han sido reducidos a un nivel tal que actúan como inhibidores de crecimiento celular.
 - Existencia de acumulación de productos procedentes del metabolismo que actúan como inhibidores de crecimiento celular.
 - Las mismas células forman una capa que cubre la superficie de crecimiento.
4. Fase de deterioro: Esta fase tiene lugar como consecuencia de la muerte celular. Existen dos posibles mecanismos de la muerte celular;
 - Apoptosis: Es conocida como suicidio celular ya que es una muerte programada donde la célula al morir empaqueta su contenido, evitando así, que se produzca una respuesta inflamatoria.

De esta manera son fácilmente englobadas vía fagocitosis por lo que sus componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente.

- Necrosis: Comprende un estado irreversible de la célula la cual no es capaz de mantener la integridad de la membrana plasmática de manera que se hincha y revienta derramando todo su contenido, posiblemente dañino, por todo el espacio intercelular. Como consecuencia se crea la respuesta inflamatoria en el tejido *in situ*, pero no en el cultivo celular. “El principal problema que se presenta en cultivos celulares es la contaminación debido a que éstos son susceptibles a la presencia de bacterias y hongos”.

1.5.4. Condiciones de cultivo

En cuanto a temperatura, las mejores condiciones se establecen cuando ésta es de 310 °K pero si llega a ser menor lo único que ocurre es que la velocidad de crecimiento disminuye sin llegar a dañar a las células. Si la temperatura es mayor a 312 °K las células son destruidas.

En el caso del pH, este debe ser de 7.4 mantenido por el CO₂ el cual es el principal proceso que opera en la sangre de un ser vivo. Por ello, los protocolos de ensayos de cultivo describen que la atmósfera de la incubadora es rica en CO₂. Así mismo, el bicarbonato presente en el medio cuya concentración normalmente es de 24 mM se mantiene en equilibrio con el CO₂ presente en la fase gaseosa siendo su porcentaje de un 5%. No obstante para asegurar el buen mantenimiento del pH del cultivo suele ponerse un 10% de CO₂ en la fase gaseosa. Además de esto debe de tenerse en cuenta el medio que se utiliza a la hora de sumergir las células ya que dependiendo del medio dicho porcentaje variará.[31]

1.5.5. Caracterización biológica de los Cultivos Celulares

Los cultivos celulares presentan ciertas ventajas, por ejemplo, se obtiene una buena reproducibilidad de los resultados primordialmente en aquellos que tienen poblaciones homogéneas, además, debido a las diversas investigaciones que se realizan con los cultivos celulares, los laboratorios en donde practican con animales han establecido varios procedimientos toxicológicos que son más baratos en cultivos celulares que en ensayos con animales. Además, existen protocolos bien establecidos en los cuales se extraen únicamente las células de interés, lo cual garantiza la inexistencia de contaminantes como virus o bacterias.

No obstante, también hay desaciertos ya que si un cultivo celular se mantiene por un periodo largo de tiempo, las células pueden cambiar sus características originales debido a que van adaptándose a distintos nutrientes y condiciones.

Generalmente la caracterización biológica de algún material se realiza mediante el análisis del cultivo celular por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), pruebas de viabilidad celular con Microscopía Confocal Láser de Barrido (CLSM), e incluso pruebas de tinción con Azul de Tripano, entre otras.

Hipótesis

Las matrices fabricadas con fibras de poli(ácido-láctico) y nanotubos de carbono (PLA-NTCMP) mediante la técnica de Electrohilado funcionan como soportes para la proliferación celular, incrementando las propiedades mecánicas y eléctricas de las fibras, para posibles aplicaciones potenciales en Ingeniería de Tejidos.

Objetivos

Objetivo General

Encontrar las condiciones óptimas para electrohilar fibras de Poli(ácido láctico) PLA, y estudiar las propiedades físico-químicas de los Nanotubos de carbono multi-pared (NTCMP) embebidos en las fibras electrohiladas de PLA, para observar sus interacciones con cultivos celulares.

Objetivos Específicos

1. Encontrar las condiciones óptimas de los parámetros involucrados en el proceso de Electrohilado (concentración, voltaje aplicado, distancia entre aguja-colector y razón de inyección) para la fabricación de fibras de PLA.
2. Producción de fibras electrohiladas de PLA, embebiendo en ellas NTCMP, empleando las condiciones óptimas.
3. Caracterizar por medio de las técnicas estándares para polímeros (SEM, FTIR, DRX, CDB y Microscopía Raman) las fibras compuestas de PLA-NTCMP.
4. Adicionalmente realizar un análisis de pruebas mecánicas y eléctricas a los andamios fabricados.
5. Pruebas piloto de un cultivo *in vitro* con línea celular NG108-15 sobre los andamios fabricados, para estudiar el comportamiento de las células con los materiales.

Capítulo 2

Metodología Experimental

La investigación se enfocó en el estudio de los parámetros que afectan la morfología y uniformidad de andamios electrohilados de PLA; se encontraron las condiciones óptimas para la concentración del polímero, voltaje aplicado, razón de inyección y distancia entre la aguja y colector, basados en la idea de producir fibras poliméricas uniformes y en escala nanométrica. Una vez encontrados los parámetros ideales se emplearon para la fabricación de andamios compuestos (PLA-NTCMP), se estudió la variación en el porcentaje correspondiente a la concentración de los NTCMP, y finalmente se realizó las caracterizaciones apropiadas a la composición e interacción de los materiales involucrados, en los análisis desarrollados durante la presente investigación se usó equipo experimental que es descrito en las siguientes secciones para cada uno de los estudios.

2.1. Materiales

Para la realización de los andamios poliméricos biodegradables se utilizó, el polímero PLA de la compañía PromaPlast (Nature Works), con $Mw=180\text{ kg/mol}$, en forma de pellets. Las características suministradas por el fabricante del producto se muestran en la Tabla 2.1. Para la caracterización en cuanto a la identificación, determinación de la estructura química y cristalinidad del polímero, se utilizó un solvente con parámetro de solubilidad tal que pudiera disolver al polímero, promoviéndose la evaporación de éste en la solución durante la fabricación de fibras mediante la técnica de Electrohilado. De esta manera, el polímero se solubilizó en Cloroformo, la información relevante del mismo se detalla en la Tabla 2.2.

Material/Proveedor	PLA/Ingeo Biopolymer 3251D
Fórmula molecular	$(C_3 H_4 O_2)_n$
Temperatura de fusión cristalina ($^{\circ}C$)	160 - 170
Temperatura de transición vítrea ($^{\circ}C$)	55 - 65
Cristalinidad	37 %
Resistencia a la tracción, psi (MPa)	7,000 (48)
Alargamiento a la tracción	2.5 %
Resistencia a la flexión (MPa)	83

Tabla 2.1: Propiedades relevantes del poli(ácido láctico).[10]

Material/Proveedor	Cloroformo/9180-02 J. T. Baker
Fórmula molecular	$CHCl_3$
Peso molecular (g/mol)	119.38
Punto de ebullición °C (°F)	62 (142)
Punto de fusión °C (°F)	-63 (-81)
Temperatura de descomposición °C (°F)	225 (437)
Solubilidad en agua a 77°F (g/L)	5
Porcentaje volátil	100 %

Tabla 2.2: Propiedades relevantes del Cloroformo.[11]

Por lo general, las soluciones poliméricas de PLA-Cloroformo se encuentran en fase homogénea, debido al disolvente que ocasiona a simple vista un proceso de solubilización adecuado, sin embargo éste provoca una mayor posibilidad estadística de que haya más moléculas en un lugar que en otro en un instante dado, permitiendo el estiramiento de la cadena polimérica. Lo que es relacionado con la polaridad de una molécula debido a la concentración de electrones en sus átomos, presentando cargas negativas y positivas similares a las de un dipolo, a pesar de ello por su simetría espacial no forman un dipolo y por consiguiente las sustancias no son polares.[70] De esta manera, a las soluciones preparadas de PLA-Cloroformo se les incorporó Alcohol Etilico para ayudar a la polaridad de la molécula aportando una mejor condición al polímero la cual va a permitir que las especies reactivas gocen de mayor libertad de movimiento y se difundan en el volumen total del disolvente, aumentando así la probabilidad de colisión entre ellas, en otras palabras se provoca una compactación en la cadena polimérica; las especificaciones del Alcohol Etilico se describen en la Tabla 2.3.

Material/Proveedor	Alcohol Etilico Absoluto/9000-03 J. T. Baker
Fórmula molecular	$C_2 H_6 O$
Peso molecular (g/mol)	46.07
Punto de ebullición (°C)	78.3
Punto de fusión (°C)	-114
Punto de inflamabilidad °C (°F)	13 (55)

Tabla 2.3: Especificaciones del Alcohol Etilico.[12]

Por último se utilizó “Nanotubos de Carbono Multi-Pared (NTCMP)” como materiales adicionales en las soluciones poliméricas, debido a que éstos poseen excelentes propiedades mecánicas y fisico-químicas y actualmente han sido empleados con mayor frecuencia para diversas aplicaciones en IT. De esta manera el uso de NTCMP es con el propósito de incrementar las propiedades mecánicas y eléctricas de los andamios electrohilados, así como también aumentar el potencial en su biocompatibilidad con algún tejido celular.

2.2. Procedimiento Experimental

2.2.1. Preparación de soluciones poliméricas

En la etapa inicial, para la obtención de parámetros ideales en la fabricación de las fibras electrohiladas de PLA, se procedió a la preparación de cuatro soluciones poliméricas. Para dicha preparación se pesó la cantidad correspondiente de polímero y se vació en un recipiente de vidrio agregando la proporción adecuada de Cloroformo (ver Figura 2.1b), y así almacenar cada una de las soluciones esperando el proceso de

solubilización como se muestra en la Figura 2.1c. Después de seis horas se visualizó el proceso de solubilización y se incorporó a cada una de las soluciones una cierta cantidad de Alcohol Etilico provocando una ligera agitación de tal manera que permitiera la mezcla en el volumen total. Es importante señalar que la cantidad de Cloroformo y de Alcohol Etilico se dejó constante en todas las soluciones, por consiguiente se estudió la variación en la concentración del polímero; la composición de las cuatro soluciones se muestra en la Tabla 2.4.

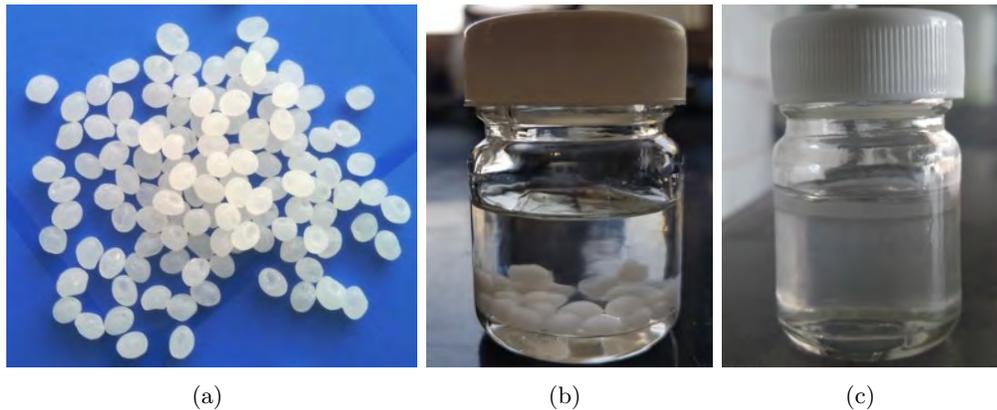


Figura 2.1: Preparación de soluciones poliméricas de PLA. a)Imagen de PLA en forma de pellets usados para determinar la concentración polimérica. b)La cantidad de polímero con el correspondiente volumen de Cloroformo son almacenados en recipientes de vidrio para la formación de la solución. c)El proceso de solubilización tardó cerca de seis horas, y posterior a éste se incorporó Alcohol Etilico agitando suavemente para la obtención de una solución homogénea.

<i>Estudiando concentración del PLA</i>					
Solución	PLA (g)	Cloroformo (mL)	Alcohol Etilico (mL)	<i>Concentración</i>	
				(g/mL)	(m/v)
1	2.02874	18	2	0.1014	10 %
2	2.41159	18	2	0.1206	12 %
3	3.00319	18	2	0.1502	15 %
4	4.08774	18	2	0.2043	20 %

Tabla 2.4: Composición de las soluciones para estudiar la concentración de PLA.

La segunda parte del proyecto fue la obtención de andamios compuestos, incorporando NTCMP a los andamios electrohilados, con diferentes concentraciones en las soluciones poliméricas, para evaluar las propiedades e interacciones que puedan originarse en dichos materiales. En este caso se procedió a la preparación de seis soluciones compuestas de PLA-NTCMP, dejando constante la cantidad ideal de PLA, Cloroformo y Alcohol Etilico. La incorporación de los NTCMP no se realizó directa, debido a las aglomeraciones que éstos presentaban, por lo tanto se molió el material en un Mortero de Agata con mano y posteriormente se vació a la solución polimérica antes preparada (ver Figura 2.2b y 2.2c). Una vez agregados los NTCMP en la solución, se observó que la dispersión de éstos no era la adecuada, por lo que se empleó un Ultrasonido marca Branson Ultrasonic Cleaner, modelo B-220 que trabaja con 117 Volts, 125 Watts y una frecuencia 50-60 Hz, disponible en el Área de Polímeros, perteneciente al Laboratorio T-125 de la UAM-I. Todas las soluciones que contienen NTCMP se dejaron en el ultrasonido por 30 minutos en un baño a temperatura ambiente, con una ligera agitación cada 15 minutos, obteniendo una mezcla más homogénea como se aprecia en la Figura 2.2d. La composición de los seis andamios a fabricar de PLA y

PLA-NTCMP se muestra en la Tabla 2.5.

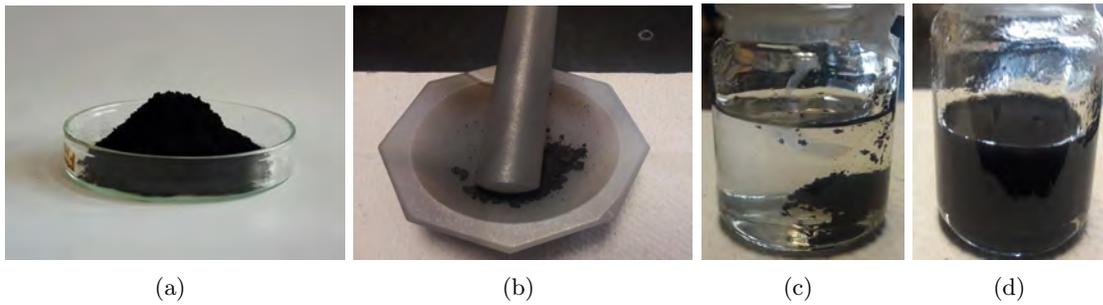


Figura 2.2: Preparación de soluciones compuestas de PLA-NTCMP. a)Imagen de NTCMP en polvo. b)Antes de incorporar los NTCMP en la solución, se muelen ligeramente en un mortero, para evitar las grandes aglomeraciones entre ellos. c)Teniendo la solución polimérica solubilizada, se vació la cantidad de NTCMP molidos, sin embargo no se logró apreciar una dispersión correcta. d)Ayudando a mejorar la dispersión de los NTCMP en la solución se dejó en el ultrasonido por 30 minutos, con agitaciones cada 15 minutos.

<i>Estudiando concentración de NTCMP</i>				
Solución	Concentración PLA (p/v)	Cloroformo (mL)	Alcohol Etílico (mL)	Concentración NTCMP (p/p)
1	12 %	18	2	0
2	12 %	18	2	0.5 %
3	12 %	18	2	1 %
4	12 %	18	2	2 %
5	12 %	18	2	3 %
6	12 %	18	2	4 %

Tabla 2.5: Composición de las soluciones para estudiar la concentración de NTCMP.

2.2.2. Proceso de Electrohilado

En la fabricación de andamios, se empleó una máquina llamada “Nanofiber Elctrospinning Unit” marca NaBond y una Bomba de Inyección modelo TCI-IV, que se pueden observar en la Figura 2.3a, ambas disponibles en el Área de Polímeros, perteneciente al Laboratorio T-125 de la UAM-I.

Para los andamios electrohilados de PLA se utilizó una jeringa de 20 mL por cada preparación, se vació la solución en dicha jeringa y se conectó a un segmento de manguera aproximadamente de 50 cm, en el otro extremo de la manguera se colocó una base para la aguja, cubriéndose con Parafilm ambos extremos para evitar algún tipo de goteo (ver Figura 2.3b) y finalmente se insertó la jeringa en la bomba de inyección para suministrar la solución. En este estudio se manejó variaciones en el parámetro a optimizar eligiendo entre tres y cuatro valores, dejando constantes los demás parámetros, para una comparación morfológica en las fibras. El proceso se inició buscando el valor adecuado de la concentración polimérica en la solución, debido a que es la variable que más afecta en la morfología de las fibras, las condiciones empleadas en el proceso de Electrohilado para esta parametrización son especificadas en la Tabla 2.6.



Figura 2.3: a) Cámara de Electrohilado para la fabricación de fibras con estructuras de tipo andamio, la cual permite el control en todas sus variables y el cambio en el tipo de colector según la morfología que se desee. Además en la parte superior de la cámara se observa la bomba de inyección que se encarga de controlar el suministro de solución polimérica. b) Colocación de jeringa y aguja en los extremos de la manguera, cubriendo ambas uniones con Parafilm para evitar algún goteo, de manera que la solución pueda ser dirigida al colector plano que se observa en la parte inferior.

<i>Estudiando concentración del PLA</i>	
Porcentaje de concentración (m/v)	10 %, 12 %, 15 %, 20 %
Voltaje aplicado	20 kV
Distancia aguja-colector	12 cm
Razón de inyección	1 mL/h

Tabla 2.6: Parámetros utilizados en la fabricación de los andamios de PLA, para la optimización de la variable de concentración en la solución polimérica.

Una vez que se encontró el valor adecuado para la concentración se continuó con la optimización de las variables involucradas en el proceso de Electrohilado, como son el voltaje aplicado, distancia entre aguja-colector y razón de inyección. De la misma manera que en la concentración, se manejó una variación en los parámetros a optimizar, es importante señalar que conforme se encontró cada valor ideal se tomó en cuenta para los siguientes estudios, las condiciones experimentales para cada parametrización se pueden observar en la Tabla 2.7.

Para la fabricación de andamios con nanomateriales se utilizó las soluciones preparadas de PLA-NTCMP, y se acondicionó el sistema jeringa-manguera-aguja de la misma manera que en los andamios de PLA como se puede observar en la Figura 2.3b (imagen superior). Sin embargo en este caso, antes de ser

vaciada cada solución en las jeringas, se hizo pasar a través de un filtro marca MILLIPORE de la compañía Multipore Corporation (25 mm Micro Syringe), para evitar las aglomeraciones provocadas por los NTCMP no dispersados. Es importante señalar que a altas concentraciones de NTCMP (4%) se provocó una consistencia densa por lo que se filtró la solución por segunda vez. Las condiciones que se utilizaron para la fabricación de estos andamios compuestos de PLA-NTCMP, fue cada valor optimizado que se encontró en la parametrización, mismos que se muestran en la Tabla 2.8.

<i>Estudiando el voltaje aplicado</i>	
Porcentaje de concentración (m/v)	12 %
Voltaje aplicado	15 kV, 20 kV, 25 kV
Distancia aguja-colector	12 cm
Razón de inyección	1 mL/h
<i>Estudiando la distancia entre aguja-colector</i>	
Porcentaje de concentración (m/v)	12 %
Voltaje aplicado	25 kV
Distancia aguja-colector	10 cm, 12 cm, 15 cm, 20 cm
Razón de inyección	1 mL/h
<i>Estudiando la razón de inyección</i>	
Porcentaje de concentración (m/v)	12 %
Voltaje aplicado	25 kV
Distancia aguja-colector	20 cm
Razón de inyección	0.1 mL/h, 0.5 mL/h, 1 mL/h, 1.5 mL/h

Tabla 2.7: Parámetros utilizados en la fabricación de los andamios de PLA, para la optimización de las variables en el proceso de Electrohilado.

Condiciones experimentales	
Porcentaje de concentración (m/v)	12 %
Voltaje aplicado	25 kV
Distancia aguja-colector	20 cm
Razón de inyección	0.1 mL/h

Tabla 2.8: Parámetros del proceso de Electrohilado para los andamios de PLA-NTCMP.

Todos los procesos de fabricación se llevaron a cabo dentro de la cámara de Electrohilado; se colocó un colector plano cubierto de papel aluminio para el depósito de fibras (ver Figura 2.3b, imagen inferior), en las Tablas 2.6, 2.7, y 2.8 se indican las condiciones experimentales según el tipo de andamio a fabricar. Una vez colocados los parámetros del proceso y la solución contenida en la jeringa, ésta se insertó en la bomba de inyección para dirigir el fluido hacia la aguja por medio de una manguera, recordemos que la aguja se encuentra dentro de la cámara de Electrohilado en la que se ejecutan las condiciones para la producción de fibras (ver Figura 2.3a).

2.3. Caracterización morfológica

2.3.1. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Para la observación morfológica tanto de los andamios fabricados como de los NTCMP se utilizó un microscopio electrónico de barrido de alta resolución, marca HRSEM Jeol 7600F, con una resolución de 4 nm y un voltaje de 30 kV (ver Figura 2.4), este equipo fue facilitado por el Laboratorio de Microscopia Electrónica de la UAM-I. Se analizó primero los andamios de PLA asociados al estudio de las variables a optimizar; se colocó una pequeña porción de la muestra en soportes de aluminio (previamente asentada en cinta de carbono) como se aprecia en la Figura 2.5a, estos soportes fueron introducidos en un equipo marca Baltec, modelo SCD-050 Sputter Coater, dentro de una cámara al vacío, trabajando a 200 V, durante dos minutos para el recubrimiento de las muestras con Oro, finalmente se colocaron los soportes dentro de la cámara del microscopio. En los andamios de PLA-NTCMP la muestra se montó en soportes con cierta inclinación ajustando con un tornillo perteneciente al mismo portamuestra (ver Figura 2.5b), ésto para facilitar la observación de los nanomateriales embebidos en la sección transversal de cada fibra.

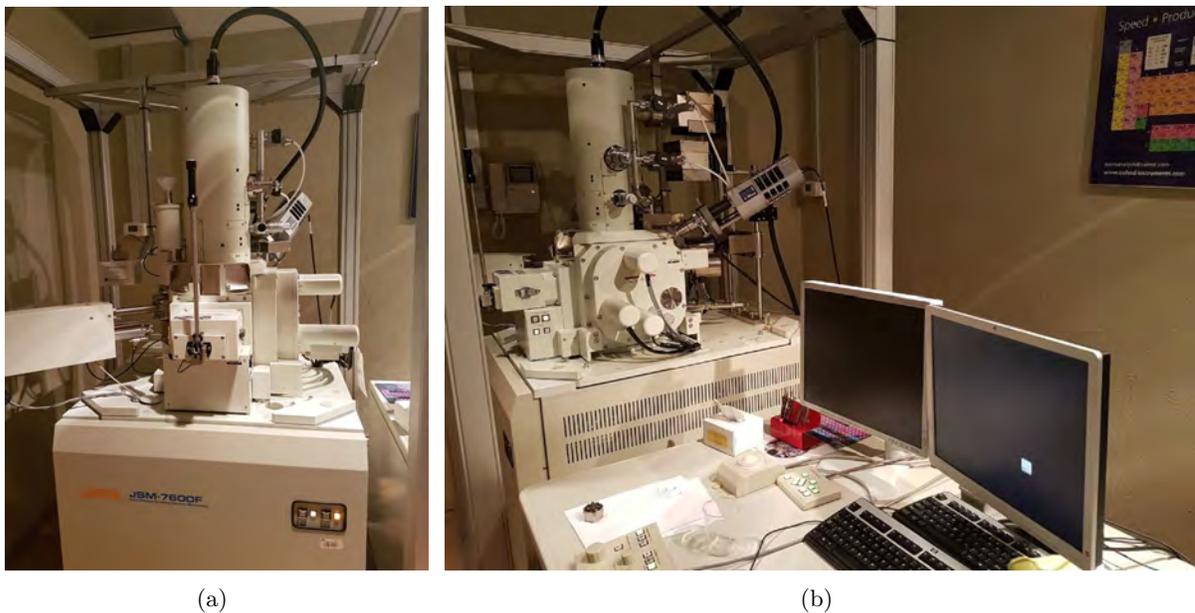


Figura 2.4: Microscopio Electrónico de Barrido perteneciente al Laboratorio Central de Microscopia Electrónica; a) vista frontal del microscopio y b) vista lateral en donde también se observar el sistema para su operación.

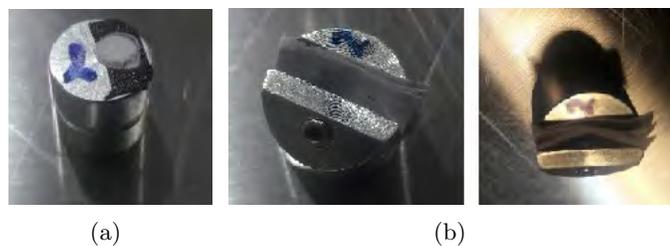


Figura 2.5: a) Colocación de una muestra de PLA en un soporte de aluminio, previamente asentada en cinta de carbono. b) En los andamios de PLA-NTCMP, se utilizó un soporte con inclinación, para una mejor observación en la sección transversal de la muestra.

Adicionalmente se observó de nuevo los andamios de PLA-NTCMP y los NTCMP con un microscopio electrónico de barrido y emisión secundaria con control de rangos variables de vacío (presión variable), marca JEOL, modelo JSM-5900 LV, con un espectrómetro EDS acoplado marca Oxford, que se muestra en la Figura 2.6a, disponible en el Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (CENICA), perteneciente al Laboratorio de Microscopía (Edif. W-P.B.) de la división CBS de la UAM-I.

En este caso se utilizó un portamuestras en forma de pin como se observa en la Figura 2.6b (imagen superior), donde se colocó una pequeña porción de muestra fijándola con resistol líquido de carbono para evitar el movimiento dentro de la cámara del microscopio y obtener un mejor enfoque. Una vez colocados los andamios en los portamuestras, se ubicaron en un posicionador de iones metálicos al vacío marca DENTON VACUUM, modelo DESK II, dentro de una cámara al vacío trabajando a 200 V, durante cuatro minutos recubriéndolos con Oro (ver Figura 2.6b, imagen inferior), seguidamente las muestras se introducen en el correspondiente microscopio electrónico, para ser analizadas. Para la identificación de los diámetros presentes en las fibras de cada microfotografía obtenida, se usó el programa de procesamiento de imagen digital “iTEM” (Analysis Image Processing). Es importante señalar que la observación por medio de dos equipos diferentes ayudó a la comprobación de nanomateriales presentes en las fibras, que en la mayor parte de los andamios compuestos (PLA-NTCMP) fueron difíciles de encontrar.

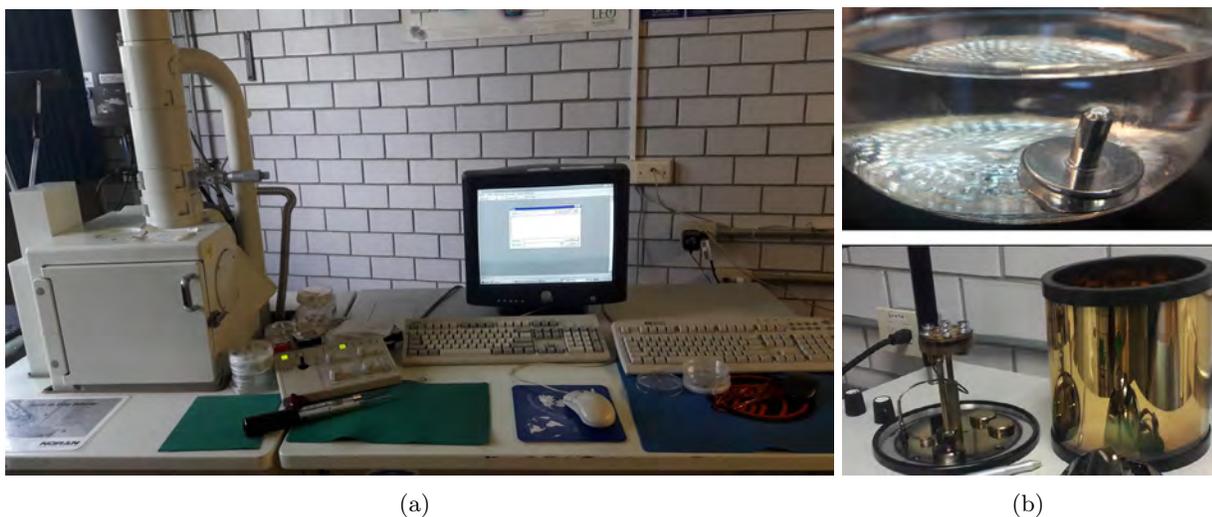


Figura 2.6: a) Microscopio Electrónico de Barrido disponible en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del CENICA. b) Soporte de aluminio para el montaje de muestras en forma de pin (imagen superior). En la imagen inferior se observan muestras asentadas en soportes ubicados dentro del posicionador de iones metálicos al vacío para el recubrimiento con Oro.

2.4. Caracterización físico-química

2.4.1. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier por Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

Para la obtención de la composición química de los NTCMP y andamios electrohilados de PLA y PLA-NTCMP, se empleó un espectrofotómetro infrarrojo por Transformada de Fourier, marca PERKIN ELMER, modelo Spectrum GX (2000 FTIR-System) equipo que se aprecia en la Figura 2.7a. El espectrofotómetro permite un rango de resolución de $0.2-64 \text{ cm}^{-1}$ y usa un haz IR con beamsplitter de KBr (Bromuro de potasio), dentro del rango $7000-50 \text{ cm}^{-1}$, además por el tipo de muestra se utilizó también

un dispositivo de ATR (ver Figura 2.7b y 2.7c) con punta para sólidos, marca Smiths (Smiths Detection), modelo DuraSamplIR II, ambos instrumentos disponibles en el Área de Polímeros, perteneciente al Laboratorio T-125 de la UAM-I.



(a)



(b)



(c)

Figura 2.7: Equipos experimentales empleados para el estudio de la composición química de los andamios fabricados y los NTCMP. a) Espectrofotómetro infrarrojo por Transformada de Fourier utilizando el dispositivo ATR, para muestras sólidas y no transparentes. b) Aumento en la observación del dispositivo ATR enfocando la colocación de la muestra de un andamio. c) Aumento en la observación del dispositivo ATR enfocando la ubicación de la muestra de NTCMP.

Para realizar las correspondientes mediciones se recortó una película de aproximadamente 1x1 cm de cada uno de los andamios fabricados, dicha película se colocó en el dispositivo de ATR de manera que la punta estuviera en contacto con la muestra como se observa en la Figura 2.7b. Con respecto a las mediciones con los NTCMP, se tomó una cantidad considerable de estos nanomateriales en polvo y de la misma manera que con los andamios, se colocó entre la punta y el portamuestras del dispositivo ATR (ver Figura 2.7c). Las condiciones se mantuvieron fijas en todas las mediciones; se realizó 32 barridos a una longitud de onda de $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$, resolución de 2 cm^{-1} y una energía de 122 eV por

cada muestra, lo que permitió obtener un promedio de las señales infrarrojo produciendo un espectro de FTIR-ATR para cada prueba. Posteriormente con ayuda de la bibliografía [71], [72], [73], [13], [14] y [15] se comparó las señales del espectro relevantes a la composición química del polímero y nanomateriales.

2.4.2. Microscopía Raman

La Microscopía Raman y Espectroscopía FTIR son técnicas complementarias y por lo general, ambas se requieren para medir los modos de vibración de una molécula.[74] El análisis de las muestras mediante esta técnica, se realizó con un microscopio marca WiTec (Focus Innovations), modelo Alpha 300RA para imágenes Raman-AFM combinado (ver Figura 2.8) , que opera con dos láseres que emiten a 633 nm (rojo) y 532 nm (verde), con una resolución de 200 nm; equipo disponible en el Laboratorio de Biofísica e Ingeniería de Tejidos (AT-221) perteneciente a la UAM-I.

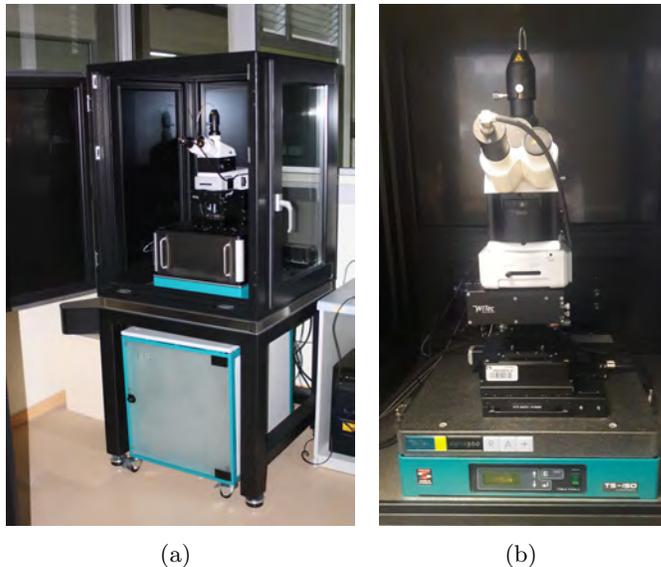


Figura 2.8: Microscopio WiTec modelo Alpha 300RA para imágenes Raman-AFM, a) Vista lateral del equipo y b) Vista frontal del microscopio.

En la preparación de las muestras, se tomó una película (5x5 cm) de cada andamio y se colocó en un porta-objetos con cinta adhesiva doble cara, de tal manera que no se provocará el libre movimiento de la muestra, en el caso de los NTCMP se tomó una pequeña cantidad en polvo y se trató de adherir al porta-objetos, sin utilizar la cinta doble cara. En cuanto a la medición, primero se enfocó la posición deseada para tomar la señal en la muestra y poder incidir con el láser hasta lograr la máxima intensidad de señales presentes en el espectro, de modo que se pueda dar una interacción con las moléculas y así percibir sus distintos modos de vibración. La señal Raman en cada espectro se adquirió utilizando el láser de 532 nm, en un intervalo de 0-3800 cm^{-1} .

2.4.3. Difracción de Rayos X de ángulo amplio (DRX)

Los rayos X son una forma de radiación electromagnética de exactamente la misma naturaleza que la luz, pero de longitud de onda mucho más corta y elevada energía. El proceso consiste en hacer incidir un

haz de Rayos X sobre una muestra, en donde parte de este haz se va a dispersar en todas direcciones, pero el resto va a dar lugar al fenómeno de Difracción de Rayos X. El ángulo entre el haz difractado y el haz transmitido es siempre 2θ “ángulo de difracción”, y es medido experimentalmente a través de un barrido, obteniendo como resultado un patrón de difracción, donde es posible analizar la propiedad de cristalinidad en las muestras. En general las direcciones de difracción son determinadas únicamente por la forma y tamaño de la celda unitaria.[3]

Por lo tanto, para observar la cristalinidad del polímero PLA y picos característicos de los nanomateriales incorporados, se realizó el patrón de DRX. Dicho patrón se obtuvo empleando un difractómetro marca BRUKER, modelo D8 ADVANCE ECO, con radiación $K\alpha$ de Cu (0.15406 nm), como el que se observa en Figura 2.9a, facilitado por el laboratorio de Análisis Cuantitativo por Difracción de Rayos X (T-128) perteneciente a la UAM-I.

La preparación de las muestras radicó en colocar una película sobre un portamuestras de bajo fondo (compuesto de Silicio) de modo que lo cubriera por completo, quedando así como un soporte para cada andamio (ver Figura 2.9b). Las condiciones de medición para obtener los patrones de difracción se manejaron con un ángulo de barrido de Rayos X de $2\theta=2^\circ$ a 70° , sin giro y sin cuchilla.

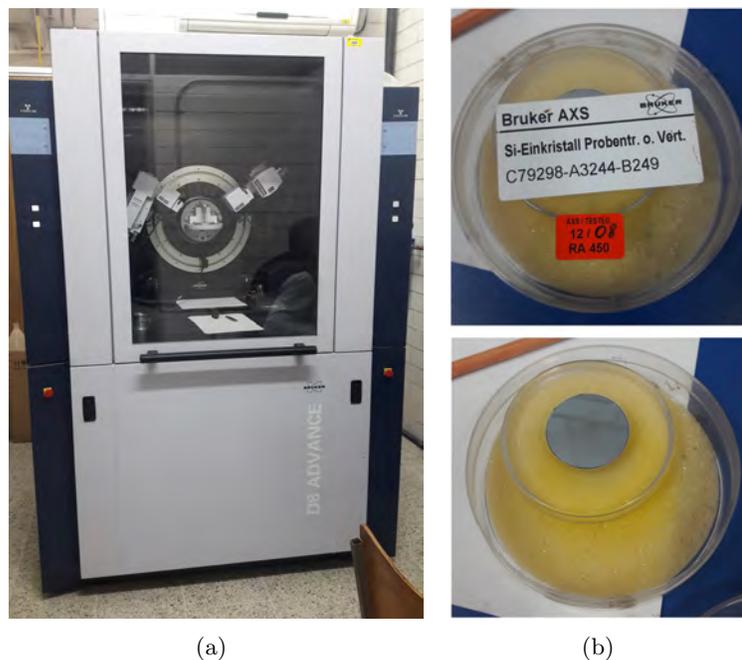


Figura 2.9: Equipo experimental de Difracción de Rayos X para muestras. a)Difractómetro BRUKER, modelo D8 ADVANCE ECO. b)Soporte de Silicio (Si) a bajo fondo, para la caracterización de los andamios.

2.5. Caracterización térmica

2.5.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)

En esta técnica termoanalítica el flujo de calor es medido en función de la temperatura y/o del tiempo, es decir, evalúa las transiciones térmicas del material. Por lo tanto, cualquier cambio en la temperatura de la muestra o en la referencia, causado por un evento exo o endotérmico es inmediatamente compensado

por una cantidad equivalente de flujo de calor, requerido para mantener a la muestra y la referencia a la misma temperatura.[3]

Los análisis térmicos mediante CDB para las muestras de PLA y PLA-NTC, se realizaron en un equipo DSC-2920 marca TA Instruments (ver Figura 2.10a), disponible en el Área de Polímeros, perteneciente al Laboratorio T-130 de la UAM-I. En este estudio, se tomó una muestra de cada andamio, de modo que pesara alrededor de 10 mg, para ser encapsulada en recipientes de aluminio como se observa en Figura 2.10b; cada capsula se introdujo en la celda vacía del equipo (ver Figura 2.10c), para su análisis térmico bajo atmósfera controlada de N_2 (gas).

El ciclo de CDB para PLA y PLA-NTCMP se expone como sigue:

- 1) Calentamiento a 10 °C/min desde 0 °C hasta 250 °C.
- 2) Sostenimiento por 3 min. a 250 °C para borrar historia térmica previa.
- 3) Enfriamiento desde 250 °C a 0 °C a 10 °C/min.
- 4) Segundo calentamiento a 10 °C/min desde 0 °C a 250 °C.



(a)



(b)



(c)

Figura 2.10: Equipo experimental empleado para la caracterización de propiedades térmicas presentes en los andamios fabricados. a)Equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido DSC-2920 marca TA Instruments. b)Encapsulación de la muestra en recipientes de aluminio. c)Cavidad del equipo de CDB, donde se introduce la muestra y la referencia.

2.6. Pruebas mecánicas

Los ensayos de tracción son una herramienta muy útil para determinar las propiedades mecánicas, que ayudan a optimizar el desempeño y potencial de los biomateriales. Durante el procedimiento de una prueba mecánica, la fuerza y el desplazamiento son registrados conforme las tenazas que sostienen al

material se van separando una de otra. El objetivo principal de dicha prueba es obtener el módulo de elasticidad y la dureza del material a partir de las mediciones registradas.[75]

En esta investigación el análisis de las muestras por ensayos de tracción se llevó a cabo en un Dispositivo tipo Instron para caracterización y/o estímulo mecánico (ver Figura 2.11a), diseñado por el M. en C. Herón Gutiérrez García, disponible en el Área de Polímeros, perteneciente al Laboratorio T-130 de la UAM-I.[5] Para tomar las pruebas mecánicas, se midió el área transversal de la muestra, con ayuda de un Vernier Caliper (marca Mitutoyo) y un Micrómetro (Tipo IDC-112ME, marca Mitutoyo) como se observa en la Figura 2.11b, posteriormente se colocó al andamio entre las tenazas y se calibró la fuerza con el peso de la muestra. Finalmente, se midió la longitud inicial de la muestra y se fijó las condiciones de velocidad de estiramiento a 1 mm/min en la dirección de su eje y la distancia de muestreo a 0.25 mm, registrando la fuerza y el alargamiento del andamio, los cuales ayudaron a generar la curva de Esfuerzo vs Deformación. Se realizó 3 mediciones por cada muestra para obtener valores promedio de dureza y módulo elástico.



Figura 2.11: Equipo experimental para pruebas mecánicas. a)Dispositivo tipo Instron para caracterización y/o estímulo mecánico, disponible en UAM-I.[5] b)Medición del ancho y espesor de la muestra, para el cálculo del área transversal.

2.7. Pruebas de conductividad eléctrica

La parte final en la caracterización, fue comprobar si existía conductividad eléctrica en los andamios de PLA y PLA-NTCMP, recordemos que la conductividad eléctrica es una propiedad importante en los materiales biocompatibles. Para esta prueba, inicialmente se midió el área del electrodo (con Vernier) y el

espesor de la muestra (con Micrómetro), parámetros que son esenciales para el cálculo de la Resistividad (ver Figura 2.12a).

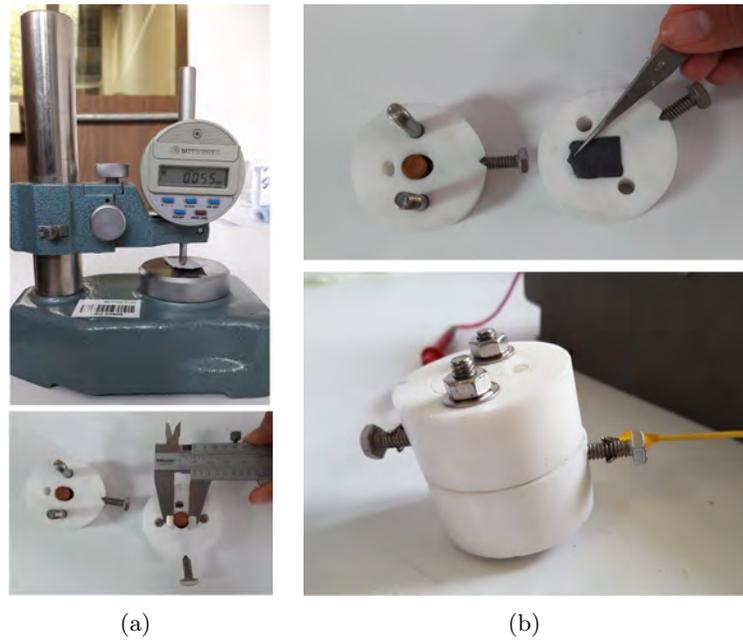


Figura 2.12: Equipo experimental para determinar la conductividad eléctrica en los andamios fabricados. a) Medición del electrodo, y espesor de la muestra, para el cálculo de la Resistividad. b) Colocación de la muestra, al interior de las placas paralelas.

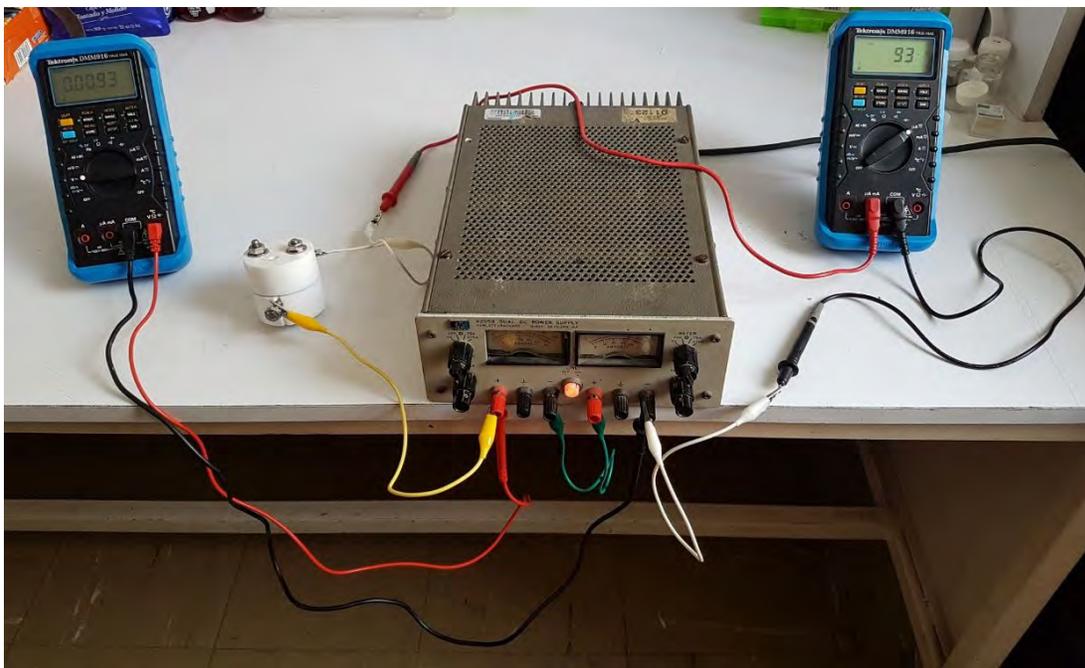


Figura 2.13: Arreglo experimental para la evaluación de conductividad eléctrica.

El arreglo experimental para evaluar la conductividad eléctrica, consistió en un arreglo de placas paralelas de cobre, que tienen una base de Teflón. También se utilizaron dos multímetros (marca Tektronix, modelo DMM914 True RMS Digital Multimeter) y una fuente de poder (marca HP, modelo 6205B DUAL DC POWER SUPPLY con 0-40 V a 3 A y 0-20 V a 6 A), que se muestran en Figura 2.13. Entre los electrodos de las placas se colocó la muestra (ver Figura 2.12b), conectando éstas a la fuente de poder y a un multímetro, de tal manera que se registrará la corriente producida a través del material por la diferencia de voltajes suministrados por la fuente. Mientras que el otro multímetro se encontraba conectado a la fuente, de modo que al suministrar el correspondiente valor del voltaje con la fuente, se confirmará con el que se registraba en la pantalla del multímetro (ver Figura 2.13).

Una vez obtenidos los valores de corriente (I) y voltaje (V), se graficaron para poder apreciar su comportamiento lineal, y así asociarlo a la Ley de Ohm ($\mathbf{V}=\mathbf{IR}$) para encontrar el valor de la resistencia eléctrica (R). Con dicho valor encontrado, se realizó una serie de cálculos para determinar la Resistividad (ρ) y finalmente obtener el inverso, el cual corresponde al valor de la conductividad eléctrica (σ).

2.8. Cultivos celulares

Esta sección describe el proceso desarrollado para la obtención de las células neuronales y su crecimiento sobre los andamios construidos, además de presentar resultados preliminares de la extracción del tejido cardíaco, en un cultivo primario. Todo tipo de células, son complicadas de cultivar ya que requieren un ambiente propicio para su proliferación, nutrientes necesarios, sustratos óptimos y que sea libre de contaminación; sin embargo, la obtención de células a partir de un cultivo primario, involucra mayor dificultad, ya que existen riesgos que pueden perjudicar su supervivencia.[76]

Por lo tanto, el cultivo celular se realizó en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, de modo que las características que se cuidaron al momento de preparar el medio fueron el pH, nutrientes, factores de crecimiento y osmolaridad. En el primer cultivo celular, se trabajó con células neuronales (NG108-15), ya que el principal interés es la interacción tanto física como eléctrica de células del sistema nervioso en contacto con los nanotubos de carbono; esta línea celular fue seleccionada de acuerdo con la literatura, ya que se encontró que han sido empleada en el estudio de las uniones neuromusculares en co-cultivos.[77],[78]

2.8.1. Línea celular: NG 108-15

Una ventaja al trabajar con líneas celulares, es que son homogéneas, es decir, que no existe ningún otro tipo celular en la población, además puede ser propagada una mayor cantidad de veces y en general es más resistente que las células obtenidas mediante cultivo primario.[76]

La línea celular seleccionada fue la NG108-15, que corresponde a un híbrido celular de neuroblastoma de ratón y glioma de rata, esta línea celular proviene de la fusión de las líneas celulares N18TG2 y C6-BU-1, que pertenece a neuroblastoma de ratón y glioma de rata, respectivamente.[77],[79] Esta línea celular fue adquirida de ATCC[®], No.HB-123417, teniendo una morfología epitelial, con un tamaño de 10-20 μm , como se muestra en la Figura 2.14.[7] Además es considerada una célula colinérgica (que produce el neurotransmisor encargado de la producción de los potenciales de placa), y es empleada con éxito como modelo para estudiar las propiedades de células neuronales. Antes de utilizar esta línea, es importante dejar que prolifere, hasta tener una población neuronal suficiente.[78]

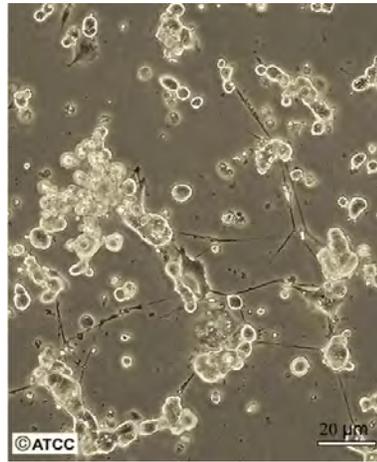


Figura 2.14: Imagen de la línea celular NG108-15 reportada por ATCC®.[7]

2.8.1.1. Descongelación y proliferación de línea celular

Esta línea celular se trabajó con anterioridad en nuestro grupo de trabajo para el desarrollo de algunos proyectos de investigación, por lo tanto dichas células se encontraban almacenadas en nitrógeno líquido, de tal forma que se mantuvieran congeladas.[78],[8],[7] Es importante señalar que el material empleado, fue esterilizado y previamente se realizó la asepsia del cuarto de cultivos (ver Apéndice A) para evitar alguna contaminación por microorganismos.[8]

Previo al descongelamiento de dichas células, se preparó el medio de cultivo específico para la mantención de esta línea; la elaboración del medio y suplementos requeridos se realizó de forma manual, el protocolo de preparación se muestra a detalle en el Apéndice B. De esta manera, se empleó como medio de cultivo base DMEM, complementándolo con 10 % de Suero Fetal Bovino, 2 % de glutamina, 1 % de medio HAT (medio hipoxantina-aminopterina-timidina) y 1 % antibiótico-antimicótico, del volumen total.[7] Todos los medios preparados fueron sometidos a pruebas de esterilidad, colocando 2 mL de cada medio en platos de 35 mm y puestos en la incubadora para su seguimiento. Una vez aprobada la esterilidad de los medios, fueron empleados en el cultivo y sembrado de la línea celular.

Para dar paso a la descongelación de las células, se extrajo del recipiente de nitrógeno dos críos viales (con pase 25 y 26) cada uno de 1.5 mL, que contenía el material celular, el cual fue descongelado de manera rápida en baño térmico a 37 °C, debido a que la presencia de reactivos (en este caso DMSO) pueden dañar a las células.[78] Una vez descongeladas las células, fueron colocadas en dos tubos FALCON de 15 mL, donde se agregó 5 mL de medio fresco de cultivo para ayudar a la re-suspensión de las células. Posteriormente se centrifugó la suspensión (medio fresco con células) a 1500 rpm, para dar paso a la formación del botón celular, en el fondo de ambos tubos FALCON. A continuación, se removió el sobrenadante y se agregaron 5 mL de medio fresco de cultivo, para nuevamente re-suspender las células, de manera que se pueda remover las sustancias provenientes de la congelación. Por último, se transfirió el material celular a dos cajas Petri de 25 cm² con los correspondientes pases de 26 y 27, agregando 3 mL más de medio de cultivo, e introduciéndose a una incubadora en condiciones óptimas de atmósfera y temperatura (5 % de CO₂ a 37 °C). El medio de cultivo de la caja fue cambiado cada tercer día, con el objetivo de evitar que las células se estresen y ésto provoque desprendimiento y muerte celular, la proliferación de dicha línea celular se monitoreo aproximadamente 1 semana.[78],[8]

Al tener una confluencia celular del 80 % en las cajas de cultivo de 25 cm² (aproximadamente en el

5to. día), las células son tripsinizadas con 2 mL de Tripsina, la cual es una enzima que actúa rompiendo los enlaces proteínicos entre las células y el sustrato, provocando que éstas se desprendan de la superficie en la que estén adheridas. El objetivo principal de la proliferación y sembrado celular, es la obtención de una reserva de la línea celular adquirida y en lo que refiere al sembrado en los andamios fabricados. Por lo tanto, el total de células tripsinizadas se dividieron en dos porciones iguales, en ambas cajas; una porción fue sembrada en los andamios y la otra fue sometida a una técnica de crio preservación celular.

La técnica de crio preservación consistió en utilizar los medios de congelación mostrados en el Apéndice B, en una porción de células tripsinizadas, de esta manera la suspensión se colocó en tubos FALCON de 15 mL, para centrifugar a 1500 rpm y obtener nuevamente el botón celular, posteriormente éste se homogeneizó con medio de congelación y se colocó en crio viales de 2 mL. Finalmente estos viales se congelaron a una temperatura de -20°C durante una semana y posteriormente llevados a una temperatura de -80°C (ver Figura 2.15), por lo que se colocaron en fase gaseosa del nitrógeno por tres días y por último en nitrógeno líquido, hasta nuevo uso, es de suma importancia realizar una congelación en forma gradual, para evitar que las células se dañen por cambios bruscos de temperatura.[78]



Figura 2.15: Para conservar una línea celular a muy bajas temperaturas, se almacenan los críos viales con células, en un tanque de nitrógeno líquido a -80° . [78]

La otra porción de células tripsinizadas, se homogeneizó con 3 mL de medio fresco de cultivo y se sembró en una caja de 75 cm^2 con 8 mL de medio de cultivo. Al momento de ser sembrada esta línea celular, se presentó una morfología esferoide, mientras que en el proceso de adhesión y crecimiento, se comenzó a presentar el alargamiento de sus neuritas, lo que es esencial para un modelo neuronal, de esta manera es necesario conservar esta morfología y sobre todo evitar la reproducción celular; para lograr esto se realizó una diferenciación utilizando dibutil AMPc. Por lo tanto, cuando las células se adherieron a las cajas de cultivo, el medio fue cambiado por 2 mL del medio de diferenciación (ver Apéndice B), para posteriormente ser cambiado a diario ya que al reducir la cantidad de nutrientes al cultivo, se corre el riesgo de tener una mayor muerte celular.[78]

Una vez diferenciadas las células, se realizó el cultivo en los andamios y en sus respectivos controles, esto para comprobar los efectos de la película de nanotubos de carbono sobre el material celular en cuan-

to a la adhesión, proliferación y el desarrollo de neuritas.

2.8.1.2. Cultivo de línea celular en los andamios

Antes de hacer el depósito del material celular sobre los controles y los andamios fabricados (PLA-NTCMP), se realizó el conteo celular para conocer la concentración de células al sembrar. Para realizar dicho conteo, fue necesario extraer 100 μL de la suspensión de material celular y se vació en un tubo Eppendorf que tuviera 900 μL de azul de tripano (dilución 1:10) (ver Apéndice B).[8] El conteo celular se llevó a cabo con una cámara de Neubauer o hemocitómetro, esta cámara es un instrumento que se encuentra grabado con un cuadrículado en su superficie, además en las esquinas se ubican cuadrantes, que dan la oportunidad de observar lo que se está contando, como se observa en la Figura 2.16, sin embargo es relativamente lento y susceptible a errores. Por lo tanto, para realizar el conteo se tomó un volumen suficiente de la suspensión para cubrir los cuadrantes y se dejó reposar por 1 minuto. En estos cuadrantes se contó el número total de células en ellos con ayuda del microscopio óptico invertido, las células que se observaron azules y como explotadas, se consideraron como células muertas (generalmente se ven más grandes que las células vivas), mientras que las células vivas contadas fueron aquellas que se observaron como una pequeña esfera blanca. Al finalizar el conteo, se efectuó una ecuación que toma en cuenta las características geométricas de la cámara para calcular la concentración celular, dicha ecuación es la siguiente:[76],[8]

$$C = N * 10^4 * \text{Factor de dilución}$$

donde; C concentración de células (cel/mL)

N número de células contadas



Figura 2.16: Cámara de Neubauer, para realizar el conteo celular.[8]

Una vez que se realizó el conteo celular, se dio paso al cultivo sobre los andamios electrohilados de PLA-NTCMP; sin embargo, antes de extraer el material celular y sembrarlo sobre los andamios, estos fueron introducidos en cajas Petri con medio fresco de cultivo, cubriendo por completo la superficie del andamio, enseguida se metieron a la incubadora a una temperatura de 37 °C y a una concentración del 5% de CO₂ por 24 horas.[8] De esta manera, se ajustó la temperatura del medio de cultivo en contacto con las fibras compuestas de PLA y NTCMP, en este procedimiento se observó al medio depositándose sobre la superficie del andamio haciéndolo más hidrofílico, lo cual ayuda a que el material celular tenga mayores posibilidades de anclarse sobre la superficie.

Posteriormente se extrajeron todos los andamios de la incubadora y se les cambio el medio de cultivo por medio fresco (cuya temperatura fue previamente ajustada a 37 °C). Por otra parte, se extrajeron

10 μL de suspensión celular y se depositaron sobre cada andamio electrohilado (con la superficie hidrofílica), una vez que se depositó el material celular, los andamios y el control se incubaron a las condiciones óptimas de 37 °C y 5% de CO_2 , para su crecimiento. Así, las preparaciones se incubaron cambiando el medio de cultivo cada tercer día por aproximadamente 1 semana, al mismo tiempo se fue monitoreando el proceso de adhesión y crecimiento sobre dichos andamios. Para observar la proliferación de las células, se tomaron fotos de los cultivos con ayuda de un microscopio óptico y una cámara digital de 10 MP.

2.8.2. Prueba de viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular, se realizaron pruebas con un kit de Calceína-AM y Homodímero de Etidio-1, adquirido en AccesoLab[®] (ver Apéndice B), empleando además pipetas con puntas de 3 mm de diámetro, para no destruir los agregados celulares formados en los cultivos. Para dichas pruebas de viabilidad, primero se lavaron las células con PBS, esperando a que las células precipitarán en el fondo de las cajas Petri, tomando un tiempo aproximado de 5 minutos. Una vez precipitadas se quitó el sobrenadante y se volteó el andamio, agregando 2 mL de PBS fresco, quedando de nuevo las células en suspensión, el proceso se repitió dos veces más pero agregando 500 μL al final del último lavado y llevando los andamios fabricados a nuevas cajas Petri de 35x10 mm.

Posteriormente, se preparó una solución de PBS con Calceína-AM y Homodímero de Etidio-1 en una concentración de [1 μM] y [2 μM], que corresponden a las concentraciones recomendadas por el kit. Inmediatamente, se añadieron 500 μL de esta solución en cada caja Petri y se cubrieron para protegerlas de la luz, dejándolas reposar durante 30 minutos, antes de ser observadas en el microscopio confocal. Con esta técnica de viabilidad, las células viables fluorescen en color verde mientras que las células muertas fluorescen en color rojo.[7]

Capítulo 3

Resultados y Discusión

Los resultados y su respectiva discusión serán presentados en tres partes. Inicialmente, se consideró la fabricación por medio del Electrohilado de fibras (optimizando los parámetros del proceso) y de los andamios compuestos al incorporar nanomateriales a las fibras para mejorar sus propiedades mecánicas; al mismo tiempo se describirán todos los aspectos relacionados con esta innovadora técnica de Electrohilado. Luego, como una segunda parte de este trabajo, se estudió la caracterización de cada uno de los andamios fabricados, cuyos parámetros y propiedades son de interés para poder hacer un análisis completo, y finalmente una breve descripción de resultados preliminares al evaluar la línea celular NG108-15 sobre los andamios. La propuesta de sembrar un cultivo celular sobre los materiales fabricados, será perfeccionada en un trabajo a futuro, además se evaluará un cultivo primario de células cardíacas llamadas cardiomiocitos (CMs), para observar la proliferación y biocompatibilidad que tiene el material con los dos tipos de cultivo, de tal manera que permitan mimetizar de la mejor manera a la ECM para dos posibles aplicaciones; como Conexión Neuronal y Parche Cardíaco.

3.1. Parametrización de variables en el proceso de Electrohilado

La idea de encontrar el valor adecuado de cada uno de los parámetros involucrados en el proceso de fabricación, es con el propósito de electrohilar fibras que mantengan una estructura específica y puedan servir como base para la producción de andamios compuestos biodegradables.

3.1.1. Optimizando la concentración polimérica

La primera variable que se optimizó fue la concentración del polímero PLA, a consecuencia de lo reportado en diversos escritos indicando que es la variable que más afecta la morfología de las fibras. Por lo tanto, el análisis en la concentración de PLA para la preparación de soluciones poliméricas se realizó con los valores especificados en la Tabla 2.4 junto con las condiciones experimentales de la Tabla 2.6.

El primer valor que se estudió fue 10 % (m/v) de PLA (porcentaje más pequeño) donde se provocó una consistencia demasiado líquida en la solución, por lo tanto al suministrarla por medio de la aguja la mayor parte del tiempo se observó gotas depositándose en el colector, a causa de la baja concentración del polímero. Sin embargo para asumir una conclusión se realizó un análisis morfológico mediante SEM; las microfotografías de los andamios a 10 % de PLA se muestran en Figura 3.1, en donde se observó la presencia de perlas unidas por pequeñas fibras distribuidas en todo el andamio, formando una estructura tipo “rosario” como se percibe en el inciso a). En la Figura 3.1b) se visualiza un acercamiento a las fibras, en donde se observó su diminuto tamaño a comparación de las perlas, además dicho acercamiento ayuda a distinguir en la superficie de las perlas cierta porosidad que no se observó en las fibras. Por último,

para complementar el análisis se realizó un estudio cuantitativo de la distribución de diámetros en perlas y fibras (ver Figura 3.1c y 3.1d); en dichos diagramas se logró visualizar la diferencia de tamaños; correspondiendo un diámetro promedio de (326 ± 67) nm en las fibras y $(11,539 \pm 447)$ nm en las perlas.

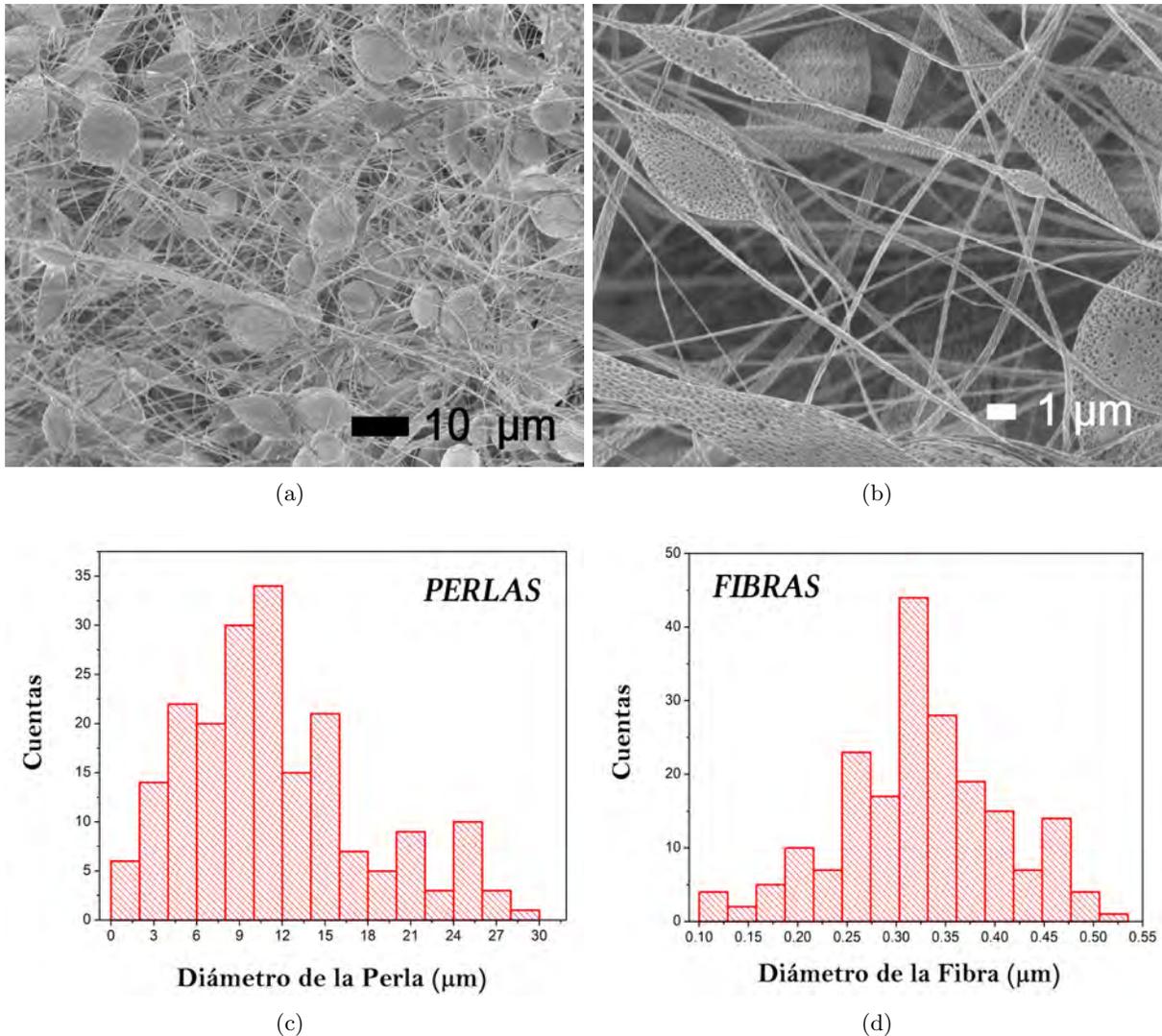


Figura 3.1: Resultados obtenidos a una concentración del 10% de PLA. a) Microfotografía en donde se observa gran cantidad de perlas unidas con fibras formando una estructura tipo “rosario” en el andamio. b) Microfotografía mostrando un acercamiento en las fibras y la porosidad superficial en perlas. c) Distribución de diámetros presentes en perlas, y d) distribución de diámetros presentes en fibras, ambos con $n=200$.

De manera general en este estudio se logró apreciar una diferencia morfológica en ambas estructuras presentes en el andamio las cuales son fáciles de identificar; la presencia de perlas es muy notable, lo que corroboró que en el proceso de Electrohilado la evaporación del solvente no fue la adecuada antes de llegar al colector, debido a la baja concentración de polímero, dando como resultado poca existencia de fibras. Además no se presenta una orientación privilegiada en las fibras por causa del depósito aleatorio de la solución.

El siguiente análisis fue para la concentración de 12% de PLA, para este porcentaje la solución polimérica presentó una consistencia adecuada para su suministro por medio de la aguja, en el proceso para

la fabricación del andamio se observó una buena formación de fibras al coleccionar. El estudio morfológico a dicha concentración se observaron fibras sin la presencia de perlas y con una mayor uniformidad a lo largo de su longitud (ver Figura 3.2a), sin embargo en la superficie de cada fibra se puede apreciar cierta porosidad como se muestra en el inciso b). En cuanto al análisis cuantitativo (ver Figura 3.2c) se encontró un diámetro promedio de (232 ± 43) nm, indicando ser una concentración más favorable que la de 10%.

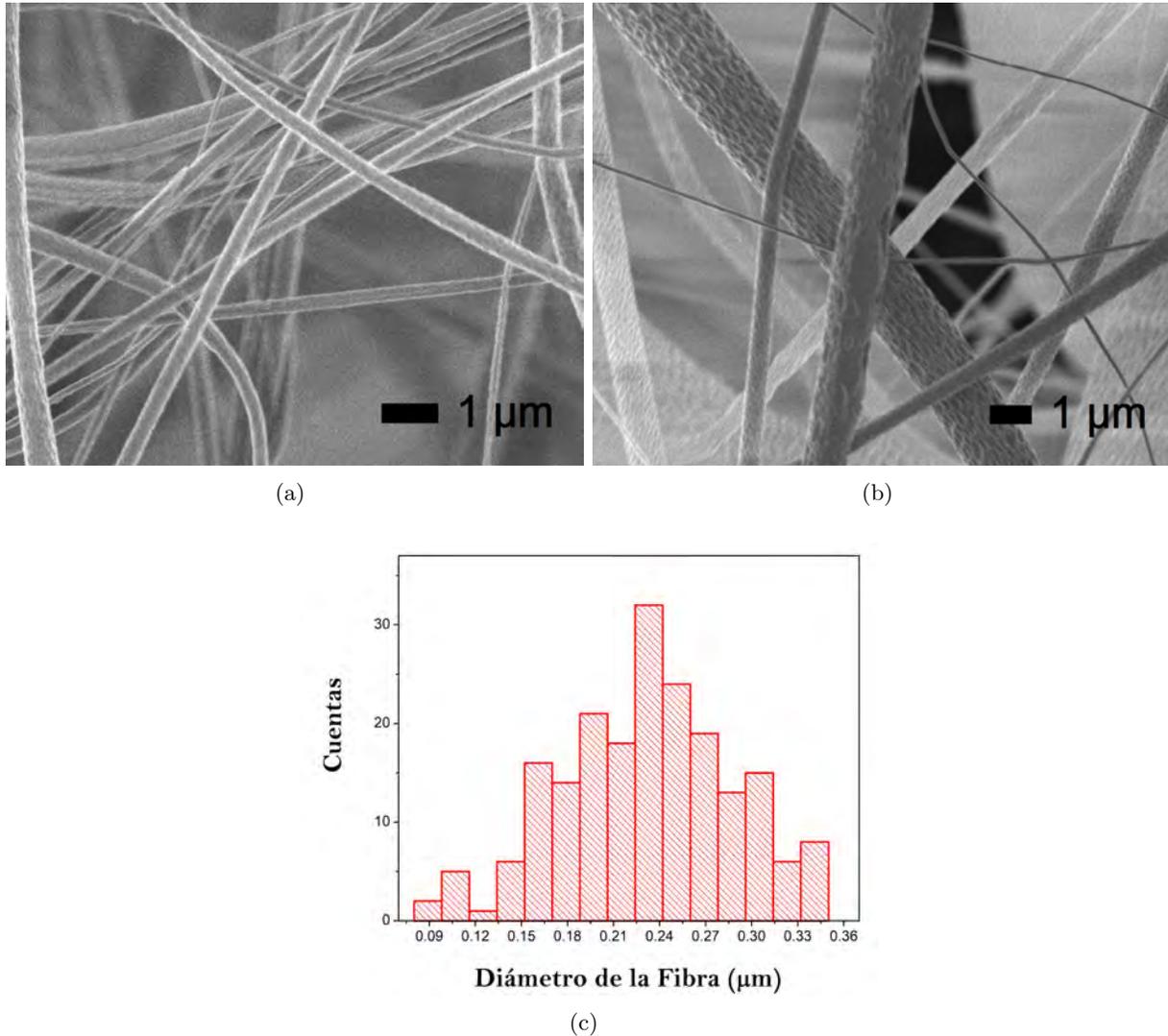
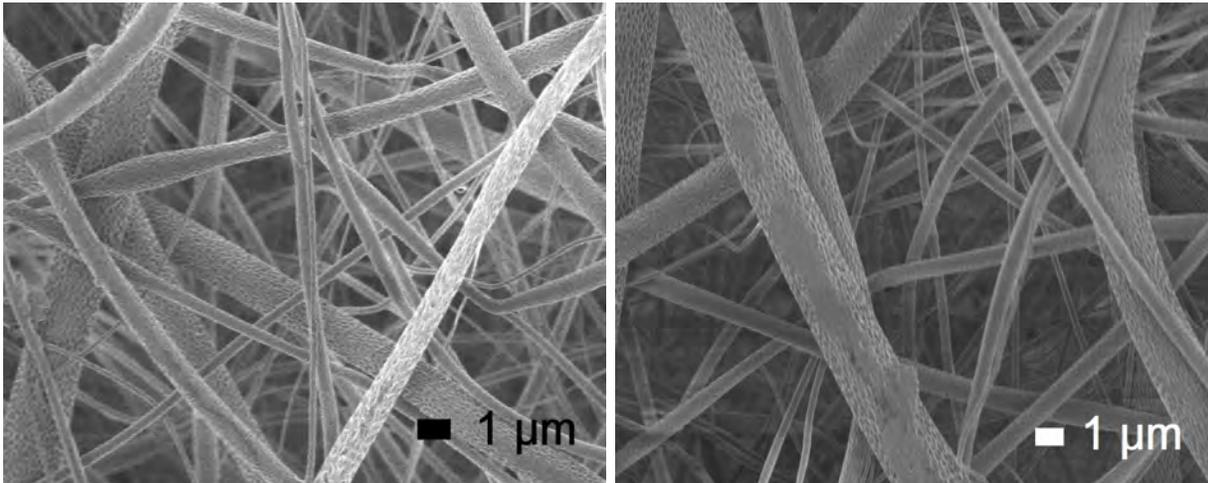


Figura 3.2: Resultados obtenidos a una concentración del 12% de PLA. a) Microfotografía en donde se observó fibras más uniformes y sin la presencia de perlas. b) Microfotografía enfocando la porosidad superficial en las fibras. c) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

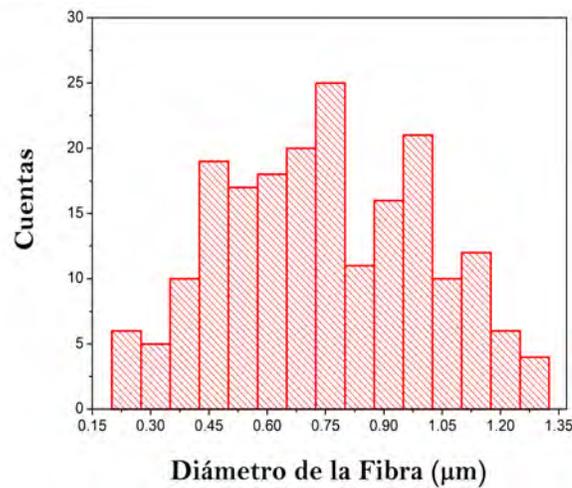
En las concentraciones a 15% y 20% se presentó una consistencia con alta viscosidad en la solución polimérica, lo que permitió una menor fluidez al final de la aguja, provocando que el “jet” se observará con un mayor volumen. El análisis morfológico para 15% de concentración se muestra en Figura 3.3, donde se encontró una gran distribución de tamaños en las fibras, predominando un aumento en el diámetro de éstas, característica atribuida al porcentaje de concentración causante de cierto grado de viscosidad. En general, este andamio no presentó perlas, pero sí se observó la conservación de porosidad superficial (ver inciso 3.3a y 3.3b). Finalmente con el estudio cuantitativo se comprobó un incremento en el tamaño de

las fibras, obteniendo un diámetro promedio de (749 ± 58) nm.



(a)

(b)

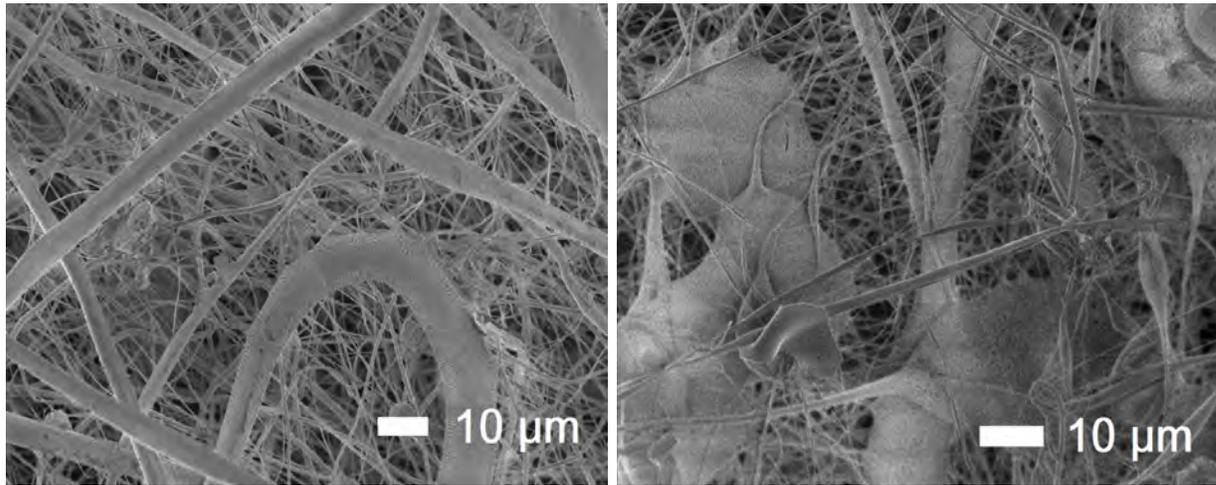


(c)

Figura 3.3: Resultados obtenidos a una concentración del 15 % de PLA. a) Microfotografía en donde se aprecia un aumento en el diámetro de la fibra, con porosidad superficial. b) Observación de fibras gruesas y delgadas sin presentar uniformidad entre ellas. c) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

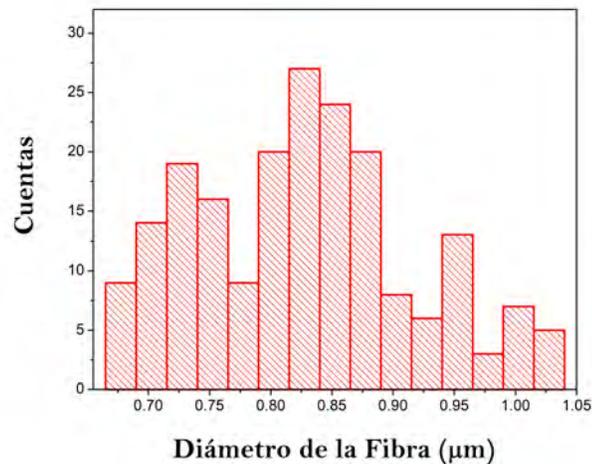
El último valor de concentración que se estudió fue 20 %, el cual presentó un poco más de viscosidad en la solución debido al porcentaje manejado de PLA, durante el proceso de Electrohilado para la fabricación del andamio se provocó constantemente la obstrucción en la punta de la aguja, lo que se observó como fibras muy gruesas depositándose en el colector. Gracias al análisis morfológico se encontró en algunas partes del andamio fibras demasiado gruesas como se muestra en la Figura 3.4a, mientras que en otros lugares se logró ver grandes cantidades de salpicaduras de solución polimérica obstruyendo la visibilidad de pequeñas y delgadas fibras formadas en la parte inferior del andamio (ver Figura 3.4b). Al igual que en los anteriores estudios, se calculó el diámetro promedio con la ayuda de cierta distribución de tamaños correspondiente al andamio en cuestión (ver Figura 3.4b), obteniendo como resultado (823 ± 97) nm, diámetro más grande en los análisis para la concentración.

Para finalizar el estudio en la variación de concentración, se realizó una comparación entre los resultados ya obtenidos y se encontró que al ir aumentando el porcentaje de concentración polimérica se evita la presencia de perlas unidas por fibras, sin embargo existe la formación de fibras con mayor diámetro que en algunos casos parece ser salpicaduras de la misma solución. En cuanto a la orientación de las fibras no se consideró una dirección privilegiada debido a su distribución aleatoria en el proceso de fabricación, mientras que la porosidad superficial se mantiene presente en las fibras en todos los valores manejados de la concentración.



(a)

(b)



(c)

Figura 3.4: Resultados obtenidos a una concentración del 20% de PLA. a) Microfotografía en donde se observan fibras más gruesas en la parte superior del andamio. b) Observación de salpicaduras asociadas a la solución, en algunas partes del andamio. c) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

Por último, gracias a los diagramas de distribución de tamaños se encontró que *“el diámetro de las fibras aumenta conforme incrementa el porcentaje de concentración polimérica”*, es importante señalar que en 10 % el diámetro promedio es mayor que en 12 %, debido a la baja concentración del polímero que provocó la presencia de fibras muy gruesas con gran cantidad de solvente.

Siguiendo con la comparación de resultados, el gráfico que se muestra en la Figura 3.5 indicó que el

andamio de fibras con menor diámetro promedio pertenece a una concentración de 12%, mismo que aportó ventajas en la uniformidad y distribución de fibras sin contar con la presencia de perlas; por tal motivo, se consideró el parámetro más adecuado para la fabricación de estos andamios, con las condiciones experimentales antes señaladas.

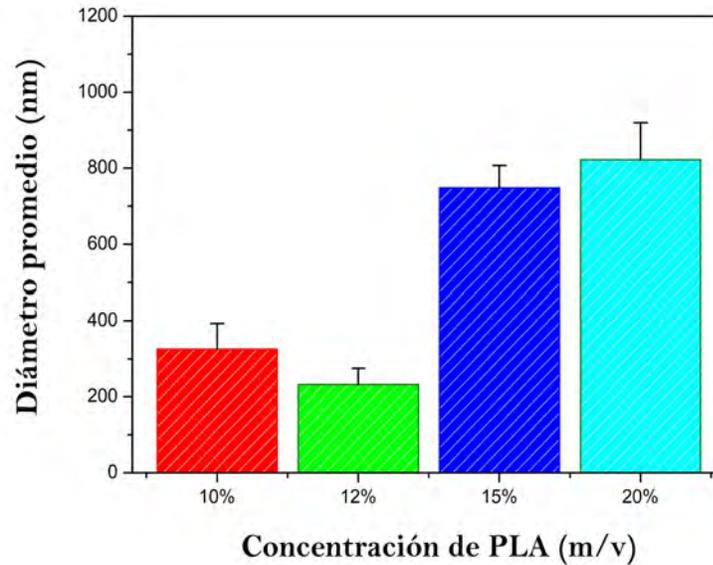


Figura 3.5: Diagrama representativo de diámetros promedios a diferentes concentraciones de PLA.

3.1.2. Optimizando el voltaje aplicado

El siguiente parámetro que se optimizó fue el voltaje aplicado en el proceso de Electrohilado, como bien se explicó en el Capítulo 1 es una de las variables más importantes en la fabricación de los andamios, por lo tanto al igual que la concentración son los parámetros que más afectan la morfología en las fibras. De esta manera el análisis en el voltaje aplicado para la producción de fibras se realizó bajo las condiciones experimentales detalladas en la Tabla 2.7, manejando tres diferentes valores para el voltaje.

El primer valor de voltaje que se estudió fue 15 kV; en el proceso de Electrohilado se observó que cuando la solución polimérica se ve afectada por el voltaje, la formación del jet es correcta, sin embargo la dispersión de fibras se provocó en todo lugar dentro de la cámara de Electrohilado, colectando así tanto fibras gruesas como delgadas, para corroborar dicha información se realizó un análisis por SEM ya que ayuda a visualizar con exactitud la morfología presente en las fibras.

Por medio del análisis morfológico, se obtuvo las microfotografías observadas en la Figura 3.6, en donde se logró percibir estructuras tipo conos alargados conectados entre sí por medio de fibras, distribuidos en todo el andamio (ver Figura 3.6a), además nuevamente se presenta la porosidad superficial en dichas estructuras (ver Figura 3.6b). Por lo tanto, de manera general se comprobó la presencia de fibras tanto delgadas como gruesas, esto probablemente al poco voltaje aplicado, mismo que ocasionó la dispersión de fibras en todos los lugares sin tener un control en el depósito de éstas. Para complementar este análisis se estudió cuantitativamente la distribución de diámetros presentes en las fibras del andamio y se obtuvo un diagrama (ver Figura 3.6c) como resultado del cálculo, indicando que el diámetro promedio es de (510 ± 168) nm.

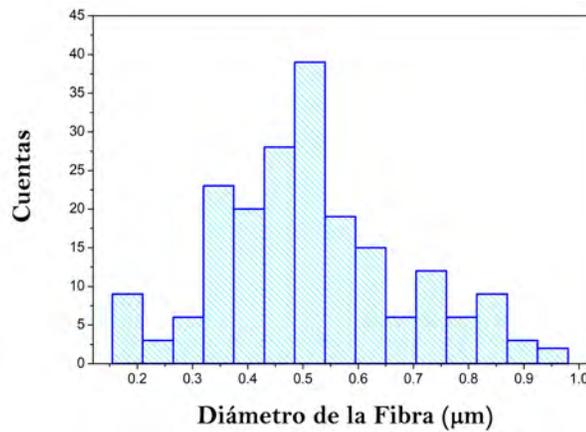
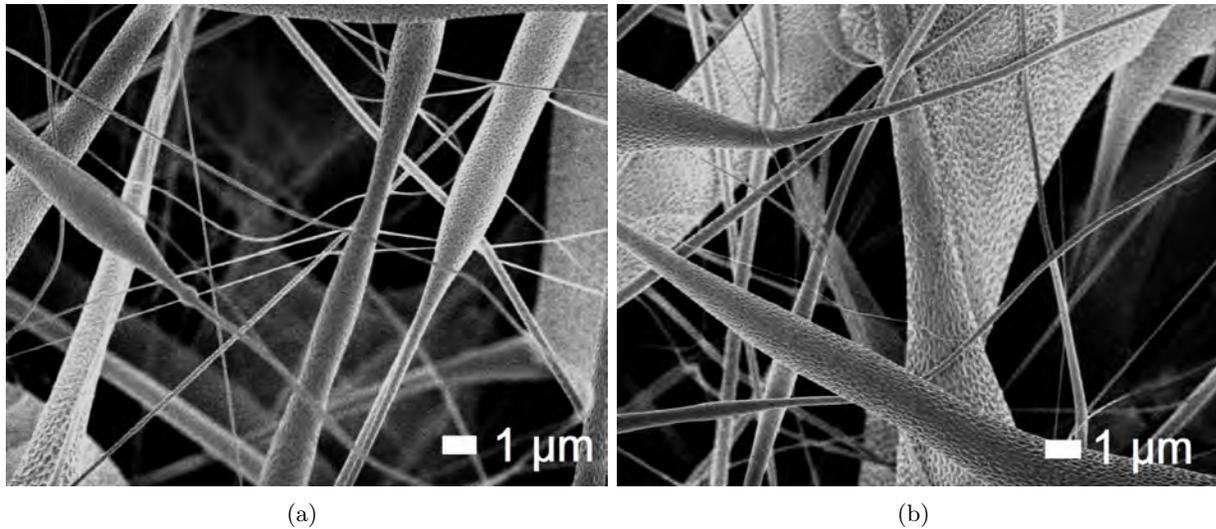


Figura 3.6: Resultados obtenidos a un voltaje aplicado de 15 kV. a) Microfotografía en donde se observan pequeños conos alargados unidos por fibras. b) Observación de porosidad superficial en las fibras y en estructuras parecidas a conos. c) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

El siguiente análisis fue para el voltaje de 20 kV, para este parámetro las condiciones experimentales fueron más favorables en el proceso de fabricación; se percibió que la mayor parte de las fibras se depositaron en el colector, a pesar de eso en ocasiones se tuvo una dispersión en otros lugares de la cámara. En su respectivo estudio morfológico, se logró apreciar en algunas partes del andamio la desaparición de estructuras tipo conos debido al estiramiento aún más de dicha configuración, además se presentó mayor uniformidad a lo largo de su longitud y la presencia de porosidad superficial en cada una de las fibras como se muestra en Figura 3.7a.

Por otro lado se encontró de manera general un arreglo aleatorio en el deposito de fibras (ver Figura 3.7b) debido a que en el proceso de fabricación éstas no se orientan en una dirección privilegiada, sin embargo en algunos lugares una pequeña cantidad de fibras tienden a acomodarse en cierta dirección como se logró apreciar en Figura 3.7a. En cuanto al análisis cuantitativo que se muestra en el diagrama de la Figura 3.7c se determinó un diámetro promedio de (434 ± 102) nm, observando que la medición disminuye en comparación al anterior voltaje.

El último valor que se analizó fue el voltaje a 25 kV, en el cual las condiciones experimentales se adecuaron

mejor que en los otros valores, en el proceso de Electrohilado se provocó un constante depósito de fibras en el colector, sin desviaciones a otro lugar de la cámara, por lo tanto se infiere que el andamio fabricado va a contener una mayor cantidad de fibras. Con relación al análisis morfológico, se observó la desaparición de las estructuras tipo conos, obteniendo fibras más delgadas y con mayor uniformidad a lo largo de su longitud, además no presentó una dirección privilegiada entre ellas como se puede ver en la Figura 3.8a. Como se mencionó, este parámetro tiende a presentar en el andamio fibras muy delgadas provocando en ocasiones enrollamientos con ellas mismas (ver Figura 3.8b). Al igual que en los otros análisis, se realizó una distribución de tamaños con respecto a los diámetros presentes en las fibras (ver Figura 3.8c), en donde se encontró que el diámetro promedio es de (206 ± 64) nm señalando que es la medición más pequeña en los análisis para el voltaje.

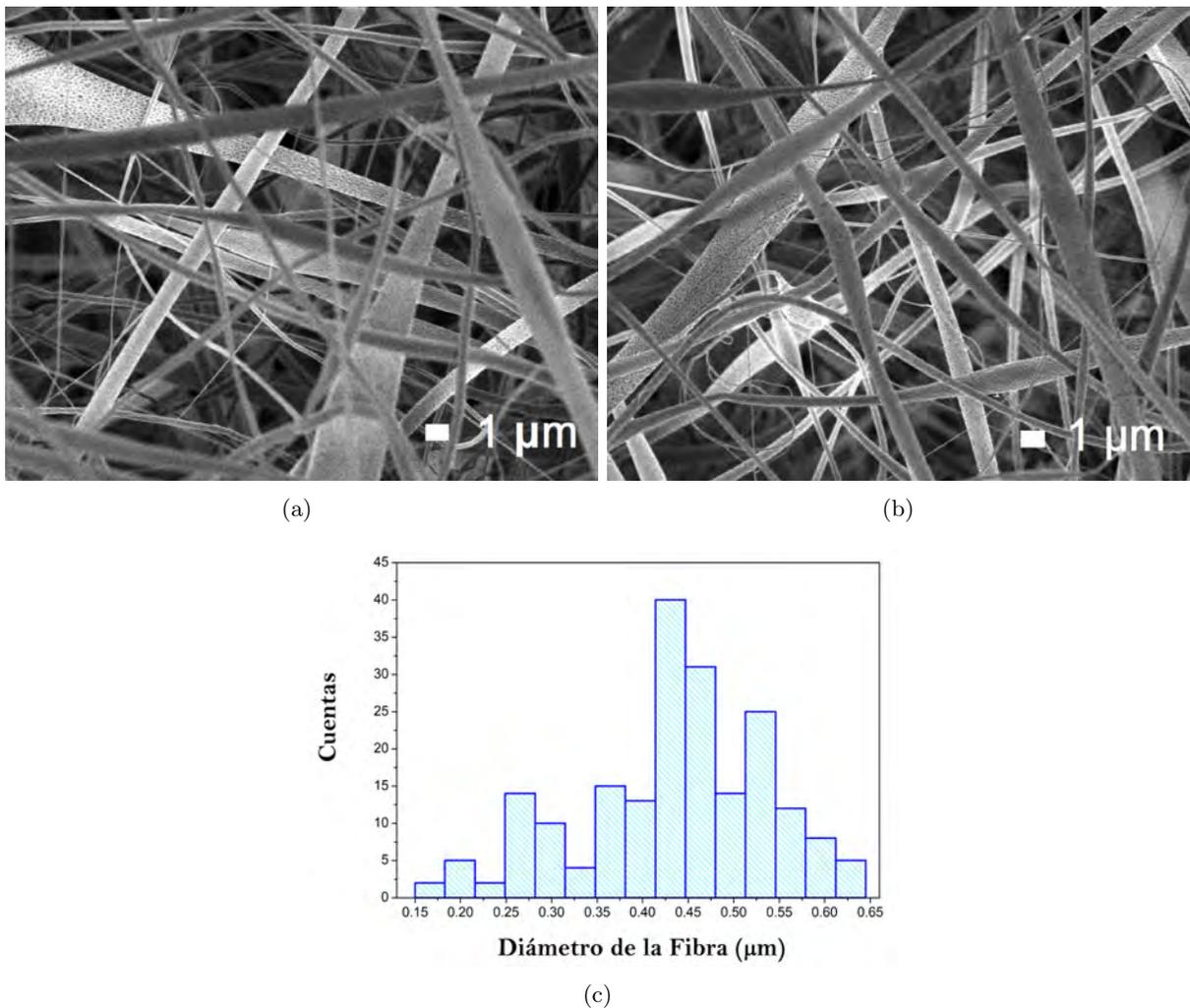


Figura 3.7: Resultados obtenidos a un voltaje aplicado de 20 kV. a) Microfotografía donde se aprecia la desaparición de algunos conos, por el alargamiento aún más de estas estructuras. b) Observación de una distribución más aleatoria de las fibras a comparación de la imagen en a). c) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

Para terminar el análisis en la variación del voltaje, se realizó una comparación entre los resultados obtenidos con dicha variación. De manera general, al ir aumentando el valor en el voltaje se evita la desviación de fibras en otros lugares de la cámara, depositándose la mayor parte en el colector. En cuanto a la orientación de las fibras, nuevamente no se puede concluir que éstas prefieren una dirección, aunque a

un voltaje de 20 kV se presentó en algunas partes del andamio fibras que tendían a alinearse, sin embargo en la mayor parte del andamio se logró apreciar una distribución aleatoria.

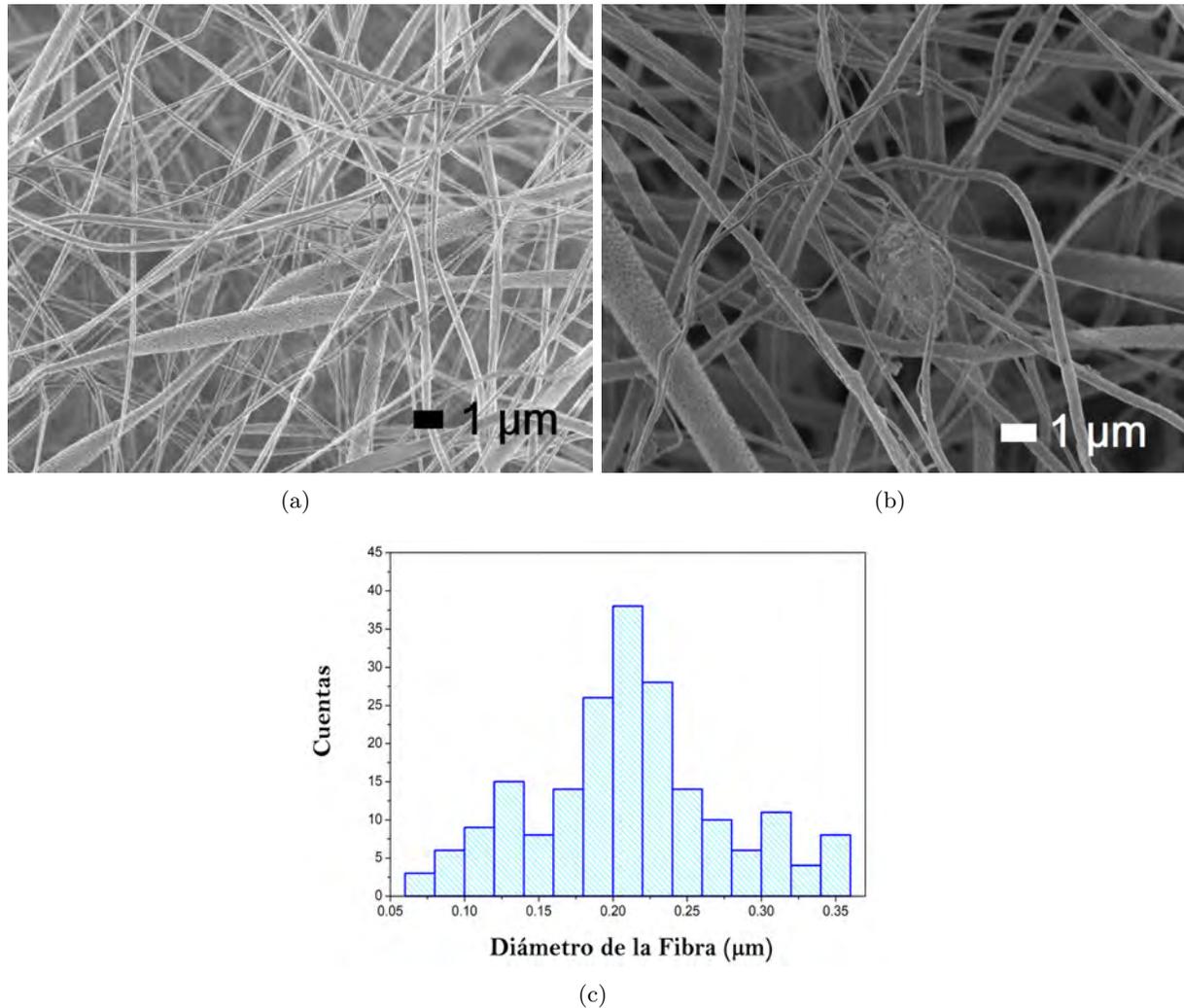


Figura 3.8: Resultados obtenidos a un voltaje aplicado de 25 kV. a) Microfotografía en donde se percibió mayor uniformidad en las fibras, sin la presencia de estructuras tipo conos. b) Observación de fibras muy delgadas provocando enrollamientos entre ellas mismas. c) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

Por último, como resultado importante en los análisis morfológicos de este estudio, se observó que en todos los andamios se continúa con la presencia de porosidad superficial en las fibras, además se puede inducir que conforme se aumenta el valor en el voltaje se tiene una mayor uniformidad en las fibras. Por otra parte, gracias a las distribuciones de tamaños, se encontró que *“el diámetro de las fibras disminuye si se incrementa el valor del voltaje aplicado”*, es importante recordar que en 15 kV el diámetro es aproximadamente el doble que en 25 kV (ver Figura 3.9), a consecuencia de la presencia de estructuras tipo conos, los cuales van desapareciendo al incrementar el voltaje.

De esta manera a un voltaje de 25 kV se pueden distinguir fibras con menor diámetro en el andamio, lo cual aporta ventajas en la uniformidad y distribución de fibras; por lo que se consideró el valor más favorable para el parámetro del voltaje en la fabricación de estos andamios, aclarando que las condiciones experimentales de concentración polimérica a 12 %, distancia entre aguja-colector a 12 cm y razón de

inyección a 1 mL/h, están acondicionadas en particular para este estudio.

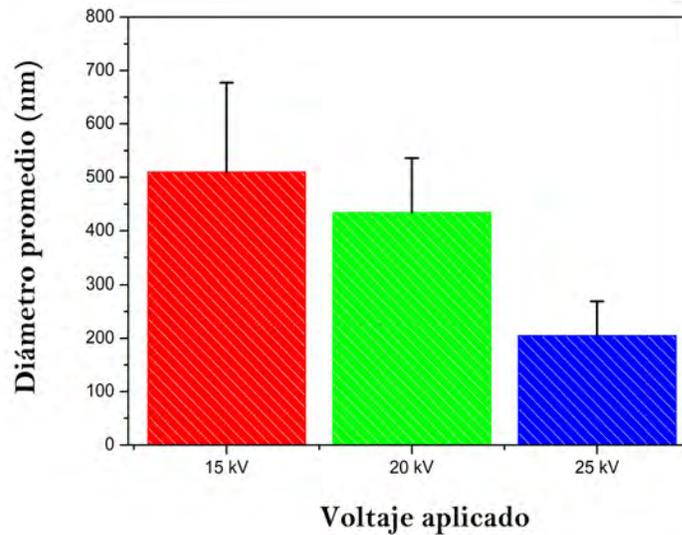
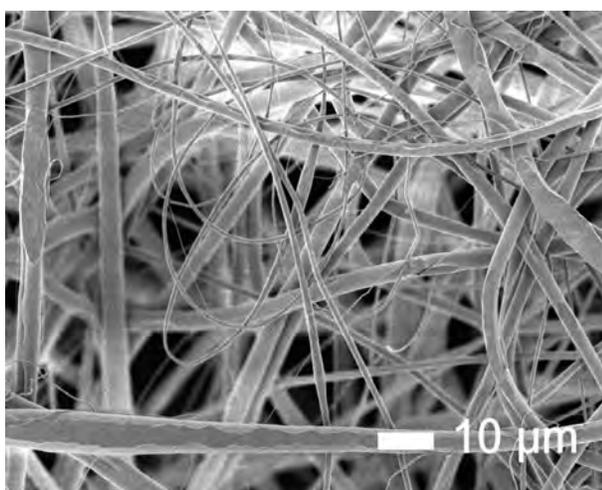


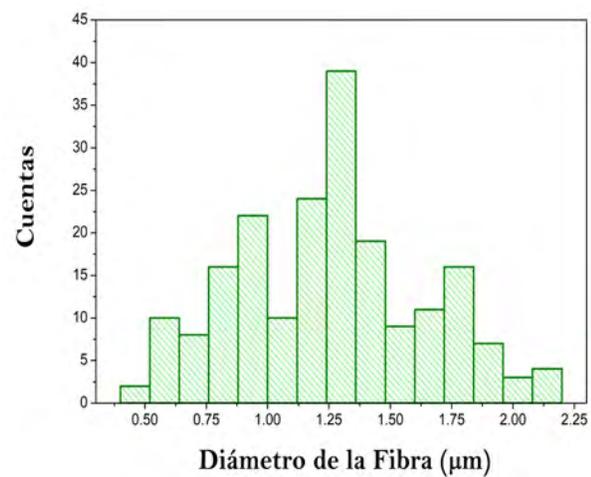
Figura 3.9: Diagrama representativo de diámetros promedios a diferentes voltajes aplicados en el proceso de Electrohilado.

3.1.3. Optimizando la distancia entre aguja-colector

Otra variable que se parametrizó fue la distancia que existe entre aguja y colector, al interior de la cámara de Electrohilado; su estudio se basó en un análisis acerca de la variación de este parámetro bajo las condiciones experimentales detalladas en la Tabla 2.7, en donde se aprecian cuatro valores diferentes para la distancia, mientras que para la concentración polimérica y el voltaje se toman los valores ideales encontrados en los anteriores análisis.



(a)



(b)

Figura 3.10: Resultados obtenidos a una distancia entre aguja-colector de 10 cm. a) Microfotografía en donde se logró apreciar fibras con mejor morfología, pero con una gran distribución de tamaños, presentando enrollamientos entre las más delgadas. b) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

La primera distancia se manejó a 10 cm durante todo el proceso de fabricación, las observaciones relevantes se encontraron en la formación del jet, ya que su longitud era muy pequeña, sin embargo se logró apreciar que todas las fibras se depositaban en el colector sin haber dispersión de ellas, lo que hacía pensar que probablemente el tiempo para la evaporación del solvente era muy poco y posiblemente las fibras por lo cerca del colector se formaban con mayor tamaño en su diámetro. Para comprobar dichos argumentos y asumir una conclusión se realizó una caracterización por SEM a fin de observar con exactitud la morfología presente en las fibras de este andamio.

De esta manera, en el análisis morfológico se observó fibras mejor definidas sin la presencia de perlas o conos alargados como se muestra en la microfotografía de la Figura 3.10a, esto debido al uso de valores ideales para la concentración y el voltaje. Además en esta misma fotografía se logró ver una gran distribución de tamaños en los diámetros de las fibras, presentando pequeños enrollamientos entre las más delgadas; es importante señalar que los resultados observados son buenos, sin embargo para la investigación en desarrollo se desea obtener una estructura mejor definida con respecto a su morfología. Para complementar este estudio se realizó un diagrama con la distribución de diámetros presentes en las fibras que componen al andamio (ver Figura 3.10b) y se obtuvo cuantitativamente un diámetro promedio de $(2,402 \pm 571)$ nm, el cual a comparación de nuestros análisis anteriores es una de las mediciones más grandes.

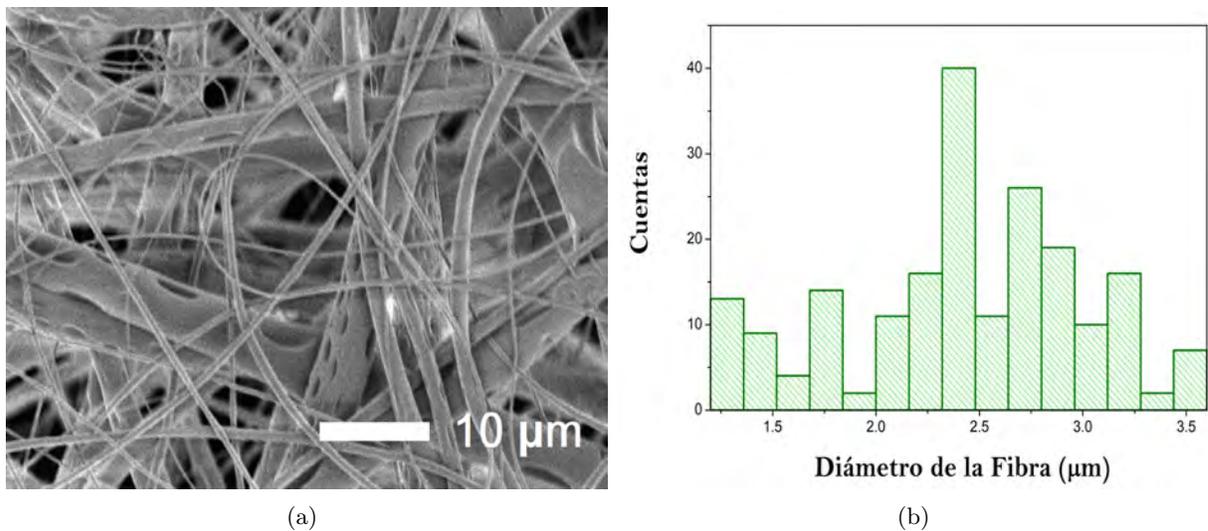


Figura 3.11: Resultados obtenidos a una distancia entre aguja-colector de 12 cm. a) Microfotografía donde se observó gran cantidad de fibras delgadas sin tener preferencia en el arreglo hacia una dirección, con respecto a la porosidad superficial es posible apreciarla en las fibras gruesas. b) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

El siguiente análisis fue para una distancia de 12 cm entre aguja y colector; para este valor se percibió que las fibras tenían más tiempo para la evaporación del solvente, por lo tanto la formación del jet era de mayor longitud lo que permitía un poco de dispersión en las fibras al interior de la cámara de hilado, no obstante se observó una gran cantidad de fibras depositándose en el colector; por ello se espera obtener una mejor morfología de las fibras colectadas. Un resultado del estudio morfológico realizado a este andamio se muestra en la Figura 3.11a, donde se logró ver fácilmente fibras un poco más delgadas, además en las fibras más gruesas se denotó muy bien su porosidad superficial, esto posiblemente asociado a la no evaporación adecuada del solvente utilizado. En cuanto a la variación de diámetros disminuyó un poco, presentando fibras más uniformes a lo largo de su longitud y con un arreglo aleatorio. El diagrama correspondiente a la distribución de tamaños para este valor en la distancia se muestra en Figura 3.11b,

donde gracias al análisis cuantitativo se encontró un diámetro promedio de $(2,133 \pm 731)$ nm, indicando una pequeña disminución a la anterior medición encontrada, por esta razón se consideró en principio una distancia más favorable que la de 10 cm.

En las distancias de 15 cm y 20 cm se presentó una mayor dispersión de fibras en el proceso de electrohilado, a pesar de ello se colectó una gran cantidad de éstas que visualmente se podían percibir más alargadas debido a la longitud del jet ya que en estos casos era mayor, permitiendo una mejor formación de éste al final de la aguja.

El análisis morfológico para la distancia de 15 cm se presenta en la Figura 3.12a, donde se encontró que la variación de tamaños en las fibras disminuyó, percibiendo así muy poca diferencia entre las fibras delgadas y gruesas, además se observó que los espacios vacíos entre cada una de ellas se encuentran mejor definidos. Es importante resaltar que la producción de andamios con mayor uniformidad en sus elementos se atribuye a la forma del depósito de fibras, proporcionando en algunos casos espacios entre ellas con una distribución más favorable. Por otro lado, debido a la distancia que se manejó para este estudio, existe más tiempo para la evaporación del solvente provocando el alargamiento en el hilo de solución polimérica. En cuanto a la distribución de fibras sigue siendo aleatoria, con un diámetro promedio de $(1,255 \pm 381)$ nm (ver Figura 3.12b), por lo tanto se comprobó que el tamaño en los diámetros de las fibras disminuye.

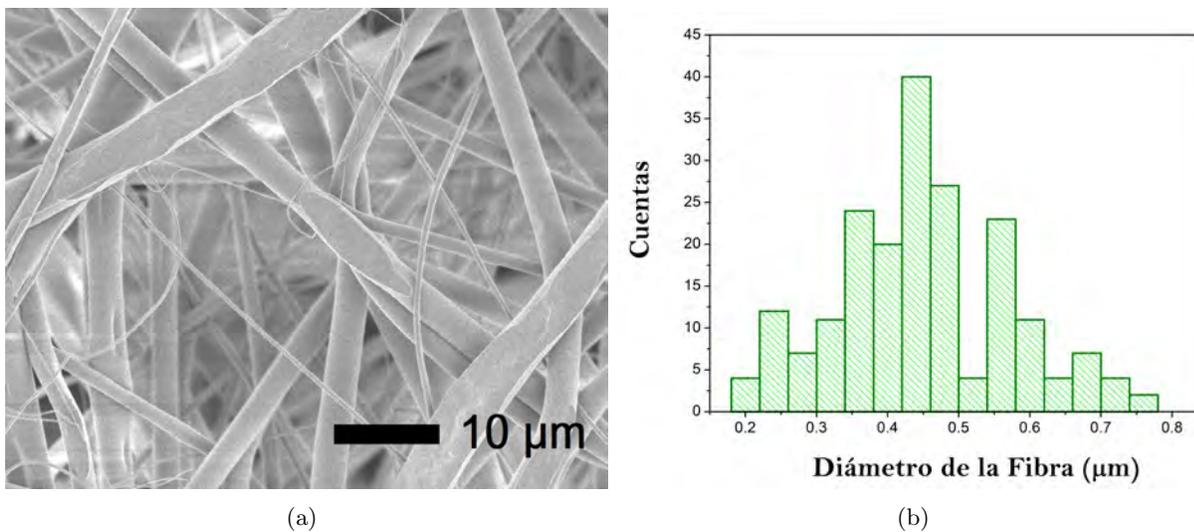


Figura 3.12: Resultados obtenidos a una distancia entre aguja-colector de 15 cm. a) Microfotografía donde se observó mayor uniformidad en la distribución de tamaños de las fibras, además se logró apreciar los espacios entre ellas mejor definidos, permitiendo visualizar el arreglo tridimensional. c) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

El último valor de distancia que se estudió fue 20 cm, el cual presentó un poco más de dispersión en las fibras al momento de la fabricación, a pesar de ello al igual que en el caso anterior una gran cantidad de fibras (muy delgadas y largas) se depositaron en el colector durante todo el proceso de Electrohilado. Con respecto al análisis morfológico (ver Figura 3.13a) se observó la presencia de fibras muy delgadas permitiendo hacer la comparación con otras más gruesas, además se percibió mayor cantidad de fibras colectadas y los espacios entre ellas mejor definidos, sin la observación de porosidad superficial. El hecho de que exista en este andamio un poco de variación en los tamaños de las fibras, se atribuye a la separación asignada entre la aguja y el colector, permitiendo así una mayor dispersión y depósito de éstas. De igual manera que en estudios anteriores, se encontró el diámetro promedio, con la ayuda de cierta distribución

de tamaños observada en la Figura 3.13b, localizando un valor de (447 ± 124) nm, el cual se denota como el diámetro más pequeño en todos los análisis para la distancia.

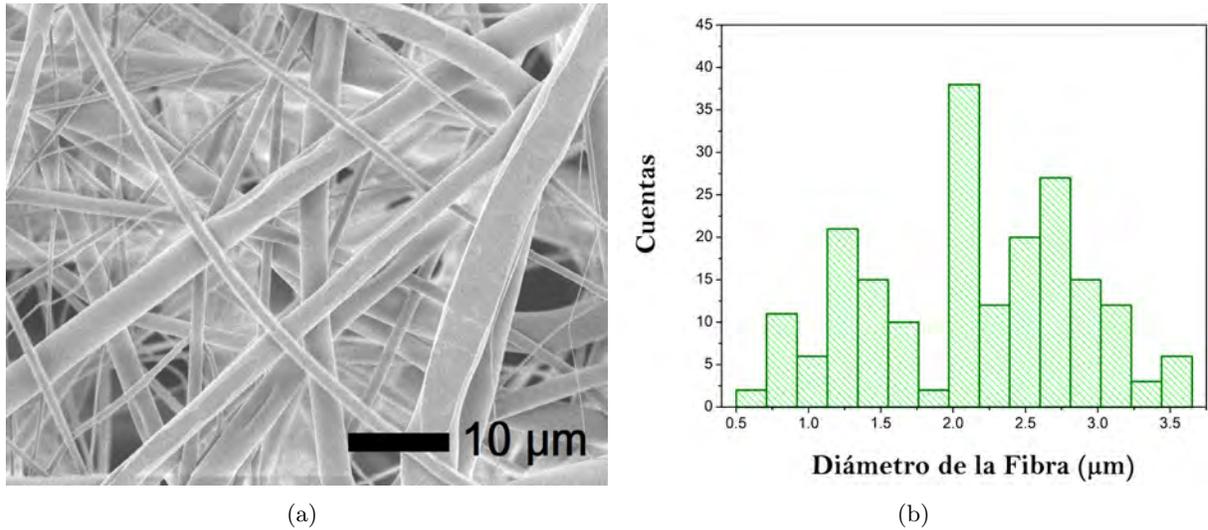


Figura 3.13: Resultados obtenidos a una distancia entre aguja-colector de 20 cm. a) Microfotografía en donde se observó cierta variación en los tamaños de las fibras, debido a la dispersión provocada dentro de la cámara de hilado. b) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

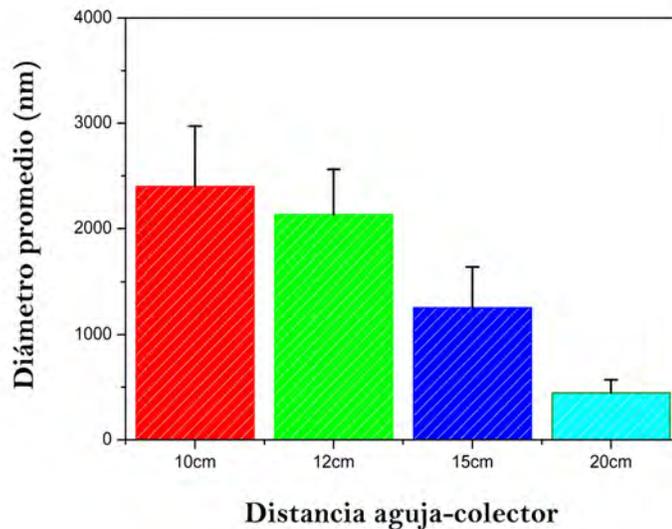


Figura 3.14: Diagrama representativo de diámetros promedios a diferentes distancias entre aguja y colector.

Para finalizar el estudio en la variación de la distancia, se realizó una comparación entre los resultados obtenidos de los anteriores análisis. De manera general, al ir aumentando la distancia de separación entre la aguja y colector, se obtuvo una mejor distribución de tamaños y mayor uniformidad en las fibras, así como también espacios entre ellas mejor definidos proporcionando la observación del arreglo tridimensional asociado al modo de fabricación.

Es importante mencionar que debido al uso de los valores en las condiciones experimentales encontradas en los anteriores análisis se obtienen fibras sin la presencia de perlas o conos alargados. Además se encontró que sólo a la distancia de 12 cm se observa la porosidad superficial en las fibras más gruesas, dicho efecto que se asocia a la no evaporación del solvente en algunas partes de la solución.

Por último, en los diagramas de distribución de tamaños, se encontró que *“el diámetro de las fibras disminuye conforme se incrementa la distancia existente entre aguja y colector”* (ver Figura 3.14); es importante señalar que a pesar de los resultados obtenidos a una distancia de 15 cm, se tomó como parámetro ideal para la fabricación de este tipo de andamios, la distancia correspondiente a 20 cm ya que aporta las mismas ventajas que el andamio de 15 cm y adicionalmente muestra un diámetro promedio menor en las fibras.

3.1.4. Optimizando la razón de inyección

La última variable que se estudió fue la razón de inyección, ya que es la responsable en el suministro de la solución, él cual tiene efectos que definen la morfología del andamio, por lo tanto se considera como uno de los parámetros más esenciales para la producción de fibras electrohiladas. De esta manera, el análisis en la razón de inyección se realizó bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 2.7, en donde se observan cuatro valores asignados para la variación, mientras que las demás variables involucradas en el proceso de Electrohilado toman los valores ideales encontrados en los anteriores análisis, valores específicos para este estudio.

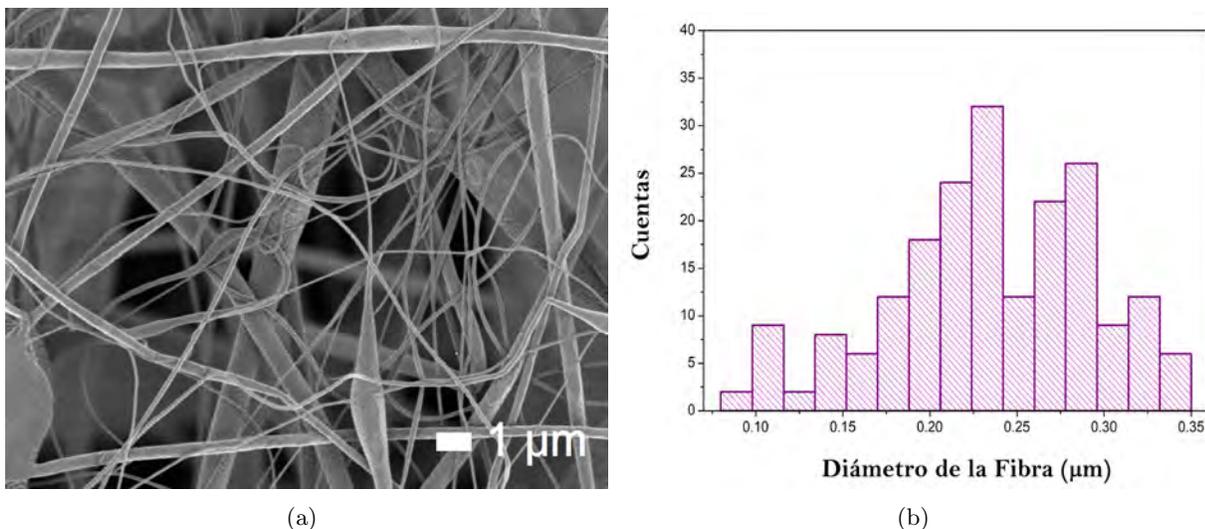


Figura 3.15: Resultados obtenidos a una razón de inyección de 0.1 mL/h. a) Microfotografía donde se aprecia mayor cantidad de fibras delgadas, observando entre ellas mismas enrollamientos, además se presenta una cantidad mínima de porosidad superficial en cada fibra debido a que es mayor el tiempo para la evaporación del solvente. b) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

El primer valor que se analizó fue una razón de inyección de 0.1 mL/h aplicada durante todo el proceso de Electrohilado; se observó que debido a la poca velocidad del flujo se permitía una mejor formación del jet y se contemplaba una mejor morfología en las fibras gracias a la adecuada evaporación del solvente.

En cuanto a la dispersión del material dentro de la cámara era mínima, ya que el valor en la razón de inyección ocasionó que la mayor cantidad de fibras que se formaban se depositaran en el colector a causa de la polaridad que éste poseía. Asimismo se realizó un análisis morfológico mediante SEM para observar la estructura presente en las fibras del andamio, adquiriendo microfotografías como la que se muestra en Figura 3.15a, donde se logró apreciar más cantidad de fibras delgadas que gruesas y se observó algunos enrollamientos entre las más delgadas. Adicionalmente se percibió uniformidad a lo largo de cada fibra, aunque en ocasiones se distinguen pequeños engrosamientos en alguna de ellas. Con respecto a la porosidad superficial se encontró en menor cantidad y sólo en las fibras más gruesas, indicando que se ha otorgado más tiempo para la evaporación del solvente durante el proceso de fabricación. De manera general, la estructura del andamio va adquiriendo fibras con mejor morfología, gracias a las condiciones ideales encontradas en cada uno de los anteriores estudios. Para complementar este análisis se examinó cuantitativamente la distribución de diámetros en las fibras que componen a este andamio, obteniendo el diagrama que se observa en Figura 3.15b, como resultado del cálculo se encontró que el diámetro promedio es de (221 ± 50) nm.

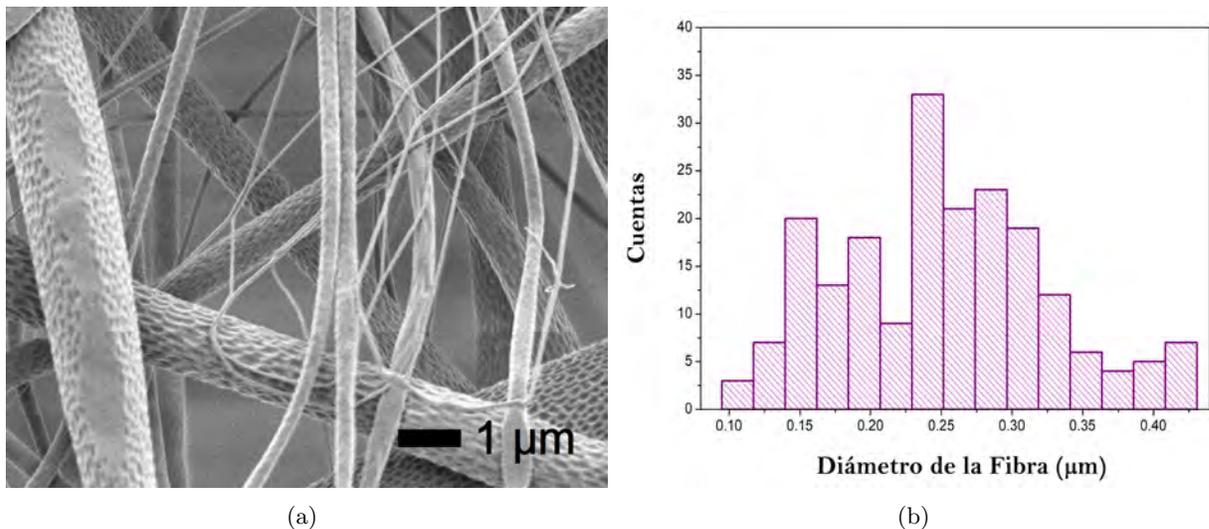


Figura 3.16: Resultados obtenidos a una razón de inyección de 0.5 mL/h. a) Microfotografía donde se observa la disminución tanto de fibras delgadas como de la cantidad de material depositado en el colector, a causa de la dispersión asociada al valor en la razón de inyección. b) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

El siguiente análisis que se realizó fue a una inyección de 0.5 mL/h, en este parámetro las condiciones experimentales fueron un poco menos favorables durante el proceso de Electrohilado, debido al aumento en la velocidad del flujo, no obstante la formación del jet era adecuada y sólo se provocó un poco de dispersión en las fibras, por lo tanto se espera obtener una formación de fibras con mayor tamaño y porosidad superficial, a causa del poco tiempo para la evaporación del solvente. En su respectivo estudio morfológico (ver Figura 3.16a), se logró corroborar el incremento en la porosidad superficial de las fibras, además disminuye la presencia de fibras delgadas y aumenta la cantidad de fibras gruesas, desapareciendo así los aumentos a lo largo de su longitud.

También se comprobó que con esta razón de inyección se obtiene una menor cantidad de fibras depositadas en el colector, debido a la dispersión que se presenta. En cuanto a la orientación, en la mayor parte del andamio sigue siendo aleatoria, sin embargo en algunas partes existe una pequeña cantidad de fibras alineadas en cierta dirección como se logra apreciar en la Figura 3.16a. Una vez obtenido el

resultado de la caracterización morfológica, se realizó un análisis cuantitativo obteniendo el diagrama de la Figura 3.16b, en éste se encontró que el diámetro promedio es de (251 ± 86) nm, medición que señala un aumento en comparación a la anterior razón de inyección analizada, efecto asociado con el aumento en la velocidad del suministro de solución polimérica al final de la aguja, afectando la dispersión de las fibras formadas gracias al jet.

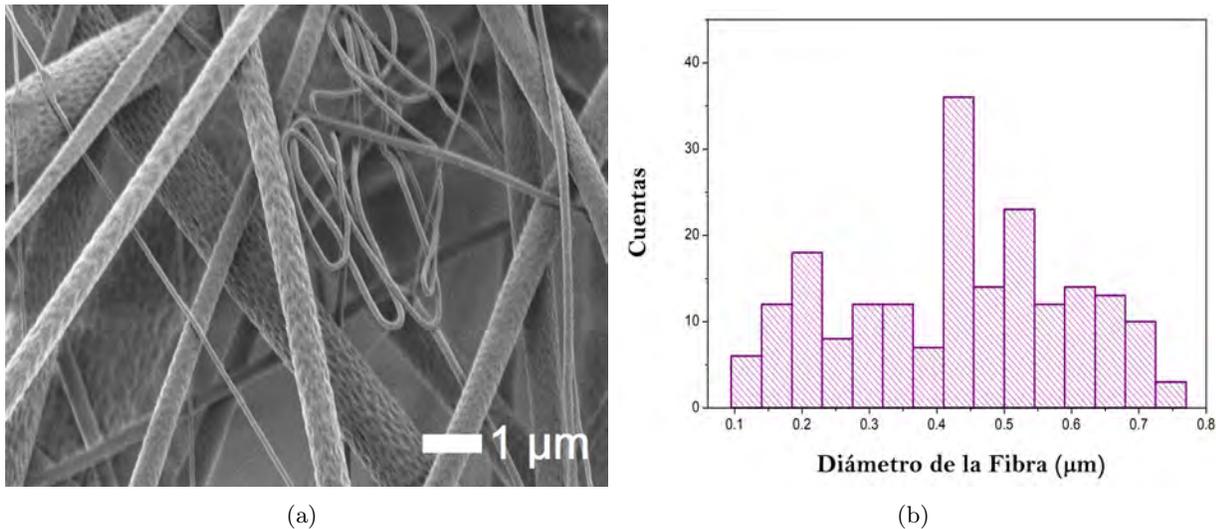


Figura 3.17: Resultados obtenidos a una razón de inyección de 1 mL/h. a) Microfotografía donde se presenta el doblamiento de algunas fibras delgadas y se aprecia la porosidad superficial en fibras más gruesas. b) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

En los valores de inyección a 1 mL/h y 1.5 mL/h se presentó un fluido rápido y continuo, lo que permitía al final de la aguja una formación del jet con menor longitud, observando mayor dispersión de fibras y variación en los tamaños de éstas.

El análisis morfológico para la inyección de 1 mL/h se muestra en Figura 3.17a, donde se observó mayor cantidad de fibras gruesas a comparación con el andamio fabricado a 0.1 mL/h, sin embargo en las más delgadas se apreció pequeños doblamientos a lo largo de su longitud (similar a un enrollamiento), y nuevamente se percibió una menor cantidad de fibras colectadas gracias a la dispersión presentada durante el proceso de Electrohilado. Mientras tanto la porosidad superficial es más notable que en los casos anteriores, y la uniformidad más precisa a lo largo de cada fibra; características atribuidas a los parámetros ideales utilizados en el análisis de esta variación. Por otro lado, la distribución de las fibras continúa siendo aleatoria a pesar de que algunas veces éstas se acomodan hacia una misma dirección. Por último se comprobó el tamaño de los diámetros con el estudio cuantitativo obteniendo un diámetro promedio de (428 ± 167) nm (ver Figura 3.17b).

El último valor que se estudió fue la razón de inyección a 1.5 mL/h, en el cual las condiciones experimentales desajustaron algunos arreglos en el proceso de Electrohilado, por ejemplo el aumento en la dispersión del material dentro de la cámara de hilado, menor longitud del jet y la variación en los tamaños de las fibras. Con relación al análisis morfológico que se muestra en Figura 3.18a, se observó un aumento en los diámetros de todas las fibras, presentando pequeñas rupturas en algunas de éstas a lo largo de su longitud, además se sigue apreciando la porosidad superficial en fibras relativamente gruesas, con una distribución más aleatoria. Por último se elaboró un diagrama con respecto al tamaño de diáme-

tros en las fibras (ver Figura 3.18b), donde se encontró que el diámetro promedio es de (857 ± 123) nm percibiendo un aumento en comparación al anterior resultado obtenido con 1 mL/h.

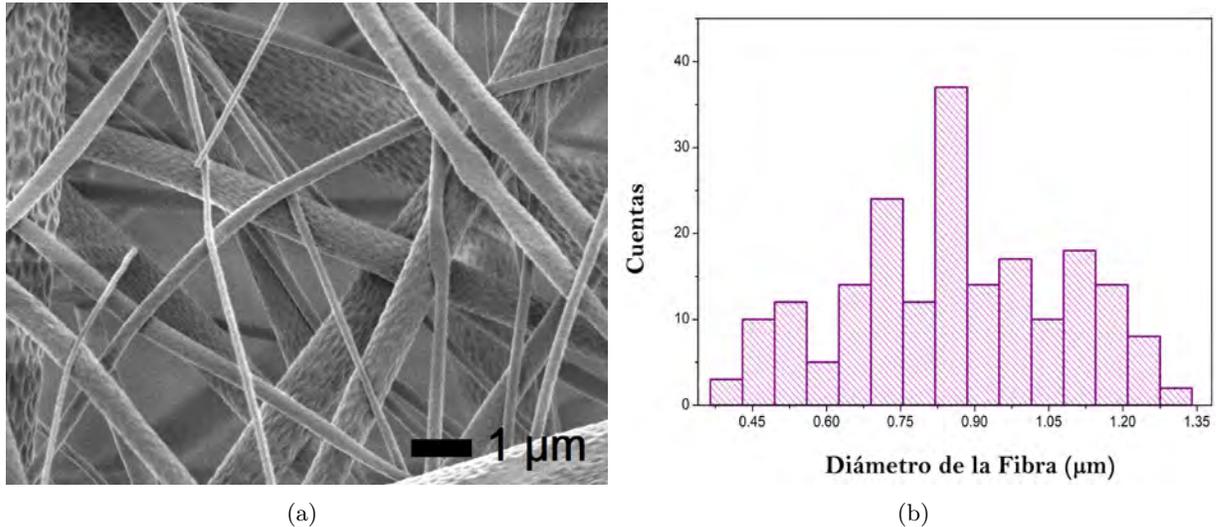


Figura 3.18: Resultados obtenidos a una razón de inyección de 1.5 mL/h. a) Microfotografía donde se visualizan fibras con un determinado grosor y porosidad superficial, presentando en alguna de ellas cierta ruptura a lo largo de su longitud. b) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

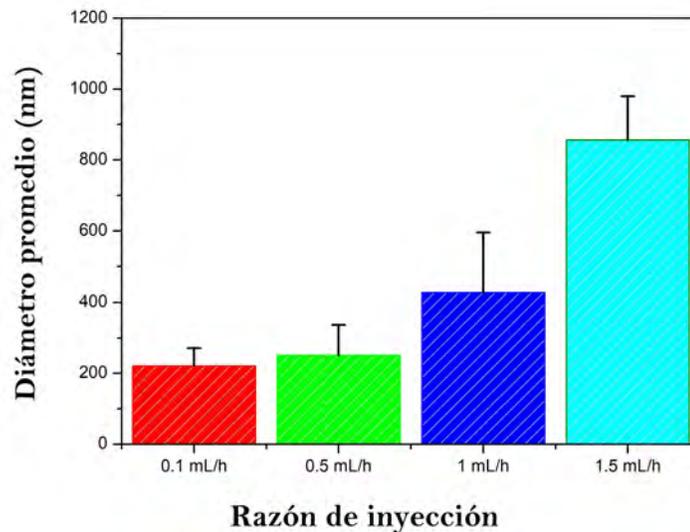


Figura 3.19: Diagrama representativo de diámetros promedios a diferente razón de inyección.

Para terminar el estudio en la variación de inyección, se elaboró un diagrama haciendo una comparación entre los valores de los diámetros obtenidos. De manera general, al ir aumentando el valor en la razón de inyección se evita la evaporación adecuada del solvente durante el proceso de Electrohilado, lo que se percibió como incremento en la porosidad superficial de cada una de las fibras. Además se provocó mayor dispersión del material dentro de la cámara de hilado, efecto que ocasiona menor depósito de fibras en el colector. En cuanto a la orientación no se puede concluir una dirección privilegiada ya que en la mayor parte de todos los andamios se presentó una distribución aleatoria, a pesar de que en algunos casos cierto

número de fibras se interesaban por acomodarse en una orientación específica.

Como resultado importante en los análisis morfológicos de este estudio, se observó que en todos los andamios se continuó con la presencia de porosidad superficial en las fibras (en unos casos es más notable), además se puede inducir que conforme se aumenta el valor en la razón de inyección se tiene mayor uniformidad en las fibras. Por otra parte, gracias a los diagramas de las distribuciones de tamaños, se encontró que *“el diámetro de las fibras incrementa sí se aumenta el valor en la razón de inyección”*. Es importante señalar que en 1.5 mL/h el diámetro es aproximadamente cuatro veces más que en 0.1 mL/h (ver Figura 3.19), a consecuencia del incremento en la velocidad del fluido provocando gran dispersión y variación de tamaños en las fibras.

De esta manera a una razón de inyección de 0.1 mL/h se pueden distinguir fibras con menor diámetro, presentando enrollamientos entre ellas lo que permite la reducción de los espacios irregulares vacíos entre las fibras del andamio; por tal motivo se considera el valor más adecuado para el parámetro de la razón de inyección en la fabricación de este tipo de andamios, aclarando que las condiciones experimentales están adaptadas en particular para este estudio.

3.2. Fabricación de los andamios compuestos de PLA-NTCMP

Para la fabricación de los andamios de PLA y PLA-NTCMP se consideró las concentraciones especificadas en la Tabla 2.5 y las condiciones experimentales de la Tabla 2.8. El proceso de Electrohilado para el andamio de PLA no presentó ningún problema, obteniendo fibras con buena apariencia y observándose a simple vista con una morfología suave y homogénea, en tono blanco (ver Figura 3.20a).

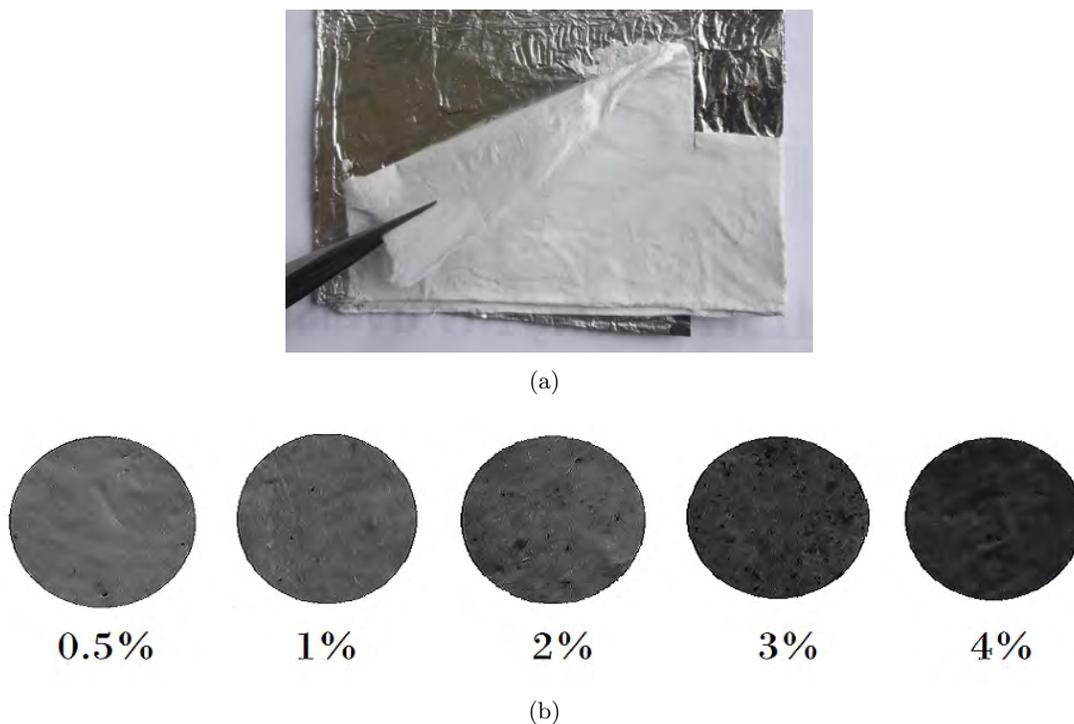


Figura 3.20: Andamios de PLA-NTCMP, fabricados por Electrohilado. a) Desprendimiento del andamio de PLA depositado en la hoja de aluminio. b) Presentación de andamios con las diferentes concentraciones de NTCMP.

En el caso de los andamios de PLA-NTCMP; cuando se incorporó los NTCMP a la solución, el problema que se presentó fue la constante obstrucción en la punta de aguja, debido a la aglomeración de los nanotubos que no se dispersaron adecuadamente, provocando que el proceso se llevara por lapsos de tiempo, a pesar de ello, el resultado que se obtuvo fue un andamio homogéneo y nuevamente sin grumos en la superficie, pero con un tono más oscuro conforme se incrementó la concentración de los nanomateriales (ver Figura 3.20b). En general, al terminar de electrohilar cada uno de los andamios, las fibras quedaban depositadas en la hoja de aluminio, la cual cubría por completo la superficie del colector, por lo tanto, para cada estudio realizado se desprendió una pequeña parte del andamio, como se observa en Figura 3.20a.

Antes de la caracterización correspondiente a cada muestra, se tomaron porciones de los andamios de PLA y PLA-NTCMP (4% de NTCMP), para colocarlas en un porta-objetos, y ser observadas con el microscopio óptico; en el caso del andamio de PLA, se observó fibras muy finas sin poseer una dirección privilegiada como se muestran en la Figura 3.21a. Mientras tanto, en el andamio de PLA-NTCMP con una concentración de 4% en nanomateriales, se logró percibir fibras muy delgadas con aglomeraciones de NTCMP en diferente volumen, los cuales se pueden apreciar en Figura 3.21b como puntos negros, este comportamiento se presentó en todo el andamio.

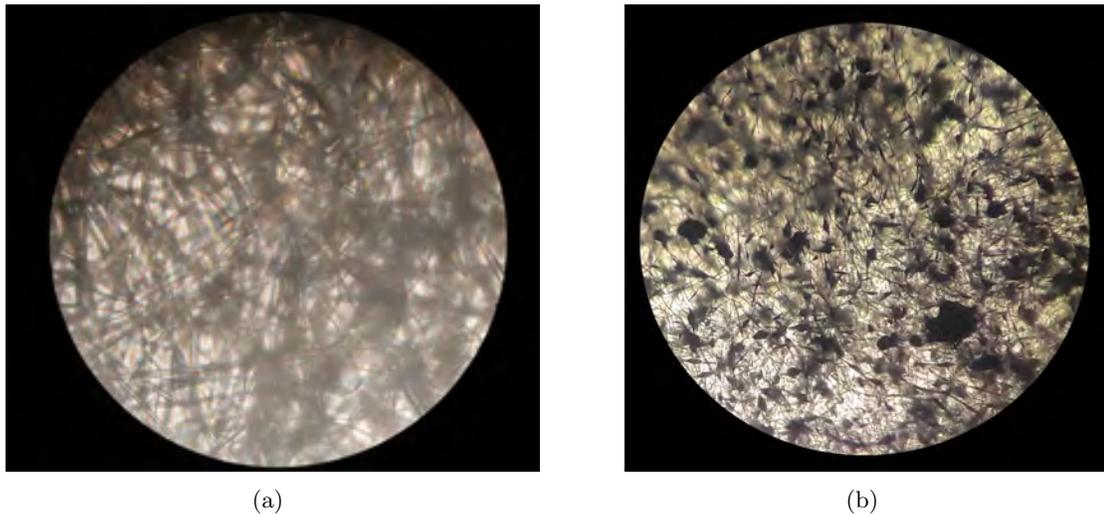


Figura 3.21: Microfotografías mediante un microscopio óptico de los andamios fabricados. a) Andamio de PLA, presentando fibras muy finas sin poseer una dirección privilegiada. b) Andamio de PLA-NTCMP (4%), presentando fibras delgadas con aglomeraciones de NTCMP (puntos negros).

3.3. Caracterización de los andamios compuestos PLA-NTCMP

Se realizó la caracterización de los andamios fabricados de PLA y PLA-NTCMP, utilizando para ello técnicas de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Difracción de Rayos X de ángulo amplio (DRX), Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) y Espectroscopía Raman, obteniendo de esta manera las características iniciales que permiten identificar al poliéster biodegradable PLA, para poder establecer criterios comparativos con el material al incorporarle los NTCMP.

3.3.1. Caracterización morfológica

3.3.1.1. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Con el fin de poder observar la estructura y orientación de los andamios fabricados, se empleó la Microscopia (MEB), mediante este análisis se logró extraer información respecto a la morfología en la superficie de las fibras que constituyen al andamio. Dichos andamios se fabricaron con las condiciones ideales encontradas en los estudios correspondientes a la parametrización de las variables involucradas en el proceso de Electrohilado, por tal motivo se espera observar fibras con una mejor morfología y sin la presencia de estructuras ajenas a la composición de los filamentos. De esta manera se detallará la explicación de tres resultados en particular, la muestra de NTCMP, el andamio de PLA y un andamio compuesto de PLA-NTCMP, de tal forma que puedan ser comparativos y ayuden a deducir una conclusión.

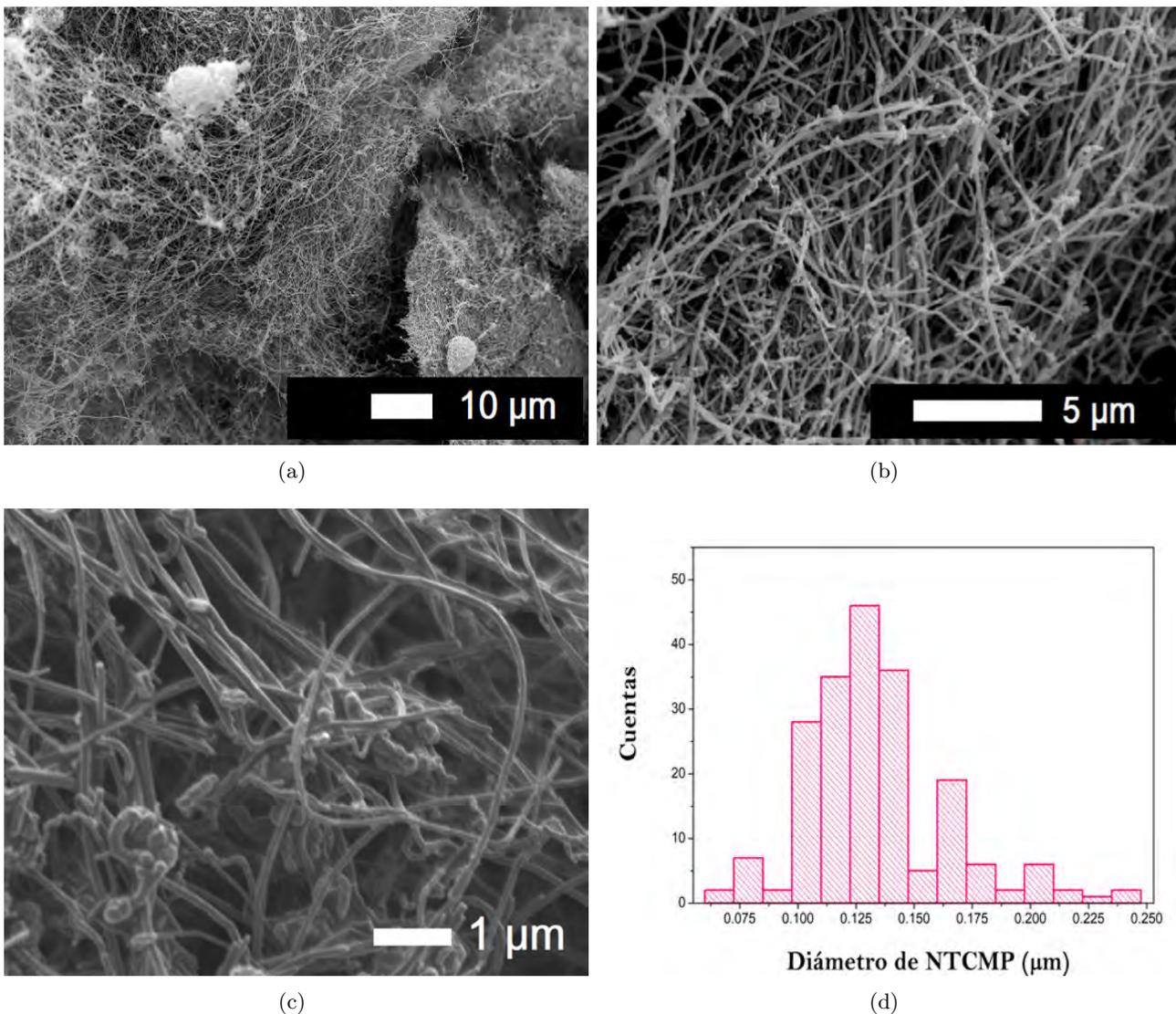


Figura 3.22: Microfotografías obtenidas mediante MEB, de la muestra de NTCMP. Imágenes capturadas por el microscopio electrónico del CENICA; a) Observación de grandes cúmulos de NTCMP entrelazados, y b) Enfoque más cercano a la muestra apreciando la gran longitud que éstos poseen. c) Imagen capturada por el microscopio electrónico del Laboratorio Central; nuevamente se aprecian nanotubos con gran longitud, y en algunos extremos se logró percibir que dichos nanomateriales no son huecos. d) Distribución de diámetros presentes en los NTCMP, con $n=200$.

En la Figura 3.22a y 3.22b se muestran las microfotografías de los NTCMP obtenidas con el Microscopio Electrónico del CENICA, en estas imágenes se logró apreciar la estructura de dichos nanomateriales, en forma de filamentos con gran longitud, presentándose por lo regular en extensas aglomeraciones que se perciben como enrollamientos entre ellos mismos. Adicionalmente se examinó esta misma muestra, en el Microscopio Electrónico del Laboratorio Central (ver Figura 3.22c); se encontró las mismas características (fibras muy finas y de gran longitud), pero también se observó los extremos de algunos filamentos, donde se percibe que no son nanotubos huecos. Sin embargo, debido a la dimensión que tienen estos NTCMP, se presenta dificultad para enfocar adecuadamente su superficie y determinar de forma precisa la estructura de dichos nanomateriales. Por último se estudió el tamaño de sus diámetros (ver Figura 3.22d) con ayuda de un análisis cuantitativo, donde se encontró que el diámetro promedio de los nanotubos es de (134 ± 31) nm, colocándose en la categoría de “Nanotubos de Carbón Multi-Pared” que poseen un diámetro entre 50 nm o más, corroborando la información mencionada.[45],[80]

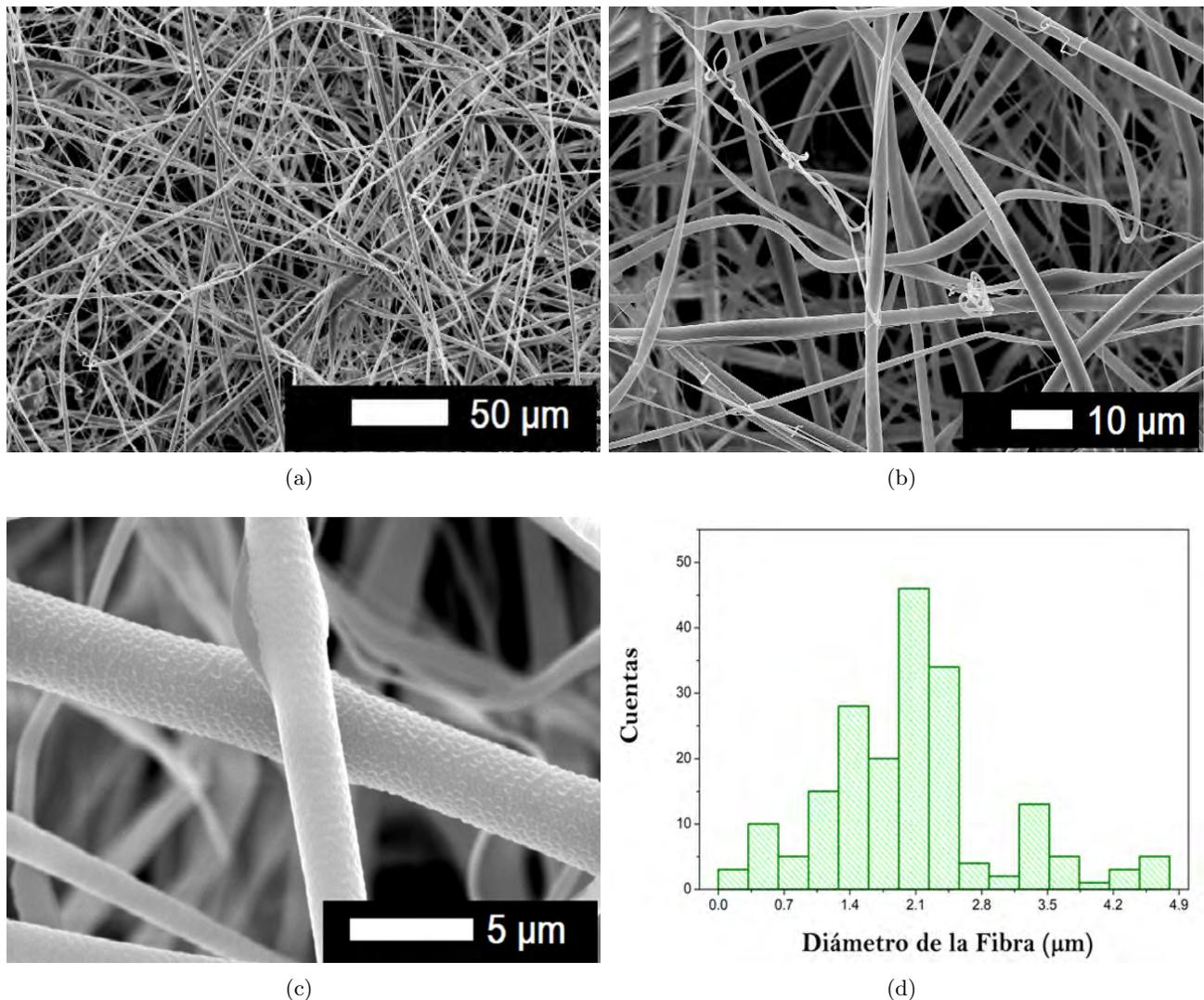


Figura 3.23: Microfotografías obtenidas mediante MEB, del andamio de PLA. a) Distribución de fibras en la superficie del andamio. b) Observación del diámetro en las fibras a lo largo de su longitud, presentando filamentos ultrafinos en forma de nudos. c) Acercamiento a la superficie de un par de fibras, percibiendo la presencia de porosidad (escamas). d) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

El análisis morfológico del andamio de PLA se muestra en la Figura 3.23, donde se logró apreciar que las fibras se encuentran distribuidas en toda la superficie, sin presentar una orientación privilegiada (ver inciso a), en cuanto al diámetro que poseen estos filamentos, sólo se puede decir que no es uniforme a lo largo de su longitud, ya que de manera general se observan engrosamientos en algunas fibras. Mientras tanto en el inciso b), se perciben mejor estos ensanchamientos, y se visualiza la presencia de fibras muy finas que se entrelazan formando estructuras tipo nudos. En la Figura 3.23c se muestra un acercamiento en la observación de una pequeña área del andamio, enfocando la superficie de un par de fibras, donde se percibió poros o escamas de forma continua, y el diámetro con mayor uniformidad a lo largo del filamento.

Para complementar este estudio se realizó un diagrama con la distribución de diámetros presentes en las fibras que componen a este andamio (ver Figura 3.23d) y se obtuvo cuantitativamente un diámetro promedio de (314 ± 22) nm; sin embargo es importante señalar que aunque se emplearon las condiciones ideales para este estudio en particular, existe una pequeña variación del diámetro, debido a que no se controló las demás variables involucradas en el proceso de fabricación como son: temperatura, vacío dentro de la cámara, desplazamiento de la aguja inyectora, entre otras. A pesar de esto, un resultado enriquecedor fue la obtención de fibras con mejor distribución en la superficie del colector, mayor uniformidad y sin la presencia de estructuras ajenas a los filamentos.

El siguiente análisis fue para los andamios de PLA-NTCMP, con las concentraciones en nanomateriales de 0.5 %, 1 %, 2 % y 3 %. En el proceso de fabricación de dichos andamios, el conflicto que se presentó fue la constante obstrucción en la aguja inyectora, provocando gran variación en el tamaño y diámetro de las fibras, mientras que en las concentraciones más altas de NTCMP, se visualizaron pequeñas salpicaduras oscuras sobre la superficie del andamio. Sin embargo para corroborar esta información, se realizó un estudio morfológico, el cual se muestra en la Figura 3.24.

La morfología del andamio con 0.5 % de concentración en NTCMP, es muy similar a las fibras de PLA; se observó filamentos con diámetro más uniforme, además de apreciar algunos ensanchamientos distribuidos por toda el área de colección, asociados a la encapsulación de nanomateriales no dispersados (ver Figura 3.24a). La microfotografía que se muestra en Figura 3.24b corresponde al andamio con 1 % de NTCMP, donde gracias a la escala con la que se capturó la imagen se logró percibir mayor cantidad de fibras colectadas, presentando entre ellas gran variación de volumen, lo que ayuda a identificar fácilmente entre fibras gruesas, delgadas y finas; además al centro de esta figura se observó una de las fibras con mayor diámetro, teniendo un tono más oscuro a comparación de las otras, dichas características se relacionan a las aglomeraciones presentadas por los NTCMP adquiriendo un recubrimiento por la fibra de PLA, al momento de la fabricación.

Los andamios con 2 % y 3 % de NTCMP, presentaron deformaciones en las fibras electrohiladas, perdiendo la uniformidad a lo largo de su longitud, además de percibir doblamientos y estructuras tipo espiral entre las mismas fibras. En el andamio con 3 % de NTCMP, se observó fibras más gruesas (ver Figura 3.24d) a comparación de las fibras delgadas que se presentan en el andamio con 2 % (ver Figura 3.24d), corroborando la información, de que a altas concentraciones de nanomateriales la obstrucción en la punta de la aguja se presenta frecuentemente, provocando en la mayor parte del tiempo que los NTCMP se queden aglomerados en la aguja y en cualquier momento inesperado salgan con una determinada presión obteniendo la formación de fibras muy gruesas o de salpicaduras de la misma solución, con mayor cantidad de nanotubos que de polímero.

El último andamio fabricado, compuesto de PLA-NTCMP con 4 % en nanomateriales, se analizó de manera más detallada, ya que involucraba el mayor porcentaje en NTCMP, lo que facilitaría mejor la observación de los nanotubos sobre las fibras de polímero, por lo tanto en este caso también se realizó un estudio cuantitativo para deducir una conclusión acerca del diámetro promedio en las fibras, de tal

manera que permita comparar el tamaño en los filamentos y ayude a distinguir la morfología, entre las fibras poliméricas y las fibras compuestas con nanomateriales. La morfología en general de este andamio se muestra en Figura 3.25a, donde se observó la presencia de grumos distribuidos por toda la superficie, teniendo cierta variación en su volumen, sin embargo para visualizar mejor las características en estas fibras, se realizó un acercamiento, el cual permitió apreciar la persistencia en la deformación de las fibras perdiendo uniformidad del diámetro y presentando algunos doblamientos entre las más delgadas (ver Figura 3.25b). Además se observó que en algunos casos ciertas fibras tienden a adquirir una estructura en forma de espiral, mientras que en los ensanchamientos de éstas (grumos) es posible ver algunos NTCMP sobre su superficie (ver Figura 3.25c).

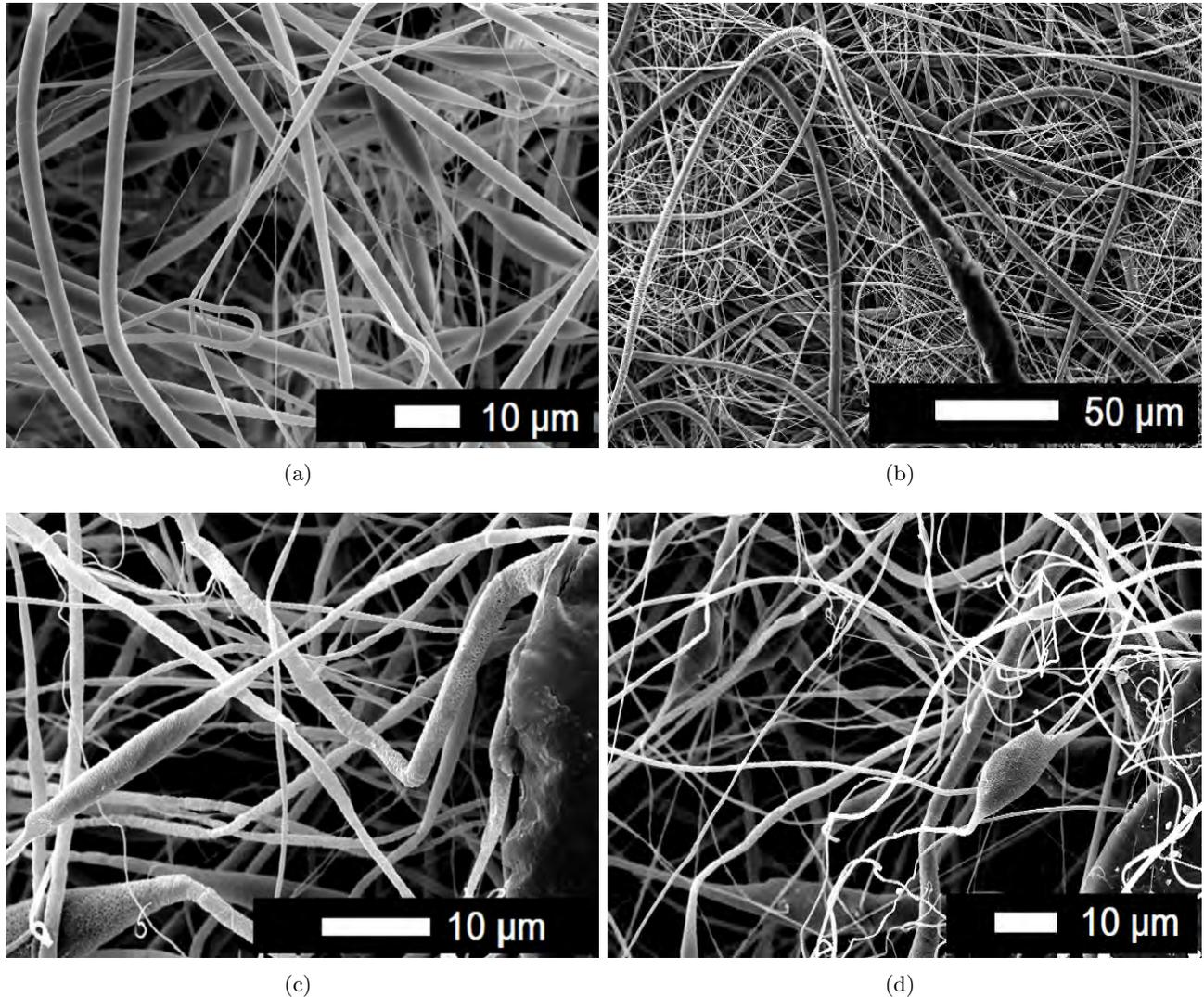


Figura 3.24: Microfotografías de los andamios de PLA-NTCMP. a) Andamio con 0.5 % de NTCMP; presentando algunos engrosamientos a lo largo de ciertas fibras. b) Andamio con 1 % de NTCMP; fibras con gran variación en su volumen, apreciando con facilidad filamentos con mayor diámetro. c) Andamio con 2 % de NTCMP; la morfología en las fibras empezó a deformarse, debido al aumento en las aglomeraciones de los nanomateriales. d) Andamio con 3 % de NTCMP; las fibras tienden a ser ultrafinas y se observa la presencia de mayor cantidad de perlas formadas por los nanotubos contenidos en las fibras de PLA.

Este tipo de comportamiento en las fibras, es el hecho observado a la concentración de los NTCMP,

ya que su dispersión no es la adecuada en la solución polimérica, lo que provoca el surgimiento de ensanchamientos con tonalidades oscuras, en los que se encuentran cierta cantidad de nanomateriales.

En cuanto al análisis cuantitativo (ver Figura 3.25d), se encontró que el diámetro promedio en la distribución de tamaños es de $(5,400 \pm 1,207)$ nm, el cual se denota como el diámetro más grande en todos los estudios cuantitativos, y se relaciona a la unión de NTCMP con polímero, lo cual se esperaba en principio, ya que el propósito de electrohilar las soluciones compuestas de PLA-NTCMP fue para empaquetar la mayor cantidad de nanomateriales dentro de la fibra de polímero; por tal motivo se realizó primero la parametrización de las variables involucradas en el proceso, eligiendo siempre los resultados con mejor morfología en las fibras y con menor tamaño en su diámetro.

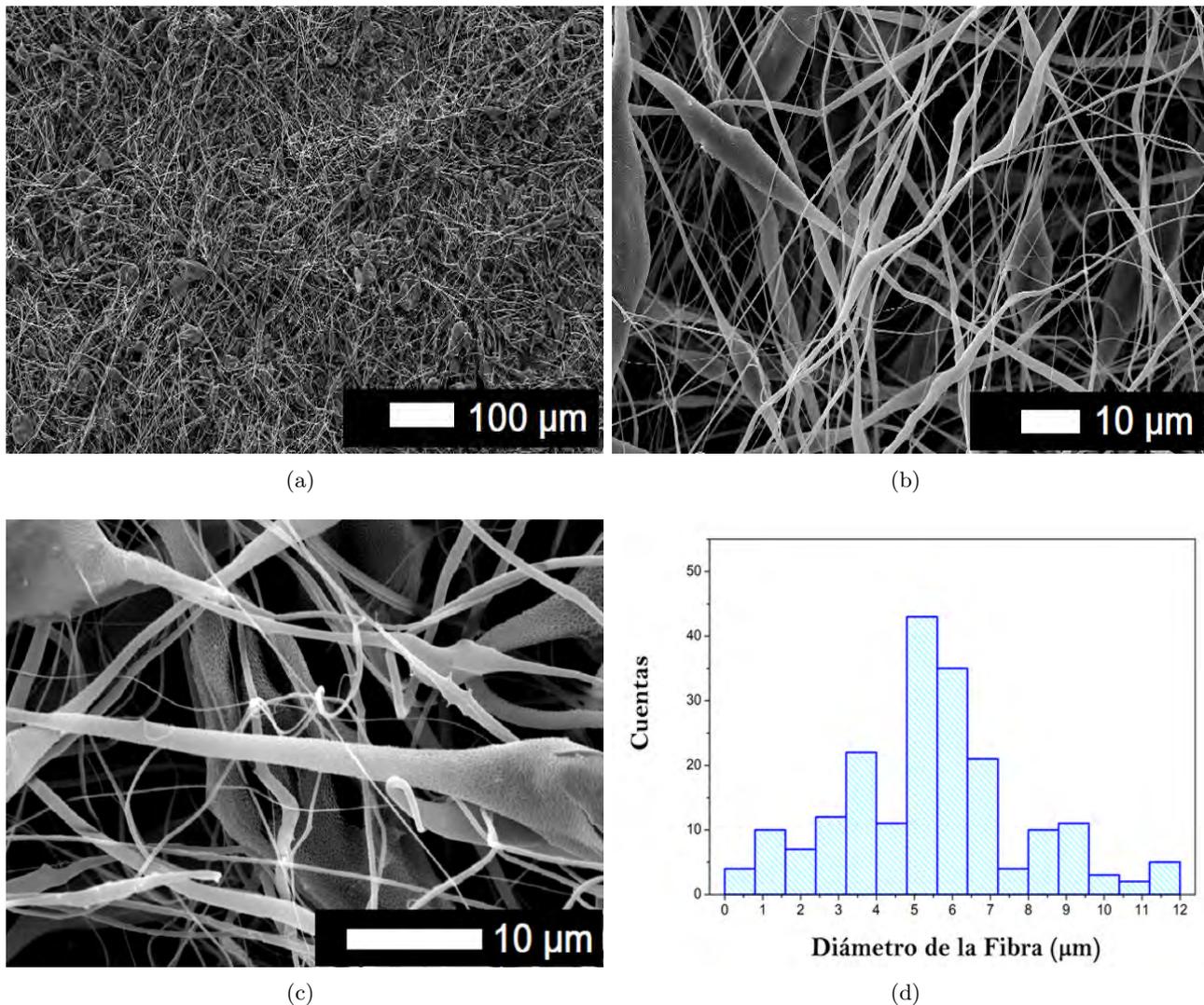


Figura 3.25: Microfotografías obtenidas por MEB, del andamio de PLA-NTCMP (4%). a) Distribución de fibras en la superficie del andamio, presentando una gran cantidad de grumos o perlas, en toda el área. b) La deformación en las fibras persiste; provocando la pérdida en la uniformidad del diámetro a lo largo de su longitud, además de percibir NTCMP embebidos en los grumos del filamento por la tonalidad oscura. c) Las fibras más delgadas tienden a formar espirales y en la superficie de los grumos con mayor volumen se puede percibir algunos nanotubos. d) Distribución de diámetros presentes en las fibras, con $n=200$.

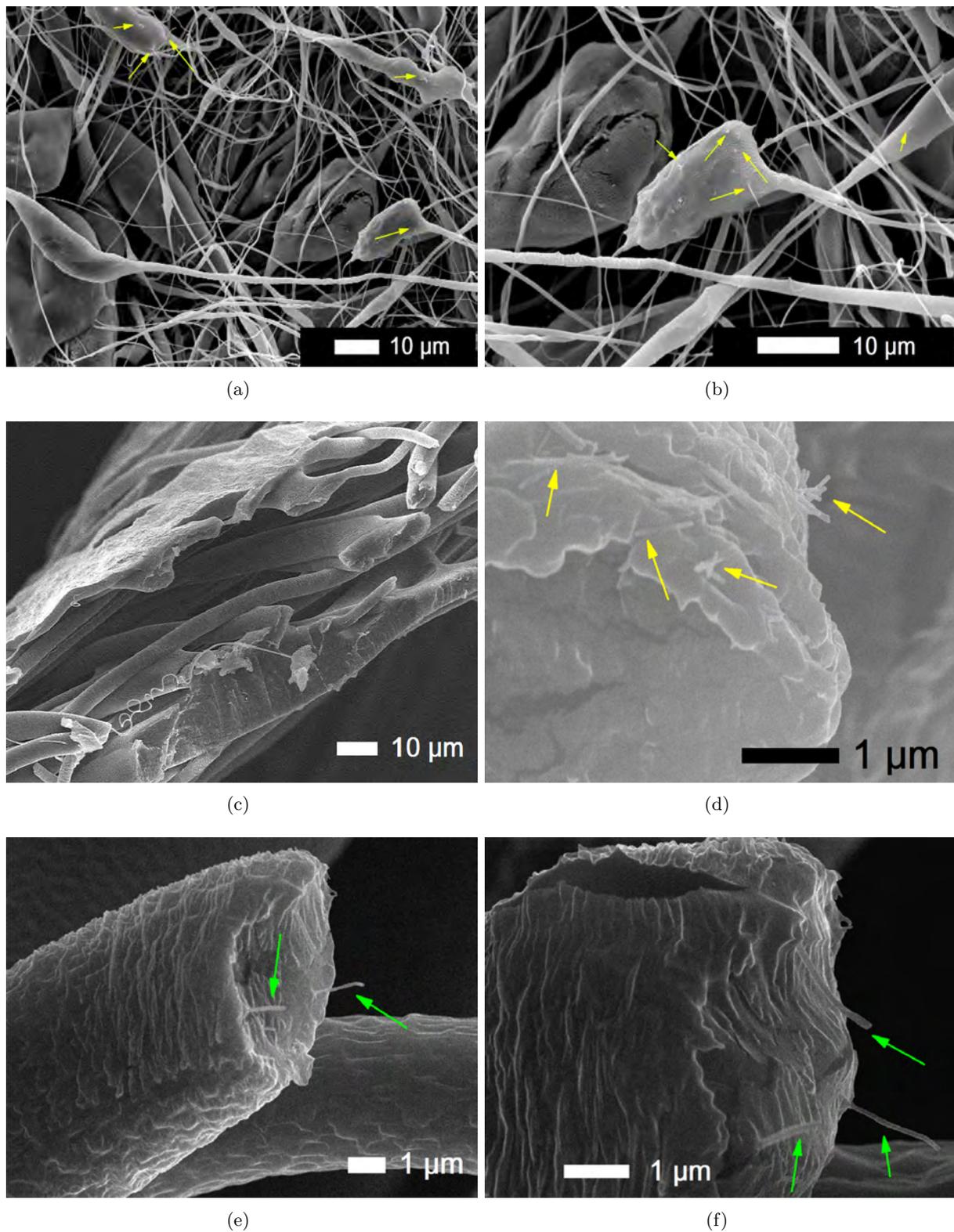


Figura 3.26: Microfotografías de NTCMP observados en el andamio de PLA-NTCMP (4%). a) y b) NTCMP expuestos sobre la superficie de los ensanchamientos en las fibras (flechas amarillas). c) Para comprobar la hipótesis de la fabricación de fibras con NTCMP embebidos en ellas, se realizó un corte transversal, exponiendo fibras del interior del andamio. d) En las fibras internas a la matriz se observó grandes cantidades de nanomateriales en su superficie (flechas amarillas). e) y f) Adicionalmente se encontró nanotubos embebidos en las fibras de PLA, observándose como pequeños cables saliendo del interior (flechas verdes).

Como se mencionó, se estudió a detalle el andamio de PLA-NTCMP (4%) debido al porcentaje en nanomateriales, lo que permitía encontrar más rápido las zonas en donde se ubicaban los NTCMP. En las Figuras 3.26(a y b) se observó la superficie del andamio, apreciando de mejor manera el ensanchamiento en algunas fibras, donde se visualizan pequeños hilos que salen (señalados con flechas amarillas), los cuales se deducen que son NTCMP; sin embargo para comprobar esta deducción se analizó el tamaño de éstos con respecto a su diámetro, encontrando un valor promedio entre (140 ± 8) nm, por lo que se concluye que es correcta la información, ya que se encuentra en el rango de los NTCMP.

Una vez que se analizó la superficie, se continuó estudiando las fibras internas del andamio, por lo que se optó en realizar un corte transversal, de tal manera que las fibras quedaran expuestas y así examinar si se encontraban nanomateriales dentro del filamento. La microfotografía del corte transversal en el andamio se muestra en Figura 3.26c, donde se puede apreciar algunos extremos de fibras perpendiculares al corte, las cuales se usaron para el análisis de nanotubos embebidos. La primera observación se enfocó en la superficie de una fibra expuesta (ver Figura 3.26d), se encontró varias cantidades de NTCMP en forma de cúmulos distribuidos sobre la superficie, dichos nanomateriales se señalan con flechas amarillas en la imagen. La siguiente observación se realizó directamente en las fibras expuestas, para apreciar su interior de mejor manera (ver Figuras 3.26e y 3.26f), en estas imágenes se logró comprobar que algunos NTCMP se encuentran embebidos en la matriz polimérica de PLA, formando con la fibra una estructura de tipo cable; estos nanomateriales se pueden identificar como pequeños y delgados tubos saliendo del interior de la fibra (señalados con flechas verdes). Por otra parte, también se observó una serie de marcas sobre la superficie de la nanofibra posiblemente por la interacción del aire sobre la fibra cuando viaja de la aguja al colector, presentándose como pequeñas escamas o porosidad superficial. De manera general, la hipótesis planteada inicialmente, sobre el empaquetamiento de NTCMP dentro de las fibras de polímero, fue acertada; sin embargo también se tiene nanomateriales en la superficie de los filamentos, debido a la forma de fabricación con la técnica de Electrohilado convencional.

Para terminar el análisis entre las fibras de PLA y las fibras compuestas con NTCMP, se elaboró un diagrama haciendo una comparación entre los valores de los diámetros obtenidos (ver Figura 3.27), concluyendo que al agregar el 4% de nanotubos a la solución polimérica, se incrementa alrededor de 5 veces el tamaño de la fibra de polímero, lo que era de esperarse debido a la cantidad de NTCMP contenidos al interior de la fibra, sumando además los nanotubos observados en las superficies.

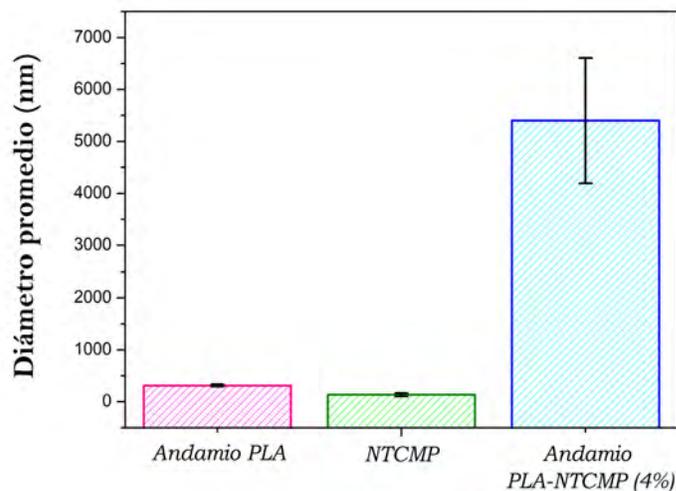


Figura 3.27: Diagrama representativo de diámetros promedio en las fibras de PLA y las fibras compuestas con NTCMP.

3.3.2. Caracterización físico-química

3.3.2.1. Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

La energía asociada con la radiación electromagnética en el rango infrarrojo (justo por encima de la longitud de onda del visible, aproximadamente entre $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) es suficiente para provocar la excitación de los enlaces químicos, generando vibraciones de estiramiento o deformación de éstos. La Espectroscopía FTIR-ATR involucra el uso de esta radiación para caracterizar los enlaces químicos, provocando que la vibración de una estructura determinada sea analizada en términos de los grados de libertad que ésta posee. Este estudio se realizó a todos los andamios fabricados de PLA y PLA-NTCMP.

El espectro infrarrojo que se muestra en la Figura 3.28 corresponde al andamio de PLA, donde se observan valores característicos relacionados con los modos de vibración de grupos funcionales correspondientes al andamio. Estos valores asociados a las bandas más relevantes del espectro, son obtenidos experimentalmente y se resumen con los datos teóricos en la Tabla 3.1, de tal manera que se puedan comparar dichos resultados y permitan identificar o confirmar que el material corresponde al polímero PLA.

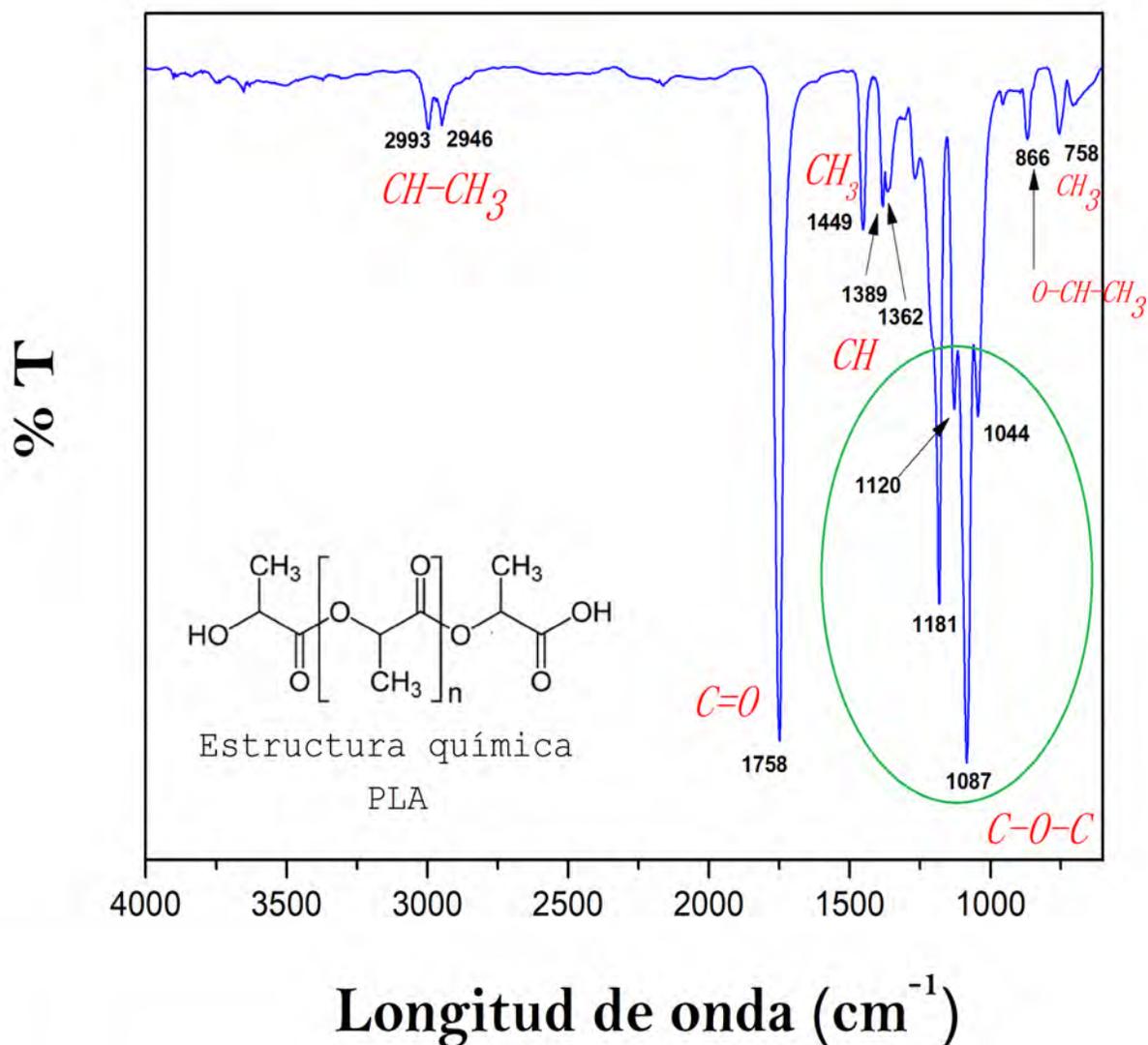


Figura 3.28: Espectro FTIR-ATR del andamio de PLA.

En Figura 3.28 y Tabla 3.1, se observó que destacan las bandas características de los ésteres alifáticos mostrando picos alrededor de 2993 y 2946 cm^{-1} que son asociados a estiramientos del grupo $CH - CH_3$, y una banda a 1449 cm^{-1} de intensidad moderada relacionada con el grupo metilo del PLA. Además se encontró señales ubicadas entre 1181 y 1044 cm^{-1} que se atribuyen a las vibraciones dentro de estructuras cristalinas que pueden estar presentes en el poliéster PLA, representándose en componentes del tipo estiramiento alrededor del grupo éster $-COC-$, oscilación de acuerdo con lo establecido en la literatura.[71],[72] Asimismo la presencia de picos en 866 cm^{-1} y 758 cm^{-1} , se relacionó con las fases amorfa y semicristalina de PLA, respectivamente.[73]

$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ experimental	$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ teórico	Modos de Vibración
2993	2997	Estiramiento asimétrico $CH - CH_3$
2946	2946	Estiramiento simétrico $CH - CH_3$
1758	1759	Estiramiento $C = O$
1449	1456	Flexión CH_3
1389	1373	Flexión CH simétrica y asimétrica
1362	1365	Deformación CH
1181 - 1044	1183 - 1038	Estiramiento $C - O - C$
866	869	Estiramiento $O - CH - CH_3$
758	750	Balanceo CH_3

Tabla 3.1: Resumen de las bandas características atribuidas al andamio de PLA mediante FTIR-ATR.

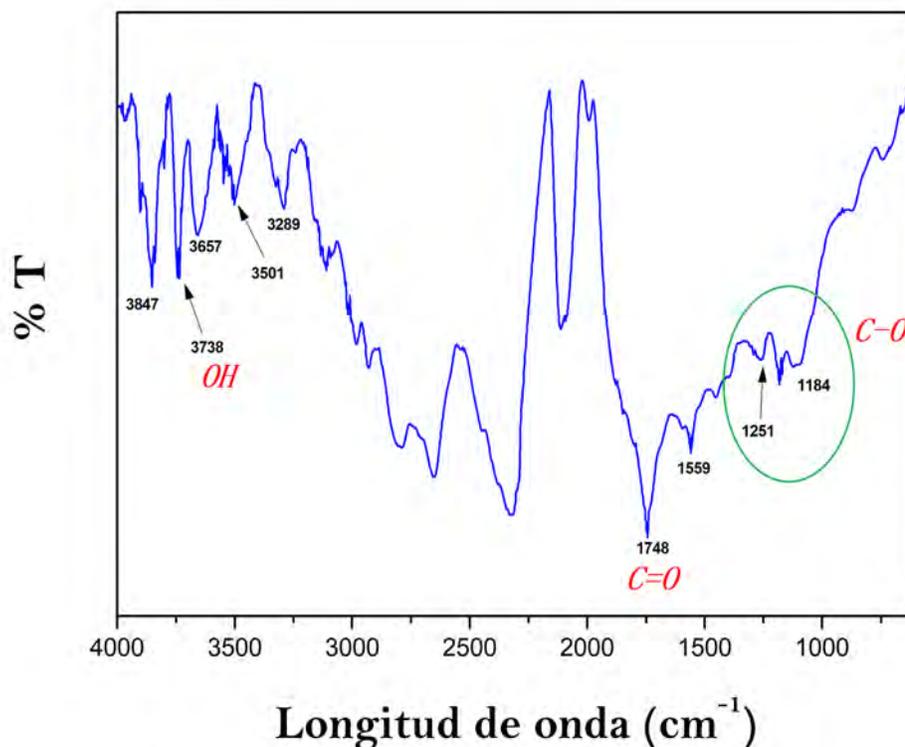


Figura 3.29: Espectro FTIR-ATR de los NTCMP en polvo.

El análisis realizado al espectro FTIR-ATR de los NTCMP (ver Figura 3.29 y Tabla 3.2), presentó un

pico importante en 3738 cm^{-1} , atribuido a los grupos hidroxilo libres, confirmando la presencia de varios restos hidroxilos en la superficie del carbón. Además se logró encontrar bandas con picos bien definidos en el rango $1748\text{-}1559\text{ cm}^{-1}$, que pueden ser asignadas a grupos $C = O$ en diferentes entornos (ácido carboxílico, cetona/quinona).[13] Los movimientos característicos a 1748 cm^{-1} son bandas $C = O$ relacionadas con los modos de estiramientos de grupos funcionales carboxílicos formados debido a la oxidación de algunos átomos de carbono sobre la superficie de los NTCMP, probablemente al tratamiento con ácidos durante la purificación en su manufacturación.[14],[13] Mientras que el pico a 1559 cm^{-1} se relaciona al modo de estiramiento del anión carboxilato, además es atribuido al modo del grafito activo en infrarrojo, conocido como la banda G , la cual se origina en sp^2 carbono hibridizado.[15],[13]

$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{) experimental}$	$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{) teórico}$	Modos de Vibración
3738	3728	Vibración de los grupos OH
1748	1750 - 1736	Estiramiento $C = O$
1559	1584 - 1550	Banda G
1251 - 1184	1300 - 950	Presencia de enlaces $C - O$

Tabla 3.2: Resumen de las bandas características atribuidas a la muestra de NTCMP en polvo.[13],[14],[15]

En este espectro también se observaron, las bandas en 1251 cm^{-1} y 1184 cm^{-1} prueban la presencia de enlaces $C - O$ en varios entornos químicos, e incluso el pico a 1251 cm^{-1} se atribuye a los estados defectuosos sobre las paredes de los NTCMP. [15],[13] Por otra parte, los picos observados alrededor de $3173\text{-}1938\text{ cm}^{-1}$, no son señales características de grupos funcionales, en este estudio se relaciona a un artefacto que introduce el dispositivo ATR al momento de emplearlo. Los análisis mediante FTIR-ATR de los andamios de PLA-NTCMP a diferentes concentraciones de NTCMP se muestran en Figura 3.30, donde en general gracias a la comparación entre los espectros obtenidos, en el rango de $3000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ no se encontró una diferencia relevante entre las señales infrarrojas de cada andamio, sin embargo en el rango de $4000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ la diferencia se presentó en la intensidad de las bandas que aparecieron en esta zona. De esta manera, los picos relacionados con los modos de vibración de grupos funcionales, obtenidos experimentalmente de los andamios de PLA-NTCMP y su correspondencia con los valores experimentales del PLA y NTCMP por separado, son descritos en la Tabla 3.3.

En estos estudios se encontró que los cinco espectros presentaron las mismas bandas de los ésteres alifáticos asociadas a estiramientos del grupo $CH - CH_3$ en 2992 cm^{-1} y 2942 cm^{-1} , y también de las bandas relacionadas con las flexiones del grupo metilo y CH , en 1454 cm^{-1} y 1378 cm^{-1} respectivamente; es importante señalar que todas estas bandas sufren desplazamientos en el eje de la longitud de onda, entre $1\text{-}11\text{ cm}^{-1}$, a comparación de los espectros obtenidos en Figura 3.28. Lo mismo sucede con las señales en el rango $1181\text{-}1042\text{ cm}^{-1}$ que pertenecen al estiramiento del grupo funcional $C - O - C$, las cuales sufren desplazamientos en la longitud de onda, sin observar aumento de intensidad entre ellas, sin embargo se esperaba obtener un incremento en la intensidad de la banda a 1181 cm^{-1} , ya que se encontró presente tanto en el andamio de PLA como en la muestra de los NTCMP, lo que probablemente hubiera indicado una interacción entre dichos materiales. Las bandas a 870 cm^{-1} (Estiramiento $O - CH - CH_3$) y 750 cm^{-1} (Balanceo CH_3) siguen presentes aún con la incorporación de los nanomateriales, indicando las fases amorfa y semicristalina del PLA, a pesar de ello, algo interesante que se observó en la comparación de estos espectros, fue un pequeño aumento con respecto a la intensidad en la banda de 750 cm^{-1} con 1%, 2% y 3% de NTCMP, lo que se relacionó con un arreglo más semicristalino dentro del andamio.

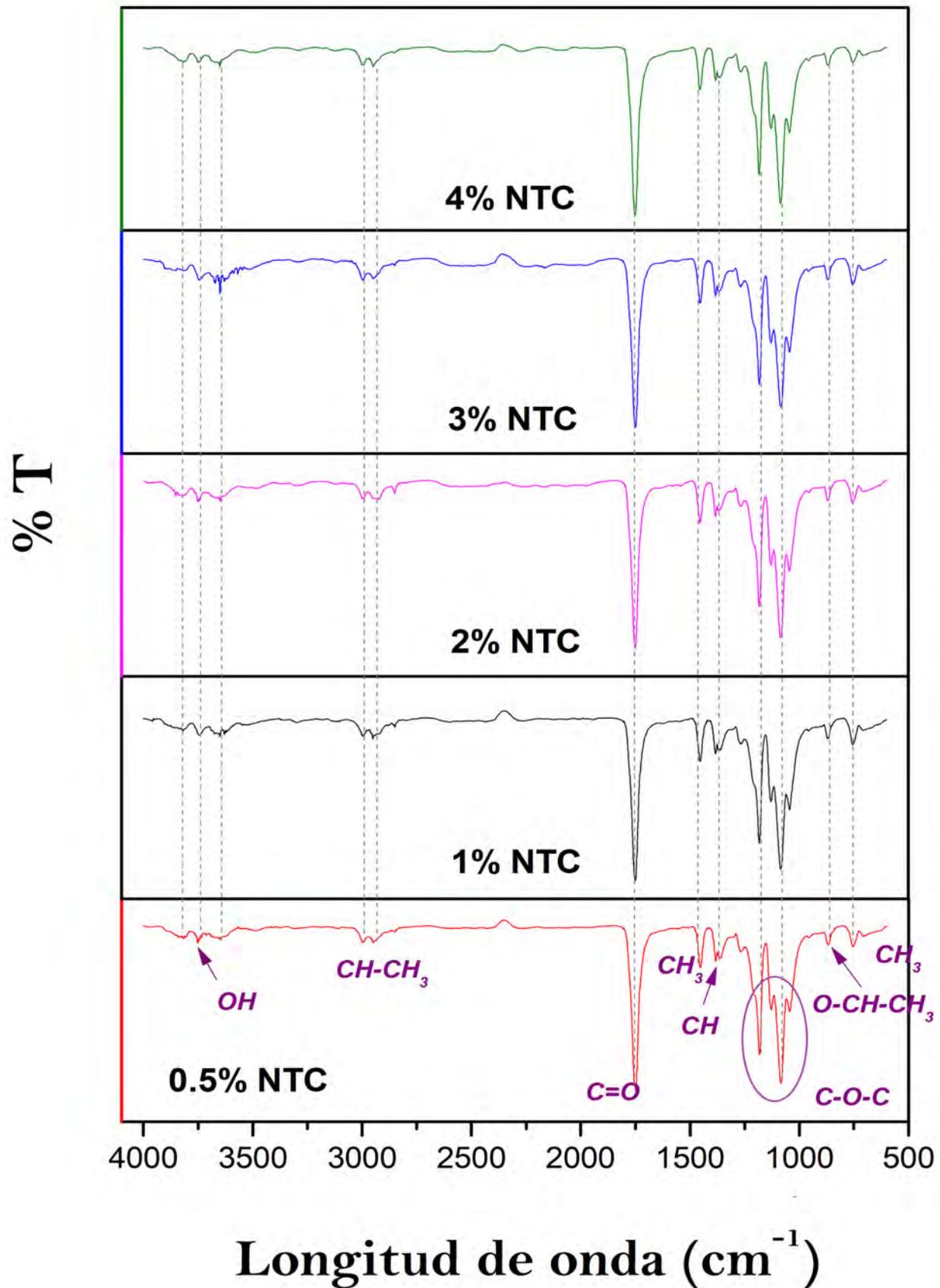


Figura 3.30: Comparación entre los espectros FTIR-ATR de los andamios compuestos de PLA-NTCMP.

Además se logró apreciar un incremento en la banda asociada al estiramiento de los grupos carboxílicos ($C = O$) a 1754 cm^{-1} , recordemos que esta banda se encontró en los espectros de las Figuras 3.28 y 3.29, corroborando que existe una interacción entre los materiales (PLA y NTCMP) debido a la intensidad que presentó, que incluso excede las señales del grupo $C - O - C$. Mientras tanto, las bandas que se encuentran en el rango de $3847\text{-}3657\text{ cm}^{-1}$ son relacionadas con los grupos hidroxilos presentes en la superficie del carbón, además se observó que la intensidad de estas señales es muy baja, sin embargo se logró percibir que a una concentración de 3% en NTCMP, la intensidad incrementa un poco a comparación de los demás espectros. Es importante señalar que las bandas encontradas en los NTCMP son similares a las reportadas en la literatura [13], [14] y [15], lo cual puede observarse con claridad en la Tabla 3.2.

$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ experimental “Andamio PLA”	$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ experimental “Muestra NTCMP”	$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ experimental “Andamios PLA-NTCMP”
758	- - - -	750
866	- - - -	870
1044	- - - -	1042
1087	- - - -	1092
1120	- - - -	1131
1181	1184	1181
1389	- - - -	1378
1449	- - - -	1454
1758	1748	1754
2946	- - - -	2942
2993	- - - -	2992
- - - -	3657	3652
- - - -	3738	3747
- - - -	3847	3815

Tabla 3.3: Resumen de las bandas características atribuidas a los andamios compuestos de PLA-NTCMP.

3.3.2.2. Espectroscopia Raman

Con la técnica de caracterización “Espectroscopia Raman”, se puede encontrar el espectro correspondiente a los enlaces químicos que conforman al material, además gracias al microscopio Raman empleado como instrumento en la técnica se puede obtener una imagen perteneciente al espectro que nos arroja la espectroscopia, logrando apreciar la estructura de la muestra. En general la mayoría, pero no todos los modos vibracionales de una molécula son activos en Raman, ya que depende de la simetría que ésta posee. Por lo tanto, si se requiere obtener la máxima cantidad de información de una molécula, debe utilizarse ambos tipos de espectroscopía FTIR y Raman.[53] De esta manera, para complementar los resultados, se realizó el análisis por Espectroscopia Raman al andamio fabricado de PLA y muestra de NTCMP, así como al andamio compuesto de PLA-NTCMP a una concentración de 4% en nanomateriales.

En la Figura 3.31 se observa una imagen del área en donde se tomó la señal Raman para la obtención del espectro de PLA, en esta imagen se puede percibir una porción de fibra, la cual nos ayuda a obtener picos bien definidos de la señal registrada. Asimismo se muestra también el espectro Raman correspondiente al andamio de PLA, el cual presentó una amplia gama de intensidades equivalentes a picos característicos de dicho polímero. En este espectro se observó algunas líneas agudas que están relacionadas con la presencia de dominios cristalinos en la muestra; mientras que las líneas anchas corresponden a la

fase amorfa del material, dicha información sugiere que el material de la muestra es semicristalino.

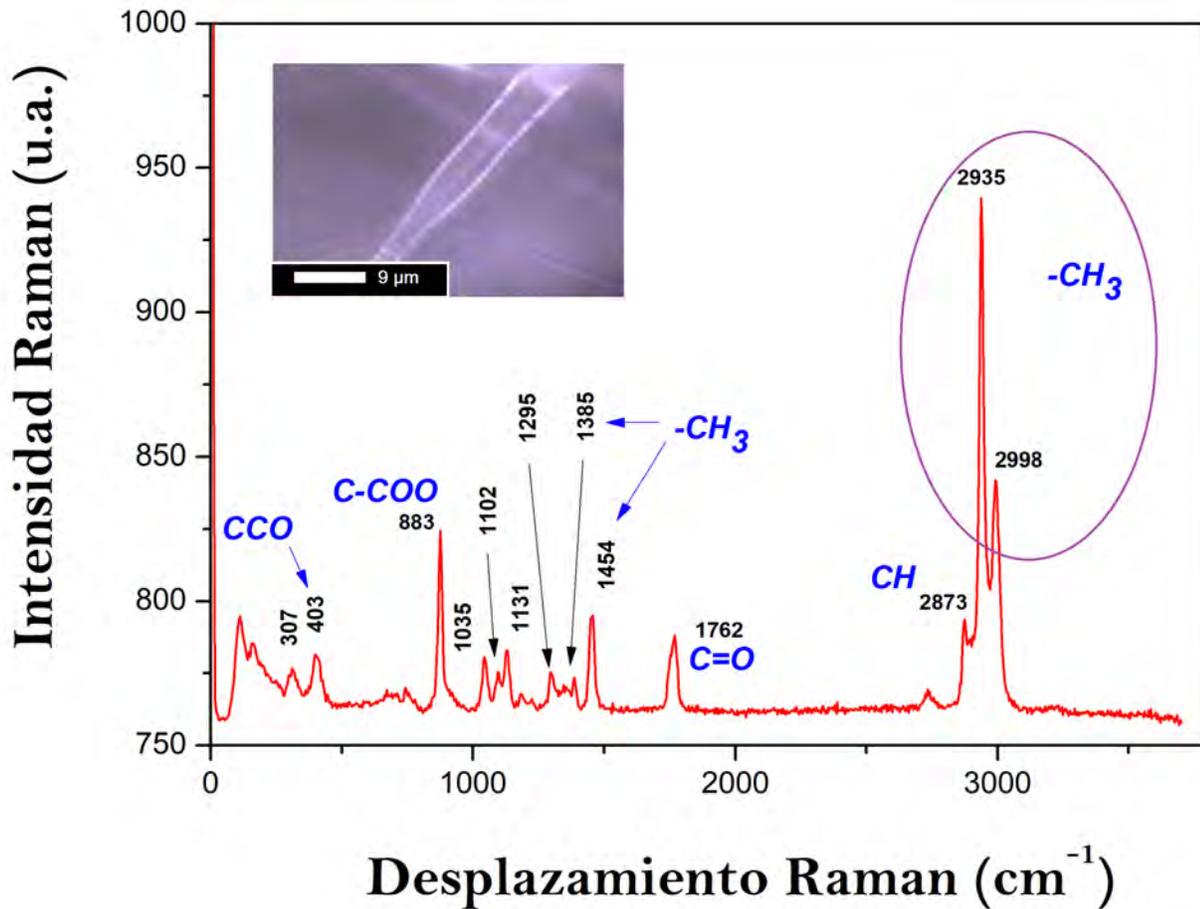


Figura 3.31: Imagen y espectro de la señal Raman correspondiente al andamio de PLA.

Desplazamiento Raman (cm^{-1}) experimental	Desplazamiento Raman (cm^{-1}) teórico	Bandas Raman
307	306	Deformación $CH - CH_3$
403	410	Deformación CCO
883	871	Estiramiento $C - COO$
1035	1042	Estiramiento $C - CH_3$
1102	1094	Estiramiento simétrico COC
1131	1127	Balanceo asimétrico CH_3
1295	1295	Deformación CH
1385, 1454	1385, 1452	Deformación simétrica y asimétrica de CH_3
1762	1768	Estiramiento $C = O$
2873	2881	Estiramiento CH
2935, 2998	2945, 2998	Estiramiento simétrica y asimétrica de CH_3

Tabla 3.4: Resumen de los desplazamientos Raman y asignación de bandas características atribuidas al andamio de PLA.

En la región de bandas de estiramiento CH , $-CH_3$ ($2800-3100\text{ cm}^{-1}$) del espectro (ver Figura 3.31), se muestran líneas a 2873 , 2935 y 2998 cm^{-1} . La línea Raman asignada al modo de estiramiento del grupo carbonilo ($C=O$), se presentó en 1762 cm^{-1} , esta banda corresponde a la parte cristalina del PLA. En la región de deformaciones (flexiones) simétricas y asimétricas del grupo metilo (CH_3) y CH se encuentran las bandas a 1295 , 1385 y 1454 cm^{-1} . Los modos de estiramiento COC simétricos se observaron en 1102 cm^{-1} . La línea intensa a 883 cm^{-1} se asignó al modo de estiramiento $C-COO$. Mientras que la banda en 403 cm^{-1} se relacionó con los modos de deformación CCO ; esta línea se observó como una banda ancha característica de la parte amorfa. Finalmente, la línea ancha a 307 cm^{-1} se presentó debido a la deformación $C-CH_3$, que refleja nuevamente la parte amorfa del PLA semicristalino. En la Tabla 3.4, se presenta a detalle la posición y asignación de bandas vibracionales del espectro Raman del PLA de acuerdo con las referencias [71][81].

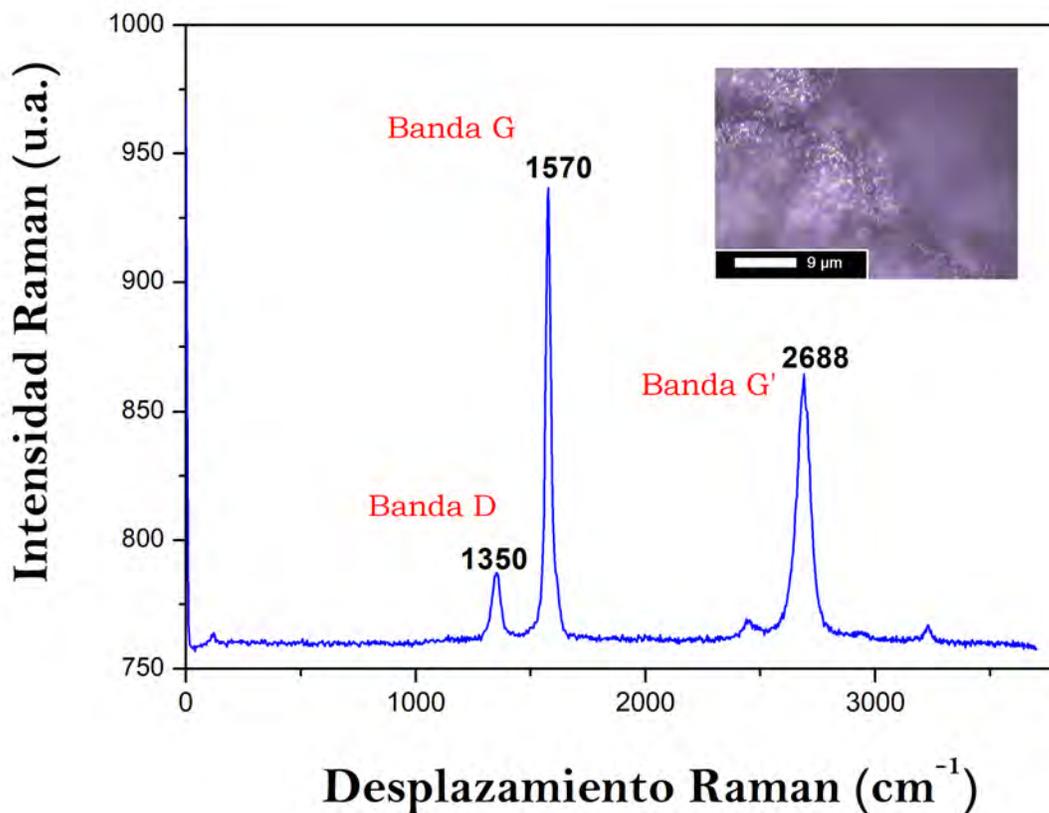


Figura 3.32: Imagen y espectro de la señal Raman correspondiente a la muestra de NTCMP.

Desplazamiento Raman (cm^{-1}) experimental	Desplazamiento Raman (cm^{-1}) teórico	Asignación Raman
1350	1300	Banda D
1570	1600	Banda G
2688	2650	Banda G'

Tabla 3.5: Resumen de los desplazamientos Raman y asignación de las bandas características de NTCMP.

Posteriormente se estudió el espectro Raman correspondiente a la muestra de NTCMP (en polvo), este espectro se presenta en la Figura 3.32, donde se logró observar tres bandas características de los NTCMP. La señal Raman ubicada en 1350 cm^{-1} es asociada a la banda D de la muestra, su presencia se debe a un proceso dispersivo en el que está involucrado un defecto que rompe con la simetría original del grafito, al comparar su intensidad se observó que es baja indicando que es poca la cantidad de impurezas de carbón en la muestra; además proporcionó la información de que la muestra empleada se trata de carbono amorfo.

En general la presencia de la banda D, indicó que el nanomaterial empleado tiene la característica de que su pared es múltiple, corroborando la información mencionada al comienzo del escrito. Por otro lado, la banda G o los modos tangenciales (TMs), se presentaron en 1570 cm^{-1} , los cuales provienen de vibraciones dentro de plano de las láminas de grafito, que dan modos activos en Raman, por lo tanto, indica los movimientos de los átomos de carbono perpendiculares a la dirección radial de los NTCMP. Además debido a su alta intensidad que presentó se asocia a una vibración fundamental en primer orden de los NTCMP. Por último la banda G', ubicada en 2650 cm^{-1} , es considerada un armónico de segundo orden de la banda D. En la Tabla 3.5, se presenta a detalle la posición y asignación de bandas vibracionales del espectro Raman de los NTCMP.[82]

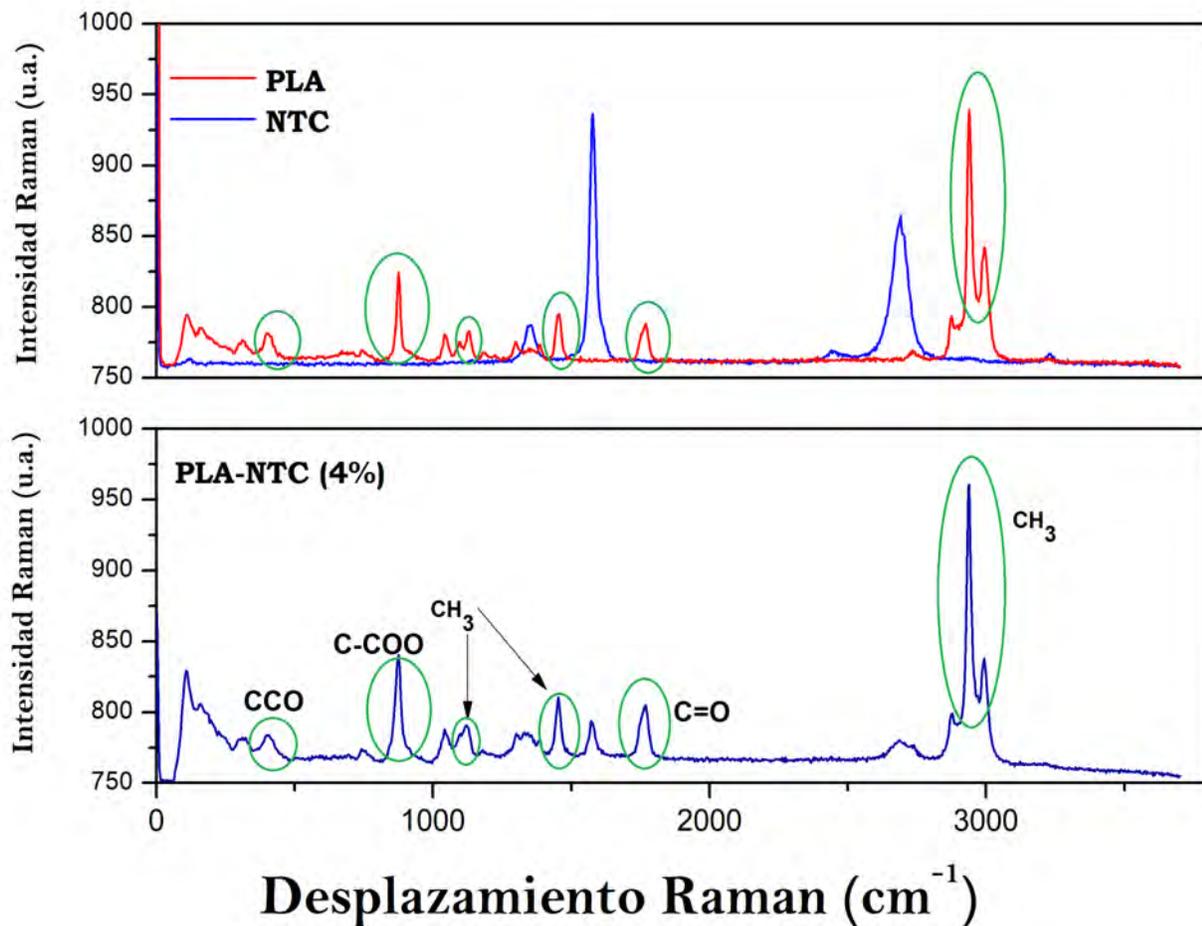


Figura 3.33: Comparación entre las señales de los espectros Raman correspondientes a los andamios PLA y PLA-NTCMP (4%).

En el último análisis mediante espectroscopía Raman, se estudió el andamio compuesto de PLA-NTCMP al 4% (porcentaje de concentración en NTCMP), examinando los resultados a través de una

adecuada comparación entre las señales de los materiales empleados, en este caso del PLA y los NTCMP. Por lo tanto, la primera comparación se realizó con el espectro de PLA (ver Figura 3.33) donde se señaló con círculos las bandas vibracionales correspondientes al andamio de PLA. En este espectro se logró visualizar la presencia de la región de bandas de estiramiento para CH y CH_3 alrededor de $2800-3100\text{ cm}^{-1}$, además de la región de deformaciones simétricas y asimétricas de CH_3 encontradas a 1131 y 1454 cm^{-1} .

También se puede observar una banda principal del PLA que indica su parte cristalina, asignada al modo de estiramiento $C=O$, la cual se presentó alrededor de 1762 cm^{-1} . Asimismo se encontró la presencia del modo de estiramiento $C-COO$ como una línea intensa en 883 cm^{-1} , e incluso se percibió la existencia de bandas a 403 cm^{-1} y 307 cm^{-1} atribuidas a los modos de deformación CCO y $C-CH_3$, respectivamente, indicando la parte amorfa del PLA semicristalino.

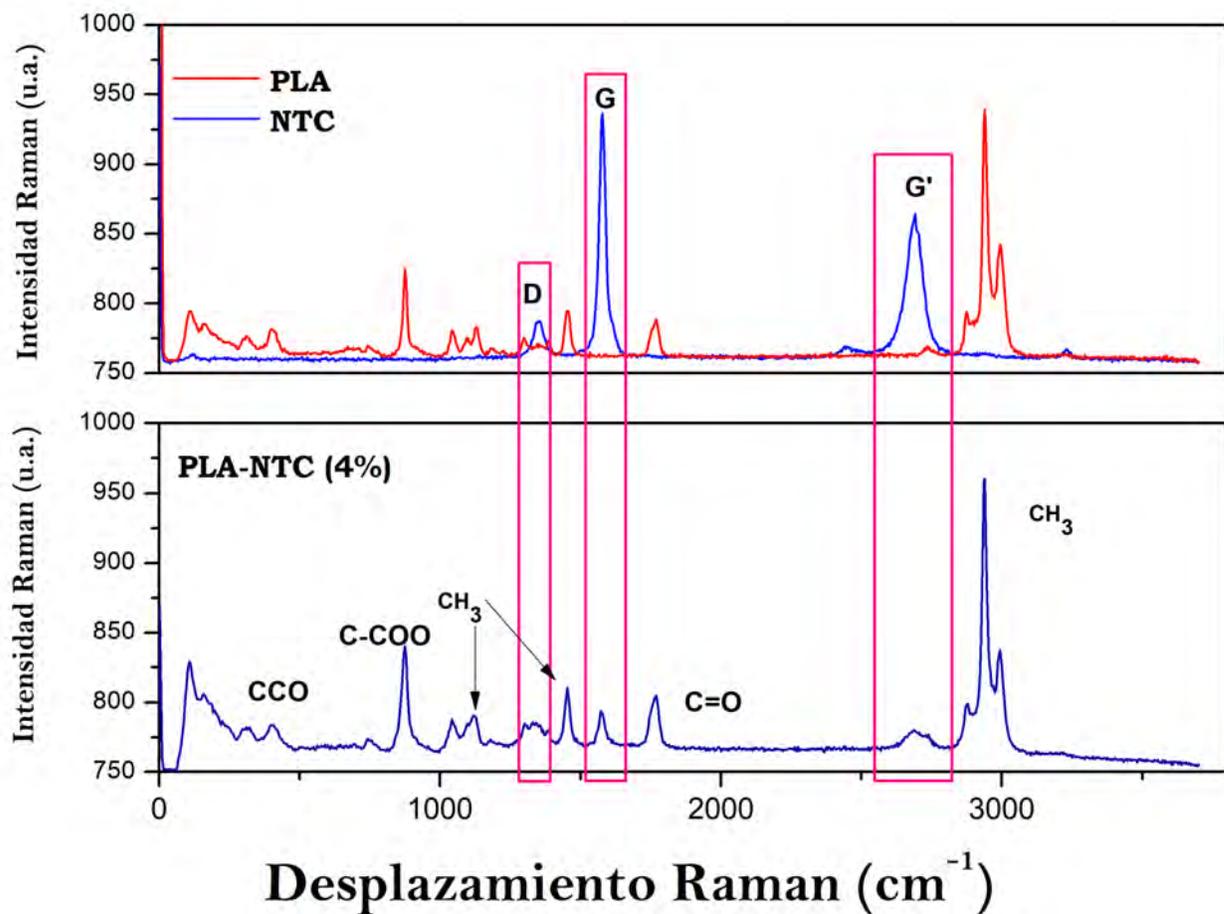


Figura 3.34: Comparación entre las señales de los espectros Raman correspondientes a los NTCMP y al andamio de PLA-NTCMP (4%).

Por último, se realizó la comparación con el espectro Raman de los NTCMP como se muestra en la Figura 3.34, encontrando favorablemente las tres bandas principales asociadas a dichos nanomateriales, las cuales proporcionan de manera general que los NTCMP empleados contienen una cantidad pequeña de impurezas, además de poseer múltiples paredes. Sin embargo es importante subrayar que la proporción en intensidad de estas señales disminuye bastante, posiblemente a la cantidad de concentración de los

NTCMP en comparación con la cantidad de polímero que se utilizó.

3.3.2.3. Difracción de Rayos X (DRX)

Para confirmar los resultados estructurales que se obtuvieron por Espectroscopía Raman, relacionados con la cristalinidad o el carácter amorfo de los materiales, los andamios de PLA y PLA-NTCMP a diferentes concentraciones de nanomateriales fueron analizadas por DRX.

En el patrón de difracción referente al andamio de PLA (ver Figura 3.35), se encontró la presencia de un máximo en $2\theta=13.7^\circ$ asociado a la reflexión del plano (103), que coinciden con alguna de las reflexiones de la fase pseudo-ortorrómbica. En 1968, D. Sntis y Kovacs, reportaron una estructura cristalina pseudo-ortorrómbica para el PLA adoptando una conformación helicoidal y hasta ahora se ha sugerido este tipo de conformación, incluso si los patrones de difracción observados presentan reflexiones adicionales que no se ajusten completamente a la forma pura del PLA.[83] Este máximo en $2\theta=13.7^\circ$ corresponde a un pico característico del PLA, que es asociado al espacio interplanar 5.9 Å (resultado obtenido empleando la Ley de Bragg), y que además indica que se trata de un material semicristalino, a pesar de que la parte amorfa predomina en el material ya que el pico observado en el patrón de difracción es muy ancho, por lo tanto se concluye que existe la presencia de algunos dominios cristalinos en la muestra que logran cristalizar en dicha fase.

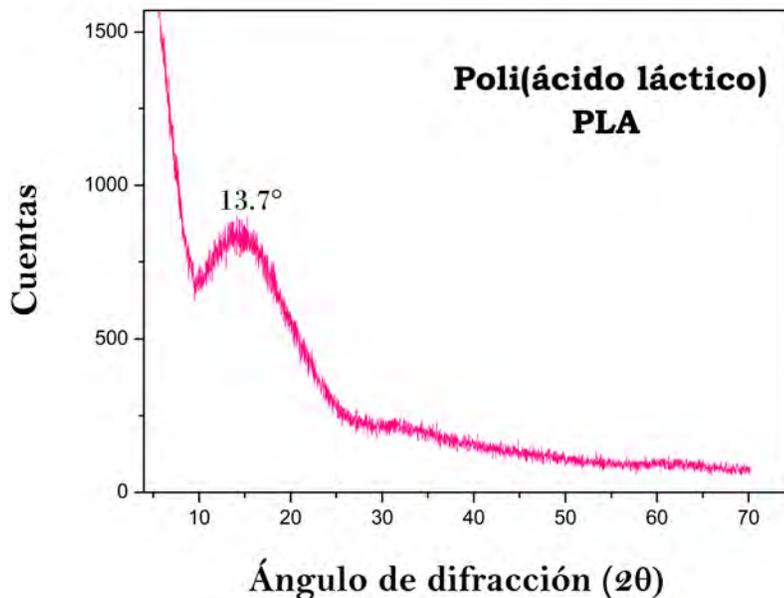


Figura 3.35: Patrón de difracción WAXD del andamio de PLA.

A continuación, se presenta el análisis de los difractogramas obtenidos al adicionar cada una de las concentraciones señaladas de NTCMP (ver Figura 3.36), examinando las posibles interacciones con el polímero durante el proceso de Electrohilado.

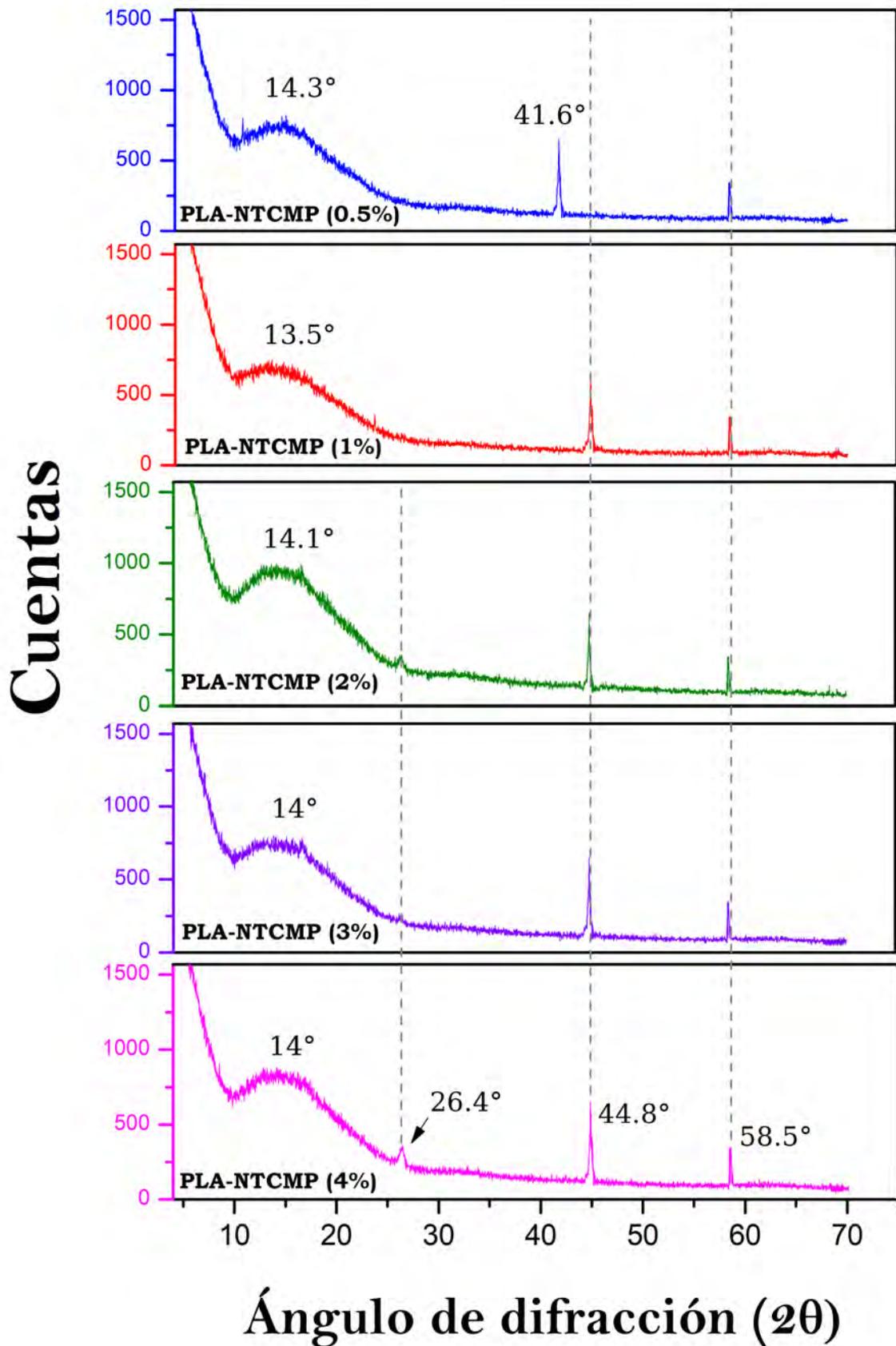


Figura 3.36: Patrones de difracción de los andamios compuestos PLA-NTCMP a las diferentes concentraciones manejadas de NTCMP.

En cada uno de los patrones de difracción que se muestran en Figura 3.36, se logró apreciar nuevamente la parte semicristalina del polímero PLA alrededor de $2\theta=13.5-14.3^\circ$, que confirma la estructura pseudo-ortorrómbica adoptada por las porciones cristalinas del PLA, aun que predomine la parte amorfa. Además, en estos patrones, se encontró la presencia de los picos característicos del grafito ubicados en $2\theta=44.8^\circ$ y $2\theta=58.5^\circ$ los cuales nos indica que los nanotubos empleados en la fabricación son de pared múltiple. En general, se observó que con las concentraciones de 1-4 %, las señales asociadas a los NTCMP no presentan alguna modificación significativa, sin embargo en el andamio de PLA-NTCMP con 0.5 % de nanomateriales, se aprecia un desplazamiento negativo a $2\theta=41.6^\circ$, resultado que sugiere que las interacciones intermoleculares entre el PLA y los NTCMP, provocan mayor desorden molecular debido a la fuerte interacción del polímero. Por último, en los andamios con 2 % y 4 % se encontró pequeños picos alrededor de $2\theta=26.4^\circ$, su presencia en el modelo de difracción indica nuevamente la cristalinidad del polímero y corresponde al plano (306) que forma parte de la estructura pseudo-ortorrómbica del PLA.

3.3.3. Análisis térmico

3.3.3.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)

A fin de analizar las modificaciones en las propiedades térmicas de los andamios, se realizó una evaluación del comportamiento térmico en dichos andamios mediante el uso de CDB, con el propósito de conocer los cambios producidos debido a la procesabilidad de éstos, durante la fabricación de fibras. Por lo tanto, se discutirán los comportamientos dinámicos de fusión y cristalización de los andamios compuestos de PLA y PLA-NTCMP, en este análisis se empleó un ciclo que consta de un calentamiento, enfriamiento y calentamiento, el cual se especifica en la metodología.

Primer calentamiento:

En la Figura 3.37 se muestra el termograma del primer calentamiento del andamio de PLA; se observó una temperatura de fusión (T_f) característica de 169.5°C . Lim et al., en 2008, reportaron que la T_f del PLA está en función de su pureza óptica; sin embargo los valores típicos de T_f para el PLA se encuentran en el intervalo de $160-170^\circ\text{C}$. [84] Por otra parte, el termograma muestra una señal exotérmica en 90.5°C , correspondiente a la temperatura de cristalización (T_c), ocurrida durante el ciclo de calentamiento, que se atribuye a la lenta velocidad de cristalización del PLA. [85], [3]

Algo similar sucede con el análisis térmico que se muestra en la Figura 3.38 con respecto a los andamios de PLA-NTCMP, utilizando diferentes concentraciones de NTCMP, dichos termogramas de calentamiento se observan realizando una comparación con las transiciones térmicas mostradas por el PLA. En la tabla 3.6 se presentan los valores de T_f y T_c , registrados por los andamios de PLA-NTCMP. En estos termogramas (ver Figura 3.38), se logró apreciar que con las concentraciones manejadas a 0.5 % y 1 % de NTCMP, las fibras presentan una T_c que sufre un desplazamiento positivo alrededor de $4-6^\circ\text{C}$, mientras que los análisis con las concentraciones de 2 %, 3 % y 4 % el desplazamiento que sufren no es significativo en comparación con la T_c encontrada en el andamio de PLA; por lo tanto se observó que debido a la incorporación de NTCMP, con un incremento de concentración en cada andamio, la T_c del PLA prácticamente no sufre cambios. Los desplazamientos presentados en este tipo de temperatura se encuentran relacionados a la diferencia en la movilidad de las cadenas y su capacidad para formar cristales. [85], [86] En cuanto a la comparación de la T_f observada en cada uno de los cinco diagramas térmicos, no se encuentra la presencia de un cambio significativo que pueda ser asociado a la interacción del polímero con los NTCMP, presentándose así las T_f en el intervalo de $168.6-169.3^\circ$. Sin embargo, algo importante a resaltar en la observación de las Figuras 3.37 y 3.38 es la presencia de señales distorsionadas en el intervalo de $0-80^\circ\text{C}$, debido a que es la primer corrida de calentamiento, y la muestra tiene una historia térmica, en la que si se pone al material muy cerca de su punto de fusión o cristalización, de repente sufre cambios bruscos de

energía debido a la constante organización de las moléculas en la muestra antes de fundir, adicionalmente si la muestra posee agua o residuos de solventes también puede presentarse este tipo de comportamiento relacionado con la volatilidad.

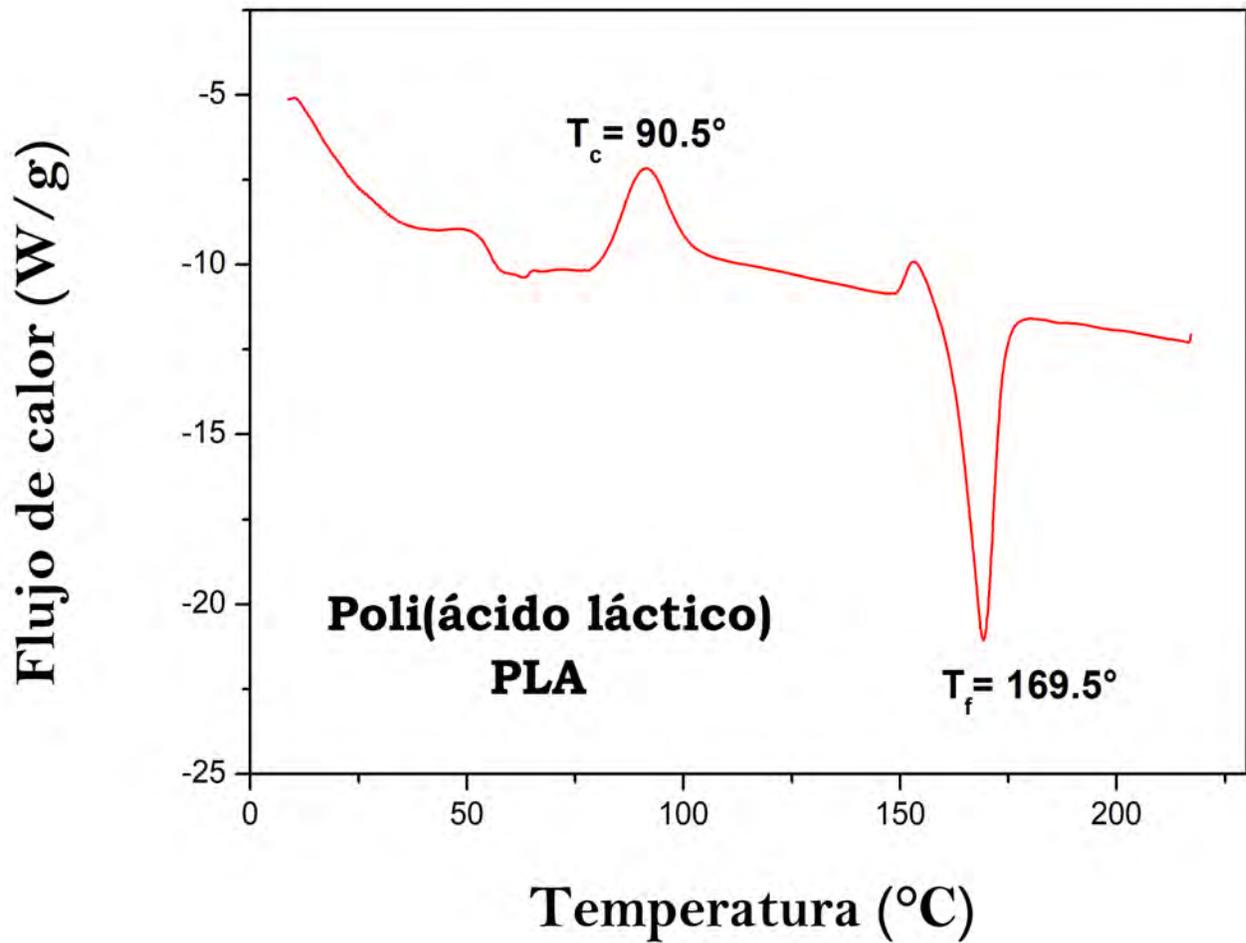


Figura 3.37: Termograma del primer calentamiento, mostrando las temperaturas de T_f y T_c del andamio de PLA.

Muestra	Temperatura de fusión T_f (°C)	Temperatura de cristalización T_c (°C)
PLA	169.3	95
PLA-NTCMP (0.5 %)	169.5	90.5
PLA-NTCMP (1 %)	169.3	96.5
PLA-NTCMP (2 %)	169.4	91.9
PLA-NTCMP (3 %)	168.5	91.8
PLA-NTCMP (4 %)	168.6	91.8

Tabla 3.6: Transiciones térmicas de los andamios PLA-NTCMP en el primer calentamiento.

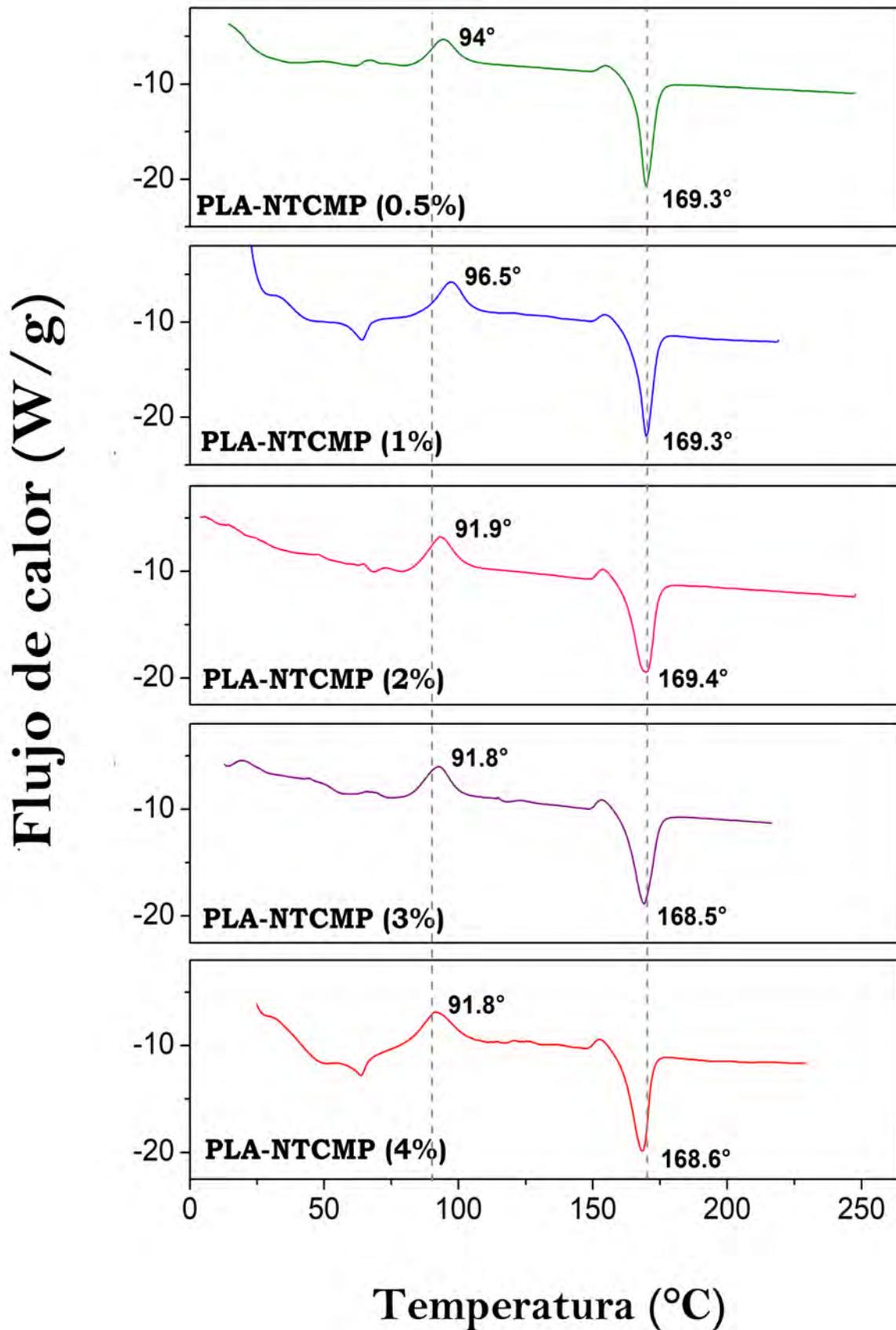


Figura 3.38: Comparación entre los termogramas del primer calentamiento, correspondientes a los andamios compuestos de PLA-NTCMP.

Enfriamiento:

El termograma que se muestra en la Figura 3.39, corresponde a la curva de enfriamiento del andamio de PLA, donde se logró apreciar que el material tiene una T_c de 97.9 °C, al realizar la comparación con la primer T_c de la Figura 3.37 se registró un aumento en la temperatura, lo que indica que en la segunda corrida se facilitó en cierto grado la formación de zonas cristalinas, evidenciando que se requiere una mayor temperatura para llevar a cabo esta nucleación.[86]

Por otra parte, se realizó la comparación entre los termogramas de los andamios compuestos de PLA-NTCMP (ver Figura 3.41), donde se encontró que con las concentraciones de NTCMP de 0.5-3% se presenta una T_c alrededor de 114.2-115.8 °C, la cual se percibe que sufre un desplazamiento positivo de 17-20 °C a comparación de la encontrada en Figura 3.39. Mientras tanto, en el termograma del andamio con 4% de NTCMP, se presentó una T_c de 99 °C cercana a la que presentó el andamio de PLA.

Por lo tanto, el aumento que presenta la T_c en algunos andamios, indica que la incorporación de NTCMP, facilitó la formación de zonas cristalinas, necesitando una mayor temperatura para llevar a cabo el proceso, sin embargo a una concentración de 4% los NTCMP prácticamente saturan a las fibras y se comportan como si sólo el material fuera PLA. En la Tabla 3.7 se describen los valores asignados a la T_c en los andamios de PLA-NTCMP.

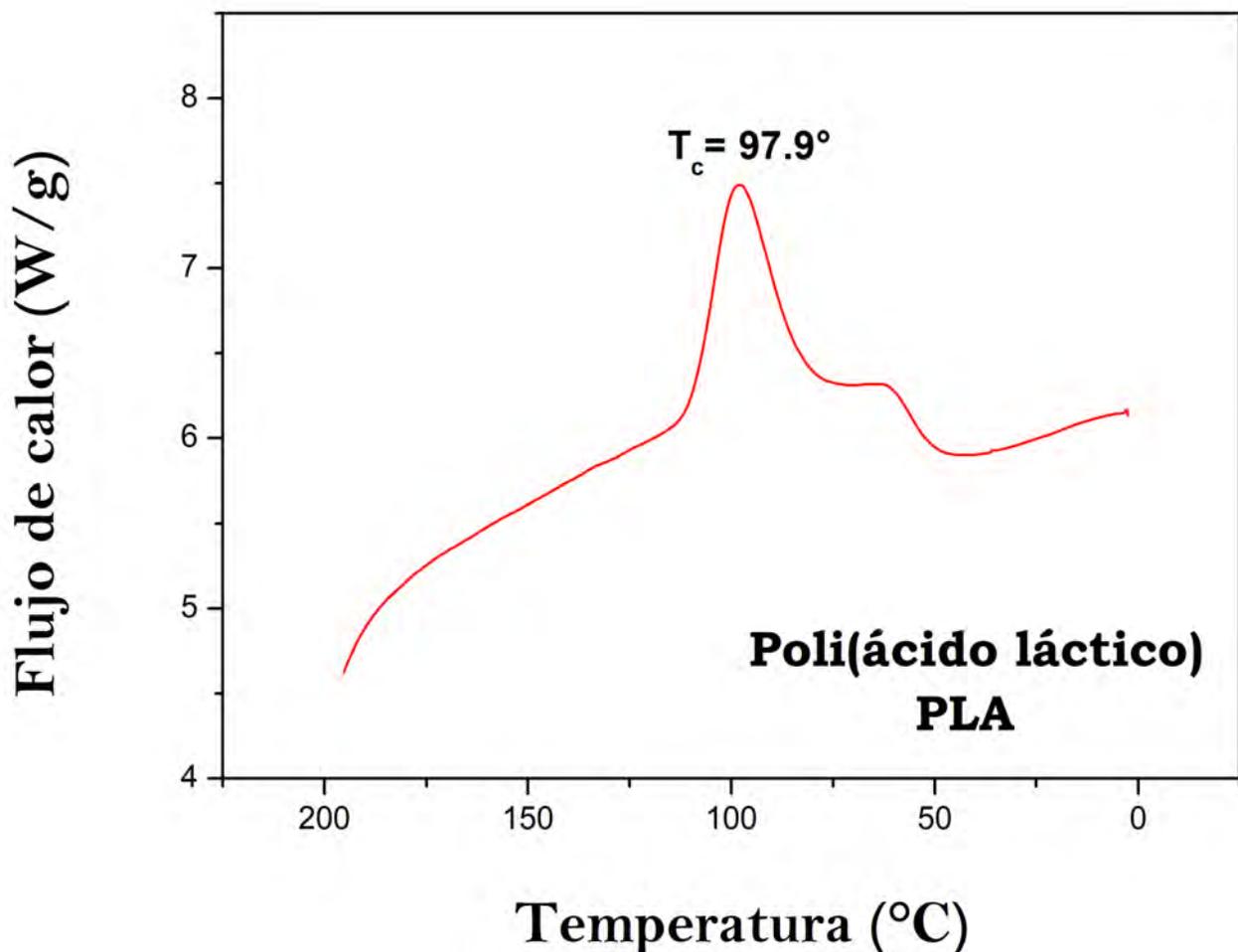


Figura 3.39: Termograma de enfriamiento, mostrando la T_c del andamio de PLA.

Muestra	Temperatura de cristalización T_c (°C)
PLA	97.9
PLA-NTCMP (0.5 %)	114.2
PLA-NTCMP (1 %)	114.4
PLA-NTCMP (2 %)	115.4
PLA-NTCMP (3 %)	115.8
PLA-NTCMP (4 %)	99

Tabla 3.7: Temperatura de cristalización en los andamios PLA-NTCMP durante el ciclo de enfriamiento.

Segundo calentamiento:

El comportamiento térmico del andamio de PLA en su segundo calentamiento, se muestra en el termograma de la Figura 3.40. En este tercer ciclo, se observó una T_c de 97 °C y una T_f de 169.5 °C, ambas temperaturas no presentaron cambios significativos en la fusión y cristalización del PLA. Mientras tanto, en el análisis realizado a los andamios de PLA-NTCMP (ver Figura 3.42), solamente se encontró temperaturas de fusión alrededor del intervalo 164.6-171.4 °C; en los termogramas con 0.5 %, 1 %, 2 %, 3 % de NTCMP, se observó una T_f doble, una que es la relacionada con el polímero de PLA (en 169.5 °C) y otra que presenta un desplazamiento negativo aproximadamente de 3 °C. Con respecto a la ausencia de T_c , se dice que los NTCMP ya no aportan la temperatura suficiente para formar zonas cristalinas en la tercera corrida.

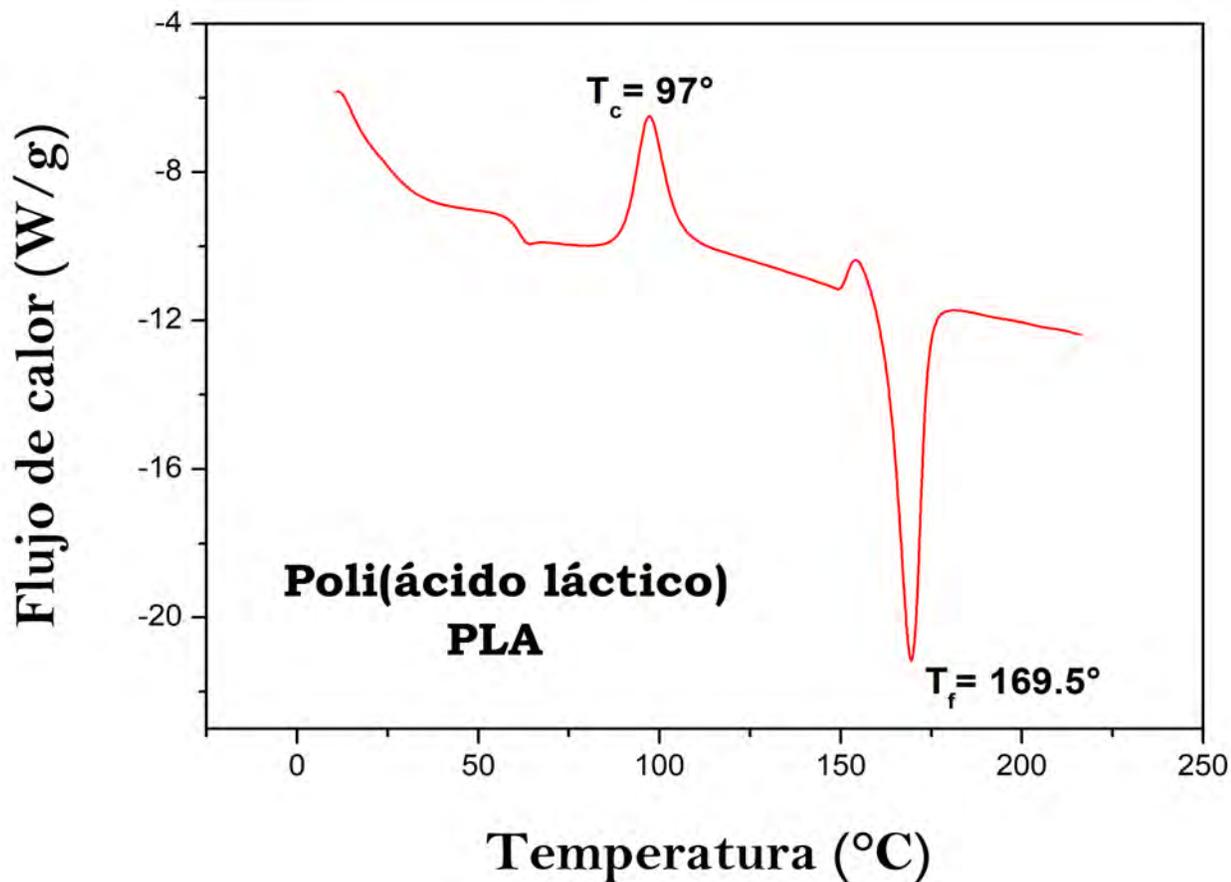


Figura 3.40: Termograma del segundo calentamiento, mostrando las temperaturas de T_f y T_c del andamio de PLA.

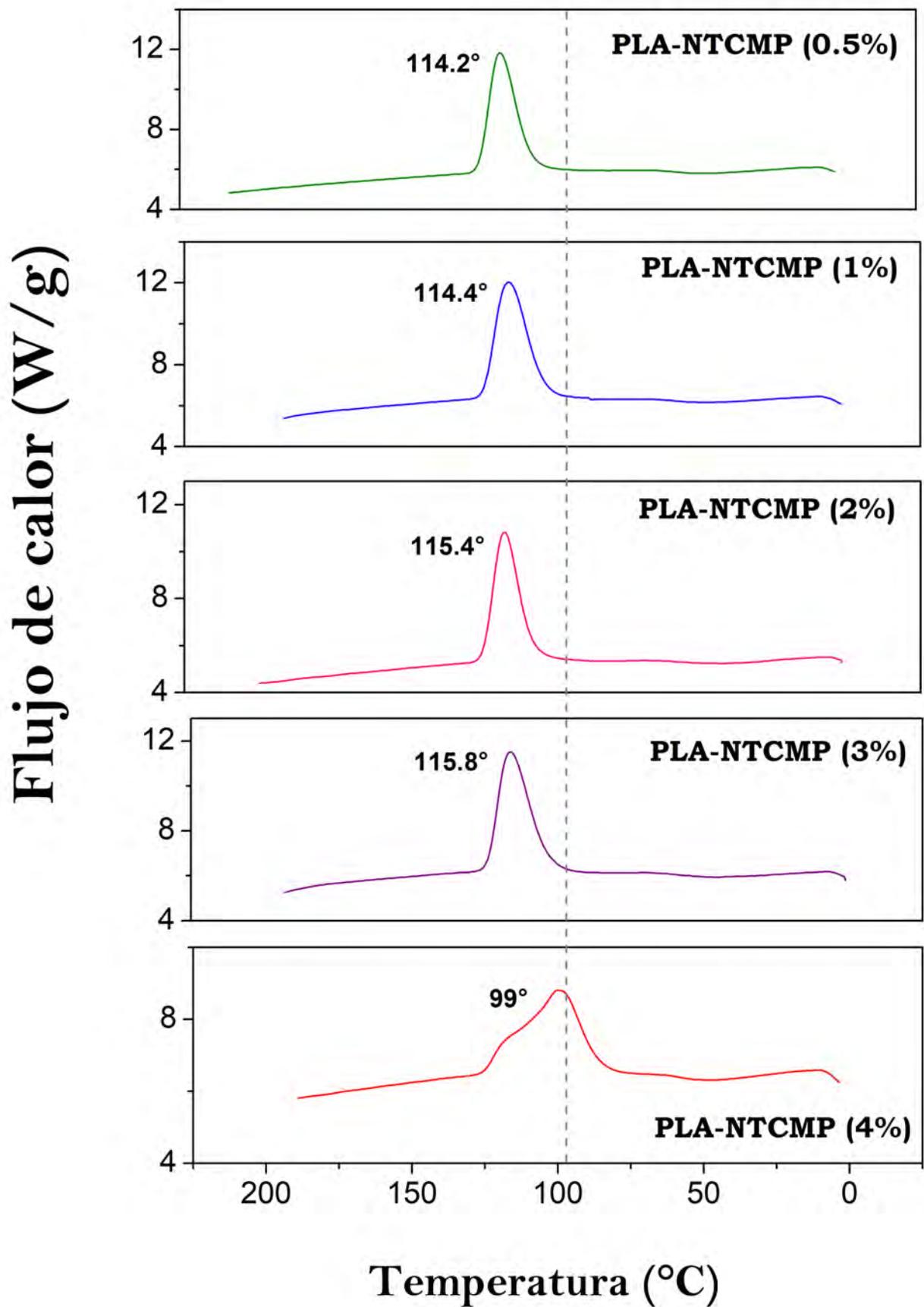


Figura 3.41: Comparación entre los termogramas de enfriamiento, correspondientes a los andamios compuestos de PLA-NTCMP.

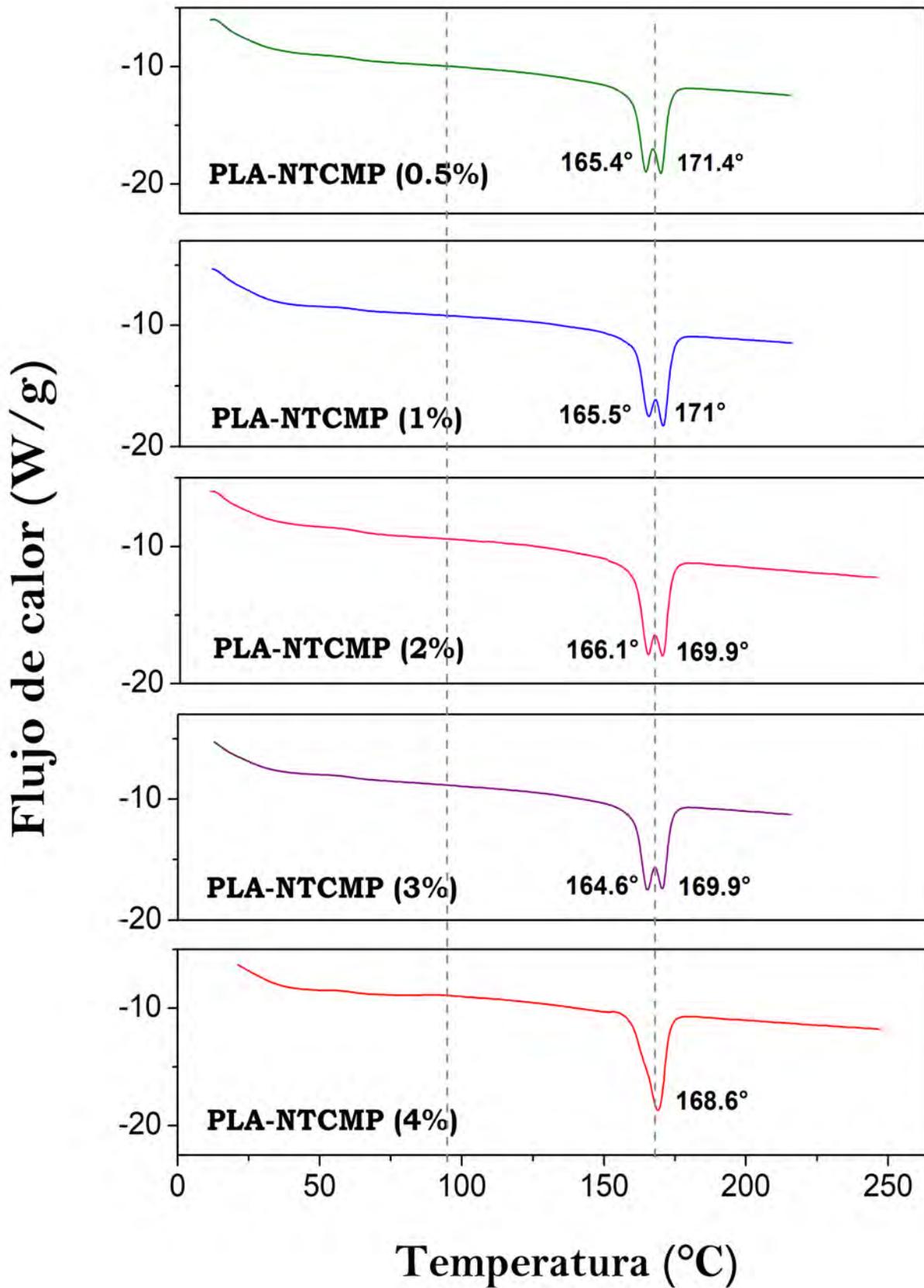


Figura 3.42: Comparación entre los termogramas del segundo calentamiento, correspondientes a los andamios compuestos de PLA-NTCMP.

En el termograma del andamio con 4% de NTCMP sólo se observó una T_f en 168.6 °C, temperatura observada en el primer ciclo de calentamiento correspondiente al andamio de PLA. En la tabla 3.8 se presentan los valores de T_f y T_c , registrados por los andamios de PLA-NTCMP. Cabe señalar que en este tipo de muestras con NTCMP a ciertas concentraciones, se observaron dos señales de fusión, atribuidas a la existencia de dos tipos de fase cristalina en la muestra.[87] Sin embargo se aprecia nuevamente que con 4% de NTC, el comportamiento térmico del andamio, es similar al caso del andamio de PLA.

Muestra	Temperatura de fusión T_f (°C)	Temperatura de cristalización T_c (°C)
PLA	169.5	97
PLA-NTCMP (0.5 %)	165.4, 171.4	- - -
PLA-NTCMP (1 %)	165.4, 171	- - -
PLA-NTCMP (2 %)	166.1, 169.9	- - -
PLA-NTCMP (3 %)	164.6, 169.9	- - -
PLA-NTCMP (4 %)	168.6	- - -

Tabla 3.8: Transiciones térmicas de los andamios PLA-NTCMP en el segundo calentamiento.

3.3.4. Pruebas mecánicas

El comportamiento mecánico que presenta un material, es el reflejo de la relación entre su respuesta o deformación ante una fuerza aplicada, el cual puede variar de acuerdo con diferentes parámetros, como la cristalinidad, estructura del polímero, peso molecular e incluso la incorporación de otros materiales. Por lo tanto, la importancia en la medición de propiedades mecánicas, radica en las aplicaciones a la que este enfocado el material.[3] En ese sentido mediante una prueba mecánica, se midieron algunas propiedades como el módulo elástico, fluencia y el máximo esfuerzo, en los andamios electrohilados de PLA y PLA-NTCMP, para comprobar que la incorporación de los NTCMP provoca un incremento en las propiedades mecánicas de las fibras.

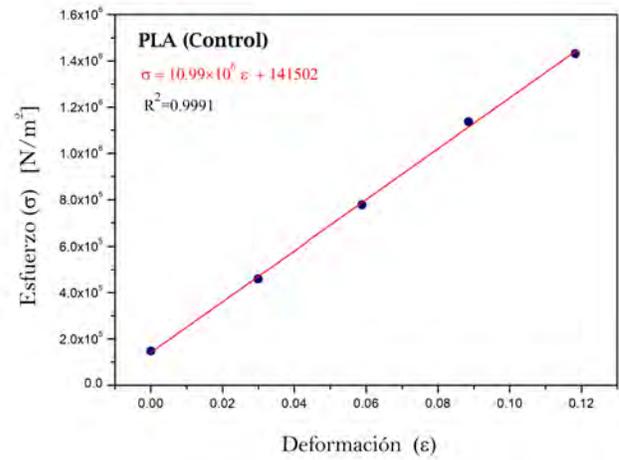
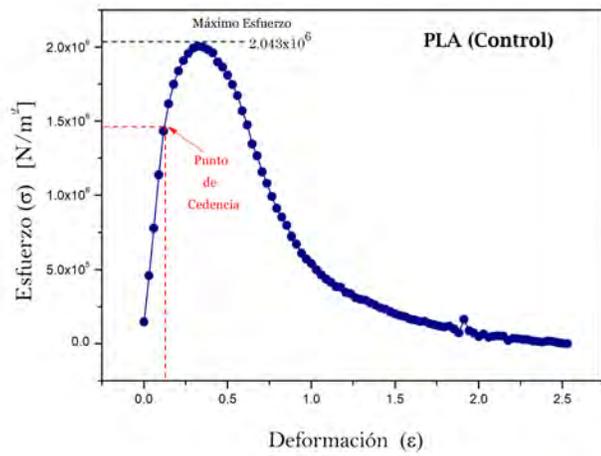
Módulo de Young:

Las Figuras 3.43 y 3.44, muestran las curvas de esfuerzo-deformación y la parte lineal asociada a la región elástica de los andamios de PLA y PLA-NTCMP, donde se observó que la incorporación de NTCMP, produjo un incremento en el módulo de Young en las muestras con 0.5 %, 1 %, 2 %, 3 %, comparadas con el andamio de PLA, como se esperaba gracias a las excelentes propiedades mecánicas que poseen los NTCMP.

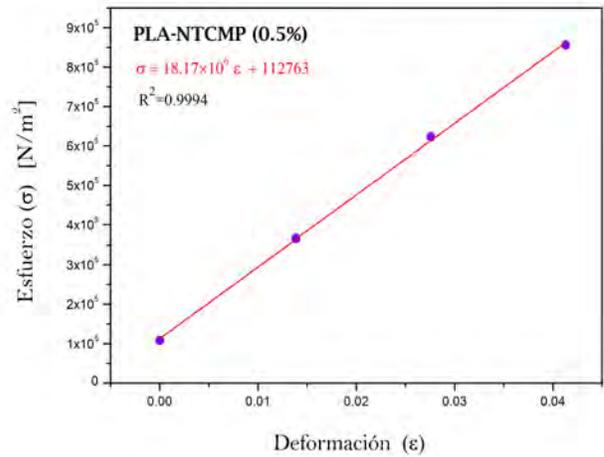
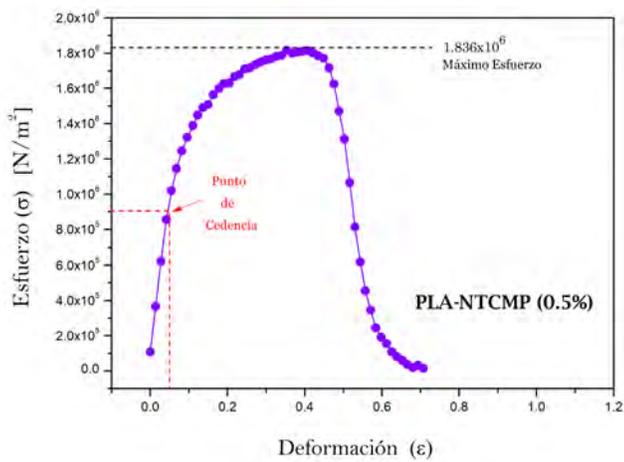
Por otro lado, la muestra con la adición al 4% de NTCMP, disminuyó su módulo de Young, en comparación con el andamio de 3%, registrando un decremento del 74%, cambiando de 74.89 MPa a 19.74 MPa, (ver Figura 3.45). Este resultado es evidencia de que se obtuvo un material con una menor rigidez y por tanto, una mayor capacidad de deformación; ésto debido a la concentración tan alta de NTCMP, que complicaba el proceso de electrohilado, por lo que se optó en filtrar varias veces, procedimiento en el cual se perdía parte de la concentración, llegando a un porcentaje menor. Sin embargo en comparación con el andamio de PLA, se sigue apreciando que esta propiedad mecánica aumenta con la incorporación de NTCMP. En la Tabla 3.9, se presentan los valores del módulo elástico, obtenidos para las muestras de los andamios electrohilados.

Cedencia:

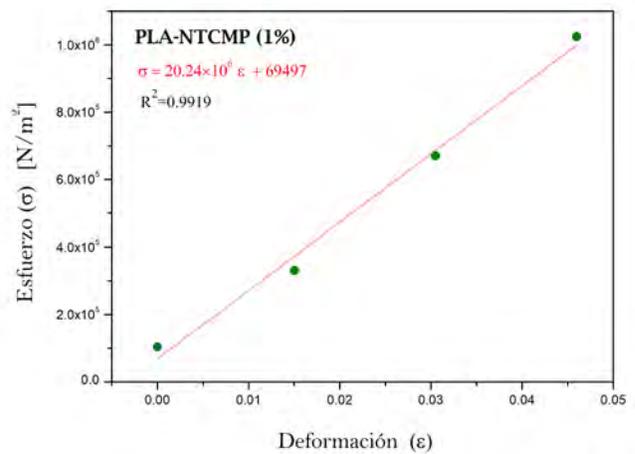
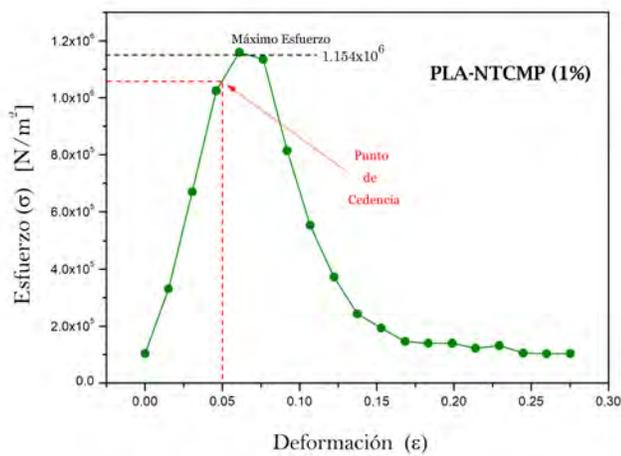
El término fluencia o cedencia se utiliza frecuentemente para describir un retardo en la respuesta a una tensión o deformación aplicada.[3]



(a)

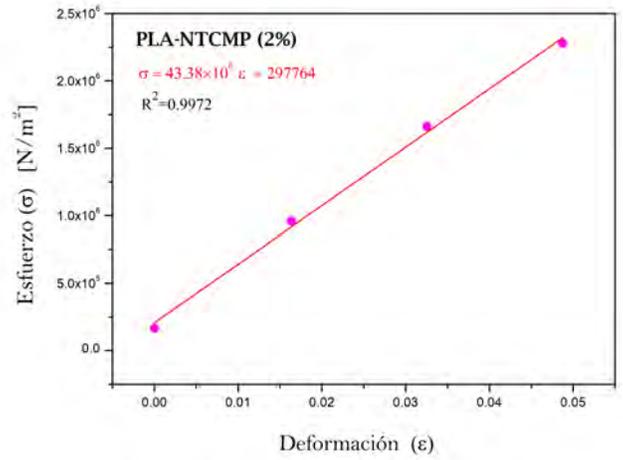
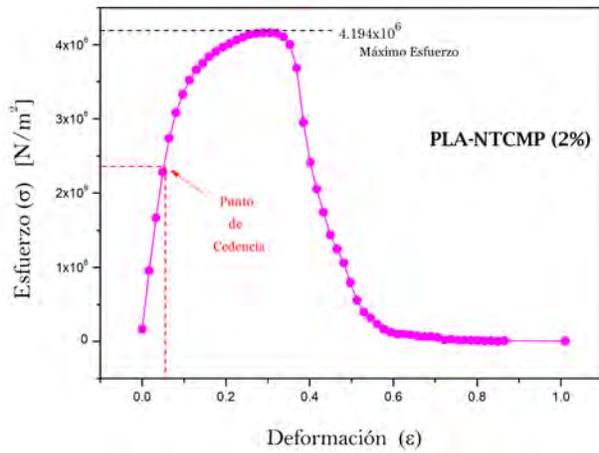


(b)

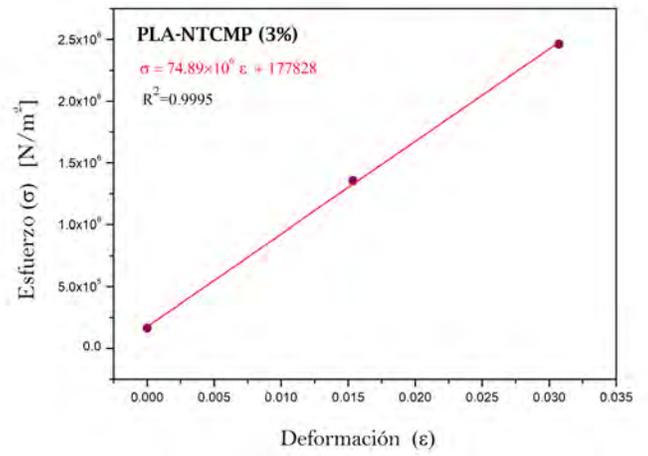
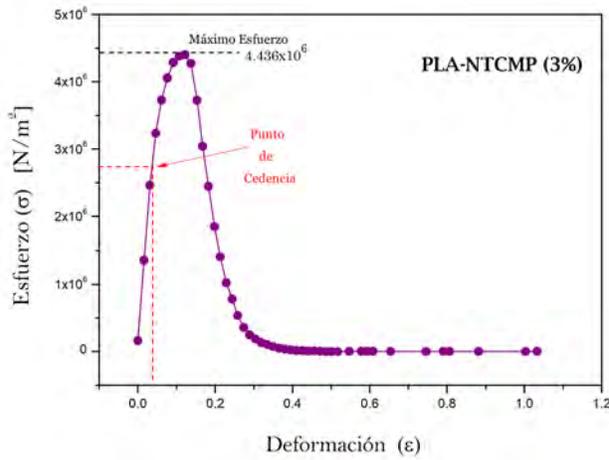


(c)

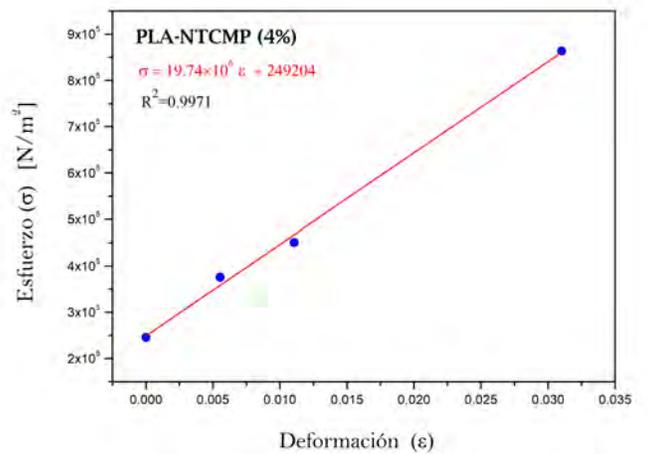
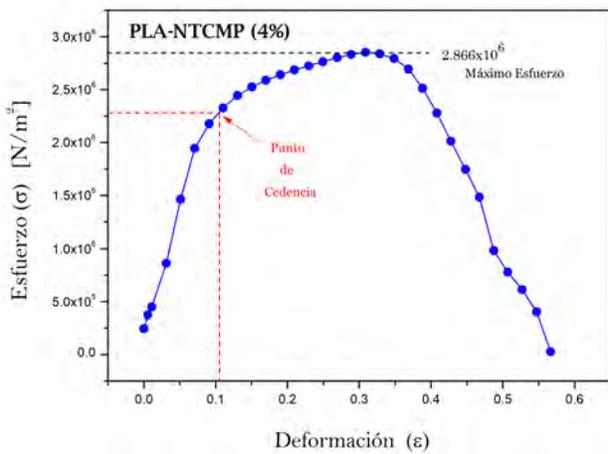
Figura 3.43: Curvas de esfuerzo-deformación correspondientes a la evaluación mecánica de los andamios electrohilados; a) PLA, b) PLA-NTCMP (0.5%), c) PLA-NTCMP (1%).



(a)



(b)



(c)

Figura 3.44: Curvas de esfuerzo-deformación correspondientes a la evaluación mecánica de los andamios electrohilados; a)PLA-NTCMP (2%), b)PLA-NTCMP (3%), c)PLA-NTCMP (4%).

Para la obtención de la fluencia, se trazó una línea paralela a la parte lineal del diagrama de esfuerzo-deformación, desplazada 0.002 de deformación; de esta manera se realizaron mediciones para identificar el punto de intersección, en el cual los materiales se encuentran en la región de transición de zona elástica a zona plástica, recordemos que esto sucede por el deslizamiento que tiene las moléculas unas sobre otras dentro de los materiales, en donde una vez que las moléculas se han desplazado ya no pueden recuperar su posición original, a lo que se conoce como deformación irreversible.[6] Los resultados que se obtuvieron al medir esta propiedad se describen en la Tabla 3.9 y son señalados en los diagramas de esfuerzo-deformación de las Figuras 3.43 y 3.44; donde se observó que el andamio con 3% es el que presenta un mayor punto de cedencia a 2.748 MPa con la menor deformación (0.037), sin embargo el andamio con 0.5% de NTCMP mostró el punto más bajo en cedencia con 0.912 MPa y una deformación de 0.046, e incluso esta cedencia es inferior a la del andamio de PLA, (ver Figura 3.45).

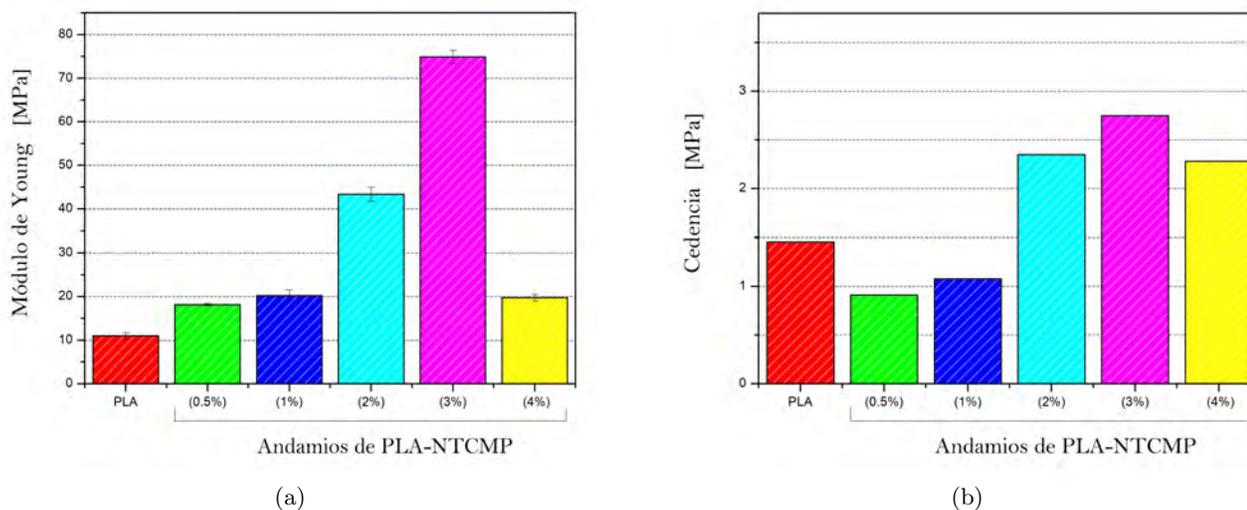


Figura 3.45: Diagramas de comparación entre los andamios, con los resultados obtenidos para; a)El módulo de Young, y b)Punto de Cedencia, ambos con $n=5$.

Máximo esfuerzo:

Una vez que un material alcanza la zona de cedencia en una prueba mecánica, éste sigue deformándose hasta la zona de máximo esfuerzo o tensión de rotura, cuando llega a este punto el material en forma de probeta se considera fracturado. De esta manera la tensión de rotura es el punto máximo en el diagrama de esfuerzo-deformación, obtenido conforme a los datos registrados en la prueba mecánica.

Por lo tanto para obtener la tensión de rotura presente en los andamios electrohilados de PLA y PLA-NTCMP, se observó los diagramas de esfuerzo-deformación de las Figuras 3.43 y 3.44, los cuales muestran un máximo sobre la curva. La adquisición de resultados se llevó a cabo, midiendo 10 veces el máximo para obtener un promedio de la ubicación aproximada de la tensión de rotura. En la Tabla 3.9, se presentan los valores obtenidos del máximo esfuerzo correspondiente a los andamios en cuestión; con estos resultados se observó que el andamio que presenta una mayor tensión de rotura pertenece al de 3% en concentración de NTCMP, e incluso éste duplica el valor que muestra el andamio de PLA, y quien presentó un valor menor fue el andamio con 1%. Mientras tanto, en el andamio con 4% de NTCMP el cambio que se observó no es significativo, por lo que se deduce que el andamio con 3% tiene un mejor comportamiento mecánico con respecto a su máximo esfuerzo, lo que se relacionaría con la presencia de una mayor resistencia.

De manera general, el andamio que presentó mejores resultados, fue con una concentración de 3% de

NTCMP, en el cual se observó el mayor módulo de Young, máximo esfuerzo y punto de cedencia; en comparación con los resultados obtenidos para el andamio de PLA. Por lo tanto al incorporar los NTCMP en las fibras de PLA se logró apreciar un incremento en las propiedades mecánicas de las fibras electrohiladas, e incluso en el andamio con 4 % de NTCMP, que presentó un módulo de Young menor.

Muestra	Módulo de Young (MPa)	Máximo esfuerzo (MPa)	Cedencia
PLA	10.993 ± 0.179	2.043 ± 0.0071	(0.122, 1.457 MPa)
PLA-NTCMP (0.5 %)	18.167 ± 0.288	1.836 ± 0.0040	(0.046, 0.912 MPa)
PLA-NTCMP (1 %)	20.241 ± 1.288	1.154 ± 0.0012	(0.052, 1.077 MPa)
PLA-NTCMP (2 %)	43.375 ± 1.617	4.194 ± 0.0180	(0.051, 2.349 MPa)
PLA-NTCMP (3 %)	74.885 ± 1.512	4.436 ± 0.0100	(0.037, 2.748 MPa)
PLA-NTCMP (4 %)	19.736 ± 0.743	2.866 ± 0.0090	(0.104, 2.282 MPa)

Tabla 3.9: Comparación de los valores obtenidos para el módulo de Young, para los andamios fabricados, con $n=5$.

3.3.5. Pruebas de conductividad eléctrica

La última prueba de caracterización en este proyecto, fue comprobar si existía conductividad eléctrica en los andamios electrohilados. Por lo tanto se midió la resistencia eléctrica a través de un arreglo experimental de placas de cobre, el cual consistió en conectar una terminal de éstas a un multímetro digital para medir el voltaje administrado, y la otra terminal de las placas se conectó a un segundo multímetro para registrar las señales de corriente con respecto al voltaje aplicado. Con estas señales registradas se realizaron los gráficos de corriente-voltaje que se muestran en Figura 3.46, donde se ajustó el comportamiento lineal de los datos, de tal manera que permitiera la comparación con la Ley de Ohm, y así obtener la resistencia eléctrica asociada a cada andamio.

Muestra	Resistencia (R) [MΩ]	Conductividad eléctrica (σ) [$\times 10^{-11}$ Scm $^{-1}$]
NTCMP	6.643 ± 0.006	231.696 ± 12.0830
PLA-NTCMP (1 %)	194.670 ± 11.565	6.271 ± 0.0027
PLA-NTCMP (2 %)	62.027 ± 9.352	17.193 ± 0.0016
PLA-NTCMP (3 %)	18.353 ± 0.591	54.993 ± 0.0053
PLA-NTCMP (4 %)	43.548 ± 5.869	29.450 ± 0.0089

Tabla 3.10: Comparación de los valores obtenidos para la Resistencia y Conductividad eléctrica, de los andamios fabricados.

En la Figura 3.46 se puede observar solamente el análisis realizado a los andamios de PLA-NTCMP con 1 %, 2 %, 3 % y 4 % de NTCMP, ya que en los andamios de PLA y PLA-NTCMP con 0.5 %, no se registró ninguna señal, comportándose como materiales aislantes, lo que era de esperarse en el andamio de PLA ya que el material polimérico empleado no es conductor. En el caso del andamio de PLA-NTCMP con una concentración de 0.5 %, se consideró que alteraba el resultado el polímero contenido en las fibras, ya que era mayor que el porcentaje de NTCMP, además debido a la pequeña cantidad de nanomateriales, éstos se encontraban tan dispersos que no lograban tener contacto para presentar cierta resistencia eléctrica. A consecuencia de estos resultados, se realizó un estudio eléctrico en los NTCMP en polvo, para

tener una referencia de la resistencia que podrían proporcionar a las fibras electrohiladas de PLA.

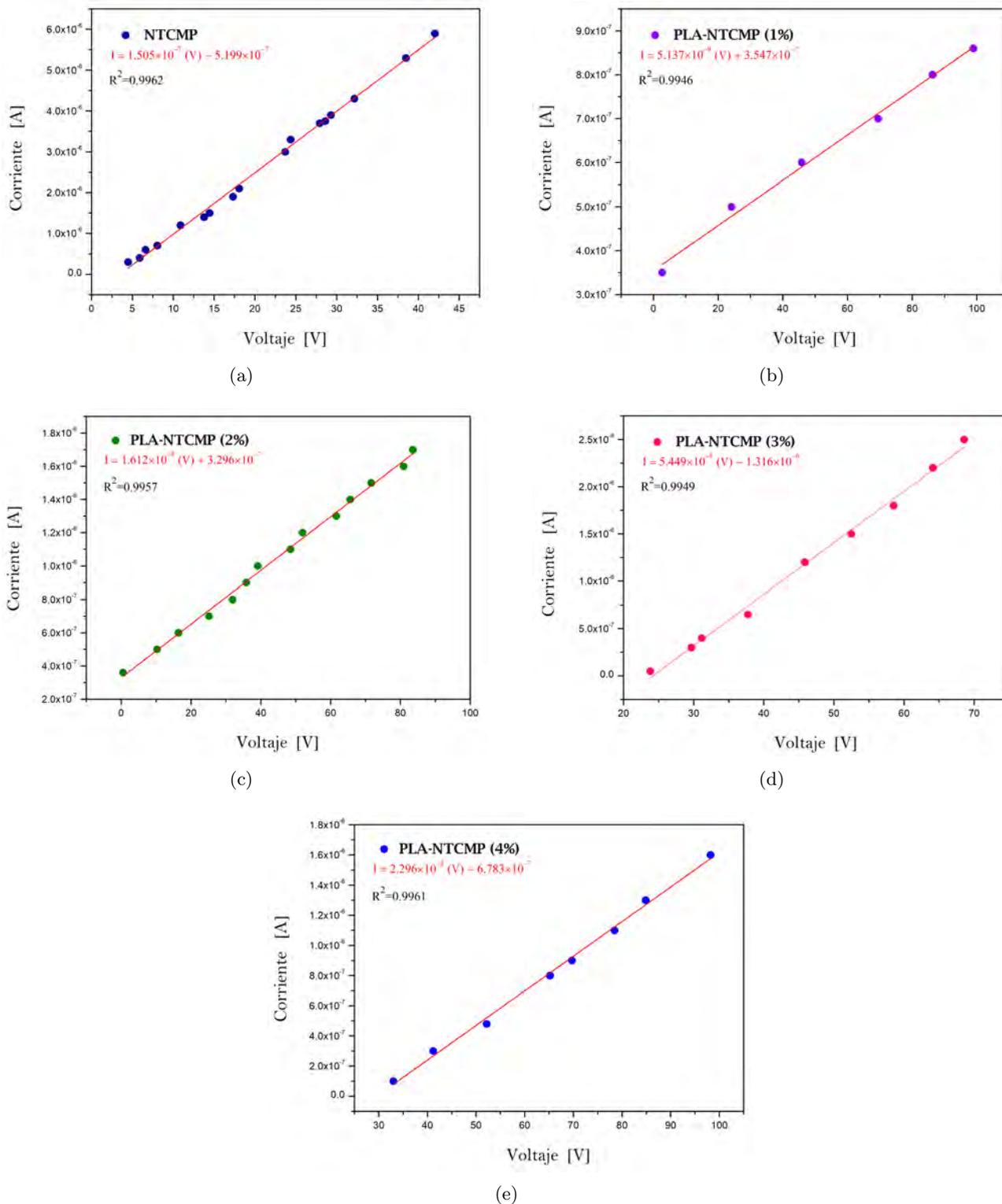


Figura 3.46: Gráficos de corriente-voltaje correspondientes a la evaluación eléctrica de los andamios electrohilados; a)NTCMP, b)PLA-NTCMP (1%), c)PLA-NTCMP (2%), d)PLA-NTCMP (3%), e)PLA-NTCMP (4%).

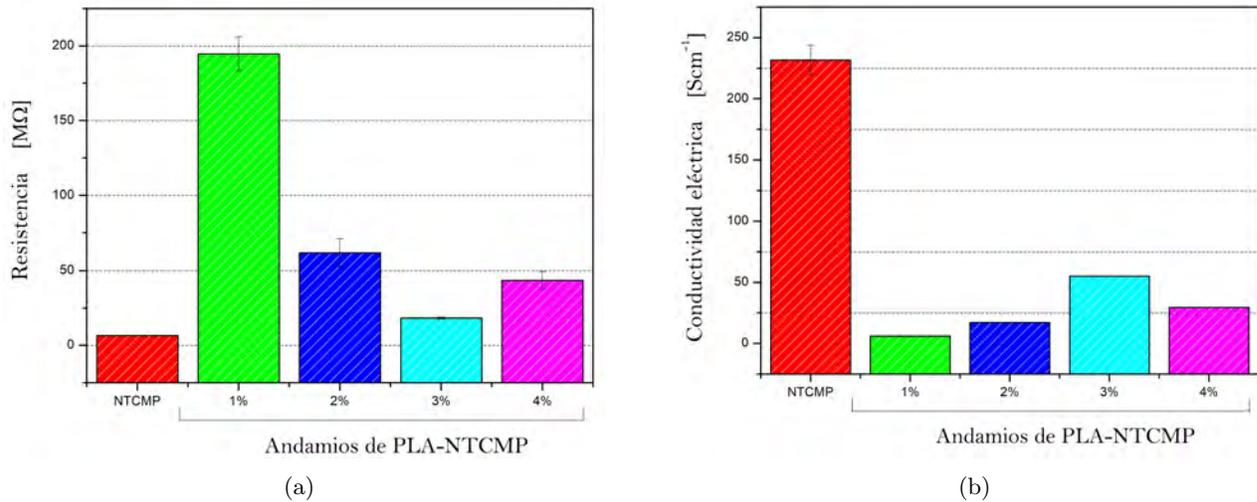


Figura 3.47: Diagramas de comparación entre los andamios, con los resultados obtenidos para; a) La resistencia eléctrica, y b) La conductividad eléctrica.

La resistencia de los NTCMP es de $(6.643 \pm 0.006) M\Omega$ lo cual es relativamente baja, sin embargo como la conductividad eléctrica es el inverso de la resistividad (ρ), los NTCMP presentaron un valor de $(231.7 \pm 12.1) \times 10^{-11} Scm^{-1}$, resultado mayor en los análisis realizados para conductividad eléctrica (ver Figura 3.46a y Tabla 3.10).

Una vez que se encontró el resultado para los NTCMP, se comparó con los valores que presentó cada uno de los andamios al incorporar dichos nanomateriales a las fibras de PLA. En las muestras con 1% y 4% de NTCMP (ver Figura 3.46b y 3.46e), se registraron una menor cantidad de señales, sin embargo se ajustaron bien al comportamiento lineal, en estos dos andamios se obtuvo valores en la resistencia mayores a la de los NTCMP, e incluso en el andamio con 1% presentó la resistencia más alta con $(194.7 \pm 11.6) M\Omega$, lo que nos lleva al cálculo de una conductividad más pequeña en los análisis para los andamios (ver Tabla 3.10).

En los andamios con 2% y 3% se registró una mayor cantidad de puntos para el cálculo de la resistencia (ver Figura 3.46c y 3.46d), donde se encontró que conforme se aumenta la concentración de NTCMP se presenta un incremento en la conductividad eléctrica, obteniendo uno de los valores más altos de $(54.9 \pm 0.005) \times 10^{-11} Scm^{-1}$ en este análisis en particular (ver Tabla 3.10). Dicho resultado es favorable y comprueba que la incorporación de NTCMP mejora las propiedades eléctricas en las fibras como se esperaba, a pesar que con la adición al 4% de NTCMP, disminuyó su conductividad, en comparación con el andamio de 3%, registrando un decremento del 53%, cambiando de $54.9 \times 10^{-11} Scm^{-1}$ a $24.5 \times 10^{-11} Scm^{-1}$, (ver Figura 3.47 y Tabla 3.10), ésto debido al proceso de filtración por el que se sometió la solución polimérica, en el cual se perdió cierto porcentaje de concentración.

Este resultado es evidencia de que se obtuvo un material con menor capacidad de conductividad eléctrica a comparación de los NTCMP, sin embargo gracias a la incorporación de éstos, las fibras se vuelven materiales conductores, apreciando grandes aplicaciones asociadas a esta propiedad eléctrica. De manera general, el andamio que presentó mejores resultados, fue con una concentración de 3% de NTCMP, en el cual se observó la mayor conductividad eléctrica, en comparación con los resultados obtenidos para los andamios de PLA-NTCMP.

3.4. Cultivos celulares

3.4.1. Sembrado y crecimiento del cultivo *in vitro*: línea celular NG108-15

Las pruebas de esterilidad con respecto al medio de cultivo preparado, tuvieron una favorable evolución ya que durante su seguimiento no mostró algún tipo de contaminación, por lo que se utilizó para suplementarlo y ser ocupado en el sembrado celular.

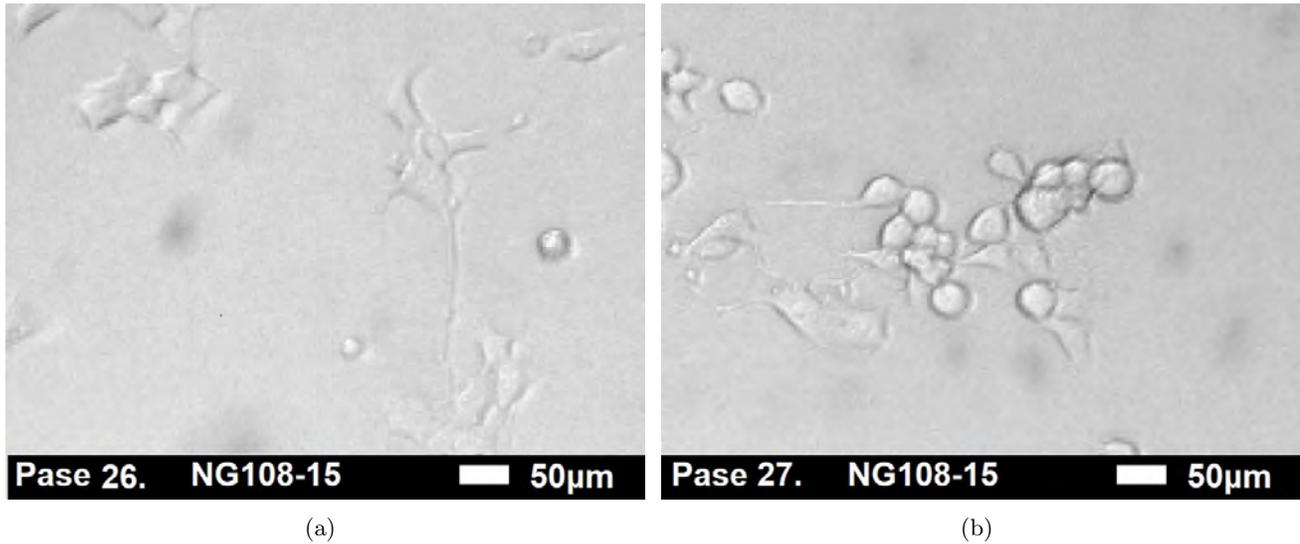


Figura 3.48: Microfotografías del cultivo celular a las 48 horas de ser sembradas en las cajas Petri; a)Pase 26 y b)Pase 27, mostrando adherencia a la superficie de la caja de cultivo y comenzando a desarrollar sus procesos dendríticos.

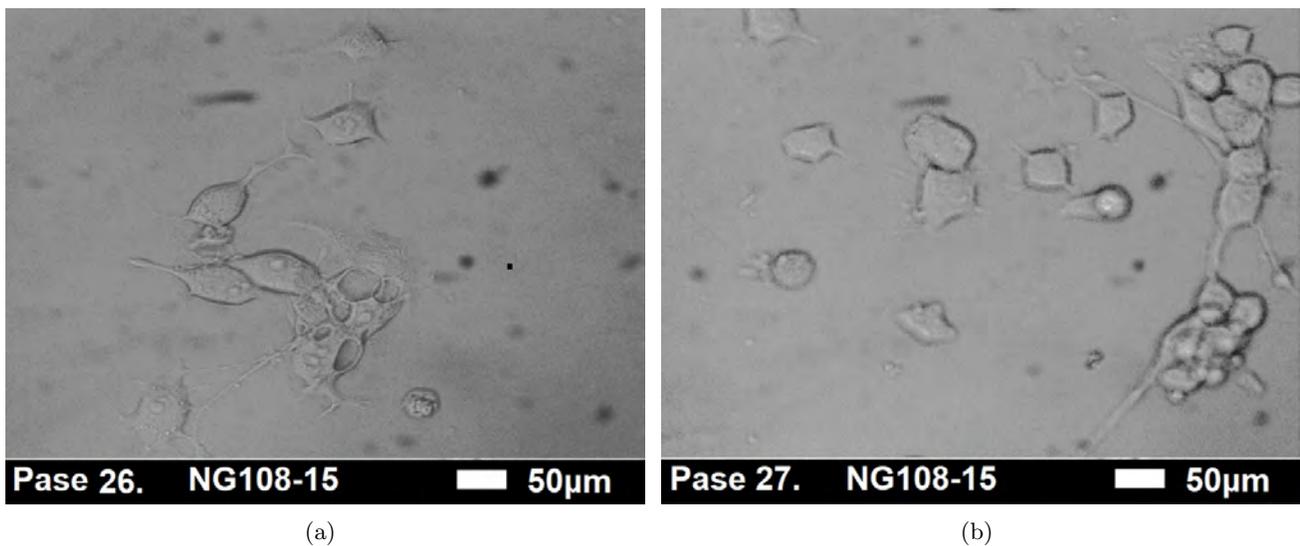


Figura 3.49: Microfotografías del cultivo celular a 3 días de ser sembrado en las cajas Petri con los pases a)26 y b)27; presentando el desarrollo de axones y detalles de los núcleos celulares.

Gracias a la descongelación, se proliferaron las células con los pases 26 y 27, al momento de sembrar la línea celular NG-108 se conservó cada uno de los pases anteriores. De acuerdo con el conteo realizado

en la cámara de Neubauer, se obtuvo una concentración celular de 1.02×10^6 células/mL de NG108-15 (sembradas). A continuación se presentan los resultados obtenidos del crecimiento celular de dicha línea, durante las primeras 48 horas de cultivo, hasta el 5^{to}. día, el sembrado del cultivo se realizó en cajas Petri.

En la Figura 3.48, se observan las imágenes capturadas a las 48 horas después de ser sembrado el material celular. Estos cultivos *in vitro*, al momento de ser sembrados presentaron una forma esferoide, sin embargo a las 48 horas se logró apreciar células vivas con adherencia a la superficie de la caja de cultivo, comenzando a desarrollar procesos dendríticos en ambas cajas Petri, además se observó mayor concentración celular en la caja que contiene el pase 27 de proliferación (ver Figura 3.48b), en donde las células tienden a juntarse, en cambio en el pase 26 las células se encuentran más dispersas y con menos terminaciones dendríticas (ver Figura 3.48a).

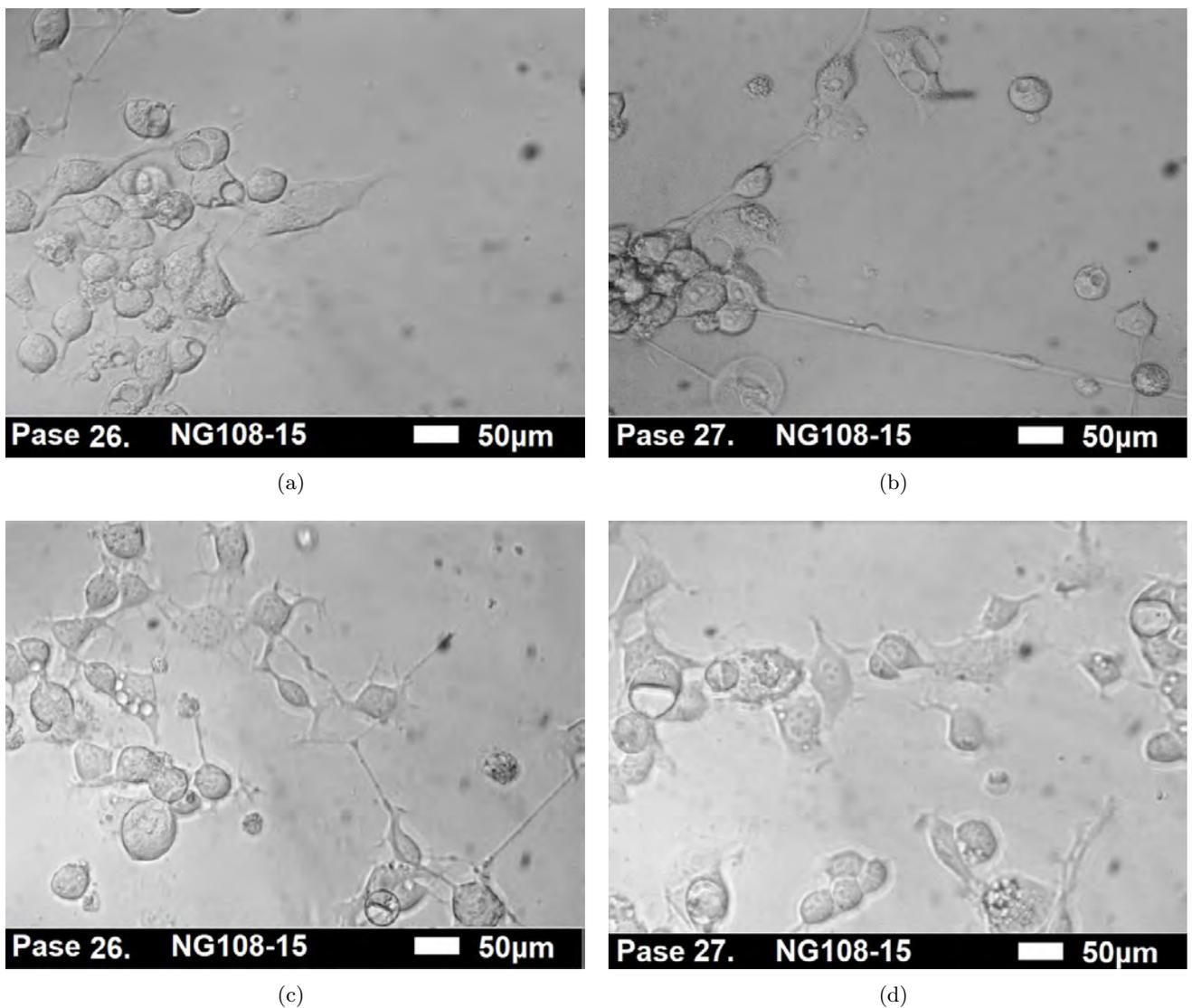


Figura 3.50: Microfotografías de las células a 4 días de cultivo en las cajas Petri, con los pases a)26 (las células tienden a crecer en forma aislada) y b)27 (las células proliferan en grupos). Microfotografías de las células a 5 días de cultivo en las cajas Petri, con los pases c)26 y d)27; se aumenta el crecimiento y maduración neuronal, llegando a una proliferación del 80 %.

A 3 días de iniciar el cultivo (ver Figura 3.49), fue posible observar una morfología mejor definida en las células nerviosas e incluso se aprecia un ligero aumento en su tamaño, en cuanto a sus procesos dendríticos no se percibe algún cambio significativo. En la Figura 3.49 se muestra la proliferación al tercer día de ser sembrado dicho cultivo con el respectivo pase 26, en el cual se sigue presentando menor concentración celular, en comparación con el pase 27 (ver Figura 3.49b), sin embargo en el pase 26 se observó que la mayoría de las células ya presentan terminaciones dendríticas, caso contrario al pase 27, que sólo algunas células tienen desarrolladas estas terminaciones.

El crecimiento de estas células se siguió con un registro fotográfico, con el que se logró apreciar el desarrollo de los axones y detalles de los núcleos celulares, como se observa en la Figura 3.50. Con el microscopio óptico, a 4 días de cultivo, se comprobó que las cajas Petri muestran material celular vivo sobre la superficie de éstas, además se observó que las células tienden a agruparse en el pase 27 (ver Figura 3.50a), caso contrario en el pase 26 donde las células se encuentran un poco aisladas (ver Figura 3.50b). A los 5 días de cultivo, se continuó con un crecimiento favorable, presentando la morfología característica de una célula neuronal, es decir, un alargamiento en sus axones y presencia de terminales neuronales, como se observa en las Figuras 3.50c y 3.50d. En este 5to. día se comprobó en ambos pases 26 y 27, que el crecimiento y maduración neuronal aumentó, además se percibe un conjunto de células, con un comportamiento similar, por lo tanto se tiene que las células proliferaron de manera satisfactoria cubriendo la superficie de ambas cajas en un 80 %, con lo que es posible crear una reserva celular de crio viales para experimentos futuros.

Posteriormente las células proliferadas en ambos pases (26 y 27) se tripsinizaron, y gracias a la abundancia de concentración celular, se logró sembrar una parte de células sobre los andamios y la otra parte sirvió para crear la reserva celular de 9 crio viales para experimentos posteriores. Para el sembrado de células en los andamios fabricados (PLA y PLA-NTCMP), se colocó una porción de éstos en cajas de cultivo de 45 mm², para el depósito de células y el medio de cultivo para su proliferación, el cual actúa como fuente de energía celular, estos cultivos celulares se conservaron por una semana, para observar a detalle su crecimiento e interacción con los materiales. Cabe resaltar que se dejó una caja de cultivo sin material, únicamente con células al cual se le asignó el nombre de “control”. Para interpretar el comportamiento de la interacción, se dividió la porción de andamio que se tenía para realizar por separado la prueba de tinción y de viabilidad celular.

Una vez que se cumplió las 48 horas del sembrado de células en los andamios y en el control, se agregó el factor de crecimiento neuronal, para inducir el crecimiento celular diferenciado sobre los materiales. En las primeras 48 horas después de la aplicación del factor de crecimiento neuronal, las células cambiaron su forma redonda que tenían previo a la diferenciación, y aumentaron su tamaño, así como también comenzaron a desarrollar los procesos dendríticos. En los siguientes 4 días, se continuó con la aplicación del factor de crecimiento neuronal, observando favorablemente el desarrollo de los procesos dendríticos. Finalmente a los 6 días de iniciada la diferenciación, se formó ya una compleja red celular tanto en los controles como en los andamios.[8]

3.4.1.1. Prueba de viabilidad celular

En la prueba de viabilidad, las células muertas fluorescen en una longitud de onda cercana a la que fluoresce el Homodímero de Etidio-1 (color rojo), mientras que las células vivas fluorescen en la longitud de onda de la calceína (color verde), es así como se identifica la biocompatibilidad que tiene el tipo celular con el material, dicha prueba se realizó a una semana de cultivo sobre los andamios. En la Figura 3.51 se muestra la prueba de viabilidad del andamio de PLA con el cultivo celular de NG108-15, en estos resultados se logró apreciar que la cantidad de células viables es considerablemente pequeña observándose células aisladas en la superficie del andamio (ver Figura 3.51a); caso contrario a lo que sucedió con la

concentración de células muertas, las cuales conforman una gran cantidad en todo el andamio formando pequeños agregados de distintos tamaños (ver Figura 3.51b), por último se puede percibir en la Figura 3.51c, el conjunto de células viables y muertas en el andamio de PLA.

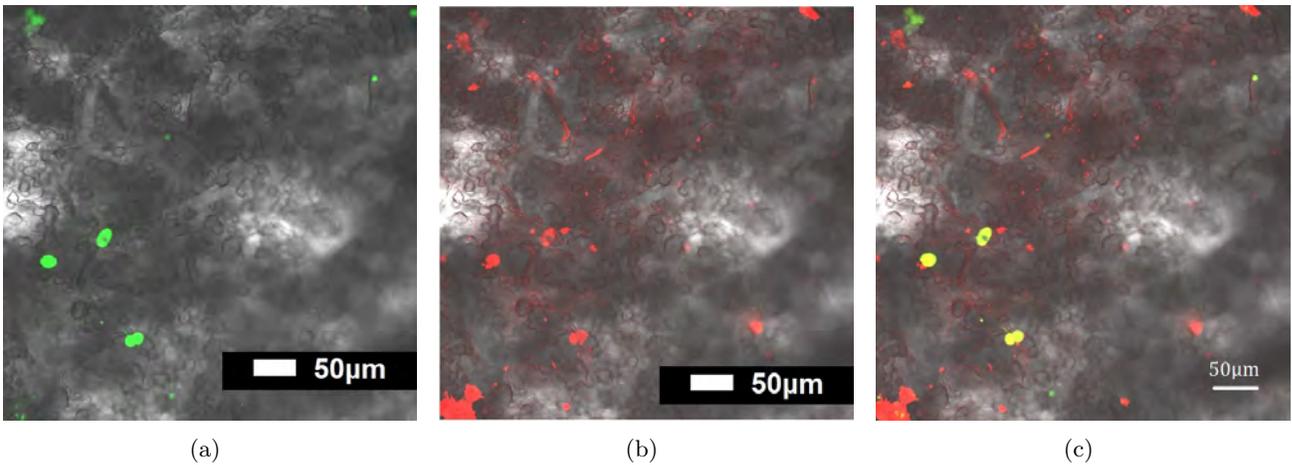


Figura 3.51: Imágenes de viabilidad de NG108-15 sobre el andamio de PLA; a)Células viables, b)Células no viables, y c)Conjunto de células en la prueba de viabilidad celular.

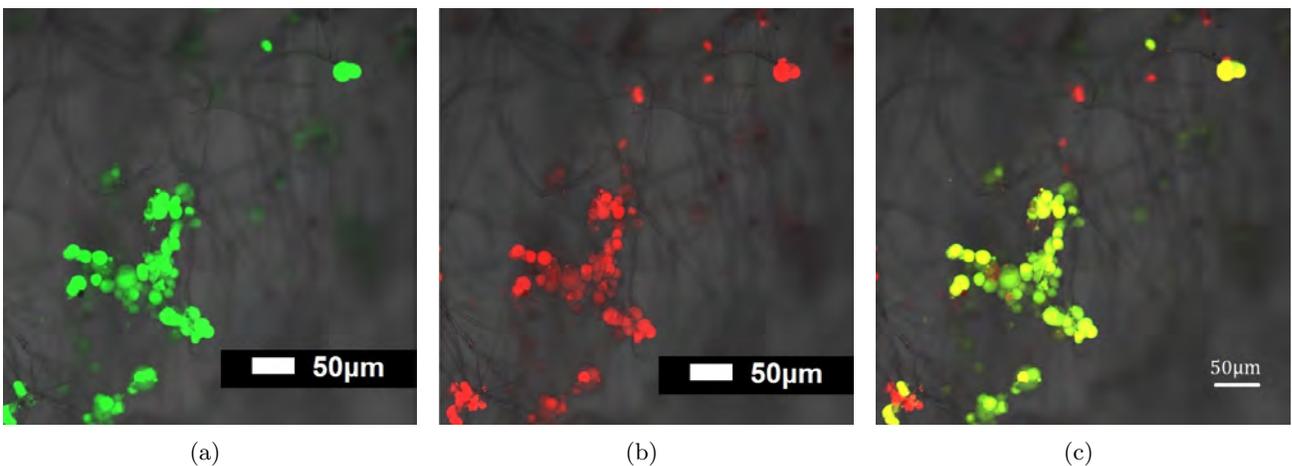


Figura 3.52: Imágenes de viabilidad de NG108-15 sobre el andamio de PLA-NTCMP; a)Células viables, b)Células no viables, y c)Conjunto de células en la prueba de viabilidad celular.

Los resultados del andamio PLA-NTCMP se muestran en la Figura 3.52, donde se observó una apreciable cantidad de viabilidad en las células sembradas, formando agregados con la mayoría de éstas (ver Figura 3.52a), sin embargo algo curioso sucede en el análisis de células muertas, ya que a simple vista se puede apreciar nuevamente que la cantidad de células que aparecían vivas ahora se consideran muertas, aumentando la cantidad con pequeños puntos rojos en la parte superior derecha (ver Figura 3.52b). Además se analizó el conjunto de células viables y muertas como se muestra en la Figura 3.52c, donde se logró apreciar grandes cúmulos de células vivas, sin embargo el tono que manejaban éstas no es realmente verde, es un tono amarillo verdoso, posiblemente indicando que las células muertas en las imágenes fueron

generalmente enmascaradas por la fluorescencia de las células viables. Dichos resultados no permiten estimar la viabilidad celular de los materiales, a pesar de ello al observar sólo la fluorescencia de la calceína (tono verde), se puede ver que se encuentran una mayor cantidad de células vivas en comparación con el material de PLA. Sin embargo no se puede obtener una conclusión de esto, debido a la pequeña cantidad de pruebas biológicas que se realizaron, por lo que falta detallar y realizar varios análisis; aunque es importante señalar que solamente se querían obtener avances preliminares acerca de la evaluación de un cultivo celular sobre los materiales fabricados.

Conclusiones y perspectivas

En base al estudio realizado sobre los andamios electrohilados biodegradables de PLA y PLA-NTCMP, considerando su procesamiento y los resultados obtenidos por medio de las técnicas de caracterización llevadas a cabo, se puede señalar que, se logró encontrar que las condiciones óptimas para la fabricación de fibras de PLA, mediante la técnica de Electrohilado son: 12 % (m/v) en concentración polimérica, 25 kV en voltaje aplicado, 20 cm de distancia entre aguja-colector y 0.1 mL/h en velocidad de inyección. Con estas condiciones se obtuvieron fibras con morfología mejor definida y cuantificando en ellas un diámetro promedio de (314 ± 22) nm, apreciando en la mayor parte de las fibras porosidad superficial, con una orientación aleatoria. Sin embargo en cada fabricación con estas condiciones existe una pequeña variación en la cuantificación del diámetro, debido al no tener control en la temperatura, desplazamiento de la aguja, entre otras. A pesar de ello, el resultado fue la obtención de fibras con mejor distribución, mayor uniformidad y sin la presencia de estructuras ajenas a los filamentos, teniendo en cuenta que las condiciones experimentales están adaptadas en particular para este estudio.

Mediante la Microscopia MEB, se encontró en la parametrización con respecto a la concentración polimérica, que el diámetro de las fibras aumenta conforme se incrementa el porcentaje en la concentración, presentando estructuras tipo perlas unidas por fibras sobre el andamio, tomando forma de rosario. Lo mismo sucede con la razón de inyección, que al incrementar ésta, se aumenta el diámetro promedio de las fibras a consecuencia de la gran dispersión de y variación de tamaños, sin embargo a una velocidad de 0.1 mL/h se distinguió un menor diámetro y la reducción irregular de los espacios vacíos entre las fibras colectadas. Mientras tanto, en el análisis del voltaje aplicado se encontró, que el diámetro de las fibras disminuye sí se incrementa el valor del voltaje, obteniendo en voltajes menores la presencia de estructuras tipo conos alargados. Algo similar sucede con la distancia entre aguja y colector, que a mayores distancias se presenta una disminución en el diámetro de las fibras.

El análisis que se llevó a cabo en los parámetros del proceso de Electrohilado, condujo a fabricar estructuras tipo andamios tridimensionales compuestos de PLA y NTCMP, a pesar de la constante obstrucción debido a la concentración de los NTCMP, se obtuvieron andamios de manera exitosa, con tonalidad oscura y cierto grado de rigidez. A estos andamios se les realizó caracterizaciones por medio de las técnicas estándares de polímeros, que ayudaron a obtener propiedades de interés y determinar posibles cambios estructurales, propiedades térmicas y de morfología superficial, en las estructuras tridimensionales.

En Microscopia MEB se observó que a concentraciones de 0.5 % y 1 % de NTCMP, los andamios presentaron gran variación en el tamaño y diámetro de las fibras, además de algunos ensanchamientos distribuidos en toda el área de colección, pero con un poco de uniformidad a lo largo de su longitud. Con las concentraciones de 2 % y 3 % se observaron deformaciones en las fibras perdiendo uniformidad y percibiendo doblamientos formando espirales entre ellas mismas. Mientras tanto, con la concentración a 4 % de NTCMP, se observó una morfología con presencia de grumos en toda la superficie, en algunos casos ciertas fibras tienden a adquirir una estructura en forma de espiral; su diámetro promedio en estas fibras fue de $(5,400 \pm 1,207)$ nm, el cual se relacionó con la unión de los NTCMP con polímero, encontrando gran cantidad de NTCMP en forma de cúmulos, sobre la superficie de algunas fibras. Adicionalmente MEB

permitió evidenciar que cierta cantidad de NTCMP se encuentran embebidos en la matriz polimérica de PLA, formando una estructura de tipo cable. Para testificar que realmente se trataban de NTCMP, se midió el diámetro promedio y se encontró que su valor promedio es de (140 ± 8) nm, encontrándose en el rango del diámetro de los NTCMP empleados, porque se deducen que es correcta la evidencia. Por lo tanto, la hipótesis planteada inicialmente, sobre el empaquetamiento de NTCMP dentro de las fibras de polímero, fue acertada, sin embargo se tienen también nanomateriales en la superficie de los filamentos, debido a la forma de fabricación con la técnica de Electrohilado convencional.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de Espectroscopia FTIR-ATR, en cuanto a la composición química de los andamios de PLA-NTCMP; confirman la presencia del polímero PLA sobre los andamios, mostrando bandas representativas del mismo, sin embargo no se encontró cambios significativos en la posición de estas, solo se destaca un incremento en la banda asociada al estiramiento de los grupos carboxílicos ($C = O$); este comportamiento se debe a la purificación de los NTCMP, con ácidos concentrados que provocan el rompimiento de enlaces que dan lugar a la formación de este tipo de grupos funcionales, y que además sugieren la existencia de interacciones físicas entre los grupos terminales del PLA y los grupos presentes en los NTCMP. Por otro lado, las bandas que se encuentran relacionadas con los grupos hidroxilos presentes en la superficie del carbón, se observan con mayor intensidad a una concentración de 3 % de NTCMP, mientras que en los demás andamios su intensidad es muy baja.

El análisis estructural por Espectroscopia Raman mostró que al adicionar los NTCMP, a una concentración del 4 %, se logró visualizar la presencia de señales Raman representativas del PLA, apreciando la banda principal de dicho polímero que indica su parte cristalina, y sus modos de deformación indicando la parte amorfa del PLA semicristalino. Además en estos andamios de PLA-NTCMP también se encontró las tres bandas principales asociadas a los NTCMP, las cuales proporcionan de manera general que los nanomateriales empleados contienen una cantidad pequeña de impurezas y poseen múltiples paredes. Sin embargo, se observó que la presencia de estas señales es débil, lo que se atribuye a la influencia de la línea Raman asignada al polímero PLA, ya que es mayor la cantidad de concentración de polímero que de NTCMP. Estos resultados pueden ser significativos de interacciones físicas y cambios en el entorno químico de los enlaces de PLA, corroborando los resultados de Rayos X.

Por DRX se logró apreciar nuevamente la parte semicristalina del polímero en los andamios de PLA-NTCMP, que confirma la estructura pseudo-ortorrómbica adoptada por las porciones cristalinas del PLA, aunque predomine la parte amorfa. Este resultado sugiere que la estructura resultante de la interacción entre el PLA y los NTCMP, corresponde a una estructura simétrica con menos ramificaciones que pueden ser incorporadas dentro de la red cristalina. Además se encontró la presencia de los picos característicos del grafito ubicados en 44° y 58.5° , indicando que los nanotubos empleados poseen una pared múltiple. Cabe señalar que en el andamio de PLA-NTCMP a una concentración de 0.5 %, se observó un desplazamiento negativo en las señales características del grafito, dicho resultado sugiere que las interacciones intermoleculares entre el PLA y NTCMP, provocan mayor desorden molecular debido a la fuerte interacción del polímero.

Las propiedades térmicas obtenidas por CDB, se analizaron en las tres etapas del ciclo empleado. En el primer calentamiento se obtuvo que en los andamios con 0.5 % y 1 % se presentó una T_c mayor que en el andamio de PLA, mientras que en los demás andamios no se encontraron cambios significativos referentes a esta temperatura. En la etapa de enfriamiento los andamios con 0.5-3 % de NTCMP, nuevamente presentaron una T_c menor a la del PLA, indicando que la incorporación de NTCMP facilitó la formación de zonas cristalinas, necesitando una menor temperatura para llevar a cabo el proceso. En esta misma etapa, pero con el andamio a 4 % la T_c fue cercana a la del polímero PLA, indicando que prácticamente los NTCMP saturan a las fibras y se comportan como si sólo el material fuera PLA. Por último en el segundo calentamiento, los termogramas con 0.5-3 % presentaron doble T_f una que es relacionada con el polímero

PLA y otra que presenta un desplazamiento negativo ~ 3 °C, este comportamiento con doble señal de fusión se atribuye a la existencia de dos tipos de fases cristalinas que producen puntos de nucleación en la muestra. Caso contrario con el termograma a 4 %, se verificó que la única T_f que se observó corresponde a la del polímero PLA.

En la medición de las propiedades mecánicas se obtuvo un incremento con respecto al módulo de Young en los andamios al 0.5-3 %, ésto gracias a las excelentes propiedades mecánicas que poseen los NTCMP. Sin embargo con la adición al 4 % el comportamiento no fue el mismo, presentando una disminución en su módulo de Young, debido al proceso de filtración al cual se somete la solución polimérica antes de ser electrohilada, donde se perdía parte de la concentración, llegando a un porcentaje menor, a pesar de ello presenta un aumento en esta propiedad con la incorporación de NTCMP en comparación con el andamio de PLA. Con respecto a los análisis de cedencia en los andamios, se observó que el andamio con 3 % presentó el mayor punto de fluencia a 2.75 MPa con la menor deformación a 0.037, en cambio con el andamio al 0.5 % se mostró el punto más bajo de cedencia, e incluso fue una medición inferior a la que presentó el andamio de PLA. Por último en los resultados del máximo esfuerzo, la muestra que registro una mayor tensión de rotura nuevamente fue con la concentración al 3 % de NTCMP, y quien presentó un valor menor fue el andamio al 1 % de NTCMP. De manera general, se deduce que el andamio con 3 % de NTCMP presentó mejores resultados, observándose un mayor valor en las propiedades mecánicas analizadas, en comparación con el andamio de PLA, por lo tanto al incorporar los NTCMP a las fibras de PLA, se logró obtener un mejor comportamiento mecánico.

En el análisis de las propiedades eléctricas, se encontró que los NTCMP tienen una resistencia de (6.643 ± 0.006) M Ω y una conductividad eléctrica de $(231.7 \pm 12.1) \times 10^{-11}$ Scm $^{-1}$. Además en el andamio de PLA-NTCMP con una concentración de 0.5 % se consideró que el polímero contenido en las fibras, alteraba el resultado de los NTCMP, ya que éstos posiblemente se encontraban tan dispersos, que no lograban tener una buena aportación para conducir cierta resistencia eléctrica. En el caso de las muestras al 1-3 %, se encontró que conforme se aumenta la concentración de NTCMP, se presenta un incremento en la conductividad eléctrica, obteniendo uno de los valores más altos de $(54.9 \pm 0.005) \times 10^{-11}$ Scm $^{-1}$ para el andamio con 3 % de NTCMP. Sin embargo en la muestra con la adición al 4 %, se logró apreciar una disminución del 53 % en su conductividad, en comparación con el andamio de 3 %, dicha disminución se asoció al proceso de filtración donde se perdió cierto porcentaje de concentración. Por lo tanto, nuevamente se presentó mejores resultados en el andamio al 3 %, en el cual se observó la mayor conductividad eléctrica, en comparación con el análisis para los andamios de PLA-NTCMP. Estos resultados son favorables y comprueban que gracias a la incorporación de NTCMP se mejoran las propiedades eléctricas en las fibras, volviéndolas materiales conductores, propiedad que las hace candidatas a grandes aplicaciones.

En los resultados con respecto al cultivo celular *in vitro* NG108-15, se logró apreciar que a las 48 horas de sembrar el cultivo, las células comenzaron a desarrollar procesos dendríticos en ambas cajas Petri. A los 3 días, se observó células nerviosas con morfología mejor definida y la presencia de un ligero aumento en su tamaño, y a los 5 días de cultivo, se continuó con un crecimiento favorable, presentando células nerviosas con alargamiento en sus axones, detalles de los núcleos celulares y terminales neuronales. Además se comprobó que en ambos pases empleados (26 y 27), las células proliferaron de manera satisfactoria en una semana, cubriendo la superficie de ambas cajas en un 80 %, con lo que se logró dejar una reserva celular de 9 crio viales para experimentos futuros. Por lo tanto, gracias a estos resultados se obtuvo que la línea celular NG108-15 no presentó ningún tipo de contaminación, promoviendo de manera correcta la proliferación celular sobre las cajas de cultivo.

El sembrado en los andamios electrohilados, no se observó contaminación alguna en el medio de cultivo. Como avances preliminares en la evaluación de cultivos celulares, se obtuvo que en las pruebas de viabilidad celular; el andamio de PLA presentó una pequeña cantidad de células viables y aisladas, mien-

tras que en el andamio de PLA-NTCMP, las células viables presentan una concentración mayor y forman agregados para su proliferación, a pesar de que éstas enmascararon un poco la fluorescencia de las células muertas.

Finalmente se concluye, en base a material caracterizado que la incorporación de una concentración del 3% de NTCMP en las fibras de PLA, se obtiene un andamio ideal que mejora las propiedades mecánicas y eléctricas de las fibras. Además con la adición de estos nanomateriales, se presentan interacciones en los enlaces químicos, que ayudan a identificar la presencia de ambos materiales, e incluso se logró encontrar a los NTCMP embebidos en las fibras de PLA, electrohiladas convencionalmente. Como perspectiva hacia un proyecto a futuro se elegiría trabajar con el andamio de PLA-NTCMP a una concentración del 3%, para un cultivo primario de cardiomiocitos, obtenido experimentalmente de la extracción celular del ventrículo izquierdo, para la fabricación de un parche cardíaco.

Apéndice A. Asepsia y preparación del material para cultivos celulares.

Asepsia del cuarto de cultivo

Lo primordial en la asepsia del cuarto de cultivo, es que debe estar libre de entradas de polvo/aire, y tener un sistema de luz ultravioleta para eliminar bacterias. Previo a realizar cualquier actividad de cultivo, es de suma importancia limpiar perfectamente techo, paredes, piso, ventanas, puerta, mobiliario y equipo existente; ésto también se debe hacer cuando se haya terminado de realizar la actividad. En este caso la limpieza se realiza de la siguiente forma:

1. Con un trapo o gasa limpios y dextran.
2. Con un trapo o gasa limpios y benzal.
3. Con un trapo o gasa limpios y alcohol al 70 %.

Una vez limpio el cuarto, se realizan pruebas de esterilidad para comprobar que el ambiente esté libre de bacterias. Por lo tanto, se vierte una cierta cantidad de medio de cultivo en tubos de centrifugación y se dejan ligeramente abiertos de 24-48 hrs. en los lugares estratégicos donde el material celular estará en contacto (en la campana de flujo laminar, incubadora de CO₂, gaveta de almacenamiento del material estéril y área de almacenamiento de soluciones. Si al termino de ese periodo de tiempo, el medio en el interior de los tubos se observa turbio “el cuarto no cumple con las condiciones de asepsia necesarias”, si por el contrario el medio permanece como cuando se depositó “el cuarto cuenta con las condiciones de asepsia requeridas”.

Lavado y esterilización del material.

Al utilizar el material por primera ocasión es necesario lavarlo muy bien con estropajo, jabón y agua. Después se deben seguir los siguientes pasos:

1. Sumergir el material en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 24 hrs.
2. Sacar y enjuagar el material en 10 ocasiones con agua corriente, tallando con un estropajo exclusivo para lavado del material.
3. Sumergir el material en una solución de HCl al 5 % por 24 hrs.
4. Sacar y enjuagar el material en 10 ocasiones con agua corriente.
5. Sumergir el material en agua destilada/bidestilada por 24 hrs.
6. Sacar y enjuagar el material con agua desionizada.

7. Dejar secar el material sobre una superficie limpia por 24 hrs., o bien secar en horno por 1 hora a una temperatura de 100 °C.

En cuanto a la esterilización, una vez completamente seco el material, se cubre con papel aluminio la boca de frascos, matraces, probetas, entre otros; después se cubre con papel Kraft y se asegura el papel con ligas de hule, en un área visible se adhiere un pedazo de cinta testigo para comprobar la esterilización del material. En el caso de las pipetas, es necesario colocar un pequeño tapón de algodón de aproximadamente de 1.5 cm de profundidad, después se introducen en un contenedor de pipetas que tenga en el fondo una gasa con algodón para proteger las puntas de éstas. Finalmente se introduce el material en una bolsa de plástico, se cierra y se introducen en un esterilizador de vapor.

Apéndice B. Cultivo celular *in vitro*

Preparación de Medio D-MEM con alta Glucosa y Glutamina (No. Catalogo:12100-046)

■ Dulbecco, Diffco.

1. Preparación de 1 L de Medio DMEM a partir del polvo contenido en un sobre.
2. Adicionar aproximadamente 200 mL de agua miliQ estéril en un vaso de precipitado estéril de 2 L. Vaciar el contenido del sobre, enjuagándolo con agua miliQ estéril. Disolver el polvo suavemente con ayuda de un agitador magnético sobre una parrilla de agitación magnética, adicionando 500 mL más de agua miliQ estéril.
3. Agregar 3.7 g de NaHCO₃ y solubilizar.
4. Ajustar el pH a 7.2 con HCl (1 M). Aproximadamente se utilizan 3 mL.
5. Aforar a un 1 L con agua miliQ estéril en un matraz aforado y posteriormente transferir a un vaso.
6. Adicionar 25.6 mL de HEPES estéril 1 M (pH 7.4).
7. Para esterilizar utilizar un filtro de campana desechable con membrana de 0.22 μm (MILLIPORE, No. SCGPU05RE), enchufar el tubo de vacío a la boquilla del filtro. Pasar el contenido del vaso por el filtro.
8. Etiquetar el frasco con el tipo de medio, fecha y la persona que realizó la preparación.

■ Preparación de HEPES 1 M.

1. Pesar la cantidad requerida de HEPES en una báscula de precisión, de acuerdo con la cantidad de solución que se quiera preparar. En este caso se utilizó 23.83 g de HEPES en polvo para preparar 100 mL de solución de HEPES 1 M.
2. Disolver el HEPES en un vaso de precipitado de 250 mL en agua des-ionizada estéril con ayuda de un agitador magnético en una parrilla de agitación magnética.
3. Filtrar la solución con ayuda de filtros para jeringas.
4. Envasar y refrigerar.

■ Preparación de Glutamina 0.2 M. (No. Cat. G-1517)

1. Pesar la cantidad requerida de Glutamina en una báscula de precisión, de acuerdo con la cantidad de solución que se quiera preparar. Para este caso se utilizaron 7.305 g para preparar 250 mL de solución.
2. Disolver la Glutamina en un vaso de precipitado de 250 mL en agua desionizada estéril con ayuda de un agitador magnético en una parrilla de agitación magnética.
3. Filtrar la solución con ayuda de filtros para jeringas.

4. Envasar y refrigerar.

Suplementación de Medio de Cultivo para crecimiento de línea celular NG108-15 (200mL)

1. Agregar en un frasco estéril con tapa 182 mL de DMEM con alta Glucosa y Glutamina (No. Cat. 12100-046 Dulbecco, Dificco).
2. Agregar 20 mL de Suero Bovino Fetal (FBS) (No. Cat. 16000, Gibco), homogeneizar la solución.
3. Agregar 2 mL de Anti-Anti (Antibiótico-Antimicótico) (No. Cat. 15240 Gibco), homogeneizar la solución.
4. Agregar 1x de suplemento HAT (No. Cat. 21060, GIBCO 50x), homogeneizar la solución.
5. Refrigerar la solución preparada.

Suplementación de Medio de Cultivo para diferenciación de línea celular NG108-15 (200mL)

1. Agregar en un frasco estéril con tapa 194 mL de DMEM con alta Glucosa y Glutamina (No. Cat. 12100-046 Dulbecco, Dificco).
2. Agregar 0.5x de Hipoxantina aminopterina timidina (HAT, Gibco 50x) y homogeneizar.
3. Agregar 10 mL de Suero Bovino Fetal (FBS) (No. Cat. 16000, Gibco) y homogeneizar.
4. Agregar 1 M de N⁶, O² Dimetil adenosina 3':5' monofosfato ciclico (dibutiril AMP-c;SIGMA), homogeneizar vigorosamente.
5. Refrigerar la solución preparada.

Sembrado de línea celular NG108-15 a partir de un crio vial.

1. Preparar las cajas de cultivo, rotulándolas con la fecha de descongelación, número de pasaje, nombre de la línea celular.
2. Substraer del tanque de crio preservación celular la línea celular que se requiera.
3. Colocar el crio vial en baño térmico a una temperatura de 37 °C por aproximadamente 1-2 minutos.
4. Retirar el crio vial, limpiándolo con un paño humedecido con Etanol al 70 % y llevarlo a la campana de flujo laminar.
5. Colocar 8 mL de medio de cultivo en un tubo de 10 mL y vaciar el contenido del crio vial y homogeneizar.
6. Llevar el tubo a la centrifuga y centrifugar a una velocidad de 1300 rpm por 5 minutos, para obtener en el fondo el botón celular.
7. Decantar el contenido del tubo en un vaso de precipitados, rellenar el tubo con 5 mL de medio de cultivo y homogeneizar.

8. Tomar el contenido del tubo y transferirlo a la caja de cultivo, incubar a las condiciones de temperatura y atmósfera requeridas (37°C , 5 % CO_2).
9. Examinar el cultivo microscópicamente después de 24 hrs. y subcultivar si es necesario.

Crio preservación de la línea celular NG108-15.

1. Observar por medio de un microscopio invertido la confluencia celular y corroborar la ausencia de contaminación.
2. Decantar el medio de la caja de cultivo colocándolo en un vaso de precipitados especial solo para deshechos, teniendo lejos del lugar donde se tenga el resto de los materiales para evitar cualquier tipo de escurrimiento y contaminación.
3. Aplicar 1mL de Tripsina a una caja de 25 cm^2 , colocarla en la incubadora por 5 minutos o hasta que la superficie de las células se haya desprendido.
4. Retirar las células desprendidas y colocarlas en un tubo con tapa de 10 mL.
5. Centrifugar el tubo por 5 minutos a una velocidad de 1300 rpm para obtener un botón de células en el fondo del tubo.
6. Decantar el sobre nadante de los tubos en el vaso de deshechos teniendo cuidado de hacerlo en un solo movimiento para evitar que se deshaga el botón de células que se encuentra en el fondo.
7. Colocar en el tubo 1.8 mL de FBS, 0.2 mL de DMSO.
8. Resuspender el contenido rápidamente ya que el DMSO es toxico para las células y puede llegar a dañarlas ya que este rompe la pared celular de las células.
9. Se coloca el contenido del tubo en un crio vial de 2 mL el cual ha sido previamente rotulado (pasaje, fecha y línea celular), este se cubre con papel aluminio.
10. Se coloca por una semana en el revco en donde habrá un descenso gradual de la temperatura para posteriormente ser llevado a una fase gaseosa o líquida de congelación (nitrógeno líquido).

Solución “Azul de Tripano”

1. Para preparar 10 mL de azul de tripano.
2. Pasar en un tubo para centrifugación 0.02 g de azul de tripano.
3. Agregar 10 mL de PBS.
4. Disolver perfectamente la solución.
5. Filtrar y envasar protegiéndolo de la luz.

Pruebas de viabilidad: Calceina-AM y Homodímero de Etidio-1

La Calceina-AM es una molécula no fluorescente que al hidrolizarse se divide en calceina y acetoximetil, es permeable a la membrana celular y en presencias de esteras (enzima que rompe enlaces esteres)

Apéndice C. Extracción celular del tejido cardíaco, para un cultivo primario de Cardiomiocitos (CMs)

Solución Hank's con seroalbúmina bovina (HBSS)

1. Para preparar un litro de solución HBSS:

Componente	Peso molecular	g/L	mM
CaCl ₂	111	0.14	1.3
KCl	74.55	0.4	5.4
KH ₂ PO ₄	136.1	0.06	0.4
MgCl ₂ 6H ₂ O	203.3	0.1	0.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	246.5	0.1	0.4
NaCl	53.44	8.0	136.9
NaHCO ₃	84.01	0.35	4.2
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	268.1	0.09	0.3
Total de Sales			149.4
Otros			
D-glucosa	180.2	1	5.5
Rojo de Fenol	354.4	0.01	
HEPES, Sal Na	260.3	2.08	8.0
Seroalbúmina bovina		3	

Tabla 3.11: Componentes de preparación para la solución Hank's.

Extracción celular y aislamiento de Cardiomiocitos.

1. Lavar y esterilizar los instrumentos quirúrgicos. (Pinza hemostática, tijeras curvas, pinzas de punta)
2. Colocar el instrumental en un frasco con alcohol 70 %, y acomodarlo en la mesa de cirugía, adicionalmente colocar un frasco con agua para el deposito del instrumental utilizado.
3. Limpiar el área de cirugía con alcohol al 70 %.
4. Preparar Colagenasa Tipo II al 0.05 % (p/v). Se pesan 2.5 mg de colagenasa en un tubo FALCON y se agregan 5 mL de solución Hank's, para diluir la concentración. Mantener siempre en refrigeración. Etiquetar el tubo con el tipo de solución, fecha y la persona que realizó la preparación.

5. Preparar la anestesia, con relación 1:1 (2-2.5 unidades de Pentobarbital:2-2.5 unidades de Agua destilada), considerando el peso y edad de la rata.
6. Se aplica la anestesia a la rata, y se elimina el pelo desde el vientre hasta parte superior del tórax.
7. Se coloca a la rata en la mesa de cirugía y se rocía con alcohol al 70 % la parte rasurada.
8. Se verifica la anestesia presionando con una pinta, las patas y cola de la rata, observando cualquier reflejo que ésta pueda presentar.
9. Se realizan las incisiones adecuadas para extraer el corazón. Con un porta-agujas se toma la piel con músculo en la parte baja del estómago de la rata. Con las tijeras curvas se cortan estos dos planos hasta llegar a las costillas, de tal manera que permita el corte también de éstas. Se levanta el tórax y se detiene con el porta-agujas, para permitir el acceso al corazón.
10. Se aplica el método de eutanasia por medio de dislocación cervical a la rata.
11. Una vez expuesto y dislocada la rata, se cortan arterias coronarias y tejidos epiteliales, de tal manera que permitan extraer al corazón.
12. Inmediatamente el corazón se transfiere a un plato bacteriano con 5 mL de solución Hank's fría, y realizar el primer lavado.
13. Se ubican las aurículas y se eliminan, exponiendo las válvulas cardíacas.
14. Se realiza un segundo lavado en otro plato bacteriano que contiene 5 mL de solución Hank's.
15. Se identifica la cavidad de mayor tamaño (ventrículo izquierdo), y se elimina la otra cavidad.
16. El tejido perteneciente al ventrículo izquierdo, se disecciona en partes pequeñas, y se transfiere a viales con solución Hank's fría, realizándose 6 lavados más, para continuar eliminando restos sanguíneos.
17. Al finalizar los lavados, el tejido se trasladó a un tercer plato bacteriano, donde se tritura con tijeras de punta al tejido, hasta obtener porciones de $\sim 0.5-1 \text{ mm}^3$.
18. Se agrega la Colagenasa Tipo II al 0.05 %, en el plato bacteriano, para la digestión enzimática del tejido.
19. Se transfiere la solución con material celular a un tubo Falcon estéril, y se incuba a 37°C por un período total de 10 minutos.
20. La solución celular se recupera y se filtra (filtro Corning $70 \mu\text{m}$), y se coloca en dos tubos FALCON estériles, adicionando 5 mL de solución Hank's fría para inactivar la colagenasa.
21. Ambos tubos se centrifugan a 2000 rpm por 10 minutos.
22. Se elimina el sobrenadante de ambos tubos y el botón celular se resuspende con solución Hank's.

Procedimiento para la extracción del tejido cardíaco.

Un cultivo primario se refiere a la obtención del material celular directamente de un tejido.[8] En este proyecto de investigación, el material celular se obtuvo de 5 Ratas Winstar de 2 meses de edad, proporcionadas por el Bioterio de la UAM-I, como la que se observa en la Figura 3.54. Las células de interés en este experimento, fueron células cardíacas del ventrículo izquierdo, mejor conocidas como “cardiomiocitos

(CMs)".



Figura 3.54: Rata Wistar de 2 meses de edad, empleada para el cultivo primario de células cardíacas.

Previo a la extracción celular del ventrículo izquierdo del animal, se preparó los instrumentos quirúrgicos junto con la mesa de cirugía. Además se preparó la Colagenasa Tipo II al 0.05 % (p/v), con 2.5 mg de enzima y 5 mL de Solución Hank's, debido a su composición, siempre se procuró mantener refrigerada a esta enzima. Una vez preparada la enzima, se pasó a anestésiar a la rata con Pentobarbital:Agua destilada (1:1), la anestesia se suministró intraperitoneal (ver Figura 3.55a), dando un periodo de reposo para observar los efectos de ésta, y enseguida rasurar desde la parte torácica hasta el vientre, de tal forma que el pelaje de la rata se elimine casi por completo, para evitar cualquier contaminación, el procedimiento se muestra más detallado en el Apéndice C.

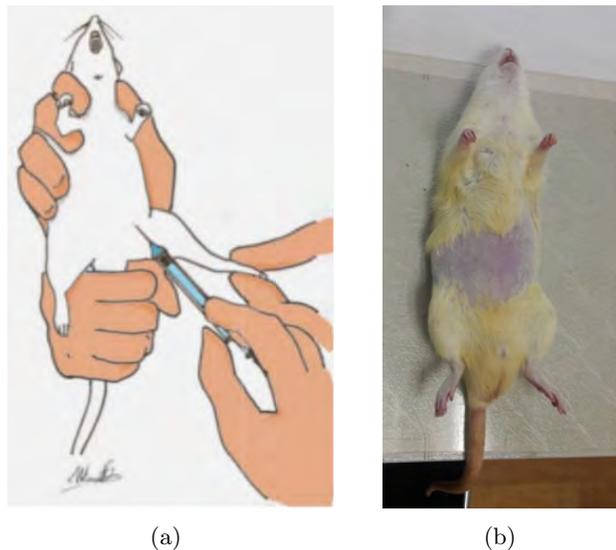


Figura 3.55: a)Administración de la anestesia vía intraperitoneal.[9] b)Colocación de la especie animal, en la mesa de cirugía para dar inicio a la extracción celular.

Posteriormente la rata se colocó en la mesa quirúrgica, esparcir alcohol al 70 % sobre la parte rasurada (ver Figura 3.55b), para dar inicio a la cirugía, cuyo procedimiento fue el siguiente: Mediante la

pinza y la tijera se ubica la zona bajo la parrilla costal y se procede a hacer una incisión transversal, de preferencia considerando los planos cutáneos y muscular (ver Figura 3.56a). Enseguida se debe palpase el inicio de la parrilla costal en el tórax de la rata, y al mismo tiempo ubicar la línea axilar anterior, una vez encontradas estas referencias, se procede a introducir la tijera bajo las costillas y se comienza a realizar una incisión en dirección ascendente, como se puede observar en el esquema de la Figura 3.56b, esta incisión se hace en ambos lados, en forma rápida para evitar que la rata muera por colapso pulmonar.

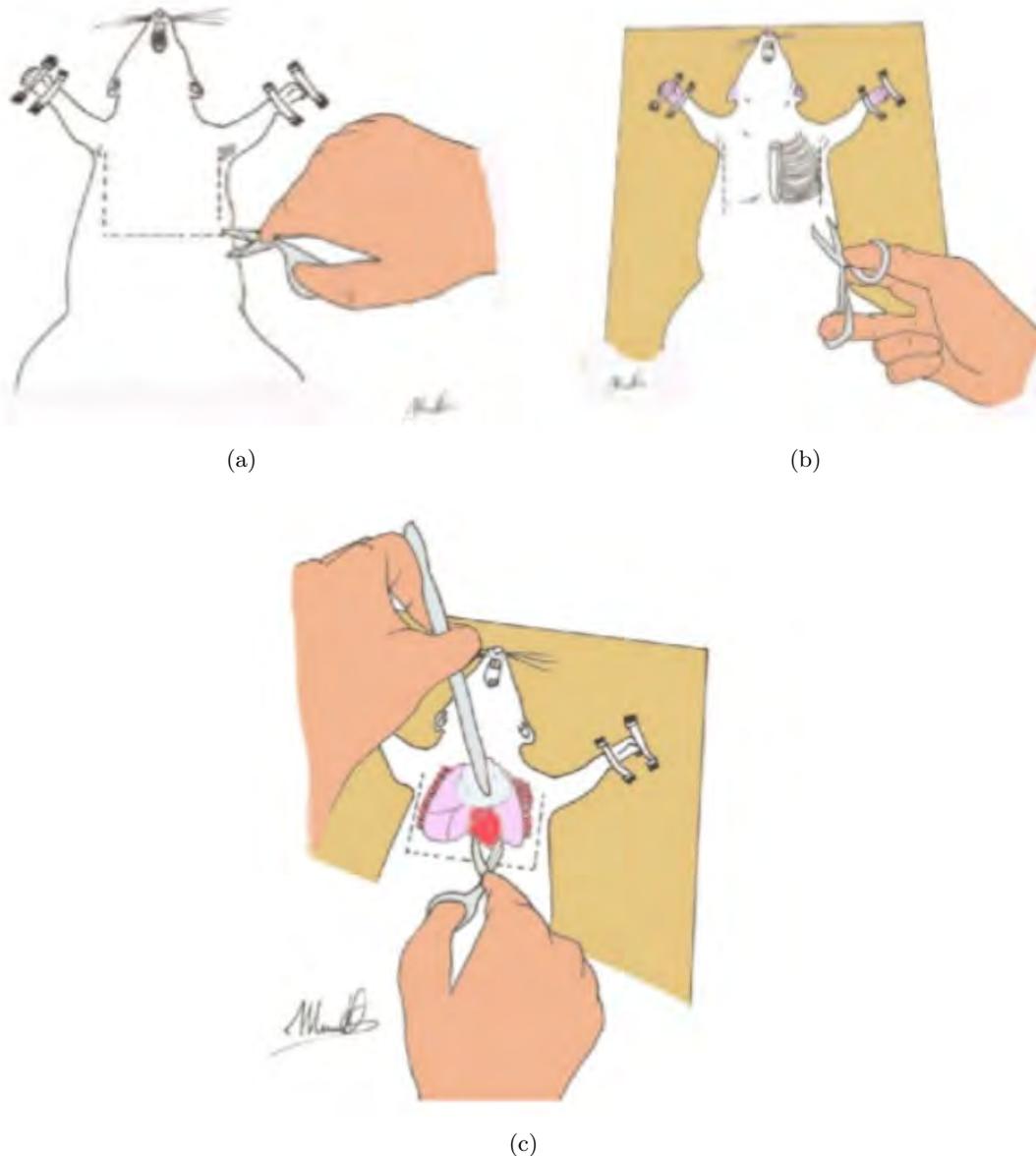


Figura 3.56: a) Realización de la incisión transversal, considerando los planos cutáneos y muscular. b) Incisión en costillas (en ambos lados) para exponer los órganos intratorácicos. c) Ubicación de la vena cava superior, aorta y venas pulmonares, para realizar un corte fino en los vasos, y extraer el corazón.[9]

Una vez realizadas las anteriores incisiones correspondientes, se eleva la parrilla costal exponiendo los órganos intratorácicos, esto conlleva un colapso pulmonar debido a que las presiones externas e internas se igualan, lo que provocará la muerte de la rata, en algunos casos es necesario realizar la dislocación cervical de la rata para provocar su muerte, y evitar el constante flujo sanguíneo. Por último para la extracción

del corazón, se ubican la vena cava superior, la aorta y venas pulmonares, y se introduce la tijera dejando una de las hojas debajo de los vasos y la otra sobre éstos para poder realizar un corte fino y preciso, (ver Figura 3.56c).[9]

Después de extraer el corazón, se depositó en una caja Petri que contenía 10 mL de solución Hank's, lo que permitía apreciar la función automática de este órgano. Enseguida se realizaron cortes en condiciones de esterilidad, eliminando aurículas y ventrículo derecho, hasta obtener solamente la parte del ventrículo izquierdo. Posteriormente se realizaron 6 cambios/lavados a ésta parte del tejido en crio viales con solución Hank's. Una vez lavado el tejido, se transfirió a un vaso de precipitado con 2 mL de solución Hank's, de tal manera que permita triturar a dicho tejido, hasta obtener un tejido diseccionado en pequeñas porciones milimétricas. Enseguida se agregó la Colagenasa preparada y nuevamente se volvió a triturar, para ser vaciada la solución en un tubo FALCON, agregando 10 mL de Solución Hank's (ver Apéndice C). La solución Hank's además de limpiar el tejido, es un medio que contiene los nutrientes adecuados para que el material celular se mantenga vivo por hasta 4 horas, mientras que la Colagenasa es una enzima que ayuda a disgregar el material celular.[8]

El tubo FALCON que contiene la solución con el material celular, se introduce en baño térmico a 37 °C por 5 minutos, para terminar la digestión con la Colagenasa. Finalmente se divide la solución obtenida, en dos tubos y se completa a 15 mL con solución Hank's, para ser centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se removió el sobrenadante, y se agregaron 5 mL de solución Hank's para diluir la concentración de la enzima. Con el proceso descrito, se consiguió la suspensión de material celular cardíaco para ser observado mediante un microscopio óptico.

Resultados preliminares para un cultivo primario de cardiomiocitos “CMs”

Para la extracción celular del tejido cardíaco se utilizaron 5 ratas Winstar con aproximadamente 2 meses de edad. Pevio al comienzo del proceso quirúrgico, fue necesario aislar a cada especie de las demás, para evitar estrés y nerviosismo en las otras ratas; por lo tanto se colocó a cada rata en un contenedor para poder aplicar la anestesia, en la Figura 3.57 se presentan dos de las ratas empleadas para estos ensayos experimentales.



Figura 3.57: Ratas Winstar empleadas en el proceso quirúrgico para la extracción celular del tejido cardíaco.

Posteriormente se preparó el instrumental quirúrgico en la mesa de cirugía y se aplicó la anestesia en la rata; una vez que se observaron los efectos de ésta en la especie animal, inmediatamente se rasuró teniendo cuidado de no hacer lesión más allá de la piel (ver Figura 3.58a), en cada momento se procuró de revisar el pulso cardíaco de la rata, por cualquier desorden respiratorio debido a la anestesia. Cabe resaltar que en los dos primeros ensayos experimentales, al momento de estar rasurando a las ratas y

posteriormente entraron en paro respiratorio, a pesar de realizar reanimaciones en los animales, estos fallecieron al poco tiempo (antes de iniciar la cirugía).

Debido a que las células de interés en este cultivo primario son las cardíacas, se necesita extraer el corazón y enfocarse en la parte del ventrículo izquierdo, para la obtención de los cardiomiocitos, por lo que el procedimiento quirúrgico debe ser lo más rápido posible. De esta manera, se colocó a la rata en la mesa de cirugía, rociando alcohol en la parte rasurada como se puede apreciar en la Figura 3.58b. Cabe resaltar que es muy importante revisar de manera correcta que la rata se encuentre bajo los efectos de la anestesia, para evitar que el animal se despierte en medio de la cirugía o incluso se presenten otros tipos de percances. En los cinco ensayos experimentales realizados, una de las ratas fue resistente a la anestesia y tardó más tiempo en dormirse, sin embargo al momento de rasurarla, presentó reflejos en patas y ojos, y cuando se colocó en la mesa de cirugía la rata se movió bruscamente provocando su desplazamiento en la mesa.

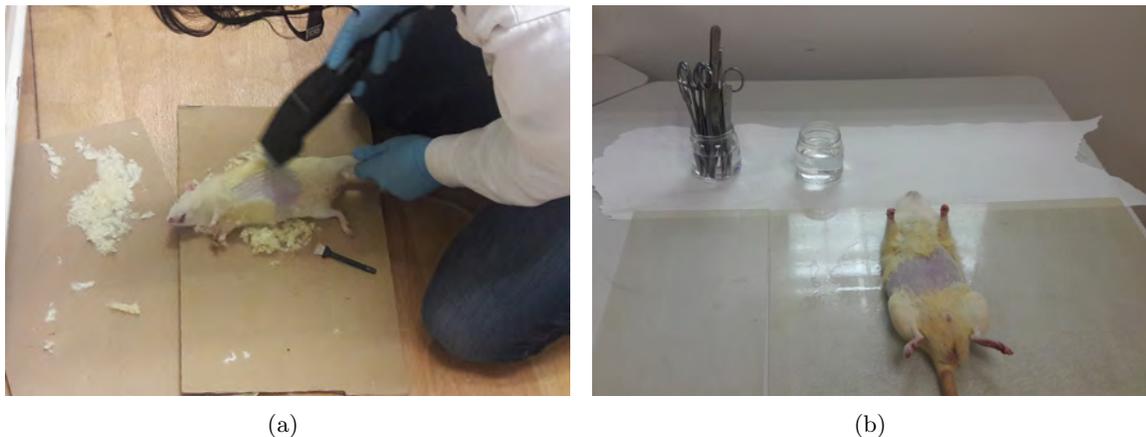


Figura 3.58: Preparación para el proceso quirúrgico de extracción celular. a)Una vez anestesiada la rata, se rasuró desde la parte baja del estómago hasta el tórax, evitando realizar lesiones más allá de la piel. b)Preparación del instrumental quirúrgico y colocación de la rata en la mesa de cirugía.

En el procedimiento quirúrgico, al realizar las incisiones considerando los planos cutáneo y muscular, se tuvo bastante cuidado de introducir el mismo lado de la tijera, para evitar meter algún contaminante (pelos del animal) hacía los órganos. En los dos primeros ensayos experimentales, la problemática anterior surgió a causa de no tomar adecuadamente el instrumental quirúrgico.

Una vez realizadas las incisiones laterales, se procedió a cortar costillas y levantar tórax con unas pinzas hemostáticas de tal manera que ayudará a sostener el tejido epitelial, como se puede observar en la Figura 3.59a. En todo el proceso quirúrgico se estuvo revisando constantemente el pulso cardíaco del animal, y a pesar de que la cirugía debe ser de forma rápida para evitar la muerte por colapso pulmonar, en los ensayos el tiempo que tomaba la cirugía era aproximadamente de 10 minutos, sin embargo ninguna rata falleció en medio de la cirugía sólo un espécimen presentó alteración cardíaca (taquicardia).

Posterior al corte de costillas, se procedió a dislocar a la rata para cortar el flujo sanguíneo, este método de eutanasia se basa en separar la médula espinal desde el cerebro, provocando una muerte rápida, cabe señalar que dicho método solo fue practicado en tres ratas, debido a que dos fallecieron después de aplicar la anestesia. El último paso para la extracción del corazón, fue cuando se realizó el corte de tejidos epiteliales y arterias coronarias de manera que permitieran la extracción del órgano, inmediatamente se realizan lavados con solución Hank's dentro de una caja Petri, para tener mejor visión de la morfología

del corazón, en todos los ensayos se observó que después de extraer el órgano, éste aún presentaba contracciones (ver Figura 3.59b).

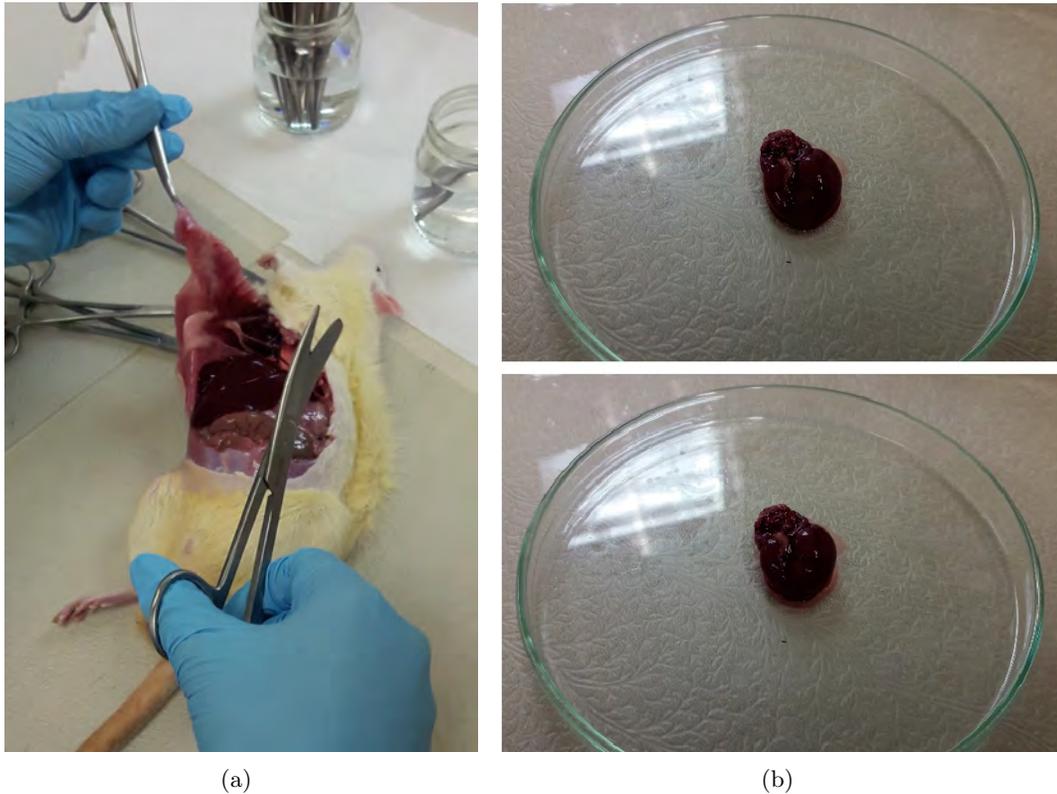


Figura 3.59: Procedimiento quirúrgico para la extracción del corazón. a) Una vez realizadas las incisiones laterales, considerando los planos cutáneo y muscular, se cortan las costillas, de tal manera que permita levantar el tórax, sujetando el tejido epitelial con una pinza hemostática. b) Posterior a la extracción del corazón, se realizan lavados para eliminar los residuos sanguíneos, en esta parte se sigue percibiendo la relajación (imagen superior) y la contracción (imagen inferior) del órgano cardíaco.

Una vez que se extrajo el corazón de la rata y realizaron los lavados adecuados, se observó dicho órgano, para identificar el ventrículo izquierdo, que es el tejido de interés, para dicha selección primero se cortó las aurículas como se observa en la Figura 3.60a, y nuevamente se realizó un lavado con solución Hank's de tal manera que permitiera la observación de las válvulas cardíacas (ver Figura 3.60b) e identificar la cavidad más grande de los ventrículos, la cual corresponde al izquierdo, por lo tanto se eliminó también el ventrículo derecho. Después de seleccionar solamente el ventrículo izquierdo, se diseccionó en varios tejidos pequeños y posteriormente se realizó seis lavados en viales (ver Figura 3.60c), como lo marca el protocolo, cabe resaltar que la porción de tejido cardíaco depende de la especie, en los 5 ensayos experimentales siempre se obtuvo distintas porciones correspondientes al ventrículo izquierdo.

Finalmente se trituró el tejido diseccionado, hasta que se obtuvieron fragmentos milimétricos, inmediatamente se agregó la Colagenasa preparada, y dicha solución de material celular se vació en un tubo para centrifugar y se introdujo en un baño térmico a 37°C por 5 minutos, para terminar la digestión del tejido. Una vez que transcurrió el tiempo de la digestión, la solución con material celular se dividió en dos tubos como se observa en Figura 3.61a, para ser centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos. Ya que se obtuvo el botón celular con la centrifugadora, se retiró el sobrenadante y se agregó solución Hank's, y

con ayuda de una ligera agitación se vació una cantidad de material celular en una caja Petri (ver Figura 3.61b), la cual se observó mediante un microscopio óptico. Cabe resaltar que el protocolo señala que el material celular debe ser filtrado, sin embargo en los cinco ensayos experimentales, nunca se filtraron las células, a pesar de ello los resultados fueron favorables.

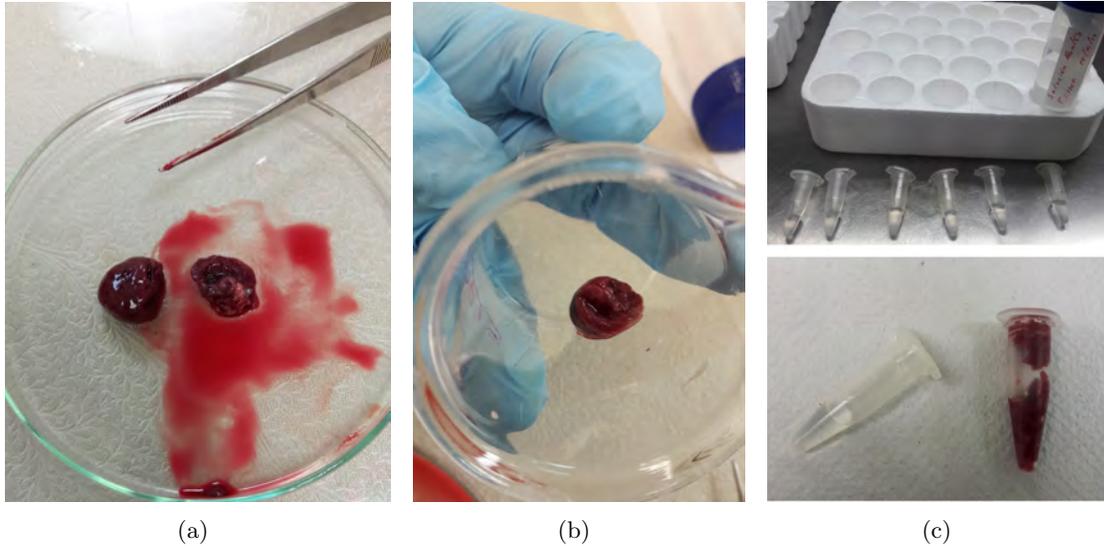


Figura 3.60: Obtención del tejido cardíaco ubicado en el ventrículo izquierdo. a) Para la selección del tejido de interés, se eliminan las aurículas. b) Se realizó lavados para exponer las válvulas cardíacas e identificar la cavidad mayor, que corresponde al ventrículo deseado. c) Finalmente se diseccionó el tejido en varios pedazos y se realizó seis lavados en viales que contenían solución Hank's.

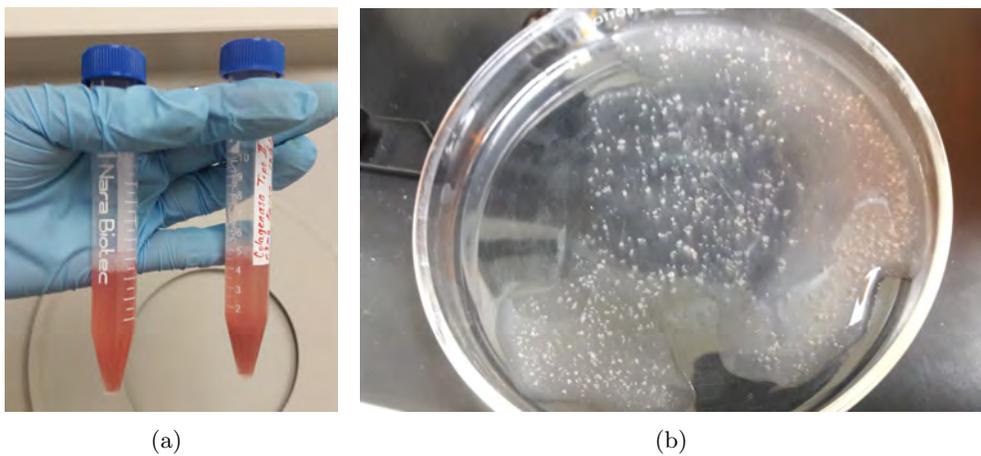


Figura 3.61: Obtención del material celular. a) Después de la trituration y digestión de las células con la Colagenasa, la solución con material celular se dividió en dos tubos para ser centrifugados. b) Posterior a la centrifugación se retiró el sobrenadante y se agregó solución Hank's provocando una ligera agitación, enseguida se vació una cantidad de material celular en una caja Petri para observar los resultados obtenidos.

En la observación del material celular; en los dos primeros ensayos experimentales no se logró apreciar células con la morfología de cardiomiocitos, probablemente a causa de una incorrecta trituration y un

tiempo mayor en la cirugía, ya que en estas prácticas no se presentó contracción después de la extracción, y además las porciones de tejido quedaban con un mayor volumen, lo que no permitían la observación de alguna célula cardíaca.

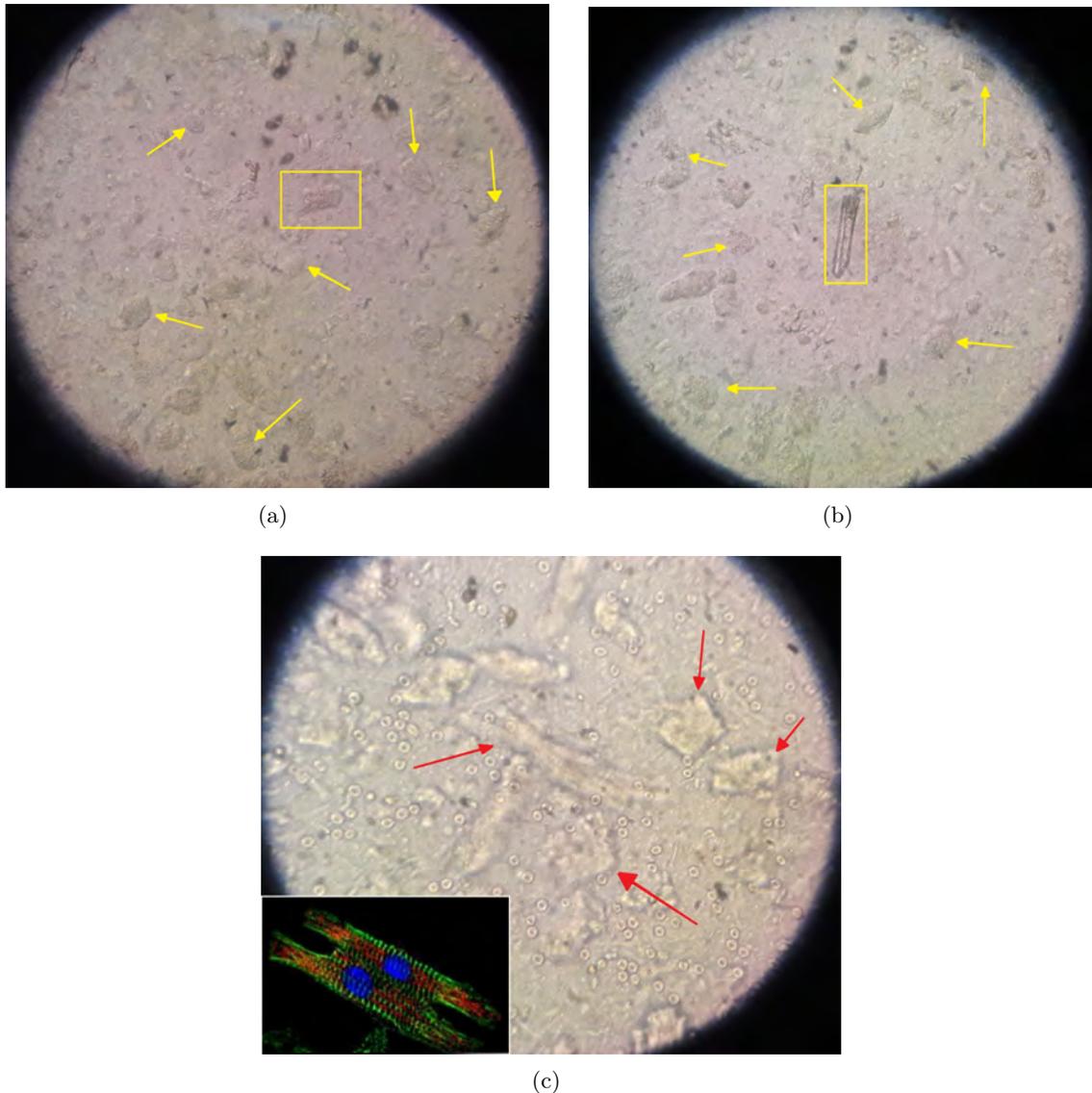


Figura 3.62: Observación de obtención de células cardíacas (Cardiomiocitos). a) Resultados del tercer ensayo experimental; la célula estriada observada dentro del recuadro amarillo, asemeja más su morfología con las células cardíacas, las células estriadas señaladas con flechas amarillas, presentan daño severo en su membrana celular, posiblemente al incorrecto manejo en su digestión. b) Resultados del cuarto ensayo experimental; se continuó observando células estriadas con daño en su membrana celular, sin embargo gracias a los cuidados que se hicieron al momento de la extracción celular, se encontró una célula alargada y sin daño en su membrana, presentando una morfología más parecida a la de un cardiomiocito. c) Resultados del último ensayo experimental; al mejorar el tiempo en el proceso quirúrgico y digestión, se observó células estriadas sin daño en su membrana, conservando una estructura mejor definida, además al centro de la imagen se logró apreciar una célula presentando la misma morfología de un cardiomiocito (imagen confocal del recuadro), lo cual es un excelente resultado.

En la tercer práctica, el tiempo en la cirugía disminuyó y además se trituró más al tejido celular; el

resultado fueron tipos celulares estriados, característica primordial en las células cardíacas, sin embargo la morfología de estructuras rectangulares alargadas no se observó, en la Figura 3.62a se muestra el resultado obtenido de la tercer práctica, donde se aprecia una célula en forma de cuadrado (recuadro amarillo), que puede interpretarse como un cardiomiocito, ya que conserva un poco más la morfología a este tipo de células, no obstante a los alrededores se perciben células con membrana celular muy dañada (flechas amarillas), lo cual se asocia a una exagerada trituración y llegando a lastimar la membrana celular con la digestión de la Colagenasa.

Con la anterior experiencia, se procesó la cuarta práctica con más cuidado, además el procedimiento quirúrgico se realizó más rápido, y en la trituración y digestión se procuró no dañar tanto al material celular, lo que permitió obtener mejores resultados los cuales se muestran en la Figura 3.62b, donde se observó una célula alargada pero muy poco estriada señalada en el recuadro amarillo, además al igual que en los resultados de la tercer práctica, se logró apreciar células estriadas a los alrededores pero siguieron presentando un daño severo en su membrana celular, éstas células se encuentran señaladas en la imagen con flechas amarillas.

Los resultados que se obtuvieron en los cuatro ensayos son buenos, sin embargo sería preferible la obtención de una gran concentración de células cardíacas, con características de éstas sin presentar daños en su membrana, por lo tanto, el quinto ensayo experimental se enfocó en mejorar el tiempo en la cirugía y realizar el tiempo de la digestión de forma más rápido para tener resultados más concretos. Dichos resultados se muestran en la Figura 3.62c, donde se observó que la estructura en la membrana se aprecia mejor definida, las células que se observan estriadas, conservan una forma cuadrada, además al centro de la imagen se encuentra una estructura estriada y en forma rectangular alargada, similar a la estructura celular que se encuentran en la parte inferior de la imagen (observada con microscopia confocal), indicando exactamente la morfología de una célula cardíaca, mejor conocida como cardiomiocito. Sin duda la práctica para la extracción celular de algún órgano, ayuda a mejorar los resultados, como fue en el quinto ensayo, en el que se encontró excelentes resultados, a pesar de la mínima cantidad de células relacionadas con cardiomiocitos.

Bibliografía

- [1] Idalba A Hidalgo, Jorge Ramírez, Marcos A Sabino, and Alejandro J Müller. Obtención de estructuras tipo andamio de poli (ácido) láctico para bioingeniería mediante electrospinning. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, pages 28–29, 2011.
- [2] Poliacido láctico (PLA). <http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.mx/2011/08/poliacido-lactico-pla.html?m=1.m>. *Tecnología de los plásticos*, Consultada el 20/02/2018.
- [3] C. Ramírez Herrera. Estudio estructural y síntesis de poliésteres mediante el uso de extensores de cadena. Tesis de maestría, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Unidad Altamira. Instituto Politécnico Nacional, Enero 2014.
- [4] Formhals Anton. Process and apparatus for preparing artificial threads, October 2 1934. US Patent 1,975,504.
- [5] X. Heron Gutiérrez. Diseño y construcción de un dispositivo versátil para la caracterización y/o estímulo mecánico de biomateriales y tejidos. Tesis de maestría, Ingeniería Biomédica. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Junio 2015.
- [6] N. Islas Arteaga. Andamios generados mediante electrohilado, modificados por plasma y evaluados mecánicamente para la regeneración de tejido cartilaginoso articular. Tesis de maestría, Ingeniería Biomédica. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Abril 2014.
- [7] M. Guadalupe Flores. Interacción de nanopartículas de polipirrol sintetizadas por plasma con líneas celulares para aplicaciones biomédicas. Tesis de maestría, Ingeniería Biomédica. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mayo 2015.
- [8] Israel Morales Reyes. Diseño y caracterización de interfaz células neuronales substrato metálico a través de una película de nanotubos de carbono. Tesis de maestría, Ingeniería Biomédica. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 2009.
- [9] Manuel Quiroz Flores. <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/141641/manual-procedimientos-quirurgicos.pdf?sequence=1>. *Manual esquemático de procedimientos quirúrgicos para fisiología.*, Consultada el 10/01/2018.
- [10] Ficha técnica del poli(ácido láctico). <http://www.promaplast.com/uploads/ingeo%203251d.pdf>. *Ingeo Biopolymer 3251D*, Consultada el 28/09/2016.
- [11] Hoja de seguridad del Cloroformo. http://proveedorcientifico.mx/index.php?controller=attachment&id_attachment=71. *J. T. Baker, 9180-02*, Consultada el 30/09/2016.
- [12] Hoja de seguridad del Alcohol Etilico. <http://www.lco.cl/operations/safety-and-health/technical-info/safety-data-sheets/ficha%20seguridad%20alcohol> *J. T. Baker, 9000-03*, Consultada el 30/09/2016.

- [13] Lesiak Stobinski, B Lesiak, L Kövér, J Tóth, S Biniak, G Trykowski, and Jarosław Judek. Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the ftir and electron spectroscopy methods. *Journal of Alloys and Compounds*, 501(1):77–84, 2010.
- [14] Muataz Ali Atieh, Omer Yehya Bakather, Bassam Al-Tawbini, Alaadin A Bukhari, Faraj Ahmad Abuilawi, and Mohamed B Fettouhi. Effect of carboxylic functional group functionalized on carbon nanotubes surface on the removal of lead from water. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2010, 2010.
- [15] Mahananda Baro, Amreen A Hussain, and Arup R Pal. Enhanced light sensing performance of a hybrid device developed using as-grown vertically aligned multiwalled carbon nanotubes on tco substrates. *RSC Advances*, 4(87):46970–46975, 2014.
- [16] Joseph M Lane, Brian Hurson, PATRICK J Boland, and DALE B Glasser. Osteogenic sarcoma. *Clinical orthopaedics and related research*, (204):93–110, 1986.
- [17] Jeffrey A Hubbell. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Current opinion in biotechnology*, 14(5):551–558, 2003.
- [18] Wan-Ju Li, Cato T Laurencin, Edward J Caterson, Rocky S Tuan, and Frank K Ko. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 60(4):613–621, 2002.
- [19] Xinhua Zong, Harold Bien, Chiung-Yin Chung, Lihong Yin, Dufei Fang, Benjamin S Hsiao, Benjamin Chu, and Emilia Entcheva. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials*, 26(26):5330–5338, 2005.
- [20] R Langer and JP Vacanti. Tissue engineering. science 260: 920-926. *TISSUE ENGINEERING: THE UNION OF BIOLOGY AND ENGINEERING*, 98, 1993.
- [21] Mahboubeh Kabiri, Masoud Soleimani, Iman Shabani, Kathryn Futrega, Naser Ghaemi, Hana Hanaee Ahvaz, Elahe Elahi, and Michael R Doran. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells on conductive nanofiber scaffolds. *Biotechnology letters*, 34(7):1357–1365, 2012.
- [22] Valentina Martinelli, Giada Cellot, Francesca Maria Toma, Carlin S Long, John H Caldwell, Lorena Zentilin, Mauro Giacca, Antonio Turco, Maurizio Prato, Laura Ballerini, et al. Carbon nanotubes instruct physiological growth and functionally mature syncytia: nongenetic engineering of cardiac myocytes. *ACS nano*, 7(7):5746–5756, 2013.
- [23] GF Falke and Anthony Atala. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch Argent Pediatr*, 98(2):103–105, 2000.
- [24] F Blanco García and M Gimeno Longas. Terapia celular para reparar cartílago. *Revista Española de Reumatología*, 32(1):18–21, 2005.
- [25] Yoko Tanaka, Hisayo Yamaoka, Satoru Nishizawa, Satoru Nagata, Toru Ogasawara, Yukiyo Asawa, Yuko Fujihara, Tsuyoshi Takato, and Kazuto Hoshi. The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage. *Biomaterials*, 31(16):4506–4516, 2010.
- [26] Meital Zilberman. *Active implants and scaffolds for tissue regeneration*. Springer, 2011.
- [27] C. Pelegay Salas. Caracterización de biomateriales compuestos para uso en ingeniería de tejidos. Proyecto fin de carrera, Escuela de Ingeniería y Arquitectura. Universidad Zaragoza, Diciembre 2012.

- [28] I. Patricia Mollega Mainsard, Alejandro Müller, and Vittoria Balsamo. Caracterización y biodegradación de mezclas de policaprolactona y poliácido láctico con almidón de yuca. 2008.
- [29] Kay C Dee, DA Puleo, and R Bizios. An introduction to tissue-biomaterial interactions. 2002.
- [30] E Álvarez, PL Ripoll, A Restrepo, and F Forriol. Revisión de la reparación del cartílago. posibilidades y resultados. *Trauma (Majadahonda)*, pages 117–134, 2010.
- [31] M. Guadalupe Flores. Fabricación y caracterización biológica de matrices compuestas de ácido poliláctico-hidroxiapatita cubiertas con polipirrol para su uso como andamios en tejido óseo. Tesis de maestría, Ingeniería Biomédica. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Septiembre 2012.
- [32] Iman Shabani, Vahid Haddadi-Asl, Ehsan Seyedjafari, and Masoud Soleimani. Cellular infiltration on nanofibrous scaffolds using a modified electrospinning technique. *Biochemical and biophysical research communications*, 423(1):50–54, 2012.
- [33] Seth D McCullen, Kelly L Stano, Derrick R Stevens, Wesley A Roberts, Nancy A Monteiro-Riviere, Laura I Clarke, and Russell E Gorga. Development, optimization, and characterization of electrospun poly (lactic acid) nanofibers containing multi-walled carbon nanotubes. *Journal of applied polymer science*, 105(3):1668–1678, 2007.
- [34] Zheng-Ming Huang, Y-Z Zhang, M Kotaki, and S Ramakrishna. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites science and technology*, 63(15):2223–2253, 2003.
- [35] Xinhua Zong, Kwangsok Kim, Dufei Fang, Shaofeng Ran, Benjamin S Hsiao, and Benjamin Chu. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*, 43(16):4403–4412, 2002.
- [36] Avinash Baji, Yiu-Wing Mai, Shing-Chung Wong, Mojtaba Abtahi, and Pei Chen. Electrospinning of polymer nanofibers: effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites science and technology*, 70(5):703–718, 2010.
- [37] J Lannutti, Darrell Reneker, Tea Ma, D Tomasko, and D Farson. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 27(3):504–509, 2007.
- [38] J Calderón, R Martínez, and A Harold. Obtención de fibras poliméricas a partir de la técnica de “electrospinning” para aplicaciones biomédicas. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Occidente, 2013.
- [39] Joseph M Deitzel, James Kleinmeyer, DEA Harris, and NC Beck Tan. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 42(1):261–272, 2001.
- [40] SH Tan, Ryuji Inai, Masaya Kotaki, and Seeram Ramakrishna. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer*, 46(16):6128–6134, 2005.
- [41] T Song, YZ Zhang, and TJ Zhou. Fabrication of magnetic composite nanofibers of poly (ϵ -caprolactone) with fept nanoparticles by coaxial electrospinning. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 303(2):e286–e289, 2006.
- [42] Haiying Wang, Xiaofeng Lu, Yiyang Zhao, and Ce Wang. Preparation and characterization of zns: Cu/pva composite nanofibers via electrospinning. *Materials Letters*, 60(20):2480–2484, 2006.
- [43] Marisela Maubert, Laura Soto, Ana Ma León, and Jorge Flores. Nanotubos de carbono-la era de la nanotecnología. *Razón y palabra*, 14(68), 2009.

- [44] Gabriel A Silva. Nanotechnology approaches for the regeneration and neuroprotection of the central nervous system. *Surgical Neurology*, 63(4):301–306, 2005.
- [45] Armando Almendárez-Camarillo and José Amir González-Calderón. Nanomateriales: su crecimiento, caracterización estructural y tendencias, 2011.
- [46] Víctor J Cruz-Delgado, Carlos A Ávila-Orta, Odilia Pérez-Camacho, Maricela García-Zamora, Víctor E Comparán-Padilla, and Francisco J Medellín-Rodríguez. Funcionalización de nanotubos de carbono para la preparación de nanocompuestos poliméricos. *Ide@s Concyteg*, 6(72):679–697, 2011.
- [47] AB Kaiser, KJ Challis, GC McIntosh, GT Kim, HY Yu, JG Park, SH Jhang, and YW Park. Frequency and field dependent conductivity of carbon nanotube networks. *Current Applied Physics*, 2(2):163–166, 2002.
- [48] Jonathan N Coleman, Umar Khan, Werner J Blau, and Yurii K Gun'ko. Small but strong: a review of the mechanical properties of carbon nanotube–polymer composites. *Carbon*, 44(9):1624–1652, 2006.
- [49] Jian Chen, Mark A Hamon, Hui Hu, Yongsheng Chen, Apparao M Rao, Peter C Eklund, and Robert C Haddon. Solution properties of single-walled carbon nanotubes. *Science*, 282(5386):95–98, 1998.
- [50] Rodney Andrews, David Jacques, Dali Qian, and Terry Rantell. Multiwall carbon nanotubes: synthesis and application. *Accounts of chemical research*, 35(12):1008–1017, 2002.
- [51] PM Ajayan. Nanotubes from carbon. *Chemical reviews*, 99(7):1787–1800, 1999.
- [52] Michael J Dykstra and Laura E Reuss. *Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting*. Springer Science & Business Media, 2011.
- [53] David I Bower. *An introduction to polymer physics*. Cambridge University Press, 2002.
- [54] Núria Ferrer. Practical fourier transform infrared spectroscopy. industrial and laboratory chemical analysis: John r. ferraro and k. krishnan (eds.), academic press, new york, 1990 (isbn 0-12-254125-1). 534 pp., 1994.
- [55] Técnicas de muestreo de FTIR: Reflectancia Total Atenuada (ATR). <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-attenuated-total-reflection-atr.html>. *TermoFisher Scientific*, Consultada el 16/03/2017.
- [56] www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6887/03Rpp03de11.pdf. Capítulo 1: Fundamentos de espectroscopía raman. *R. Pérez Pueyo*, Consultada el 23/04/2017.
- [57] Georg Placzek. *Rayleigh-streuung und Raman-effekt*, volume 2. Akad. Verlag-Ges., 1934.
- [58] Bernard Dennis Cullity. Elements of x-ray diffraction. page 514, 2001.
- [59] Lesley E Smart and Elaine A Moore. *Solid state chemistry: an introduction*. CRC press, 2012.
- [60] H Cortes, P Martínez, and H Valencia. Fundamentos de cristalografía. *Editorial Elizcom, Armenia, Colombia*, page 112, 2006.
- [61] FJ Balta-Calleja and CG Vonk. *X-ray scattering of synthetic polymers*, volume 8. Elsevier Science Ltd, 1989.

- [62] M Isabel Lasanta Carrasco. *Estudio de adiciones de bismuto en aleaciones zinc-aluminio*. PhD thesis, Universidad Complutense de Madrid, 2013.
- [63] Santiago Suriñach, S Baró, S Bordas, N Clavaguera, and MT Clavaguera-Mora. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la ciencia de materiales. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 1992, vol. 31, num. 1, p. 11-17, 1992.
- [64] RI Freshney. *Biology of the cell cultured-culture of animal cells*. Ed, Nueva York, 1987.
- [65] Johan Astermark, Jan y Stenflo. The epidermal growth factor-like domains of factor ix. effect on blood clotting and endothelial cell binding of a fragment containing the epidermal growth factor-like domains linked to the gama-carboxyglutamic acid region. *Journal of Biological Chemistry*, 266(4):2438–2443, 1991.
- [66] Francesc Cardellach, Theodore F Taraschi, John S Ellingson, Christopher D Stubbs, Emanuek Rubin, and Jan B Hoek. Maintenance of structural and functional characteristics of skeletal-muscle mitochondria and sarcoplasmic-reticular membranes after chronic ethanol treatment. *Biochemical journal*, 274(2):565–573, 1991.
- [67] Rose G Harrison, MJ Greenman, Franklin P Mall, and CM Jackson. Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*, 1(5):116–128, 1907.
- [68] Alexis Carrel. On the permanent life of tissues outside of the organism. *Journal of Experimental Medicine*, 15(5):516–528, 1912.
- [69] M Taub. The use of defined media in cell and tissue culture. *Toxicology in vitro*, 4(3):213–225, 1990.
- [70] Carlos Eduardo Núñez Comentarios sobre solventes y solubilidades de sustancias orgánicas. www.cenunez.com.ar/archivos/51-comentariossobresolventesy solubilidades.pdf. *Texto libre*, 2017., Consultada el 04/01/2018.
- [71] Yanming Cai, Jungang Lv, and Jimin Feng. Spectral characterization of four kinds of biodegradable plastics: poly (lactic acid), poly (butylenes adipate-co-terephthalate), poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly (butylenes succinate) with ftir and raman spectroscopy. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(1):108–114, 2013.
- [72] J Ahmed, J-X Zhang, Z Song, and SK Varshney. Thermal properties of polylactides. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 95(3):957–964, 2009.
- [73] Hideto Tsuji. *Poly (lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and applications*. Wiley, 2011.
- [74] Peter Larkin. *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Elsevier, 2017.
- [75] Christopher A Schuh. Nanoindentation studies of materials. *Materials today*, 9(5):32–40, 2006.
- [76] RI Freshney. In book *Culture of animal cells*. Wiley-Liss. Inc.: New York, 2000.
- [77] Nicole Alessandri-Haber, Christophe Paillart, Christine Arsac, Maurice Gola, François Couraud, and Marcel Crest. Specific distribution of sodium channels in axons of rat embryo spinal motoneurons. *The Journal of physiology*, 518(1):203–214, 1999.
- [78] Zúñiga Aguilar Esmeralda Sarai. Desarrollo y caracterización de un modelo de unión neuromuscular empleando técnicas de co cultivos celulares. Tesis de maestría, Ingeniería Biomédica. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Octubre 2009.

- [79] Bernd Hamprecht, Thomas Glaser, Georg Reiser, Ernst Bayer, and Friedrich Propst. [26] culture and characteristics of hormone-responsive neuroblastoma x glioma hybrid cells. In *Methods in enzymology*, volume 109, pages 316–341. Elsevier, 1985.
- [80] Sigma-Aldrich Cabon Nanotubes. <https://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html?tablepage=16376687>. *Nanomaterials*, Consultada el 15/10/2016.
- [81] G Kister, G Cassanas, and M Vert. Effects of morphology, conformation and configuration on the ir and raman spectra of various poly (lactic acid) s. *Polymer*, 39(2):267–273, 1998.
- [82] Alejandro Ansón Casaos. *Nanotubos de carbono: estructura porosa y sus implicaciones en el campo de la energía*. PhD thesis, Universidad de Zaragoza, 2005.
- [83] Davide Brizzolara, Hans-Joachim Cantow, Kay Diederichs, Egbert Keller, and Abraham J Domb. Mechanism of the stereocomplex formation between enantiomeric poly (lactide) s. *Macromolecules*, 29(1):191–197, 1996.
- [84] L-T Lim, R Auras, and M1 Rubino. Processing technologies for poly (lactic acid). *Progress in polymer science*, 33(8):820–852, 2008.
- [85] Chi-Yuan Hung, Cheng-Chien Wang, and Chuh-Yung Chen. Enhanced the thermal stability and crystallinity of polylactic acid (pla) by incorporated reactive ps-b-pmma-b-pgma and ps-b-pgma block copolymers as chain extenders. *Polymer*, 54(7):1860–1866, 2013.
- [86] Mohamed A Abdelwahab, Allison Flynn, Bor-Sen Chiou, Syed Imam, William Orts, and Emo Chie-llini. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized pla-phb blends. *Polymer Degradation and Stability*, 97(9):1822–1828, 2012.
- [87] Lijun Qin, Jianhui Qiu, Mingzhu Liu, Shenglong Ding, Liang Shao, Shaoyu Lü, Guohong Zhang, Yang Zhao, and Xie Fu. Mechanical and thermal properties of poly (lactic acid) composites with rice straw fiber modified by poly (butyl acrylate). *Chemical Engineering Journal*, 166(2):772–778, 2011.
- [88] Edna S Kaneshiro, Michael A Wyder, Yi-Ping Wu, and Melanie T Cushion. Reliability of calcein acetoxy methyl ester and ethidium homodimer or propidium iodide for viability assessment of microbes. *Journal of microbiological methods*, 17(1):1–16, 1993.