



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Básicas e Ingenierías

**“Andamios electrohilados de Polihidroxitirato (PHB),
para su uso en ingeniería de Tejidos”**

TESIS

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Física)

Presenta:

Fis. Emma Cortés Ortiz

Dirigida por: Dr. Juan Morales Corona

Jurado Calificador:

Presidente: Dr. Gerardo Muñoz Hernández

Secretario: Dr. Juan Morales Corona

Vocal: Dra. Miriam Verónica Flores Merino

Ciudad de México; Enero 10 2019

Agradecimientos

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

A mi asesor el Dr. Juan Morales Corona por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación bajo su dirección, así como su apoyo académico durante la realización de este proyecto, las aportaciones y correcciones para mejorar mi trabajo de investigación.

Al Dr. Roberto Olayo González así como al Dr. Roberto Olayo Valles por sus aportaciones y correcciones a este trabajo. Al Dr. Israel Morales y al Mtro. Omar E. Uribe por el tiempo dedicado a guiarme en el uso del microscopio confocal-raman y la realización de cultivo celular *in vitro*. A la Mtra. Erika Fragoso y a la Ing. Joselyn Alvarado por la ayuda brindada en alguna de las caracterizaciones, agradezco su tiempo y disponibilidad.

De manera personal agradezco a mi familia y a Valente Zecua Ramírez por todo su apoyo incondicional, gracias por creer siempre en mí.

Agradezco a todas la persona que estuvieron conmigo de alguna manera durante este proceso de vida académica, gracias a todos por ser parte ser este proceso.

ÍNDICE

Lista de tablas	V
Lista de figuras	VI
Lista de abreviaturas	VIII
Resumen	VIII
Introducción	X

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS

1.1	Biomateriales e Ingeniería de Tejidos	1
1.1.2	Polímeros Biodegradables	2
1.1.2.1	Clasificación de Polímeros	2
1.1.3	PHAs: Generalidades PHB	5
1.2	Técnica de Electrohilado	7
1.2.1	Generalidades	7
1.2.2	Descripción del Proceso	9
1.2.3	Etapas del Proceso de Electrohilado	11
1.2.4	Parámetros del Electrohilado	12
1.2.5	Parámetros de la Solución	13
1.2.6	Parámetros del Proceso	14
1.2.7	Parámetros Ambientales	18
1.3	Plasma	20
1.3.1	Plasma de bajas energías	21
1.3.2	Polimerización por Plasma de descargas luminiscentes	21
1.3.3	Polimerización por plasma	23
1.3.4	Pirrol	24
1.3.5	Dopante	25
1.4	Técnicas de Caracterización	25
1.4.1	Técnicas de Espectroscopia vibracional	25
1.4.1.1	Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)	26
1.4.1.2	Microscopia Raman	29
1.4.2	Cristalografía de rayos X	31
1.4.2.1	Difracción de Rayos X	31
1.4.3	Caracterización Térmica	34
1.4.3.1	Calorimetría Diferencial de Barrido	35
1.4.4	Tensión y energía superficial (Propiedades de mojado)	37
1.4.4.1	Ángulo de Contacto	37
1.4.4.2	Ángulo de Contacto Dinámico	40
1.4.5	Caracterización Morfológica	40
1.4.5.1	Microscopia Electrónica de Barrido	41
1.5	Cultivos celulares	43
1.5.1	Tipos de Cultivo Celular	43
1.5.2	Medios de Cultivo	45
1.5.3	Conteo celular	45
1.5.4	Caracterización Biológica	46

Hipótesis	47
Objetivos	47
Objetivo Particular	47
Objetivos Específicos	47

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1	Materiales	48
2.2	Método Experimental	51
2.2.1	Preparación de Muestras Poliméricas	51
2.2.2	Proceso de Electrohilado	52
2.3	Polimerización por Plasma	53
2.4	Técnicas de Espectroscopia Vibracional	55
2.4.1	Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)	55
2.4.2	Microscopia Confocal- Raman	56
2.5	Cristalografía de rayos X	58
2.5.1	Difracción de Rayos X (DRX)	58
2.6	Caracterización Térmica	59
2.6.1	Calorimetría Diferencial de Barrido	59
2.7	Tensión y energía superficial (Propiedades de mojado)	60
2.7.1	Ángulo de Contacto	60
2.8	Caracterización Morfológica	61
2.8.1	Microscopia Electrónica de Barrido	61
2.9	Cultivos Celulares	62
2.9.1	Línea celular Rin-M	63
2.9.2	Cultivo celular sobre los andamios	63
2.9.3	Viabilidad Celular	64

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1	Razón de inyección & Microscopia Electrónica de Barrido	65
3.2	Polimerización por Plasma	71
3.3	Técnicas de Espectroscopia Vibracional	73
3.3.1	Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)	73
3.3.2	Microscopia Confocal- Raman	76
3.4	Cristalografía de rayos X	80
3.4.1	Difracción de Rayos X (DRX)	80
3.5	Caracterización Térmica	81
3.5.1	Calorimetría Diferencial de Barrido	81
3.6	Tensión y energía superficial (Propiedades de mojado)	86
3.6.1	Ángulo de Contacto	86
3.7	Cultivos Celulares	89
3.7.1	Cultivos Celulares sobre los andamios de PHB	89
3.7.2	Viabilidad Celular	99

CAPÍTULO 4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	101
Bibliografía	104
Apéndice A Calceína-AM y Homodímero de Etidio-1	111

LISTA DE TABLAS

1.1	Propiedades de los principales solventes utilizados en la técnica de electrohilado	19
1.2	Características de descargas luminiscentes a nivel laboratorio e industrial	22
2.1	Propiedades del PHB	49
2.2	Propiedades del Cloroformo	49
2.3	Propiedades del Alcohol Etílico	49
2.4	Propiedades del Pirrol	50
2.5	Propiedades del Yodo	50
2.6	Parámetros de los tres diferentes electrohilados	53
3.1	Bandas características atribuidas a los andamios electrohilados de PHB	73

LISTA DE FIGURAS

1.1	Clasificación de Polímeros	4
1.2	Molécula de PHB	6
1.3	Estructura PHA	7
1.4	Aparato de electrohilado (Patentado por Formhals)	9
1.5	Diseño básico de un aparato de electrohilado y partes del equipo. [17]	10
1.6	Efecto de la velocidad de infusión, concentración y tensión aplicado en la morfología de las fibras electrohiladas [27]	16
1.7	Estados de la materia en función de la temperatura	20
1.8	Plasma luminiscente	21
1.9	Acoplamiento resistivo, electrodos en el interior del reactor	22
1.10	Esquema del espectrómetro Infrarrojo por Transformada de Fourier	27
1.11	Dispersion Rayleigh, Dispersion Raman y Dispersion Raman Anti-Stokes	30
1.12	Tipos de Dispersiones	30
1.13	Esquema de funciones y montaje de un difractor	32
1.14	Representación de la Ley de Bragg	33
1.15	Generación de rayos X	34
1.16	Esquema básico de un montaje del calorímetro	36
1.17	Esquema representando el ángulo formado entre la interfaz sólido-líquido y la interfaz líquido-vapor y el vértice en el que las interfaces se encuentran constituye el ángulo de contacto	38
1.18	Esquema representando los ángulos de contacto de una superficie hidrofóbica e hidrofílica y las distintas propiedades de las mismas	39
1.19	Representación de la columna del Microscopio Electrónico de Barrido	42
1.20	Etapas de un cultivo celular	44
1.21	Cámara de Neubauer (izquierda) y esquema de la cuadrícula utilizada para el recuento de células (derecha)	46
2.1	(a) Soluciones poliméricas colocadas sobre la plancha térmica, (b) soluciones de PHB listas para electrohilar	51
2.2	Máquina de Electrohilado	52
2.3	Esquema del reactor de plasma	53
2.4	Muestras de Fibras Electrohiladas de PHB dentro del reactor de plasma	54
2.5	Espectrómetro Infrarrojo por transformada de Fourier empleando el dispositivo de ATR	56
2.6	Microscopio Confocal-Raman	57
2.7	Difractor de Rayos X	58
2.8	Equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido	60
2.9	Microscopio Electrónico de Barrido	62
2.10	Equipo para recubrimiento de oro	62
3.1	Microfotografías obtenidas por SEM (a),(b),(c) y (d) diámetro de las fibras; del andamio de PHB con una razón de inyección de 10 ml/h	66
3.2	Microfotografías obtenidas por SEM (a),(b),(c) y (d) diámetro de las fibras; del andamio de PHB con una razón de inyección de 5 ml/h	68
3.3	Microfotografías obtenidas por SEM (a),(b),(c) y (d) diámetro de las fibras; del andamio de PHB con una razón de inyección de 3 ml/h	70
3.4	Microfotografías obtenidas por SEM (a),(b),(c) y (d) diámetro de las fibras; del andamio de PHB-PPy-I	72

3.5	Espectros FTIR-ATR: (a),(b) y (c) espectros de infrarrojo de los andamios electrohilados de PHB, (d) espectro de infrarrojo del andamio de PHB polimerizado con PPy-I	75
3.6	Espectros RAMAN de los andamios de PHB. (a) andamio electrohilado a 10 ml/h, (b) andamio electrohilado a 5 ml/h,(c) andamio electrohilado a 3 ml/h y (d) andamio polimerizado con PPy-I	78
3.7	Imágenes Confocal de los andamios de PHB. (a) andamio electrohilado a 10 ml/h, (b) andamio electrohilado a 5 ml/h, (c) andamio electrohilado a 3 ml/h y (d) andamio polimerizado con PPy-I	79
3.8	Patrón de difracción de DRX de los andamios de PHB	81
3.9	Termogramas obtenidos por DSC del primer calentamiento de los andamios de PHB. (a) PHB a 10 ml/h, (b) PHB a 5 ml/h, (c) PHB a 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I	82
3.10	Termogramas obtenidos por DSC de cristalización de los andamios de PHB. (a) PHB a 10 ml/h, (b) PHB a 5 ml/h, (c) PHB a 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I	84
3.11	Termogramas obtenidos por DSC del segundo calentamiento de los andamios de PHB. (a) PHB a 10 ml/h, (b) PHB a 5 ml/h, (c) PHB a 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I	85
3.12	(a) Ángulo de contacto del andamio de PHB a 10 ml/h, (b) Ángulo de contacto del andamio de PHB a 5 ml/h	86
3.13	(c) Ángulo de contacto del andamio de PHB a 3 ml/h, (d) Ángulo de contacto del andamio de PHB polimerizado	87
3.14	Fotografías ópticas del primer día de cultivo de células beta Rin-M sobre los andamios de PHB; (a) 10 ml/h, (b) 5 ml/h, (c) 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I	90
3.15	Fotografías ópticas del cuarto día de cultivo de células beta Rin-M sobre los andamios de PHB; (a) 10 ml/h, (b) 5 ml/h, (c) 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I	91
3.16	Fotografías ópticas del sexto día de cultivo de células beta Rin-M sobre los andamios de PHB; (a) 10 ml/h, (b) 5 ml/h, (c) 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I	93
3.17	Fotografías ópticas del octavo día de cultivo de células beta Rin-M sobre los andamios de PHB; (a) 10 ml/h, (b) 5 ml/h, (c) 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I	95
3.18	Fotografías ópticas del décimo día de cultivo de células beta Rin-M sobre los andamios de PHB; (a) 10 ml/h, (b) 5 ml/h, (c) 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I	97
3.19	Prueba de viabilidad celular en los andamios de PHB; (a) 10 ml/h, (b) 5 ml/h, (c) 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I. Las células vivas se muestran en color verde y las células muertas en color rojo	99
A1.	Molécula de Calceína-AM y Calceína	111
A2.	Molécula de Homodímero de Etidio-1	112

Lista de Abreviaturas

PHAs: Polihidroxicanoatos.

PHB: Polihidroxibutirato.

IT: Ingeniería de Tejidos.

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

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

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

MEC: Matriz extracelular.

PPy: Polipirrol

PPy-I: Polipirrol con Yodo

FBS: Suero Bovino Fetal.

CD: Corriente directa.

RF: Radio frecuencia.

MW: Microondas.

IR: Infrarrojo.

EthD-1: Homodímero de Etidio 1.

CH₂O: Formaldehido.

Resumen

El objetivo del desarrollo de este trabajo de investigación es contribuir al desarrollo de la ingeniería de tejidos, mediante el estudio y caracterización experimental de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de andamios poliméricos conformados por nanofibras de Polihidroxibutirato fabricados con la técnica de electrohilado. Para fabricar las fibras de PHB, se controlaron los parámetros del proceso de electrohilado y se analizó el efecto de la razón de inyección sobre la estructura de las nanofibras, empleando tres razones de inyección diferentes (3, 5 y 10 ml/h).

La estructura microscópica de las nanofibras de PHB se estudió por diferentes técnicas experimentales. La morfología de las nanofibras de PHB se observó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM); mostrando que la mejor razón de inyección para la elaboración de andamios de PHB es de 3 mL/h. Este andamio se empleó para realizar la modificación superficial usando la técnica de polimerización por plasma para obtener un material con mayor biocompatibilidad. Se empleó Poli pirrol dopado con Yodo (PPy-I) para la polimerización, se optó por usar PPy-I porque en estudios previos se mostró que contiene grupos aminos los cuales promueven la adhesión y proliferación celular.

La estructura cristalina se determinó con difracción de rayos X, por medio de calorimetría diferencial de barrido se obtuvieron las temperaturas de fusión y cristalización. Para determinar su composición química se empleó Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier así como microscopia confocal-raman. Para medir su energía superficial (hidrofobicidad) se evaluó el ángulo de contacto.

Para evaluar la viabilidad se realizó un cultivo *in vitro* empleando células Rin-M (células beta células provenientes de islotes pancreáticos), en andamios de PHB con modificación superficial y sin modificación; por un periodo de 10 días. Una vez cumplido el periodo de cultivo se realizó una prueba de biocompatibilidad la cual se realizó con la técnica de inmunofluorescencia muerte/vida (Live/Dead) tiñendo los núcleos de las células de color verde para células vivas y de color rojo para las células muertas.

Introducción

La ingeniería de tejidos es un campo de investigación multidisciplinario cuyo objetivo es desarrollar sustitutos para los órganos y/o tejidos dañados por enfermedad o por accidente. Para lograr tejidos viables es muy importante que el soporte logre realizar las funciones del entorno celular natural, este entorno de las células, es llamado matriz extracelular, está organizado jerárquicamente a partir de complejos compuestos de fibras y proteínas, las cuales sirven a las células para regular todas sus funciones esenciales como migración, adhesión, proliferación y diferenciación.[1]

La ingeniería de tejidos es una alternativa prometedora para la sustitución o reparación de algún órgano o tejido, en donde la función biológica o pérdida en los tejidos del huésped podrá restaurarse y mantenerse mediante la ingeniería de tejidos [2]. Un andamio ideal diseñado con tejido debería ser mecánicamente estable y capaz de funcionar biológicamente en el sitio del implante. La estabilidad mecánica depende principalmente de la selección del biomaterial, el diseño arquitectónico del andamio y las interacciones entre el material y las células [3].

El objetivo final del diseño del andamio es la producción de una estructura ideal que pueda reemplazar la MEC natural hasta que las células anfitrionas puedan repoblar y sintetizar una nueva matriz natural. Para poder lograr este objetivo, el material del andamio debe seleccionarse cuidadosamente, y la arquitectura del andamio debe diseñarse para asegurar que las células cultivadas sean biocompatibles con el andamio diseñado.

La biocompatibilidad se puede clasificar en biocompatibilidad superficial y estructural, que se determinan mediante la selección del material y la arquitectura del andamio, respectivamente. La biocompatibilidad de la superficie se asocia con la química de la superficie del material. Las características químicas de una superficie material mediarán en la adsorción de moléculas biológicas que regulan las actividades celulares, como la adhesión y la migración.

Una técnica para elaborar MEC artificiales y que ha crecido en los últimos años es la técnica de electrospinning o electrohilado, esta técnica permite la elaboración de fibras poliméricas con diámetros que oscilan de nanómetros a micrómetros. Las aplicaciones potenciales del electrohilado incluyen membranas de filtración, nanofibras catalíticas, sensores basados en fibras, y andamios para ingeniería de tejidos.

En este trabajo de investigación se empleó Polihidroxibutirato (PHB), un polímero de origen microbiano para la elaboración y análisis de andamios electrohilados con modificación superficial.

Las nanofibras poliméricas elaboradas por la técnica de electrohilado presentan propiedades físicas, químicas y mecánicas similares a las que poseen algunos tejidos vivos (hueso, cartílago, músculo, venas y arterias), algunas de estas propiedades son: facilitar la adhesión con las células; buena resistencia mecánica que brinda el soporte mecánico durante las primeras etapas de reparación del tejido; posibilidad de funcionalizar su superficie y facilidad para adoptar la forma de un tejido. [4]. Las nanofibras poliméricas presentan propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad, garantiza el soporte de las células durante un período de tiempo, para luego degradarse a medida que se obtiene el nuevo tejido, así como una respuesta biológica favorable del organismo receptor [5].

Capítulo 1

Fundamentos

1.1 Biomateriales e ingeniería de tejidos

Se denomina ingeniería de tejidos o ingeniería tisular (IT) es una ciencia multidisciplinaria, la cual evolucionó del campo de desarrollo de biomateriales y se refiere a la práctica de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. El objetivo principal de la ingeniería de tejidos es reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función de un órgano o tejido. [6]

Normalmente los materiales que se utilizan para IT son andamios porosos que sirven como modelos tridimensionales que proporcionan el soporte necesario para que las células se adhieran, proliferen y mantengan sus funciones específicas, es decir, su fenotipo.

Estos materiales pueden ser de origen natural, como la seda (fabricada por gusanos o arañas), el ácido hialurónico (que se puede extraer de las crestas de gallos), el colágeno (p. ej., de piel de subproductos pesqueros) o el quitosano (del caparazón de los crustáceos). Otros materiales son de origen sintético, como los fosfatos cálcicos que se fabrican para parecerse lo más posible al mineral que forma los huesos, hidroxiapatita, o polímeros tales como los ácidos poliglicólico o poliláctico los cuales no son rechazados por el organismo.

Otro tipo de polímeros empleados son los de origen microbiano como es el caso de los polihidroxialcanoatos (PHAs), polímeros que han demostrado ser biocompatibles, biodegradables y bioabsorbibles. [7].

1.1.2 Polímeros biodegradables

Los polímeros biodegradables y biocompatibles naturales y sintéticos se denominan "biomateriales". Cualquier material, natural o artificial, que aumenta o reemplaza una función que se ha perdido a través de una enfermedad o lesión se conoce como biomaterial. Los polímeros biodegradables se han utilizado ampliamente como parte de aplicaciones biomédicas debido a sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Se ha comprobado que los polímeros biodegradables son materiales versátiles con un gran potencial en el campo biomédico. La tendencia de los biomateriales en el mercado está reflejando el inmenso esfuerzo que se ha mantenido en el desarrollo de estos polímeros. Las aplicaciones en diversos campos, desde las suturas quirúrgicas y el vendaje de heridas hasta la regeneración tisular, la inmovilización de enzimas, el suministro controlado de fármacos. La aparición de los biomateriales a base de polímeros biodegradables conduce al desarrollo de nuevas estrategias para diversas terapias. Se ha mantenido un gran esfuerzo para moldear estos polímeros de acuerdo con la idoneidad en una aplicación particular. [7]

1.1.2.1 Clasificación de polímeros

Los polímeros biodegradables comúnmente se dividen en dos grupos; naturales y sintéticos. Los polímeros de origen sintético presentan ventajas sobre los polímeros naturales con un amplio espectro de aplicaciones, que tienen una capacidad de adaptar las propiedades mecánicas y alterar la tasa de degradación según la necesidad. Mientras que los polímeros naturales parecen ser atractivos debido a su excelente biocompatibilidad [8].

Los polímeros biodegradables ofrecen un gran potencial en diversas aplicaciones como administración de fármacos, ingeniería de tejidos, terapia génica, medicina regenerativa, dispositivos para implantes temporales, recubrimientos en implantes, etcétera [9]. Los criterios básicos para seleccionar un polímero para su uso como biomaterial degradable son hacer coincidir las propiedades mecánicas y la tasa de degradación con las necesidades de la aplicación, productos de degradación no tóxicos, biocompatibilidad, vida útil / estabilidad y costo [10].

Existen varios polímeros disponibles para diferentes aplicaciones (Fig. 1.1) [11], donde la elección del polímero depende de los requisitos que exige un biomaterial particular. Los polímeros encontraron una multitud de usos en la industria médica, comenzando con suturas biodegradables aprobadas por primera vez en 1960 [12].

Los poliésteres que son la clase representativa de polímeros sintéticos biodegradables continúan siendo atractivos en muchas aplicaciones clínicas debido a sus propiedades únicas.

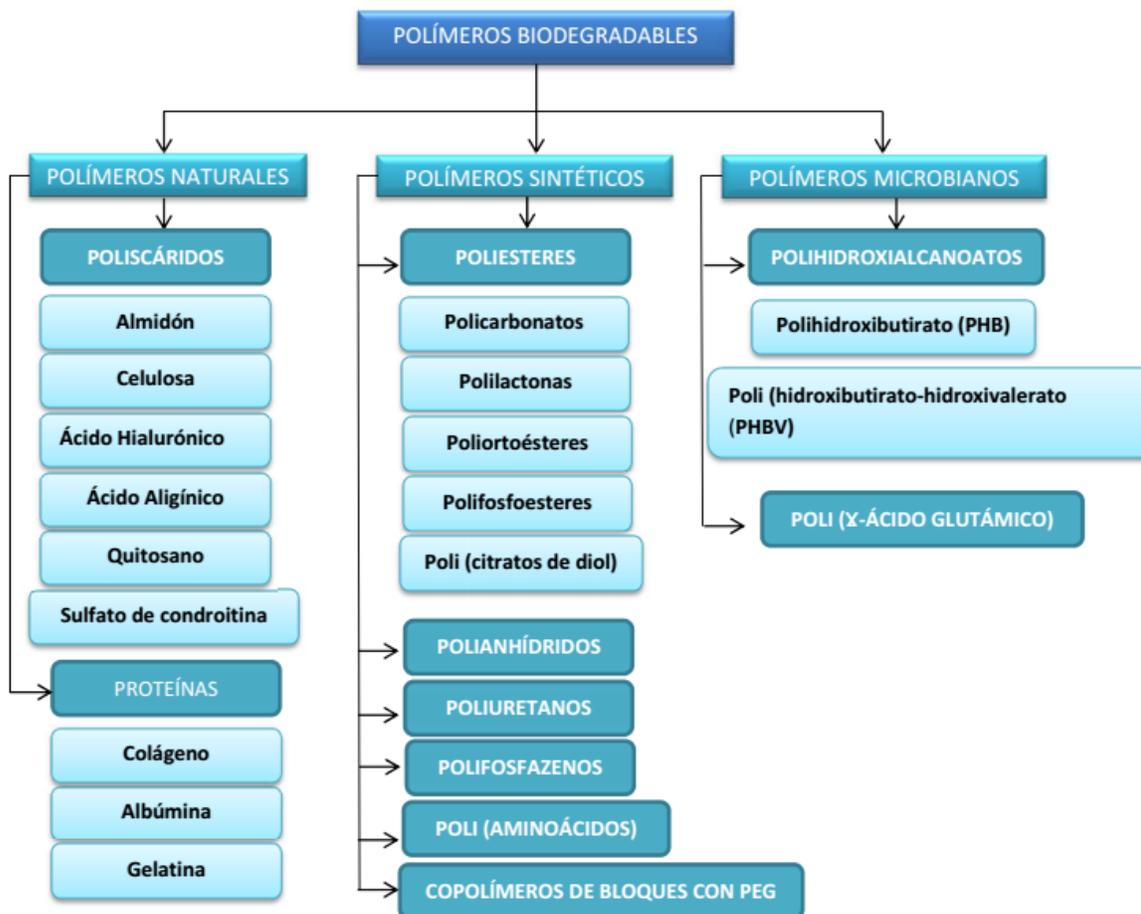


Figura 1.1 Clasificación de polímeros biodegradables [11].

Polímeros naturales

Son todos aquellos que podemos hallar de manera natural, como el almidón, celulosa, etc. Todo lo con lo que estamos en contacto en nuestra vida diaria son polímeros. Los tejidos de nuestro cuerpo, la información genética se transmite mediante un polímero, cuyas unidades estructurales son los ácidos nucleídos. [8].

Polímeros sintéticos

Son los que se obtienen por síntesis ya sea en una industria o en un laboratorio, y están conformados a base de monómeros. Dando mayores ventajas sobre los materiales naturales y los compuestos porque pueden ser diseñados según las propiedades requeridas. Además, éstas pueden ser estimadas teóricamente. [8].

Polímeros microbianos

Los biopolímeros microbianos están presentes en una gran variedad de compuestos, los cuales cubren diversas funciones biológicas en los organismos que los producen, presentando características y propiedades únicas para una amplia variedad de aplicaciones en diversas áreas industriales, médicas y biomédicas. [8].

1.1.3 PHAs: Generalidades PHB

Los Polihidroxicanoatos son biopoliésteres naturales sintetizados intracelularmente por algunos microorganismos como reserva de carbono y energía que, una vez extraídos de la célula, presentan propiedades físicas similares a plásticos derivados del petróleo, son biopoliésteres renovables, biodegradables y biocompatibles; entre ellos se encuentra el Polihidroxibutirato tiene propiedades que le permite tener diversas aplicaciones, entre ellas destaca la aplicación biomédica, esta se debe a su biocompatibilidad con el tejido humano y por ser reabsorbido a una baja velocidad. Cuando este material se implanta en el cuerpo se hidroliza en metabolitos biocompatibles, por lo que se ha usado como hilo para sutura, sustitutos pericárdicos y sistemas de liberación de medicamentos [13].

Hay tres tipos de PHAs con respecto a la longitud de la cadena lateral: (1) ácidos hidroxialcanoicos de longitud de cadena corta, contienen 3-5 átomos de carbono, por ejemplo P3HB (figura 1.2) Polihidroxibutirato, P4HB Poli (4-hidroxibutirato).

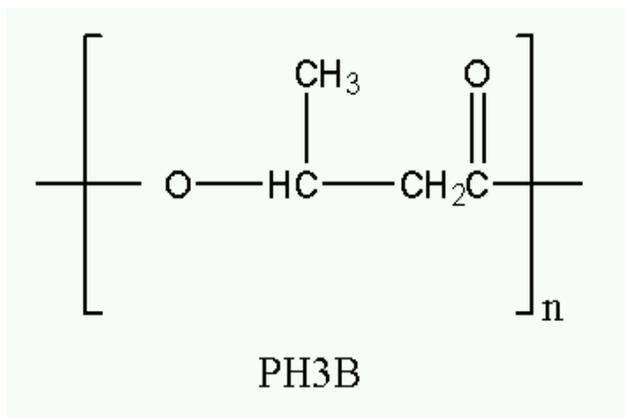


Figura 1.2 Molécula de PHB.

(2) Ácidos hidroxialcanoicos de longitud de cadena media tales con cadena lateral de alquilo [12] contienen 6-14 átomos de carbono, por ejemplo P3HHx, P3HO, P3HD, P3HDD, P3HTD y P3HHD. (3) Polímeros obtenidos a partir de ácidos grasos de cadena larga, que contienen más de 14 átomos de carbono [13].

El principal biopolímero de la familia PHA es el PHB, y muchos copolímeros se sintetizaron en base a PHB. [14] PHB es altamente cristalino (superior al 50%) con un alto punto de fusión de 173-180 ° C, en comparación con otros poliésteres. Los PHA se clasifican generalmente en PHA de longitud de cadena corta (cuatro o cinco carbonos) y PHA de longitud media de cadena (seis o más átomos de carbono). En la figura 2 se observa la estructura química general de un PHA donde el grupo R cambia, dando origen a diferentes polímeros como lo muestra la figura 1.3.

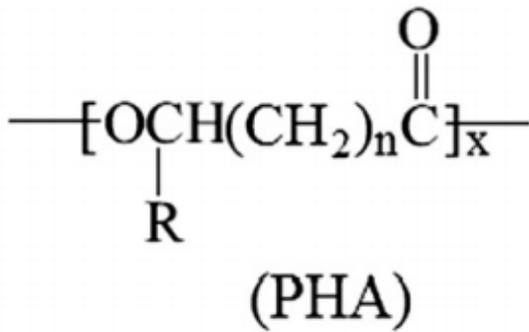


Figura 1.3 Estructura PHA

X=100-3000

n= 1 R=H Poli (3-hidroxiopropionato) (P3HP)

R=Metil Poli (3-hidroxi butirato) (P3HB)

R=Etil Poli (3-hidroxi valerato) (P3HV)

R=Propil Poli (3-hidroxi hexanoato) (P3HHx)

R=Pentilo Poli (3-hidroxi octanoato) (P3HO)

R=Nonil Poli (3-hidroxi dodecanoato) (P3HDD)

n=2 R=H Poli (4-hidroxi butirato) (P4HB)

n=3 R=H Poli (5-hidroxi valerato) (P5HV)

1.2 Técnica de Electrohilado

1.2.1 Generalidades

Mediante la técnica de electrohilado, es posible diseñar materiales ligeros, porosos y con alta superficie específica a partir de nanofibras poliméricas cuyo diámetro, aspecto y morfología puede controlarse de forma sencilla y eficiente. Las aplicaciones de estos materiales están ahora centradas en el campo de la ingeniería de tejidos, aunque son también prometedores los resultados obtenidos en el sector de las energías renovables.

La técnica de electrohilado proviene de los primeros experimentos en 1897 por Zeleny quien evaluó el efecto de inducir cargas eléctricas en chorros de agua, así como la inestabilidad asimétrica del flujo del jet a través del análisis del comportamiento de las gotas de solución en el extremo de un capilar y el inicio del proceso de modelamiento matemático del comportamiento de los fluidos bajo las fuerzas electroestáticas en 1914.

Uno de los trabajos más trascendentales es el desarrollado por el físico británico Sir Geoffrey Ingram Taylor en la década de 1960 el cual contribuyó al esclarecimiento del proceso de electrohilado mediante modelos matemáticos para describir la geometría cónica (cono de Taylor) que adopta el fluido en la punta del capilar ante los efectos del campo eléctrico. Sin embargo fue Formhals quien la patentó en 1934. Formhals inventó el aparato electrostático de electrohilado, donde a una solución polimérica se le aplicó un campo eléctrico proveniente del electrodo de polaridad negativa para formar fibras delgadas que eran atraídas a un electrodo móvil de polaridad positiva.

Un dispositivo con una cinta segmentada recolectaba las fibras astilladas, que luego eran removidas con un cilindro, como lo muestra la Figura 1.4. Formhals electrohiló acetato de celulosa disuelto en etilenglicol, a un voltaje de 57kV. Posteriormente, se le dio el nombre a la técnica como electrohilado en 1994, término que se deriva de “hilado electrostático”.

Esto fue en base al trabajo de Taylor en 1969 sobre chorros dirigidos a un colector mediante la influencia de un campo eléctrico. Como es posible notar, a pesar que el término electrohilado es reciente, sus orígenes son antiguos [15].

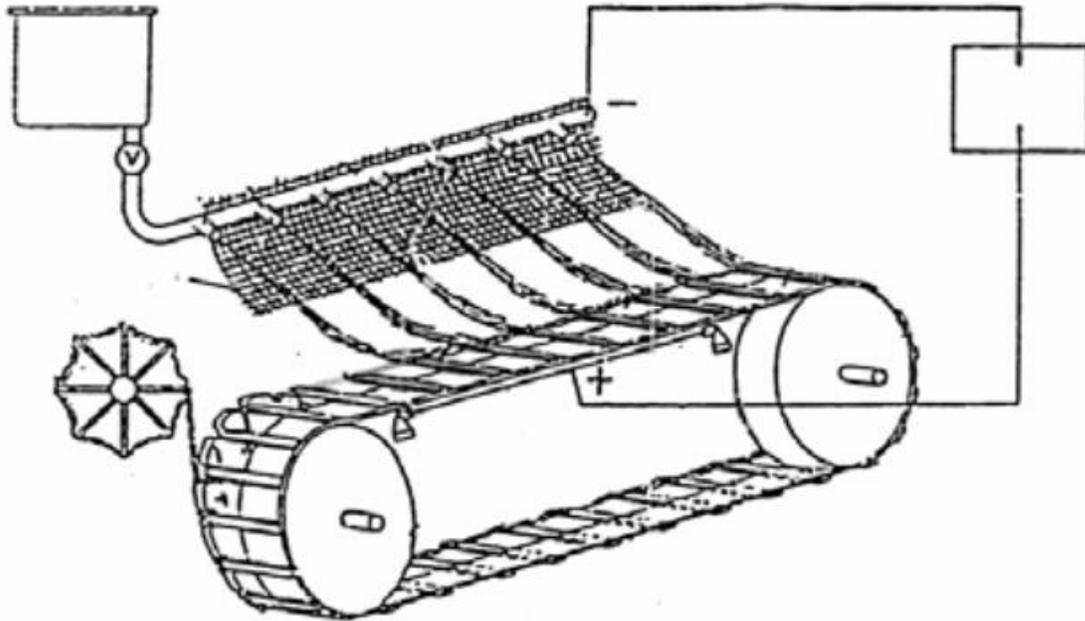


Figura 1.4. Aparato de electrohilado (Patentado por Formhals)

1.2.2 Descripción del proceso

El diseño experimental básico para electrohilado de soluciones consta de cuatro componentes (Figura 1.5): una bomba de infusión que permite suministrar un flujo constante y controlado de solución, una fuente de alto voltaje y un sistema colector sobre el que se deposita el material electrohilado. Al aplicar alto voltaje (5-30 kV), la solución polimérica se carga eléctricamente. Se generan cargas inducidas que se distribuyen sobre la superficie de la gota de la solución polimérica. La gota experimenta un conjunto de fuerzas: fuerza de repulsión coulombica entre las cargas presentes, fuerza electroestática producto del campo eléctrico externo generado al aplicar tensión, fuerza gravitatoria, fuerzas visco elástica que dependen del polímero y solvente, y la tensión superficial que se opone al estiramiento y a que la gota sea más fina.

Bajo la acción de estas interacciones, la gota se distorsiona en forma cónica, fenómeno conocido como cono de Taylor.

Cuando las fuerzas electroestáticas repulsivas superan la tensión superficial del polímero, se produce una situación inestable que provoca la expulsión de un micro chorro líquido cargado desde la boquilla del capilar. Este micro chorro electrizado sufre estiramiento y movimientos tipo latigazo (whipping), dando lugar a la formación de largos y delgados hilos. A medida que el chorro se deforma continuamente y el solvente se evapora, las cargas superficiales aumentan conduciendo a una disminución del diámetro de las fibras. Los entrecruzamientos físicos de las cadenas poliméricas permiten dar continuidad al micro chorro, formando fibras que se depositan en el sistema colector que se encuentra conectado a tierra [16].

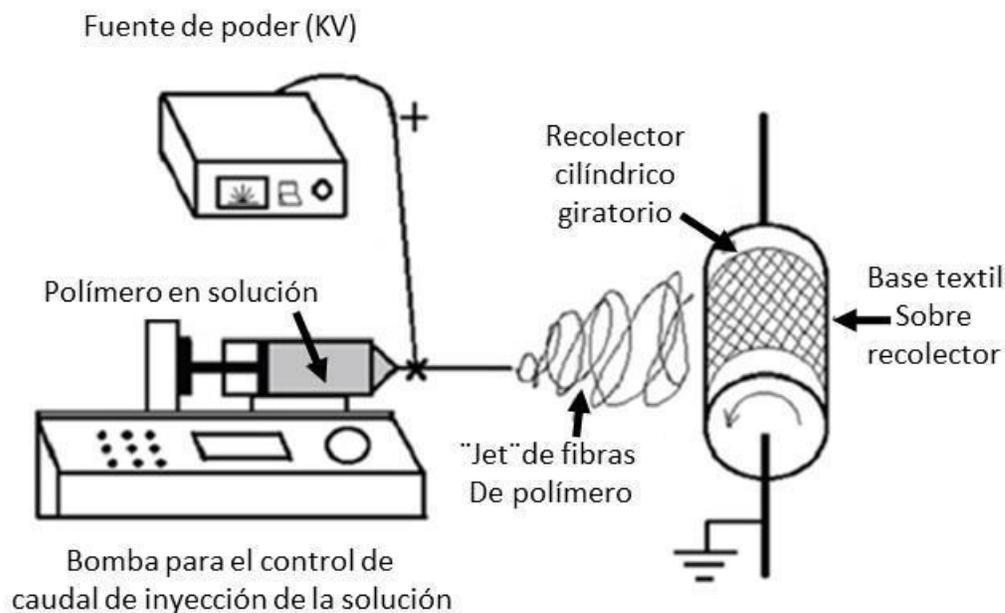


Figura1.5 Diseño básico de un aparato de electrohilado y partes del equipo. [17]

1.2.3 Etapas del proceso de electrohilado

Carga eléctrica de la solución.

La carga eléctrica en el proceso de electrohilado ocurre por el contacto entre la solución y el ánodo de la fuente de alto voltaje. Dependiendo de la naturaleza del fluido, así como de la polaridad de la fuente de voltaje, será la naturaleza de los portadores de carga en la gota y en el filamento.

Formación del cono y filamento.

Es la etapa inicial en la formación de las nanofibras. Para cada solución polimérica existe un nivel de potencial eléctrico con el cual se consigue que la gota adopte la forma de un cono (*cono de Taylor*). Por encima de este nivel de potencial eléctrico se consigue expulsar un filamento de fluido a partir de la punta del cono.

Adelgazamiento del filamento.

Esta etapa consiste en la formación de un delgado filamento de fluido continuo que se forma a partir de la punta del cono de Taylor. El filamento sigue una trayectoria en dirección al colector de fibras.

Inestabilidades del filamento.

Durante el trayecto del filamento hacia el colector, este sucumbe ante una o más inestabilidades que distorsionan su movimiento. Dos de las inestabilidades más comunes son la de latigazos (*whipping*) y la del rompimiento de gota (*droplet break-up*). La primera de las inestabilidades consiste en movimientos laterales crecientes

que desvían la dirección del filamento, la segunda inestabilidad consiste en el rompimiento del filamento en forma de múltiples gotas. Este tipo de inestabilidades pueden presentarse simultáneamente o de manera independiente, y contribuyen a la falta de control que se tiene durante el proceso.

Recolección de las nanofibras.

Se trata de la última etapa del proceso de electrohilado, ocurre cuando el filamento de fluido que viaja por el aire se impacta con un cuerpo conductor conectado eléctricamente con el cátodo de la fuente de alto voltaje. Dentro del argot del electrohilado el cuerpo conductor se conoce como *colector de fibras* y es uno de los elementos con más posibilidades de innovación ya que puede utilizarse para manipular las líneas de campo eléctrico con el fin de guiar la deposición de fibras. El colector de fibras más simple consiste en una placa vertical con la cual se consigue una membrana de fibras aleatorias sobrepuestas una sobre otra.

1.2.4 Parámetros del electrohilado

Durante el electrohilado existen otras variables de procesamiento que son factores decisivos para el resultado final del proceso y el rendimiento de las nanofibras elaboradas, estas variables de procesamiento se pueden denominar de la siguiente manera: voltaje aplicado, flujo de solución, concentración de polímero, viscosidad de la solución, naturaleza del solvente, conductividad de la solución y la distancia entre el capilar y el colector. Podemos clasificar los parámetros de la siguiente manera: parámetros de la solución, parámetros del proceso y parámetros ambientales.

1.2.5 Parámetros de la solución

Viscosidad

La viscosidad de la solución tiene un papel fundamental en el tamaño y morfología de la fibra durante el proceso de electrohilado. La viscosidad de una solución polimérica está relacionada con el peso molecular del polímero disuelto y el solvente. A mayor peso molecular, mayor es la viscosidad de la solución. Aumentar la viscosidad ayuda a obtener un *jet* estable y por lo tanto fibras con diámetro uniforme (sin presencia de gotas). Si bien la viscosidad de la solución influye significativamente en generar fibras lisas, no necesariamente determina la concentración crítica a la cual se obtienen fibras por electrohilado.

Concentración

Para que se pueda formar una fibra por la técnica de electrohilado, se requiere una determinada concentración mínima de la solución. Diversos estudios aseguran que a bajas concentraciones, se ha observado que se obtienen grumos pero al ir aumentando la concentración, los grumos cambian de una forma esférica hasta llegar a formarse una fibra. Sin embargo, a muy altas concentraciones las fibras no son continuas debido a la incapacidad que se presenta para mantener el flujo de la solución en la punta del capilar impidiendo la formación de hilos o fibras largas [14].

Se requiere de una concentración crítica de solución polimérica para que los entrecruzamientos físicos de las cadenas poliméricas permitan la formación de fibras bajo la acción del campo eléctrico aplicado. Si la concentración de polímero se encuentra por debajo de una concentración crítica, los entrecruzamientos físicos entre las cadenas poliméricas no alcanzan a contrarrestar estas fuerzas y el micro chorro se rompe, obteniendo un pulverizado de gotas. Un incremento de la concentración puede llegar a formar una morfología de fibras no uniformes (estructura tipo rosario).

Tensión superficial

El solvente es un factor determinante en la tensión superficial. Entre menor sea la tensión superficial de la solución polimérica las fibras obtenidas presentarán ausencia de grumos. Una tensión superficial alta impide el proceso de electrohilado ya que se presenta mucha inestabilidad del hilo expulsado y la formación de gotas. Valores bajos de tensión superficial de la solución ayudan a que el electrohilado pueda darse a valores menores de campo eléctrico. Sería ideal emplear un solvente con baja tensión superficial. Sin embargo, la concentración y la naturaleza química del polímero también determinan la tensión superficial. En general, el aumentar la concentración polimérica de la solución disminuye la tensión superficial. Otra forma de disminuir la tensión superficial, es con el agregado de surfactantes a la solución. [15]

1.2.6 Parámetros del Proceso

Campo eléctrico (voltaje)

Taylor observó que la diferencia entre el voltaje aplicado causaría que la caída de un polímero se vuelva inestable y la que provocaría que se vuelva de forma cónica es muy pequeña. Cualquier aumento adicional en el voltaje más allá de un valor crítico conduce a la eyección de un chorro de polímero desde el vértice del cono. Este valor crítico del voltaje aplicado puede variar con el tipo de solución de polímero y hay un rango óptimo del voltaje aplicado o la resistencia del campo eléctrico para un sistema polímero-disolvente dado dentro del cual es deseable la formación de nanofibras. Un campo eléctrico que puede ser más débil o más fuerte que este valor crítico dará como resultado morfologías con cuentas o incluso inhibir el inicio del chorro de polímero. En general, con un aumento en el voltaje aplicado más allá de un valor crítico, el diámetro de la nanofibra disminuye inicialmente y luego aumenta después de un punto definido [20].

La disminución inicial en el diámetro de las nanofibras se atribuye a un mayor grado de estiramiento del chorro en correlación con una mayor repulsión de carga dentro del chorro y un fuerte campo eléctrico externo como consecuencia de un aumento en el voltaje aplicado. En la mayoría de los casos, los voltajes altos causan un mayor alargamiento de la fibra debido a las fuerzas Coulómbicas en el chorro, así como también a un campo eléctrico más fuerte. Todo esto resulta en una reducción del diámetro de la fibra y en una rápida evaporación del solvente [21, 22-23, 24-25]. Sin embargo, a muy altos voltajes hay mayor probabilidad de formación de grumos o aglomerados poliméricos.

Distancia aguja-colector

La distancia entre el capilar y el colector influye en el tamaño y la morfología de las nanofibras formadas. Es deseable una distancia óptima entre el capilar y el colector para la formación de nanofibras, para evitar la formación de perlas o electrospray en lugar de electrospinning [23]. Generalmente, con un aumento en la distancia entre el capilar y el colector, el diámetro de nanofibras electrohiladas disminuye [15]. A distancias más pequeñas, el disolvente no tiene tiempo suficiente para evaporarse por completo dando como resultado nanofibras con estructuras planas debido a un secado inadecuado.

Este parámetro influye directamente en el tiempo de vuelo del micro chorro y en la fuerza del campo eléctrico aplicado. En consecuencia, variar este parámetro influye en el diámetro medio de las fibras obtenidas y en su morfología. Si la distancia es alta, hay un mayor tiempo para que el micro chorro se elongue y estire, lo que produce matrices con tamaño medio de fibra menor. No obstante, el aumentar la distancia se debilita la magnitud del campo eléctrico, resultando en menor estiramiento del micro chorro y un mayor tamaño medio de fibra. Si la distancia es muy pequeña, la fuerza del campo eléctrico es mayor y se produce una mayor aceleración del micro chorro, pero como el tiempo de vuelo también disminuye la evaporación del solvente es pobre.

La figura 1.6 resume el efecto de algunos de los parámetros más influyentes del proceso de electrohilado.

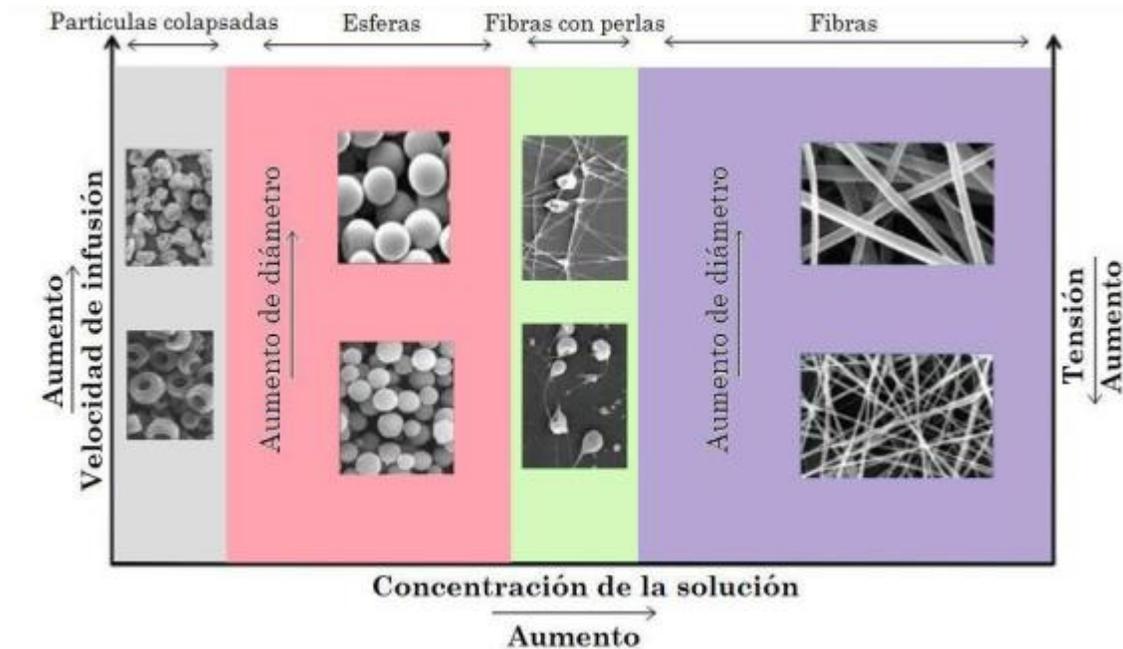


Figura 1.6 Efecto de velocidad de infusión, concentración y tensión aplicada en la morfología de las fibras electrohiladas. [27]

La distancia entre la aguja y el colector ha sido estudiada como otro de los medios de control del diámetro y morfología de fibras en el proceso de electrohilado. Una distancia apropiada es requerida para darles a las fibras tiempo suficiente para secarse antes de llegar al colector, de otra forma a distancias muy cortas o muy largas se obtienen grumos e incluso gotas de solvente que no se alcanzó a evaporar.

Un aspecto físico muy importante en la formación de nanofibras por electrohilado es el secado del solvente utilizado para disolver el polímero en un principio; por esto es necesario encontrar la distancia óptima entre la aguja y el colector para cada solución polimérica para favorecer la evaporación de dicho solvente.

Boquilla capilar

El diámetro interno de la boquilla influye en el diámetro de las nanofibras, y en la velocidad de evaporación del solvente en la boquilla. Al disminuir el diámetro interno de la boquilla aumenta la tensión superficial de la solución, por lo tanto a igual tensión aplicada se necesita de una mayor fuerza coulombica para vencerla. Consecuentemente, la aceleración del micro chorro disminuye y posee mayor tiempo de estiramiento y elongación antes de ser depositado en el colector, generando fibras de menor diámetro.

Los sistemas de producción industrial emplean un sistema de dosificación sin boquillas evitando la interferencia eléctrica que se genera cuando se utilizan simultáneamente múltiples boquillas. Las boquillas coaxiales permiten obtener nanofibras con un núcleo interno y un recubrimiento exterior o nanofibras huecas. [28-29]

Velocidad de inyección

Para que el proceso de electrohilado sea satisfactorio debe existir un equilibrio entre la velocidad a la cual la solución es dosificada y la velocidad de remoción de la misma por efecto del campo eléctrico aplicado. Por lo general, la velocidad de infusión es controlada mediante una bomba que suministra la solución a una velocidad constante determinada por el usuario. Si bien el mayor efecto de este parámetro es la obtención o no de un micro chorro continuo, el aumento de la velocidad de infusión aumenta el diámetro medio de fibras, aunque se debe tener en cuenta que si la cantidad de solvente en el colector es apreciable se perderá la estructura fibrosa por disolución de las fibras.

La velocidad de flujo desde la jeringa es un parámetro importante de proceso ya que determina la velocidad del chorro expulsado y la velocidad de salida del polímero. Una velocidad de flujo baja es deseable para dar tiempo suficiente al solvente para su evaporación.

También se ha observado que a altas velocidades de flujo las fibras obtenidas contienen grumos debido a la incapacidad de un secado apropiado del solvente antes de alcanzar el colector. [20,30]

1.2.7 Parámetros ambientales

Además de los parámetros del proceso y de la solución, existen también los parámetros ambientales que incluyen la humedad, la temperatura, etc. Se ha encontrado que en ambientes casi secos o de muy poca humedad, un solvente volátil se evapora más rápidamente. A veces la velocidad de evaporación es demasiado rápida, comparada con la eliminación del disolvente en la punta de la aguja que se crea una deficiencia en el proceso de electrohilado al taparse la aguja después de pocos minutos de haber empezado el proceso [31]. Aunque otros investigadores, también han sugerido que ambientes muy húmedos pueden ayudar a la descarga de las fibras [32, 33].

Solvente

La elección del disolvente es primordial para que un polímero en particular se solubilice y se transforme en nanofibras mediante electrohilado. Se deben tomar dos consideraciones importantes para elegir un disolvente son la solubilidad del polímero en el disolvente y el punto de ebullición del disolvente como indicativo de su volatilidad. Principalmente, los disolventes volátiles son la opción preferida ya que facilitan la deshidratación de las nanofibras durante la trayectoria desde la punta capilar a la superficie del colector hasta su punto de ebullición inferior y, por lo tanto, su tasa de evaporación es rápida. Sin embargo, se deben evitar los solventes altamente volátiles con puntos de ebullición muy bajos, ya que pueden evaporarse en la punta capilar obstruyendo el flujo de la solución de polímero. Solventes con puntos de ebullición altos no pueden deshidratarse por completo antes de llegar al colector, lo que da como resultado nanofibras aglomeradas [20, 34]. Se puede usar una mezcla de dos solventes (co-disolventes) con diferentes puntos de ebullición. La Tabla 1.1 muestra

las propiedades los principales solventes utilizados para el electrohilado y su efecto sobre la morfología en las nanofibras.

diclorometano	Punto de ebullición (°C)	Otras propiedades	Morfología de la fibra	Referencia
Diclorometano	39.8	Baja constante dieléctrica, alta tensión superficial	Rebordeado, diámetro grande	35, 38
Cloroformo	61.2	Alta viscosidad intrínseca	Rebordeado a una concentración de polímero muy baja, liso a mayor concentración	39
Metanol	64.7	Alta constante dieléctrica	Diámetro de fibra pequeña con mayor concentración de metanol hasta 50%, incrementando el diámetro de la fibra	35
Tetrahidrofurano	66	Momento de dipolo alto, buena conductividad	Suave y con cuentas, con forma de cinta, alta densidad de poros	36, 40
Acetato de etilo	77.1	Constante dieléctrica alta, conductividad justa	Suave y con cuentas, como cinta	40
Etanol	78.3	Baja tensión superficial, alta viscosidad intrínseca	Suave, gran diámetro	37, 38, 39
Metil etil cetona	79.6	Momento de dipolo alto, buena conductividad	Plano, como cinta, muy pocas cuentas	40
Dicloroetano	83.5	Momento de dipolo alto, conductividad justa	Lisa y con cuentas, en forma de C	40
Agua	100	Baja viscosidad intrínseca	Rebordeado, diámetro pequeño	37, 39
Dimetilformamida	153	Momento dipolar alto, alta conductividad, baja viscosidad intrínseca	Liso y con cuentas, redondo	39,40

Tabla 1.1 Propiedades de los principales solventes utilizados en la técnica de electrohilado.

1.3 Plasma

Un plasma es un gas eléctricamente neutro compuesto de un número igual de iones positivos y negativos. La ionización se inicia por las continuas colisiones entre los átomos que durante las colisiones provocaran que se desprendan electrones, los cuales también participan activamente en las siguientes colisiones incrementando el número de iones y electrones en el gas de inicio. Cuando el gas es alterado por cualquiera de estos procesos se genera un plasma, y regresa a su estado basal cuando la ionización o excitación se deja de aplicar.

En la Fig. 1.7 se muestra un esquema de los estados de la materia y el proceso que existe para cambiar entre cada uno de ellos. Los sólidos, se caracterizan por poseer volumen y forma definida; mientras que los líquidos, por su baja incompresibilidad, tendrían un volumen fijo, pero adquieren la forma del recipiente que los contiene; y los gases por su elevada compresibilidad, tendrían un volumen que depende de la presión y temperatura a que están sometidos y su forma las fijan las paredes del recinto que los confina.

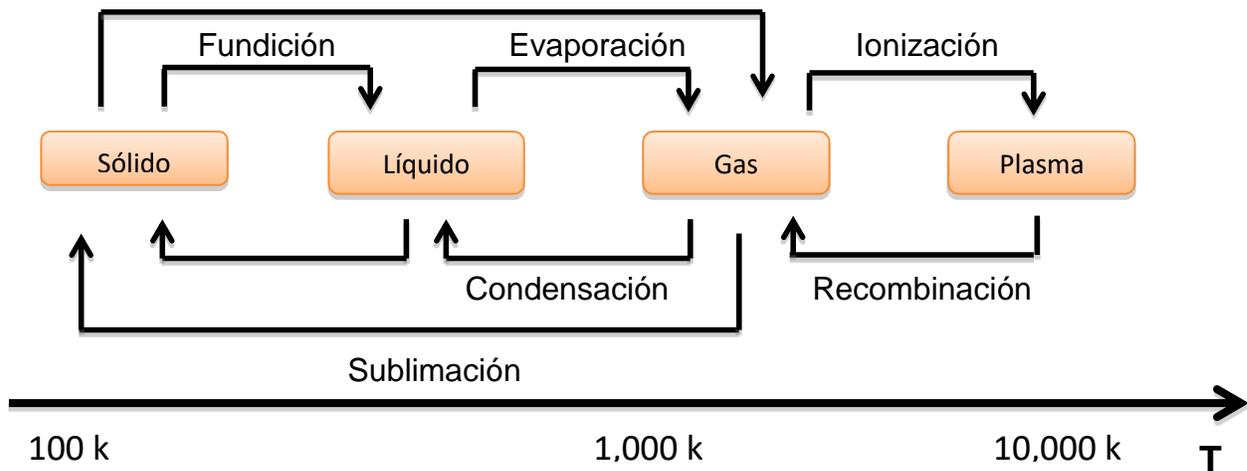


Figura 1.7. Estados de la materia en función de la temperatura

1.3.1 Plasmas de baja energía

Los plasmas de baja energía pueden ser a presión baja (10^{-2} - 10^2 mbar): iniciados y sostenidos por corriente directa, radiofrecuencia o microondas. Los plasmas por descargas luminiscentes (Figura 1.8) son los más representativos. Algunas aplicaciones de estos plasmas son: síntesis, funcionalización y modificación superficial, cambios de conductividad eléctrica [41,42].



Figura 1.8 Plasma luminiscente.

1.3.2 Polimerización por plasma de descargas luminiscentes

Los plasmas de descarga luminiscente son de baja energía (1-10 eV) y pueden ser iniciados y sostenidos a presiones bajas (menores a 1 mbar) por descargas eléctricas de CD, RF o MW. El nombre luminiscente se debe a la luminosidad que producen los fotones originados por los electrones desplazados de sus órbitas o liberados durante las colisiones de los átomos. En la generación de plasmas por descargas luminiscentes, el campo eléctrico generador puede aplicarse a través de acoplamiento resistivo, capacitivo, inductivo, o sus combinaciones. En un arreglo resistivo los electrodos que están en contacto con el gas generan un campo eléctrico por la

aplicación externa de diferencias de potencial. El gas actúa como una resistencia eléctrica al paso de la corriente, Figura 1.9

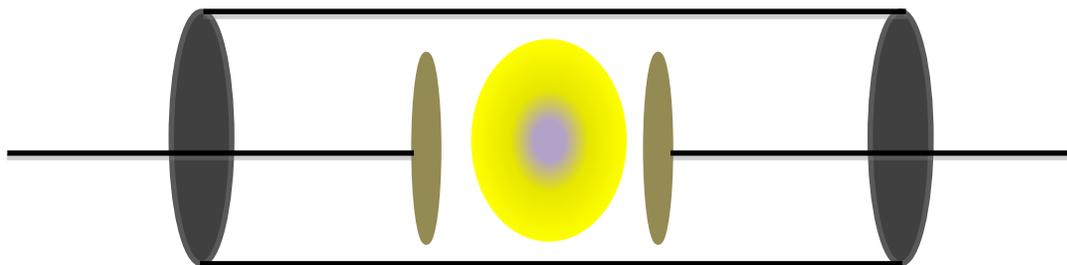


Fig. 1.9 Acoplamiento resistivo, electrodos en el interior del reactor.

Las características de las descargas luminiscentes usadas a nivel laboratorio e industrial se muestran en la tabla 1.2 [43]

Energía de los electrones	≈1-10 eV
Densidad electrónica	≈10⁹-10¹²/cm³
Energía suministrada	5-1000 W
Frecuencia	13.6 MHz, CD
Presión	0.1 a 1.0 mbar

Tabla 1.2 Características de descargas luminiscentes a nivel laboratorio e industrial

1.3.3 Polimerización por plasma

La polimerización por plasma puede ser generada por medio de descargas de resplandor a bajas presiones a través de especies químicas derivadas del monómero. Cada especie puede generar un resplandor distinto dando lugar a colores característicos del plasma [44,45].

En una polimerización por plasma, el monómero debe encontrarse en su fase gaseosa, pero el producto principal de este monómero se encuentra en estado sólido. Así, la polimerización por plasma es un proceso que inicia con la producción de iones y radicales libres y continúa sobre la superficie interna del reactor con la formación del polímero.

Debido a la gran variedad de reacciones químicas que puedan presentarse en este proceso, las estructuras resultantes así como sus propiedades físicas asociadas, como la conductividad eléctrica, dependen de varios factores entre los que destacan la potencia de las descargas con las que se genera el plasma.

Las películas se adhieren a una gran diversidad de sustratos, después de realizar una polimerización por plasma el polímero no presenta contaminación, debido a que no contiene agentes oxidantes o solventes. Además de que las reacciones pueden ser combinadas con otros compuestos dando características específicas al polímero resultante de la reacción.

Este tipo de polímeros presentan diferentes arreglos, pueden ser ramificados y/o entrecruzados [46, 47].

En la polimerización por plasma, la secuencia de las reacciones químicas no es lo suficientemente clara debido a la complejidad del proceso de polimerización. Depende de las condiciones eléctricas del sistema, de las especies químicas producidas por el plasma, y de las condiciones termodinámicas como son: presión, potencia, flujo del monómero y temperatura en el reactor. Los polímeros sintetizados mediante esta técnica presentan características importantes como:

- Excelente adhesión al sustrato.
- Fuerte resistencia a los agentes químicos.
- Formar arreglos espaciales tridimensionales, que comúnmente no se observa en un polímero convencional.

El uso de plasmas como agentes ionizantes para generar iones, electrones, fotones y moléculas en estado electrónico excitado es una alternativa para promover la propagación de reacciones de polimerización sin contaminantes, porque en lugar de reactivos catalíticos, solo participan los monómeros de partida y los productos de la siguiente etapa como oligómeros y polímeros con diferente peso molecular. [48]

1.3.4 Pirrol

El uso de materiales derivados del pirrol está emergiendo como una alternativa interesante para la reparación de tejidos. Compuesta por aminas heterocíclicas, polipirrol. PPy es un material semiconductor eléctrico con uso potencial en la próxima generación de sensores, baterías y diodos Las capacidades eléctricas de PPy tienen su origen en los dobles enlaces conjugados participan en las moléculas heterocíclicas. En aplicaciones biológicas, la biocompatibilidad y la bioestabilidad de PPy se han probado tanto in vitro como in vivo. Así, aplicando sus propiedades eléctricas y biológicas, el polipirrol puede ser utilizado para crear nuevas tecnologías de bioingeniería para modificar las funciones celulares, como la migración, la adhesión, síntesis de ADN y secreción de proteínas para la reparación de tejidos o para otras funciones biológicas.[48]

Además, la síntesis se puede enriquecer con dopantes halogenados que son útiles para mejorar la respuesta eléctrica en los polímeros finales.

1.3.5 Dopante

El dopaje de polímeros conjugados ocasiona alteraciones en su estructura electrónica. Para que las cargas puedan fluir a lo largo de las moléculas en un material semiconductor, es necesario agregar portadores de carga en forma de electrones extra o bien eliminar electrones. Aplicando un campo eléctrico, los electrones que constituyen enlaces tipo π pueden mover las cargas eléctricas a través de la cadena polimérica. Cuando un espacio libre de la cadena es ocupado por un electrón proveniente de una molécula vecina, se crea un nuevo espacio disponible permitiendo a la carga recorrer toda la cadena polimérica [49,50].

1.4 Técnicas de Caracterización

La caracterización de materiales nos ayuda a la reconocer un material a partir del estudio de sus propiedades físicas, químicas, estructurales; etc.

Obtener información como: composición, estructura, topología, morfología; etc. nos ayuda a conocer y valorar la utilidad del material para diversas aplicaciones.

1.4.1 Técnicas de espectroscopia vibracional.

El análisis vibracional de los materiales poliméricos a través de las espectroscopias Raman e Infrarrojo, es un método experimental apropiado para obtener información sobre parámetros estructurales de los mismos. Así, además de poder analizar las especies químicas presentes en el compuesto, es posible obtener entre otros, datos sobre el estado de orden de los polímeros (orientación de cadenas, cristalinidad, fases cristalinas, etc.)

1.4.1.1 Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR-ATR)

El principio de funcionamiento de ésta técnica se basa en la excitación de los modos de vibración y rotación de los enlaces entre los átomos al ser irradiados con un haz de luz infrarroja. Cada molécula, según las características de sus enlaces absorberá radiación de una o varias longitudes de onda específicas por lo que podrá ser identificada.

El propósito del sistema óptico es transmitir la radiación desde la fuente al detector con la mínima pérdida, se utilizan espejos de vidrio con un recubrimiento de oro o aluminio. El sistema óptico va equipado con un compartimento para la muestra, en el que ésta se sitúa en el camino de la radiación, u otros accesorios que permitan realizar medidas diferentes a la transmisión. (Ej. Attenuated Total reflectance ATR). El detector se emplea para convertir la señal óptica en una señal eléctrica fácilmente medible, como el voltaje [51]. La figura 1.10 muestra un esquema de un espectrómetro basado en la Transformada de Fourier.

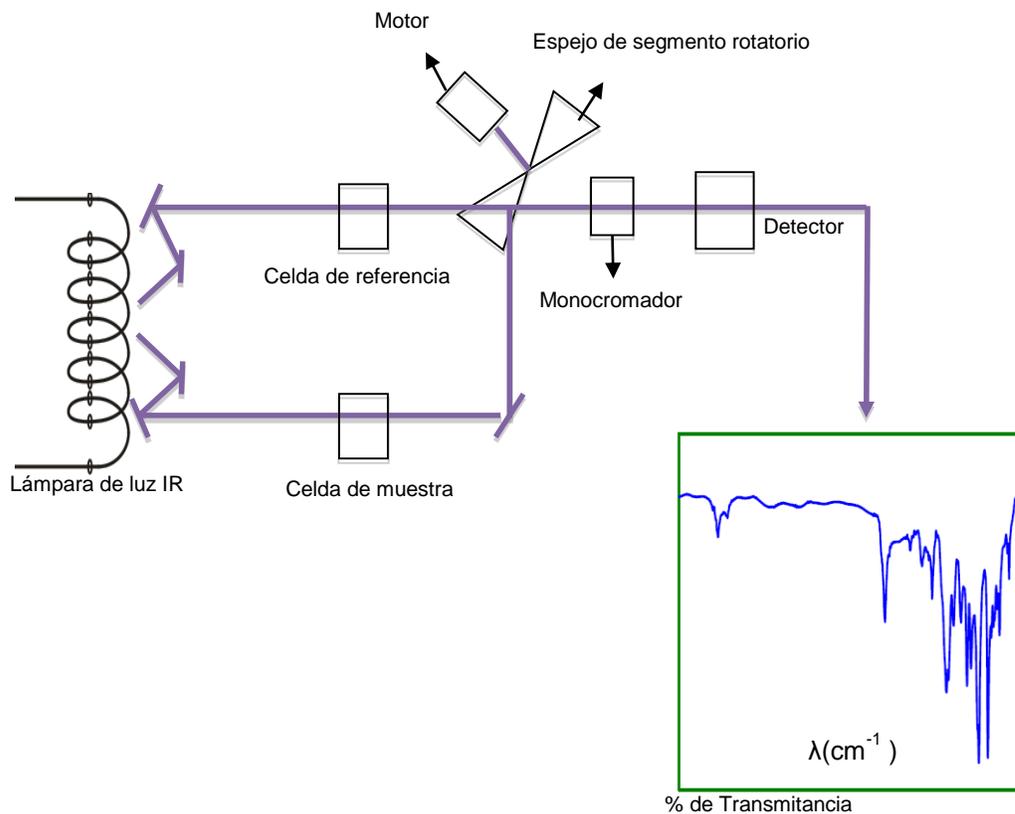


Figura 1.10 Esquema del espectrómetro Infrarrojo por Transformada de Fourier.

La región IR del espectro electromagnético se encuentra en $12800\text{-}10\text{ cm}^{-1}$. La región IR se puede dividir en tres zonas: IR cercano: $12800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, IR medio: $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$; IR lejano: $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$, siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales.

El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de ésta molécula. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia.

Otros métodos y accesorios

También se puede observar el comportamiento de los sólidos en el infrarrojo por técnicas de reflectancia y por el método foto acústico. Estos espectros son, con frecuencia, similares a los espectros de absorción y proporcionan la misma clase de información.

Accesorios de reflectancia total atenuada (ATR):

Esta gama de dispositivos son especialmente útiles para obtener espectros IR de muestras que no pueden ser colocadas en los soportes habituales para el método de transmisión. Así, son apropiadas para estudiar sólidos gruesos insolubles o muy absorbentes, muestras líquidas, incluyendo láminas, recubrimientos, polvos, hilos, adhesivos, polímeros y muestras acuosas. La ATR requiere poca o ninguna preparación para la mayoría de las muestras y es una de las técnicas de muestreo más versátiles.

La ATR ocurre cuando un haz de radiación entra desde un medio más denso (con un mayor índice de refracción) en un medio menos denso (con un menor índice de refracción). La fracción del haz incidente reflejado se incrementa cuando aumenta el ángulo de incidencia. Toda la radiación incidente se refleja en la interfaz cuando el ángulo de incidencia es mayor que el ángulo crítico (que es función del índice de refracción). El haz penetra una distancia muy pequeña más allá de la interfaz hacia el medio menos denso antes de que suceda la reflexión completa. Esta penetración se llama «onda evanescente» y se produce a una profundidad de unas pocas micras. Su intensidad se ve atenuada por la muestra en las regiones del espectro IR donde la muestra absorbe. [51]

1.4.1.2 Microscopia Raman

En 1921, el físico hindú Chandrasekhara Venkata Raman realizó las primeras observaciones que lo llevaron a descubrir el fenómeno inelástico de dispersión de luz que permite el estudio de vibraciones moleculares, llamado efecto Raman en su honor [52].

El principio físico espectroscopía Raman consiste en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia, ν sobre una muestra cuyas características moleculares se desean determinar [53]. Los fotones del haz incidente pueden experimentar los siguientes efectos:

- **Colisiones elásticas** con los átomos de la muestra, prácticamente sin pérdida de energía y conservando la misma frecuencia con la que incidieron generando la llamada dispersión Rayleigh (figura 1.11) la cual, no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra debido a que las moléculas vuelven al mismo nivel de energía que tenían antes del choque como se muestra en la gráfica de la figura 1.12.
- **Colisiones inelásticas** con los átomos de la muestra en donde se presentan transferencia de energía que modifican la frecuencia de los fotones dispersados que forman la llamada **dispersión Raman** la cual contiene información sobre la composición y estructura de la muestra debido a que las moléculas son excitadas a un estado vibracional distintos del que tenían antes del choque (figura 1.12) en dos formas posibles:
 - a) El fotón incidente transmite energía a la molécula con la que choca, (**dispersión Stokes**), induciendo vibraciones moleculares, y disminuyendo su frecuencia (figura 1.11) por la pérdida de energía al chocar.
 - b) El fotón absorbe energía al chocar con moléculas excitadas, (**dispersión anti - Stokes**) aumentando su frecuencia al ganar energía (figura 1) durante el choque [54].

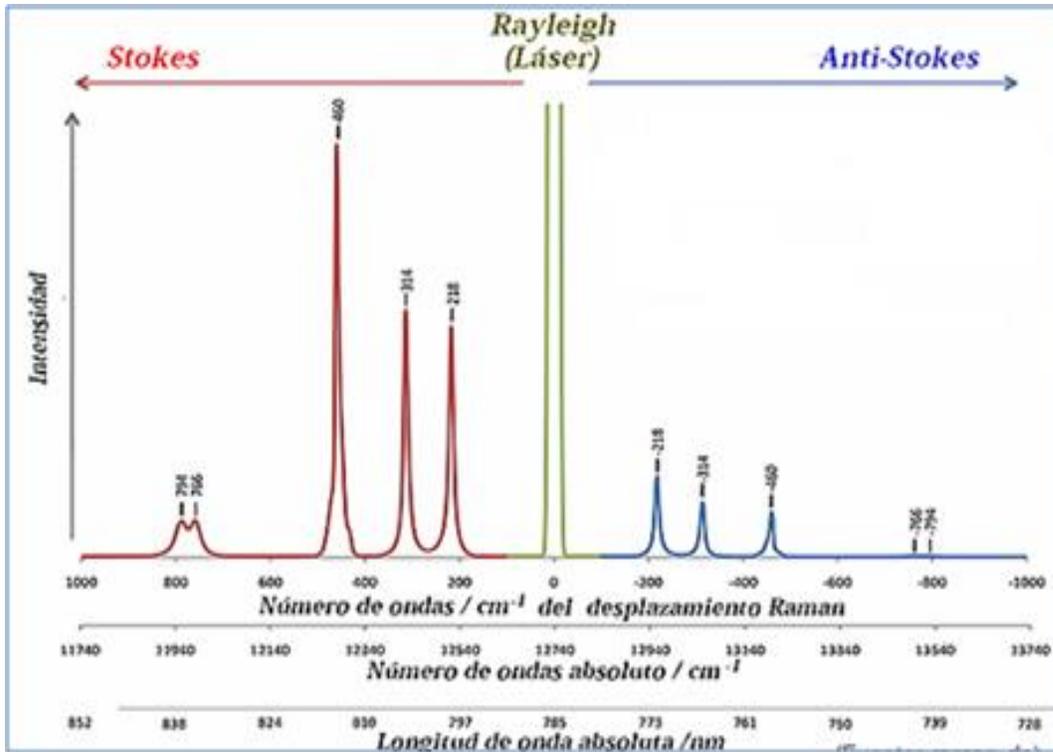


Figura 1.11 Dispersión Raman Stokes, Rayleigh y Anti-Stokes

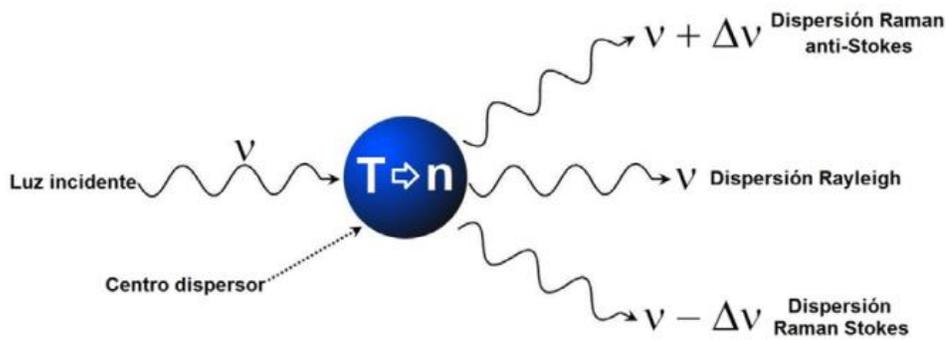


Figura 1.12 Tipos de dispersiones

1.4.2 Cristalografía de polvo

La Cristalografía es la ciencia que estudia la estructura, propiedades y formación de los cristales, así como la interacción de los materiales con la radiación.

La difracción de rayos en muestra policristalina permite abordar la identificación de fases cristalinas (puesto que todos los sólidos cristalinos poseen un difractograma característico) tanto en su aspecto cualitativo como cuantitativo. Los estudios de polimorfismo, transiciones de fase, y soluciones sólidas, medida del tamaño de partícula, determinación de diagramas de fase, etc., se realizan habitualmente por difracción de rayos X.

El conjunto de técnicas que permiten obtener la mayor información estructural sobre un sólido o un material, incluyendo el orden periódico a larga distancia, son los métodos difractométricos.

1.4.2.1 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X es una de las técnicas de caracterización más eficaz y más comúnmente utilizadas para el análisis estructural de cristales, la técnica de DRX es una técnica de caracterización no destructiva las además de que las muestras no requieren ningún proceso específico de preparación de muestras para ser analizadas.

La técnica consiste en bombardear la muestra a estudiar con un haz de rayos x de longitud de onda λ , variando el ángulo de incidencia de los rayos en la muestra, θ .

Un esquema del funcionamiento de un difractómetro de método de polvos es presentado en la figura 1.13.

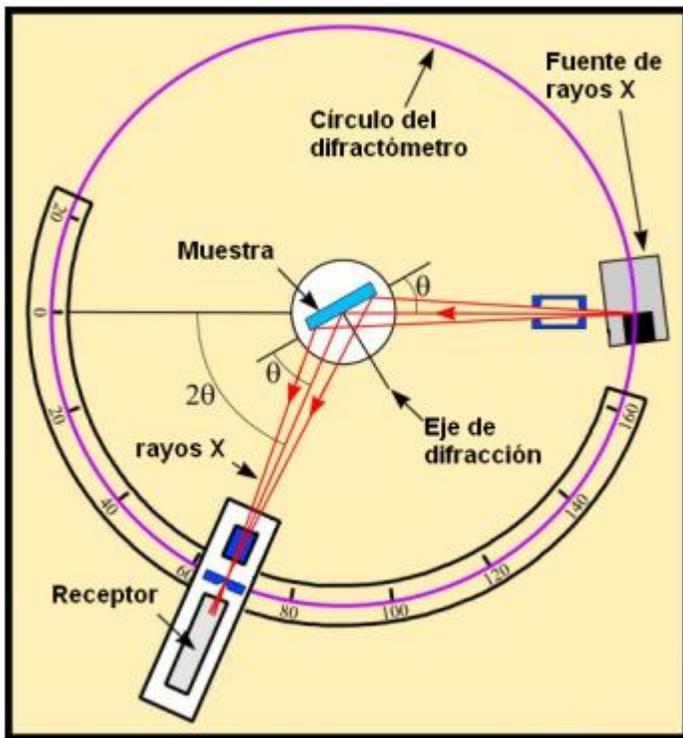


Figura 1.13. Esquema de funcionamiento y montaje de un difractómetro

El principio básico de funcionamiento de esta técnica consiste en que los rayos x son difractados de manera constructiva por la estructura de la muestra si es que se cumple la ley de Bragg como se muestra en la figura 1.14.

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \text{Sen}(\theta)$$

Dónde:

n es un entero.

λ es la longitud de onda.

d es la distancia interplanar de la estructura de la muestra.

θ el ángulo de incidencia de los rayos x.

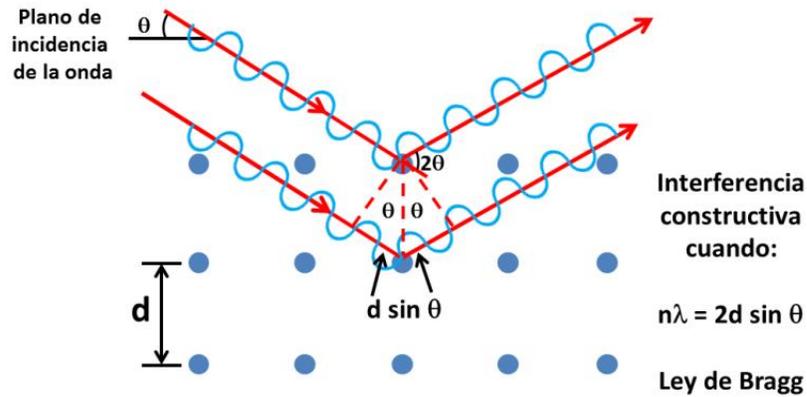


Figura 1.14 Representación de la ley de Bragg

Los electrones acelerados que poseen suficiente energía, chocan con los átomos del metal utilizado como blanco removiendo electrones de los niveles internos, ocasionando que los electrones de los niveles superiores cubran los lugares vacantes, emitiendo fotones de rayos X como se muestra en la figura 1.15. Debido a que los rayos X tienen una frecuencia correspondiente a la diferencia de energía entre los dos niveles, también son llamados radiación característica. Los rayos X generados, se utilizan para bombardear una muestra para obtener su patrón de difracción de rayos X [55].

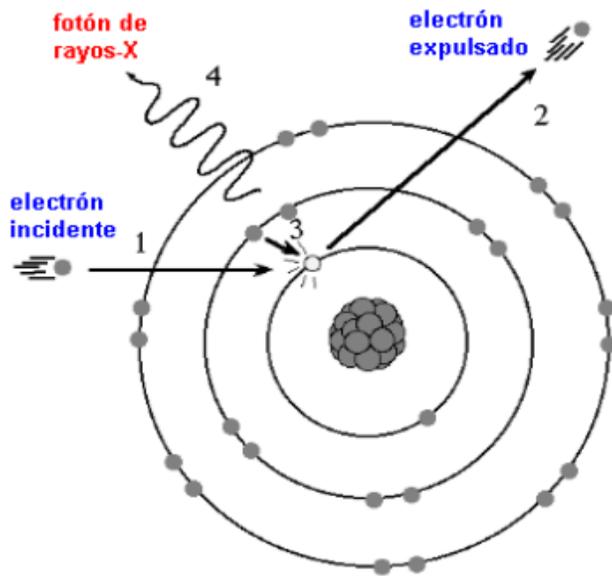


Figura 1.15 Generador de Rayos X

1.4.3 Caracterización térmica

Bajo la denominación de Análisis Térmico se engloban un conjunto de técnicas analíticas que estudian el comportamiento térmico de los materiales. Cuando un material se calienta o se enfría, su estructura cristalina y su composición química pueden sufrir cambios más o menos importantes:

- Fusión: paso del estado sólido al estado líquido
- Sublimación: paso del estado sólido al estado gaseoso
- Solidificación: paso del estado líquido al estado sólido
- Cristalización: paso al estado sólido ordenado
- Amorfo: pasa al estado sólido desordenado
- Transición: cambio en su estructura cristalina

La mayor parte de estos cambios se pueden estudiar midiendo la variación de distintas propiedades de la materia en función de la temperatura.

1.4.3.1 Calorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría diferencial de barrido, es una técnica experimental dinámica que 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. [56]

El análisis de DSC es realizado con un calorímetro, el cual requiere, además de la muestra a analizar, una muestra que sirva referencia al análisis. El utilizado en el presente estudio es un calorímetro que basa su funcionamiento en la medición del flujo de calor que es aportado a la muestra analizada.

Este flujo de calor es variable, y es aportado por el calorímetro para lograr que la diferencia de temperatura entre la muestra analizada y la muestra patrón sea nula, mientras la temperatura de la celda donde se encuentran las muestras es aumentada linealmente. La medición del flujo de calor es casi directa, pues es proporcional a la potencia que el calorímetro consume.

La diferencia de temperaturas entre las muestras es medida con dos termocuplas. Un esquema básico del montaje del calorímetro es presentado en la figura 1.16.

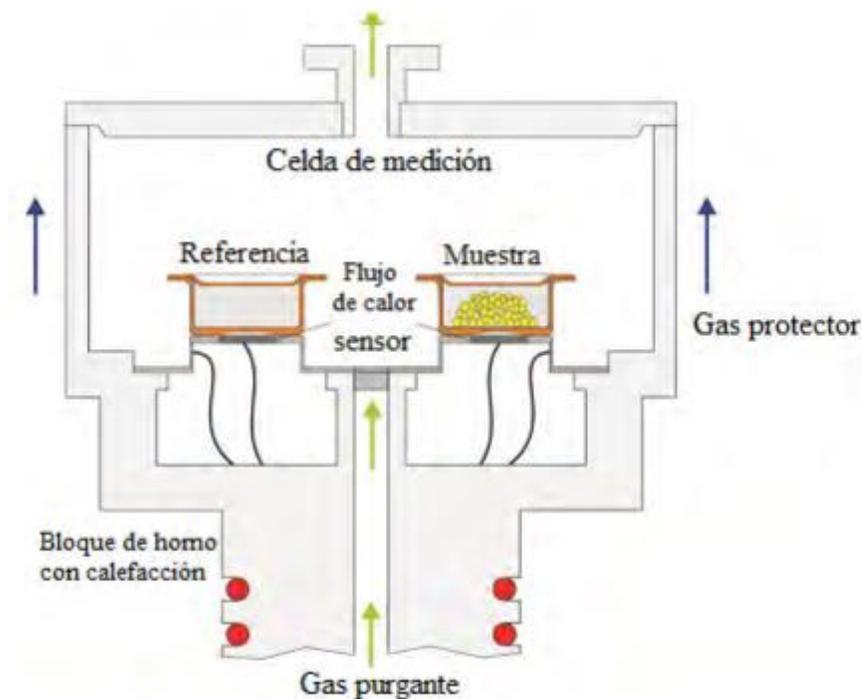


Figura 1.16 Esquema básico de un montaje del calorímetro

Este tipo de calorímetros, a diferencia de los calorímetros de control de potencia, tiene sólo una fuente de calor. Debido a que para realizar el análisis es necesario aumentar la temperatura de la muestra, es esperable que esta sufra un proceso oxidativo que altera los resultados. Para evitar este fenómeno suele utilizarse flujos de gases libres de oxígeno, tales como nitrógeno y argón [57] [58] [59], que forman una atmósfera protectora en torno a la muestra.

Como resultado del análisis DSC se obtiene un gráfico de potencia por unidad de masa (flujo de calor entregado a la muestra de masa conocida) en función de la temperatura, llamado Curva de DSC.

La curva obtenida es llamada traza calorimétrica. Permite entre otras cosas, calcular la entalpia propia de una reacción, la que está determinada por el área bajo la curva del gráfico ΔC_p vs T. Es por ello que el método de DSC es un método cuantitativo.

Otros resultados que pueden obtenerse de una curva calorimétrica son [60]:

- Identificación del comportamiento de las distintas fases en función de la temperatura.
- Determinación del diagrama de fases.
- Determinación del grado de cristalinidad.
- Determinación de temperatura de transición vítrea.

1.4.4 Tensión y energía superficial (Propiedades de mojado)

Antes de definir el ángulo de contacto, es pertinente tener claro el concepto de tensión superficial, pues ambos conceptos están íntimamente relacionados.

Está causada por los efectos de las fuerzas intermoleculares que existen en la interface (plano de separación entre dos fases) y dependerá de la naturaleza del líquido, del medio que le rodea y de la temperatura.

Los dos principales parámetros que afectan a la magnitud de la tensión superficial son la temperatura y la composición química de las fases. [61]

La influencia del medio exterior se debe a que las moléculas del medio ejercen acciones atractivas sobre las moléculas situadas en la superficie del líquido, contrarrestando las acciones de las moléculas del interior del líquido.

1.4.4.1 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto es una propiedad superficial de los sólidos que cuantifica su tendencia a cuan hidrofóbico puede ser un material como parámetro importante para analizar los mecanismos de interacción entre las fases sólida y líquida.

Las mediciones de ángulos de contacto es un método fiable para caracterizar la interacción entre un líquido y una superficie. Cuando la gota de agua no penetra en el sustrato, la interacción puede ser caracterizada por un ángulo de contacto si la superficie es suave y homogénea.

El ángulo de contacto es una función de la tensión superficial del líquido y de la energía libre superficial del sustrato. Puede evaluarse mediante una gota de un líquido puro dispuesta sobre un sólido. El ángulo formado entre la interfaz sólido/líquido y la interfaz líquido/vapor, cuyo vértice está donde las tres interfaces se encuentran, constituye el ángulo de contacto (Figura 1.17). [62]

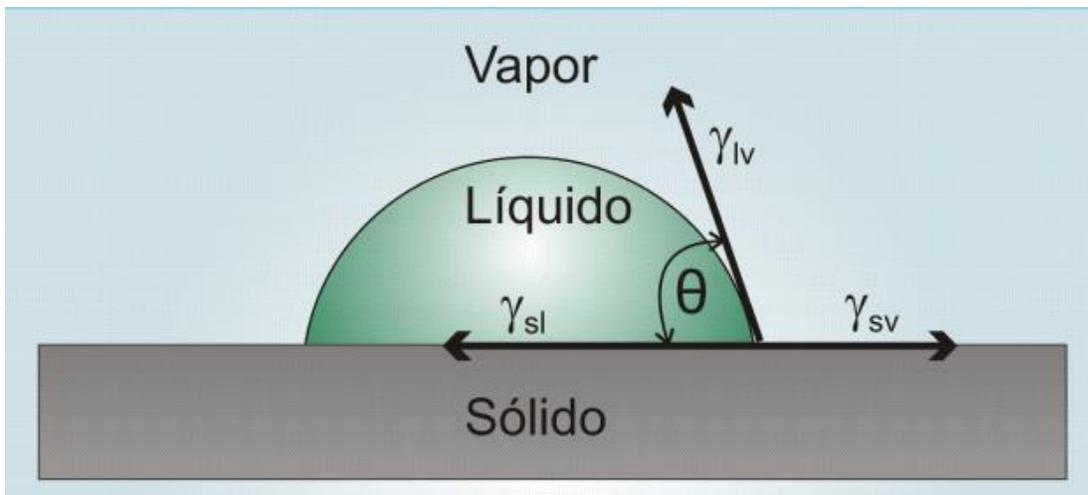


Figura 1.17. Esquema representando el ángulo formado entre la interfaz sólido/líquido y la interfaz líquido/vapor y el vértice en el que las interfaces se encuentran constituye el ángulo de contacto.

Donde:

θ Es el ángulo de contacto.

γ_{sl} Tensión superficial a la interface sólido/líquido.

γ_{sv} Tensión superficial a la interface sólido/vapor.

γ_{lv} Tensión superficial a la interface líquido/vapor.

Una superficie en la cual la gota forma un ángulo de contacto mayor que 90° , es una superficie hidrofóbica.

Esta condición implica que la mojabilidad, adhesividad y la energía superficial del sólido son bajas. En cambio, si la superficie es hidrofílica, se observará un ángulo de contacto menor a 90° y tanto la mojabilidad, adhesividad como la energía superficial del sólido serán altas (Figura 1.18). [62]

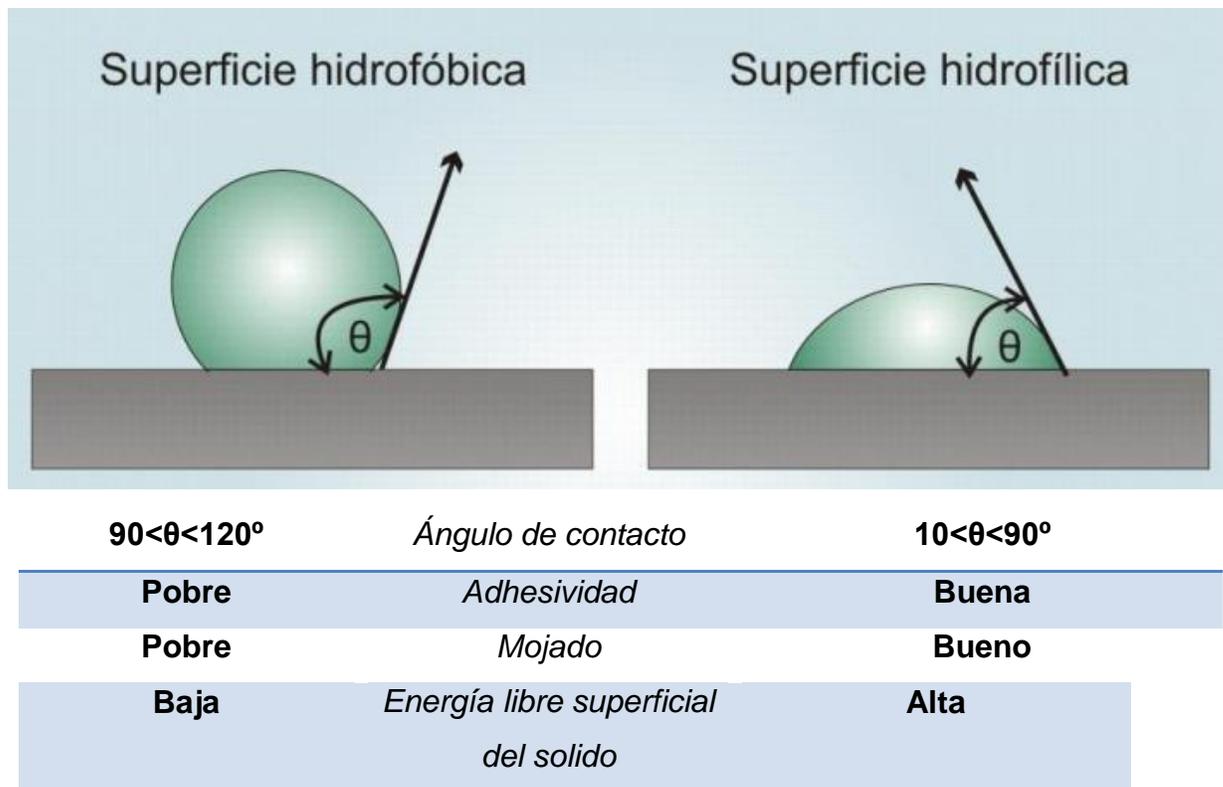


Figura 1.18 Esquema representando los ángulos de contacto de una superficie hidrofóbica e hidrofílica y las distintas propiedades de los mismos.

1.4.4.2 Ángulo de contacto dinámico

En materiales absorbentes o porosos, cuando el líquido penetra en el sustrato, el ángulo de contacto cambiará continuamente como una función del tiempo. En ciertas aplicaciones el tiempo de esta fase es crítica en el proceso global. Para medir este ángulo de contacto dinámico, así como el rango o grado de absorción y de expansión, es necesario captar una secuencia de imágenes durante la interacción [62]. Los ángulos de contacto dinámicos describen las interacciones en el límite entre líquido y sólido durante el aumento (ángulo de avance) o disminución (ángulo de retroceso) del volumen de la gota en los procesos de mojado.

La frontera no se forma instantáneamente, requiere cierto tiempo antes de que se establezca un equilibrio dinámico. [63.64.65]

El ángulo de contacto θ puede medirse con un instrumento llamado goniómetro, que realiza mediciones estáticas y dinámicas de los ángulos de contacto. Se deposita una gota de agua y se mide el ángulo de contacto haciendo una captura digital de la imagen y utilizando programas informáticos específicos (ej. Image J®).

1.4.5 Caracterización morfológica

La caracterización física de un material, en nuestro caso de un electrohilado, la podemos vincular con su estructura y morfología de las mallas, dónde podemos conocer: su diámetro, la orientación de las fibras y rugosidad, para conocer estas propiedades se recurre a la Microscopía Electrónica de Barrido

1.4.5.1 Microscopia Electrónica de Barrido

La MEB utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen ampliada de la superficie de un objeto. Es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de sólidos inorgánicos y orgánicos. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra.

El microscopio electrónico de barrido está equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar:

- Detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución por medio de la morfología superficial de la muestra (SEI, Secondary Electron Image).
- Un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie (BEI ,Backscattered Electron Image),
- Un detector de energía dispersiva (EDS Energy Dispersive Spectrometer) detecta, cualitativamente, los rayos X característicos de los elementos químicos presentes en la superficie de la muestra. [66]

Un microscopio electrónico de barrido cuenta principalmente con un cañón de electrones con un emisor, un sistema de lentes electromagnéticas que focalizan y reducen el haz de electrones provenientes del filamento; un sistema de barrido que hace recorrer sobre la superficie de barrido sobre la superficie de la muestra al haz de electrones una vez que está focalizado. [67]

Los electrones procedentes del cañón electrónico, atraviesan la lente condensadora y objetivo, incidiendo sobre la muestra, produciendo tras la interacción con los átomos de la muestra una serie de efectos que desencadenan la liberación o “devolución” de electrones secundarios, retrodispersados. Estos electrones liberados o devueltos, son recogidos en un detector que contiene lentes electromagnéticas

(electroimanes), encargados de formar la imagen final en el sistema de registro. Para generar el barrido sobre la superficie de la muestra, este microscopio electrónico contiene un deflector que distribuye el haz de electrones, permitiendo el recorrido de los electrones punto por punto o línea por línea de la muestra a observar. La imagen que se obtiene al final, es de carácter tridimensional, facilitando información sobre las estructuras, texturas y/o morfología de las muestras observadas. [67]

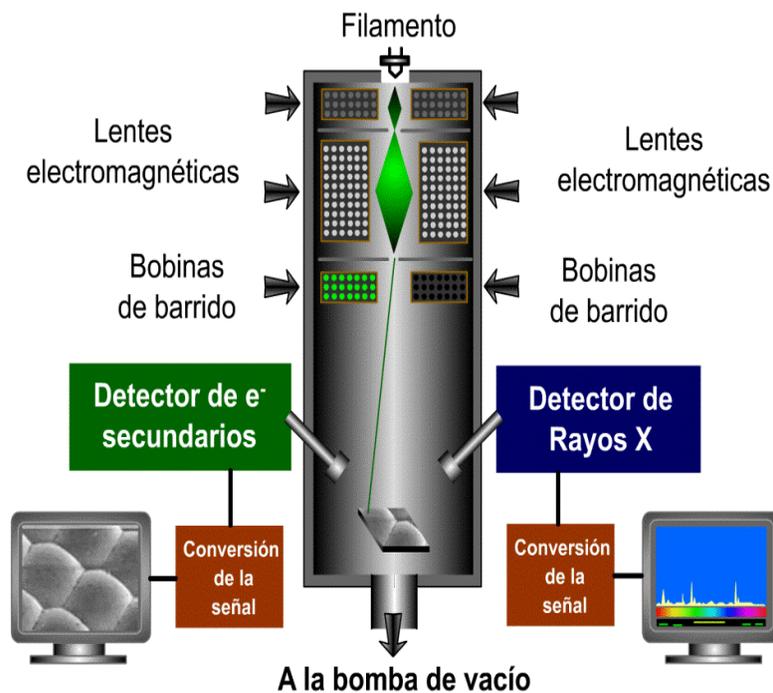


Figura 1.19 Representación de la columna del Microscopio Electrónico de Barrido.

Una representación del funcionamiento del microscopio electrónico de barrido se muestra en la figura 1.19.

1.5 Cultivos celulares

Se considera al zoólogo americano R. G. Harrison como el iniciador de los cultivos de tejidos animales. En 1907, Harrison fue el primer científico que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios.

Se le llama cultivo celular a la propagación de células fuera del organismo de origen, por medio de técnicas que permiten el mantenimiento de las células '*in vitro*', manteniendo su propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas funcionales para su proliferación. Los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas. Las células se pueden obtener de especies animales y vegetales.

Podemos encontrar una serie de ventajas:

- Fácil manipulación bajo condiciones controladas
- Alternativa al uso de animales
- Permite trabajar en pequeña, mediana y gran escala
- Las células pueden mantenerse congeladas por largos períodos de tiempo con mínima pérdida de viabilidad. [68]

1.5.1 Tipos de cultivo celular

Cultivo celular primario

Se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. En estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular. Sin embargo, las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente.

Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia. En esta etapa, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene. Por eso, al cabo de un tiempo hay que trasplantar las células a un nuevo soporte. Esta operación se denomina subcultivo o pase como se muestra en la figura 1.20. [69]

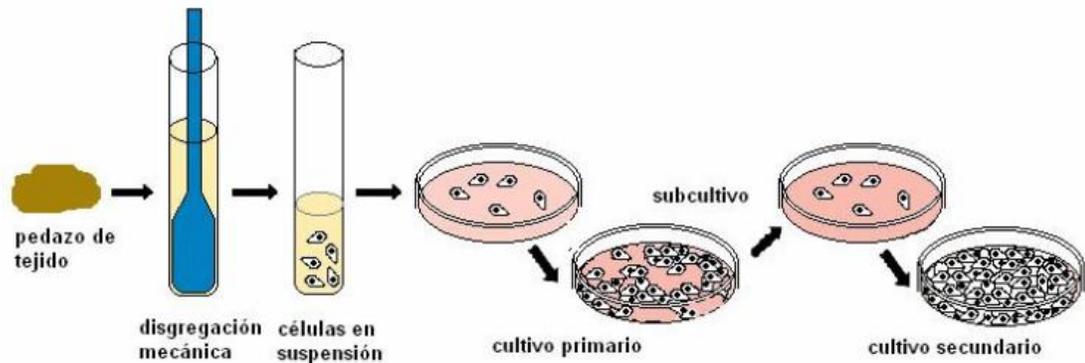


Figura 1.20 Etapas de un cultivo celular

Líneas celulares

Es aquel cultivo que se establece a partir de un tejido u órgano, en muchos casos de un tumor, y que se mantiene en proliferación un tiempo ilimitado.

Pueden ser resultado de una transformación, que se refiere a cambio de un cultivo primario a línea. No todas las líneas son igualmente sensibles al crecimiento de virus, lo que significa que no hay un tipo celular universal. Las líneas celulares pueden derivar de tumores, por transformación con oncogenes, o por tratamiento con carcinogénicos. Una particularidad es que pueden reproducirse de manera indefinida [69].

1.5.2 Medios de cultivo

El cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de instrumentos que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas y sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior. Podemos decir que el medio de cultivo estará formado por cuatro elementos: la naturaleza del sustrato o fase en que crecen las células, las condiciones físico-químicas y fisiológicas del medio, la naturaleza y composición de la fase gaseosa y las condiciones de incubación, especialmente la humedad y la temperatura [70].

El medio de cultivo contiene los suplementos necesarios (aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, proteínas, elementos traza, glucosa, etc.) para proporcionar un ambiente adecuado para el crecimiento y proliferación celular.

1.5.3 Conteo celular

Para determinar la densidad de las células se emplean diferentes técnicas, desde la relativamente simple cámara de conteo celular de la que existe numerosas variantes, entre ellas la cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la figura 1.21.

Es un cuadrado de 3×3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0,25 mm. Así pues el área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0,1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0,1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0,1 milímetro cúbico, es decir 0,1 micro litro [71] .

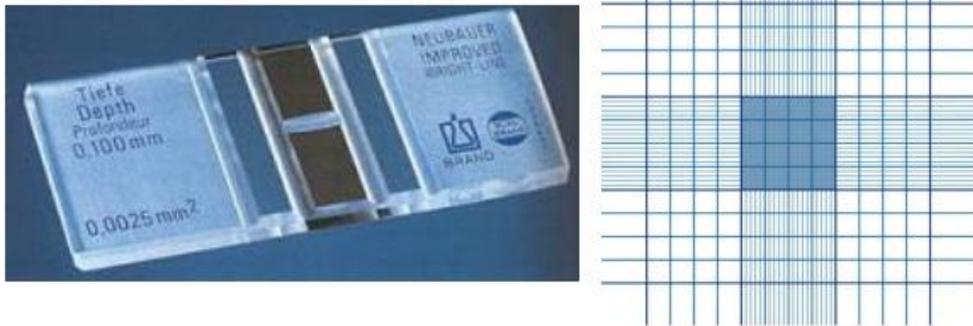


Figura 1.21. Cámara de Neubauer (izquierda) y esquema de la cuadrícula utilizada para el recuento de células (derecha).

1.5.4 Caracterización biológica

Los parámetros que definen la viabilidad celular en un experimento particular pueden ser muy diversos. Dentro de algunos ensayos podemos encontrar el ensayo mediante la técnica LIVE/DEAD.

La determinación de la viabilidad mediante la técnica de LIVE/DEAD nos permite realizar un ensayo funcional, en base a la integridad de su membrana plasmática. Para este tipo de ensayo se emplean fluorocromos del kit comercial LIVE/DEAD (Viability/citotoxicity kit for mammalian cells) diluidos en PBS. Después de la preparación se realiza la toma de imágenes con un microscopio de fluorescencia. Las longitudes de onda de excitación de los fluorocromos son de 494 nm para la calceína y 528 nm para el bromuro de etidio, respectivamente.

Hipótesis

Fabricar andamios a base de poli (hidroxibutirato) por medio de la técnica de electrohilado y modificarlos superficialmente por medio de polimerización por plasma, mejorando la adherencia y proliferación celular.

Objetivos

Objetivo General

Hallar las condiciones apropiadas para electrohilar andamios de PHB y poder realizar modificación superficial, para cultivar en ellos células Rin-M secretoras de insulina.

Objetivos específicos

- Encontrar las condiciones adecuadas para la producción de matrices de PHB.
- Realizar modificación superficial, a través de la técnica de polimerización por plasma empleando el monómero de pirrol y como dopante yodo.
- Caracterizar los andamios electrohilados de PHB por medio de las técnicas: Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier, Microscopia confocal-raman, Difracción de Rayos X, Calorimetría Diferencial de Barrido, Ángulo de contacto y Microscopia Electrónica de Barrido.
- Analizar la biocompatibilidad de las matrices por medio de un cultivo celular sobre los andamios *in vitro*, empleando la línea celular Rin-M.

Capítulo 2

Metodología Experimental

Este trabajo de investigación se basó en la realización de tres electrohilados de PHB a diferentes velocidades de inyección manteniendo constantes el resto de los parámetros (voltaje, temperatura, distancia entre aguja colector; etc.). Una vez que se encontró el andamio con la mejor distribución de fibras se procedió a realizar una modificación superficial por medio de la técnica de polimerización por plasma, empleando como monómero pirrol y dopante yodo para mejorar sus propiedades de adherencia celular, una vez que se tuvieron los andamios electrohilados se realizaron caracterizaciones estándares para conocer sus propiedades fisicoquímicas.

2.1 Materiales

Para la elaboración de los andamios electrohilados, se empleó un polímero biodegradable, el polímero usado fue PHB de la compañía Sigma Aldrich, en forma de gránulos, las características principales del polímero se muestran en la tabla 2.1. El solvente empleado para disolver el polímero fue cloroformo de la compañía J.T. Baker (9180-02), ya que este solvente se evapora en el proceso de electrohilado permitiendo que se formen las fibras, las características de este solvente se muestran en la tabla 2.2 [74]. Una vez que se tenía un solución homogénea se adiciono Alcohol Etílico para aumentar el compactado de la cadena polimérica, las características del alcohol etílico se describen en la tabla 2.3 [75].

		Referencia
Formula molecular	$[\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$	[72]
Temperatura de Fusión cristalina	172°C- 180°C	[72][73]
Temperatura de transición vítrea	2°C	[73]
Resistencia a la tracción	40 MPa	[73]
Alargamiento a la rotura	6%	[73]

Tabla 2.1 Propiedades del PHB

Fórmula molecular	CHCl₃
Peso molecular	119.38 g/mol
Punto de ebullición	62°C
Punto de fusión	-63°C
Temperatura de descomposición	225°C
Solubilidad al agua a 77°F	5 g/L
Porcentaje volátil	100%

Tabla 2.2 Propiedades del Cloroformo

Fórmula molecular	C₂H₆O
Peso molecular	46.07 g/mol
Punto de ebullición	78.3°C
Punto de fusión	-114°C
Punto de Inflamabilidad	13°C

Tabla 2.3 Propiedades del Alcohol Etilico

Para realizar la modificación superficial, empleando la técnica de polimerización por plasma se utilizó como monómero pirrol y como dopante se usó yodo, ambos materiales de la compañía Sigma Aldrich, las especificaciones del proveedor se muestran en tabla 2.4 [73-74] para el caso del pirrol y en la tabla 2.5 para el yodo [76].

Formula molecular	C₄H₅N
Grado	Grado regente
Densidad de vapor	2.3 (vs aire)
Ensayo	98%
Índice de refracción	1.508
Punto de ebullición	131°C
Punto de Fusión	-2.3°C
Densidad	0.967 g/mol

Tabla 2.4 Propiedades del Pirrol

Formula molecular	I₂
Presión de vapor	0.31 mmHg (25 °C)- 1 mmHg (38.7 °C)
Densidad de vapor	9 (vs aire)
Ensayo	≥99%
Resistividad	1.3E15 μΩ-cm
Punto de ebullición	183°C
Punto de Fusión	-113°C
Impurezas	≤0.05% materia no volátil

Tabla 2.5 Propiedades del Yodo

2.2 Método experimental

2.2.1 Preparación de soluciones poliméricas

En esta fase del proyecto se prepararon tres soluciones poliméricas a base de PHB, para lograr obtener una solución homogénea se colocaron 2.4 g de polímero así como 18 ml de cloroformo en un recipiente de cristal, posteriormente se colocó un agitador magnético en el interior del recipiente para obtener una mejor dispersión del polímero en el solvente, a su vez se puso en una plancha térmica a 50 °C por 1 hora para llegar a obtener la solución deseada, como se observa en la figura 2.1.

Después se agregaron 2 ml de Alcohol etílico, realizando una agitación la cual permitiera la incorporación a todo el volumen de nuestra solución. Es necesario mencionar que las concentraciones del polímero así como los solventes se mantuvieron constantes, el factor variante fue la velocidad de inyección en el electrohilado.



(a)



(b)

Figura 2.1. (a) Soluciones poliméricas colocadas sobre la plancha térmica, (b) Soluciones de PHB listas para electrohilar.

2.2.2. Proceso de electrohilado

Para el proceso de electrohilado se hizo uso del equipo del Área de Polímeros (T-125), se empleó una maquina “Nanofiber Electrospinning Unit “marca NaBond así como una bomba de inyección modelo TCI-IV, como se muestra en la figura 2.2.

Para realizar el suministro de la solución polimérica se empleó una jeringa de 20 ml en la cual se vertió la solución, el orificio de la jeringa se acopló a una manguera de plástico con un diámetro de 5 mm y una longitud de 50 cm aproximadamente en el extremo de la manguera se colocó una aguja, ambos extremos de la manguera fueron cubiertos con parafilm para evitar cualquier tipo de escurrimiento de solución polimérica durante el proceso de electrohilado. Una vez terminado este proceso se procedió a colocar la jeringa en la bomba de inyección para abastecer la solución. Los parámetros empleados para los tres distintos electrohilado se muestran en la tabla 2.6.



Figura 2.2 Máquina de Electrohilado.

Electrohilados	
Razón de inyección	10, 5 y 3 ml/h
“ ω ” del colector	1723 rpm
Distancia entre aguja y colector	12 cm
Temperatura	30°C
Voltaje aplicado	15 kV

Tabla 2.6 Parámetros de los tres diferentes electrohilados

Para la recolección de las fibras se usó un colector de tipo cilíndrico recubierto con una hoja de papel aluminio, cada uno de los diferentes procesos se realizaron en el interior de la cámara del equipo de electrohilado.

2.3 Polimerización por Plasma

La modificación superficial se realizó a uno solo de los andamios electrohilados, la malla a la cual se realizó dicho cambio fue cuya razón de inyección fue de 3 ml/h, en el siguiente capítulo se detalla el procedimiento para elegir este andamio.

La modificación superficial se llevó a cabo en un reactor de plasma como se muestra en la figura 2.3

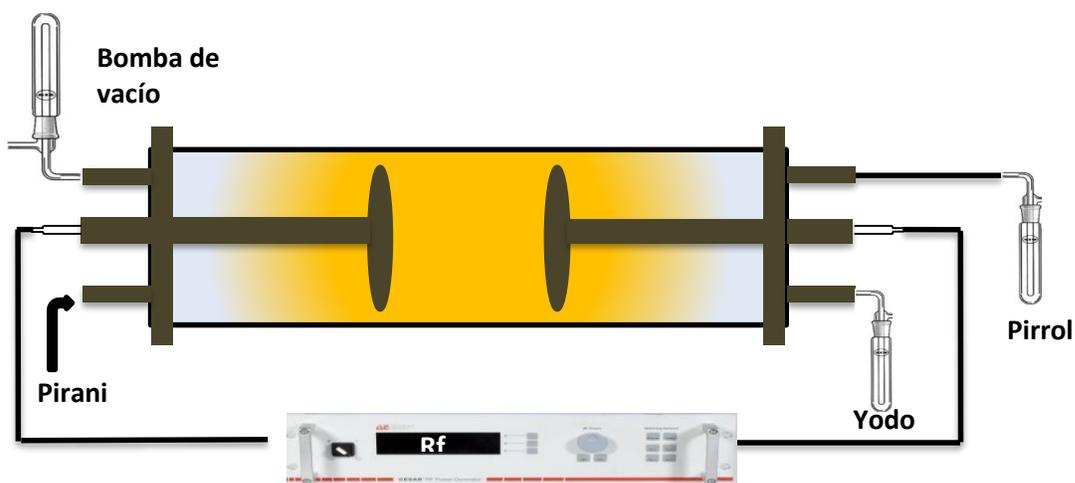


Figura 2.3. Esquema del reactor de plasma.

El reactor está conformado por un tubo de cristal de 16 cm de largo por 9 cm de diámetro así como 5 mm de espesor, los extremos se encuentran sellados por dos tapas de acero inoxidable, en cada una de ellas se encuentran dos electrodos redondos de acero inoxidable de 7 cm de diámetro.

Fue necesario cortar segmentos del andamio los cuales fueron colocados dentro del reactor de plasma, una vez colocados los segmentos de andamio se procedió a sellar el reactor con ambas tapas, un extremo del reactor se conectó a un sensor de vacío así como a una trampa para gases, el otro extremo se conectó al Pirrol y al yodo por medio de manguera de látex, la síntesis se realizó a una potencia de 20W, 3.4×10^{-1} Torr de presión por un tiempo de 25 minutos. Ver figura 2.4



Figura 2.4 Muestras de fibras electrohiladas de PHB dentro del reactor de plasma.

2.4 Técnicas de espectroscopía vibracional

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

El análisis fisicoquímico de las fibras electrohiladas de PHB se realizó con un espectrofotómetro infrarrojo por Transformada de Fourier, marca Pekín Elmer modelo Spectrum Gx (200 FTIR-System) como se observa en la figura 2.5.

Este modelo tiene un rango de resolución de $0.2\text{-}64\text{ cm}^{-1}$ el cual emplea un haz IR con beamsplitter de Bromuro de potasio (KBr) con un rango de $7000\text{-}50\text{ cm}^{-1}$ como las muestras a analizar son sólidas el equipo cuenta con una punta para sólidos marca Smiths (Smith Detection) modelo DuraSamplIR II.

Una de las ventajas de esta técnica es que no se requiere una preparación específica de las muestras, por lo que solo se requirió recortar secciones de los tres diferentes andamios de $2\text{x}2\text{ cm}$ como se muestra en la fig. 2.5 los cuales fueron colocados en el dispositivo de ATR como se ilustra en la figura 2.5.

Los parámetros de medición se mantuvieron constantes durante todas las mediciones, se realizaron 32 barridos a una longitud de onda de $4000\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ para cada muestra, obteniendo así un espectro de FTIR-ATR para cada una de las muestras analizadas.



Figura 2.5. Espectrómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier empleando el dispositivo ATR.

2.4.2 Microscopía Confocal Raman

Esta técnica es complementaria al análisis de FTIR-ATR las cuales miden modos vibracionales de las moléculas presentes en los andamios electrohilados de PHB. Esta técnica cuenta con la ventaja de que podemos analizar una zona en específico debido a la parte Confocal del microscopio. Las muestras fueron analizadas con un microscopio de la marca WITec (Focus Innovations), modelo Alpha 300RA, el equipo cuenta con dos tipos de láseres, uno que emite a 633 nm (rojo) y el segundo con una longitud de onda de 532 nm (verde), empleando un láser verde (532 nm) con una resolución de 200 nm.

En la figura 2.6 podemos observar el microscopio empleado para el análisis Raman de las fibras electrohiladas de PHB.



Figura. 2.6 Microscopio Confocal-Raman.

Para este tipo de análisis no es necesario preparar las muestras de una manera en especial, se cortaron segmentos de andamios de 4x4 cm aproximadamente, cada muestra se situó en un porta objeto fijándose con cinta adhesiva doble cara. Para poder realizar el análisis fue necesario enfocar una fibra en específico para poder tomar la señal de la muestra, una vez enfocado el andamio se procedió a prender el láser hasta alcanzar la intensidad máxima del láser verde con un intervalo de longitud de onda de 0- 4000 cm^{-1} .

2.5 Cristalografía en polvo

2.5.1 Difracción de Rayos X

Por medio de esta técnica es posible obtener el grado de cristalinidad de nuestro polímero, así como observar los picos característicos del PHB, para ello se empleó un equipo de DRX con un difractómetro marca BRUKER, modelo D (ADVANCE ECO el cual se puede apreciar en la fig. 2.7 con una radiación tipo $K\alpha$ de Cu. Para poder analizar las muestras fue necesario depositar un segmento en forma de película sobre un porta muestras de bajo fondo cubriéndolo por completo. Las muestras se manejaron con un ángulo de barrido de Rayos X de $2\theta = 2^\circ$ a 70° .



Figura 2.7 Difractómetro de Rayos X

2.6 Caracterización Térmica

2.6.1 Calorimetría Diferencial de Barrido

Esta técnica nos permite conocer transiciones del material bajo flujo de calor. El análisis térmico se realizó con la ayuda de un equipo DSC-2929 marca TA Instruments como se muestra en la fig. 2.8.

Para poder realizar el estudio fue necesario tomar muestras de 3 a 10 mg, para posteriormente encapsularlas en “charolas” de aluminio. El equipo cuenta con dos celdas en una se coloca la charola de referencia para su análisis térmico cada una de las muestras se depositó en la celda vacía del equipo, se operó con una atmósfera controlada de N₂ en forma de gas.

Las condiciones para el ciclo fueron las siguientes.

- Calentamiento a 10 °C/min desde 50 °C- 200 °C.
- Se borra la historia térmica precedente, manteniendo la temperatura por 3 minutos a 200 °C.
- La tercera etapa corresponde al enfriamiento de 200 °C a 0 °C con una razón de cambio de 10 °C /min.
- Por último se realiza el segundo calentamiento de 0 °C a 200 °C a 10 °C/min.



Figura 2.8 Equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido DSC-2920 marca TA Instruments

2.7 Tensión y energía superficial (Propiedades de mojado)

2.7.1 Ángulo de contacto

Es necesario saber el grado de hidrofobicidad de nuestros electrohilados de PHB ya que serán empleados como andamios para cultivos celulares, y tendrán interacción con el medio de cultivo de las células (medio acuoso).

El ángulo de contacto es una propiedad superficial de los sólidos que cuantifica su tendencia a la hidrofobicidad como parámetro importante para analizar los mecanismos de interacción entre las fases sólida y líquida.

Dado que los andamios que fabricamos contarán con poros, estos pueden absorber líquidos, por lo que el ángulo de contacto cambiará como función del tiempo, para ello emplearemos el ángulo de contacto dinámico. Para medir este ángulo de contacto dinámico, así como el rango o grado de absorción y de expansión, es necesario captar una secuencia de imágenes durante la interacción [60]. Para realiza las mediciones

se tomaron 3 muestras de 3x3 cm de cada andamio, posteriormente se les colocó una gota de agua con un volumen de 20 μl por medio de una micropipeta, este procedimiento se repitió cinco veces para cada una de las muestras, las fotografías se tomaron con la ayuda de una cámara digital de 12x.

El ángulo de contacto se determinó con un software libre ImageJ® con el cual se midió el ángulo de contacto de cada una de las fotografías y se obtuvo un promedio para cada uno de los andamios analizados.

2.8 Caracterización morfológica

2.8.1 Microscopia Electrónica de Barrido

Para poder visualizar la morfología de las fibras elaboradas con PHB y las recubiertas con PPy-I por plasma se empleó un microscopio electrónico de barrido de alta resolución, marca HRSEM Jeol 7600F, con una resolución de 4nm y un voltaje de 30 kV el equipo se puede observar en la figura 2.9.

Las muestras necesitaron una preparación previa la cual consistió en un recubrimiento de oro con la ayuda de un equipo marca Baltec, modelo SCD-050 Sputter Coater, (ver fig. 2.10) aplicando un voltaje de 200 V durante 2 minutos, posteriormente las muestras se colocaron en el interior de la cámara del microscopio.



Figura 2.9 Microscopio Electrónico de Barrido.



Figura 2.10 Equipo para el recubrimiento de oro.

2.9 Cultivos celulares

Para la evaluación biológica de los andamios electrohilados fue necesario cultivar células sobre ellos para evaluar su biocompatibilidad, empleando cultivo secundario, es decir se empleó una línea celular para la evaluación biológica; las células usadas fueron células betas pancreáticas de la línea Rin-M (ATCC® CRL2057™).

Los medios para preservar los cultivos fueron preparados por medio de mezclas establecidas por el proveedor, los cuales proporcionan los nutrientes y factores de crecimiento adecuados para este tipo de células [77].

La prueba se realizó por triplicado para lo cual se necesitó tener tres muestras de cada andamio de 3x3 cm las cuales se esterilizaron por medio de luz ultravioleta con una longitud de onda de 254nm por un periodo de dos días.

2.9.1 Línea celular Rin-M

El uso de líneas celulares nos facilita su identificación, ya que hay una sola especie de células es decir son homogéneas.

Se utilizó línea celular RIN-M correspondientes a células beta de rata adquirida en ATCC®. Esta línea celular es proveniente de un insuloma de rata macho de la especie *Rattus Norvegicus*; el tumor fue ocasionado por altas dosis de radiación [78] posteriormente se realizó un trasplante en diferentes ratas (macho) de la misma especie para lograr estabilizar la línea celular [79]. Este tipo de células son secretoras de insulina y somatostatina [80], tienen una morfología epitelial.

La proliferación celular se llevó a cabo siguiendo el protocolo de ATCC®, empleando RPMI-1640 como medio de cultivo base adicionalmente se agregó suero fetal bovino y antibiótico con antimicótico al 10% y 1% del volumen total, respectivamente. La línea celular se incubó en un ambiente recomendado de 5% de CO₂ a 37 °C, empleando cajas de cultivo (petri) de 100x20 mm y cambiando el medio de cultivo cada tercer día.

2.9.2 Cultivo celular sobre los andamios

Una vez que se tenían los andamios esterilizados (tres muestras para cada tipo de electrohilado) se procedió a realizar los cultivos sobre cada una de las muestras usando cajas petri de 35x10 mm. Todos los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones óptimas, a 37 °C y con un ambiente húmedo al 5% de CO₂, empleando su medio de cultivo correspondiente y cambiando el medio cada tercer día por un lapso de diez días.

Previo al sembrado celular se depositaron en un tubo eppendorf con medio de cultivo obteniendo un volumen de 2 ml, este se centrifugó 1200 rpm por 5 minutos dando como resultado un “botón” celular el cual fue disociado con ayuda de una pipeta, las células se depositaron sobre una cámara Neubauer para su conteo, este se realizó con la ayuda de un microscopio óptico. Se sembraron 4×10^3 células en cada uno de

los andamios, se tomaron fotografías de los cultivos celulares (sobre los andamios) con ayuda de un microscopio óptico y una cámara de 10 mega pixeles. El cultivo celular sobre los andamios fue por un periodo de diez días.

2.9.3 Viabilidad celular

La viabilidad celular se realizó mediante pruebas de viabilidad LIVE/DEAD, empleando un kit de Calceína-AM y Homodímero de Etidio-1(EthD-1) adquirido en AccesoLab®, como material adicional se emplearon pipetas con puntas con un diámetro de 4mm para no destruir los agregados celulares formados sobre los cultivos celulares.

Antes de agregar Calceína-AM y EthD-1 las células de nuestros cultivos celulares fueron fijadas con Formaldehido (CH_2O), para ello se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- Retirar el medio de cultivo de cada una de las cajas petri con el debido cuidado.
- Agregar y retirar 3ml de PBS (para realizar lavado).
- Agregar 1 ml de CH_2O y dejarlo actuar por 5 minutos, posteriormente retirar.
- Lavar con 3 ml de FBS.

Para la solución de viabilidad, se preparó una solución de PBS con Calceína-AM y EthD-1 en una concentración de $1\mu\text{M}$ y $2\mu\text{M}$ correspondientes a las indicadas por el kit. Enseguida se tomaron $500\mu\text{l}$ y se depositaron en cada una de las cajas petri, cubriéndolas para protegerlas de la luz, se dejaron por un lapso de treinta minutos, para después ser analizadas con un microscopio Confocal.

Esta técnica nos permite diferenciar células vivas y células muertas, ya que Calceína-AM y Homodímero de Etidio-1 hace que los núcleos de las células viables fluorescen en color verde mientras que las células muertas fluorescen en color rojo.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Razón de Inyección y Microscopia Electrónica de Barrido

Se determinó la razón de inyección adecuada para un andamio electrohilado de PHB, para posteriormente realizar modificación superficial por polimerización por plasma con PPy-I esperando una mejor adherencia y proliferación celular; se emplearon micrografías de SEM para poder observar la morfología y determinar el diámetro promedio de cada uno de los andamios electrohilados de PHB.

En las figuras 3.1 se muestran micrografías del primer andamio electrohilado a una razón de inyección de 10 ml/h obtenidas por SEM, en 3.1(a) es posible apreciar la estructura del andamio en forma de “hebras” largas, las cuales presentan aglomeraciones así como rosarios (perlas) a lo largo de su longitud, las cuales muestran una rugosidad estas imperfecciones se atribuyen a la velocidad de inyección, la cual no permitió la evaporación adecuada del solvente. Las fibras no muestran una orientación privilegiada, el diámetro de las fibras no es uniforme a lo largo de su longitud. En 3.1 (b) es posible apreciar perlas que se formaron a lo largo de las fibras las cuales se muestran aglomeraciones rugosas en segmentos de las fibras, además se puede observar fibras delgadas comparadas con la perlas formadas. En la figura 3.1 (c) se puede observar que existe separación entre las fibras, también se observan poros sobre los rosarios. Por medio de las micrografías es posible conocer al diámetro promedio de las fibras electrohiladas como se muestra en el histograma de la figura 3.1 (d) el diámetro hallado fue de $1.72 \pm 15 \mu\text{m}$ lo cual nos indica que son fibras delgadas las cuales se pueden apreciar en las distintas micrografías.

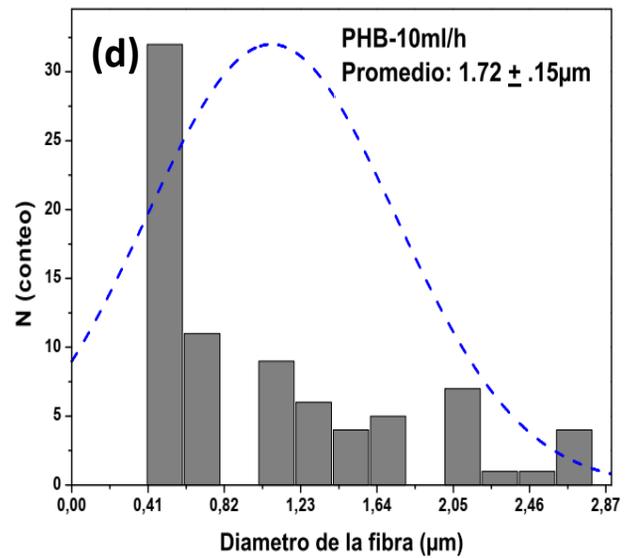
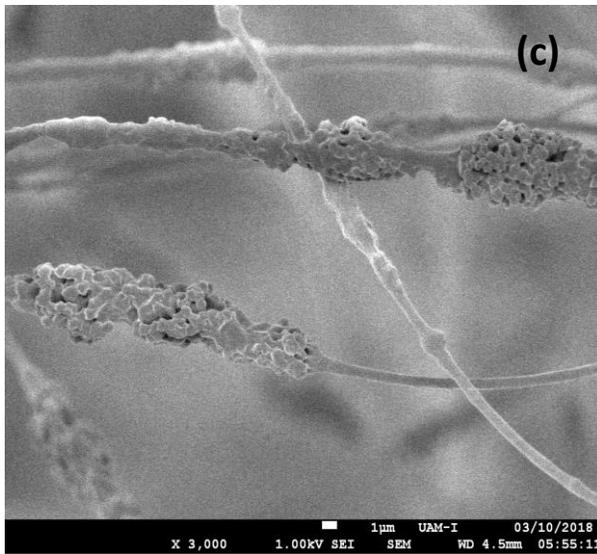
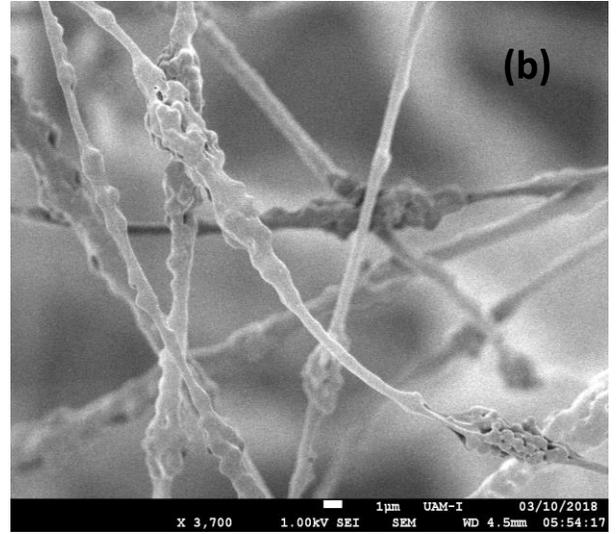
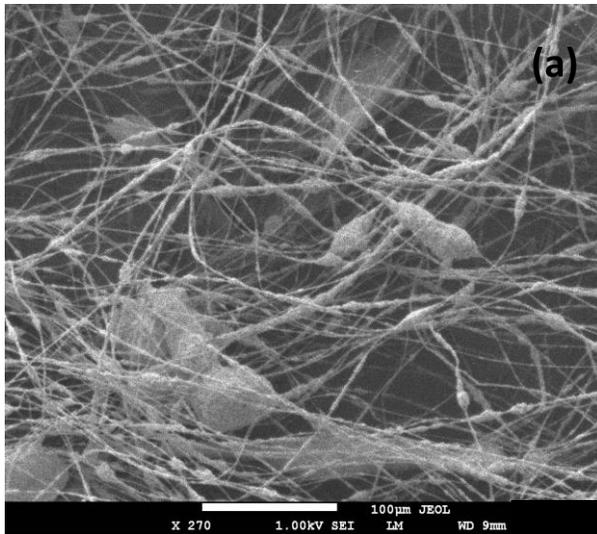


Figura 3.1 Microfotografías obtenidas por SEM (a), (b), (c) y (d) diámetro de las fibras; del andamio de PHB con una razón de inyección de 10 ml/h.

Debido a los resultados encontrados anteriormente se decide bajar la razón de inyección de 10 ml/h a 5 ml/h. Los resultados encontrados fueron los siguientes:

En la figura 3.2 se muestran microfotografías del andamio electrohilado a una velocidad de 5 ml/h; en 3.2(a) es posible apreciar la formación de cúmulos de polímero, las fibras presentan una orientación al azar, la formación de rosarios a lo largo de su longitud es persistente se puede observar una mejor distribución de fibras sobre todo el andamio en comparación con el andamio anterior, en 3.2 (b) es posible observar poros sobre las fibras así como en las perlas, es posible identificar que las fibras se encuentran entre cruzadas entre sí.

Mientras que en 3.2 (c) se observan los rosarios que se formaron durante el proceso de electrohilado, la formación de estos rosarios se debe a que el solvente no alcanzó a evaporarse en su totalidad ocasionando este tipo de formaciones sobre todo el andamio, es posible apreciar que los rosarios tienen poros sobre toda su superficie. El diámetro promedio es de $2.16 \pm 0.32 \mu\text{m}$ el cual se muestra en el histograma de la figura 3.2 (d).

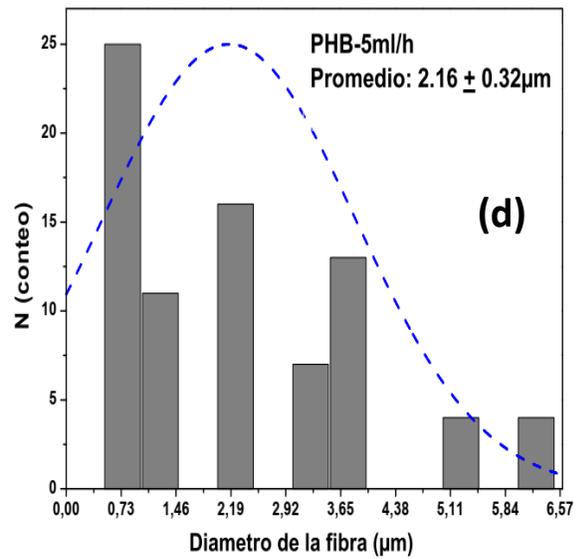
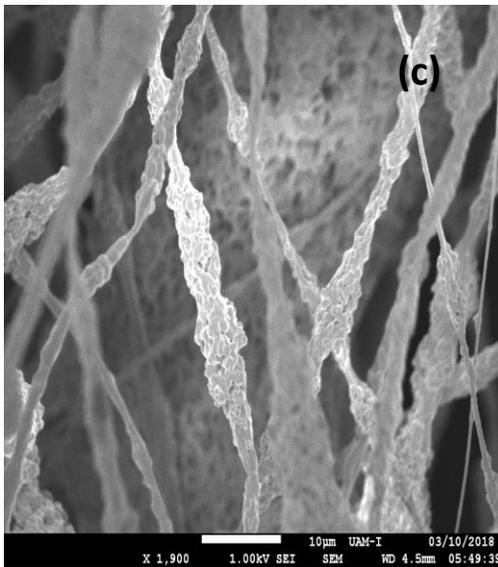
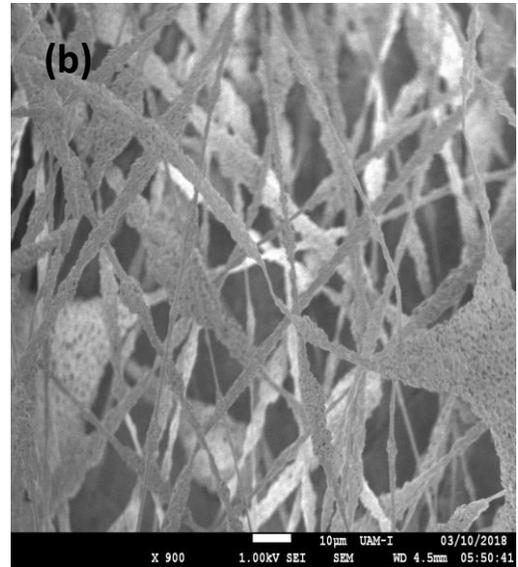
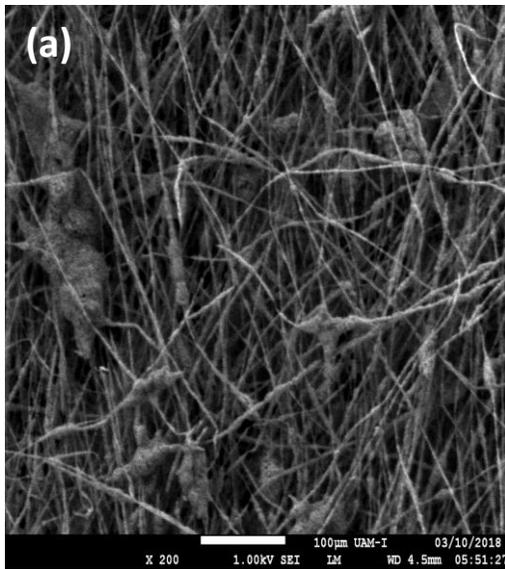


Figura 3.2 Microfotografías SEM (a), (b) y (c) y (d) diámetro de las fibras del andamio de PHB con una razón de inyección de 5 ml/h.

Dado que los andamios que se obtuvieron no muestran homogeneidad se opta por reducir la razón de inyección a 3 ml/h encontrando los siguientes resultados.

Las fibras se encuentran distribuidas sobre todo el andamio ver fig. 3.3 (a), también podemos observar que las fibras muestran una mejor orientación privilegiada, las fibras se encuentran con una mayor distribución sobre el andamio disminuyendo las separación entre ellas, a pesar de ello aún sigue presente la formación de rosarios sobre el andamio, en la figura 3.3 (b) es posible apreciar poros sobre la superficie de las fibras también es posible apreciar en la parte inferior de la microfotografía el segmento de la formación de una perla, en 3.3 (c) se pueden observar fibras, las cuales presentan poros en su superficie, además es notable que el tamaño no es homogéneo. En 3.3 (d) se muestra el diámetro promedio de este andamio el cual es de $2.49 \pm 0.09 \mu\text{m}$.

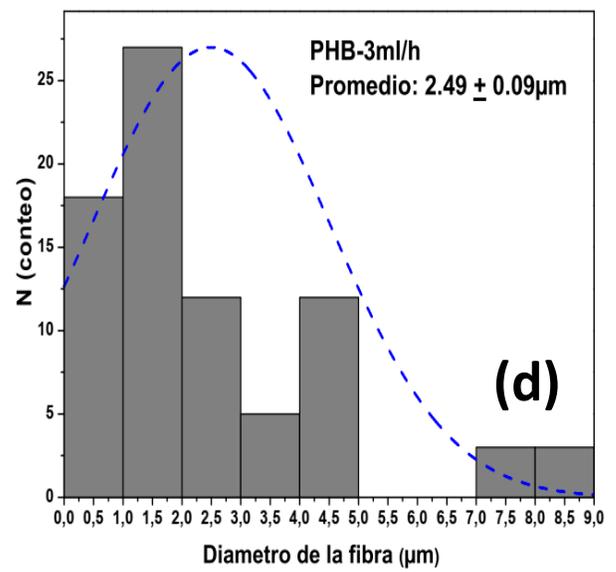
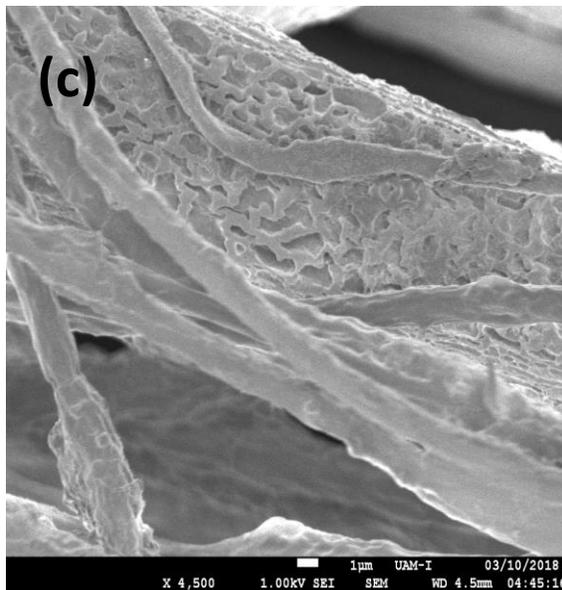
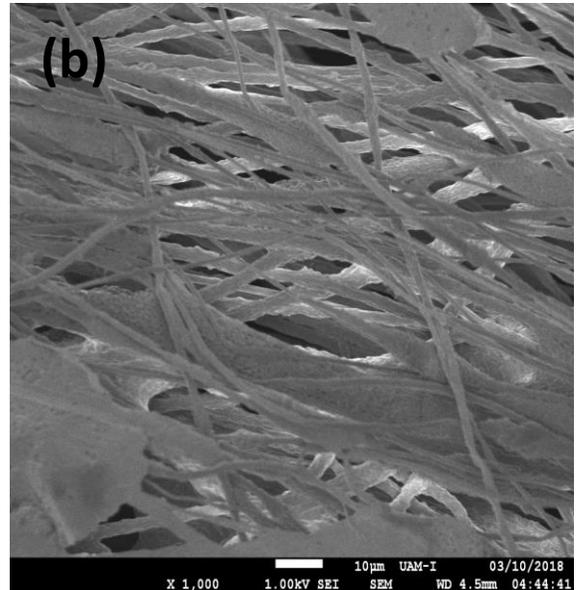
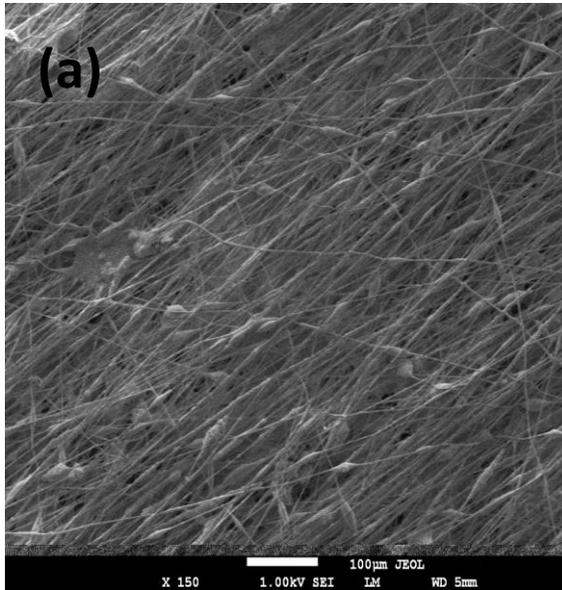


Figura 3.3 Microfotografías SEM (a), (b) , (c) y (d) diámetro de las fibras del andamio de PHB con una razón de inyección de 3ml/h.

3.2 Polimerización por plasma.

Una vez analizados los tres andamios electrohilados por medio de SEM, fue posible determinar que andamio era el más apropiado para modificar su superficie por medio de polimerización por plasma, empleando Pirrol y Yodo como dopante.

El andamio empleado para este proceso del experimento fue el andamio electrohilado con una velocidad de inyección de 3 ml/h debido a que el andamio mostró una mejor distribución y tamaño, además de que las fibras se encontraron distribuidas sobre todo el andamio.

Durante la síntesis se pudo observar la reacción que se llevaba en el interior del reactor, al inicio de la reacción el color era azul, posteriormente el color paso a ser morado. Al finalizar la síntesis se obtuvieron fibras recubiertas con PPy-I fue notable el cambio de apariencia ya que los andamios pasaron de tener un color blanco a ser de color café como se observa en la figura 3.4.

En la figura 3.4 (a) se observa el andamio con modificación superficial en el cual se pueden observar fibras que sufrieron fracturas, la modificación superficial cubrió la superficie de las fibras, mientras que en 3.4 (b) aún es posible apreciar poros sobre la superficie de las perlas presentes; la figura 3.4 (c) nos muestra que la superficie de las fibras se volvió rugosa y el recubrimiento se realizó de manera satisfactoria. Debido al recubrimiento superficial se logró un aumento en el diámetro de las fibras, como se observa en el histograma de la figura 3.4 (d) el cual nos muestra que el diámetro promedio es de $2.87 \pm 0.05 \mu\text{m}$.

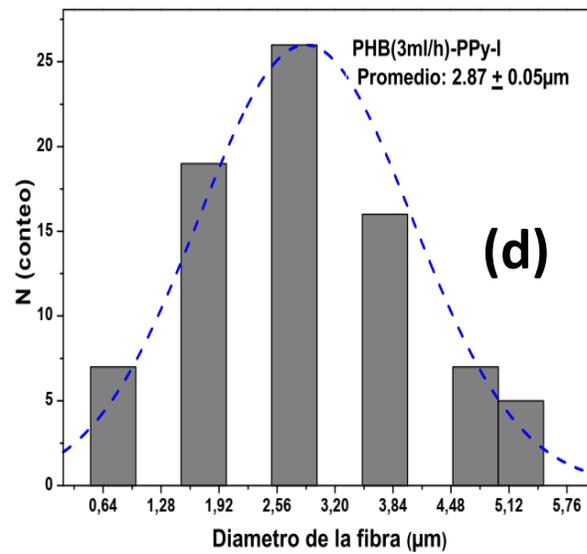
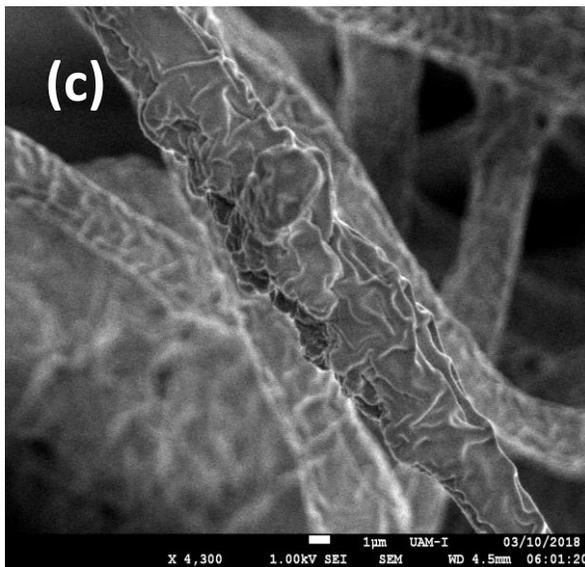
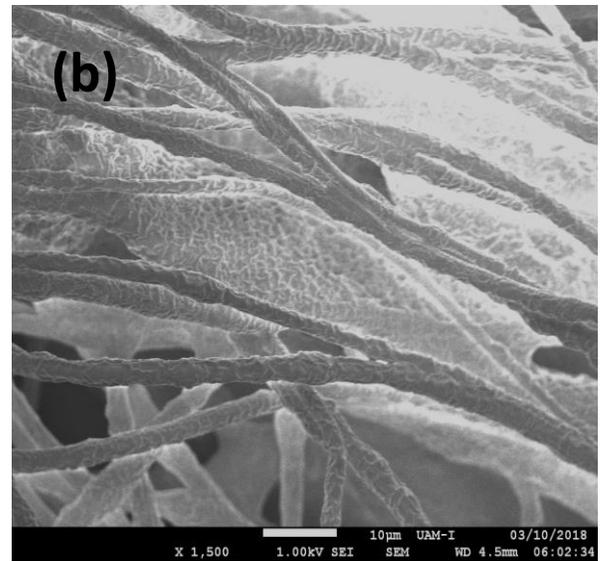
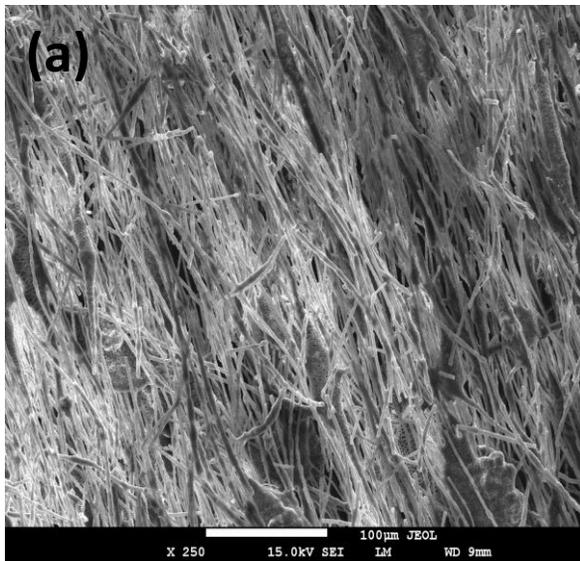


Figura 3.4 Microfotografías obtenidas por SEM(a), (b) y (c) , (d) y diámetro de las fibras del andamio de PHB-PPy-I.

3.3 Técnicas de Espectroscopía Vibracional

3.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier por Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

Se realizó el estudio para cada uno de los andamios para poder determinar los grupos funcionales presentes.

En la fig. 3.5 se muestran los espectros de infrarrojo de cada uno de los andamios se observan los modos vibracionales de los diferentes grupos funcionales correspondientes al polímero empleado (PHB), así como los grupos funcionales de Pirrol en el caso del andamio con modificación superficial, la tabla 3.1 muestra los valores obtenidos así como el grupo funcional correspondiente.

λcm^{-1} (longitud de onda)	Modo de vibración
2935	Estiramiento asimétrico CH_3
2977	Estiramiento asimétrico CH_3
1721	Estiramiento $\text{C}=\text{O}$
1451	Deformación asimétrica CH
1383	Deformación simétrica CH_3 y Estiramiento $\text{C}-\text{H}$
1300-1000	Estiramiento $\text{C}-\text{O}-\text{C}$

Tabla 3.1(a), (b) y (c). Bandas características atribuidas a los andamios de PHB

En la figura 3.5 (a), (b) y (c) se presenta el espectro de infrarrojo de poli(3-hidroxi-butirato) (PHB) electrohilado a diferentes velocidades de inyección se presentan dos bandas en 2977 y en 2935 cm^{-1} correspondientes al estiramiento asimétrico del enlace CH_3 . También aparecen una banda en 1721 cm^{-1} debido al estiramiento del enlace $\text{C}=\text{O}$ perteneciente a compuestos carboxílicos.

La banda que aparece en 1451 cm^{-1} se debe a la deformación asimétrica del enlace CH de grupos metilenos, en 1383 cm^{-1} ocasionado por el estiramiento del enlace C-H de grupos metilos, así como deformación simétrica de CH_3 y las bandas que comprenden de $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ son originadas por el estiramiento del enlace C-O del grupo éster.

En la figura 3.5 (d) se muestra el espectro infrarrojo del andamio polimerizado con PPy-I, en el podemos notar en $3781\text{-}3052\text{ cm}^{-1}$ una banda intensa correspondiente al grupo aminas, la banda de 1721 cm^{-1} aumento lo cual nos indicia la presencia de más grupos CH_2 . El resto del espectro se mantiene igual que el resto.

Los resultados encontrados corresponden a los reportados en la literatura [81-82]

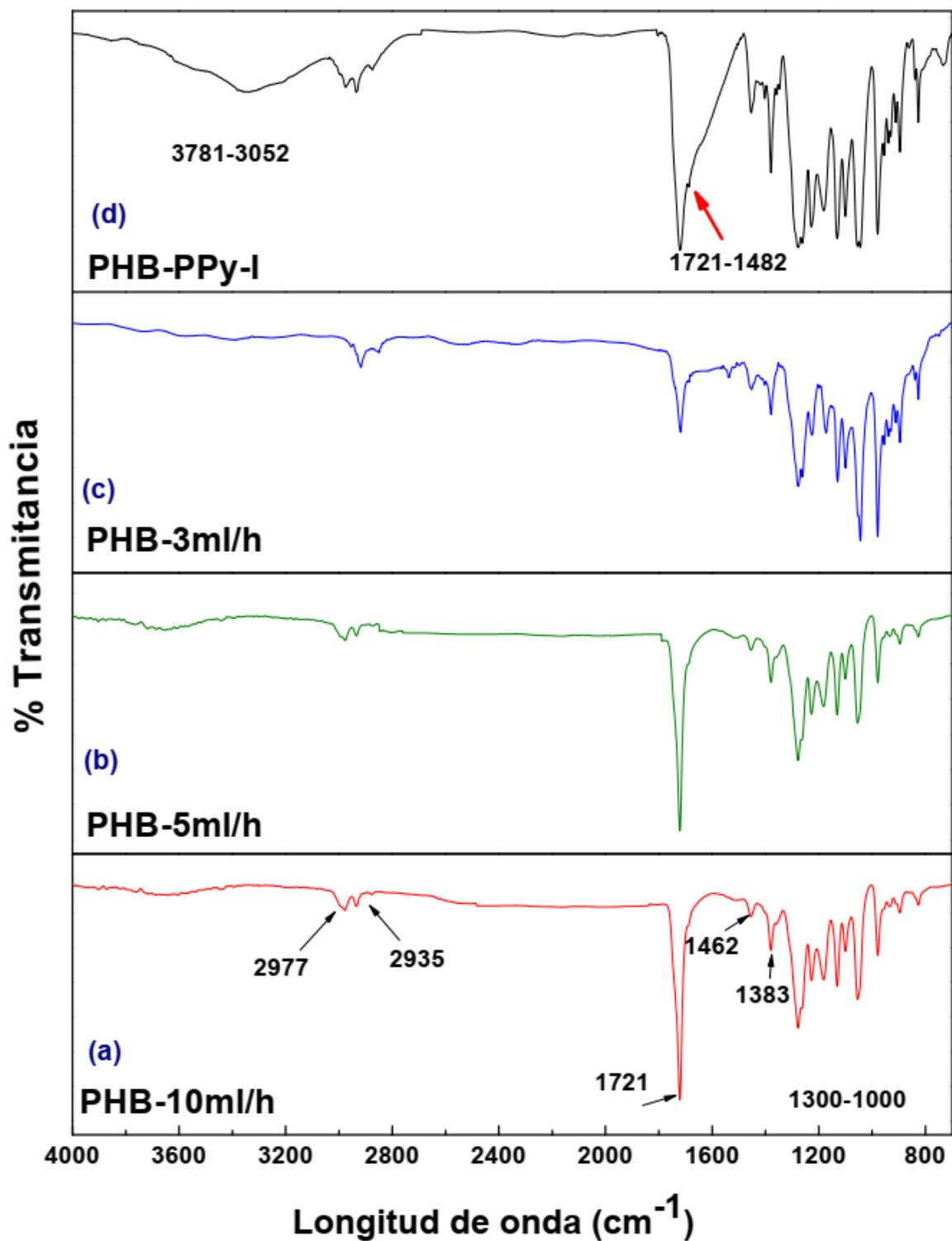


Figura 3.5 Espectros FTIR-ATR: (a), (b) y (c) Espectros de infrarrojo de los andamios electrohilados de PHB, (d) espectro de infrarrojo del andamio de PHB polimerizado con PPy-I.

3.3.2 Microscopia Confocal- Raman

La caracterización Raman nos permite hallar el espectro de los diferentes enlaces químicos que conforman el polímero, asimismo se empleó un microscopio Confocal el cual no permite tener una imagen de la zona en específico de la cual proviene el espectro obtenido.

En la figura 3.6 se puede apreciar el espectro Raman de los cuatro diferentes andamios electrohilados de PHB en (a), (b) y (c), se muestran los andamios electrohilados a las diferentes velocidades de inyección, se puede apreciar que presentan los mismo picos característicos entre ellos, los picos más notables se encuentran alrededor de 216 cm^{-1} en el cual aprecia un pico correspondiente al enlace CH_3 (torsión), en 1720 cm^{-1} aparece una banda debido al estiramiento cristalino del enlace $\text{C}=\text{O}$, aparecen tres señales en 2945 , 2987 y 3015 cm^{-1} debido al estiramiento asimétrico del enlace CH_3 . La información hallada es consistente con lo reportado por Tsuyoshi Furukawa [83] y Celly M.S [84], dado que la información es consistente con la información obtenida por medio de FTIR-ATR.

En la figura 3.6 (d) se muestra el espectro correspondiente del andamio polimerizado, debido a que el pirrol fluoresce es notable una banda alrededor de $1600\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ la cual enmascara cualquier otra señal que pudiera indicarnos la presencia de enlaces característicos de PHB, sin embargo se intensificaron dos señales una en 1346 cm^{-1} atribuida al enlace CH (deformación) y una señal en 1590 cm^{-1} debido al enlace CH_3 (deformación simétrica).

La parte complementaria de esta técnica fue el uso de un microscopio Confocal el cual nos permitió visualizar el segmento de una fibra de la cual se obtuvo el espectro que nos permitió identificar las distintas señales Raman. La figura 3.7 muestra las diferentes imágenes obtenidas por medio del microscopio confocal de cada uno de los andamios analizados en esta parte del trabajo.

En 3.7 (a) se puede percibir fibras y aglomeraciones correspondientes al andamio de 10 ml/h las cuales se observaron con una mayor resolución en SEM, al ser visibles en Confocal es notable que el tamaño de los rosarios son de tamaño mayor al de las fibras, el espectro fue tomado sobre uno de los rosarios ya que las fibras al ser muy delgadas eran quemadas por el láser antes de poder obtener la señal Raman correspondiente, en 3.7 (b) se muestra la imagen correspondiente al electrohilado con una razón de inyección de 5 ml/h, en cual se observan un par de fibras las cuales se encuentran demasiado separadas entre sí, igualmente se llega a observar un rosario de menor volumen que en el caso del andamio de 10 ml/h, además de mostrar una mayor uniformidad en el diámetro de las fibras, la figura 3.7 (c) pertenece al andamio que fue electrohilado con una rapidez de 3ml/h en la cual se observan fibras delgadas pero con mayor uniformidad que en los andamios anteriores, fue posible tomar el espectro sin ninguna dificultad, como en los andamios anteriores, para el caso de la figura 3.7 (d) se pueden observar las fibras modificadas superficialmente las cuales muestran un cambio de color en su superficie, a diferencia de las otras muestras debido a la modificación superficial que se le realizó no fue posible obtener un espectro que nos permitiera identificar los grupos de Polipirrol así como los grupos correspondientes a PHB.

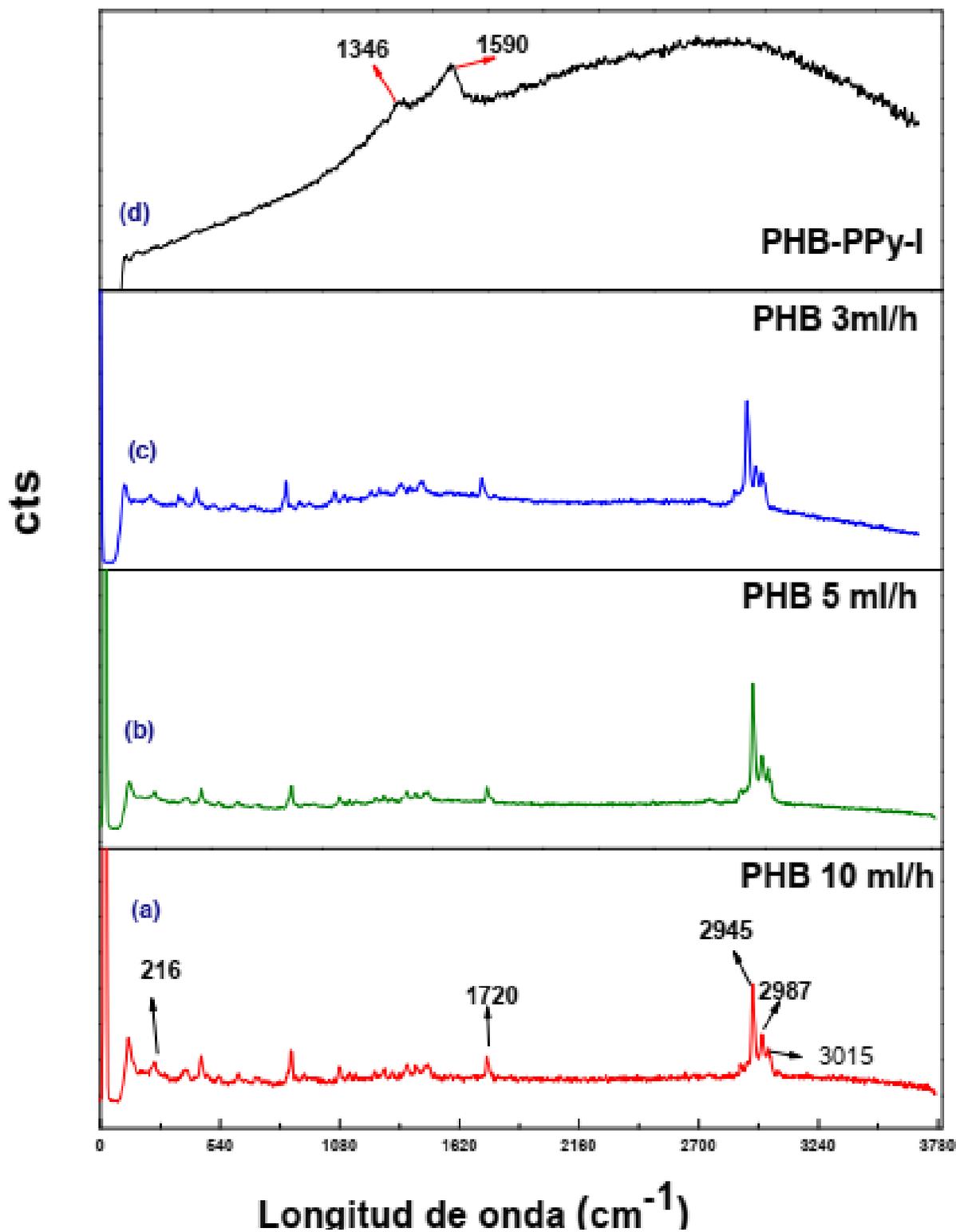
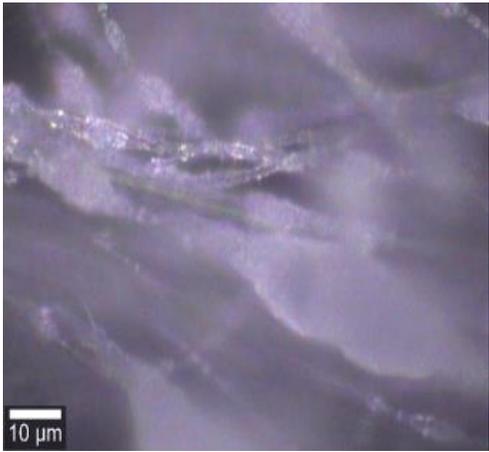


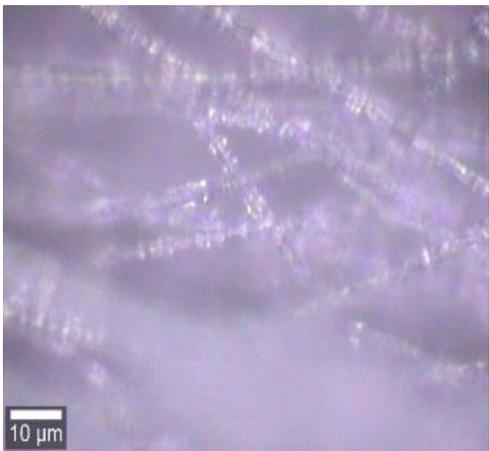
Figura 3.6. Espectros Raman de los andamios de PHB. (a) Andamio electrohilado a 10 ml/h, (b) Andamio electrohilado a 5 ml/h, (c) Andamio electrohilado a 3 ml/h y (d) Andamio polimerizado con PPy-I.



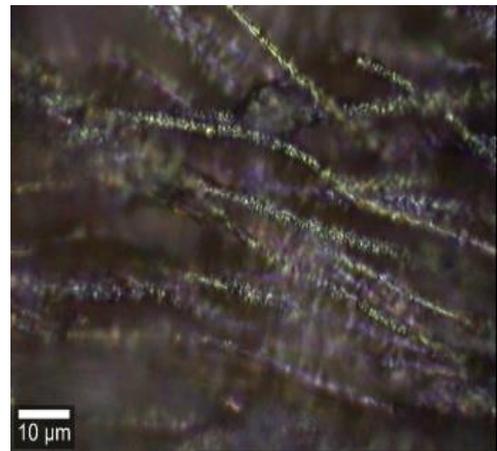
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 3.7. Imágenes Confocal de los andamios electrohilados de PHB. (a) Andamio electrohilado a 10 ml/h, (b) Andamio electrohilado a 5 ml/h, (c) Andamio electrohilado a 3 ml/h y (d) Andamio polimerizado con PPy-I.

3.4 Cristalografía de Rayos X

3.4.1 Difracción de Rayos X

Para analizar la cristalinidad de los andamios electrohilados de PHB, así como el andamio polimerizado se empleó difracción de rayos X.

El patrón de difracción se puede observar en la figura 3.8.

Se detectaron dos picos de intensidad fuerte alrededor de $2\theta = 17^\circ$ y 13° asignados para (110) y (020) de la celda unitaria ortorrómbica respectivamente [85-86]. Señales más débiles ubicadas alrededor de 21° y 22° correspondiente a (101) y (111) [85]. Otros picos que se detectaron en torno a 25° y 27° se reportan en la literatura como (130) y (040) respectivamente [86]. Finalmente en $2\theta = 20^\circ$ se puede percibir un pico de difracción atribuido a los cristales de forma beta [86].

En términos de estructuras de cristales de PHB, la estructura cristalina de la molécula de PHB es la forma α , que se produce bajo condiciones típicas de fusión, frío o cristalización en solución [87]. Lo reportado por Laycock et al. [87], la forma de obtener el tipo β del cristal de PHB, se puede obtener en películas con estiramiento uniaxialmente, es una forma metaestable y puede volver a la forma α a 130°C con un aumento en la cristalinidad.

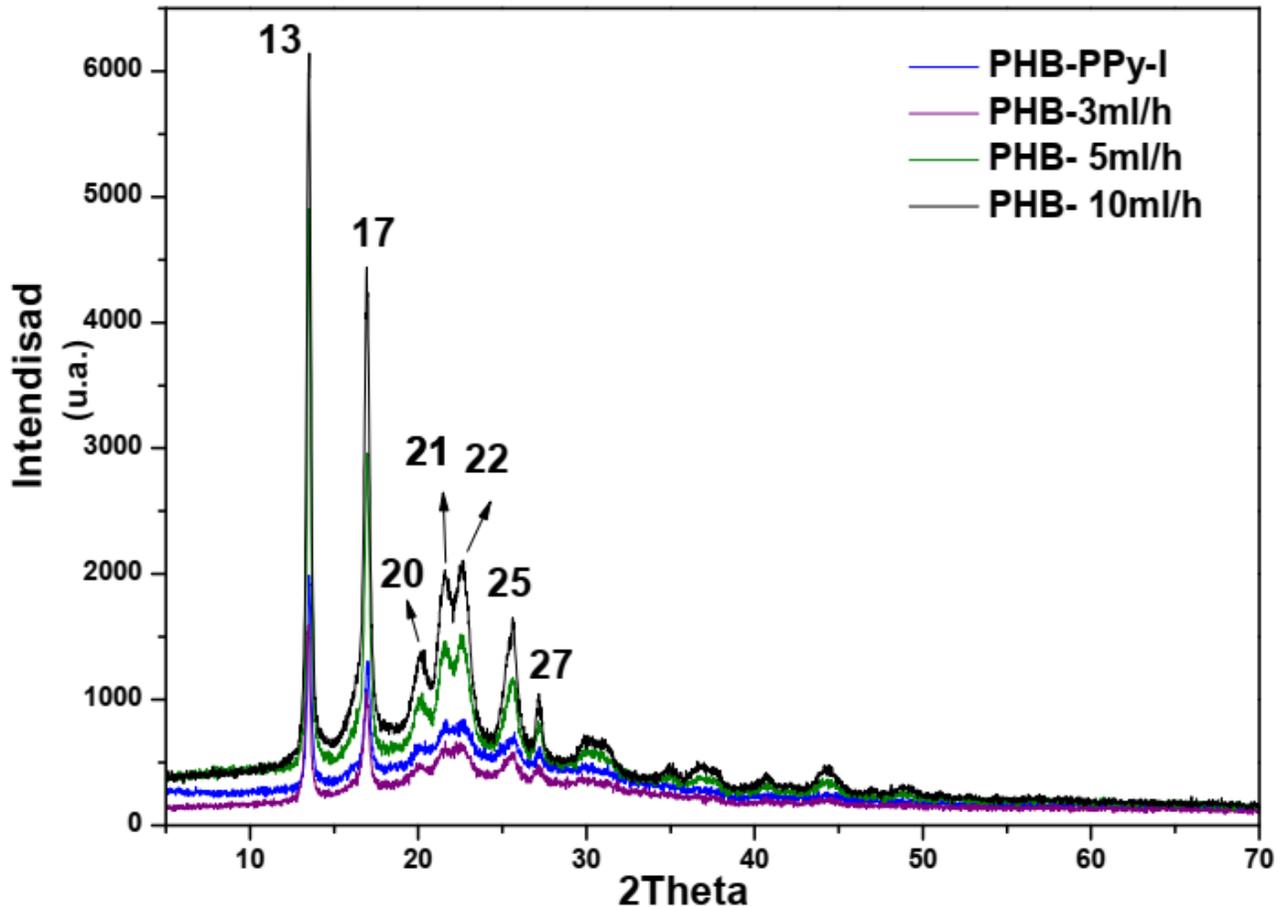


Figura 3.8. Patrón de difracción de DRX de los andamios de PHB.

3.5 Caracterización Térmica

3.5.1 Calorimetría Diferencial de Barrido

Se empleó un calorímetro diferencial de barrido para determinar la temperatura de fusión y de cristalización de los distintos andamios electrohilados. Las muestras se sometieron a un programa térmico consistente en un primer calentamiento para borrar la historia térmica. Los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 3.9 la cual nos muestra una temperatura de fusión (T_f) de 177 °C para los tres andamios electrohilados a diferentes razones de inyección, mientras que el andamio que sufrió modificación superficial mostro una T_f 172 °C, son temperaturas cercanas a los rangos reportados que van de 170-175 °C.

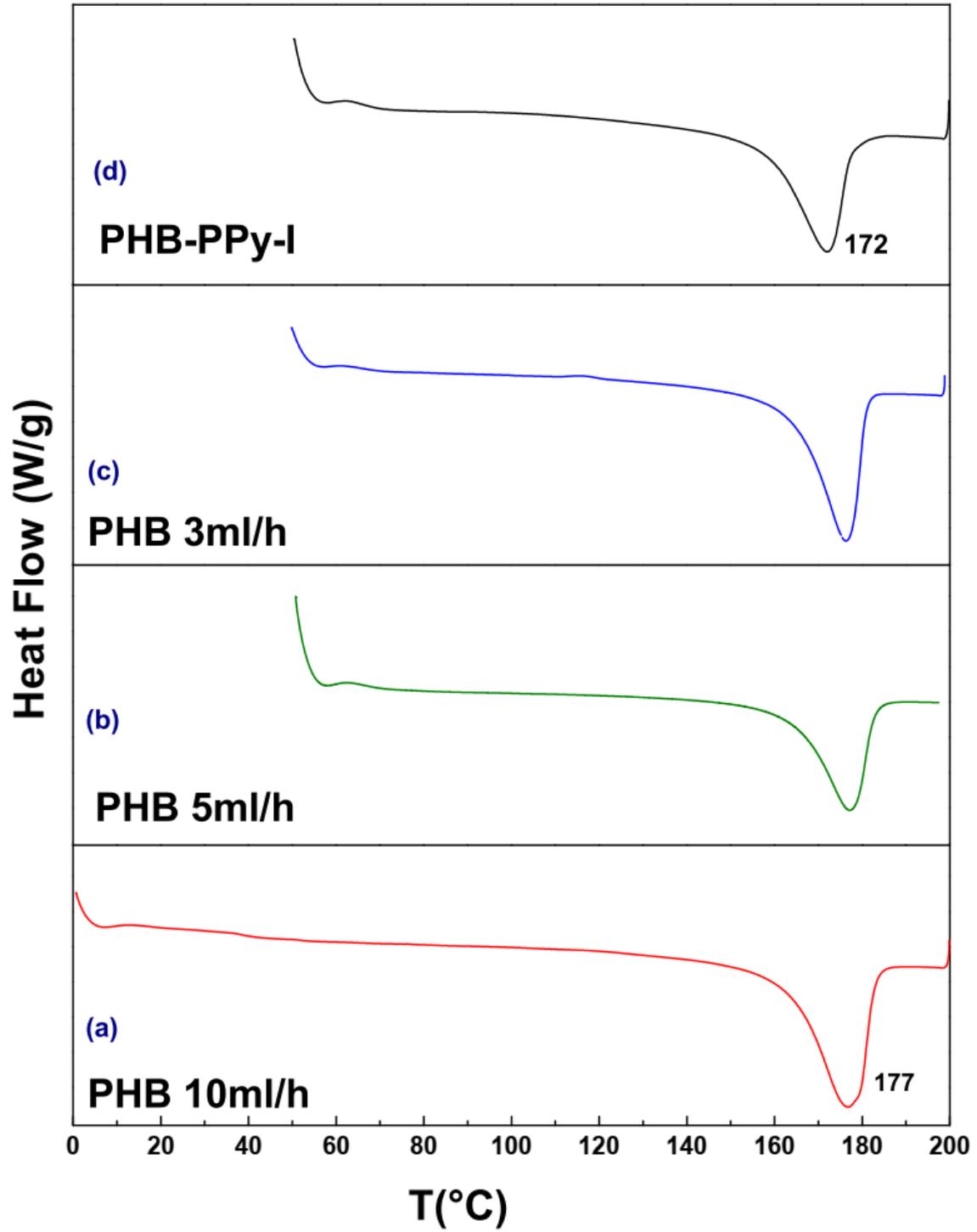


Figura 3.9. Termogramas obtenido por DSC del primer calentamiento de los andamios de PHB. (a) PHB a 10 ml/h, (b) PHB a 5 ml/h, (c) PHB a 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I.

Segunda fase: Enfriamiento

Después de la primera fase (calentamiento) se realiza una etapa de enfriamiento para conocer la temperatura de cristalización (T_c), los termogramas obtenidos se ilustran en la figura 3.10, donde es posible apreciar los rangos de temperatura para cada uno de los andamios de PHB y PBH-PPy-I; para el andamio de 10 ml/h se obtuvo una T_c de 88 °C, para el caso del andamio 5 ml/h su T_c fue de 89 °C y para el andamio de 3 ml/h fue de 87 °C, la T_c varían entre cada uno de los andamios pero no de manera muy significativa, a diferencia del termograma del andamio polimerizado, el cual muestra una T_c de 78 °C, una diferencia de 9 °C comparado con el andamio que no sufrió modificación superficial, (el cual fue hilado a 3 ml/h), la T_c para el PHB está reportada en los 97 °C lo cual nos indica que el PHB en forma de fibras requieren menor temperatura para formar cristales. 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.

Tercera fase: Segundo calentamiento

Para conocer la T_f fue necesario realizar un primer calentamiento el cual nos permitiera borrar el historial térmico de nuestro material, el segundo calentamiento nos permite conocer la T_f de nuestras fibras electrohiladas a base de PHB así como la del andamio con recubrimiento con PPy-I. Los termogramas se muestran en la figura 3.11 en el cual podemos observar que a diferencia del primer calentamiento todos los termogramas muestran dos picos a diferentes temperaturas, en el primer pico existen cristales que se funden a esa temperatura sin embargo el segundo pico el cual muestra la temperatura de cristalización, en la figura 3.11(a) se observa que la T_f para el andamio de 10 ml/h corresponde a 170°C, en 3.11(b), (c) y (d) se observa que la T_f es la misma de 172 °C para los andamios de 5 ml/h, 3 ml/h y el andamio polimerizado con PPy-I; las temperaturas de fusión de los cuatro diferentes andamios de encuentran dentro del rango de datos ya reportados (170- 175 °C).

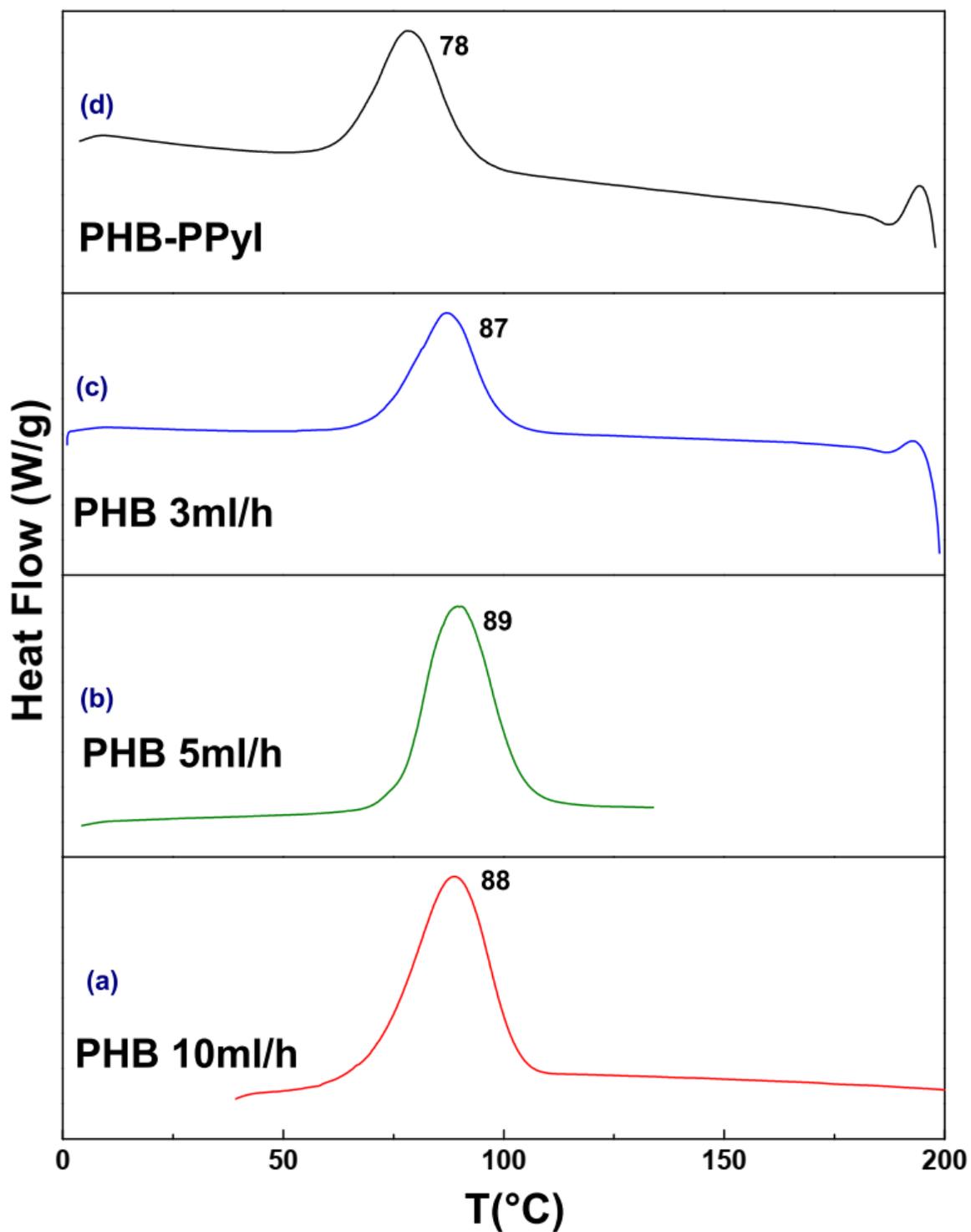


Figura 3.10. Termogramas obtenido por DSC de cristalización de los andamios de PHB. (a) PHB a 10 ml/h, (b) PHB a 5 ml/h, (c) PHB a 3 ml/h y (d) PHB- PPy-I.

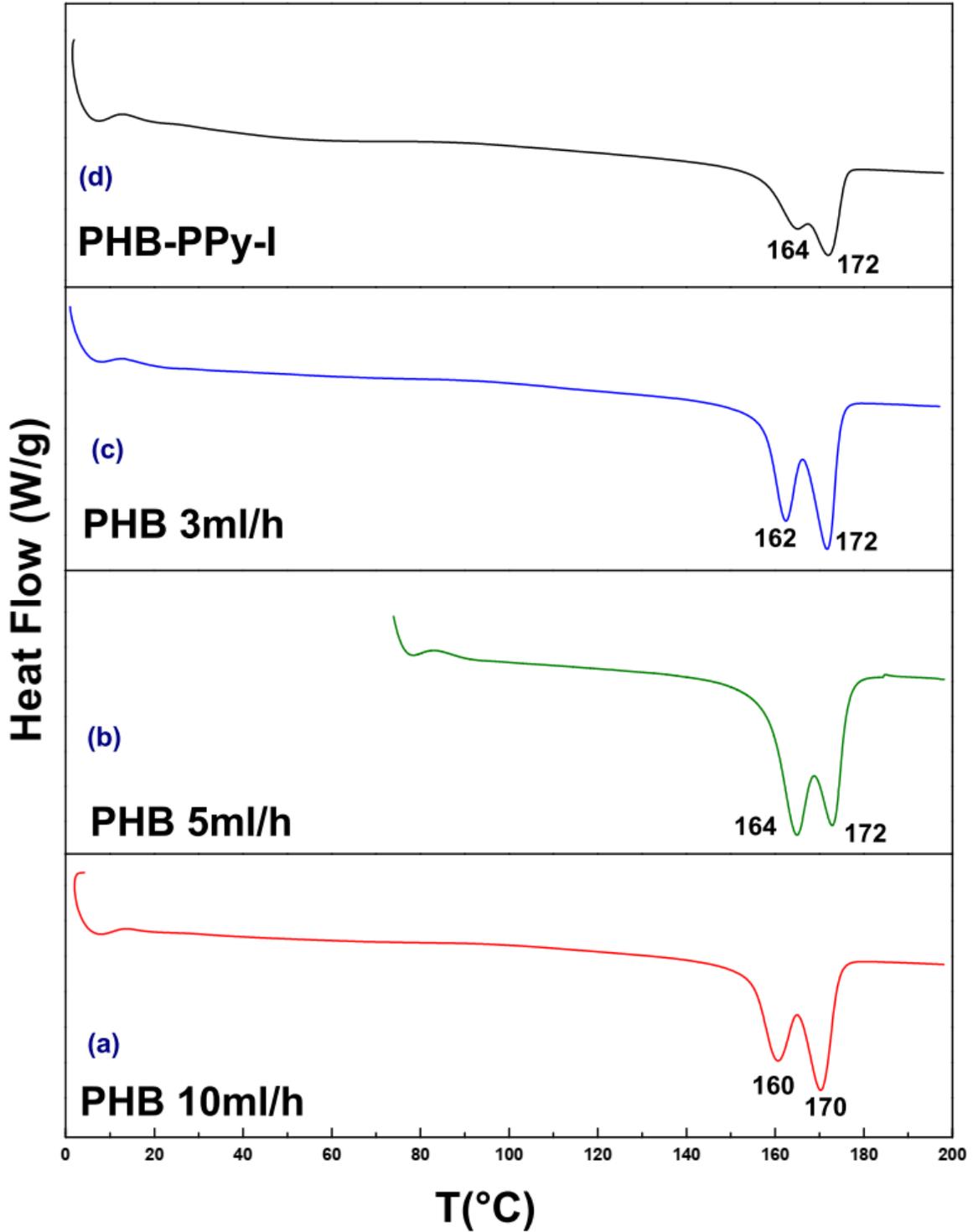


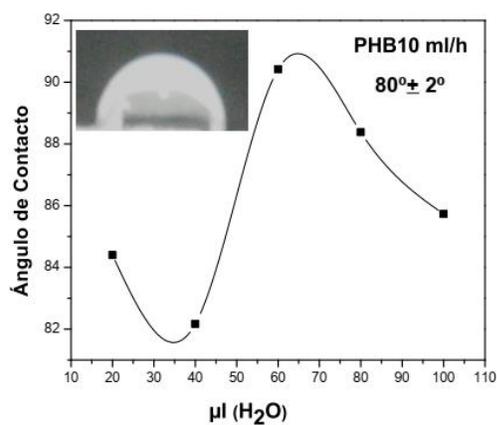
Figura 311. Termogramas obtenido por DSC del segundo calentamiento de los andamios de PHB. (a) PHB a 10 ml/h, (b) PHB a 5 ml/h, (c) PHB a 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I.

3.6 Propiedades de mojado

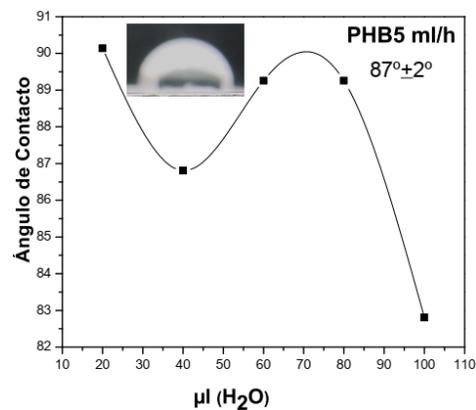
3.6.1 Ángulo de contacto

Las propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas son de gran importancia debido a que se busca que los andamios tengan aplicaciones biomédicas, y en este trabajo se realizaron pruebas biológicas las cuales se llevaron a cabo en un medio acuoso. Por lo tanto las muestras fueron examinadas por ángulo de contacto.

En la figura 3.12(a) podemos observar la gráfica correspondiente al andamio de 10 ml/h el cual nos muestra un ángulo de contacto igual a $86^{\circ} \pm 2^{\circ}$ indicándonos que el material tiene un comportamiento hidrofílico de acuerdo a lo reportado en la literatura, el cual es coherente con la fotografía de la parte superior izquierda en la cual es notable que la gota tiene una forma esférica indicándonos que el material no absorbe el líquido que se la ha suministrado.



(a)

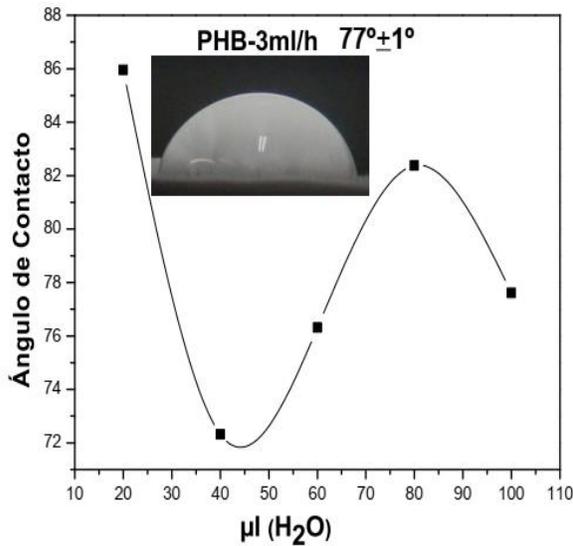


(b)

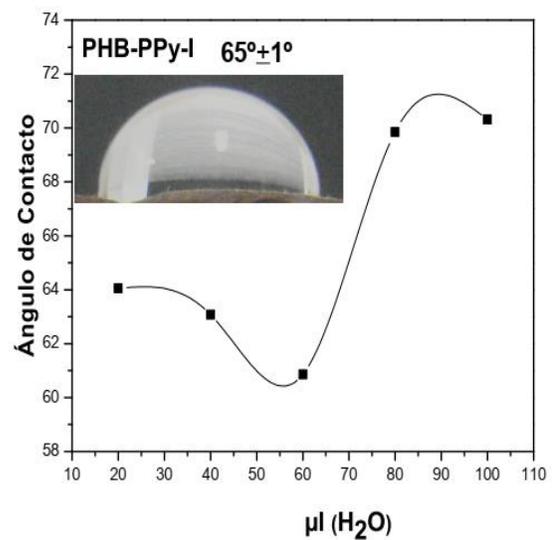
Figura 3.12 (a) Ángulo de contacto del andamio de PHB a 10 ml/h, (b) ángulo de contacto del andamio de PHB a 5 ml/h

La figura 3.12(b) muestra el resultado obtenido para el andamio con una velocidad de inyección de 5ml/h, la gráfica nos muestra el comportamiento del material al depositar la gota de agua sobre su superficie, se puede observar como el ángulo de contacto siempre es mayor a los 80° durante las cinco mediciones, obteniendo un ángulo final de $87^{\circ} \pm 2^{\circ}$ el cual nos indica que el material mantiene un comportamiento hidrofílico como el andamio anterior ya que la diferencia entre los ángulos de contacto es de 1° .

Por otra parte observamos en la parte superior izquierda la fotografía correspondiente a esta medición en la cual se observa una gota muy bien definida y con una forma esférica.



(c)



(d)

3.13 (c) Ángulo de contacto del andamio de PHB a 3 ml/h, (d) ángulo de contacto del andamio de PHB polimerizado.

Para el caso de la figura 3.13(c) la cual muestra los resultados obtenidos para las fibras de PHB con una razón de inyección de 3 ml/h observamos como en la primera medición se obtiene un ángulo de contacto mayor a 80° , posteriormente decrece hasta obtener un ángulo de contacto final de $77^{\circ} \pm 1^{\circ}$, notando que el ángulo de contacto a disminuido en al menos 10° con respecto a los dos andamios anteriores. Para este caso la gota generada al final de la medición se muestra en la parte superior izquierda de la gráfica, es notable su distribución en el andamio así como su forma esférica.

Finalmente el andamio con modificación superficial (ver figura 3.13(d)) se muestra como solo dos valores están por arriba de 70° y los otros tres valores se encuentran por debajo de los 65° , por lo cual se obtiene un ángulo de contacto igual a $65^{\circ} \pm 1^{\circ}$, en cuanto a la fotografía resultante se puede observar como la forma esférica ha disminuido y como la gota se ha expandido permitiendo que el ángulo de contacto sea menor en comparación con el resto de los andamios esto puede deberse a que la modificación superficial disminuya el comportamiento hidrofílico de nuestros andamios electrohilados de PHB.

Los resultados obtenidos nos muestran un comportamiento hidrofílico, los resultados obtenidos son menores a los reportados por otros grupos de trabajo los cuales oscilan entre los $115.5 \pm 3.4^{\circ}$, 102° [90] y 130.3° para fibras electrohiladas, estos resultados son favorables para nuestro trabajo ya que nos indica que son andamios viables para la interacción con medios líquidos.

3.7 Cultivos celulares

3.7.1 Cultivo celular sobre los andamios de PHB

Una vez que los andamios se encontraban esterilizados se procedió a realizar un cultivo celular sobre cada uno de ellos realizando observaciones por medio de un microscopio óptico por un lapso de 7 días tiempo suficiente para evaluar viabilidad y biocompatibilidad, a continuación se muestran los resultados obtenidos durante este periodo. Las fotografías se tomaron sobre las orillas de los andamios debido a que no fue posible visualizar la superficie de los mismos.

La figura 3.14 muestra los cuatro diferentes andamios al primer día del cultivo celular, en la figura 3.14(a) podemos observar el andamio correspondiente a la velocidad de inyección de 10 ml/h en el cual se encuentran células sobre la superficie, de igual manera en 3.14(b) se observan células sobre el andamio, pero estas se encuentran agrupadas a diferencia del andamio anterior, para el caso de 3.14(c) se observan células sobre toda la orilla del andamio con razón de inyección de 3 ml/h y finalmente en 3.14(d) que corresponde al andamio polimerizado muestra una mayor cantidad de células sobre toda su orilla además las células se encuentran agrupadas.

Día 1

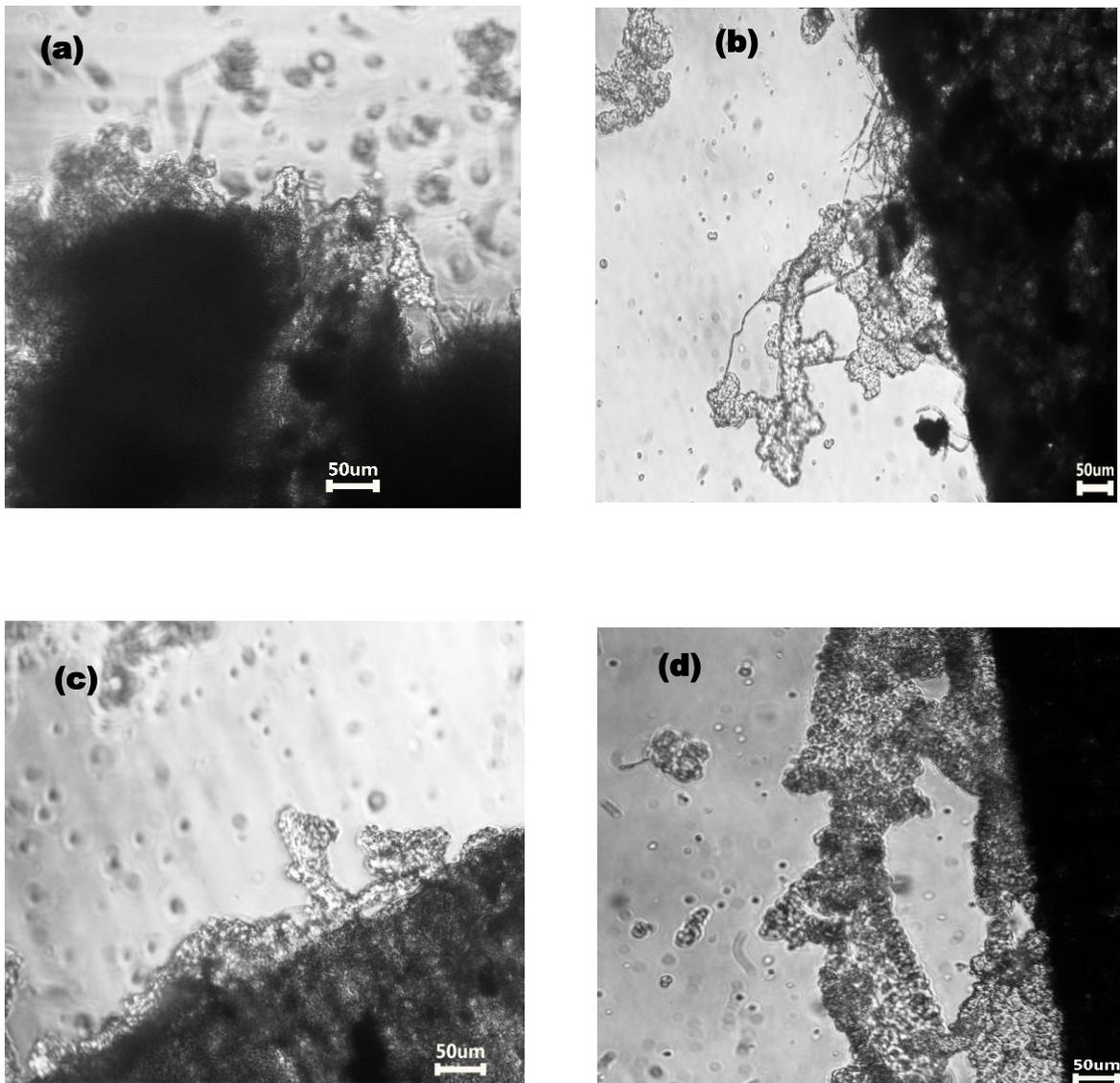


Figura 3.14 Fotografías ópticas del primer día de cultivo de células beta Rin-M sobre los andamios de PHB; (a) 10 ml/h, (b) 5 ml/h, (c) 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I.

Día 4

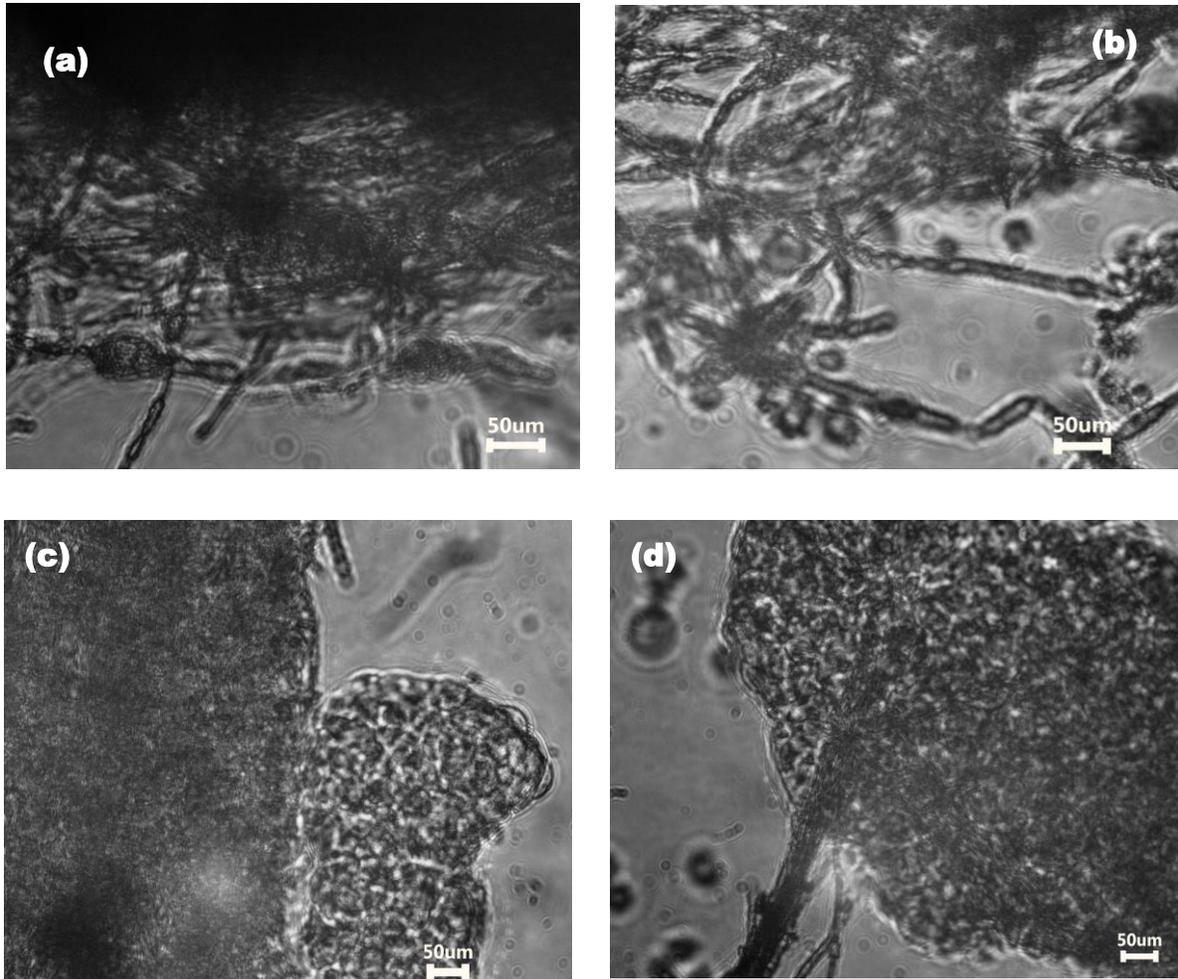


Figura 3.15 Fotografías ópticas del cuarto día de cultivo de células beta Rin-M sobre los andamios de PHB: (a) 10 ml/h, (b) 5 ml/h, (c) 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I.

La figura 3.15 nos muestra los andamios al cuarto día del cultivo celular en el cual el andamio de 10 ml/h fig. 3.15(a) no se observa proliferación celular lo cual nos podría indicar que las células no se pudieron adherir al andamio de manera exitosa, mientras que en la fig. 3.15 (b) se pueden observar células sobre alguna de las fibras del andamio, pero en poca cantidad, contrario a lo que se observa en la fig. 3.15 (c) en la cual se aprecia un agregado de células en una de las orillas del andamio, y por último podemos observar en la figura 3.15 (d) como se encuentra una gran cantidad de células sobre un segmento de fibras del andamio, con lo que nos percatamos en el andamio con modificación superficial logra una mayor proliferación celular así como mayor cantidad de células sobre su superficie.

Día 6

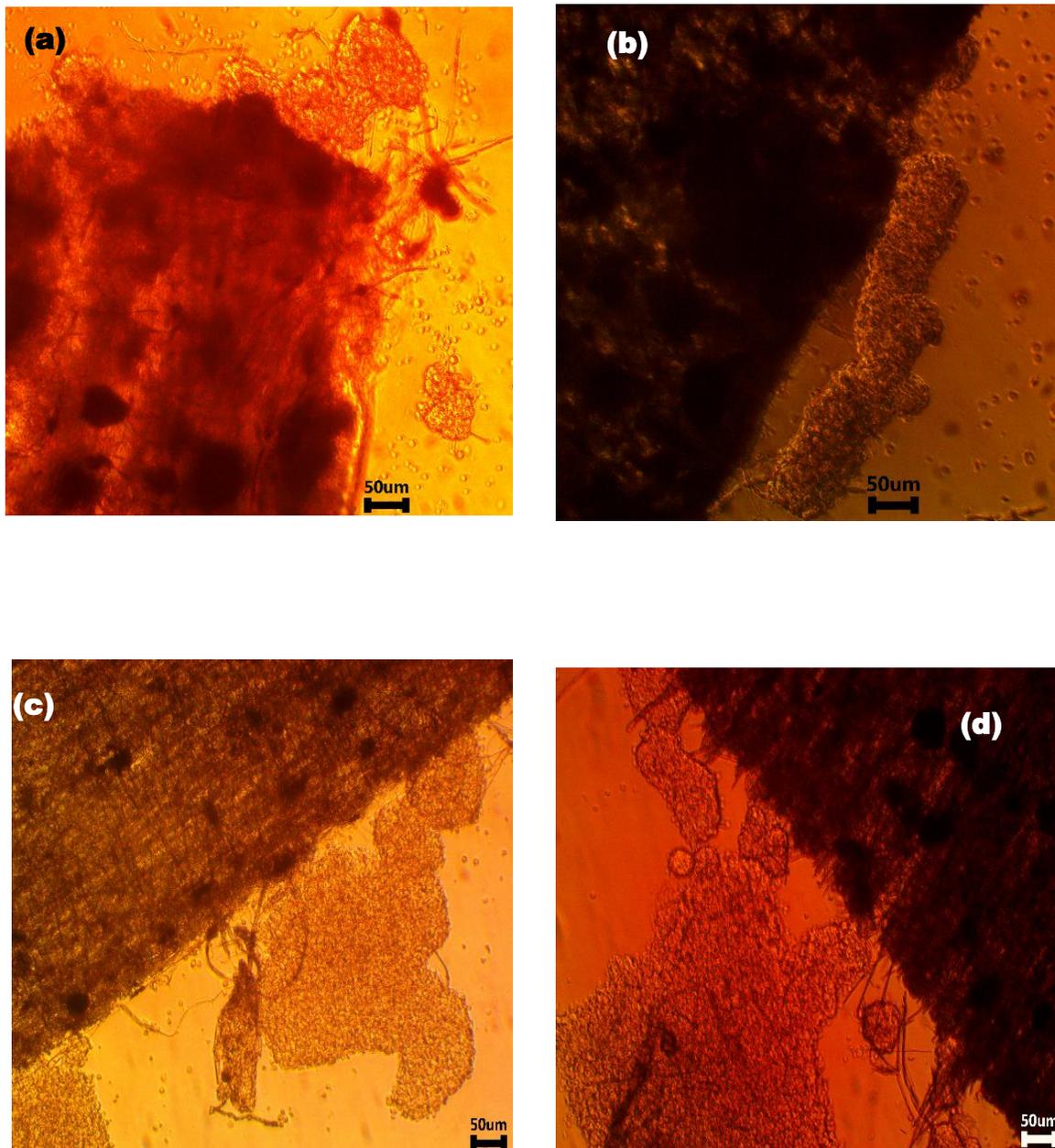


Figura 3.16 Fotografías ópticas del sexto día de cultivo de células beta Rin-M sobre los andamios de PHB: (a) 10 ml/h, (b) 5 ml/h, (c) 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I.

En la figura 3.16 podemos observar el avance del sexto día de cultivo celular sobre los cuatro diferentes andamios electrohilados de PHB, en (a) podemos observar como hay células sobre el andamio y se comienzan a observar células agrupadas, en 3.16(b) podemos observar un agregado de células agrupadas sobre la orilla del andamio electrohilado de PHB a 5 ml/h comportamiento que no se había observado en los días anteriores, mientras en 3.16(c) se puede observar una de las orillas del andamio electrohilado a 3 ml/h el cual muestra una respuesta favorable en cuanto a la proliferación y adhesión celular, en la figura 3.16(d) se muestra el andamio con modificación superficial en el cual se observa una gran cantidad de células sobre la orilla del andamio así como en algunas fibras que están separadas del resto del andamio.

Día 8

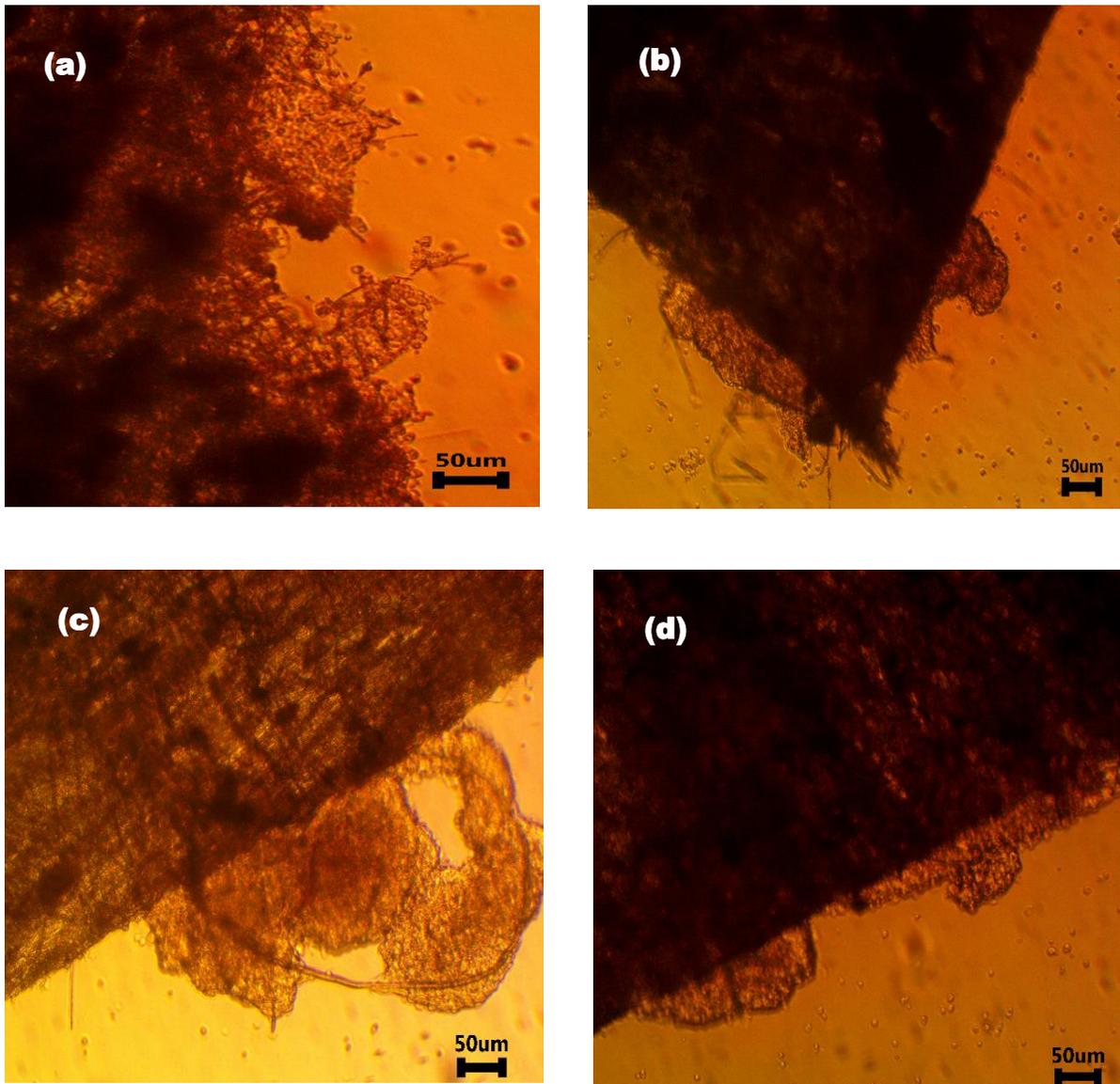


Figura 3.17 Fotografías ópticas del octavo día de cultivo de células beta Rin-M sobre los andamios de PHB: (a) 10 ml/h, (b) 5 ml/h, (c) 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I.

Se puede observar en la figura 3.17 resultados del día 8 del cultivo celular en cada uno de los diferentes andamios de PHB electrohilados, en 3.17(a) podemos observar que hay células distribuidas sobre el andamio también hay células dispersas sobre la caja de cultivo, mientras que en 3.17(b) se puede observar una de las esquinas del andamio en el cual se observan células agrupadas y adheridas a la superficie del andamio, 3.17(c) nos permite visualizar como las células se agrupan en ciertas zonas del andamio, manteniendo buena adherencia a lo largo de ocho días de prueba, la figura 3.17 (d) nos muestra el andamio polimerizado con PPyI en el cual se visualiza como las células se encuentran muy bien adheridas y distribuidas sobre la orilla del andamio.

Día 10

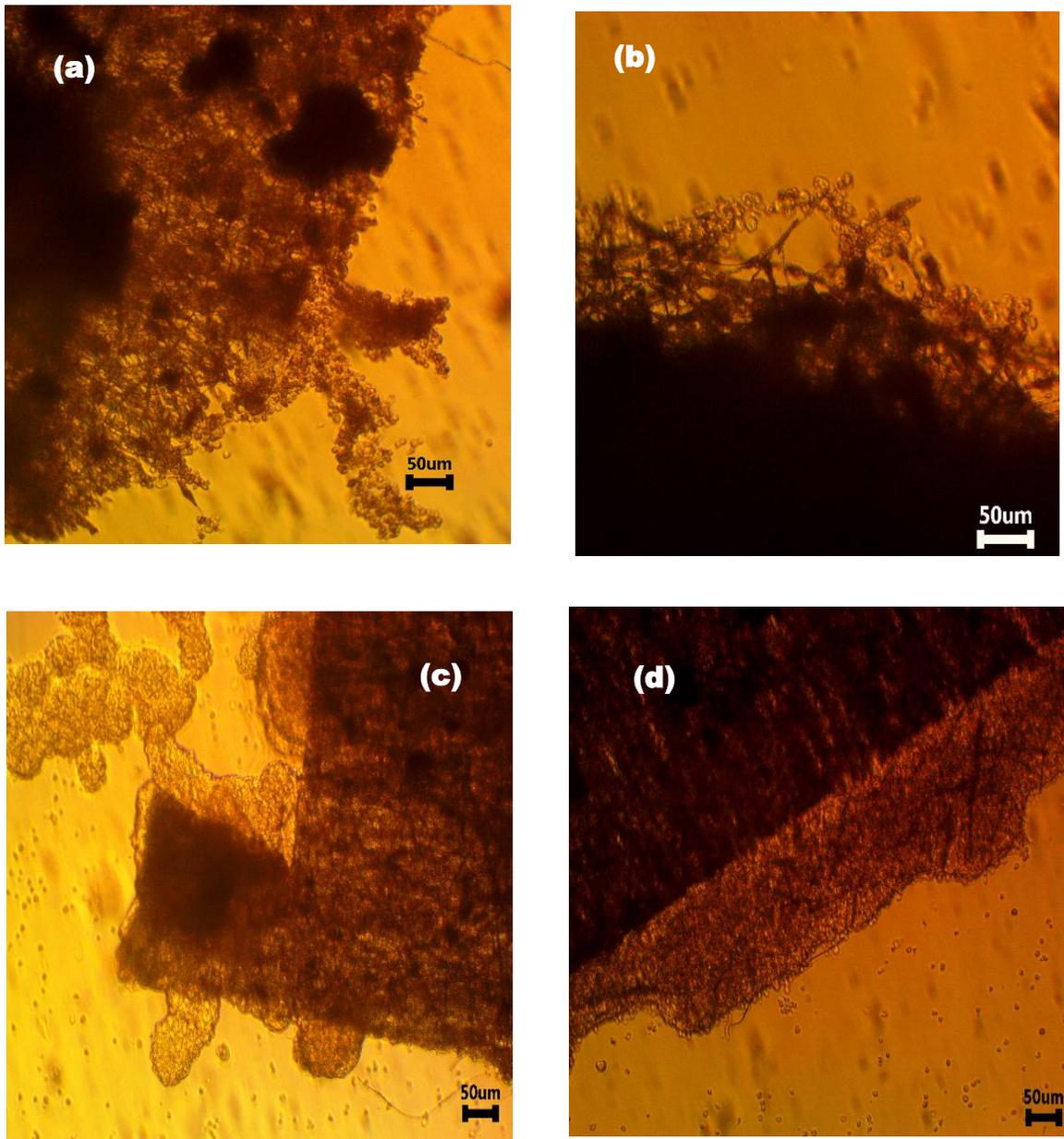


Figura 3.18 Fotografías ópticas del décimo día de cultivo de células beta Rin-M sobre los andamios de PHB: (a) 10 ml/h, (b) 5 ml/h, (c) 3 ml/h y (d) PHB-PPy-I.

La figura 3.18 nos muestra el último día de cultivo celular, en la cual podemos observar que en 3.18(a) hay pocas células adheridas al andamio, ese comportamiento se observó durante los diez días del cultivo, a pesar de ello siempre se observaron células en el andamio, en el caso de 3.18(b) podemos observar como la cantidad de células adheridas a lo largo del experimento y en el día diez hay células incorporadas a lo largo de la orilla del andamio, mientras en 3.18(c) se observan células adheridas sobre las orillas del andamio, de igual manera se encuentran agrupadas y en la figura 3.18(d) nos muestra como las células se han adherido y agrupado de manera organizada sobre la orilla del andamio cubriéndola en su totalidad.

3.7.2 Viabilidad celular

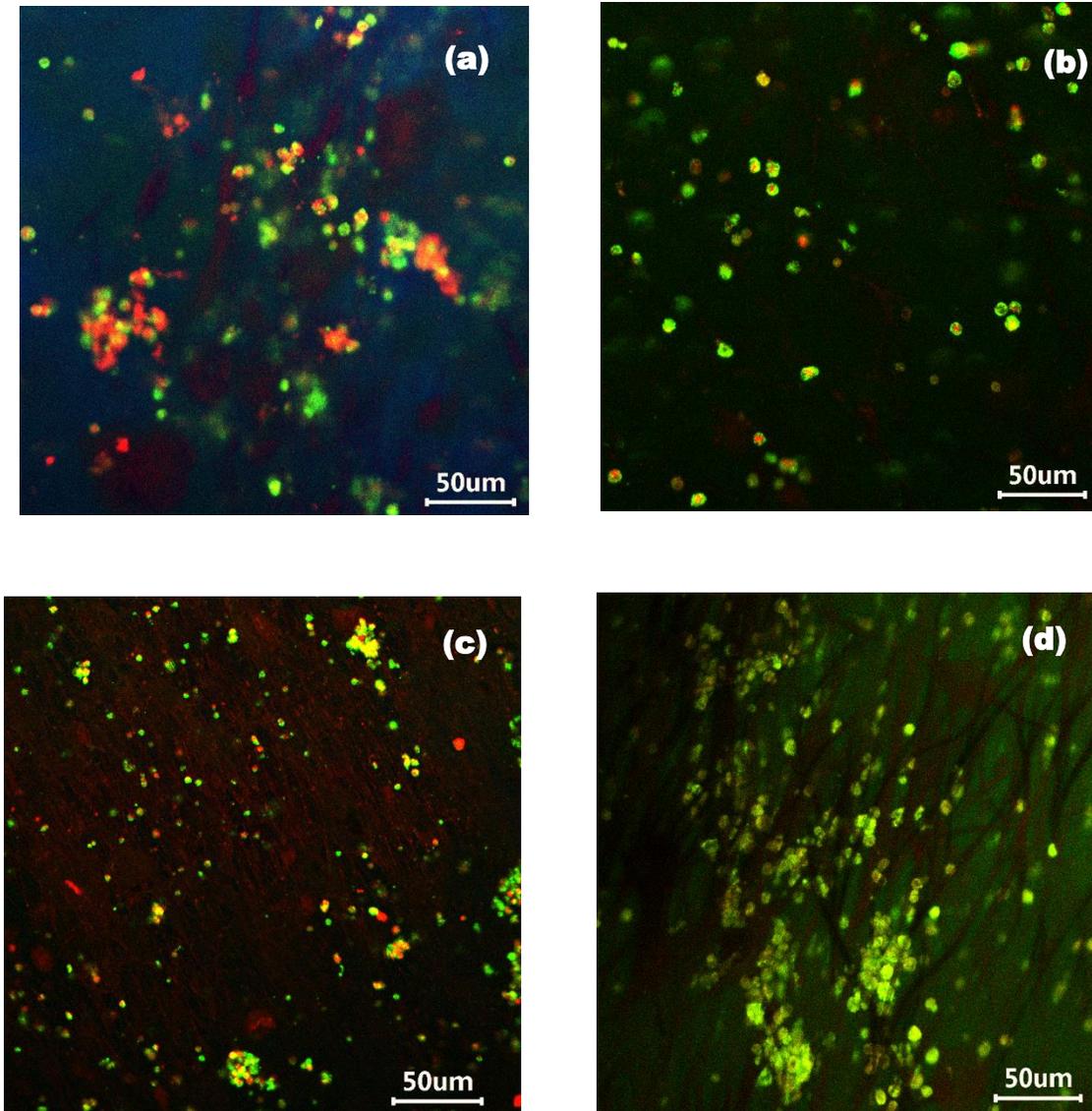


Figura 3.19 Prueba de viabilidad celular de los andamios de PHB: (a) 10 ml/h, (b) 5 ml/h, (c) 3 ml/h y (d) PHB-PPyI. Las células vivas se muestran en color verde y las células muertas en rojo.

La imagen 3.19 nos presenta los resultados obtenidos tras realizar el ensayo de viabilidad con calceína y EthD-1 para los cuatro andamios electrohilados de PHB.

Los resultados del andamio electrohilado a una razón de inyección de 10 ml/h se visualizan en la imagen 3.19(a) en la cual se pueden observar células sobre el andamio es notable que la cantidad de células muertas (rojas) es similar las células vivas (verdes) es acorde a lo que se observó en el microscopio óptico la poca proliferación y adhesión celular sobre el andamio de PHB, aun así hubo células que lograron adherirse y vivir por un lapso de diez días sobre este andamio.

La figura 3.19 (b) muestra las células vivas y muertas después de diez días de cultivo celular sobre el andamio de PHB electrohilado con una velocidad de inyección de 5 ml/h en el cual es posible apreciar que la cantidad de células vivas es mayor que las células muertas presentes en este andamio, las células que se observan se encuentran dispersas sobre el andamio.

La figura 3.19 (c) nos permite visualizar los resultados obtenidos para el andamio electrohilado a una razón de 3 ml/h en la cual se puede observar fibras que se ven en color rojo las cuales se observan orientadas, y entre las fibras es posible ver células vivas y células muertas a lo largo del andamio, sin embargo es posible ver que algunas células se encuentran agrupadas.

Por último en la figura 3.19 (d) nos permite las células viables después de los diez días de cultivo celular para el andamio electrohilado de PHB con modificación superficial por medio de polimerización por plasma con PPyI, en la cual se logran apreciar algunas de las fibras del andamio y entre ellas se observan gran cantidad de células vivas, podíamos decir que las células que se observan en su totalidad se encuentran viables además de mostrar que en su mayoría están agrupadas formando varios agregados celulares.

CAPITULO 4

Conclusiones y Perspectivas

Con base en los estudios realizados a los andamios electrohilados de Polihidroxibutirato, fue posible por medio de caracterizaciones obtener la razón de inyección óptima para la elaboración de fibras de PHB, por medio de la técnica electrohilado la velocidad de inyección adecuada fue de 3 ml/h, con un voltaje de 15 kV, a una temperatura de 30°C, a 1723 rpm y la distancia entre aguja y colector de 12 cm, bajo estas condiciones fue posible obtener fibras con una orientación y con una morfología más definida, y con diámetro promedio de $2.49 \pm .09 \mu\text{m}$, mostrando porosidad a lo largo de las fibras, esto permitió realizar modificación superficial a este andamio por medio de la técnica de polimerización por plasma empleando el monómero de Pirrol y como dopante Yodo bajo condiciones controladas, una potencia de 20W, 3.4×10^{-1} Torr de presión y por un lapso de 25 minutos.

Por medio de Microscopia Electrónica de Barrido, se logró encontrar que el diámetro de las fibras cambia con la razón de inyección en el proceso de electrohilado, el diámetro aumenta con forme disminuye la velocidad de inyección, además de mostrar mejoría en la orientación entre las fibras del andamio (se aprecia una orientación horizontal), así como la disminución de la formación de estructuras tipo perlas (rosarios) a lo largo de las fibras.

Para el andamio de PHB a 10 ml/h se pudo observar que presentaba mayor cantidad de rosarios sobre todo el andamio así como una menor cantidad de fibras y éstas se encontraban separadas entre ellas así como un diámetro promedio de $1.72 \pm 0.15 \mu\text{m}$. El andamio de PHB a 5 ml/h mostró un aumento en el diámetro de las fibras electrohiladas de $2.16 \pm 0.32 \mu\text{m}$, la formación de rosarios sigue presente pero en menor cantidad.

Para el caso del andamio electrohilado a 3 ml/h se pudo observar un aumento en el diámetro de las fibras, mejorando la orientación horizontal de las fibras, la formación

de rosario permaneció viéndose reducida así como la separación entre las fibras fue menor considerablemente, se observó porosidad sobre las fibras. Mientras que el andamio al que se le realizó polimerización mostro un cambio visible en cuanto a la coloración del mismo pasando de un color blanco a un color café, aumentando el diámetro de las fibras, se observó el recubrimiento de los poros presentes en las fibras, la polimerización volvió a las fibras más frágiles y por lo tanto quebradizas.

El análisis de Espectroscopia FTIR-ATR permitió analizar la composición química de los andamios de PHB, la cual confirma la existencia de los diferentes grupos característicos de la molécula de PHB, mostrando bandas características asociadas al estiramiento de grupos carboxílicos (C=O), así como la presencia de enlaces tipo CH₂ debido a la deformación asimétrica de este enlace, así como la presencia de enlaces de CH₃ debido a la deformación simétrica de este grupo, así como la presencia del grupo éster debido al estiramiento del enlace C-O.

El análisis por Espectrometría Raman mostro que al realizar polimerización por plasma con Pirrol no es posible identificar las bandas características del PHB debido a la fluorescencia del material, sin embargo el resto de los andamios mostró la presencia de señales Raman mostrando la parte cristalina del PHB, así como los modos de deformación correspondientes a la parte amorfa del material.

La parte cristalina del polímero se pudo corroborar por medio del análisis de Difracción de Rayos X ya que fue posible obtener los espectros de difracción los cuales nos muestran la parte semicristalina del polímero empleado para los andamios electrohilados, los espectros muestran la presencia de cristales en forma ortorrómbica con formación de cadena helicoidal, las fibras de PHB también poseen una pequeña cantidad de cristales tipo β como lo muestra la señal en $2\theta=20^\circ$.

Las propiedades térmicas adquiridas, se examinaron en las tres diferentes etapas del ciclo.

El primer calentamiento mostro una T_f de 177 °C para los andamios electrohilados a 10, 5 y 3 ml/h mientras que el andamio polimerizado presentó una T_f de 172 °C valores que se encuentran dentro del rango reportado. En la etapa de enfriamiento los

andamios sin modificación superficial no mostraron cambios significativos en su T_c entre ellos mostrando 88 °C, 89 °C y 87 °C para 10, 5 y 3 ml/h respectivamente, mientras que el andamio de PHB polimerizado mostró una T_c de 78 °C lo que nos indica que el recubrimiento por polimerización con pirrol facilita la formación de zonas cristalinas. La última etapa del ciclo (segundo calentamiento) los cuatro andamios presentaron una doble T_f , las temperaturas para las T_f encontradas fueron 160 y 170 °C para el andamio electrohilado a 10 ml/h, 164 y 172°C para el andamio de 5 ml/h, las temperaturas para el andamio de 3ml/h fueron 162 y 172 °C, finalmente el andamio polimerizado presentó las siguientes temperaturas 164 y 172 °C, estas dobles temperaturas nos indican que existen dos fases cristalinas en el polímero. Así mismo las T_f se encuentran en el rango de la literatura (170-175 °C).[81,82]

Las pruebas de cultivo celular *in vitro* con la línea celular RIN-m mostraron que los andamios electrohilados de PHB son andamios biocompatibles, ya que permitieron la adherencia y proliferación celular sobre ellos, la prueba de viabilidad permitió determinar al andamio con mejores propiedades para el cultivo celular, siendo el andamio de PHB-PPyI el que mostró una mayor cantidad de células viables organizadas en agregados de células sobre el andamio. Como perspectiva a futuro se elegiría elaborar andamios a una razón de inyección menor a 3 ml/h y realizar polimerización por plasma con PPy-I para cultivar células beta (Rin-M) y medir la secreción de insulina, para un posible parche en personas con diabetes.

Bibliografía

- [1] Woerly, S.; Marchand, R.; Lavalle, C., Intracerebral implantation of synthetic polymer/biopolymer matrix: a new perspective for brain repair. *Biomaterials*, 1990.
- [2] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993.
- [3] Thomson RC, Yaszemski MJ, Mikos AG. Polymer scaffold processing. In: Lanza RP, Langer R, Chick WL, editors. *Principles of tissue engineering*. Austin, TX: R.G. Landes; 1997.
- [4] Barnes CP, Sell SA, Boland ED, and Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv. Drug Delivery Reviews* 2007.
- [5] Kumbara SG, Nukavarapu SP, Jaimes R, Hogan MV, Laurencin CT. Recent patents on electrospun biomedical nanostructures: An Overview. *Recent Patents on Biomedical Engineering* 2008.
- [6] R. Langer, D.A. Tirrell, *Nature* 428 2004.
- [7] J. P. Jain, W. YenetAyen, A. J. Domb, N. Kumar, *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development*. John Wiley & Sons Inc. Hoboken, New Jersey, 2011.
- [8] W. Khan, H. Hosseinkhani, D. Ickowicz, P. D. Hong, D. S. Yu, A. J. Domb, *Acta Biomater.* 2012.
- [9] P. A. Gunatillake, R. Adhikari, *Eur. Cell. Mater.* 2003.
- [10] K. G. ShaliniVerma, A. Mittal, N. Kumar, *Biodegradable Polymers for Emerging Clinical Use in Tissue Engineering*. Wiley, Hoboken, New Jersey, 2011
- [11] J. C. Middleton, A. J. Tipton, *Biomaterials* 2000.
- [12] González, Y., Meza, J. C., González, O., & Córdova, J. A. Síntesis y Biodegradación de Polihidroxialcanoatos: Plásticos de Origen Microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2013
- [13] J. Venugopal, Y. Z. Zhang, and S. Ramakrishna, "Electrospun nanofibers: biomedical applications," *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers* 2005.
- [14] A. Hazari, G. Johansson-ruden, C. Junemo-Bostrom, C. Ljungberg, *J. Hand Surg.* 24B (1999).

- [15] A. Greiner and J. H. Wendorff, "Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers," *Angewandte Chemie*, 2007.
- [16] H. Fong, I. Chun, and D. H. Reneker, "Beaded nanofibers formed during electrospinning," *Polymer*, 1999.
- [17] BHARDWAJ, N., KUNDU, Subhas C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, Enero, 2010.
- [18] Andrady A.L., 2008. Science and technology of polymer nanofibers, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.
- [19] Sabino, Marcos & M, Loiaza&Dernowsek, Janaína&Rezende, Rodrigo & Silva, Jorge. Techniques for manufacturing polymer scaffolds with potential applications in tissue engineering. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 2017.
- [20] T. J. Sill and H. A. von Recum, "Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials* 2008.
- [21] P. X. Ma and R. Zhang, "Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix," *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999.
- [22] L. Larrondo and R. S. J. Manley, "Electrostatic fiber spinning from polymer melts. 1. Experimental-observations on fiber formation and properties," *Journal of Polymer Science A*, 1981.
- [23] W. Yao, J. Yang, J. Wang, and L. Tao, "Synthesis and electrochemical performance of carbon nanofiber-cobalt oxide composites," *Electrochimica Acta*, 2008.
- [24] S. Tan, X. Feng, B. Zhao, Y. Zou, and X. Huang, "Preparation and photoluminescence properties of electrospun nanofibers containing PMO-PPV and Eu(ODMB)3phen," *Materials Letters*, vol. 62, no. 2008.
- [25] J. Bai, Y. Li, M. Li, S. Wang, C. Zhang, and Q. Yang, "Electrospinning method for the preparation of silver chloride nanoparticles in PVP nanofiber," *Applied Surface Science*, 2008.
- [26] Boenig H.V., *Plasma Science and Technology*. Cornell University Press., USA, 1982.

- [27] Zamani M., Prabhakaran M.P., Ramakrishna S. Advances in drug delivery via electrospun and electrospayed nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*, 2013.
- [28] J. Doshi and D. H. Reneker, "Electrospinning process and applications of electrospun fibers," *Journal of Electrostatics*, 1995.
- [29] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnology Advances*, 2010.
- [30] J. Zeleny, "The role of surface instability in electrical discharges from drops of alcohol and water in air at atmospheric pressure," *Journal of the Franklin Institute*, 1935.
- [31] Wendorff, J. et al. eds *Electrospinning – Materials, Processing, and Applications*, Wiley-VCH. 2012
- [32] Doshi, J. and Reneker, D. *Electrospinning process and applications of electrospun fibers*. J. *Electrostat*. 1995.
- [33] Casper CL, Stephens JS, Tassi NG, Chase DB, Rabolt Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. 2004.
- [34] J. Lannutti, D. Reneker, T. Ma, D. Tomasko, and D. Farson, "Electrospinning for tissue engineering scaffolds," *Materials Science and Engineering C*, 2007.
- [35] C. Meechaisue, R. Dubin, P. Supaphol, V. P. Hoven, and J. Kohn, "Electrospun mat of tyrosine-derived polycarbonate fibers for potential use as tissue scaffolding material," *Journal of Biomaterials Science*, 2006.
- [36] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, and B. Chu, "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes," *Polymer*, 2002.
- [37] H. Fong, I. Chun, and D. H. Reneker, "Beaded nanofibers formed during electrospinning," *Polymer*, 1999.
- [38] Q. Yang, L. I. Zhenyu, Y. Honget al., "Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning," *Journal of Polymer Science B*, 2004.
- [39] W. K. Son, J. H. Youk, T. S. Lee, and W. H. Park, "The effect of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly (ethylene oxide) fibers," *Polymer*, 2004.

- [40] T. Jarusuwannapoom, W.Hongrojjanawiwat, S. Jitjaichamet al., "Effect of solvents on electrospinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers," *European Polymer Journal*, 2005.
- [41] Valdivia R., "Excitación de un Plasma por Altas Frecuencias para Pronósticos de Iluminación", Tesis Licenciatura, Instituto Tecnológico de Toluca, México 2003.
- [42] S. Kirkpatrick, *Reviews of Modern Physics* 1973.
- [43] B. Chapman, "Glow Discharge Processes", Ed. Wiley Interscience Publication, 1980.
- [44] R. D'Agustino, "Plasma Deposition, Treatment and Etching of Polymers, Ed. Academia Press, 1990.
- [45] H. Yasuda, "Plasma Polymerization" Ed. Academia Press Inc; 1985.
- [46] M. Chen T.C. *Yong ZG Journal of Polymer Science; Part A: Polymer Chemistry* 1998, 1262-1270.
- [47] J. Casanovas, E. Armelin, J. I. Iribarren, *Revista de Polímeros: Ciencia y Tecnología, Asociación Brasileña de Polímeros*, Vol. 15 No 4, 2005.
- [48] G. J. CRUZ, J. MORALES and R. OLAYO, *Thin solid films* 1999.
- [49] A. Malinauskas, *Synthetic Metals*, Vol 2, No 107, 1999.
- [50] W. Smith, "Fundamentos de la Ciencia e Ingeniería de Materiales, 1993.
- [51] Skoog, D.A., West, D.M. *Analisis Instrumental*. 2001.
- [52] Raman C.V., 1921. *Nature*.
- [53] Smith E. and Dent G. "Modern Raman Spectroscopy –A practical approach" John Wiley 2005.
- [54] Nakamoto K.. "Infrared and Raman Spectra", Wiley-Interscience, 1986.
- [55] Difracción de rayos X. Universidad Politécnica de Cartagena. Disponible en: https://www.upct.es/~minaeees/difraccion_rayosx.pdf.
- [56] H. Holme, W.Hemming, H-J.Flammersheim "Differential Scanning Calorimetry: an introduction for practitioners", 1996.
- [57] J.C. de Lima; M. Schmitt; S.M. Souza; T.O. Almeida; A.R. Jeronimo; D.M. Triches; T.A. Grandi; C.E.M. Campos "Structural and thermal study of nanostructured GaSb alloy prepared by mechanical alloying", *Journal of Alloys and Compounds*, 2007.

- [58] B.N. Mondal, A. Basumallick, P.P. Chattopadhyay \Effect of Isothermal Treatments on the Magnetic Behavior of Nanocrystalline CuNiFe Alloy Prepared by Mechanical Alloying", Journal of Magnetism and Magnetic Materials 2007.
- [59] V.V. Tcherdyntsev, S.D. Kaloshkin, A.I. Salimon, I.A. Tomilin and A.M. Korsunsky \Quasicrystalline Phase Formation by Heating a Mechanically.
- [60] Alloyed Al65Cu23Fe12 Powder Mixture", Journal of Non-Crystalline Solids, 2002.
- [61] L. Savov, Wettability of solids by molten metals and alloys. METALL, 1997.
- [62] E.S.S. Bustos and F.Z. Ranahan, Tensión superficial. 2004. Disponible en: <http://citt.ufl.edu/Marcela/Sepulveda/index.htm>.
- [63] R.G. Good and L.A. Girifalco, *A theory for estimation of surface and interfacial energies*. Estimation of surface energies of solids from contact angle data, ed. J.P. Chem. 1960.
- [64] F.M. Fowkes, *Attractive forces at Interfaces*, ed. I.a.E. Chemistry. 1964.
- [65] W.A. Zisman, Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution, ed. A.i. Chemistry. 1964.
- [66] http://www.linan-ipicyt.mx/Microscopio_de_Barrido.html
- [67] Patricia Mollega Mainsard, Alejandro Müller, adn Vittria Balsamo. Caracterizacion y Biodegradacion de mezclas de policaprolactona y poliacido láctico con almdo de yuca. 2008
- [68] *Molecular Biology of the Cell*. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. Publisher: Garland Publishing Inc.
- [69] Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). Lic. María Eugenia Segretín. INGEBI-CONICET - Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA
- [70] R. Ian Freshney. Culture of animal cells, a manual of basic technique. Wiley; 2005.
- [71] Soluciones de cultivos celulares disponible en: http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf
- [72] Ficha de PHB disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/363502?lang=es®ion>
- [73] Ficha de PHB disponible en: <http://www.goodfellow.com/S/Polihidroxibutirato-Biopolimero.html>

[74] Hoja de seguridad del Cloroformo:

http://proveedorcientifico.mx/index.php?controller=attachment&-id_attachment=71

[75] Ficha de seguridad del Alcohol Etilico: <http://www.lco.cl/operations/safety-and-health/technicalinfo/safetydatasheets/Ficha%20seguridad%20Alcohol%20Etilico.pdf>

[76] Ficha de seguridad del Pirrol disponible en:

<https://www.sigmaldrich.com/catalog/product/aldrich/131709?lang=es®ion>

[77] Ficha de seguridad del Yodo disponible en:

<https://www.sigmaldrich.com/catalog/product/sigald/376558?lang=es®ion>

[78] W. L. Chick, S. Warren, R. N. Chute, A. A. Like, V. Lauris, and K. C. Kitchen. A transplantable insulinoma in the rat. 1977.

[79] A. F. Gazdar, W. L. Chick, H. K. Oie, H. L. Sims, D. L. King, G. C. Weir, and V. Lauris. Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. 1980.

[80] S. J. Bhathena, H. K. Oie, A. F. Gazdar, N. R. Voyles, S. D. Wilkins, and L. Recant. Insulin, glucagon, and somatostatin receptors on cultured cells and clones from rat islet cell tumor. Diabetes, 1982.

[81] B. Rojas de Gáscue, J. L. Manosalva, G. Liendo R. Nonatoy C. Rosse, -Caracterización a partir de la microscopía óptica de luz polarizada, las propiedades térmicas y la espectroscopía del termoplástico biodegradable poli (hidroxibutirato)2000.

[82] A.J. Anderson, E.A Daws. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial use of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev*, 1990.

[83] Tsuyoshi Furukawa, Harumi Sato, Rumi Murakami, Jianming Zhang, Isao Noda, Shukichi Ochiai and Yukihiro Ozaki. Raman microspectroscopy study of structure, dispersibility, and crystallinity of poly (hydroxybutyrate)/poly (l-lactic acid) blends. 2006.

[84] Celly M.S Izumi, Marcia L.A. Tempereni. FT-Raman investigation of biodegradable polymers: Poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate).2010.

[85] Zhijiang C, Chengwei H and Guang Y. Crystallization behavior, thermal property and biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate)/ poly(ethylene glycol) grafting copolymer. *Polymer Degradation & Stability*. 2011; 96:1602-1609.]

[86] Sun X, Guo L, Sato H, Ozaki Y, Yan S and Takahashi I. A study on the crystallization behavior of poly (β -hydroxybutyrate) thin films on si wafers. 2011.

[87] Wang C, Hsu CH and Hwang IH. Scaling laws and internal structure for characterizing electrospun poly [(R)-3-hydroxybutyrate] fibers. 2008.

[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. *Microbiological Methods*, 1993.

Apéndice

A

Calceína- AM y Homodímero de Etidio-1

La calceína-AM es una molécula no fluorescente que al hidrolizarse se separa en calceína y acetoximetil, el cual es permeable a la membrana celular y en presencias de enzimas que rompen enlaces esteres (esteras) ocasionando que la división ocurra más rápido. Una vez dividida la calceína (molécula no fluorescente) se excita a 494 nm y emite a 517 nm (en verde), debido a esto es que la calceína-AM resulta ser un buen marcador para las células viables.

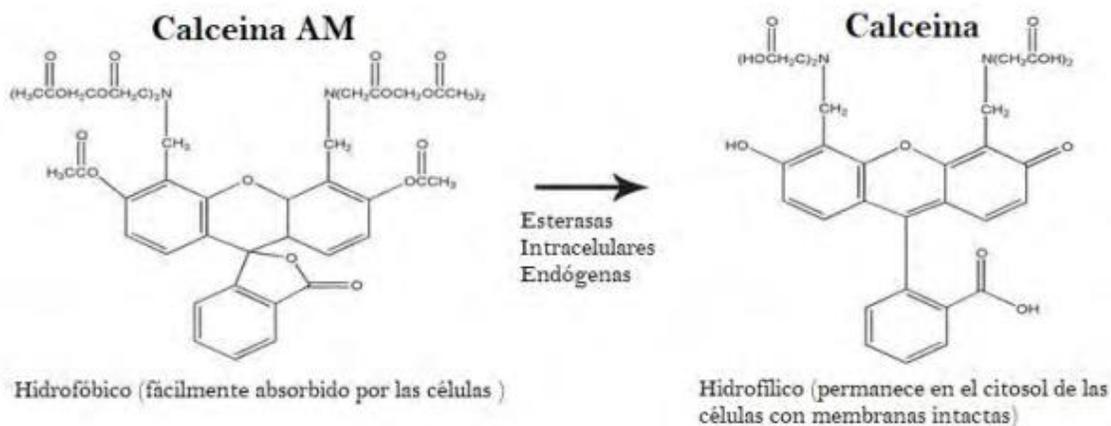


Figura A1. Molécula de Calceína-AM y Calceína

El Homodímero de Etidio-1 es una molécula fluorescente y no permeable a la membrana celular, pero es capaz de cruzarse con ácidos nucleídos y puede llegar a mejorar la fluorescencia cuarenta veces, se excita a 528 nm y emite a 617 nm (en rojo) al poder entrar solo en células con membrana dañada, resulta ser un buen marcador para las células no viables.

Es por ello que la Calceína- AM y Homodímero de Etidio-1 se emplean como marcadores en las pruebas de viabilidad celular. [88]

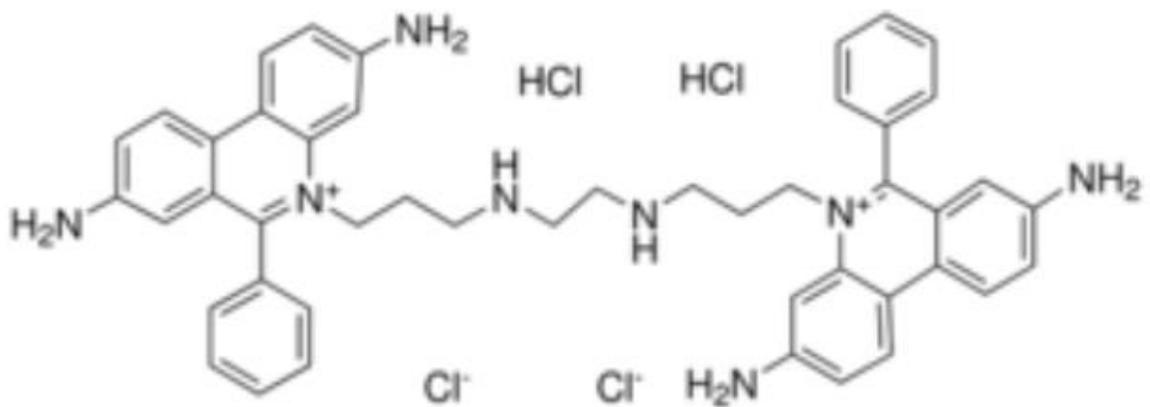


Figura A2. Molécula de Homodímero de Etidio-1



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00072

Matrícula: 2163802946

Andamios electrohilados de Polihidroxibutirato (PHB), para su uso en ingeniería de Tejidos.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 10 del mes de enero del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. GERARDO MUÑOZ HERNANDEZ
DRA. MIRIAM VERONICA FLORES MERINO
DR. JUAN MORALES CORONA



EMMA CORTES ORTIZ
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: EMMA CORTES ORTIZ

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

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

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE

DR. GERARDO MUÑOZ HERNANDEZ

VOCAL

DRA. MIRIAM VERONICA FLORES MERINO

SECRETARIO

DR. JUAN MORALES CORONA