



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“PROCESAMIENTO POR ELECTROHILADO Y CARACTERIZACIÓN DE
MEMBRANAS PLA Y PVA CON MICROESTRUCTURA”**

Diciembre 2021

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN MATERIALES

PRESENTA:
ERICA VELAZQUEZ DE LA LUZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. EFRAÍN RUBIO ROSAS
DR. MARCO ANTONIO MORALES SANCHEZ

PUEBLA, PUEBLA.



BUAP

Oficio No. FIQ/AC/212/2021
Asunto: Registro de Tema de Tesis

C. ERICA VELAZQUEZ DE LA LUZ
PASANTE DE LA LICENCIATURA EN
INGENIERÍA EN MATERIALES
P R E S E N T E:

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería en Materiales cuyo título es el siguiente:

“PROCESAMIENTO POR ELECTROHILADO Y CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS PLA Y PVA CON MICROESTRUCTURA”

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

Director de Tesis: Dr. Efraín Rubio Rosas
Co-Director de Tesis: Dr. Marco Antonio Morales

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **UNICAMENTE POR UN AÑO**.

Atentamente

“Pensar Bien, Para Vivir Mejor”
H. Puebla de Z., a 29 de julio de 2021

Dra. Valeria Jordana González Coronel
Secretaría Académica

C.c.p. Director de Tesis: Dr. Efraín Rubio Rosas
C.c.p. Co-Director de Tesis: Dr. Marco Antonio Morales
C.c.p. Archivo.



Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72590
01 (222) 229 55 00
Exts. 7250 y 7251

DEDICATORIA

“A mi madre María Rosa de la Luz Monterrosas por haberme apoyado y acompañado a lo largo de mi vida, por ser la mejor consejera, amiga, mi fuerza y motor de todos los días.

A mi hermana Evelina por ser siempre un ejemplo a seguir y apoyarme en todo momento, mi hermano Cristóbal a ustedes por confiar en mí.

Para ustedes con todo mi cariño, los amo.”

“Por más dura que te parezca la vida,
siempre hay algo en lo que puedes
ser exitoso; mientras haya vida,
habrá esperanza”

Stephen Hawking

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre María Rosa por todo su amor incondicional y su esfuerzo para que yo culminara la licenciatura, a mis hermanos; agradezco que siempre me han apoyado en todo momento, motivándome y alentándome cada día, por brindarme su confianza para continuar. Los guardo en mi corazón y en mis pensamientos.

Al Dr. Efraín Rubio Rosas, quiero hacer mención del gran apoyo que me brindó:

- Me permitió realizar esta tesis de licenciatura. Me aportó sus conocimientos y experiencias profesionales, con los cuales se incrementaron mis conocimientos y experiencia en el área de la licenciatura.
- Me brindo la confianza y creyó en mí para la realización de simposios, visitas, conferencias, talleres por parte del Capitulo Estudiantil perteneciente a la Sociedad Mexicana de Materiales A.C.
- Su constante asesoramiento y opinión durante la licenciatura.
- Por su paciencia y comprensión.

Muchas gracias Doctor Efraín por aceptarme como su estudiante y por su confianza, con su ayuda aprendí a interpretar muchas técnicas de caracterización y mejorar mis habilidades muy reveladoras para mi formación profesional.

Al Dr. Marco Antonio Morales Sánchez, quiero hacer mención del gran apoyo que me brindó:

- Me permitió realizar no solo esta tesis, sino muchos proyectos de investigación durante la licenciatura, de lo cual estoy muy agradecida ya que me abrió el gran panorama e impacto de la carrera de Ingeniería en Materiales.
- Me brindo sus conocimientos sin restricción de horarios, los cuales me ayudaron a superarme y ser mejor estudiante cada día.
- Gracias por su paciencia, comprensión y apoyo incondicional.
- Su constante asesoramiento y opinión en la creación de este proyecto de tesis.
- Por crear en mi esa curiosidad e inquietud por querer realizar más proyectos, experimentos y demás.

Le agradezco mucho Dr. Marco por su confianza y aceptarme como su alumna de prácticas profesionales y tesista, con su ayuda aprendí muchas cosas las cuales dieron impulso a mi formación profesional.

Al Dr. Heriberto Hernández Cocolletzi, por aceptar ser mi sinodal en esta tesis de licenciatura y por su apoyo, gracias por todo el conocimiento que me brindó durante las clases que tomé con usted y estar en disposición para resolver mis dudas.

Al Dr. Jenaro L. Varela Casélis, por aceptar ser sinodal y por el apoyo que nos brindó durante mi periodo en el Capítulo Estudiantil de Ingeniera en Materiales y por sus valiosas correcciones.

A la Dra. María Elena Hernández Torres por toda su ayuda y paciencia, gracias por compartir sus conocimientos, motivarme a ser mejor cada vez y ver más allá de las cosas y no conformarnos con lo poco que sabemos. Gracias por siempre tener un espacio disponible, brindarme su confianza y amistad.

A mis compañeros de laboratorio: Aleph Adel gracias por brindarme tus conocimientos médicos, culturales y experiencias, por tu apoyo y la confianza depositada en mí, por el gran cariño. A Hugo Alberto y Fabiola gracias por las risas, confianza y compañía en el laboratorio, por preocuparse por mí.

Gracias a Carlos Gerardo Arenas que ha sido la clave para superarme y ser mejor cada día, por el apoyo incondicional y gran cariño. Un orgullo haber coincidido contigo en esta vida.

A todos mis amigos y compañeros de la carrera, en especial a Verónica Arroyo Sánchez y Brenda Irais Orea Calderón gracias por estar conmigo en este trayecto, por su apoyo incondicional y sus conocimientos brindados. Las quiero mucho y les deseo lo mejor de vida.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	V
CAPÍTULO I	1
1. Introducción	1
1.2 Procesamiento por Electrohilado de membranas	3
1.2.1 Variables de la solución polimérica	4
1.2.2 Elementos integrantes del proceso de electrohilado	5
1.3 Anatomía de la piel	6
1.3.1 Capas de la piel	8
1.3.1.1 Epidermis	8
1.3.1.2 Dermis	10
1.3.1.3 Hipodermis	12
1.4 Biomateriales	12
1.4.1 Biomateriales como apósitos activos para regeneración cutánea	13
1.5 Cicatrización	16
1.5.1 Fases de la cicatrización	16
1.5.1.1 Hemostasia	16
1.5.1.2 Inflamatoria	16
1.5.1.3 Proliferativa	17
1.5.1.4 Remodelación	17
1.6 Regeneración de tejido por electrohilado (andamios)	18
1.7 Pruebas de biocompatibilidad	19
1.8 Membranas poliméricas que se emplean en la actualidad	20
1.8.1 Polímeros Biodegradables	21
1.8.1.1 Ácido Poliláctico (PLA)	22
1.8.1.2 Alcohol Polivinílico (PVA)	23
CAPÍTULO 2	25
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	25
2.1 Preparación de soluciones poliméricas	25
2.1.1 Solución del Ácido Poliláctico - PLA	25

2.1.2 Solución de PVA.....	26
2.2 Obtención de membranas PVA/PLA en el equipo de electrohilado.....	28
2.2.1 Tipos de inyección.....	30
2.3 Sistema de control automático de inyección para un equipo de electrohilado por manufactura aditiva.....	31
2.4. Técnicas de Caracterización	32
2.4.1 Reología.....	33
2.4.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	34
2.4.3 Análisis Termogravimétrico (TGA/DSC)	36
2.5 Prueba de Biocompatibilidad	38
2.5.1 Prueba de Hemocompatibilidad – Adherencia Plaquetaria	38
2.5.2 Cultivo de Fibroblastos y ensayo de cicatrización de heridas <i>in vitro</i>	39
CAPÍTULO 3.....	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
3.1 Caracterización: Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	43
3.1.1 Micrografía de Membranas PLA	43
3.1.2 Micrografía de Membranas PVA.....	47
3.1.3 Micrografía de Membranas PVA/PLA	51
3.2 Análisis Termogravimétrico TGA/DSC de las membranas	54
3.2.1 Análisis Termogravimétrico TGA	54
3.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	55
3.3 Adherencia plaquetaria: Microscopia electrónica de barrido (SEM)	57
3.4 Cultivo de Fibroblastos y ensayo de cicatrización de heridas <i>in-vitro</i>.....	59
3.4.1 Cultivo de Fibroblasto	60
3.4.2 Ensayo de cicatrización de heridas <i>in-vitro</i> pruebas de Ibidi®.....	61
4. CONCLUSIONES	63
5. BIBLIOGRAFÍA	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de Electrohilado	4
Figura 2. Representación gráfica del funcionamiento de un equipo de electrohilado (Divulgación IQOG- CSIC).	5
Figura 3. Representación esquemática de un corte transversal del tejido de la piel humana, donde se muestran las capas que la conforman, en esta imagen se muestran las tres capas (epidermis, dermis e hipodermis) y sus anexos cutáneos folículos pilosos, glándulas, vasos sanguíneos (Borke, J. 2017). 7	
Figura 4. Donde se muestran cambios morfológicos que tiene el queratinocito desde la lámina basal el estrato corneo (estrato más superficial de la piel) (1.- Estrato basal, 2.- Estrato espinoso, 3.- Estrato granular, 4.- Estrato lucido y 5.- Estrato corneo).....	9
Figura 5. Representación esquemática de las fases de la cicatrización (Wound Healing photos 2017).	18
Figura 6. Ácido Poliláctico (PLA).	23
Figura 7. Alcohol Polivinílico (PVA).	24
Figura 8. Polímero Ácido Poliláctico (PLA).....	25
Figura 9. Polímero Alcohol Polivinílico (PVA).....	27
Figura 10. Fotografía que muestra las soluciones de PVA y PLA.....	28
Figura 11. Representación de las etapas de la formación del cono de Taylor en un equipo de electrohilado.....	29
Figura 12. Equipo de Electrohilado: Proceso de hilado de membrana.	30
Figura 13. Sistema de control automático de inyección para un equipo de electrohilado.	32
Figura 14. Esquema: Técnica de inspección visual.....	34
Figura 15. Posibles señales generadas de la interacción de un haz de electrones con la muestra....	36
Figura 16. Obtención del Plasmas rico en plaquetas (PRP).	39
Figura 17. Micrografía de membrana de Ácido poliláctico (PLA), a) obtenida a una escala de 50 μm y 500x, b) obtenida a una escala de 10 μm y 1000x, c) histograma de diámetro promedio de filamento.	44
Figura 18. Micrografía de membrana de Ácido poliláctico (PLA) con variación en los parámetros de inyección , a) obtenida a una escala de 10 μm y 2000x, b) obtenida a una escala de 5 μm y 5000x, c) histograma de diámetro promedio de filamento.....	45
Figura 19. Micrografía de membrana de Ácido poliláctico (PLA) con sistema de inyección automático y sus respectivos histogramas, a) obtenida a una escala de 10 μm y 2000x, b) obtenida a una escala de 5 μm y 5000x.	46
Figura 20. Micrografía de membrana de Alcohol Polivinílico (PVA) con sistema de inyección simple y manual, a) obtenidas a una escala de 10 μm y 2000x, b) histograma de diámetro promedio de filamento.....	48
Figura 21. Micrografía de membrana de Alcohol Polivinílico (PVA) con sistema de inyección manual-automática, a) obtenida a una escala de 50 μm y 500x, b) obtenida a una escala de 10 μm y 1000x.....	49

Figura 22. Micrografía de membrana de Alcohol polivinílico (PVA) con sistema de inyección manual-automática, a) obtenida a una escala de 50 μm y 500x, b) histograma de diámetros promedio del filamento.	50
Figura 23. Micrografía de la membrana PLA/PVA. Inciso a) Viscosidad alta, se observa un rompimiento de las fibras a una escala de 5 μm y 500x. Inciso b) Medianamente viscosa, se observa una morfología ordenada.....	51
Figura 24. Micrografía de la membrana PLA/PVA. Inciso a) con una escala de 10 μm y 1000x, inciso b) con una escala de 2 μm y 7000x e inciso c) histograma de diámetros promedio del filamento.	52
Figura 25. Matriz extracelular de la piel, inciso a) Membrana PLA, inciso b) Membrana PVA e inciso c) Membrana PLA/PVA.	53
Figura 26. Micrografía de la membrana PLA: En el inciso a) se puede observar la distribución de las plaquetas adheridas, inciso b) se observa una forma ovoide de una plaqueta adherida e inciso c) histograma del diámetro promedio de la partícula.	58
Figura 27. Micrografía del filamento PVA: En el inciso a), b) se puede observar la distribución de las plaquetas adheridas, inciso c) histograma del diámetro promedio de la partícula.....	59
Figura 28. Inciso a) Fibroblastos inmaduros, inciso b) Fibroblastos durante 24 horas, inciso c) Fibroblastos durante 48 horas e inciso d) Fibroblastos durante 72 horas.	60
Figura 29. Esquema del dispositivo Ibidi@.....	61
Figura 30. Control de proliferación de fibroblastos. Inciso a) Fibroblastos en tiempo 0, b) Fibroblastos proliferando después de 48 hrs y c) fibroblastos en contacto con membrana PLA/PVA.	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto que producen las variables de electrohilado en la morfología de las fibras.....	4
Tabla 2. Características de los biopolímeros más utilizados en aplicaciones biomédicas.	14
Tabla 3. Tipos de Inyección: Inyección simple, doble y coaxial.	31
Tabla 4. Pérdida y aumento en peso.....	37
Tabla 5. Parámetros de inyección membranas PLA.	43
Tabla 6. Parámetros de inyección membranas PVA.	47

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curvas TGA de las membranas a base de PLA, PVA y su combinación PLA/PVA en atmosfera controlada de nitrógeno, con un incremento de 10°C por min.	55
Gráfica 2. Curvas DSC de las membranas a base de: a) PLA, b) PVA y su combinación c) PLA/PVA en atmosfera controlada de nitrógeno, con un incremento de 10°C por min.	57

RESUMEN

Debido a las atractivas propiedades y semejanzas al imitar la matriz extracelular de la piel humana, las membranas a base de biopolímeros PLA/PVA se consideran un material con potencial para su aplicación a la ingeniería tisular. En conjunto con la técnica de electrohilado se han desarrollado diversas investigaciones, incluyendo el presente trabajo para darles más estabilidad a las membranas. Se reportan membranas a base de biopolímeros PLA/PVA con una morfología biomimética a la matriz extracelular, además de presentar diversas membranas variando los parámetros de control experimental. Se encuentra que la viscosidad, el voltaje, distancia del colector y el tipo de inyección manual o automático son fundamentales para obtener un tamaño de fibra micrométrico, sub-micrométrico y nanométrico en dichas membranas poliméricas.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN / ANTECEDENTES

1. Introducción

Los antecedentes históricos sobre la utilización de materiales en Medicina, para ayudar a restaurar las funciones de tejidos dañados, se remontan al uso de ciertos metales y otros productos naturales en el antiguo Egipto y durante las civilizaciones clásicas griega y romana. El desarrollo de los polímeros se aceleró a principios del siglo XX, con el descubrimiento de materiales para fabricar hilos de sutura capaces de ser degradados y absorbidos por el organismo. La investigación sistemática sobre los materiales tolerables por el organismo para la fabricación de prótesis e implantes se impulsó después de la segunda Guerra Mundial, por la necesidad de rehabilitar a los inválidos de guerra. La descripción de nuevos biomateriales y sistemas utilizados en Medicina, que sean fisiológicamente eficaces y mecánicamente funcionales, ha sido vertiginosa [1]. En un recorrido a través de los años más recientes, se puede resaltar que entre 1940 y 1950, la investigación y el desarrollo de los implantes se realizó casi exclusivamente por cirujanos; algunos de los implantes concebidos en esa época todavía se utilizan, como por ejemplo el implante o prótesis de cadera de Charnley. Entre 1950 y 1975 se determinaban las características de los biomateriales para implantes y prótesis, la integridad de los mismos tras su implantación a largo tiempo, su naturaleza no tóxica y la respuesta inflamatoria [2]. Durante la década de los 60 se publicaron los primeros estudios sobre las lesiones provocadas por la presencia de un implante y se introduce el término biocompatibilidad, que define el grado de tolerancia del biomaterial por parte del organismo.

El año 1969 marca el punto de partida de la necesaria incorporación a la Medicina de diversas disciplinas para el desarrollo de biomateriales. Así, el ingreso de la

Ingeniería permitió introducir técnicas para caracterizar la estructura y la superficie de los biomateriales y, el de otras ciencias (Biología, Bioquímica, etc.), el estudio de la respuesta celular.

En la actualidad la escasez de piel, procuración y sanidad de bancos de piel ha generado la búsqueda de nuevas alternativas para el cuidado y la regeneración de está. Los tratamientos empleados en el cuidado de heridas, quemaduras resultan no ser favorables para el paciente. Siendo esta una problemática para las instituciones y para el paciente.

Este tipo de problemas ha generado que los trabajos se vuelvan multidisciplinarios, buscando nuevas alternativas en la biotecnología ejemplo de ello son los polímeros funcionalizados que imitan una matriz extracelular [3], así como el empleo de nanofibras obtenidas por electrohilado que favorezcan la epitelización de heridas [4] o el uso de materiales porosos formado con andamios tridimensionales que actúen como un facilitador de la adhesión celular y el crecimiento. Debido a la cantidad de polímeros que es posible hilar con diferentes estructuras, se ha realizado intensas investigaciones para utilizar micro-fibras, por ejemplo, en medicina regenerativa utilizando la técnica de Electrohilado.

La ingeniería tisular es una ciencia que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida desarrollando sustitutos biológicos que reparen o mejoren la función biológicas de un tejido u órgano, basándose en el uso de tres elementos: biomateriales, células y andamios. A pesar de los muchos avances alcanzados, los investigadores de este campo se enfrentan a importantes retos en la reparación o la sustitución de los tejidos.

En este sentido, los biomateriales utilizados en la construcción de andamios juegan un papel muy importante por lo que deben cumplir una serie de requisitos tales como: permitir una estructura adecuada con el fin de favorecer la integración y vascularización del tejido, ser biocompatibles, biodegradables, teniendo adecuadas propiedades mecánicas y una superficie química apropiada que favorezca la

adhesión, diferenciación y proliferación celular [5]. Por consiguiente este estudio busca investigar alternativas para la regeneración de piel. Además se propone un nuevo tratamiento a base del empleo de fibras constituidas por la técnica de electrohilado con características de un entrelazamiento coaxial, que imite la matriz extracelular.

1.2 Procesamiento por Electrohilado de membranas

El electro-hilado es una técnica que usa fuerzas electrostáticas para producir fibras de orden nanométrico o micrométrico mediante soluciones poliméricas [6]. La técnica consiste en inyectar soluciones de polímeros a través de campos eléctricos de gran intensidad. Se basa en aplicar suficiente carga eléctrica que supere las fuerzas de la tensión superficial en la solución de polímero cargado. En esta forma a un voltaje determinado, finos chorros de solución son expulsados desde un capilar hasta el colector así como se muestra en la Figura 1. Posteriormente el chorro se mueve en la dirección del campo eléctrico, con elongación de acuerdo a las fuerzas externas e internas, experimentando inestabilidad en algunas ocasiones. El disolvente se evapora y los segmentos de fibras son depositados al azar en un sustrato.

Los parámetros de control de la técnica de electro-hilado son principalmente: concentración, flujo de salida, viscosidad, tensión superficial, voltaje, distancia entre colector e inyector. Esto genera tipos de morfologías del material polimérico procesado mediante esta técnica, las cuales pueden ser planas o cintas, helicoidales, ramificadas, huecas, fibras con defectos tipo gota, fibras con poros, etc. [7]. Estos parámetros de control en la técnica de electrohilado determinan la morfología de las fibras, las cuales constituyen membranas.

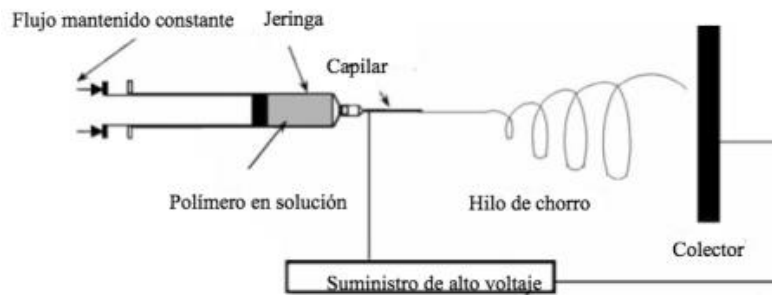


Figura 1. Esquema del proceso de Electrohilado

1.2.1 Variables de la solución polimérica

Además de los parámetros, hay una serie de variables de la solución polimérica que desempeñan un papel importante en la formación y la estructura de las fibras. En orden relativo de importancia en el proceso de electrohilado está la concentración de la solución polimérica, la volatilidad del solvente y la conductividad del solvente. Si bien un número de relaciones generales entre los parámetros de proceso y morfología de las fibras se pueden ver en la Tabla 1., es importante darse cuenta de que la relación exacta será diferente para cada polímero y solvente utilizado en el sistema. Dependiendo de una serie de variables de la solución obtendrán diferentes resultados.

Tabla 1. Efecto que producen las variables de electrohilado en la morfología de las fibras.

Variables	Efecto de la morfología de la fibra
Voltaje aplicado ↑	Diámetro de la fibra ↓ inicialmente, después aumenta (no es monótona).
Velocidad de flujo ↑	Diámetro de la fibra ↑ (si el flujo es demasiado alto se forman aglomerados)
Distancia entre la aguja y el colector ↑	Diámetro de las fibras ↓ (si la distancia es demasiado corta se forman aglomerados).
Concentración de la solución polimérica (viscosidad) ↑	Diámetro de la fibra ↑ (dentro del rango óptimo).
Conductividad de la solución polimérica ↑	Diámetro de la fibra ↓ (distribución de diámetro amplio).

Volatilidad del solvente ↑	Las fibras presentan una microtextura (se muestran poros en la superficie, aumentando el área superficial).
Alto ↑ Bajo ↓	

1.2.2 Elementos integrantes del proceso de electrohilado

Un equipo de electrohilado se divide principalmente en tres partes: una fuente de alto voltaje, una bomba de inyección con su aguja capilar y un colector conectado a tierra física ver la Figura 2. El principio de electrohilado es la extensión o estiramiento de un fluido viscoso ocasionado por una diferencia de potencial de carga eléctrica, entre el fluido cargado con energía eléctrica (carga negativa) y el colector (carga positiva). El proceso inicia cuando se genera la ruptura de la tensión superficial del fluido y genera el llamado, cono de Taylor, lo que induce a la formación de la fibra y su recolección constante al colector [6].

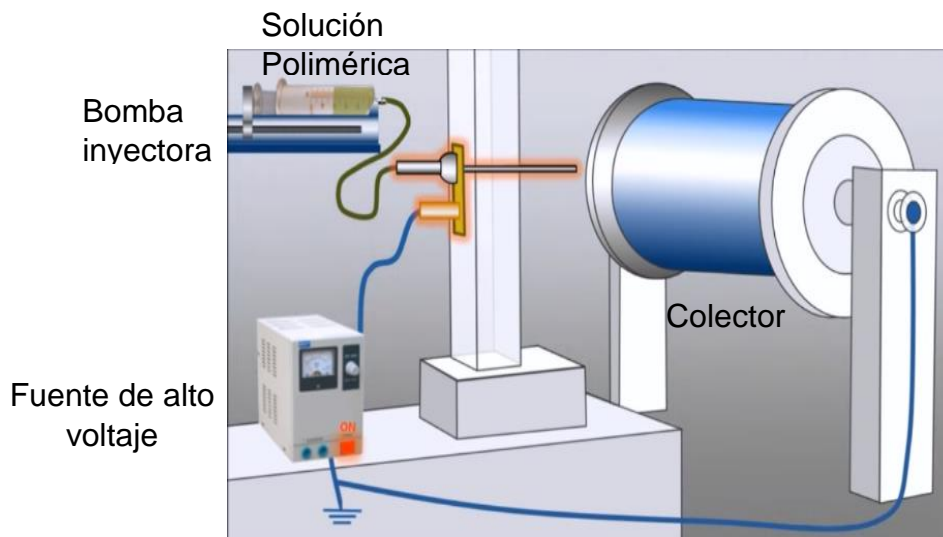


Figura 2. Representación gráfica del funcionamiento de un equipo de electrohilado (Divulgación IQOG- CSIC).

Formación del cono de Taylor: El fenómeno ocurre al momento de que las fuerzas eléctricas (positivas y negativas) superan a la tensión superficial de la solución polimérica. La carga de la solución es inducida por una fuente de alto voltaje que supere la carga de 6 KV en adelante. La tensión superficial ocasiona la elongación de la solución viscosa mediante fuerzas de repulsión o atracción. El proceso inicia con la carga eléctrica constante sobre la superficie de la gota, hasta llegar al punto de una atracción con la tierra física, esta atracción genera una ruptura en la tensión superficial de la gota, seguida de la evaporación del disolvente que da lugar a la formación de fibras.

Dirección de flujo: la trayectoria del flujo inicia desde la punta de la aguja capilar hacia la tierra física pasando por el colector para obtener un buen rendimiento en la obtención de fibras. Sin embargo, esta trayectoria puede verse afectada fácilmente por la presencia de campos eléctricos. La obtención de estructuras bidimensionales y tridimensionales necesita una recolección constante de fibras para obtener un espesor de membrana adecuada. Los electrodos permiten el manejo de campos eléctricos externos para controlar la trayectoria del flujo y así construir estructuras fibrosas ordenadas fácilmente.

El método de procesamiento del electrohilado es más versátil en cuanto al grosor de la membrana y en cuanto a su preparación debido a que la volatilización del disolvente facilitando la solidificación de la membrana lista para su caracterización mostrando su eficiencia y facilidad de manipulación [7].

1.3 Anatomía de la piel

Todo ser vivo sea unicelular o pluricelular cuenta con una capa que lo reviste, como medida de protección del medio que lo rodea, permitiendo que interactúe y se relacione con el medio externo. En el caso de seres unicelulares la cubierta está representada por la membrana celular. Y en los organismos pluricelulares hablando

de los mamíferos vertebrados específicamente cuentan con un tejido llamado piel [8].

La piel es el órgano que recubre, aísla y da protección a los mamíferos del exterior. Cumple funciones relacionadas al control de líquidos, control de temperatura corporal mediante el flujo sanguíneo y la emisión de sudor [9].

La piel es un órgano que no tiene cambios significativos en cada especie, por lo que los mamíferos tienen las mismas características tanto en su ordenamiento celular como en su morfología y distribución. Por lo que podemos decir que para su estudio en todos los casos se dividen en: *epidermis*, *dermis* e *hipodermis* ver la Figura 3. Y anexos cutáneos que derivan del tejido epitelial y cumple funciones independientes, los anexos más importantes son glándulas, pelos y uñas [9].

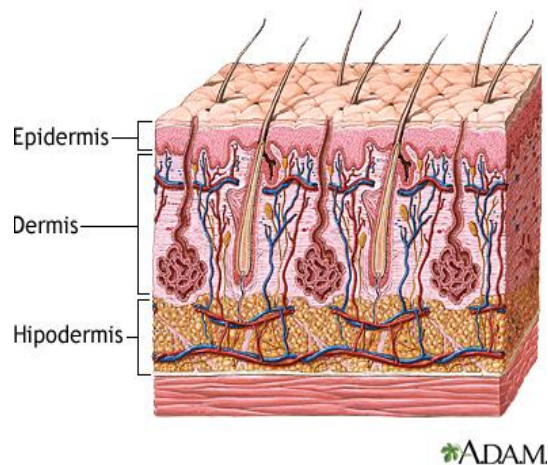


Figura 3. Representación esquemática de un corte transversal del tejido de la piel humana, donde se muestran las capas que la conforman, en esta imagen se muestran las tres capas (epidermis, dermis e hipodermis) y sus anexos cutáneos folículos pilosos, glándulas, vasos sanguíneos (Borke, J. 2017).

1.3.1 Capas de la piel

1.3.1.1 Epidermis

Es la capa más superficial de la piel, es la primera barrera de protección ante agresiones externas. Está constituida por un epitelio plano estratificado de tipo queratinizado que carece de irrigación y de inervación propio, se nutre a través de la dermis por difusión. En la epidermis también encontramos otro tipo de células denominadas anexos cutáneos, los cuales son: anexos glandulares (glándulas sebáceas, sudoríparas y folículos), y anexos queratinizados [8].

Células de la epidermis

Existen cuatro bloques celulares que son:

Queratinocitos: Estas células constituyen el 90% de la población, se denominan así porque fabrican una proteína llamada queratina, que es impermeable al agua y protege la piel y los tejidos de las agresiones y abrasiones externas. Son células que constituyen un epitelio de tipo estratificado plano, caracterizado por tener células planas, sin embargo en estratos más profundos las células tienen forma de cuboides o cilíndrica como se muestra en la Figura 4. Razón por la cual se estudia como un tejido epitelial formando por múltiples capas o estratos dispuestos desde su parte basal donde se lleva a cabo la mitosis hasta su parte superior del epitelio [8].

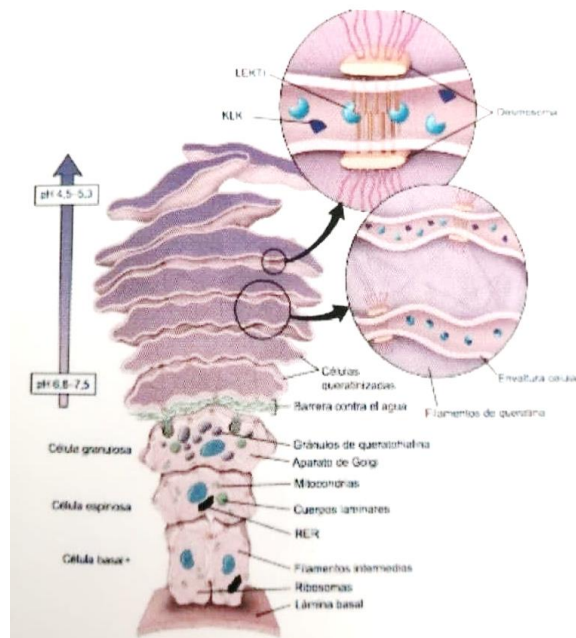


Figura 4. Donde se muestran cambios morfológicos que tiene el queratinocito desde la lámina basal el estrato córneo (estrato más superficial de la piel) (1.- Estrato basal, 2.- Estrato espinoso, 3.- Estrato granular, 4.- Estrato lucido y 5.- Estrato córneo).

Melanocitos: Son células dendríticas que proceden de la cresta neural (células que migran de la cresta neural hacia la epidermis en la embriogénesis), están en contacto con el estrato germinativo y la porción más superficial de la dermis [9].

Células de Langerhans: Son células poco numerosas representan del 3 al 8% de la población total del epitelio, por lo que son infrecuentes en el estrato basal. Se originan en la médula ósea y son transportados por la sangre hasta la dermis. De donde migran hasta llegar a las capas más superficiales de la epidermis. Su morfología es estrellada, sus núcleos son oscuros e irregulares envueltos por un citoplasma de color claro, en su interior encontramos gránulos en forma de bastón, rodeados por una membrana, llamados gránulos vermiformes o de Birbeck [10]. Se sitúan habitualmente en las capas espinosas, granulosas y basales.

Células de Merkel: Son células epidérmicas modificadas, de morfología redondeada, algo aplanadas, con núcleo invaginado y con un citoplasma lleno de gránulos de núcleo denso y filamentos de queratina que a diferencia de los queratinocitos estas células tienen una función mecano receptora. Se ubican en la capa basal de la epidermis, originadas de células ectodermales epidérmicas; también llamadas discos de Merkel.

1.3.1.2 Dermis

La dermis está constituida por tejido conjuntivo, conteniendo fibras de colágeno de tipo I y fibras elásticas. Las células de la dermis incluyen fibroblastos, macrófagos, mastocitos y adipocitos y en ella se encuentran vasos sanguíneos, nervios, glándulas subcutáneas y folículos pilosos. Su grosor no se puede medir exactamente porque no se diferencia claramente de la capa subcutánea pero es delgada en los párpados (0.6 mm o menos) y tiene unos 3 mm en las zonas de más fricción que son las palmas de las manos y las plantas de los pies, en donde está la piel gruesa. Suele ser más delgada en la parte anterior del cuerpo que en la posterior y más delgada en las mujeres que en los hombres [9].

Se distinguen dos capas morfológicas:

Dermis Papilar: Tejido laxo superficial, formado por haces finos y entrecruzados de fibras de colágeno tipo I, tipo II y fibras elásticas siendo esta la porción más rica en elementos celulares, está formada por unas elevaciones o crestas que se denominan papilas dérmicas [8].

Dermis Reticular: Estrato inferior y de mayor grosor está unido con la hipodermis, formando un tejido conjuntivo denso irregular, es la porción mayor de la dermis, compuesta por numerosas fibras y con escasas células [8-9].

En ciertas regiones del cuerpo, las fibras de colágeno tienden a orientarse más en una dirección que en otra formando las líneas de incisión o tensión en la piel que indican la dirección predominante de las fibras de colágeno subyacentes. Estas líneas son especialmente evidentes en las superficies palmares de los dedos en

donde se colocan paralelas al eje longitudinal de los dedos y son de interés particular para el cirujano, puesto que una incisión paralela a las fibras de colágeno curará con una fina cicatriz mientras que una incisión que cruce las fibras, desorganiza el colágeno con lo que las heridas quedan muy abiertas y curan con una cicatriz gruesa y ancha.

Células de la dermis

Fibroblastos: Son las células más particulares del tejido conjuntivo en la dermis con predominio en la dermis papilar, morfológicamente son células estrelladas con largas prolongaciones, e inmóviles y planas. Su función es la fabricación y mantenimiento de las fibras dérmicas y de la hipodermis por medio de la producción de colágeno. Ante traumatismos y lesiones se vuelven más activos lo que favorece a la cicatrización mediante la síntesis de matriz extracelular.

Macrófagos: Células de gran tamaño, de forma esférica y con un núcleo arriñonado, estas células participan en la detección, fagocitosis y destrucción de agentes extraños, además forman parte de la defensa del organismo. Actúan en el proceso inflamatorio como presentador de antígenos mediante la liberación de citosinas.

Células Plasmáticas: Son células de pequeño tamaño, con núcleo grande, redondeado y abundante retículo endoplásmico rugoso. Derivan de los linfocitos y su función es fabricar anticuerpos en procesos infecciosos.

Células Cebadas: Células de defensa actúan ante la presencia de anticuerpos con la secreción de sustancias inflamatorias o compuestos químicos activando la respuesta inmunológica ante invasiones.

Adipocitos: Células encargadas del almacenamiento de lípidos, morfológicamente son células redondeadas de tamaño grande con una gota de grasa en su citoplasma, su función es de almacenamiento de energía, regulación corporal y como amortiguador ante traumatismo.

1.3.1.3 Hipodermis

Está localizado por debajo de la dermis reticular y está constituido por tejido adiposo que están inmersos en una maya fibrosa, por lo tanto según esta disposición se habla de lóbulos adiposos, que no son más que un conjunto de adipocitos rodeados de tabiques de tejido conjuntivo, sus fibras se comunican con la dermis, es su mayoría encontramos acúmulos de células grasas (adipocitos). Otro nombre que recibe es tejido celular subcutáneo). Dentro de sus funciones está el movimiento de la piel sobre estructuras subyacentes, y el acumulo de células adiposas en zonas como el abdomen y los glúteos [11].

1.4 Biomateriales

Se denomina biomaterial a los productos empleados para reproducir la función de tejidos vivos en los sistemas biológicos de forma segura, mecánicamente funcional y aceptable fisiológicamente, que son temporal o permanentemente implantados en el cuerpo y que tratan de restaurar el defecto existente y, en algún caso, conseguir la regeneración tisular [12,13]. El biomaterial en contacto con tejidos vivos no debe producir en ellos ningún tipo de alteración, lo que limita las materias primas con las que se puede abordar su diseño. Sin embargo, los biomateriales constituyen un conjunto de materiales cuya principal característica es su gran diversidad. Entre ellos se incluyen metales, cerámicas, vidrios, acero y otras aleaciones metálicas, polímeros sintéticos de múltiples clases, polímeros naturales, tejidos biológicos modificados, etc. [14].

Cualquier biomaterial, para poder ser implantado, debe cumplir unos requisitos generales que se engloban en el concepto de biocompatibilidad, en el que se considera la tolerancia de dicho material, su bioestabilidad tanto a corto como a largo plazo, o el mantenimiento de sus propiedades y estructura químico-física en el entorno biológico durante el tiempo que permanezca en el organismo [12,14]. Además, deben poseer unas propiedades mecánicas y químicas específicas que aseguren la función para la cual se diseñan. Esta viabilidad funcional es crítica y está relacionada con la capacidad del material para desempeñar su papel en una

aplicación concreta, quedando garantizada a largo plazo la función del órgano o tejido donde se implanta. Para asegurar el éxito de un nuevo biomaterial se requiere que éste supere una serie ensayos que preceden a las pruebas clínicas: simulaciones biomecánicas, modelos in vitro, ensayos toxicológicos y de biocompatibilidad, e implantación en animales de experimentación [15,7].

Los requisitos que debe cumplir un biomaterial se pueden resumir en: 1) ser biocompatible, aceptado por el organismo receptor, y no provocar que éste desarrolle mecanismos de rechazo ante la presencia del biomaterial, 2) no ser tóxico, ni carcinógeno, 3) ser químicamente estable, o biodegradable en productos no tóxicos, al menos durante el tiempo programado, ya que hay biomateriales biodegradables y biomateriales permanentes, 4) que la resistencia y propiedades mecánicas, características superficiales, el tiempo de fatiga, y el peso sean los adecuados, y 5) su diseño, el tamaño y la forma del implante deben ser los adecuados.

1.4.1 Biomateriales como apósitos activos para regeneración cutánea

El trabajo pionero de Martin y Cockshoot en 1974 [16] da origen a la relación entre la fabricación de membranas por electrohilado [17,18] y la invención de nuevos materiales que sirven como barrera antimicrobiana, favorecen el intercambio de oxígeno, irrigación de fluidos, adsorción de células muertas y toxinas (apósitos activos) en el proceso de regeneración cutánea a base de biopolímeros. Se establece que existen biopolímeros naturales y artificiales para la fabricación de membranas con funcionalidad de apósitos activos.

No obstante, membranas con este tipo de comportamiento de apósitos activos son biomateriales de tercera generación (BTG) [19] a los cuales no solamente se les exige ser biocompatibles (no tóxicos) y biodegradables, sino también se desea que sean apropiadamente hidrofílicos y con resistencia mecánica adecuada. Estas propiedades creadas bajo diseño para el apósito activo mimetizan la matriz extracelular de la piel, la cual se encarga de proliferar, migrar y diferenciar las células dermales y epiteliales.

Los polímeros más utilizados en el electrohilado de nanofibras para aplicaciones biomédicas. Ejemplos de apósitos activos que potencialmente cumplen con esta finalidad a base de biopolímeros naturales y artificiales. En estudios recientes [20] son obtenidas por primera vez membranas poliméricas de PLA/PVA, pero se enfocan en determinar: parámetros de control para obtener fibras de PLA o PVA con un diámetro específico [20], control de la microestructura de la membrana a partir de la velocidad de flujo y extrusión [21], así como poder controlar el mecanismo de hilado a partir de los parámetros del dispositivo de electrohilado [21].

A continuación se presenta la Tabla 2, la cual contiene las características que deben cumplir los biomaterial y las combinaciones que pueden tener cada biomaterial para cumplir con estas características requeridas:

Tabla 2. Características de los biopolímeros más utilizados en aplicaciones biomédicas.

Polímero	Propiedades de Superficie		Biodegradables		Fuerza Mecánica		Integración de las células
	Hidrofílica	Hidrofóbica	Hidrolítica	Enzimático	Alto	Bajo	
Naturales							
Quitosano	X			X	X		
Colágeno	X			X		X	X
Ácido Hialurónico	X			X		X	
Elastina	X			X		X	X
Alginato	X			X		X	
Fibrinógeno	X			X	X		X
Celulosa	X		X		X		
Laminina	X			X		X	X
Gelatina	X		X	X	X		X

Sintéticos							
PVA	X		X			X	
PEO	X		X			X	
PCL		X	X	X	X		
PGA		X		X	X		
PLGA		X	X	X	X		
PVP	X		X			X	
Combinación							
PVA/Quitosano	X		X	X	X	X	
PVA/PLA	X	X	X	X	X	X	
PEO/PLGA	X	X	X	X	X	X	
PVA/PCL	X	X	X	X	X	X	
PVA/PGA	X	X	X	X	X	X	

Otros ejemplos de apósitos activos que potencialmente cumplen con esta finalidad a base de biopolímeros naturales son membranas poliméricas de poli(hidroxi-butilato)-plurónico [17]; membranas mixtas antibacteriales a base de celulosa/sulfatiacina [18] o compuestas de poli(ϵ -caprolactona)/quitosano/ácido cafeico [19] o a base de quitosano/cinamaldehído/plata metálica (Ag) [20] o bien, aceite de menta con nanopartículas de sílice/digluconato de clorhexidina/PVA [21] o mixta doble capa a base de PVA/quitosano y Ag/polivinil polipirridona (PVP) [22] para imitar con mayor semejanza la piel y sus funciones; mientras que ejemplos de apósitos de biopolímeros sintéticos son membranas de polivinil alcohol (PVA)/PVP [22] o a base PVA [23] o/y nanopartículas de tri-etilamina con benceno axadiazol (TBO) [24] o ácido poliláctico (PLA) [25] o membranas mixtas con funcionalidad antibacterial hechas de PLC/Ag [26] o PVA/PLC/sulfatiazina [27] o PVA/Pluronic® F127/nanopartículas de TiO₂ [28] o membranas de triple capa constituidas de cloruro de polivinilideno, curcumina/PLA y enrofloxacina/PLA [29].

1.5 Cicatrización

El proceso de cicatrización es un proceso fisiológico donde ocurre una secuencia de eventos que depende de la dinámica celular del tejido celular lesionado y circundante. Estas células permiten la liberación de factores de crecimiento y citosinas para llevar a cabo la reparación en cuatro fases: Hemostasia (coagulación), inflamatoria, proliferación celular y remodelación tisular así como se muestra en la Figura 5.

1.5.1 Fases de la cicatrización

1.5.1.1 Hemostasia

La hemostasia es el primer proceso de cicatrización, inicia con la liberación quimiotáctica en el sitio o zona de la herida, al romperse la continuidad de los tejidos, ocasionando rompimiento de vasos sanguíneos, y exponiendo la matriz extracelular a las plaquetas sitio, comienza inmediatamente después de presentarse la lesión y el objetivo es detener la hemorragia. En esta fase, el cuerpo activa su sistema de reparación de emergencia, el sistema de coagulación de la sangre, y forma una especie de dique para bloquear el drenaje del fluido sanguíneo. Durante este proceso, las plaquetas entran en contacto con el colágeno, lo que da como resultado la activación y la agregación. Una enzima llamada 'trombina' se encuentra en el centro, e inicia la formación de una malla de fibrina, fortaleciendo los grupos de plaquetas para formar un coágulo estable [30].

1.5.1.2 Inflamatoria

Si la Fase 1 trata principalmente de la coagulación, la segunda fase, llamada fase de inflamación o defensiva, se enfoca en destruir bacterias y eliminar residuos, esencialmente preparando el lecho de la herida para el crecimiento de tejido nuevo. Durante la Fase 2, un tipo de glóbulos blancos llamados neutrófilos ingresan a la herida para destruir las bacterias y eliminar los agentes nocivos. Estas células a menudo alcanzan su población máxima entre 24 y 48 horas después de producida la lesión, reduciéndose en gran medida en número a los tres días. A medida que los glóbulos blancos desaparecen, unas células específicas llamadas macrófagos

llegan para continuar limpiando los agentes nocivos. Estas células también secretan factores de crecimiento y proteínas que atraen células del sistema inmune a la herida para facilitar la reparación tisular. Esta fase a menudo dura de cuatro a seis días y puede presentarse edema, eritema (enrojecimiento de la piel), calor y dolor [31].

1.5.1.3 Proliferativa

Una vez que se limpia la herida, se ingresa en la Fase 3, la proliferación, donde el objetivo es regenerar el tejido y cubrir la herida. La fase de proliferación presenta tres etapas distintas: 1) regenerar el tejido de la herida; 2) contraer los márgenes de la herida; y 3) cubrir la herida (epitelización). Durante la primera etapa, el tejido de granulación de color rojo intenso y brillante llena el lecho de la herida de tejido conjuntivo y se forman nuevos vasos sanguíneos. Durante la contracción, los márgenes de la herida se contraen y tiran hacia el centro de la herida. En la tercera etapa, las células epiteliales surgen del lecho o los márgenes de la herida y comienzan a migrar saltando a través del lecho de la herida hasta que la herida se cubre con epitelio. La fase de proliferación suele durar de cuatro a 12 días [30-31].

1.5.1.4 Remodelación

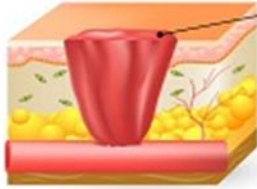
La maduración y remodelación inicia en la fase fibroblásticas, proceso que se da en el día 14 y dura hasta 6 meses o un año donde se logra cicatrizar completa. Este proceso es marcado por la reorganización del colágeno, es decir, el colágeno es degradado por las metaloproteinasas de la matriz dando como resultado la lisis y síntesis del colágeno. Siendo así que el reordenamiento de la matriz extracelular va en relación a la síntesis de colágeno, por lo que encontraremos una cicatriz con abundantes fibras en colágeno y carente de células [31].

Para comprender la fuerza de tensión y la integridad mecánica de la herida debemos hablar de los depósitos de colágeno en el sitio de la herida, teniendo en cuenta que la fibronectina y el colágeno tipo III es el sustento de la misma, que al interactuar con los glicosaminoglicanos y proteoglicanos darán como resultado una matriz

extracelular rica en colágeno del tipo I. La remodelación continuara por varias meses más aproximadamente de 6 a 12 meses posterior a la injuria [31].

Etapas de la Cicatrización

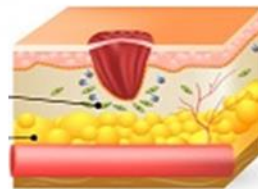
Hemostasia - Coagulación



Inflamatoria



Proliferación - Migración



Remodelación

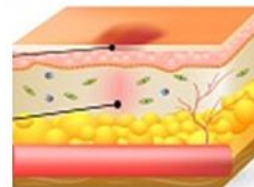


Figura 5. Representación esquemática de las fases de la cicatrización (Wound Healing photos 2017).

1.6 Regeneración de tejido por electrohilado (andamios)

La medicina regenerativa o ingeniería de tejidos, es la rama de la bioingeniería que combina otras áreas para mejorar, restaurar, reemplazar o imitar funciones de tejidos biológicos usando conceptos de biología celular, microbiología y ciencia de

materiales para diseñar y fabricar sustitutos biológicos del cuerpo humano como órganos y tejidos [32].

El uso de estructuras micrométricas para la fabricación de “andamios” o matrices extracelulares, permite el crecimiento celular a través de materiales no tóxicos, biocompatibles y biodegradables que asemejan funciones del tejido original teniendo en cuenta los requerimientos necesarios como oxígeno, temperatura, pH, presión osmótica, nutrientes y antibióticos, garantizando el crecimiento, supervivencia y funcionalidad. Por lo que se opta por una matriz altamente porosa hecha de fibras entrecruzadas que permiten la infiltración de nutrientes y biomoléculas, que facilitan la migración y adhesión celular a comparación de una superficie lisa, como la de los materiales que actualmente se emplean [32].

1.7 Pruebas de biocompatibilidad

El concepto de biocompatibilidad se refiere a la interacción entre los tejidos y los sistemas fisiológicos del paciente que está siendo tratado con un dispositivo médico. La evaluación de biocompatibilidad es parte de la evaluación de seguridad general de un dispositivo.

La biocompatibilidad de los dispositivos médicos se está investigando utilizando química analítica, pruebas in vitro y animales. La biocompatibilidad de un dispositivo que depende principalmente de los siguientes factores:

- Estructura química y física de los materiales componentes.
- Tipos de tejido del paciente a exponer al dispositivo.
- Tiempo de exposición a este dispositivo.

La evaluación de biocompatibilidad de un dispositivo médico se realiza realmente para garantizar la seguridad del paciente. Al programar una prueba de biocompatibilidad, los fabricantes deben considerar sus objetivos y riesgos de cumplimiento. De hecho, evaluar la biocompatibilidad de un dispositivo médico es un estudio de evaluación de riesgos. Todos los dispositivos médicos tienen algún

grado de riesgo. Las compañías que diseñan dispositivos médicos están tratando de maximizar los beneficios que brindan a los pacientes mientras minimizan estos riesgos.

El principal estándar en pruebas de biocompatibilidad es el estándar ISO 10993. Esta norma ha sido publicada en nuestro país por el Instituto de Estándares Turco (TSE) con el siguiente título: TS EN ISO 10993 Evaluación biológica de dispositivos médicos. La primera parte de este estándar es la guía de selección de prueba.

1.8 Membranas poliméricas que se emplean en la actualidad

En búsqueda de nuevas alternativas el empleo de membranas ha sido de gran importancia debido a la versatilidad con la que cuentan, para el cuidado y tratamiento de pacientes con enfermedades o traumas, se ha optado por la bioingeniería o ingeniería de sistemas biológicos. Un ejemplo de ello es el uso de membranas obtenidas por ingeniería y con fin medico como en la reconstrucción de láminas vasculares combinadas con matrices electro-dispersión (electrospun), mismas que funcionan como sustitutos de matrices en la reconstrucción de vasos sanguíneos, válvulas cardiacas y similares, haciendo que los vasos se vuelvan a endotelizar gracias al lumen de los andamios vasculares, aportados por los biomateriales [3]

La matriz extracelular representa una red tridimensional que engloba todos los órganos, tejidos y células del organismo, debido a que constituye un filtro biofísico de protección, nutrición e inervación celular, el terreno para la respuesta inmune, angiogénesis, fibrosis y regeneración tisular.

Lo estudios para comprender y sustituir algunos sistemas naturales, nos han llevado a desarrollar diversos trabajos de investigación como la creación de nanofibras derivadas del ácido hialurónico para la reconstrucción de cartílago, en este proceso se hicieron es investigaciones de esté en las articulaciones que cuentan con capsula sinovial, como ya se comentó el ácido hialurónico es un componente fundamental de la matriz cartilaginosa y del líquido sinovial. Por lo que se crearon fibras por hilado

que actúan directamente en la capsula articular como lubricante viscoso en movimientos lentos y en movimientos rápidos como amortiguador evitando traumas o micro traumas por el impacto que tiene la articulación, este tipo de tratamientos son empleados en pacientes que tienen enfermedades crónico degenerativas en donde el desgaste de la cámara articular por pérdida progresiva de cartílago articular como es el caso de la Osteoporosis [33].

Dentro de los usos que se relacionan con este trabajo, se encuentran el empleo de injertos modificados a partir de tejidos vivos con potencial para desarrollar folículos modificados a partir de estructuras multicapa parecidos a la piel de una alfombra formada por nanofibras alternas en las que se incrustan multicapas de fibroblastos, para posteriormente cultivarlos y diferenciarlos en queratinocitos y células propias de la papila dérmica, esta técnica ayuda a crear un injerto de piel, el cual contiene capas dérmicas y epidérmicas generando un entorno biomimético para promover la curación y el crecimiento del folículo piloso [34]. Así mismo la creación de armazones porosos, fibrosos con forma tridimensional por técnicas de electrohilado para la regeneración de tejido, donde se emplean estructuras biomiméticas establecidas usando electro-hilado (electrospinning). El principio de este trabajo se basa en el empleo de un armazón poroso, que actúa en la regeneración tisular del tejido haciendo que el área superficial propicie un adhesión celular que favorecerá el crecimiento y regeneración del tejido [35].

Otro trabajo relacionado con este estudio es en el que emplearon andamios sintéticos que forman un armazón sintético en órganos o tejido sólidos y/o huecos. Proponiendo métodos que implican ensamblar un armazón sintético partiendo de un primer material como componente estructural y un segundo material como componente estructural que atribuya a un camino de perfusión, imitando un andamio natural o varias características de un andamio natural [36].

1.8.1 Polímeros Biodegradables

Los polímeros biodegradables pueden ser de origen natural como los polihidroxi-alcanoatos, los polisacáridos (celulosa, almidón, quitina) o pueden ser sintéticos

como el ácido poliláctico, (PLA), el ácido poliglicólico, la policaprolactona, el alcohol polivinílico (PVA), entre otros. Las principales aplicaciones de los polímeros biodegradables están orientadas hacia la producción de empaques, suturas, mini-implantes bioabsorbibles, como tornillos y stents [37], la liberación controlada de fármacos y la ingeniería de tejidos.

Desde hace algún tiempo se encontró que las matrices poliméricas podían estimular la regeneración de tejidos con tamaños y formas definidas, este hallazgo llevó, por ejemplo, al desarrollo de injertos vasculares obtenidos a partir de células endoteliales y politetrafluoroetileno expandido, cartílago fabricado de condrocitos y ácidos poliláctico y poliglicólico, aplicaciones para hígado a partir de hepatocitos y ácido poliglicólico, y tubos intestinales de ácido poliglicólico y enterocitos [38].

1.8.1.1 Ácido Poliláctico (PLA)

El ácido poliláctico es producido a partir del ácido láctico, un producto natural, obtenido por fermentación de fuentes renovables. El ácido láctico es un compuesto quiral. La polimerización del ácido láctico se puede controlar para obtener diferentes pesos moleculares y diferentes grados de cristalinidad mediante una selección apropiada de los parámetros de reacción como temperatura, presión, tiempo de reacción y selección del catalizador. A su vez, el grado de cristalinidad y las propiedades físicas y mecánicas del producto dependen del peso molecular y del isómero escogido para realizar la polimerización. Mientras el PLA y el PDLA son semi-cristalinos el PDLLA es amorfo.

El PLA es biodegradable, posee propiedades tensoactivas excelentes y es biocompatible además tiene una gran cantidad de aplicaciones industriales, así como en el campo biomédico. Este ácido tiene muchas características equivalentes e incluso mejores que muchos plásticos derivados del petróleo, lo que hace que sea eficaz para una gran variedad de usos. En la Figura 6 se muestra la molécula del Ácido Poliláctico.

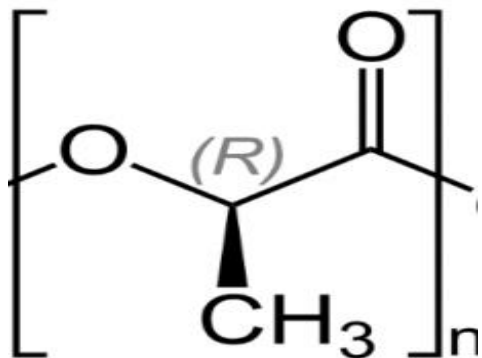


Figura 6. Ácido Poliláctico (PLA).

1.8.1.2 Alcohol Polivinílico (PVA)

La materia prima utilizada en la fabricación del alcohol Polivinílico es un monómero de acetato de vinilo. El PVA es un polímero hidrosoluble, útil en trastornos oculares que presentan deficiente flujo lagrimal. Contiene diferentes residuos de grupos acetatos, lo cual explica su viscosidad. Esta característica fisicoquímica da lugar a la formación de una capa protectora precorneal, posiblemente por arrastrar y extender el agua sobre la superficie ocular mediante el parpadeo. Estas propiedades pueden justificar que este agente sea incorporado a preparaciones oftálmicas para prolongar el tiempo de contacto de la superficie ocular con diversos medicamentos.

El PVA y sus copolímeros se han usado en medicamentos de liberación controlada. A pesar de su alto contenido de agua los hidrogeles de PVA son útiles tanto para fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos. También se ha utilizado para la liberación de polipéptidos, para liberación de teofilina, y últimamente en microesferas cargadas con sulfato de bario y metil-iotalamato como marcadores de embolización endovascular. En la Figura 7 se muestra la molécula del Alcohol Polivinílico (PVA).

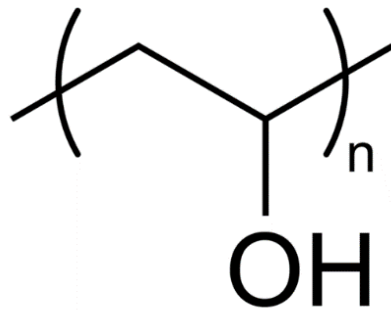


Figura 7. Alcohol Polivinílico (PVA).

CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Preparación de soluciones poliméricas

Para el procesamiento de membranas de PLA/PVA se siguió la metodología descrita en base a trabajos previos [3-6], se sabe que el Ácido Poliláctico (PLA) tiene una buena solubilidad en cloroformo y el Alcohol Polivinílico (PVA) en una solución agua-etanol en un porcentaje en peso de 1:3, respectivamente. Este porcentaje en peso es el apropiado para inyectar mediante el electrohilado las disoluciones poliméricas.

Para la disolución de polímeros (PVA/PLA) se usó una proporción en peso 1:3.

Obteniendo como resultado una solución de PLA al 8% en (p/v) y PVA al 24% en (p/v) basados en la siguiente formula:

Concentración en masa:

$$\% \frac{Masa}{Volumen} = \frac{masa\ del\ soluto(gr)}{volumen\ de\ disolución(mL)} * 100$$

2.1.1 Solución del Ácido Poliláctico - PLA

El polímero utilizado es PLA Fig.8 1.75m, incoloro de la marca 3D Printer Filament Gold Award.

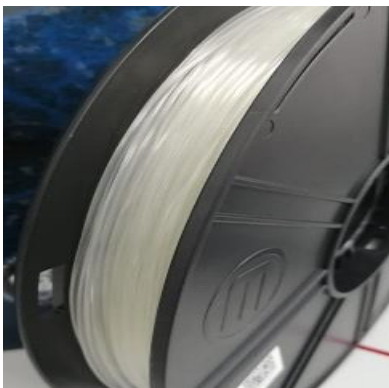


Figura 8. Polímero Ácido Poliláctico (PLA).

Utilizando la fórmula para p/v:

$$PLA = 8\% \frac{p}{v} = \frac{(8)(10ml)}{100ml} = .8gr \text{ de PLA}$$

Para hacer las soluciones se calentaron los polímeros teniendo presente el principio de disolución, viscosidad y homogeneidad para el sistema de inyección del equipo de electrohilado [3].

Preparación de la solución del PLA para el uso en el sistema de inyección del equipo de electrohilado:

1.- Se pesaron 0.8 gr de PLA y se cortó en fracciones pequeñas para colocarlos en un matraz Erlenmeyer de 50 mL.

2.- En el matraz se colocó:

- ✚ 10 mL de Cloroformo al 99.8% de pureza
- ✚ 0.8 gr de PLA
- ✚ Un agitador magnético

Además de que el matraz se coloca en una parrilla con agitación magnética.

3.- Para evitar que el cloroformo se volatilice se le coloca papel aluminio a la boca del matraz como medida de sellado.

4.- El matraz se coloca en la parrilla con agitación magnética a una temperatura de 85°C subiendo esta gradualmente y una agitación constante, durante 35 minutos como se muestra en la figura 12.

Una vez transcurrido este tiempo se deja enfriar para después utilizarla en el sistema de inyección del electrohilado.

2.1.2 Solución de PVA

El polímero utilizado es alcohol polivinílico Figura 9., 1.7mm, con una apariencia opaca de la marca Color Plus Premium Quality.

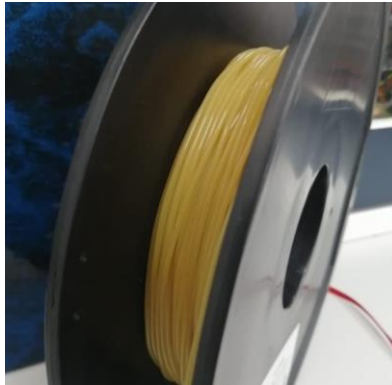


Figura 9. Polímero Alcohol Polivinílico (PVA).

Utilizando la fórmula para p/v:

$$PVA = 24\% \frac{p}{v} = \frac{(24)(10ml)}{100ml} = 2.4 \text{ gr de PVA}$$

Preparación de la solución de PVA para el uso en el sistema de inyección del equipo de electrohilado:

1.- Se pesaron 2.4 gr de PVA y se cortó en fracciones pequeñas para colocarlos en un matraz Erlenmeyer.

2.- En el matraz se colocó:

- ✚ Solución 6:4 (6 ml de etanol con 99% de pureza y 4 ml de agua destilada) para hacer un volumen total de 10 mL.
- ✚ 2.4 gr de PVA
- ✚ Un agitador magnético

Además de que el matraz se coloca en una parrilla con agitación magnética.

3.- Para evitar que el etanol se volatilice se le coloca papel aluminio a la boca del matraz como medida de sellado.

4.- El matraz se coloca en la parrilla con agitación magnética a una temperatura de 120°C subiendo esta gradualmente y una agitación constante, durante 45 minutos como se muestra en la figura 10.

Una vez transcurrido este tiempo se deja enfriar para después utilizarla en el sistema de inyección del electrohilado.

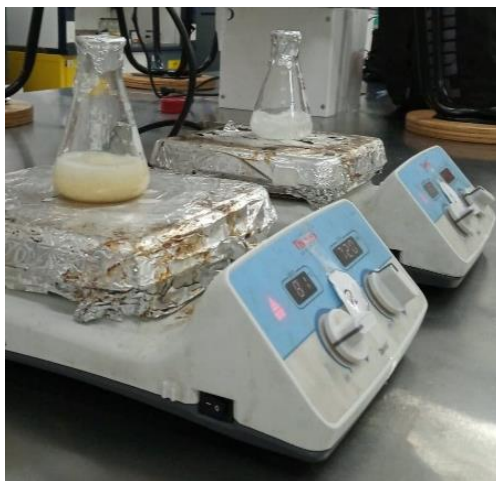


Figura 10. Fotografía que muestra las soluciones de PVA y PLA.

2.2 Obtención de membranas PVA/PLA en el equipo de electrohilado

Para la elaboración de membranas poliméricas nos basamos en el principio del electrohilado, mismo que se basa en la elongación de un fluido, ocasionado por un gradiente de potencial, entre el fluido (carga positiva) y el colector (carga negativa).

Este proceso inicia cuando hay una ruptura de la tensión superficial del fluido por la carga eléctrica, lo que da como resultado la formación del cono de Taylor ver figura 11, lo que induce la formación de fibras y su depósito al colector.

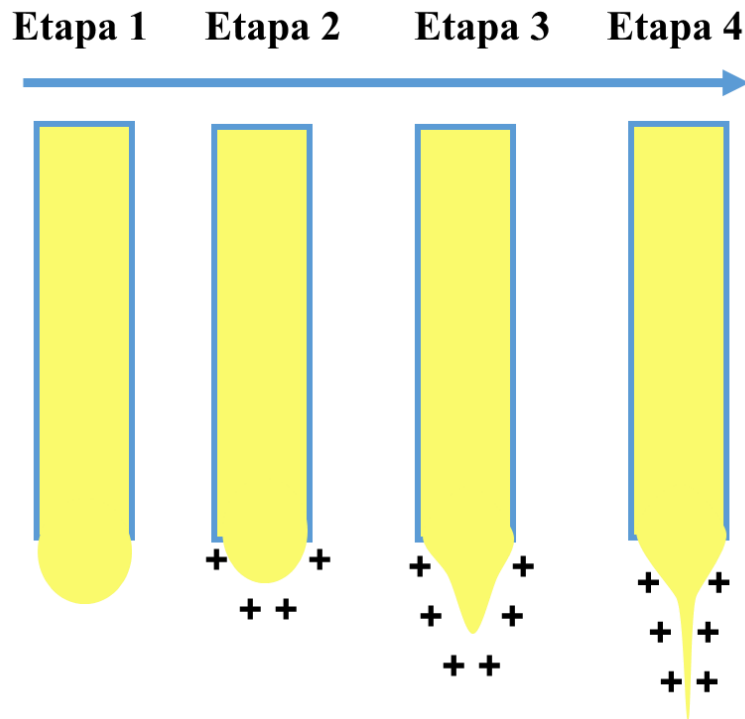


Figura 11. Representación de las etapas de la formación del cono de Taylor en un equipo de electrohilado.

Al iniciar el proceso de electrohilado y tener la formación del cono de Taylor, se procede a la estabilización y deposición de las membranas poliméricas como se muestra en la Figura 12, tomando en cuenta los siguientes parámetros experimentales empleados en la técnica de electrohilado:

- ✚ Alto voltaje de la fuente de alimentación de 16kV.
- ✚ Distancia entre ajuga de inyección de la solución polimérica y colector de 10cm o 7.5cm.
- ✚ Velocidad de inyección manual y automática.

- ✚ Tiempo de hilado: 30 a 40 minutos.
- ✚ Colector tipo cilindro con recubrimiento de papel encerado como material de soporte.

Es importante mencionar que la variación de los parámetros de control escritos anteriormente, implica un cambio de morfología en la membrana polimérica.



Figura 12. Equipo de Electrohilado: Proceso de hilado de membrana.

2.2.1 Tipos de inyección

En el equipo de electrohilado se pueden manejar tres tipos de inyección: inyección simple, doble inyección e inyección coaxial. En el presente trabajo se utilizaron dos tipos: inyección simple e inyección doble.

En la Tabla 3 se describen los tres tipos de inyección en el equipo de electrohilado también se muestra su representación mediante una imagen. Los parámetros que se deben cuidar durante el proceso de hilado en cualquier tipo de inyección son los siguientes:

- Voltaje PLA: 16 kV al 8% (p/v).
- Voltaje PVA: 20 a 25 kV al 24% (p/v).

- Distancia entre aguja y colector: 10 cm a 7.5 cm.
- Inyección: Manual o Automático.
- Tiempo de Hilado: 40 min.
- Colector tipo rodillo con papel encerado como material de soporte.

Tabla 3. Tipos de Inyección: Inyección simple, doble y coaxial.

<i>Tipo de Inyección</i>	<i>Descripción</i>
Inyección Simple	En este tipo de inyección lo que se puede obtener es una membrana única de solución polimérica. Los parámetros que varían son el voltaje aplicado, dependiendo de la solución que se inyecta.
Inyección Doble	Una doble inyección es una forma por la cual se obtiene una membrana de dos soluciones poliméricas sin tener que mezclar estas soluciones en una.
Inyección Coaxial	La inyección coaxial, tiene la capacidad de crear membranas con más de un polímero en su morfología, ya que la inyección se hace mediante una misma aguja, mezclándose las soluciones poliméricas.

2.3 Sistema de control automático de inyección para un equipo de electrohilado por manufactura aditiva

El sistema está dividido en dos partes: el control y la inyección del polímero. El control: La parte de control se hace a través del software LabVIEW 2018, en el cual se creó una herramienta virtual para controlar:

- ✚ El movimiento de dos motores a pasos
- ✚ Dirección en sentido a las manecillas del reloj para la inyección de la solución polimérica.
- ✚ Tiempo entre pasos: 3 s, 3.5 s, 2 s, 2.5 s, 1 s.

✚ Ángulo de giro de cada paso: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16.

Ya con el programa realizado, usando una tarjeta de adquisición de datos, las señales generadas en el programa se envían a los motores para inicial la parte de inyección de la solución polimérica es importante mencionar que este sistema de control automático solo se utiliza para el método de inyección simple.

El prototipo de inyección se conforma de dos motores NEMA 17, cada uno con un tornillo sinfín sujeto al rotor. Los motores se fijan paralelamente y los rotores se unen a una pieza que sirve como eje el cual funciona para empujar el émbolo de la jeringa. Adicionalmente se tienen bases con rodamientos para alinear los motores y sostener los tornillos sinfín, además de una base para asegurar el cilindro de la aguja como se muestra en la Figura 13.

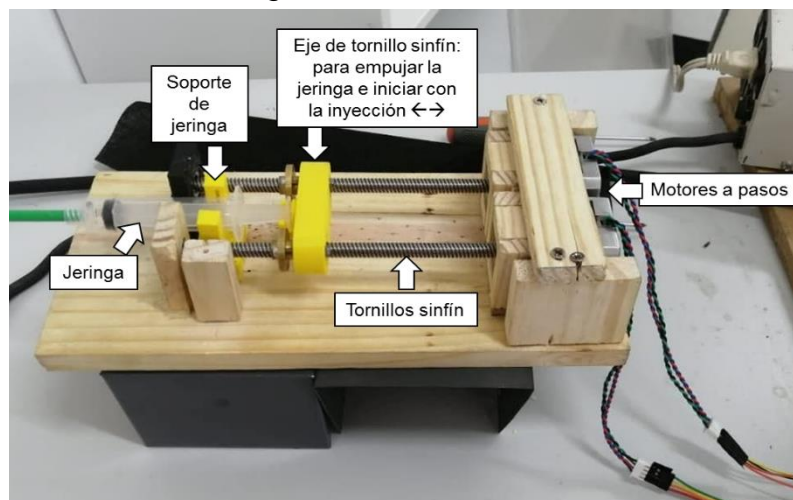


Figura 13. Sistema de control automático de inyección para un equipo de electrohilado.

2.4. Técnicas de Caracterización

Las técnicas de caracterización juegan un papel importante en los procesos de materiales. Junto con la necesidad de crear y fabricar nuevos materiales, está la necesidad de poder caracterizarlos apropiadamente. Es imposible saber cómo utilizar cualquier tipo de material si no tenemos la capacidad apropiada de poder caracterizarlos con un conjunto de técnicas. Esto se debe a que comúnmente la composición superficial de un material no es la misma a su interior. Hay técnicas

que dan información más del interior y otras que solo son superficiales. También, podemos tener técnicas que permiten estudiar composición y morfología.

Las técnicas utilizadas en este trabajo son: Reología, Microscopia electrónica de barrido (SEM) y Análisis Termo-gravimétrico (TGA).

2.4.1 Reología

Reología es la ciencia que estudia la deformación y flujo de un cuerpo sometido a esfuerzos, de acuerdo con la teoría básica de mecánica de los fluidos, los fluidos son deformados por esfuerzos cortantes originados por los gradientes de velocidad o tasa de cizalladura [41].

Se puede decir que la Reología se encarga de estudiar la viscosidad, la plasticidad y la elasticidad de los fluidos. Estas propiedades de los fluidos tienen una enorme importancia en una multitud de fenómenos, como la fabricación de pinturas, cosméticos (dentífricos, cremas), productos alimenticios, fármacos, esmaltes, suspensiones, tintas de impresión, detergentes etc.

Un estudio de la Reología que nos importa destacar en este trabajo de investigación es la “Viscosidad” ya que dicha propiedad como bien ha sido mencionado antes variara la morfología y textura de las membranas al ser hiladas por el equipo de electrohilado.

La viscosidad es una medida cuantitativa de la resistencia de un fluido al movimiento. Más concretamente, la viscosidad determina la velocidad de deformación del fluido que se produce cuando se le aplica un esfuerzo cortante dado. La medición se llevó a cabo mediante una técnica de inspección visual como se muestra en la Figura 14.

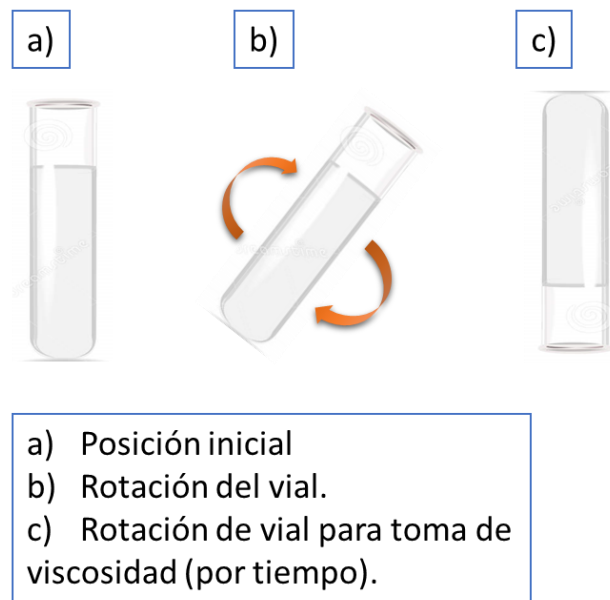


Figura 14. Esquema: Técnica de inspección visual.

2.4.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es uno de los instrumentos más versátiles disponible para el examen y el análisis de la microestructura y morfología (a escalas del orden de micrómetros (10^{-6} m) o inclusive nanómetros (10^{-9} m)) [42]. Los microscopios difieren principalmente en el tipo de haz, la longitud de onda de iluminación, las lentes y el procesamiento de datos de la muestra.

Las principales ventajas del SEM son la resolución, la profundidad del campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras. Para que las muestras puedan ser analizadas sin tener problemas de acumulación de carga en la superficie, es decir, que sean conductoras, de lo contrario la acumulación desvía al haz electrónico y como consecuencia de ello aparecen distorsiones en la imagen.

En esta técnica un haz de electrones (llamados electrones primarios) se hace incidir sobre la muestra de interés con la finalidad de realizar un barrido sobre la superficie

que se desea analizar. El haz que proviene del cañón, con energías desde unos cientos eV hasta unas decenas de KeV, pasa por lentes electromagnéticas (condensadoras y objetivas), y después bajo el control de una bobina de deflexión que se encarga de realizar el barrido sobre la superficie de la muestra.

Cuando el haz de electrones choca contra la muestra, ocurren interacciones entre dichos electrones y los átomos que componen la muestra. En esta interacción varios de los siguientes fenómenos pueden ocurrir: los electrones incidentes pueden ser absorbidos, emitidos, reflejados y/o transmitidos. Este tipo de interacciones pueden ser divididas en: interacciones elásticas e interacciones inelásticas. Las distintas señales que pueden surgir de tal interacción se presentan en la Figura 15.

- ✚ Dispersión Elástica donde existe un cambio de dirección con pérdida insignificante de energía, causada por la interacción del haz con los electrones de los últimos orbitales atómicos parcialmente apantallados, generándose así los electrones retrodispersados. Es más probable que ocurra en materiales con número atómico (Z) elevado y con un haz de baja energía.
- ✚ Dispersión Inelástica que consiste en la pérdida de energía con un cambio insignificante en la dirección, causada por la transferencia de energía del haz primario a los electrones secundarios, electrones de Auger, pares electrón-hueco, electrones transmitidos, rayos x característicos, etc.

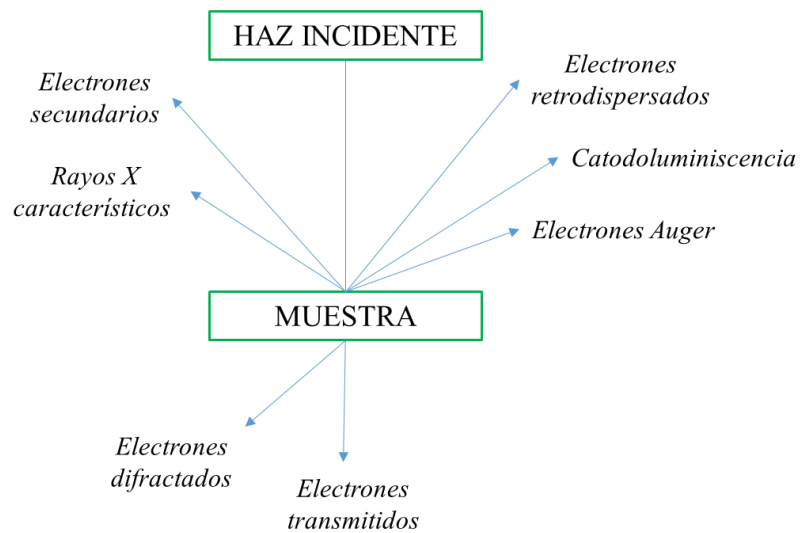


Figura 15. Posibles señales generadas de la interacción de un haz de electrones con la muestra.

2.4.3 Análisis Termogravimétrico (TGA/DSC)

Es una técnica en la cual la masa de una muestra es monitoreada en función de la temperatura o el tiempo. Está sujeto a un programa de temperatura controlada en una atmósfera controlada.

La conformación general del aparato de análisis térmico es:

- ✚ Sensor de medición de propiedades físicas.
- ✚ Una atmósfera controlada.
- ✚ Horno.
- ✚ Un programador de temperatura

Todo esto conectado a una computadora para procesar los datos obtenidos y así realizar la curva. Mide los cambios de peso en relación con los cambios de temperatura. La curva de pérdida de peso medida proporciona información sobre: Cambios en la composición de la muestra, estabilidad térmica, parámetros cinéticos para reacciones químicas en la muestra.

En la Tabla 4 se describe la pérdida y ganancia que se puede llevar a cabo en este tipo de caracterizaciones.

Tabla 4. Pérdida y aumento en peso.

<i>Pérdida en Peso</i>	<i>Aumento en Peso</i>
Descomposición: la ruptura de los enlaces químicos.	Oxidación: interacción de la muestra con un oxidante atmósfera.
Evaporación: La pérdida agentes volátiles con temperatura elevada.	Absorción o adsorción.
Reducción: interacción de la muestra con una atmósfera reductora (Hidrógeno, amoníaco, etc.).	
- Desorción.	

Todos estos son procesos cinéticos (es decir, hay una velocidad a la que ellos ocurren).

¿Qué puede decir el estudio termogravimétrico -TGA?

- ✚ Estabilidad térmica de los materiales: Mecanismo de descomposición explícito, materiales de huellas digitales para identificación y control de calidad.
- ✚ Estabilidad oxidativa de los materiales: oxidación de metales en el aire descomposición oxidativa de sustancias orgánicas en aire/O₂, descomposición térmica en atmósfera inerte.
- ✚ Composición de sistemas multi-componentes: se puede identificar comportamientos suficientemente diferentes en la escala de temperatura y formular un mecanismo de reacción.
- ✚ Vida útil estimada de un producto: relacionada con la estabilidad térmica.
- ✚ Cinética de descomposición de materiales: velocidad de reacción, energía de activación.
- ✚ El efecto de las atmósferas reactivas o corrosivas sobre materiales: estudios de oxidación y corrosión.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

¿Qué mide un DSC?

En DSC se mide la diferencia en el flujo de calor o de potencia compensada. En el primer caso se mide la variación en el flujo de calor entre una muestra y una muestra de referencia inerte esto en función de la temperatura en una atmosfera controlada.

En el segundo caso se mide la potencia que hay que aportar o retirar del sistema para que la muestra y la muestra de referencia se mantenga a la misma temperatura cuando dicha muestra se somete a un programa de temperatura en una atmosfera controlada.

2.5 Prueba de Biocompatibilidad

2.5.1 Prueba de Hemocompatibilidad – Adherencia Plaquetaria

Por medio de plasma rico en plaquetas (PRP) se tomó una muestra sanguínea de una persona sana (el investigador) en tubos impregnados con citrato de sodio, se centrifugó a 1,500rpm por 15 minutos, se separan los glóbulos rojos y plaquetas, obteniendo, el plasma pobre en plaquetas y el plasma rico en plaquetas este se localiza en la zona del tercio medio del plasma como se muestra en la Figura 16.

El PRP se colocó a 300µl en 3 microtubos de la marca Eppendorf con capacidad de 1.5ml en condiciones estériles y en campana de flujo laminar. Posteriormente, se colocó un fragmento del polímero de PLA, PVA y una membrana obtenida por electrohilado de PLA/PVA cada uno en su respectivo microtubo. Se incubó a una temperatura de 37°C por 48 horas; posteriormente se procedió a lavar las muestras con solución salina al 0.9% para eliminar las plaquetas débilmente adheridas.

Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo JEOL JSM-6610LV, con esto se determinó si existe adhesión plaquetaria al material de estudio, al igual valorar si existe agregación plaquetaria.

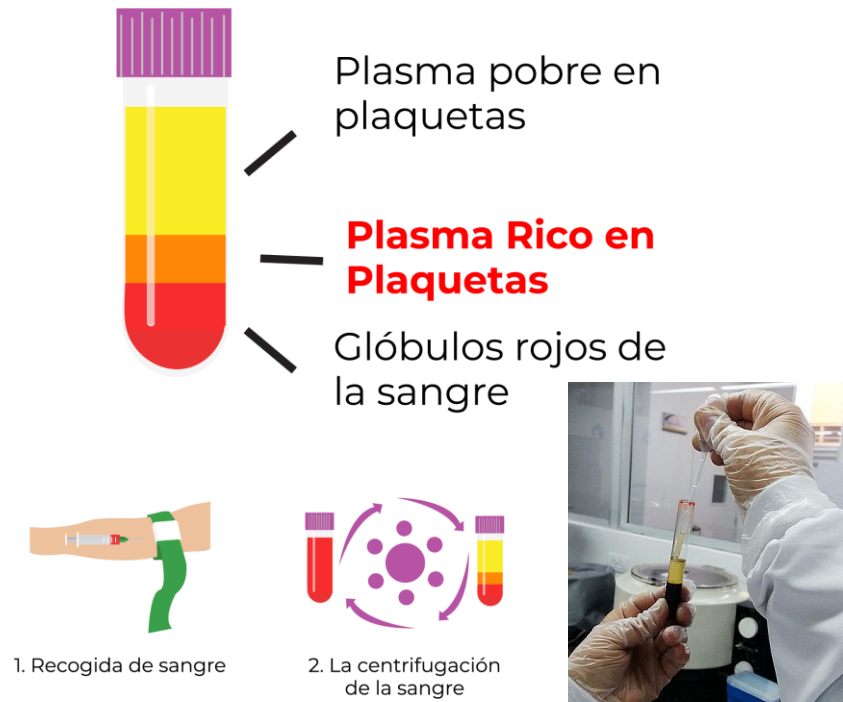


Figura 16. Obtención del Plasmas rico en plaquetas (PRP).

2.5.2 Cultivo de Fibroblastos y ensayo de cicatrización de heridas in vitro.

Preparación del medio

- ✓ Se utiliza medio basal de fibroblastos (ATCC PCS-201-030) el cual se prepara con el kit de crecimiento fibroblástico libre de suero (ATCC PCS-201-040) de la siguiente forma (ATCC, 2018):
- ✓ Todo el procedimiento se lleva a cabo en campana de flujo previamente esterilizado con UV.

- ✓ Se descongela el kit de crecimiento fibroblástico, la L-glutamina se descongela en agua con una temperatura de 37 grados Celsius.
- ✓ Sacar el medio basal de fibroblastos del refrigerador.
- ✓ Descontaminar las superficies del kit y medio basal con etanol al 70%.

Se adiciona el kit al medio basal con los siguientes volúmenes:

Componente	Volumen	Concentración final
<i>L-glutamina</i>	18.75 ml	7.5 mM
<i>Hidrocortisona, hemisuccinato</i>	0.5 ml	1 µg/mL
<i>Suplemento HLL</i>	1.25 ml	HSA 500 µg/mL Ácido linoleico 0.6 µM Lectina 0.6 µg/mL
<i>Rh FGF b</i>	0.5 ml	5 ng/mL
<i>Suplemento Rh EGF/TGF b-1</i>	0.5 ml	5 ng/mL 30 pg/mL
<i>Rh insulina</i>	0.5 ml	5 µg/mL
<i>Ácido ascórbico</i>	0.5 ml	50 µg/mL

(ATCC, 2018)

- ✓ Se adiciona 0.5ml de gentamicina-anfotericina B.
- ✓ El volumen total se divide en 10 tubos Falcon de 50ml y se mantuvo en refrigeración.
- ✓ Para iniciar el cultivo se descongelan las células PCS-201-012 con el siguiente cálculo se siembran 2,500 a 5,000 células por cada cm².
- ✓ Se adicionan 5ml de medio previamente preparado por cada 2 cm² de superficie y se mantienen en incubadora a 37°C con CO₂ del 5% por 30 minutos previamente al adicionar las células.

- ✓ Posteriormente al descongelamiento de las células se transfieren a los recipientes correspondientes, distribuyéndolas de forma homogénea con el medio y se mantienen por 72 horas en incubadora hasta obtener confluencia del 80 al 100%. Posteriormente se realizan pases tripsinizando los frascos.
- ✓ Se tomaron alícuotas de varias muestras de medio con células y se congelan a -60 °C para realizar subcultivos (ATCC, 2018).

Cicatrización in vitro

Para realizar este procedimiento se usará una placa de 2 pozos de cultivo Ibidi® la cual tiene como ventaja que tiene una división de silicón con dimensiones específicas, que se puede remover cuando las células alcanzaron la confluencia deseada, en este caso se proliferarán fibroblastos humanos; se puede realizar el ensayo de cicatrización de herida in vitro, ya que la placa de silicón que se puede retirar y separar, simulando una herida limpia con bordes definidos a diferencia de lo que ocurriría si se realiza el experimento del rasguño que puede llegar afectar el estudio por tener bordes irregulares y patrones de proliferación celular irregular. A continuación, se explicará el proceso de cultivo y el experimento de cicatrización in vitro:

1. Sembrado de células

- ✓ Preparar la suspensión celular como usualmente se realiza. Se recomienda que se centrifugue para retirar células muertas y restos celulares. Ajustar la suspensión celular a una concentración celular de 3×10^5 células/ml para obtener una capa de confluencia celular después de 24 horas.
- ✓ Agregar 70µl de las células suspendidas en cada pozo de la placa. Evitar que se mueva la placa ya que puede tener una distribución celular poco homogénea.
- ✓ Incubar las células a 37°C y 5% CO₂ por lo menos por 24 horas.

2. Formación del espacio

- ✓ Una capa de células confluentes es un prerrequisito para iniciar este ensayo, nuevo medio es agregado después de retirar la placa de 2 pozos. Agregar la membrana de PLA para valorar el efecto en el proceso de la cicatrización contra una placa de control el cual no se le agregará la membrana.
- ✓ Revisar la densidad celular después de 24 horas debajo del microscopio. En el caso de que no exista una confluencia celular después de las 24 horas, colocarlo en la placa de cultivo y nuevamente incubarlo por 12-horas. Revisar la confluencia de forma regular.
- ✓ Con cuidado usando unas pinzas estériles retirar la placa que divide los dos pozos sujetándolo por la esquina.
- ✓ Posteriormente al retiro, verificar que la capa celular siga adherido a la superficie de la placa.
- ✓ Lavar la capa celular con un medio acelular o PBS para la remoción de los restos celulares y las células que no pudieron adherirse.
- ✓ Llenar la placa con un medio acelular con un volumen recomendado de 2ml.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del estudio de las propiedades estructurales y biocompatibles de las membranas PLA/PVA obtenidas por electrohilado, empleando las técnicas de: Microscopia Electrónica de Barrido, Análisis termogravimétrico TGA/DSC. Además de analizar la sensibilidad antimicrobiana y la adherencia plaquetaria que presentan las membranas de PLA/PVA.

3.1 Caracterización: Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

3.1.1 Micrografía de Membranas PLA

La morfología de las membranas producidas se caracterizó mediante análisis SEM con un recubrimiento de oro sobre la superficie de las membranas. Los parámetros que se manejaron en dichas membranas son los que se muestran en la Tabla 5., donde se realizan variaciones en el procesamiento de las membranas con el equipo de electrohilado. El tiempo de electrohilado de cada membrana fue de 20 a 30 minutos aproximadamente.

Tabla 5. Parámetros de inyección membranas PLA.

	Membrana 1	Membrana 2	Membrana 3
Tipo de inyección	Manual	Manual	Inyección automática
Voltaje	16 kV	18 kV	20 kV
Viscosidad	Instantáneo (Medianamente Viscoso)	5 segundos (Viscoso)	12 segundos (Muy Viscoso)
Distancia del colector y aguja	7 cm	9 cm	11 cm

SEM	Fig. 17	Fig. 18	Fig.19
------------	---------	---------	--------

Como resultado, se obtuvieron tres membranas a base de PLA con características diferentes entre sí. En la Figura 17, se observa la primera membrana (Membrana 1) con una estructura entrelazada lo que nos beneficia ya que imita la matriz extracelular de la piel. Además, se presenta una morfología en forma de fibras homogénea con una diversidad de diámetros aproximados de 50.06 μm en un histograma donde se realizó el promedió de estos diámetros.

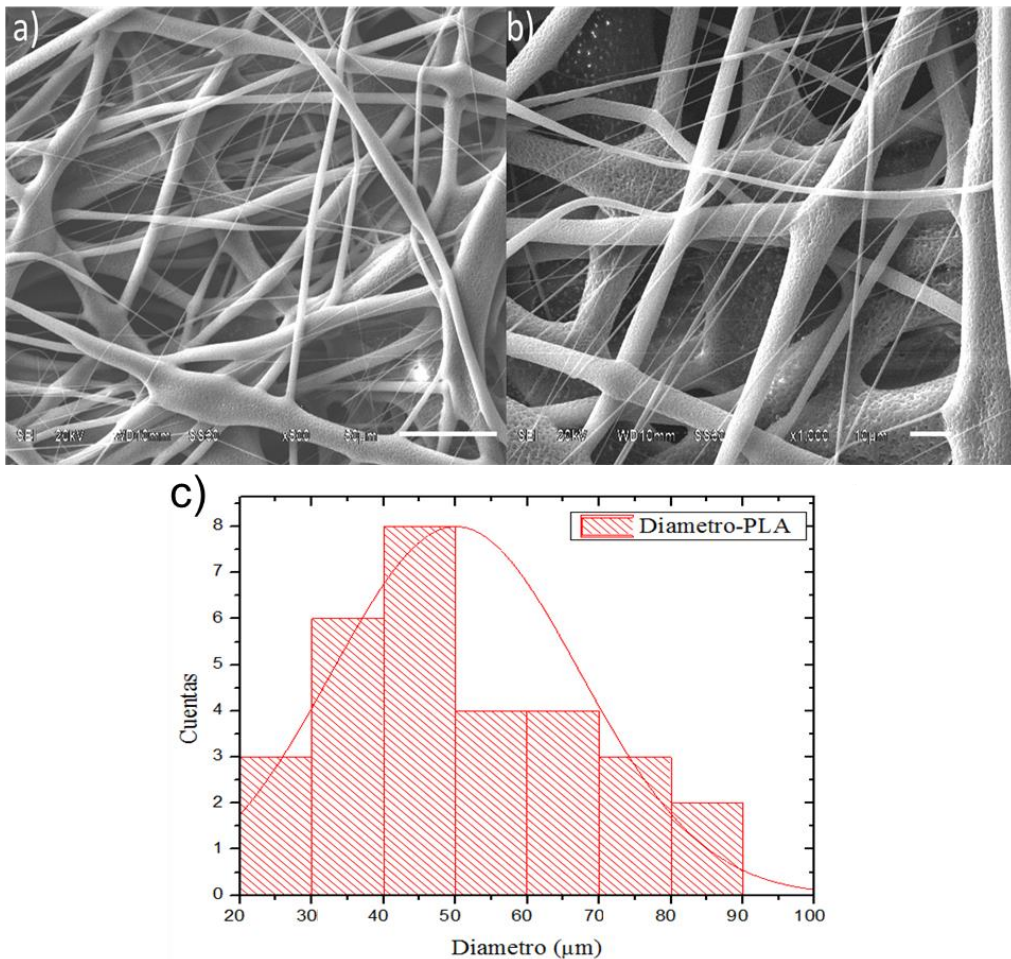


Figura 17. Micrografía de membrana de Ácido poliláctico (PLA), a) obtenida a una escala de 50 μm y 500x, b) obtenida a una escala de 10 μm y 1000x, c) histograma de diámetro promedio de filamento.

La Figura 18, presenta una segunda membrana (Membrana 2) de PLA con otros parámetros como se mostró en la Tabla 5. En esta se observa una morfología homogénea de fibras con un diámetro aproximado de 1.008 μm obtenidos de un histograma. Además se puede observar la depreciación en los diámetros de las fibras con respecto a los de la membrana 1, esto debido a la variación en los parámetros de procesamiento de la membrana.

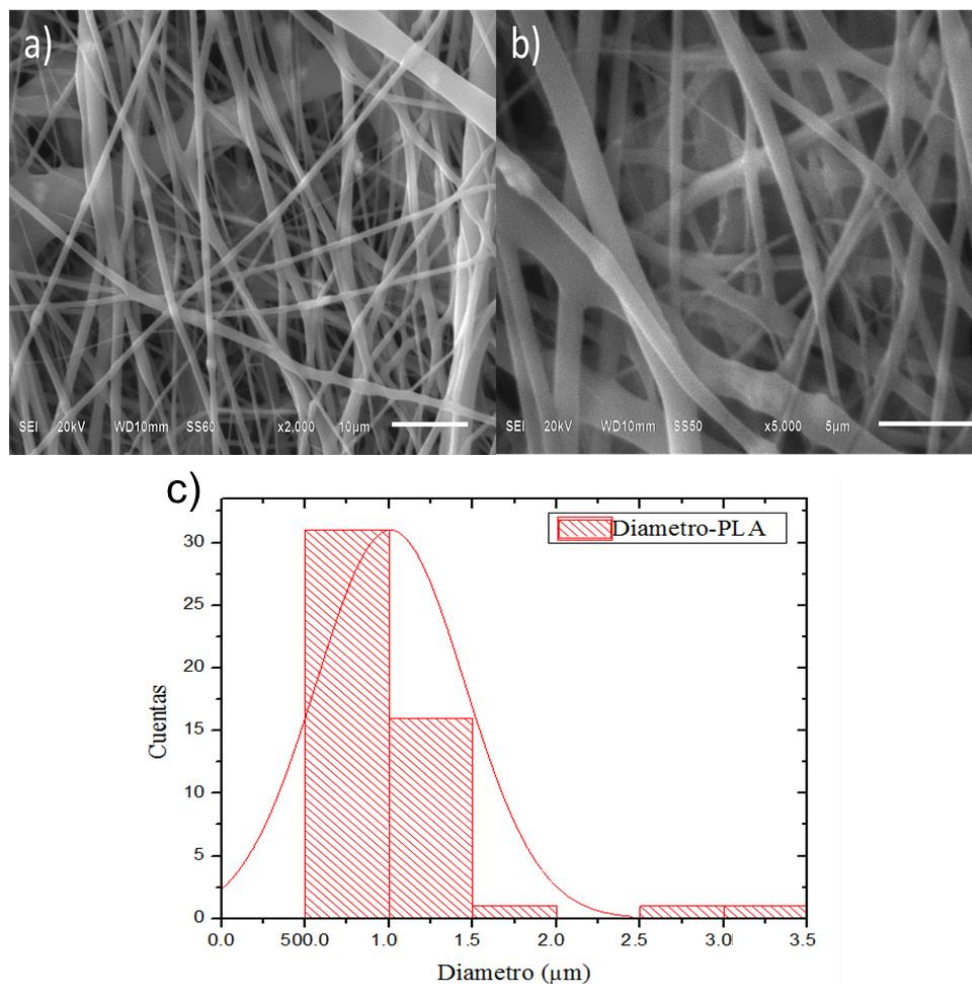


Figura 18. Micrografía de membrana de Ácido poliláctico (PLA) con variación en los parámetros de inyección , a) obtenida a una escala de 10 μm y 2000x, b) obtenida a una escala de 5 μm y 5000x, c) histograma de diámetro promedio de filamento.

En la Figura 19, se observa la tercer membrana (Membrana 3 de la tabla 5) obtenida por electrohilado con un sistema de inyección automático cada uno con sus respectivos histogramas del tamaño de diámetro de fibra. En el inciso a) de esta micrografía se presenta una morfología lineal de las fibras con respecto a la variación de los parámetros mencionados en la Tabla 5, con un diámetro de 10.612 μm . En el inciso b) se puede observar que las fibras tienen una textura porosa con un diámetro de poro de 1.82 μm obtenido de un histograma. Obtener ese tipo de membranas lineales tienen otro tipo de aplicación como fibras textiles con propiedades hidrofóbicas, además de que su obtención no es muy peculiar. El comportamiento típico de este tipo de microfibras es gracias a su porosidad, en la cual se podría funcionalizar su superficie para obtener el *efecto loto*.

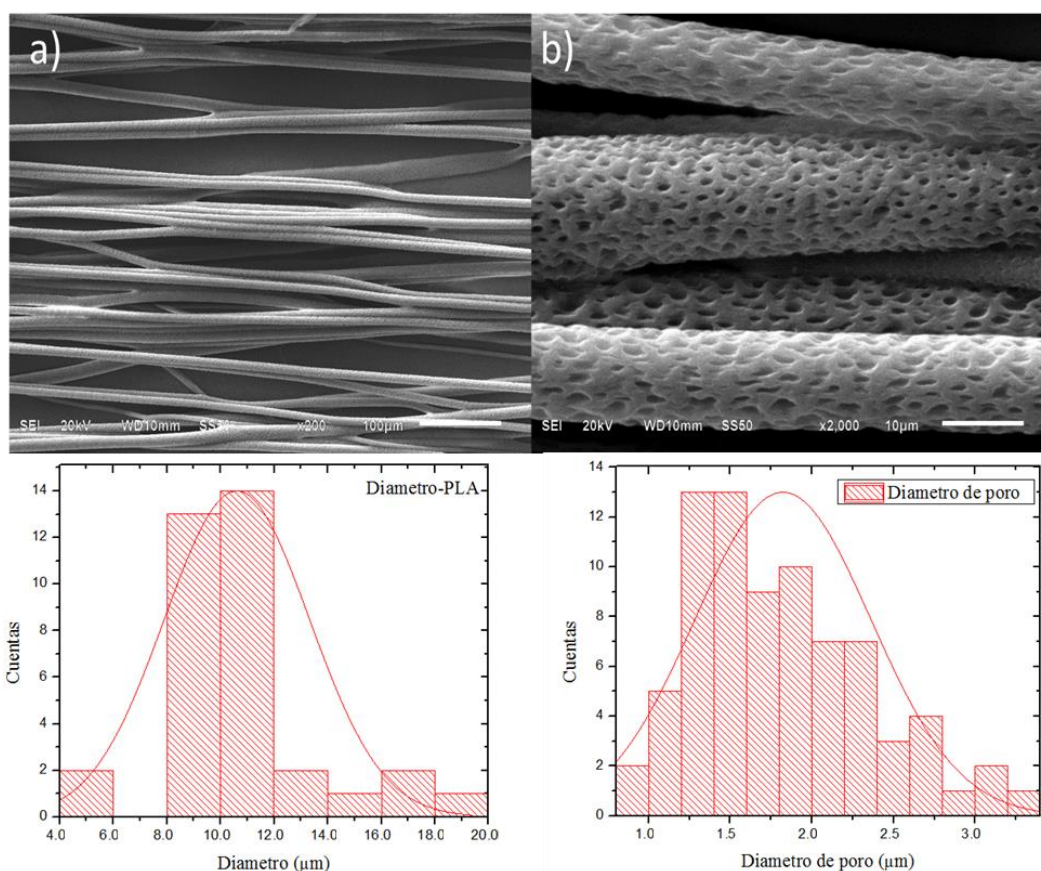


Figura 19. Micrografía de membrana de Ácido poliláctico (PLA) con sistema de inyección automático y sus respectivos histogramas, a) obtenida a una escala de 10 μm y 2000x, b) obtenida a una escala de 5 μm y 5000x.

Los parámetros que mejor presentaron una morfología entrecruzada para obtener las membranas de PLA fueron los de la Membrana 2, la cual imita la morfología de la matriz extracelular. Además de presentar un tamaño micrométrico homogéneo que ayuda a la propagación de los fibroblastos, induciendo la producción de colágeno que es muy importante para darle estabilidad a la matriz extracelular [26].

3.1.2 Micrografía de Membranas PVA

La morfología de las membranas producidas se caracterizó mediante análisis SEM, con un recubrimiento de oro sobre la superficie de las membranas, esto para una mejor caracterización de las muestras. Los parámetros que se manejaron en dichas membranas son los que se muestran en la Tabla 6., donde se realizan variaciones en el procesamiento de las membranas con el equipo de electrohilado. El tiempo de electrohilado de cada membrana fue de 30 a 40 minutos aproximadamente.

Tabla 6. Parámetros de inyección membranas PVA.

	Membrana 1	Membrana 2	Membrana 3
Tipo de inyección	Manual	Doble inyección: manual/automática	Doble inyección: automática/manual
Voltaje	18 kV	20 Kv	22 kV
Viscosidad	Instantáneo (Medianamente Viscoso)	5 segundos (viscosa)	12 segundos (muy viscosa)
Distancia del colector y aguja	7 cm	9 cm	11 cm
SEM	Fig. 20	Fig. 21	Fig. 22

Como resultado, se obtuvieron tres membranas a base de PVA con características diferentes entre sí. Las membranas a base de PVA no presentaron ningún tipo de textura, en comparación con las membranas de PLA antes mencionadas.

En la Figura 20. Se observa la primera membrana con una morfología heterogénea y al azar, lo que nos ayuda a representar la matriz extracelular de la piel, donde sus fibras no están orientadas y presentan una buena distribución de estas. Además de que las fibras presentan diámetros aproximados de $0.688 \mu\text{m}$ obtenidos de un histograma.

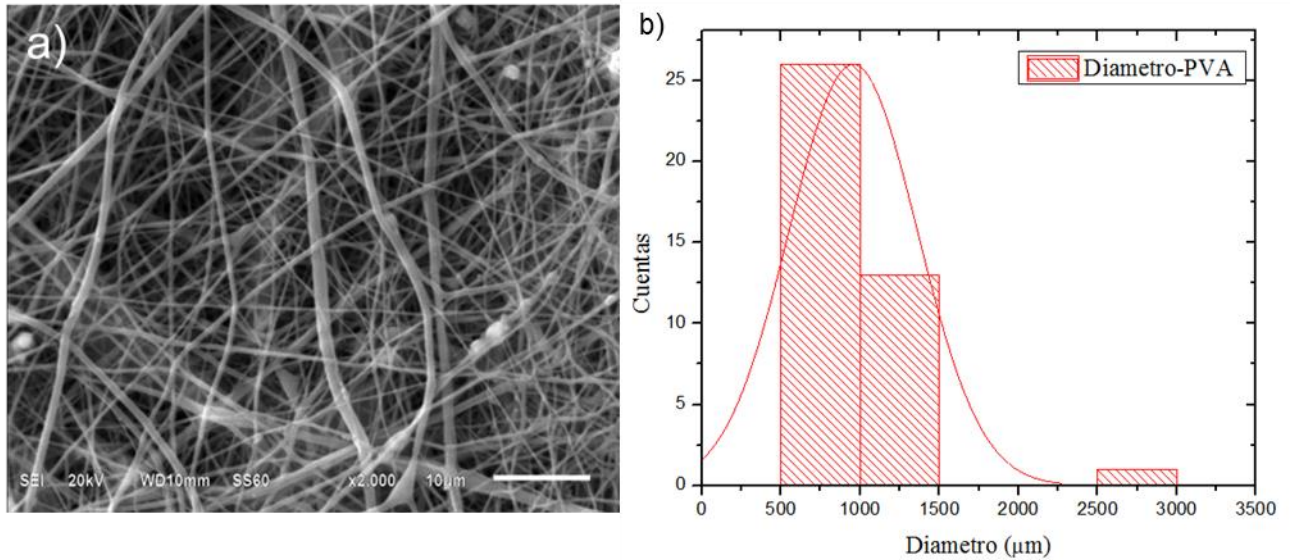


Figura 20. Micrografía de membrana de Alcohol Polivinílico (PVA) con sistema de inyección simple y manual, a) obtenidas a una escala de $10 \mu\text{m}$ y $2000x$, b) histograma de diámetro promedio de filamento.

En la Figura 21, se presenta la segunda membrana, observando claramente una falta de control de diámetros de las fibras. En el inciso a) se puede observar algunas fibras orientadas se realizó la medición de diámetros de todas las fibras obteniendo un promedio de fibra de $7.743 \mu\text{m}$ para la formación de la membrana, además de no presentar una morfología entre cruzada. En el inciso b) se puede observar unas fibras más finas estas con un diámetro de $0.635 \mu\text{m}$. Concluyendo que los parámetros utilizados al realizar esta membrana no fueron los mejores para el proceso de electrohilado ya que no hace una homogeneidad del diámetro y morfología de la membrana.

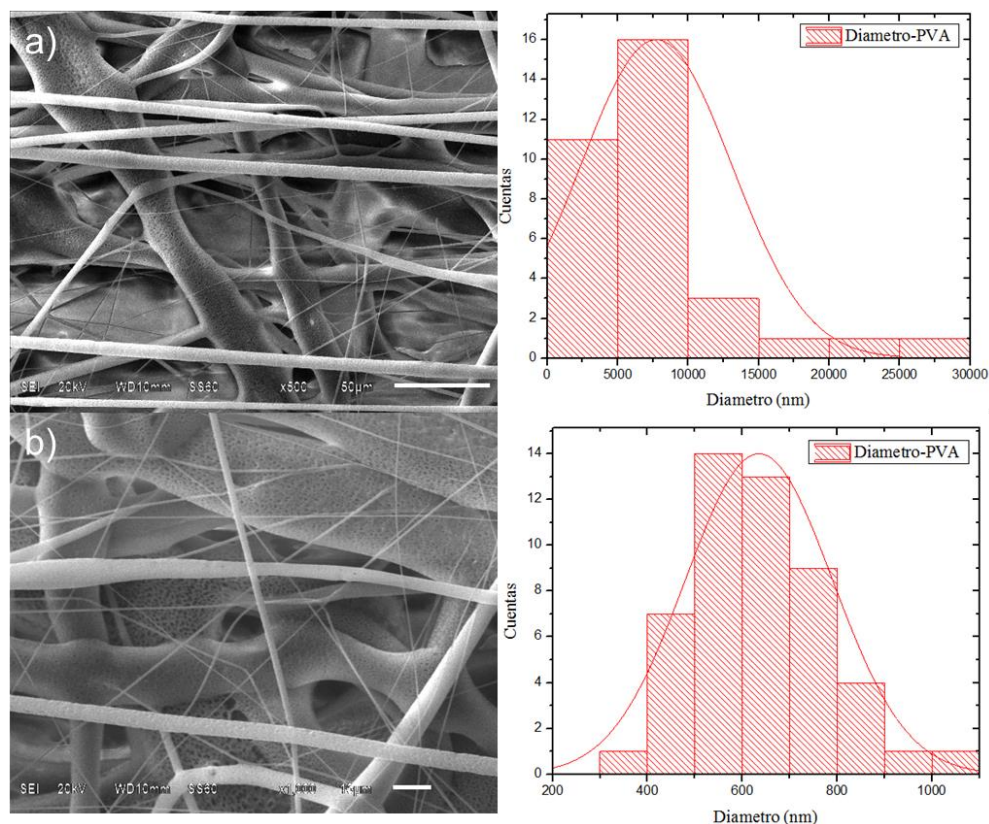


Figura 21. Micrografía de membrana de Alcohol Polivinílico (PVA) con sistema de inyección manual-automática, a) obtenida a una escala de $50 \mu\text{m}$ y $500x$, b) obtenida a una escala de $10 \mu\text{m}$ y $1000x$.

En la Figura 22, se puede observar algunas fibras orientadas de PVA con una estructura cilíndrica homogénea y un diámetro de 5.803 μm obtenidos de un histograma, detrás de ellas se encuentran otras fibras que tienen una distribución entrecruzada y no presenta una estructura cilíndrica homogénea. Esto se debe a que el procesamiento de electrohilado se realizó con una doble inyección: una manual y otra automática, presentando este tipo de variaciones al crear la membrana; ya que al hacer la inyección manual no hay control sobre la cantidad de solución polimérica inyectada y eso genera una variación en el tamaño de la fibra. La inyección automática como se observa claramente tiene una distribución homogénea en la cantidad de solución polimérica que es inyectada.

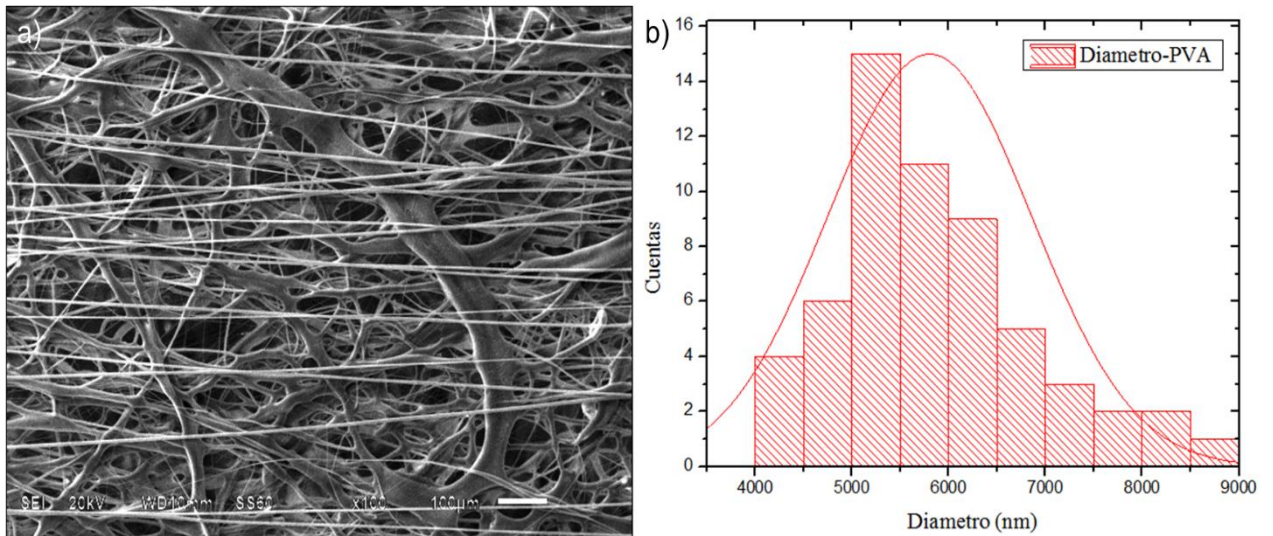


Figura 22. Micrografía de membrana de Alcohol polivinílico (PVA) con sistema de inyección manual-automática, a) obtenida a una escala de 50 μm y 500x, b) histograma de diámetros promedio del filamento.

Los mejores parámetros para la obtención de la membrana PVA fueron con una inyección manual con la finalidad de imitar la matriz extracelular; un voltaje de 18 kV, una solución polimérica medianamente viscosa, a una distancia de 7cm entre el colector y la aguja de inyección presentados en la Tabla 6. Membrana 1.

3.1.3 Micrografía de Membranas PVA/PLA

La morfología de las membranas producidas se caracterizó mediante análisis SEM, con un recubrimiento de oro sobre la superficie de las membranas PVA/PLA. Para realizar estas membranas se tomaron en cuenta todas las consideraciones de las membranas realizadas anteriormente por separado, esto para ir descartando variaciones de viscosidad (medianamente viscosa y muy viscosa) y morfología lineal. En el caso de la solución polimérica PLA/PVA muy viscosa al inyectarlo con el sistema automático de control se obtenían aglomerados del polímero PLA/PVA impidiendo el hilado como se muestra en la Figura 23 inciso a). Mientras que en el caso de una solución PLA/PVA medianamente viscosa se generan las fibras lineales de PLA con aglomerados de la solución polimérica de PVA como se muestra en la Figura 23 inciso b).

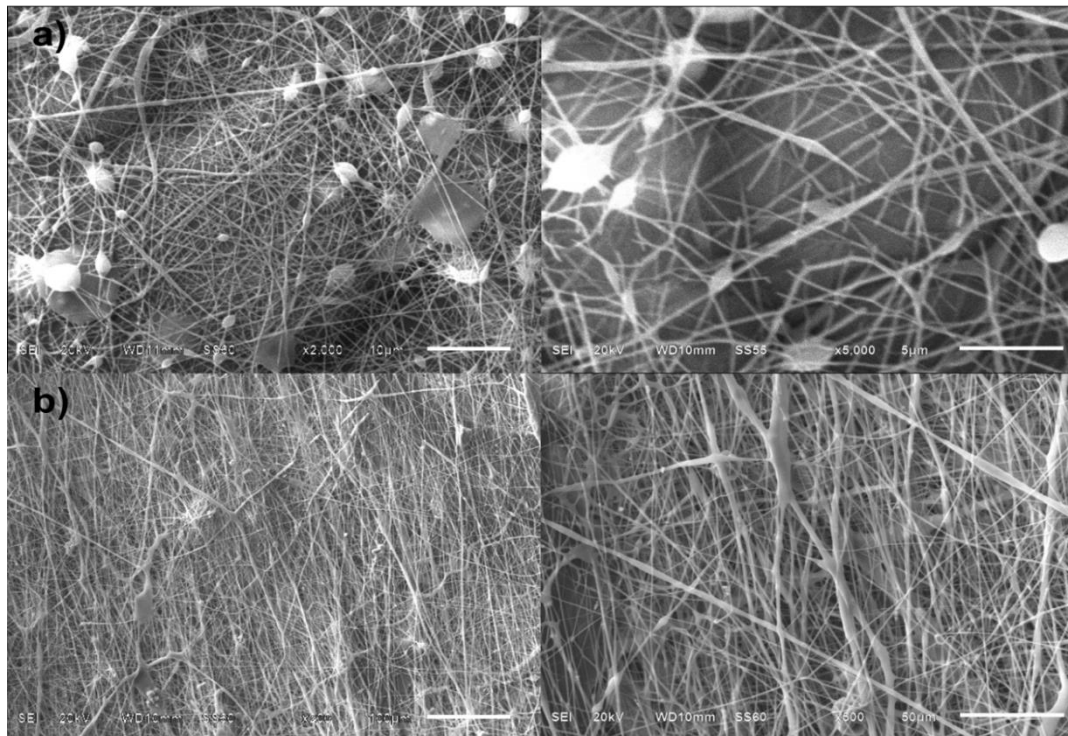


Figura 23. Micrografía de la membrana PLA/PVA. Inciso a) Viscosidad alta, se observa un rompimiento de las fibras a una escala de 5 μm y 500x. Inciso b) Medianamente viscosa, se observa una morfología ordenada.

Una vez elegidos los parámetros de inyección para la membrana PLA/PVA, se efectuó la inyección doble con las soluciones poliméricas, a un tiempo de electrohilado de 25 a 35 minutos aproximadamente, con un voltaje entre los 19 y los 22 kV, a una distancia de 7 cm entre el colector y la aguja de inyección, con una solución polimérica PLA y PVA viscosa. Obteniendo las siguientes micrografías de la membrana. En la Figura 24. Se puede observar que las micrografías presentan una morfología entrecruzada imitando a la matriz extracelular, presentando un tamaño de diámetro aproximado de $0.621 \mu\text{m}$ obtenidos de un histograma.

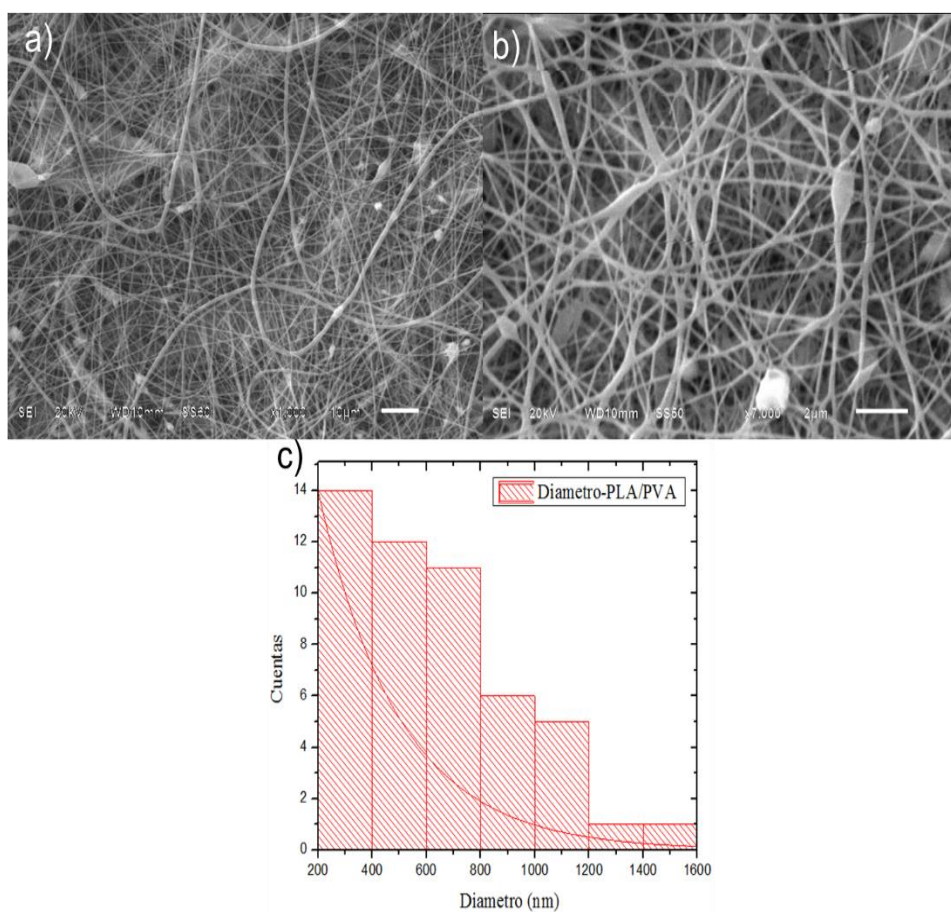


Figura 24. Micrografía de la membrana PLA/PVA. Inciso a) con una escala de $10 \mu\text{m}$ y $1000x$, inciso b) con una escala de $2 \mu\text{m}$ y $7000x$ e inciso c) histograma de diámetros promedio del filamento.

En los resultados obtenidos por medio de la técnica de caracterización por SEM, se muestra la mimetización de la morfología de la matriz extracelular de la piel [43] en la Figura 25, en comparación con las membranas de PLA, PVA y PLA/PVA mostradas en las figuras anteriores.

Concluimos que influye mucho los parámetros de las Tablas: 5 y 6, las cuales muestran la influencia de los parámetros experimentales en la morfología: diámetro de la membrana y morfología de la misma.

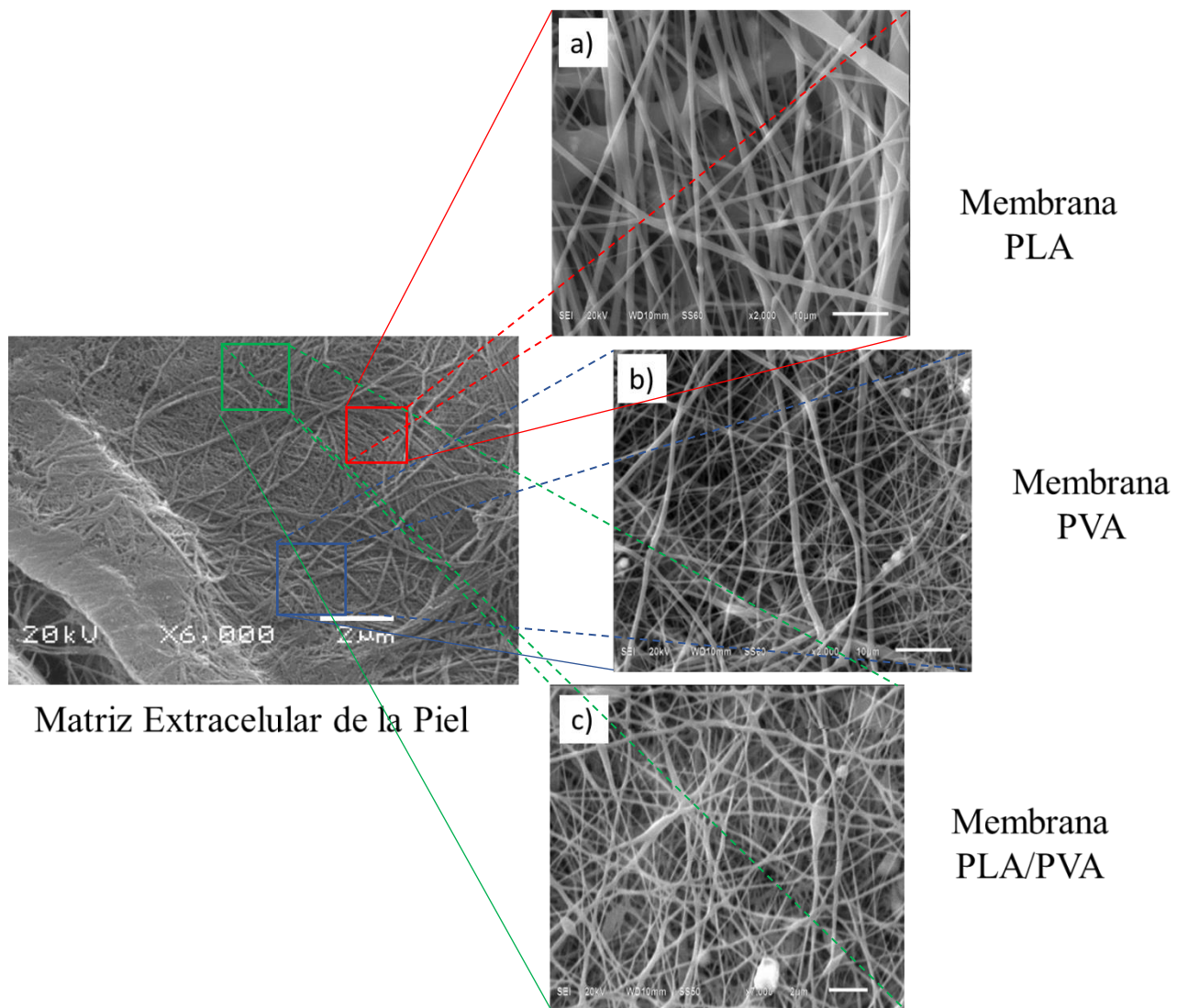


Figura 25. Matriz extracelular de la piel, inciso a) Membrana PLA, inciso b) Membrana PVA e inciso c) Membrana PLA/PVA.

3.2 Análisis Termogravimétrico TGA/DSC de las membranas

3.2.1 Análisis Termogravimétrico TGA

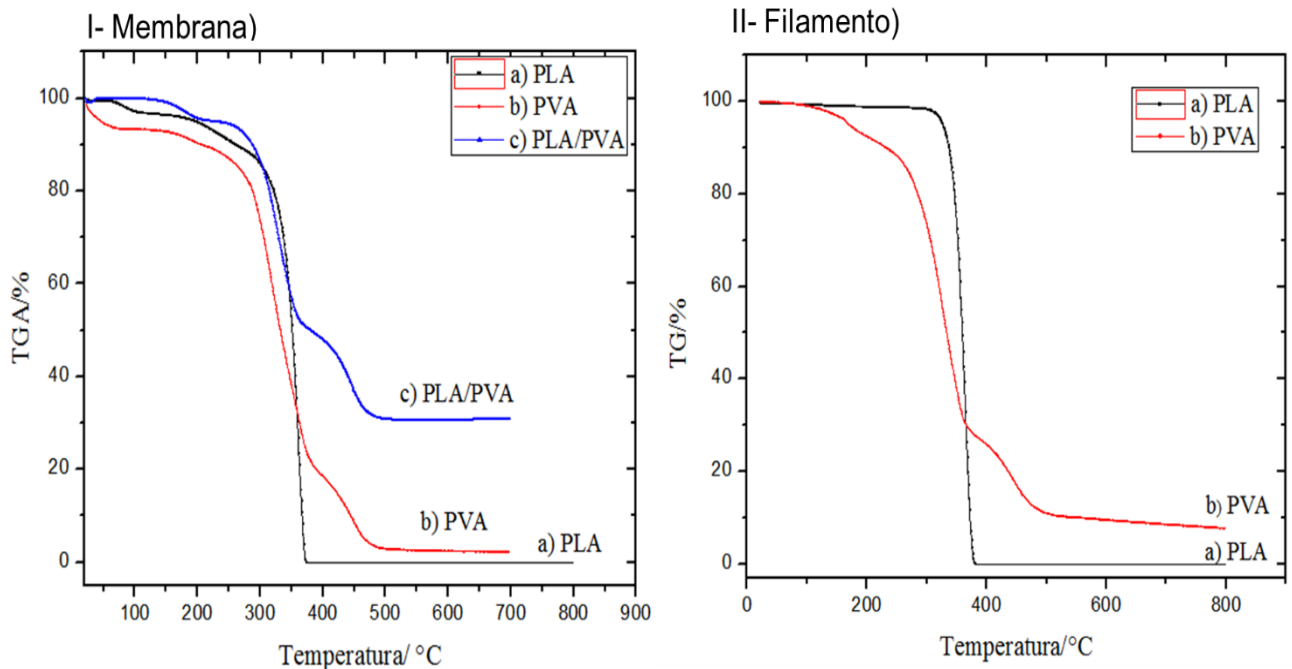
En la técnica de caracterización del análisis termogravimétrico generalmente registran el comportamiento de la masa en función del tiempo y la temperatura. La pérdida de peso se debe a dos razones, reacciones químicas y transformaciones físicas.

En la gráfica 1, se puede observar la pérdida de masa de las membranas: PLA, PVA y la membrana de la mezcla PLA/PVA. En la gráfica 1, I- Membrana) en el inciso a) PLA, muestra el comportamiento de la membrana PLA con respecto a la temperatura mostrando una descomposición multi-etapa donde los productos intermedios no son estables por ello no es posible obtener datos sobre la estequiometría de la reacción. La primera pérdida de peso se hace presente a los 70 °C que es una pérdida de masa rápida inicial característica de un proceso de desorción, debido al solvente con el cual se hizo la solución polimérica. La segunda pérdida de masa es a los 196°C y la tercera más importante se hace presente a los 288°C ya que se encuentra en una pérdida de masa total hasta llegar a los 380°C. A comparación con la gráfica 1, II- Filamento) que es el material polimérico PLA simple, donde la curva representa una descomposición simple. Y su mayor pérdida de masa se hace presente a los 290°C hasta 390°C donde ya no hay huella del material.

En la misma grafica 1, I- Membrana) en el inciso b) PVA, se muestra la reacción de la membrana de PVA con respecto a la temperatura, teniendo un mismo comportamiento de multi-etapa al igual que la membrana PLA, la primera descomposición inmediata se presenta a los 47 °C esto debido a los solventes utilizados en la realización de la solución polimérica, seguida de una mayor pérdida de masa a los 171°C, por último se observa que a la temperatura de 378°C se requirió de mayor energía para efectuar la última pérdida de masa por el rompimiento de las fuerzas de Van der Waals. En la gráfica 1, II Filamento) a la

temperatura de 164°C se muestra la primera pérdida de masa hasta presentar el mismo comportamiento que el de la membrana de PVA a los 378°C.

En el inciso c) PLA/PVA membrana, se muestra la reacción de la membrana combinada con los dos polímeros mostrando una descomposición multi-etapa, la primera pérdida en peso se presenta a los 145°C esto debido a un proceso de desorción por parte de los solventes, posteriormente se presenta la segunda pérdida a los 254 °C y por último a los 366°C se observa un mayor requerimiento de energía para efectuar la última pérdida en peso.



Gráfica 1. Curvas TGA de las membranas a base de PLA, PVA y su combinación PLA/PVA en atmósfera controlada de nitrógeno, con un incremento de 10°C por min.

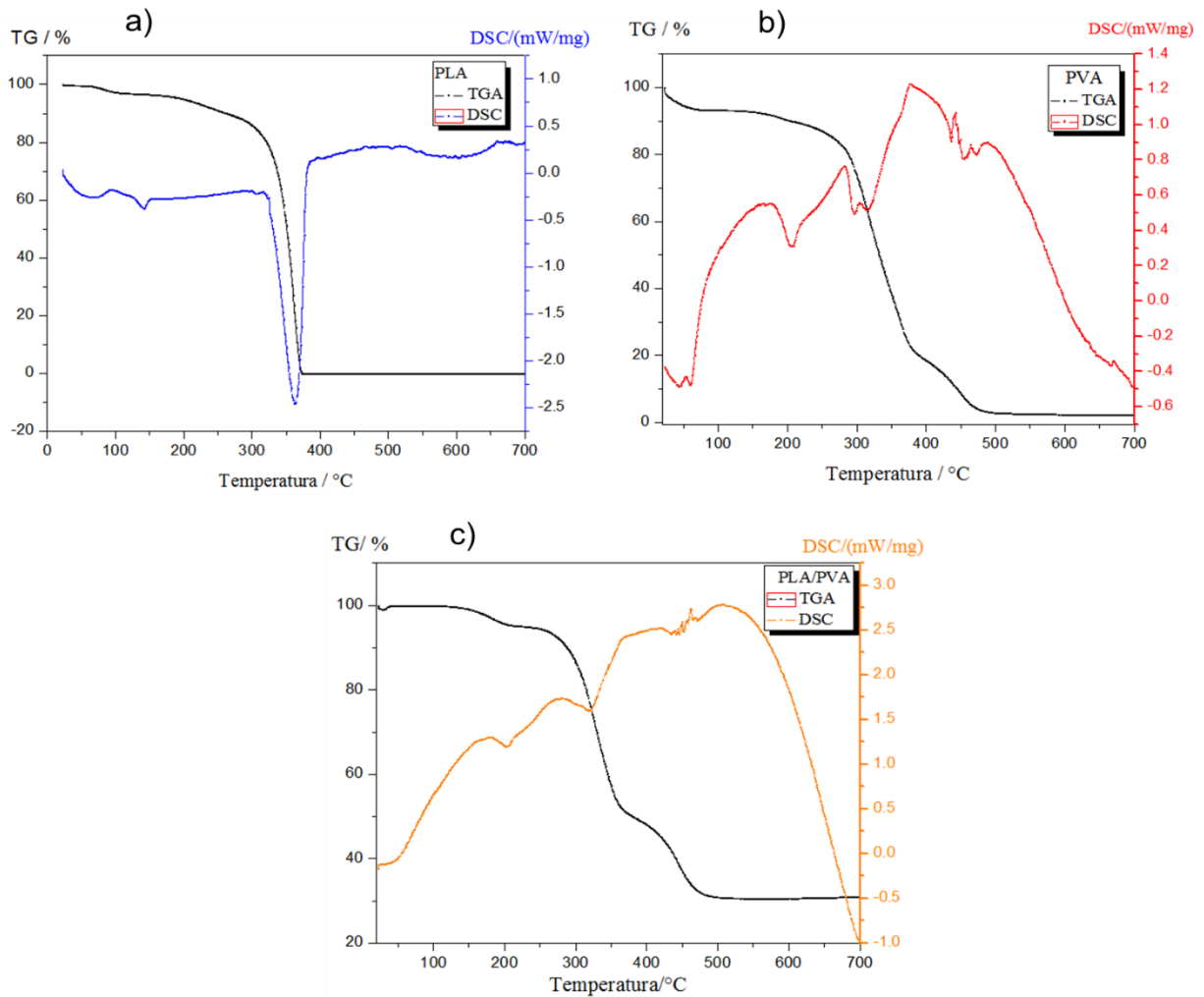
3.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se presentan las gráficas de Calorimetría diferencial de barrido de las membranas PLA, PVA y la membrana de la mezcla PLA/PVA.

En la gráfica 2. Inciso a) PLA presentan una ligera reacción endotérmica a la temperatura de 64°C asociada a la temperatura de transición vítrea (Tg) [44], al

igual que la evaporación del solvente que se empleó, Tg puede entenderse como una temperatura en la que el polímero disminuye su densidad, dureza y rigidez, así como el porcentaje de alargamiento drásticamente. Seguido de una reacción endotérmica a la temperatura de 141°C debido a la temperatura de cristalización y la modificación por el solvente, por último se genera una reacción endotérmica a la temperatura de 362°C relacionada con la pérdida total de masa

En la gráfica 2. Inciso b) PVA presentan una reacción endotérmica a la temperatura de 206°C lo que simboliza un cambio de la estructura presentando una reorganización interna, asociándola a la temperatura de transición vítrea. Seguido de una reacción endotérmica a la temperatura de 314°C asociado a la mayor pérdida de masa debido a la descomposición de la molécula polimérica. En la gráfica 2. Inciso c) PLA-PVA presenta un comportamiento similar a la membrana PVA, se presenta una reacción endotérmica a la temperatura de 202°C coligada con la temperatura de transición vítrea del PVA después a los 318°C se presenta nuevamente la reacción endotérmica relacionada a la mayor pérdida de masa de la membrana combinada.



Gráfica 2. Curvas DSC de las membranas a base de: a) PLA, b) PVA y su combinación c) PLA/PVA en atmosfera controlada de nitrógeno, con un incremento de 10°C por min.

3.3 Adherencia plaquetaria: Microscopia electrónica de barrido (SEM)

En este apartado se mostraran las micrografías de la adherencia plaquetaria en las membranas de PLA y el material PVA. El experimento se realizó a nivel estéril para evitar agentes externos garantizando la impregnación neta del plasma rico en plaquetas, las plaquetas tienen una forma redonda u ovoide con un tamaño aproximado de 0.5 a 2.5 μm [45].

En la Figura 26, se muestran la micrografía de la membrana PLA, en ella se puede observar la distribución del plasma rico en plaquetas con un diámetro de 2.41 μm obtenidos de un histograma.

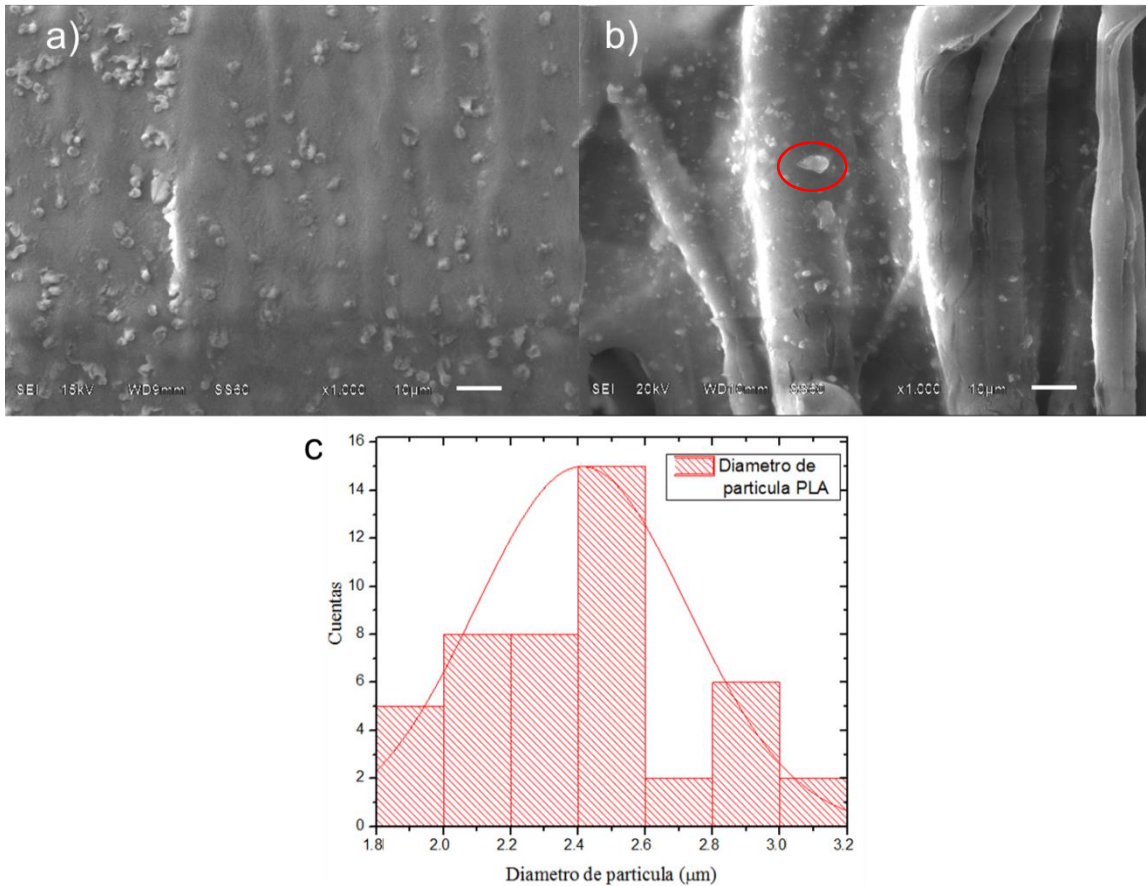


Figura 26. Micrografía de la membrana PLA: En el inciso a) se puede observar la distribución de las plaquetas adheridas, inciso b) se observa una forma ovoide de una plaqueta adherida e inciso c) histograma del diámetro promedio de la partícula.

El experimento de adherencia plaquetaria se realizó en el filamento de PVA ya que la membrana por si sola se desintegraba al ponerla en contacto con el plasma rico en plaquetas. En la Figura 27, se muestra la micrografía del material PVA, en ella se puede observar la distribución del plasma rico en plaquetas con un diámetro aproximado de 1.26 μm obtenidos de un histograma. Sin embargo, queda para estudios futuros realizar una técnica para estabilizar la estructura de la membrana

de PVA como en la referencia [46]. En esta referencia se explica que para darle estabilidad a la membrana de PVA se necesita darle un baño en metanol (96% de pureza) durante 24 horas después se deja secar. Posteriormente a este tratamiento, se estabiliza aplicando calor en seco a una temperatura de 160°C durante 30 min.

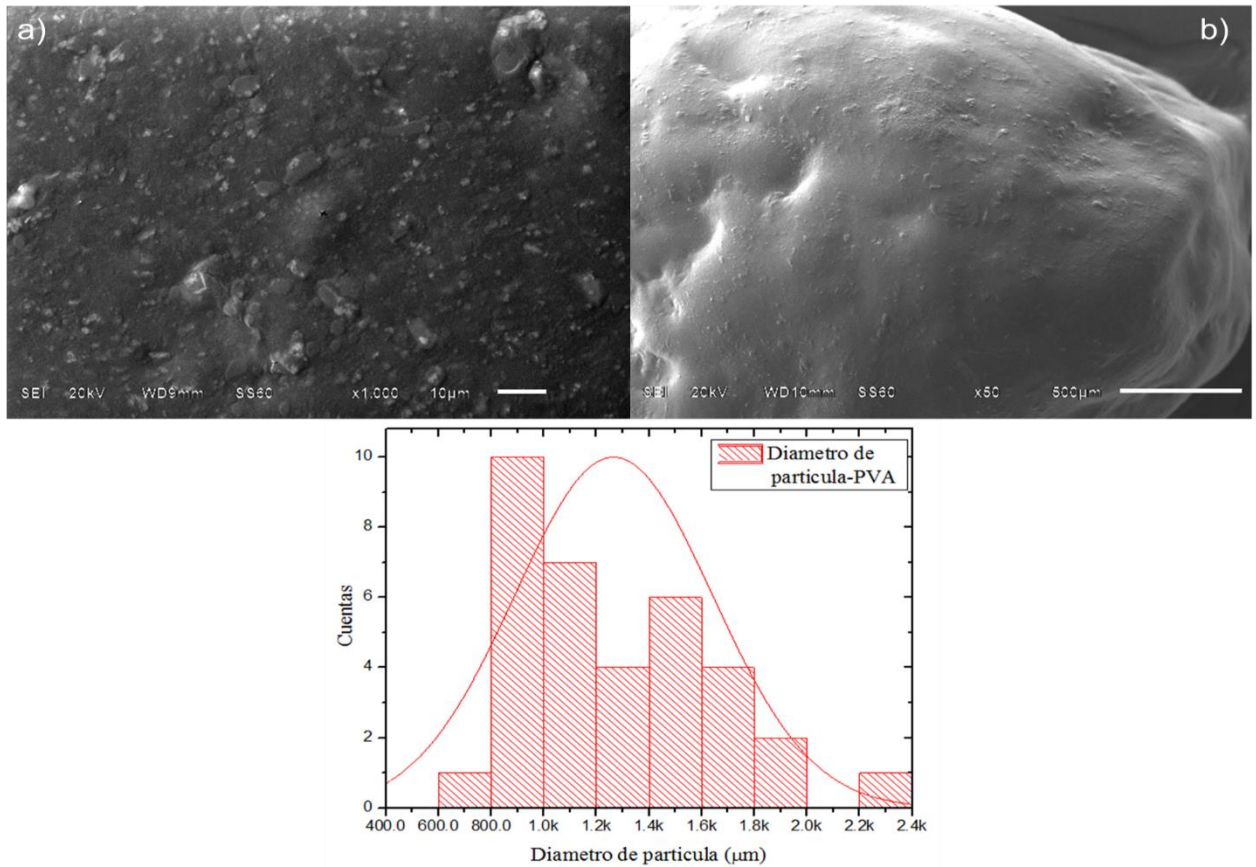


Figura 27. Micrografía del filamento PVA: En el inciso a), b) se puede observar la distribución de las plaquetas adheridas, inciso c) histograma del diámetro promedio de la partícula.

Con esta prueba de adherencia plaquetaria se puede demostrar la biocompatibilidad e interacción celular con los biopolímeros.

3.4 Cultivo de Fibroblastos y ensayo de cicatrización de heridas *in-vitro*

En este experimento se evaluaron tres aspectos importantes: cultivo de fibroblastos, curva de crecimiento y pruebas de Ibidi®.

3.4.1 Cultivo de Fibroblasto

En la *curva de crecimiento de los fibroblastos* se evaluó su reproducción y su adherencia en caja Petri. Este experimento se realizó en tres cajas Petri donde fueron depositados 50 mL de medio con los fibroblastos y se dejaron incubar durante 24, 48 y 72 horas. Posteriormente a los tiempos mencionados se observó que a las 72 horas las células fibroblásticas eran confluentes, es decir, que se reprodujeron ocupando más del 80 % de la caja Petri además de presentar una buena adherencia. En la Figura 28, se puede observar la reproducción de los fibroblastos a las 24,48 y 72 horas.

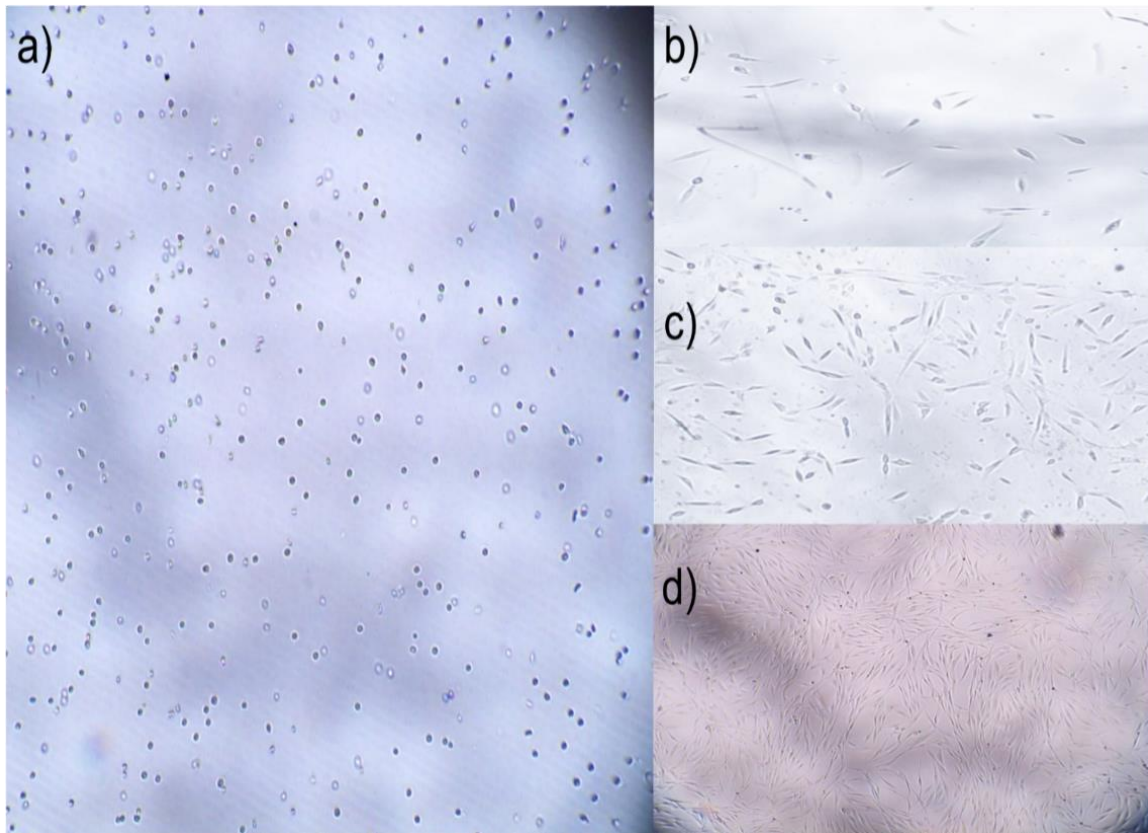


Figura 28. Inciso a) Fibroblastos inmaduros, inciso b) Fibroblastos durante 24 horas, inciso c) Fibroblastos durante 48 horas e inciso d) Fibroblastos durante 72 horas.

3.4.2 Ensayo de cicatrización de heridas *in-vitro* pruebas de Ibidi®

Se realizó el ensayo de cicatrización de heridas *in-vitro* con la prueba Ibidi®.

Este ensayo busca simular una lesión en la piel a nivel *in-vitro*, este dispositivo de Ibidi® contiene dos pozos en donde se depositaron 70 μ L de medio con células fibroblásticas y una membrana desmontable, que al retirarla simula una lesión de la piel dejando un área acelular, como se muestra en la Figura 29.

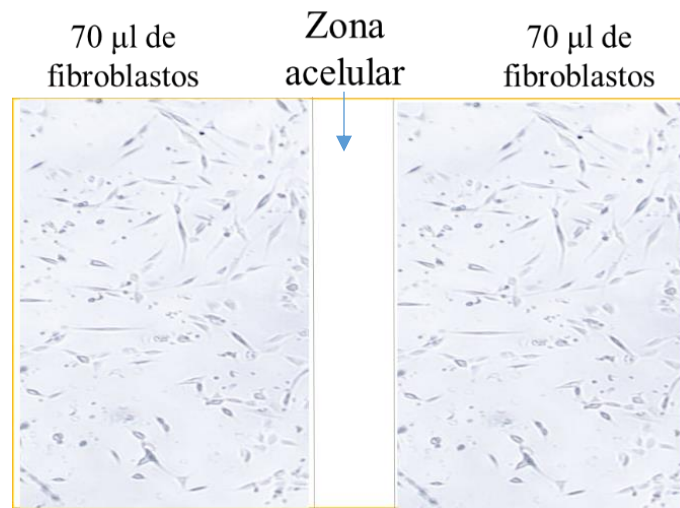


Figura 29. Esquema del dispositivo Ibidi®

En esta prueba se valora cuanto tiempo es que las células fibroblásticas tardan en cerrar el espacio acelular simulando el tiempo de cicatrización de una herida. Mas puntualmente, se quería observar si las membranas tienen alguna influencia en donde las células fibroblásticas pudieran adherirse y propagarse haciendo función de soporte para una mayor proliferación y así acelerar el proceso de cicatrización.

En la Figura 30, se observa el inciso a) en donde se encuentran los fibroblastos a un tiempo 0 siendo este nuestro control, inciso b) muestra la propagación después de 48 horas los fibroblastos empiezan a migrar en la parte acelular. Sin embargo, no se llegó a la confluencia, ni proliferación deseada. En el inciso c) se muestra la membrana en contacto con el medio celular de fibroblastos observando un inicio de

propagación. No obstante, no se pudo caracterizar correctamente la propagación en la membrana, por cuestiones ajenas a la universidad como lo es la propagación del virus COVID-19. Queda para estudios futuros realizar la caracterización de las membranas sometidas a este estudio.

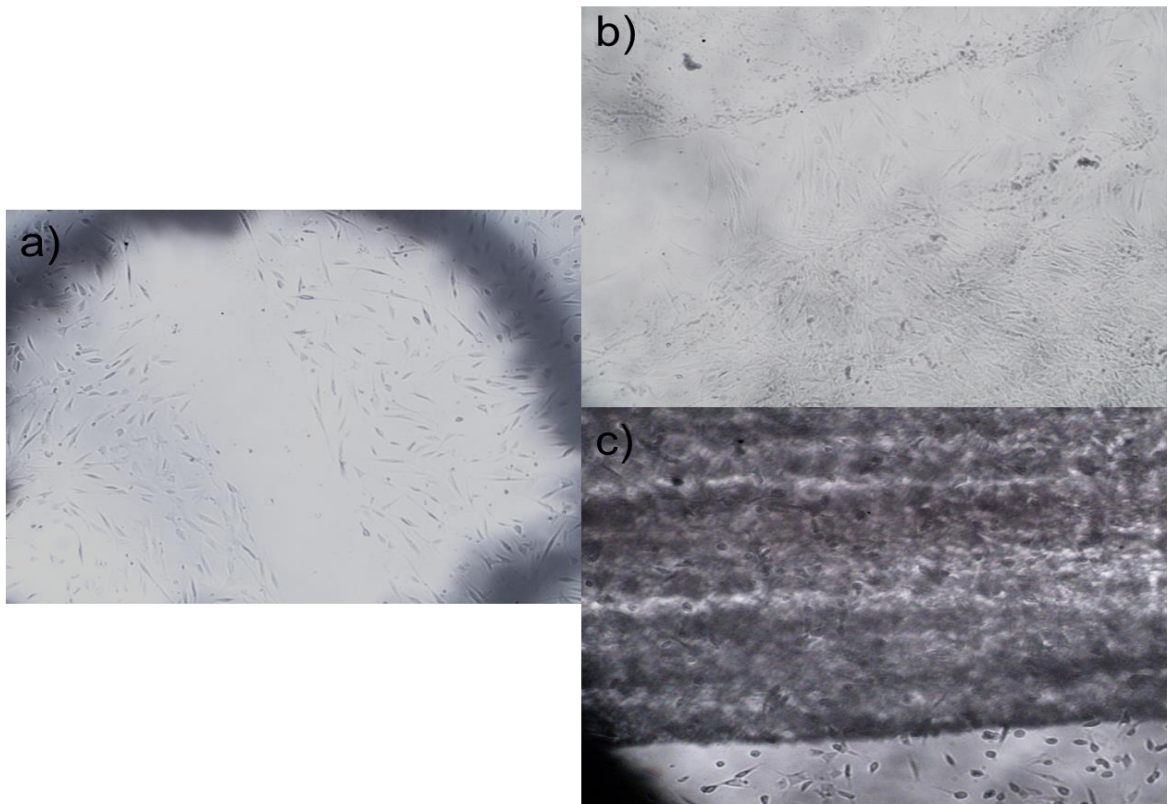


Figura 30. Control de proliferación de fibroblastos. Inciso a) Fibroblastos en tiempo 0, b) Fibroblastos proliferando después de 48 hrs y c) fibroblastos en contacto con membrana PLA/PVA.

4. CONCLUSIONES

1.- La evaluación de las membranas a base de los polímeros PLA/PVA, demuestran la versatilidad de su aplicación en función de su estructura y morfología que puede llegar a variar a partir de los parámetros de control experimental como: tipo de inyección, voltaje, viscosidad y distancia del colector a la punta de inyección. Y las combinaciones que se pueden llegar a hacer directo a la inyección: manual y automática.

2.- La membrana, debido a la ilimitación de la matriz extracelular, favorece la adhesión y proliferación celular. Por lo tanto, las membranas poliméricas se comportan como un biomaterial de 3ra generación.

3.- El tamaño micrométrico obtenido en las membranas ayuda a la adhesión de los fibroblastos. Y aunque no se alcanzó a obtener una membrana con una estructura nanométrica (debido a que la contingencia sanitaria no permitió mayor tiempo de experimentación), hipotéticamente, con un voltaje alrededor de los 18 kV, a una distancia de 7 cm del colector a la fuente de inyección de los polímeros, para unas disoluciones medianamente viscosas y con un tipo de inyección doble automática, deberían ser obtenidas membranas con tamaño de fibra nanométrica.

4.- En cuanto al equipo de electrohilado, se pudieron realizar varios experimentos con modificaciones en los parámetros de control, viscosidad de las soluciones poliméricas, control de inyección: manual y automática, obteniendo membranas con distintas características.

5.- Se observa que hay biocompatibilidad con el cuerpo debido a la prueba de adherencia plaquetaria donde se mostró que las plaquetas se adhieren a ambos polímeros de PLA y PVA. Así mismo, las membranas de PLA, PVA y la mezcla PLA/PVA mostraron no ser tóxicas a micro-organismos [49]. Se atribuye éste tipo de comportamiento a sus propiedades hidrofóbicas-hidrofílicas debido a la mezcla de PLA/PVA. Respecto a la biocompatibilidad de membranas de tamaño de fibra nanométrica, para el caso del PVA fue encontrado que tiene menor capacidad de

adherencia celular y proliferación para queratinocitos [46]. Sin embargo, hipotéticamente debido a que su estructura nanométrica y propiedades de hidrofobicidad-hidrofilicidad no debería afectar la adhesión celular y proliferación celular para el caso de los fibroblastos.

6.- En trabajos recientes [47, 48] con estas membranas poliméricas, fue encontrado en experimentos in-vivo que permiten regeneración tisular dérmica completa. Por lo tanto, el comportamiento de estas membranas es el de un biomaterial de tercera generación.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Binyamin G, Shafi BM, Mery CM. (2006). Biomaterials: a primer for surgeons. *Semin Pediatr Surg*, 15:276-283.
- [2] Anderson JM. (2006). The future of biomedical materials. *J Mater Sci Mater Med*, 17:1025-1028.
- [3] Pichón, S. (2017) BUAP. Diseño y fabricación de un equipo de electrohilado: elaboración de fibras nano-métricas y micrométricas de materiales poliméricos y compósitos. Colegio de Ingeniería en Materiales.
- [4] Ballarin., Florencia Montini., Tornello., Cortez P., Abraham, A. (2015). Biomateriales aplicados en desarrollo de sistemas terapéuticos avanzados, Universidad de Coímbra.
- [5] Gladys Velazco. (2011). INGENIERIA DE TEJIDOS Y ANDAMIOS DE REGENERACION CELULAR. *Acta bioclínica Volumen1, N°1*,
- [6] José Mijaíl Pérez Pórras, (2018). Procesamiento de membranas microporosas a base de polímeros y bio-polímeros mediante la técnica de electro-hilado para su posterior escalabilidad a un diseño industrial. *Disertación: Licenciatura en Ingeniería en Materiales, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.*
- [7] Casis, Natalia. 2010., *Elaboración de Membranas Poliméricas Porosa, Información tecnológica Vol.21.*
- [8] José Martínez Fraga. (2011). Tema 4: Anatomía y Fisiología de la Piel.
- [9] Cesar Eduardo Montalvo Arenas, Francisco Pasos Nájera, Ricardo Hernández Trujillo. (2010). *Sistema Tegumentario: Piel anexos (Faneras)*, de Universidad Autónoma de México, Facultad de Medicina, Departamento de Biología Celular y Tisular.
- [10] Fitzpatrick TB, Freedberg A. 2003. *Dermatology in General Medicine*. New York: Mc GrawHill, Medical Publications, 2594p.

- [11] Don W. Facewsett. M. D., Ronald P. Jeensh, Ph. D.mc. 1995. Tema 14 Piel. En Compendiob de Histología Bloom-Fawcett. Madrid: Graw-Hill Interamericana.
- [12] Williams DF (1976) Biomaterials and biocompatibility. *Med Prog Technol*, 4:31-42
- [13] Williams DF (1999) The Williams dictionary of biomaterials. Liverpool, UK. University Press.
- [14] Hench LL, Ethridge ECE (1982) Biomaterials. An interfacial approach. Biophysics and Bioengineering. Academic Press. NY. Series Vol 4.
- [15] Chang Y, Tsai CC, Liang HC, Sung HW (2002) In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). *Biomaterials*, 23:2447-2457.
- [16] Graham Ernest Martin, Ian Derek Cockshott. 1974. Fibrillary product of electrostatically spun organic material, Number request: US4043331A.
- [17] Formhals Anton. 1934. Process and apparatus for preparing artificial threads, Patent number: US1975504A.
- [18] Adnan Haider, Sajjad Haider, Inn-Kyu Kang, (2018). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology, 11(8) 1165-1188.
- [19] María Vellet Regí, (Madrid, 2013). ¿Qué sabemos de...? Biomateriales, Los libros de la Catarata ISBN: 978-84-00-09756-1.
- [20] Josef Haik, Rachel Kornhaber, Biader Blal, Moti Harats. (2017). The Feasibility of a Handheld Electrospinning Device for the Application of Nanofibrous Wound Dressings, *Advances In Wound Care*, 6:5 166–174.
- [21] N. H. A. Tran, H. Brünig, G. Heinrich. (2016). Controlling micro-and nanofibrillar morphology of polymer blends in low-speed melt spinning process. Part I. Profiles of

PLA/PVA-filament parameters along the spinline. *Journal of Applied Polymer Science*, 133:47 1-10.

[22] Arijit Bhattacharjee, Krishan Kumar, Aditya Arora, Dharendra S. Katti. (2016). Fabrication and characterization of Pluronic modified poly(hydroxybutyrate) fibers for potential wound dressing applications, *Materials Science and Engineering.*, C 63 266–273.

[23] Jiabin Luan, Jian Wu, Yudong Zheng, Wenhui Song, Guojie Wang¹, Jia Guo¹ and Xun Ding. (2012). Impregnation of silver sulfadiazine into bacterial cellulose for antimicrobial and biocompatible wound dressing, *Biomedical Materials.*, 7 065006.

[24] Lee Cremar, Jorge Gutierrez, Jennifer Martinez, Luis A Materon, Robert Gilkerson, Fenghua Xu, Karen Lozano, (2018). Development of antimicrobial chitosan based nanofiber dressings for wound healing applications, *Nanomed Journal* 5(1) 6-14.

[25] Gun-Woo Oh, Seok-Chun Ko, Jae-Young Je, Young-Mog Kim, JungHwan Oh, Won-Kyo Jung, (2016). Fabrication, Characterization and determination of biological activities of poly(ϵ -caprolactone) /chitosan-caffeic acid composite fibrous mat for wound dressing application, *International Journal of Biological Macromolecules* 93 1549–1558.

[26] Pelipenko, Jan, Petra Kocbek, and Julijana Kristl, (2015). Nanofiber diameter as a critical parameter affecting skin cell response, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 66: 29-35.

[27] E Y Gómez-Pachón, R Vera-Graziano, R Montiel Campos, (2014). Structure of poly(lactic-acid) PLA nanofibers scaffolds prepared by electrospinning, *Materials Science and Engineering* 59 012003.

[28] B. Janković, J. Pelipenko, M. Škarabot, I. Mušević, J. Kristl, (2013). The design trend in tissue-engineering scaffolds based on nanomechanical properties of

individual electrospun nanofibers. International journal of pharmaceutics, 455:1-2 338-347.

[29] Nisha Shankhwar, Manishekhar Kumar, Biman B. Mandal, P.S. Robi, A. Srinivasan, (2016). Electrospun Polyvinyl Alcohol-Polyvinyl Pyrrolidone Nanofibrous Membranes for Interactive Wound Dressing Application, Journal of Biomaterials Science, 27 (3) 247-62.

[30] Emilio Decinti Wiess. 2008. Bases de la Medicina Clínica, de Universidad de Chile, Facultad de Medicina.

Web: http://www.basesmedicina.cl/cirugia/16_1_heridas/16_1_heridas.pdf

[31] F. Charles Brunicardi, Dana k. Andersen. (2011). Tema 8 Cicatrización de Heridas. En Schwartz Principios de cirugía. México, D.F.: Mc Graw-Hill.

[32] Robles, M., Rodríguez, F., Maques E., Barrera, A., Aguilar, J., Del Toro, C. (2014). APLICACIONES BIOMÉDICAS, TEXTILES Y ALIMENTARIAS DE NANOESTRUCTURAS ELABORADAS POR ELECTROHILADO, Departamento de Ciencias Médicas.

[33] David Bellini, Albigasego, Lanfranco Callegaro, Marie Astier., 28 Junio 2011. Biomaterials, their preparation by electrospinning and their use in the biomedical and surgical field., de anika Therapeutics S.r.l

[34] Seyed Babak Mahjour, Hungjun. Wonag. 2011. Creation of hair follicles in tissue- engineered skin grafts, Stevens Institute of Technology. Patents US2012276.

[35] Seung Jin Lee, Sol Han, In Kyong Shim. 2005. Fibrous 3-dimensional scaffold via electrospinning for tissue regeneration and method for preparing the same. Ewha University- Industry Collaboration Foundation. Patentes EP1917048A1.

[36] Ron Sostek 2013. Synthetic Scaffolds., Harvard Apparatus Regenerative Technology Patents W02014110300A1.

- [37] Soares, J.S., Moore, J.E., Rajagopal, K.R. 2008. Constitutive Framework for biodegradable polymers with applications to biodegradable stents, *ASAIO Journal*, 54(3), 295-301.
- [38] Mitragotri Samir, Lahann Joerg. 2009. Physical approaches to biomaterial design. *Nature Materials* 8, 15-23.
- [39] Lowy FD. 2003. Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Infect.*; 111: 1265-1273.
- [40] Moreillon P, Que Y, Glauser M. 2005. *Staphylococcus aureus*. In Mandell GL, Bennett JE, Olin R. *Principles and practice of infectious diseases*. 6a ed. Philadelphia, Churchill Livingston.
- [41] MUNSON, Bruce Roy; OKIISHI, Theodore H. and YOUNG, Donald F. 2001. *Fundamentals of fluid mechanics*. United States: Wiley, John & Sons. 816 p.
- [42] J. Goldstein, D.E. Newbury, D.C. Joy, C.E. Lyman, P. Echlin, E. Lifshin, L. Sawyer. (New York 2003). *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, (Springer US).
- [43] Irving Fernández Cervantes. (2018). *OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS TEGUMENTARIOS A PARTIR DE POLÍMEROS NATURALES*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Mérida, Yucatán, México.
- [44] Yang, Z., Li, X., Si, J., Cui, Z., & Peng, K. (2019). Morphological, Mechanical and thermal Properties of Poly(lactic acid)(PLA)/Cellulose Nanofibrils (CNF) Composites Nanofiber for Tissue Engineering. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, 34(1), 207-215. doi:10.1007/s11595-019-203.7-7.
- [45] Bermejo E., (2017). *Hematología: Plaquetas*, Instituto de Investigaciones Hematológicas “Mariano R. Castex”, Academia Nacional de Medicina de Bs As, Dpto. de Hemostasia y Trombosis. Volumen 21 N°

[46] J. Pelipenko, P. Kocbek, B. Govedarica, R. Rošic, S. Baumgartner, J. Kristl. (2017). The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(2), 401-411. doi:10.1016/j.ejpb.2012.09.009.

[47] Romero-Sánchez H. E. (2018). Efecto de membranas de PLA/PVA obtenidas por electrohilado y extracto acuoso de *Quercus ilex* en el tratamiento de heridas pos-quirúrgicas en piel de rata de la cepa Wistar, Disertación de licenciatura en medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2018, Puebla, Pue. México.

[48] Aleph Adel Domínguez (2021), Efecto cicatrizante in vivo e in vitro del extracto acuoso *Agave salmiana* en presencia y ausencia de membranas de ácido poliláctico y alcohol polivinílico obtenidas por electrohilado. Disertación de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2020, Puebla, Pue. México.

[49] Juan Plans Contreras (2020), "Interacción de fibroblastos humanos con bio-membranas de PLA/PVA obtenidas por electrohilado y extracto acuoso de *Quercus ilex*, con potencial aplicación en la cicatrización de heridas". Disertación de Licenciatura para obtener el grado de medico partero. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2020, Puebla, Pue. México.