



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales poliméricos

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA  
DE UNA PELÍCULA POLIMÉRICA A PARTIR DE  
COLÁGENA MARINA Y PLA

Tesis que presenta

VANESSA CAROLINA PAT CETINA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS  
(MATERIALES POLIMÉRICOS)

Mérida, Yucatán, México

2023

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión de este documento, proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que, a razón de lo anterior, y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y se regirán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

Ing. Biomed. Vanessa Carolina Pat Cetina

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN MATERIALES POLIMÉRICOS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Vanessa Carolina Pat Cetina** titulado “**Elaboración y caracterización fisicoquímica de una película polimérica a partir de colágena marina y PLA**”, fue realizado en la Unidad de Materiales, en la línea de investigación en Materiales para medicina regenerativa, en el laboratorio de Biomateriales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes** perteneciente al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro. y bajo la codirección del **Dr. Víctor Javier Cruz Delgado** del Centro de Investigación en Química Aplicada-CIQA.

Atentamente



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 13 de octubre de 2023

## **AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS**

Al CONAHCYT, por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado (1099786)

Al laboratorio de Biomateriales y al laboratorio de Química Macromolecular de la Unidad de Materiales, así como al laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Al departamento de Transformación de Plásticos del Centro de Investigación en Química Aplicada CIQA.

Al proyecto Ciencia de Frontera 2019 FORDECYT/PRONACES 6660.

A mi directora de tesis Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por su aliento para seguir mejorando en cada etapa, por su paciencia y por su tiempo invertido en transmitirme sus conocimientos durante todo el proceso.

A mi codirector de tesis Dr. Víctor Javier Cruz Delgado, por su apoyo en los procesos experimentales, por el tiempo y paciencia dedicados a resolver mis dudas y por los conocimientos transmitidos.

A los miembros del comité tutorial, Dra. Lucia Fabiola Cano Salazar, y Dr. Ángel de Jesús Montes Luna por su tiempo invertido en la mejora de mi tesis.

A mis revisores, la Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana y el Dr. José Manuel Cervantes Uc, por sus aportaciones a la mejora de mi trabajo.

Al Dr. Wilberth A. Herrera Kao y al Dr. Hugo Joel Carrillo Escalante por el apoyo técnico en la caracterización fisicoquímica, a la Q.I. Rossana F. Vargas Coronado por las facilidades para los procesos de liofilización. A la Dra. Georgina Estrada Tapia y a la M.C. Lucila Aurelia Sánchez Cach por las facilidades y apoyo técnico para la realización de electroforesis.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A Dios, por siempre darme la fortaleza para no rendirme.

A mis padres, por su apoyo incondicional en cada una de las etapas personales y académicas de mi vida, por siempre impulsarme a seguir y cumplir mis metas y por todos los valores que me han inculcado para ser una mejor persona y una buena profesional.

A mi esposo por siempre confiar en mí y animarme en los momentos más difíciles del proceso.

A mis hermanos: Silvia Pat y Martin Pat, por siempre estar conmigo y apoyarme.

A mis abuelos, por siempre alegrarse de mis logros.

A mis amigos del laboratorio de Biomateriales: Noemi Pat, José Luis Quijano, Cielo Poot, Jaime Domínguez, Maritza Galván, José Bolio y Tania Gil, por el apoyo y compañerismo que me demostraron durante todo el proceso, así como por los conocimientos transmitidos.

A mis amigos y compañeros del CICY: Paulina Vázquez, Ileana León, Erick Uc Fernández, y Carlos Belman por su apoyo cuando lo he necesitado.

A mis amigos: Alejandra Baas, Jorge Alcocer, Karen Novelo, Shaira García, David Huchim y Víctor Flota, por entender mis ocupaciones y seguir apoyándome con su amistad a pesar del tiempo y los compromisos.

## **DEDICATORIA**

A mi querida amiga y hermana Alejandra Baas Guzmán† , por siempre alentarme e inspirarme a seguir adelante, por todo el apoyo durante todo el tiempo en cada proyecto y por las enseñanzas que me dejó y me motivan a no rendirme.

# CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	2
1.1. Ingeniería de tejidos.....	2
1.1.1. Biomateriales.....	3
1.2. Sustitutos dérmicos.....	3
1.3. Polímeros.....	6
1.3.1. Clasificación .....	7
1.3.1.2 Polímeros biodegradables .....	9
1.4. Colágena .....	9
1.4.1. Estructura.....	10
1.4.2. Clasificación .....	11
1.4.3. Degradación .....	12
1.4.3.1. Biodegradación.....	13
1.4.4. Biocompatibilidad.....	14
1.4.5. Fuentes de obtención de CLG.....	15
1.4.6. Proceso de extracción de colágena. ....	16
1.5. PLA (poliácido láctico) .....	16
1.5.1. Estructura.....	17
1.5.2. Propiedades físicas y mecánicas.....	17
1.5.3. Métodos de obtención.....	18
1.5.4. Degradación .....	19
1.5.5. Biocompatibilidad, biodegradación y excreción PLA .....	20
1.6. Extrusión en la generación de biopelículas .....	21
1.7. Estrategias para mejorar las propiedades del PLA y la CLG .....	23
1.8 CLG y PLA en la regeneración dérmica .....	23
HIPÓTESIS .....	26

OBJETIVOS .....	26
General.....	26
Específicos .....	26
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA.....	27
2.1 Obtención de colágena marina .....	27
2.1.1 Obtención y pretratamiento de la materia prima.....	27
2.1.2 Hidrólisis en medio básico.....	28
2.1.3. Solubilización y tratamiento térmico .....	28
2.1.4. Precipitación e hidrólisis enzimática.....	29
2.1.5. Diálisis y liofilización.....	30
2.2 Caracterización de la colágena obtenida .....	31
2.2.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	31
2.2.2. Caracterización térmica.....	32
2.2.4. Electroforesis.....	33
2.3. Elaboración de compuestos y películas de PLA/CLG. ....	35
2.3.1. Preparación de los materiales .....	36
2.3.2. Determinación de las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las películas PLA/CLG .....	37
2.3.2.1. Propiedades fisicoquímicas .....	37
2.3.2.2. Prueba de tensión .....	37
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
3.1 Obtención de la CLG .....	39
3.2 Estimación del rendimiento de obtención de CLG.....	39
3.3 Propiedades fisicoquímicas de la CLG marina.....	41
3.3.1. FTIR.....	41
3.3.2. Análisis TGA de la colágena. ....	42
3.3.3. Análisis DSC de la colágena. ....	44
3.4 Patrón electroforético de la CLG marina .....	45
3.5. Obtención y caracterización de las películas de PLA/CLG.....	46
3.6. Análisis del espectro IR de las películas de PLA Y CLG .....	46
3.7. Calorimetría diferencial de barrido .....	51
3.8. Análisis termogravimétrico .....	56
3.9. Propiedades mecánicas (prueba de tensión) .....	61



CONCLUSIONES.....65  
PERSPECTIVAS.....67  
BIBLIOGRAFÍA .....68

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema representativo del concepto de ingeniería de tejidos .....	2
Figura 1.2. Clasificación de los polímeros termoplásticos.....	8
Figura 1.3. Estructura molecular de la CLG .....	11
Figura 1.4. Contenido aproximado de colágena en diferentes tejidos.....	11
Figura 1.5. Representación de la acción de las metaloproteinasas sobre la estructura de la CLG. .....	13
Figura 1.6. Isómeros del ácido láctico .....	17
Figura 1.7. Mecanismos de obtención del PLA.....	19
Figura 1.8. Esquema general de una extrusora.....	21
Figura 2.1. Lavado y pretratamiento de pieles.....	27
Figura 2.2. Reducción de tamaño e hidrólisis básica.....	28
Figura 2.3. Proceso de solubilización.....	29
Figura 2.4. Precipitación e hidrólisis enzimática.....	29
Figura 2.5. Proceso de diálisis y liofilización de la CLG.....	30
Figura 2.6. Espectrofotómetro infrarrojo.....	31
Figura 2.7. Analizadores térmicos .....	32
Figura 2.8. Lector de microplacas .....	33
Figura 2.9. Cámara de electroforesis.....	34
Figura 2.10. Vista lateral de los husillos .....	35
Figura 2.11. Dado para la obtención de película.....	36
Figura 2.12. Procesamiento de los materiales para extrusión.....	37
Figura 3.1. Curva de calibración a partir de BSA.....	40
Figura 3.2. Espectro FTIR de la CLG de piel de Tilapia.....	41
Figura 3.3. Grafica TGA de la CLG de piel de Tilapia.....	43
Figura 3.4. Grafica DSC de colágena de piel de Tilapia .....	44
Figura 3.5. Patron electroforético de la colágena de piel de Tilapia.....	45
Figura 3.6. Películas obtenidas a partir de PLA y CLG.....	46
Figura 3.7. Espectros FTIR de las películas PLA-CLG.....	48
Figura 3.8. Espectros FTIR de películas PPLA Y CLG.....	50
Figura 3.9. Curvas DSC para las películas PLA-CLG.....	52
Figura 3.10. Curvas DSC de películas de PPLA Y CLG.....	55
Figura 3.11. Curvas TGA para películas PLA-CLG.....	57
Figura 3.12. Curvas TGA para películas PPLA-CLG .....	60
Figura 3.13. Curva esfuerzo- deformación de las películas PLA-CLG .....	62
Figura 3.14. Curvas esfuerzo-deformación de las películas de PPLA-CLG .....	63

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales sustitutos dérmicos comerciales disponibles en México .....	4
Tabla 2.1. Valores utilizados para la preparación de los geles .....	34
Tabla 2.2. Relación de lotes PLA/CLG Y PPLA/CLG.....	36
Tabla 3.1. Valores de concentración de BSA vs absorbancia.....	39
Tabla 3.2. Asignaciones de bandas FTIR, de la CLG obtenida de piel de tilapia .....	42
Tabla 3.3. Asignación de los grupos funcionales para las películas a partir de PLA Y CLG, obtenidos mediante FTIR. ....	48
Tabla 3.4. Asignación de los grupos funcionales para las películas a partir de PPLA y CLG, obtenidos mediante FTIR. ....	50
Tabla 3.5. Eventos térmicos y sus correspondientes valores de temperatura para las películas de PLA y CLG. ....	53
Tabla 3.6. Eventos térmicos y sus correspondientes valores de temperatura para las películas de PPLA y CLG.....	56
Tabla 3.7. Pérdidas de peso y temperaturas de máxima degradación de películas a partir de PLA y CLG.....	58
Tabla 3.8. Pérdidas de peso y temperaturas de máxima degradación de películas a partir de PPLA y CLG.....	61
Tabla 3.9. Propiedades mecánicas de películas de PLA y CLG. ....	62
Tabla 3.10. Propiedades mecánicas de películas PPLA y CLG.....	64

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ASTM:** Sociedad Americana para Pruebas y Materiales

**BSA:** Albumina de Suero Bovino

**CLG:** Colágena

**CIQA:** Centro de Investigación en Química Aplicada

**DSC:** Calorimetría Diferencial de Barrido

**EEB:** Encefalopatía Esfingiforme Bovina

**FA:** Fiebre Aftosa

**FACIT:** Colágenas Asociadas A Fibrillas Con Hélices Triples Interrumpidas

**FDM:** Modelado Por Deposición Fundida

**FTIR:** Infrarrojo Por Transformada De Fourier

**LA:** Ácido Láctico

**LCA:** Ligamento Cruzado Anterior

**MEC:** Matriz Extracelular

**MMP:** Metaloproteinasa De La Matriz Extracelular

**PCL:** Policaprolactona

**PDLA:** Poli (Acido D-Láctico)

**PGA:** Poliácido Glicólico

**PLA:** Poli (Ácido Láctico)

**PLLA:** Poli (Acido L-Láctico)

**PPLA:** Poli (Ácido Láctico) hidrolizado , con posible efecto plastificante

**PVA:** Polivinil Alcohol

**PVP:** Polivinilpirrolidona

**ROP:** Polimerización Por Apertura De Anillo

**SDS:** Dodecilsulfato Sódico

**SDS-PAGE:** Electroforesis En Gel De Poliacrilamida Con Dodecilsulfato Sódico

**TGA:** Análisis Termogravimétrico

## RESUMEN

La colágena (CLG) posee excelentes características de biocompatibilidad, sin embargo, su uso en aplicaciones médicas depende de la fuente de extracción, así como del mejoramiento en sus características mecánicas y de procesabilidad, por lo que la mezcla con polímeros como el PLA (poli- ácido láctico) permitiría el reforzamiento de estas propiedades. En este sentido, el presente trabajo se enfocó en la elaboración de películas de CLG-PLA, mediante la técnica de extrusión en fundido, y su caracterización fisicoquímica y mecánica, para evaluar su potencial aplicación como biomaterial en la ingeniería de tejidos. La extracción de CLG se realizó a partir de la piel de Tilapia *Oreochromis niloticus* mediante digestión enzimática y las películas se generaron mediante extrusión en fundido en un mini extrusor doble husillo (velocidad de 3 rpm y 170 °C, acoplado a la salida un dado de película de 6 cm de ancho y una apertura de 100 µm), utilizando 0.5%, 1%, y 2% de CLG en PLA. La CLG extraída y las películas CLG-PLA se evaluaron fisicoquímicamente mediante FTIR, DSC, TGA y ensayo de tensión. Los resultados sugieren que las películas de CLG-PLA obtenidas poseen propiedades fisicoquímicas adecuadas para su potencial aplicación en la ingeniería de tejidos blandos, como la piel, sin embargo, las propiedades mecánicas requieren de ajustes adicionales, ya que el módulo elástico de las películas está por arriba del reportado para el tejido dérmico.

## ABSTRACT

Collagen (CLG) has excellent biocompatibility characteristics, however, its use in medical applications depends on the extraction source, as well as on the improvement of its mechanical and processability characteristics, so that the mixture with polymers such as PLA (poly-lactic acid) would allow the reinforcement of these properties. In this sense, the present work focused on the elaboration of CLG-PLA films, by means of the melt extrusion technique, and their physicochemical and mechanical characterization, to evaluate their potential application as biomaterial in tissue engineering. CLG extraction was performed from Tilapia *Oreochromis niloticus* skin by enzymatic digestion and films were generated by melt extrusion in a mini twin-screw extruder (speed of 3 rpm and 170 °C, coupling a die of film 6 cm wide and an aperture of 100 µm), using 0.5%, 1%, and 2% CLG in PLA. The extracted CLG and CLG-PLA films were physiochemically evaluated by FTIR, DSC, TGA, and tensile testing. Results suggest that the obtained CLG-PLA films possess physicochemical properties suitable for potential application in soft tissue engineering, such as skin; however, the mechanical properties require further adjustments, since the elastic modulus of the films is above that reported for dermal tissue.

## INTRODUCCIÓN

Investigaciones recientes en el área de ingeniería de tejidos, buscan dar forma a nuevos biomateriales con estructuras complejas que posean propiedades específicas para su aplicación. Los polímeros representan una excelente alternativa para la creación de estos materiales ya que poseen características versátiles; pueden adoptar múltiples configuraciones geométricas y se puede producir con ellos mezclas con aditivos de diferente naturaleza para generar materiales compuestos con propiedades sinérgicas [1]. Entre los polímeros de interés clínico se encuentran los biopolímeros provenientes de fuentes renovables, que cuentan con ventajas como alta adherencia y vascularidad, biocompatibilidad y capacidad para controlar el metabolismo de las células implicadas en los procesos de reparación que permiten un restablecimiento total del tejido en corto tiempo [2], pero con deficiencias en funciones de barrera, baja resistencia mecánica y poca elasticidad. Dentro de estos biopolímeros, destaca la colágena (CLG), la cual se obtiene principalmente de origen porcino y bovino [3], sin embargo, la comunidad científica en la última década ha buscado fuentes alternativas para su extracción debido a cuestiones socio-culturales asociadas al rechazo por creencias religiosas y enfermedades de transmisión al humano como: la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) y la fiebre aftosa (FA) [4], además de los elevados costos de producción [5]. Recientemente, la CLG proveniente de fuentes marinas ha ganado atención debido a su alto contenido de CLG y a que se consideran una fuente más segura en comparación con la obtenida de animales terrestres; además, se ha demostrado que la CLG proveniente de organismos marinos comparte características similares con sus homólogos humanos [6].

Por otra parte, existen polímeros sintéticos de origen natural, como el poli ácido láctico (PLA), el cual cuenta con excelentes propiedades mecánicas, es de fácil transformación, biodegradable y tiene diversas aplicaciones biomédicas como: las suturas absorbibles, injertos de piel artificial, implantes ortopédicos y sistemas controlados de liberación de medicamentos [7]; sin embargo, carecen de señales moleculares para modular la actividad celular [8]. En este sentido, este trabajo se enfocó en la creación de una mezcla polimérica a través de la técnica de extrusión en fundido que permita la incorporación de CLG y PLA y posteriormente la creación de una estructura tridimensional y continua (película), con potencial aplicación en la ingeniería de tejidos. y, además, a través de la técnica de extrusión en fundido, con la finalidad de que pueda llevarse a cabo su producción a escalas mayores que con otras técnicas.

## CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Ingeniería de tejidos

El objetivo de la ingeniería tisular es reparar órganos y/o tejidos dañados. Se basa en tres pilares importantes: células, factores de crecimiento y andamios, (**Figura 1.1**), es un campo interdisciplinario que aplica los principios y métodos de la bioingeniería, la ciencia de los materiales, la química y la medicina, con el fin de desarrollar tejidos biológicos que restablecerán, mantendrán y mejorarán las funciones tisulares después del daño debido a una enfermedad o accidente por procesos traumáticos [9]. Los principios generales de la ingeniería de tejidos involucran la combinación de células vivas con un soporte natural/sintético o andamio para construir una matriz tridimensional que sea funcional, estructural y mecánicamente igual o mejor que el tejido que se reemplazará. La fuente celular óptima, el diseño de andamios, las pruebas *in vitro*, así como el uso y desarrollo de tecnología de fabricación para crear tejidos están siendo investigados actualmente [10 ,11].

Los andamios se construyen con materiales cuya naturaleza está acorde con la función de la estructura del órgano o tejido donde se vayan a implantar. En todos los casos, están constituidos de materiales que deben ser compatibles con el organismo receptor, así como poseer una determinada vida media para desarrollar su tarea y aportar las prestaciones necesarias para realizar adecuadamente la función a la que van destinados [12,13].

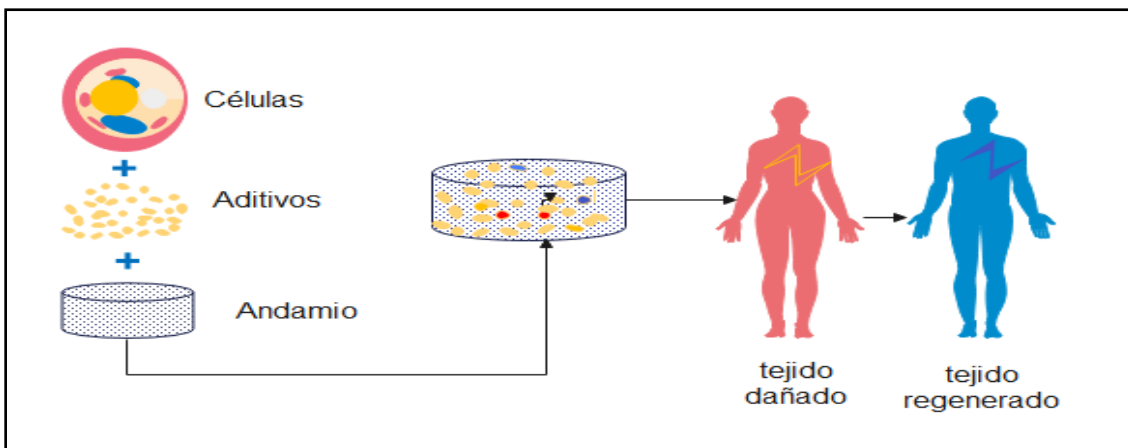


Figura 1.1. Esquema representativo del concepto de ingeniería de tejidos. Se muestran los 3 elementos principales de la triada de la ingeniería de tejidos. Elaboración propia, 2023.



### **1.1.1. 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, los cuales son implantados en el cuerpo temporal o permanentemente, que tratan de restaurar el defecto existente y, finalmente, conseguir la regeneración tisular [11]. Para el estudio y la evaluación de los biomateriales, es necesario implementar métodos de control de calidad, tanto de la estructura, propiedades mecánicas y de las interacciones a nivel interno y superficial, para poder verificar su función en un sistema biológico [13].

Entre las características que debe cumplir un biomaterial se encuentran; biocompatibilidad, no debe ser tóxico ni cancerígeno, debe ser estable químicamente y presentar una buena biodegradación, y resistencia mecánica (semejantes al tejido receptor) su diseño y tamaño debe adaptarse a la función que debe cumplir y al tejido en el que se va a implantar; además debe considerarse el precio de su fabricación, reproducibilidad y la capacidad de producción a escala. No obstante, lo anterior dependerá en gran medida de los materiales de partida, las técnicas de procesamiento empleadas, el rendimiento y la funcionalidad del biomaterial obtenido [1,11].

Existe una gran diversidad de materiales que se usan para la fabricación de biomateriales, entre ellos, se incluyen metales, cerámicos, vidrios, acero y diferentes polímeros. Así mismo en función de la respuesta del organismo, estos pueden ser clasificados como: inertes, bioactivos, reimplantados, biodegradables o no degradables [9].

### **1.2. Sustitutos dérmicos**

Los sustitutos dérmicos son un grupo de materiales diseñados para cubrir zonas en las que la estructura de la piel esté dañada, con el fin de suplir sus funciones durante el proceso de curación. De esta manera, además de favorecer las acciones anteriormente citadas, facilitan que se produzca una cicatrización estética y funcional. Las características básicas que debería reunir el sustituto dérmico ideal son las de ser biocompatible, producir baja antigenicidad, ser resistente, mantener la función de barrera de la piel, reducir el dolor de la herida, reducir las pérdidas de agua por evaporación, adaptarse a las superficies irregulares, ser de fácil manejo y fijación, poder

almacenarse durante largos períodos de tiempo de manera sencilla y ser de coste asequible [14, 15] . En función de su contenido en materiales orgánicos o inorgánicos, los sustitutos dérmicos pueden clasificarse como biológicos o sintéticos, asimismo pueden fabricarse a partir de compuestos que contengan tanto materiales naturales como sintéticos y que ayuden a fortalecer sus propiedades y cumplir con su función.

**Tabla 1.1. Principales sustitutos dérmicos comerciales disponibles en México (15)**

<b>Nombre Comercial</b>	<b>Composición y origen</b>	<b>Pros</b>	<b>Contras</b>
<b>Alloderm®</b>	Dermis acelular de origen humano y liofilizada.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmunológicamente inerte.</li> <li>• Posee una porosidad dérmica natural para la vascularización de las heridas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso de dos etapas.</li> <li>• Existen riesgos de transmitir enfermedad.</li> <li>• Es costoso</li> </ul>
<b>Biobrane®</b>	Película de silicón con una matriz 3D de nylon y cadenas de péptidos de CLG I.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso de una sola etapa.</li> <li>• Es bueno para cubrir heridas parciales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intolerante a la contaminación de heridas.</li> </ul>
<b>Integra® DRT</b>	Matriz de CLG bovina inmersa en glucosaminoglicano y recubierta por una capa de silicón.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resultados estéticos y funcionales a largo plazo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso de dos etapas.</li> <li>• Altos costos.</li> <li>• Mala adhesión. Vulnerabilidad a infecciones y pérdida del injerto.</li> </ul>

<b>CellSpray</b>	Suspensión celular de queratinocitos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite abarcar heridas periféricas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Riesgo de infección o de rechazo.</li> </ul>
<b>Epícel</b>	Lámina conformada por queratinocitos de la paciente adherida a un soporte de petrolato.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede cubrir hasta un 30% del área corporal.</li> <li>• Se puede aplicar a marcas de nacimiento.</li> <li>• Riesgo de rechazo casi nulo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiempo de elaboración largo.</li> </ul>
<b>TissueTech</b>	Fibroblastos y queratinocitos del paciente crecidos en membranas microperforadas de ácido hialurónico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tasas bajas de recurrencia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Implica el injerto de 2 productos, por lo que puede ser difícil de usar en un entorno clínico.</li> </ul>
<b>TransCyte</b>	Matriz de CLG y nylon incrustado con fibroblastos de prepucio neonatal.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disponibilidad inmediata.</li> <li>• Fácil almacenamiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solución temporal.</li> <li>• Debate ético sobre la fuente de los fibroblastos.</li> </ul>
<b>Dermagraft</b>	Fibroblastos de prepucio neonatal inmersos en una matriz de poligalactina.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil aplicación en heridas crónicas y úlceras diabéticas.</li> <li>• No hay riesgo de rechazo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede generar infecciones y celulitis.</li> <li>• Debate ético sobre la fuente de los fibroblastos.</li> </ul>
<b>Permacol</b>	Dermis acelular de cerdo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Buenos resultados estético-</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propensión a infecciones, seromas y</li> </ul>

		funcionales.	hematomas.
<b>Apligraf</b>	Matriz de CLG bovina incrustada de fibroblastos de prepucio neonatal y queratinocitos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Buenos resultados en tratamiento de úlceras venosas y de pie diabético.</li> <li>• Gran mejoría a las 4 semanas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiempo de vida corto (5-10 días).</li> <li>• Costoso.</li> <li>• Riesgo de infecciones mínimo.</li> <li>• Debate ético sobre la fuente de los fibroblastos.</li> </ul>

### 1.3. Polímeros

Un polímero es una macromolécula, formada por moléculas más pequeñas conocidas como monómeros, los cuales se encuentran unidos mediante diversos enlaces químicos. El uso de los polímeros es ampliamente conocido en distintos campos para cumplir con diversas aplicaciones que permiten la creación de materiales para satisfacer necesidades específicas [16]. Debido a sus propiedades versátiles, estos materiales han ganado popularidad en la industria y en diversas aplicaciones que facilitan la vida del ser humano, como es el caso de los biopolímeros, los cuales hacen referencia a polímeros que tienen la particularidad de ser biocompatibles con el organismo; normalmente se obtienen por fermentación o polimerización química, a partir de sistemas biológicos como: plantas, animales o microorganismos, así como de fuentes renovables. En la actualidad es posible encontrar también polímeros sintéticos con características de biocompatibilidad y biodegradación, las cuales son útiles en campos como la ingeniería de tejidos [17].

### 1.3.1. Clasificación

Los polímeros pueden clasificarse de muchas maneras: dependiendo de su origen, por su estructura, por su conformación, en función de sus propiedades físicas, etc.

Atendiendo a su origen, pueden ser naturales (provenientes de recursos renovables) o sintéticos [18], por su estructura se pueden distinguir entre polímeros amorfos y semicristalinos. Mientras que los polímeros amorfos no poseen orden en su estructura, los polímeros semicristalinos, presentan un ordenamiento periódico. De acuerdo con su estructura química pueden distinguirse en: homopolímeros o copolímeros [18–20] dependiendo de si poseen el mismo tipo de monómeros o no; por otra parte, debido a sus propiedades térmicas los polímeros pueden ser termoplásticos (**Figura 1.2**) o termoestables; mientras que los termoplásticos permiten moldearse varias ocasiones después de fundirse, los polímeros termoestables solo permiten una conformación después de haberse fundido [21].

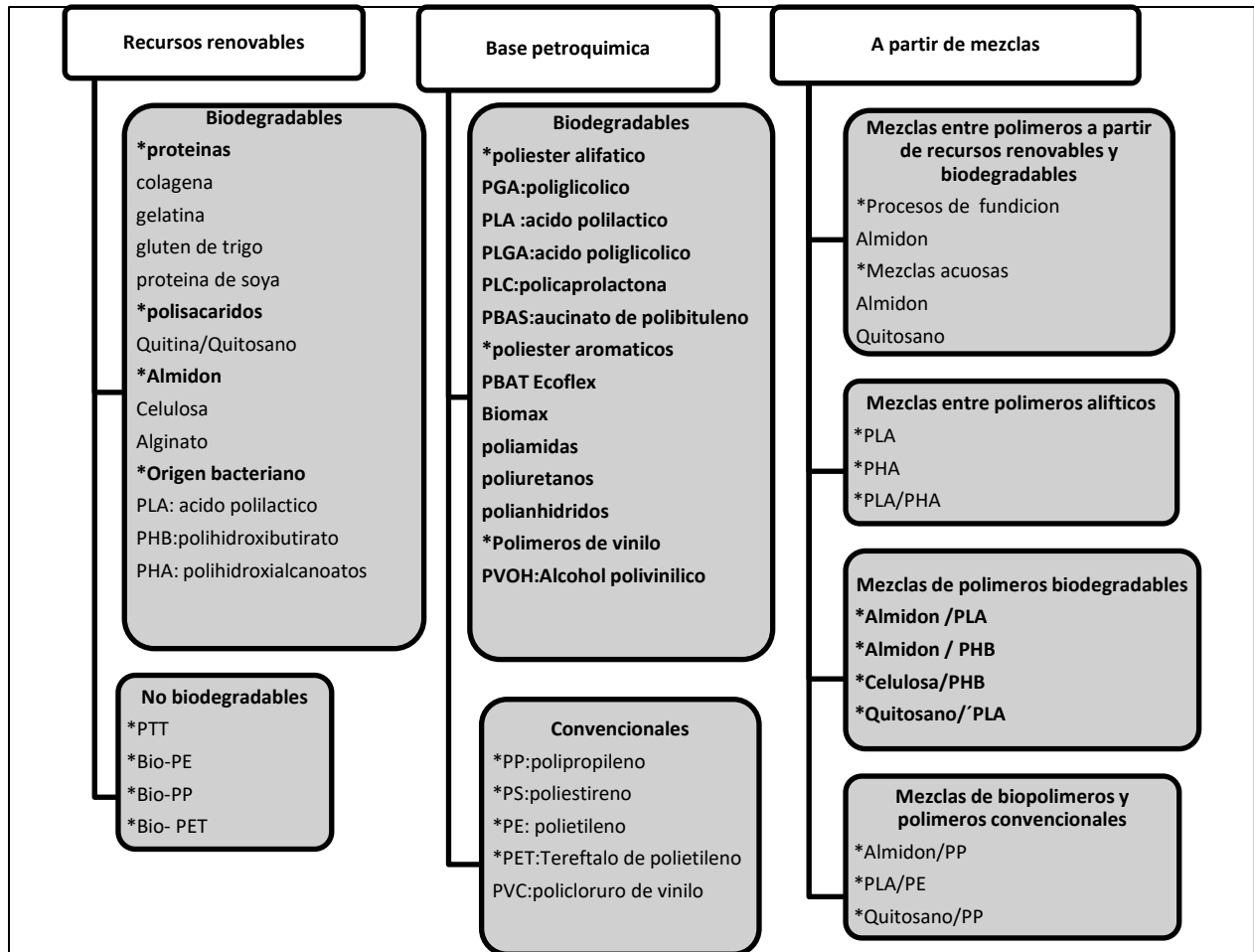


Figura 1.2. Clasificación de los polímeros termoplásticos. Se muestra la clasificación según su método de producción, biodegradabilidad y mezclas [20].

### 1.3.1.1. Polímeros sintéticos y biopolímeros

Los polímeros sintéticos se han caracterizado por su versatilidad, maleabilidad, facilidad de procesamiento, baja densidad; además, tienen buenas propiedades mecánicas, estabilidad térmica, resistencia química y a la humedad [22]. En contraste, los biopolímeros son frágiles, y de baja resistencia térmica y a la humedad [23]. La mezcla de biopolímeros y polímeros sintéticos proporciona materiales con mejores propiedades pues se puede aumentar la biocompatibilidad y la biodegradabilidad, mientras se mantienen las propiedades térmicas y mecánicas con importantes reducciones de costos [18].

Cuando el principal objetivo es la biodegradabilidad, las mezclas están basadas en biopolímeros como la CLG, la gelatina, el quitosano, el almidón y polímeros sintéticos, como el PLA, el poliácido glicólico (PGA) y la poli caprolactona (PCL). La industria biomédica es la principal demandante de estos materiales llamados también bioartificiales/biosintéticos o plásticos híbridos [24].

### **1.3.1.2 Polímeros biodegradables**

Un polímero degradable, se descompone por completo en el medio ambiente, transformándose en sustancias simples como agua, dióxido de carbono y biomasa, las cuales son asimiladas por el medio ambiente [24,25]; asimismo, dependiendo de su origen, los polímeros biodegradables pueden clasificarse como: polímeros de origen natural (extraídos de animales, vegetales o bacterias), por ejemplo la CLG ,y como polímeros sintéticos (presentan facilidad de procesamiento y economía de los procesos) algunos ejemplos son PLA, PVA, PCL. De igual manera, existen mezclas a partir de la combinación de un polímero natural y uno sintético, las cuales presentan propiedades interesantes como mejorías mecánicas y control de degradación, además de que se disminuyen sus costos de producción.

## **1.4. Colágena**

La CLG es un biopolímero degradable de origen natural, ha sido uno de los materiales más utilizados en medicina para reparar daños o trauma químico-mecánico en diferentes tejidos, debido a su biocompatibilidad y su capacidad para promover la cicatrización de heridas, es uno de los iniciadores primarios de la cascada de coagulación y por tanto puede emplearse como un agente hemostático. Esta proteína estructural representa, en los mamíferos, 30% de las proteínas totales del organismo, más del 90% de la proteína extracelular en el tendón y el hueso, y más del 50% en la piel [26]. Tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad biológica y estructural de la matriz extracelular (MEC), además de otras funciones dependiendo del tejido en cuestión. Debido a su capacidad de unión, podrían servir como sistemas de liberación controlada, del mismo modo, la capacidad de formación de redes y la función de anclaje de ciertos

tipos de CLG podrían contribuir a la formación de andamios que promueven la reparación o regeneración de tejidos [6,27].

#### **1.4.1. Estructura**

La estructura de la CLG (**Figura 1.3**) se divide en dos segmentos: la parte central (helicoidal) y la parte no helicoidal, conocida como telopéptido correspondiente a los extremos terminales de la cadena (N-terminal y C-terminal). Su estabilidad se debe principalmente a los entrecruzamientos intermoleculares, además, los residuos de prolina, a menudo se modifican a hidroxiprolina [27,28]. La unidad básica estructural de la CLG es la tropocolágena la cual está constituida por tres cadenas polipeptídicas del mismo tamaño y de composición idéntica o no, según el tipo de CLG. En su mayoría se compone de tres cadenas polipeptídicas que adquieren una conformación de hélice levógira que se encuentra tan empaquetada que cada tercer residuo debe ser una glicina. Las otras dos posiciones se encuentran ocupadas por el aminoácido prolina. En la posición Y, la prolina es transformada en 4-hidroxiprolina, lo cual juega un papel esencial en la estabilización de la triple hélice de la CLG, ya que se forman enlaces de hidrógeno entre el grupo hidroxilo y el agua, lo cual es necesario para soportar las temperaturas corporales sin degradarse [29]. Este dominio de triple hélicoidal es la característica común que comparten las 28 proteínas de esta familia, llegando a abarcar de 10 a 96% de la estructura total de la CLG. Cada tipo de CLG tiene una composición diferente en sus cadenas (denominadas  $\alpha$ ) y en su estructura cuaternaria, de manera que algunas CLGs se encuentran constituidas por homotrímeros (tres cadenas  $\alpha$  iguales) o heterotrímeros (2 cadenas  $\alpha$  iguales y una diferente o tres cadenas  $\alpha$  diferentes) [28]. La CLG, se caracteriza principalmente por su notable resistencia, una fibra de 1 mm de diámetro puede soportar una carga de 10 a 40 kg [29].



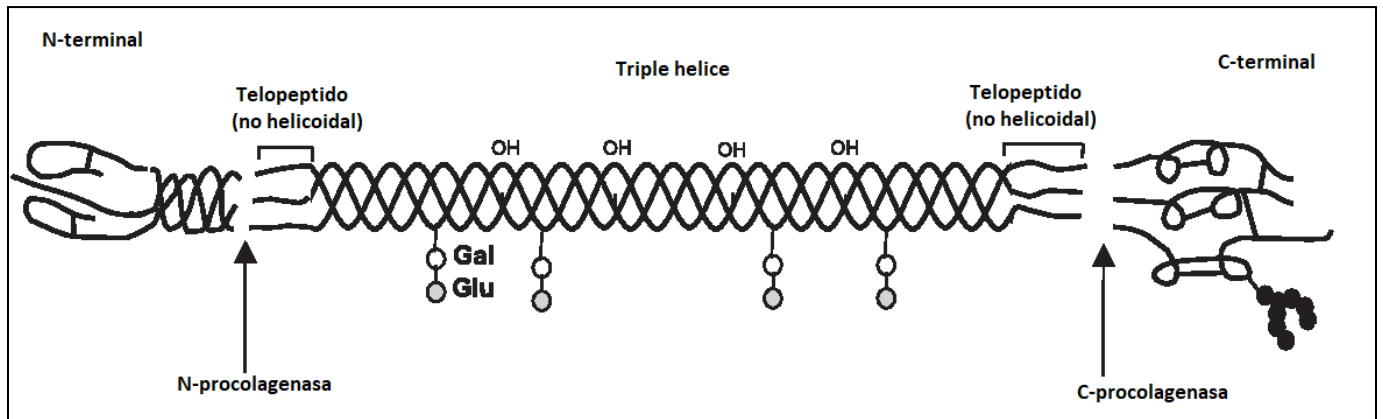


Figura 1.3. Estructura molecular de la CLG [27].

### 1.4.2. Clasificación

Según su estructura y organización supramolecular se pueden encontrar al menos, 28 tipos de CLG que dependen, entre otros factores, del tejido en el que actúe y de las sustancias con las que se combine [28]. De igual manera se pueden agrupar en CLGs formadoras de fibrillas, CLGs asociadas a las fibrillas (FACIT), CLGs formadoras de redes, fibrillas de anclaje, CLGs transmembranales, CLGs de membrana basal y otras con funciones únicas. Aunque la mayor parte del andamiaje del cuerpo está compuesto de CLG, el espectro de CLG varía de tendones de Aquiles a la córnea. Por lo tanto, los diferentes tipos de CLG son necesarios para conferir características biológicas distintas a los diversos tipos de tejidos (**Figura 1.4**) [30].

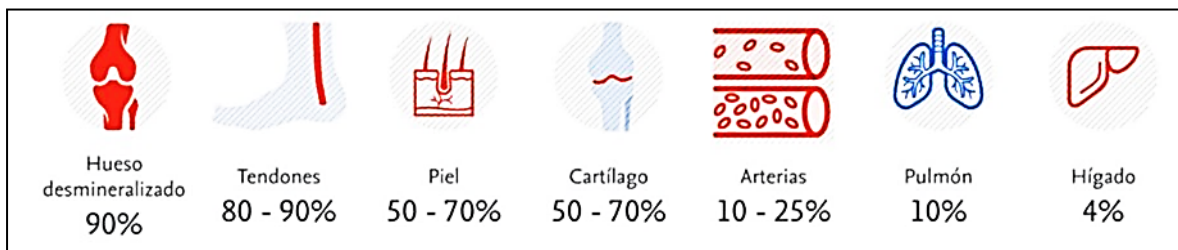


Figura 1.4. Contenido aproximado de colágena en diferentes tejidos.

### **1.4.2.1. Colágena tipo I**

La CLG tipo I, pertenece a la subfamilia de CLGs formadoras de fibrillas, dentro de la cual también se encuentran las CLGs tipo I, II, III, V y XI. Las fibrillas se forman en la MEC y su función es proveer rigidez, resistencia a la tracción y rigidez torsional. En particular, la CLG-I, exhibe un patrón de estrías cruzadas con una periodicidad característica de 65-67 nm, observable en micrográficas electrónicas. Este tipo de CLG, es la proteína más abundante y mejor caracterizada, y consiste en 2 cadenas  $\alpha 1$  (I) idénticas y de una cadena  $\alpha 2$  genéticamente diferente. Esta forma representa cerca del 90% de la CLG en el cuerpo y es el mayor componente de CLG de la córnea, conjuntiva, piel, esclera, hueso y tendón [31].

### **1.4.3. Degradación**

Se pueden considerar tres rutas principales de degradación de la CLG; desnaturalización molecular, hidrólisis y oxidación [30]. La desnaturalización de esta proteína sucede con el aumento de la temperatura, la fibra nativa de la CLG se encoge de un tercio a un cuarto de su longitud original cuando se calienta a aproximadamente 65 °C. La estructura helicoidal de la molécula de CLG se colapsa en cadenas aleatorias al calentarla con una temperatura de desnaturalización muy aguda. Las moléculas en forma de varilla en solución se desnaturalizan a aproximadamente 40 °C para la piel de bovino y humano, pero pueden oscilar entre 15 °C y 50 °C para organismos marinos; esta variación se correlaciona con la proporción de hidroxiprolina en la muestra particular. En general, la desnaturalización de la CLG fibrosa ocurre a 65 °C aproximadamente [32].

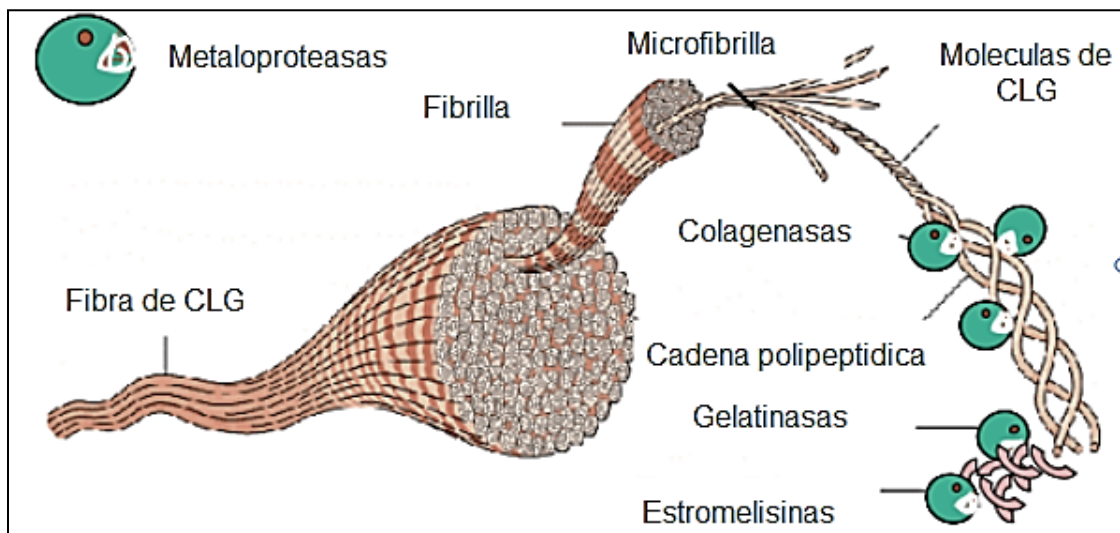
En cuanto a la oxidación de las moléculas de CLG, ésta tiene un efecto sobre las cadenas laterales de los aminoácidos, generando reducción del número de aminoácidos básicos como arginina, hidroxilisina y lisina, y un aumento en el número de aminoácidos como el ácido glutámico y el ácido aspártico. Por lo tanto, la oxidación de CLG, puede ser causada por la presencia de radicales libres, los cuales están formados por la interacción de agua y luz ultravioleta [30].

Por otra parte, la hidrólisis puede ser provocada por ácidos, presentes más comúnmente de la atmósfera. Los ácidos actúan junto con el agua para provocar una escisión en la cadena principal de la molécula de CLG. La hidrólisis del enlace peptídico afecta simultáneamente a todas las

fibrillas a lo largo de la masa de CLG, se produce en posiciones aleatorias a lo largo de las cadenas de polipéptidos [33].

### 1.4.3.1. Biodegradación

A pesar de que la CLG, debido a su inusual estructura, es relativamente inerte a las sustancias químicas y ataque enzimático durante largos períodos de tiempo, puede sufrir degradación enzimática por parte de metaloproteinasas (MMPs), presentes en el cuerpo humano. Por este motivo, la CLG se ha estudiado para su aplicación en biomedicina; a pH neutro, solo las colagenasas específicas rompen la hélice nativa en una posición, aproximadamente a tres cuartos de la estructura, partiendo desde el extremo N-terminal. Los diversos tipos de CLG muestran diferente susceptibilidad a la degradación colagenolítica. La colagenasa I (MMP-1) degrada CLG tipo III, mientras que el tipo MMP-8 es más eficaz degradando CLG tipo I. La colagenasa III (MMP-13) degrada CLG tipo II [34].



**Figura 1.5. Representación de la acción de las metaloproteinasas sobre la estructura de la CLG. Las metaloproteinasas son capaces de actuar sobre la triple hélice helicoidal de la fibra de CLG y degradarla. Los productos resultantes de la acción de las colagenasas se desnaturalizan rápidamente en gelatina, la cual es a su vez susceptible de las gelatinasas y las estromelisinias [36].**

Por otra parte, existen otro tipo de metaloproteinasas, conocidas como gelatinasas, las cuales tienen un papel importante en la degradación final de la CLG, una vez que estas se han

modificado por colagenasas. La gelatinasa A (MMP-2) rompe CLGs tipo IV, V, I, mientras que la gelatinasa B (MMP-9) rompe CLGs I, II, IV y V. De igual manera las estromelisininas son capaces de degradar una amplia gama de CLGs, elastina, laminina, gelatina y proteoglicanos, como se ve representado en la **Figura 1.5**. Particularmente en la piel, existen diversos eventos que producen el aumento de las MMPs como son: la reparación de heridas y el envejecimiento, así como enfermedades de fibrosis e invasión tumoral [35].

#### **1.4.4. Biocompatibilidad**

La CLG es conocida por su excelente biocompatibilidad debido a su baja toxicidad y sus bajas reacciones inmunogénicas, existe una similitud en la secuencia de aminoácidos en las especies y hay un escaso contenido de compuestos aromáticos. Sin embargo, los animales y los humanos pueden producir anticuerpos contra tres determinantes antigénicos en la molécula de CLG: los cuales están ubicados en la región telopéptica no helicoidal (determinantes P), el determinante central presentado por la secuencia de aminoácidos en la sección helicoidal, y la estructura terciaria de triple hélice conocida como determinantes helicoidales (A-). La importancia de cada determinante depende de la naturaleza y el procesamiento de los productos de CLG; la respuesta inmunogénica depende de la estructura de CLG, así como de la técnica de prueba y de la especie utilizada, en este sentido, experimentos realizados en con animales, han mostrado reacciones de eritema, hinchazón y prurito, en la aplicación de CLG inyectable, estas respuestas fueron notadas en el 3% de los pacientes, por lo que a pesar de las preocupaciones teóricas sobre la respuesta inmunológica, la CLG derivada de animales, se considera inmunogénicamente segura y ligeramente antigénica, por lo que es adecuada para su uso como biomaterial [34].

### 1.4.5. Fuentes de obtención de CLG

La CLG utilizada en la industria biomédica, proviene, principalmente, de los bovinos y porcinos, ésta presenta dificultades y son inapropiadas para muchos grupos religiosos y étnicos debido a limitaciones socioculturales además de que existen otro tipo de limitaciones como son los costos de obtención de CLG de bovinos, ya que se ve afectado por el alto valor que tiene el levante de este tipo de animales de consumo humano. Lo anterior ha incentivado el aprovechamiento de fuentes alternativas de CLG más seguras y saludables, como son algunas especies marinas o los subproductos provenientes de su industrialización, como la piel, cartílago, escamas y huesos [28].

#### 1.4.5.1 Colágena marina

Se pueden definir tres categorías principales de CLGs marinas: CLGs de origen invertebrado, CLGs de peces y CLGs de mamíferos marinos. Los genes tipo I, II, V, XI y XVIII que codifican CLGs se han identificado en peces [39] El número de secuencias publicadas todavía es limitado, pero actualmente existen secuencias adicionales disponibles en las bases de datos. La comparación entre las secuencias de CLG de peces y de tetrápodos indica que las principales características de las CLGs se conservaron durante la evolución de los vertebrados. En la piel y el tejido conjuntivo intramuscular de los peces, las CLGs de tipo I y V se han identificado como CLG mayor y menor, respectivamente [6, 37]. Asimismo, existen estudios que asocian CLGs de origen invertebrado con especies de medusas y corales, entre las que podemos mencionar: *Nemopilema nomurai*, *Aurelia aurita*, *Stomolophus nomurai*, *Cassiopeia andromeda*, *Stomolophus meleagris* y coral *Sarcophyton ehrenbergi*, identificando principalmente CLGs Tipo I, II y III [6].

Se ha encontrado que la distribución de aminoácidos de la CLG marina es similar a la proveniente de los mamíferos, pero con menores cantidades de prolina e hidroxiprolina y altos valores de serina, treonina, y en algunos casos metionina. Así mismo, se ha demostrado que la CLG, proveniente de organismos marinos, presenta una menor temperatura de desnaturalización lo cual se relaciona con el menor contenido de aminoácidos [6].

La CLG obtenida de fuentes marinas ha demostrado ser biocompatible en ensayos *in vitro* con diversas estirpes celulares (fibroblastos humanos, células endoteliales, etc.). Derivado de estas

investigaciones, se ha incrementado el desarrollo de metodologías alternativas, utilizando diversas fuentes de biopolímeros de origen marino [37].

#### **1.4.6. Proceso de extracción de colágena.**

La CLG se puede obtener básicamente por hidrólisis química e hidrólisis enzimática [38]. La hidrólisis química se usa más comúnmente en la industria, pero los procesos biológicos que usan la adición de enzimas son más prometedores cuando se requieren productos con alto valor nutricional y funcionalidad mejorada. Además, los procesos enzimáticos generan menos residuos y pueden reducir el tiempo de procesamiento, pero son más caros. Para extraer la CLG es necesario eliminar numerosos enlaces covalentes intra e intermoleculares, que involucran principalmente residuos de lisina e hidroxilisina, enlaces éster y otros enlaces con sacáridos, todo lo cual hace que el proceso sea bastante complejo [28]. Antes de poder extraer la CLG, se realiza un tratamiento previo mediante un proceso ácido o alcalino, que varía según el origen de la materia prima. El tratamiento previo se utiliza para eliminar sustancias no colagénicas y para obtener rendimientos más altos en el proceso. Los métodos de extracción más utilizados se basan en la solubilidad de la CLG en soluciones salinas neutras, soluciones ácidas y soluciones ácidas con enzimas añadidas [28].

#### **1.5. PLA (poliácido láctico)**

El PLA, es un biopolímero termoplástico, biodegradable, biocompatible y con propiedades de barrera. Este biopolímero se ha encontrado numerosas aplicaciones, entre ellas en el área biomédica, ya que presenta un amplio rango de propiedades. En el área de los biomateriales, se ha utilizado para las siguientes aplicaciones: producción de hilo para sutura, implantes, cápsulas para la liberación controlada de fármacos y prótesis. El PLA es un poliéster termoplástico que forma parte de los  $\alpha$ -hidroxiácidos; su precursor es el ácido láctico, una molécula quiral. A diferencia del isómero D (-), la configuración L (+) es metabolizada por el organismo humano [39], este polímero presenta propiedades similares a las de algunos termoplásticos tradicionales, como el polietileno y el polipropileno [40].

### .1.5.1. Estructura

Este poliácido posee un grupo funcional llamado grupo carboxilo (-COOH) y se produce cuando coinciden sobre el mismo carbono un grupo hidroxilo (-OH) y carbonilo (C=O). La presencia de un carbono quiral en la molécula de ácido láctico permite la existencia de dos isómeros (**Figura 1.6**); L-isómero y D-isómero, y una modificación racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L (+) y D(-) [40].

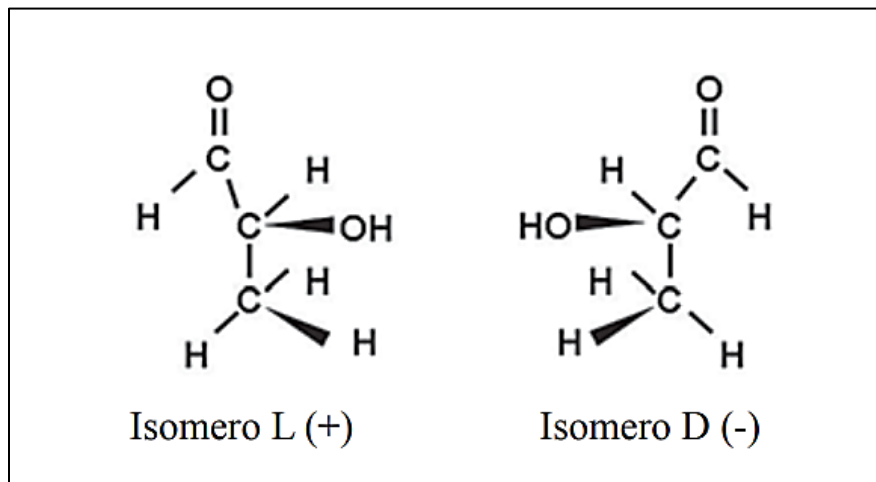


Figura 1.6. Isómeros del ácido láctico [39].

### 1.5.2. Propiedades físicas y mecánicas

Las propiedades físicas y mecánicas dependen de la composición del polímero, de su peso molecular y de su cristalinidad. Una forma cristalina (en su mayor parte compuesta de forma L láctico) y de alto peso molecular, garantiza una reabsorción larga; formulaciones diferentes y la adición de radicales en las cadenas, permiten controlar o modelar la velocidad de reabsorción.

El PLA se puede sintetizar para ser rígido o flexible y puede ser copolimerizado con otros materiales dependiendo del proceso específico para el que se requiere como el moldeo por inyección o soplado, termoformado y, extrusión de películas y/o fibras. Al compararlo con otros termoplásticos, posee una temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) elevada (52 - 60) °C y una temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) bastante baja (145 - 177) °C (24). El PLA, tiene propiedades mecánicas en el mismo rango de los polímeros petroquímicos, a excepción de una baja

elongación. Sin embargo, esta propiedad puede ser mejorada durante la polimerización (por copolimerización) o por la adición de plastificantes [20].

La resistencia al agua y al CO<sub>2</sub> del PLA es bastante buena, la resistencia al O<sub>2</sub> es considerada buena; Además, los productos a base de PLA pueden ser sometidos a esterilización con rayos gamma y son estables cuando se exponen a los rayos ultravioleta [39].

### **1.5.3. Métodos de obtención**

Su proceso implica la extracción de los azúcares (principalmente dextrosa, glucosa y sacarosa) del almidón de la remolacha, maíz o del trigo y después fermentarlo con ácido láctico [24].

El PLA puede ser preparado por policondensación o por polimerización por apertura de anillo (ROP) [20]. La polimerización por condensación es el método más barato, pero es complicado obtener un PLA de alto peso molecular y libre de disolvente por esta ruta, además por este método tienen lugar muchas reacciones paralelas. El proceso (**Figura 1.7**) se da en tres etapas; en primer lugar, se elimina el agua obtenida al producirse los oligómeros a partir de los monómeros de ácido láctico, en la segunda etapa, el paso determinante es la reacción química entre los oligómeros, que dependiendo del catalizador que se emplee dará lugar a un PLA de un peso molecular determinado. Por último, en la tercera etapa nuevamente se elimina el agua que se ha vuelto a producir en la condensación de los oligómeros, finalmente el polímero obtenido se enfría por debajo de su temperatura de fusión para favorecer su cristalización. Por otra parte, la ROP es el método más empleado para obtener PLA de alto peso molecular; el proceso también consta de tres etapas; policondensación, despolimerización y por último la polimerización por apertura de anillo. Requiere varios pasos de purificación lo que encarece el método, pero las propiedades finales del PLA obtenido son mejores [20].



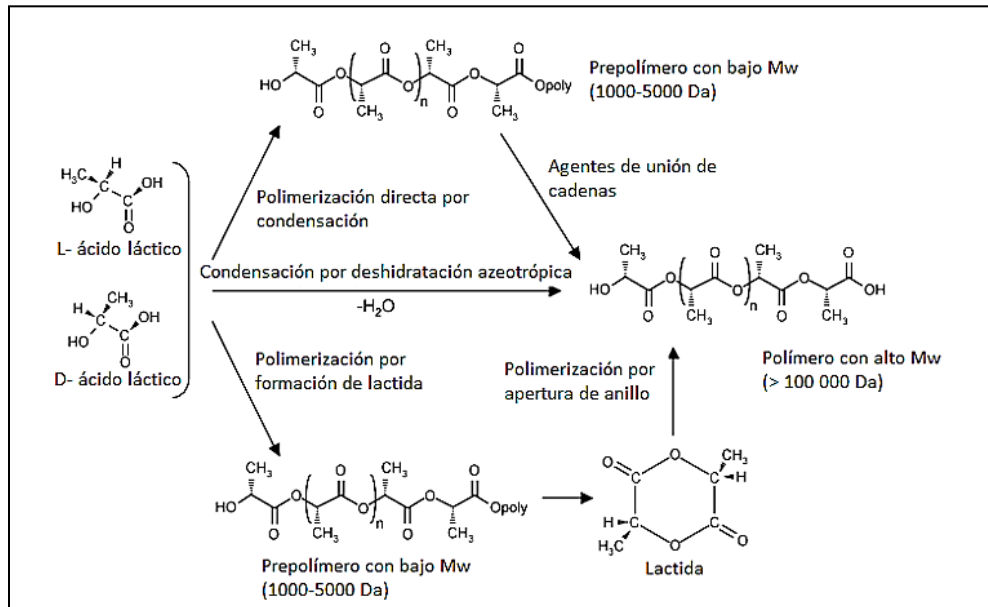


Figura 1.7. Mecanismos de obtención del PLA [20].

#### 1.5.4. Degradación

El PLA es altamente susceptible a la degradación térmica, oxidativa e hidrolítica, lo cual puede ocurrir durante procesos como la inyección y/o la extrusión. La degradación térmica es muy compleja y existen varios mecanismos postulados, incluyendo varias reacciones que involucran la formación de radicales, los cuales provienen de reacciones de escisión de cadenas, despolimerización, degradación oxidativa, hidrólisis, eliminación pirolítica entre otros. La degradación del PLA es menos severa si la cristalinidad es elevada, si el contenido de L-PLA es alto y si el peso molecular es elevado [39].

Durante el procesamiento del PLA a gran escala en líneas de producción, que involucran la extrusión, el polímero debe mantener una estabilidad térmica adecuada para evitar la degradación de sus propiedades, para lo cual debe eliminarse la humedad presente en el material antes de ser procesado.

### 1.5.5. Biocompatibilidad, biodegradación y excreción PLA

El PLA es un polímero biodegradable ampliamente utilizado en aplicaciones clínicas. Esto se debe en gran medida a la biocompatibilidad que exhibe y a que los productos de su degradación no son tóxicos. Una vez que entra en contacto con los medios biológicos, el polímero comienza a descomponerse, generalmente por hidrólisis, en ácido láctico (LA), CO<sub>2</sub> y agua. Estos productos se metabolizan intracelularmente o se excretan en la orina y la respiración. La reacción de inflamación a cuerpo extraño promueve la degradación de PLA, a través de la secreción de enzimas que degradan la matriz polimérica. La biodegradación ocurre tanto en la superficie del material polimérico como dentro del cuerpo del polímero, por difusión de agua entre las cadenas de éste. La vida media del polímero bajo estas condiciones es de 30 semanas; sin embargo, esto puede ser alargado o acortado para abordar las necesidades, mediante la adición de un mayor contenido del monómero (L) o (D) del LA [41].

El mecanismo principal por el cual el PLA se degrada dentro del cuerpo es mediante la hidrólisis de la cadena principal del enlace éster. Los microorganismos (hongos y bacterias) colonizan la superficie del polímero y son capaces de segregar enzimas que rompen en pequeños fragmentos el polímero; la colonización de la superficie depende de factores tales como la tensión superficial, porosidad y textura superficial, así como de la accesibilidad a las cadenas del polímero. Los grupos hidrófilos de las enzimas (-COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>) atacan los grupos éster de las cadenas del polímero mediante reacciones de hidrólisis seguida por reacciones de oxidación, de esta forma, reducen el polímero a fragmentos de peso molecular inferiores a 500 g/mol, los cuales pueden ser digeridos por los microorganismos. Las reacciones enzimáticas, ocurren generalmente en medio acuoso. Las condiciones necesarias para que se pueda producir el proceso de biodegradación son: presencia de microorganismos, oxígeno, humedad, nutrientes minerales, temperatura entre 20 a 60 °C, dependiendo del microorganismo y pH entre 5-8 [42].

Por otro lado, cuando cualquier material polimérico se implanta en el cuerpo, se activa la respuesta inmunológica a cuerpo extraño. Las células inmunes migran hacia el lugar de la implantación para detectar, poner en cuarentena y retirar el objeto extraño. Estas células, incluyen a los neutrófilos, macrófagos y fibroblastos, los cuales secretan una serie de enzimas, como la fosfatasa ácida y la lactato-deshidrogenasa, que potencian la degradación de PLA [43].

En general, solo el 0.2% de los procedimientos que involucran implantes de PLA presentan una reacción de cuerpo extraño, como resultado de la nueva interacción del tejido y el dispositivo en el sitio de implantación [44].

### 1.6. Extrusión en la generación de biopelículas

El proceso de extrusión es uno de los más importantes en la industria de la transformación de plásticos. ya que se puede obtener una amplia la variedad de productos mediante esta técnica, como son: tuberías, flejes, perfiles, botellas, películas, etc. Asimismo, se utiliza en la preparación de mezclas, concentrados y formulaciones, que posteriormente son utilizados en otros procesos de transformación [50].

Básicamente, consiste en transportar, fundir, homogenizar y bombear un material plástico a través de un dado donde adquiere su forma final. Este proceso requiere de una alimentación continua del material termoplástico ya sea en polvo o en pellet, mediante un tornillo sin fin o husillo, el material fluye dentro del barril que se encuentra bajo un perfil de calentamiento, donde el material que es transportado por el husillo se funde o reblandece dependiendo de la naturaleza del material, saliendo posteriormente a través de un dado, cuya geometría dará la forma final al producto extruido. Un extrusor debe disponer de un sistema de alimentación del material, un sistema de fusión-plastificación, un sistema de bombeo y presurización (**Figura 1.8**), que habitualmente generará también un efecto de mezclado y finalmente, el dispositivo para dar forma al material fundido [53].

Las etapas del proceso de extrusión son: 1) Plastificación del material de partida (pellet o polvo), 2) paso del material plastificado a través de una boquilla que le dé la forma deseada, 3) Solidificación con la forma deseada, 4) Bobinado o bien cortado en unidades [51].

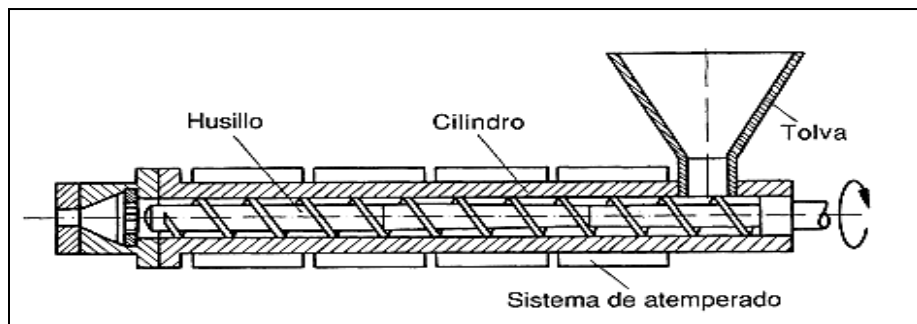


Figura 1.8. Esquema general de una extrusora

### 1.6.1. Tipos de extrusión y clasificación

Existen dos métodos de extrusión: por pistón y por husillo. En la extrusión por pistón el material se extruye a través de una boquilla al ser empujado por un pistón, mientras que en extrusión de husillo se usa un tornillo que gira en el interior de un cilindro caliente [50].

Los pellets del material se alimentan por una tolva situada en uno de los extremos y se desplaza a lo largo del cilindro conforme gira el tornillo; el fundido del polímero ocurre durante el desplazamiento por el contacto con las paredes calientes y por el calor que se genera por fricción. Finalmente, el polímero fundido es forzado a atravesar la boquilla situada a la salida del extrusor y de esta manera adquiere su forma final [50].

Existen dos configuraciones para las extrusoras por husillo: la extrusora monohusillo y la extrusora de doble husillo. La configuración monohusillo se utiliza en procesos de transformación de plásticos, y alimenta de forma continua el material fundido para dar forma al producto; el husillo puede contener además de las zonas de transporte, alguna zona de mezclado con el fin de lograr la correcta incorporación de pigmentos y/o aditivos. Este tipo de extrusores puede ser empleado de forma individual o en conjunto, para realizar procesos de co-extrusión para la obtención de película soplada y/o película plana, tubería y fibras. Por otra parte, el extrusor doble husillo permite procesar grandes volúmenes, manteniéndolos constantes para lograr un producto homogéneo, los 2 husillos tienen configuración idéntica, la cual puede contener secciones de transporte, mezclado, mezclado distributivo, mezclado intensivo y presurización, las cuales pueden ser intercambiables, para lograr diferentes efectos durante procesos de mezclado; este tipo de extrusor está diseñado principalmente para realizar mezclas de polímeros compatibles o no, mezclas de polímeros con rellenos convencionales en altas concentraciones, mezclas de polímeros con aditivos para generar compuestos poliméricos para aplicaciones específicas, son más versátiles en cuanto a su modo de operación, ya que ambos husillos pueden girar en sentido horario (co-rotatorio) o sentido anti horario (contra rotatorio) [52].

## **1.7. Estrategias para mejorar las propiedades del PLA y la CLG**

El PLA tiene propiedades favorables para su aplicación en el campo biomédico, entre las que se encuentran su biocompatibilidad, biodegradabilidad, buena procesabilidad y propiedades mecánicas. Sin embargo, su uso en la medicina regenerativa está limitado debido a su dificultad para la adhesión y proliferación celular, así como la liberación de subproductos durante el proceso de degradación. Con el fin de contrarrestar estos inconvenientes y aumentar la bioactividad, ha surgido una variedad de métodos [53]. Por otra parte, considerando que la CLG es una proteína, se sabe que las proteínas suelen tener una Tg bastante alta, la mayoría de sus aminoácidos tienen cadenas laterales grandes, lo que dificulta la rotación disminuyendo así la flexibilidad de la cadena. También los diversos aminoácidos pueden formar enlaces intermoleculares, aumentando aún más la Tg [54].

## **1.8 CLG y PLA en la regeneración dérmica**

Actualmente, existen diferentes investigaciones orientadas a la creación de biomateriales que puedan ser capaces de regenerar tejido dérmico dañado, éstas se basan en diferentes enfoques y técnicas, así como en el uso tanto de polímeros naturales como de polímeros sintéticos.

Como se ha mencionado anteriormente, dentro de los polímeros naturales de mayor importancia en el área de ingeniería de tejidos, se encuentra la CLG, con excelentes propiedades biológicas que permiten el crecimiento celular; las aplicaciones de la CLG como biomaterial son muy variadas [34]. En forma de membranas o películas se utiliza como sustitutivo de la córnea, en membranas para hemodiálisis, en membranas de oxigenación, en piel artificial, en reparación de hernias, cartílagos y tendones. En forma de esponja se utiliza en el tratamiento de lesiones de la piel, en la sustitución de huesos y como disoluciones o geles se usa como transportador de fármacos o como inyectable en cirugía plástica y, en forma de fibras, como material de sutura, componente artificial de vasos sanguíneos, componentes de válvulas cardíacas y como agente hemostático [55]. Asimismo, existen investigaciones acerca del uso de CLGs marinas para aplicaciones biomédicas, las cuales han presentado buenos resultados de biocompatibilidad y similitud con respecto a las CLGs humanas. En la piel y el tejido conjuntivo intramuscular de los peces, se han identificado las CLGs de tipo I y de tipo V, las cuales presentan secuencias similares a los aminoácidos de CLGs de mamíferos [6]. Se han obtenido andamios de CLG,

aprovechando la mesoglea de diferentes especies de medusa como: *Stomolophus nomurai meleagris*, *Rhopilema asamushi*, *Stomolophus meleagris*, *Catostylus tagi*, *Rhizostoma pulmo*, y *Cassiopea andromeda*, y en general, la CLG obtenida es biocompatible en ensayos *in vitro* con diversas líneas celulares, existen también diversas investigaciones enfocadas en la obtención de CLG de tilapia, la cual ha presentado propiedades de biocompatibilidad con potencial aplicación en ingeniería de tejidos [4,6,59, 60].

Por otro lado, el PLA se ha utilizado ampliamente en aplicaciones de ingeniería de tejidos como material base para andamios destinados a la regeneración ósea [60], cartilaginosa, tendinosa, neural o vascular. Incluidas aplicaciones como suturas, material de fijación ósea, sistemas de administración de fármacos y regeneración dérmica. Se ha estudiado la interacción del PLA en diversas combinaciones con biopolímeros que permitan el refuerzo de sus propiedades, principalmente enfocadas en el mejoramiento de su capacidad de proliferación celular y biodegradación, para ello se ha recurrido a técnicas entre las que se encuentran: la incorporación de aditivos, la aplicación de tratamientos superficiales y el uso de revestimientos superficiales con compuestos bioactivos [42].

Asimismo, se ha investigado la creación de materiales a partir de mezclas tanto de polímeros naturales como de polímeros sintéticos, ya que esto puede representar ventajas estructurales y mejoramiento de propiedades biológicas. Dentro de estas investigaciones se encuentran aquellas que evalúan la interacción de CLG y PLA, generando matrices poliméricas por diferentes métodos. Pinese, *et al*, realizaron una evaluación *in vivo* de parches híbridos compuestos de copolímeros basados en PLA y sulfato de CLG/condroitina para la regeneración del tejido del ligamento [83]. Este estudio demostró que los copolímeros de PLA-CLG son biomateriales prometedores para aplicación temporal en ligamentos debido a sus propiedades mecánicas y un tiempo de degradación más rápido en comparación con el homopolímero PLA. Asimismo, exhibe una muy buena integración tisular y permite síntesis de tejidos después de 12 semanas *in vivo* [61].

Otro estudio que analiza la interacción de PLA y CLG descrito por Ospina *et al.*, [62] donde se obtuvo PLA funcionalizado con CLG, mediante una ruta de injerto simple, y se produjeron andamios electrohilados para hacer crecer células *in vitro*, como resultado de la incorporación de CLG se pudo notar un aumento en la adhesión celular de cuatro veces en comparación con los de andamios PLA mezclado con CLG.

Asimismo, se reporta la combinación de PLA y CLG marina mediante la creación de composites mediante una combinación covalente de ambos polímeros, estos composites exhibieron propiedades térmicas y mecánicas mejoradas en comparación con otros polímeros como CLG-quitosano, CLG-PVP [63].

Otra de las aplicaciones en donde se analiza la combinación de estos polímeros se reportó previamente en trabajos de Dunn, *et al* [55] donde se desarrollaron implantes compuestos reabsorbibles para la reconstrucción del ligamento cruzado anterior (LCA) de la rodilla. Los compuestos se fabricaron incrustando fibras de CLG paralelas dentro de una matriz de PLA o CLG. Se determinaron las propiedades mecánicas, las tasas de reabsorción y las reacciones del tejido subcutáneo para ambos tipos de compuestos. La resistencia a la tracción y el módulo de los compuestos de CLG-PLA fueron el doble que los de los compuestos de CLG-CLG. Se mejoró el crecimiento interno de tejido fibroso subcutáneo y la reabsorción del implante se retrasó ligeramente en los compuestos de CLG-PLA [64].

En general, la información proporcionada por estos estudios demuestra que existe una interacción positiva entre CLG y PLA [18], además de que se logra mejorar sus propiedades mecánicas, se pueden controlar parámetros de degradación y se ha logrado verificar la biocompatibilidad mediante ensayos *in vitro*, con diferentes líneas celulares.

## **HIPÓTESIS**

La incorporación de CLG marina en una matriz de PLA permitirá su procesamiento mediante el proceso de extrusión y su posterior transformación en una película con características fisicoquímicas similares al tejido dérmico.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Elaborar una película polimérica a partir de CLG marina y PLA mediante extrusión en fundido, con potencial aplicación en la ingeniería del tejido dérmico.

### **Específicos**

- Obtener CLG marina proveniente de piel de Tilapia *Oreochromis niloticus*.
- Caracterizar fisicoquímicamente la CLG mediante FTIR, DSC y TGA y electroforesis SDS PAGE.
- Elaborar películas delgadas a base de CLG y PLA, mediante extrusión en fundido.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las películas obtenidas, mediante FTIR, DSC, TGA, y ensayos de tensión.



## CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Obtención de colágena marina

Muestras de piel de Tilapia *Oreochromis niloticus* fueron colectadas de los desechos que generan los establecimientos dedicados a la distribución del pescado en Yucatán. La piel se colectó fresca y se trasladó al laboratorio de biomateriales para su limpieza y procesamiento. Una vez limpia y sin residuos de carne de pez, se procesó de acuerdo al método de extracción reportado previamente por Quintero J, Zapata JE, 2017 [5], el cual consiste en hidrólisis básica, solubilización en medio ácido, tratamiento térmico e hidrólisis enzimática, precipitación y por último purificación de la proteína. Se aplicaron algunas modificaciones con el fin de aprovechar su rendimiento y cumplir las características deseadas.

#### 2.1.1 Obtención y pretratamiento de la materia prima

Se tomó una muestra de 635 g de piel provenientes de los residuos pesqueros; seguidamente se lavaron con agua corriente hasta eliminar residuos asociados al pescado y contaminantes, posteriormente con ayuda de navajas se eliminó tejido adherido a la piel, asimismo se sometió a blanqueamiento con hipoclorito de sodio al 0.53% durante 30 min, finalmente las pieles se enjuagaron con suficiente agua para eliminar residuos de hipoclorito y proceder a la siguiente etapa como se muestra en la **Figura 2.1**.

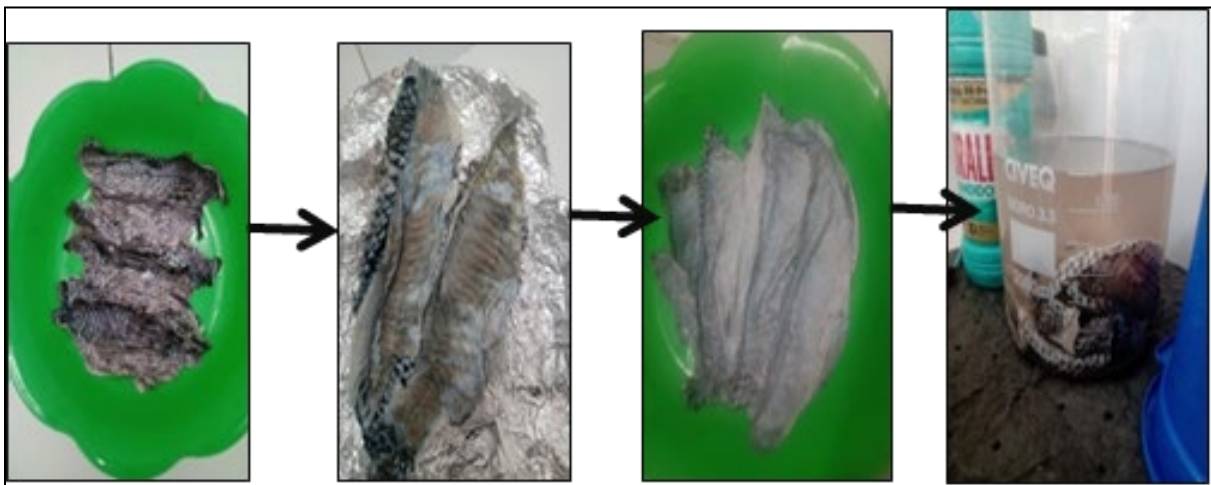
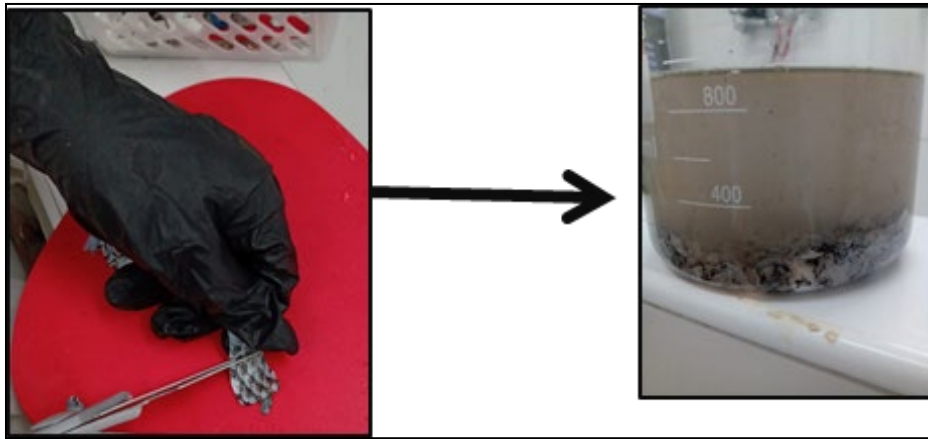


Figura 2.1. Lavado y pretratamiento de pieles.

### 2.1.2 Hidrólisis en medio básico

Posterior al lavado, se redujo el tamaño de las pieles, para un mejor procesamiento, con el fin de eliminar las proteínas no colagenosas, se incubaron en una solución de NaOH 0.1 M con una relación muestra /solución de 1:10 (m/v); la mezcla se mantuvo en agitación durante 4 h, transcurrido ese tiempo, las pieles se enjuagaron con abundante agua corriente para eliminar os restos de NaOH (**Figura 2.2**).



**Figura 2.2.** Reducción de tamaño e hidrólisis básica.

### 2.1.3. Solubilización y tratamiento térmico

La piel recuperada de la hidrólisis básica se solubilizo con ácido acético 0.5 M con agitación constante durante 4 h, posteriormente, la piel se retiró y lavo para eliminar los residuos de ácido acético, seguidamente la piel se sometió a tratamiento térmico a 55 °C en agua de la llave , en proporción 1:10 m/v durante 4 h. Una vez que se produjo la ruptura de la matriz extracelular, se llevó a cabo la solubilización de los fragmentos de piel en medio ácido, con concentración del ácido acético 0.5 M (**Figura 2.3**).



Figura 2.3. Proceso de solubilización.

#### 2.1.4. Precipitación e hidrólisis enzimática

La recuperación de la CLG de la solución ácida se llevó a cabo mediante la recuperación del sobrenadante del tratamiento térmico, se adicionó NaCl al 12% y se dejó en agitación constante a temperatura de 4 °C, durante 45 h, transcurrido ese tiempo, se adicionó pepsina en relación 1:70 m/m (**Figura 2.4**), tomando como referencia el peso inicial de las pieles, posteriormente la solución se almacena a -20 °C para poder liofilizarse. Según lo reportado por la bibliografía, la precipitación ocurre debido a las interacciones iónicas de la proteína con la sal, esto debido a que dicha proteína presenta inicialmente interacciones de sus grupos polares con las moléculas de agua, al agregar la sal se lleva a cabo la precipitación debido a interacciones hidrofóbicas, disminuyendo de esta manera la solubilidad en agua [69]. Asimismo, la adición de pepsina ayuda a la digestión de los telopéptidos de la proteína, y según lo reportado por la bibliografía: “al eliminar los telopéptidos, la CLG resulta menos antigénica, más pura y con mejores posibilidades para ser utilizada como biomaterial” [34,68].

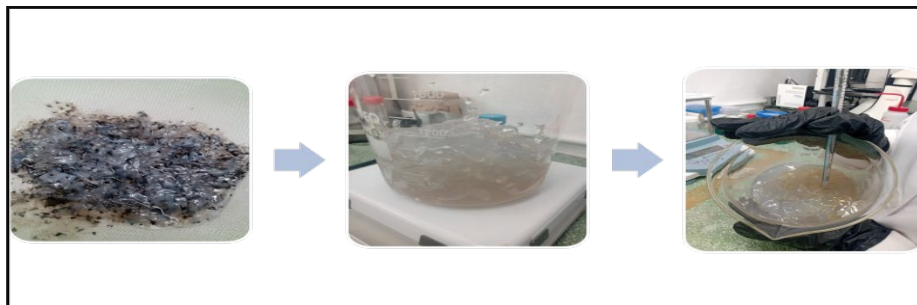
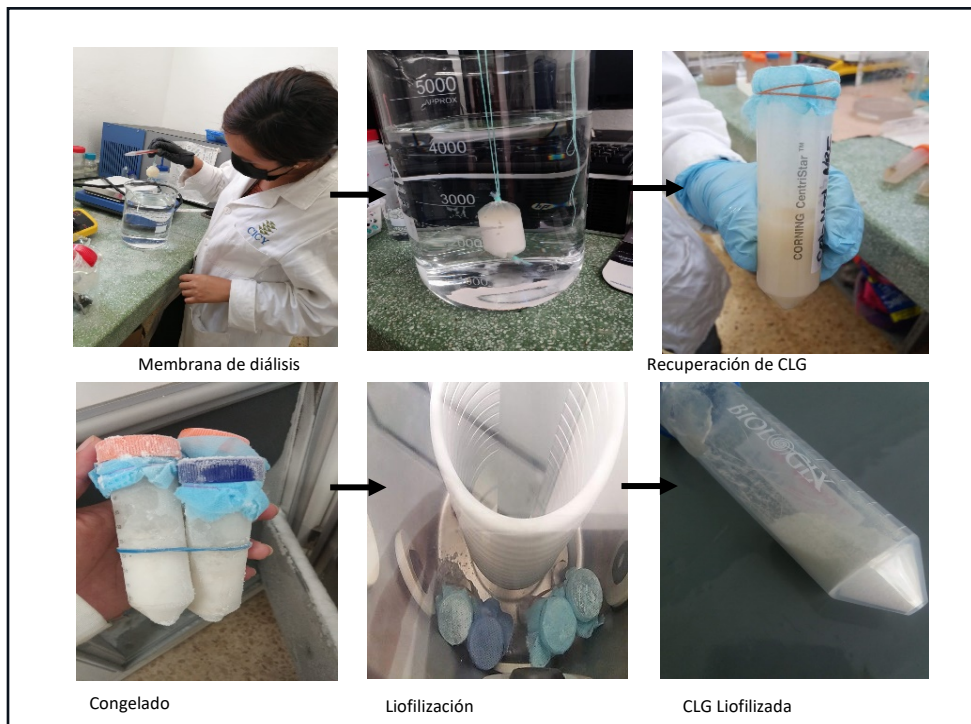


Figura 2.4. Precipitación e hidrólisis enzimática.

### 2.1.5. Diálisis y liofilización

Para purificar la CLG obtenida, se dializó en una membrana de 3500 kDa (Molecular porous membrane tubing, SpectrumLab) contra una solución de 0.005 M de ácido acético, el proceso se llevó a cabo durante 3 días, en agitación constante a 4 °C, con cambio de solución dializadora cada 24 h, para la eliminación de sales. Posteriormente se realizó una liofilización de la CLG dializada. Para ello, muestras de 30 mL de CLG dializada se congelaron a -20 °C por 48 h y se colocaron en una liofilizadora (LABCONCO, modelo FREEZONE 4.5), en condiciones de 50 °C y 0.2 psi de presión de vacío, el proceso se llevó a cabo durante 96 h y se obtuvieron muestras en polvo. Adicionalmente, las muestras liofilizadas se pulverizaron con mortero, con el fin de adquirir la consistencia de polvo más fina para poder ser procesadas y caracterizadas (**Figura 2.5**).



**Figura 2.5. Proceso de diálisis y liofilización de la CLG.**

## 2.2 Caracterización de la colágena obtenida

### 2.2.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El principio básico de esta técnica se basa en la excitación de grupos moleculares por un haz de luz infrarroja (2.5 a 15  $\mu\text{m}$ ; equivalentes a número de onda comprendido entre 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ ), que genera movimientos vibracionales en los enlaces de la molécula. Los movimientos vibracionales se distinguen por el tipo de desplazamiento generado en los enlaces, conociéndose como vibraciones de tensión o flexión. De esta forma, se obtiene información acerca del entorno químico de los enlaces y de la estructura molecular presente en determinada muestra.

Las mediciones del espectro IR se hicieron en un espectrofotómetro infrarrojo (Thermo Scientific; NICOLET 8700), (**Figura 2.6**). Se prepararon pastillas de 3 mg a partir del polvo de la CLG obtenida y se analizaron las vibraciones entre 4000 y 650  $\text{cm}^{-1}$  debido a que la mayoría de los componentes de un enlace químico en muestras biológicas tienen movimientos vibracionales con frecuencias dentro del intervalo. El análisis de los datos, el procesamiento, así como como la obtención de gráficas, fueron realizados en el programa Origin pro-versión 8.0.



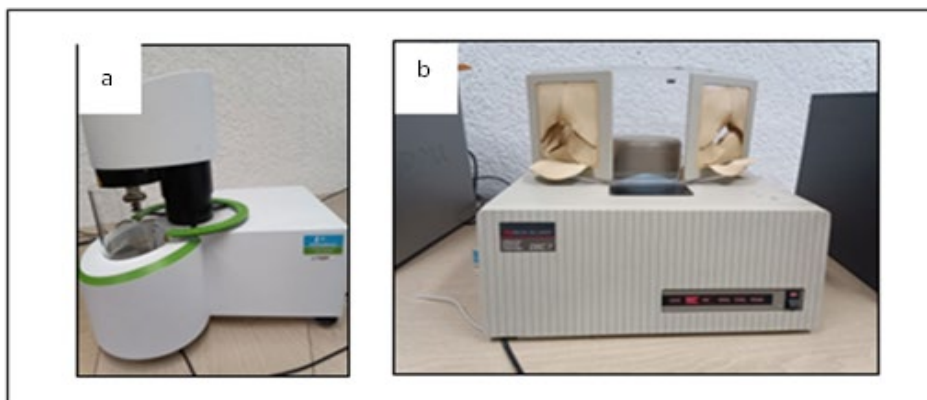
**Figura 2.6. Espectrofotómetro infrarrojo.**

### 2.2.2. Caracterización térmica

Las técnicas de análisis térmico miden las propiedades físicas de una sustancia en función del tiempo al ser sometida a un programa controlado de temperatura. Entre este conjunto de técnicas experimentales analíticas que investigan el comportamiento de una muestra de material se destacan técnicas como: Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TGA).

La TGA es un tipo de análisis térmico que se basa en los cambios de masa como resultado de una variación de temperatura o por someter un material a una temperatura establecida durante un periodo de tiempo definido. Los cambios de masa identificados permiten determinar en qué condiciones los materiales se descomponen. Por otra parte, el DSC permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica. En general, puede trabajar en un intervalo de temperaturas que va desde la temperatura del nitrógeno líquido hasta unos 600 °C. Esta técnica de análisis se emplea para caracterizar aquellos materiales que sufren transiciones térmicas en dicho intervalo de temperaturas.

El ensayo termogravimétrico se realizó, a través de un analizador termo gravimétrico (PERKIN ELMER TGA8000). Para dicho procedimiento se prepararon muestras a partir del polvo de la liofilización; se llevó a cabo con las siguientes condiciones de barrido: 10 a 600 °C, con una rampa de 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno. Asimismo, para el ensayo DSC se empleó un calorímetro diferencial de barrido (PERKINELMER DSC7), con condiciones de barrido 10 °C a 200 °C, con rampa de 10 °C /min en atmosfera de nitrógeno.



**Figura 2.7. Analizadores térmicos. a) Analizador termo gravimétrico b) Calorímetro diferencial.**

### 2.2.3. Análisis de proteína por el método de Bradford

La cuantificación de proteína se realizó por colorimetría, mediante el método de Bradford. Se utilizó albumina sérica bovina (BSA) como proteína de referencia para la formación de la curva estándar, utilizando 6 concentraciones que varían de 0.2 a 1.2  $\mu\text{g/mL}$  de proteína. A partir del polvo obtenido de CLG, se preparó una solución de 1  $\text{mg/mL}$ , de la cual se tomaron 5  $\mu\text{L}$  y se completó con agua y reactivo Bradford. Todas las muestras tanto de proteína estándar como de muestra de estudio se prepararon por triplicado. La lectura de absorbancias se realizó a 595 nm mediante un lector de microplacas (UV-vis) (Citation 3 Biotek). Una vez realizadas las lecturas; a partir de la ecuación generada por la gráfica se obtuvo la concentración de las muestras de estudio.



Figura 2.8. Lector de microplacas (Citation 3 Biotek).

### 2.2.4. Electroforesis

El peso molecular se determinó mediante electroforesis SDS-PAGE, utilizando una cámara de electroforesis Mini-Protean 3 Cell, (Bio-Rad, EE. UU.) y un marcador de peso molecular de amplio rango (Prestained SDS-PAGE standards broad range, Bio-Rad, EE. UU.), como ha sido

previamente reportado [66,67]. La electroforesis SDS–PAGE fue desarrollada usando un gel de separación de 8% y otro concentrador del 5%.

**Tabla 2.1. Valores utilizados para la preparación de los geles**

	Gel separador	Gel concentrador
Agua	2.41 mL	1.5 mL
Tris- pH 8.8/6.8	1.25 mL	625 $\mu$ L
PSA 10%	17 $\mu$ L	12.5 $\mu$ L
TEMED	3.3 $\mu$ L	2.5 $\mu$ L
SDS	50 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Acrilamida 30%	1.33 mL	335 $\mu$ L

La muestra de estudio se preparó a partir de los valores obtenidos en la cuantificación de la CLG, con una concentración 1  $\mu$ g/ $\mu$ L, considerando la concentración de proteína total de la muestra, a partir de la cual se tomaron 16  $\mu$ L y se añadieron 4  $\mu$ L de LAEMLI, se llevó a ebullición durante 10 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente, la muestra de CLG se cargó y fue sometida a electroforesis con voltaje constante (120 V); al término se retiró el gel de la cámara, se tiñó en una solución de azul de comassie R-250, y finalmente se destiñó con una solución de ácido acético al 10%, metanol al 40% y agua destilada al 50%.



**Figura 2.9. Cámara de electroforesis Mini-Protean 3 Cell, (Bio-Rad, EE. UU.**



### 2.3. Elaboración de compuestos y películas de PLA/CLG.

Se empleó PLA Ingeo 6260D de NatureWorks con presentación de pellets, diseñada para extrusión de fibras, con un MFI de 65 g/10 min, temperatura de fundido de 165–180 °C y densidad de 1.24 g/cm<sup>3</sup>. Se usó tanto el PLA en condiciones normales, así como pellets de PLA en condiciones de hidrólisis causada por exposición a humedad del ambiente, mismos que estuvieron expuestos por un largo periodo de tiempo sin condiciones impermeables (nombrados como PPLA, para su comparación), esto con el fin de evaluar el posible efecto plastificante del agua presente en material.

De igual manera se usó CLG proveniente de piel Tilapia en concentraciones de 0.5%, 1% y 2%, con respecto al peso total para cada composición, estos valores se eligieron tomando como referencia que la composición para diversos productos comerciales en el área de biomateriales se basa en el 1%.

Para realizar las mezclas y películas en una sola etapa, se empleó un mini extrusor doble husillo cónico de 15 cm<sup>3</sup> de capacidad, de la marca DSM, modelo Xplore® 15 cc, el cual se empleó en modo continuo, con temperatura de 170 °C, velocidad de 3 rpm, bajo estas condiciones se generó un torque promedio de 500 N y tiempo de residencia 7 min.

A la salida del extrusor se acopló un dado para película plana de 6 cm de ancho y una apertura fija de 100 µm, el cual se mantuvo a una temperatura de 175 °C, se empleó también una línea para película plana (Cast Film Pro Line) de DSM Xplore® para enfriar, estirar y coleccionar la película, a una velocidad de estirado de 250 cm/min, manteniendo un torque de 150.

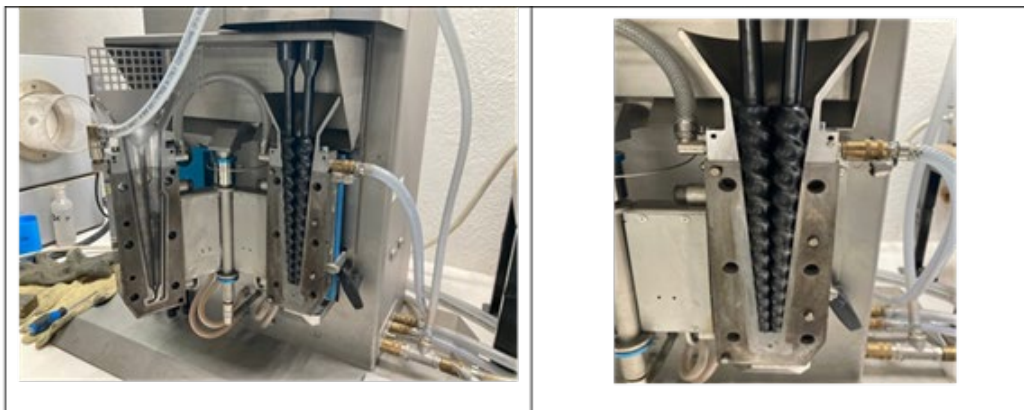


Figura 2.10. Vista lateral de los husillos

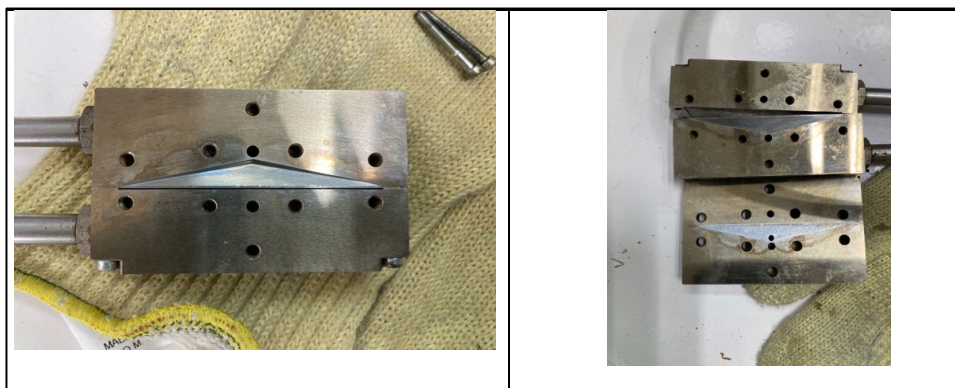


Figura 2.11. Dado para la obtención de película.

### 2.3.1. Preparación de los materiales

Tanto el PLA en condiciones normales como el PPLA fueron secados en una estufa a una temperatura de 60 °C durante 24 h, se prepararon lotes de 15 g y se adicionó diferentes concentraciones de CLG, de acuerdo con la **Tabla 2.2**. Debido a que la CLG no se podía mezclar bien con los pellets del PLA, se utilizó 1 mL de alcohol isopropílico y un baño de ultrasonido a temperatura ambiente durante 10 min para dispersar previamente la CLG, después, se vertió sobre los pellets para recubrirlos realizando un mezclado manual con espátula. La mezcla recién preparada fue alimentada (dosificada manualmente en pequeños lotes) al extrusor. Para efectos de comparación, a la muestra de PLA y PPLA sin CLG también se adicionó 1 mL de alcohol isopropílico antes de ser extruida.

Tabla 2.2. Relación de lotes PLA/CLG Y PPLA/CLG

Muestra	CLG(%)	CLG (g)	PLA (g)
PLA	0	0	15
PLA-CLG0.5	0.5	0.075	15
PLA-CLG1	1.0	0.15	15
PLA-CLG2	2.0	0.30	15
PPLA	0	0	15
PPLA-CLG0.5	0.5	0.075	15
PPLA-CLG1	1.0	0.15	15
PPLA-CLG2	2.0	0.30	15

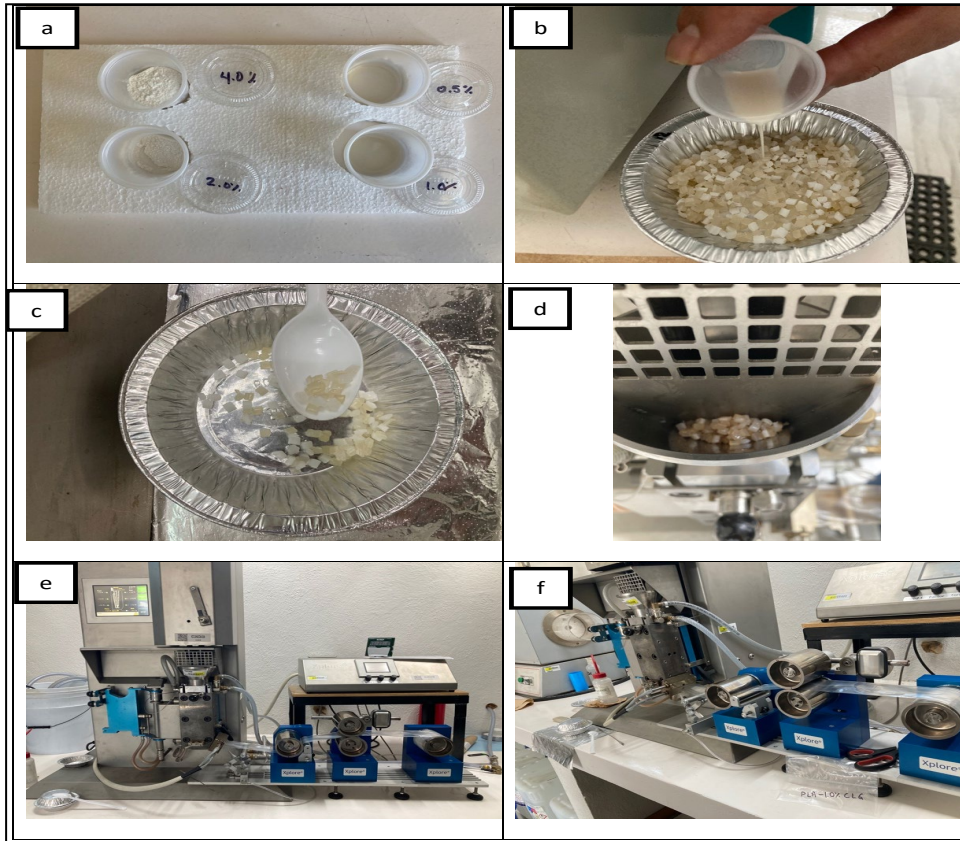


Figura 2.12. Procesamiento de los materiales para extrusión. a) CLG + alcohol isopropílico (AI), b) CLG+AI + PLA, c) Dosificación de material al extrusor, d) Material en la tolva del extrusor, e) Extrusión de película, vista frontal f) Extrusión de película, vista lateral.

## 2.3.2. Determinación de las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las películas PLA/CLG

### 2.3.2.1. Propiedades fisicoquímicas

La obtención de los espectros IR y el análisis DSC se hicieron en las mismas condiciones, previamente descritas para la CLG. Para el análisis termogravimétrico, se usaron muestras de 10 mg; con condiciones de barrido en un intervalo: 25 a 800 °C, con una rampa de 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno de ultra alta pureza, en el analizador termogravimétrico TGA5500 de TA Instruments, ubicado en el departamento de transformación de plásticos del CIQA.

### 2.3.2.2. Prueba de tensión

La determinación de las propiedades mecánicas se realizó mediante una prueba de tensión utilizando un equipo MTS Criterion™ Model 43, con una celda de carga de 1 kN y mordazas

neumáticas, siguiendo la Norma ASTM D882. Se emplearon 5 probetas para cada material, con las siguientes medidas: 100 mm de longitud, 10 mm de ancho y ~ 0.10 mm de espesor; las probetas se acondicionaron por al menos 24 h a  $25 \pm 2$  °C y humedad relativa de 50%, durante la prueba la temperatura se mantuvo a 22 °C y la humedad relativa a 36%. Asimismo, se empleó el software TW Elite de MTS Test Suite, para el cálculo de las diferentes propiedades reportadas.

## CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Obtención de la CLG

El rendimiento de la extracción de CLG a partir de descartes de piel de Tilapia Oreochromis Niloticus fue de 3.4%, lo cual está por arriba del rendimiento reportado para la extracción de CLG a partir de piel del pez Parang-Parang (1.92%) y de la Tilapia roja, Bagre y Palometa (2.27%), y ligeramente por debajo del rendimiento de la extracción de CLG a partir de piel del pez anguila (4.2%) [84].

### 3.2 Estimación del rendimiento de obtención de CLG.

En la **Tabla 3.1**, se presentan los valores de concentración de BSA vs absorbancia, usados para la obtención de la curva de calibración; por otra parte, la **Figura 3.4** presenta la curva generada para dichas concentraciones de BSA (usado como muestra estándar). Con base en la ecuación generada por la curva patrón; se calcularon la concentración de la muestra perteneciente a la extracción de CLG de piel de Tilapia, Dicha curva presenta un coeficiente de correlación  $r^2 = 0.9273$ , lo cual indica que el método es apropiado para la cuantificación.

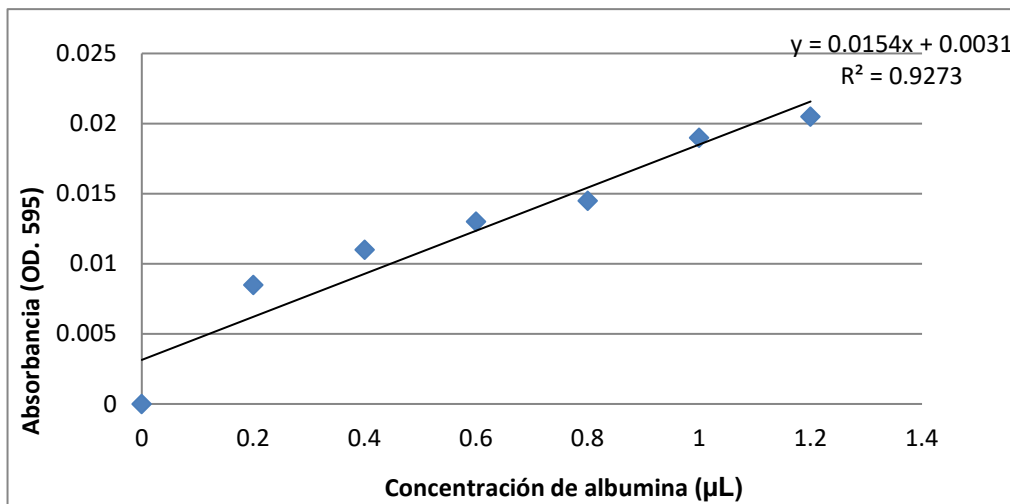
**Tabla 3.1. valores de concentración de BSA vs absorbancia.**

Concentración	Absorbancia
0	0
0.2	0.0085
0.4	0.0110
0.6	0.0130
0.8	0.0145
1.0	0.0190
1.2	0.0205

A partir del despeje de la formula se tiene que la concentración (x) es igual a:

$$X = \frac{(Y-0.0031)}{0.154} \quad (\text{Eq. 1})$$

Para la muestra de CLG, se obtuvo un promedio de absorbancia de  $0.0215 \pm 0.002$ , el cual al sustituir en la ecuación (Eq. 1) reveló que la concentración de proteína en la muestra de estudio fue de  $1.19 \mu\text{g/mL}$ . A partir de lo cual se calculó un rendimiento de 23.8% de concentración de proteína. Este rendimiento proteico, es consistente y comparable con los reportados anteriormente para especies marinas similares; de acuerdo con los resultados, de distintos autores (4,5,33,34,71) , es posible notar que la extracción de CLG a partir de piel de diferentes peces, es mayor en comparación con otras regiones anatómicas, como lo son el hueso y las escamas, esto podría deberse a la presencia de enlaces cruzados, así como al contenido de sustancias adicionales (como al  $\text{Ca}^{2+}$ ) en dichas regiones. De acuerdo con lo reportado por Quintero, los rendimientos de extracción para diferentes regiones de tilapia roja (*Oreochromis spp*) son 9,62% a partir de escamas; 13,41% a partir de espinas y 18,93% a partir de piel [5], dichos resultados son inferiores a los encontrados en este estudio, con lo cual se puede comprobar la variabilidad de contenido proteico para estas especies. Asimismo, es posible notar que el rendimiento de CLG marina en comparación con fuentes terrestres son menores que los encontrados en zonas anatómicas de otras especies como cerdo y pollo, con 30% y 62%, respectivamente, sin embargo, estas especies son usadas para alimentación humana, mientras que aquellos obtenidos de residuos pesqueros no tienen usos adicionales, asimismo estos últimos no han presentado dificultades relacionadas con transmisión de enfermedades.



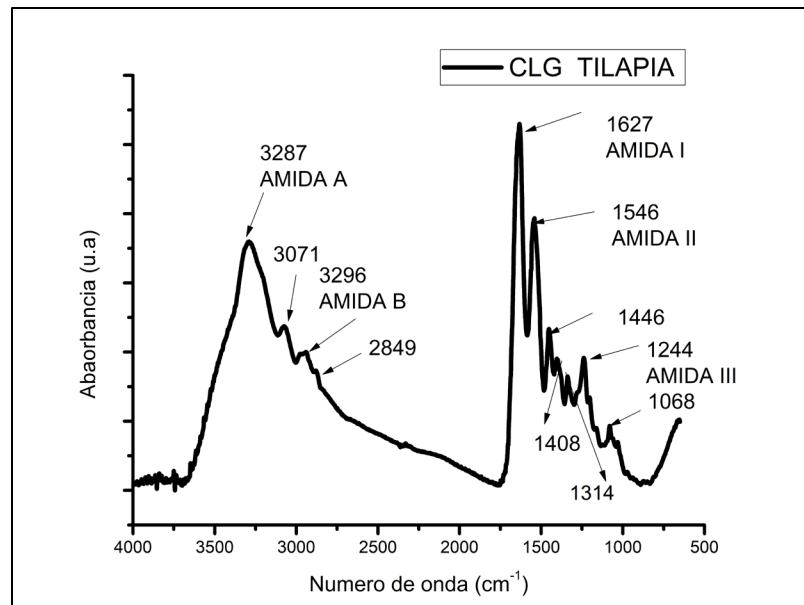
**Figura 3.1. Curva de calibración a partir de BSA.**

### 3.3 Propiedades fisicoquímicas de la CLG marina

#### 3.3.1. FTIR

El espectro FTIR de la CLG proveniente de pieles de Tilapia se presenta en la **Figura 3.2**. Se pudo apreciar la aparición de vibraciones características de enlaces típicos de la CLG tipo 1, como ha sido previamente reportado [29, 68,69,71].

La banda que se observa a  $3287\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento del enlace N-H. La vibración del grupo C=O generalmente se observa en el intervalo entre  $1670\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ ; sin embargo, para la CLG de piel de Tilapia se observó a  $1627\text{ cm}^{-1}$ ; lo que puede atribuirse a que existe un corrimiento que se relaciona con el reforzamiento de enlaces hidrógeno; por otra parte, la banda que se observa a  $1546\text{ cm}^{-1}$ , atribuida al estiramiento del enlace C-N presentó un corrimiento, ya que de acuerdo a reportes previos para CLGs de distintas fuentes esta banda se ubica entre los valores  $1590\text{ y }1530\text{ cm}^{-1}$  [29,69,71]. Por último, es posible observar una banda a  $1244\text{ cm}^{-1}$ , la cual representa la estructura helicoidal de la proteína. Lo anterior puede justificar que la obtención de CLG obtenida corresponde con estructura de CLG tipo I [29,71].



**Figura3.2. Espectro FTIR de la CLG de piel de Tilapia.**

**Tabla 3.2. Asignaciones de bandas FTIR, de la CLG obtenida de piel de tilapia.**

Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) (reportado) (29,71)	Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) CLG de tilapia	Asignación
3200-3600	3287	Estiramiento N-H, acoplado con puente de hidrógeno
3030-3100	3071	Estiramiento N-H
2950-2930	2936	Estiramiento asimétrico C-H <sub>2</sub>
2953-2870	2849	Estiramiento simétrico C-H <sub>2</sub>
1630-1670	1627	Vibración por estiramiento del grupo C=O
1530-1590	1546	Estiramiento C-N y Flexión N-H
1450	1446	Vibraciones del anillo pirrol, entrecruzamiento de la matriz
1405-1410	1408	Vibraciones por deformación del grupo CH <sub>2</sub> de la glicina
1310-1340	1314	Meneo CH <sub>2</sub> , de la prolina
1230-1260	1244	Estiramiento C-N y deformación N-H
1170	1068	Flexión asimétrica C-O-C
1075-1080	***	Vibración C-O

### 3.3.2. Análisis TGA de la colágena.

En la **Figura 3.3** se muestra el termograma de la CLG obtenida a partir de piel de Tilapia, se pueden observar las principales pérdidas de peso ubicadas a diferentes intervalos, así como el punto de degradación máxima de la proteína. La primera pérdida de peso se puede apreciar a una temperatura de 94 °C la cual corresponde a una pérdida de masa de 8.9%, esta primera pérdida generalmente se atribuye a la pérdida de agua fisisorbida, coincidente con el comportamiento de los gráficos TGA de distintos materiales biológicos según reportes previos [60,71]. Seguidamente, se puede observar una transición debida a degradación de la CLG, con un máximo de temperatura de 246.6 °C y con pérdida de peso de 15.5%, asimismo se registra una pérdida debida a la combustión en 357.95 °C y puede considerarse una pérdida de peso de 58%. Finalmente, la degradación máxima de la proteína se considera a una temperatura de 496.6°C con una pérdida de peso 76.3% y los residuos correspondientes a los procesos de combustión del material.



De igual manera se puede observar picos de degradación del material con base en la información proporcionada por la primera derivada, en donde primeramente se nota la aparición de un pico a 56.6 °C al que se le puede atribuir un inicio de desnaturalización de la proteína, seguidamente se observa un segundo pico a una temperatura de 322.6 °C el cual da información acerca de la descomposición máxima del material y se asume que por encima de esta, la proteína ha perdido todas sus propiedades, quedando únicamente residuos de la combustión.

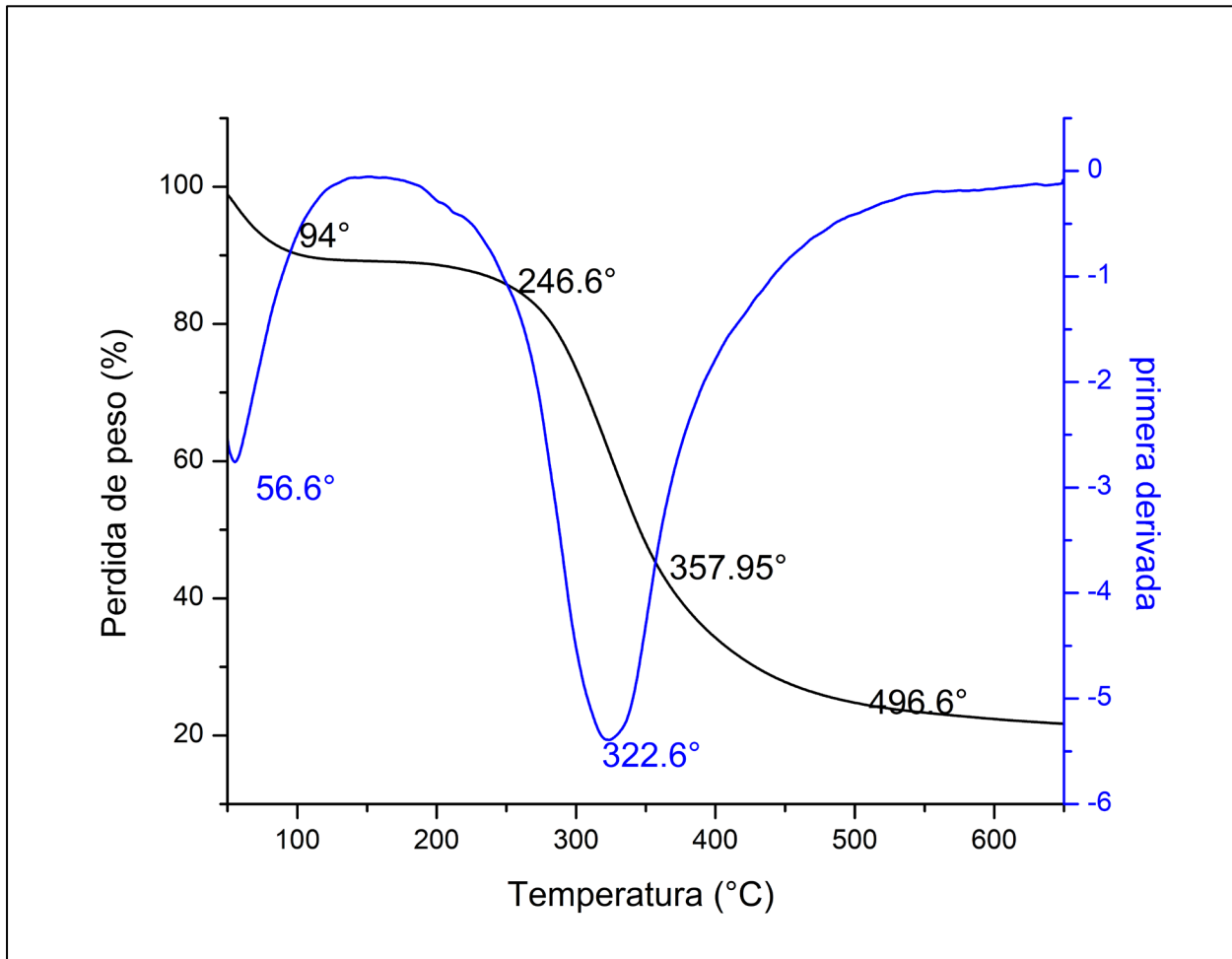


Figura 3.3. Grafica TGA de la CLG de piel de Tilapia.

### 3.3.3. Análisis DSC de la colágena.

En la **Figura 3.4**, es posible observar el primer y el segundo calentamiento de la muestra de CLG, así como un enfriamiento en un intervalo de temperatura de 10 °C a 300 °C. Se observa una transición térmica a 47.27 °C que se puede asociar al inicio de desnaturalización de la CLG, interpretándose como una pequeña fracción de CLG gelatinizada, de igual manera se observa un pico endotérmico a 84.45 °C, el cual se puede atribuir a la pérdida de humedad, y se asume que se superpone al pico endotérmico correspondiente a la desnaturalización, ya que se ha demostrado que los puentes de hidrógeno inter e intramoleculares, así como el agua unida mediante dichos enlaces son responsables de la estabilidad de la triple hélice colagénica, por lo que la ruptura de dichos enlaces y la pérdida de agua durante el calentamiento desenrollan la triple hélice, desnaturalizandola. Asimismo, se puede notar que a una temperatura aproximada de 194 °C ocurre desnaturalización máxima de la hélice de CLG. Debido a la pérdida de agua durante el primer calentamiento existe ausencia de pico endotérmico en el segundo calentamiento [65,71]. De igual manera en el enfriamiento, no se observan presencia de picos endotérmicos, asociados a cristalización del material, esto debido a que después de la desnaturalización, las transiciones son irreversibles, mostrando de esta manera la naturaleza amorfa de la colágena desnaturalizada (gelatina).

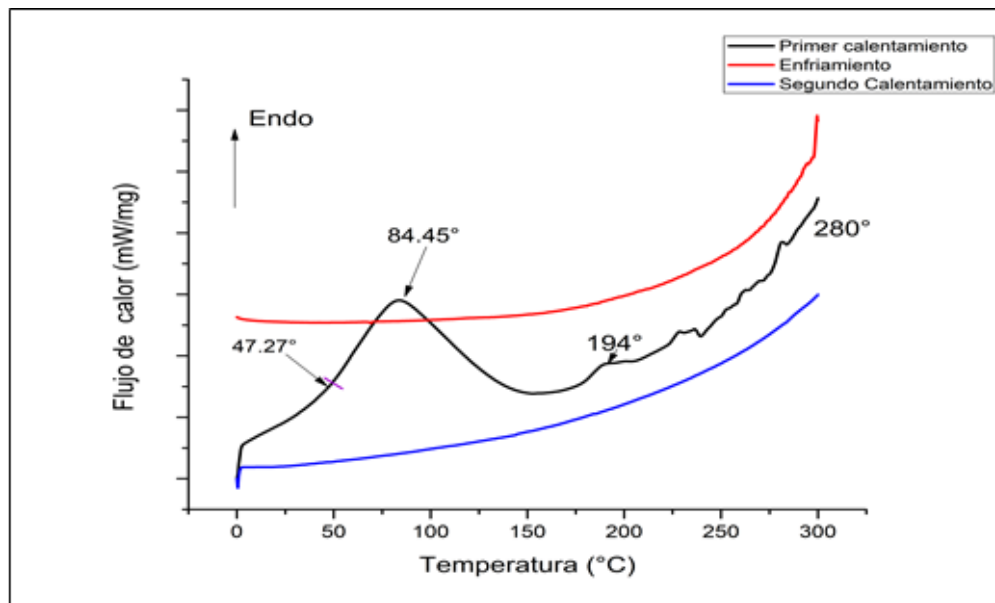


Figura 3.4. Grafica DSC de colágena de piel de Tilapia

### 3.4 Patrón electroforético de la CLG marina

El patrón electroforético obtenido para la muestra de CLG extraída a partir de piel de tilapia, se puede observar en la **Figura 3.5**. Fue posible observar las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  con masas moleculares cercanas a 100 KDa, asimismo, se observó una banda a 150 KDa, la cual puede atribuirse a la cadena  $\beta$ , y ha sido relacionada con la conservación de CLG triplehelicoidal.

La disminución del peso molecular para las bandas comparadas con las reportadas para diferentes especies marinas como: *Oreochromis mossambicus* y *Dosidicus gigas*, los cuales tienen pesos entre 116 y 120 KDa para las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , y entre 200 y 250 KDa para la cadena  $\beta$ ; y se puede atribuir al uso de la pepsina durante el proceso de extracción, la cual facilita la solubilización sin degradar la molécula, como ha sido previamente reportado [29]. La pureza de la CLG obtenida se puede corroborar en el patrón electroforético, ya que no existen bandas proteicas adicionales a las bandas típicas de la CLG, lo que sugiere que el proceso de extracción y purificación logra eliminar el material no colagénico y es coincidente con los pesos moleculares reportados para las especies de *S. luridus*, donde se han observado dímeros con pesos de 161 kDa.

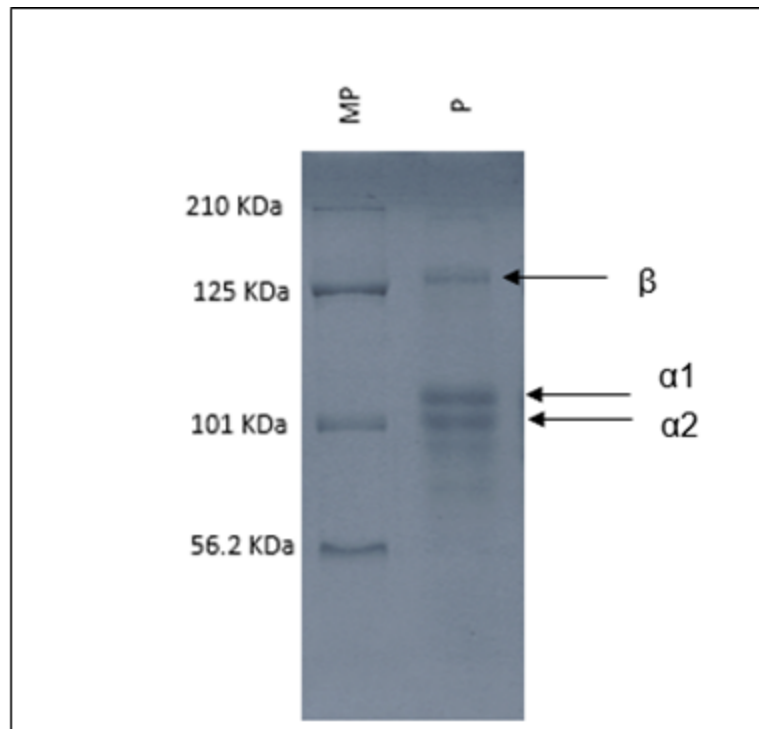


Figura 3.5. Patrón electroforético de la colágena de piel de Tilapia.

### 3.5. Obtención y caracterización de las películas de PLA/CLG

A través de la metodología, previamente descrita, se lograron obtener películas de PLA/CLG y PPLA/CLG de 2 m de longitud con distintas concentraciones de CLG. Dichas películas fueron caracterizadas mediante los análisis fisicoquímicos y mecánicos, para evaluar su aplicación como biomaterial.

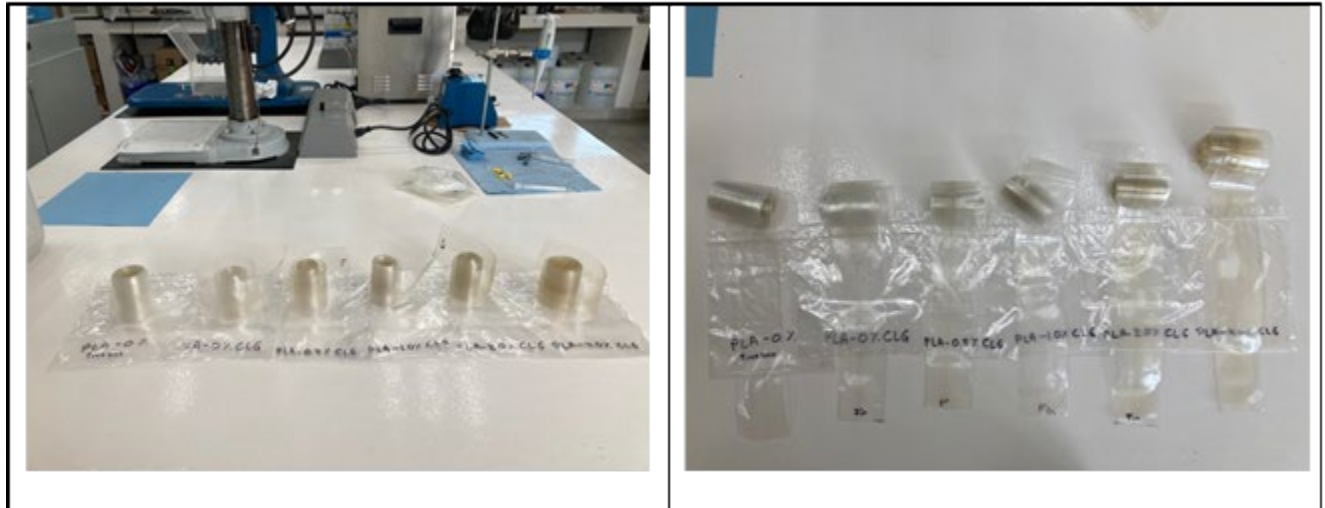


Figura 3.6. Películas obtenidas a partir de PLA y CLG.

### 3.6. Análisis del espectro IR de las películas de PLA Y CLG

En la **Figura 3.7** se presentan los espectros correspondientes a películas de CLG-PLA con concentraciones de 0.5%, 1% y 2% de CLG. Mientras que en la **Figura 3.8** se presentan las películas CLG-PPLA (PLA hidrolizado) con las mismas concentraciones de CLG. A su vez, cada conjunto de películas se compara con el espectro de los componentes por separado.

En el espectro de PLA (**Figura 3.7**) se aprecian bandas a  $2994\text{ cm}^{-1}$  y  $2933\text{ cm}^{-1}$  correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico de enlaces  $\text{CH}_3$ ; en  $1755\text{ cm}^{-1}$  aparece la vibración del grupo  $\text{C}=\text{O}$  asociado al enlace éster, en  $1074\text{ cm}^{-1}$  un pico correspondiente al grupo  $\text{COOH}$ , en  $1458\text{ cm}^{-1}$  una flexión de enlace  $\text{CH}$ , y en  $861\text{ cm}^{-1}$  y  $759\text{ cm}^{-1}$  se observan vibraciones longitudinales de los enlaces  $\text{C}-\text{C}$ . Estos espectros corresponden a enlaces característicos del PLA reportados previamente [77,78,79].

Para el espectro de CLG se aprecian las principales bandas en  $3287\text{ cm}^{-1}$ ,  $1627\text{ cm}^{-1}$ ,  $1546\text{ cm}^{-1}$  y  $1244\text{ cm}^{-1}$  asociadas a las amidas A, B, I, II y III, como se ha descrito anteriormente.

Es posible notar que la incorporación de CLG a las películas, no afecta de manera significativa el espectro del componente principal, el PLA, ya que en general, los grupos funcionales asociados al PLA aparecen en los mismos intervalos de las películas con y sin CLG, con ligeros corrimientos en algunas regiones, como por ejemplo aquellas relacionadas con los estiramientos de C-H Y COOH. Esto probablemente se deba a que el espectro del PLA enmascara al espectro correspondiente a CLG, lo que era de esperarse por las bajas concentraciones de CLG utilizada. Este hallazgo podría ser favorable para una aplicación biomédica de las películas CLG-PLA, ya que se conserva la estructura principal del PLA con las propiedades mecánicas y fisicoquímicas elevadas y contiene el polímero bioactivo, la CLG. Sin embargo, es necesario corroborar la presencia de la CLG en la mezcla de PLA y su actividad biológica en forma de película extruida.

Además, es posible que la CLG se haya desnaturalizado durante el proceso de extrusión, principalmente dando origen a moléculas de CLG desenrolladas o a péptidos de la misma, sin embargo, esto puede ser una ventaja, debido a que ha sido demostrado que moléculas desenrolladas de CLG tienen actividad biológica, así como péptidos pequeños de CLG, llamados matricriptinas, los cuales han demostrado que aumentan la funcionalidad de las CLGs, al tener actividad biológica específica para ciertos procesos como angiogénesis y reparación de tejido, ya que al unirse a receptores pueden liberar factores de crecimiento de manera más específica que su molécula precursora [85].

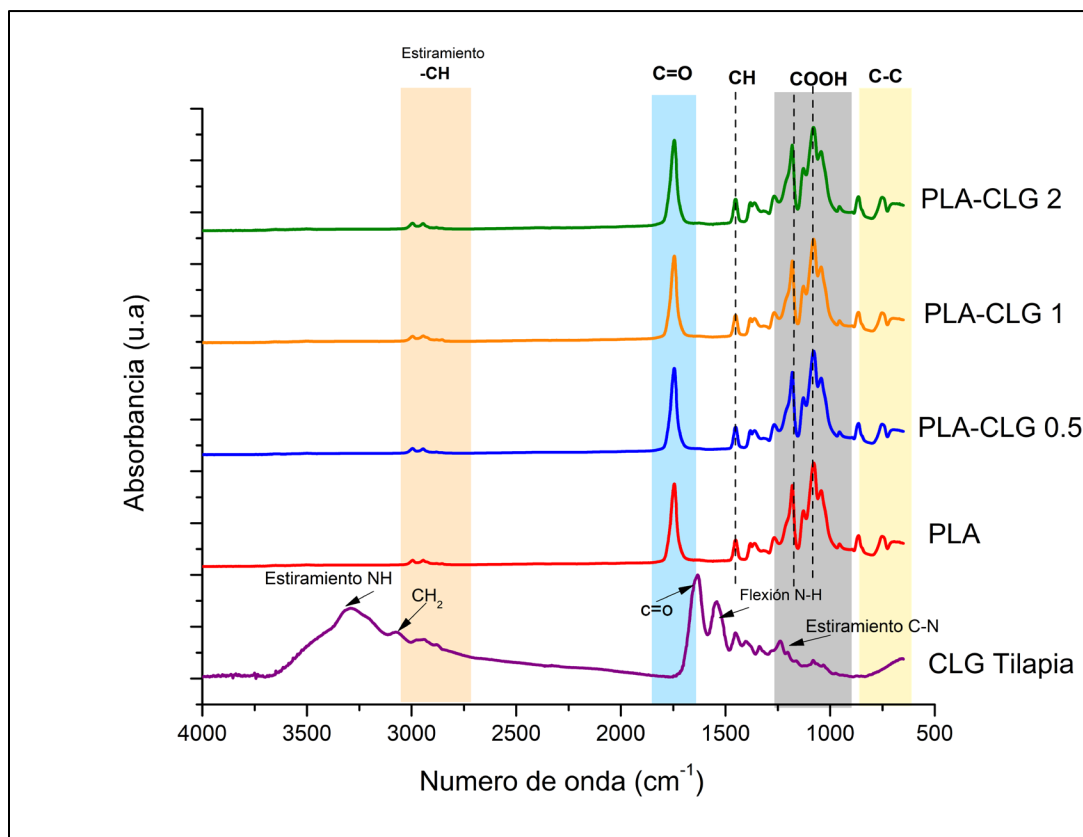


Figura 3.7. Espectros FTIR de las películas PLA-CLG.

En las **tablas 3.3 y 3.4**, se presentan los valores de los grupos funcionales asociados a las vibraciones en el espectro de FTIR, para cada película.

**Tabla 3.3. Asignación de los grupos funcionales para las películas a partir de PLA Y CLG, obtenidos mediante FTIR.**

Grupo	Asignación	Numero de onda (cm <sup>-1</sup> )			
		PLA	PLA-CLG 0.5	PLA-CLG1	PLA-CLG2
OH	Estiramiento	---	---	---	---
CH	Estiramiento simétrico y asimétrico	2994 y 2933	3000 y 2938	2929 y 2828	2899 y 2856
C=O	Vibración carbonilo	1744	1744	1744	1737
CH	Flexión	1454	1454	1461	1458
COOH	Grupo carboxilo	1074	1074	1074	1074
C-C	Estiramiento	871 y 759	871 y 759	720	871 y 759

En el espectro de PLA hidrolizado (PPLA) (**Figura 3.8**), es posible notar algunos cambios en cuanto a los picos asociados a los enlaces característicos. Primeramente, es posible notar la aparición de una banda en  $3524\text{ cm}^{-1}$ , el cual se puede asociar a la presencia de grupos OH libres, de igual manera, se aprecia una reducción de intensidad en  $1744\text{ cm}^{-1}$  relacionado con el grupo carbonilo C=O asociado al enlace éster. Por otra parte, es posible notar que con la presencia de CLG en la mezcla, se va reduciendo la intensidad del pico asociado al grupo carbonilo C=O y el enlace O-H continúa presente, ocupando mayor longitud; esto podría asociarse a una degradación hidrolítica, debido a la presencia de agua que puede actuar con efecto plastificante, así como al proceso de extrusión que conduce a degradación termooxidativa, en consecuencia, los grupos OH y los ácidos carboxílicos se hacen visibles por la ruptura del enlace, esto podría indicar que el polímero se ha vuelto más hidrofílico, aumentando su degradación, lo cual puede producir moléculas de bajo peso molecular que pueden ser bioabsorbidas por el organismo. De igual manera, se puede apreciar que la intensidad de las bandas asociadas al estiramiento C-H se va haciendo más notoria conforme se agrega CLG, asimismo, es posible notar una banda adicional a partir de la mezcla con 0.5 de CLG, mismo que podría asociarse al enlace N-H de las amidas presente en la CLG, lo que podría estar indicando la interacción de ambos polímeros.

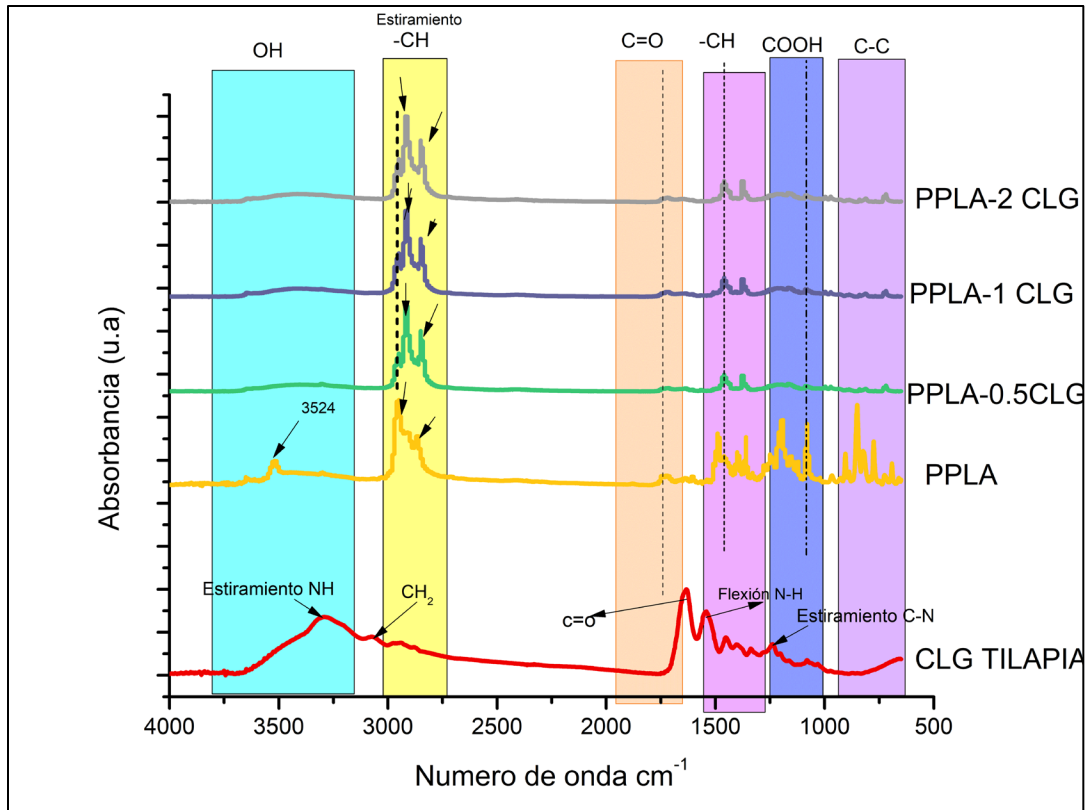


Figura 3.8. Espectros FTIR de películas PPLA Y CLG.

Tabla 3.4. Asignación de los grupos funcionales para las películas a partir de PLA hidrolizado (PPLA) y CLG, obtenidos mediante FTIR.

Grupo	Asignación	Numero de onda (cm <sup>-1</sup> )			
		PPLA	PPLA-CLG0.5	PPLA – CLG1	PPLA-CLG2
OH	Estiramiento	3524	3466	3466	3466
CH	Estiramiento simétrico y asimétrico	2986 y 2856	2914 y 2871	2903 y 2834	2952 y 2959
C=O	Vibración carbonilo	1744	1744	1744	1744
CH	Flexión	1458	1458	1458	1458
COOH	Grupo carboxilo	1074	---	---	---
C-C	Estiramiento	871 y 759			



### 3.7. Calorimetría diferencial de barrido

Los eventos térmicos de las películas hechas a partir de PLA y CLG, se pueden observar en la **Figura 3.9 y en la Figura 3.10**; mismos que fueron registrados después del enfriamiento y un segundo calentamiento por DSC. Asimismo, en las **tablas 3.5 y 3.6**, se indican los valores de temperatura para dichos eventos.

En la **Figura 3.9**, es posible ver los gráficos, correspondientes al calentamiento y enfriamiento de las películas obtenidas a partir de PLA y diferentes concentraciones de CLG (0.5, 1 y 2%), mismas que se comparan con películas hechas únicamente de PLA sin CLG.

Para las películas de PLA, y PLA mezclado con CLG es posible notar que, durante el calentamiento, solo se aprecia la transición vítrea ( $T_g$ ) entre 55y 58 °C, misma que tiene un ligero aumento hacia temperaturas más altas (aproximadamente 2.5 °C) con las concentraciones de 0.5% y 2% de CLG. Mientras que durante el enfriamiento ninguna película registra algún pico asociado a cristalización.

Los eventos térmicos obtenidos para la familia de películas de PLA y CLG, evidencian la miscibilidad de los polímeros, debido a un único registro de temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), coincidente con el estudio de Burgos, et al .,2013, [82], quien encontró que materiales con solubilidad similar pueden acoplarse indicando su miscibilidad por medio de un único registro de  $T_g$ . De igual manera es notoria la estructura de la región amorfa del polímero PLA predominante en la mezcla; esto podría deberse a las condiciones de procesamiento, debido a los movimientos mecánicos y a someterse a enfriamientos bruscos que dificultan la formación de regiones cristalinas, así como a condiciones de barrido para el estudio del historial térmico, considerando que es posible obtener una estructura amorfa del polímero, por enfriamiento a tasas moderadas; asimismo, según lo reportado por estudios anteriores [80] el isómero L-PLA (usado para este estudio), tiene tasas de cristalización más bajas. Sin embargo, en un ambiente no controlado o con tasas de enfriamiento y calentamiento más lentas podría ser visible la aparición de eventos relacionados con la temperatura de cristalización en frío ( $T_{cc}$ ), así como temperatura de fusión ( $T_m$ ); por lo que las características cristalinas del material podrían estudiarse a detalle mediante técnicas de difracción de rayos X. De igual manera se puede considerar que los materiales de esta primera familia no presentan degradación o nucleaciones debidas a la posible interferencia de agentes plastificantes o mayores esfuerzos mecánicos.

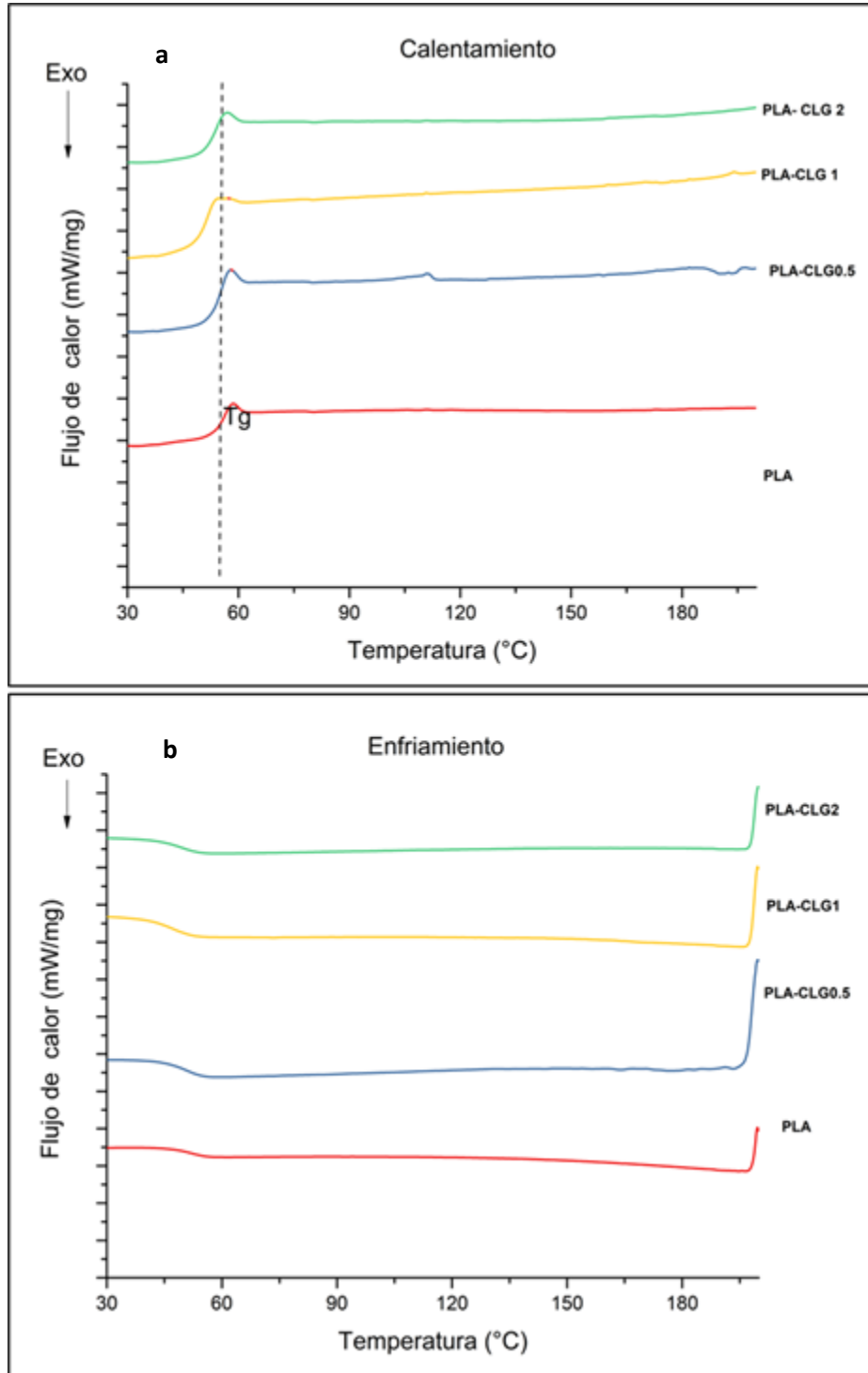


Figura 3.9. Curvas DSC para las películas PLA-CLG. a) calentamiento y b) enfriamiento del material.

**Tabla 3.5. Eventos térmicos y sus correspondientes valores de temperatura para las películas de PLA y CLG.**

Muestra	Calentamiento
	Tg (°C)
PLA	55
PLA -0.5 CLG	58
PLA -1 CLG	55
PLA-2 CLG	58

Por otra parte, los gráficos de la **Figura 3.10**, corresponden a las películas obtenidas a partir de PLA hidrolizado por exposición a humedad del medio ambiente, con posible efecto plastificante (PPLA) y CLG con diferentes concentraciones (0.5, 1 y 2%).

Existe un comportamiento distinto para los termogramas asociados con las películas a partir de PLA hidrolizado (PPLA), así como de PPLA y CLG (**Figura 3.10**). Durante el calentamiento se observa que tanto para la película únicamente de PPLA, como para las películas hechas a partir de mezclas de CLG y PPLA; el pico relacionado con la Tg no se detecta o está escasamente definido, mientras que es posible observar eventos relacionados con temperaturas de cristalización en frío (Tcc) y temperatura de fusión (Tm), de igual manera, es posible notar la presencia de un evento endotérmico adicional al pico de fusión. Asimismo, durante el enfriamiento existe un comportamiento similar para todas las películas: se observan dos picos exotérmicos, relacionados con temperaturas de cristalización (Tc), los cuales coinciden en los mismos intervalos tanto para la película de PPLA como para las películas de PPLA con adición de CLG.

Por otra parte, los eventos térmicos observados para la segunda familia (PPLA y CLG), relacionados con temperatura de cristalización en frío (Tcc) y temperatura de fusión (Tm), coinciden con los valores, en intervalos de temperatura reportados previamente [39]; Asimismo los eventos adicionales que no han sido reportados con exactitud pueden deberse a diferentes condiciones de procesamiento, así como a la nueva conformación estructural debida a la adición de plastificante en el polímero. Por una parte la adición de plastificante, favorece la disminución de la Tg; y, considerando que para este estudio se considera que el agua podría tener este efecto, se ha reportado que ésta (el agua), puede inducir reducción de la Tg hasta 20 °C en comparación

con diluyentes orgánicos, que solo logran disminución entre 4 y 5 °C; a su vez, el plastificante puede influir en movimientos moleculares en la cadena, lo cual estaría generando reordenamientos de las cadenas en fases cristalinas durante periodos más largos, razón por la cual es difícil visualizar la transición vítrea en el termograma de calentamiento; esta característica podría de igual manera relacionarse con la aparición de picos de cristalización durante el enfriamiento, esto ligado a procesos mecánicos durante el procesamiento del material, que podrían generar empaquetamiento en las zonas amorfas cuando el material se funde, lo que permite la interacción de cadenas y facilita la formación de más zonas cristalinas [74]. Sin embargo, este fenómeno no ha sido reportado previamente en termogramas de PLA hidrolizado por humedad del medio ambiente, por lo que su estudio deberá complementarse con técnicas que permitan visualizar fases cristalinas como difracción de rayos X.

En general, los valores para los eventos térmicos de las películas de PLA-CLG, para componentes por separado, presentan los mismos intervalos de temperatura, por lo que la estabilidad térmica del polímero sintético parece no estar alterada por la presencia de la CLG, sino únicamente tiene cambios notorios por la influencia del agua que tiene efecto plastificante tal como ha sido reportado por otros estudios [84].

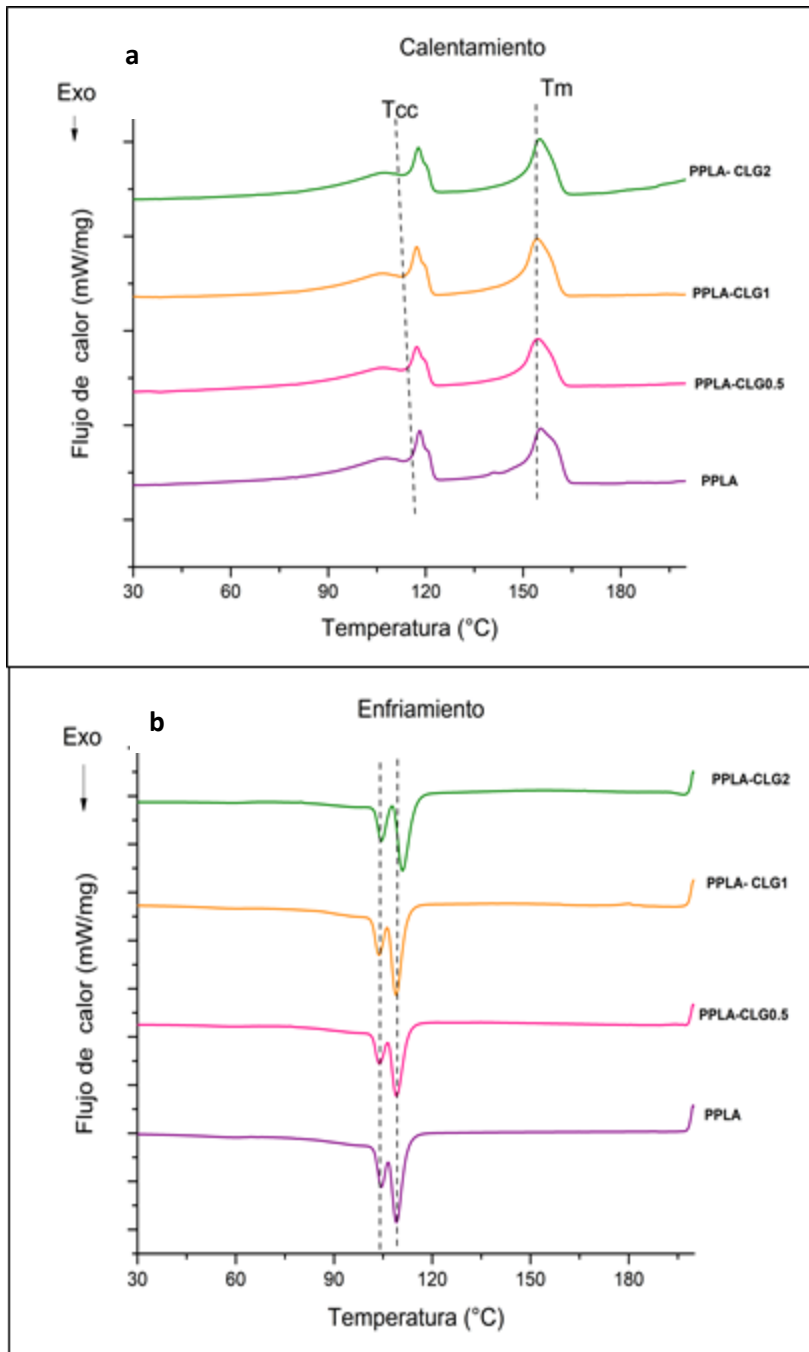


Figura 3.10. Curvas DSC de películas de PPLA y CLG. a) calentamiento y b) enfriamiento del material.

**Tabla 3.6. Eventos térmicos y sus correspondientes valores de temperatura para las películas de PLA plastificado y CLG.**

Muestra	Calentamiento		Enfriamiento	
	T <sub>cc</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>c</sub> 1 (°C)	T <sub>c</sub> 2 (°C)
PPLA	113.4	154	104	108.7
PPLA -0.5 % CLG	113.0	154	104	108.7
PPLA -1 % CLG	111.4	154	104	108.7
PPLA-2% CLG	111.4	154	104	108.7

### 3.8. Análisis termogravimétrico

**Las Figuras 3.11 y 3.12**, muestran los termogramas (TGA) de las películas hechas a partir de PLA y CLG y sus correspondientes derivadas (DTG). De igual manera las **tablas 3.7 y 3.8** describen los valores de pérdidas de peso y temperaturas de máxima degradación. A partir de dichos valores fue posible visualizar y comparar los eventos de pérdida de peso de las muestras.

La **Figura 3.11** muestra las curvas TGA y su correspondientes DTG de las películas elaboradas a partir de PLA-CLG, mismas que a su vez se comparan con películas hechas únicamente de PLA. El análisis y comparación de las pérdidas de peso se observaron en distintas transiciones donde: la primera hace referencia a la pérdida de peso atribuida a la pérdida de agua absorbida del medio ambiente, seguidamente se observa la mayor pérdida de peso asociada a la descomposición del PLA, y por último es posible visualizar el residuo a 600 °C.

Los resultados de los termogramas muestran que la película de PLA comienza a descomponerse en 303 °C, presentando una pérdida de peso en una sola etapa en un intervalo de 303-387 °C, y finalmente un residuo a 600 °C de solo el 0.76%, asimismo la primera derivada evidencio un pico, mismo que indico que la temperatura de máxima de degradación fue de 367.83 °C, estos resultados coinciden con los reportados previamente [82,73].

Por otra parte, se puede observar que las películas de PLA y CLG, presentan ligeras pérdidas de peso, mismas que tienen un aumento correspondiente con el porcentaje de colágena agregada, por lo cual dicha pérdida, además de relacionarse con la desorción de agua, podría de igual manera deberse a la descomposición asociada a la CLG. La mayor pérdida de peso ocurre en el

intervalo de 298 y 387 °C de la misma forma que ocurre para la película de PLA. Sin embargo, es posible notar que con los contenidos de 0.5% y 2% de CLG, la estabilidad térmica se ve ligeramente modificada, notando que la pérdida de peso se desplaza en temperaturas menores, asimismo se puede observar que las temperaturas de degradación máxima, dadas por la DTG son más bajas, siendo la película de PLA la más estable térmicamente, seguida de la película de PLA- 1% CLG, PLA-0.5% CLG y por ultimo PLA -2% CLG; finalmente el residuo a 600 °C no supera el 2% para ninguna de las películas.

En general, la adición de CLG, no presenta cambios significativos con referencia a la estabilidad térmica del PLA, por lo que podrían procesarse con adición de CLG en esos porcentajes.

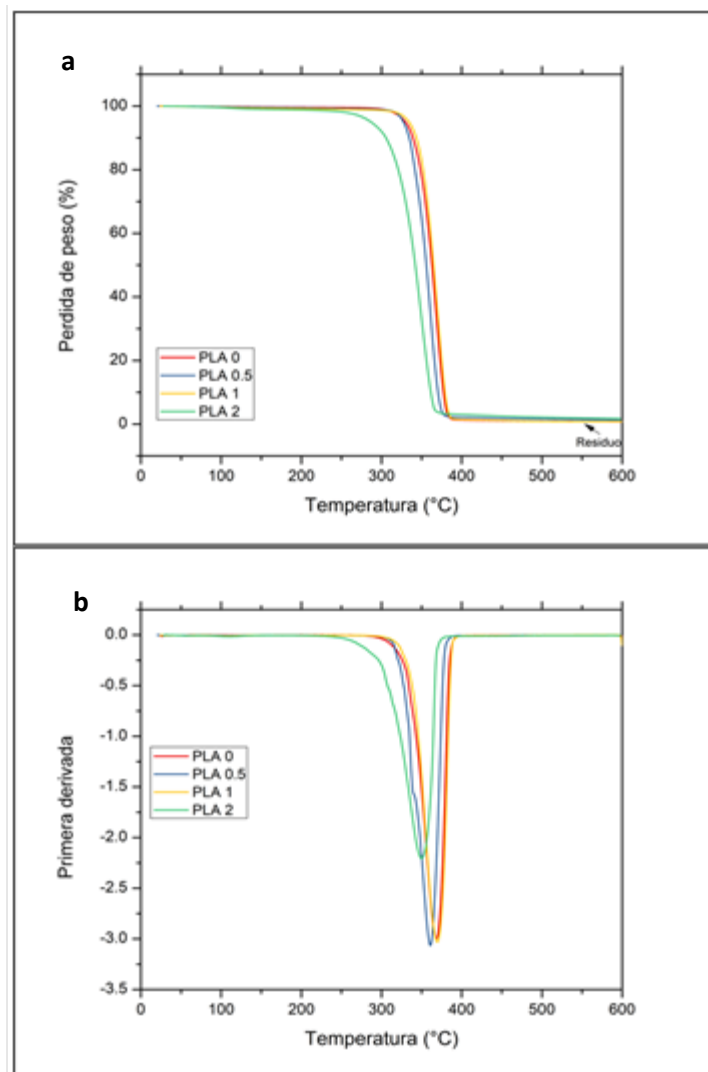


Figura 3.11. Curvas TGA para películas PLA-CLG a) TGA y b)DTG

**Tabla 3.7. Pérdidas de peso y temperaturas de máxima degradación de películas a partir de PLA y CLG**

MUESTRA	TRANSICIONES				
	Pérdida de peso (%)	Tmax (°C)	Pérdida de peso (%)	Tmax (°C)	residuo a 600 °C (%)
PLA	----	----	99.241	367.83	0.764
PLA-CLG0.5	0.54	----	98.120	360.28	1.34
PLA-CLG1	0.99	---	98.250	369.95	0.76
PLA -CLG 2	1.18	----	97.110	349.91	1.71

Por otra parte, los termogramas TGA y sus derivadas DTG, de las películas hechas a partir de PPLA y diferentes porcentajes de CLG, se pueden observar en la **Figura 3.12**.

En estos termogramas es posible notar las pérdidas de peso debidas a transiciones; las primeras pueden atribuirse a pérdidas de peso asociadas al agua, componentes volátiles, así como a fragmentos de PLA degradado entre 100 y 160 °C, con pérdidas de peso entre 11 y 16%, mientras que al final se puede observar la mayor pérdida de peso entre 373.50 y 478.53 °C, con pérdidas entre 76.15 y 88.16% de peso, asociadas con la degradación del PLA; asimismo, se registra el residuo a 600°C.

El termograma asociado a la película de PPLA, evidencia que a diferencia de las películas de PLA sin degradación, que se descomponen en una sola etapa, esta película presenta degradación por etapas, lo cual puede deberse, a la presencia de humedad en la estructura; debido a que el agua podría presentar efecto plastificante, por lo que se genera mayor volumen libre [73] la cual tardará más en evaporarse, asimismo, se puede atribuir a la degradación térmica y mecánica que ocurre durante el proceso de extrusión, misma que dejara residuos de PLA que se verán reflejados como pérdida de peso a menor temperatura. Lo anterior a su vez refleja picos de degradación máxima.

Por otra parte, las películas hechas de PPLA-CLG, muestran que con la adición de diferentes porcentajes de CLG, las temperaturas de pérdidas de peso disminuyen en función del contenido de CLG. Siendo la disminución más evidente, en el intervalo de las últimas dos zonas, donde se



da la mayor pérdida de peso y es posible notar que la estabilidad de las películas que contienen 1 y 2% de CLG, se ve afectada con el desplazamiento de la temperatura de degradación máxima con valores de hasta 30 °C por debajo de los obtenidos para las películas de PLA hidrolizado.

Las distintas pérdidas de peso (marcadas en intervalos con flechas que agrupan los eventos similares) se puede atribuir de manera general a la presencia del agua con efecto plastificante, que como ya se mencionó pueden generar volumen libre, y a su vez generar degradación hidrolítica del PLA, esto junto con la degradación termomecánica ocasionada por la extrusión, podría generar residuos de bajo peso molecular que serían visibles en pérdidas de peso a menores temperaturas. Adicionalmente, es posible que la adición de CLG, produjera pérdidas de peso, sin embargo, éstas podrían estar enmascaradas por los demás componentes de bajo peso molecular. Finalmente, es posible notar que la película de PPLA-CLG0.5, presenta la mayor estabilidad térmica, con valores muy cercanos a la de PPLA, mientras que películas de PPLA-CLG1y PPLA-CLG2, se descomponen ligeramente más rápido, por lo que su proceso debería cuidar no sobrepasar la temperatura de 429 °C.

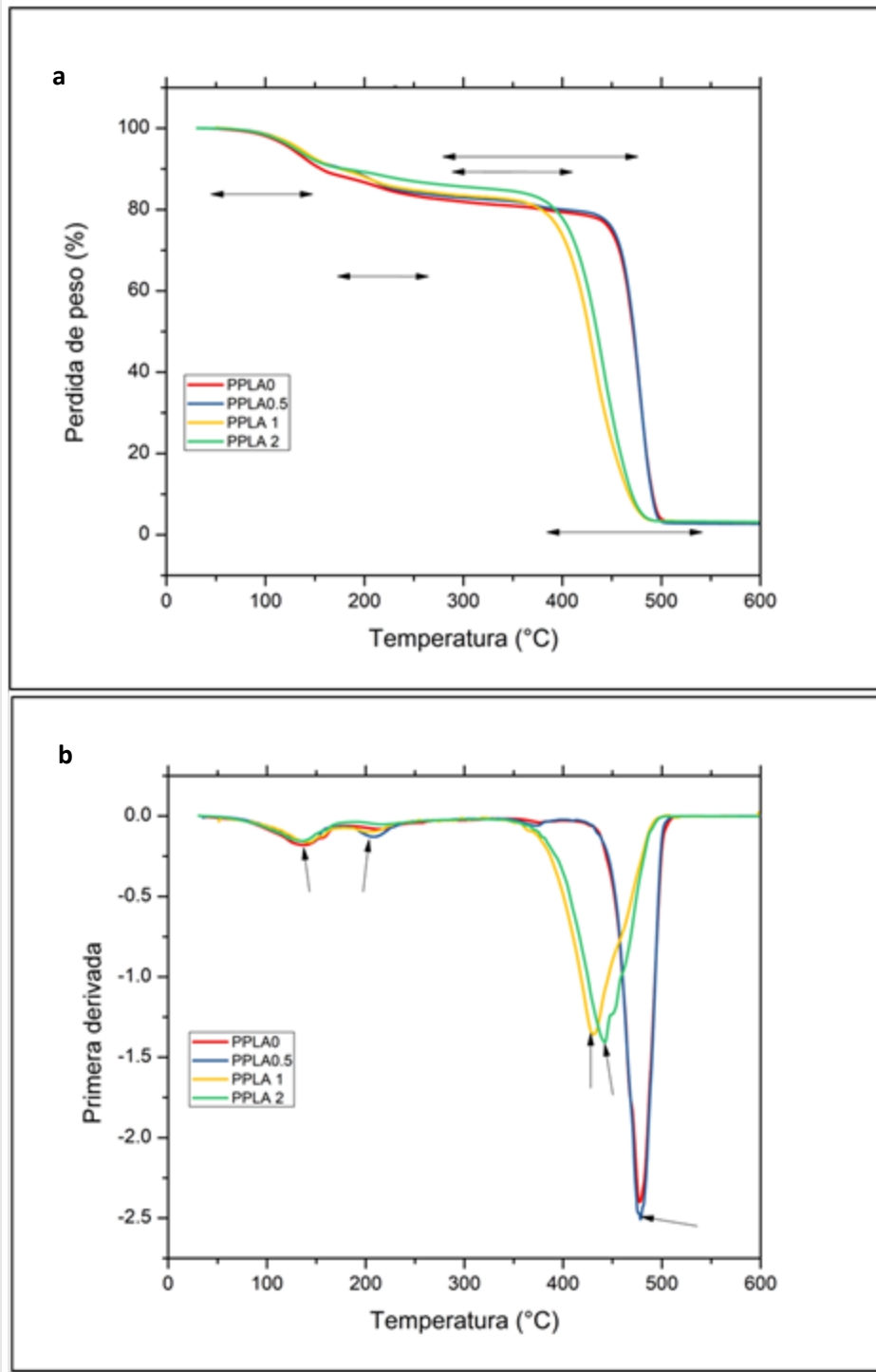


Figura 3.12. Curvas TGA para películas PPLA-CLG a)TGA y b)DTG

**Tabla 3.8. Pérdidas de peso y temperaturas de máxima degradación de películas a partir de PPLA y CLG.**

MUESTRA	TRANSICIONES								residuo a 600 °C (%)
	Pérdida de peso (%)	Tmax (°C)	Pérdida de peso (%)	Tmax (°C)	Pérdida de peso (%)	Tmax (°C)	Pérdida de peso (%)	Tmax (°C)	
PPLA	11.98	136.39	6.09	211.78	2.70	375.88	76.15	476.78	3.08
PPLA-CLG0.5	9.83	140.71	7.72	209.00	2.39	373.50	77.37	478.53	2.69
PPLA-CLG1	10.12	139.94	7.04	203.14	---	----	79.70	429.53	3.14
PPLA -CLG2	10.32	133.32	4.36	218.14	----	----	82.16	442.57	3.16

### 3.9. Propiedades mecánicas (prueba de tensión)

Las **Figuras 3.13 y 3.14** muestran las curvas de esfuerzo- deformación, de las películas de PLA-CLG, obtenidos a partir del ensayo de tensión. Asimismo, las **Tablas 3.9 y 3.10** resumen los valores de las propiedades mecánicas de dichas películas.

La **Figura 3.13** muestra las propiedades mecánicas obtenidas a partir de las películas conformadas por PLA-CLG.

Los resultados demuestran que las películas de PLA, tal como se ha reportado anteriormente, son materiales rígidos [91,77].ya que se observa la presencia de un mayor modulo elástico, sin embargo, con la adición de la CLG se reduce ligeramente el módulo de elasticidad, hasta 1993 MPa, pero sin cambios significativos en su deformación.

En general las propiedades mecánicas obtenidas para las películas compuestas a partir de PLA y CLG, demostraron que dichos materiales son rígidos y resistentes, con un buen desempeño mecánico, reflejado en sus altos módulos de elasticidad que fueron de 2635, 2190, 2113, 1993 MPa respectivamente y resistencia a la tracción de 39.6, 28.4, 34 y 27.8 respectivamente, pero con valores de deformación muy bajos entre 0.78 y 0.84%, mismos que podrían resultar en materiales quebradizos y con baja flexibilidad, por lo anterior se puede deducir que la matriz de PLA aporta características de resistencia mecánica a la mezcla, pero con baja flexibilidad.

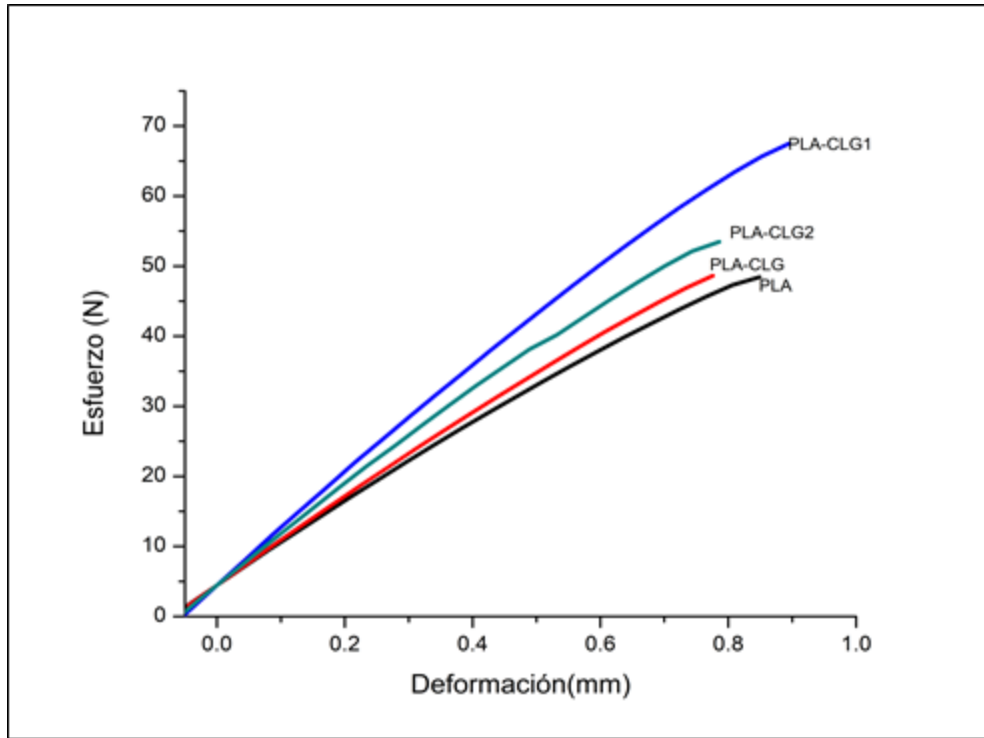
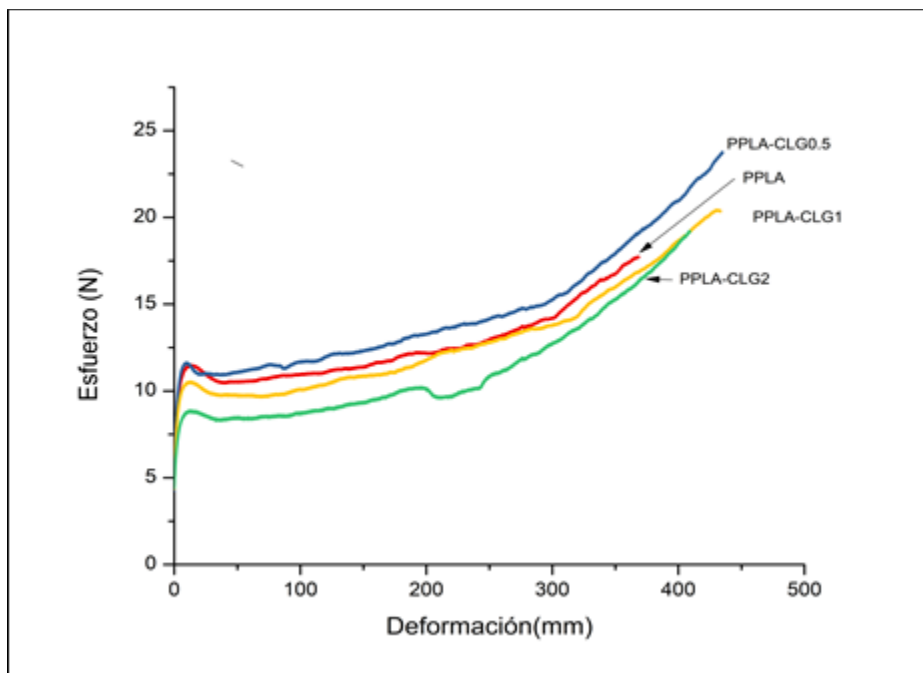


Figura 3.13. Curva esfuerzo- deformación de las películas PLA-CLG

Tabla 3.9. Propiedades mecánicas de películas de PLA y CLG.

Muestra	Resistencia a la tracción (MPa)	Módulo de Elasticidad (MPa)	Deformación (%)
PLA-0% CLG	39.6 ±6.2	2635.0±420.2	0.84
PLA-0.5% CLG	28.4±3.8	2190.8±246.2	0.77
PLA-1.0% CLG	34.0±3.8	2113.5±101.3	0.89
PLA-2.0% CLG	27.8±2.3	1993.3±146.7	0.78

En la **Figura 3.14** se muestra el grafico con las propiedades mecánicas obtenidas para las películas a base de PPLA y CLG. Es posible notar que, para las películas plastificadas, la resistencia a la tracción y el módulo de elasticidad se ven considerablemente reducidos, los cuales mostraron valores entre 15.60 y 19.72 MPa y entre 164 y 215 MPa respectivamente. Asimismo, el porcentaje de deformación aumenta hasta 425% en función de la cantidad de CLG, mostrando una ligera disminución en aquella donde se añadió 2% de CLG, esto probablemente debido a la incorporación de fases de PLA y CLG, donde CLG podría representar un refuerzo. Estos resultados permiten ver que el plastificante hace más flexible a la mezcla polimérica, permitiendo tener un área más grande de zona plástica antes de la fractura. Estos hallazgos sugieren que el PPLA, aporta una resistencia mecánica, que a su vez permite la flexibilidad de película; en este sentido considerando que dicho material puede ser usado en la superficie de la piel y que ésta presenta módulos de elasticidad entre 4,6 MPa y 20 MPa, la flexibilidad en las películas es una característica favorable para estas aplicaciones; este ensayo demuestra que a pesar de tener valores aun lejanos a estas cifras, se ha logrado disminuir considerablemente en comparación con aquellas sin presencia de PPLA, por lo que su composición futura podría considerar disminuir el módulo de elasticidad, sin comprometer demasiado su resistencia, con ayuda de aditivos como plastificantes y aceites esenciales para mejorar la flexibilidad y refuerzos que mantengan la resistencia.



**Figura 3.14.** Curvas esfuerzo-deformación de las películas de PPLA-CLG

**Tabla 3.10. Propiedades mecánicas de películas PPLA y CLG.**

<b>Muestra</b>	<b>Resistencia a la tracción (MPa)</b>	<b>Módulo de Elasticidad (MPa)</b>	<b>Deformación (%)</b>
PPLA-0% CLG	18.30±2.57	215.96±59.74	411.00
PPLA-0.5% CLG	19.72±2.25	215.78±51.10	425.20
PPLA-1.0% CLG	18.10±2.25	176.40±50.16	421.25
PPLA-2.0% CLG	15.60±1.94	164.95±54.19	391.60

## CONCLUSIONES

Mediante la técnica de hidrólisis enzimática, propuesta en la metodología, se logró la extracción a partir de piel de tilapia *Oreochromis niloticus* con un rendimiento de extracción de 3.4%, lo cual está por arriba del rendimiento reportado para la extracción de CLG a partir de piel del pez Parang-Parang (1.92%) y de la Tilapia roja , Bagre y Palometa (2.27%)

De acuerdo con el análisis de FTIR, la CLG extraída es tipo 1, lo cual se confirmó con la electroforesis, donde fue posible observar bandas asociadas a las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  relacionadas con la estructura de la CLG tipo I. Las caracterizaciones térmicas demuestran que la CLG puede mezclarse con el PLA o PLLA a temperaturas no mayores a 322 °C, ya que esta temperatura es su temperatura máxima de degradación.

Mediante el proceso de extrusión en fundido, llevado a cabo en una sola etapa se lograron obtener películas continuas de 2 m de longitud de PLA-CLG y PPLA-CLG, presentando mejores características macroscópicas en cuanto a apariencia y flexibilidad, aquellas realizadas con el PPLA.

Los espectros FTIR de las películas, mostraron bandas asociadas principalmente a PLA, esto debido a que es el componente mayoritario en todas las composiciones por lo que los espectros de CLG quedaron enmascarados. Por otra parte, fue posible notar que tanto la presencia de humedad (agua), como el propio procesamiento de extrusión, generaron rompimiento de enlaces, y ligeras degradaciones termooxidativas asociadas al PLA, lo cual promovió la generación de fragmentos de la cadena de PLA, reflejándose en disminución de pesos moleculares; lo que a su vez promovió el aumento de los enlaces asociados a grupos OH y la disminución de la intensidad del grupo carbonilo.

Por otro lado, las pruebas térmicas permitieron mostrar las características semicristalinas de las películas .El análisis DSC, permitió mostrar que la presencia de agua podría favorecer el procesamiento de los materiales ya que se visualiza una clara disminución en la temperatura Tg , asimismo se la atribuye la formación de regiones cristalinas debido a los movimientos generados por los enlaces al aumentar el volumen libre. Del mismo modo también se le pueden atribuir fenómenos de degradación debidos a la interacción del PLA con el agua mismos que estarían coincidiendo con los espectros OH obtenidos en FTIR.

En cuanto al TGA, las películas compuestas de PLA y CLG, muestran pérdida de peso en una sola etapa, con un porcentaje bajo de residuos, sin embargo, aquellas películas elaboradas con PPLA muestran pérdidas de peso en varias etapas, que de igual manera que DSC, podría estar asociado a la degradación del PLA por los procesos de extrusión, así como a la incorporación de agua, pese a ello, el residuo es bajo en porcentaje y la estabilidad térmica se mantiene.

Finalmente las pruebas mecánicas dejan ver que las películas a base de PLA-CLG, son rígidas con tendencia a la fractura, y a pesar de mantener fuerte la estructura mecánica del material, podría representar una desventaja para aplicaciones dérmicas, por otra parte las películas a base de PPLA-CLG, presentan una mayor flexibilidad con bajos módulos de elasticidad, lo cual a pesar de representar cierta degradación, puede ser más fácil de manipular debido a su flexibilidad, por lo que representa una ventaja para la aplicación para la que se quiere evaluar.

En general se logró la incorporación de PLA y CLG, con películas que presentan buen tamaño en comparación con otros andamios, pese a la degradación que surgió durante el proceso, se puede atribuir que las películas de PPLA y CLG, presentan características de flexibilidad con posible aplicación en la ingeniería del tejido dérmico, por lo que su mejoramiento depende de aditivos que puedan mantener la estabilidad térmica y mecánica, conservando la flexibilidad.



## PERSPECTIVAS

Con la finalidad de evaluar más a fondo la estructura y composición de las películas, así como el uso de éstas como biomaterial de uso dérmico, se recomienda:

- Mejoramiento de las propiedades biológicas, con adición de recubrimientos antimicrobianos, como aceites esenciales, que a su vez podrían mejorar sus propiedades de flexibilidad.
- Evaluación de sus propiedades semicristalinas mediante técnicas de caracterización por dispersión de rayos X (WAXS).
- Verificación de su composición morfológica, por microcopia electrónica de barrido (SEM).
- Evaluación de sus propiedades biológicas mediante ensayos de viabilidad celular, hemocompatibilidad y ensayo de cierre de herida.

## BIBLIOGRAFÍA

1. M. Osorio, et al., Aplicaciones biomédicas de biomateriales poliméricos. *DYNA (Colombia)*. 84, 241-252, 2017.
2. R. Lara, J. Claudio, E. Múzquiz, López. Hidrogeles de colágeno acoplados con hidroxiapatita para aplicaciones en ingeniería tisular. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 23, 1-12, 2020.
3. P. Almeida, J. Reinaldo, S. Caetano. Quality assurance and economical feasibility of an innovative product obtained from a byproduct of the meat industry in Brazil. *African Journal of Business Management*. 7, 27, 45-2756, 2013.
4. H. Liu, K. Huang. Structural Characteristics of Extracted Collagen from Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Bone: Effects of Ethylenediaminetetraacetic Acid Solution and Hydrochloric Acid Treatment. *Int J Food Prop*. 19, 1, 63-75, 2016.
5. J. Quintero, J. Zapata. Optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis spp*) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta. *Información Tecnológica*. 28, 109-120, 2017.
6. H. Ehrlich. *Marine Biological Materials of Invertebrate Origin*. Biologically-Inspired Systems . 2019, Vol. 13, 295–308.
7. M. Guillermo, et al., Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. *Revista ingeniería e investigación*. 28, 57-71, 2008.
8. A. Colorado, C. Agudelo, M. Moncada . Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: revisión. *Rev Ing Biomed*. 7, 14, 11-23, 2013.
9. D. Lin, et al., A poly (glycerol sebacate)-coated mesoporous bioactive glass scaffold with adjustable mechanical strength, degradation rate, controlled-release, and cell behavior for bone tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 131, 1-11, 2013.
10. A. Pich, W. Richtering. Polymer Nanogels and Microgels. *Polymer Science*. 1, 309-350, 2012.
11. M. Lizarbe . Sustitutivos De Tejidos: De Los Biomateriales a La Ingeniería Tisular. *CiencExactFísNat* . 101, 1, 227-249, 2007.
12. S. Vlierberghe, P. Dubruel, E. Schacht. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review. *Biomacromolecules*. 12, 1387-1408, 2011.
13. E. Pişkin. Biodegradable Polymers as Biomaterials. *J Biomater Sci Polym*. 32, 762-798, 1995.
14. A. Ramos. Sustitutos dérmicos biológicos. *Panorama actual del medicamento*. 43, 421, 275-279, 2019.

15. K. Vig, et al., Advances in skin regeneration using tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 18,789-808, 2017.
16. Odian G. *Principles of Polymerization* , 2004, New York,19-29.
17. M. Valero, Y. Ortegón, Y. Uscategui. Biopolímeros: Avances y perspectivas. *DYNA (Colombia)*.80, 181, 171-180, 2013.
18. L. Rodríguez, C. Orrego. Applications of blends of biopolymers and synthetic polymers: Bibliographic review. *Revista Científica*.2, 25,1962, 2016.
19. P. Pérez, I. Carreño, A. García, A. Guerrero. Uso de biopolímeros para la elaboración de andamios con aplicación en ingeniería tisular. *Revista chilena de cirugía*.67,165-169, 2015.
20. A. Labeaga. Polímeros biodegradables. Importancia y potenciales aplicaciones. Uned. 2018.
21. R. Young, C Chung. Introduction to Polymers. *J Eng Mater Technol*.104, 4,169-189, 2011.
22. A. Kahar, H. Ismail, A. Abdul. The correlation between crosslink density and thermal properties of high-density polyethylene/natural rubber/thermoplastic tapioca starch blends prepared via dynamic vulcanisation approach. *J Therm Anal Calorim*.123, 1, 301-308, 2016.
23. U. Wendt. Engineering Materials and Their Properties. *Springer Handbooks*, 2001, Vol.1, 233-252.
24. K. Leja, G. Lewandowicz. Polymer biodegradation and biodegradable polymers - A review. *Pol J Environ Stud*.19, 2, 255-266, 2010.
25. P. Prado, B. Rossy, B. Molina. Metaloproteinasas de la matriz extracelular (mmps) en Odontología. *Odontoestomatología*.18, 28, 20-29, 2018.
26. D. Bernales, F. Caride, A, Lewis, L. Martin. Membranas de colágeno polimerizado: Consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*. 23, 2, 65-74, 2004.
27. K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv*. 55, 12,1541-1546,2003.
28. K. Gómez, P. Barba, N. Rodríguez. Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino. *Superficies y vacío*. 24, 137-140, 2011.
29. M. Shoulders, R. Raines. Collagen structure and stability. *Biochemistry*.78, 929-958, 2009.
30. J. Kennedy, T. Wess.The Structure of Collagen within Parchment - A Review. 24,61-80, 2003.
31. H. Ramírez, J. Ramírez, M. Mazorra. Biological properties of collagen-derived peptides from marine resources. *Biotecnia*. 15, 34-45, 2013.
32. M. Lambri, E. Giordano, et al., Thermal degradation of type I collagen from bones. *J Renew Mater*. 4, 251-257, 2016.

33. B. Chevally, D. Herbage. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: Applications for tissue engineering and gene therapy. *Medical and Biological Engineering and Computing*. 38, 211-218, 2000.
34. T. Nagai, Y. Tanoue, N. Kai, N. Suzuki. Characterization of collagen from emu (*Dromaius novaehollandiae*) skins. *J Food Sci Technol*. 52, 4, 2344-2351, 2015.
35. L. Pérez. Metaloproteinasas y piel. *Actas Dermo-Sifiliograficas*. 2004, Vol. 95, 413-423.
36. D. Kleiner, W. Stetler. Metaloproteasas de matriz y metástasis. *La quimioterapia y la farmacología del cáncer*. 43, 58-89, 1999.
37. T. Silva, J. Moreira, et al., Marine origin collagens and its potential applications. *Marine Drugs*. 12, 581-590, 2014.
38. X. Ran, L. Wang. Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products. *J Sci Food Agric*. 94, 585-590, 2014.
39. J. Medina, Y. Roche, O. Maldonado, J. Hernández, C. Zapata. Degradación hidrolítica y biodegradación de mezclas binarias de ácido poliláctico (PLA) con residuos plásticos. *Revista Ingeniería UC*. 25, 2, 248-258, 2018.
40. N. Paragkumar, D. Edith, J. Six. Surface characteristics of PLA and PLGA films. *Appl Surf Sci*. 253, 5, 2758-2764, 2006.
41. D. Silva, et al. Biocompatibility, biodegradation, and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. *Chemical Engineering Journal*. 340, 9-14, 2018 .
42. A. Schroeder, K. Turjeman, J. Schroeder, M. Leibergall, Y. Barenholz. Using liposomes to target infection and inflammation induced by foreign body injuries or medical implants. *Drug Delivery*. 7, 1171-1189, 2010.
43. O. Böstman, H. Pihlajamäki. Adverse tissue reactions to bioabsorbable fixation devices. *Clin Orthop Relat*. 371, 216-227, 2000.
44. G. Gonzalez, R. Cassilly, F. Remotti, W. Levine. Is the etiology of pretibial cyst formation after absorbable interference screw use related to a foreign body reaction. *Clinical Orthopaedics*. 469, 1082-1089, 2011.
45. Y. Yeong, C. Chua, K. Leong, M. Chandrasekaran. Rapid prototyping in tissue engineering: Challenges and potential. *Trends in Biotechnology*. 22, 643-652, 2004.
46. G. Orive, R. Hernández, A. Garcón, M. Igartúa, J. Pedráz. Ingeniería Tisular: retos y realidades. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 10, 2, 46-51, 2003.
47. F. Melchels, et al., Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in Polymer Science*. 37, 1079-1104, 2012.

48. P. Bartolo. Innovative Developments in Virtual and Physical Prototyping, Portugal. 5, 13-51, 2011.
49. M. Sabino, M. Loaiza, J. Dernowsek, R. Rezende. Técnicas para la fabricación de andamios poliméricos con aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.* 37, 2, 1-27, 2017.
50. K. Prabha, et al. Recent development, challenges, and prospects of extrusion technology. *Future Foods.* 3,100019-100034, 2021.
51. S. Naghieh, X. Chen. Printability—A key issue in extrusion-based bioprinting. *Journal of Pharmaceutical Analysis.*11, 5, 564-579, 2021.
52. H. Cheng, Y. Yang, S. Li, Y. Hong, G. Jang. Modification and extrusion coating of polylactic acid films. *J Appl Polym Sci.* 132, 35,108-119, 2015.
53. S. Aparicio, et al. Optimal methods for processing mineralized tissues for Fourier transform infrared microspectroscopy. *Calcif Tissue Int.* 70, 5, 422-429, 2002.
54. D. Bellini, et al. PLA-grafting of collagen chains leading to a biomaterial with mechanical performances useful in tendon regeneration. *J Mech Behav Biomed Mater.* 64, 151-160, 2016
55. N. Montañez, D. Peña, H. Estupiñán. Respuesta dieléctrica y bioquímica de un recubrimiento PLA-PGA-HAp-Quitosano-Colágeno sobre Ti6Al4V. *Ingeniare.*2, 24, 215-227, 2016.
56. J. Carrión. Procesos de fabricación de productos plásticos. *Industrial Data.* 3, 1, 6-8, 2014.
57. Y. Mogahzy. Finishing processes for fibrous assemblies in textile product design. *Engineering Textiles.*1, 300-326, 2009.
58. A. Abdelnour. Microbiota y Salud. *Acta Med Costarric.*60, 3, 101-102, 2018.
59. D. Le, G. Morvan , J. Sire. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Developmental Biology.*48, 217-232, 2004.
60. I. Fernández, N. Rodríguez, L León, L. Alcántara, et al. Cell-free scaffold from jellyfish *Cassiopea andromeda* (Cnidaria; Scyphozoa) for skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering C.* 111, 110748-110758, 2020.
61. M. Cui, L. Liu, N. Guo, R. Su, F. Ma. Preparation, cell compatibility and degradability of collagen-modified poly (lactic acid). *Molecules.* 20, 1, 595-607, 2015.
62. A. Ospina, et al. Grafting collagen on poly (lactic acid) by a simple route to produce electrospun scaffolds, and their cell adhesion evaluation. *Tissue Eng Regen Med.* 13, 4, 375-387, 2016.
63. H. Duran, D. Ballesteros. Adhesión de osteoblastos sobre andamios de PLA-PLG- biocerámico-colágeno, fotosensibilizados con luz UV. *Revista Ion.*27, 2, 7-15, 2014.

64. I. Armentano, et al. Novel poly(L-lactide) PLLA/SWNTs nanocomposites for biomedical applications: Material characterization and biocompatibility evaluation. *J Biomater Sci Polym Ed.* 22, 4–6, 2016.
65. E. Rodríguez, E. Villegas. Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. *Métodos y Materiales.* 2, 25-32, 2012.
66. H. Pérez. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos , actualidad e importancia. *Univ Diag.* 1, 2, 31-41, 2000.
67. C. Cercenado. Procedimientos en Microbiología Clínica. *SeimcOrg.* 1, 1-31, 2008.
68. T. Nagai, N. Suzuki. Isolation of collagen from fish waste material - Skin, bone, and fins. *Food Chem.* 60, 277-281, 2000.
69. D. Liu, et al. Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins, and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Biosci.* 9, 68-74, 2015.
70. E. García, L. Gómez, F. Rodríguez. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 29, 15-39, 2017.
71. W. Torres, et al. Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Ciencia y Tecnología Alimentaria.* 6, 2, 101-108, 2008.
72. N. Wang, X. Zhang, J. Yu, J. Fang. Study of the properties of plasticised poly (lactic acid) with poly (1,3-butylene adipate). *Polymers and Polymer Composites.* 16, 9, 597-604, 2008.
73. M. Zorah, I. Roshawaty, N. Daud, J. Nahida, N. Sudin. Effects of Tributyl Citrate Plasticizer on Thermomechanical Attributes of Poly Lactic Acid. *Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences.* 62, 274–84, 2019.
74. P. Pagés. Procesado del ácido poliláctico (PLA) y de nanocompuestos PLA/montmorillonita en planta piloto: Estudio de sus cambios estructurales y de su estabilidad térmica. *Journal of Chemical.* 67, 107-113, 2011.
75. M. Haaparanta, et al. Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 25, 4, 1129-1136, 2014.
76. M. Rapa, et al. PLA/collagen hydrolysate/silver nanoparticles bionanocomposites for potential antimicrobial urinary drains. *Polymer-Plastics Technology and Materials.* 58, 18, 2041-2055, 2019.
77. J. Vega, et al. Ácido L-poliláctico (PLA) y nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) con potenciales aplicaciones industriales. *Revista Colombiana de Química.* 50, 1, 20–39, 2021.

78. N. Choksi, H. Desai. Synthesis of Biodegradable Polylactic Acid Polymer by Using Lactic Acid Monomer. *International Journal of Applied Chemistry*. 13, 377-384, 2017.
79. E. Ruiz, et al. Moldeo rotacional de mezclas de poli (ácido láctico) /polietileno compatibilizadas. *Rev. Iberoam. Polímeros*. 20, 221-235, 2019.
80. M. Sánchez, et al. Effect of the cooling rate on the nucleation kinetics of poly (l-lactic acid) and its influence on morphology. *Macromolecules*. 40, 22, 7989-7997, 2007.
81. N. Burgos, V. Martino, A, Jiménez. Characterization and ageing study of poly (lactic acid) films plasticized with oligomeric lactic acid. *Polym Degrad Stab*. 98, 2, 651-658, 2013.
82. J. Mina, et al. Preparación y caracterización fisicoquímica y mecánica de mezclas ternarias de polilactida (plla), policaprolactona (pcl) y almidón termoplástico. *Rev LatinAm Metal Mat*. 33, 1, 82-91, 2013.
83. C. Pinese, et al. In vivo evaluation of hybrid patches composed of PLA based copolymers and collagen/chondroitin sulfate for ligament tissue regeneration. *J Biomed Mater*. 105, 7, 1778-1788, 2017.
84. H. Jafari, et al. Fish collagen: Extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering. *Polymers*. 12,10, 2230-2266, 2020.
85. S. Ricard. The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3, 1, 4978-4998, 2023.