Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE ANDAMIOS ELECTROHILADO DE POLICAPROLACTONA MEDIANTE PLASMA DE AIRE PARA SU USO POTENCIAL EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

Tesis que presenta

LUIS ALFONSO CAN HERRERA

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS
(MATERIALES POLIMÉRICOS)

Mérida, Yucatán,
Junio 2017

Al Señor Todopoderoso

A mi Madre (Siempre un ejemplo, Q.E.P.D)

A mi Esposa

A mi hijo Samuel

A mi Hermana, Sobrinos, Cuñados, Suegros.

A mis Pastores.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número 169698.

Agradezco al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por permitirme desarrollar en sus instalaciones la mayoría de los experimentos contenidos en este documento.

Profundamente agradezco a mi asesor el Dr. José Manuel Cervantes Uc, por las enseñanzas brindadas tanto en lo académico, como en lo personal, ya que siempre procuró contribuir para mi superación profesional.

Quiero agradecer a los miembros del comité tutorial, conformados por el Dr. Manuel Aguilar Vega y por el Dr. José Bonilla, por sus consejos y por darle seguimiento a este camino que apenas comienza.

Agradezco de manera especial al Dr. Alejandro Ávila por las facilidades brindadas para realizar la modificación con plasma de los andamios en la FIQ-UADY, y por su amistad.

Sinceramente le agradezco al Dr. Iván Oliva su orientación y sus consejos.

También agradezco al Dr. Wilberth Antonio Herrera Kao por su apoyo durante las pruebas.

No podía faltar mi agradecimiento a mis amigos (as), Ena, María José, Zujey, Mario Dzul, Mario Muñoz, David, Charlie, Marcial, Victor, Miguel, y a mis compañeros del grupo de biomateriales.

Índice

Lista de Figuras vi

Lista de Tablas x

Resumen…. 1

Abstract…… 2

Introducción 4

Capítulo 1. Marco teórico 5

1.1. Ingeniería de tejidos (IT) 5

1.2. Técnicas para la elaboración de andamios en IT 7

1.2.1. Moldeo por evaporación de disolvente (*solvent casting*). 7

1.2.2. Lixiviación de partículas (*particulate leaching*). 8

1.2.3. Separación de fases (*phase separation*). 9

1.2.4. Autoensamble (*self assembly*). 9

1.2.5. Prototipado rápido (*rapid prototyping*). 10

1.2.6. Hilado por fuerza centrifuga (*forcespinning*). 11

1.2.7. Electrohilado (*electrospinning*). 11

1.3. Materiales poliméricos usados en la elaboración de andamios (naturales y sintéticos). 13

1.3.1. Policaprolactona (PCL) 17

1.4. Técnicas de modificación superficial de andamios 19

1.4.1. Modificación superficial con plasma 20

1.4.1.1. Plasmas inductivos y capacitivos 23
Generador de acoplamiento inductivo. 23
Generador de acoplamiento capacitivo. 23
1.5. Técnicas de caracterización superficial de materiales 24
1.6. Antecedentes 27
Justificación 29
Hipótesis…. 28
Objetivos…. 28
General 28
Específicos 29
Capítulo II. Materiales y Métodos 33
2.1. Materiales 29
2.2 Preparación de los andamios electrohilados de PCL 29
2.3. Caracterización de los andamios electrohilados de PCL 30
2.3.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM) 34
2.3.2. Análisis del área superficial y volumen total de poro 34
2.3.3. Caracterización mecánica de los andamios electrohilados 35
2.4. Modificación superficial de los andamios por medio de plasma de aire 35
2.5. Caracterización de los andamios de PCL modificados por el plasma de aire 37
2.5.1. Análisis morfológico de los andamios 37
2.5.1.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM) 37
2.5.1.2. Microscopia de fuerza atómica (AFM) 37

2.5.2. Caracterización fisicoquímica de los andamios modificados. 37

2.5.2.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, en modo de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) 37

2.5.2.2. Espectroscopía de energía dispersiva de rayos-X (EDS) 38

2.5.2.3. Espectroscopia fotoeléctronica de rayos-X (XPS) 38

2.5.2.4. Análisis del ángulo de contacto y energía libre superficial. 38

2.5.2.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC). 39

2.5.2.6. Difracción de rayos-X (XRD). 39

2.5.3. Análisis de la concentración de grupos carboxilo (COOH) en los andamios por el método TBO 39

2.6. Análisis estadístico y error experimental 40

Capítulo III. Resultados y Discusión 37

3.1. Obtención y caracterización de los andamios electrohilados 37

3.1.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM) 37

3.1.2. Análisis del área superficial y volumen total de poro. 44

3.1.3. Caracterización mecánica de los andamios electrohilados de PCL 46

3.2. Caracterización de los andamios de PCL modificados por el plasma de aire 51

3.2.1. Análisis morfológico de los andamios de PCL 51

3.2.1.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM) 51

3.2.1.2. Microscopia de fuerza atómica (AFM) 49

3.2.2. Caracterización fisicoquímica de los andamios de PCL modificados. 57

3.2.2.1. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier en modo reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) 57

3.2.2.2. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X (EDS) 59

3.3.2.3. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X (XPS) 60

3.2.2.4. Análisis de ángulo de contacto y energía libre superficial. 66

3.2.2.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC). 68

3.2.2.6. Difracción de rayos-X (XRD). 70

3.2.3. Caracterización mecánica de los andamios de PCL 72

3.2.4. Análisis de la concentración de grupos COOH por el método TBO de los andamios de PCL modificados. 69

Conclusiones 78

Recomendaciones 81

Referencias bibliográficas 82

Anexos……..…….90

Lista de Figuras

Figura 1.1. Descripción del proceso básico de la ingeniería de tejidos que involucra el sembrado de células (a), en un andamio o soporte (b), y que puede incluir factores de crecimiento, proteínas, entre otros (c). Este conjunto es considerado un constructo (d) que es implantado en el cuerpo del paciente..... 5

Figura 1.2. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de moldeo por evaporación de disolvente..... 8

Figura 1.3. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de lixiviación de partículas..... 8

Figura 1.4. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de separación de fases 8

Figura 1.5. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de autoensamble.. 9

Figura 1.6. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de prototipado rápido..... 10

Figura 1.7. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de hilado por centrifugación 10

Figura 1.8. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de electrohilado. Arreglo vertical (a) y arreglo horizontal (b) 12

Figura 1.9. Ilustración gráfica de la degradación de la PCL. Inicia con la hidratación del polímero, con el paso del tiempo ocurre la pérdida de hidratación y de la masa, posteriormente se lleva a cabo la reabsorción y finalmente la metabolización (a). Tambien se muestra la degradación por vía hidrolítica (b) y los cambios asociados a la cristalinidad como consecuencia de la degradación (c). 18

Figura 1.10. Los cuatro estados de la materia…….. 20

Figura 1.11. Ilustración de algunos de los procesos fundamentales empleados en el tratamiento con plasma sobre materiales. 22

Figura 1.12. Cámara de acoplamiento inductivo. 23

Figura 1.13. Cámara de descarga de acoplamiento capacitivo; con electrodos internos (a) y electrodos externos (b). 24

Figura 2.1. Equipo de electrohilado marca Nabond, utilizado en este trabajo. 34

Figura 2.2. Etapas del análisis de las isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno 35

Figura 2.3. Representación esquemática de la configuración del reactor de plasma. 36

Figura 3.1. Micrografías de SEM a 2000x, de los andamios electrohilados de PCL obtenidos a diferentes voltajes y flujos de salida del polímero 43

Figura 3.2. Diámetros de fibras presentes en los andamios con respecto a la velocidad de flujo de salida del polímero y el voltaje aplicado. 43

Figura 3.3. Comportamiento del área superficial y volumen total de poro con respecto al voltaje aplicado en el proceso de electrohilado. 45

Figura 3.4. Esfuerzo de tensión (σ) de los andamios de PCL obtenidos a diferentes voltajes aplicados y velocidades de flujo de salida del polímero. 47

Figura 3.5. Porcentaje de deformación (ϵ) de los andamios de PCL obtenidos a diferentes voltajes aplicados y velocidades de flujo de salida del polímero. 48

Figura 3.6. Módulo de elasticidad (E) de los andamios de PCL obtenidos a diferentes voltajes aplicados y velocidades de flujo de salida del polímero. 49

Figura 3.7. Relación del área superficial y el diámetro de las fibra con respecto al esfuerzo mecánico de los andamios obtenidos por electrohilado, a una velocidad de flujo de 1.5 mL/h..... 50

Figura 3.8. Micrografías SEM de los materiales electrohilados de PCL (5000x) sin tratamiento y tratados con plasma de aire a diferentes condiciones de tiempo y potencia. 47

Figura 3.9. Distribuciones de los diámetros de las fibras en los andamios electrohilados de PCL... 54

Figura 3.10. Imágenes en 3D de AFM (lado izquierdo) y perfiles de rugosidad (lado derecho) de la superficie de los andamios electrohilados de PCL. Andamio sin tratamiento (a) y andamios tratados con plasma de aire a 30 W durante 1 min (b), 3 min (c) y 5 min (d). 56

Figura 3.11. Espectros FTIR-ATR de los andamios de PCL sin tratamiento y tratados con plasma de aire a diferentes condiciones de tiempo y potencia. 58

Figura 3.12. Análisis de reconocimiento de elementos (survey) por XPS de los andamios de PCL sin tratamiento y los tratados a diferentes tiempos y potencias: 10 W (a), 20 W (b) y 30 W (c). 61

Figura 3.13. Espectros XPS de los andamios de PCL correspondientes a la señal de C1s, sin tratamiento (a) y tratados a 30 W y diferentes tiempos; 1 min (b), 3 min (c) y 5 min (d) 59

Figura 3.14. Deconvolución de la señal del O1s de los espectros de XPS de los andamios de PCL. Sin tratamiento (a) y tratados con plasma de aire a 30 W durante 1 min (a), 3 min (c) y 5 min (d). 59

Figura 3.15. Espectros XPS de los andamios de PCL, correspondientes a la señal de N1s, tratados a 30 W y diferentes tiempos. Sin tratamiento (no tuvo señal en N1s) (a), 1 min (b), 3 min (c) y 5 min (d). 66

Figura 3.16. Termogramas de los andamios electrohilados de PCL, sin tratamiento y tratados con plasma de aire a 30 W durante 1, 3 y 5 min..... 69

Figura 3.17. Porcentaje de cristalinidad obtenidos por DSC, de los andamios electrohilados de PCL, sin modificar y modificados con plasma de aire a 30 W durante 1, 3 y 5 min.. 70

Figura 3.18. Patrones de difracción de los andamios de PCL tratados con plasma. Sin tratamiento (a), 10W/1min (b), 10W/3min (c), 10W/5min (d), 20W/1min (e), 20W/3min (f), 20W/5min (g), 30W/1min (h), 30W/3min (i) y 30W/5min (j) 71

Figura 3.19. Porcentaje de cristalinidad obtenido por XRD de los andamios electrohilados de PCL sin modificar y modificados con plasma de aire a 30 W durante 1, 3 y 5 min. 66

Figura 3.20. Esfuerzo de tensión (σ) de los andamios de PCL modificados con plasma de aire a diferentes condiciones de tiempo y potencia. 67

Figura 3.21 Porcentaje de deformación (ϵ) de los andamios de PCL modificados con plasma de aire a diferentes condiciones de tiempo y potencia. 68

Figura 3.22. Módulo de elasticidad (E) de los andamios de PCL modificados con plasma de aire a diferentes condiciones de tiempo y potencia 68

Figura 3.23. Densidad de grupos COOH (µmol cm^{-2}) de los andamios de PCL sin tratamiento y de los andamios tratados con plasma de aire. 70

Figura 3.24. Grupos COOH medidos por XPS (en %) y por el método TBO (en µmol cm^{-2}) sobre los andamios de PCL sin tratamiento y los tratados con plasma de aire. 77

Lista de Tablas

Tabla 1.1. Efecto de algunos parámetros durante el proceso de electrohilado..... 14

Tabla 1.2. Materiales poliméricos (naturales y sintéticos) empleados para la fabricación de andamios electrohilados para su uso en ingeniería de tejidos (IT) 15

Tabla 1.3. Principales ventajas y desventajas de los materiales naturales y sintéticos empleados en ingeniería de tejidos. 16

Tabla 1.4. Principales ventajas y desventajas de la modificación superficial por plasma. 22

Tabla 1.5. Principales técnicas de caracterización superficial de los materiales..... 26

Tabla 3.1. Diámetro promedio y desviación estándar de las fibras presentes en los andamios de PCL tratados y no tratados con plasma de aire. 53

Tabla 3.2. Valores promedio y error experimental del porcentaje atómico de C, O y la relación O/C, obtenido por EDS de los andamios de PCL tratados y no tratados con plasma de aire.60

Tabla 3.3. Composición elemental obtenida por XPS para los andamios de PCL tratados y los no tratados con plasma de aire. 62

Tabla 3.4. Porcentaje atómico (%) de las diferentes señales de oxígeno, en los andamios de PCL, sin tratamiento y tratados con plasma de aire.……...……..65

Tabla 3.5. Valores promedio y error experimental del ángulo de contacto y energía libre superficial de los andamios de PCL sin tratamiento y los tratados con plasma de aire..... 67

Tabla 3.6. Datos obtenidos mediante análisis DSC de los andamios de PCL..... 69

Resumen

La policaprolactona (PCL) es un polímero biocompatible, y aunque ha sido aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) para ser usada en dispositivos médicos, presenta características hidrofóbicas. Con el fin de aumentar su carácter hidrofílico, andamios electrohilados de PCL han sido modificados superficialmente mediante tratamientos con plasma de aire, a tres valores de potencia (10, 20, 30 W) y tres tiempos de descarga (1, 3, 5 min). Los cambios generados en los andamios fueron analizados usando técnicas espectroscópicas y microscópicas, tales como: espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, abreviación en inglés), espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X (EDS, por sus siglas en inglés), microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y microscopia de fuerza atómica (AFM, abreviación en inglés); el ángulo de contacto y la energía libre superficial de los materiales electrohilados también fueron determinados, al igual que la concentración de grupos carboxílicos por el método de azul de o-toluidina (TBO, abreviación en inglés). Mediante las imágenes SEM y AFM se demostró que los andamios electrohilados no sufren cambios morfológicos o topográficos significativos después del tratamiento de plasma. El ángulo de contacto en agua disminuyó, mientras que en diiodometano aumentó, a medida que se incrementó el tiempo y la potencia del tratamiento con plasma de aire. Los espectros de FTIR no mostraron evidencia de que el tratamiento con plasma modifique la composición química superficial de los andamios; sin embargo, los resultados de EDS y XPS mostraron un incremento en la cantidad de oxígeno y, por ende, de la relación O/C después del tratamiento. La deconvolución de las señales O1s en el espectro de XPS demostró que los grupos carboxílicos (COOH) aumentan con el tiempo de tratamiento, lo cual fue confirmado y cuantificado por el método TBO. El porcentaje de grupos COOH medidos por XPS fue correlacionado con la concentración obtenida en el análisis de TBO. Por otro lado, las pruebas de calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) y difracción de rayos-X (XRD, abreviación en inglés), demostraron que no hubo cambios significativos entre las muestras tratadas con plasma y las no tratadas; una conducta similar fue observada en el análisis de las propiedades mecánicas.

Abstract

Polycaprolactone (PCL) is a biocompatible polymer approved by Food and Drug Administration (FDA) for using in medical devices although it is considered as hydrophobic material. In order to improve this drawback, electrospun PCL scaffolds were superficially modified by air plasma treatments at three power values (10, 20, 30 W) and three discharge times (1, 3, 5 min). The changes undergone by the scaffolds were followed using spectroscopic and microscopic techniques such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM); contact angle and surface energy were also determined meanwhile the concentration of carboxylic groups was estimated by means of the toluidine blue-O method (TBO). SEM and AFM images demonstrated that the electrospun PCL scaffolds did not suffer morphological or topographical changes after the treatment. The contact angle in water diminished, whereas that in diiodomethane increased, after air plasma treatment. FTIR spectra did not show evidence that plasma treatment modified the surface chemical composition of the microfibers, although the results from EDS and XPS showed an increase in oxygen–containing species as well as in the O/C ratio after treatment. Deconvolution of the O1s signals in the XPS spectra demonstrated that the carboxylic groups (COOH) increase with treatment time, which was confirmed and quantified with the TBO method. The percentage of the COOH groups measured by XPS was correlated with the concentration obtained in the TBO analysis. On the other hand, differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (XRD) results exhibited no significant changes between treated and untreated samples; similar behavior was obtained from the analysis of the mechanical properties.

Introducción

Desde hace muchos años, los polímeros han sido empleados en la manufactura de diversos dispositivos biomédicos y, en años recientes, se han utilizado en la elaboración de andamios (soportes) para ingeniería de tejidos, en sistemas de liberación controlada de fármacos, en apósitos para heridas, entre otros. Para ser utilizados en las aplicaciones antes mencionadas, los polímeros en cuestión deben cumplir con una serie de requisitos como: ser biocompatible y, degradarse en cierto tiempo después de haber sido implantados.

Hoy en día, gran parte de la investigación se centra en el desarrollo de polímeros sintéticos biodegradables que cumplan con las propiedades antes señaladas; es decir, que tengan la capacidad de ser biocompatibles y degradarse, por hidrólisis, a productos que puedan ser eliminados por el cuerpo. Un ejemplo de éstos es el caso de la policaprolactona (PCL), la cual ha sido empleada desde los años 80, e incluso cuenta con la aceptación de la FDA para su uso en dispositivos biomédicos.

A pesar de lo anterior, este polímero tiene el inconveniente de poseer una baja energía superficial, un carácter notablemente hidrófobo y una pobre humectabilidad; estas características no son las idóneas en fenómenos como la adhesión y proliferación celular, por lo que su uso en aplicaciones de ingeniería de tejidos se ha visto limitado.

Para superar los inconvenientes antes señalados, se han llevado a cabo varios procedimientos que tienen como finalidad modificar la superficie de este polímero. Entre éstos, el tratamiento con plasma es una de las técnicas más empleadas, la cual permite la incorporación de grupos funcionales mediante la reacción de las moléculas de la superficie del material, con las generadas por el plasma, alterando la química, la carga y la energía de la superficie del material, sin menoscabo de sus propiedades intrínsecas. Así, el tratamiento con plasma de aire u oxígeno se utiliza comúnmente en el campo biomédico para aumentar el carácter hidrófilo de los polímeros, ya que estos tratamientos incrementan la cantidad de grupos que contienen oxígeno en la superficie, como los hidroxilo (OH) y carboxilo (COOH).

Por lo antes expuesto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la modificación superficial producida por un tratamiento con plasma de aire, sobre las características morfológicas, fisicoquímicas y mecánicas de andamios electrohilados elaborados a base de policaprolactona, para su posible uso en ingeniería de tejidos.

Este trabajo de tesis doctoral está organizado fundamentalmente en 3 capítulos; en el primero de ellos, se describen aspectos teóricos sobre la ingeniería de tejidos, la elaboración de andamios poliméricos por medio de la técnica de electrohilado, así como de las diversas técnicas de modificación superficial que permiten dotar a éstos de grupos funcionales polares en su superficie. En el segundo capítulo se presentan las metodologías empleadas en este trabajo para la elaboración de los andamios de PCL, para su modificación superficial mediante tratamientos con plasma de aire, así como de las técnicas utilizadas para la caracterización de los materiales modificados. En el capítulo tres se presentan los resultados obtenidos y su respectivo análisis. Finalmente, se presentan las conclusiones a las que se llegaron después de haber efectuado el trabajo, y algunas recomendaciones para trabajos futuros.

Capítulo 1. Marco teórico.

1.1. Ingeniería de tejidos

El término “ingeniería de tejidos” (IT) fue definido por primera vez en 1993, por Langer y Vacanti, como *el campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida, para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido* [1]. Desde entonces, definiciones alternativas han sido planteadas por otros autores, pero manteniendo la esencia inicial. Este campo ha experimentado en los últimos años un crecimiento acelerado ya que su desarrollo ha estado ligado a intentar resolver la escasez de órganos y tejidos, empleados en la terapia de trasplantes [2].

La IT consiste en sembrar células sobre un biomaterial denominado soporte o andamio (*scaffold*, término en inglés), el cual idealmente debe ser biocompatible, biodegradable y bioactivo; en algunas ocasiones, este sistema es complementado por la adición de factores de crecimiento [3]. Al conjunto formado por el andamio y las células sembradas se le conoce como *constructo*. Una vez que las células han sido sembradas en el andamio, éste es cultivado *in vitro*, con la intención de inducir en el sistema la proliferación y crecimiento celular (ver Figura 1.1).

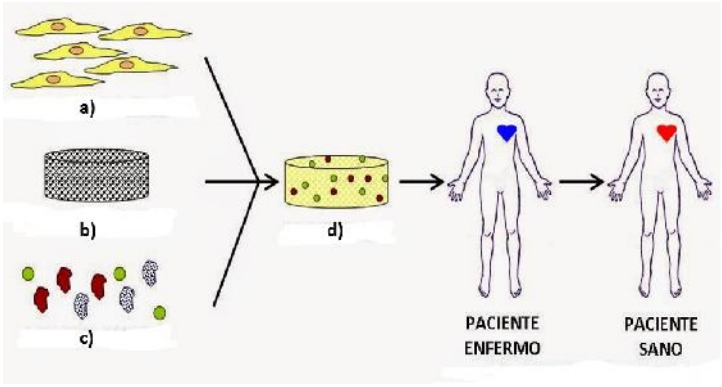


Figura 1.1. Descripción del proceso básico de ingeniería de tejidos que involucra el sembrado de células (a), en un andamio o soporte (b), que puede incluir factores de crecimiento, proteínas, entre otros (c). Este conjunto es considerado un constructo (d) que es implantado en el cuerpo del paciente [4].

Un factor determinante en el campo de la IT, es la regulación del comportamiento celular que permite el crecimiento del tejido mediante el diseño y desarrollo de análogos sintéticos de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), obtenidos a partir de nuevos materiales. El biomaterial utilizado como andamio debe proporcionar un marco y soporte inicial para la adhesión, proliferación y diferenciación celular, que garantice la generación de la ECM correspondiente, la cual a su vez ofrecerá integridad estructural al tejido [3].

En la IT, la preparación del andamio tridimensional (3D) desempeña un papel crucial, ya que éste es el lugar en donde la célula y el tejido se regeneran. Hay muchas variables en el diseño de un andamio "ideal", que pueden afectar el comportamiento celular y que son necesarias para lograr una respuesta biológica adecuada. A continuación se mencionan algunos factores que deben ser considerados:

1) La macroestructura de un andamio debe ser diseñado para imitar la estructura del tejido natural, es decir que imite la ECM.
2) El andamio debe poseer poros interconectados de tamaño apropiado, con el objetivo de permitir a la célula penetrar hacia el interior del andamio, promoviendo el intercambio de nutrientes y la excreción de desechos. Además, diferentes arquitecturas de tejido requieren diferentes tamaños de poro del andamio. Por ejemplo, para la formación de tejido óseo se demanda un tamaño de poro de 100 μm; para las células de la piel es preferible un diámetro de poro de 20 μm; para nervios periféricos entre 5-10 μm y para tejido vascular de 5 μm (neovascularización) [5].
3) Debe ser manufacturado a partir de un material con una biodegradabilidad controlada.
4) Debe poseer propiedades mecánicas que coincidan con los del sitio de implantación y ser lo suficientemente fuerte como para soportar las tensiones aplicadas y las cargas fisiológicas durante la regeneración del tejido.
5) Los andamios deben poseer una química superficial y topografía adecuada que favorezca la adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular. Esto

depende, en gran medida, tanto del material elegido como de la funcionalización del mismo.

6) No debe inducir respuesta adversa y,
7) Debe ser fácil de fabricar en una variedad de formas y tamaños.

Todo lo anterior es de vital importancia para crear ambientes que promuevan el desarrollo de nuevas estructuras, cuyas propiedades se asemejen cada vez más a la arquitectura y las propiedades de los tejidos originales, y poder dirigir el proceso macroscópico de la formación de tejido [6, 7].

1.2. Técnicas para la elaboración de andamios en IT

Para la obtención o fabricación de andamios se han empleado diversas técnicas, entre las cuales se pueden mencionar: moldeo por evaporación de disolvente (*solvent casting*), lixiviación de partículas (*particulate leaching*), separación de fases (*phase separation*), autoensamble (*self assembly*), prototipado rápido (*rapid prototyping*), hilado por centrifugación (*forcespinning*), entre otros [8].

Por otro lado, la técnica de electrohilado o *electrospinning*, ha sido ampliamente estudiada durante los últimos años gracias a la posibilidad de obtener fibras, de escala micro y nano, para una gran variedad de aplicaciones biomédicas. Esta técnica aporta a los materiales desarrollados características diversas como: una amplia superficie por unidad de área y una adecuada porosidad, siendo atractiva a nivel biotecnológico. La técnica es versátil y de fácil ejecución, lo que ha permitido procesar una gran variedad de polímeros, tanto naturales como sintéticos.

En este apartado se describe brevemente las metodologías empleadas, para obtener andamios que pueden ser usados en ingeniería de tejidos [8]:

1.2.1. Moldeo por evaporación de disolvente (*solvent casting*).

Esta técnica se caracteriza por su simplicidad y bajo costo, ya que no requiere de gran equipamiento. Se basa en la evaporación de algún disolvente para formar las estructuras de

andamiaje (ver Figura 1.2). La principal desventaja es el uso de disolventes orgánicos que pudieran dejar residuos en el andamio (debido a una evaporación incompleta del mismo) y resultar tóxicos para las células [8, 9].

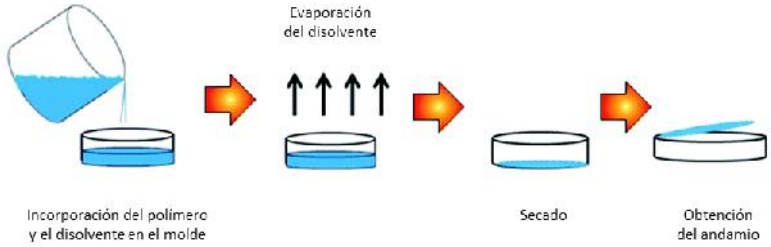


Figura 1.2. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de moldeo por evaporación del disolvente [10].

1.2.2. Lixiviación de partículas (*particulate leaching*).

En esta técnica, sustancias como la sal, cera o azúcares, son utilizados como porógenos, los cuales permiten la creación de poros o canales en el andamio resultante (ver Figura 1.3). El tamaño de poro logrado en los andamios mediante esta técnica es de aproximadamente 500 micras, y se puede lograr una porosidad de hasta 95%. Para controlar el tamaño de poro en los andamios se recomienda realizar previamente un proceso de tamizado para homogenizar el tamaño de las partículas que serán incorporadas durante el proceso de manufactura [8, 9].

Figura 1.3. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de lixiviación de partículas [11].

1.2.3. Separación de fases (*phase separation*).

El proceso de separación de fases puede ser inducido térmicamente o por un no-solvente y ha sido utilizado para fabricar membranas porosas o espumas (ver Figura 1.4). La inducción del proceso de separación de fases utilizando un no-solvente produce un andamio con una estructura porosa heterogénea. En contraste, la separación de fases inducida térmicamente toma lugar cuando una solución polimérica homogénea se vuelve inestable termodinámicamente, bajo ciertas condiciones de temperatura, y tiende a separarse en un sistema multifásico (uno con poca concentración de polímero y el otro con alta concentración de éste). Esta última fase solidifica para formar la matriz, mientras que la primera conduce a la formación de los poros [8, 9].

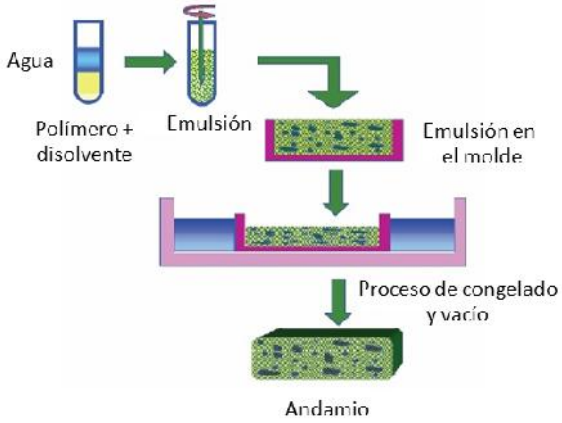


Figura 1.4. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de separación de fases [12].

1.2.4. Autoensamble (*self assembly*).

El proceso de autoensamblaje, definido como una organización autónoma de componentes en patrones o estructuras sin intervención humana, se ha utilizado para la fabricación de algunas nanofibras (ver Figura 1.5). Tal autoensamble de moléculas biológicas puede ser inducido por enlaces no covalentes o interacciones covalentes débiles, incluyendo interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, entre otros.

Por ejemplo, secuencias de péptidos anfifílicos son empleados para la fabricación de estructuras 3D de andamios para ingeniería de tejidos. Sin embargo, su principal desventaja es la complejidad de la técnica [8, 9].

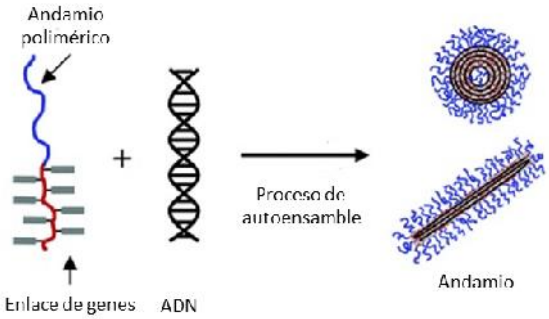


Figura 1.5. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de autoensamble [13].

1.2.5. Prototipado rápido (*rapid prototyping*).

Esta técnica surge con el auge tecnológico y la necesidad de elaborar piezas de mayor complejidad, en cuanto a diseño se refiere. La técnica utiliza programas de computadoras o software. Esta es una de las técnicas más avanzadas para la fabricación de andamios, y permite la obtención de un objeto tridimensional previamente modelado con un programa de diseño asistido por computadora (CAD), que luego es expresado como una serie de secciones transversales usando un método de fabricación por capas, por medio de una computadora, de manera controlada (ver Figura 1.6). Sin embargo, existen algunas limitaciones respecto a la variedad de polímeros que pueden emplearse [8, 9].

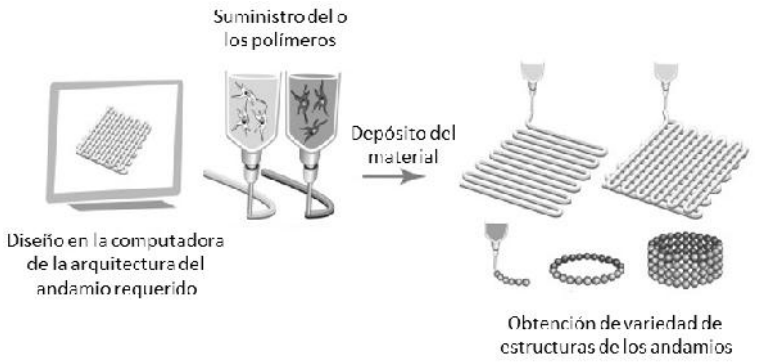


Figura 1.6. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de prototipado rápido [14].

1.2.6. Hilado por centrifugación (*forcespinning*).

Un nuevo proceso derivado del electrohilado (*electrospinning*) para el desarrollo de nanofibras en un amplio intervalo de materiales es el conocido como hilado por fuerza centrífuga ó "forcespinning". Esta técnica brinda una tasa de producción mayor, menores costos y en ocasiones no se emplean disolventes en el proceso [9]; se basa en la obtención de micro y nanofibras a través de fuerza centrífuga. Este método permite eliminar y/o minimizar muchas de las limitaciones que se han encontrado al trabajar con la técnica de electrohilado.

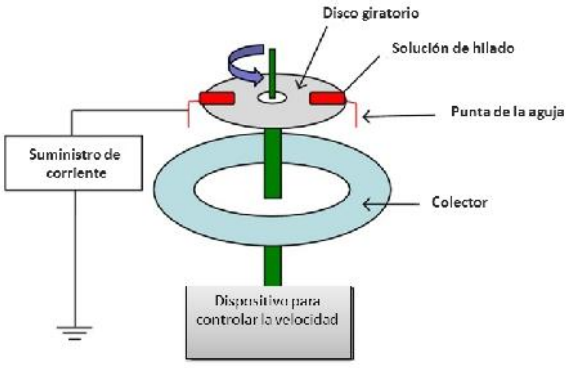


Figura 1.7. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de hilado por centrifugación [15].

1.2.7. Electrohilado (*electrospinning*).

La técnica de electrohilado consiste en expulsar una solución polimérica, cargada eléctricamente mediante la aplicación de altos campos eléctricos que superan las fuerzas de tensión superficial que posee la solución del polímero, dando origen a flujos que son colectados en una placa metálica (ver Figura 1.8.). Cuando el disolvente se evapora, las fibras permanecen en el sustrato. Este proceso permite obtener fibras con diámetros que van desde las sub-micras hasta los nanómetros, intervalos en los que es posible encontrar características únicas como: un área superficial muy grande en relación al volumen, alta porosidad, poros interconectados, además de que su composición química puede ser modulada o bien, formar materiales compuestos de dos o más polímeros (*co-electrospinning*); todas estas ventajas que ofrece la técnica de electrohilado es incluso escalable. Lo anterior hace de los andamios electrohilados, candidatos ideales para diversas aplicaciones en ingeniería de tejidos [8, 9].

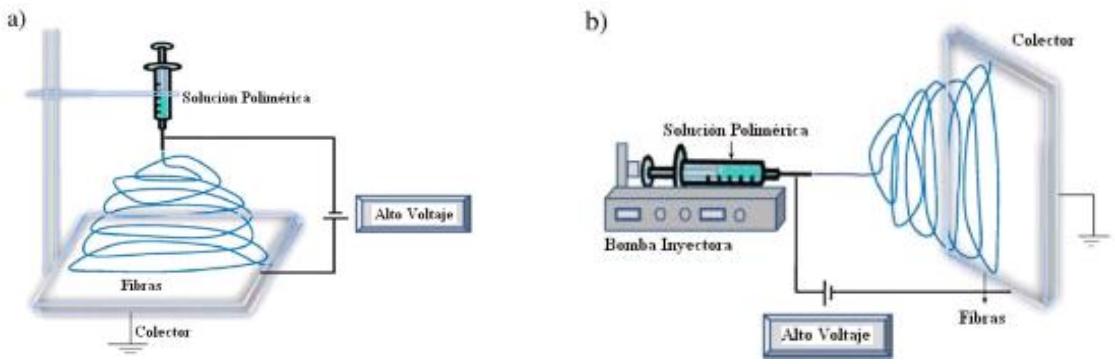


Figura 1.8. Representación del proceso de obtención de andamios por la técnica de electrohilado. Arreglo vertical (a) y arreglo horizontal (b).

El proceso de electrohilado se encuentra gobernado principalmente por dos conjuntos de parámetros: los parámetros del sistema y del proceso. Los primeros se refieren a las características de la solución polimérica tales como: viscosidad, tensión superficial, conductividad, entre otros; mientras que los del proceso se refieren a la velocidad de flujo y el voltaje, estos últimos influyen directamente sobre la morfología del andamio [16]. Con

respecto a la aplicación del voltaje durante el proceso de electrohilado, existen reportes que señalan que cuando se aplican altos voltajes, se produce una mayor expulsión del polímero, lo que facilita la formación de fibras de diámetros más grandes [17].

Por otra parte, también se cuenta con reportes sobre la influencia de la velocidad de flujo con respecto a la morfología y al diámetro de las fibras durante el proceso de electrohilado. En general se considera que una baja velocidad de flujo es conveniente, ya que brinda tiempo suficiente para la evaporación del disolvente; por el contrario, el empleo de altas velocidades de salida de la solución del polímero puede dar lugar a la formación de grumos, perlas (*beads*) y defectos de las fibras, debido a la incapacidad de un secado adecuado del polímero antes de llegar al colector [9, 18].

Existen diversos parámetros que están íntimamente relacionados con las propiedades y características de las fibras obtenidas por medio de electrohilado, por lo que su control durante la ejecución del proceso es indispensable. En la Tabla 1.1, se resume la influencia que tienen algunos parámetros sobre las características de las fibras obtenidas.

1.3. Materiales poliméricos usados en la elaboración de andamios (naturales y sintéticos).

La técnica de electrohilado es ampliamente utilizada para la obtención de soportes (andamios) poliméricos, ya que casi cualquier polímero soluble se puede electrohilar si su peso molecular es lo suficientemente alto. Para las aplicaciones de IT se han empleado principalmente dos clases diferentes de materiales poliméricos en la preparación de las estructuras: los naturales y los sintéticos (ver Tabla 1.2).

Tabla 1.1. Efecto de algunos parámetros durante el proceso de electrohilado [9].

Parámetros del proceso	Efecto sobre la morfología de la fibra
Viscosidad/Concentración	• Baja viscosidad/concentración produce defectos en forma de perlas; incrementando la concentración se reducen los defectos.
	• El diámetro de las fibras aumenta con el incremento de la viscosidad/concentración.
Conductividad/Densidad de la carga de la solución	• Incrementado la conductividad se obtienen fibras uniformes libres de defectos.
	• Altas conductividades producen en general diámetros pequeños (con excepción del poliácido acrílico y la poliamida 6).
Tensión superficial	• No hay resultados concluyentes establecidos entre la tensión superficial y la morfología de las fibras.
Peso molecular del polímero	• Incrementando este parámetro se reduce el número de defectos y de perlas.
Momento dipolar y constante dieléctrica	• Con disolventes que poseen altas constantes dieléctricas se obtienen fibras definidas.
Velocidad de flujo	• Bajos flujos producen fibras con diámetros pequeños.
	• Altos flujos producen fibras que pueden no estar secas al llegar al colector.
Voltaje	• Con altos voltajes se observan muchos defectos.
	• La correlación entre el voltaje y el diámetro de la fibra es ambiguo.
Distancia entre el colector y la punta de la aguja	• Una distancia mínima (entre 10-18 cm) es requerida para obtener fibras secas.
	• Con distancias grandes se observan defectos; lo mismo sucede cuando la distancia es muy pequeña.
Parámetros ambientales	• Un aumento en la temperatura causa una disminución en la viscosidad de la solución, produciéndose diámetros pequeños.
	• Un aumento de la humedad resulta en la aparición de poros circulares en las fibras.

Tabla 1.2. Materiales poliméricos (naturales y sintéticos) empleados para la fabricación de andamios electrohilados para su uso en ingeniería de tejidos [21].

Polímero	**Aplicación**
Poliácido glicólico (PGA)	Andamios IT
Poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)	Aplicaciones biomédicas, cicatrización de heridas
Policaprolactona (PCL)	Aplicaciones para IT de hueso
Poli(ácido L-láctico) PLLA	Sustrato celular 3D
Poliuretano (PU)	Andamios para curación de heridas
Poli(etilen-vinil acetato) (PEVA)	Andamios para IT
Poliestireno (PS)	Aplicaciones para IT de piel
Poli(1,2-butadieno) sindiotáctico	Aplicaciones para IT
Fibrinógeno	Cicatrización de heridas
Poli(vinil alcohol/acetato de celulosa) (PVA/CA)	Biomateriales
Acetato de celulosa	Absorción de membranas/filtros
Poli(vinil alcohol)	Apósitos para heridas
Fibroína de seda, seda/poli (óxido de etileno) (PEO)	Nanofibras para IT
Seda	Aplicaciones biomédicas
Fibroína de seda	Andamios de nanofibras usados como apósitos para heridas
Seda/quitosano	Apósitos para heridas
Quitosano/PEO	Andamios para IT, liberación de fármacos, cicatrización de heridas
Gelatina	Andamios para cicatrización de heridas
Ácido hialurónico (HA)	Implantes médicos
Celulosa	Afinidad de membrana
Gelatina/polianilina	Andamios para IT
Colágeno/quitosano	Biomateriales

Los polímeros naturales ofrecen la ventaja de una excelente biocompatibilidad con el cuerpo humano siendo los más utilizados el colágeno, el ácido hialurónico (HA), la gelatina, el quitosano, la seda, entre otros [19]. Sin embargo, la falta de homogeneidad de estos materiales (naturales), así como su menor susceptibilidad a la modificación superficial (en comparación con los materiales sintéticos), hace que estos últimos sean preferidos, ya que además, son más baratos y es menos complejo llevar a cabo su caracterización [20]. Algunos de los polímeros sintéticos empleados incluyen a la policaprolactona (PCL), el poliácido láctico (PLA), poliácido glicólico (PGA) y el copolímero poli(ácido láctico-co-glicólico) PLGA [19]. Además, este segundo grupo (los materiales sintéticos) tiene la

característica de ser biodegradables, y son preferidos en comparación con los polímeros no biodegradables, debido a la gran ventaja de evitar una segunda cirugía para eliminar dicho soporte (ver Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Principales ventajas y desventajas de los materiales naturales y sintéticos empleados en ingeniería de tejidos [3].

	MATERIALES POLIMÉRICOS		
	Naturales	**Sintéticos no-biodegradables**	**Sintéticos biodegradables**
Ventajas	Estimulan la adhesión, migración y proliferación celular Buena biocompatibilidad	Facilidad de fabricación y reproducibilidad del proceso.	El tiempo de degradación se puede regular mediante la selección de sus pesos moleculares y/o composiciones. Se han empleado ampliamente en dispositivos aprobados por la FDA, incluyendo: suturas, sistema de liberación controlada de fármacos, tornillos ortopédicos y placas. Son biocompatibles.
Desventajas	Se degradan muy rápido. Pérdida temprana de su resistencia mecánica	Permanecen *in situ* como un cuerpo extraño. Puede provocar respuesta inflamatoria. Puede formar una cápsula fibrosa alrededor del implante. Son hidrófobos y carecen de sitios de unión para la adhesión celular.	Carecen de sitios activos de unión para la adhesión celular

1.3.1. Policaprolactona (PCL)

La PCL es un poliéster alifático lineal, semicristalino, con una temperatura de transición vítrea de -62 ºC y un punto de fusión entre 55 - 60 ºC. Este último parámetro está en función del porcentaje de cristalinidad y del peso molecular del polímero (normalmente entre 3,000 – 100,000 g/mol) [22]. La PCL es un polímero sintético, biocompatible, bioabsorbible; presenta propiedades mecánicas adecuadas para una variedad de aplicaciones, además de que sus rutas de producción son relativamente baratas en comparación con la de otros poliésteres alifáticos [23]. Una de las características más destacadas de este material es que ha sido aprobado por la FDA, lo que ha permitido su uso clínico en dispositivo de liberación controlada de fármacos y, como material de sutura desde 1980 (por ejemplo; Capronor®, SynBiosys®, Monocryl® suture, entre otros). Este polímero también tiene propiedades reológicas y viscoelásticas interesantes, que permiten fabricar andamios a través de una amplia gama de tecnologías (la facilidad mediante el cual un material polimérico puede ser transformado a un andamio a partir de diferentes tecnologías de fabricación es una propiedad que no se debe subestimar); sin embargo, debido a su naturaleza semicristalina e hidrófoba, exhibe una velocidad de degradación muy lenta (de 2 a 4 años dependiendo del peso molecular). Además de lo anterior, se considera que la PCL genera una menor cantidad de productos ácidos (por ejemplo ácido caproico) durante su degradación hidrolítica, comparado con otros poliésteres alifáticos como el PLGA que se degradan en aproximadamente 3-6 meses (el cual genera como productos de degradación tanto ácido láctico D,L como ácido glicólico) [5]. En la Figura 1.9a, se muestra un esquema de degradación de polímeros reabsorbibles como la PCL. En este proceso se puede ver de manera general, la influencia del tiempo tanto en la pérdida de masa como en la pérdida del peso molecular. Este proceso de degradación inicia con la hidratación del polímero (0 a 6 meses), continúa con la pérdida de hidratación y de masa (6 a 12 meses), la reabsorción (después de 12 meses) y por último la metabolización (18 meses). En la Figura 1.9b, se ilustra el mecanismo por medio del cual, se degrada la PCL, en forma acelerada, por hidrólisis hasta formar ácido 6-hidroxi caproico y posteriormente se elimina del cuerpo [24]. Por otro lado, en la Figura 1.9c, se muestra la forma en que tiene lugar la erosión superficial de este polímero durante su degradación, la cual afecta

principalmente a la fase amorfa del polímero, conduciendo a un aumento en la cristalinidad del material remanente.

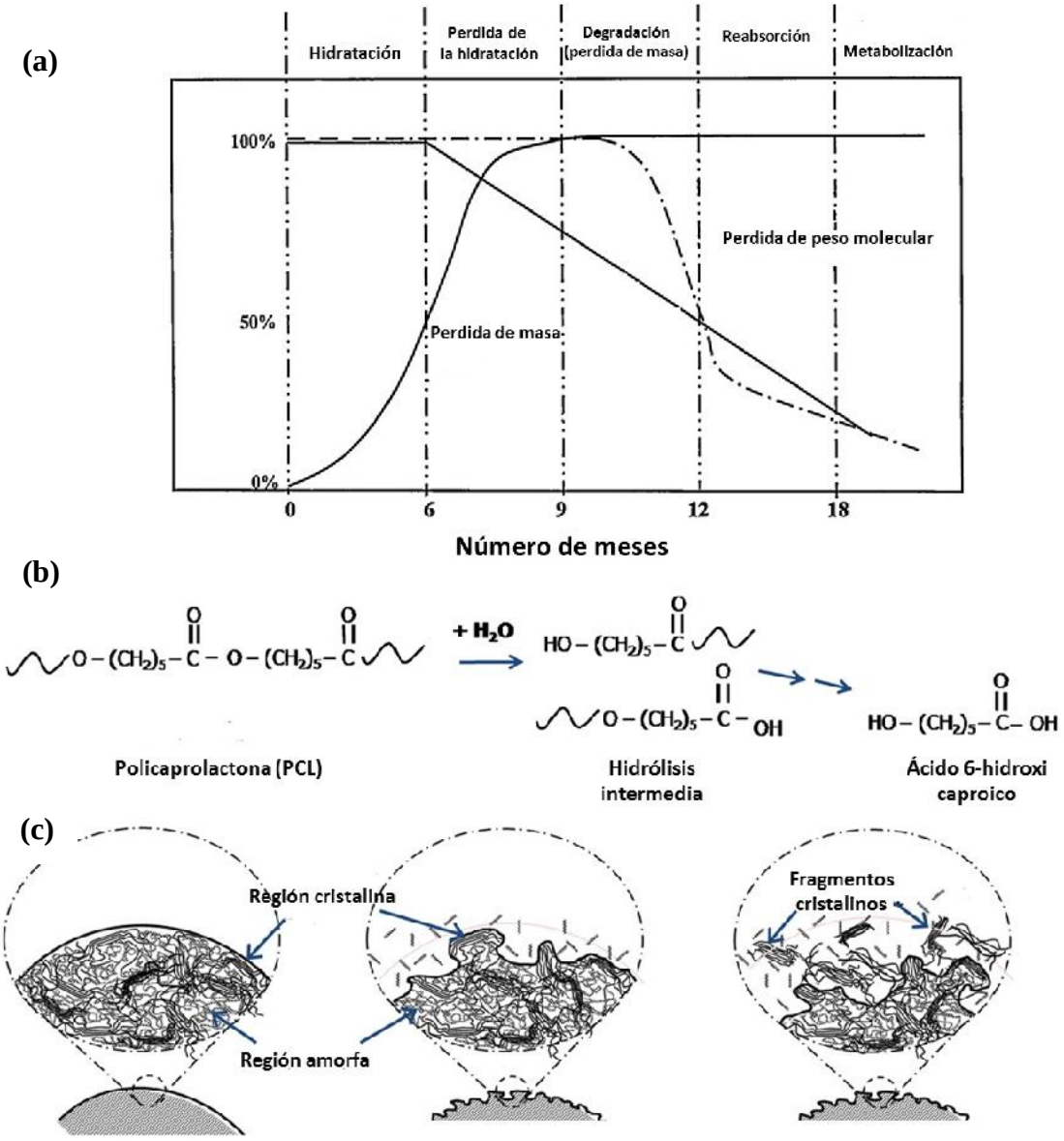


Figura 1.9. Ilustración gráfica de la degradación de la PCL. Inicia con la hidratación del polímero, con el paso del tiempo (meses) ocurre la pérdida de hidratación y de masa, posteriormente se lleva a cabo la reabsorción y finalmente la metabolización (a). También se muestra la degradación por vía hidrolítica (b) y los cambios asociados a la cristalinidad como consecuencia de la degradación (c) [24].

Pese a todas las características favorables de la PCL, también se encuentran reportados algunos inconvenientes en este material; por ejemplo, su naturaleza hidrófoba y su baja energía superficial dan como resultado una mala humectación y una limitada adhesión celular, comparado con otros poliésteres como el PLA [25]. Estas características hacen necesaria la modificación superficial de este polímero cuando se emplea en la elaboración de biomateriales como soportes para IT.

1.4. Técnicas de modificación superficial de andamios

Para subsanar el problema anteriormente mencionado, se han propuesto diferentes técnicas de modificación que puedan alterar, tanto física como químicamente, las propiedades superficiales de la PCL. Para llevar a cabo la modificación superficial de la PCL se han reportado cuatro técnicas principales:

a) El tratamiento con plasma, dado que mejora el carácter hidrófilo mediante la formación de grupos polares que contienen oxígeno en la superficie.
b) El tratamiento químico empleando reactivos como el hidróxido de sodio.
c) La adsorción de proteínas naturales de la ECM, que pueden introducir sitios de reconocimiento celular para mejorar la interacción célula-biomaterial y,
d) La mezcla del polímero con componentes biológicamente activos que proporcionen señales químicas al material y que sean reconocidos por las células.

Estas técnicas de modificación superficial han sido aplicadas sobre andamios poliméricos electrohilados. Además, hay que señalar la importancia de la elección del método de modificación, ya que hay técnicas que requieren una inversión económica considerable, o bien algunas que demandan que el andamio sea inmerso en una solución (por ejemplo, de hidróxido de sodio) lo cual pueden dañar o erosionar la estructura del material.

Por otro lado, una metodología, relativamente económica y que evita la inmersión de los materiales en medios agresivos, es por ejemplo: la modificación con plasma.

1.4.1. Modificación superficial con plasma

El plasma es considerado como el cuarto estado de la materia, debido a que posee características propias, que no se dan en ninguno de los otros estados de agregación ya conocidos (sólido, líquido y gas).

Es un hecho conocido que cuando se incrementa la temperatura de un sólido, éste experimenta transiciones secuenciales a los estados líquidos y gaseosos. Cuando la temperatura de las moléculas de un gas es suficientemente alta, las moléculas se dividen para formar un gas atómico. Un suministro adicional de energía lleva a los átomos al estado ionizado y, el gas eventualmente cambia a plasma, como se ilustra en la Figura 1.10.

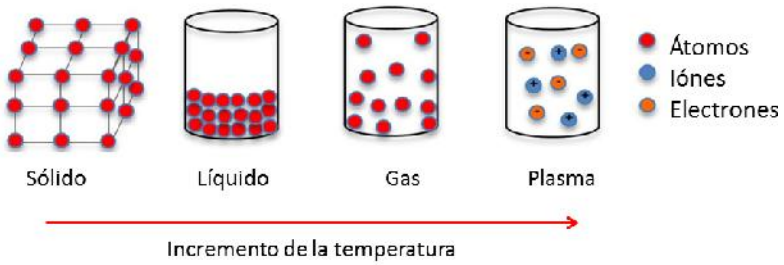


Figura 1.10. Los cuatro estados de la materia [26].

El plasma es un gas parcialmente ionizado, que está compuesto de átomos, moléculas y partículas con cargas positivas y negativas, con un amplio intervalo de energías. Los plasmas se pueden crear cuando un átomo o una molécula gana suficiente energía y es excitada a mayores estados energéticos, ya sea mediante un generador de radiofrecuencia, microondas, o bien, por la aplicación de un campo electromagnético fuerte. Tan pronto como la energía cinética molecular excede la energía de ionización, las colisiones separan algunos electrones de los átomos, creando una mezcla de electrones e iones.

Los tratamientos superficiales con plasma permiten modificar una gran variedad de materiales, tanto de origen cerámico, metálico, polimérico, o bien, compuestos de dos o más de los ya mencionados [19]. El plasma puede modificar superficies de diferentes maneras, ya sea como preparación para etapas subsecuentes de un tratamiento superficial, o bien, de manera que dicha modificación consista en suministrar la capa final del mismo.

De manera general podemos mencionar algunos de los procesos empleados por la tecnología de plasma para modificar andamios poliméricos: por ejemplo, durante la limpieza de superficies poliméricas (Figura 1.11a), el plasma desintegra y evapora las moléculas depositadas sobre una superficie, eliminando residuos, impurezas, grasa, capas de óxido o incluso silicones. También puede emplearse para la activación de superficies de materiales poliméricos (Figura 1.11b), generando grupos funcionales, o bien, se puede utilizar en el grabado de superficies (películas o andamios) (Figura 1.11c), para transferir microestructuras (ya sea patrones o formas) a una superficie mediante un grabado simple brindando rugosidad superficial o creando microestructuras sofisticadas. Otro proceso es el recubrimiento de una superficie con plasma (Figura 1.11d), mediante el empleo de un monómero que es introducido en la cámara de plasma y que puede depositarse sobre la superficie de diversos materiales, como capas ultrafinas de polímero. El tratamiento con plasma también es empleado para aumentar la humectabilidad y la energía superficial en los materiales poliméricos (Figura 1.11e). Los tratamientos con plasmas de aire, oxígeno, amoníaco, argón, entre otros, han sido utilizados habitualmente para incrementar el carácter hidrófilo de los polímeros, generando principalmente funcionalidades hidroxilo (OH) y carboxilo (COOH) [27].

En la Tabla 1.4, se presentan algunas de las ventajas y desventajas del tratamiento con plasma sobre los andamios poliméricos. Como ya se mencionó, esta técnica se emplea convencionalmente en la ciencia de los biomateriales con la finalidad de generar grupos funcionales en la superficie de éstos, que permitan modular no solamente la hidrofilia sino también la carga superficial, la energía superficial y la química, sin afectar las propiedades volumétricas del material, mejorando de este modo la adhesión celular [25, 27, 28].

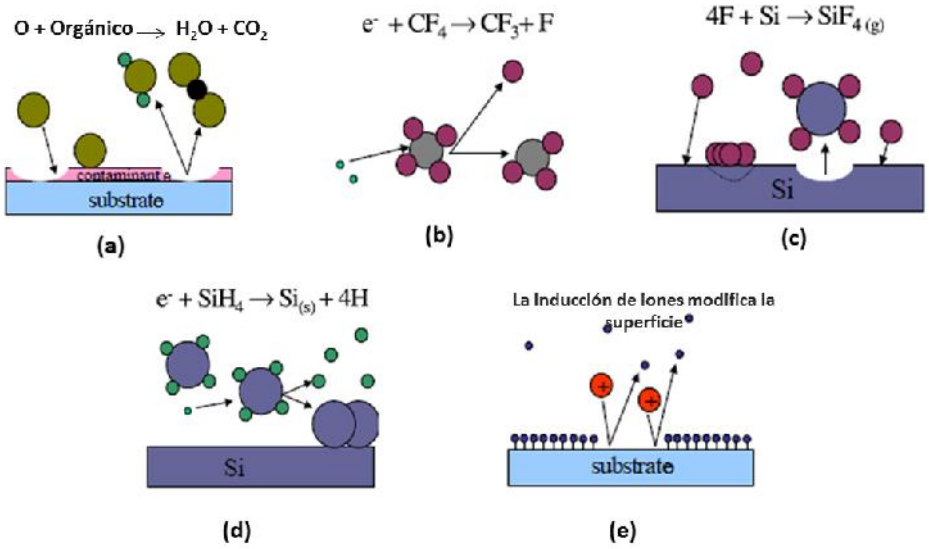


Figura 1.11. Ilustración de algunos de los procesos fundamentales empleados en el tratamiento con plasma, sobre materiales: limpieza de superficies (a), activación de superficies (b), grabado de superficies (c), recubrimiento de superficies (d) y tratamiento de superficies (e) [28].

Tabla 1.4. Principales ventajas y desventajas de la modificación superficial por plasma [8].

Ventajas	**Desventajas**
La modificación está confinada a la capa superficial del material sin afectar las propiedades intrínsecas del polímero.	Las reacciones químicas implicadas aún se desconocen, pero pueden sugerirse rutas.
Especies químicas con alta energía (ionizadas) pueden modificar la superficie de todos los polímeros sin importar su naturaleza química o reactividad.	No es una reacción selectiva.
Versatilidad: cada gas genera diferentes grupos funcionales en la superficie.	
Cuando se tratan los materiales a nivel laboratorio, la modificación es bastante uniforme en toda la superficie, aunque el proceso puede ser escalable.	
No se requiere de disolventes para llevar a cabo la modificación y, el tiempo de exposición es menor comparado con otros procesos de modificación.	
Es posible tratar superficies de cualquier tamaño y geometría, tanto polvos, películas, textiles, fibras, etc.	
El proceso no calienta las muestras, por lo que se pueden tratar materiales que posean baja temperatura de fusión o sensibles a la temperatura.	

1.4.1.1. Plasmas inductivos y capacitivos

Cuando se desea llevar a cabo la modificación superficial de polímeros por plasma, el arreglo geométrico y eléctrico del reactor juega un papel importante en las propiedades finales del sustrato, ya sea que se elija un arreglo eléctrico capacitivo o inductivo y/o combinaciones entre ellos. Estos arreglos siempre emplearán un amplificador de voltaje que pueda trabajar a diferentes frecuencias (la más usada es de 13.56 MHz), con un sistema de vacío para reducir la presión durante el proceso [29].

Generador de acoplamiento inductivo.

Un generador de plasma con acoplamiento inductivo consiste en un tubo de gas, dentro del cual se induce un campo magnético mediante una bobina conectada a un generador de radiofrecuencia (RF) a través de una red de acoplamiento de impedancia. El plasma de acoplamiento inductivo usa una bobina enrollada a través de la cámara de descarga [29], como se ilustra en la Figura 1.12.

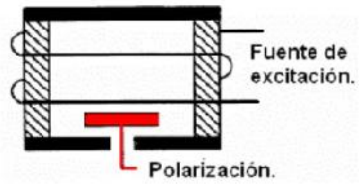


Figura 1.12. Cámara de acoplamiento inductivo [29].

El voltaje de RF es aplicado a las terminales de la bobina, lo que produce una corriente en ésta. La bobina produce un efecto capacitivo debido al voltaje que hay entre sus terminales y produce un campo eléctrico el cual es generado por la variación del campo magnético con el tiempo.

Generador de acoplamiento capacitivo.

Un generador de plasma de acoplamiento capacitivo consiste en dos electrodos paralelos separados por una pequeña distancia (1 - 10 cm); el cátodo va conectado a tierra, mientras que el ánodo se conecta al generador de RF a través de una red de acoplamiento, (ver Figura 1.13). La potencia producida por el generador de RF es absorbida por el plasma

generado a partir de la mezcla de gases alimentada, lo que produce un aumento de la energía cinética de los electrones originada por el campo eléctrico alterno [29].

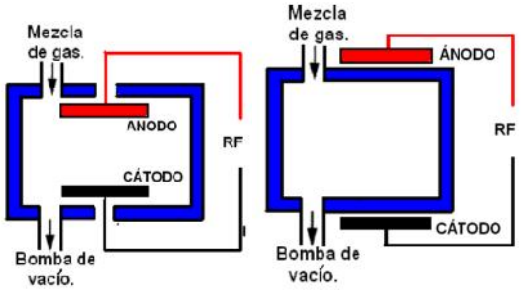


Figura 1.13. Cámara de descarga de acoplamiento capacitivo;
con electrodos internos (a) y electrodos externos (b) [29].

1.5. Técnicas de caracterización superficial de materiales

Existen diversas técnicas para identificar y/o confirmar los cambios químicos y físicos que ha experimentado la superficie de un polímero después de su modificación. En la Tabla 1.5 se muestra un resumen de estas técnicas y sus principales características.

Cabe señalar que la influencia de las características topográficas de la superficie (nano y microescala) sobre el comportamiento celular y la caracterización de la morfología superficial del polímero son de gran importancia. El equipo universalmente empleado para observar la morfología superficial es el microscopio electrónico de barrido, aunque la resolución del SEM suele estar en el orden de microescala con respecto a la superficie del material. En contraste, la microscopía de fuerza atómica tiene una resolución mucho más alta en esta dirección y puede detectar fácilmente superficies con picos y valles, cuya altura o profundidad sea del orden de nanómetros. Por lo tanto, el AFM se está convirtiendo en una herramienta ampliamente utilizada para estudiar la topografía de los biomateriales a nivel nanométrico [25].

Por otro lado, las técnicas espectroscópicas también son ampliamente utilizadas para determinar los cambios que experimentan las superficies de los materiales después del

tratamiento. Por ejemplo, la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier en modo reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), la espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X (XPS) y la espectroscopia de masas de iones secundarios (SIMS) se encuentran dentro de las técnicas espectroscópicas más utilizadas para revelar la estructura química superficial de los materiales poliméricos. Cabe señalar que la profundidad de penetración del análisis es variable en cada técnica, siendo más sensibles unas que otras, además de que cada técnica suministra información distinta pero complementaria [30].

Asimismo, la medición del ángulo de contacto es un método que permite evaluar el carácter hidrófilo de un material ya que muestra la afinidad de la superficie a ciertos líquidos (polares o no polares). Las superficies sólidas se pueden clasificar en dos grupos básicos: hidrofílicas (humectable con agua y con una alta energía superficial) e hidrofóbicas (no humectable con agua y una baja energía superficial). En esta técnica, varios parámetros pueden influir considerablemente en la medición; entre éstos se pueden mencionar el volumen de la gota, la densidad del líquido, la presión de vapor del líquido, el tipo de superficie (rugosa o lisa), el tiempo de equilibrio y la temperatura del laboratorio [30]. A partir de los datos del ángulo de contacto se puede determinar los valores de la energía libre superficial del sólido, así como sus componentes polar y dispersiva, mismas que pueden relacionarse con la polaridad de la superficie del material.

Un método complementario para medir la cantidad de grupos funcionales superficiales de un biomaterial involucra el uso de técnicas colorimétricas, particularmente cuando existe una gran cantidad de grupos funcionales en la superficie. Para esto, se han desarrollado varios métodos colorimétricos que miden eficazmente la densidad superficial de grupos carboxilo y grupos amino en las superficies poliméricas, basándose en el mecanismo de intercambio iónico. Sin embargo, su principal desventaja es que son menos sensibles que los análisis XPS y SIMS, y por lo tanto sólo es útil cuando hay una gran cantidad de grupos funcionales en la superficie [25].

Tabla 1.5. Principales técnicas de caracterización superficial de los materiales.

Método	**Principio**	**Profundidad de análisis**	**Resolución espacial**	**Sensibilidad analítica**
Ángulo de contacto	La humectación superficial es usada para estimar la energía libre superficial	0.3-2 nm	1 mm	Baja o alta dependiendo de la química superficial
XPS	Los rayos X causan la emisión de electrones de una energía característica	1-25 nm	10-150 µm	0.1 % atómico
EDS	Consiste en analizar la señal de rayos X producida por la interacción del haz de electrones con la muestra	Hasta 2 µm	Hasta 500,000 X de magnificación y 1 nm de resolución	1 % peso
FTIR-ATR	La radiación IR es absorbida por un enlace cuando la frecuencia vibracional usada es la misma que la del propio enlace, facilitando la asignación de picos de absorción a grupos funcionales específicos.	1-5 µm	10 µm	1 % mol
SEM	Utiliza un haz de electrones para producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra	0.5 nm	Típicamente 4 nm	Es alta, pero no es cuantitativa
AFM	Es capaz de registrar continuamente la topografía de la muestra	0.01 nm hasta unas pocas µm.	Escala nanométrica	Sensibilidad de fuerza de 10^{-13} N a 10^{-5} N
Colorimetría (Densidad de grupos COOH)	Mediante el mecanismo de intercambio iónico, se asume que un mol de TBO reacciona con un mol de grupos COOH	Dependiendo de los grupos funcionales presentes	Sujeto a la concentración de grupos funcionales	Alta, cuando hay gran cantidad de grupos superficiales

1.6. Antecedentes

El proceso de modificación superficial con plasma ha sido considerado una metodología efectiva, ya que es capaz de lograr que la superficie modificada pueda ser compatible con un sistema biológico. El tratamiento con plasma puede no solo mejorar la humectabilidad de la superficie, sino también, oxidar la misma y, por ende, mejorar el crecimiento y la adhesión celular. El tratamiento con plasmas de aire u oxígeno ha sido utilizado comúnmente en el campo biomédico para aumentar el carácter hidrófilo de los polímeros, generando principalmente funcionalidades hidroxilo (OH) y carboxilo (COOH) [24].

A pesar de que existe un gran número de reportes acerca de la modificación superficial, por medio de plasma, de andamios electrohilados de PCL, la mayoría de estos estudios utilizan condiciones predefinidas y se centran en comparar sólo algunas propiedades del material tratado con respecto al material sin tratar. Ejemplo de éstos se puede encontrar en los estudios llevados a cabo por Prabhakaran *et al.* [31], Ma *et al.* [32], Fujihara *et al.* [33] y Zander *et al*. [34] quienes compararon los andamios electrohilados de PCL sin modificar con aquellos andamios modificados con plasma de aire a diferentes condiciones de voltaje y tiempo (30 W durante 1 min, 30 W durante 5 min, 30 W durante 10 min y 18 W durante 5 min, respectivamente). Al analizar el comportamiento de las células, Prabhakaran *et al.* encontraron una mayor proliferación de células en la superficie del andamio de PCL tratado, en comparación con el material sin tratar. Esto se puede explicar por medio del aumento de grupos polares que contienen oxígeno en la superficie de PCL tratada, los cuáles aumentan su carácter hidrófilo. Resultados similares fueron reportados por Zander *et al.* quienes señalaron que esto puede deberse a una mayor concentración de grupos COOH en la superficie del material, después de su modificación con plasma de aire.

Existen otros reportes acerca de la modificación superficial de materiales a base de PCL (electrohilados o películas), tratados con plasma de aire, en donde se fijan prácticamente todos los parámetros y se estudia el efecto de una sola variable: tipo de gas, la potencia o el tiempo. Por ejemplo, Arolkar *et al.* [35] usaron plasma de aire con una potencia de descarga de 40 W y tiempos de exposición de 0.5, 1, 2, 3 y 5 min en películas de PCL. También hay publicaciones disponibles sobre el tratamiento con plasma de aire de materiales de PCL,

donde se establecieron, tanto la potencia como el tiempo de tratamiento y se varió el tipo de gas de descarga. Siri *et al.* [36] fijaron la potencia y el tiempo de tratamiento (30 W durante 5 min) y variaron el tipo de gas (aire, argón y oxígeno) sobre andamios electrohilados de PCL.

Por el contrario, existen escasos reportes en los que se estudian sistemáticamente diversas condiciones del tratamiento con plasma, como por ejemplo, la potencia y el tiempo. Martins *et al.* [27] utilizaron dos tipos de gases (Ar y O_2), dos potencias (20 y 30 W) y dos tiempos de exposición (5 y 10 min) y, afirmaron que, si bien es cierto que se logró mejorar las propiedades superficiales obteniendo un incremento en el carácter hidrófilo (lo cual contribuyen sustancialmente a mejorar el rendimiento celular de los andamios), las condiciones deben ser optimizadas. Del mismo modo, Jacobs *et al.* [37] emplearon tres tipos de gases (aire, Ar y He), tres potencias (1.1, 1.6 y 2.1 W) y tres intervalos de tiempo de exposición (0-30, 0-70 y 0-90 s). Ellos aseguran que la atmósfera de descarga (tipo de gas) tiene un efecto significativo sobre la modificación de la superficie de PCL, pero los resultados obtenidos no muestran una tendencia clara con respecto a las otras variables (potencia y tiempo). Por lo tanto, los autores concluyen, a partir de sus resultados, que se necesitan más estudios para poder establecer claramente el efecto de cada variable en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los andamios desarrollados.

Tomando como base lo antes expresado, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto que tiene la potencia y el tiempo, durante el tratamiento superficial con plasma de aire, en la superficie de andamios elaborados a base de PCL. Para esto, se utilizaron tres niveles de potencia (10, 20 y 30 W) y tres tiempos de descarga (1, 3 y 5 min). Con el fin de monitorear los cambios generados por el tratamiento se utilizaron técnicas espectroscópicas como la FTIR-ATR, EDX y XPS, así como técnicas microscópicas: SEM y AFM. Además se determinó el ángulo de contacto (con dos líquidos diferentes) para calcular la energía libre superficial de los diversos sustratos y el método TBO para cuantificar la concentración de grupos COOH en la superficie de los materiales.

Justificación

Hoy en día, los materiales poliméricos se utilizan frecuentemente en diversas aplicaciones médicas, incluyendo implantes artificiales, andamios para ingeniería de tejidos, apósitos para heridas y en sistemas de liberación de fármacos [38].

Los andamios empleados en ingeniería de tejidos pueden ser fabricados a partir de polímeros sintéticos como la PCL, ya que este material posee la característica de ser biocompatible y biodegradable; esta última característica es importante ya que implica que no será necesario retirarlo del cuerpo humano después de la implantación, porque éste puede degradarse dentro del organismo generando productos no tóxicos [39]. Sin embargo, tales andamios requieren modificación de su superficie para mejorar la adhesión y proliferación de células [40], por ser éste un material intrínsecamente hidrofóbico, con una baja energía superficial, lo que da como resultado una mala humectación y por lo tanto una pobre adhesión y proliferación celular.

Para superar el inconveniente antes señalado, el tratamiento con plasma es una de las técnicas más útiles ya que permite la incorporación de diferentes grupos funcionales en la superficie del polímero tratado, sin menoscabo de las propiedades volumétricas del material. Mediante una adecuada elección de gas de descarga, es posible manipular estos grupos funcionales y cambiar la naturaleza hidrófoba de la PCL, alterando el grado de humectabilidad, la energía y la química superficial del material; todo esto tendría un impacto importante en fenómenos como la adhesión y proliferación celular [37].

Algunos autores han utilizado el plasma de aire o de oxígeno para la modificación superficial de PCL y han encontrado que este proceso incrementa el carácter hidrófilo de la superficie, además de aumentar la energía superficial, la rugosidad y la cantidad total de grupos funcionales que contienen oxígeno comparado con los andamios sin modificar [37, 40].

Durante la revisión del estado del arte se encontraron reportes [31, 32, 34] donde se fijan todas las variables involucradas en el tratamiento con plasma, es decir, la potencia, el tiempo y el tipo de gas de descarga, pero los autores únicamente comparan los resultados

obtenidos bajo estas condiciones con las muestras de PCL que no recibieron tratamiento. Otros autores reportan la modificación de andamios o películas de PCL por medio de plasma de aire u oxígeno, variando ya sea el tiempo, la potencia o los gases de descarga [16, 41-44], pero no más de una variable a la vez. En contraste a los informes anteriores, existen muy pocos reportes en la literatura en donde hayan llevado a cabo estudios sistemáticos sobre la modificación superficial de electrohilados de PCL, mediante tratamiento con plasma, y se haya estudiado más de una variable; es decir diferentes tipos de gas, potencias y tiempos, ya sea a dos o tres niveles; [27, 37], y los pocos que trabajos que existen, no muestran resultados concluyentes del efecto de dichos parámetros.

Debido a lo anterior, se determinó que el poder establecer con claridad el efecto de algunas variables involucradas en el proceso de modificación superficial de andamios de PCL, por medio de un tratamiento con plasma de aire, como la potencia y el tiempo de tratamiento, proporcionará información valiosa en este campo de la ciencia.

Hipótesis

La modificación superficial de andamios elaborados a base de policaprolactona mediante tratamientos con plasma de aire, generará grupos funcionales polares que modificarán las propiedades superficiales del material, produciéndose de esta forma una superficie más adecuada a las requeridas en el campo de la ingeniería de tejidos.

Objetivos:

General

Estudiar el efecto de la modificación superficial generada por un tratamiento con plasma de aire en andamios electrohilados elaborados a base de policaprolactona para su posible uso en ingeniería de tejidos.

Específicos

1. Preparar andamios a base de PCL utilizando la técnica de electrohilado, variando la velocidad de flujo del polímero y el voltaje aplicado.
2. Modificar superficialmente por medio de plasma de aire, los andamios obtenidos por electrohilado, variando parámetros como el tiempo de exposición y la potencia de descarga.
3. Monitorear los cambios generados por el tratamiento con plasma de aire, mediante microscopía (SEM y AFM), técnicas espectroscópicas (FTIR, EDS, XPS), superficiales (ángulo de contacto, energía libre superficial) y pruebas mecánicas, entre otras.

Capítulo II. Materiales y Métodos.

2.1. Materiales

Poli(caprolactona), PCL, con un peso molecular Mw: 70,000 - 90,000 g/mol fue empleada para fabricar los andamios electrohilados. Los disolventes usados fueron metanol (MeOH) grado reactivo, con una pureza del 99.9% y cloroformo ($CHCl_3$) grado reactivo con una pureza del 99.8%. Tanto la PCL como los disolventes empleados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Para el cálculo del ángulo de contacto se emplearon 2 líquidos: agua destilada y diiodometano (CH_2I_2), este último con una pureza del 99% (Sigma-Aldrich, USA). Para la cuantificación de los ácidos carboxílicos se emplearon los siguientes reactivos: azul de o-toluidina (TBO, por sus siglas en inglés) con un peso molecular de 305.83 g/mol adquiridos de Sigma-Aldrich, USA, e hidróxido de sodio (NaOH) y ácido acético (CH_3COOH_3), estos dos últimos adquiridos de J.T. Baker, México.

2.2 Preparación de los andamios electrohilados de PCL

La PCL fue disuelta al 12% p/v en una mezcla de cloroformo-metanol ($CHCl_3$-MeOH), en una proporción 3:1. 10 mL de esta solución fueron depositados en una jeringa de plástico que tenía una aguja de 0.4 mm de diámetro interno. El equipo utilizado para electrohilar los andamios es de la marca Nabond (ver Figura 2.1).

Con la finalidad de evaluar el efecto de la velocidad de flujo y el voltaje del proceso de electrohilado, cada una de las variables fue estudiada a varios niveles. La solución se inyectó a 0.5, 1.0 y 1.5 mL/h, y se aplicaron voltajes de 10, 15, 20 y 25 kV, con una corriente fija de aproximadamente 1 Ampere. Una vez optimizadas las condiciones, se decidió utilizar una velocidad de flujo de 1.5 mL/h y un voltaje de 15 kV a una distancia de 12 cm de la punta de la aguja al colector. Los electrohilados obtenidos fueron secados a temperatura ambiente en un horno a vacío marca Lab Companion y almacenados en un desecador hasta su posterior caracterización.

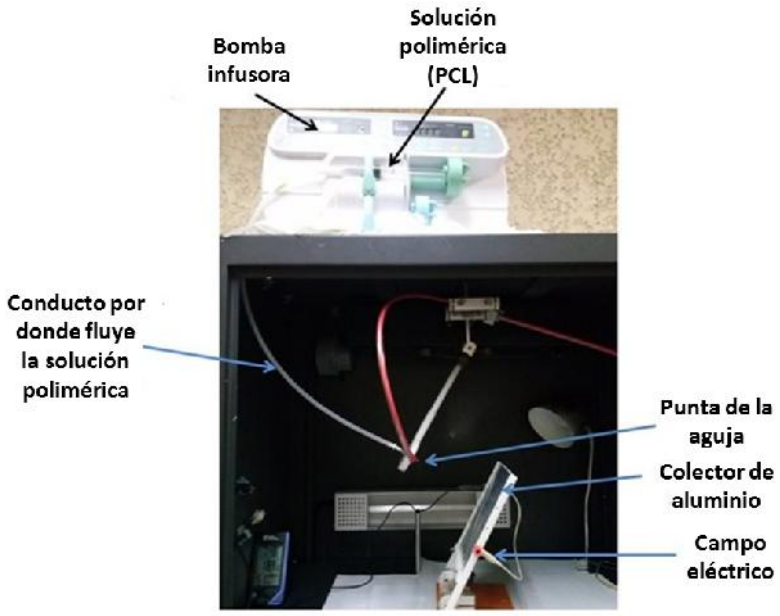


Figura 2.1. Equipo de electrohilado, marca Nabond, utilizado en este trabajo.

2.3. Caracterización de los andamios electrohilados de PCL

2.3.1. Microscopia electrónica de barrido

Las fibras obtenidas fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido de la marca JEOL, modelo JSM 6360LV. Imágenes de diferentes zonas del andamio fueron tomadas utilizando una magnificación de 2000x, con un potencial de aceleración de 10-20 kV. Mediante el programa *Image PRO* se midieron los diámetros de 150 fibras y posteriormente se obtuvo su valor promedio, desviación estándar y su distribución para cada caso.

2.3.2. Análisis del área superficial y volumen total de poro

Tanto el área superficial, como el volumen total de poro de los andamios obtenidos por electrohilado fueron determinados mediante un análisis de las isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno, empleando la metodología descrita por Brunauer–Emmett–Teller (BET, por las iniciales de sus autores), la cual está basada en el modelo de

la teoría de funcionales de densidad (DFT, por sus siglas en inglés). Los análisis fueron llevados a cabo a una temperatura de 77 K (-196ºC) en un aparato de adsorción Quantachrome Instruments, modelo NOVA 1200e. Las muestras fueron desgasificadas con nitrógeno a una presión de aproximadamente 13.33 x 10^{-5} Pa y temperatura ambiente, durante 24 h, para eliminar las impurezas [45]. El peso de las muestras fue de aproximadamente 50 mg.

Brevemente; mediante un baño de circulación externo se introduce el adsorbato (gas nitrógeno) en pequeñas dosis, provocando que las moléculas del gas se adhieran a la superficie del sólido (adsorbente). Las moléculas que logran adherirse a la superficie forman una monocapa que cubre toda la superficie del sólido. A medida que las moléculas de gas siguen adsorbiéndose en el sólido, éstas comienzan a formar multicapas; al mismo tiempo, la condensación del gas comienza a llevarse a cabo dentro de los poros. Por último, y a medida que la presión del adsorbato se acerca al punto de saturación, los poros se llenan completamente de adsorbato, tal y como se muestra en la Figura 2.2.

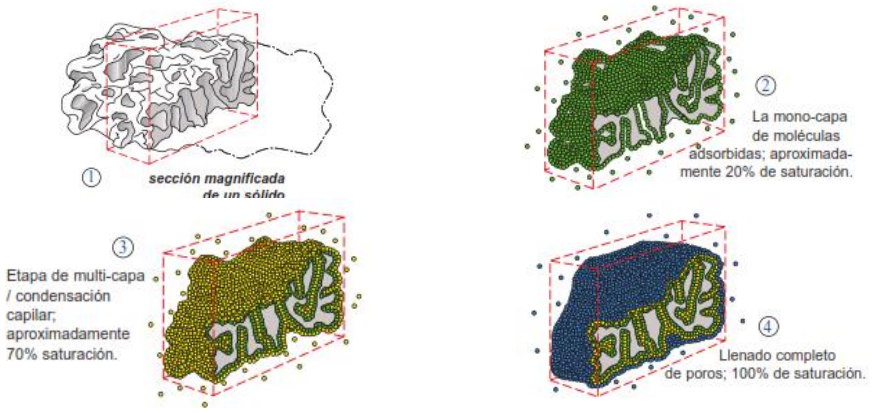


Figura 2.2. Etapas del análisis de las isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno [45].

2.3.3. Caracterización mecánica de los andamios electrohilados

Los andamios obtenidos por electrohilado, a diferentes condiciones de velocidad de flujo y voltaje, fueron sometidos a pruebas mecánicas de tensión en una máquina de pruebas universales mini-shimadzu modelo AGS-X, con una celda de carga de 100 N, y una rapidez

de cabezal de 10 mm/min. Se prepararon 8 especímenes rectangulares con dimensiones de 60 mm de largo, 5 mm de ancho y un espesor homogéneo entre 0.25-0.5 mm para cada lote de experimentos [31]. A partir de las curvas de esfuerzo-deformación obtenidas, se calculó el esfuerzo de tensión, el porcentaje de deformación y el módulo de elasticidad del material.

2.4. Modificación superficial de los andamios por medio de plasma de aire

La modificación superficial se llevó a cabo en un reactor cilíndrico de vidrio con las siguientes dimensiones: 8.2 cm de diámetro y 30 cm de longitud. El reactor tiene dos electrodos capacitivos en su interior (electrodo activo y electrodo a tierra), conectados a un acoplador de impedancia y a un generador de RF de 13.56 MHz, como se muestra en la Figura 2.3, (ambos de la marca Advanced Energy, USA) [46].

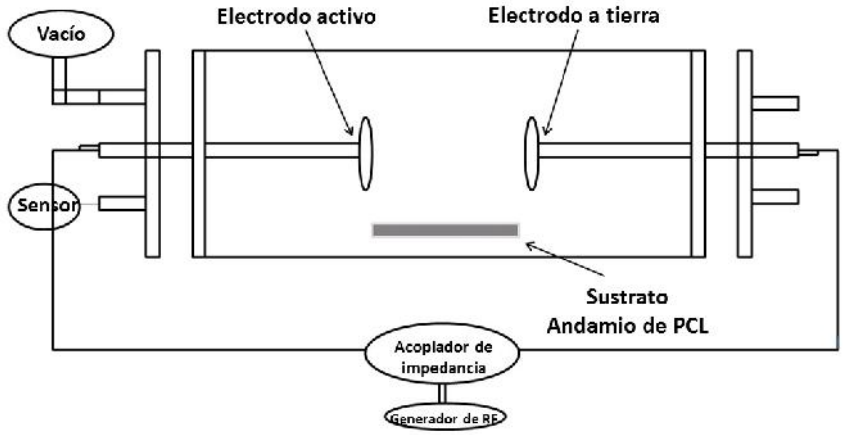


Figura 2.3. Representación esquemática de la configuración del reactor de plasma.

El vacío empleado fue de aproximadamente 2.66 Pa. Para observar el efecto de la potencia y el tiempo de tratamiento, los materiales fueron sometidos a tres niveles de potencia (10, 20 y 30 W) y tres tiempos de tratamiento (1, 3 y 5 min). Estos valores fueron establecidos en base a estudios preliminares en donde se encontró que, para intervalos más altos de tiempo y potencia, los materiales electrohilados experimentan daños severos (cambios morfológicos, dimensionales, de rigidez, entre otros) mientras que a menores condiciones

de tiempo y potencia no se encontraron cambios relevantes durante su caracterización fisicoquímica.

2.5. Caracterización de los andamios de PCL modificados por el plasma de aire

2.5.1. Análisis morfológico de los andamios

Los posibles cambios morfológicos producidos por el tratamiento con plasma de aire fueron estudiados por SEM y AFM. Para ambos estudios, las muestras fueron recubiertas con una capa delgada de oro de aproximadamente 5 nm, con el fin de proveer conducción eléctrica al material.

2.5.1.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las micrografías por SEM fueron obtenidas mediante un microscopio electrónico de barrido, marca JEOL, modelo JSM 6360LV. Las imágenes fueron tomadas en diferentes zonas del andamio utilizando una magnificación de 5000x, y un potencial de aceleración de 10-20 kV. Para obtener los valores del diámetro promedio de las fibras, su desviación estándar y su distribución, se midieron los diámetros de 50 fibras utilizando el programa *Image PRO.*

2.5.1.2. Microscopia de fuerza atómica (AFM)

Las imágenes de AFM se obtuvieron en un microscopio de fuerza atómica (SPM, Ambios Universal, USA) usando un cantiléver de Si-N en modo no contacto. Las imágenes de cada muestra fueron tomadas en zonas diferentes, con una resolución de 512 x 512 px^2. La raíz media cuadrática de la rugosidad (por sus siglas en inglés, R_{rms}) fue determinada usando el programa WSxM v5.0 develop 8.1 de Nanotec [47].

2.5.2. Caracterización fisicoquímica de los andamios modificados.

2.5.2.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, en modo de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

Los materiales sin modificar y modificados fueron caracterizados mediante análisis de FTIR-ATR, usando un cristal de ZnSe. Los espectros fueron obtenidos en un equipo

Nicolet 8700 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) utilizando un promedio de 100 barridos, una resolución de 4 cm^{-1}, en un intervalo de número de onda de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1}.

2.5.2.2. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X (EDS)

La composición química elemental de la superficie de los andamios electrohilados fue analizada antes y después del tratamiento con plasma de aire, mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X (EDS), usando un espectrómetro Oxford Instruments, INCA Energy 200, acoplado a un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6360LV.

2.5.2.3. Espectroscopia fotoeléctronica de rayos-X (XPS)

Se realizaron estudios de XPS, sobre los materiales, antes y después de la modificación, usando un equipo Thermo Scientific™ K-Alpha™ con una radiación de Al $K\alpha_{1,2}$ a 600W (10 kV-60 mA) y un ángulo de análisis de 50º. Los espectros fueron obtenidos bajo dos diferentes condiciones: (i) se generó un espectro en modo de reconocimiento de 0-1200 eV para determinar la composición de los elementos presentes (en porcentaje atómico) y (ii) en modo de barrido (scan) en donde se llevaron a cabo múltiples repeticiones de las señales de O1s, C1s y N1s. Se emplearon funciones mixtas Lorentziana-Gaussiana para deconvolucionar los picos [48], usando el software PeakFit v4.12.

2.5.2.4. Análisis del ángulo de contacto y energía libre superficial.

El ángulo de contacto de los materiales fue medido por el método de la gota sésil, usando un goniómetro óptico (Tantec Inc., USA) y una jeringa de precisión (Hamilton, Inc., USA). Los líquidos empleados (aproximadamente 5 µL) fueron agua destilada y diiodometano.

La energía superficial se calculó a partir del ángulo de contacto que forma la gota del líquido (agua y diiodometano) sobre la superficie de la muestra, empleando el método de Owens-Wendt y la ecuación extendida de Fowkes [49, 50]. Este método permite calcular tanto la componente dispersiva (hidrofóbica, γ^d) como la polar (hidrofílica γ^p) de la energía superficial (γ_s).

2.5.2.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

El estudio por DSC se llevó a cabo en un DSC-7 de la marca Perkin Elmer, en un intervalo de temperatura de -80°C a 80°C, a una rapidez de calentamiento de 10°C/min. Las muestras se colocaron en charolas de aluminio para su análisis. Esta técnica permitió determinar la temperatura de fusión (T_m), la entalpía de fusión (ΔH_m), la temperatura de cristalización (T_c), y el porcentaje de cristalinidad (X_c) [51].

2.5.2.6. Difracción de rayos-X (XRD).

Estos estudios se llevaron a cabo para verificar si el patrón de difracción de rayos X de la PCL experimentó algún cambio con los diferentes tratamientos superficiales. Los análisis fueron llevados a cabo en un difractómetro de rayos-X de la marca Siemens D5000, con un tiempo de paso de 6 s, un tamaño de paso de 0.04 °, un voltaje de 34 kV y 25 mA.

Con el fin de estimar el índice de cristalinidad del polímero a partir de los difractogramas de rayos-X, se siguió la metodología propuesta por Nara y Komiya [52]. Para tal efecto se estimó una zona amorfa trazando una línea base que une a los valles y los picos de los difractogramas; posteriormente se evaluó la zona cristalina con base al cálculo del área bajo la curva de los picos. El índice de cristalinidad, I_c, se determinó relacionando las áreas de las zonas cristalinas, A_c, y amorfas, A_a, como se muestra en la ecuación 2.1:

$$I_C = \left(\frac{A_C}{A_C + A_a}\right) x\, 100 \qquad \text{(Ec. 2.1.)}$$

2.5.3. Análisis de la concentración de grupos carboxilo (COOH) en los andamios por el método TBO

La concentración de grupos COOH en la superficie de los materiales, antes y después de la modificación, se determinó por el método colorimétrico denominado azul de orto-toluidina (TBO) [53]. Brevemente, las fibras electrohiladas de PCL (1 cm^2) se colocaron en viales con una solución de 2 mL de TBO al 0.5 mM y pH 10, agitándose por 20 h. Luego se lavaron con NaOH 0.1 mM hasta retirar el exceso de colorante, se le agregaron 2 mL de

ácido acético al 50% y se agitaron por 10 min. Por último, se midió la concentración del colorante residual en la solución usando un espectrofotómetro UV-VIS a 633 nm. Previamente se elaboró una curva estándar de concentraciones conocidas de TBO [54, 55]. (Ver Anexo 1).

2.6. Análisis estadístico y error experimental

Para todas las pruebas se llevaron a cabo análisis estadísticos y de error experimental, según el caso. Por ejemplo, al analizar los diámetros de fibras se obtuvo su valor promedio y su respectiva desviación estándar. Para ello, se efectuó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) mediante la prueba de Tukey; un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo. Lo mismo ocurrió cuando se analizaron las propiedades mecánicas, ángulo de contacto, energía libre superficial y densidad de grupos COOH de estos andamios.

Por otro lado, los estudios de AFM, EDS, XRD, DSC y XPS, se llevaron a cabo solo por triplicado. Para este caso, de los tres valores obtenidos se tomó el valor mayor, se le restó el menor y su diferencia se dividió entre dos para obtener así el error experimental.

Capítulo III. Resultados y Discusión.

3.1. Obtención y caracterización de los andamios electrohilados

3.1.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Los andamios fueron elaborados usando PCL, ya que este polímero ha sido usado ampliamente en la elaboración de soportes en ingeniería de tejidos [56]. En la Figura 3.1 se pueden observar las micrografías de SEM de los andamios electrohilados, obtenidos a diferentes voltajes y flujos de salida del polímero, mientras que en la Figura 3.2 se pueden ver los diámetros promedio de las fibras obtenidas en cada uno de los casos. Como se observa en las micrografías de la Figura 3.1, las fibras obtenidas muestran un aspecto bastante homogéneo y no se observan la presencia de perlas (beads) en ninguno de los casos reportados. Además, se puede ver que para ciertas condiciones, las fibras obtenidas poseen morfologías de tipo rama, lo cual podría ser atribuido a la utilización de voltajes altos durante el proceso de electrohilado. Doshi *et al.* [57], encontraron resultados similares al electrohilar diversos polímeros y señalaron que se pueden obtener diversas arquitecturas de fibras, tales como fibras en forma de ramas, fibras enredada, de cintas, entre otros).

En la Figura 3.2 se puede apreciar que un incremento en el voltaje parece producir un aumento en el diámetro de las fibras para todos los flujos estudiados (0.5, 1.0 y 1.5 mL/h); por ejemplo, para el caso de los electrohilados obtenidos a 0.5 mL/h, el diámetro promedio aumentó de 1.07 a 1.23 μm aprox.; para el flujo de 1.0 mL/h, el incremento del diámetro fue de 0.64 a 1.05 μm y; por último, para el mayor flujo (1.5 mL/h) el cambio fue de 0.77 a 1.38 μm (ver Anexo 2). A pesar de lo anterior, el análisis de varianza indicó que solo a flujos elevados esta tendencia es estadísticamente significativa.

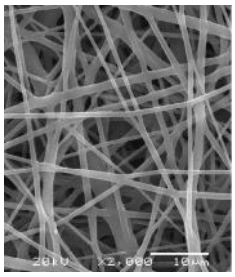
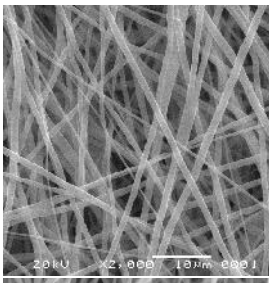
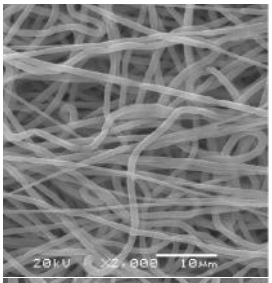
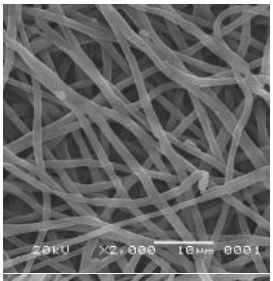
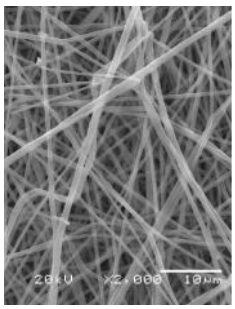
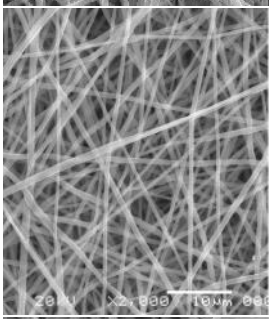
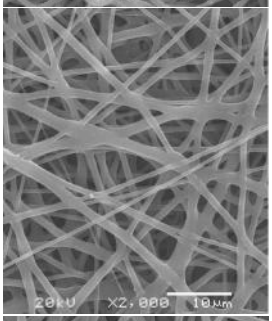
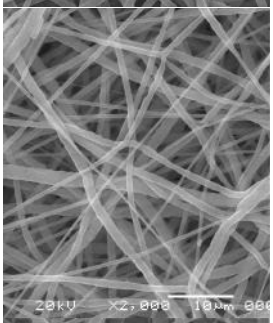
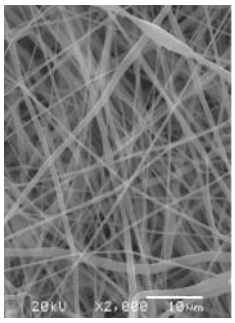
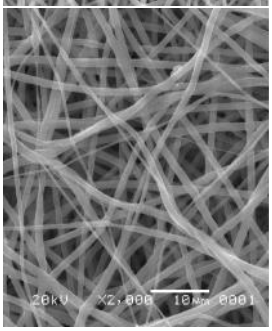
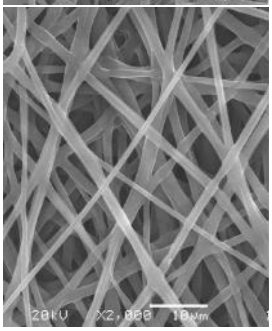
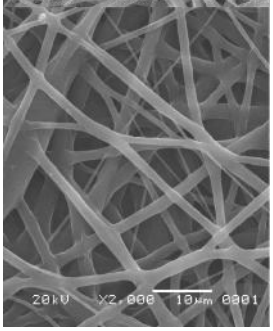
Flujo de salida del polímero (mL/h)	Voltaje de electrohilado (kV)			
	10	15	20	25
0.5				
1.0				
1.5				

Figura 3.1. Micrografías de SEM a 2000x, de los andamios electrohilados de PCL obtenidos a diferentes voltajes de electrohilado y flujo de salida del polímero**.**

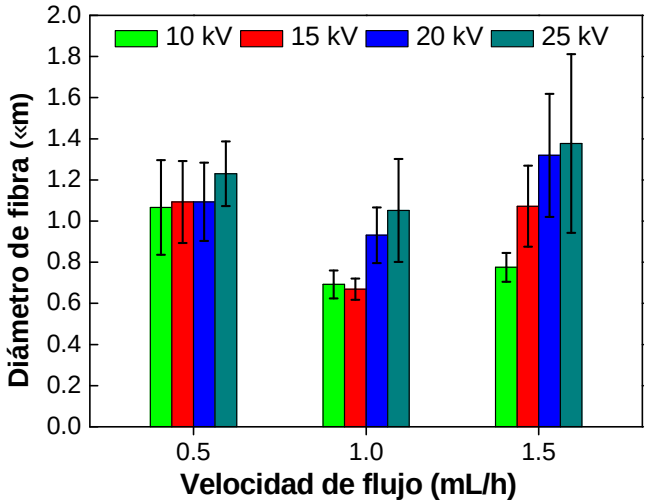


Figura 3.2. Diámetros de fibras presentes en los andamios con respecto a la velocidad de flujo de salida del polímero y el voltaje aplicado.

La tendencia encontrada en este trabajo, en relación al efecto del voltaje, coincide con lo reportado por Cipitria *et al.*, en una revisión [56]. Ellos reportan resultados de andamios de PCL obtenidos por electrospinning donde notaron que al incrementar el voltaje es posible obtener fibras más gruesas; y que al aumentar el voltaje de 13 a 20 kV, el diámetro de las fibras pasó de tener valores del intervalo de 660-700 nm hasta valores de 1-2 µm.

Por otra parte, también se analizó la influencia de la velocidad de flujo del polímero sobre el diámetro promedio de las fibras obtenidas durante el proceso de electrohilado (ver Figura 3.2). Se puede observar que este parámetro presenta una conducta compleja, ya que a voltajes bajos (10 kV), el diámetro de las fibras disminuye al aumentar la velocidad de flujo; mientras que a voltajes mayores (20 y 25 kV) este parámetro parece ya no tener influencia alguna sobre el diámetro de la fibra. Doustgani *et al.* [18] también encontraron en sus resultados que la velocidad de flujo no muestra influencia significativa sobre el diámetro de las fibras de PCL.

En general, se considera que una velocidad de flujo baja es conveniente, debido a que brinda tiempo suficiente para la evaporación del disolvente, y que el empleo de altas velocidades puede dar lugar a la formación de grumos, perlas (beads) y defectos de las

fibras electrohiladas debido a la incapacidad de un secado adecuado de estos materiales antes de llegar al colector.

3.1.2. Análisis del área superficial y volumen total de poro.

Con el fin de estimar el efecto del voltaje aplicado y, la velocidad de flujo de salida del polímero, utilizados durante el proceso de electrohilado sobre las características morfológicas de las fibras, se calculó el área superficial y el volumen total de poro (o volumen de poro del andamio).

Mediante la técnica de BET, se logró calcular el tamaño de poro a partir de las isotermas de adsorción. Esta técnica ha sido empleada para determinar el área superficial y el volumen de poro en materiales mesoporosos (diámetros de poro entre 2 y 50 nm) y macroporosos (diámetros superiores a 50 nm) de diferentes morfologías [58].

Para la evaluación de las propiedades antes mencionadas se eligió estudiar aquellos andamios obtenidos a una velocidad de flujo de 1.5 mL/h y diferentes voltajes (10, 15, 20 y 25 kV). Lo anterior fue debido a que únicamente con estas condiciones se obtuvieron diferencias significativas en el diámetro de las fibras generadas (ver Figura 3.2), por lo que se espera que se pueda encontrar diferencias tanto en el área superficial como en el volumen total de poro. En la Figura 3.3., se puede observar que el área superficial disminuye, conforme aumenta el voltaje aplicado (de 10 a 25 kV); esto podría explicarse si se tiene en cuenta que un aumento en el voltaje produce un aumento del diámetro de las fibras, como se demostró en los resultados anteriores. Deitzel *et al.* [59] tratan de explicar este fenómeno representando a la fibra del polímero como un cilindro, en el cual se relaciona el área superficial específica (área superficial/volumen) que es inversamente proporcional a 2 sobre el radio de la fibra ($2/R_{fibra}$); por lo que un aumento en el radio de la fibra significa una disminución del área superficial específica, como se muestra en la ecuación 3.1.

$$A_{SE} = \frac{1}{\left(\frac{2}{R_{Fibra}}\right)} \qquad \text{(Ec. 3.1.)}$$

También se aprecia que a medida que se incrementa el voltaje, el volumen total de poro pareciera incrementar, aunque el análisis de varianza demostró que este cambio no fue estadísticamente significativo.

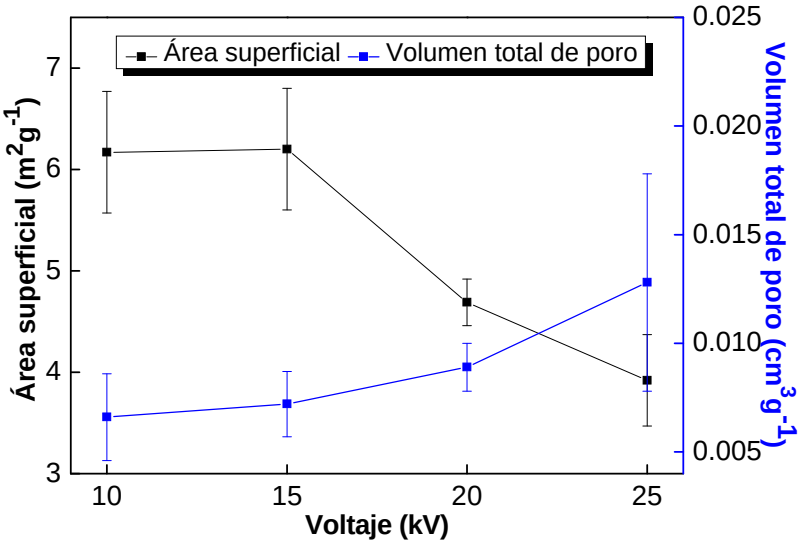


Figura 3.3. Comportamiento del área superficial y volumen total de poro ,con respecto al voltaje aplicado en el proceso de electrohilado, para una velocidad de flujo de 1.5 mL/h..

La medición de los parámetros exhibidos en la Figura 3.3 es importante ya que existen reportes en la literatura que han tratado de establecer la influencia del diámetro de las fibras, el área superficial y el volumen de poro, sobre el crecimiento celular y han encontrado que las células exhiben cierta selectividad ante las características señaladas previamente [60]. Así, diversos autores han estudiado la dependencia del diámetro de fibra y el diámetro de poro sobre la adhesión, proliferación y migración de fibroblastos [60] y células madre neuronales [61]. Lo anterior ha sido demostrado tanto en forma experimental como por modelos matemáticos que pretenden comprobar la utilidad del empleo de diversos diámetros de fibra y de poro [62].

3.1.3. Caracterización mecánica de los andamios electrohilados de PCL

Uno de los aspectos más importantes a considerar en los andamios o soportes, son las propiedades mecánicas de estos materiales, ya que se requiere que éstos sean capaces de resistir las cargas fisiológicas *in vivo* a los cuales se encontrarán sometidos durante la regeneración del tejido [63]. Por ejemplo, para la regeneración de tejido blando como la piel, requiere de materiales que sean flexibles, ya que estarán sujetos a elongaciones cuando se le aplique una fuerza externa, y que estén diseñados para recuperarse de esfuerzos mecánicos [5]. Pruebas de esfuerzos a tensión se llevan a cabo para tejidos blandos, por ejemplo, para ligamentos, piel, cartílago, etc., mientras que para tejidos duros, como el hueso, se utiliza más los valores del módulo de elasticidad [5].

En el presente trabajo, se pretende calcular mediante ensayos mecánicos a tensión, los valores del esfuerzo de tensión de los andamios obtenidos a diferentes condiciones de voltaje aplicado (10, 15, 20 y 25 kV) y diferentes velocidades de flujo de salida del polímero (0.5, 1.0 y 1.5 mL/h), procurando en todos los casos mantener las mismas condiciones medioambientales (45% humedad) y/o de corriente (1 Ampere) para cada andamio obtenido. En la Figura 3.4 se puede apreciar que un incremento en el voltaje produce un aumento en el esfuerzo de tensión (σ) de los andamios, aunque el grado de significancia estadística depende de la velocidad de flujo de salida del polímero utilizada; por ejemplo, cuando la velocidad es de 0.5 mL/h ó 1.0 mL/h, el aumento del esfuerzo mecánico ocurre desde los 15 kV, mientras que cuando la velocidad de flujo es 1.5 mL/h, el aumento inicia a partir de los 20 kV.

Por otro lado, el valor σ de los andamios muestra una evolución interesante al aumentar la velocidad de flujo: primero aumenta y luego disminuye; es decir, al parecer existe una velocidad de flujo en donde el esfuerzo mecánico se ve maximizado. En este caso, la velocidad de flujo de salida del polímero a la que se obtuvo el mayor esfuerzo mecánico fue de 1.0 mL/h para todos los voltajes estudiados.

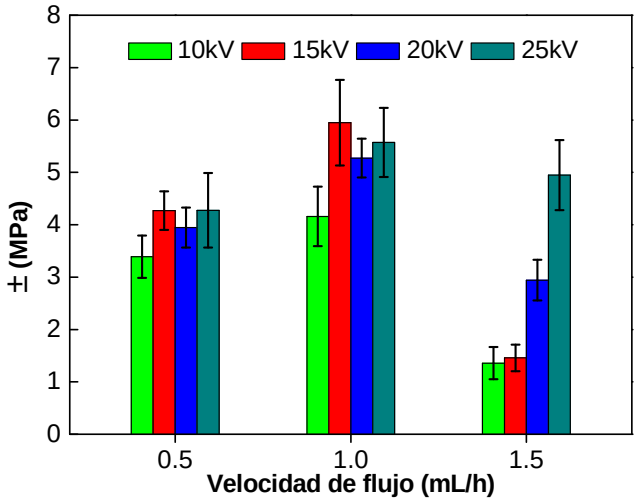


Figura 3.4. Esfuerzo de tensión (σ) de los andamios de PCL obtenidos con diferentes voltajes aplicados y velocidades de flujo de salida del polímero.

Continuando con el análisis se puede observar en la Figura 3.5 que el porcentaje de deformación de los andamios aumenta significativamente con el aumento del voltaje aplicado, prácticamente en todos los casos. También se observa que cuando la muestra fue preparada con un voltaje de 10 kV, el valor ϵ no exhibe una tendencia definida al aumentar la velocidad de flujo; en contraste, cuando los andamios fueron preparados con 15 y 20 kV, la deformación tiende a disminuir con el aumento de la velocidad de flujo y cuando el voltaje es máximo (25 kV), ocurre lo contrario. Es evidente, después analizar estos resultados, que se necesitan realizar más experimentos para tener una mejor idea del efecto de las variables estudiadas sobre esta propiedad mecánica.

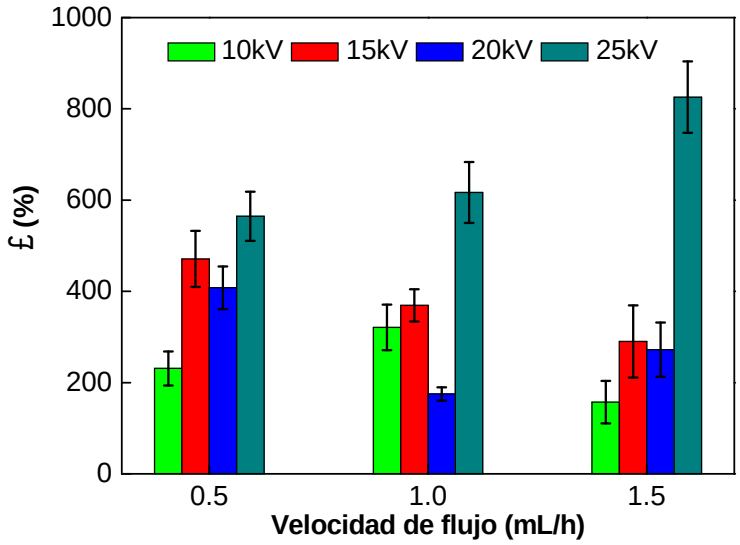


Figura 3.5. Porcentaje de deformación de los andamios de PCL, obtenidos a diferentes voltajes aplicados y velocidades de flujo de salida del polímero.

Thomas *et al.* [64], prepararon andamios de PCL por medio de electrospinning y reportaron valores de deformación en el intervalo obtenido en este trabajo.

Por otro lado, ni la velocidad de flujo ni el voltaje aplicado parecen tener un efecto definido sobre el módulo elástico (E), al que también podemos llamarle módulo estructural. Lo anterior puede ser debido a que se trata de comparaciones estructurales entre andamios que poseen diferentes diámetros de fibra, volumen total de poro y/o área superficial, como se observó en la Figura 3.3. A pesar de lo anterior, se pudo observar que en las muestras elaboradas con un flujo de 1.5 mL/h, un aumento en el voltaje produce un aumento en el módulo estructural (hasta 20 kV, aunque posteriormente esta propiedad disminuye al aumentar el voltaje hasta 25kV). También se observó un incremento del valor de E, al aumentar la velocidad de flujo, especialmente cuando el voltaje fue de 20 kV (véase la Figura 3.6.).

Existen informes de autores que fabricaron nanofibras de PCL por electrospinning y encontraron que los valores del módulo de elasticidad aumentan con el incremento del voltaje aplicado y el flujo de salida del polímero; incluso, comentan que tanto σ como % pueden mejorarse al aumentar ambos parámetros [64, 65]. En nuestro caso, esta tendencia fue observada parcialmente, aunque fue dependiente de las condiciones seleccionadas.

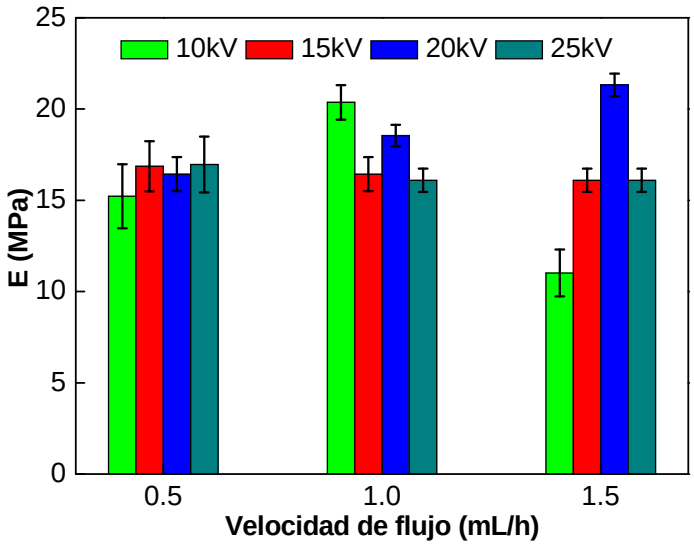


Figura 3.6. Módulo de elasticidad (E) de los andamios de PCL obtenidos a diferentes voltajes aplicados y velocidades de flujo de salida del polímero.

Interesantemente, se puede observar que solo para una velocidad de flujo de 1.5 mL/h, un incremento del voltaje produce un aumento en el diámetro de la fibra, en el esfuerzo mecánico del material, en el porcentaje de deformación , así como en el módulo estructural (ver Figuras 3.2, 3.4-3.6).); a esta velocidad de flujo, el volumen total de poro no experimenta cambios significativos (ver Figura 3.3), que pudieran afectar las propiedades medidas. Lo anterior podría deberse al hecho de que los andamios con fibras más finas o delgadas, son mucho más débiles comparadas con aquellos fabricados con diámetros de fibras más gruesas. Notablemente, los materiales se vuelven más flexibles, pero al mismo tiempo, más fuertes y más duros cuando se incrementa el diámetro de la fibra.

En la Figura 3.7 se observa la relación que guarda el área superficial y el diámetro de las fibras obtenidas a diferentes voltajes, con el esfuerzo a tensión del andamio elaborado. Por lo tanto, esta gráfica pretende relacionar el esfuerzo mecánico del andamio con su morfología, específicamente con el diámetro de fibra, el área superficial y el volumen total de poro. Se puede notar que un aumento del voltaje, incrementa tanto σ, como el diámetro de fibra, mientras que el área superficial disminuye.

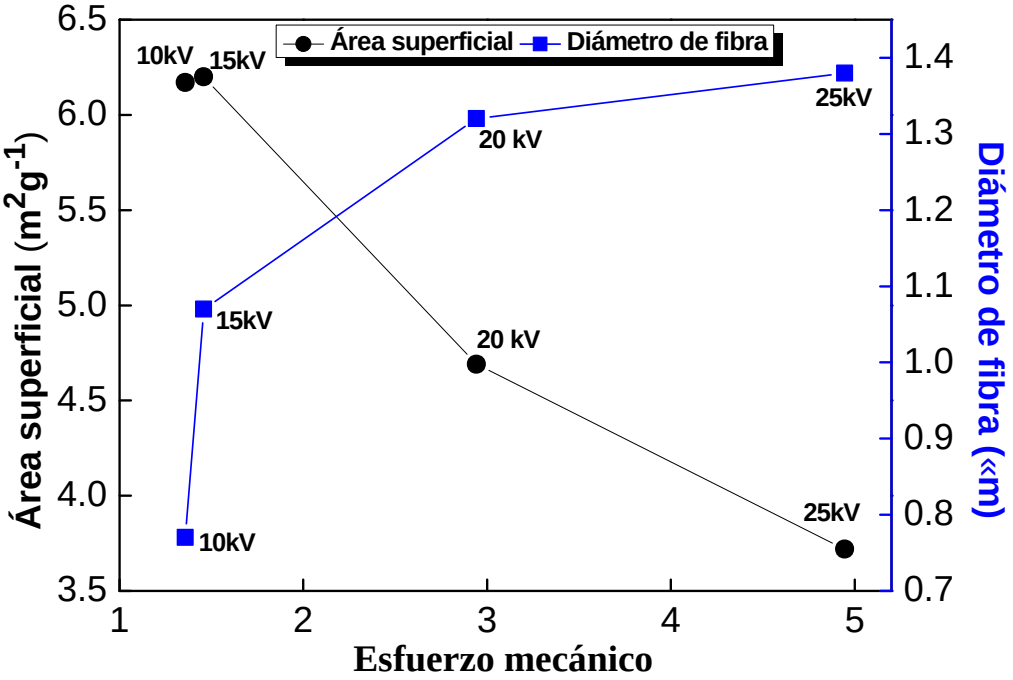


Figura 3.7. Relación del área superficial y el diámetro de las fibra con respecto al esfuerzo mecánico de los andamios obtenidos por electrohilado a una velocidad de flujo de 1.5 mL/h.

Resultados similares fueron reportados por Pai *et al.* [65] quienes elaboraron andamios de PCL por electrospinning y explicaron que el área superficial de la red electrohilada puede ser controlada mediante cambios del diámetro de las fibras; lo anterior es debido a que una reducción del diámetro de fibra, aumenta el área superficial y viceversa; esto tiene un impacto directo en las propiedades mecánicas del material obtenido.

Los resultados anteriores nos permitieron decidir cuáles serían los parámetros o las condiciones de fabricación de los andamios más idóneas para su posterior modificación con plasma de aire y su caracterización. En todos los casos, los andamios obtenidos a una velocidad de flujo de 1.5 mL/h exhibieron mejores características, en cuanto al diámetro de fibra, morfología y propiedades mecánicas se refiere, comparado con las otras velocidades de flujo de salida del polímero (ver Figuras 3.2, 3.4-3.6); por ello se decidió emplear estas condiciones. Además, se decidió usar un voltaje de 15 kV, ya que con este parámetro la superficie de los andamios se encuentra completamente libre de perlas (beads) (ver Figura 3.1).

3.2. Caracterización de los andamios de PCL modificados por el plasma de aire

Los andamios de PCL fueron analizados antes y después de la modificación con plasma de aire, con la finalidad de estudiar los cambios generados. Para ello, se emplearon técnicas de microscopia (SEM y AFM) y espectroscópicas (FTIR-ATR, EDS, XPS). También se llevaron a cabo análisis por XRD, DSC, propiedades mecánicas, mediciones del ángulo de contacto, de energía libre superficial y de la concentración de grupos COOH por el método TBO. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

3.2.1. Análisis morfológico de los andamios de PCL

3.2.1.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La Figura 3.8 muestra las micrografias de SEM de los andamios de PCL tratados con plasma de aire a diferentes condiciones; también se presenta una muestra del que no fue sometido a este tratamiento. Se puede notar claramente que las fibras de los andamios presentan características similares entre sí y que, las microfibras de los andamios tratados con plasma no presentan erosión o cambios dimensionales en su superficie, incluso, cuando se emplearon las condiciones más severas del tratamiento (una potencia de 30 W y un tiempo de 5 min).

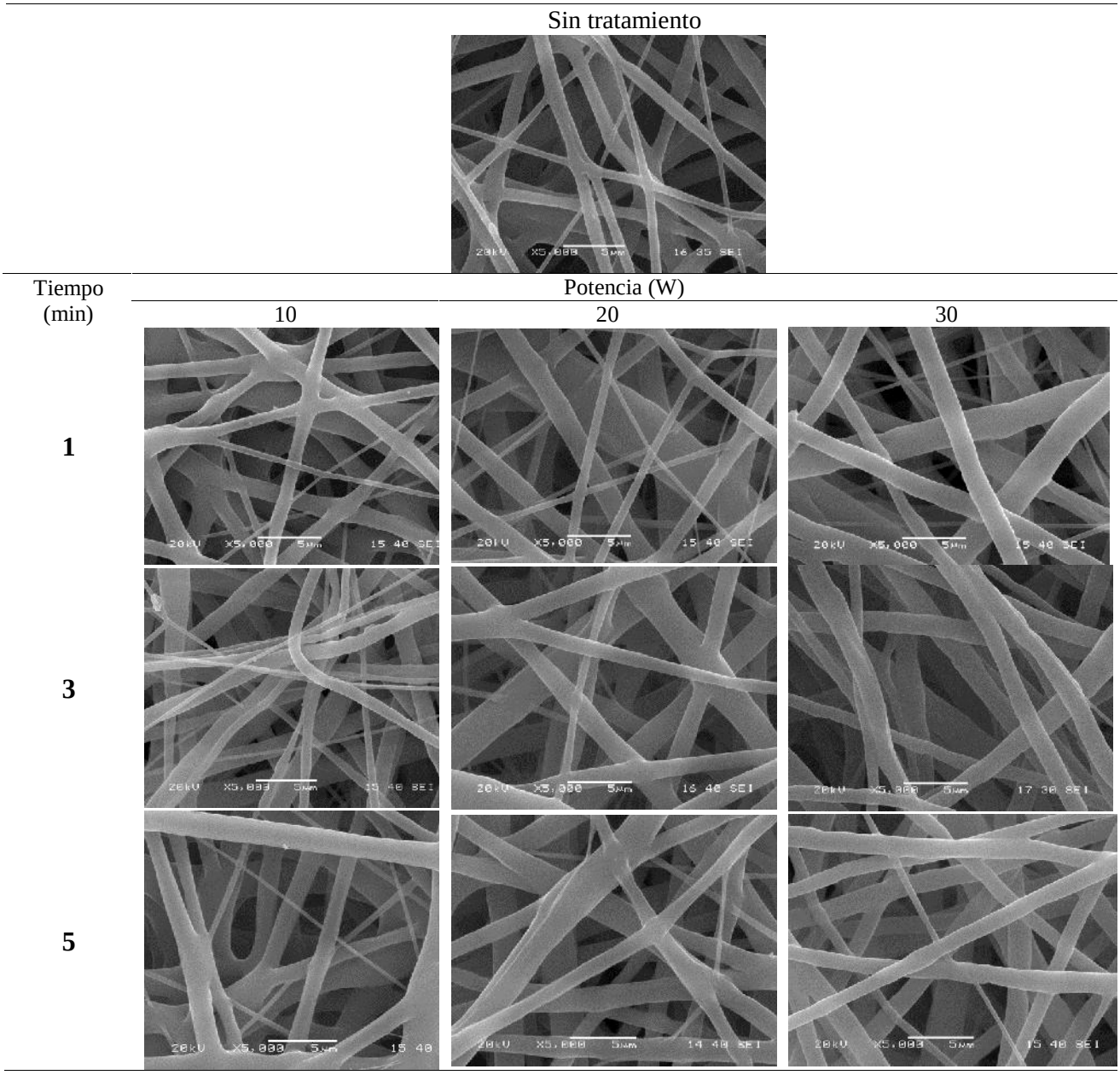


Figura 3.8. Micrografías SEM de los materiales electrohilados de PCL (5000x); sin tratamiento y tratados con plasma de aire a diferentes condiciones de tiempo y potencia.

El estudio de las fibras generadas durante el proceso de electrohilado no solo contempló el análisis morfológico de éstas, sino también la medición de los diámetros obtenidos en todas y cada una de las muestras. La Tabla 3.1 muestra que el diámetro promedio de las fibras

oscila entre 1.1 y 1.3 µm, con desviaciones estándar similares (alrededor de 0.6 µm). El análisis de varianza de una vía (ANOVA) realizado a estos resultados indicó que no existe diferencia significativa en el diámetro de las fibras entre los diversos tratamientos. En estas pruebas se consideró un valor de $p \leq 0.05$.

Prabhakaran *et al.* [31], prepararon andamios electrohilados de PCL y posteriormente los trataron con plasma de aire a una potencia de 30 W durante 1 min, sin observar cambios en su morfología y en el diámetro de las fibras después del tratamiento. Chan *et al.* [66], realizaron estudios similares con descarga de plasma y fotones, observando por SEM que no hubo cambios en la estructura de los andamios de PCL a tiempos cortos. En contraste, Martins *et al.* [27] encontraron que al someter los andamios de PCL a un tratamiento con plasma de oxígeno, a una potencia de 30 W, durante 10 min, se induce la fusión de las fibras mas delgadas. Lo anterior demuestra que a potencias bajas (hasta 30 W) y tiempos cortos (hasta 5 min) el tratamiento con plasma no provoca daños a la estructura fibrilar del material (PCL).

Tabla 3.1. Diámetro promedio y desviación estándar de las fibras presentes en los andamios de PCL tratados y no tratados con plasma de aire.

Tratamiento	**Diámetro de fibra (µm)**
Sin tratamiento	1.05 ± 0.6
10W/1min	1.1 ± 0.7
10W/3min	1.1 ± 0.8
10W/5min	1.1 ± 0.7
20W/1min	1.1 ± 0.6
20W/3min	1.3 ± 0.7
20W/5min	1.3 ± 0.7
30W/1min	1.2 ± 0.7
30W/3min	1.3 ± 0.6
30W/5min	1.2 ± 0.6

Los diámetros medidos fueron graficados para obtener las distribuciones correspondientes (ver Figura 3.9), y se puede notar que prácticamente todas las muestras presentan distribuciones normales centradas entre 1.0 y 1.2 µm, lo que indica que los tratamientos

efectuados sobre los materiales no produjeron cambios significativos en las distribuciones generadas.

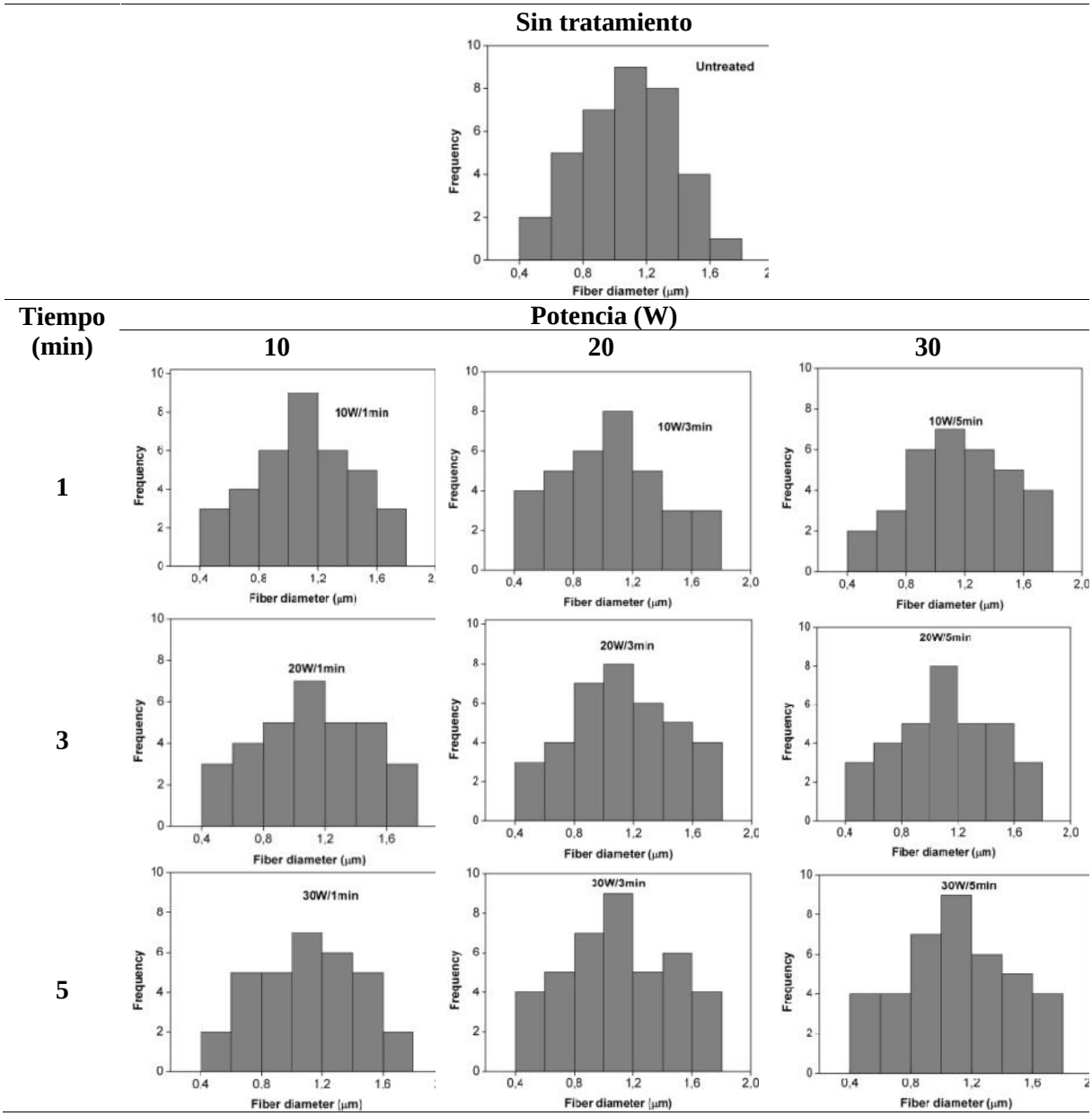


Figura 3.9. Distribuciones de los diámetros de las fibras presentes en los andamios electrohilados de PCL.

3.2.1.2. Microscopia de fuerza atómica (AFM)

Por otro lado, también se llevaron a cabo estudios de AFM, con la finalidad de analizar las características topográficas de la superficie de los andamios electrohilados, cuando éstos fueron tratados con la potencia máxima (30 W) y diferentes tiempos de tratamiento (1, 3 y 5 min). Esto se realizó, para determinar si el tratamiento con plasma induce cambios en la superficie de los materiales.

La topografía de los materiales electrohilados de PCL fue observada a través de imágenes en 3D, obtenidas del AFM antes y después de la modificación con plasma. Para esto se examinaron tres zonas de cada muestra y, una imagen representativa fue elegida y desplegada en lado izquierdo de la Figura 3.10. Del lado derecho de cada figura se presentan los perfiles de rugosidad en el eje x de cada imagen. Se puede observar que las imágenes en 3D son similares entre sí; lo mismo ocurre con los perfiles de rugosidad ya que éstos no muestran diferencias en su distribución por el tratamiento aplicado.

La raíz media cuadrática de la rugosidad del andamio sin tratamiento fue de aproximadamente 1.00 ± 0.20 μm, mientras que para los tratados a 30 W durante 1, 3 y 5 min, fueron de 0.66 ± 0.21, 0.85 ± 0.16 y 0.67 ± 0.19 μm, respectivamente. Como se puede ver los valores de rugosidad se encuentran en un mismo intervalo y no presentan cambios notables en su topografía que demuestren que la rugosidad del andamio este cambiando con el tratamiento con plasma, incluso a la potencia y el tiempo máximos utilizados en este estudio (30 W durante 5 min). También se estimaron los valores de superficie de planchado para los andamios sin modificar y modificados. Los andamios sin modificar tuvieron un valor de 8,871.13 μm^2 y, para los modificados a 30 W durante 1, 3 y 5 min, los valores fueron de 8,852.22, 8,807.21 y 8,823.68 μm^2, respectivamente. El análisis de estos datos tampoco reveló que la superficie del andamio, después del tratamiento, experimentara grandes cambios.

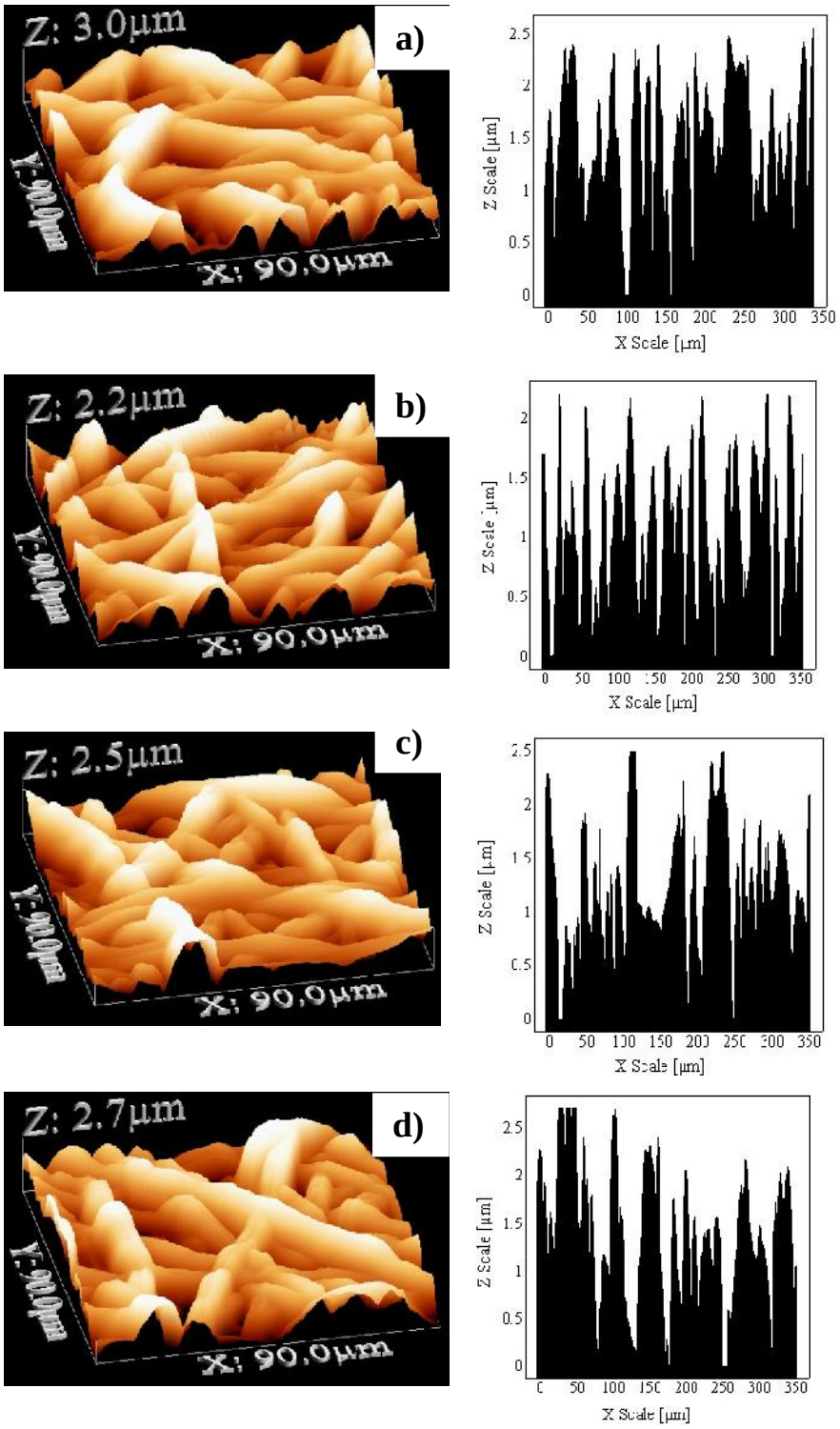


Figura 3.10. Imágenes en 3D de AFM (lado izquierdo) y perfiles de rugosidad (lado derecho) de la superficie de los andamios de PCL. Andamios sin tratamiento (a) y andamios tratados con plasma de aire a 30 W durante 1 min (b), 3 min (c) y 5 min (d).

En contraste a lo encontrado en este trabajo, Yildirim *et al.* [42], reportaron haber modificado andamios de PCL con plasma de oxígeno a una potencia de 100 W, variando el tiempo (1, 3 y 5 min) y, encontraron que la rugosidad superficial de los andamios se incrementa a partir del primer minuto de modificación y hasta el minuto 3; un aumento adicional del tiempo de tratamiento (hasta 5 min) produjo una disminución de la rugosidad. Recientemente, Pappa *et al.* [43], trataron la superficie de andamios de PCL con plasma de oxígeno y reportaron que la rugosidad se incrementa al modificar los andamios con una potencia de 20 W por 15 min con respecto al que no fue tratado, aunque cuando se sometieron los andamios a una potencia (40 W) durante el mismo tiempo, la rugosidad disminuyó. La diferencia entre los resultados obtenidos en este trabajo y lo reportado en los trabajos anteriores puede radicar en que estos autores utilizaron altas potencias (hasta 100 W) y tiempos largos (hasta 15 min) durante sus tratamientos.

3.2.2. Caracterización fisicoquímica de los andamios de PCL modificados.

3.2.2.1. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier en modo reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

El análisis por FTIR fue empleado para detectar posibles cambios en los grupos funcionales presentes en la superficie de los materiales electrohilados, ocurridos durante el tratamiento con plasma. En la Figura 3.11 se presentan los espectros de los andamios sin tratamiento y de los tratados a diferentes potencias y tiempos. Los espectros de IR muestran las principales señales de absorción de la PCL tales como, los estiramientos asimétrico y simétrico de los grupos metilenos (2944 y 2865 cm^{-1} respectivamente), el estiramiento del grupo carbonilo del éster (O-C=O) a 1726 cm^{-1} y, por supuesto, la banda a 1294 cm^{-1} que corresponde al estiramiento de los grupos C-O de la fase cristalina de la PCL. También se observan bandas a 1418 cm^{-1} (relacionada a la flexión de enlaces O-H), 1242 y 1189 cm^{-1} relacionadas con los estiramiento asimétrico y simétrico de los enlaces C-O-C (de origen cristalino) y OC-O, respectivamente [67]. Finalmente, también se observaron picos de baja

intensidad en 984, 961 y 840 cm^{-1}, los cuales corresponden al balanceo (rocking) de los grupos metileno [51]

Al realizar una inspección más detallada de los espectros de estos materiales se observa que la banda a 1726 cm^{-1} exhibe un pequeño hombro localizado a 1708 cm^{-1}, el cual podría estar asociado a grupos COOH [68, 69]. Asimismo, se observa la presencia de una pequeña banda a 3439 cm^{-1}, relacionada con el estiramiento del enlace O-H. Estas señales se pueden visualizar en todas las muestras (incluyendo los espectros del polímero no modificado), por lo que no pueden vincularse a cambios ocurridos durante el tratamiento con plasma. Teniendo en cuenta lo anterior, entonces es muy probable que éstos pudieran estar relacionados con los grupos terminales de la PCL.

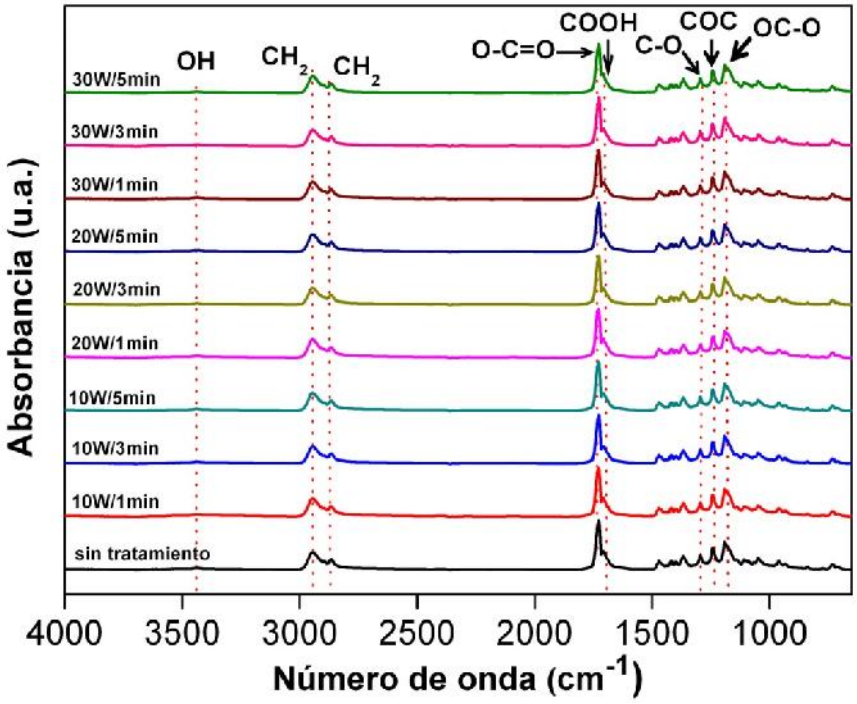


Figura 3.11. Espectros FTIR-ATR de los andamios de PCL sin tratamiento y tratados con plasma de aire a diferentes condiciones de tiempo y potencia**.**

El hecho de que no se observen cambios notables entre el espectro del andamio electrohilado que no fue tratado con plasma y los que sí lo fueron, puede ser atribuido a que

la modificación superficial por plasma únicamente involucra cambios en la superficie del material tratado, del orden de los nanómetros, mientras que la profundidad de análisis de la técnica FTIR-ATR se encuentra en un intervalo de 1 a 5 µm [70]. De esta manera, las variaciones producidas por el tratamiento superficial de plasma no fueron observadas. Gupta *et al.* [71] injertaron ácido acrílico sobre la superficie de películas de PET mediante polimerización con plasma y tampoco detectaron por FTIR el polímero injertado. Ellos señalaron que los cambios en la superficie del PET es del orden de nanómetros por lo que los cambios generados se diluyen cuando el haz IR penetra la muestra.

3.2.2.2. Espectroscopía de energía dispersiva de rayos-X (EDS)

Se llevaron a cabo estudios de EDS con el fin de estimar la composición elemental de la superficie de los andamios antes y después del tratamiento con plasma de aire. Este análisis propició un indicio del efecto que produce el tratamiento con plasma de aire sobre los materiales electrohilados, ya que está reportado que este tratamiento incorpora grupos hidroxilos y carboxilos en la superficie del material [32, 34, 56]. El anclaje de estos grupos sobre los materiales de PCL solo puede seguirse mediante un incremento en la concentración de oxígeno ya que este polímero posee grupos ésteres, que contienen este elemento desde su composición original.

En la Tabla 3.2 se muestran los valores promedio del porcentaje atómico, y su respectivo error experimental, tanto del carbono, oxígeno y del cociente O/C de los andamios de PCL, tanto para los electrohilados sin modificar, como para los modificados a diferentes condiciones. Se puede apreciar que los materiales electrohilados sin tratamiento presentan una relación O/C de 0.43 y, conforme aumenta la potencia y el tiempo de tratamiento, el valor del cociente se incrementa en un 12% como máximo, (para 10 W durante 5 min),, y un 7% como valor minimo para el andamio tratado a 20 W durante 1 min . Por otro lado, Arolkar *et al.* [35] reportaron que al modificar películas de PCL con plasma de aire a una potencia de 40 W durante 0.5, 1, 2, 3 y 5 min, la concentración del carbono disminuye, mientras que la del oxígeno aumenta, con el incremento del tiempo de tratamiento.

Tabla 3.2. Valores promedio y su error experimental (±) del porcentaje atómico de C, O y la relación O/C obtenido por EDS de los andamios de PCL tratados y no tratados con plasma de aire.

	Porcentaje atómico %		
Tratamiento	**Carbono**	**Oxígeno**	**O/C**
Sin tratamiento	69.9 ± 0.1	30.1 ± 0.1	0.43
10W/1min	68.5 ± 0.2	31.1 ± 0.3	0.45
10W/3min	68.4 ± 0.4	31.5 ± 0.4	0.46
10W/5min	67.6 ± 0.3	32.4 ± 0.3	0.48
20W/1min	63.3 ± 1.1	31.7 ± 1.1	0.46
20W/3min	67.6 ± 1.4	32.5 ± 1.4	0.48
20W/5min	66.6 ± 0.4	33.3 ± 0.4	0.50
30W/1min	67.0 ± 0.8	33.0 ± 0.8	0.49
30W/3min	66.6 ± 0.3	33.4 ± 0.3	0.50
30W/5min	66.5 ± 0.5	33.5 ± 0.5	0.50

Los resultados obtenidos permiten suponer que es probable que se estén generando grupos polares que contienen oxígeno en la superficie de los materiales electrohilados como consecuencia del tratamiento con plasma. Esta hipótesis será corroborada posteriormente mediante el empleo de otras técnicas analíticas.

3.3.2.3. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X (XPS)

La técnica XPS fue empleada para analizar, tanto la composición elemental de los materiales electrohilados de la PCL (antes y después del tratamiento con plasma), como para conocer el medio ambiente electrónico de los elementos más representativos de este polímero. Como era de esperarse con base a la estructura química de la PCL y lo observado por EDS, el análisis por XPS del andamio sin tratamiento indicó que la superficie está dominada por especies que contienen principalmente carbono (87.3%) y oxígeno (12.7%), aunque algunos espectros de XPS mostraron la aparición de pequeñas señales de nitrógeno del aire después del tratamiento con plasma (ver Figura 3.12 y Tabla 3.3) y en menor proporción algunas impurezas.

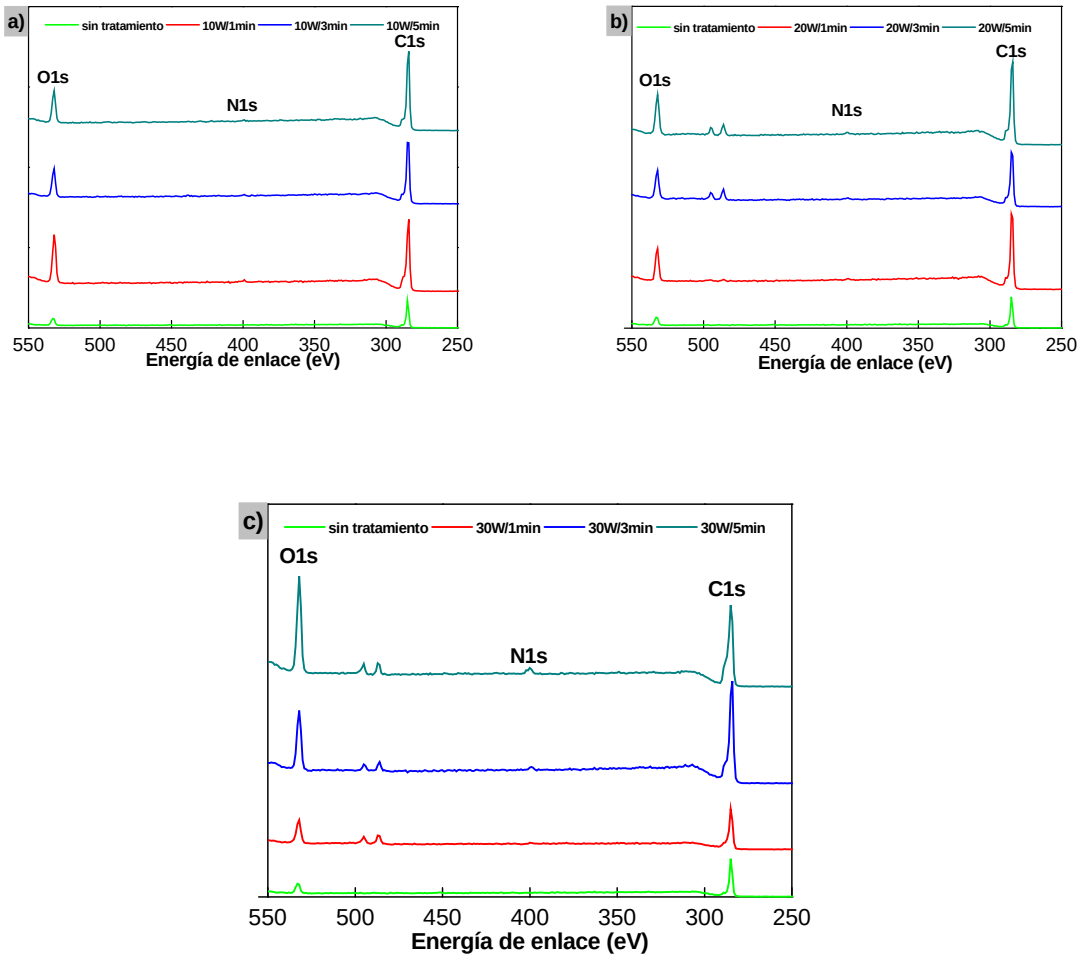


Figura 3.12. Análisis de reconocimiento de elementos (survey) por XPS de los andamios de PCL, sin tratamiento y tratados a diferentes tiempos y potencias: 10 W (a), 20 W (b) y 30 W (c). El eje *x*, corresponde a la energía de enlace (eV) y el eje *y*, corresponde a las cuentas (s).

Tabla 3.3. Composición elemental obtenida por XPS para los andamios de PCL tratados y no tratados con plasma de aire.

	Porcentaje Atómico (%)				
Tratamiento	**Carbono**	**Oxígeno**	**Nitrógeno**	**Impurezas**	**O/C**
Sin tratamiento	87.3	12.7	--		0.15
10W/1min	76.8	20.4	2.8		0.27
10W/3min	83.6	14.7	1.7		0.18
10W/5min	83.7	14.6	1.7		0.17
20W/1min	83.7	14.4	1.9		0.17
20W/3min	79.2	17.0	2.6	1.2	0.21
20W/5min	80.6	15.9	2.7	0.8	0.20
30W/1min	78.0	17.6	2.4	2.0	0.23
30W/3min	77.5	21.0	0.7	0.8	0.27
30W/5min	68.5	27.4	3.5	0.6	0.40

El análisis de la composición elemental de los andamios de PCL tratados con plasma de aire, muestra una disminución del contenido de carbono y un incremento en el contenido de oxígeno, cuando se aumenta la potencia y el tiempo de tratamiento; es decir, se observa un incremento en la razón O/C al aumentar la potencia y el tiempo de tratamiento respecto de las muestras que no fueron tratadas. Esta tendencia se aprecia con mayor claridad cuando las muestras son sometidas a la potencia máxima. Prabhakaran *et al.* [31], reportaron que la relación de O/C aumentó casi 2 veces, cuando compararon andamios de PCL tratados con plasma de aire, a una potencia de 30 W durante 5 min, respecto de los que no recibieron ningún tratamiento. Las tendencias obtenidas corroboran lo encontrado en EDS, ya que en ambos estudios se observó un aumento en el contenido de oxígeno después del tratamiento con plasma. Las señales de C1s en los espectros de XPS fueron deconvolucionadas en tres tipos de carbono (ver Figura 3.13). El primer pico localizado a 284.7 eV, fue relacionado con los enlaces C-C y C-H de la cadena hidrocarbonada; el segundo, a 286.5 eV, fue asociado al enlace C-O y, por último, la señal a 288.8 eV fue atribuido al enlace O-C=O del carbonilo del éster de la PCL, tal y como se ha reportado en previos reportes [37, 44].

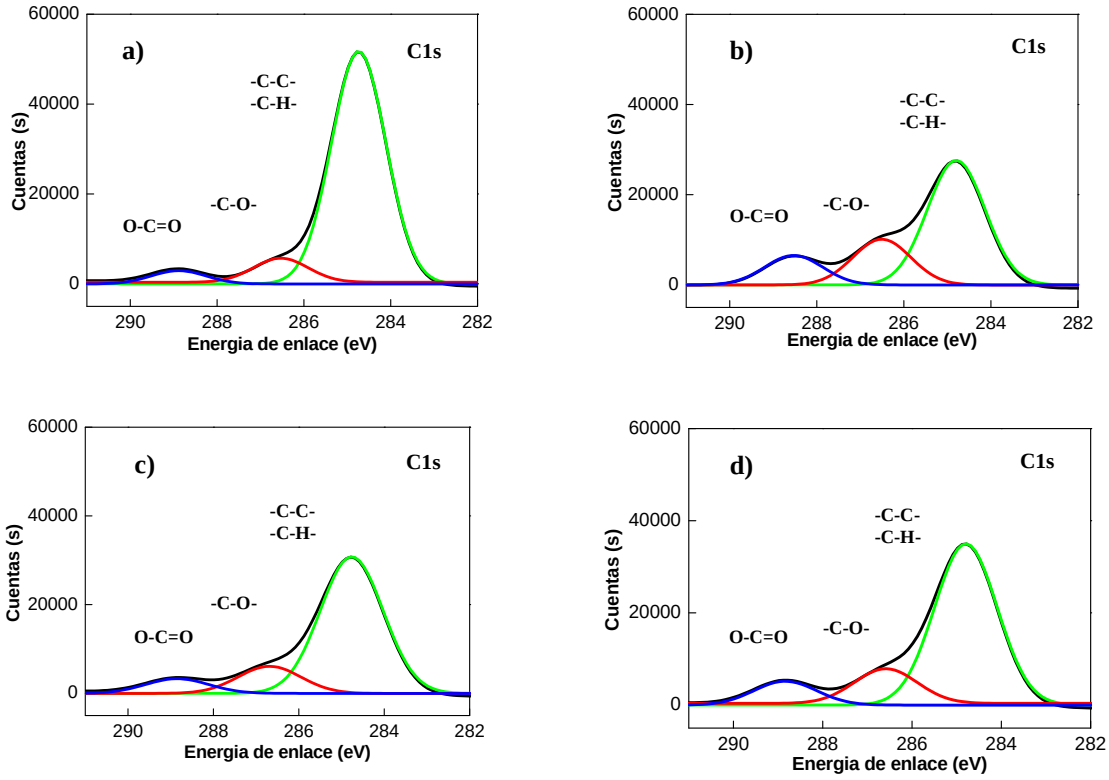


Figura 3.13. Espectros XPS de los andamios de PCL correspondientes a la señal de C1s, sin tratamiento (a) y tratados a 30 W y diferentes tiempos; 1 min (b), 3 min (c) y 5 min (d).

La Figura 3.14 muestra la deconvolución de la señal O1s de los andamios sin modificar y modificados a 30 W durante 1, 3 y 5 min de tratamiento. El análisis detectó la presencia de tres picos en los andamios de PCL sin tratamiento, aunque después del tratamiento surgió un pico adicional. Además de lo anterior, fueron observados cambios en la forma del pico del oxígeno entre el espectro de las fibras nativas y las tratadas con plasma de aire. Por ejemplo, en el espectro del O1s de la muestra sin tratamiento, existen dos contribuciones: la primera a 532.1 eV y la segunda a 533.5 eV (ver Tabla 3.4).

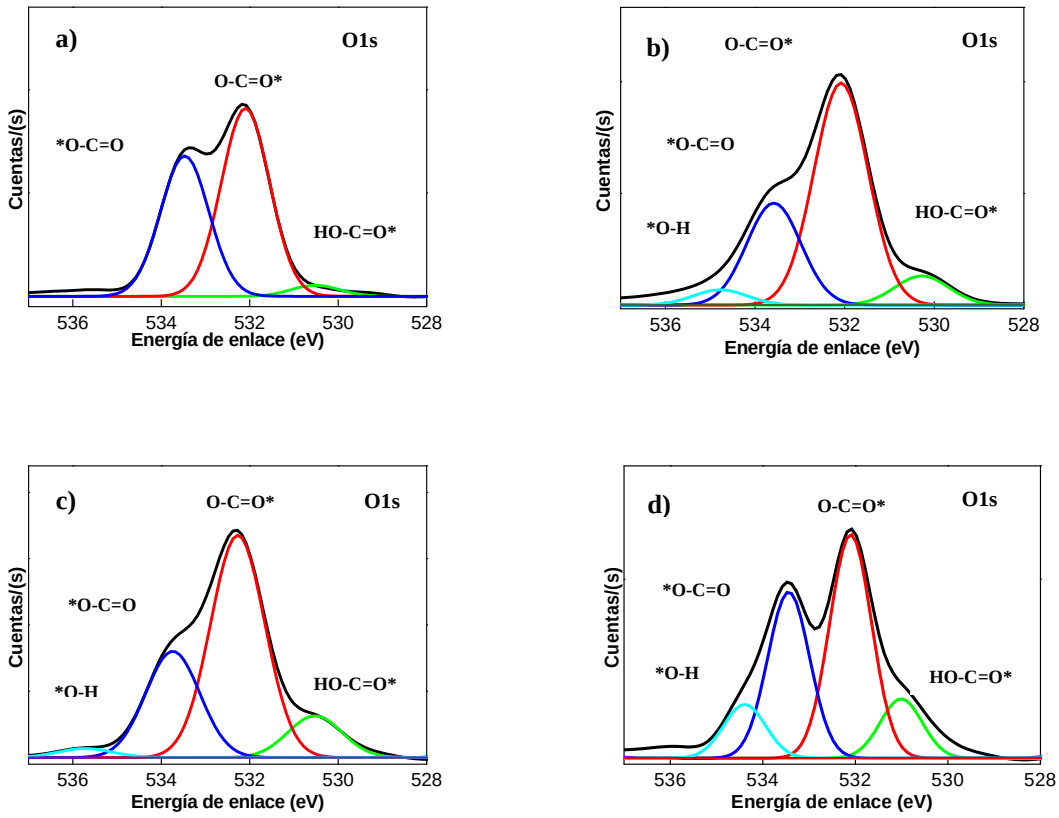


Figura 3.14. Deconvolución de la señal del O1s de los espectros de XPS de los andamios de PCL. Sin tratamiento (a) y tratados con plasma de aire a 30 W durante 1 min (b), 3 min (c) y 5 min (d).

Zander *et al.* [34] atribuyeron estas señales al oxígeno del carbonilo O-C=O* y al oxígeno del éster *O-C=O de la PCL. De manera adicional a las dos señales anteriores, se encontró un pico pequeño (2.8%) a 530.5 eV, el cual podría atribuirse a la presencia de grupos carboxílicos HO-C=O* [77, 78, 79] presentes en la muestra sin tratamiento (los cuales fueron también detectados por FTIR). Esta señal se incrementa cuando aumenta el tiempo de exposición, llegando a ser hasta casi 4 veces superior al comparar las muestras que fueron tratadas por 5 min con las muestras sin tratamiento (ver Tabla 3.4), en similitud a lo reportado por Ma *et al.* [32].

Tabla 3.4. Porcentaje atómico (%) de las diferentes señales de oxígeno en los andamios de PCL, sin tratamiento y tratados con plasma de aire.

Porcentaje atómico del oxígeno (%)				
Tratamiento	***O-H**	***O-C=O**	**O-C=O***	**HO-C=O***
	534.5 (eV)	**533.5 (eV)**	**532.1 (eV)**	**530.5 (eV)**
Sin tratamiento	--	35.8	48.0	2.8
30W/1min	4.0	26.6	57.9	7.6
30W/3min	2.2	25.9	54.1	10.1
30W/5min	9.6	29.5	39.8	10.5

En las muestras tratadas también se puede ver una señal a una energía de enlace de 534.5 eV, que fue asignada a los oxígenos pertenecientes al enlace *O-H [78, 79], los cuales también son susceptibles de generarse durante el tratamiento con plasma de aire. Sin embargo, la concentración de estos grupos no presenta una tendencia definida. Los grupos funcionales encontrados en las señales de O1s y sus porcentajes están resumidos en la Tabla 3.4.

Adicionalmente, se encontraron señales de nitrógeno aproximadamente en 400 eV (ver Figuras 3.12 y 3.15), que no aparecen en las fibras electrohiladas sin tratamiento [42, 72]. Esto puede ser explicado tomando en cuenta que el aire utilizado durante el tratamiento con plasma contiene cerca del 70% de nitrógeno gas en su composición, y a pesar de que éste es inerte, se puede incorporar a la superficie de la PCL, como ya ha sido reportado por Yildirim *et al.* [42] y Jordá-Vilaplana *et al.* [73].

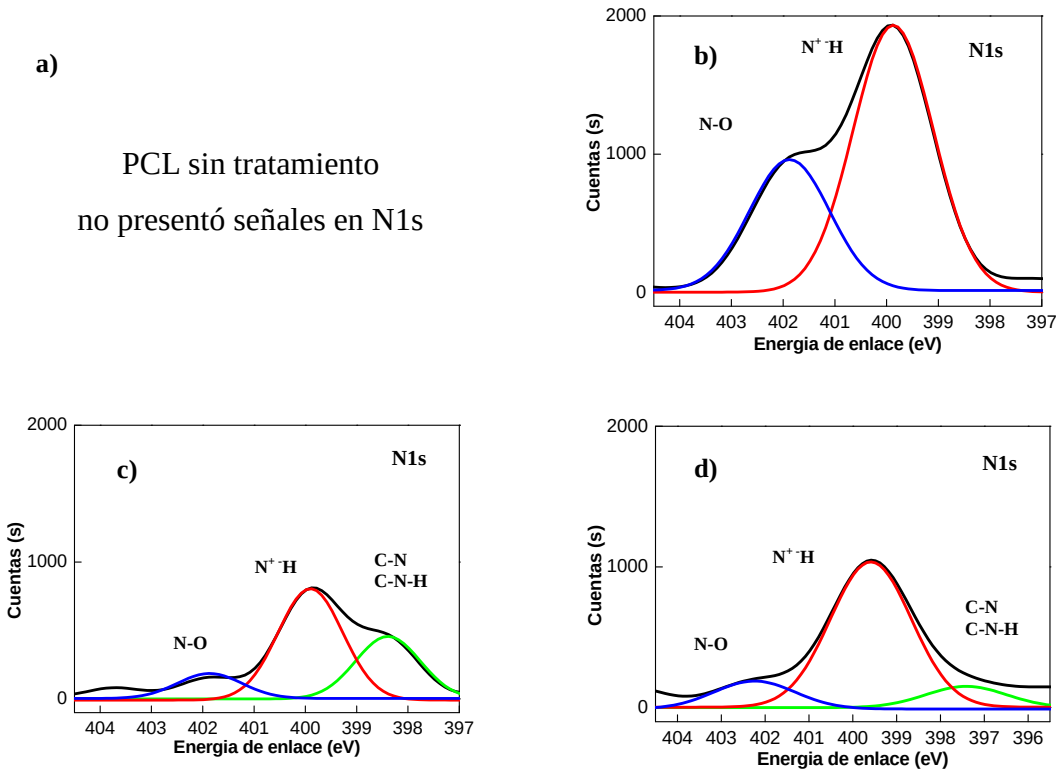


Figura 3.15. Espectros XPS de los andamios de PCL que corresponden a la señal de N1s tratados a 30 W y diferentes tiempos. Sin tratamiento (no tuvo señal en N1s) (a), 1 min (b), 3 min (c) y 5 min (d).

Los resultados sugieren que el tratamiento con plasma de aire promueve la inserción superficial de grupos que contienen oxígeno, y en menor proporción, nitrógeno, en enlaces como N^+-H y N-O, o bien enlaces C-N (como se muestra en la Figura 3.15) [78]. Esto es como consecuencia de la gran variedad de reacciones que permite la formación de sitios activos que facilitan la generación de grupos polares sobre la superficie de los andamios electrohilados de PCL.

3.2.2.4. Análisis de ángulo de contacto y energía libre superficial.

La Tabla 3.5 muestra que la superficie de las muestras sin tratamiento es bastante hidrófoba, presentando un valor de ángulo de contacto en agua destilada (líquido polar), de 128º y un valor de ~0º en diiodometano (líquido-no polar).

En general, se puede observar una disminución del ángulo de contacto en agua cuando se incrementa, tanto la potencia como el tiempo del tratamiento. Si bien es cierto que este hecho es indicativo de que la superficie se está volviendo hidrófila, también debe tomarse en cuenta que una disminución del ángulo de contacto en diiodometano indicaría lo contrario; es decir, que la superficie simultáneamente se esté volviendo hidrófoba. Esta aparente contradicción puede explicarse si se toma en cuenta que durante el tratamiento con plasma se produce una mezcla de especies altamente reactivas, generando gran variedad de grupos funcionales. Recientemente, Moraczewski *et al.* [41] publicaron resultados similares al modificar películas de PCL con plasma de oxígeno a una potencia de 35 W durante 3, 10 y 30 min; ellos encontraron que al aumentar el tiempo de exposición al plasma, tanto el ángulo de contacto en agua, como en diiodometano disminuyen.

Tabla 3.5. Valores promedio y su desviación estándar del ángulo de contacto y energía libre superficial de los andamios de PCL sin tratamiento y los tratados con plasma de aire**.**

Tratamiento		**Ángulo de contacto (º)**		**Energía libre superficial (mJ.m $^{-2}$)**		
Potencia (W)	**Tiempo (min.)**	**Agua destilada**	**Diiodo-metano**	γ_s^p	γ_s^d	γ_s
0	**0**	128 ± 6	~ 0	7 ± 2	51 ± 1	58 ± 2
10	**1**	43 ± 2	51 ± 4	25 ± 2*	34 ± 2*	59 ± 1
	3	32 ± 4	36 ± 4	27 ± 1*	42 ± 2*	69 ± 3*
	5	26 ± 5	16 ± 6	26 ± 1*	49 ± 1	75 ± 3*
20	**1**	25 ± 1	60 ± 6	39 ± 2*	29 ± 3*	68 ± 2*
	3	~ 0	36 ± 3	36 ± 1*	42 ± 1*	78 ± 1*
	5	~ 0	28 ± 4	34 ± 1*	45 ± 2*	79 ± 1*
30	**1**	~ 0	33 ± 3	35 ± 1*	43 ± 1*	78 ± 1*
	3	~ 0	21 ± 5	34 ± 1*	46 ± 2*	80 ± 1*
	5	~ 0	11± 7	51 ± 1*	30 ± 1*	81 ± 1*

*Cambios estadísticamente significativos con respecto a los andamios sin tratamiento, en dónde un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo.

La caracterización de las muestras también incluyó la determinación de la energía superficial (γ_s) y sus respectivas componentes polar ($\boldsymbol{\gamma_s^p}$) y dispersiva ($\boldsymbol{\gamma_s^d}$), tanto en las muestras no tratadas con plasma, como en aquellas tratadas con diferentes condiciones; los resultados son presentados en la Tabla 3.5. Como se puede observar, la energía libre

superficial se incrementa con la potencia y el tiempo de tratamiento, lo cual ocurre debido, principalmente, al incremento en el valor de la componente polar.

De este modo, se encontró que el tratamiento con plasma de aire está cambiando las propiedades hidrofóbicas propias de la PCL, de un material no-polar a uno polar, lo cual está directamente relacionado con la generación de grupos de esta naturaleza (polares), en su superficie.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que la modificación con plasma de aire genera principalmente grupos polares, que contienen oxígeno en la superficie de los materiales electrohilados de PCL (monitoreados por EDS y XPS), lo que conduce a un incremento en el grado de humectación y como consecuencia de la energía superficial.

3.2.2.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

El análisis por DSC se realizó para determinar el efecto que tiene el tratamiento con plasma de aire sobre la cristalinidad y la entalpía de fusión (ΔH_m), de los andamios electrohilados de PCL. En la Figura 3.16 se presentan los termogramas correspondientes a la PCL sin modificar y modificada con plasma, a una potencia de 30 W durante 1, 3 y 5 min respectivamente. En la figura se observan picos endotérmicos que corresponden a la fusión de los cristales de la PCL entre 59-61ºC para los diferentes tratamientos. La Tabla 3.6 muestra los valores promedio y su respectivo error experimental (±) de los resultados del porcentaje de cristalinidad, de temperatura de fusión y su entalpía.

Por otro lado, cabe mencionar que el cambio de la cristalinidad X_c de la PCL, producida por el tratamiento con plasma, se monitoreó relacionando el calor de fusión de las muestras entre el calor de fusión de la PCL 100% cristalina (ΔH_m^0=139.5 J/g) [51, 74]. Como se puede observar, los resultados obtenidos son muy similares entre sí (ver Figura 3.17 y Tabla 3.6).

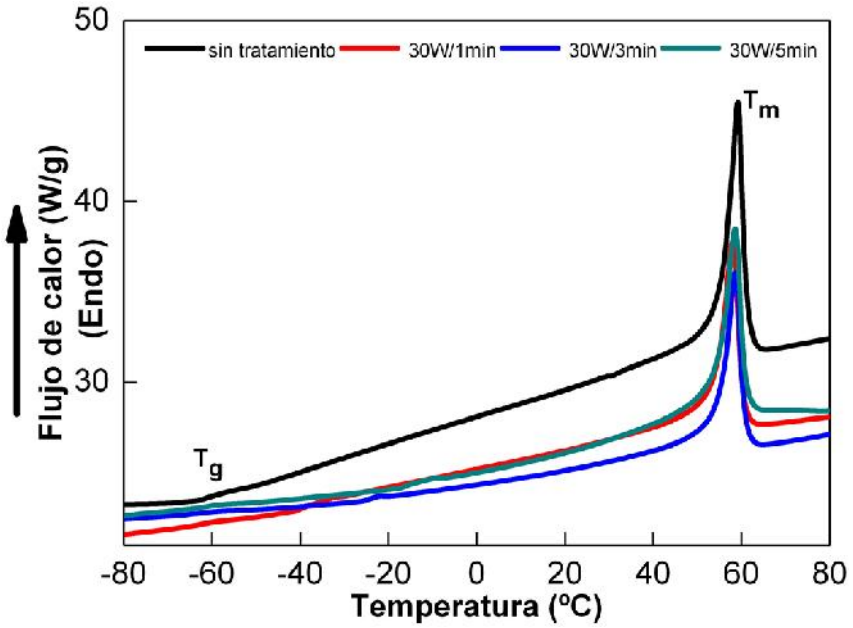


Figura 3.16. Termogramas de los andamios electrohilados de PCL, sin tratamiento y tratados con plasma de aire a 30 W, durante 1, 3 y 5 min.

Tabla 3.6. Datos promedio y su error experimental **(±)** de los análisis por DSC de los andamios de PCL sin tratamiento y tratados con plasma de aire a 30 W, durante 1, 3 y 5 min.

Andamios de PCL	**T_m (ºC)**	**T_c (ºC)**	**ΔH_m(J/g)**	**X_c (%)**
Sin tratamiento	59.17±2.70	33.34±2.12	55.65±4.17	39.83 ± 3.3
30 W/1min	57.90±2.56	36.53±0.79	60.22±4.61	43.17 ± 5.6
30 W/3min	58.50±2.31	36.97±1.48	44.51±3.43	31.91 ± 7.1
30 W/5min	58.51±1.92	35.49±1.09	59.09±3.17	42.35 ± 4.2

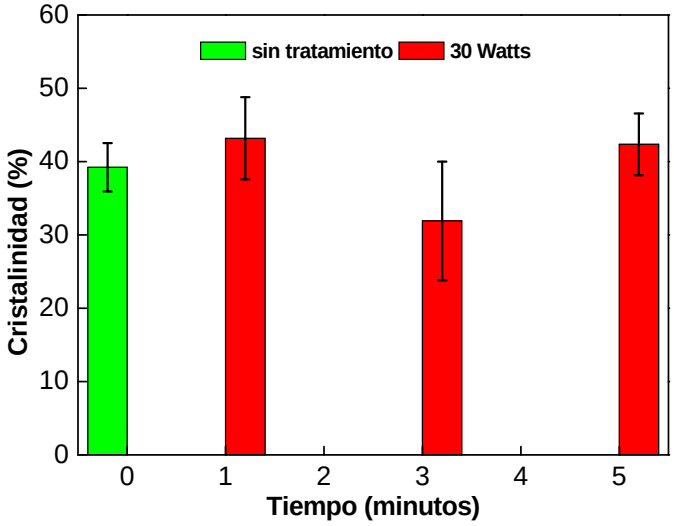


Figura 3.17. Porcentaje de cristalinidad obtenido por DSC, de los andamios electrohilados de PCL, sin modificar y modificados con plasma de aire a 30 W, durante 1, 3 y 5 min.

3.2.2.6. Difracción de rayos-X (XRD).

Los patrones de difracción de rayos X de los andamios de PCL resultantes se muestran en la Figura 3.18. Se pueden apreciar la presencia de dos picos cristalinos, así como la ausencia de picos de difracción de otros compuestos; es decir, los picos de difracción corresponden a la PCL. Por otra parte, los picos son agudos, lo que indica que las muestras son materiales con un considerable porcentaje de cristalinidad. Los porcentajes de cristalinidad obtenidos de los difractogramas para las muestras tratadas a diferentes condiciones se ubicaron entre 43-51%.

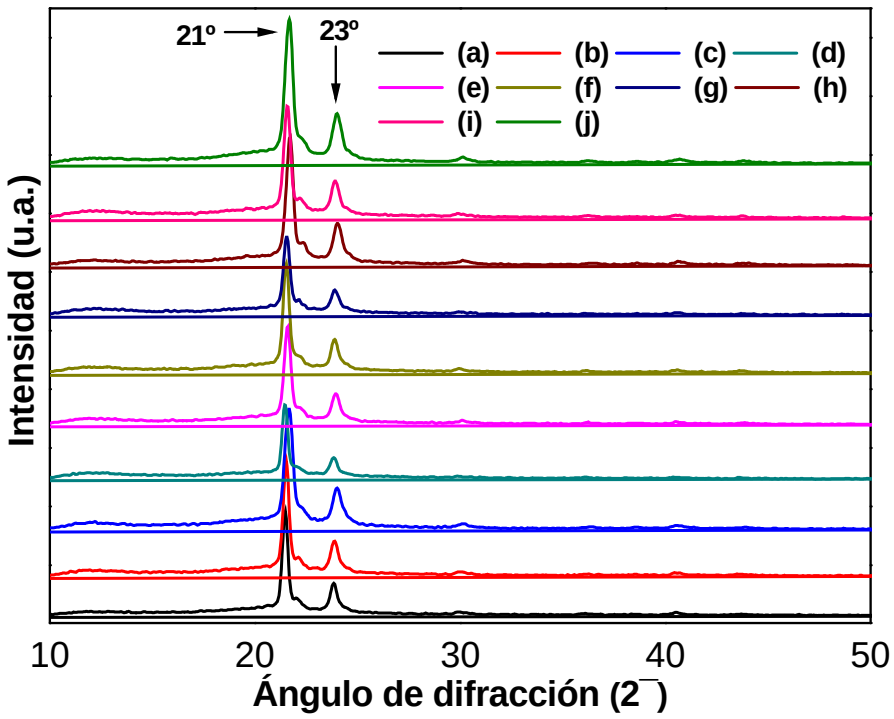


Figura 3.18. Patrones de difracción de los andamios de PCL tratados con plasma. Sin tratamiento (a), 10W/1min (b), 10W/3min (c), 10W/5min (d), 20W/1min (e), 20W/3min (f), 20W/5min (g), 30W/1min (h), 30W/3min (i) y 30W/5min (j).

Los porcentajes de cristalinidad calculados mediante XRD arrojan tendencias similares a los obtenidos por DSC (ver Figura 3.19 y Tabla 3.6), aunque estos últimos son ligeramente menores. Esto pudiera deberse a que este parámetro fue calculado por dos técnicas diferentes.

Debido a que los resultados obtenidos no presentaron grandes cambios, sino que se encontraron en el mismo intervalo, se puede inferir que los tratamientos con plasma de aire, no produjeron cambios en la cristalinidad de los andamios [75]. Por lo tanto, se considera que éste tratamiento solo se llevó a cabo a nivel superficial.

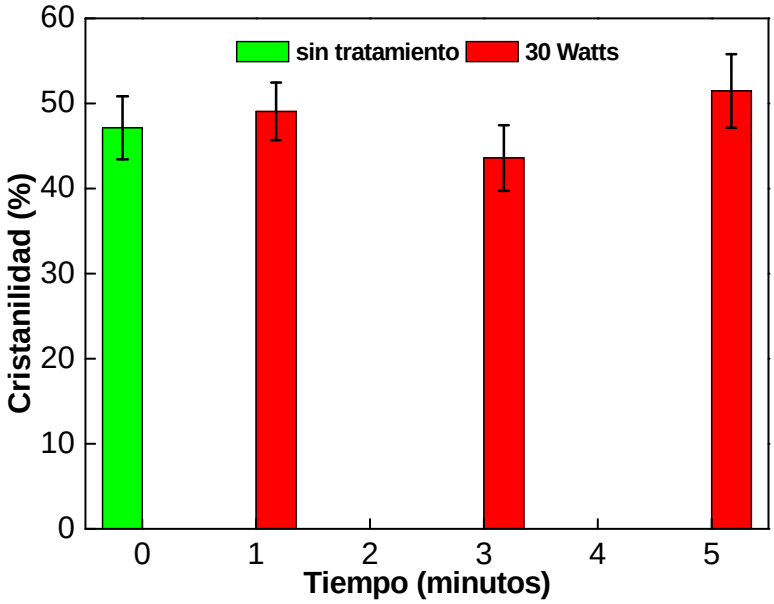


Figura 3.19. Porcentaje de cristalinidad obtenido por XRD, de los andamios electrohilados de PCL, sin modificar y modificados con plasma a 30 W, durante 1, 3 y 5 min.

3.2.3. Caracterización mecánica de los andamios de PCL modificados con plasma

Se evaluaron las propiedades mecánicas de los materiales antes y después de modificarlos con plasma, con diferentes condiciones de potencia (10, 20 y 30 W) y tiempos de exposición (1, 3 y 5 min).

El efecto del tratamiento superficial con plasma de aire sobre las propiedades mecánicas a tensión de los andamios de PCL son presentados en las Figuras 3.20 - 3.22. Como se puede observar, las propiedades presentan un comportamiento variado y complejo cuando el voltaje y el tiempo de exposición son incrementados. Aunque no hay un efecto único del tiempo de exposición, ni de la potencia utilizada durante el tratamiento, se puede evidenciar que el tratamiento generalmente produce disminución de las propiedades mecánicas de los andamios obtenidos, aunque para tiempos largos y potencias altas, las propiedades tienden a recuperarse. Pappa *et al.*, tambien encontraron que estas propiedades se recuperan pasado un tiempo de tratamiento. Ellos realizaron pruebas de nanoindentación y demostraron que

el plasma de oxígeno no disminuyó significativamente las propiedades mecánicas de la PCL, sino por el contrario, el comportamiento nanomecánico de la PCL parece ser más homogéneo después del tratamiento [43].

En las Figuras 3.20 y 3.22 se aprecia un incremento significativo de las propiedades mecánicas (esfuerzo de tensión y módulo de elasticidad), únicamente cuando el andamio es sometido a tratamientos con la mayor potencia (30 W) y, con los tiempos más prolongados (3 y 5 min). Resultados similares obtuvieron Jahani y colaboradores [80], al modificar andamios electrohilados de PCL con plasma de oxígeno a la misma potencia y tiempo (30 W y 3 min). Aunque cabe destacar que a mayor potencia y mayor tiempo de exposición, el material se vuelve rígido.

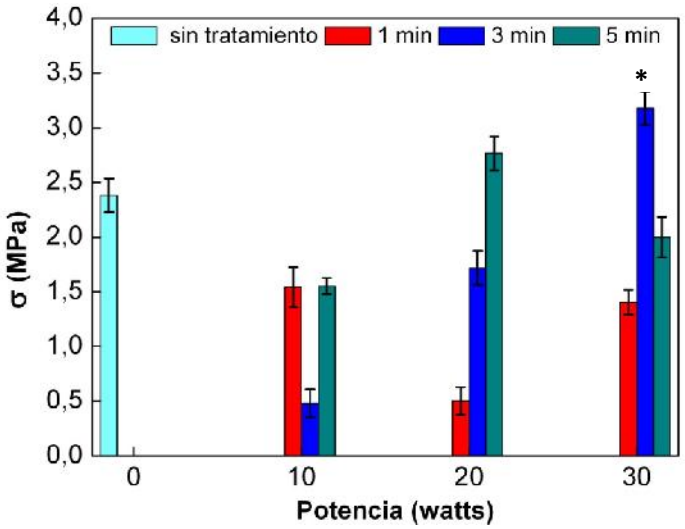


Figura 3.20. Esfuerzo de tensión de los andamios de PCL modificados con plasma de aire a diferentes condiciones de tiempo y potencia.

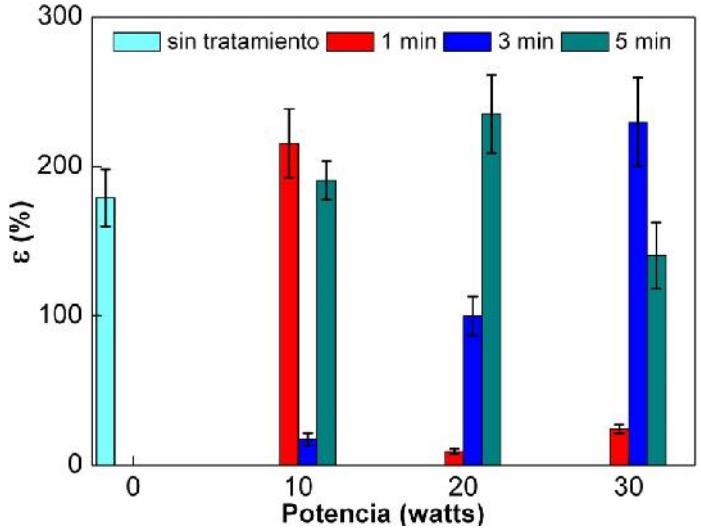


Figura 3.21 Porcentaje de deformación de los andamios de PCL modificados con plasma de aire a diferentes condiciones de tiempo y potencia.

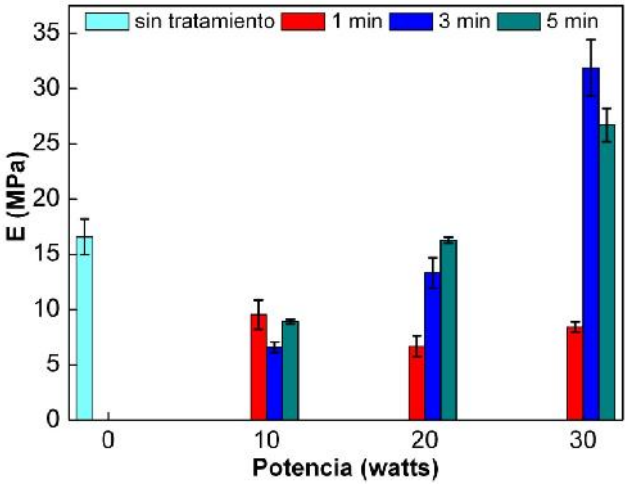


Figura 3.22. Módulo de elasticidad de los andamios de PCL modificados con plasma de aire a diferentes condiciones de tiempo y potencia.

Los resultados que se obtuvieron al analizar estas propiedades mecánicas, reflejan evidentemente que se necesita un estudio más detallado para observar con claridad cual o cuales son los posibles efectos de las variables estudiadas sobre estas propiedades en los andamios.

A pesar de lo anterior, se puede mencionar que los valores obtenidos en este trabajo coinciden con lo reportado por Abbasi *et al.* [75], quienes reportaron valores de 4.26 MPa, 103.2% y 3.16 MPa para el esfuerzo mecánico, porcentaje de deformación y módulo de elasticidad, respectivamente, de los andamios a base de nanofibras de PCL sin modificar. Sin embargo, despues de la modificación con plasma de oxígeno a una potencia de 30 W durante 3 min, los valores cambiaron a 4.02 MPa, 85.83% y 2.9 MPa, respectivamente. Los autores mencionan que los cambios observados fueron estadisticamente significativos únicamente al evaluar el porcentaje de deformación. Resultados similares son reportados por Thomas *et al*. [64].

Finalmente, se sugiere realizar un análisis exhaustivo del efecto que produce el tratamiento de plasma sobre las propiedades mecánicas de los andamios, disminuyendo la velocidad de cabezal (a un valor de 1 mm/min).

3.2.4. Análisis de la concentración de grupos COOH por el método TBO de los andamios de PCL modificados.

El tratamiento con plasma de aire u oxígeno es comúnmente utilizado en el campo biomédico para incrementar el carácter hidrófilo de los polímeros mediante la incorporación de grupos que contienen oxígeno como los hidroxilos y/o carboxilos [32, 34, 56]. A pesar de lo anterior, resulta sumamente complicado controlar el tipo y la cantidad de los grupos polares generados durante el tratamiento debido a que en el interior del reactor se producen una cantidad considerable de especies altamente reactivas durante el proceso de ionización del gas [35, 41].

Por otro lado, en la literatura no se ha determinado con claridad qué grupos, que contienen oxígeno (hidroxilos o carboxilos) generados durante el tratamiento con plasma de aire, influyen de manera más notable en la interacción célula-biomaterial. Martins *et al.* [27] han sugerido que los oxígenos de los grupos COOH son más eficientes en promover esta interacción en comparación con los grupos de ésteres o hidroxilos. Por lo tanto, en este

trabajo se decidió determinar la cantidad de los grupos carboxilos presentes en los andamios electrohilados de PCL, mismos que fueron cuantificados mediante la técnica de TBO. Esta molécula tiene una carga positiva que se puede combinar específicamente con los grupos COOH, por lo que se podría estimar la cantidad generada de estos grupos durante el tratamiento con plasma, asumiendo que éstos reaccionan estequiométricamente en una relación 1:1. [76]. Este método (TBO), ha sido ampliamente reportado como un enfoque complementario para cuantificar la densidad de grupos carboxílicos, presente en la superficie de materiales poliméricos [53-55], por ejemplo en la PCL [32].

La densidad de los grupos COOH fue determinada, tanto a los andamios de PCL modificados, como a los no modificados. Los resultados obtenidos muestran claramente que la concentración de los ácidos carboxílicos (en µmol cm^{-2}) en las muestras de PCL, aumenta al incrementarse la potencia de descarga; excepto para 1 min. Estos incrementos resultaron estadísticamente significativos, cuando los materiales fueron tratados por un tiempo de 5 min, y, a partir del tratamiento a 20 W por 3 min (ver Figura 3.23).

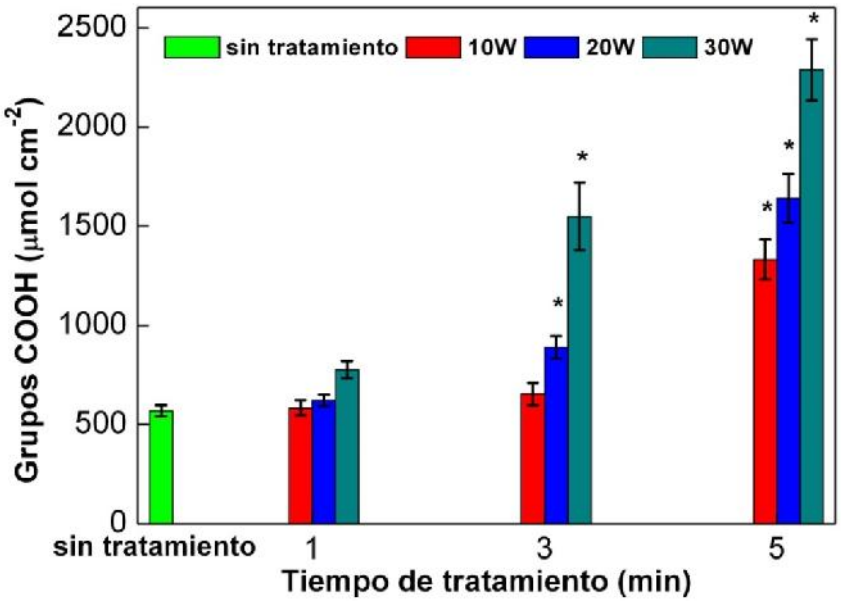


Figura 3.23. Densidad de grupos COOH (µmol cm^{-2}) en la superficie de los andamios de PCL sin tratamiento y de los tratados con plasma de aire**.**

Como se puede apreciar, esta técnica corrobora los resultados obtenidos anteriormente, los cuales señalaban que grupos polares como los COOH eran generados, durante el tratamiento con plasma de aire. Resultados similares reportan Ma *et al.* [32], quienes midieron la concentración de grupos COOH después de la modificación con plasma de aire en andamios electrohilados de PCL, y encontraron que estos grupos aumentan con el tiempo de tratamiento. Además, reportan que un incremento del espesor del material genera mayores cantidades de grupos COOH, ya que éstos también son encontrados en zonas más profundas, como en el caso de un andamio tridimensional.

Interesantemente, la cantidad de grupos carboxílicos obtenidos por TBO, correlacionan bien con la señal obtenida a 530.5 eV del pico O1s del espectro de XPS (ver Figura 3.24). Como se mencionó anteriormente, este pico fue atribuido a los grupos carboxilo, (los cuales también se detectaron por los análisis FTIR a 1708 cm^{-1}). Para el caso de las fibras sin tratamiento, la señal O1s a 530.5 eV presentó un 2.8%, que corresponde aproximadamente a una densidad de grupos COOH de 569.5 µmol cm^{-2}.

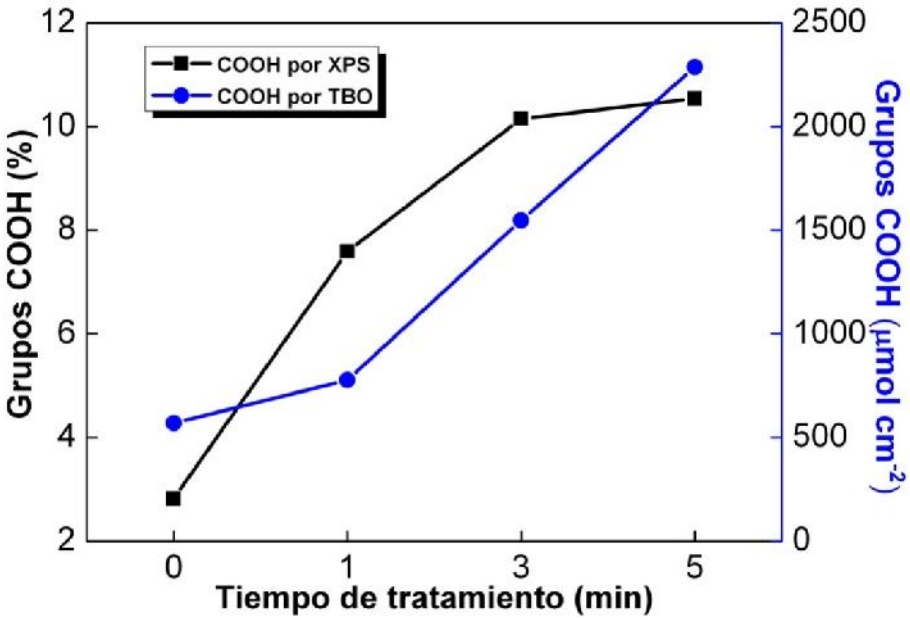


Figura 3.24. Grupos COOH medidos por XPS (en %) y por el método TBO (en µmol cm^{-2}) presentes en los andamios de PCL sin tratamiento y los tratados con plasma de aire**.**

Cuando los andamios electrohilados de PCL, son sometidos al tratamiento de modificación con plasma de aire, se observa que la cantidad de grupos carboxilos se incrementa con el tiempo; y los valores obtenidos por XPS fueron de 7.6, 10.1 y 10.5%, mientras que por TBO se obtuvieron valores de 776, 1,547 y 2,287 µmol cm^{-2} para los tiempos de tratamiento de, 1, 3 y 5 min, respectivamente.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- Se obtuvieron andamios (soportes) electrohilados de policaprolactona, variando parámetros como la velocidad de flujo de salida del polímero y el voltaje aplicado. Los estudios por SEM revelaron que los diámetros de los andamios aumentan conforme aumenta el voltaje, mientras que la velocidad de flujo parece no afectar de manera significativamente el diámetro de las fibras, excepto a bajos voltajes.

- Mediante estudios de isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno, se logró estimar el volumen total de poro y el área superficial, de los diferentes andamios obtenidos por electrohilado. Se encontró que, cuando el diámetro de las fibras es pequeño, el área superficial es grande y el volumen total de poro disminuye, aunque sin que éste llegue a ser significativo.

- De manera general se observa que el tratamiento con plasma de aire modifica las propiedades superficiales de los andamios electrohilados de PCL, cambiando de hidrofóbicas a hidrofílicas. Además, este tratamiento incrementa la energía superficial de los andamios sin afectar sus propiedades morfológicas, las cuáles fueron monitoreadas mediante SEM y AFM. Específicamente se observa que un incremento en la potencia y el tiempo del tratamiento con plasma de aire, generan un aumento en la energía superficial en los andamios y por ende, de las características de humectación de los mismos; esto último está directamente relacionado con un incremento de los grupos funcionales que contienen oxígeno, (grupos polares como hidroxilos y carboxilos) como se observó por EDS y XPS.

- La potencia del tratamiento y el tiempo de descarga no muestran una tendencia definida sobre las propiedades mecánicas de los andamios modificados. Por el

contrario, se observó que a tiempos cortos y potencias bajas, el tratamiento con plasma produce una disminución en las propiedades mecánicas, mientras que a tiempos largos y potencias altas, las propiedades tienden a recuperarse.

- Los análisis por DSC y XRD mostraron que la cristalinidad de los andamios electrohilados de PCL modificados con plasma no experimentan cambios significativos respecto de los materiales que no fueron modificados superficialmente.

- Una interesante correlación fue observada entre el porcentaje de grupos COOH encontrados por XPS y la concentración obtenida mediante el análisis colorimétrico de TBO, ya que ambos aumentan al incrementarse el tiempo de tratamiento.

Recomendaciones

- Se recomienda determinar el peso molecular del polímero, mediante estudios de cromatografía de permeación en gel (GPC), para corroborar que la modificación superficial con plasma de aire, no está produciendo una disminución de la masa molecular en los andamios de PCL, cuando éstos son expuestos a diferentes tiempos y potencias de tratamiento.

- Se sugiere realizar un analisis exhaustivo del efecto que produce el tratamiento de plasma de aire sobre las propiedades mecánicas de los andamios, con una velocidad de cabezal menor (1 mm/min).

- Es deseable realizar pruebas de adhesión y proliferación celular sobre los andamios modificados a las condiciones que mostraron mejores tendencias (a la potencia máxima y los tiempos estudiados). Mediante estos resultados, se podría correlacionar el efecto que tienen los grupos COOH respecto de la adhesión celular.

Referencias bibliográficas

[1] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 1993;260:920-926.

[2] Levenberg S, Langer R. Advances in tissue engineering. Current Topics in Developmental Biology 2004;61:113-134.

[3] Zizumbo F. Obtención y caracterización de andamios en forma de conductos tubulares coaxiales a base de quitosano y poli (ácido láctico) mediante la técnica de electrohilado para su posible uso en la regeneración de nervios periféricos. Tesis de maestría en ciencias, Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC, (CICY). Unidad de materiales. Mérida, Yucatán, México, 2013.

[4] Thieman W.J, Palladino M.A. 2010. Introducción a la biotecnología. Editorial Pearson.

[5] Küçükgöksel K, Cesur S. The investigation of desired product properties of polycaprolactone-hydroxy apatite composites for tissue engineering applications. Usak University Journal of Material Sciences 2014;1:107-119

[6] Hutmacher D. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues state of the art and future perspectives. Journal of Biomaterials Science Polymer 2001;12:107-124.

[7] Liu C, Xia Z, Czemuska JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. Chemical Engineering Research and Design 2007;85:1051-1064.

[8] Zulielfre F. Obtención de andamios en base a poliésteres biodegradables mediante la técnica de prototipado rápido. Tesis de doctorado, Universidad Simón Bolivar, Venezuela 2012.

[9] Duque LM, Rodriguez L, López M. Electrospinning: La era de las Nanofibras. Revista Iberoamerica de Polímeros 2013;14:10-27.

[10] Katiyar N Balasubramaniam K. Nano-heat-sink thin film composite of PC/three-dimensional networked nano-fumed silica with exquisite hydrophobicity. RCS Advanced 2015;5:4376-4384.

[11] Janik H, Maezec M. A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds. Materials Science and Engineering C. 2015;48:586-591

[12] Huinan L. Webster TJ. Chapter 1. Bioinspired nanocomposites for orthopedic applications. Nanotechnology for regeneration of hard and soft tissue. World Publishing Co. Pte. Ltd. 2007.

[13] Haley J, Kabiru P, Geng Y. Effect of clustered peptide binding on DNA condensation. Molecular Biosystem. 2010;6:249-255.

[14] Fedorovich N.E. Organ printing: the future of bone regeneration? Cell Press, Trends in Biotechnology. 2011:29;601-606

[15] http://electrospintech.com/centri-espin.html#.WT8Utus1_IU

[16] Fridrikh SV, Yu JH, Brenner MP. Controlling the fiber diameter during electrospinning. Physics Review Letter 2003;90:1-4.

[17] Demir MM, Yilgor I, Yilgor E, Erman B. Electrospinning of Polyurethane Fibers. Polymer 2002;43:3303-3307.

[18] Doustgani A. Effect of electrospinning process parameters of polycaprolactone and nanohydroxyapatite nanocomposite nanofibers. Textile Research Journal 2015;85:1445-1454.

[19] Rajesh V, Dhirendra S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. International Journal of Nanomedicine 2006;1:15-30

[20] Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW. Basement membrane complexes with biological activity. Biochemistry 1986;25:312-318.

[21] Nandana B, Subhas C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. Biotechnology Advances 2010;28:325-347.

[22] Engelberg I, Kohn J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study. Biomaterials 1991;12:292-304.

[23] Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. Progress in Polymer Science 2007;32:762-798.

[24] Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. Progress in Polymer Science 2010;35:1217-1256.

[25] Ma Z, Mao Z, Gao C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. Colloids and Surface B Biointerfaces 2007;60:137-157.

[26] Khelifa F, Ershov S, Habibi Y, Snyders R, Dubois P. Free-Radical-Induced grafting from plasma polymer surfaces. Chemical Review 2016;116:3975-4005

[27] Martins A, Pinho E, Faria S, Pashkuleva I, Marques A, Reis R, Neves N. Surface modification of electrospun polycaprolactone nanofiber meshes by plasma treatment to enhance biological performance. Small 2009;5:1195-1206.

[28] Selwyn GS, Herrmann, HW, Park J, Henins I. Materials processing using an atmospheric pressure, RF-generated, plasma source. Contributions to Plasma Physics 2001;41:610-619

[29] Sánchez I. Generador de plasma por radiofrecuencia aplicado al tratamiento de superficies. Tesis de maestría, Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica del Instituto Politécnico Nacional (IPN), México, 2008.

[30] López JA. Surface treatment of collagen-based. Biomaterials in medical applications. PhD Thesis, Tomas Bata University in Zlín, Czech Republic, 2012.

[31] Prabhakaran M, Venugopal J, Chan CK, Ramakrishna S. Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. Nanotechnology 2008;19:455102.

[32] Ma Z, He W, Yong T. Grafting of gelatin of electrospun polycaprolactone nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation. Tissue Engineering 2005;11:1149-1158.

[33] Fujihara K, Kotaki M, Ramakrishna S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nanofibers. Biomaterials 2005;26:4139-4147.

[34] Zander N, Orlicki J, Rawlett A, Beebe Jr. Quantification of protein incorporated into electrospun polycaprolactone tissue engineering scaffolds. Applied Materials Interfaces 2012;4:2074-2081.

[35] Arolkar GA, Salgo MJ, Kelkar V, Deshmukh RR. The study of air-plasma treatment on corn starch/poly(e-caprolactone) films. Polymer Degradation and Stability 2015;120:262-272.

[36] Siri S, Wadbua P, Amornkitbamrung V, Kampa N, Maensiri S. Surface modification of electrospun PCL scaffolds by plasma treatment and addition of adhesive protein to promote fibroblast cell adhesion. Materials Science and Technology 2010;26:1292-1297.

[37] Jacobs T, De Geyter N, Morent R, Desmet T, Dubruel P, Leys C. Plasma treatment of polycaprolactone at medium pressure. Surface & Coatings Technology 2011;205:543-547.

[38] Augustine R, Dominic EA, Reju I, Kaimal B, Kalarikkal N, Thomas S. Electrospun poly(ε-caprolactone)-based skin substitutes: in vivo evaluation of wound healing and the mechanism of cell proliferation. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials. 2015;103:1445-1454.

[39] Augustine R, Kalarikkal N, Thomas S. Effect of zinc oxide nanoparticles on the in vitro degradation of electrospun polycaprolactone membranes in simulated body fluid. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials 2016;65:28-37.

[40] Morent R, De Geyter N, Desmet T, Dubruel P, Leys C. Plasma surface modification of biodegradable polymers: a review. Plasma Processes and Polymers. 2011;8:171-190.

[41] Moraczewski K, Stepczynska M, Malinowski R, Rytlewski P, Jagodzinski B, Zenkiewicz M. Stability studies of plasma modification effects of polylactide and polycaprolactone surface layers. Applied Surface Science 2016;377:228-237.

[42] Yildirim E, Pappas D, Selçuk G, Wei S. Enhanced cellular functions on polycaprolactone tissue scaffolds by O_2 plasma surface modification. Plasma Processes and Polymers 2011;8:256-267.

[43] Pappa AM, Karagkiozaki V, Krol S, Kassavetis S, Konstantinou D, Pitsalidis C, Tzounis L, Pliatsikas N Logothetidis S. Oxygen-plasma-modified biomimetic

nanofibrous scaffolds for enhanced compatibility of cardiovascular implants. Beilstein Journal Nanotechnology 2015;6:254-262.

[44] Recek N, Resnik M, Motaln H, Lah-Turnšek T, Augustine R, Kalarikkal N, Thomas S, Mozetic. Cell adhesion on polycaprolactone modified by plasma treatment. International Journal of Polymer Science 2016;7354396:1-9.

[45] Gupta KK, Kundan A, Pradeep K. Polycaprolactone composites with TiO_2 for potential nanomaterilas: tunable properties using different phases. Physic Chemistry- Chemistry Physic 2012;14:12844-12853.

[46] Lopez J, Avila A, Morales J, Cervantes J, Olayo R. Surface modification of quarry stone by hexamethyldisiloxane plasma treatment. Applied Organometalic Chemistry 2007;21:858-861.

[47] Horcas I, Fernandez R, Gomez J, Colchero J, Gomez J, Baro A. A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. Review Science Instrument 2007;78:013705.

[48] Sabbatini L, Maltesta C, De Giglio E, Losito I, Zambonin P. Electrosynthesised thin polymer films: the role of XPS in the design of application oriented innovative materials. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena 1999;100:35-53.

[49] Owens D, Wendt R. Estimation of the surface free energy of polymers. Journal of Applied Polymer Science 1969;13:1741-1747.

[50] Zhenchu R, Chen G, Wei Z, Sang L, Qi M. Hemocompatibility evaluation of polyurethane film with surface-grafted poly(ethylene glycol) and carboxymethyl-chitosan. Journal Applied Polymer Science 2013;127:308-315.

[51] Chiono V, Vozzi G, D´Acunto, Brinzi S, Domenici C, Vozzi F, Ahluwalia A, Barbani N, Giusti P, Ciardelli G. Characterisation of blends between poly(e-caprolactone) and polysaccharides for tissue engineering applications. Material Science and Engineering 2009:7:2174-2187.

[52] Nara S, Komiya T. Studies on the relationship between water-satured state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. Starch/Stärke 1983:35: 407-410.

[53] Ying L, Yin C, Zhuo RX, Leong KW, Mao HQ, Kang ET, Neoh KG. Immobilization of galactose ligands on acrylic acid graft-copolymerized poly(ethyleneterephthalate) film and its application to hepatocyte culture. Biomacromolecules 2003;4:157-165

[54] Gupta B, Hilborn JG, Bisson I, Frey P. Plasma induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films. Journal Applied Polymers Science 2001;81:2993-3001.

[55] Uchida E, Uyama Y, Ikada Y. Sorption of low-molecular-weight anions into thin polycation layers grafted onto a film. Langmuir 1993;9:1121-1124.

[56] Cipitria A, Skelton A, Dargaville TR Hutmacher DW. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds - a review. Journal Materials Chemistry 2011;21:9419.

[57] Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. Journal Electrostatics 1995;35:151-160.

[58] Pore size distribution and porosity of solid materials by mercury porosimetry and gas adsorption. Part 3: Analysis of micropores by gas adsorption. ISO-15901-3:2007.

[59] Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan NC. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. Polymer 2001;42:261-272.

[60] Sun T, Norton D, Ryan AJ, MacNeil S, Haycock JW. Investigation of fibroblast and keratinocyte cell-scaffold interactions using a novel 3D cell culture system. Journal Materials Science. Materials Medical 2007;18:321-328.

[61] Xie J, MacEwa MR, Schwartz AG, Xia Y. Electrospun nanofibers for neural tissue engineering. Nanoscale 2010;2:35-44.

[62] Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospun poly(e-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. Biomacromolecules 2006;7:2796-2805.

[63] Cao H, Liu T, Chew SY. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. Advance Drug Delivery Reviews 2009;61:1055-1064.

[64] Thomas V, Moncy V, Chowdhury S, Sullivan JF, Dean DR, Vohra YK. Mechano-morphological studies of aligned nanofibrous scaffolds of polycaprolactone fabricated by electrospinning. Journal of Biomaterials Science 2006;9:969-984.

[65] Pai CL, Boyce MC, Rutledge GC. Morphology of porous and wrinkled fibers of polystyrene electrospun from dimethylformamide. Macromolecules 2009;42:2102-2114.

[66] Chan CM, Ko TM, Hiraoka H. Polymer surface modification by plasmas and photons. Surface Science Reports 1996;24:3-54.

[67] Elzein T, Nasser M, Delaite C, Bistac S, Dumas P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. Journal Colloid Interface Science 2004;273:381-387.

[68] Wu CS. In Situ polymerization of titanium isopropoxide in polycaprolactone: properties and characterization of the hybrid nanocomposites. Journal Applied Polymer Science 2004;92:1749-1757.

[69] Verma D, Katti K, Katti D. Experimental investigation of interfaces in hydroxyapatite/polyacrylic acid/polycaprolactone composites using photoacoustic FTIR spectroscopy. Journal Biomedical Materials Research A 2006;77:59-66.

[70] Sodhi RNS. Application of surface analytical and modification techniques to biomaterial research. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena 1996;81:269-284.

[71] Gupta B, Plummer C, Bisson I, Frey P, Hilborn J. Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films: characterization and human smooth muscle cell growth on grafted films. Biomaterials 2002;23:863-871.

[72] Slepička P, Slepicková NS, Stránská E, Bačáková L, Švorčík V. Surface characterization of plasma treated polymers for applications as biocompatible carriers. Express Polymer Letter 2013;7:535-545.

[73] Jordá-vilaplana A, Fombuena V, García D, Samper MD, Sánchez L. Surface modification of polylactic acid (PLA) by air atmospheric plasma treatment. European Polymer Journal 2014;58:23-33.

[74] Crescenzi V, Manzini G, Calzolari G, Borri C. Thermodynamics of fusión of poly-β-propionate and poly-ε-caprolactone. Comparative analysis of the melting of aliphatic polylactone and polyester chains. European Polymer Journal 1972;8:449-463.

[75] Abbasi N, Soudi S, Hayati-Roodbari N, Dodel M, Soleimani M. The effects of plasma treated electrospun nanofibrous poly(e-caprolactone) scaffolds with different orientations on mouse embryonic stem cell proliferation. Cellular Journal 2014;16:245-254.

[76] Friedbacher G, Bubert H. Surface and thin film analysis: A compendium of principles, instrumentation and applications, Second edition. Ed.; Wiley VCH Verlag, GmbH & Co. KGaA, 2011.

[77] Morent R, De Geyter N, Leys C, Gengembreb L, Payen E. Comparison between XPS- and FTIR-analysis of plasma-treated polypropylene film surfaces. Surface Interface Analysis 2008;40:597-600.

[78] España BL, Rodríguez JA, González P, Neira MG, Franco B, Anaya F, Mendoza CL, Ávila CA, Padilla F. Nanocompuestos de polipropileno con nanopartículas de cobre: preparación, activación superficial por plasma y actividad antibacteriana. Acta Universitaria 2014;24:13-24.

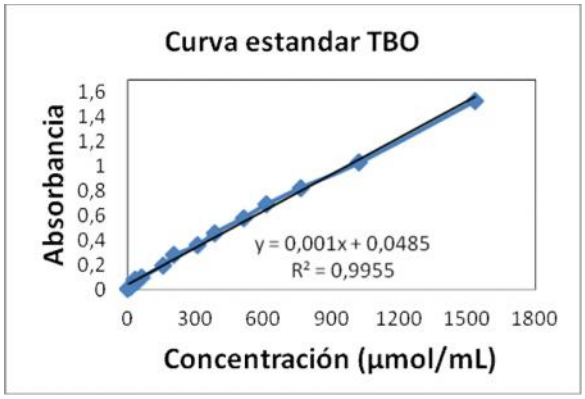
[79] Yatsimirskii KB, Nemoshalenko VV, Aleshin VG, Bratushko YI, Moiseenko EP. Chemistry Physics Letter 1977;52:481.

[80] Jahani H, Kaviani S, Hassanpour-Ezatti M, Soleimani M, Kaviani Z, Zonoubi Z. The effect of aligned and random electrospun fibrous scaffolds on rat mesenchymal stem cell proliferation. Cell Journal 2012;14:31-38.

Anexos

ANEXO 1

Procedimiento utilizado para la cuantificación de la concentración de grupos COOH en los andamios de PCL utilizando el método de TBO.



(a) preparación de las soluciones, b) incorporación de los andamios en la solución de TBO, c) agitación durante 20 horas, d) lavados con NaOH y ácido acético respectivamente, e) agitación en el vortex, y f) lectura en el espectrofotómetro UV-Vis. También se muestra la curva estándar del análisis de TBO a concentraciones conocidas.

ANEXO 2

Diámetros de las fibras de PCL obtenidas por electrohilado a diferentes condiciones (se mantuvo una corriente fija de 1 Ampere).

Voltaje (kV)	**Velocidad de Flujo (mL/h)**	**Diámetro (µm)**	**Desviación estándar**	**Moda de la distribución (mayor frecuencia) (µm)**
10	0.5	1.07	± 0.33	0.80
	1.0	0.64	±0.32	0.55
	1.5	0.77	±0.30	0.72
15	0.5	1.09	±0.20	0.93
	1.0	0.67	±0.13	0.52
	1.5	1.07	±0.20	1.13
20	0.5	1.09	±0.19	1.15
	1.0	0.93	±0.23	0.77
	1.5	1.32	±0.30	1.41
25	0.5	1.23	±0.16	1.29
	1.0	1.05	±0.25	1.12
	1.5	1.38	±0.43	0.93