



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE QUERÉTARO

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS PLA-QUITOSANO-QUERATINA: ELECTROHILADO E IMPRESIÓN 3D

TESIS

Que para obtener el Grado de:
MAESTRA EN INGENIERÍA

presenta

I.Q. LAURA EDITH ROJAS MARTÍNEZ

Dirigida por:

Dra. Ana Laura Martínez Hernández

Dra. Luz María López Marín

Dra. Cynthia Graciela Flores Hernández

OCTUBRE 2019





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Querétaro
División de Posgrado e Investigación

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Querétaro, Qro., **09 de Octubre del 2019**
DIV. DE EST. POSG. E INV.
DEPI-221/2019

ROJAS MARTINEZ LAURA EDITH
ESTUDIANTE
MAESTRÍA EN INGENIERÍA
PRESENTE

De acuerdo con el Reglamento para Exámenes Profesionales de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica, se le autoriza la impresión de la Tesis, para obtener el Grado de MAESTRIA EN INGENIERÍA, titulada:

"SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS PLA-QUITOSANO-QUERATINA: ELECTROHILADO E IMPRESIÓN 3D"

Para el correspondiente Examen de Grado.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica
"la tierra será como sean los hombres"

MA. DEL CONSUELO ALCÁNTARA TÉLLEZ
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



SEP

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE QUERÉTARO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.C.P. Archivo
MCAT/mrr*



Av. Tecnológico s/n esq. Mariano Escobedo, Col. Centro, C.P. 76000, Querétaro, Qro., México
Plantel Centro tel. 01(442) 2274400, Ext. 4421 e-mail: depin@mail.itq.edu.mx
Plantel Norte tel. 01(442) 2435554
www.tecnm.mx / www.itq.edu.mx



Reg. No. 2019-01

Santiago de Querétaro, Qro. a 16 de octubre de 2019.

El que suscribe, egresado de la MAESTRÍA en INGENIERIA; de manera libre y voluntaria autorizo al Centro de Información del Instituto Tecnológico de Querétaro a difundir la obra de mi autoría con el Título del trabajo SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS PLA-QUITOSANO-QUERATINA: ELECTROHILADO E IMPRESIÓN 3D. Para fines académicos, científicos y tecnológicos, mediante formato CD-ROM o digital, desde Internet, Intranet y en general cualquier formato conocido o por conocer.

Dicha obra estará disponible al estudiantado de esta Institución a partir del 18 de octubre de 2019, fecha en la cual se puede difundir la obra.

Postulante: Laura Edith Rojas Martínez

No. de Control: M17142647

Correo electrónico: lauura169@gmail.com

Título de la obra: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS PLA-QUITOSANO-QUERATINA: ELECTROHILADO E IMPRESIÓN 3D

Área del conocimiento: Materiales compuestos y Nanotecnología

Palabras clave de la obra: Polímeros, andamios polimericos, electrospinning, Impresión 3D, queratina, quitosano, PLA.



Laura Edith Rojas Martínez



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Querétaro

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN DE POSGRADO

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE TESIS

Santiago de Querétaro, Qro. a 27 de Junio de 2019

Ma. Del Consuelo Alcantara Téllez
Jefa de la División de Estudios de Posgrado e Investigación
Instituto Tecnológico de Querétaro
PRESENTE

Nos permitimos hacer de su conocimiento, que después de haber procedido a la revisión y evaluación rigurosa y detallada de la Tesis del (de la) C.

ING. Laura Edith Rojas Martínez

Cuyo título es: Síntesis y caracterización de andamios poliméricos
PLA-Quitosano-Queratina: Electrohilado e Impresión 3D

Este jurado considera Aprobada dicha Tesis y se le notifica que el tesista puede continuar con los trámites correspondientes para obtener el Grado de Maestría.

Sin más por el momento, nos despedimos de usted.

Atentamente,

Comité Tutorial

Dra. Ana Laura Martínez Hernández DIRECTOR(A) Dra. Luz María López Marín CODIRECTOR(A)

Dra. Cynthia Gisela Flores Hernández ASESOR(A)

c. c. p. Presidente comité tutorial
Expediente del alumno
alumno



Av. Tecnológico s/n esq. Mariano Escobedo, Col. Centro, C.P. 76000, Querétaro, Qro., México
Campus Centro Tel. 01(442) 2274400 Fax: 01(442)2169931
Campus Norte 01(442) 2435554
www.itq.edu.mx



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
NOMENCLATURA.....	X
AGRADECIMIENTOS.....	XII
ABSTRACT.....	XVI
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 2. MARCO TEORICO.....	4
2.1 POLÍMEROS	4
2.1.1 POLÍMEROS NATURALES	5
2.1.2 ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA)	6
2.1.3 QUITOSANO.....	8
2.1.4 QUERATINA	9
• <i>Queratina de pluma de pollo</i>	11
• <i>Queratina de cabello</i>	11
2.2 INGENIERÍA DE TEJIDOS	13
2.2.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS ÓSEOS	13
2.2.2 ANDAMIOS.....	14
2.2.3 TÉCNICAS PARA LA FABRICACIÓN DE ANDAMIOS.....	15
2.2.3.1 <i>Electrohilado</i>	15
2.2.3.2 <i>Impresión 3D</i>	16
2.3 ANTECEDENTES.....	18
CAPITULO 3. METODOLOGÍA	22
3.1 MATERIALES Y EQUIPO.....	22
3.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	22
3.2.1 <i>Preparación de los materiales iniciales</i>	22
3.2.2 <i>Impresión 3D</i>	23
<i>Extrusión de los materiales</i>	23
<i>Diseño para la impresión 3D de andamios</i>	24
<i>Parámetros de impresión</i>	25
3.2.3 <i>Electrohilado</i>	25
<i>Preparación de sal de queratina</i>	25

<i>Preparación de la solución de quitosano</i>	25
<i>Preparación de la solución de PLA</i>	25
<i>Serie de experimentos del electrohilado</i>	25
<i>Parámetros de electrohilado</i>	26
3.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	27
3.3.1 <i>Microscopia electrónica de barrido (SEM)</i>	27
3.3.2 <i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</i>	28
3.3.3 <i>Análisis dinámico mecánico (DMA)</i>	29
3.3.4 <i>Raman</i>	31
3.3.5 <i>Biocompatibilidad</i>	31
<i>Cultivo celular</i>	31
<i>Ensayo del MTT</i>	31
<i>Microscopía Confocal</i>	32
CAPITULO 4. RESULTADOS	34
4.1 MATERIALES DE INICIO	34
4.1.1 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	34
4.1.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	35
4.1.3 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA).....	37
4.2 IMPRESIONES 3D	38
4.2.1 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	40
4.2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	43
4.2.3 RAMAN.....	46
4.2.4 ANÁLISIS DINÁMICO MECÁNICO (DMA).....	47
4.2.5 PRUEBAS DE BIOCMPATIBILIDAD	51
4.3 ELECTROHILADO.....	54
4.3.1 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	54
4.3.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	56
4.3.3 RAMAN.....	58
4.3.4 ANÁLISIS DINÁMICO MECÁNICO (DMA).....	60
4.3.5 PRUEBAS DE BIOCMPATIBILIDAD	62
CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Título	Pág.
1	Estructura química del quitosano (adaptada de José Carlos Viana Ribeiro, et al., 2017).	8
2	Estructura de la pluma de pollo (adaptada de Yussef Esparza, et al., 2017).	11
3	Estructura de una fibra de cabello humano (adaptada de Bin Wang, et al., 2016).	12
4	Proceso de electrohilado (adaptada de Vahid Mottaghitlab y Mona Farjad., 2013).	16
5	Proceso de impresión 3D por FDM (adaptada de Bojan Banjanin, et al., 2018).	17
6	Esquema de experimentos para la impresión 3D de PLA, quitosano y queratina.	23
7	Esquema de experimentos para la impresión 3D de la mezcla de PLA-Quitosano-Queratina.	24
8	Diseño de los andamios a realizar, diseño elaborado en Tinkercad.	24
9	Esquema de experimentos para el electrohilado de PLA, quitosano y queratina.	26
10	Esquema de experimentos para el electrohilado de la mezcla de PLA-quitosano-queratina.	26
11	Diagrama del funcionamiento de un equipo SEM (adaptada de Fu-Yun Zhu, et. al, 2014).	27
12	Diagrama del funcionamiento de un equipo FTIR (adaptada de Magda Marcela Torres-Luque, 2010).	29
13	Diagrama del funcionamiento de un equipo DMA.	30
14	Estructura de MTT y formazan (adaptada de Sittampalam GS, et. al., 2004).	32
15	Diagrama del funcionamiento de un microscopio confocal (adaptada de Allaire, A., et. al., 2015).	33
16	Espectros obtenidos por FTIR materiales iniciales.	34
17	Imágenes e histogramas SEM materiales iniciales.	36
18	TGA y dTGA materiales iniciales.	37
19	Muestras impresas usando fibras como refuerzo a diferentes concentraciones.	38
20	Muestras impresas usando partículas como refuerzo a diferentes concentraciones.	39
21	Espectros de FTIR de materiales impresos con refuerzo en forma de fibra.	40
22	Espectros de FTIR de materiales impresos con refuerzo en forma de partícula.	41
23	Espectros de FTIR de materiales impresos PLA-Quitosano-Queratina.	42
24	Imágenes SEM de materiales impresos en 3D de materiales hechos con fibra como refuerzo, fotos tomadas transversalmente.	43
25	Imágenes SEM de materiales impresos en 3D de materiales hechos con partículas como refuerzo, fotos tomadas transversalmente.	44

26	Imágenes SEM de materiales impresos en 3D de materiales hechos con partículas como refuerzo mezcla PLA-Quitosano-Queratina, fotos tomadas transversalmente.	45
27	Espectros de Raman de materiales impresos con refuerzo en forma de fibra.	46
28	Resultados de la DMA de materiales impresos en 3D con fibra como refuerzo.	47
29	Resultados de la DMA de materiales impresos en 3D con partículas como refuerzo.	48
30	Resultados de la DMA de materiales impresos en 3D con partículas como refuerzo PLA-Quitosano-Queratina.	49
31	Ensayo de MTT a) Impresiones 3D hechas con fibra como refuerzo y b) impresiones 3D hechas con partículas como refuerzo.	51
32	Imágenes del microscopio confocal de los materiales impresos con refuerzo en forma de fibra.	52
33	Imágenes del microscopio confocal de los materiales impresos con refuerzo en forma de partícula.	53
34	Muestras de electrohilado de PLA.	54
35	Espectros de FTIR de materiales electrohilados.	54
36	Imágenes SEM de materiales electrohilados.	56
37	Análisis estadístico del tamaño de fibras obtenidas por electrohilado.	57
38	Espectros de Raman de materiales electrohilados.	58
39	Resultados de la DMA de materiales electrohilados.	60
40	Resultados de la DMA de materiales electrohilados mezcla de materiales PLA-Quitosano-Queratina.	61
41	Ensayo de MTT para los materiales hechos a partir de electrohilado.	62
42	Imágenes del microscopio confocal de los materiales electrohilados.	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Pág.
1	Propiedades del PLA (adaptada de Shady Farah, Daniel G. Anderson y Robert Langer, 2016).	7
2	Ejemplos de α y β queratina (adaptada de Bin Wang, et al., 2016).	10
3	Tabla de antecedentes.	20
4	Grupos funcionales y longitudes de onda aproximadas de los materiales impresos fibras.	40
5	Grupos funcionales y longitudes de onda aproximadas de los materiales impresos con partículas.	41
6	Grupos funcionales y longitudes de onda aproximadas de los materiales impresos PLA-Quitano-Queratina.	42
7	Grupos funcionales y longitudes de onda aproximadas de los materiales electrohilados	53

NOMENCLATURA

Abreviatura	Descripción	Unidades
C	Carbono (Elemento químico)	
cm	Unidad de longitud	Centímetros
CO	Monóxido de carbono	
CO ₂	Dióxido de carbono	
CH ₂	Grupo funcional alcanos	
DMA	Análisis dinámico mecánico (Por sus siglas en ingles)	
FTIR	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (Por sus siglas en ingles)	
g	Unidad de peso	Gramos
H	Hidrogeno (Elemento químico)	
H	Unidad de tiempo	Horas
Hz	Unidad de frecuencia	Hertz
IR	Espectroscopia infrarroja	
kV	Medida de potencial eléctrico	Kilo volts
M	Medida de la concentración de un soluto en una disolución	Molar
mAmps	Unidad de intensidad de la corriente eléctrica	Microamperes
mL.	Unidad de volumen	Mililitros
mm.	Unidad de longitud	Milímetros
mM	Medida de la concentración de un soluto en una disolución	Micromolar
MPa	Unidad de presión	Megapascales
N	Nitrógeno (Elemento químico)	
NH ₂	Grupo funcional amino	
nm	Unidad de longitud equivalente a la millonésima parte del metro	Nanómetro
O	Oxigeno (Elemento químico)	
°C.	Unidad de temperatura	Grados Celsius
PC	Policarbonato	
PE	Polietileno	

PHA	Polihidroxicanoatos	
PI	Ioduro de Propilio.	
PLA	Ácido poliláctico	
pm	Unidad de longitud	Picómetro
PP	Polipropileno	
PVC	Policloruro de vinilo	
SEM	Microscopia electrónica de barrido (Por sus siglas en ingles)	
Tf	Temperatura de fusión.	Grados Celsius
Tg	Temperatura de transición vítrea	Grados Celsius
torr	Unidad de presión	
w:w	Porcentaje peso – peso	

Símbolo griego	Descripción	Unidades
α	Clasificación de la queratina	
β	Clasificación de la queratina	
δ	Deformación	
λ	Longitud de onda	cm^{-1}
μm	Unidad de longitud	Micrómetros
μml	Unidad de volumen	Microlitros
ν	Estiramiento simétrico/asimétrico	

AGRADECIMIENTOS

A mis abuelos y a mi madre por el sacrificio y apoyo incondicional que me brindaron para lograr mis objetivos y alcanzar mi triunfo profesional. A toda mi familia por brindarme siempre su compañía.

Quiero agradecer al Dr. Carlos Velasco Santos y a la Dra. Ana Laura Martínez Hernández por haberme dado la oportunidad de trabajar y aprender tantas cosas con su grupo de investigación, además de su apoyo y tutoría en la realización de esta tesis.

A la Dra. Luz María López Marín por haberme aceptado en su equipo de investigación, guiarme y apoyarme con las pruebas de biocompatibilidad en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada – UNAM campus Juriquilla.

Quiero también expresar mi agradecimiento a la Dra. Cynthia G. Flores Hernández por la asesoría, tiempo, guía y consejos brindados durante el desarrollo de esta investigación, además de los análisis de espectroscopia FTIR dentro del laboratorio de Materiales Avanzados y Nanotecnología del ITQ.

También agradezco la ayuda y orientación del Dr. Antonio Esaú del Río Castillo por darme la oportunidad de quedarme en el extranjero, de asesorarme en mi proyecto de tesis, así como de proporcionarme el equipo necesario para el desarrollo de mi proyecto.

A Daniel por su compañía, comprensión y apoyo incondicional y total, además de impulsarme a terminar mis proyectos de vida.

Un agradecimiento especial al Dr. Sanjay Thorat por guiarme en el uso apropiado del equipo dentro del laboratorio “Graphene Labs”, ayudándome en el desarrollo de mis materiales y siempre asistiéndome después de la hora de la comida.

Al Dr. Vittorio Pellegrini y al Dr. Francesco Bonaccorso por aceptarme en el Istituto Italiano di Tecnologia y en el grupo de trabajo de Graphene Labs para terminar mi tesis de maestría con excelentes resultados.

También agradezco a Elisa Mantero y Luigi Marasco por aceptarme en el laboratorio de Graphene Labs y siempre proporcionarme el equipo y los reactivos necesarios para completar mi tesis de maestría, además de darme los entrenamientos necesarios para completar mi estancia en el laboratorio.

De igual manera quiero agradecer a la Dra. Marina Vega del Centro de Geociencias – UNAM campus Juriquilla por su apoyo en la Microscopia Electrónica de Barrido, a la Dra. Elsa Nydia Hernández Ríos del Centro de Neurobiología – UNAM campus Juriquilla por su asistencia en Microscopia Confocal y al Dr. Armando Almendarez Camarillo por su apoyo en la caracterización de Análisis Dinámico Mecánico del Instituto Tecnológico de Ciudad Madero.

A todos los técnicos y doctores que me ayudaron en cada una de las caracterizaciones realizadas durante mi estancia en el Istituto Italiano di Tecnologia, Luca Ceseracciu, Giammarino Pugliese, Silvia Gentiluomo, Paraskevi Papadopoulou, Muhammad Zahid y Simone Laucielo, gracias a todos.

Finalmente quiero agradecer a la MATCORED y CONACyT por las becas otorgadas para la realización de esta tesis.

RESUMEN

La investigación intensiva se centra en encontrar nuevas alternativas que puedan sustituir a los compuestos derivados del petróleo con compuestos de impacto ambiental reducido (F.P. La Mantia y M. Morreale, 2011). Muchos estudios se centran en el uso de materiales de la naturaleza, por ejemplo, el ácido poliláctico (PLA), que es un poliéster derivado del ácido láctico, que ha sido el principal polímero biodegradable utilizado en la investigación biomédica para la ingeniería de tejidos (Arijit Basu, Robert Langer y Abraham J. Domb, 2016).

La ingeniería tisular es un campo multidisciplinar que desarrolla materiales funcionales biocompatibles para preservar, restaurar o mejorar la funcionalidad de huesos, tejidos y órganos. Sin embargo, el mayor problema es generar andamiajes que no causen rechazo inmunológico (Tania Limongi, et al., 2017), sean porosos, tridimensionales y puedan crear condiciones para que proliferen las células (Z.G. Chen, et al., 2010).

El objetivo de este proyecto fue realizar andamios mediante dos técnicas de fabricación, la impresión 3D y el electrohilado, utilizando PLA, quitosano y queratina para su elaboración, además estos materiales fueron caracterizados utilizando FTIR, Raman, pruebas de biocompatibilidad, DMA y SEM. Los resultados obtenidos muestran que estos materiales si pueden tener oportunidad en el área biomédica ya que, tanto los materiales electrohilados como los impresos, tienen una buena interacción por fuerzas electroestáticas con las células.

Los resultados de DMA muestran en los materiales impresos y electrohilados que añadir quitosano o queratina mejora la rigidez del material y aumenta su estabilidad térmica. Por otro lado, los resultados de SEM de los materiales electrohilados muestran como añadir quitosano o queratina a la mezcla de PLA, se logra disminuir entre un 80% y 86% el diámetro de las fibras del PLA blanco.

Dentro de los resultados de SEM para los materiales impresos nos muestran que los materiales que tienen un tamaño de refuerzo menor (quitosano o queratina) tienen una mejor dispersión en la matriz de PLA y menores aglomeraciones en las concentraciones mínimas.

Por otro lado, dentro de los resultados de las pruebas de biocompatibilidad para el caso de los materiales electrohilados, muestran que no existe una gran diferencia entre el PLA blanco y las mezclas que contienen quitosano o queratina. En cambio, los materiales impresos, muestran en las pruebas de biocompatibilidad un incremento de entre 81% y 87% al añadir el quitosano y la queratina a la matriz de PLA.

Con base en los resultados de DMA, SEM y biocompatibilidad de los materiales electrohilados, a pesar que estos materiales no tuvieron un incremento considerable en el crecimiento celular, el añadir quitosano y queratina a la mezcla de PLA logra incrementar la estabilidad térmica y su rigidez, además de disminuir el diámetro de las fibras de los materiales electrohilados, lo cual es bastante benéfico dentro del área biomédica. Estos mismos análisis pero para los materiales impresos, nos muestran que un tamaño de refuerzo en forma de partícula genera buenos resultados, ya que se logra una mayor dispersión del quitosano y la queratina dentro de la matriz de PLA, lo cual genera un aumento en la rigidez de los materiales impresos y a su vez, que exista una mayor área de contacto con las células provocando un mayor crecimiento celular que el PLA blanco.

ABSTRACT

Intensive research is focused on finding new alternatives that can replace petroleum-derived compounds with reduced-environmental impact compounds (F.P. La Mantia y M. Morreale, 2011). Several studies have been developed on using materials from nature, for example, polylactic acid (PLA), which is a polyester derived from lactic acid, that has been the main biodegradable polymer used in biomedical research for tissue engineering (Arijit Basu, Robert Langer y Abraham J. Domb, 2016).

Tissue engineering is a multidisciplinary field that develops functional biocompatible materials to preserve, restore or improve the functionality of bones, tissues and organs. However, the major problem is to generate porous scaffolds that do not cause immune rejection (Tania Limongi, et al., 2017), three-dimensional and also can create conditions for cells to proliferate (Z.G. Chen, et al., 2010).

The objective of this project was to develop scaffolds by two manufacturing techniques: 3D printing and electrospinning, using PLA, chitosan and keratin for their preparation. The materials obtained were characterized using FTIR, Raman, biocompatibility tests, DMA and SEM. The results obtained show that these materials can have an opportunity in the biomedical area since both electrospinning and printed materials have a good interaction by electrostatic forces with the cells. The DMA results show in printed and electrospinning materials that adding chitosan or keratin improves the stiffness of the material and increases its thermal stability.

DMA results show that the incorporation of chitosan or keratin into the printed and electrospinning materials improves the stiffness and increases their thermal stability. On the other hand, the electrospinning SEM results show diameter reduction of PLA mixtures in comparison with PLA fibers by 80% to 86%.

SEM results for printed materials show that materials with a smaller reinforcement size (chitosan or keratin) get a best dispersion in the PLA matrix and a lower agglomeration in the minimum concentrations.

On the other hand, the results of the biocompatibility tests for the electrospinning materials, show that there is not a big difference between PLA and PLA mixtures containing chitosan or keratin. In contrast, printed materials show an increase (in comparison of PLA) from 81% up to 87% in the biocompatibility test when chitosan and keratin are added into the PLA matrix.

Based on DMA results, SEM and biocompatibility tests, in spite of electrospinning materials, do not have a considerable increase in cell growth, the addition of chitosan and keratin to the PLA for mixture, increase the thermal stability and stiffness, in addition, diameter decreasing of the electrospinning fibers is quite beneficial within the biomedical area. These same analyses but for the printed materials, show that the reinforcement size in the form of a particle generates significant results, since a greater dispersion of chitosan and keratin within the PLA matrix is achieved, which generates an increase in the rigidity of the printed materials and a greater area of contact with the cells producing a greater cell growth than the pristine PLA.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.

Los plásticos son uno de los materiales más importantes que sostienen tanto a la sociedad como nuestro modo de vida actual, por desgracia, estos generan problemas ambientales sustanciales, ya que están hechos principalmente de materias primas no renovables (K. Pivnenko, et al., 2016). Cada vez hay más investigaciones enfocadas a encontrar nuevas alternativas que puedan sustituir los compuestos derivados del petróleo por compuestos de menor impacto ambiental (F.P. La Mantia y M. Morreale, 2011).

Existen estudios que se enfocan en utilizar materiales provenientes de la naturaleza, como lo es el ácido poliláctico (PLA), el cual es un poliéster derivado del ácido láctico que ha sido el principal polímero biodegradable utilizado en la investigación biomédica como la ingeniería de tejidos (Arijit Basu, Robert Langer y Abraham J. Domb, 2016).

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinaria que emplea nociones de ciencia de los materiales, ingeniería, medicina y biología tratando de desarrollar soluciones biocompatibles funcionales para preservar, restaurar o mejorar la funcionalidad de células, tejidos y órganos, sin embargo, la mayor problemática que se presenta es generar andamios, los cuales son materiales que son fundamentales para la regeneración tisular, ya que crean una conexión física para la infiltración y proliferación celular. Es muy importante para la ingeniería de tejidos es que estos andamios no provoquen un rechazo inmunitario (Tania Limongi, et al., 2017), que sean porosos, tridimensionales y puedan crear condiciones para que las células proliferen (Z.G. Chen, et al., 2010). Existe otra área de la ingeniería de tejidos, la cual es, la ingeniería de tejidos óseos abarca los principios de la biología ósea y las disciplinas de ingeniería para aumentar la pérdida ósea mediante el uso de andamios, estos andamios no tienen que generar rechazo inmunitario por parte del organismo, altamente porosos, con interconectividad que proporcione espacio para la infiltración celular, la transferencia de nutrientes, la eliminación de desechos, la neovascularización y el espacio para un nuevo crecimiento de tejido óseo (S. Saravanan, R.S. Leena y N. Selvamurugan, 2016).

Investigaciones recientes sobre biomateriales para la implantación y el reemplazo óseo en la ingeniería de tejidos óseos se ha expandido considerablemente en las últimas cuatro décadas. En los últimos años, se ha logrado un progreso significativo en el trasplante de

órganos, la reconstrucción quirúrgica y el uso de prótesis artificiales para tratar la pérdida o falla de un órgano o tejido óseo. Los biopolímeros son cada vez más importantes como andamios para la ingeniería de tejidos óseos (Jayachandran Venkatesan y Se-Kwon Kim, 2010).

El ácido poliláctico (PLA) es considerado como uno de los polímeros renovables biológicos más competitivos debido a su excelente biocompatibilidad, buena biodegradabilidad y alta resistencia mecánica (N. Wu y H. Zhang, 2017). Estas propiedades se ven diversificadas cuando se mezcla con otros biopolímeros como es el quitosano, el cual es un aminoácido que tiene propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, promotor de absorción, actividad antimicrobiana y antioxidante (F. M. Goycoolea, C. Remuñán-López y M. J. Alonso, 2009). Otro biopolímero con el que puede ser mezclado es la queratina, la cual es una proteína natural que puede ser considerado uno de los biopolímeros más abundantes en el mundo, sus propiedades se deben a su estructura organizativa. La queratina se puede encontrar en diversos organismos totalmente disímiles, tales como seres humanos, caballos, serpientes y aves, entre otros (Flores-Hernández, 2014).

Con base a investigaciones ya realizadas anteriormente (Rojas-Martínez Laura E., 2017), se ha demostrado que los biopolímeros como el quitosano y la queratina tienen gran oportunidad en este campo ya que se ha demostrado que existe un crecimiento celular en andamios hechos a base de estos materiales.

Es importante destacar que estos materiales son biopolímeros, lo que significa que son producidos a partir de fuentes renovables, de esta manera se busca ayudar al medio ambiente dejando de lado los productos que son provenientes del petróleo.

Los andamios juegan un papel crucial en la ingeniería de tejidos e ingeniería de tejidos óseos y estos pueden elaborarse mediante distintas técnicas, entre estas destacan la técnica de electrohilado en donde gracias a sus características se logran obtener películas con un entramado de tamaño adecuado para el crecimiento celular, por otro lado la técnica de impresión 3D es interesante por crear andamios tridimensionales con formas muy complejas, sin embargo, se tiene complicaciones a la hora de seleccionar el biopolímero que se va a utilizar para su elaboración, ya que estos tienen que cumplir con ciertos requerimientos, necesarios para que puedan ser colocados dentro del cuerpo humano.

Como solución a estas problemáticas, en este proyecto se propone la utilización de ácido poliláctico por sus antecedentes en la investigación biomédica además que el quitosano y la queratina han demostrado propiedades para el desarrollo de andamios los cuales permiten el crecimiento a nivel celular. De esta manera teniendo estos materiales de partida se aplicarán las técnicas de electrohilado e impresión 3D para así obtener materiales de diferentes dimensiones con excelentes características y a su vez usos diversos en la ingeniería de tejidos.

La combinación de la queratina como el quitosano ha demostrado en investigaciones anteriores que al combinarse con otros polímeros genera fibras entramadas, uniformes, con buena porosidad y con un buen tamaño de celdas, lo cual es muy importante para el crecimiento celular en andamios poliméricos (Rojas-Martínez Laura E., 2017).

En este trabajo tiene como objetivo general desarrollar andamios poliméricos a base de PLA, Quitosano y Queratina mediante la técnica del electrohilado e impresión 3D para analizar su uso como biomateriales de inserción en organismos vivos de acuerdo al tipo de queratina y los arreglos formados en cada técnica, para esto se tiene la hipótesis de que los andamios poliméricos realizados a base de PLA, quitosano y queratina alcanzarán características morfológicas, químico-estructurales y propiedades mecánicas y de biocompatibilidad tales que demuestren un comportamiento sinérgico y sean adecuadas para su inserción en organismos vivos

CAPITULO 2. MARCO TEORICO

2.1 Polímeros

La palabra polímero se deriva del griego poli y meros, que significa muchos y partes, respectivamente, aunque también se pueden usar las palabras macromolécula y gran molécula como sinónimo de polímero. Los polímeros o macromoléculas son moléculas gigantes con pesos moleculares al menos 100 veces mayores que las moléculas más pequeñas como el agua o el metanol (Charles E. Carraher, Jr., 2003). Otros autores se refieren a los polímeros como materiales compuestos de muchas moléculas o partes que dan lugar a largas cadenas, estas moléculas grandes se conocen generalmente como macromoléculas, además mencionan que las propiedades únicas de los materiales hechos a partir de polímeros y la versatilidad de sus métodos de procesamiento se atribuyen a su estructura molecular (Tim A. Osswald y Georg Menges, 2010).

Es importante mencionar que la forma de los polímeros está relacionada con el tamaño de las diversas unidades que componen las macromoléculas y las diversas fuerzas de unión primarias y secundarias que están presentes dentro de la cadena y entre las cadenas. La estructura de los polímeros se puede dar como una unidad única de repetición tal que la estructura completa del polímero puede obtenerse simplemente repitiendo la unidad de repetición 100, 500 o 1.000 veces, dependiendo del número preciso de unidades de repetición en la cadena de polímero. Para los polímeros donde solo hay una estructura promedio, como proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos, a menudo se da una estructura de cadena representativa (Charles E. Carraher, Jr., 2003).

Una de las formas de clasificar los polímeros se basa en su respuesta al calor. En este sistema, existen dos tipos de polímeros: termoplásticos y termoestables. Para los termoplásticos, los polímeros se "funden" en el calentamiento y se solidifican en el enfriamiento. Los ciclos de calentamiento y enfriamiento se pueden aplicar varias veces sin afectar significativamente las propiedades. Los polímeros termoestables, por otro lado, se funden sólo la primera vez que se calientan. Durante el calentamiento inicial, el polímero es "curado"; después, no se derrite al recalentarse, sino que se degrada (Anil Kumar y Rakesh K. Gupta, 2003). Los polímeros también se dividen en materiales naturales y sintéticos, los polímeros naturales forman la base misma de la vida y proporcionan gran parte del alimento

del que vive el hombre, algunos ejemplos de polímeros naturales son la lana, el quitosano, la celulosa, etc. Los polímeros sintéticos en cambio, provienen del petrolo y son los materiales utilizados para la elaboración de plásticos y elastómeros (Fred W. Billmeyer, 1975).

Las propiedades de los polímeros están relacionadas no solo con la naturaleza química del polímero sino también por la extensión y distribución de la cristalinidad, la distribución de las cadenas de polímeros y la naturaleza y cantidad de aditivos que se le pueden agregar, como rellenos, agentes de refuerzo y plastificantes, por mencionar sólo unos pocos. Estos factores influyen esencialmente en todas las propiedades poliméricas, tales como dureza, inflamabilidad, resistencia a la intemperie, resistencia química, respuestas biológicas, apariencia, teñido, punto de reblandecimiento, propiedades eléctricas, rigidez, vida útil, retención de humedad, etc. (Charles E. Carraher, Jr., 2003).

Los materiales poliméricos muestran una gran versatilidad en aplicaciones biomédicas a comparación con los materiales cerámicos y metálicos, y extensos estudios interdisciplinarios se están llevando a cabo con el propósito de mejorar sus rendimientos, asociados con una mejor biocompatibilidad. Muchos polímeros naturales están siendo estudiados para un gran número de aplicaciones biomédicas (Valentina Grumezescu y Alexandru Grumezescu, 2019).

2.1.1 Polímeros naturales

Una de las áreas más fuertes y de más rápido crecimiento dentro de la ciencia es la que involucra a los polímeros naturales. Los polímeros naturales son polímeros formados en la naturaleza durante los ciclos de crecimiento de todos los organismos; por lo tanto, también se les conoce como biopolímeros (Masami Okamoto y Baiju John, 2013).

Físicamente no hay diferencia en el comportamiento, estudio o prueba de los polímeros naturales y sintéticos, y las técnicas de información adecuadas para la aplicación a polímeros sintéticos son igualmente aplicables a los polímeros naturales (Charles E. Carraher, Jr., 2003).

Industrialmente se pretende dar uso a polímeros naturales en muchas áreas nuevas y antiguas. Como los polímeros naturales son recursos típicamente re generables, la

naturaleza puede continuar sintetizándolos a medida que los cosechamos, además que estos polímeros naturales también están presentes en grandes cantidades (Charles E. Carraher, Jr., 2003).

Muchos proyectos y avances médicos, de salud y biológicos están relacionados con materiales que son, al menos en parte, poliméricos.

Los polímeros base bio o los biopolímeros se están promoviendo como una alternativa para responder a la creciente demanda de sustituir a los polímeros petroquímicos (fósiles). Las iniciativas y regulaciones ecológicas basadas en el medio ambiente han despertado el interés de proteger y mejorar el medio ambiente para el futuro (Francesco Galiano, et al., 2018). Biopolímeros provenientes de proteínas y polisacáridos tienen una especial atención hoy en día por sobre los materiales sintéticos, debido a que estos exhiben propiedades biodegradables, biocompatibles, baja inmunogenicidad y actividad antibacteriana (Joby Jacob, et al., 2018).

2.1.2 Ácido Poliláctico (PLA)

El ácido poliláctico (PLA) es un poliéster alifático biodegradable y de base biológica derivado de fuentes renovables como el azúcar de maíz, la papa y la caña de azúcar (E. Castro-Aguirre, et al., 2016).

El PLA es un polímero termoplástico, de alta resistencia y alto módulo que se puede fabricar a partir de recursos anuales renovables para producir diferentes componentes para usar en diversas áreas. Es fácilmente procesable en equipos de plástico estándar para producir piezas moldeadas, películas o fibras (Shady Farah, et. al., 2016).

Hoy en día, aunque existen múltiples formas de fabricar PLA, ninguna de ellas es simple o fácil de ejecutar. La síntesis de PLA requiere un control riguroso de las condiciones (temperatura, presión y pH), el uso de catalizadores y largos tiempos de polimerización (Astrid J.R. Lasprilla, et. al., 2012).

En comparación con otros biopolímeros, la producción de PLA tiene numerosas ventajas, que incluyen (Shady Farah, et. al., 2016):

- Ecológico: además de ser derivado de recursos renovables (por ejemplo, maíz, trigo o arroz), el PLA es biodegradable, reciclable y compostable.
- Biocompatibilidad: el aspecto más atractivo del PLA, especialmente con respecto a las aplicaciones biomédicas. Los productos de degradación de PLA no son tóxicos (en una composición inferior) por lo que es una opción natural para aplicaciones biomédicas.
- Procesamiento: el PLA tiene una mejor procesabilidad térmica en comparación con otros biopolímeros. Se puede procesar mediante moldeo por inyección, extrusión de película, moldeo por soplado, termoformado, hilado de fibra y formación de película.
- Ahorro de energía: el PLA requiere un 25-55% menos de energía para producir que los polímeros a base de petróleo y las estimaciones muestran que esto se puede reducir a menos del 10% en el futuro.

Algunas de las propiedades que presenta el PLA se describen en la siguiente tabla 1:

Tabla 1. Propiedades del PLA (adaptada de Shady Farah, et. al., 2016).

Propiedad	Unidad	
Densidad	g/cm ³	1.21-1.25
Tensión de rotura	MPa	21-60
Módulo de Young	GPa	0.35-3.5
Temperatura de transición vítrea (T _g)	°C	45-60
Temperatura de fusión (T _m)	°C	150-162

El PLA tiene un potencial probado para reemplazar los polímeros basados en petroquímicos convencionales para aplicaciones industriales o como un biomaterial líder para numerosas aplicaciones en medicina (E. Castro-Aguirre, et al., 2016).

2.1.3 Quitosano

El quitosano es un derivado desacetilado de la quitina, que es uno de los polisacáridos más abundantes que se encuentran en la naturaleza junto a la celulosa. Comercialmente, la quitina y sus derivados se extraen de cáscara de camarón, cáscara de cangrejo, cigalas y cáscara de krill (Suneeta Kumari, et al., 2016). Debido a que el quitosano es un polisacárido que se obtiene de fuentes abundantes en la naturaleza y se considera que tiene un gran potencial de aplicación como biomaterial para la regeneración tisular.

El quitosano tiene una estructura química con una cadena lineal compuesta de unidades de D-glucosamina y N-acetil-glucosamina unida mediante enlaces β (1-4) glucosídicos, como se muestra en la siguiente figura 1:

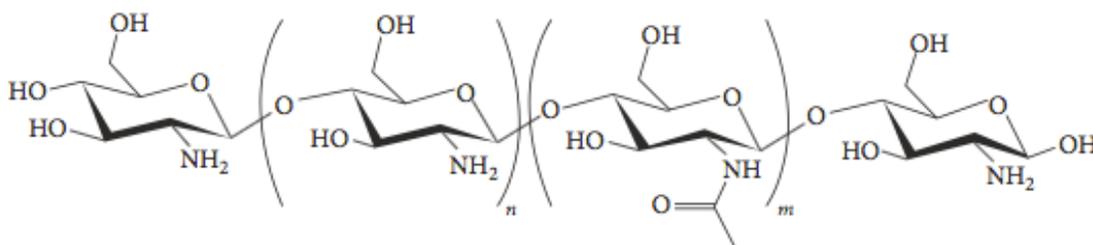


Figura 1. Estructura química del quitosano (adaptada de José Carlos Viana Ribeiro, et al., 2017).

En esta estructura, hay tres grupos funcionales reactivos: una amina (NH₂) y dos grupos hidroxílicos (OH). Estas agrupaciones, particularmente la amina, le dan al quitosano una naturaleza catiónica debido a la protonación de grupos amino (NH₃⁺) en medio ácido (José Carlos Viana Ribeiro, et al., 2017).

Las singulares características fisicoquímicas y biológicas del quitosano han llevado a numerosos estudios que investigan su aplicación en diferentes áreas. Biocompatibilidad, biodegradabilidad, mucoadhesividad, ausencia de toxicidad, capacidad para formar estructuras porosas tridimensionales, facilidad de manejo y bajo costo son solo algunos de los beneficios mencionados por diferentes autores. Además, la reactividad del quitosano también permite modificar su estructura mediante la sustitución de sus grupos funcionales, lo que le permite combinarse con otros polímeros sintéticos o naturales, formando las llamadas mezclas de polímeros, o compuestos con cerámica de calcio y fosfato (José Carlos Viana Ribeiro, et al., 2017).

Estas modificaciones permiten modular las características del quitosano, como la solubilidad, la biodegradabilidad y el rendimiento mecánico, para una buena aplicación en la ingeniería de tejidos, ya que dichas propiedades se pueden manipular según el tipo de tejido que se regenerará, lo que lo convierte en un biomaterial extremadamente versátil (José Carlos Viana Ribeiro, et al., 2017).

Adicional a esto, el quitosano posee estructuras únicas, propiedades multidimensionales, alta funcionalidad y amplias oportunidades de desarrollo biomédico, debido a su excelente biocompatibilidad y su admirable biodegradabilidad con seguridad ecológica y baja toxicidad con actividades biológicas versátiles como la actividad antimicrobiana y su baja inmunogenicidad (M. Dash, et.al., 2011).

2.1.4 Queratina

Las queratinas son proteínas naturalmente abundantes que se encuentran en los tejidos animales, que incluyen cabello, lana, cuernos, pezuñas, uñas, escamas de reptiles y picos y plumas de aves (Yussef Esparza, et al., 2017).

Existen diversas clasificaciones para la queratina que se utilizan en la literatura, como por ejemplo por la cantidad de enlaces cruzados de azufre que contiene la queratina, en esta clasificación las queratinas pueden separarse como queratinas blandas (por ejemplo, estrato córneo), debido a que son débilmente consolidadas y con una menor cantidad de azufre y lípidos, y queratinas duras (que se encuentran en el cabello, uñas, garras, picos y las plumas) las cuales tienen una estructura más ordenada y una mayor cantidad de azufre (R. D. B. Fraser, et al., 1972).

Generalmente la queratina y los materiales hechos a base de queratina a menudo se distinguen en queratina α y β . A pesar de que existen otras clasificaciones de tipo de queratina, diversos autores prefieren clasificarlo en queratinas α y β debido a que estas estructuras dominan en la difracción de rayos X (Bin Wang, et al., 2016). Adicional a esto, es importante recalcar que las dos estructuras α -hélice y β -plegada son las dos principales estructuras internas de soporte de las proteínas (Harvey Lodish, et al., 2000), por esta razón también es preferible clasificarlas en estos dos tipos.

La α -queratina es estructural y forma la corteza de la fibra. Esta construida por cuatro hélices α diestras entrelazadas para formar una súper hélice zurda (la protofibrilla) estabilizada por enlaces de hidrógeno en paralelo al eje principal, y por puentes disulfuro formados por grupos tiol de cisteína (-SH) de cadenas adyacentes. Las α -queratinas tienen un bajo contenido de aminoácidos de azufre y un peso molecular que varía de 40-70 kDa (Ferraro, V., et al., 2016).

La β -queratina tiene una estructura de lámina β y tienen un peso molecular en el rango de 10-22 kDa y son principalmente protectoras, además, la β -queratina carece de cisteína, por lo tanto, la estructura solo se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno y es rica en aminoácidos de cadena corta como glicina, alanina y serina, seguidos de lisina, histidina y triptófano (Ferraro, V., et al., 2016).

La α -queratina se encuentra principalmente en los mamíferos, mientras que la β -queratina se encuentra en los tejidos duros de aves y reptiles. En la siguiente tabla 2 se muestran algunos ejemplos de α y β queratina:

Tabla 2. Ejemplos de α y β queratina (adaptada de Bin Wang, et al., 2016).

Tipo de queratina	Fuentes de obtención
α -queratina	Cabello, lana, uñas, cuernos, pezuñas; estrato córneo
β -queratina	Plumas, picos y garras aviares, garras de reptiles y escamas
α y β queratina	Epidermis reptiliana, escamas de pangolín

Los materiales hechos a base de queratina exhiben funciones mecánicas excepcionales dependiendo del origen de la queratina. Es importante entender el comportamiento mecánico de las queratinas α y β en las nano y microescalas (Bin Wang, et al., 2016):

- La β -queratina tiene una mayor rigidez que la α -queratina.
- Bajo tensión, las hélices α cambian la estructura en hojas plegadas en β .
- El aumento de la humedad disminuye la resistencia y el módulo de Young de α y β -queratina.
- Las fracciones de orientación, empaque y volumen de los filamentos para las queratinas α y β afectan las propiedades mecánicas.

La queratina se ha mostrado prometedora para revolucionar el mundo de los biomateriales debido a su biocompatibilidad intrínseca, biodegradabilidad, durabilidad mecánica y abundancia natural. También, ha demostrado que los biomateriales a base de queratina poseen motivos de unión celular capaces de soportar la unión celular. En conjunto, todas estas propiedades podrían crear una matriz tridimensional favorable que permita la infiltración, la adhesión y la proliferación celular (Jillian G. Rouse y Mark E. Van Dyke, 2010).

- **Queratina de pluma de pollo**

Las plumas de pollo están constituidas aproximadamente en un 90% de queratina (Ju Wang, et al., 2016), durante la formación de plumas estas se forman exclusivamente de β -queratina, aunque algunos estudios indican que existe presencia de α -queratina en pequeñas cantidades. Una mirada más cercana a una pluma de pollo (figura 2) revela que está compuesta por el raquis o pluma (su estructura primaria), las bárbulas (su estructura secundaria) y las barbillas (la estructura terciaria).

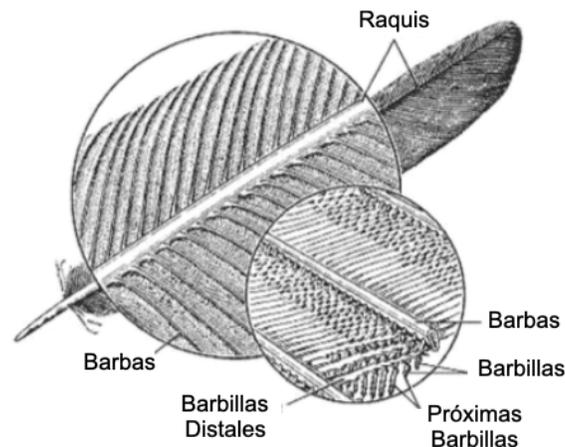


Figura 2. Estructura de la pluma de pollo (adaptada de Yussef Esparza, et al., 2017).

- **Queratina de cabello**

Aproximadamente el 80% de la masa total de la fibra capilar está compuesta por queratina. La fibra capilar consiste en tres constituyentes morfológicos concéntricos que actúan mecánicamente como un todo. La cutícula, la capa protectora externa del cabello, consiste en células en forma de placa que se superponen longitudinal y periféricamente. La corteza, la parte más gruesa de la fibra capilar, se compone de células fusiformes que contienen

macrofibrillas y material intermacrofibrilar. La médula, la parte más interna de los pelos más gruesos que no siempre existen, consiste en células huecas con un citoesqueleto de proteínas amorfas y filamentos finos (Célia F.Cruz, et, al., 2017).

En cada fibra de cabello existe una estructura jerárquica, como se muestra en siguiente figura 3. Una fibra de cabello humano típica tiene un diámetro de 50-100 μm y la capa más externa está compuesta de cutículas que aseguran la integridad de las fibras. Estas escamas de la cutícula, que tienen un grosor de 0.3-0.5 μm y una longitud de 40-60 μm , también tienen una estructura en capas. La sección interna, corteza, está compuesta de células corticales de 100 μm de longitud (Yu, Y., Yang, W., André Meyers, M., 2017).

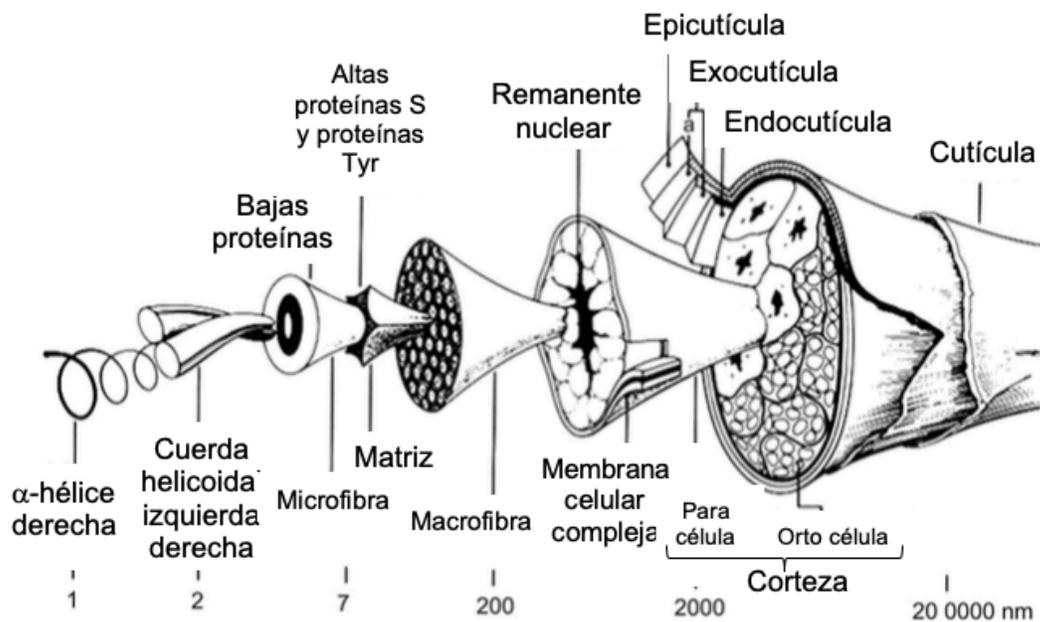


Figura 3. Estructura de una fibra de cabello humano (adaptada de Bin Wang, et al., 2016).

El complejo de la membrana celular funciona como un cemento que pega células de la cutícula superpuestas, células de la cutícula y la corteza, y las células de la corteza vecinas juntas y está compuesto principalmente de lípidos y proteínas. La fibra capilar está constituida principalmente por queratinas duras tipo I a y II a que se agregan en macrofibrillas embebidas en un material proteico llamado matriz. La matriz está compuesta por las proteínas asociadas a la queratina (Célia F.Cruz, et, al., 2017).

2.2 Ingeniería de tejidos

El cuerpo humano tiene una limitada capacidad para regenerar un órgano enfermo. En caso de traumatismos mayores, los tejidos y órganos que se ven afectados, resultan en déficits y disfunciones tisulares devastadoras. El uso de materiales para reparar el tejido dañado data desde la antigüedad, utilizando materiales naturales como la madera para reparar el hueso, cañas o tubos para reemplazar estructuralmente el tejido perdido en la nariz debido a traumatismos o enfermedades (D. Singh, 2018).

El término "ingeniería de tejidos" fue acuñado oficialmente en un taller de la Fundación Nacional de Ciencias en 1988 para significar "la aplicación de principios y métodos de ingeniería y ciencias de la vida hacia la comprensión fundamental de las relaciones estructura-función en tejidos de mamíferos normales y patológicos y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función tisular" (Fergal J. O'Brien, 2011).

El campo de la ingeniería de tejidos es altamente multidisciplinario y se basa en expertos de medicina clínica, ingeniería química, ciencia de los materiales, ingeniería mecánica y disciplinas relacionadas, tanto de ingeniería como de ciencias de la vida. El campo se basa ampliamente en el uso de andamios 3D porosos para proporcionar el ambiente apropiado para la regeneración de tejidos y órganos (Fergal J. O'Brien, 2011).

2.2.1 Ingeniería de tejidos óseos

El hueso es una estructura de soporte esencial del cuerpo, que se caracteriza por su rigidez, dureza y capacidad de regeneración. Sirve para proteger los órganos necesarios, produce células sanguíneas, actúa como depósito de minerales para el calcio y mantiene el equilibrio ácido-base. Las lesiones óseas debidas a fracturas, artroplastias articulares y defectos dentales son algunos desafíos clínicos que dificultan el patrón de curación ósea natural (K.Balagangadharan, et, al., 2016).

La ingeniería del tejido óseo se puede describir como una combinación de diferentes campos científicos de interés que ofrece alternativas prospectivas a autoinjertos y aloinjertos mediante el uso efectivo de injertos sintéticos para ayudar a la regeneración tisular. La ingeniería de tejidos óseos se centra en el diseño de andamios tridimensionales

que tienen la capacidad de imitar a la matriz extracelular, proporcionar asistencia mecánica y ayudar en la formación de hueso nuevo (K.Balagadharan, et, al., 2016).

2.2.2 Andamios

Podemos definir los *scaffolds*, andamios porosos o también denominados matrices tridimensionales, como las estructuras poliméricas sólidas, porosas y tridimensionales que se utilizan como base en la ingeniería de tejidos y tejidos óseos. Estos, tienen un rol único en la ingeniería regenerativa y reparadora. Los andamios deben de cumplir unas determinadas funciones, que los haga válidos, siendo las principales las de dirigir y facilitar el crecimiento y la migración de las células que se encuentran localizadas en el tejido alrededor del mismo, promoviendo de esta forma la formación del nuevo tejido (E. Diaz, et al., 2014) . Los andamios fabricados deben de (Iban Sandonis Oleaga, 2015):

- Permitir el transporte de nutrientes y factores que permitan la proliferación y diferenciación celular.
- Ser biodegradables
- Provocar en lo mínimo inflamación o toxicidad.
- Deben ser tridimensionales con un diseño específico para el área a tratar.
- Ser altamente poroso.
- Debe tener un alto ratio área-superficie, para facilitar la interacción entre las células y la superficie y ayudar al anclaje celular.
- La superficie de los andamios debe ser la adecuada, tanto topográfica como químicamente, para permitir y facilitar la adhesión, diferenciación y proliferación celular.
- Las propiedades mecánicas de los andamios deben ser similares a las del tejido a sustituir, mientras dure la formación del mismo.

A medida que han avanzado las tecnologías médicas y de ingeniería, los criterios de selección de materiales pasaron de la disponibilidad al más adecuado acorde a las necesidades. A principios del siglo XX, los materiales como aleaciones de metal o cerámica han sido reemplazados rápidamente por polímeros, lo que resultó en una mayor restauración de los tejidos, una mejor funcionalidad y una mayor reproducibilidad (D. Singh, 2018).

Los polímeros naturales debido a sus propiedades ideales tales como biocompatibilidad y biodegradabilidad tienen una mayor opción para usar como andamios. Además, la optimización de las concentraciones y condiciones del polímero da como resultado el control de la porosidad, la carga y la resistencia mecánica. La bioactividad es otra propiedad altamente valorada que puede controlarse mediante la introducción de sustancias químicas, proteínas, péptidos y células adicionales (Fergal J. O'Brien, 2011).

2.2.3 Técnicas para la fabricación de andamios

2.2.3.1 Electrohilado

Electrospinning o electrohilado es un sistema simple y rentable, los avances hechos durante la última década han permitido el desarrollo de arquitecturas nanofibrilares basadas en biopolímeros que imitan la estructura y las funciones biológicas de la matriz celular natural. Por lo tanto, esta técnica ha ganado gran popularidad en la investigación de ingeniería de tejidos (Zheng-Ming Huang, et al., 2003).

El electrohilado, como se muestra en la figura 4, está controlado por un campo eléctrico de alta intensidad creado entre 2 electrodos, que se colocan en una solución de polímero, y un colector con cargas eléctricas de polaridad opuesta. La solución de polímero se extrae de una boquilla bajo la gravedad o bajo presión mecánica combinada con un campo eléctrico de alto voltaje (5-50 kV). Cuando la carga eléctrica excede la tensión superficial de la gotita de la solución de polímero, se produce un chorro de polímero, seguido de la evaporación del disolvente, lo que da como resultado la formación de nanofibras sólidas (Sung-Bin Park, et al., 2017).

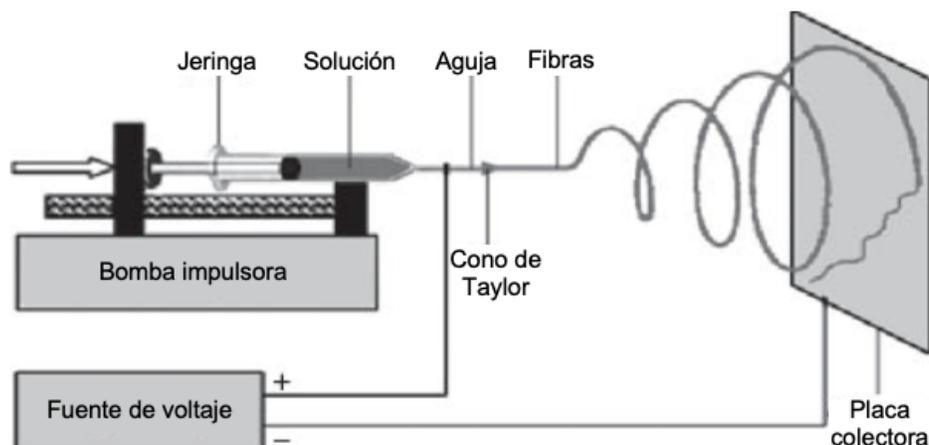


Figura 4. Sistema de procesamiento por medio de electrohilado.

El diámetro y la estructura del andamio de las fibras se controlan cambiando los parámetros de electrohilado tales como los parámetros de la solución de polímero (viscosidad, peso molecular del polímero, conductividad del polímero y tensión superficial), parámetros de procesamiento (voltaje aplicado, distancia entre la punta y el colector, y caudal) y parámetros ambientales (humedad y temperatura). Mientras que las células en condiciones de cultivo en 2D experimentan un intercambio limitado de nutrientes en un solo lado, las células que crecen en un entorno de nanofibras 3D intercambian nutrientes y utilizan receptores en toda su superficie (Sung-Bin Park, et al., 2017).

2.2.3.2 Impresión 3D

La gran limitación para la mayoría de las técnicas convencionales de fabricación de andamios es que no permite al usuario crear poros precisos o modificar su distribución o lograr una alta interconectividad con la geometría de los detalles, es por eso que la impresión 3D ha sido desarrollada para superar la mayoría de estas limitaciones que sostienen el progreso de la ingeniería de tejidos (D. Singh, 2018).

La impresión 3D es un método recientemente desarrollado para fabricar andamios de ingeniería de tejidos bien diseñados. Utiliza un modelo de diseño asistido por computadora para construir una arquitectura 3D en una forma de capa por capa, con un control preciso de las características morfológicas, la composición química y las propiedades mecánicas. Esto se logra usando un proceso aditivo, en el que capas sucesivas del material se colocan en diferentes formas. Esta técnica permite la producción de andamios altamente reproducibles cuyo tamaño y forma se pueden personalizar de acuerdo con los requisitos específicos (Sanna M. Peltola, et al., 2008).

Dentro de la impresión 3D en general se han empleado varias técnicas de impresión para fabricar compuestos de polímeros. Entre ellas, algunas técnicas están bien establecidas, como el modelado por deposición fundida (FDM), la sinterización selectiva por láser, la impresión en 3D por inyección de tinta, la estereolitografía y el trazado en 3D, mientras que otras están todavía en desarrollo o son utilizadas sólo por pequeños grupos de

investigadores. Cada técnica tiene sus propias ventajas y limitaciones en la producción de productos compuestos (Xin Wang, et al., 2017).

Las impresoras que utilizan la técnica de modelado por deposición fundida (FDM) son las impresoras más utilizadas. Los termoplásticos como policarbonato, acrilonitrilo butadieno estireno (ABS) y PLA, se utilizan comúnmente debido a su baja temperatura de fusión. Las impresoras FDM trabajan por extrusión controlada de filamentos termoplásticos, como se muestra en la Fig. 5. En FDM, los filamentos se funden en un estado semilíquido en la boquilla y se extruyen capa por capa sobre la plataforma de construcción, donde las capas se fusionan y luego se solidifican en las partes finales. La calidad de las piezas impresas se puede controlar modificando los parámetros de impresión, como el grosor de la capa, la orientación de la impresión, el ancho de la trama, el ángulo de trama y el espacio de aire.

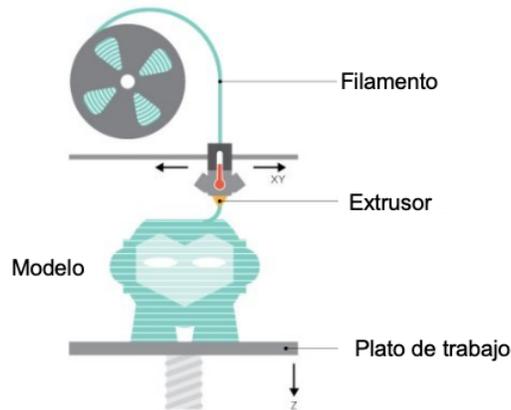


Figura 5. Proceso de impresión 3D por FDM.

En la actualidad, la impresión 3D se está utilizando para producir andamios basados en biopolímeros para su uso en medicina regenerativa. Las ventajas de los polímeros naturales para la impresión 3D incluyen su similitud con matriz celular humana y su bioactividad inherente. Las células se localizaron en construcciones impresas y este sistema 3D fue similar al entorno in vivo y a la matriz extracelular (Sung-Bin Park, et al., 2017).

2.3 Antecedentes

El estudio de andamios poliméricos ha sido reportado en diversos medios de divulgación a través del tiempo. Existe investigaciones sobre el desarrollo de andamios a partir de electrohilado y la impresión 3D, en las cuales usan polímeros naturales para una futura aplicación en la ingeniería de tejidos, sin embargo, existen muchas dudas al elegir los materiales y el método para desarrollar los andamios.

En el capítulo 2 se ha hecho mención de las diversas propiedades del PLA, el quitosano y la queratina, y basándose en estos datos teóricos, ya existen diversas investigaciones sobre andamios desarrollados utilizando estos biomateriales.

Yaowen Liu dentro de su artículo publicado en el 2017, desarrolla nanofibras de PLA/quitosano a partir del electrohilado para su aplicación como tejido cardíaco, como resultado, reporta que las nanofibras de PLA/quitosano promueven la unión y la viabilidad de las células, en este caso de los cardiomiocitos. Los autores concluyen que la alineación que tienen las nanofibras provocadas por el electrohilado provoca un crecimiento de células a lo largo del eje longitudinal de las fibras.

Un artículo similar, pero utilizando la impresión 3D es el de Catarina R. Almeida en el 2014, ya que para su investigación se imprimieron andamios de PLA/quitosano con el objetivo de saber si estos biopolímeros y la geometría del andamiaje afecta la respuesta celular (utilizaron macrófagos y monocitos en su experimentación). Los resultados arrojaron que las propiedades de los materiales y la arquitectura de los andamios efectivamente afectaron el comportamiento de los macrófagos y de los monocitos. Basándose en estos resultados les fue posible concluir que es importante considerar los biomateriales a utilizar al desarrollar andamios, las propiedades de su superficie y las geometrías correctas, también deja hincapié a nuevas investigaciones ya que menciona que este es un campo muy amplio y requiere de más estudios.

Por otro lado, aún no existen amplias investigaciones sobre andamios de PLA/queratina, pero si se encuentran diversos artículos sobre el desarrollo de compósitos con estos biopolímeros, sin embargo, solamente se enfocan hacia la ciencia básica. Por ejemplo, en el año 2016, Siriorn Isarankura Na Ayutthaya realizó una investigación sobre el efecto que

tiene la arcilla sobre la viscosidad, conductividad, microestructura y morfología de las nanofibras de PLA/queratina hechas mediante electrohilado, como resultado la arcilla demostró mejorar la eficacia del proceso de electrohilado de PLA/queratina, sin embargo, al agregar la arcilla, la viscosidad de las soluciones a electrohilar aumento y la conductividad de los materiales disminuyó.

Es importante mencionar que, en el 2014, Constantin Edi Tanase y Iuliana Spiridon publicaron un artículo similar al presente trabajo, habla sobre compósitos de PLA/quitosano/queratina para su uso en aplicaciones biomédicas, esta investigación desarrolló los compósitos mediante la técnica de moldeado por compresión y analizó el comportamiento de las células en el material utilizando osteoblastos. Como resultado se demostró que el PLA, el quitosano y la queratina promueven la adhesión y proliferación celular, y deja abierto el campo de estudio para nuevas investigaciones utilizando estos biopolímeros

El aumento de las propiedades físicas, químicas y biológicas de las queratinas, así como el deseo de explotar la lana y las fibras de cabello humano como un recurso natural renovable, han impulsado la investigación de los biomateriales de queratina durante las últimas tres décadas. Se ha hecho mucho para fabricar y caracterizar nuevos productos a base de queratina como películas, esponjas, andamios y fibras.

En muchos casos, estos nuevos materiales de queratina han demostrado poseer una excelente biocompatibilidad. Además, muchos investigadores han descubierto métodos para modular las propiedades físicas y mecánicas de las queratinas con el fin de crear biomateriales que tengan características apropiadas para su aplicación de interés (Jillian G. Rouse and Mark E. Van Dyke, 2010).

A continuación se muestra la tabla 3 de algunos artículos y reviews con los que se estuvo trabajando para el desarrollo de este proyecto de tesis:

Tabla 3. Tabla de antecedentes.

Titulo	Materiales	Resultados	Referencias
Chitin and chitosan: Properties and applications	Quitosano Quitina	Se dieron a conocer las propiedades y características que pueden llegar a tener el quitosano y la quitina.	Marguerite Rinaudo, 2006.
3D-Printed Biopolymers for Tissue Engineering Application	Polímeros naturales y sintéticos	Se da a conocer información sobre la impresión 3D, los biopolímeros utilizados en la impresión 3D para la ingeniería de tejidos y algunos diseños utilizados para la impresión.	Xiaoming Li, et.al, 2014.
Modulation, functionality, and cytocompatibility of three-dimensional printing materials made from chitosan-based polysaccharide composites	PLA Quitosano Polilactida injertada con anhídrido maleico	Se investigaron compósitos hechos de diferentes materiales mediante impresión 3D, la morfología para todos los materiales es constante y con buena adhesión celular, todos los materiales utilizados demostraron tener buenos resultados para su aplicación en el área biomédica.	Chin-San Wu, 2016.
Preparation of chitosan/PLA blend micro/nanofibers by electrospinning	Acido trifluoroacetico PLA Quitosano	Aumentando la cantidad de PLA en la solución las gotas que pueden llegar a presentarse al momento de electrohilar empiezan a desaparecer y las fibras se vuelven más delgadas. La interacción molecular entre el PLA y quitosano es débil. Los materiales pueden ser utilizados en la ingeniería de tejidos.	Jia Xu, et. al, 2009.

Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration	Queratina	Este artículo habla sobre las propiedades, la estructura y la bioquímica de la α -queratina y β -queratina, además habla sobre su historia y las propiedades mecánicas de los materiales hechos a base de queratina.	Bin Wang, et al., 2016.
Measurements of the mechanical response of unidirectional 3D-printed PLA	PLA	La porosidad de los materiales hechos por impresión 3D puede variar si se modifica la temperatura y la velocidad del extractor. La impresión 3D aumenta la cristalinidad de un material. Un diseño en dirección axial resiste más a la deformación que en dirección transversal.	Song Y, et. al, 2017.
Three-dimensional printing of biological matters	Impresora 3D	En este artículo se retoma la aplicación de la impresión 3D en los tejidos y órganos humanos, los materiales que han utilizado para esas aplicaciones.	Munaz Ahmed, et. al, 2016.

Los antecedentes anteriormente presentados proporcionan la base de esta investigación, donde por separado ya se ha observado que tanto el PLA como el quitosano y la queratina pueden tener un futuro prometedor en el campo de la ingeniería de tejidos, así como las técnicas de electrohilado e impresión 3D.

CAPITULO 3. METODOLOGÍA

3.1 Materiales y equipo

Los materiales utilizados fueron quitosano grado reactivo (desacetilado >75%) de cascara de camarón de la marca SIGMA ALDRICH, plumas de pollo proporcionadas por la industria avícola Pilgrim's-Querétaro, cabello humano (hombre entre 40-50 años, mexicano, cabello negro rizado), urea al 98% grado reactivo de la marca J.T. BAKER, EDTA al 90% grado reactivo marca SIGMA ALDRICH, 2-mercaptoetanol al 98% grado reactivo marca SIGMA ALDRICH, tris(hidroximetil) amino metano al 97% de la marca SIGMA ALDRICH, ácido acético glacial al 99.9% de la marca J.T. BAKER, agua destilada marca ECOPURA, el PLA utilizado fue filamento de color natural de 3mm de la marca Print Filament y Cloroformo al 99% grado reactivo de la marca J.T. BAKER.

Para las pruebas de biocompatibilidad se utilizó Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de la marca GIBCO, suero fetal bovino (FBS) de la marca GIBCO, tampón fosfato salino 1X (PBS) de la marca GIBCO, TrypLE Express de la marca GIBCO, p-formaldehído al 2% de la marca J.T. BAKER, Tritón X100 marca IBI Scientific y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) de la marca SIGMA (1mg/mL).

Para la impresión 3D se utilizaron una impresora 3D de industria 55, Querétaro, mientras que para el proceso de electrohilado se utilizó una bomba KDScientific 100 y se montó una fuente de poder con un máximo de 25 kV.

3.2 Procedimientos experimentales

3.2.1 Preparación de los materiales iniciales

Las plumas de pollo proporcionadas por Pilgrim's y el cabello de humano "sin tratamiento químico" fueron lavados con agua y etanol con el propósito de desinfectarlas, posteriormente fueron secadas con aire a temperatura ambiente (~23°C). Para las plumas, adicional a lo anterior, se separaron las barbas y las bárbulas del raquis con ayuda de tijeras. Posteriormente se triturarán las barbas de pollo y el cabello de humano en el molino IKA con una malla de 1 mm.

El cabello y las plumas trituradas, así como el quitosano fueron posteriormente molidos con ayuda de un molino de bolas de la marca SPEX SamplePrep modelo Mixer/Mill 8000M, para obtener un tamaño de material aún más pequeño.

Se utilizó PLA en forma de filamento continuo el cual se redujo de tamaño a 0.6 cm con ayuda de una pelletizadora ya que a que las partículas máximas para alimentar el extrusor deben ser menores de a 1/4 de pulgada (0.635 cm) para permitir el giro del tornillo.

Finalmente, el PLA, el polvo de quitosano, y la queratina de pluma de pollo y cabello se utilizaron dentro de las técnicas de impresión 3D y electrohilado.

3.2.2 Impresión 3D

Extrusión de los materiales

Se estableció un esquema de experimentos para la extrusión e impresión de la combinación de los materiales a realizar, el cual se muestra en la figura 6:

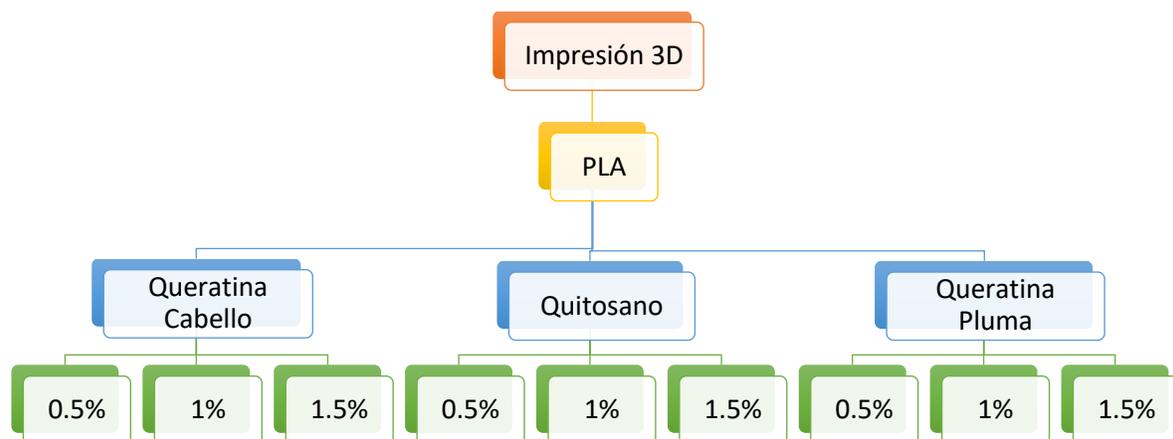


Figura 6. Esquema de experimentos para la impresión 3D de PLA, quitosano y queratina.

Además, se hizo una mezcla de PLA-Quitosano-Queratina como se muestra en la figura 7:

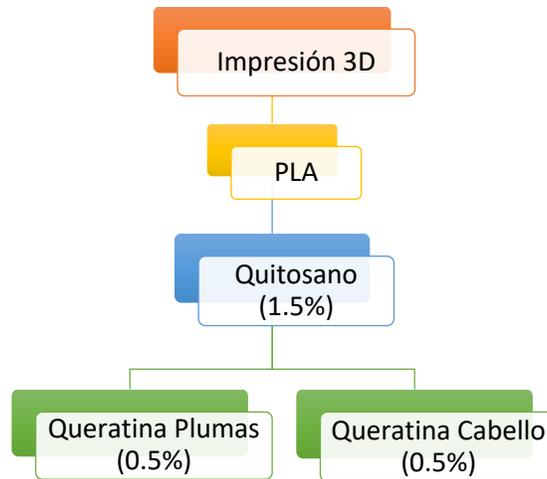


Figura 7. Esquema de experimentos para la impresión 3D de la mezcla de PLA-Quitosano-Queratina.

Los materiales fueron extruidos en un extrusor de la marca Extrusor Academy BANDERA modelo 2C15-45 L/D Laboratory a una temperatura inicial de 175°C, segunda temperatura de 180°C, tercera temperatura de 185°C, cuarta temperatura de 190°C y temperatura final de 195°C, con una velocidad angular de 94 RPM y un flujo de 5%.

Diseño para la impresión 3D de andamios

El diseño elegido para la impresión de andamios para las pruebas de biocompatibilidad se selecciono a partir de bibliografía (Alexander Szojka, et al., 2017) y se diseño mediante el programa Tinkercad.

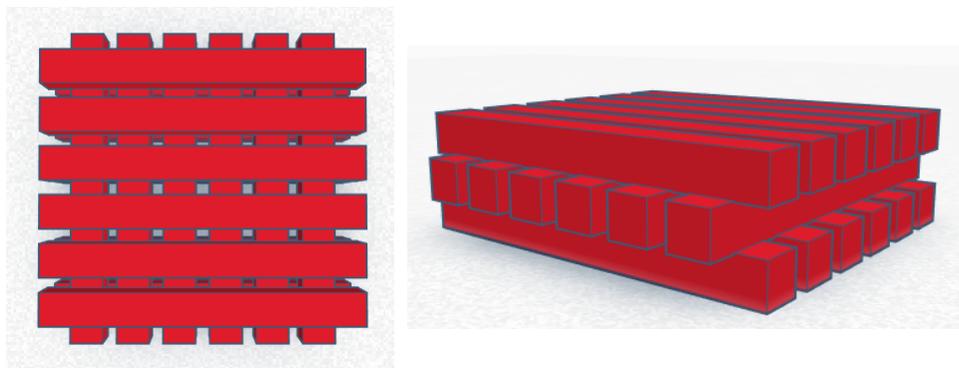


Figura 8. Diseño de los andamios a realizar, diseño elaborado en Tinkercad.

El tamaño de estos andamios es de 10x10x5 mm³ y el espaciamiento entre barras es de 0.5 mm.

Parámetros de impresión

Después de armar el diseño del andamio, los datos fueron importados al software Ultimaker Cura 3.1.0, mediante este programa se establecieron los parámetros necesarios para la impresión: primeramente, se estableció que el material a utilizar es el PLA, con una densidad de 1.24 g/cm³ y un diámetro de filamento de 1.74 mm, después se estableció que la calidad de impresión sea media (0.2 mm), una densidad de relleno al 100%, la temperatura de impresión de 210 °C, flujo al 100% y a una velocidad de 80 mm/s.

3.2.3 Electrohilado

Preparación de sal de queratina

Se tomaron 3 g de la fibra de la pluma de ave y se disolvieron en una solución compuesta de urea 8 M, EDTA 3 mM, 2-mercaptoetanol 125 mM y tris(hidroximetil) aminometano 200 mM en 75 mL de agua destilada, la mezcla se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente por 24 h. La solución resultante de color amarilla se mantuvo refrigerada a 4°C para su preservación. Las soluciones se prepararon con base la tesis del Dr. Edgar Jiménez (E. Jiménez Cervantes Amieva, 2016).

Preparación de la solución de quitosano

Se preparó una solución de 100 mL de la cual el 90% es ácido acético y 10% agua destilada para posteriormente agregarle 1.5 g de quitosano, se dejó agitar por 30 min a temperatura ambiente.

Preparación de la solución de PLA

Se utilizaron 35 ml de cloroformo y se le añadieron 3.5 g de PLA lentamente, la solución se mantuvo a 40° C y con agitación constante por una hora.

Serie de experimentos del electrohilado

Las concentraciones que se manejaron para la síntesis de los materiales mediante la técnica de electrohilado se muestran en la figura 9:

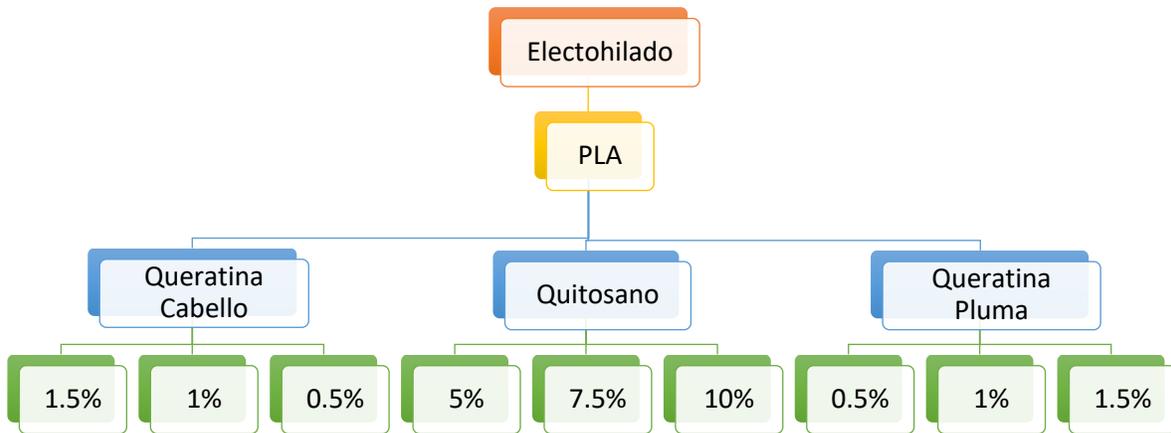


Figura 9. Esquema de experimentos para el electrohilado de PLA, quitosano y queratina.

Al igual que en la impresión 3D, se hicieron unas mezclas de PLA-quitosano-queratina, el diseño de experimentos se muestra en la siguiente figura:

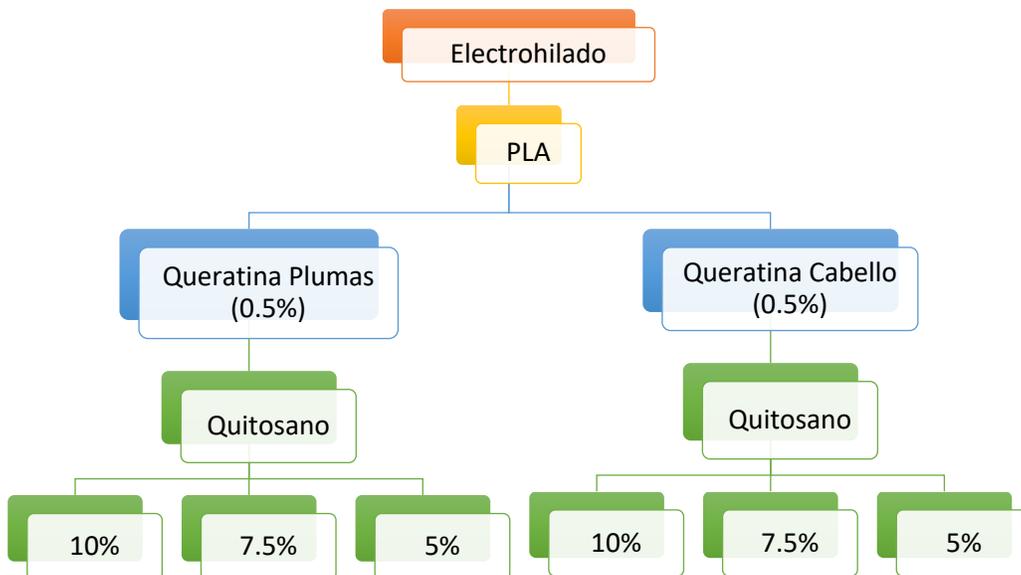


Figura 10. Esquema de experimentos para el electrohilado de la mezcla de PLA-quitosano-queratina.

Parámetros de electrohilado

Dentro del proceso de electrohilado se mantuvo una distancia de 10 cm entre la punta de la jeringa y la placa colectora, una velocidad de flujo de 0.5 ml/hr y 17kV en la fuente de poder, la humedad relativa se mantuvo menor al 30%.

3.3 Técnicas de caracterización

3.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica es una herramienta versátil con una serie de métodos que sirven para caracterizar las características micro estructurales de una muestra de 100 pm a 100 escalas μm de longitud (B.J. Inkson, 2016).

La figura 11 muestra un diagrama esquemático del principio de funcionamiento del SEM. Primero, un cañón de electrones emite electrones, estos pasan a través de la lente del condensador y la lente del objetivo, y forman un haz de electrones con un diámetro de sólo unos pocos nanómetros. Posteriormente, las señales de electrones son generadas por el proceso de interacción haz-muestra cuando el haz de electrones bombardea la superficie de la muestra. Mientras que el haz de electrones escanea rectilíneamente la superficie de la muestra, las señales de electrones son detectadas sincrónicamente por el detector y convertidas en el brillo de los puntos correspondientes de acuerdo con la cantidad de electrones detectados y luego mostradas en una pantalla de vídeo, formando así la imagen de electrones correspondiente (Fu-Yun Zhu, et. al, 2014).

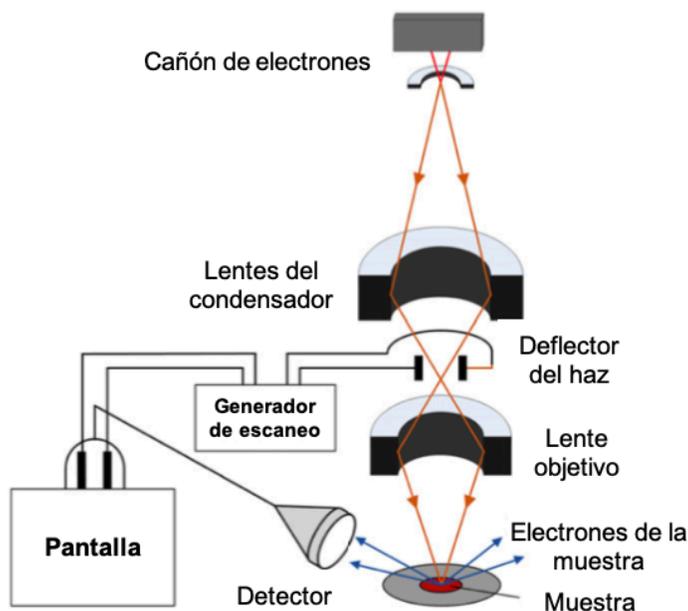


Figura 11. Diagrama del funcionamiento de un equipo SEM (adaptada de Fu-Yun Zhu, et. al, 2014).

Con el objetivo de conocer la morfología, los andamios obtenidos de 5x30x0.3 mm fueron cortados con N₂ para observar su fractura con un microscopio electrónico de barrido TM-1000 de Hitachi operado a 15 KV con un detector de electrones retrodispersados, para hacer este análisis, las muestras se cubrieron de oro en un metalizador DENTON VACUUM Desk V HP a una presión de 0.073 torr y una corriente continua de 28 mAmps.

3.3.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El objetivo principal del análisis espectroscópico infrarrojo (IR) es determinar los grupos funcionales químicos en la muestra. Diferentes grupos funcionales absorben frecuencias características de la radiación IR.

El FTIR es una técnica poderosa y ampliamente utilizada para el estudio de una amplia gama de sustancias, incluyendo investigaciones de su naturaleza y comportamiento bajo una gama de condiciones. Los espectros IR son característicos de los enlaces en especies moleculares; por lo tanto, a menudo se utilizan para 'huellas dactilares' de sustancias y para determinar su identidad, calidad, impurezas y cambios (G.E. Tranter, 2017).

La figura 12 nos muestra el esquema de como es el funcionamiento de un equipo de FTIR, donde sus principales componentes son (Magda Marcela Torres-Luque, 2010):

- Fuente de radiación: Sólido inerte calentado eléctricamente a temperatura comprendida entre 1500 y 2000 K. Se produce una radiación continua que se aproxima a la de un cuerpo negro.
- Interferómetro: Es basado en el interferómetro de Michelson, consta de un espejo fijo, un espejo móvil y un espejo divisor de haces. Es el encargado de modular cada frecuencia del infrarrojo con el fin de realizar la transformada de Fourier.
- Sistema de detección: Son usados los detectores piroeléctrico o los fotoconductores. La característica principal del primer detector es que tiene respuestas muy rápidas, lo que permite medir las señales procedentes de un interferómetro. Los segundos son detectores de telururo de cadmio y mercurio y tiene una respuesta más rápida que los piroeléctricos.

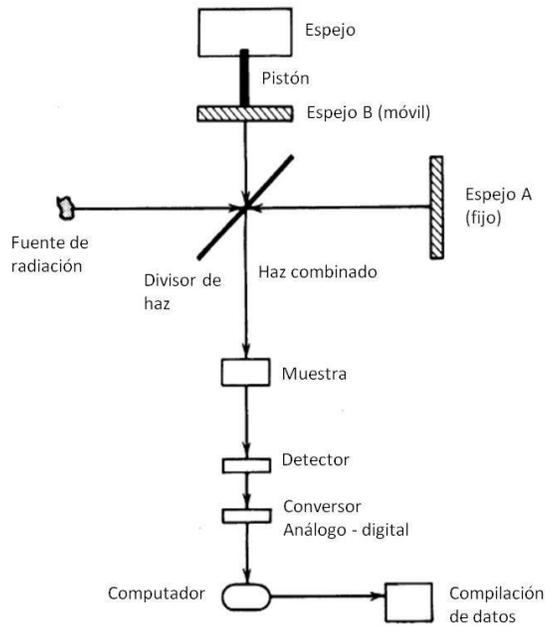


Figura 12. Diagrama del funcionamiento de un equipo FTIR (adaptada de Magda Marcela Torres-Luque, 2010).

Los andamios obtenidos se someterán a una espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier para observar los grupos funcionales que contienen. Se usó un Equipo Bruker Tensor 37 con una resolución de 1 cm^{-1} con 32 scans. Las dimensiones de los andamios fueron de $1 \times 1\text{ cm}$.

3.3.3 Análisis dinámico mecánico (DMA)

Es la aplicación de una fuerza de oscilación a una muestra y el análisis de la respuesta a esa fuerza material. A partir de este, se calculan propiedades como la tendencia a fluir (llamada viscosidad) del retardo de fase y la rigidez (módulo) de la recuperación de la muestra. Estas propiedades se describen a menudo como la capacidad de perder energía en forma de calor (amortiguación) y la capacidad de recuperarse de la deformación (elasticidad) (Kevin P. Menard, 1999).

En la figura 13 se aprecian los elementos de un equipo de análisis dinámico mecánico:

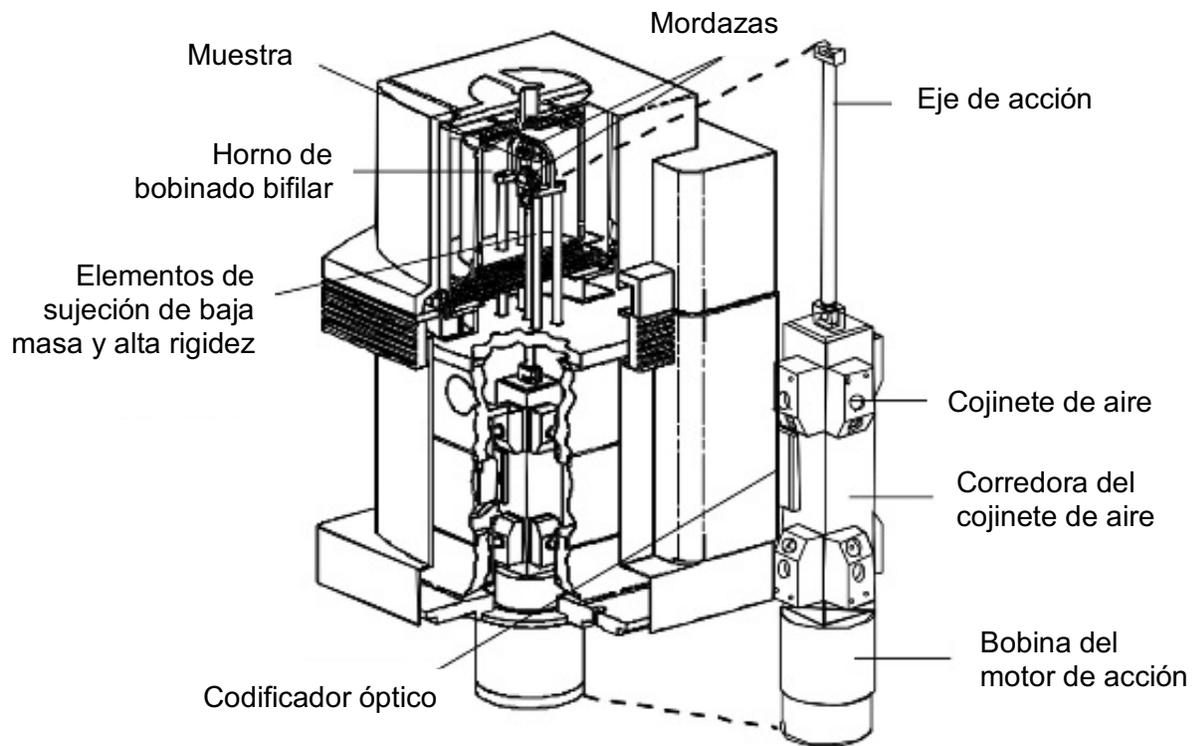


Figura 13. Diagrama del funcionamiento de un equipo DMA.

El análisis mecánico dinámico (DMA) es una técnica que se ha utilizado ampliamente en la caracterización de polímeros debido a que proporciona información, tanto para transiciones primarias como para transiciones de segundo y tercer orden que no se pueden identificar con facilidad con otras técnicas. En la actualidad esta técnica ofrece alternativas para evaluar propiedades viscoelásticas y de amortiguamiento en sólidos (Martínez-Flores E. E., et. al., 2008).

Para conocer las propiedades termo-mecánicas de los andamios se utilizará un DMA de la marca Perkin Elmer 8000. Las dimensiones de las muestras fueron de 5x30x0.3 mm y se analizarán bajo el modo tensión. Las muestras se corrieron de temperatura ambiente a 30°C a 100°C con una rampa de temperatura de 10°C por minuto a una frecuencia de 5 Hz para el caso de las muestras de impresión 3D y 1 Hz para los electrohilados.

3.3.4 Raman

Es una técnica espectroscópica usada en química y física de la materia condensada para estudiar modos de baja frecuencia como los vibratorios, rotatorios, y otros. Ha demostrado ser un enfoque poderoso para resolver una amplia gama de problemas analíticos, incluyendo la elucidación de la estructura de las moléculas orgánicas, el análisis cuantitativo y cualitativo en química, la física, la geología, la arqueología, la investigación de polímeros y el control de los procesos de fabricación, además, el Raman puede ofrecer la detección de incluso pequeños cambios en la distribución de los electrones, dando así información estructural sobre una molécula (Julia Ashina, 2017).

La espectroscopia Raman se realizó en un espectrómetro Raman, Dilor LabRaman II con un láser de He-Ne (632.8 nm.) como fuente de excitación a temperatura ambiente y resolución de 1 cm^{-1} .

3.3.5 Biocompatibilidad

La biocompatibilidad es la capacidad de un material de ser utilizado para una aplicación específica sin tener efectos tóxicos o perjudiciales sobre la función biológica (Ribeiro DA, et al., 2005). Para las pruebas de biocompatibilidad se utilizaron los andamios con medidas de $1 \times 1 \text{ cm}^2$.

Cultivo celular

En un ambiente estéril se prepararon las muestras a analizar, para esto los andamios obtenidos por impresión 3D y electrohilado se expusieron a 5 min de radiación UV por cada lado y posteriormente fueron colocados en placas de 24 pozos. Se preparó una suspensión celular de densidad definida según el tipo de células, en este caso se usó un cultivo primario de fibroblastos humanos gingivales y se sembraron 6000 células por cada muestra o pozo, se incubaron por 3 y 7 días en medio de cultivo DMEM con 10% FBS y 1% antibióticos.

Ensayo del MTT

Dependiendo de la cantidad de muestras o pozos a analizar, se preparó la solución de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), considerando que debe de ser

una solución de 10% MTT y 90% DMEM. Para la preparación del MTT se tiene que preparo 5 mg de MTT por 1 ml de PBS 1X estéril. Posteriormente, se añadió 500 μ l de la solución de MTT preparada en cada pozo y se dejó incubar por 3 horas, después se retira la solución y se añadió 500 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido) en cada pozo, se mantiene la placa en agitación por 15 minutos para agilizar el proceso de dilución de los cristales y finalmente se pasaron 100 μ l de cada muestra a una placa de 96 pozos para posteriormente analizar las muestras en el lector de absorción de microplacas marca iMark a una longitud de onda de 595 nm.

El ensayo de MTT (mostrado en la figura 14) se basa en la conversión de MTT en cristales de formazán por las células vivas, lo que determina la actividad mitocondrial. Dado que para la mayoría de las poblaciones celulares la actividad mitocondrial total está relacionada con el número de células viables, este ensayo se utiliza ampliamente para medir la cantidad de células presentes en una muestra (Johan van Meerloo, et. al., 2011).

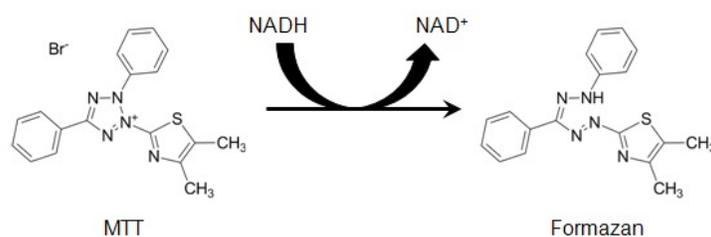


Figura 14. Estructura de MTT y formazan (adaptada de Sittampalam GS, et. al., 2004).

Microscopía Confocal

Se removió el medio, se lavaron las células 2 veces con PBS y posteriormente se añadió para-formaldehído al 3.7% por 10 minutos, después se lavaron las células nuevamente 3 veces con PBS y finalmente, usando material para desechar de manera especial (mutagénicos) se añadió de 5 gotas de DAPI de tal forma que todo el material quede empapado, se incubo por 5 min a 37°C y se resguardo hasta su observación en el confocal. Para observar las muestras en el microscopio confocal, las muestras se colocaron de cabeza en una caja de fluorodish limpia.

El microscopio confocal se ha convertido en un instrumento vital para el examen de la estructura subcelular, especialmente en células teñidas fluorescentemente. Debido a su capacidad de reducir notablemente la llamada desenfocada, en comparación con el microscopio de fluorescencia de campo amplio convencional, el microscopio confocal

proporciona una mejora sustancial en la resolución a lo largo del eje "z" y permite el seccionamiento óptico de las células. Estos desarrollos han sido particularmente útiles para la investigación de células y tejidos vegetales, que por su forma, tamaño y propiedades ópticas han sido difíciles de analizar a alta resolución por medios convencionales (Peter K. Hepler y Brian E. S. Gunning, 1998).

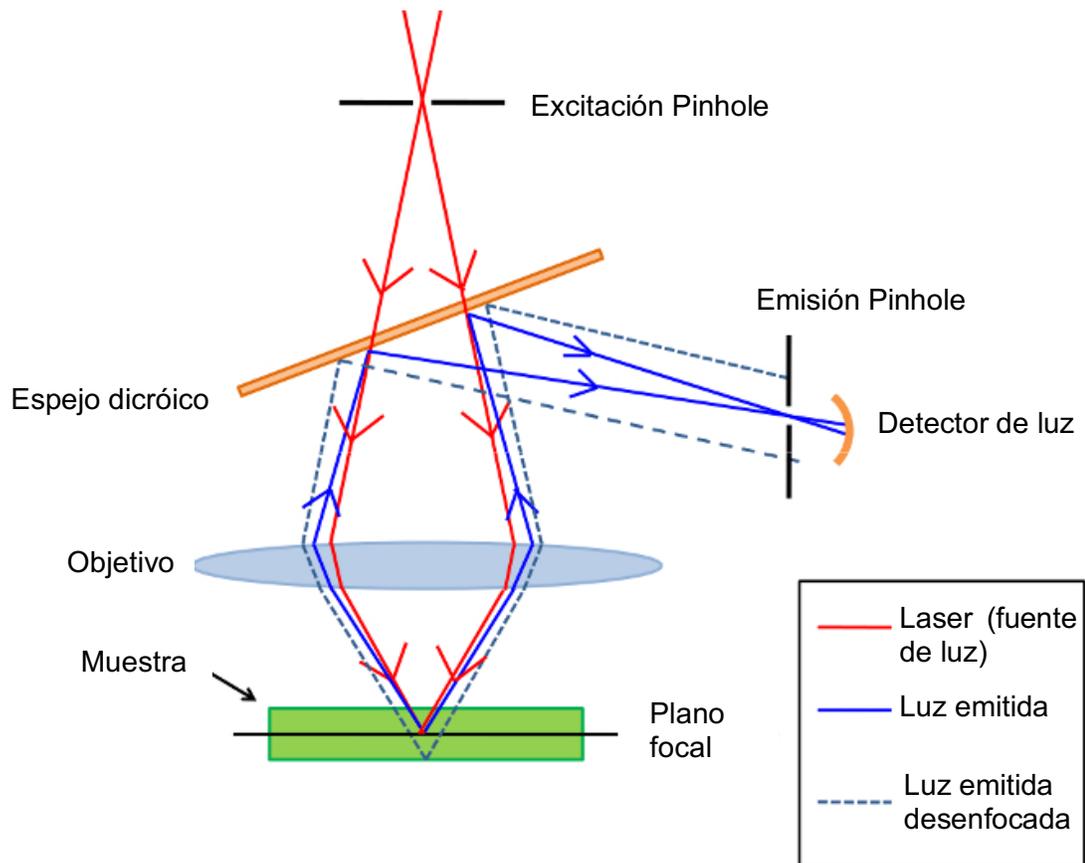


Figura 15. Diagrama del funcionamiento de un microscopio confocal (adaptada de Allaire, A., et. al., 2015).

CAPITULO 4. RESULTADOS

Este capítulo reporta los resultados obtenidos de la caracterización de los materiales de inicio, los materiales obtenidos por impresión 3D y los electrohilados.

4.1 Materiales de inicio

Debido a que la metodología de esta tesis ocupa polímeros naturales, se realizó una amplia caracterización para conocer a profundidad las propiedades que tienen los materiales de partida: PLA, quitosano, pluma de pollo y cabello de humano.

4.1.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó un análisis de FTIR con el fin de conocer las bandas características de los grupos funcionales que contienen los materiales prístinos antes de los procesos a realizar dentro de la tesis.

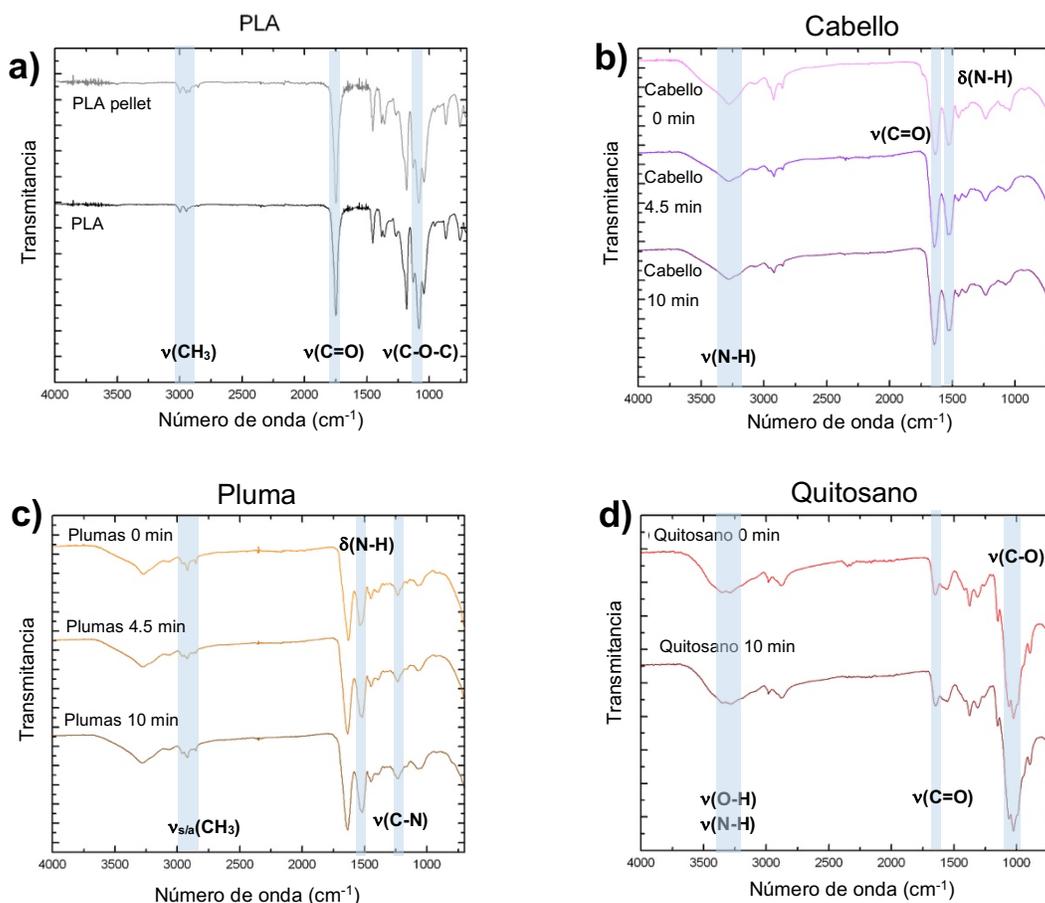


Fig 16. Espectros obtenidos por FTIR materiales iniciales, a) PLA peletizado y triturado b) Pelo no molido, pelo molido durante 4.5 minutos y 10 minutos, c) Plumas no molidas, plumas molidas durante 4.5 minutos y 10 minutos y d) Quitosano no molido, quitosano molido durante 10 minutos.

Debido a que los materiales sufren impactos y fricción después de pasar por el molino de bolas, se decidió comparar los materiales prístinos con las partículas obtenidas después de la molienda, los espectros obtenidos se observan en la figura 16.

Los espectros de la fig. 11 (a) muestran las bandas características del PLA a 1740 cm^{-1} y 1180 cm^{-1} correspondientes al enlace de estiramiento del éster de carbonilo (C=O) y al estiramiento de C-O-C respectivamente (J. P. Mofokeng, et al., 2011). Las imágenes de los espectros (b) y (c) muestran las bandas características de la queratina, las vibraciones simétricas y asimétricas de CH_3 y CH_2 a 2920 y 2850 cm^{-1} respectivamente, la vibración de los grupos C=O pertenecientes a la amida I a 1650 cm^{-1} y la flexión N-H de la amida II a 1550 cm^{-1} . Finalmente, a 1220 cm^{-1} el estiramiento de C-N correspondiente a la amida III (Francesca Selmin, et al., 2012). El espectro (d) muestra las bandas características del quitosano, a 3350 y 3300 cm^{-1} las bandas de los grupos O-H y N-H, las vibraciones simétricas y asimétricas de CH_3 y CH_2 a 2920 y 2850 cm^{-1} respectivamente (Moacir Fernandes Queiroz, et. al, 2015) y las bandas de las amidas I, II y III anteriormente mencionadas.

Como resultado, el análisis FTIR sugiere que el proceso de molienda no está degradando el PLA, el quitosano o la queratina, independientemente del tiempo requerido para este proceso.

4.1.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Los materiales de refuerzo (cabello de humano, plumas de pollo y quitosano) fueron molidos en un molino de bolas para obtener un tamaño de partícula después de ser cortados por el molino de aspas, con el cual se molió el PLA y donde la malla asegura un tamaño de 0.5 mm . Para conocer con precisión el tamaño de partícula o de hojuela obtenida con el molino de bolas, se realizaron micrografías de SEM y se les realizó un análisis estadístico de cada muestra, tal y como se muestran en la figura 17.

Las imágenes SEM muestran cómo el tamaño particular del cabello, las plumas y el quitosano disminuye cuando se muelen durante 4.5 y 10 minutos en el molino de bolas, sin embargo dentro de los histogramas se logra observar como la molienda de 4.5 min no logra asegurar un tamaño de partícula en comparación con la molienda de 10 min .

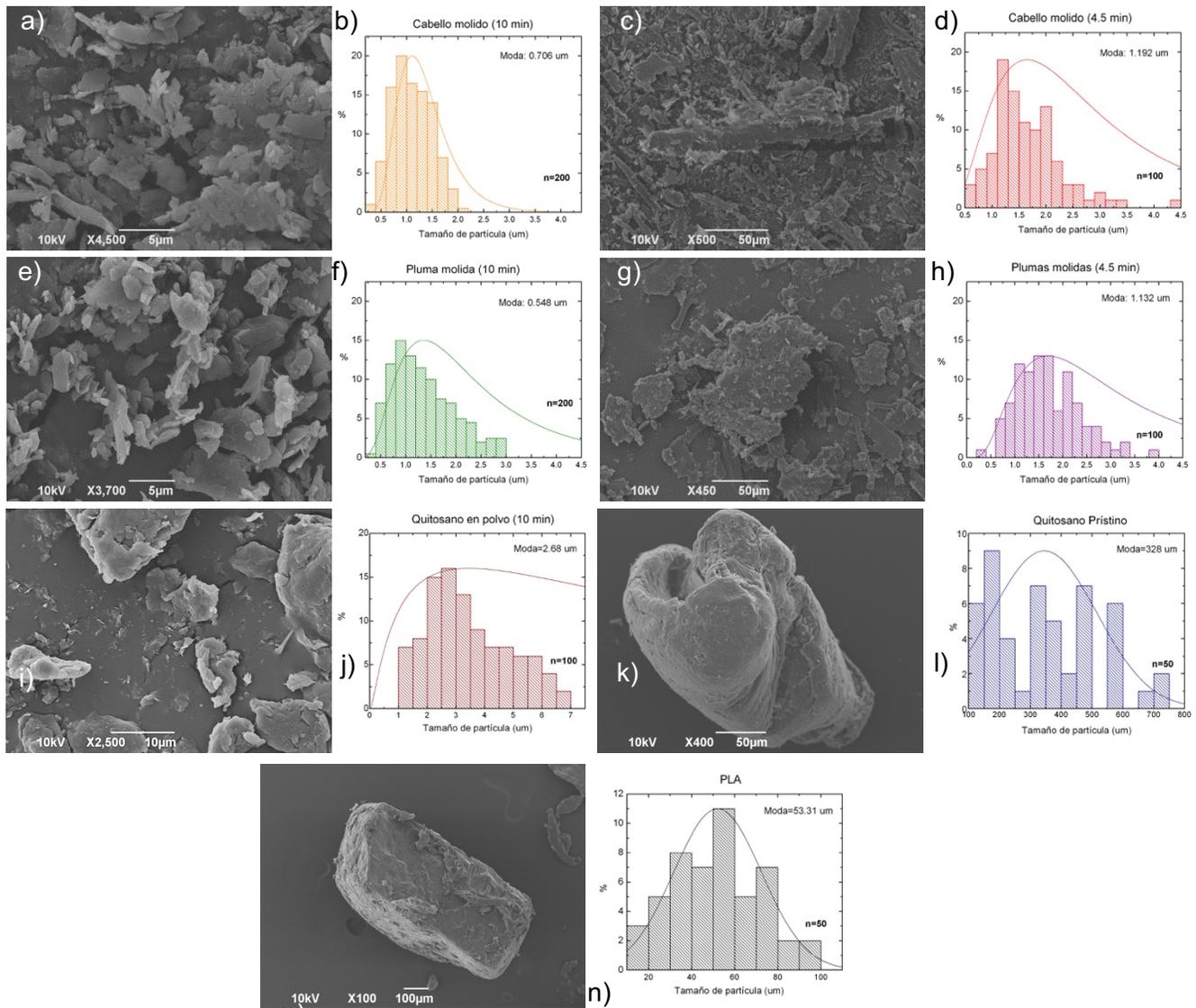


Fig 17. Imágenes e histogramas SEM materiales iniciales a,b) Cabello molido por 10 min, y c,d) Cabello molido durante 4.5 min, e,f) Plumas molidas por 10 min, g,h) Plumas molidas por 4.5 min, i,j) Quitosano molido por 10 min, k,l) Quitosano prístino y m,n) PLA.

En el caso del cabello de humano y la pluma de pollo después de la molienda por 10 min, es posible obtener un tamaño de partícula de 0.706 µm y 0.548 µm respectivamente, mientras que en el caso del quitosano, antes de ser molido tiene un tamaño de fibra a lo largo de 328 µm, pero después de ser molido durante 10 minutos es posible asegurar un tamaño de partícula de 2.68 µm. En el caso del PLA, al ser molido en un molino de cuchillas, se asegura un tamaño de partícula de 53.31 µm.

4.1.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

Como análisis extra, se optó por hacer un análisis termogravimétrico (TGA) con el fin de conocer el comportamiento de los materiales de inicio con respecto a la temperatura. La queratina de cabello y de pluma, y el PLA fueron analizados usando TGA, como se muestra en la figura 18, el quitosano no se analizó mediante esta técnica debido a que se tomaron los datos que vienen en la ficha técnica del reactivo.

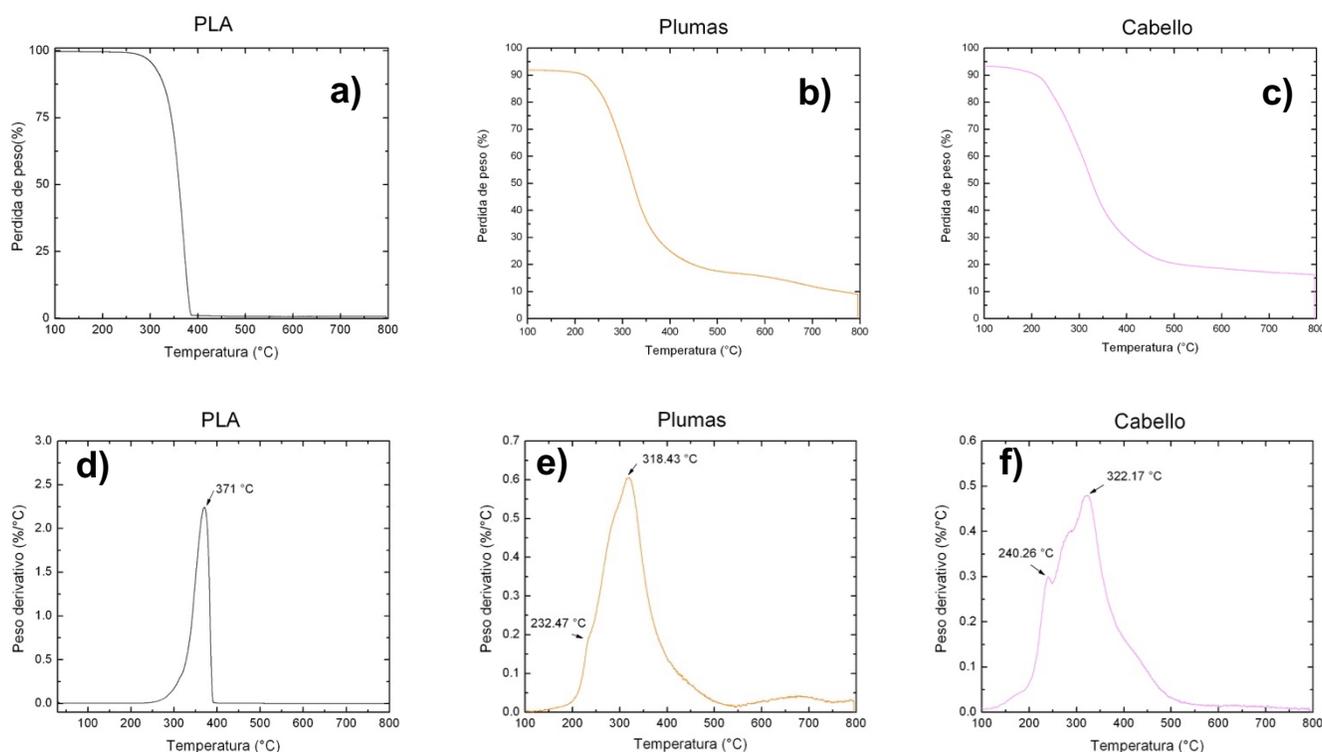


Fig 18. TGA y dTGA materiales iniciales a) TGA PLA, b) TGA de queratina de plumas, c) TGA de queratina de cabello, d) dTGA PLA, e) dTGA de queratina de plumas y f) dTGA de

El TGA registra la variación en la masa del material a medida que la temperatura aumenta a una velocidad térmica constante y el dTGA muestra la temperatura a la que se degrada el material. Los resultados en la figura de TGA, los incisos a), b) y c) muestran que las dos muestras de queratina (plumas y cabello) son estables hasta 230°C, y hay una pérdida de peso de 230°C a 500°C con un rango reducido de hasta 74% para la queratina de plumas y 73% para la queratina de cabello. Estos valores obtenidos son consistentes con los reportados en la literatura, donde se muestran degradaciones en el rango de 70-80% (Bomou Ma, et al. (2016)). Esta disminución está asociada con la desnaturalización de la estructura helicoidal y la destrucción de los eslabones de la cadena, los puentes peptídicos y la degradación de la estructura de la cadena principal de la queratina (Bomou Ma, et al.

(2016)). En el caso del PLA, el TGA muestra sólo un paso de degradación a 300°C y pierde el 98% de su peso.

La primera derivada de las curvas TGA se traza para determinar los puntos de inflexión útiles para una visualización clara de la pérdida de peso máxima. (A. W. Coats y J. P. Redfern, 1963). Los resultados muestran que en el caso de la pluma y el cabello, la descomposición térmica comenzó a 232.47°C y 240.26°C respectivamente, para luego mostrar una pérdida de peso acelerada a 318°C y 322°C respectivamente, debido a la descomposición de la queratina (73-74%). Además, la temperatura de degradación central del PLA es de 370°C.

4.2 Impresiones 3D

Como se menciona en el capítulo de metodología, se utilizaron dos diferentes tipos de refuerzo para la impresión de materiales 3D. En la figura 19 se muestran las muestras impresas usando fibras como refuerzo con un tamaño de aproximadamente 0.5 mm a diferentes concentraciones en México, mientras que en la figura 20 se muestran los materiales hechos a partir de partículas como refuerzo de un tamaño de entre 0.5 μm y 2.6 μm a diferentes concentraciones en Italia, ambos tipos de muestras fueron impresas a la misma temperatura de 210°C como lo indica el capítulo de metodología.

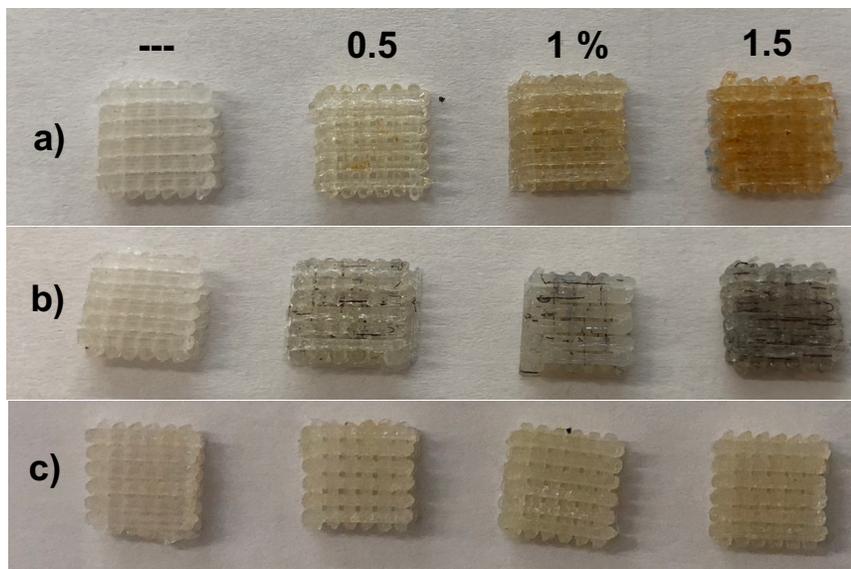


Fig 19. Muestras impresas usando fibras como refuerzo a diferentes concentraciones, a)PLA-Pluma de pollo, b) PLA-Cabello de humano y c) PLA-Quitosano.

Para el caso de los materiales impresos con fibra de queratina de pluma y queratina de cabello, es muy visible la fibra de la queratina dentro de la matriz de PLA y como aumenta la cantidad de fibras conforme a su concentración. Las muestras impresas con fibra de quitosano no presentan un gran cambio en su color entre los que contienen quitosano y el blanco.

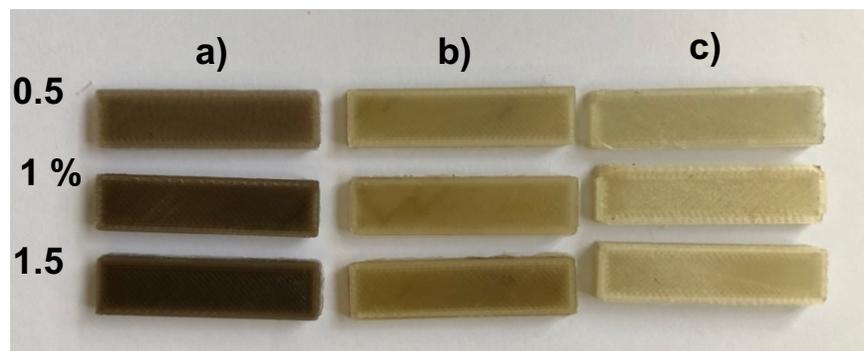


Fig 20. Muestras impresas usando partículas como refuerzo a diferentes concentraciones, a)PLA-Cabello de humano, b) PLA- Pluma de pollo y c) PLA-Quitosano.

Por otro lado, las muestras impresas con partículas como refuerzo muestran un color mas uniforme en todo el material, además, en el caso de las muestras de PLA-Queratina de cabello reforzado con fibras, el cabello mantiene su color natural (negro) y cuando el cabello es molido y se incorpora a la matriz de PLA para las muestras reforzadas con partículas, muestra un color café en todo el material. Ambos tipos de materiales con distintos refuerzos intensifican su color conforme aumenta su concentración. Debido a estos resultados, se opto por hacer las combinaciones de PLA-Quitosano-Queratina (98%-1.5%-0.5%) utilizando los refuerzos a base de partículas, esto debido al su notoria mejor distribución de refuerzo en la matriz en comparación con los refuerzos en forma de fibra.

4.2.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los materiales obtenidos por impresión 3D tanto con fibras como con partículas, fueron analizados por FTIR para conocer los grupos funcionales presentes en cada muestra, en la figura 21 se pueden observar los espectros obtenidos y en la tabla 4 el resumen de las bandas encontradas en los espectros.

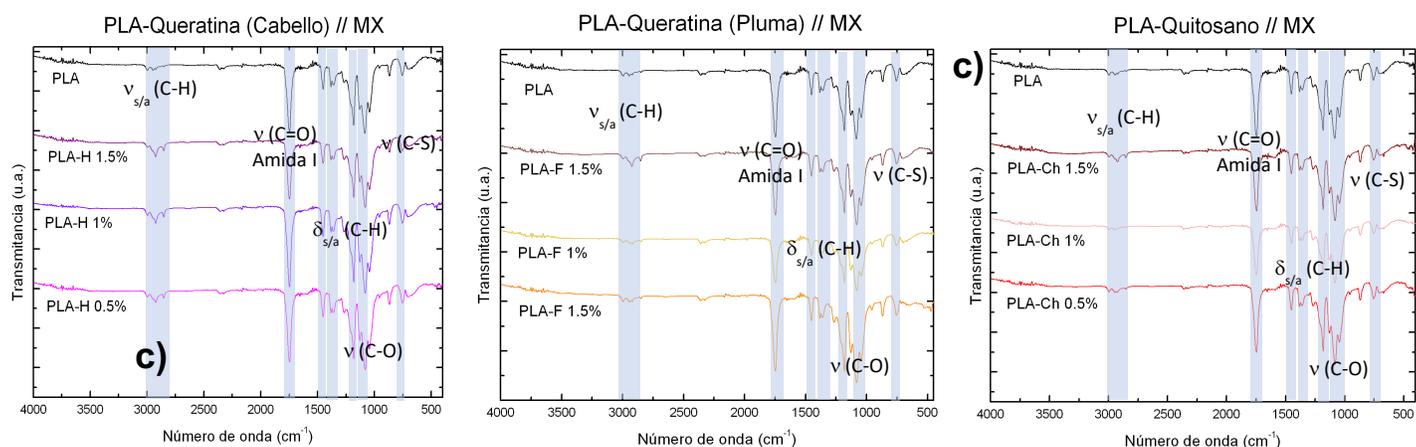


Fig 21. Espectros de FTIR de materiales impresos con refuerzo en forma de fibra, a)PLA- Cabello de humano, b) PLA- Pluma de pollo y c) PLA-Quitosano.

Tabla 4. Grupos funcionales y longitudes de onda aproximadas de los materiales impresos con fibras.

λ aprox. (cm^{-1})	Grupo funcional
2930/2840	$\nu_{s/a}$ (C-H)
1750	ν (C=O)
1480/1371	$\delta_{s/a}$ (C-H)
1120	ν (C-O)
875	ν (C-C)

Los materiales obtenidos por impresión 3D con fibras no muestran cambio en sus bandas entre una muestra y otra, esto es porque los materiales utilizados para su elaboración son muestras orgánicas y comparten grupos funcionales. Dentro de los espectros se muestran las bandas pertenecientes al PLA: el estiramiento asimétrico y simétrico de (C-H) a los 2930 cm^{-1} y 2840 cm^{-1} respectivamente, la deformación simétrica y asimétrica de (C-H) a 1480

cm^{-1} y 1371 cm^{-1} , la vibración del grupo carbonilo de la amida I ($\text{C}=\text{O}$) a los 1750 cm^{-1} y finalmente la banda vibracional de ($\text{C}-\text{O}$) la vemos en 1120 cm^{-1} .

En el caso de las muestras hechas con refuerzo en partícula hechas en Italia, los espectros se muestran en la figura 22 y se resumen las bandas encontradas en la tabla 5.

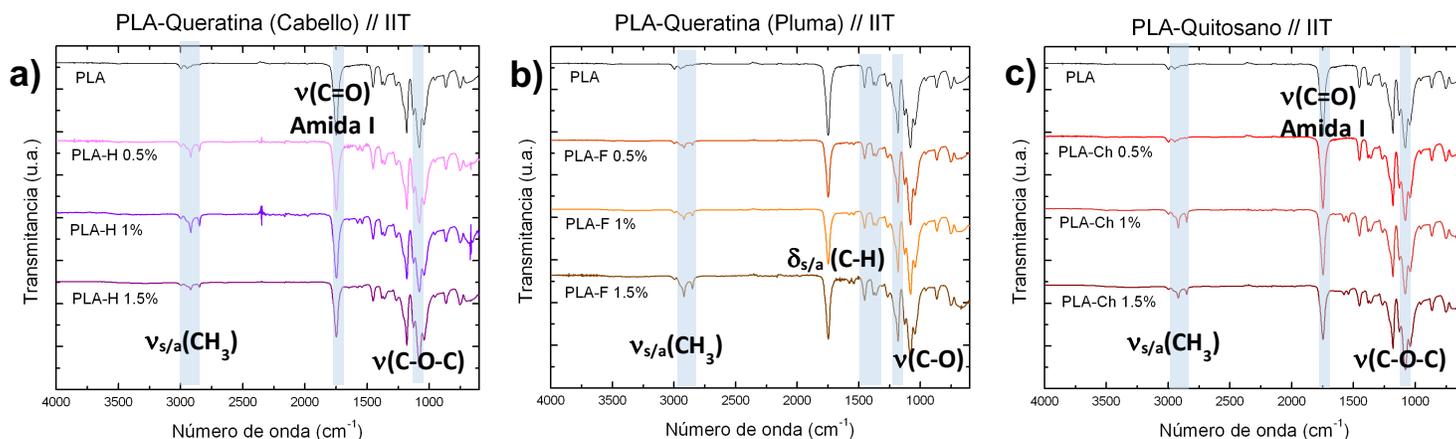


Fig 22. Espectros de FTIR de materiales impresos con refuerzo en forma de partícula, a)PLA-Cabello de humano, b) PLA- Pluma de pollo y c) PLA-Quitosano.

Tabla 5. Grupos funcionales y longitudes de onda aproximadas de los materiales impresos con partículas.

λ aprox. (cm^{-1})	Grupo funcional
2930/2840	$\nu_{s/a}(\text{C}-\text{H})$
1750	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1480/1371	$\delta_{s/a}(\text{C}-\text{H})$
1120	$\nu(\text{C}-\text{O})$
875	$\nu(\text{C}-\text{C})$

Al igual que con los espectros de los materiales impresos con fibra como refuerzo, los materiales impresos con partícula como refuerzo solamente muestran las bandas características del PLA.

Los espectros de los materiales PLA-Quitosano-Queratina de cabello y PLA-Quitosano-Queratina de pluma (98%-1.5%-0.5%) se muestran en la figura 23 y el resumen de sus bandas en la tabla 6.

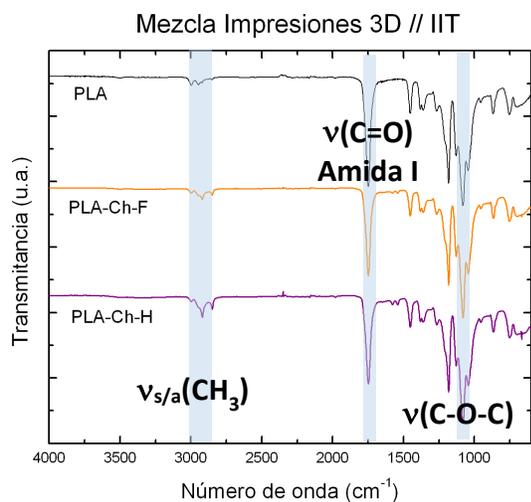


Fig 23. Espectros de FTIR de materiales impresos PLA-Quitosano-Queratina.

Tabla 6. Grupos funcionales y longitudes de onda aproximadas de los materiales impresos PLA-Quitosano-Queratina.

λ aprox. (cm^{-1})	Grupo funcional
2930/2840	$\nu_{s/a}$ (C-H)
1750	ν (C=O)
1480/1371	$\delta_{s/a}$ (C-H)
1120	ν (C-O)
875	ν (C-C)

Al igual que con los espectros de los materiales hechos con refuerzo de partícula y fibras, dentro del espectro de la combinación de PLA-Quitosano-Queratina de pluma y PLA-Quitosano-Queratina de cabello, solamente muestra las bandas características del PLA.

4.2.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las imágenes para los materiales hechos por impresión 3D utilizando fibras como refuerzo, se muestran en la figura 24.

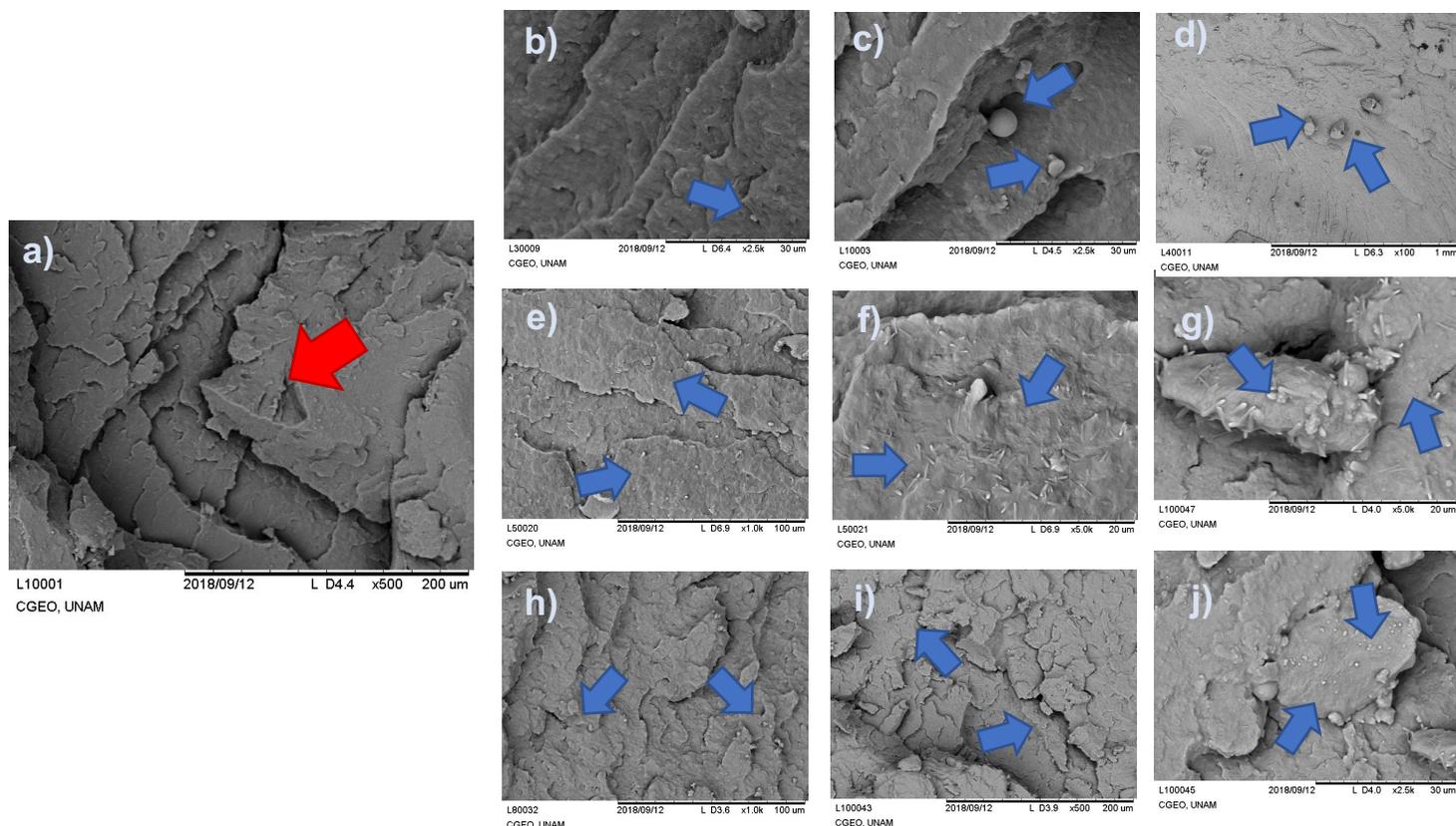


Fig 24. Imágenes SEM de materiales impresos en 3D de materiales hechos con fibra como refuerzo, fotos tomadas transversalmente, a) PLA, b) PLA-Cabello 0.5%, c) PLA-Cabello 1%, d) PLA-Cabello 1.5%, e) PLA-Plumas 0.5%, f) PLA-Plumas 1%, g) PLA-Plumas 1.5%, h) PLA-Quitosano 0.5%, i) PLA-Quitosano 1% y j) PLA-Quitosano 1.5%.

Con base a que en las imágenes observadas por SEM para la impresión 3D de los materiales hechos con fibra como refuerzo, marcados en una flecha azul se logra apreciar como se encuentra el cabello, la pluma y el quitosano en forma de fibra dentro de la matriz de PLA. En el caso de las muestras de PLA-Queratina de cabello en los incisos b), c) y d) se observa perfectamente la forma cilíndrica del cabello, para el caso de los materiales de PLA-Queratina de pluma se logra observar en los incisos e), f) y g) algunas pequeñas bárbulas dentro del material y por último para las muestras de PLA-Quitosano los incisos h), i) y j) se observan algunos grumos de quitosano dentro de la matriz de PLA.

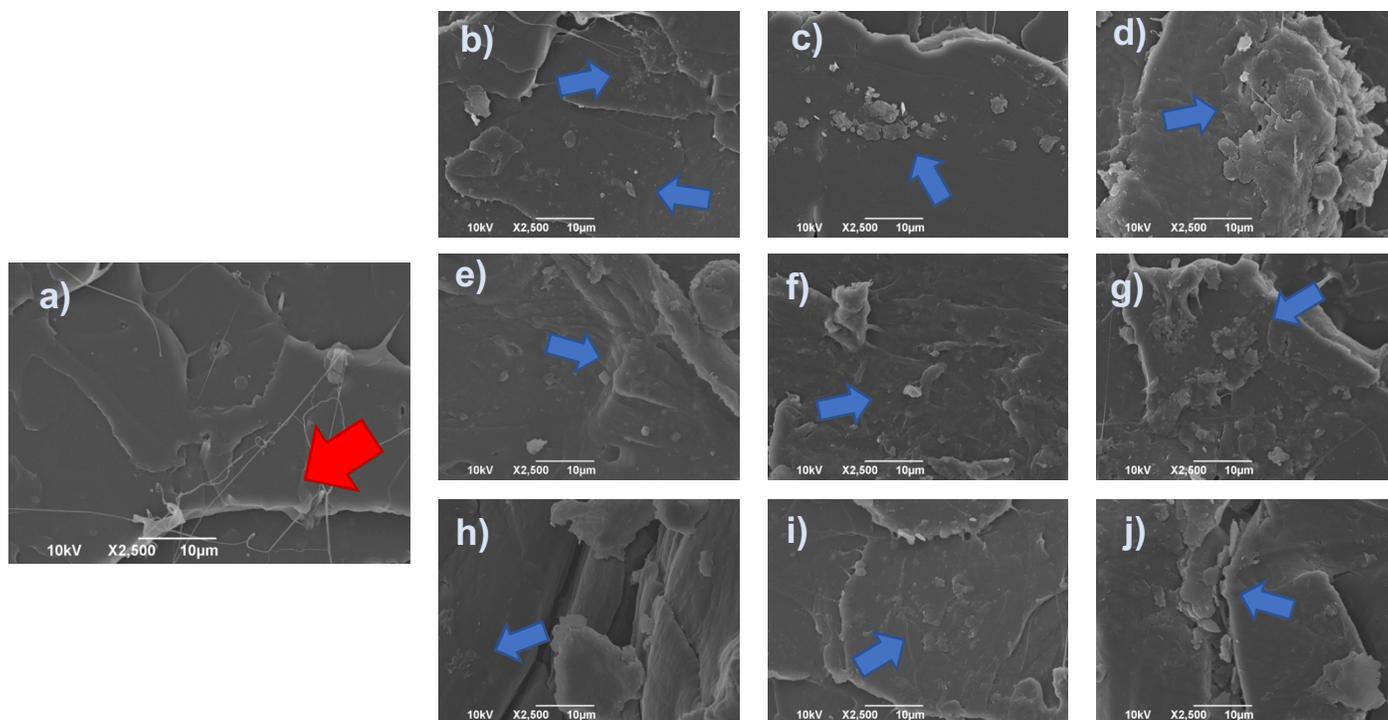


Fig 25. Imágenes SEM de materiales impresos en 3D de materiales hechos con partículas como refuerzo, fotos tomadas transversalmente, a) PLA, b) PLA-Cabello 0.5%, c) PLA-Cabello 1%, d) PLA-Cabello 1.5%, e) PLA-Plumas 0.5%, f) PLA-Plumas 1%, g) PLA-Plumas 1.5%, h) PLA-Quitosano 0.5%, i) PLA-Quitosano 1% y j) PLA-Quitosano 1.5%.

Los resultados del SEM del PLA blanco, PLA-Quitosano, PLA-Queratina de pluma y PLA-Queratina de cabello diferentes concentraciones (0.5%, 1% y 1.5%) de la figura 25, muestran cómo el PLA prístino (inciso a)) tiene una superficie sin agregados, pero en el caso de muestras de PLA-quitosano, PLA-plumas y PLA-Cabello es posible apreciar que las partículas aumentan a medida que aumenta la concentración. Para las muestras en los incisos d), g) y j) con la mayor concentración (1,5%) de refuerzos, se puede observar existen aglomerados marcados con flechas azules.

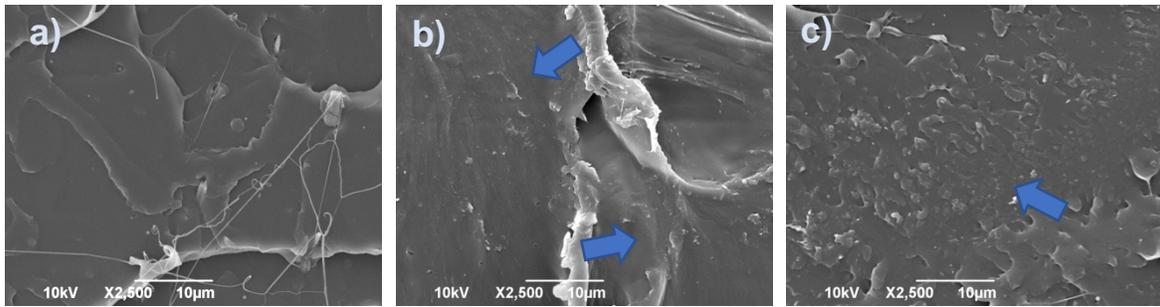


Fig 26. Imágenes SEM de materiales impresos en 3D de materiales hechos con partículas como refuerzo mezcla PLA-Quitosano-Queratina, fotos tomadas transversalmente, a) PLA, b) PLA-Quitosano 1.5%-Cabello 0.5%, c) PLA-Quitosano 1.5%-Pluma 0.5%

Los resultados de la figura 26 muestran que al mezclar PLA-Quitosano-Cabello o PLA-Quitosano-Plumas la superficie de las muestras se vuelve heterogénea y aglomerada en comparación con PLA prístina y las muestras que contienen sólo la matriz de PLA y un material de refuerzo. Es posible apreciar cómo hay partículas de los refuerzos esparcidas por toda la superficie de PLA, pero éstas no se convierten en grandes cúmulos de aglomerados.

Con base en las investigaciones hechas por el grupo de trabajo de Chacón, se puede confirmar que el tipo de fractura que se presenta en todas las muestras es de tipo frágil (Chacón J.M., et al., 2017) en la flecha marcada con rojo se logra observar el tipo de fractura que presenta el PLA es característico del tipo frágil.

4.2.3 Raman

La espectroscopia Raman permite analizar los grupos funcionales presentes en los materiales impresos (con refuerzo en fibra y hojuela). Esta caracterización se lleva a cabo con el objetivo de complementar los resultados obtenidos en FTIR y observar posibles grupos funcionales que no sean distinguibles en esta técnica. Los espectros Raman de los materiales hechos con fibra en México como refuerzo se muestran en la figura 27.

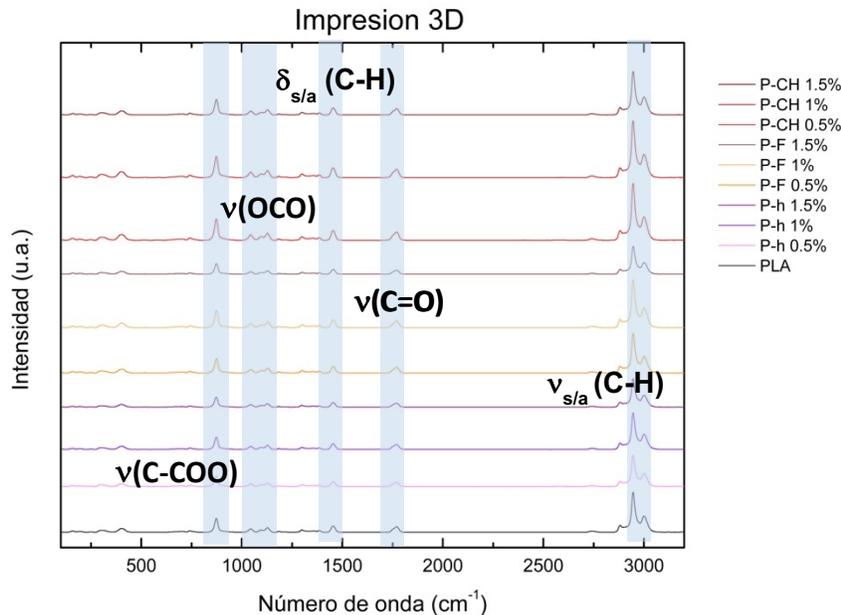


Fig 27. Espectros de Raman de materiales impresos con refuerzo en forma de fibra.

Dentro de los espectros de las muestras de impresión 3D con fibras como refuerzo, solamente se logran apreciar las bandas características del PLA, sus bandas de estiramiento simétricas y asimétricas de C-H del grupo metil (CH_3) se observaron a 3045 cm^{-1} y 2957 cm^{-1} (Shoab Mallick, et al., 2018). También, exhiben la banda característica de C=O con un pico a 1770 cm^{-1} y un hombro a 1754 cm^{-1} . Los picos de 1454 cm^{-1} , 1387 cm^{-1} y 1129 cm^{-1} se asignan a los modos de balanceo asimétrico y simétrico y de flexión de CH_3 respectivamente; mientras que los picos de 1182 cm^{-1} y 1096 cm^{-1} corresponden al modo de estiramiento OCO. La flexión CH, el estiramiento C- CH_3 y el estiramiento C-COO aparecen a 1297 cm^{-1} , 1045 cm^{-1} y 875 cm^{-1} , respectivamente (Wanwei Zhang, et al., 2017).

4.2.4 Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

Los resultados del DMA para las muestras de PLA, PLA-Quitosano, PLA-Cabello y PLA-Pluma de los materiales hechos con fibra como refuerzo se muestran en la figura 28.

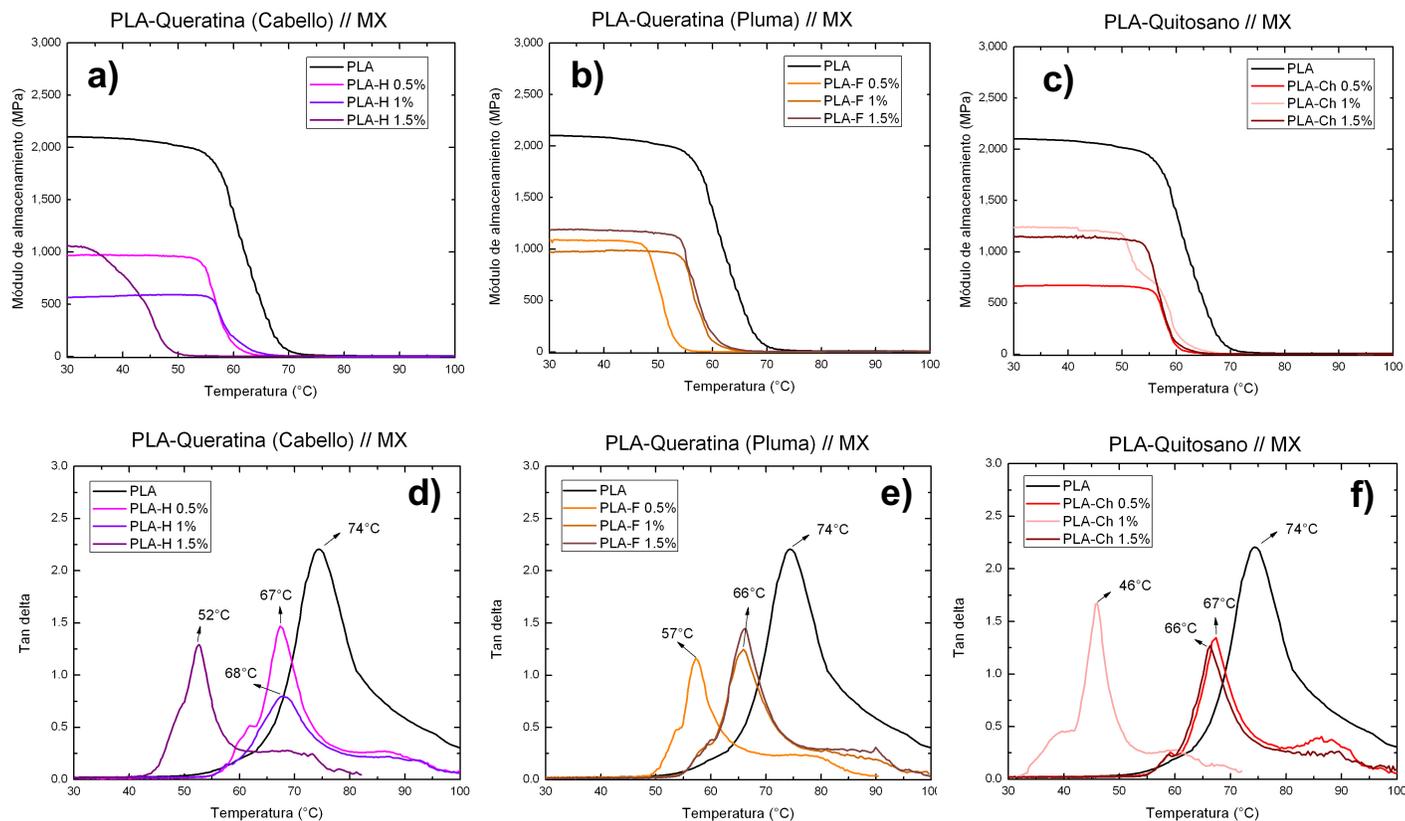


Fig 28. Resultados de la DMA de materiales impresos en 3D con fibra como refuerzo, a) PLA-Cabello, b) PLA-Plumas, c) PLA-Quitosano, d) Tan delta PLA-Cabello, e) Tan delta PLA-Plumas y f) Tan delta PLA-Quitosano.

Los resultados del DMA permiten complementar la caracterización de los materiales, ya que con estos datos podemos examinar la capacidad del material para devolver o almacenar energía con su módulo de almacenamiento, su temperatura de transición vítrea (T_g) a la cual las cadenas poliméricas empiezan a moverse y su capacidad de amortiguamiento de la energía con los picos de Tan Delta (Kevin P. Menard, 1999). Los gráficos del DMA muestran que el módulo de almacenamiento es de 2100 MPa para el PLA puro, y que los materiales impresos con fibra como refuerzo tienen un módulo de almacenamiento menor, debido a esto es posible afirmar que el refuerzo en forma de fibra está provocando que los materiales tengan un comportamiento viscoelástico. La mejor concentración para la muestra de PLA-Cabello es la de 1.5% con un módulo de almacenamiento de 1100 MPa,

para la muestra PLA-Pluma la mejor concentración fue de 1.5% con 1200 MPa y finalmente para la muestra de PLA-Quitosano la mejor concentración fue de 1% con un valor en el modulo de almacenamiento de 1250 MPa. Es importante mencionar que, al añadir el refuerzo en forma de fibra a la matriz de PLA, se genera una inestabilidad térmica en las muestras, ya que en las graficas se aprecia como el modulo de almacenamiento tiene una caída prominente a una menor temperatura que el PLA blanco, lo cual se comprueba con la graficas de los picos de Tan Delta.

Las graficas d), e) y f) nos muestran la temperatura de transición vítrea (Tg) de cada material. En el caso del PLA blanco tiene una Tg de 74°C, mientras que la concentración mínima (0.5%) de los materiales PLA-Cabello, PLA-Pluma y PLA-Quitosano tienen una Tg de 67°C, 57°C y 46°C, respectivamente. De igual manera, con ayuda de estas graficas de Tan delta es notorio como la capacidad de amortiguamiento que tiene la matriz de PLA disminuye considerablemente cuando se le añaden los refuerzos en fibras, ya que los picos de Tan delta disminuyen considerablemente.

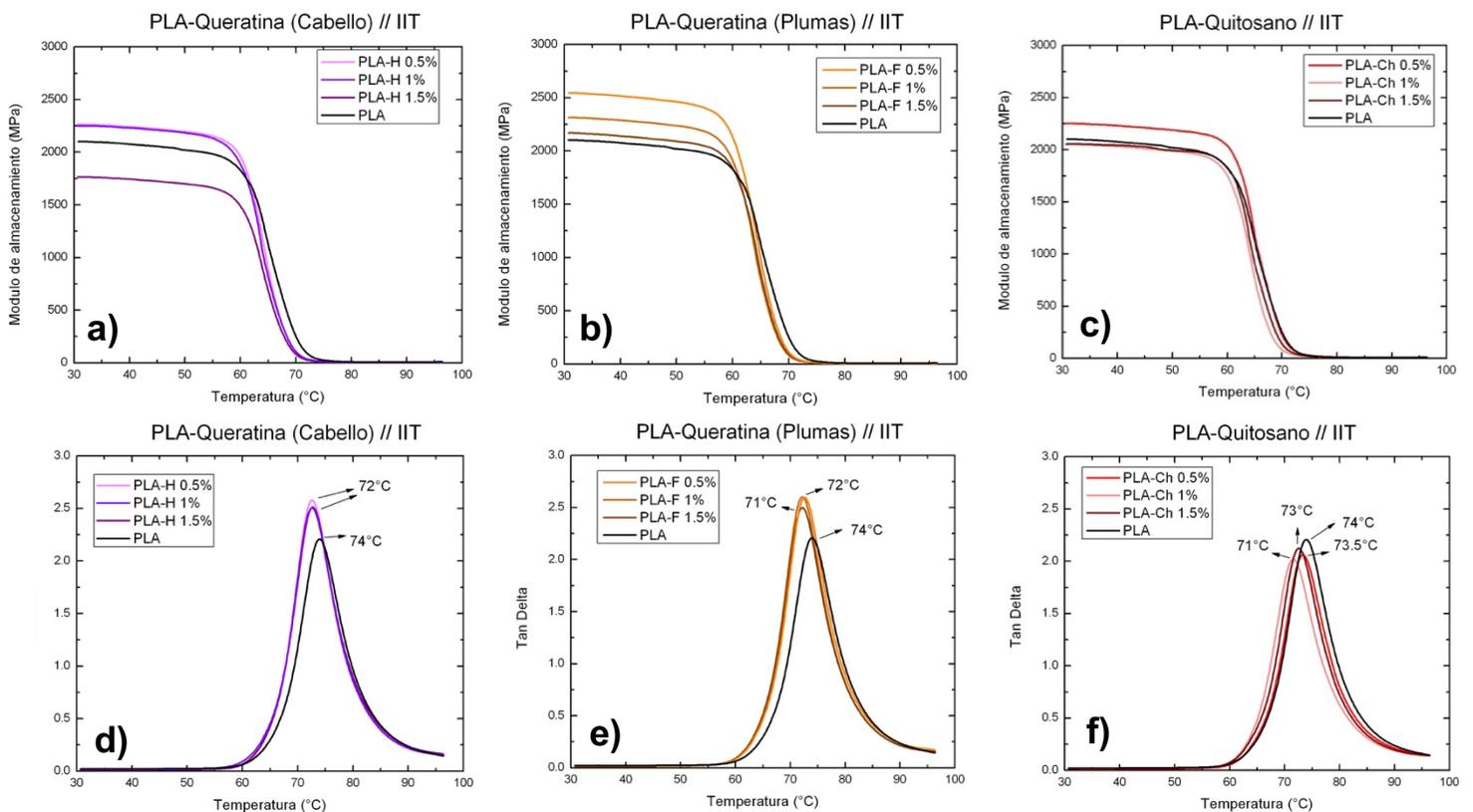


Fig 29. Resultados de la DMA de materiales impresos en 3D con partículas como refuerzo, a) PLA-Cabello, b) PLA-Plumas, c) PLA-Quitosano, d) Tan delta PLA-Cabello, e) Tan delta PLA-Plumas y f) Tan delta PLA-Quitosano.

La figura 29 muestra los resultados de DMA de los materiales hechos con partículas como refuerzos en Italia, el modulo de almacenamiento del PLA es el mismo que con los materiales hechos con fibra como refuerzo (2100 MPa). Las graficas a), b) y c) muestran que la concentración de 0.5% para PLA-Quitosano, PLA-Cabello y PLA-Plumas se tiene un módulo de almacenamiento de 2200 MPa, 2550 MPa y 2250 MPa respectivamente, estas concentraciones obtienen materiales más rígidos que los materiales con una mayor concentración de quitosano, pelo o plumas (1% y 1.5%). Los valores del Módulo de Almacenamiento de todos los materiales con la concentración más baja son más altos que el resto de las concentraciones en todo el rango de temperatura del experimento, lo que indica que la concentración más baja podría actuar como relleno de refuerzo efectivo y tiene la mejor dispersión de pelo, plumas o quitosano en la matriz PLA.

Como se menciona anteriormente, la temperatura del pico tan delta está relacionada con la temperatura de transición vítrea (Tg), para el PLA este valor es de 74°C, en el caso de la queratina PLA-Cabello las tres concentraciones tienen una Tg de 72°C, mientras que para las plumas PLA la concentración más alta tiene una Tg de 71°C, las concentraciones medias y bajas tienen una Tg de 72°C y finalmente, en el caso del PLA-quitosano, la concentración de 0.5% tiene un Tg de 73.5°C, en 1% un Tg de 73°C y para 1.5% un Tg de 71°C. Estos resultados nos muestran que añadir refuerzo en forma de hojuela no afecta significativamente la estabilidad térmica de los materiales, pero por otro lado, dentro de las graficas d) y e) es notable como el pico de Tan delta para el caso de los materiales que contienen queratina son mas altos que el pico Tan delta del PLA prístino, esto nos indica que la queratina (de cabello o pluma) dentro de la matriz de PLA en forma de partículas, favorece la capacidad de amortiguamiento del material.

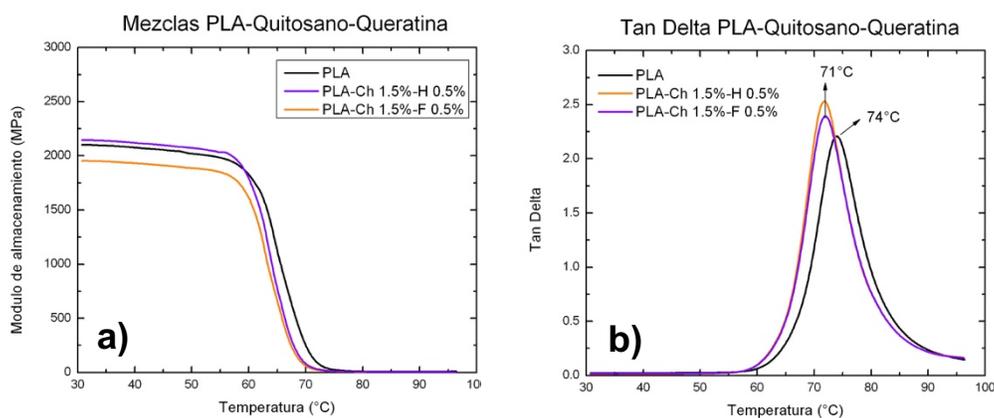


Fig 30. Resultados de la DMA de materiales impresos en 3D con partículas como refuerzo PLA-Quitosano-Queratina, a) Modulo de almacenamiento, b) Tan Delta.

Con base a los resultados de DMA para las mezclas poliméricas de PLA-Quitosano 1.5%-Cabello 0.5% y PLA-Quitosano 1.5%-Pluma 0.5% es posible conocer los valores de modulo de almacenamiento de ambas muestras, los cuales son 2200 MPa y 1950 MPa, respectivamente, también es posible apreciar como la mezcla de quitosano y queratina dentro de la matriz de PLA no provoca inestabilidad térmica en el material, lo cual se comprueba con las graficas de Tan delta. Por otro lado, en el caso de la muestra de PLA-Quitosano-Cabello se observa como estos refuerzos provocan que el material tenga un comportamiento más rígido que el PLA blanco, sin embargo, la muestra de PLA-Quitosano-Pluma tiene un comportamiento más viscoelástico.

Las graficas de Tan delta indican que efectivamente no hay una gran inestabilidad térmica en los materiales, ya que ambos tienen una Tg de 71°C, mientras que el PLA blanco una Tg de 74°C. Adicional a esto, la grafica de Tan Delta muestra como el añadir la mezcla de refuerzos quitosano-queratina a la matriz de PLA, mejora la capacidad del material de amortiguar la energía que se le suministra.

4.2.5 Pruebas de biocompatibilidad

Las pruebas de biocompatibilidad se dividen en dos caracterizaciones, la primera es utilizando el ensayo del MTT para conocer si existe crecimiento celular en presencia de los materiales realizados y la segunda es sobre pruebas de adhesión celular, esta última prueba utiliza la microscopía confocal para observar la fluorescencia de las células una vez añadidas a los materiales realizados. Los resultados obtenidos para los andamios, tanto con fibra y hojuela como refuerzo obtenidos vía impresión 3D son los mostrados en la figura 31.

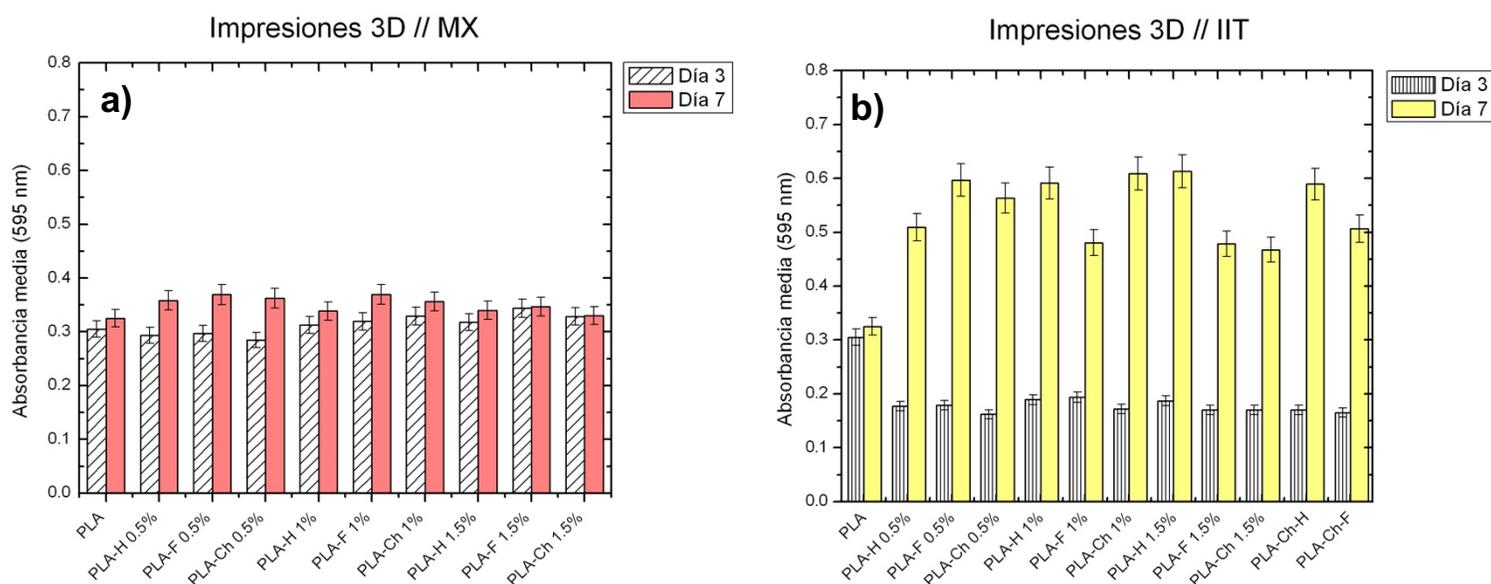


Fig 31. Ensayo de MTT a) Impresiones 3D hechas con fibra como refuerzo y b) impresiones 3D hechas con partículas como refuerzo.

La grafica a), que contiene la información sobre el crecimiento celular en presencia de los andamios hechos a base de fibra como refuerzo, se observa como no existe un cambio significativo entre el PLA blanco para los días 3 y 7 con las muestras de PLA-Quitosano, PLA-Cabello y PLA-Pluma independientemente de las concentraciones. La muestra de PLA-Pluma al 0.5% resulta ser la que mejor crecimiento celular tiene, sin embargo, es solamente un 15% superior al PLA blanco.

Por otro lado, en la grafica b) se logra observar como al añadir quitosano, queratina de cabello o queratina de pluma en forma de partículas al andamio, mejora considerablemente el crecimiento celular en comparación con la impresión que solo contiene PLA. El mejor resultado de la muestra de PLA-Cabello es la que tiene una concentración de 1.5%, la de

PLA-Pluma es la concentración de 0.5% y la mejor concentración de PLA-Quitosano es la de 1%, con unas mejoras del 81%, 87% y 85% respectivamente.

En la figura 32 se observan las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, el cual muestra los fibroblastos marcados con un marcador fluorescente DAPI (azul). En la imagen a) se distingue el citoesqueleto de la célula, el cual se muestra marcado en el círculo rojo y parece ser un volumen amorfo, mientras que dentro de cada citoesqueleto se distingue perfectamente su núcleo marcado por DAPI en azul. El resto de las imágenes de la figura 27 nos muestran los núcleos de cada célula, y dependiendo el color del núcleo, nos indica a que profundidad se encuentra localizada la célula dentro del andamio.

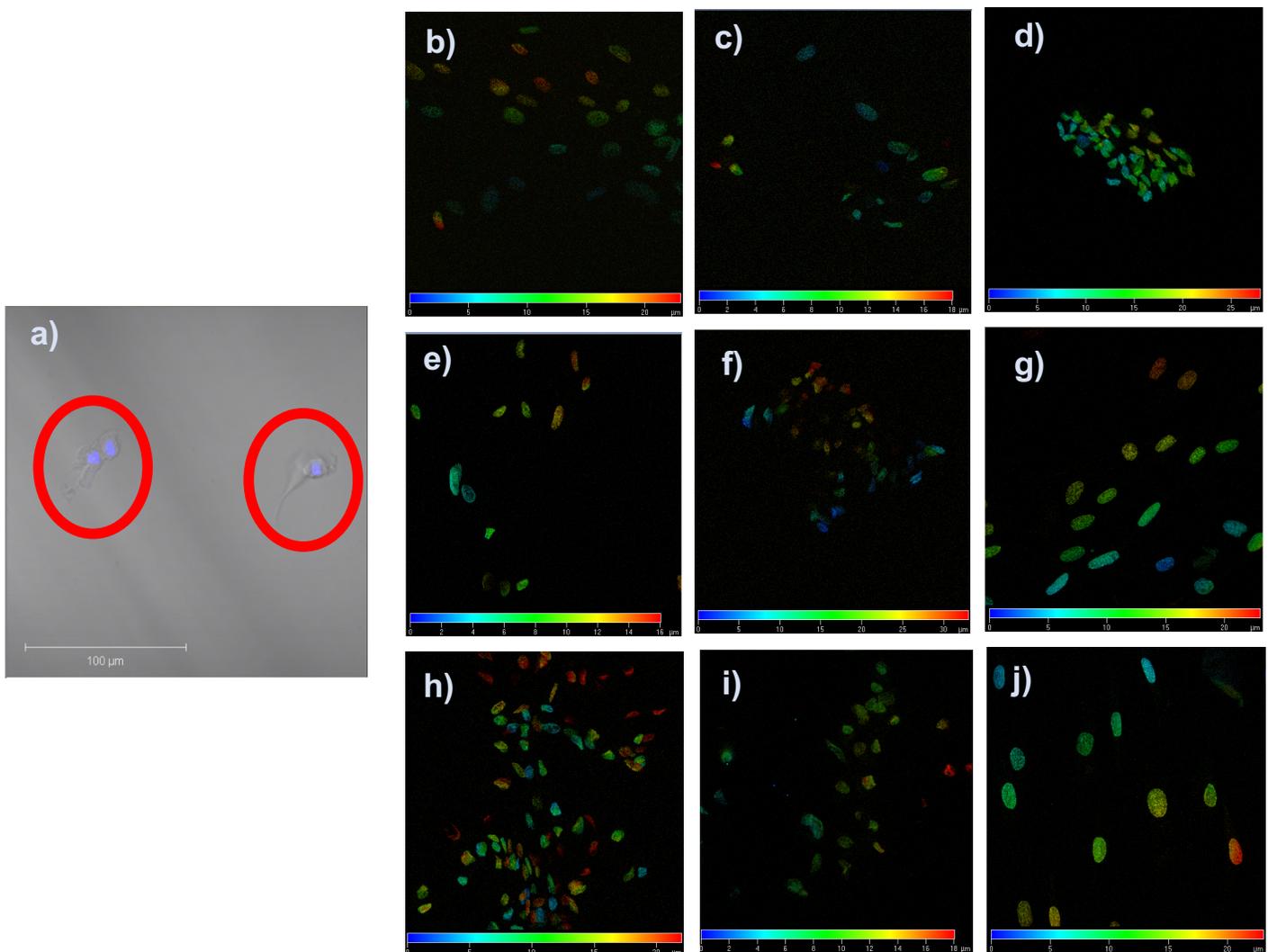


Fig 32. Imágenes del microscopio confocal de los materiales impresos con refuerzo en forma de fibra. a) Núcleo de fibroblasto marcado con DAPI , b) PLA-Cabello 0.5%, c) PLA-Cabello 1%, d) PLA-Cabello 1.5%, e) PLA-Plumas 0.5%, f) PLA-Plumas 1%, g) PLA-Plumas 1.5%, h) PLA-Quitosano 0.5%, i) PLA-

Con base en los resultados obtenidos en el microscopio confocal de las figuras 32 y 33 se puede afirmar que efectivamente las células se están adheriendo a los andamios hechos con fibra como refuerzo.

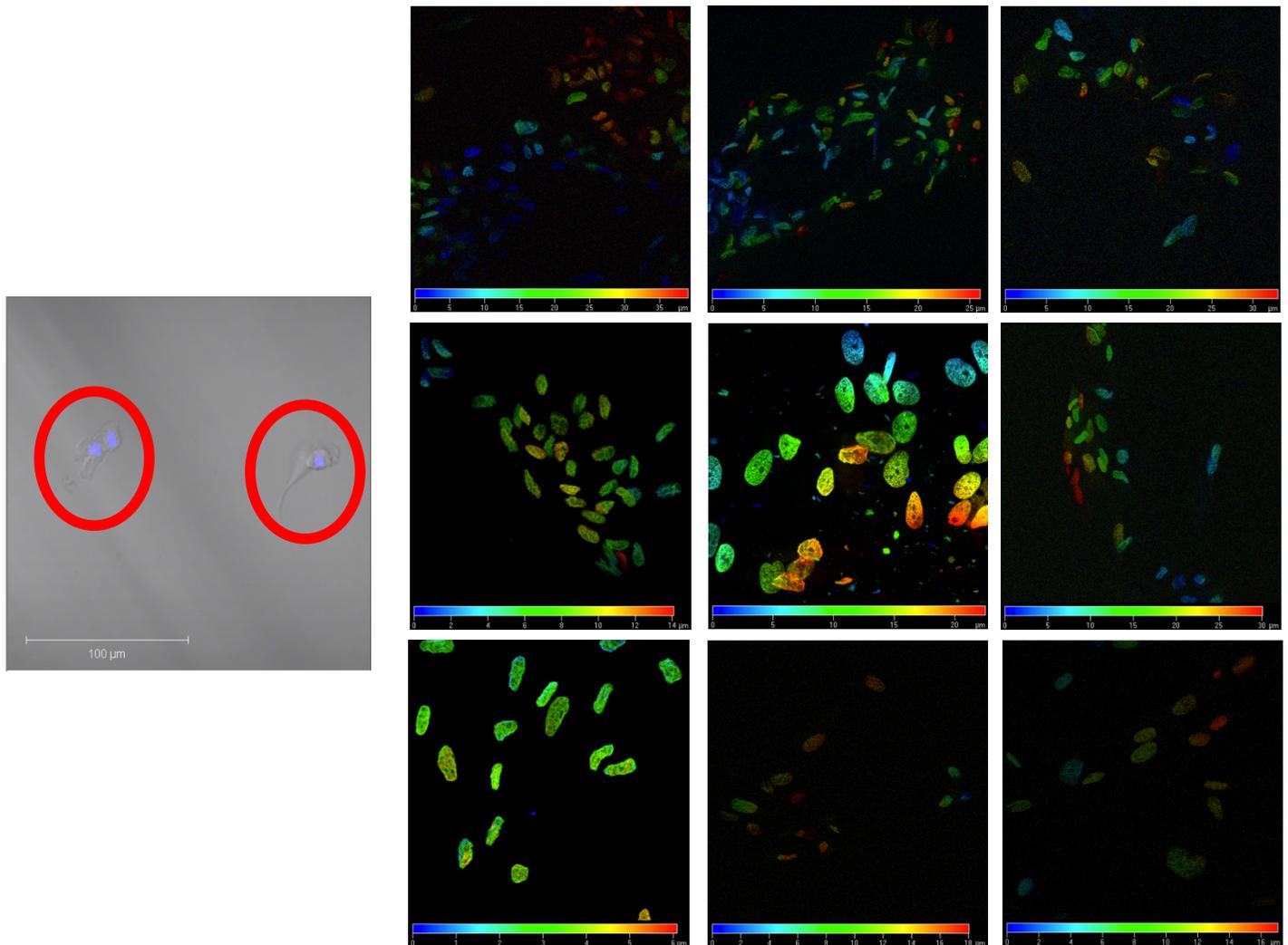


Fig 33. Imágenes del microscopio confocal de los materiales impresos con refuerzo en forma de partícula. a) Núcleo de fibroblasto marcado con DAPI, b) PLA-Cabello 0.5%, c) PLA-Cabello 1%, d) PLA-Cabello 1.5%, e) PLA-Plumas 0.5%, f) PLA-Plumas 1%, g) PLA-Plumas 1.5%, h) PLA-Quitosano 0.5%, i)

4.3 Electrohilado

Las muestras obtenidas por electrohilado se muestran en la figura 34, estos materiales tienen un espesor de aproximadamente 0.3 mm y las microfibras obtenidas son de color blanco independientemente de los materiales utilizados para su elaboración (PLA, quitosano o sal de queratina) y sus concentraciones.

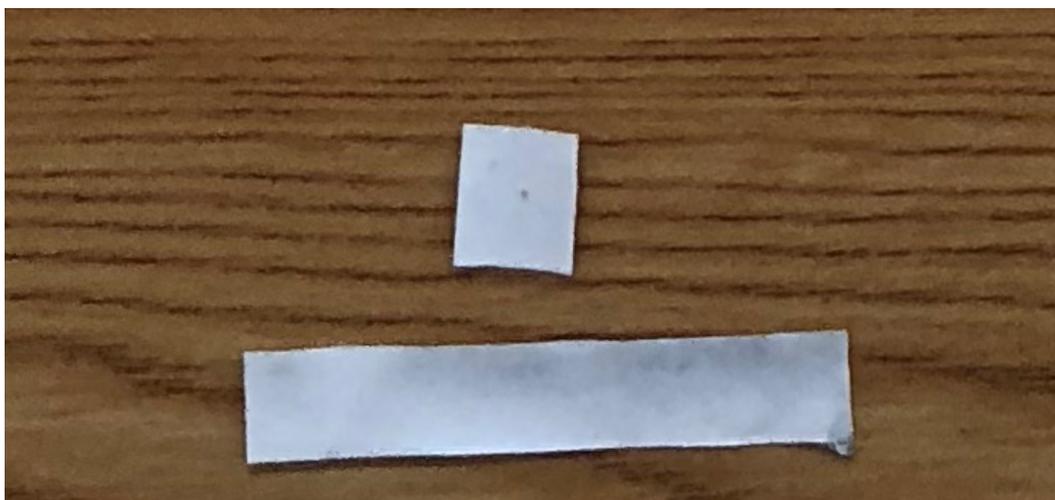


Fig 34. Muestras de electrohilado de PLA.

4.3.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de las muestras obtenidas a partir de la técnica de electrohilado, se muestran en la figura 35 y la tabla con el resumen de las bandas de los grupos funcionales encontrados dentro de los espectros se muestran en la tabla 7.

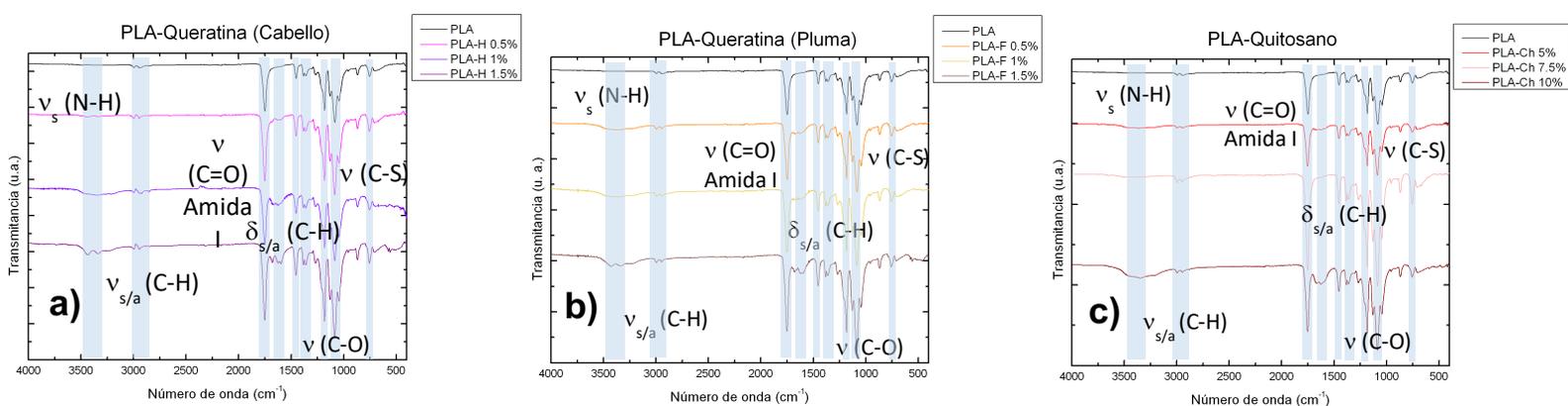


Fig 35. Espectros de FTIR de materiales electrohilados, a) PLA-Cabello de humano, b) PLA-Pluma de pollo y c) PLA-Quitosano.

Tabla 7. Grupos funcionales y longitudes de onda aproximadas de los materiales electrohilados.

λ aprox. (cm^{-1})	Grupo funcional
3300	ν_s (N-H)
2930/2840	$\nu_{s/a}$ (C-H)
1750	ν (C=O) Amida I
1540	δ_s (N-H) Amida II
1480/1371	$\delta_{s/a}$ (C-H)
1230	ν (C-N) Amida III
1120	ν (C-O)
875	ν (C-C)
750	ν (C-S)

El FTIR de los andamios obtenidos por electrohilado mostró las bandas características del PLA, quitosano y queratina: el pico característico del PLA a los 750 cm^{-1} , la vibración del grupo carbonilo (C=O) de la amida I en 1750 cm^{-1} , la deformación del N-H de la amida II a los 1540 cm^{-1} y la vibración de (C-N) en la amida III en 1230 cm^{-1} . Dentro de este mismo espectro se encuentran los picos correspondientes al quitosano: el estiramiento del N-H a 3300 cm^{-1} , el estiramiento asimétrico y simétrico de (C-H) a los 2930 cm^{-1} y 2840 cm^{-1} respectivamente, la deformación de (C-H) a 1480 cm^{-1} , la vibración del grupo carbonilo de la amida I (C=O) a los 1750 cm^{-1} , la deformación de (N-H) de la amida II a 1540 cm^{-1} , el estiramiento de la amida III (C-N) a 1230 cm^{-1} , la banda vibracional de (C-O) la vemos en 1120 cm^{-1} y finalmente al encontrarse más de tres CH_2 dentro de la estructura química del quitosano se logra observar un balanceo a los 720 cm^{-1} (Flores-Hernández et al., 2014).

En el espectro de PLA-queratina de diferentes fuentes (cabello y pluma de pollo) se lograron apreciar como las bandas características del PLA se hacían de nuevo presentes, pero esta vez para la queratina encontramos la banda del estiramiento asimétrico de (C-H) a 2930 cm^{-1} y su estiramiento simétrico a 2840 cm^{-1} , la vibración de la amida I (C=O) a 1750 cm^{-1} , la deformación de (N-H) amida II a 1540 cm^{-1} , la deformación del grupo metil (C-H) a 1480 cm^{-1} y finalmente el estiramiento de la amida III (C-N) a los 1230 cm^{-1} (Bomou Ma, et al., 2016).

4.3.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las fibras de PLA, PLA-Quitosano, PLA-Queratina de pluma y PLA-Queratina de cabello obtenidas mediante la técnica de electrohilado se observan en la figura 36.

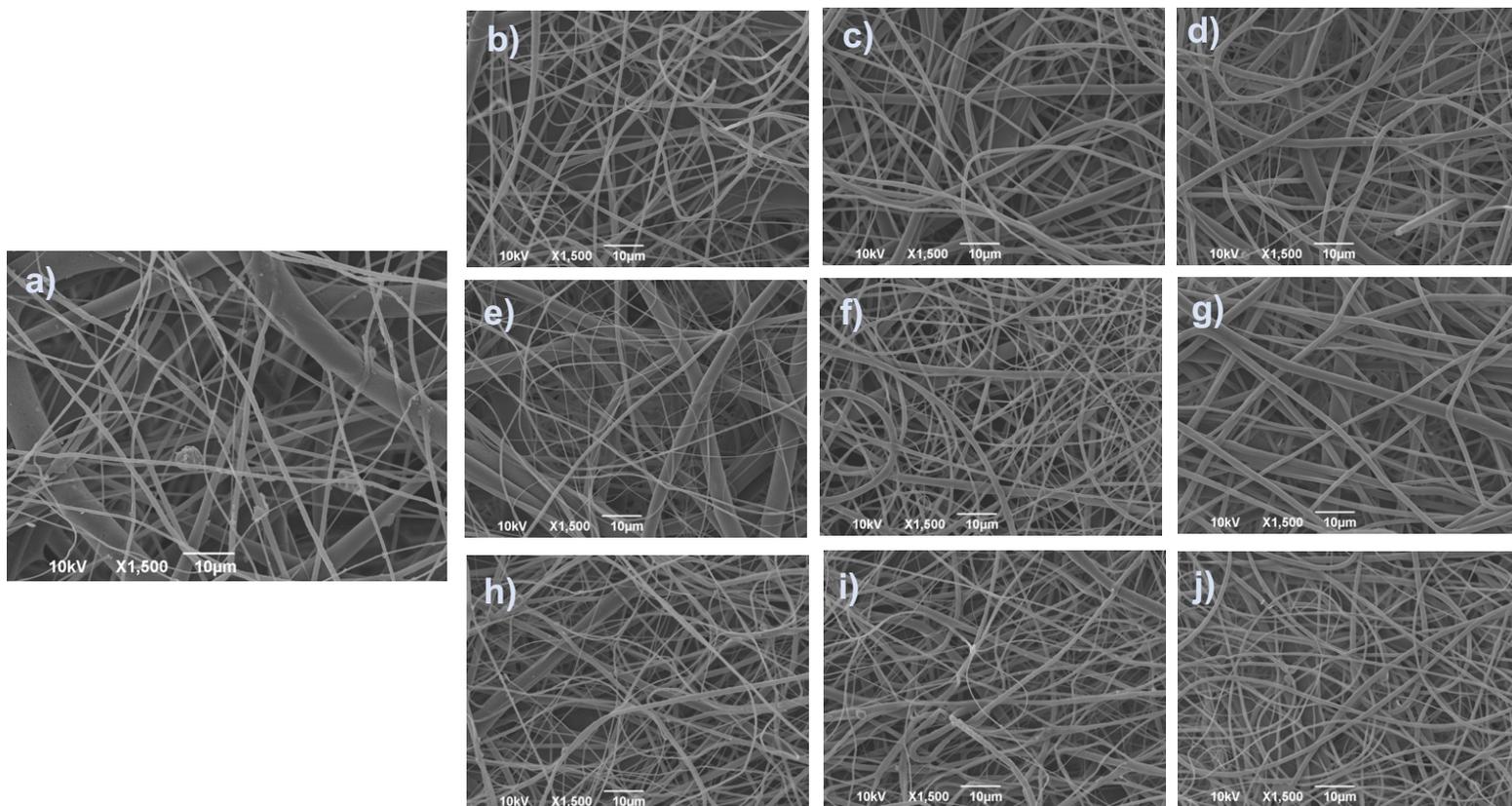


Fig 36. Imágenes SEM de materiales electrohilados, a) PLA, b) PLA-Cabello 0.5%, c) PLA-Cabello 1%, d) PLA-Cabello 1.5%, e) PLA-Plumas 0.5%, f) PLA-Plumas 1%, g) PLA-Plumas 1.5%, h) PLA-Quitosano 5%, i) PLA-Quitosano 7.5% y j) PLA-Quitosano 10%.

Con las imágenes de SEM obtenidas de las fibras de cada muestra, es posible confirmar que, al añadir quitosano o sal de queratina a la mezcla de PLA, el diámetro de las fibras disminuye considerablemente. Las fibras de PLA tienen un diámetro promedio de $4.328 \mu\text{m}$, y al añadir la mínima concentración de quitosano (5%) logra reducir el tamaño de las fibras un 85% obteniendo un diámetro de $0.609 \mu\text{m}$, para el caso de la sal de queratina de cabello la concentración mínima (0.5%) redujo las fibras un 80% obteniendo un diámetro de $0.876 \mu\text{m}$ y finalmente, la mínima concentración de sal de queratina de pluma (0.5%) consiguió un diámetro de $0.587 \mu\text{m}$ reduciendo así en un 86% el diámetro de las fibras de PLA.

La figura 37 muestra un análisis estadístico del diámetro de las fibras obtenido de cada muestra.

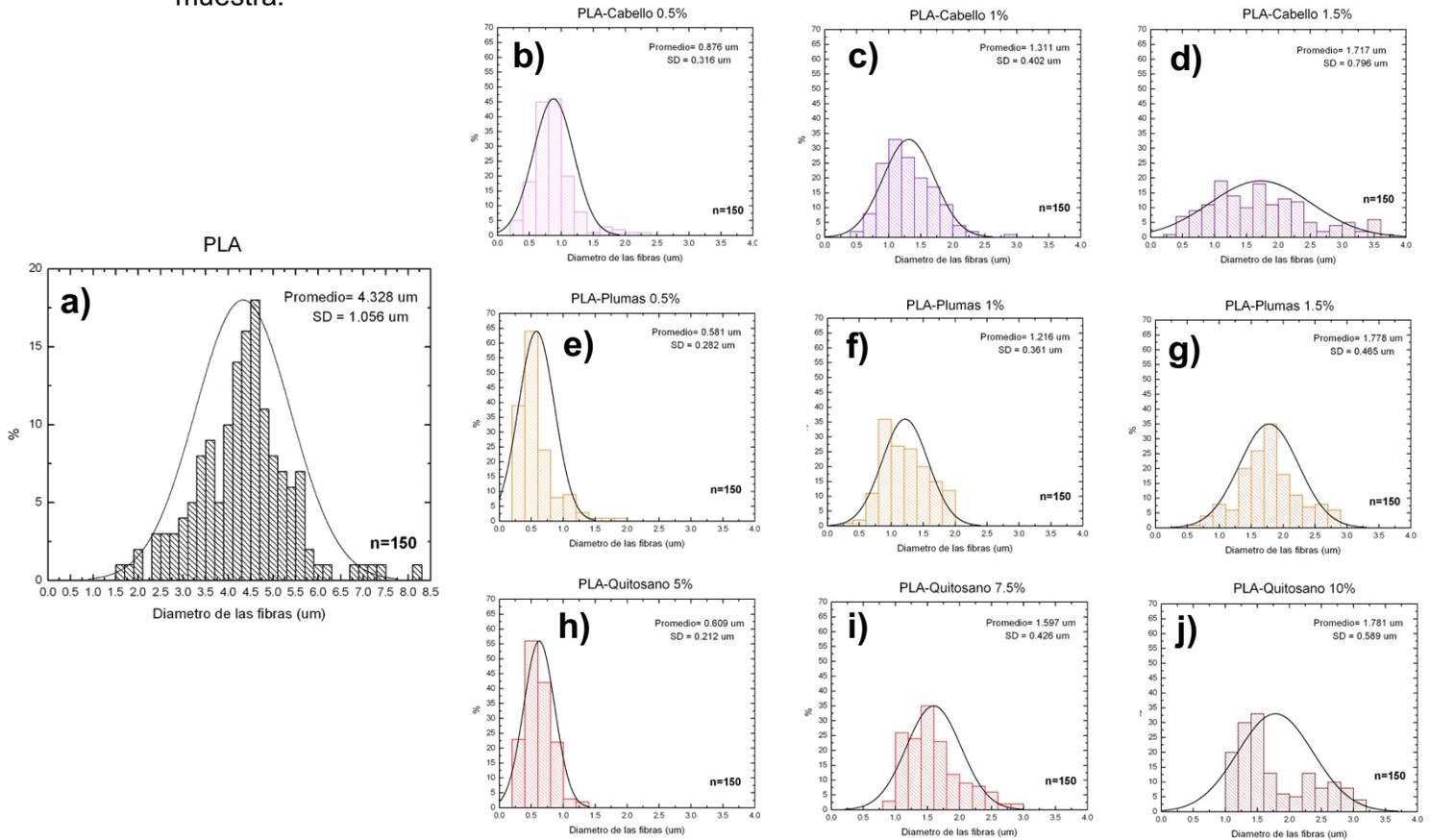


Fig 37. Análisis estadístico del tamaño de fibras obtenidas por electrohilado, a) PLA, b) PLA-Cabello 0.5%, c) PLA-Cabello 1%, d) PLA-Cabello 1.5%, e) PLA-Plumas 0.5%, f) PLA-Plumas 1%, g) PLA-Plumas 1.5%, h) PLA-Quitosano 5%, i) PLA-Quitosano 7.5% y j) PLA-Quitosano 10%.

Con base en los resultados obtenidos, es posible apreciar como a mayor concentración de quitosano, sal de queratina de pluma o sal de queratina de cabello, mayor será el diámetro de las fibras, sin embargo, el diámetro de las fibras se vuelve menos constante conforme la concentración aumenta, es decir, la medición de las fibras se vuelve menos precisa debido a que los diámetros de las fibras son mas variables conforme la concentración aumenta.

4.3.3 Raman

Los resultados de la espectroscopia Raman de los materiales electrohilados se muestran en la figura 38.

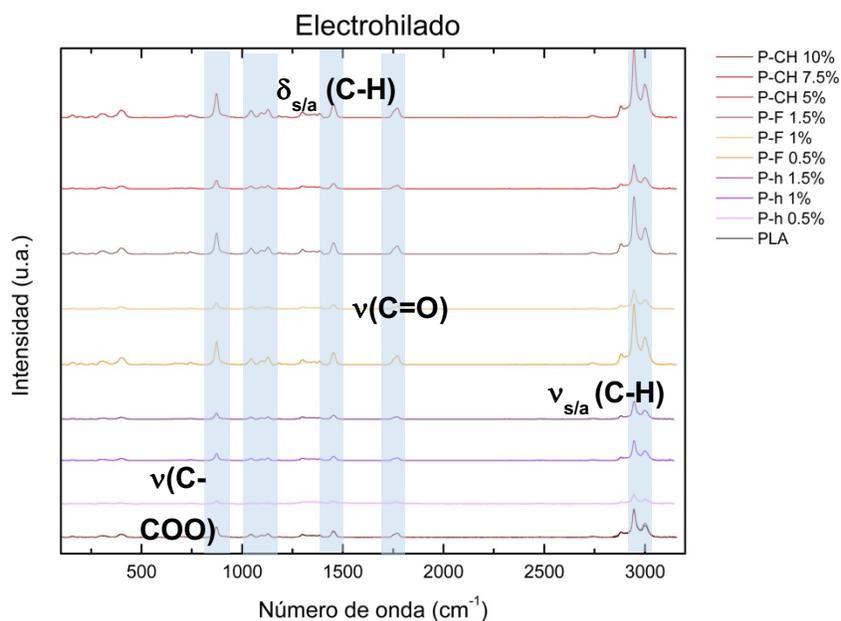


Fig 38. Espectros de Raman de materiales electrohilados.

Al igual que en la sección anterior, los resultados de Raman solamente muestran las bandas características del PLA, las bandas de su estiramiento simétricas y asimétricas de C-H del grupo metil (CH₃) a 3045 cm⁻¹ y 2957 cm⁻¹ (Shoaib Mallick, et al., 2018). La banda característica de C=O con un pico a 1770 cm⁻¹ y un hombro a 1754 cm⁻¹, los picos de 1454 cm⁻¹, 1387 cm⁻¹ y 1129 cm⁻¹ se asignan a los modos de balanceo asimétrico y simétrico y de flexión de CH₃ respectivamente; y los picos de 1182 cm⁻¹ y 1096 cm⁻¹ corresponden al modo de estiramiento OCO. La flexión CH, el estiramiento C-CH₃ y el estiramiento C-COO aparecen a 1297 cm⁻¹, 1045 cm⁻¹ y 875 cm⁻¹, respectivamente (Wanwei Zhang, et al., 2017).

A pesar de que las bandas de la queratina y el quitosano no son visibles, la literatura nos dice que la queratina es una proteína y que esta tiene una estructura lineal con un orden tridimensional específico conformada a base de una secuencia de aminoácidos (Mohammed AlQuraishi, 2019), estos aminoácidos son compuestos orgánicos que contienen un amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH) unidos por un enlace covalente llamado enlace peptídico (A.J. Bruno, et al., 2018). Por otro lado, autores también indican

que el quitosano es una amino polisacárido, el cual destaca por contener grupos funcionales amino (-NH₂) e hidroxilos (R-OH) (S. Islam, M. A. Rahman Bhuiyan y M. N. Islam, 2016).

4.3.4 Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

Los resultados de DMA para los materiales obtenidos por la técnica de electrohilado se muestran en la figura 39, estos gráficos demuestran que los materiales de PLA-Queratina de cabello, PLA-Queratina de pluma y PLA-Quitosano, tienen un comportamiento más rígido en comparación con el PLA blanco.

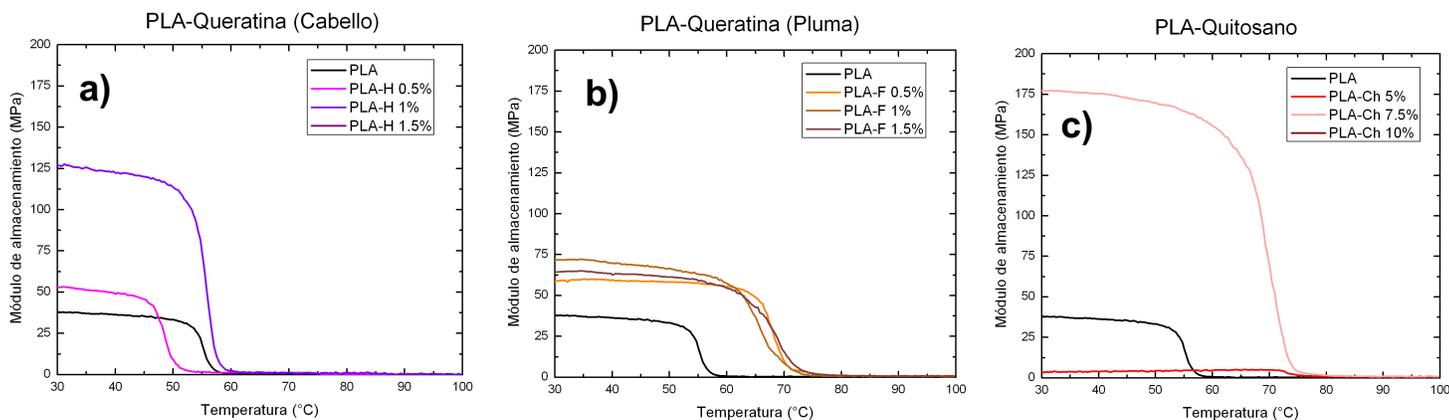


Fig 39. Resultados de la DMA de materiales electrohilados, a) PLA-Cabello, b) PLA-Plumas, c) PLA-Quitosano.

La mejor concentración para las muestras de PLA-Queratina de cabello y PLA-Queratina de pluma es la de 1% con un modulo de almacenamiento de 126 MPa y 74 MPa respectivamente, en el caso de las muestras de PLA-Quitosano, la mejor concentración fue la de 7.5% con un modulo de almacenamiento de 176 MPa. La grafica de los materiales también nos muestra que, al añadir queratina o quitosano a la mezcla de PLA, mejora significativamente la estabilidad térmica de los materiales, ya que mientras que el PLA tiene una temperatura de transición vítrea a los 54°C, al añadir sal de queratina de cabello, sal de queratina de pluma o quitosano su estabilidad térmica aumenta hasta 58°C, 65°C y 64°C respectivamente.

Finalmente, los resultados de DMA para las mezclas de PLA-Quitosano-Queratina de cabello y PLA-Quitosano-Queratina de pluma, se muestran en la figura 40, estas graficas demuestran que la mezcla de los dos materiales (queratina y quitosano) en la mezcla de PLA, logra aumentar aún más la rigidez de los materiales que los hechos solamente con queratina o quitosano.

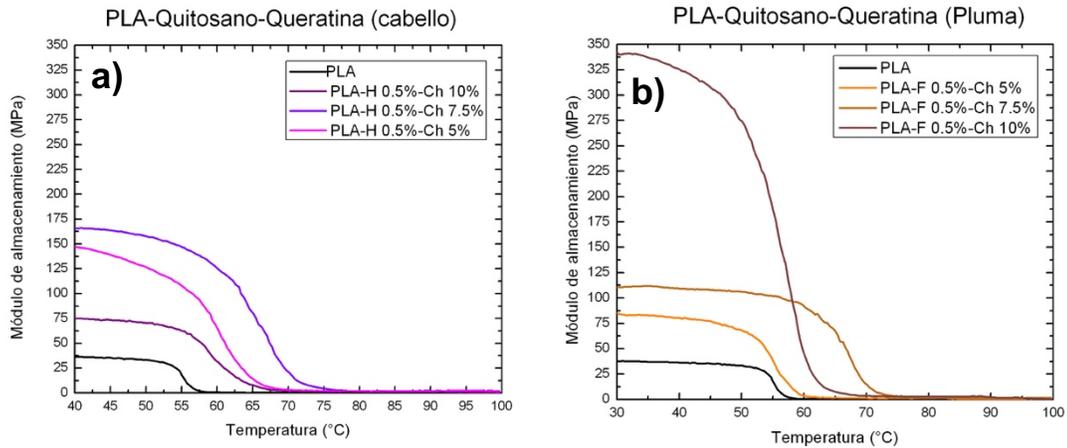


Fig 40. Resultados de la DMA de materiales electrohilados mezcla de materiales PLA-Quitosano-Queratina, a) PLA-Quitosano-Cabello, b) PLA-Quitosano-Plumas.

Los resultados de la figura 34 nos muestran que hay un aumento en el modulo de almacenamiento y estabilidad térmica para las muestras que contienen tres materiales, en el caso de la muestra de PLA-Cabello-Quitosano, la concentración que tuvo un mejor resultado fue la de 0.5% sal de queratina de cabello y 7.5% quitosano, ya que obtuvo un modulo de almacenamiento de 164 MPa y una temperatura de transición vítrea de 60°C. Para la muestra de PLA-Pluma-Quitosano la concentración que obtuvo un mejor modulo de almacenamiento fue la de 0.5% sal de queratina de pluma y 10% de quitosano con un resultado de 334 MPa, sin embargo, su temperatura de transición vítrea es muy cercana a la del PLA blanco (54°C), la concentración que obtuvo una mejor estabilidad térmica fue la de 0.5% sal de queratina de pluma y 7.5% de quitosano, ya que obtuvo 63°C en su temperatura de transición vítrea.

4.3.5 Pruebas de biocompatibilidad

Los resultados de del ensayo de MTT de los materiales electrohilados se muestran en la figura 41, mientras que las imágenes de confocal se encuentran en la figura 26.

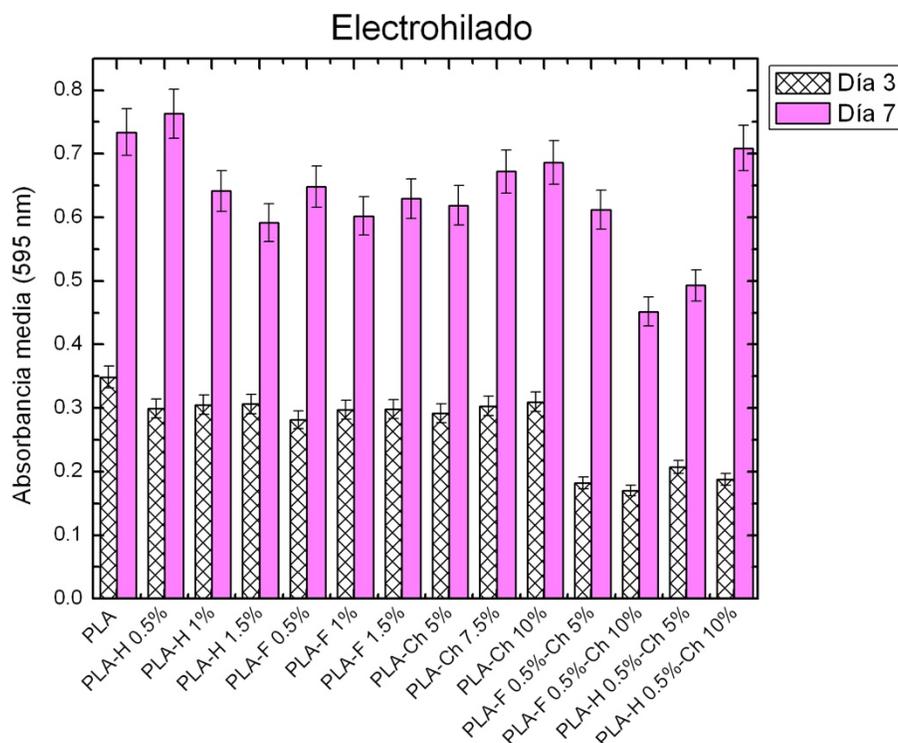


Fig 41. Ensayo de MTT para los materiales hechos a partir de electrohilado.

Los resultados del ensayo MTT nos muestra como el añadir sal de queratina o quitosano a la mezcla de PLA no es significativamente diferente con respecto al blanco, es decir que no hay un crecimiento celular tan significativo entre las muestras. Las graficas exhiben como el material con un mejor resultado fue el de PLA-Queratina de cabello, ya que este supero en un 5% el PLA blanco.

Por otro lado, en las imágenes tomadas con el confocal para las pruebas de adhesión celular, es posible comprobar que si existe una adherencia por parte de las células en los materiales electrohilados. En la figura 42, el inciso a) nos muestra la forma completa de un fibroblasto, donde el volumen amorfo es el citoesqueleto de la célula, mientras que el núcleo se encuentra marcado en azul. El resto de las imágenes muestran los núcleos de las células dentro de los materiales electrohilados a distintas profundidades dentro del material, esto se demuestra a diferentes escalas de color.

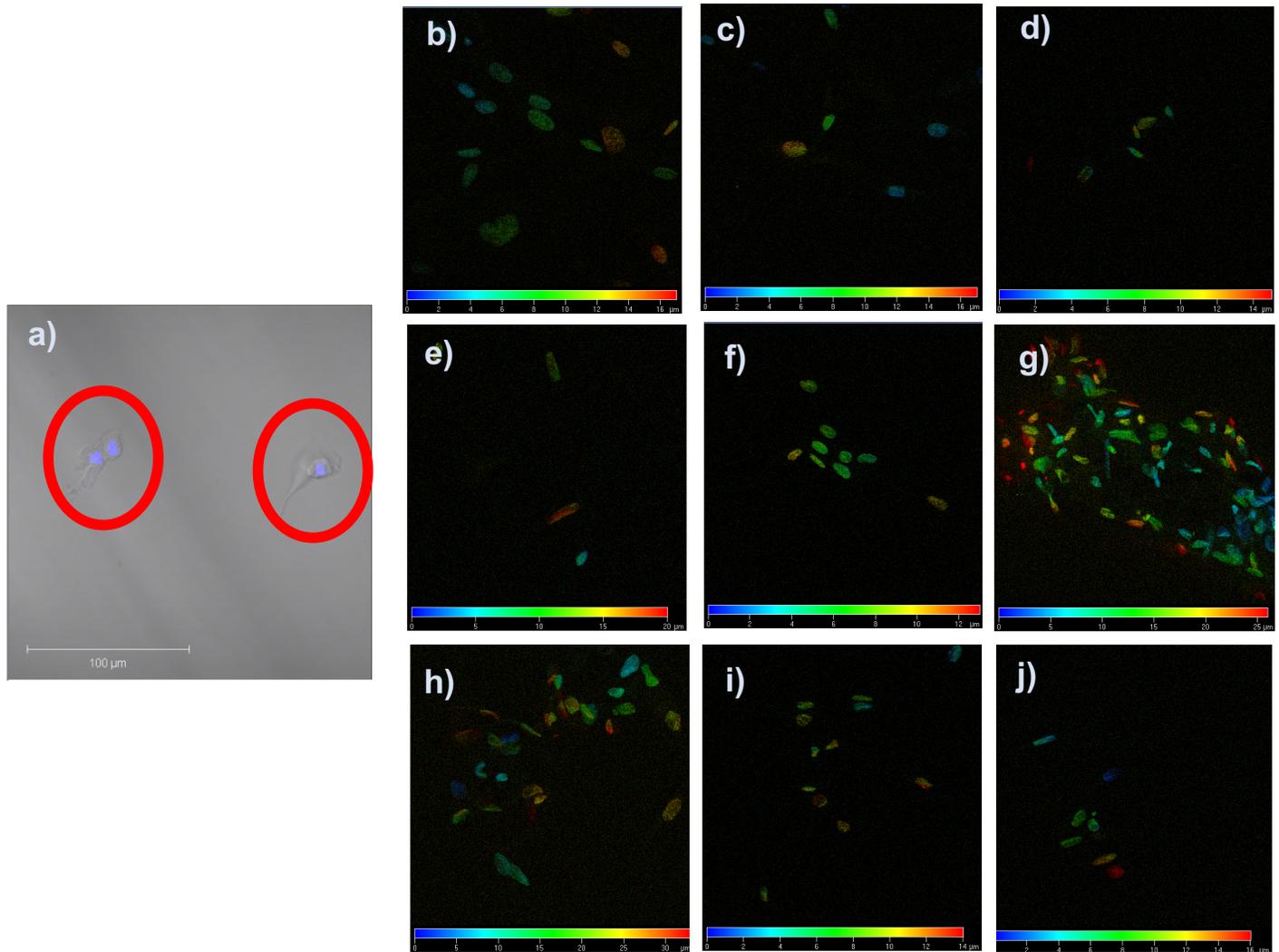


Fig 42. Imágenes del microscopio confocal de los materiales electrohilados a) Núcleo de fibroblasto marcado con DAPI, b) PLA-Cabello 0.5%, c) PLA-Cabello 1%, d) PLA-Cabello 1.5%, e) PLA-Plumas 0.5%, f) PLA-Plumas 1%, g) PLA-Plumas 1.5%, h) PLA-Quitosano 5%, i) PLA-Quitosano 7.5% y j) PLA-

CONCLUSIONES

Los resultados de este proyecto permiten concluir que la adición de quitosano y queratina (obtenida de pluma y de cabello) al PLA para la síntesis de andamios realizados por las técnicas de electrohilado e impresión 3D, son viables para ser aplicados en el área de ingeniería de tejidos.

Con base en los resultados de Raman y FTIR de los materiales de inicio, se puede conocer el tipo de interfaz matriz-refuerzo que puede existir entre los materiales impresos. Los resultados de estas técnicas de caracterización muestran que la queratina contiene grupos funcionales amino ($-NH_2$) y carboxilo ($-COOH$), el quitosano grupos amino ($-NH_2$) e hidroxilo ($-R-OH$) y en el caso del PLA los grupos funcionales carbonilo ($-C=O$), por lo tanto, se infiere que existe una interfaz mecánica entre la matriz-refuerzo por atracción electrostática o puentes de hidrogeno. Esto debido a que, el PLA contiene grupos carbonilo, los cuales son uno de los principales grupos funcionales que donan electrones, mientras que el quitosano y la queratina contienen grupos amino, hidroxilo y carboxilo, los cuales destacan por ser donadores de protones, estos grupos interaccionan entre si para finalmente formar puentes de hidrogeno.

Para las muestras realizadas por impresión 3D, se evaluó el efecto del tipo de refuerzo a ocupar. Por un lado, Se hicieron muestras utilizando el quitosano y queratina en forma de fibra y por otro, estos mismos materiales fueron ocupados como refuerzos, pero en forma de partícula. Utilizando las imágenes obtenidas en SEM, es posible apreciar como los refuerzos en forma de partículas tienen una mejor dispersión y por lo tanto una mayor área superficial en contacto en la matriz de PLA que los refuerzos en forma de fibra. Es por esto que los materiales hechos con el refuerzo de queratina y quitosano en forma de partículas obtuvieron mejores resultados en las pruebas de biocompatibilidad y DMA, ya que en las pruebas de biocompatibilidad existe una mayor área superficial del refuerzo en contacto con las células, y en los resultados de DMA, la buena dispersión del refuerzo favoreció la cantidad de puentes de hidrogeno dentro del material, debido a la unión por enlaces secundarios de la matriz con el refuerzo, favoreciendo así la rigidez del material.

También, en los resultados de los materiales impresos, para el caso de las caracterizaciones de Raman y FTIR, es notorio como las bandas de los grupos funcionales

de los refuerzos de queratina y quitosano no están presentes dentro de los espectros, se infiere que es debido a que el PLA envuelve estos refuerzos, independientemente su concentración, durante el proceso de extrusión e impresión, y los láseres ocupados en estas técnicas de caracterización no alcanzan a detectar los refuerzos dentro de los materiales impresos.

Los resultados de DMA de los materiales impresos nos muestran como las impresiones hechas con refuerzo en forma de fibra tienen un comportamiento menos rígido en comparación con el PLA blanco, mientras que las muestras hechas con refuerzo en forma de partículas presentan un comportamiento más rígido en comparación con el PLA blanco. Estos comportamientos tan diferentes son debido a la dispersión que tienen los diferentes tipos de refuerzos presentes en la matriz, los refuerzos con partículas tienen una mayor dispersión dentro de la matriz de PLA y por lo tanto una mayor área de contacto matriz-refuerzo, esto provoca que, al aplicar un esfuerzo, los refuerzos y la matriz tengan una buena transferencia de cargas impidiendo el movimiento de las cadenas poliméricas dentro del material. Los refuerzos en forma de fibra, por otro lado, no están perfectamente dispersas en el material, lo cual provoca que no tenga una buena transferencia de cargas en la interface matriz-refuerzo, generando así una mayor cedencia al esfuerzo cortante aplicado.

Adicional a esto, la concentración utilizada para los materiales impresos también es un factor a considerar en los resultados de DMA. Las graficas de los materiales impresos nos muestran que, a mayor concentración del refuerzo en la matriz, menos rígidos serán los materiales. Esta conclusión se puede complementar con las imágenes obtenidas en SEM, en donde se logra observar que, a una mayor concentración de queratina y quitosano en la matriz de PLA, existe una mayor aglomeración dentro de los materiales impresos. Este efecto de aglomeración provoca que las cadenas poliméricas del material impreso cedan ante los esfuerzos aplicados.

Concluyendo con los resultados de los materiales impresos, los análisis de biocompatibilidad nos muestran como los materiales impresos hechos con refuerzos en forma de partícula tienen un mayor crecimiento celular en comparación con los hechos con refuerzos en forma de fibra. Las células tienen la capacidad de adherirse a un material siempre y cuando se produzcan fuerzas electroestáticas entre las proteínas de adhesión

dentro de la membrana celular y el material a adherir. Estas proteínas de adhesión están compuestas por grupos amino (-NH₂), carboxilo (-COOH), carbonilos e hidroxilos (-OH), los cuales son grupos funcionales que donan electrones y efectivamente generan fuerzas electroestáticas con los grupos funcionales del PLA, quitosano y queratina los cuales son donadores de electrones. Por lo tanto, los materiales impresos hechos con refuerzo de queratina y quitosano en forma de partícula tienen una mayor interacción por fuerzas electroestáticas de los fibroblastos debido a su gran área de contacto dentro del material generado por su buena dispersión, provocando así un mayor crecimiento celular en comparación con los materiales hechos con refuerzo en forma de fibra que tienen una menor área de contacto.

Por otro lado, dentro de los resultados de los materiales electrohilados, el DMA muestran que existe un comportamiento más rígido en los materiales PLA-Quitosano, PLA-Queratina y PLA-Quitosano-Queratina que el PLA blanco, esto se debe a que para la técnica de electrohilado, es necesario hacer previamente una mezcla polimérica de PLA, quitosano y queratina a través del uso de solventes, estos solventes rompen algunos enlaces secundarios de los materiales, y durante la mezcla y el proceso de electrohilado se generan nuevos enlaces secundarios (puentes de hidrogeno) entre el PLA y el quitosano o la queratina. Esta generación de enlaces secundarios con la queratina y el quitosano limita los movimientos de relajación del PLA provocando que estos nuevos materiales sean más rígidos que el blanco.

Los resultados de SEM de los materiales electrohilados nos muestra como al añadir quitosano o queratina a la mezcla polimérica, se generan, mediante la técnica de electrohilado, diámetros más pequeños que el PLA blanco. Para el caso de la mezcla de PLA-Queratina de cabello se logro reducir el tamaño de las fibras un 80% con la mínima concentración de queratina (0.5%) en comparación con el PLA blanco, en el caso de la mezcla de PLA-Queratina de pluma, la mínima concentración de queratina (0.5%) logro disminuir un 86% el tamaño de las fibras y finalmente con la mínima concentración (5%) de la mezcla de PLA-Quitosano las fibras se redujeron un 85%. Esta disminución del tamaño de las fibras provoca una mayor área de contacto con los fibroblastos en las pruebas de biocompatibilidad. Al igual que con los materiales impresos, las proteínas adherentes de las células interaccionan por medio de fuerzas electroestáticas con las fibras de electrohilado,

las cuales contienen PLA, quitosano y queratina, y provocan un buen anclaje entre los fibroblastos y las fibras hechas por la técnica de electrohilado.

A pesar de la buena interacción de las células con las fibras, los resultados de crecimiento celular no muestran una gran diferencia entre las fibras hechas de PLA con quitosano o queratina y el PLA blanco, sin embargo, con base en los resultados de DMA, es importante considerar que la rigidez de las mezclas poliméricas electrohilados aumentaron considerablemente. Para el caso de la muestra de PLA-Queratina de cabello de la concentración media (1%) el modulo de almacenamiento aumento un 330% en comparación con el PLA blanco, para el caso de la muestra de PLA-Queratina de pluma, la concentración 1% logro aumentar el modulo de almacenamiento un 195% y finalmente la concentración media de quitosano (7.5%) de la muestra PLA-Quitosano aumento la rigidez en un 475%. Por lo tanto, se puede concluir que a pesar de no tener un mejor crecimiento celular que el PLA blanco, el aumento en la rigidez de los materiales electrohilados hace que estos materiales tengan un gran potencial en el área de ingeniería de tejidos para su inserción en organismos vivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.J. Bruno, J.R. Correa, E. Peláez-Abellán, E. Urones-Garrote, A Novel Method for the Functionalization of Aminoacids L-Glycine, L-Glutamic Acid and L-Arginine on Maghemite/Magnetite Nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2018.02.010> .
- Alexander Szojka, Karamveer Lalh, Stephen H.J. Andrews, Nadr M. Jomha, Martin Osswald and Adetola B. Adesida, Biomimetic 3D Printed Scaffolds for Meniscus Tissue Engineering, *Bioprinting*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bprint.2017.08.001>.
- Allaire, A., Picard-Jean, F., Bisailon, M. (2015). Immunofluorescence to Monitor the Cellular Uptake of Human Lactoferrin and its Associated Antiviral Activity Against the Hepatitis C Virus. *J. Vis. Exp.* (104), 53-53, doi:10.3791/53053.
- Arijit Basu, Robert Langer y Abraham J. Domb, Special issue: Polylactide (PLA) Based Biopolymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 2016, 1–2.
- Astrid J.R. Lasprilla, Guillermo A.R. Martinez, Betânia H. Lunelli, André L. Jardini, Rubens Maciel Filho, Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review, *Biotechnology Advances*, 30, 2012, 321–328.
- B.J. Inkson, Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization, *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, 17-43.
- Bomou Ma, Xue Qiao, Xiuliang Hou y Yiqi Yangb, Pure keratin membrane and fibers from chicken feather, *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 2016, 614-621.
- Chacón J.M., Caminero M.A., García-Plaza E., Núñez P.J. (2017). Additive manufacturing of PLA structures using fused deposition modelling: effect of process parameters on mechanical properties and their optimal selection. *Materials and Design* (preprint submitted), 1- 25.
- Chin-San Wu, (2016). Modulation, functionality, and cytocompatibility of three-dimensional printing materials made from chitosan-based polysaccharide composites. *Materials Science and Engineering C*, 69, 27–36.
- Edgar Jiménez Cervantes Amieva, Arquitecturas nanométricas de grafeno y óxido de grafeno modificados con queratina y su funcionalidad como nanocompositos, Tesis de doctorado, Universidad de Guanajuato-Campus Guanajuato, Marzo 2016.

- F. M. Goycoolea, C. Remuñán-López y M. J. Alonso, Nanopartículas a base de polisacáridos: Quitosano, Capítulo 3, Monografía XXVIII: Nanotecnología farmacéutica, Real Academia Nacional de Farmacia, 2011, 103-131.
- F.P. La Mantia y M. Morreale, Green composites: A brief review, *Composites: Part A*, 42, 2011, 579–588.
- Flores-Hernández Cynthia Graciela, *Plumas De Ave De Desecho Como Material Alternativo De Refuerzo De Materiales Compuestos Biodegradables Base Almidón-Quitosano*. Tesis de doctorado, Mexico: Universidad Autónoma Del Estado De México, 2014.
- Flores-Hernández Cynthia Graciela, *Plumas De Ave De Desecho Como Material Alternativo De Refuerzo De Materiales Compuestos Biodegradables Base Almidón-Quitosano*. Tesis de doctorado, Mexico: Universidad Autónoma Del Estado De México, 2014.
- Francesca Selmin, Francesco Cilurzo, Annalisa Aluigi, Silvia Franze and Paola Minghetti, Regenerated keratin membrane to match the in vitro drug diffusion through human epidermis. *Results in Pharma Sciences*, 2, 2012, 72–78.
- Fu-Yun Zhu, Qi-Qi Wang, Xiao-Sheng Zhang, Wei Hu, Xin Zhao y Hai-Xia Zhang, 3D nanostructure reconstruction based on the SEM imaging principle, and applications, *Nanotechnology*, 25, 2014, 1-10.
- G.E. Tranter, FTIR Spectroscopy of Aqueous Solutions, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*, 2017, 762-769.
- J. P. Mofokeng, A. S. Luyt, T. Tábi and J. Kovács, Comparison of injection moulded, natural fibre-reinforced composites with PP and PLA as matrices. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 25, (8), 2011, 927–948.
- Jayachandran Venkatesan y Se-Kwon Kim, Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview, *Review, Marine Drugs*, 8, 2010, 2252-2266.
- Jia Xu, Jinhui Zhang, Weiquan Gao, Hongwei Liang, Hongyan Wang, y Junfeng Li. (2009). Preparation of chitosan/PLA blend micro/nanofibers by electrospinning. *Materials Letters* 63 658–660.
- Jillian G. Rouse y Mark E. Van Dyke, A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications, *Materials*, 3, 2010, 999-1014.
- Johan van Meerloo, Gertjan J.L. Kaspers, y Jacqueline Cloos, Capítulo 20: Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay, Ian A. Cree, *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, Second Edition, *Methods in Molecular Biology*, 731, 2011, 237-245.

- Julia Ashina, Dmitry Kirsanov, Myriam Moreau, Volodymyr Koverga, Konstantin Mikhelson, Cyril Ruckebusch y Andrey Legin, Raman transduction for polymeric ion-selective sensor membranes: Proof of concept study, *Sensors and Actuators B*, 253, 2017, 697-702.
- K. Pivnenko, M.K. Eriksen, J.A. Martín-Fernández, E. Eriksson y T.F. Astrup, Recycling of plastic waste: Presence of phthalates in plastics from households and industry, *Waste Management*, 54, 2016, 44–52.
- Kevin P. Menard, *Dynamic Mechanical Analysis: A Practical Introduction*, CRC Press, 1999.
- Luis Benavides Rodríguez, María Sibaja Ballester, José Vega-Baudrit, Melissa Camacho Elizondo y Sergio Madrigal Carballo, Estudio Cinético De La Degradación Térmica De quitina Y Quitosano De Camarón de La Especie “*Heterocarpus Vicarius*” Empleando La Técnica Termogravimétrica en Modo Dinámico, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11 (7), 2010, 558-573.
- M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite y E. Chiellini, Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in Polymer Science* 36, 2011, 981–1014.
- Magda Marcela Torres-Luque, Estudio comparativo del proceso de corrosión en recubrimientos cerámicos, metálicos y orgánicos mediante técnicas electroquímicas, Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, Bogotá, D.C. 2010.
- Mantia, F. L. (2011). Green composites: A brief review. *Composites: Part A* 42, 1-10.
- Marguerite Rinaudo (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31 603–632.
- Martínez-Flores E. E., Negrete, J., Torres-Villaseñor, G., Caracterización de tres aleaciones superplásticas utilizando análisis mecánico dinámico (DMA), *Revista Materia*, 13, 2, 2008, 365 – 373.
- Moacir Fernandes Queiroz, Karoline Rachel Teodosio Melo, Diego Araujo Sabry, Guilherme Lanzi Sasaki and Hugo Alexandre Oliveira Rocha, (2015). Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation?. *Mar. Drugs* 2015, 13, 141-158.
- Mohammed AlQuraishi, A Novel Method for the Functionalization of Aminoacids L-Glycine, L-Glutamic Acid and L-Arginine on Maghemite/Magnetite Nanoparticles, *Cell Systems* 8, 2019, 1–10.

- Munaz Ahmed, Vadivelu Raja K., St. John James, y Barton Matthew (2016). Three-dimensional printing of biological matters. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* 1 1-17.
- N. Wu, H. Zhang, Mechanical properties and phase morphology of super-tough PLA/PBAT/EMA-GMA multicomponent blends, *Materials Letters* (2017), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2017.01.063>.
- Peter K. Hepler y Brian E. S. Gunning, Confocal fluorescence microscopy of plant cells, *Protoplasma*, 201, September 1998, 121–157.
- Pivnenko, K. (2016). Recycling of plastic waste: Presence of phthalates in plastics from households and industry. *Waste Management*, 1-9.
- Ribeiro DA, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. In vitro biocompatibility tests of two commercial types of mineral trioxide aggregate. *Braz Oral Res* 2005;19(3):183-7.
- Rojas-Martínez Laura E., Síntesis y caracterización de películas a partir de quitosano y poliamidas mediante la técnica de electrohilado, Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Orizaba, Veracruz, 2017.
- S. Islam, M. A. Rahman Bhuiyan y M. N. Islam, Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering, *Journal of Polymers and the Environment*, 25(3), 2016, 854–866.
- S. Saravanan, R.S. Leena y N. Selvamurugan, Chitosan based Biocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *International Journal of Biological Macromolecules* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.112>.
- Shoaib Mallick, Zubair Ahmad, Farid Touati, Jolly Bhadra, R.A. Shakoory y N.J. Al-Thani, PLA-TiO₂ nanocomposites: Thermal, morphological, structural, and humidity sensing properties, *Ceramics International*, 2018, 2-5.
- Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, *Assay Guidance Manual, Cell Viability Assays*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- Song Y., Li Y., Song W., Yee K., Lee K.-Y., y Tagarielli V.L.. (2017). Measurements of the mechanical response of unidirectional 3D-printed PLA. *Materials and Design* 123 154–164.
- T.D. Stocco, B. R. (2017). Design of a novel electrospinning setup for the fabrication of biomimetic scaffolds for meniscus tissue engineering applications. *Materials Letters*, 2.

- Tania Limongi, Lucia Lizzul, Andrea Giugni, Luca Tirinato, Francesca Pagliari, Hua Tan, Gobind Das, Manola Moretti, Monica Marini, Giovanna Brusatin, Andrea Falqui, Bruno Torre, Cristiano di Benedetto y Enzo di Fabrizio, Laboratory injection molder for the fabrication of polymeric porous poly-epsilon-caprolactone scaffolds for preliminary mesenchymal stem cells tissue engineering applications, *Microelectronic Engineering*, 175, 2017, 12–16.
- W. Coats and J. P. Redfern, (1963). Thermogravimetric Analysis: A Review. *Analyst*, Vol. 88, 906-924.
- Xiaoming Li, Rongrong Cui, Lianwen Sun, E. Aifantis Katerina , Yubo Fan, Feng Qingling, Cui Fuzhai, y Watari Fumio (2014). 3D-Printed Biopolymers for Tissue Engineering Application. *International Journal of Polymer Science* 1-13.
- Z.G. Chen, P.W. Wang, B. Wei, X.M. Mo y F.Z. Cui, Electrospun collagen–chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell, *Acta Biomaterialia*, 6, 2010, 372–382.