

**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE ANDAMIOS DE
QUITOSANO CON ÓXIDO DE GRAFENO OBTENIDOS MEDIANTE TÉCNICAS
DE LIOFILIZACIÓN Y/O ELECTROHILADO.**



AUTORES:

YERSON ARLEY VILLAMARIN CABAL

JUAN CAMILO SILVA PORRAS

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA DE MATERIALES
GRUPO DE MATERIALES COMPUESTOS
SANTIAGO DE CALI**

2017.

**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE ANDAMIOS DE
QUITOSANO CON ÓXIDO DE GRAFENO OBTENIDOS MEDIANTE TÉCNICAS
DE LIOFILIZACIÓN Y/O ELECTROHILADO.**

YERSON ARLEY VILLAMARIN CABAL

JUAN CAMILO SILVA PORRAS

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero de Materiales.

DIRECTORA:

Ing. Mayra Eliana Valencia Zapata MSc.

CO-DIRECTOR:

Carlos David Grande Tovar PhD.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA DE MATERIALES
GRUPO DE MATERIALES COMPUESTOS
SANTIAGO DE CALI**

2017.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma del evaluador

Firma del evaluador

Santiago de Cali, 22 de Julio de 2017.

DEDICATORIA

He escuchado una frase que dice: “Como Dios no podía estar en todas partes, creó a las madres”. Tenerte junto a mí da fe de eso.

Gracias por tus palabras de aliento, por ser la mejor de mis amigas y enseñarme con tu ejemplo sobre el esfuerzo y el valor de las cosas.

*A mi madre Pilar Porras Uribe, mi padre Victor Hugo Silva
y mi abuela Esperanza Uribe.*

Juan Camilo.

*A mi amada madre Luz Marina Cabal Cañas, a la cual le debo todas
mis metas alcanzadas, ya que sin sus enseñanzas, su apoyo
constante y su deseo para que yo salga adelante no sería posible
culminar este increíble proyecto de vida. Por brindarme siempre tu
amor y alegrar todos los días de mi vida. ¡TE AMO!*

Yerson Arley.

AGRADECIMIENTOS

El primero de nuestros agradecimientos es para Dios, por darnos el privilegio de culminar y participar de esta gran etapa de nuestras vidas.

A nuestros padres, por su esfuerzo constante por sacar adelante este proyecto de vida de nosotros sus hijos, porque sin su apoyo y consejo nada de esto habría sido posible.

A nuestros familiares cercanos, por participar en todo este proceso dándonos su apoyo incondicional.

A nuestros compañeros y novias, por los excelentes momentos compartidos, las lecciones aprendidas y los 5 años que sin su presencia no hubieran sido tan maravillosos.

A todos los profesores del programa de ingeniería de materiales, quienes compartieron su conocimiento y experiencia para hacer de nosotros unos valiosos profesionales.

A nuestros directores la ing. Mayra Eliana Valencia y Dr. Carlos David Grande, por disponer de su tiempo y recursos para la elaboración de este trabajo, así como por todo el conocimiento que se nos compartió que contribuyó con nuestra formación como profesionales y como personas.

Al personal del grupo de Polímeros de la escuela de ingeniería de materiales encabezado por el profesor Dr. José Herminsul Mina, la ing. Karen Lozano, la ing. Natalia Hurtado, por sus consejos, críticas y apoyo incondicional.

Al personal del proyecto de convocatoria interna liderado por el Dr. Héctor Fabio Zuluaga, al Dr. Carlos Valencia, al Qco. Gustavo Muñoz y a las demás personas que aportaron a la investigación.

Al personal del grupo TEBLAMI de la facultad de salud, la Dra. Carolina Pustovrh, la Dra. Liliana Salazar, a la Bióloga Ana María Soria y a Juan David Moreno por su perseverancia y colaboración incondicional para hacer realidad la parte final de nuestra investigación.

Al personal de la Universidad de San Buenaventura, al profesor Johannes Delgado, la profesora Lina María Gonzales, la profesora Maira Fernanda Ramírez, al ing. Joaquín Hernández, por su disposición total y colaboración.

Al personal de la Universidad del Valle, el ing. Carlos Hugo Vidal, el profesor ing. Irvin Castro, la ing. Diana Osorio, Carolina Perea y todas esas personas que contribuyeron de alguna manera para lograr nuestros objetivos a lo largo de nuestro pregrado.

¡GRACIAS!.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. JUSTIFICACIÓN.....	10
3. OBJETIVOS.....	10
3.1. GENERALES	10
3.2. ESPECÍFICOS.....	10
4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	11
4.1. INGENIERÍA DE TEJIDOS – ANDAMIOS.	11
4.2. QUITOSANO.....	12
4.3. ANDAMIOS A PARTIR DE QS REFORZADO.....	13
4.5. ÓXIDO DE GRAFENO	14
4.6. USO DE ADITIVOS PLASTIFICANTES.....	15
4.6. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ANDAMIOS.....	16
4.6.1. ELECTROSPINNING.....	16
4.6.2. LIOFILIZACIÓN	18
4.7. PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	19
4.7.1. DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA.....	19
4.7.2. PRUEBA DE TOXICIDAD CON ARTEMIA SALINA.	21
4.7.3. ENSAYOS DE ADHESIÓN Y CRECIMIENTO CELULAR.	22
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	23
5.1. MATERIALES	23
5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
FASE 1: SELECCIÓN DEL TIPO DE QS Y CANTIDAD DE PLASTIFICANTE USADO EN LAS PELICULAS.....	24
FASE 2: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL GO	25
FASE 3: ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS	25
5.3. METODOLOGÍA FASE CERO.....	25
5.3.1. CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO	25
MEDICIÓN DEL GRADO DE DESACETILACIÓN	25
5.3.2. SÍNTESIS Y CARÁCTERIZACIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO	27
5.4. METODOLOGÍA FASE UNO	30
5.4.1. ELABORACIÓN DE SOLUCIONES.....	30

5.4.2. ELABORACIÓN DE PELÍCULAS.....	31
5.4.3. CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS	32
5.4. METODOLOGÍA FASE DOS	34
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE QUITOSANO Y ÓXIDO DE GRAFENO PLASTIFICADAS	34
5.5. METODOLOGÍA FASE TRES.....	35
5.6.1. ELABORACIÓN DE ANDAMIOS POR ELECTROHILADO.....	35
5.6.2. ELABORACIÓN DE ANDAMIOS POR LIOFILIZACIÓN.....	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
6.1. FASE CERO	45
6.1.1. CARACTERIZACIÓN DEL QS	45
6.1.2. RESULTADOS CARACTERIZACIÓN DEL GO	47
6.2. FASE 1.....	50
6.2.1. ENSAYO DE TRACCIÓN DE PELICULAS QS-SORBITOL	50
6.2.2. DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA PELÍCULAS DE QS-PLASTIFICANTE	53
6.3. FASE DOS.....	56
ENSAYO DE TRACCIÓN DE PELICULAS QS- GO PLASTIFICADAS CON SORBITOL.....	56
6.4. FASE 3.....	57
6.4.1. ANDAMIOS OBTENIDOS ELECTROHILADOS.	57
6.4.2. ANDAMIOS LIOFILIZADOS	60
OBSERVACIONES DIA 4.....	68
OBSERVACIONES DIA 7.....	70
7. CONCLUSIONES	71
8. RECOMENDACIONES.....	72
9. REFERENCIAS	73

LISTADO DE IMÁGENES

Figura 1. Estructura molecular del QS.....	12
Figura 2. Modelo de la estructura del GO.....	14
Figura 3. Influencia de los aditivos plastificantes sobre el porcentaje de elongación y resistencia de películas de QS.	15
Figura 4. Esquema del proceso de electrospinning.	17
Figura 5. Esquema de los procesos celulares al implantar un biomaterial en el cuerpo	22
Figura 6. Esquema de la metodología experimental seguida en la investigación.	23
Figura 7. Diseño experimental seguido para la etapa 1.	24
Figura 8. Balón con mezcla de grafito, H_2SO_4 y $KMnO_4$	27
Figura 9. Detección de la reacción..	27
Figura 10. Proceso de centrifugado.....	28
Figura 11. Procesos de purificación del lodo.	28
Figura 12. Óxido de grafito después de la liofilización y suspensión de GO	29
Figura 13. Dispersión de una solución de QS-GO.....	30
Figura 14. Molde para preparación de películas.....	31
Figura 15. Extracción y secado de la probeta inmersa en FBS para el posterior registro de sus pesos.	34
Figura 16. Soluciones para preparación de películas y andamios.....	35
Figura 17. Montaje de electrohilado para elaboración de andamios de QS-GO.	36
Figura 18. Proceso de liofilización de andamios de QS-GO.....	37
Figura 19. Andamio antes y después de adicionarle el FBS.	38
Figura 20. Extracción y secado de la probeta inmersa en FBS para el posterior registro de sus pesos..	39
Figura 21. Presentación de artemia salina para ensayo.....	40
Figura 22. Ensayo de artemia, previo al conteo.	41
Figura 23. Equipo y proceso de corte de los andamios.	41
Figura 24. Andamio cortado y observado mediante un microscopio óptico.....	42
Figura 25. Esterilización de andamios.....	42
Figura 26. Frasco de cultivo con piezas de cráneo de murino y osteoblastos adheridos al frasco de cultivo.	43
Figura 27. Pasos iniciales del cultivo celular; extracción del medio de cultivo y adición de la tripsina.....	43
Figura 28. Centrifugado y posterior de conteo de las células a cultivar.....	44
Figura 29. Esquema cultivo celular en andamios.	44
Figura 30. Espectros RMN para la hallar el grado de desacetilación del QS	46
Figura 31. Espectro Raman obtenido en caracterización de GO experimental. ...	48
Figura 32. Difractograma GO experimental.	49
Figura 33. Espectro infrarrojo obtenido para el GO sintetizado.	49
Figura 34. Resultados ensayo de tracción a películas de QS y sorbitol.	51

Figura 35. <i>Pérdida de masa, cambio de pH y porcentaje de absorción en función del tiempo para el ensayo de degradación hidrolítica</i>	53
Figura 36. <i>SEM a estructuras fibrilares electrohiladas..</i>	59
Figura 37. <i>SEM electrohilados sobre colector de malla metálica.</i>	59
Figura 38. <i>SEM a andamios liofilizados de diferente composición.</i>	61
Figura 39. <i>Esquema de la medición de porosidad.....</i>	63
Figura 40. <i>Comparación espectros FTIR de andamios</i>	63
Figura 41. <i>Porcentaje de pérdida de peso de los andamios liofilizados con diferentes dosificaciones de GO.....</i>	65
Figura 42. <i>pH vs tiempo de degradación para diferentes composiciones de andamios liofilizados.</i>	66
Figura 43. <i>Porcentaje de absorción vs tiempo de degradación de andamios liofilizados con diferentes dosificaciones de GO.</i>	67
Figura 44. <i>Visualización de morfología de andamio día 4</i>	69
Figura 45. <i>Visualización de morfología de andamio día 7</i>	71

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. <i>Orden y cantidades de los reactivos para preparar 1000 ml de SBF.</i>	33
Tabla 2. <i>Días en que se registraron los datos.</i>	34
Tabla 3. <i>Soluciones base procedimiento de electrohilado.</i>	36
Tabla 4. <i>Descripción de formulaciones electrohiladas.</i>	36
Tabla 5. <i>Días en que se registraron los datos.</i>	39
Tabla 6. <i>Grados desacetilación del QS de MPM Y BPM mediante análisis elemental.</i>	45
Tabla 7. <i>Grados de desacetilacion del QS DE MPM y BMP mediante RMN</i>	46
Tabla 8. <i>Resultados grado de desacetilación promedio del QS de MPM y BPM..</i>	46
Tabla 9. <i>Resultados del peso molecular quitosano.</i>	47
Tabla 10. <i>Resultados ensayos mecánicos películas etapa 1.</i>	51
Tabla 11. <i>Ensayos mecánicos películas plastificadas de QS-GO.</i>	56
Tabla 12. <i>Porcentaje de porosidad de andamios a diferentes dosificaciones de GO, tomado con IQmaterials.</i>	62
Tabla 13. <i>Resultados letalidad ensayo de artemia bajo conteo.</i>	68

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la investigación en biomateriales se ha venido incrementando, debido a que la demanda de pacientes con la necesidad de un implante o injerto se ha visto solucionada con los productos de la ingeniería de tejidos, haciendo disminuir de esta manera las limitaciones dadas por su poca disponibilidad y situaciones desfavorables asociadas con el rechazo inmunológico.

La ingeniería de tejidos, radica en aplicar los conceptos de ingeniería en sinergia con algunos principios biológicos enfocados en el desarrollo de estructuras que posibiliten preservar o recomponer sistemas biológicos existentes, promoviendo de este modo, estrategias para la regeneración o recuperación de sistemas celulares completos o tejidos. Tales estrategias se han ido enfocando en las patologías de alteración de la arquitectura del tejido y se centran en el trasplante de células en combinación con materiales soporte (Di, Sittinger, y Risbud 2005).

Dichos materiales de soporte corresponden a los llamados *andamios* o *scaffolds*, que se presentan como cimientos temporales para el crecimiento y proliferación celular mientras se da la regeneración del tejido, utilizando materiales como el quitosano (QS) que presenta características que se asimilan en algunos aspectos a la matriz extracelular ósea, la cual mimetiza el hábitat común de las células y provee condiciones ambientales adecuadas para su interconexión y crecimiento (Lim, Chai, y Loh 2017). Sin embargo, la insuficiencia de estabilidad mecánica del andamio de QS en aplicaciones sometidas a altos esfuerzos, limita su utilización en la práctica clínica, por lo que se ha decidido investigar en materiales de refuerzo y mejoramiento a estas y otras propiedades. Por lo anterior, se planteó el estudio del comportamiento del óxido de grafeno (GO) como material de refuerzo en andamios de QS, debido a sus excelentes propiedades mecánicas y fisicoquímicas como la hidrofiliidad, alta dispersibilidad y la habilidad de promover interacciones biológicas a través de los grupos funcionales presentes en su superficie (Dinescu et al. 2014).

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la elaboración y caracterización de andamios de QS reforzados con GO mediante electrohilado y liofilización. La comparación de las propiedades mecánicas y biológicas de los andamios obtenidos por ambos métodos de conformado, permitió establecer el método más eficiente y práctico en vista de la futura implantación del andamio.

2. JUSTIFICACIÓN.

La realidad y el entorno actuales, sugiere que se hagan avances tecnológicos en cuanto a productos que mejoren la calidad de vida de la humanidad de alguna manera. Las diferentes enfermedades degenerativas, lesiones y consecuencias de la guerra, alertan sobre la necesidad de la reparación inmediata del paciente comprometido para garantizar su vida. Además, la falta de disponibilidad de donantes de órganos hace que se busquen estrategias apropiadas para combatir con eficacia dichas situaciones.

En lo concerniente a esta investigación, se busca dar un aporte a la solución de la problemática relacionada con la pérdida de funcionalidad de cierto órgano del cuerpo humano, implementando un andamio que sirva de soporte para la proliferación celular y por lo tanto la regeneración de un tejido.

Estos soportes o andamios, se elaboran con materiales que cumplan satisfactoriamente con propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, pero no siempre se garantiza que cuenten del mismo modo con buenas resistencias mecánicas, módulos de rigidez y/o buen anclaje celular, por lo que entran a discusión las diferentes posibilidades para solucionar estas situaciones.

Con base en esta situación, se abren muchos caminos en el ámbito investigativo para dar con el mejor método de obtención de dichos biocompuestos, alternando técnicas de procesamiento y diferentes materiales para definir un equilibrio entre propiedades mecánicas y biológicas, a costos asequibles y con practicidad a la hora de la implantación quirúrgica.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERALES

Desarrollar andamios mediante técnicas de liofilización y/o electrohilado con potencial biocompatibilidad, a partir de quitosano y óxido de grafeno, para su posible aplicación en ingeniería de tejidos.

3.2. ESPECÍFICOS

Obtener y caracterizar óxido de grafeno mediante el método de Hummers modificado para su aplicación como refuerzo a andamios base quitosano.

Evaluar el efecto de la incorporación de óxido de grafeno en películas de quitosano sobre algunas propiedades mecánicas, fisicoquímicas y biológicas, con la finalidad de determinar proporciones óptimas para la elaboración de andamios.

Estudiar andamios porosos de QS/GO obtenidos mediante liofilización y/o electrohilado, en condiciones in-vitro.

4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.

4.1. INGENIERÍA DE TEJIDOS – ANDAMIOS.

La ingeniería de tejidos utiliza andamios para la formación de tejidos nuevos a partir de células. Estos andamios, se diseñan para poner en contacto los tipos de células deseados en un medio tridimensional adecuado, también para brindar el soporte mecánico ideal hasta lograr la estabilidad estructural de los tejidos nuevos que se forman y para que se den las señales específicas que guían la expresión genética de las células que forman el tejido. Una aproximación para diseñar los andamios para la ingeniería de tejidos, es imitar, tanto como sea posible, la estructura y función biológica de la ECM (matriz extracelular) nativa tanto en su composición química como en su estructura física, es decir, imitar las funciones de las moléculas de la ECM que se encuentran en los tejidos. Esta ECM nativa, trabaja como un andamiaje para que las células estén lo suficientemente próximas para que se ensamblen y formen tejidos, controla la estructura del tejido y regula el fenotipo celular (Esteve 2013).

Para la regeneración exitosa de tejidos, los andamios tienen que abordar múltiples funciones. Deben presentar propiedades mecánicas óptimas, con el fin de apoyar el crecimiento de nuevo tejido durante un período prolongado de tiempo; deben poseer una porosidad controlable y alta, con el fin de promover las interacciones óptimas de células-biomaterial, así como la adhesión celular y la deposición de ECM y garantizar un transporte adecuado de nutrientes, proteínas y gases para el crecimiento celular; que debe ser biocompatible con el fin de evitar la inflamación in vivo o la toxicidad; deben mostrar biocompatibilidad y biorreabsorbilidad a una velocidad de degradación y resorción controlable de acuerdo con la tasa de regeneración de los tejidos. Además de eso, la liberación sostenida de agentes bioactivos (por ejemplo, factores de crecimiento y otras moléculas de señalización) en un periodo de tiempo adecuado, se considera una tarea central para mejorar y orientar el proceso de regeneración (Loretta et al. 2016).

La unión favorable de las células en el andamiaje poroso es uno de los principales aspectos de la ingeniería de tejidos, que también está predeterminada por el tipo de biomateriales utilizado para la preparación del andamio, por esta razón en los últimos años, el desarrollo de biomateriales ha ganado una popularidad significativa. Los diferentes tipos de biomateriales que incluyen polímeros naturales y polímeros sintéticos se utilizan en la preparación de dichos andamios (Elango et al. 2016).

La mezcla de polímeros se utiliza para producir nuevos biomateriales que muestran propiedades como la resistencia mecánica, propiedades térmicas y de superficie que no podían alcanzarse por los polímeros individuales. Los polímeros sintéticos

son fáciles de procesar y puede modificar las propiedades como resultado de que surgen naturalmente metabolitos en el cuerpo humano. Los polímeros sintéticos utilizados comúnmente en ingeniería de tejidos son el alcohol de polivinilo (PVA), poli ácido glutámico, poliuretanos, policaprolactona, Polietilenglicol, etc.

Los polímeros naturales son ampliamente investigados debido a su similitud con los tejidos corporales. Los polímeros naturales tales como el almidón, el quitosano (QS), colágeno, la gelatina y la albúmina son muy utilizadas en aplicaciones biomédicas (A. Islam et al. 2016).

4.2. QUITOSANO.

Generalmente, el QS se obtiene mediante un proceso de desacetilación química o enzimática de la quitina, la cual es un polisacárido compuesto de N-acetil-D-glucosamina, que después de la celulosa, es el polisacárido más abundante en la naturaleza. Se dice que su producción mayoritaria se basa en el tratamiento de los caparazones de crustáceos como camarones, langostas y cangrejos, los cuales se obtienen como desecho de las plantas procesadoras de estas especies (Averous y Pollet 2012).

Un factor que hace atractivo al quitosano es su particular carácter catiónico, que puede representar propiedades y actividad útiles en nuevas aplicaciones como en la ingeniería de tejidos. La presencia de grupos funcionales aminas en su cadena polimérica ha hecho de este material uno de los más versátiles para tales aplicaciones, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones, añadiendo a estas las que se podrían hacer por parte del grupo hidroxilo también presente en su cadena (Chávez Huerta y Colina Rincón 2012).

Con el ánimo de ilustrar estos supuestos, en la Figura 1 se puede apreciar la estructura del material.

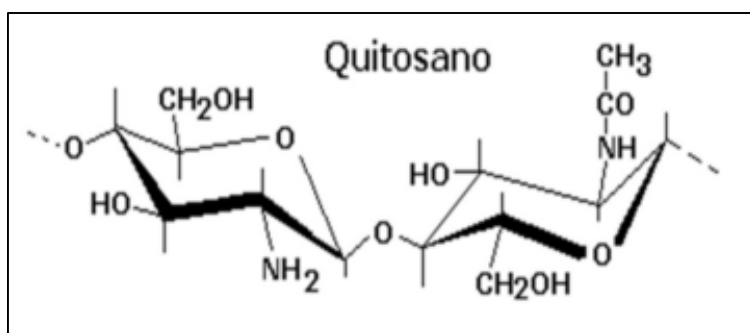


Figura 1. Estructura molecular del Quitosano (Mármol et al. 2011)

4.3. ANDAMIOS A PARTIR DE QS REFORZADO.

En los años recientes, la ingeniería de tejidos ha promovido la investigación encaminada hacia la búsqueda de materiales biocompatibles para su uso en la elaboración de andamios. Uno de estos materiales corresponde al quitosano, el cual se sitúa como el preferido debido a su capacidad extraordinaria de imitar la matriz extracelular (Sivashankari and Prabakaran 2016). Adicional a esto, se dice que los andamios basados en Quitosano, poseen propiedades pro-angiogénicas y de actividad antimicrobiana (Kanimozhi, Khaleel Basha, and Sugantha Kumari 2016), (Emanet et al. 2016).

Otra razón que hace al quitosano atractivo para esta aplicación, corresponde a la presencia de una amina primaria y grupos hidroxilo en su estructura que además de hacerlo químicamente modificable (funcionalizable), lo hace mucoadhesivo, hemostático, y totalmente capaz de enlazarse con las membranas celulares (Sivashankari y Prabakaran 2016).

El quitosano, por su parte, se degrada por hidrólisis enzimática y se advierte sobre su baja resistencia a la tracción y módulo de elasticidad (Kanimozhi, Basha, and Kumari 2016), por lo que se ven limitadas algunas de sus aplicaciones prácticas para la ingeniería de tejidos, abriendo la ventana de la investigación para modificar estas propiedades de gran interés.

Como alternativa para incrementar la resistencia mecánica de los andamios, (Mingxian Liu et al. 2016), han trabajado con compuestos de quitosano – nanocristales de quitina, obteniendo mejoras significativas en cuanto a resistencia a la tensión, módulo de elasticidad y densidad del andamio, teniendo incrementos en factores de 10, 11 y 14 veces más agregando nanocristales en 20, 40 y 60% respectivamente.

De igual forma, se elaboraron andamios porosos con quitosano – PVA – metilcelulosa, y se demostró un reforzamiento debido al fuerte enlace de hidrógeno intermolecular entre las moléculas de CS/PVA – MC y en general, se evidenció un incremento en las resistencias mecánicas y elasticidad debido a la incorporación de esta última gracias a fuertes interacciones entre el relleno y la matriz restringiendo de esta manera su movimiento (Kanimozhi, Khaleel Basha, y Sugantha Kumari 2016).

También, se registra la incorporación de nanotubos de carbono (Cooney et al., 2008), grafeno (Justin et al., 2010), arcillas (Tang et al., 2008) y nanopartículas de celulosa (Donnici et al., 2007), en andamios base quitosano, viendo en todos estos trabajos que la incorporación de refuerzos mejoró significativamente las propiedades mecánicas del andamio final.

Según esto, se puede señalar claramente que la incorporación de nanopartículas con grandes relaciones de aspecto en estructuras de baja resistencia mecánica,

puede incrementar significativamente sus módulos y resistencias. Como dato importante, se observó que algunas investigaciones han mostrado que la adición de óxido de grafeno (GO) en la composición de andamios de QS, mejora las propiedades mecánicas, la formación de poros y la bioactividad del material de andamiaje (Dinescu et al. 2014), haciéndolo un conveniente candidato para ingeniería de tejidos.

4.5. ÓXIDO DE GRAFENO

Según (Aguirre 2015), durante la última década se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de los *grafenos* químicamente modificados. Esto se hace, tomando como punto de partida la exfoliación química de óxidos de grafito dando lugar a lo que se conoce como *óxido de grafeno*. A diferencia del grafeno convencional, el óxido de grafeno posee en su superficie grupos funcionales con oxígeno, que permiten a éste ser funcionalizado por diferentes grupos químicos, lo que se evidencia en la Figura 2.

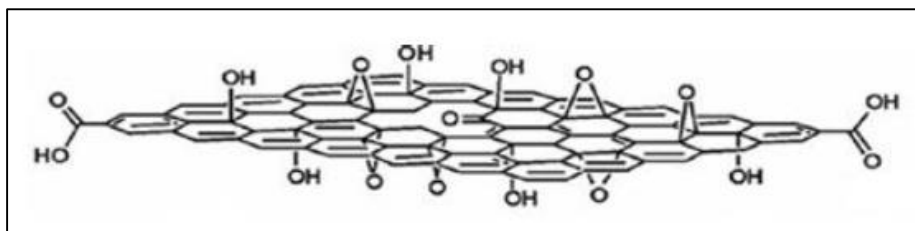


Figura 2. Modelo de la estructura del óxido de grafeno (Aguirre 2015).

El óxido de grafeno, como ya se mencionó, al tratarse de una disposición de oxígeno en su plano basal, puede ser bien dispersado en disolventes polares acuosos tales como agua, dejando abierta de esta manera la posibilidad de su producción en cantidad. Sin embargo, el GO contiene algunos defectos en su ya nombrado plano basal, por lo que se recomienda utilizarlo en varias capas, garantizando un apilamiento altamente entrecruzado para optimizar sus efectos. Desafortunadamente, el GO se ve afectado significativamente por el choque térmico (incluso a bajas temperaturas) debido a su metaestabilidad estructural, y por la humedad relativa, debido a su naturaleza hidrófila.

Las películas independientes de GO en un estado seco no permiten que las moléculas de gas penetren a través de sus laminas, incluso siendo tan pequeñas como ellas mismas, todo esto a causa de su alta energía potencial de barrera. La impermeabilidad a los gases la obtiene cuando estos intentan pasar entre las diversas capas de GO y se hace su camino tortuoso, por lo que esta impermeabilidad podría estar relacionada con el tamaño de las capas, su espesor y el contenido de agua residual (Yoo et al. 2014).

Respecto a sus mecanismos de producción, el autor alude al método que fue desarrollado por Staudermaser, Hummers y Offeusen, el cual consiste en hacer reaccionar al grafito vía oxidación con una mezcla de KMnO_4 y H_2SO_4 concentrado y las diferentes variaciones del método que se presentan en la actualidad.

4.6. USO DE ADITIVOS PLASTIFICANTES.

Según las investigaciones realizadas por (Casariego et al. 2009), las películas de quitosano obtenidas por evaporación de solvente no presentan buen comportamiento mecánico debido a su alta rigidez y fragilidad, por lo que se debe adicionar sustancias plastificantes que disminuyan dichas propiedades indeseables y aumenten su elasticidad. Los autores, sugieren que las incorporaciones de agentes plastificantes promueven un debilitamiento de las fuerzas intermoleculares a través de las cadenas poliméricas, ocasionando de esta manera, una reducción del esfuerzo tensil y un incremento en la flexibilidad de las películas, como se puede observar en la Figura 3 para 3 sustancias utilizadas como plastificantes: Glicerina, Sorbitol y Polietilenglicol.

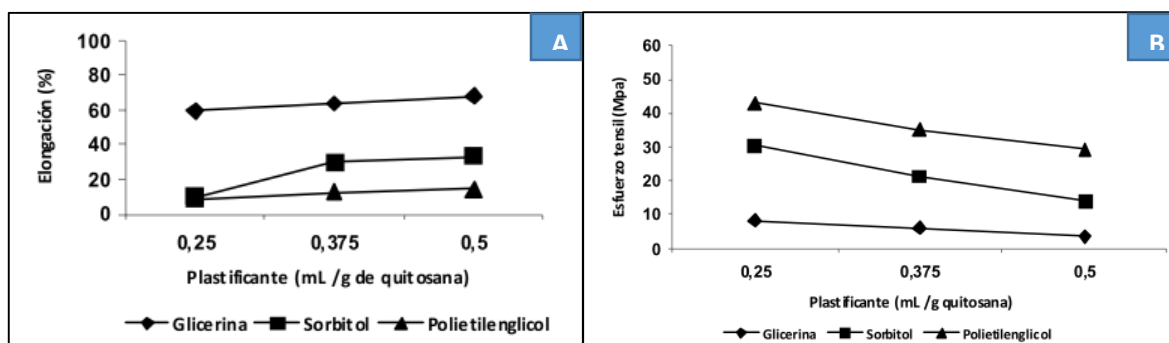


Figura 3. A) Influencia de los aditivos plastificantes sobre el porcentaje de elongación de películas de Quitosano. B) Influencia de los aditivos plastificantes sobre la resistencia a la tensión de películas de Quitosano (Casariego et al. 2009).

La marcada diferencia respecto al comportamiento de los plastificantes puede deberse a sus disimilitudes en cuanto a su estructura y por ende a los grados de interacción con el quitosano. Se sugiere el uso de glicerina debido a que sus moléculas poseen una alta constante dieléctrica y debido a esto, mayor polaridad en disolución que las de polietilenglicol y aún más que las de sorbitol, viéndose esto representado en el aumento significativo del porcentaje de elongación de las películas.

Autores como (Tharanathan 2003), afirman que el uso de plastificantes como el etilenglicol, la glicerina y el sorbitol reducen la fragilidad de la película al presentar interferencia con la unión de hidrógeno entre el lípido y las moléculas de hidrocoloides, e imparten flexibilidad que mejora el manejo del material en disposición de película.

Por otro lado (Gabriela et al. 2015) realizaron un estudio sobre las membranas de quitosano plastificadas y neutralizadas de sorbitol para la sustitución de la piel. Ambas membranas demostraron ser no citotóxicas y presentan buena superficie para el crecimiento celular. El sorbitol mejoró la flexibilidad de las membranas de quitosano reduciendo la cristalinidad. Debido a la mejora del esparramiento celular y la proliferación sobre sustratos amorfos, la concentración de sorbitol puede

modificarse adicionalmente para conseguir propiedades deseables para aplicaciones de ingeniería de tejidos de la piel.

Por su parte, (Mei Liu et al. 2014) investigaron el efecto del sorbitol sobre las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y térmicas de las películas de quitosano con diferentes grados de desacetilación. Tales propiedades sugirieron que la adición de sorbitol redujo el contenido de humedad y aumentó la solubilidad en agua de las películas de quitosano, los análisis mecánicos estáticos y dinámicos demostraron que el sorbitol aumentó la tensión, disminuyó el estrés y aumentaba la movilidad entre las moléculas de la mezcla, que resultó en películas menos rígidas y más flexibles.

Finalmente, los mismos autores en años anteriores, realizaron películas de quitosano y plastificante con el fin de analizar sus cambios estructurales. Observaron que el sorbitol era un buen agente de reticulación, generando la miscibilidad deseada en las películas de quitosano, se observó un aumento de la cristalinidad de las películas sin sorbitol y una disminución en las películas con sorbitol en comparación con el quitosano original, lo que demostró que con la adición de sorbitol no hay cambio en la estructura química del quitosano y no se crearon nuevos tipos de enlaces durante la formación de la película (Mei Liu et al. 2013b).

4.6. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ANDAMIOS

4.6.1. ELECTROSPINNING.

Electrospinning es una técnica atractiva y rentable para fabricar andamios de ingeniería de tejidos fibrosos de diversos biopolímeros naturales o sintéticos (He et al. 2014). Esta técnica permite obtener fibras por medio de estiramiento coaxial de una solución viscoelástica, estas fibras poseen diámetros que van de las sub micras a los nanómetros, rangos en los que es posible encontrar características únicas entre las que se encuentra: un área superficial muy grande en relación al volumen, flexibilidad en la superficie, alta porosidad, etc. (Marcela et al. 2014).

Existen tres componentes básicos para cumplir con el proceso de electrohilado: un proveedor de alta tensión, un tubo capilar con una pipeta o una aguja de pequeño diámetro, y una pantalla de recolección conductora (Huang et al. 2003), ilustrando de esta manera un esquema básico en la Figura 4. Esta técnica, consiste en hacer girar soluciones de polímero a través de altos campos eléctricos, aplicando suficientes fuerzas eléctricas que superen las fuerzas de la tensión superficial en la solución de polímero cargado. De esta forma, a un voltaje determinado, finos chorros de solución son expulsados desde el capilar hasta el plato colector. Posteriormente el chorro se mueve en la dirección del campo eléctrico, alargándose de acuerdo a las fuerzas externas e internas y experimentando inestabilidad en

algunas ocasiones. El disolvente se evapora y los segmentos de fibras son depositados al azar en un sustrato (Marcela et al. 2014).

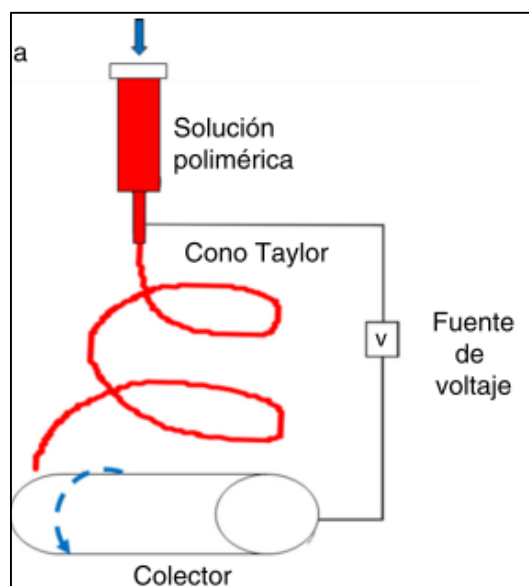


Figura 4. Esquema del proceso de *Electrospinning* (Valencia et al. 2017).

Un ejemplo del uso de esta técnica se demostró por parte de (Jeong et al. 2015) quienes desarrollaron nuevos andamios compuestos por nanofibras de colágeno de pescado y policaprolactona donde fueron mezclados mediante este método. Se encontró que los andamios no sólo facilitan la adhesión, extensión, protuberancias, y la proliferación de las células, sino también estimulan la expresión de genes y proteínas implicadas en la adhesión celular y el desarrollo de células. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los andamios elaborados serán un modelo útil de cultivo de células y pueden tener una amplia aplicación en el futuro para los tejidos u órganos de ingeniería. Por otro lado, (Jing et al. 2015) utilizó poliuretano termoplástico (TPU) / óxido de grafeno (GO) para la fabricación de los andamios mediante electrospinning con diferentes contenidos de GO como candidatos potenciales para los injertos vasculares de pequeño diámetro, donde se tuvo como resultado que la resistencia de retención de sutura y la presión de rotura de los andamios de TPU/ GO que contienen 0,5% de GO en peso cumplen los requisitos de los vasos sanguíneos humanos, y las células endoteliales fueron capaces de unirse a la superficie interior de los andamios tubulares. Por último, (W. Shao et al. 2016) fabricó un nuevo andamio utilizando el método en cuestión, el cual consistió en tejidos de nanofibras de capas múltiples tejiendo hilos de nanofibras de PLA y fibroína de seda. Como resultado tuvo que los andamios mejoraron de forma significativa la formación de hueso nuevo en cóndilo femoral dañado en conejos. Por lo tanto, los armazones son potencialmente adecuados para ingeniería de tejido óseo debido a la arquitectura biomimética, excelentes propiedades mecánicas y buena biocompatibilidad.

4.6.2. LIOFILIZACIÓN

Entre los muchos métodos disponibles para hacer andamios celulares de material compuesto, el método de liofilización es un método simple y conveniente para la fabricación de estructuras porosas con microestructuras y propiedades controlables (Sun et al. 2016). El objetivo de la liofilización es extraer un disolvente de sólidos disueltos o dispersos. De esta manera, al realizarse este proceso se obtendrá un material poroso (andamio). Los hoyos dejados por los cristales de hielo del proceso, constituyen el camino necesario para crear una estructura porosa, pero del mismo modo se advierte que el éxito y la precisión de dichas estructuras demanda un control exhaustivo del tamaño de poro en rangos micrométricos y la consistencia del andamio durante todo su tiempo de aplicación (Scoffin 2011).

Autores como (Madihally y Matthew 2012), examinaron el uso del quitosano para la formación de andamios porosos de microestructura controlada en diferentes geometrías tisulares relevantes, preparándolos por medio de liofilización a geles y soluciones de dicho material. Tales autores, advierten que los diámetros de poro pueden ser controlados dentro de un rango de 1-250 μm variando las condiciones de congelación. Ante las propiedades mecánicas de sus andamios, se pronuncian afirmando que las membranas porosas eran al menos dos veces más extensibles que las membranas de quitosano no porosas, pero con módulos y resistencias a tracción diez veces menores.

El control de la porosidad en estos procesos de liofilización se hace importante en el hecho de que es crucial para conseguir la tasa óptima de crecimiento de nuevo tejido, ya que a medida que crece en los poros, el andamio se degrada, dejando sólo el tejido regenerado sano en su lugar. Investigadores como (Garg, Chanana, and Joshi 2012), afirman que la temperatura de congelación, la presión de vacío y el periodo de tiempo del proceso, son factores importantes en la formación del andamio, por lo que se debe controlar la rata de enfriamiento debido a que en su trabajo se encontraron con que una rata de enfriamiento rápida conducía a poros más pequeños. Haciendo un estudio más profundo, (Scoffin 2011) estableció que el proceso de Liofilización debe hacerse en 3 etapas: congelamiento, secado primario y secado secundario.

De la etapa de congelamiento, se advierte que la forma en que se congele determina la estructura cristalina del andamio y que su porosidad final es subproducto de este proceso donde los cristales de hielo formados, dejan agujeros en la estructura cuando la muestra se seca. Este mismo autor, hace referencia a que se ha demostrado que las células endoteliales de los vasos sanguíneos crecen óptimamente con un andamio con un tamaño de poro de 20-80 μm , mientras que los osteoblastos requieren poros mayores de 100 μm para la formación ósea, por lo tanto, el control de la velocidad de formación de cristales es crítico para la producción exitosa y precisa de andamios.

De la segunda etapa, la de secado primario, se dice que una vez congelado, el andamio se seca para eliminar el disolvente por sublimación. La muestra se mantiene por debajo de su temperatura crítica de modo que permanece en estado congelado mientras se aplica un vacío moderado. La situación de equilibrio presión-temperatura se ajusta hasta alcanzar el punto triple de modo que el hielo se sublima directamente hasta vapor sin pasar por la fase líquida. Cabe resaltar que La sublimación conduce a un “enfriamiento evaporativo”, lo que reduce aún más la temperatura de la muestra y tomando medidas al respecto, se entiende que se debe mantener la muestra a una temperatura constante, aplicando calor para compensar el enfriamiento por sublimación. De pasarse por alto, el enfriamiento de la muestra y el proceso se detendrían, pero no debe llevarse al extremo puesto que una sobre adición de calor podría degradar el andamio.

La etapa tercera de secado secundario, correspondería a un proceso de desorción que elimina cualquier agua que está químicamente unida a la red. El secado por desorción se consigue elevando la temperatura de la muestra y reduciendo la presión al mínimo.

Las combinaciones de quitosano con otros materiales biocompatibles tales como fosfato de calcio se aplican para modificar las propiedades biomecánicas y de interacción célula-matriz, en donde autores como (Depan et al. 2011), establecen al óxido de grafeno como un material que también está en la facultad de modificar tales propiedades, así como también algunas otras como el hinchamiento in-vitro y la degradación hidrolítica en medios biológicos.

Adicional a esto, también se ha estudiado sobre el reforzamiento de estos andamios liofilizados, como es el caso de (Mohammadi, Mesgar y Rasouli-Disfani 2016), quienes utilizaron fibras cortas de fosfato de calcio multifásico, obteniendo que la incorporación de estas fibras conllevó a un aumento en el tamaño de los poros, un incremento en la densidad, la resistencia y el módulo de compresión, y una disminución en la proporción de porosidad e hinchamiento de los andamios, además de confirmarse la bioactividad in vitro mediante la formación de una capa rica en fosfato de calcio en la superficie de los andamios, embebidos en fluido biológico simulado.

4.7. PRUEBAS BIOLÓGICAS

4.7.1. DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA

Este ensayo es realizado como soporte de evaluación de la velocidad de degradación (pérdida de masa) y los cambios en las propiedades de los polímeros utilizados como implantes quirúrgicos según lo descrito por la norma ASTM F 1635-2011. La degradación hidrolítica de un polímero es consecuencia del contacto del material con un medio acuoso. La introducción del agua dentro de la matriz polimérica genera la hidratación de las moléculas, ruptura de puentes de hidrogeno intermoleculares, hinchamiento y por último la hidrólisis de los enlaces inestables.

La ruptura por hidrólisis de los grupos funcionales, se puede generar tanto en los grupos que se encuentran en la cadena principal como en los sustituyentes laterales (Figueira 2008). El agua interacciona de forma eficaz con polímeros no hidrófobos, ocasionando fenómenos de hinchamiento y disolución, pudiendo ser un agente responsable de la biodegradación de polímeros en el organismo humano.

Otro resultado de los procesos hidrolíticos es la reducción de las propiedades mecánicas del material, siendo de gran importancia que la hidrólisis se genere a una velocidad tal que dé el tiempo necesario para que fortalezca la fractura antes que el material pierda totalmente su resistencia mecánica, hablando claramente de aplicaciones biomédicas (Sabino et al, 2004).

(Olivas-Armendáriz et al. 2009), realizaron la preparación y caracterización de compuestos de quitosano/nanotubos de carbono para su aplicación en ingeniería de tejidos a los cuales se realizó el ensayo de degradación hidrolítica, obteniendo la mayor pérdida de peso para las muestras de solo quitosano, la cual exhibió una pérdida cercana al 10% durante el periodo de estudio. Por otro lado, al final del periodo las probetas con adición de nanotubos de carbono, mantuvieron su estructura, pero perdiendo masa sólo entre 6 y 8%.

Por su parte, (Depan, Shah y Misra 2013), estudiaron el mecanismo de degradación de andamios híbridos basados en quitosano reticulados con carbono nanoestructurado (CNS). El estudio se llevó a cabo en solución de fluido biológico simulado (FBS) a pH 7,4 y 37°C, cuantificando la degradación como el cambio de peso de la muestra con el tiempo. Se pudo observar que la pérdida de peso promedio total fue de ~28% para QS puro y ~ 20% para los andamios híbridos QS-CNS, con lo que se demostró que el uso de carbono nanoestructurado disminuyó la degradación de los andamios en comparación con el que presentó solo QS, debido a que se generó un aumento en la integridad estructural de los andamios.

Por último, (Thomas Freier et al., 2005) realizaron el estudio de la biodegradación y compatibilidad celular a QS con diferentes grados de acetilación. Para ello realizaron la degradación in vitro en un FBS pH 7,4 y a 37°C, con la presencia de 1,5 µg/ml de la enzima lisozima. Al cabo de 4 semanas de degradación, obtuvieron una pérdida de masa mayor al 50% para las películas con 30-70% de acetilación, mientras que la degradación de las muestras con muy bajos o altos grados de acetilación, fue mínima en dicho tiempo. Esta investigación, señaló el hecho de que las propiedades del QS, su grado de acetilación (DA) y su peso molecular, influyen significativamente en la velocidad de degradación, obteniendo finalmente que en las muestras de DA *intermedio* hubo una alta velocidad de degradación y para las muestras de DA *mínimo* o *máximo*, la degradación fue poco apreciable. De esta manera concluyeron que la habilidad de variar el DA es un arma importante para ajustar las propiedades mecánicas, de biodegradación y biocompatibilidad del QS.

4.7.2. PRUEBA DE TOXICIDAD CON ARTEMIA SALINA.

Durante los últimos 50 años, se han utilizado diversos invertebrados como posibles candidatos para indagar sobre su sensibilidad ante muchos agentes físicos y químicos en pro de su posible uso como modelos de proyección para dar pasos siguientes en estudios de toxicidad al material en cuestión. Internacionalmente, la artemia salina ha sido una de las especies más usadas para la evaluación de la toxicidad del medio que se está estudiando, tratándose de un biotipo hipersalino que se alimenta principalmente de fitoplancton y que se usa regularmente en acuicultura y acuarios. Su uso en pruebas de toxicidad lo hace históricamente un popular modelo biológico que aún requiere una estandarización oficial (Libralato et al. 2016).

Para este ensayo existen dos enfoques importantes. El primero, consiste en la visualización a *corto plazo* que incluye el comportamiento en biomarcadores, la eclosión de los huevos, el comportamiento de los *nauplios* (velocidad de nadado y la longitud del camino recorrido), la teratogénesis o crecimiento de la larva y por último la inmovilización o *mortalidad* que se caracteriza por la quietud de la artemia durante 5 a 30 segundos de observación. Para el segundo de los enfoques, se tiene la observación a largo plazo en donde se analiza el crecimiento, la reproducción y la supervivencia o mortalidad de las artemias después de 7 a 28 días de exposición desde la etapa de larva hasta su etapa adulta. Cabe resaltar, que para analizar ambos enfoques se utilizaron factores definidos de cantidad de huevos expuesta y sus respectivos organismos crecidos y condiciones de exposición (salinidad, pH, intensidad lumínica, aireación y disponibilidad de alimento). (Libralato et al. 2016).

Las principales ventajas de usar estos modelos biológicos en pruebas de toxicidad corresponden con su rapidez de incubación, relación costo-efectividad y la disponibilidad de conseguirlos en presentación de huevos con lo que se puede lograr la homogeneidad de la población y sobresale su gran durabilidad (incluso años) sin necesidad de eclosionarlos (Manfra et al. 2016). Por otro lado, utilizar este método tiene las ventajas de que su manipulación es sencilla y se puede mantener bajo condiciones de laboratorio, además de que su pequeño cuerpo permite una acomodación perfecta de varios modelos en recipientes pequeños y la alta adaptabilidad a varias condiciones de ensayo (Carvalho 2006).

Autores como (Manfra et al. 2016), hicieron visualizaciones de alteración de velocidad de nadado y de mortalidad con artemia salina franciscana, en donde estudiaron los valores de letalidad para exposiciones de 24-48 horas para dos sustancias de referencia: Sulfato de cobre pentahidrato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y Dodecil sulfato de sodio (SDS), y un compuesto orgánico de Dietilenglicol (DEG). Se encontró que los resultados del ensayo fueron aceptables, puesto que la tasa de mortalidad de las artemias en las sustancias evaluadas fue menor al 10% acorde con los protocolos utilizados en la investigación. Se pudo analizar que la alteración

en la velocidad de nadado y los porcentajes de mortalidad de la artemia después de 24 horas de exposición en el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ fueron mayores en comparación con el SDS, pero se resaltó que la exposición en DEG tuvo la menor toxicidad de toda la prueba.

4.7.3. ENSAYOS DE ADHESIÓN Y CRECIMIENTO CELULAR.

En la ingeniería de tejidos óseos, un andamio ideal debe ser osteoconductor, osteoinductivo y osteogénico. Los andamios osteoconductivos requieren injertos biocompatibles que promuevan el apego, supervivencia, migración y distribución de células osteogénicas. Los implantes osteogénicos presentan células madre osteogénicas o células progenitoras para la regeneración ósea, en la Figura 5 se puede observar el esquema de los procesos celulares anteriormente mencionados que tienen lugar cuando se implanta un biomaterial en el cuerpo.

La ingeniería de tejidos con el motivo de cumplir los requisitos anteriormente mencionados, emplea la estrategia biomimética donde se puede encontrar biomateriales (andamios), estímulos bioquímicos y físicos, células madre, vascularización, y un arreglo categórico de la matriz extracelular natural para crear tejido óseo funcional. Estos esfuerzos biomiméticos incluyen la elección de biomateriales que se encuentran presentes en el hueso nativo, la elaboración de arquitecturas de escala múltiple en andamios, principalmente cuando se encuentran a escala nano métrica y por último la incorporación de factores de crecimiento, vascularización y/o células madre para estimular la reparación y regeneración ósea (Rios et. Al.,2009).

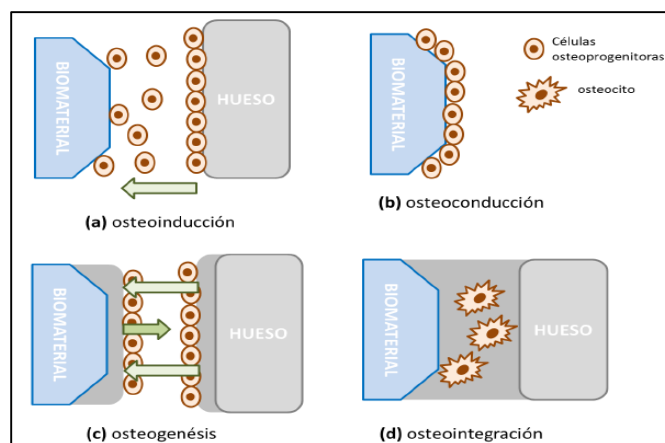


Figura 5. Esquema de los procesos celulares al implantar un biomaterial en el cuerpo (Belén and Montes 2013).

Por su parte, autores como (Zhensheng et. al., 2015), estudiaron la adhesión celular, la proliferación y la osteoconductividad de andamios de quitosano (QS) y de quitosano-alginato (QA) a los que les sembraron células de osteoblasto MG63 y se cultivaron en medio de cultivo estándar sin reactivos osteogénicos. El medio contenía 10% de suero bovino fetal (FBS), 50 UI/ml de penicilina, y 50 μg /ml de estreptomycin. La proliferación de osteoblastos en ambos andamios de QS y de

QA se evaluó usando el ensayo Alamar Blue. El número de células tanto en QS como QA aumentó con el paso del tiempo. Las células en los andamios de QA eran muchas más al compararse los de los andamios de QS a través del período de estudio.

Recientemente se ha demostrado que los andamios de quitosano-gelatina/nano-HA mejoraron la adsorción de proteínas y la fijación de células en las superficies internas del andamio. Además, la respuesta biológica de las células osteoblásticas sobre los andamios nano-biocompuestos mejoró en cuanto a la unión celular, proliferación y morfología en comparación con los andamios de quitosano-gelatina (Bao et. al., 2010).

Finalmente, (Chuang et. al., 1999) comprobaron la afinidad de los fibroblastos con el quitosano, para ello determinaron la interacción de la línea de fibroblastos L-929 con hidrogeles de quitosano-polialcohol vinílico (PVA), los cuales favorecieron la adhesión y crecimiento celular “in vitro”, con una proliferación considerable y estimulación de la respuesta celular.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología experimental llevada a cabo, se ilustra de maneras sistemática en la Figura 6.

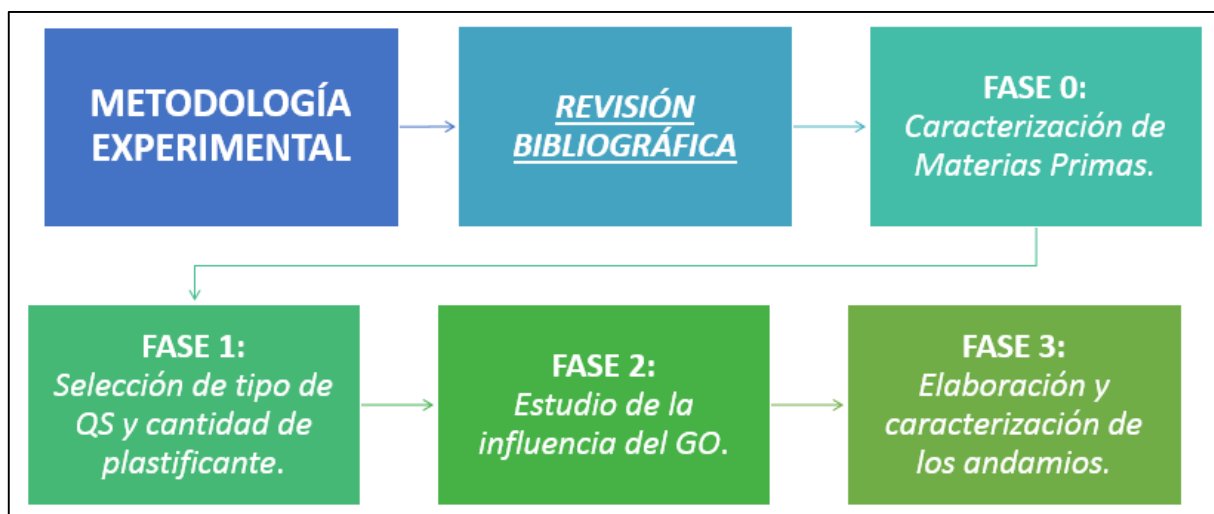


Figura 6. Esquema de la metodología experimental seguida en la investigación.

5.1. MATERIALES

Para la elaboración de la presente investigación se utilizó quitosano comercial de bajo y mediano peso molecular comprado a Sigma-Aldrich, al igual que el Sorbitol y el PVA. El ácido acético glacial usado en la elaboración de las películas y los andamios se obtuvo de la empresa Merck.

Para la síntesis del óxido de grafeno se usó grafito de la marca Alfa Aesar en hojuelas, de base metálica al 98% y tamaño de partícula menor al que pasa por la

mallá 325. También se usó H_2SO_4 concentrado al 95-97%, KMnO_4 , H_2O_2 al 30% e isopropanol, marca MERCK.

Los reactivos para la elaboración del fluido biológico simulado para los ensayos de degradación hidrolítica se describen en la sección 5.8.2.

5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se desarrolló la investigación actual en 3 etapas, resultando así en un diseño de experimentos para cada una de ellas.

FASE 1: SELECCIÓN DEL TIPO DE QS Y CANTIDAD DE PLASTIFICANTE USADO EN LAS PELICULAS

Se plantearon experimentalmente tres factores: peso molecular con dos niveles (bajo peso molecular, mediano peso molecular), adición de plastificante sorbitol con cuatro niveles (0,0.2, 0.4, 0.6%) y humedad relativa con dos niveles (50 y 80%). De esta etapa de experimentación se seleccionó el porcentaje de plastificante y el tipo de polímero para la elaboración de las películas y andamios liofilizados, se puede observar sistemáticamente en la Figura 7.

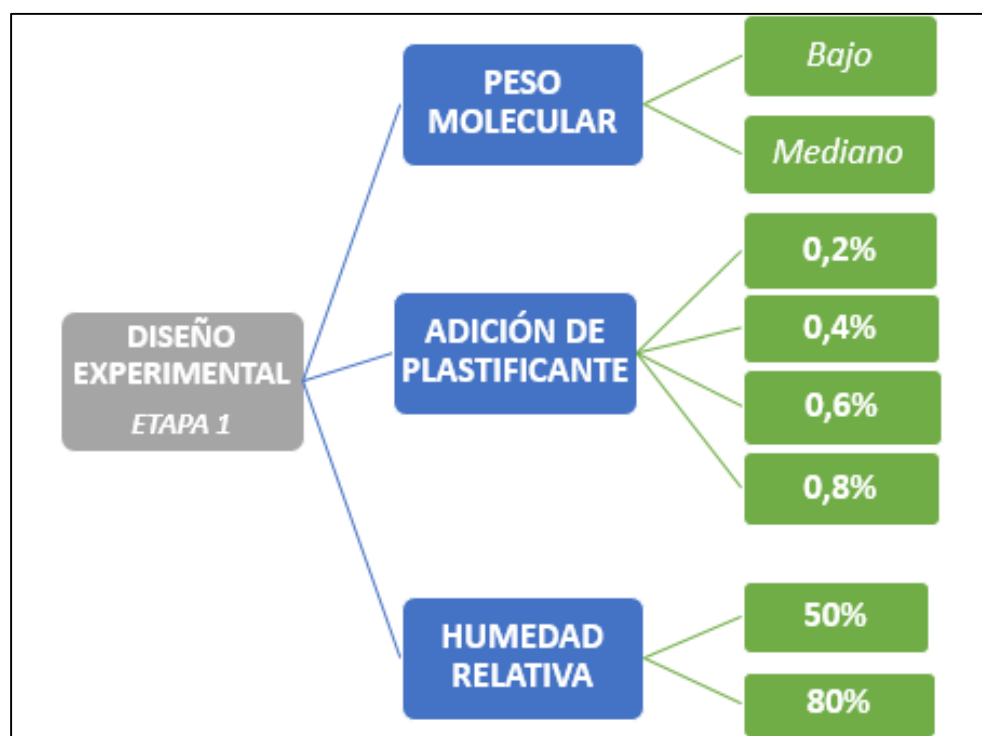


Figura 7. Diseño experimental seguido para la etapa 1.

FASE 2: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL GO

Se planteó un solo factor: Cantidad de óxido de grafeno con cinco niveles (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1%) y se dejó la humedad relativa a 50%. De esta etapa de experimentación se seleccionaron las cantidades de óxido de grafeno para los estudios posteriores.

FASE 3: ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS

Teniendo claro el tipo de polímero, cantidad de plastificante y porcentajes de óxido de grafeno, se procedió a elaborar los respectivos andamios liofilizados todos bajo las mismas condiciones para hacer su posterior caracterización. Se siguió trabajando con las mismas cantidades de GO, para mirar su influencia en los ensayos biológicos.

5.3. METODOLOGÍA FASE CERO

5.3.1. CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO

- MEDICIÓN DEL GRADO DE DESACETILACIÓN

ANÁLISIS ELEMENTAL:

El grado de desacetilación del quitosano (GD) fue calculado a partir de la composición elemental obtenida con un analizador de carbono, hidrogeno y nitrógeno, para ello se utilizó un equipo marca *THERMO-SCIENTIFIC* modelo *FLASH EA1112*, para lo que se pesó entre 2 y 3 mg de muestra en una microbalanza. Los elementos fueron determinados como dióxido de carbono, agua y óxido de nitrógeno a través de celdas de infrarrojo. El GD fue calculado de la relación Carbono/Nitrógeno (C/N) donde su rango de valores está entre 5.145 y 6.861 (Beltrán-Patiño 2013). La fórmula para obtener el GD se muestra en la ecuación 1.

$$\%GD = 100 - \left(\left(\frac{C/N - 5,145}{6,861 - 5,145} \right) * 100 \right) \quad [1]$$

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).

El ensayo de resonancia magnética nuclear se hizo con un espectrofotómetro marca *BRUKER* modelo *AVANCE II -400*, y correspondió con un experimento protónico-¹H. Para su realización se disolvió 12 mg de QS en Dimetil-Sulfoxido (DMSO) a lo que se añadieron tres gotas de ácido trifluoro-acético deuterado. Para realizar el cálculo se utilizó la ecuación 2.

$$\%GD = \left(1 - \left(\frac{2 \cdot A_{CH3}}{A_{H2-H6}} \right) \right) * 100 \quad [2]$$

PESO MOLECULAR (VISCOSIMETRÍA CAPILAR)

Para este ensayo se utilizó un viscosímetro Ubbelohde 0C, y un montaje completo de baño termostático a 25 °C.

Se preparó inicialmente un litro de solución de ácido acético 0.1 M y cloruro de sodio 0.2 M, de donde se utilizaron 250 ml para disolver 2 gramos de QS en un vaso de precipitado mediante un agitador magnético durante 5 días aproximadamente. Este procedimiento se llevó a cabo para los QS de bajo y mediano peso molecular. Acto seguido, se sacaron las alícuotas correspondientes para elaborar soluciones con concentraciones de 3.2×10^{-4} , 4.16×10^{-4} , 5.12×10^{-4} , 6.08×10^{-4} , 7.04×10^{-4} , 8×10^{-4} g/ml.

Siguiendo el procedimiento llevado a cabo por (Muñoz et al. 2015), se agregaron las soluciones al viscosímetro inmerso en totalidad en el baño termostático y se pipeteó la solución hasta sobrepasar los dos bulbos superiores, y se contó el tiempo de paso entre las dos líneas oscuras.

Se tomaron los tiempos por triplicado y se hizo su promedio la viscosidad relativa con la Ecuación 3, en donde t corresponde al tiempo de cada solución y t_o al tiempo de la solución base.

$$n_{rel} = \frac{t}{t_o} \quad [3]$$

Con este valor, se determinó la viscosidad específica, según la Ecuación 4.

$$n_{esp} = n_{rel} - 1 \quad [4]$$

Teniendo la viscosidad específica, se calculó la viscosidad reducida, siguiendo lo descrito en la Ecuación 5, donde C corresponde a la concentración de cada solución.

$$n_{red} = \frac{n_{esp}}{C} \quad [5]$$

Se graficó la viscosidad reducida de cada una de las soluciones en función de su concentración, cuyo corte con el eje y correspondió con la viscosidad intrínseca η_i , que será usado en la Ecuación 6 de Mark-Houwink-Sakurada para determinar el peso molecular en donde K y α son constantes para un sistema particular polímero-solvente a una temperatura dada. Para el caso actual se usaron como $K=1,81 \times 10^{-3}$ mL/g y $\alpha = 0,93$ obtenidos del procedimiento experimental seguido por (Muñoz et al. 2015) .

$$[n] = K \left(\frac{M_v}{M_o} \right)^\alpha \quad [6]$$

5.3.2. SINTESIS Y CARÁCTERIZACIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO

- **SÍNTESIS DEL ÓXIDO DE GRAFENO**

El óxido de grafeno se obtuvo del Método de Hummers modificado a partir de grafito natural, siguiendo paso a paso lo descrito por los autores citados (G. Shao et al. 2012). Para la síntesis se utilizó 3 gramos de grafito y 400 ml de H_2SO_4 , los cuales se mezclaron en un matraz durante 10 min. Luego, se añadían 3 gramos de $KMnO_4$ a la mezcla, resultando en una solución como la que se evidencia en la Figura 8.

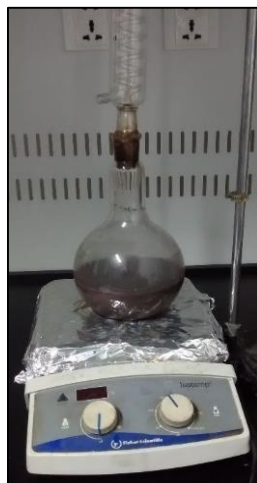


Figura 8. Balón con mezcla de grafito, H_2SO_4 y $KMnO_4$.

Se agregó $KMnO_4$ durante 3 días hasta 24 horas antes de la detención de la reacción, la que se hizo mezclando la solución obtenida con hielo de Agua Milli-Q y dividiéndola en 4 partes iguales en vasos de precipitado llenos hasta los 300ml, dejando agitar a 160 rpm durante 10 minutos para luego agregar 2ml de H_2O_2 a cada una de las 4 partes, véase Figura 9.

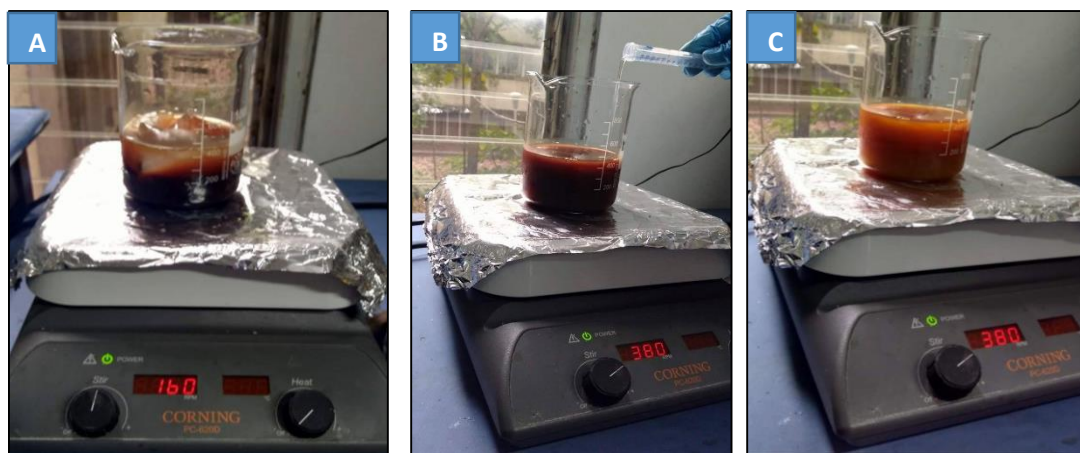


Figura 9. Detección de la reacción. A) Solución obtenida con hielo de agua Milli-Q. B) Adición del H_2O_2 . C) Reacción detenida.

La solución resultante se colocó en Tubos Falcon de capacidad 50ml, y se centrifugó a 7600 rpm durante 10 minutos, obteniendo una separación de dos fases: una fase lodosa, depositada en la parte inferior del tubo que se llamó sedimento, y una fase líquida transparente la cual se descartó, véase Figura 10.



Figura 10. Proceso de centrifugado. A) Solución sin lavar, B) Centrifugado, C) Separación de sedimento – residuo.

El paso siguiente en la síntesis correspondió con el lavado, el cual se hizo primero con agua Milli-Q y posteriormente con isopropanol con ayuda de la centrifuga hasta alcanzar un pH igual a 5.

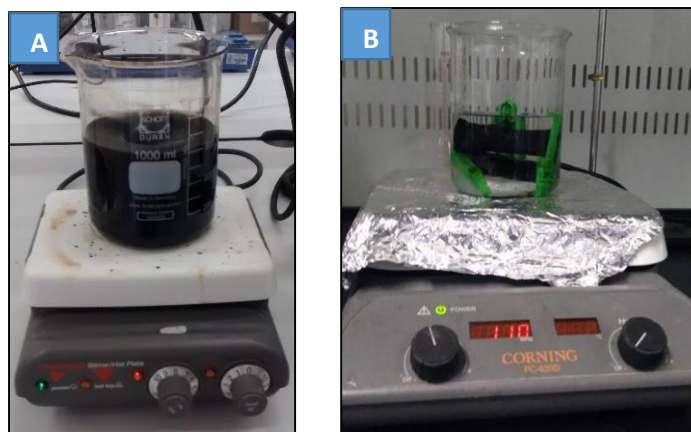


Figura 11. Procesos de purificación del lodo. A) Lavado con isopropanol, B) Diálisis.

La purificación del material se realizó mediante diálisis con tubos *SnakeSkin* de Thermo Scientific Labs de 3,5K MWCO en isopropanol a 110 rpm durante 72 horas (véase Figura 11B).

Al cabo de la diálisis, se volvió a lavar el sedimento en 2 litros de Agua Milli-Q y luego se recolectó por medio de centrifugado en Tubos Falcon, para eliminar el isopropanol y posteriormente se congeló la muestra a -40°C por 24 horas y se liofilizó en un liofilizador *LABCONCO Freezone 4.5* a -51°C y 0,12 mBar de presión, durante 24 horas más. Al cabo de este tiempo, se obtuvo el óxido de grafito ilustrado en la Figura 12A), el cual luego se dispersó en medio acuoso utilizando un

ultrasonido marca *Branson 5800* durante 15 minutos para obtener finalmente óxido de grafeno ilustrado en la Figura 12B).

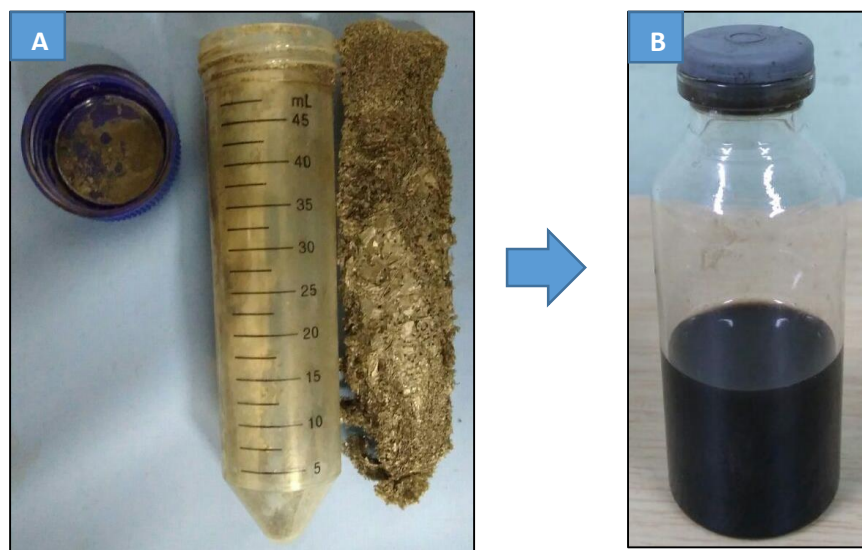


Figura 12. A) Óxido de grafito justo después de la liofilización. B) Suspensión de Óxido de grafeno.

- **CARACTERIZACIÓN DEL ÓXIDO DE GRAFENO**

ESPECTROSCOPIA RAMAN:

La espectroscopia Raman se realizó con el equipo *Thermo Scientific DXR*, disponible en el Tecnoparque Nodo Cali, con una fuente de excitación de 580 nm. Se utilizó para observar el comportamiento de los fonones acústicos y ópticos presentes en el óxido de grafeno, depositado sobre silicio (100).

DRX:

El ensayo se realizó en un equipo *X'pert PRO* de *PANalytical*, con una radiación de $k(\alpha_1)$ 1.540598 y $k(\alpha_2)$ 1.544426 provenientes de un ánodo de cobre (Cu), un voltaje acelerador de electrones 45 kV y una corriente para generar electrones 40 mA. Las rejillas ópticas de haz incidente fueron de $1/4^\circ$ y $1/8^\circ$, y las de haz difractado y soler fueron de 75 mm y 0.04 rad respectivamente. De igual forma se usó un detector PIXel en modo Scanning con una longitud activa ($^\circ$) de 2.5108, un tamaño de paso 0.0197 $^\circ$ y un rango de $2(\theta)$ $4^\circ - 90^\circ$ para un tiempo por paso de 304.390 segundos.

FTIR:

Los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) se registraron usando el espectrofotómetro *IRAffinity-1* de marca *Shimadzu* en el intervalo entre 4000 y 600 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} , utilizando el método de ATR, con el

que se logró hacer la medida directamente sobre una muestra del óxido de grafeno obtenido.

5.4. METODOLOGÍA FASE UNO

5.4.1. ELABORACIÓN DE SOLUCIONES

Las diferentes soluciones de QS, se prepararon según lo descrito por (Mei Liu et al. 2014), por lo que se implementó como base una disolución acuosa de ácido acético al 2% (v/v) y se conservó la concentración de QS al 2% (p/v). Cabe resaltar que se utilizó tal base y tal proporción de QS para todas las soluciones incluyendo las patrón, las adicionadas con plastificante y las reforzadas con GO. La adición de estos últimos componentes se hizo respecto a la cantidad de QS.

SOLUCIONES DE QUITOSANO (PATRÓN)

Se preparó una disolución al 2% (p/v) de QS en una solución de ácido acético al 2% y se homogeneizó con ayuda de un dispersor IKA ULTRATURRAX T25 entre 13000 y 15000 rpm el cual se muestra en la Figura 13. Las soluciones se almacenaron en recipientes tubos Falcón, y luego se centrifugaron a 8000 RPM durante 5 minutos con la finalidad de eliminar burbujas y precipitar impurezas no disueltas al borde del envase. Este procedimiento se realizó con el QS de bajo y mediano peso molecular.

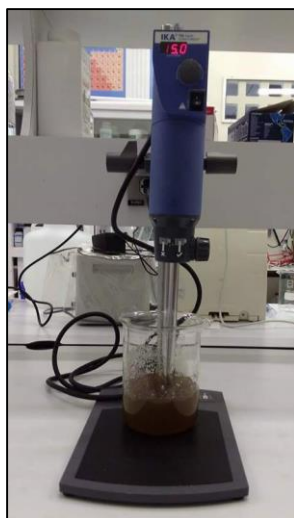


Figura 13. *Dispersión de una solución de QS-GO con el IKA ULTRATURRAX T25.*

SOLUCIONES DE QUITOSANO-PLASTIFICANTE (SORBITOL)

Para la preparación de estas soluciones, se utilizó el mismo procedimiento de las soluciones anteriormente mencionadas, solo que se agregó además del QS de bajo y mediano peso molecular, cantidades de sorbitol de 0.2, 0.4 y 0.6%, durante el proceso de dispersión con el ULTRATURRAX.

5.4.2. ELABORACIÓN DE PELÍCULAS.

Una vez obtenidas las diferentes soluciones de QS y de QS con adiciones, se procedió a preparar las películas por el método de *Film-Casting* propuesto por (Mei Liu et al. 2014) y (Aguirre-Loredo et al., 2016), donde básicamente se depositó una solución líquida de QS en un molde y luego se le realizó un curado controlado para obtener una película sólida y desprendible del sustrato.

DISEÑO DEL MOLDE:

Los moldes implementados para esta finalidad pasaron por un proceso de evolución a lo largo del presente trabajo, iniciando con un contorno de teflón con la forma de la probeta según las dimensiones descritas por la norma ASTM D882 -12 "*Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*", y un sustrato de vidrio, resultando en la alta adherencia entre la película de QS y el vidrio imposibilitando su extracción. Luego se intentó con un molde fabricado enteramente de teflón, el cual era costoso y único en su especie, por lo que limitó la producción de películas y se decidió descartarlo. Finalmente, se encontró que un sustrato de acetato de celulosa no daba cabida a una alta adherencia con la película de QS, la cual se limitó con teflón con una abertura de 150x90 mm, tal como se evidencia en la Figura 14.

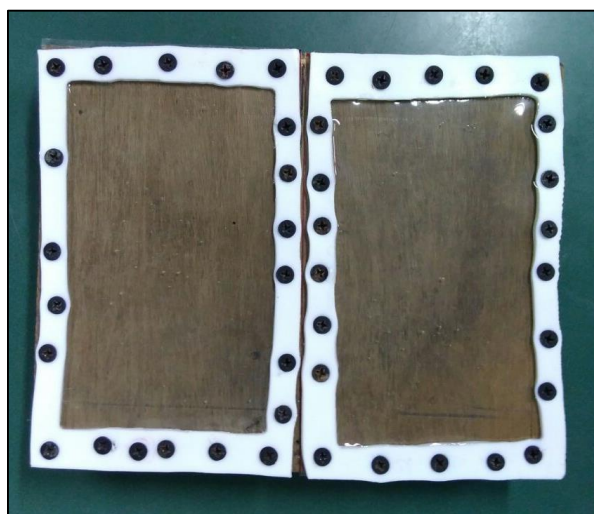


Figura 14. Molde definitivo para preparación de películas.

CONDICIONES DE CURADO:

Listas las películas, se dejaron secar a temperatura ambiente (25°C) durante 24 horas, siguiendo el procedimiento descrito por (Martínez-Camacho et al., 2010).

Luego de esta primera fase de secado, se llevaron los moldes con las soluciones a un horno a 40±2 °C marca *Quincy Lab inc.* Referencia 40GC, durante otras 24

horas, hasta que se evaporó la solución en totalidad y resultó sobre el acetato una película uniforme, homogénea y desprendible.

CORTE Y ACONDICIONAMIENTO:

Obtenida la película después de las condiciones de curado, se desprendió del acetato siendo cuidadosos con su integridad y se cortaron las rebabas de sus bordes con una guillotina marca *deli No.8016* para luego establecer las medidas de las probetas marcando sobre la película cuatro rectángulos de 140x20mm, los que subsecuentemente se cortaron con la guillotina, garantizando un solo corte que no diera lugar a concentraciones de esfuerzos. Acto seguido se llevaron las probetas a acondicionamiento en desecadores separados a 50 y 80% de Humedad Relativa durante más de 36 horas según lo descrito en la norma ASTM E104-02, hasta que se ensayaron a tracción.

5.4.3. CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS

Se decidió elaborar películas con las diferentes soluciones elaboradas, con la finalidad de evaluar sus propiedades mecánicas y en degradación hidrolítica, esperando de esta manera tener un acercamiento a la composición idónea para los andamios finales.

PROPIEDADES MECÁNICAS:

Una vez acondicionadas las películas a las humedades relativas correspondientes de 50% y 80% por un tiempo mayor a 36 horas y utilizando lo descrito en la norma ASTM E 104-02 "*Standard Practice for Maintaining Constant Relative Humidity by Means of Aqueous Solutions*", se les realizaron a cada una de ellas ensayos mecánicos de tensión utilizando una máquina universal de ensayos Shimadzu Ez-X, con una celda de carga con capacidad máxima de 0,5 kN con base en lo descrito por la norma ASTM D882-12 "*Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*".

Cabe resaltar, que las dimensiones de las películas ensayas fueron 150x20mm, con una longitud calibrada entre mordazas de 100mm, y los espesores fueron medidos con un micrómetro Mitutoyo IP 65 con el que se tomaron tres medidas por probeta y su promedio se reportó para obtener una mayor exactitud en las pruebas mecánicas. La velocidad de ensayo de la máquina fue de 50mm/min.

Las propiedades mecánicas a evaluar fueron resistencia máxima a tensión (MPa) y porcentaje máximo de deformación (%), con los cuales se hizo un análisis posterior para definir la cantidad de plastificante más acorde con la aplicación, y la influencia del GO en las propiedades mecánicas y con ello definir parámetros para la composición final de los andamios.

DEGRADACIÓN HIDROLITICA:

Inicialmente, se preparó un medio de ensayo correspondiente a Fluido Bilógico Simulado (FBS) según lo descrito por (Kokubo and Takadama 2006), con las cantidades y el orden específico dispuesto en la Tabla 1. Se calcularon dichas cantidades para obtener un litro de solución. Adicionalmente, se ajustó su pH a 7,4 adicionando gotas de HCl 0,1N y TRIS.

Para la primera prueba de degradación (QS-plastificante), se elaboraron películas siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente pero solo para las composiciones con 0,4% de plastificante, con la finalidad de determinar el tipo de polímero más resistente a la degradación de acuerdo con su peso molecular (BPM o MPM) y obtener con esto un dato más de la composición final, para producir los respectivos andamios.

Tabla 1. Orden y cantidades de los reactivos para preparar 1000 ml de SBF (Kokubo and Takadama 2006).

ORDEN	REACTIVO	CANTIDAD
1	NaCl	8,035 g
2	NaHCO ₃	0,355 g
3	KCl	0,225 g
4	K ₂ HP04-3H ₂ O	0,231 g
5	MgCl ₂ -6H ₂ O	0,311 g
6	1.0M-HCl	39 ml
7	CaCl ₂	0,292 g
8	Na ₂ SO ₄	0,072 g
9	Tris	6,118 g
10	1.0M-HCl	0-5 ml

De esta manera, se cortaron 18 probetas de 20x20mm de cada composición teniendo en cuenta el acondicionamiento a las respectivas humedades relativas, es decir: BPM 50% HR, MPM 50% HR, BPM 80% HR y MPM 80% HR, teniendo un total de 72 probetas las cuales se pesaron inicialmente para luego depositarlas individualmente en cajas Petri marcadas con un numero específico, usando este como *Día 0*. Acto seguido, se adicionaron 10ml de FBS a cada uno de los recipientes y se dejaron en una incubadora Memmert IN 110, a 37°C con la finalidad de simular las condiciones de temperatura del cuerpo humano.

Cabe resaltar, que a las últimas tres probetas de cada composición (16-18, 34-36, 52-54,70-72), sólo se les tomó pH en los días de toma de datos. De las demás probetas se registró su peso húmedo (peso al sacarlas de la caja Petri y secarlas ligeramente con un papel absorbente) y su peso seco (peso al disponerlas el tiempo necesario en un horno a 40°C hasta tenerlo constante), en la Figura 15 se evidencia

el proceso de extracción de las películas de la caja Petri con FBS para su posterior toma de pesos (véase Tabla 2).

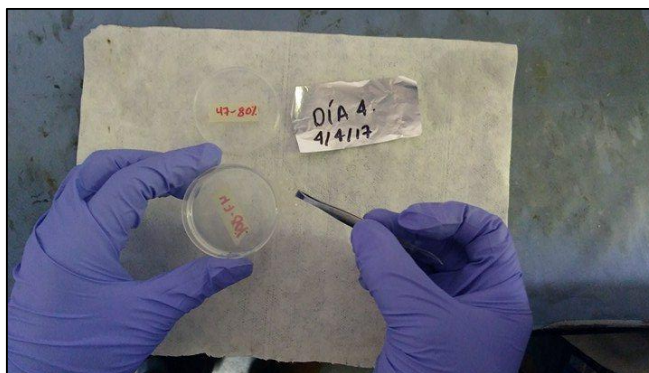


Figura 15. Extracción y secado de la probeta inmersa en FBS para el posterior registro de sus pesos.

Tabla 2. Días en que se registraron los datos.

Día	Fechas	Duración (días)
Día 0	22/Marzo/2017	0
Día 1	24/Marzo/2017	2
Día 2	27/Marzo/2017	5
Día 3	29/Marzo/2017	7
Día 4	4/Abril/2017	14
Día 5	12/Abril/2017	21

5.4. METODOLOGÍA FASE DOS

Para determinar la influencia del GO sobre los futuros andamios, se elaboraron películas utilizando la misma metodología descrita en la fase uno, llevando a cabo el procedimiento subsecuente.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE QUITOSANO Y ÓXIDO DE GRAFENO PLASTIFICADAS

A las soluciones preparadas como se describió anteriormente se les adicionó 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1% de GO con respecto al peso de QS. El GO se dispersó en agua Milli-Q en un ultrasonido *Branson 5800* durante 15 minutos de acuerdo con lo establecido por (Han et al. 2011).

Finalmente se tuvieron soluciones de coloración oscura, las cuales se utilizaron para la elaboración de películas que se caracterizaron posteriormente por medio de ensayos de tensión (véase Figura 16).

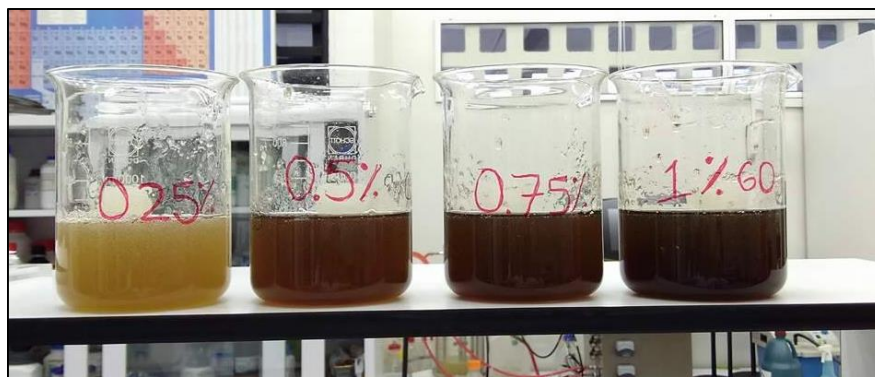


Figura 16. *Soluciones para preparación de películas y posteriormente andamios.*

5.5. METODOLOGÍA FASE TRES

En el marco de esta fase de investigación, se elaboraron andamios utilizando las técnicas de liofilización y electrohilado. Para los andamios elaborados por medio de electrohilado se utilizó el procedimiento descrito por los tesisistas antecesores del proyecto actual (Ortiz & Pretel, 2016) y para el caso de los andamios liofilizados se siguió lo descrito por (Sun et al. 2016) y algunas adecuaciones al proceso dadas por (Rojas, 2015) para las condiciones de trabajo del laboratorio.

5.6.1. ELABORACIÓN DE ANDAMIOS POR ELECTROHILADO.

Se utilizó como materia prima para la elaboración de la estructura fibrilar Quitosano de bajo peso molecular, ácido acético glacial y Polivinil-Alcohol (PVA) como coadyuvante del proceso de electrohilado y óxido de grafeno sintetizado en el marco del proyecto como reforzante.

Inicialmente se preparó el disolvente de ácido acético al 90% (*Solución 1*) que sirvió como base para las demás soluciones y composiciones a electrohilar. De igual forma se prepararon las soluciones de Quitosano al 4% (*Solución 2*) y de PVA al 8% (*Solución 3*). Todo esto se realizó según lo descrito en la Tabla 3, incluyendo los parámetros de dispersión para el óxido de grafeno (*Solución 4*).

Una vez obtenidas las soluciones, se mezclaron en las cantidades correspondientes para tener las tres formulaciones a electrohilar con diferentes porcentajes de GO, véase Tabla 4.

Se electrohiló cada formulación durante 5 horas agregando 10 ml a una jeringa graduada y conectándola a la aguja por medio de una manguera plástica, siguiendo el montaje evidenciado en la Figura 17. Se utilizó un flujo de 1.5 ml/h, un voltaje de 22 kV y una distancia entre la aguja y el colector de 10 cm.

Tabla 3. Soluciones base procedimiento de electrohilado (Ortiz & Pretel, 2016).

SOLUCIÓN	NOMBRE	PREPARACIÓN
1	Disolvente. Ácido acético 90%	Se mezclaron 90 ml ácido acético + 10 ml agua destilada. Se agitó durante 15 min a 80 RPM.
2	Quitosano 4%	A 0,8 g de quitosano de bajo peso molecular se le adicionaron 20 ml de disolvente (1). Se agitó a 100 RPM hasta dilución completa (16 horas aprox.).
3	PVA 8%	A 1,6 g de PVA se le adicionaron 20 ml de disolvente (1). Se agitó a 700 RPM durante 3,5 horas y 90°C en plancha de calentamiento.
4	Suspensión GO	A 0,04 g de GO, se le adicionaron 10 ml de disolvente y se dejó en ultrasonido durante 5 horas.

Tabla 4. Descripción de formulaciones electrohiladas (Ortiz & Pretel, 2016).

FORMULACIÓN	NOMBRE	PREPARACIÓN
1	0%GO	Se mezclaron 10 ml de Quitosano 4% + 7,5 ml PVA 8% + 2,5 ml disolvente. Se agitó a 300 RPM durante 1 hora a 80°C.
2	0,25%GO	Se mezclaron 10 ml de Quitosano 4% + 7,5 ml PVA 8% + 0,63 ml suspensión GO + 1,87 ml disolvente. Se agitó a 300 RPM durante 1 hora a 80°C.
3	0,5%GO	Se mezclaron 10 ml Quitosano 4% + 7,5 ml PVA 8% + 1,25 ml suspensión GO +1,25 ml disolvente. Se agitó a 300 RPM durante 1 hora a 80°C.



Figura 17. Montaje de electrohilado para la elaboración de andamios de QS-GO.

5.6.2. ELABORACIÓN DE ANDAMIOS POR LIOFILIZACIÓN

PREPARACIÓN DE LOS ANDAMIOS

Se trabajó con las mismas soluciones descritas en el numeral 5.5, es decir con la composición de MPM 0,4% Sorbitol y con la adición de las diferentes cantidades de GO.

Estas soluciones se agregaron a tubos Falcon hasta los 27.5ml, y posteriormente se llevaron a un congelador a una temperatura aproximada de -40°C durante 24 horas. Acto seguido, se colocaron 4 tubos con las formulaciones congeladas en el liofilizador LABCONCO Freezone 4.5 durante 24 horas a una temperatura de -52°C y una presión de 0,12 mBar. Finalmente, se retiraron los tubos de liofilizador y se sacaron los andamios. Véase la secuencia de imágenes de la Figura 18, que ilustra este procedimiento.

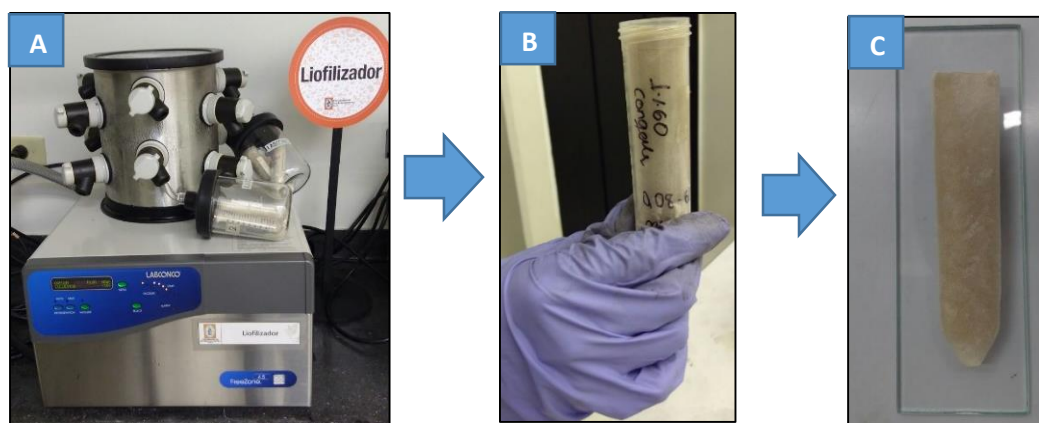


Figura 18. Proceso de liofilización de andamios de QS-GO. A) Liofilizador con los tubos contenedores de las soluciones de los andamios. B) Andamio dentro del tubo contenedor. C) Andamio listo desprendido del tubo contenedor.

CARACTERIZACIÓN FISICOQUIMICA DE LOS ANDAMIOS

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM):

Las muestras se adhirieron sobre una cinta de carbono y luego se realizó un metalizado superficial con oro (equipo Denton Vacuum Modelo Desk IV), con el fin de generar una superficie que fuera conductora. Posteriormente se realizó la inspección en un microscopio JEOL Modelo JSM 6490 LV en el modo de electrones secundarios mediante un voltaje de aceleración de 20kV. Las magnificaciones a las cuales se tomaron las imágenes fueron 50X, 100X y 200X.

FT-IR:

Los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) se registraron usando el espectrofotómetro *IRAffinity-1* de marca *Shimadzu* en el intervalo entre 4000 y 600 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} , utilizando el método de ATR, con el que se logró hacer la medida directamente sobre los andamios.

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LOS ANDAMIOS

DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA A ANDAMIOS:

Para la prueba de degradación hidrolítica de los andamios de QS-GO, realizados mediante la técnica de liofilización se siguió el procedimiento descrito en el numeral 5.7.2, implementando 0.4% de sorbitol con variaciones de GO en proporciones de 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1% (p/p) y un acondicionamiento a 50% de humedad relativa, Dicho ensayo se realizó con la finalidad de evaluar el efecto del GO en la degradación de los andamios en fluido biológico simulado FBS.

De esta manera, se cortaron 21 probetas de 10x5x4 mm de cada composición teniendo un total de 105 probetas las cuales se pesaron inicialmente para luego ser depositadas en cajas Petri individuales marcadas con un numero específico, usando este como Día 0. Acto seguido, se adicionaron 20ml de FBS a cada uno de los recipientes asegurándose que los andamios se encontraran completamente sumergidos y se dejaron en una incubadora *Memmert IN 110*, a 37°C con el propósito de simular las condiciones de temperatura del cuerpo humano.

Cabe resaltar, que a las últimas tres probetas de cada composición (19-21, 40-42, 61-63, 82-84 y 103-105), sólo se les tomó pH en los días de toma de datos.

De las demás probetas se registró su peso húmedo (peso al sacarlas de la caja Petri y secarlas ligeramente con un papel absorbente) y su peso seco (peso al disponerlas el tiempo necesario en un horno a 40°C hasta tenerlo constante) haciendo la salvedad que para las muestras de andamio proyectadas a 21 y 30 días hubo que pasarlas por papel filtro debido a su difícil manipulación, como fue el caso de las muestras evidenciadas en la Figura 20.

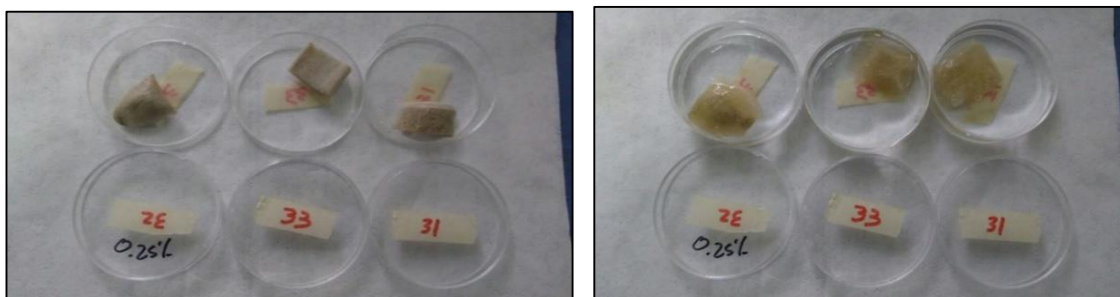


Figura 19. Andamio antes (izquierda) y después (derecha) de adicionarle el FBS.



Figura 20. Extracción y secado de la probeta inmersa en FBS para el posterior registro de sus pesos. Día 1 de ensayo (izquierda), Día 21 de ensayo (derecha).

En la Figura 19 se describe la etapa inicial del ensayo (Día 0), en donde se aprecian las muestras de andamio antes y después de adicionar el FBS. Las observaciones representadas en la Figura 18 A), corresponden a los andamios después de hacer el proceso de secado previo a la toma de pesos para el primer día de ensayo y la B) para el día 21 de registro.

Este procedimiento se llevó a cabo durante seis días más, las fechas en las que se realizó la prueba se aprecian organizadas cronológicamente en la Tabla 5.

Tabla 5. Días en que se registraron los datos.

Día	Fechas	Duración (días)
Día 0	1/Mayo/2017	0
Día 1	3/Mayo/2017	2
Día 2	6/Mayo/2017	5
Día 3	8/Mayo/2017	7
Día 4	15/Mayo/2017	14
Día 5	22/Mayo/2017	21
Días 6	31/Mayo/2017	30

CITOTOXICIDAD CON ARTEMIA SALINA:

Para el montaje de la prueba de artemia salina, se utilizaron los protocolos descritos por los autores (Libralato et al. 2016) y (Vanhaecke et al. 1981).

Inicialmente, se preparó el medio salino que garantizó el nacimiento de las larvas o *nauplios* de artemia a partir de huevos, así como su crecimiento y supervivencia inicial. Para dicha solución salina se usó 3,8g de sal marina obtenida de la droguería San Jorge y 1g de Bicarbonato sódico de cocina, para cada 100 ml de agua destilada fresca y previamente oxigenada con una bomba de aire Uniclife AP60.

Acto seguido, se hace una oxigenación adicional al agua salinizada y se vacía a nivel medio en la caja de supervivencia (véase Figura 21), la cual consta de una sección oscura que se comunica por medio de una rendija inferior con la sección transparente que siempre llevó oxigenación a bajo flujo. Luego, utilizando una espátula se agrega a la parte oscura de la caja aproximadamente 1 gr de huevos de artemia y se tapa utilizando una cubierta negra del mismo material de la caja.



Figura 21. A) *Presentación de artemia Salina para ensayo.* B) *Caja del montaje artemia salina. Artemia en forma de huevos en la parte negra de la caja.*

La iluminación de la parte transparente de la caja se hace con la finalidad de que sean las artemias más fuertes las que conquisten esta sección por estímulo directo de la luz, y contar con estas para las condiciones ulteriores del ensayo.

Pasadas 48 horas de la incubación de los huevos, se hace el conteo de las artemias que lograron pasar a la parte transparente de la caja, escogiéndolas que tuvieron mayor movimiento y separándolas con un gotero de las demás, contabilizando veinte (20) unidades por caja Petri. Se hace la aclaración de que se hizo el ensayo para tres réplicas de cada composición de andamio, para un total de 300 artemias y adicionalmente se dispusieron 3 réplicas *control* (sin andamio) y otras 3 de fluido tóxico (adición de 3 gotas de etanol).

Posteriormente, se agregó la muestra de andamio de área transversal de $0,25\text{cm}^2$ y espesor uniforme de 4mm a cada caja Petri con las artemias contadas, se llenó con 20 ml de agua salinizada y se agregó una gota de suspensión de levadura la cual consistió en 3 mg de levadura seca en 5 ml del agua salinizada, con la finalidad de alimentarlas. Las artemias con los diferentes andamios y réplicas control se pueden apreciar en la Figura 22.

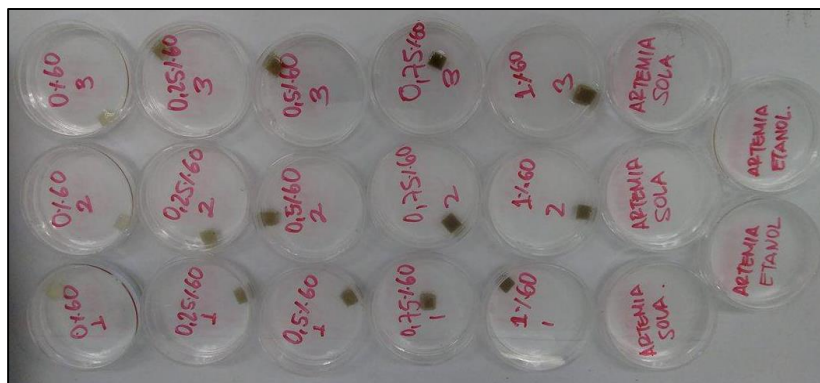


Figura 22. *Ensayo de artemia, previo al conteo.*

Se dejó el montaje con luz natural durante 24 horas, procurando que no se moviera durante este tiempo. Luego de este tiempo se hizo el conteo correspondiente de las artemias vivas y muertas, para el posterior análisis del ensayo.

CULTIVO CELULAR DE OSTEÓBLASTOS EN ANDAMIOS:

Para lograr una mayor exactitud y reproducibilidad de los datos obtenidos, los andamios fueron cortados y esterilizados antes de estar en contacto con el cultivo celular.

Se decidió trabajar con espesores constantes para garantizar las mismas condiciones de ensayo para todas las composiciones a estudiar, para ello se realizaron cortes de 100µm de espesor en seco utilizando un vibratomo marca LEICA VT 1200S y una cuchilla vibratoria a una amplitud de 1 mm, con una frecuencia de 85 Hz y una velocidad de desplazamiento de 0,1 mm/seg; en la Figura 23 se observa el equipo realizando el proceso de corte de los andamios y en la Figura 24 se aprecia forma final del andamio cortado y su topografía observada mediante un microscopio óptico.



Figura 23. *Equipo y proceso de corte de los andamios.*



Figura 24. Andamio cortado y observado mediante un microscopio óptico.

La esterilización de los andamios se hizo con un equipo marca Doncel, en cuyo procedimiento se implementó ozono gaseoso y luz ultravioleta durante 5 minutos para todos los andamios como se aprecia en la Figura 25.

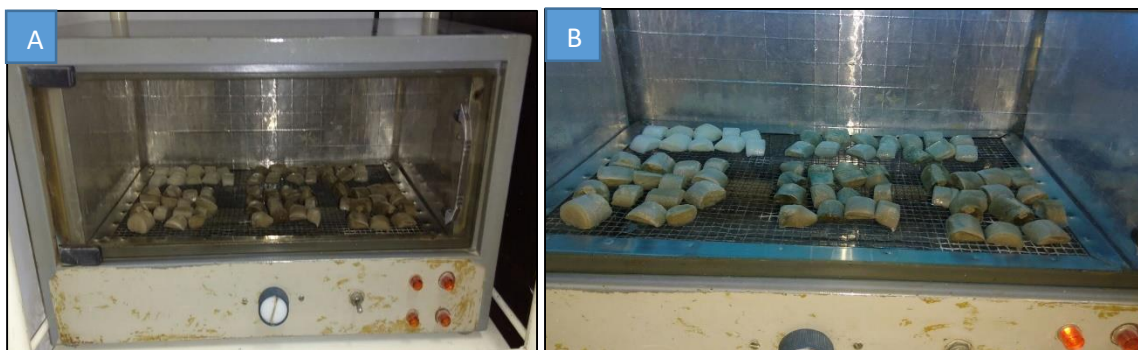


Figura 25. Esterilización de andamios. A) Disposición de los cortes de andamios dentro del equipo. B) Proceso de esterilización en marcha.

Para corroborar que el ozono gaseoso de la esterilización no reaccionó con ningún componente del andamio, se hizo un ensayo de FTIR a un andamio esterilizado de cada composición.

Para la realización del ensayo de cultivo celular se decidió utilizar los andamios de 0%, 0,5% y 1% de óxido de grafeno previamente esterilizados y cortados a 100 μ m de espesor, con la finalidad de estudiar el efecto de la dosificación de GO en las propiedades de adhesión y proliferación celular, utilizando osteoblastos extraídos de cráneos de modelos murinos, tal como se aprecia en la Figura 26. Se decidió seleccionar sólo 3 composiciones de andamio debido a la limitada cantidad de células disponibles para el ensayo, con el criterio de evaluar una sin óxido de grafeno (0 %GO), otra con cantidad de refuerzo intermedio (0,5% GO) y una última con la mayor concentración utilizada en la investigación (1%).

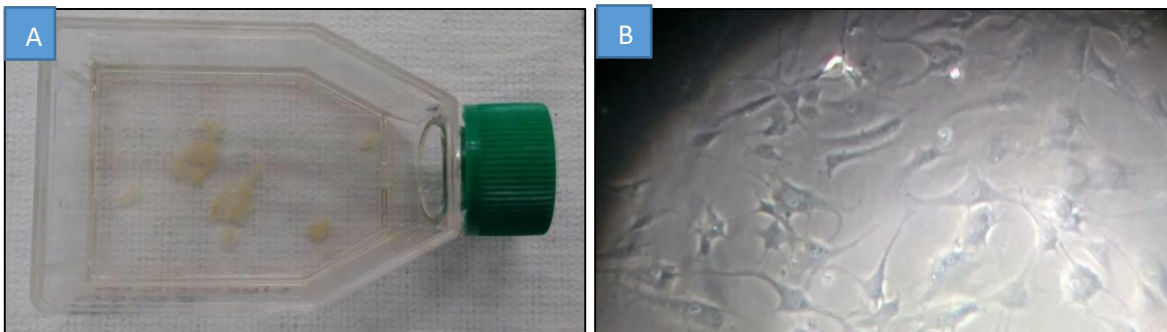


Figura 26. A) Frasco de cultivo con piezas de cráneo de murino, B) Osteoblastos adheridos al frasco de cultivo.

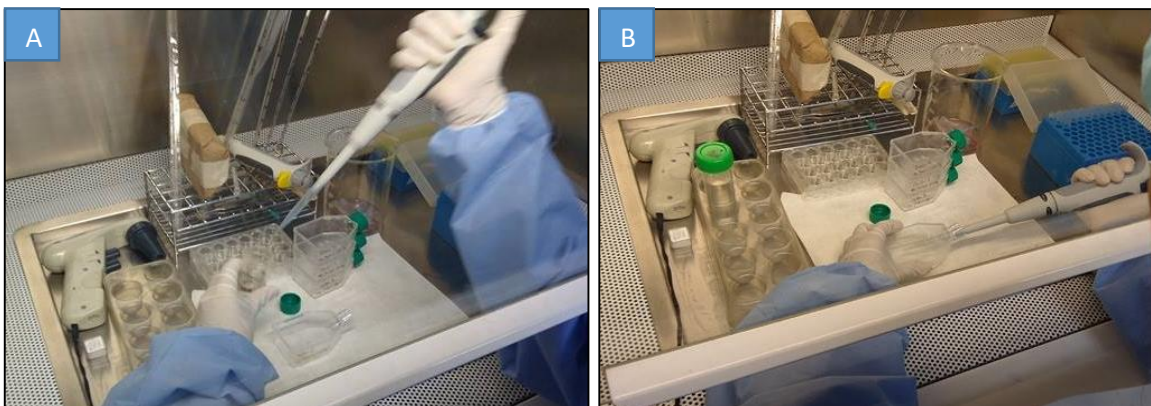


Figura 27. Pasos iniciales del cultivo celular. A) Extracción del medio de cultivo, B) Adición de la Tripsina.

Como primera medida, se ingresaron a la cabina de flujo laminar los frascos que contenían el cultivo de osteoblastos, a los cuales se les extrajo el medio de cultivo utilizando para ello una micropipeta. Acto seguido se agregó 1ml de PBS para realizar el lavado de la superficie del frasco, se retiró y se agregó 2ml de solución de Tripsina (encargada de levantar el cultivo celular que se encuentra adherido a la superficie del frasco, véase Figura 27) y se colocaron en una cámara de incubación marca NEW BRUNSWICK GALAXY 48R durante 5 minutos a una temperatura de 36,6°C, un nivel de CO₂ del 5% y una presión de 0,35 bar.

Acto seguido, se observó en el microscopio óptico para verificar que todas las células estuvieran despegadas y se ingresaron nuevamente los frascos a la cabina en donde se agregó 2ml de DMEM y 1ml de suero fetal bovino SFB para detener la reacción de la tripsina.

Las suspensiones celulares obtenidas se agregaron en un tubo falcón estéril de 50ml y se realizó el proceso de centrifugado en un equipo marca TOMY LC-120 a 1500rpm durante 10 minutos (véase Figura 28A).

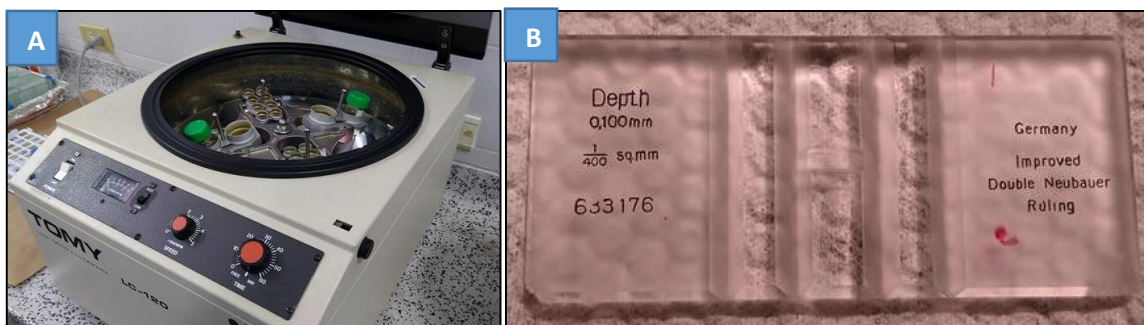


Figura 28. Centrifugado (A) y sistema posterior de conteo (B) de las células a cultivar.

El sobrenadante obtenido se descartó quedando finalmente el pellet al cual se agregó 1ml de DMEM suplementado con OGM 10%SFB y se extrajo 10 μ L de la suspensión celular en un eppendorf a los cuales se agregó 10 μ L de Trypan blue al 0,4%.

De la anterior mezcla se extrajo 10 μ L y se puso en la cámara de Neubauer en donde se realizó el conteo celular obteniéndose un total de 480000 células por cada mililitro de solución (véase Figura 28B).

Se utilizó una placa de cultivo celular de 24 pozos y se colocó a 12 de ellos un cubre objetos de vidrio para un total de 4 líneas celulares como se observa en la Figura 29.

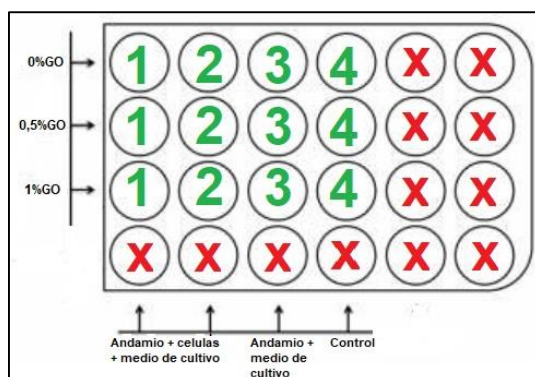


Figura 29. Esquema cultivo celular en andamios.

En las primeras dos líneas se encuentran los andamios a estudiar, cada pozo con un total de 70000 células más el medio de cultivo, en la línea 3 se encuentran los andamios con el medio de cultivo celular (sin células) y finalmente en la línea 4 se encuentran los pozos de control, cada uno con 20000 células más el medio de cultivo celular. Finalmente, la placa de cultivo celular se guardó en la incubadora a

una temperatura de 36,6°C, un nivel de CO₂ del 5% y una presión de 0,35 bar y se extrajo a 4 y 7 días para tomar registro fotográfico. A los mismos 7 días se realizó la fijación de las células para su estudio en el microscópico electrónico de barrido SEM.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. FASE CERO

6.1.1. CARACTERIZACIÓN DEL QS

- MEDICIÓN DE GRADO DE DESACETILACIÓN

ANÁLISIS ELEMENTAL:

Mediante los resultados obtenidos del análisis elemental y la Ecuación 2, se determinó el grado desacetilación para el quitosano de MPM Y BPM evidenciados en la Tabla 6.

Tabla 6. Grados desacetilación del QS de MPM Y BPM mediante análisis elemental.

Muestras	%C	%N	C/N	%GD
MPM	41,4736	7,4890	5,5379	77,1016
BPM	39,8743	7,0370	5,6663	69,6166

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN):

Para el espectro obtenido del quitosano de MPM la asignación de las señales de los diferentes protones presentes en las unidades acetiladas y desacetiladas correspondió con los protones del grupo metilo de la unidad acetilada que estuvieron a 1,86 ppm; los protones correspondientes a la unidad desacetilada se situaron cerca de 8.32 ppm; los protones unidos al carbono 2 de la unidad desacetilada estuvieron a 2,9 ppm. Los picos situados entre 3.5 y 4.76 ppm se atribuyeron a los protones de los carbonos 2 al 6 de las unidades acetiladas, y del 3 al 6 de las desacetiladas en concordancia con (Fernanda and Diaz 2014), (Balanta, Grande, and Zuluaga 2010), tal como se ve en la Figura 30A).

Para el caso de quitosano de BPM los espectros obtenidos fueron los siguientes: los protones del grupo metilo de la unidad acetilada estuvieron a 1,86 ppm; los protones correspondientes a la unidad desacetilada se situaron cerca de 8.34 ppm; los protones unidos al carbono 2 de la unidad desacetilada estuvieron a 2,9 ppm. Los picos situados entre 3.49 y 4.76 ppm se atribuyeron a los protones de los carbonos 2 al 6 de las unidades acetiladas, y del 3 al 6 de las desacetiladas, con base a lo descrito por los mismos autores anteriormente mencionados, tal como se aprecia en la Figura 30B).

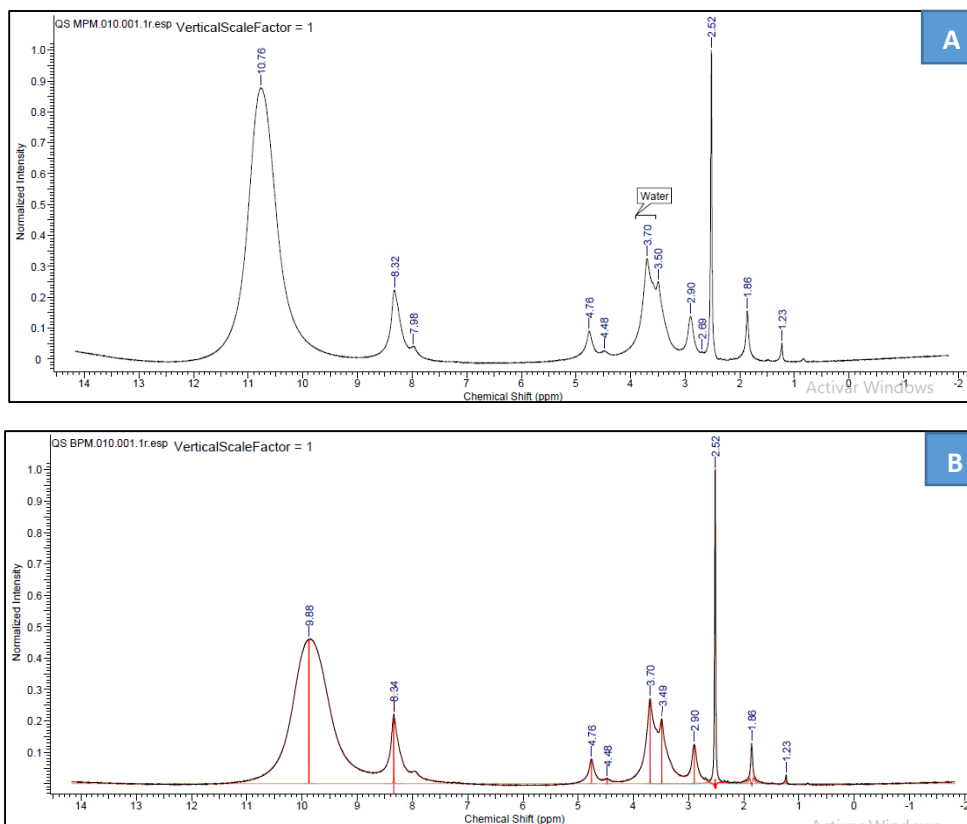


Figura 30. Espectros RMN para la hallar el grado de desacetilación del quitosano de A) MPM, B) BPM.

Mediante los resultados obtenidos de las figuras anteriores y la Ecuación 2 se determinó el grado desacetilación para el quitosano de MPM Y BPM evidenciados en la Tabla 7.

Tabla 7. Grados de desacetilacion del QS DE MPM y BMP mediante RMN

Muestras	A _{CH3}	A _{H1-H6}	%GD
MPM	1,86	16,44	77,3722628
BPM	1,86	16,43	77,3584906

Partiendo de los datos obtenidos de las Tablas TRTR y CCC se determinó un promedio del grado de desacetilación obtenido mediante análisis elemental y resonancia magnética nuclear evidenciado en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados grado de desacetilación promedio del QS de MPM y BPM

Muestras	%GD (Análisis elemental)	%GD (RMN)	%GA (Promedio)
MPM	77,1016527	77,3722628	77,2369577
BPM	74,2433959	77,3584906	75,8009432

Los valores obtenidos de grado de desacetilación del quitosano de MPM y BPM observados en la Tabla 8 concuerdan con los rangos establecidos por las fichas técnicas de Sigma Aldrich.

• RESULTADOS PESO MOLECULAR QUITOSANO

En la Tabla 9, se observa los resultados de los pesos moleculares del quitosano de BPM Y MPM, obtenidos mediante viscosimetría capilar.

Tabla 9. Resultados del peso molecular quitosano.

QS	Concentración (gr/ml)	Viscosidad Relativa	Viscosidad Específica	Viscosidad Reducida	Peso Molecular (gr/mol)
BPM	4,16x10 ⁻⁴	1,2123	0,2123	510,5188*	306272,94
	5,12x10 ⁻⁴	1,2436	0,2436	461,0508	
	6,08x10 ⁻⁴	1,2551	0,2551	462,3859	
	7,04x10 ⁻⁴	1,3903	0,3903	554,5089	
	8x10 ⁻⁴	1,4377	0,4377	568,1818	
MPM	4,16x10 ⁻⁴	1,1879	0,1879	451,7541*	480307,84
	5,12x10 ⁻⁴	1,1680	0,1680	328,2563	
	6,08x10 ⁻⁴	1,1978	0,1978	325,4292	
	7,04x10 ⁻⁴	1,2276	0,2276	323,3731	
	8x10 ⁻⁴	1,2536	0,2536	317,0359	

*No se utilizaron para determinar el peso molecular puesto que no se salían de la linealidad de la gráfica.

6.1.2. RESULTADOS CARACTERIZACIÓN DEL GO

ESPECTROSCOPIA RAMAN:

En la Figura 31 se observa el espectro raman del GO, en este se encuentran las bandas características del óxido de grafeno según lo descrito por (Aguirre 2015), en donde determinó que la **Banda G** corresponde a una banda longitudinal óptica encontrada dentro de los modos vibracionales en una misma capa de carbonos en hibridación sp². En la investigación de Aguirre reportan esta banda a 1582 cm⁻¹ y afirma que es común para los espectros del grafeno, óxido de grafeno y nanotubos de carbono.

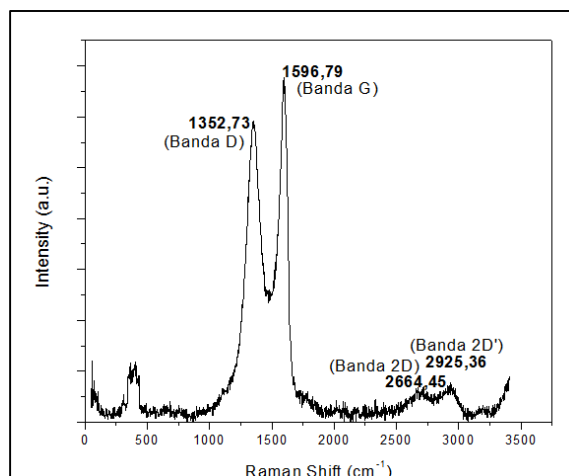


Figura 31. Espectro Raman obtenido en caracterización de GO experimental.

Por su parte, las **Bandas 2D** las relacionó con fenómenos de doble resonancia a 2722.2 cm^{-1} , comportamiento que se da con la transición del electrón a un estado real por efecto de un fotón incidente, y como en el caso de la banda D, el electrón excitado experimenta una dispersión inelástica por un fonón de la red, resultando así una transición inversa del electrón a través de una etapa de dispersión inelástica, con la participación de un segundo fonón.

Para la **Banda D**, obtenida a una señal de 1350 cm^{-1} , Aguirre afirmó que se debe a la presencia de imperfecciones en la estructura cristalina, atribuidas al comportamiento de que los carbonos en hibridación sp^3 unidos a grupos funcionales con oxígeno favorecen el desorden y el pliegue de las monocapas. Adicionalmente, cabe resaltar que esta banda puede ser un indicativo del grado de oxidación o presencia de carbonos en la hibridación mencionada.

Al comparar nuestros resultados con los reportados por Aguirre, se observó que la **Banda D**, se encontró a $1352,73\text{ cm}^{-1}$, la **Banda G** a $1596,79\text{ cm}^{-1}$, y la **Banda 2D** a 2664 cm^{-1} , con lo que se puede asegurar que se obtuvo óxido de grafeno con el método de Hummers modificado empleado en esta investigación.

Autores como (Raghubanshi et al. 2016) y (Childres et al., 2015), reportan valores de las bandas en concordancia con las obtenidas experimentalmente.

DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX):

A partir del difractograma obtenido para el GO (Figura 32) se pudo medir el espacio interplanar del plano 001, factor característico para inferir que el material sintetizado se trató de óxido de grafeno al coincidir en esta medida con autores como (Guerrero-contreras 2015).

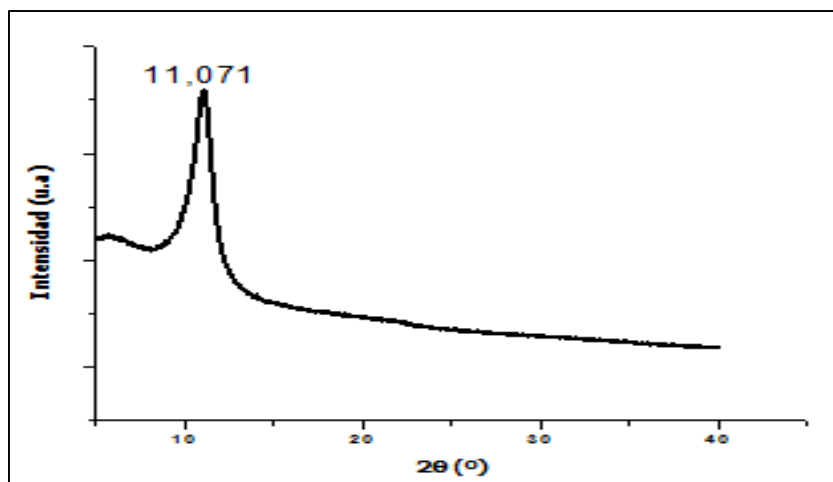


Figura 32. *Difractograma GO experimental.*

Utilizando el programa *X'Pert HighScore Plus* se determinó la distancia interlaminar generada por el pico $2\theta=11,071^\circ$, teniendo como resultado un valor de 79,287 nm. El gran espaciamiento entre capas de las láminas de GO se pudo atribuir a sus grupos funcionales oxigenados introducidos por el tratamiento de oxidación del grafito.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR):

El espectro de FTIR para el GO sintetizado se observa en la Figura 33.

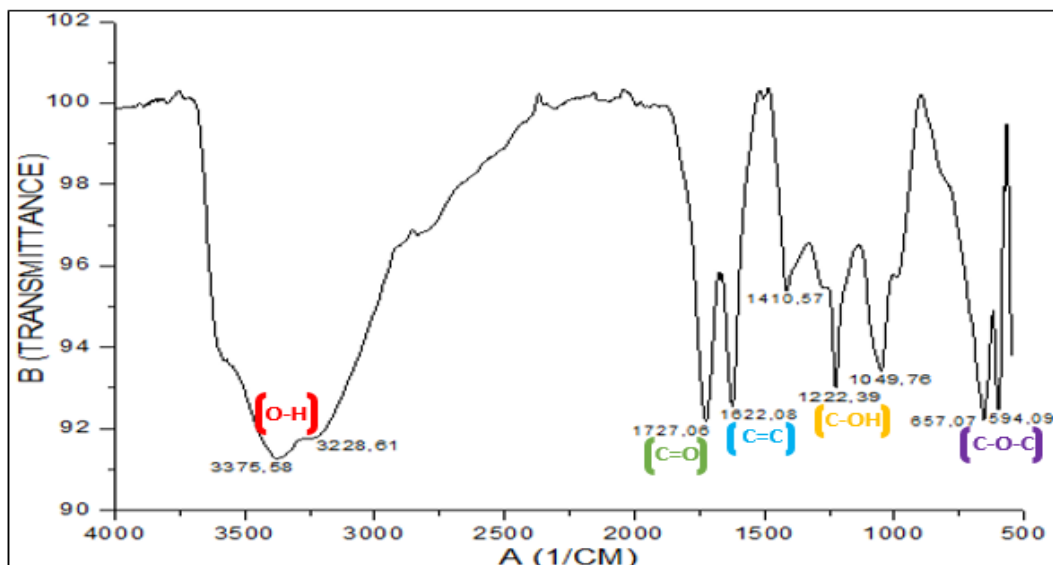


Figura 33. *Espectro infrarrojo obtenido para el GO sintetizado.*

Se observó una banda intensa y amplia entre $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ lo que indicó la presencia de grupos O-H, dicha vibración pudo representar las moléculas de agua

presentes entre las láminas del GO. De igual forma, se puede asociar a la extensión O-H de los grupos fenólicos o alcoholes del GO.

La banda a 1724 cm^{-1} está relacionada con la presencia de grupos C=O de los grupos carboxilos y a su vez, la banda 1624 cm^{-1} es característica del modo de vibración en flexión del enlace C=C de las vibraciones del esqueleto de los dominios grafíticos sin oxidar.

Por otro lado, se encontró que a 1413 cm^{-1} se vio representada la vibración de torsión del enlace O-H en los grupos hidroxilo. La banda 1224 cm^{-1} indicó la vibración de tensión de grupos C-OH. A 1049 cm^{-1} se evidenciaron las vibraciones de grupos epoxi, éter o peróxido y por ultimo las bandas 653 y 596 cm^{-1} pudieron ser representativas de las vibraciones de los grupos C-O-C, característicos del óxido de grafeno. La comparación de las vibraciones se hizo con las investigaciones de (Chen et al. 2013; Aguirre 2015).

6.2. FASE 1

Se pudo atribuir el éxito en la obtención de las películas de QS, a la presencia de ácido acético en su preparación, el cual permitió la protonación parcial y la desestructuración del QS en polvo, favoreciendo el mezclado y la manipulación del polímero para disponerlo en forma de película, coincidiendo con lo dicho por (Epure et al. 2011).

Con la finalidad de establecer la cantidad de plastificante y el tipo de polímero más acorde con la aplicación se hizo una caracterización mecánica por medio de ensayos de tracción y un ensayo de degradación hidrolítica, de películas de QS todas bajo las mismas condiciones.

6.2.1. ENSAYO DE TRACCIÓN DE PELICULAS QS-SORBITOL:

En la Tabla 10, se pueden evidenciar los resultados de los ensayos mecánicos elaborados a las diferentes formulaciones de películas de QS con plastificante, a humedades relativas de 50 y 80%, se advierte que los valores entre paréntesis corresponden con la desviación estándar.

Se escogió como patrones de decisión la resistencia máxima a tensión (MPa) y el porcentaje de deformación (%), a los diferentes porcentajes de adición de plastificante (*sorbitol*), y se estableció la diferencia de su comportamiento con la respectiva humedad relativa, ilustrando esto en la Figura 34.

Tabla 10. Resultados ensayos mecánicos películas etapa 1.

HR	COMP.	MEDIANO PESO MOLECULAR		BAJO PESO MOLECULAR	
		RESIST. MAX. TENSIÓN (MPa)	DEFORMACIÓN MAX (%)	RESIST. MAX. TENSIÓN (MPa)	DEFORMACIÓN MAX (%)
50% HR	0%SB	54,4691 (8,42)	12,8911 (2,67)	38,6745 (4,73)	4,4701 (1,33)
	0,2% SB	36,824 (7,10)	16,0994 (7,16)	17,9819 (11,61)	13,2627 (10,09)
	0,4% SB	24,3359 (7,96)	25,2759 (15,12)	19,4462 (9,8)	27,3027 (14,83)
	0,6% SB	17,3254 (6,89)	36,7317 (9,47)	9,12367 (1,76)	49,0496 (3,43)
80% HR	0% SB	26,3978 (3,18)	10,8837 (3,38)	30,4165 (4,15)	3,25443 (0,48)
	0,2% SB	24,8416 (6,14)	21,2514 (10,96)	19,8261 (5,20)	18,1058 (11,08)
	0,4% SB	17,9938 (5,59)	42,1032 (12,69)	14,9007 (2,68)	10,6735 (5,62)
	0,6% SB	8,84328 (2,97)	38,0873 (8,68)	9,90543 (3,71)	53,0848 (10,72)

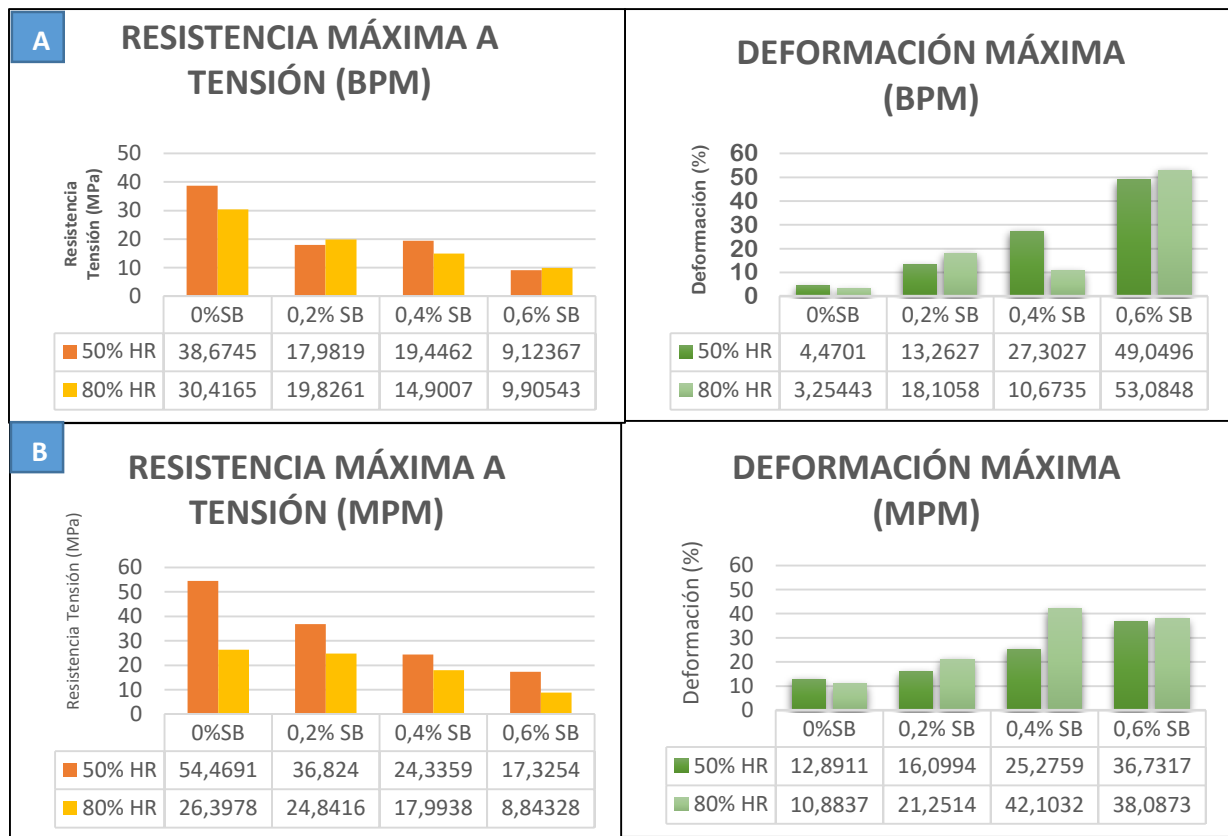


Figura 34. Resultados ensayo de tracción a películas de QS y sorbitol, para A) BPM, B) MPM.

Como primera observación, se tuvo que para las composiciones tanto de bajo como de mediano peso molecular sin adición alguna de plastificante (0%), se evidenciaron las resistencias mecánicas más altas en comparación a las películas plastificadas. Este comportamiento se relaciona con su alta rigidez, lo cual generó películas frágiles y quebradizas de muy poca aplicabilidad en ingeniería de tejidos, debido a

su posible ruptura a la hora de la manipulación e implantación en pequeñas cavidades, resultando la necesidad de un aditivo plastificante.

Asimismo, se pudo analizar la influencia de dicho plastificante (sorbitol), afirmando de manera general que su presencia redujo el esfuerzo necesario para la deformación, y aumentó significativamente la capacidad de elongación de las películas, como fue el caso de investigaciones como la de (Martínez-Camacho et al., 2010), tal como se puede apreciar en la Figura 32, que para una humedad relativa del 50% hubo un decrecimiento en la resistencia máxima a la tensión (RT) de películas de BPM en 53.5%, 49.71% y 76.4% y aumentos en el porcentaje de deformación máxima (PD) de 66.3%, 83.62% y 90,88% para adiciones de 0.2, 0.4 y 0.6% de sorbitol respectivamente.

Para las películas de MPM, se logró apreciar el mismo comportamiento, pero con pérdidas de 32.39%, 55.32% y 68.19% de RT y aumentos en 12.89%, 19.93% y 65% en PD. Esto se puede explicar con base a que la incorporación de agentes plastificantes promueven un debilitamiento de las fuerzas intermoleculares a través de las cadenas poliméricas, ocasionando de esta manera una reducción del esfuerzo tensil y un incremento en la flexibilidad de las películas (Casariego et al. 2009), en cuya definición encaja muy bien el D-sorbitol siendo una molécula hidrofílica con seis grupos hidroxilo, relativamente pequeña con la capacidad de insertarse entre cadenas poliméricas adyacentes, disminuyendo tales atracciones intermoleculares, como también lo describe (Gabriela et al. 2015).

De igual modo, cabe analizar el efecto del sorbitol en la cristalinidad de la película de QS. Por medio de ensayos de XRD, (Mei Liu et al. 2013a) evidenciaron un alto grado de cristalinidad para películas sin sorbitol y una disminución de la misma, para películas con adición de este plastificante. Esto se ve estrechamente relacionado con la disminución de la resistencia a tracción y el aumento de la elongación de la película, responsabilizando de esto una mayor fracción amorfa en la cadena polimérica, como también lo evidenció (Gabriela et al. 2015), quienes lo usaron además como una alternativa para potenciar la proliferación celular sobre sus películas, al evidenciar que mayor número de estas se extendían sobre el sustrato con menor cristalinidad (adición de sorbitol).

Otro aspecto a analizar es el efecto del peso molecular en el comportamiento mecánico de las películas como se evidencia en la Figura 32. Se observa que hay un efecto dependiendo del peso molecular en las propiedades mecánicas. Esto se podría atribuir al tipo y número de interacciones polímero-polímero, polímero-plastificante y polímero-solvente, que determina la estructura y las características de la cadena polimérica (Bof et al. 2015), argumentando que a mayor peso molecular, se presentan cadenas de mayor grado de polimerización, lo que favorece las interacciones polímero-polímero, dando lugar a “matrices” más fuertes y robustas.

La influencia de la humedad relativa de acondicionamiento de las películas también representa un factor de análisis sobre la caída de la resistencia máxima a tensión y el aumento significativo de la elongación, al hacer la comparación gráfica de dichas variables ante humedades relativas de 50% y 80% (véase la diferencia de tonalidades para las gráficas en la Figura 32). Este comportamiento es típico de polisacáridos plastificados, en los que las propiedades del material se ven fuertemente impactadas por el contenido de agua en el ambiente (Epure et al. 2011). Esto se pudo generar debido a la capacidad que tiene el sorbitol de interactuar a través de enlaces de hidrógeno tanto con el QS como con el agua, introduciendo humedad a las películas con mayor cantidad de sorbitol.

6.2.2. DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA PELÍCULAS DE QS-PLASTIFICANTE

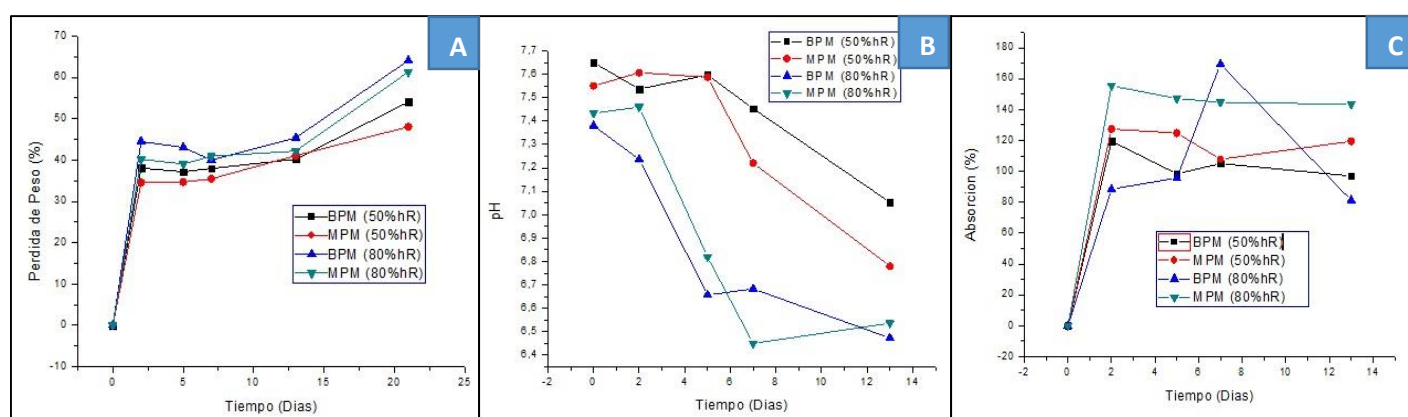


Figura 35. A) Pérdida de peso en función del tiempo, B) Cambio de pH en función del tiempo, C) Porcentaje de absorción en función del tiempo.

En la parte A se observa el porcentaje de pérdida de peso en función del tiempo, para muestras de QS de BPM y MPM con Sorbitol al 0,4%, a distintas humedades relativas de acondicionamiento. Claramente, se evidenció que el peso molecular del QS corresponde a un factor de influencia para el análisis de la degradación hidrolítica, puesto que para el caso de MPM hubo una menor pérdida de masa durante los 21 días de ensayo, con porcentajes de 48,6% y 61,5% a 50 y 80% de HR respectivamente, en comparación con el QS de BPM que tuvo pérdidas de 54% y 64,7% perdiendo evidentemente 5,4% y 3,2% más en comparación con el QS de mayor peso molecular, para unas mismas condiciones de acondicionamiento.

La explicación de este comportamiento se podría atribuir a que durante el proceso de degradación hidrolítica ocurrió una disminución de peso molecular de las cadenas en función del tiempo de degradación, producto de las escisiones de cadena al azar, características de este proceso. Esto ocurre como consecuencia del ataque del FBS en los enlaces del quitosano, además de generarse un incremento en la distribución del peso molecular, es decir, cadenas poliméricas de tamaños variados. En síntesis, se dio un decrecimiento continuo del peso molecular hasta que el polímero sufrió degradación, haciendo que el QS de BPM alcance un peso

molecular crítico más rápido que el de MPM, ocasionando el inicio del proceso de solubilización y pérdida de peso del polímero (Civantos Fernandez 2014).

Para evaluar la pérdida de peso se debe tener en cuenta que el quitosano es un polímero *semicristalino* debido a la distribución de los grupos acetilo a lo largo de la cadena polimérica, por esta razón presenta zonas amorfas y cristalinas. Partiendo de lo anterior, se pudo observar que la pérdida de peso para todas las composiciones fue apreciable a partir del día 7 debido a los productos de degradación de la fase amorfa, mientras que para los días previos fue casi constante, lo que se podría relacionar con la liberación de productos de degradación procedentes de la fase cristalina (Figueira 2008).

La humedad relativa de acondicionamiento, por su parte, tuvo repercusiones importantes en la degradación hidrolítica de las películas plastificadas, ya que se ve menor pérdida de peso para las acondicionadas a 50% en comparación con las que estuvieron a 80%. Este comportamiento se puede atribuir a que entre más alta sea la humedad del ambiente, hay mayor presencia de moléculas de agua y pudieron presentarse interacciones con la cadena polimérica del QS generando el inicio del proceso de hidrólisis antes de comenzar el ensayo de degradación, de tal manera que al iniciar dicho ensayo las muestras acondicionadas a 80%HR presentaron mayor susceptibilidad al FBS que las demás.

Respecto a la influencia del grado de desacetilación del QS con diferentes pesos moleculares, autores como (Freier et al. 2005) afirmaron que entre mayor sea dicho porcentaje de desacetilación, menor será su pérdida de peso hablando en términos de su degradación hidrolítica. Este comportamiento se logró evidenciar claramente, puesto que con el QS de MPM con grado de desacetilación de 77,10% tuvo menores pérdidas de peso, comparado con el de BPM que contó con un grado de desacetilación de 69,61%.

Sin importar el peso molecular del polímero que se estudiando, todas las composiciones presentaron la misma tendencia anteriormente mencionada, pero se logró apreciar que las pérdidas de peso son distintas entre las muestras, esto se pudo presentar debido a que a medida que el polímero presentó menor grado de desacetilación hubo una mayor cantidad de grupos acetilo, teniendo efectos significativos sobre la disposición del quitosano. En términos generales, el grupo acetilo generó cierta amorficidad en la cadena del polímero ocasionando una degradación prematura respecto al área que presentó cristalinidad. Según esto, se demostró que las muestras que presentaron mayor grado de desacetilación tuvieron una menor pérdida de peso que las que presentaron menor grado de desacetilación, en concordancia con lo expuesto por (Hsu et al. 2004).

En la parte B se puede apreciar el cambio del pH en función del tiempo de degradación, donde se evidenció su disminución para todas las composiciones que se ensayaron, pero se logró apreciar una tendencia de menor decrecimiento para

las muestras que fueron acondicionadas a 50% HR, en comparación a las que se acondicionaron a 80% HR que presentan disminuciones de pH más significativas.

El decrecimiento del pH se puede atribuir por una parte al ácido acético remanente en las muestras debido a que este es moderadamente ácido, que al interactuar con el FBS pudo causar una disminución considerable del pH, y por otro lado, a los productos que quedan de la degradación del quitosano como la glucosamina o la N-acetilglucosamina que también interactúan con el fluido biológico y generando una tendencia decreciente para el pH, estos productos de degradación están presentes en la matrices extracelulares de los tejidos humanos por lo que no son nocivos al liberarse en el cuerpo humano, según lo descrito por (Depan, Shah, and Misra 2013).

El porcentaje de absorción en el tiempo se ilustró en la parte C, en donde se apreció una tendencia creciente y luego casi constante para todas las composiciones, a excepción de las de BPM acondicionadas a 80%HR, en la que llegan a su máximo de absorción al día 2 y a partir de ahí decae.

El máximo de absorción obtenido para los primeros días de ensayo, se podría atribuir a la presencia de grupos amino a lo largo de la cadena de quitosano, permitiendo la disolución de esta macromolécula por medio de la protonación de dichos grupos, ocurriendo de esta manera un hinchamiento al entrar en contacto con el agua o el FBS, gracias su alta hidrofiliidad (Figueira 2008).

Por otro lado, el decrecimiento del porcentaje de absorción después de los dos primeros días de ensayo, se podría justificar bajo el hecho de que las cadenas poliméricas de QS llegaron a su punto de saturación, disponiéndose a formar un hidrogel que selló la película y no permitió una mayor absorción, según lo descrito por (Quimbay et al, 2015), para condiciones de ensayo similares.

CRITERIOS DE SELECCIÓN DEL TIPO DE POLÍMERO

Para la elección del tipo de polímero para la elaboración de los andamios, se partió de los datos obtenidos anteriormente permitiendo escoger el quitosano de MPM debido a que presentó una absorción no tan elevada de 125%, un pH entre 7,6-6,8 y el resultado más relevante que fue un porcentaje de pérdida de peso de 48.6% a los 21 días, garantizando que el andamio podrá estar presente un mayor tiempo mientras ocurre el proceso de regeneración del tejido óseo. Esto es importante ya que las etapas que actúan en el proceso de regeneración ósea son: etapa quiescente, de activación, de reabsorción, de formación y finalmente de mineralización.

En ese sentido, el andamio podría desempeñar un papel fundamental en la fase de formación, precedida por la de reabsorción la cual dura entre una y tres semanas (Garzón et al, 2004).

La importancia del andamio en dicha fase de formación (entre 5 y 10 días), se establece debido a la generación del fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberan en la matriz y que estimulan su proliferación, los cuales se encargarían de sintetizar una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y darían cabida a los BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la diferenciación celular.

Con el paso de los días, los osteoblastos ya diferenciados podrían sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas perforadas y después de 30 días comenzará la mineralización (Tresguerres Hernandez et al, 2006).

Se puede observar que desde la implantación del andamio hasta el momento en que actúa y ocurre la mineralización, transcurrieron entre uno y dos meses, donde es de gran importancia para dicha estructura mantener su integridad y seguir prestando el soporte óptimo sobre la zona a reparar. De aquí, se establece la necesidad de que el tiempo de degradación sea el mayor posible justificando la decisión por parte de los investigadores, de implementar para la formulación final de los andamios un quitosano de MPM y la futura introducción de GO.

6.3. FASE DOS

ENSAYO DE TRACCIÓN DE PELICULAS QS- GO PLASTIFICADAS CON SORBITOL:

En la Tabla 11, se aprecia los resultados del ensayo de tracción de las películas de MPM con 0,4% de sorbitol y diferentes porcentajes de óxido de grafeno acondicionadas a 50% HR. Se advierte que los resultados entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

Se decidió omitir el acondicionamiento a 80% HR, puesto que con los valores obtenidos para los ensayos mecánicos elaborados en la sección 6.2.1., se estableció que a valores cercanos había un decaimiento significativo en las propiedades mecánicas de las películas, por lo que dichos resultados sirvieron como base para proponer un acondicionamiento de los futuros andamios a humedades relativas no mayores al 50%.

Tabla 11. *Ensayos mecánicos películas plastificadas de QS-GO.*

HR	COMP.	MEDIANO PESO MOLECULAR	
		RESIST. MAX TENSION (MPa)	DEFORMACION MAX (%)
50% HR	0%GO	23,8105 (3,99)	26,4496 (4,42)
	0,25%GO	27,3735 (5,91)	24,1265 (6,21)
	0,5%GO	30,2782 (4,16)	22,9764 (0,57)
	0,75GO	35,4661 (5,51)	19,6745 (4,02)
	1%GO	38,4109 (4,39)	18,6531 (0,01)

La Tabla 10, demuestra el efecto de diferentes proporciones en peso de GO, sobre las propiedades mecánicas de las películas de QS, las cuales pasaron de 23,81 MPa sin refuerzo de GO, a un valor de resistencia máxima a tensión de 38,41 MPa con el mayor porcentaje de adición de reforzante.

Este reforzamiento se podría atribuir a la buena dispersión de las láminas de GO en la matriz polimérica de QS, actuando como cargas y absorbiendo parte de la carga aplicada sobre las películas. Otra posibilidad que se puede manejar respecto al notable reforzamiento podría ser la unión covalente y de puentes de hidrogeno entre los grupos amino del quitosano y los grupos carboxílicos sobre la superficie de GO tal como lo proponen (Khan et al. 2016), en uno de sus estudios . Cabe resaltar que es un comportamiento típico en los materiales reforzados que a medida que aumenta su resistencia a la tensión disminuya su deformación máxima, debido a la rigidez que se adquiere al restar movilidad de las cadenas poliméricas fruto de la acción del reforzante.

6.4. FASE 3

6.4.1. ANDAMIOS OBTENIDOS ELECTROHILADOS.

ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE ANDAMIOS ELECTROHILADOS.

Como técnica de caracterización inicial para los andamios obtenidos según los lineamientos del numeral 5.6.1., se hizo microscopía electrónica de barrido (SEM), con la finalidad de analizar si la morfología de estructura fibrilar correspondía con la deseada.

En trabajos previos como el de (Ortiz y Pretel 2017), se utilizó un colector de papel aluminio el cual presentó el inconveniente de no ser lo suficientemente antiadherente para desprender la malla electrohilada de manera correcta, contando con un andamio fraccionado y muy poco práctico para hacer cortes significativos para la elaboración de probetas para caracterización mecánica.

Para contrarrestar estos inconvenientes se decidió cambiar el colector por uno de acetato de celulosa con cavidades que permitieran establecer el campo eléctrico entre un subcolector metálico y la fuente, obteniendo de esta manera la diferencia de potencial necesaria para el proceso.

Los resultados de las imágenes SEM se pueden apreciar en la Figura 36, y en estas se evidencia de manera general para todas las composiciones electrohiladas, secciones de estructura fibrilar acompañadas por secciones continuas y algunos de los llamados *beads* en la superficie de la muestra.

Al contar con las secciones *continuas*, no se puede relacionar lo obtenido con un andamio puesto que no cuenta con las características idóneas para la adhesión, crecimiento y proliferación celular, además que no hay una simulación de la matriz

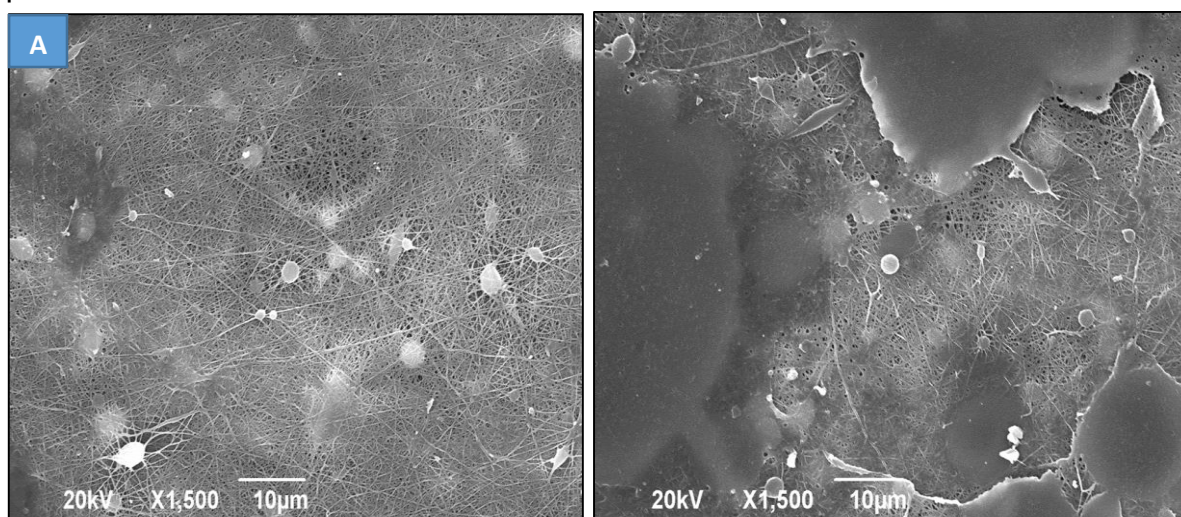
extracelular que permita su alojamiento y posterior regeneración del tejido dañado. Estas secciones no fibrilares se pueden atribuir a que la velocidad de deposición manejada pudo ser muy alta, acumulándose fibras unas sobre otras y cargas residuales imposibilitando interacciones eléctricas debido al carácter no conductor de las nanofibras, ocasionando secciones de polímero fundido en lugar del entramado esperado, según lo descrito por (Ramakrishna et al. 2005).

Según autores como (Liu & Hsieh, 2002), la porosidad del colector parece tener un efecto en las fibras depositadas, y debido a los resultados fallidos se decidió utilizar un colector de malla metálica buscando una mayor difusión y una rata de evaporación más alta de los solventes residuales en las fibras colectadas.

La utilización del colector de malla metálica como posible solución a la problemática presentada, arrojó los resultados evidenciados en la Figura 37.

Claramente, tampoco se presentó una estructura fibrilar óptima para los procesos de andamiaje celular, muy posiblemente debido a que aún con la configuración de malla hubo una acumulación de solventes alrededor de las fibras, causando una fusión entre ellas, resultando en una fase casi tan continua como si se tratase de un colector de acetato.

Debido a estos resultados, cabe resaltar que se debería buscar un solvente con menor punto de fusión para tener ratas de evaporación más altas y así tratar que las cargas residuales permanezcan en la fibra lo cual repelerá fibras subsecuentes y no se fundan unas sobre otras. Por otro lado, se recomendaría variar las condiciones de electrohilado tales como flujo, distancia colector/fuente, voltaje y buscar colectora que tengan baja adherencia y resulten convenientes para el proceso.



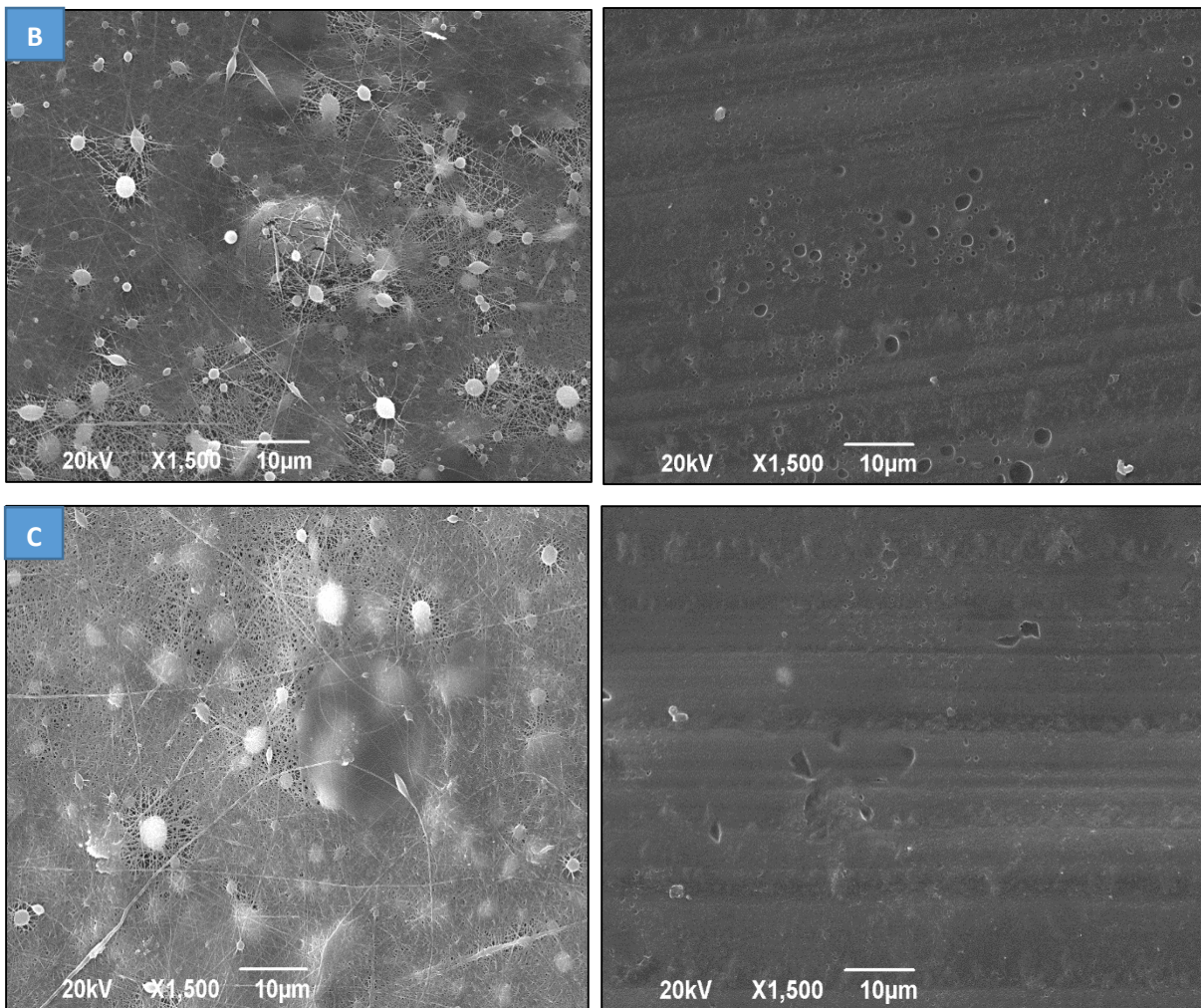


Figura 36. SEM a estructuras fibrilares electrohiladas. La vista de la izquierda corresponde a su superficie y la derecha a la cara en contacto con el colector. A) 0% GO, B) 0,25% GO, C) 0,5% GO.

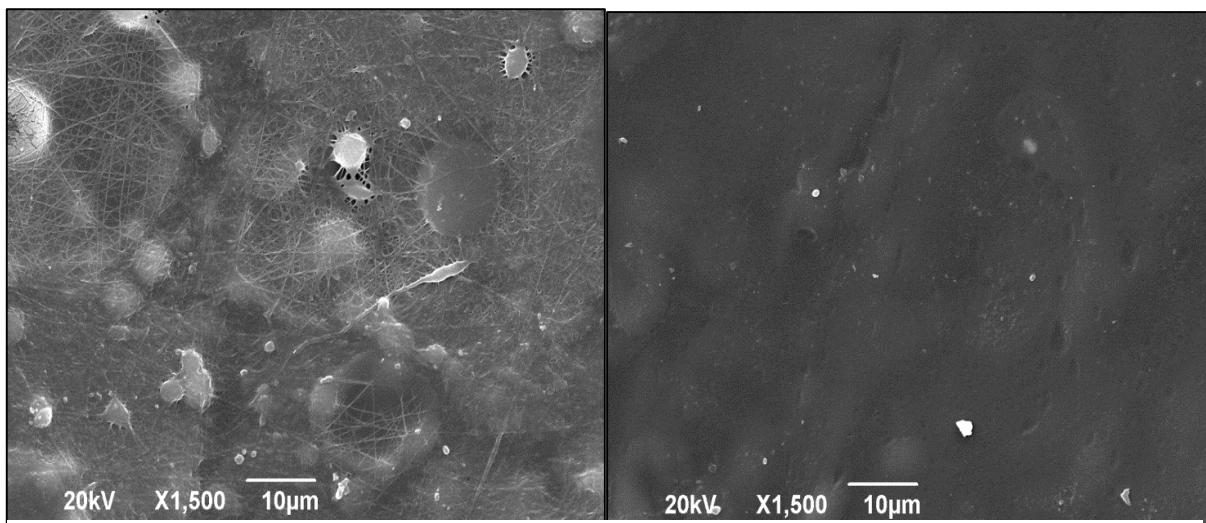


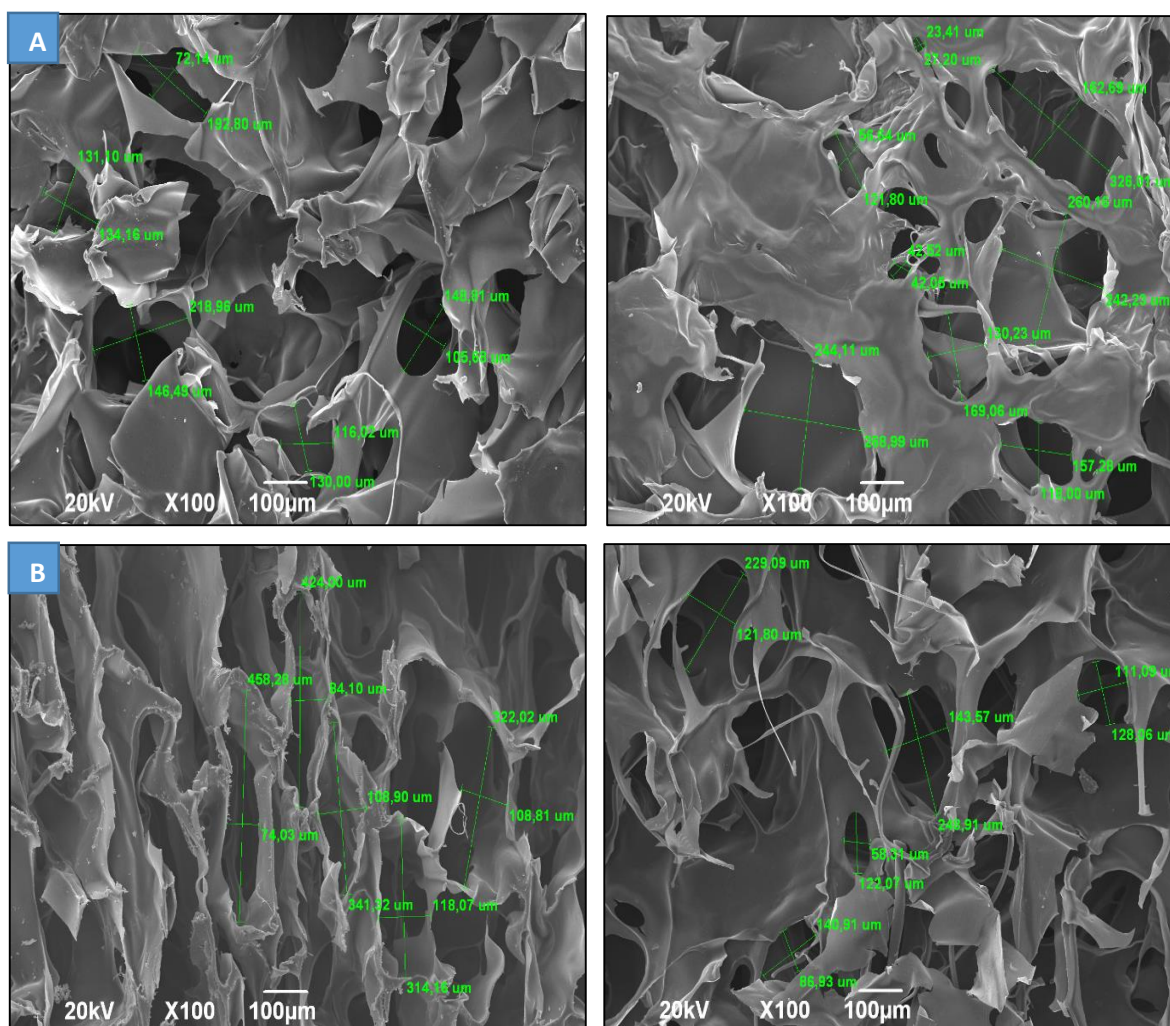
Figura 37. SEM electrohilados sobre colector de malla metálica.

6.4.2. ANDAMIOS LIOFILIZADOS

ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA ANDAMIOS LIOFILIZADOS

En la Figura 38, se observa las imágenes SEM de los andamios de QS obtenidos por el método de liofilización, con diferentes dosificaciones de GO.

Es apreciable que todas las composiciones presentaron una estructura altamente porosa e interconectada pero su morfología varió con la adición de GO, pasando de una estructura poco homogénea con poros irregulares y desgarrados para las composiciones con poco y sin refuerzo, a una estructura completamente homogénea con poros más uniformes y regulares para las composiciones con mayores adiciones de GO. Esto indica que con el aumento de refuerzo se tienen andamios con gran capacidad para evitar el colapso estructural durante la deshidratación en el proceso de liofilización, este resultado concuerda con los ensayos mecánicos reportados anteriormente. Es posible que la fuerte interacción del GO con las cadenas poliméricas del QS sea la razón principal de que ocurra este fenómeno, en concordancia con lo reportado por (Fan et al. 2016).



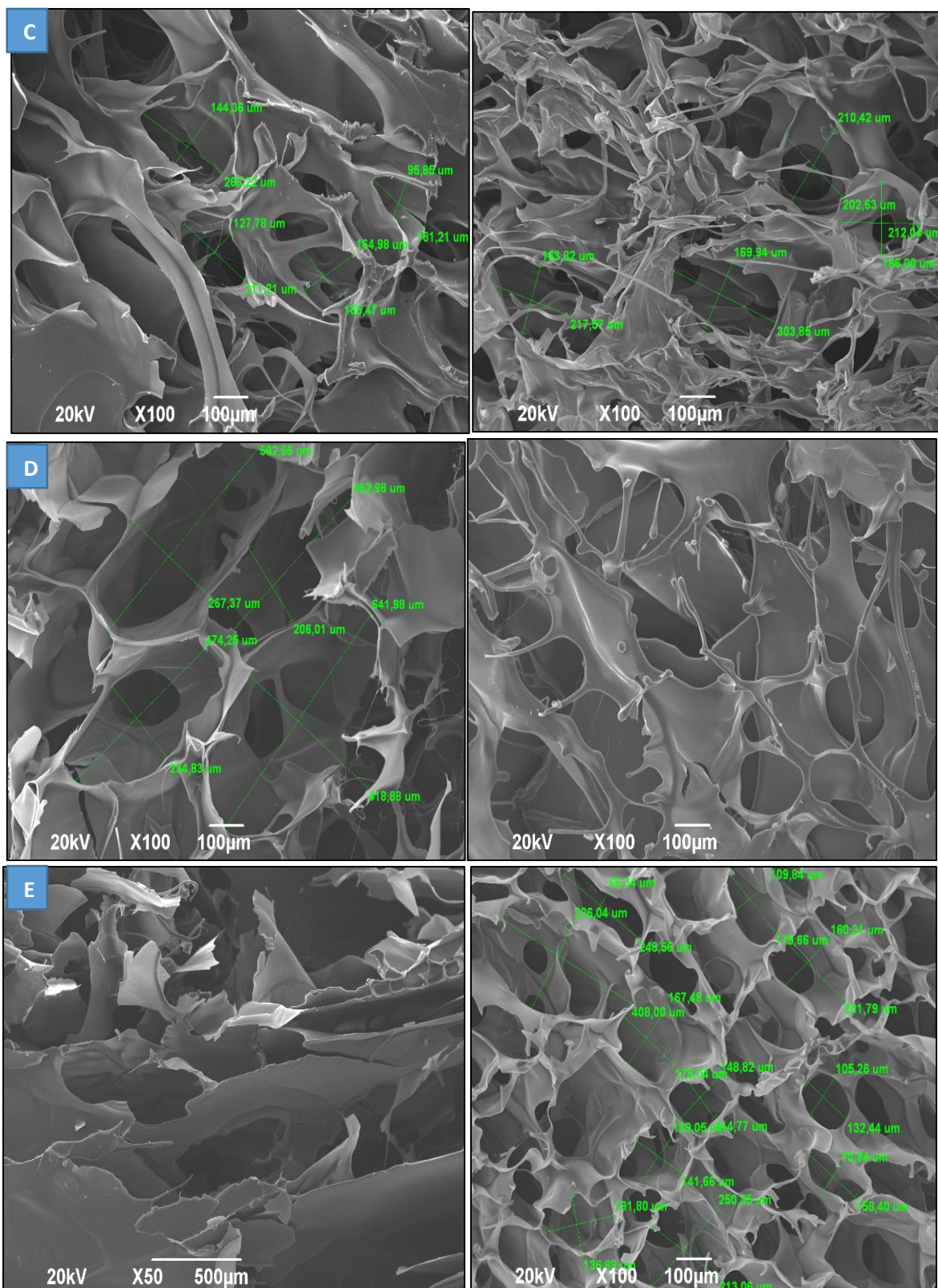


Figura 38. SEM a andamios de diferente composición. La vista de la izquierda corresponde al corte transversal y la derecha a la superficie del andamio. A) 0% GO, B) 0,25% GO, C) 0,5% GO, D) 0,75%GO, E) 1% GO.

Los diámetros de los poros con las diferentes dosificaciones de GO tuvieron variaciones notables, presentando mayor diámetro la composición de 0% con intervalos de 250-350µm, 0.25% con intervalos de 240-300µm, 0.5% entre 140-250µm, 0,75% entre 230-470µm y finalmente 1%GO que presento un diámetro de poro entre 173-215µm.

Según lo establecido por (Saravanan et al. 2016), el tamaño óptimo de poro requerido en los andamios a emplear para ingeniería de tejidos óseos está en el rango de 150-300µm, por lo tanto, los andamios obtenidos por el proceso de liofilización satisfacen los criterios para imitar la ECM presentando tamaños de poro adecuados con excepción de la composición de 0,75%GO la cual obtuvo un diámetro por encima de lo establecido. La importancia de tener una matriz con poros de un diámetro idóneo radica en la necesidad de poder introducir células en el interior del andamio, de eliminar residuos generados en los procesos metabólico de las mismas y la capacidad de transportar nutrientes teniendo afinidad con lo dicho por (Depan et al. 2011).

Además de las dimensiones, el porcentaje de poros en los andamios es crucial, y debe coincidir con el valor de porosidad del hueso humano natural que posee entre el 40% y el 65% de poros en su estructura compacta (Saravanan et al. 2016).

Para determinar el porcentaje de porosidad de los andamios se utilizó el software IQmaterials, el cual contrasta las diferentes fases presentes en la micrografía y puede determinar el porcentaje de cada una de ellas como se observa en la Figura 39, obteniendo los resultados evidenciados en la Tabla 12.

Tabla 12. *Porcentaje de porosidad de andamios a diferentes dosificaciones de GO, tomado con IQmaterials.*

Composición	Porosidad (%)	Andamio (%)
0%GO	68,8322	31,1678
0,25%GO	57,2935	42,7065
0,5%GO	47,7066	52,3294
0,75%GO	64,0553	34,9163
1%GO	43,7951	55,078

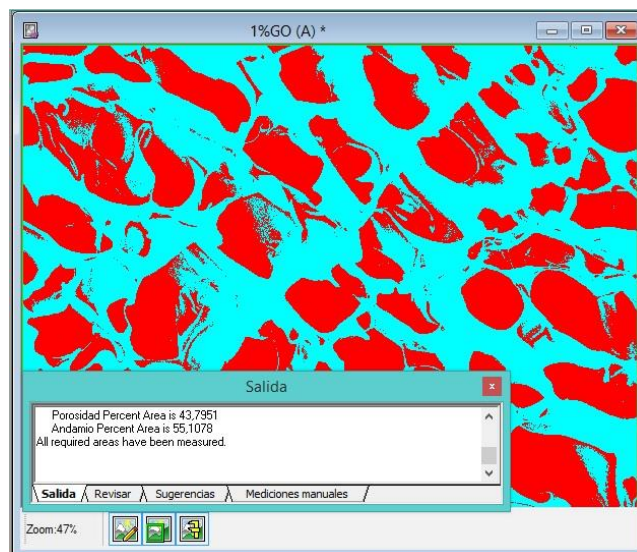


Figura 39. Esquema de la medición de fases implementando el software IQmaterials.

Partiendo de los datos de la Tabla 11, se observó que, con excepción de la composición sin refuerzo, todas presentaron un porcentaje de poro adecuado para su aplicación en la ingeniería de tejidos óseos, según lo establecido anteriormente.

FTIR

En la Figura 40, se pudo apreciar que no hubo cambios significativos de crecimientos o decrecimientos en intensidades de las bandas o generación/desaparición de las mismas, por lo que se tomó este procedimiento como válido para la investigación actual, puesto que no cambió la estructura química del andamio ni generó nuevos enlaces.

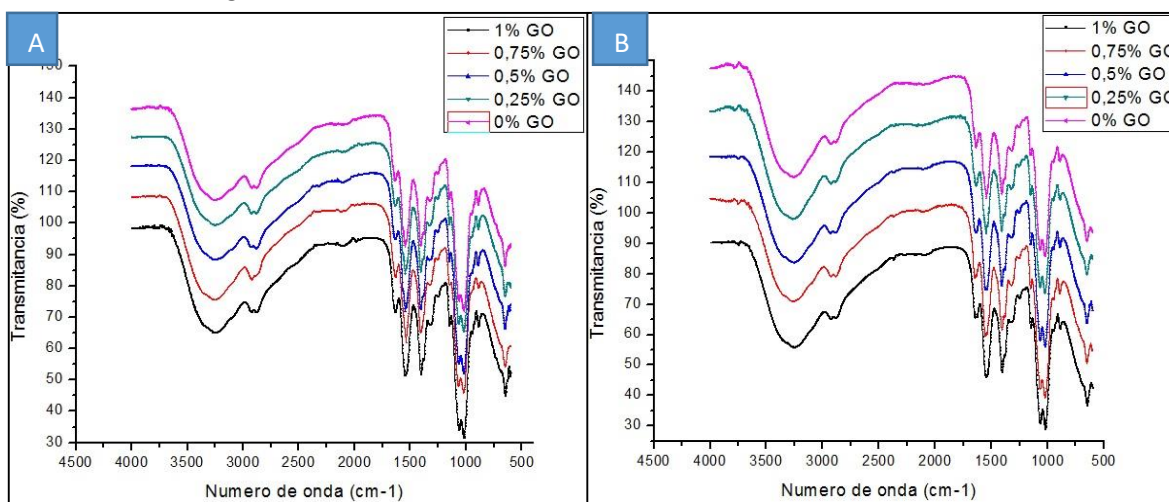


Figura 40. Comparación espectros FTIR de A) Andamio sin esterilizar, B) Andamio esterilizado con ozono y luz uv.

- **CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA**

DEGRADACION HIDROLÍTICA ANDAMIOS LIOFILIZADOS.

En la Figura 41 se observan los resultados de la pérdida de peso de los andamios con diferentes porcentajes de GO después de 30 días de estar sometidos al proceso de degradación hidrolítica en FBS, en donde se pudo apreciar de manera clara que la incorporación de GO en la matriz polimérica afectó la pérdida de peso, ya que con 1% de GO se evidenció la menor pérdida con el transcurrir de los 30 días de ensayo, con valores exactos de 43,26%, mientras que la muestra con 0%GO presentó un valor de 75,81%. Este comportamiento puede ser posible debido al grado de reticulación química mejorado entre el GO-QS lo que aumentó el efecto de impedimento estérico de las moléculas de QS e impidió que el FBS interactuara con este (Ruan et al. 2016).

Desde el día 0 hasta el 15 se observó una velocidad de degradación muy elevada, pero para los días posteriores la pérdida de peso intentó tornarse constante principalmente para las muestras de mayor adición de GO, en comparación con la no reforzada que tuvo una pequeña elevación de la pendiente indicando continuidad en su proceso de degradación. Esta tendencia se podría atribuir a la interacción del FBS con el QS que genera escisiones al azar de las cadenas poliméricas resultando en una disminución del peso molecular y por ende una mayor susceptibilidad a la pérdida de peso de las muestras de acuerdo con lo dicho por (Civantos Fernandez 2014), mientras el comportamiento de la parte menos inclinada de la gráfica se podría atribuir a la misma unión covalente del GO con los grupos amino ($-NH_2$) del QS y la interacción de los restantes con sus grupos hidroxilo, evitando la protonación de los amino impidiendo que se dé el proceso de degradación causado por el FBS.

Para explicar mejor este resultado del comportamiento de la gráfica entre los 15 y 30 días de ensayo, se alude directamente a las cadenas poliméricas de quitosano interactuando con una molécula de óxido de grafeno en el medio. De este modo, la que no tiene dicho refuerzo es muy susceptible al ataque del FBS puesto que no cuenta con grupos amino reaccionando, los cuales serán afectados por el proceso de hidrólisis. Del mismo modo, a medida que se adiciona óxido de grafeno se tienen más grupos amino del QS reaccionando dejando susceptibles al ataque por hidrólisis las secciones de polímero libres de enlaces con el refuerzo, lo que resulta al final en fracciones de polímero totalmente enlazadas al GO las cuales al no ser atacadas por hidrólisis no manifestarán pérdidas significativas de peso representando tendencias constantes en la figura en cuestión, en concordancia con (Depan et al. 2011).

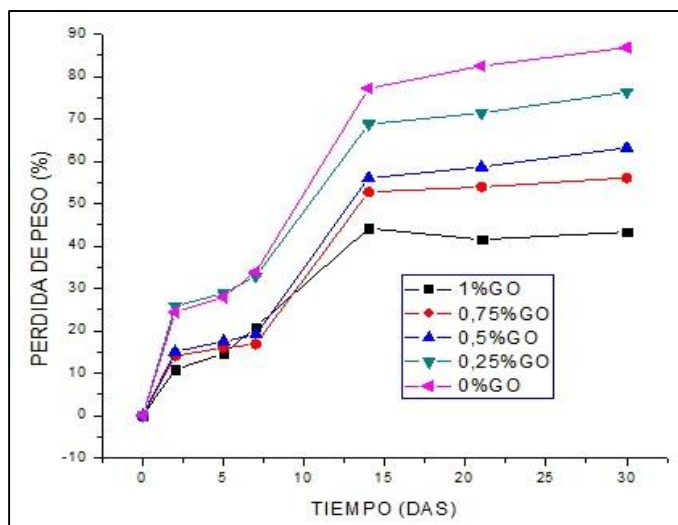


Figura 41. Porcentaje de pérdida de peso de los andamios con diferentes dosificaciones de GO

En la Figura 42 se evidencia el resultado del cambio de pH después de 30 días de degradación de los andamios, en donde se puede observar que para los primeros cinco días de ensayo se generó una disminución considerable del pH en todas las composiciones, para luego estabilizarse entre valores de 6,7 y 6,9. Según esta representación gráfica de los resultados la incorporación de óxido de grafeno no tuvo una repercusión notable en las variaciones del pH del medio de degradación de los andamios.

La caída del pH para los días iniciales, se podría asociar con el ataque a las zonas amorfas debido a que retienen mayor cantidad de especies ácidas y porque para sus bloques presentan mayor susceptibilidad a la degradación ya que no poseen segmentos de zonas cristalinas que los mantengan unidos, según la investigación de (Figueira 2008). Otra causa posible podría ser el ácido acético remanente presente en los andamios, los cuales según esta condición cuentan con un carácter ácido que al interactuar con el FBS desencadenaría una disminución del pH tal como se observa en la gráfica. Finalmente, la parte que se observa casi constante entre pH de 6,9-6,7 se podría atribuir a los subproductos de degradación típicos del QS como lo son la glucosamina o la N-acetilglucosamina, los cuales también se pueden encontrar en la matriz extracelular del tejido humano, haciéndolos inofensivos al ser liberados en el cuerpo humano (Depan et al, 2013). El pH de los medios biológicos es una constante fundamental para el mantenimiento de los procesos vitales. La acción enzimática y las transformaciones químicas de las células se realizan dentro de unos estrictos márgenes de pH. En el cuerpo humano los rangos admisibles que promueven la vida y el mantenimiento de funciones vitales oscilan entre 6 y 8 según lo determinador por la norma (ASTM F1635-11 2016) y confirmado por (Fiñana, Cejudo, y Fernández 2016), lo que indica que los valores obtenidos por parte del proceso de degradación de los andamios se encuentra dentro de los rangos coherentes con los procesos biológicos.

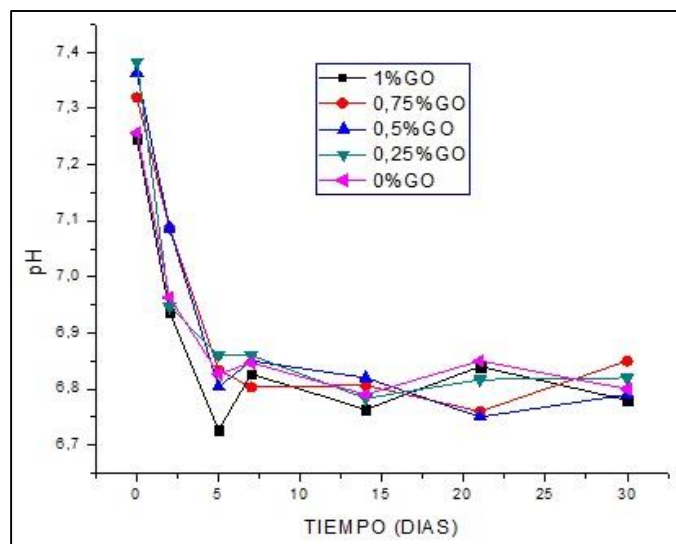


Figura 42. *pH vs tiempo de degradación para diferentes composiciones de andamios.*

Los andamios absorben cantidades considerables de agua una vez implantados in vivo, lo que es un factor crucial para determinar la bioactividad de los mismos. El aumento del tamaño de poro y el volumen, la interacción posterior de proteínas y la adhesión celular dependen de la propiedad de absorción de agua, por esta razón es de gran importancia la realización de este estudio y determinar la influencia de la adición de GO sobre la absorción de los andamios.

En la Figura 43, se aprecia el porcentaje de absorción de los andamios después de 30 días de ensayo, en donde se observa un aumento del porcentaje de absorción de todas las muestras después de un día en el fluido biológico. Para los días posteriores se observa un decaimiento significativo hasta llegar al día 15 y finalmente un intento de estabilización hasta llegar al día 30. Es evidente que el aumento de la concentración de GO en la matriz polimérica de QS influyó en gran medida su porcentaje de absorción, siendo este de 3598% para el andamio con 1%GO en comparación con la muestra no adicionada la cual presentó uno de 2055%.

El comportamiento de hinchamiento se puede atribuir principalmente a los grupos hidrofílicos del QS y GO tales como un enlace OH, un enlace NH₂ y un enlace COOH, generando que estos absorbieran de manera más fácil moléculas de agua y por ende con un aumento en las dosificaciones de GO el hinchamiento fuese más apreciable. Las cadenas del QS pueden hincharse a través de la protonación del grupo amina dando lugar a la relajación mecánica de las cadenas, generando así un aumento del área superficial y mayor espacio en los poros, por lo que se espera que el andamio al estar en servicio permita una mayor infiltración celular, transporte de nutrientes y metabolitos dentro de su estructura (Saravanan et al. 2016).

Por otro lado, el decrecimiento del porcentaje de absorción evidenciado después del día 1 hasta el final del ensayo, se podría atribuir a la saturación presentada por parte de las cadenas poliméricas del QS debido a la interacción con el FBS, esto causó que se formara un hidrogel que selló e impidió que se generara una mayor absorción por parte de los andamios según lo dicho por (Quimbay et al, 2015). Cabe resaltar que este comportamiento se ve relacionado de igual forma por la degradación y pérdida de masa de los andamios, lo que impide que haya menos volumen de andamio con la posibilidad de absorber.

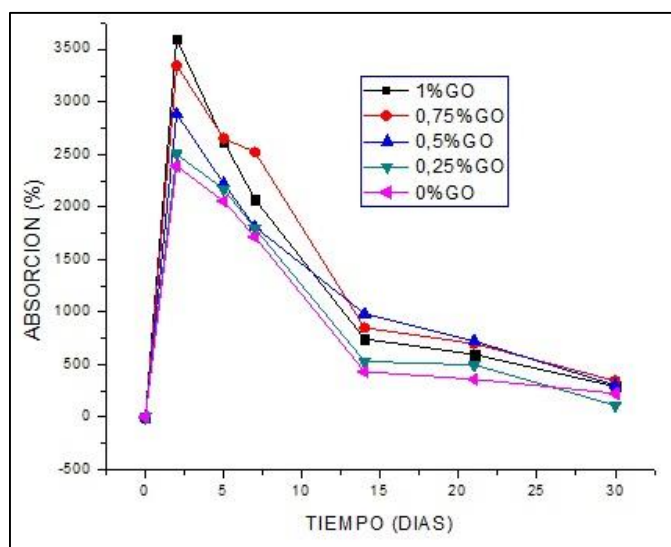


Figura 43. *Porcentaje de absorción vs tiempo de degradación de andamios con diferentes dosificaciones de GO.*

ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD CON ARTEMIA SALINA PARA ANDAMIOS LIOFILIZADOS:

Para abordar los resultados obtenidos del ensayo de citotoxicidad con artemia salina, se utilizó la premisa de que una composición de la sustancia en evaluación se considera tóxica si induce una mortalidad mayor al 30%, tal como lo describen autores como (Paula et al. 2014; Pérez and Lazo 2010).

El porcentaje de letalidad de cada composición de andamio a la artemia salina, se evidencia en la Tabla 13.

Se tuvo como generalidad, que no hubo ninguna composición descartable por letalidad, puesto que la máxima fue del 15% para los casos de andamio con 0 y 1% de GO.

Tabla 13. *Resultados letalidad ensayo de artemia bajo conteo.*

COMPOSICIÓN DE LA MUESTRA	MUERTOS	VIVOS	LETALIDAD
ARTEMIA SOLA	0	20	0%
ANDAMIO 0% GO	3	17	15%
ANDAMIO 0,25% GO	2	18	10%
ANDAMIO 0,5% GO	2	18	10%
ANDAMIO 0,75% GO	1	19	5%
ANDAMIO 1% GO	3	17	15%
BLANCO ETANOL	20	0	100%

Los porcentajes de letalidad se podrían atribuir a algunas pequeñas cantidades de ácido acético residual en las muestras y a la reducción de la concentración de oxígeno disuelto en el agua salina con el paso de las horas. A su vez, como lo describió (M. Islam, Khan, and Mizanur 2015), pudo haberse presentado la formación de una capa viscosa en las branquias de los nauplios debido a la posible formación de una fase gelatinosa fruto del contacto del andamio con el agua salina, lo que pudo inhibir la permeabilidad del oxígeno al sistema respiratorio del animal conduciéndolo a la muerte.

CULTIVO CELULAR DE OSTEObLASTOS EN ANDAMIOS.

Con la finalidad de apreciar la influencia del óxido de grafeno sobre la viabilidad y la adhesión celular, se decidió hacer el cultivo de los osteoblastos sobre los andamios de 0%, 0.5% y 1% de GO. Para la viabilidad celular se hizo una observación con un microscopio óptico a 4 y a 7 días en donde se trató de visualizar la adherencia de las células al fondo del pozo y su confluencia. Para la adhesión celular se utilizó la técnica de SEM tratando de cuantificar la cantidad de células adheridas por unidad de área a cada andamio de diferente composición.

VIABILIDAD Y CRECIMIENTO CELULAR:

OBSERVACIONES DIA 4.

Se tuvo como generalidad para este ensayo, la no letalidad de ninguna de las composiciones de andamios al contacto con las células, puesto que las mismas continuaron con su comportamiento normal al encontrarse adheridas al fondo del pozo para los días iniciales del cultivo, tal como se logra apreciar en las fotografías de la Figura 44.

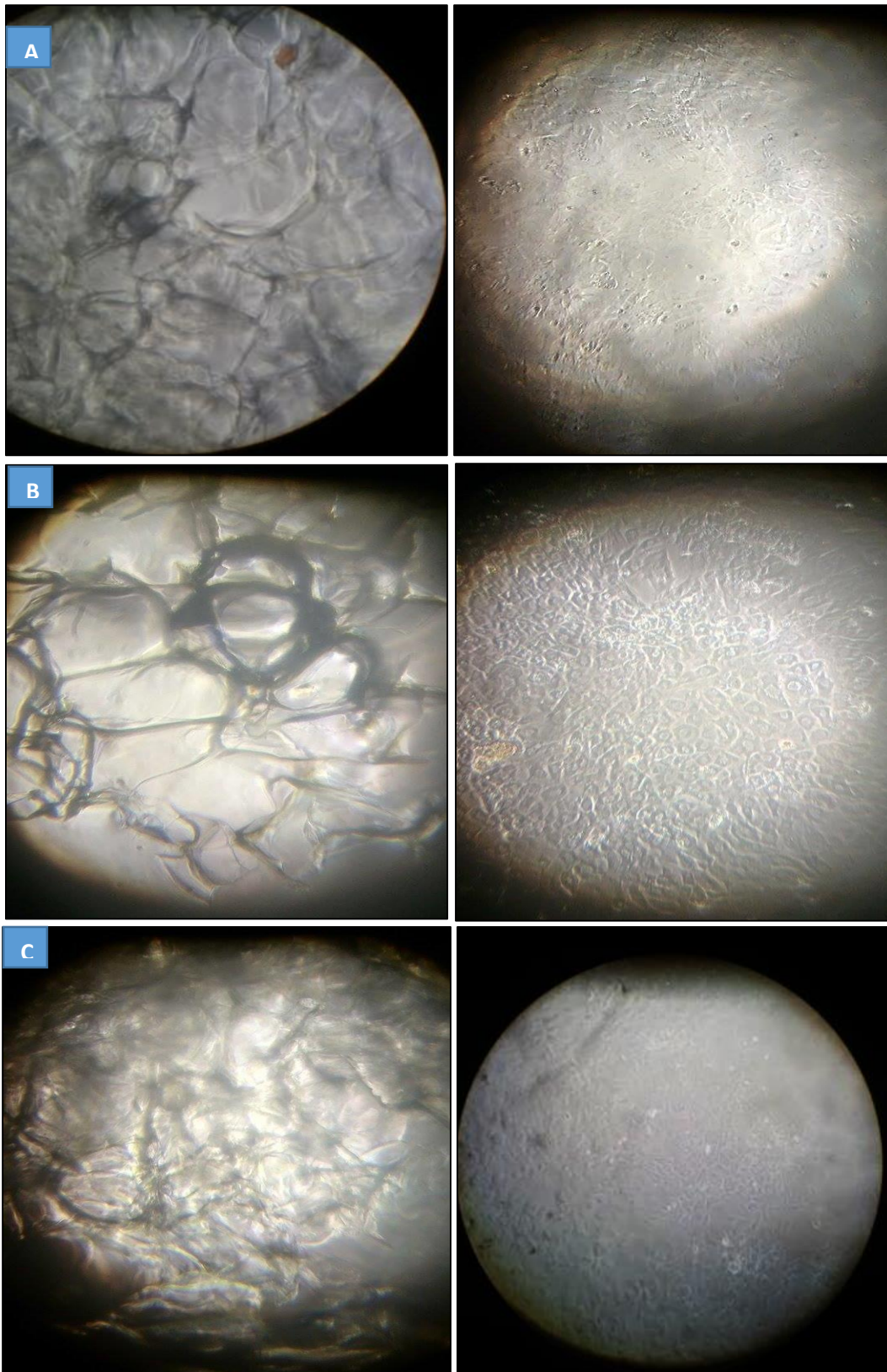


Figura 44. Visualización de morfología de andamio en la imagen de la izquierda y visualización del fondo del pozo para la derecha de andamios con composición A) 0% GO, B) 0,5% GO y C) 1% GO.

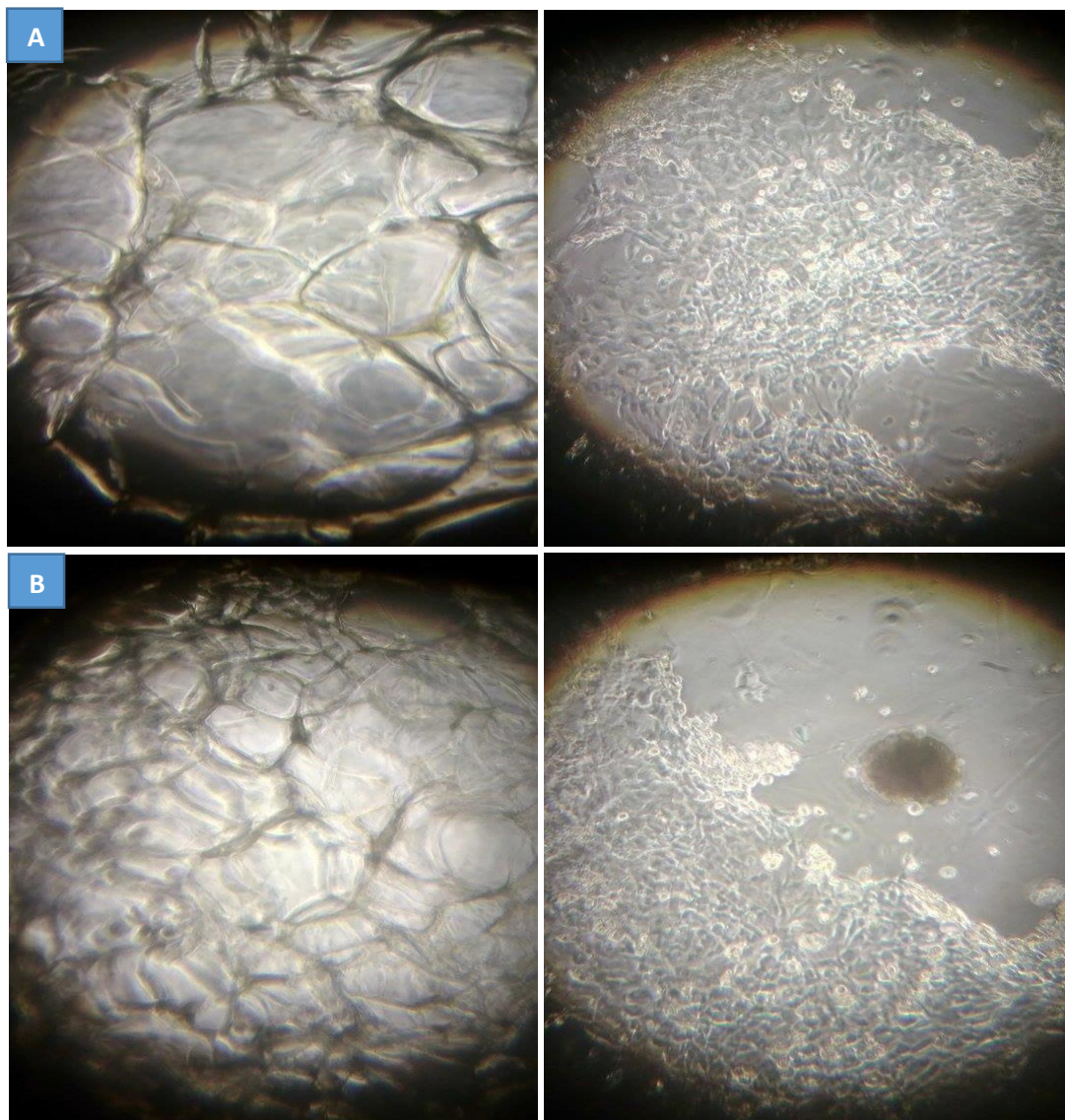
Para todas las composiciones se logró apreciar la morfología normal de los osteoblastos luego de 4 días de ensayo.

OBSERVACIONES DIA 7.

A los siete días de cultivo (véase Figura 45), se pudo apreciar la supervivencia de las células osteoblasticas al encontrarse todavía adheridas al fondo del pozo. A diferencia de la observación anterior, la disposición de las células presentó confluencia ya que más del 80% de la superficie se encontraba cubierta.

Nuevamente, no se observaron diferencias en el crecimiento celular con las diferentes composiciones de refuerzo de GO.

Se confirma de esta manera que el refuerzo de óxido de grafeno hasta una cantidad de 1% no inhibe el crecimiento celular y se diría que al tratarse de un nanocompuesto de carbono podría llegar a contribuir en su unión y proliferación.



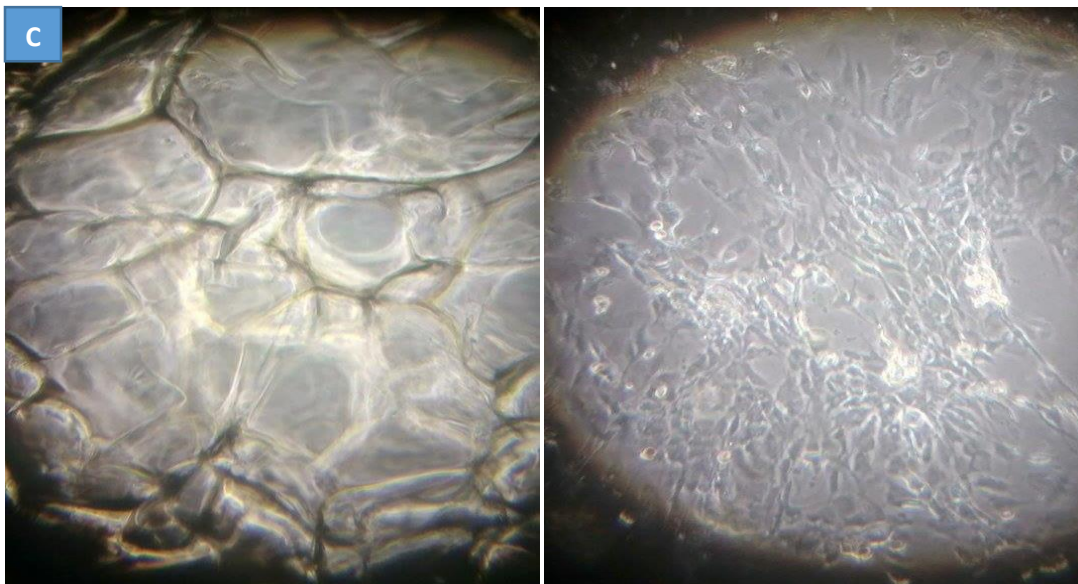


Figura 45. Visualización de morfología de andamio en la imagen de la izquierda y visualización del fondo del pozo para la derecha de andamios con composición A) 0% GO, B) 0,5% GO y C) 1% GO.

7. CONCLUSIONES

Se pudo obtener óxido de grafeno para utilizarlo como reforzante en películas de quitosano plastificadas y posteriormente en andamios porosos, ya que de su caracterización se obtuvieron resultados concordantes con lo especificado en la literatura.

Con la adición de sorbitol como aditivo plastificante a las películas de QS se tuvo mejor porcentaje de deformación, dándoles un carácter flexible que mejoró significativamente su excesiva rigidez y con la adición de GO como reforzante se pudo evidenciar incrementos en su resistencia a tracción.

Se pudo observar que morfológicamente los andamios liofilizados mejoraron su porosidad a medida que se agregó GO, obteniendo poros con formas más regulares, uniformes y con diámetros más reducidos.

Respecto a los ensayos biológicos realizados se encontró que los andamios reforzados fueron más resistentes al proceso de degradación hidrolítica en fluido biológico simulado y no presentaron citotoxicidad al someterlos al ensayo de artemia salina.

Al implantar células osteoblásticas sobre todos los andamios se encontró que su viabilidad no se vio afectada por la presencia de GO ya que con el paso de 7 días siguieron con sus funciones biológicas naturales (confluencia) y no se observó letalidad.

Con los ensayos biológicos elaborados a los andamios se puede concluir su potencial utilidad en la ingeniería de tejidos, para composiciones de quitosano de mediano peso molecular, 0.4% de plastificante y hasta un 1% de óxido de grafeno.

8. RECOMENDACIONES

Realizar caracterizaciones más profundas con técnicas de XPS y/o espectroscopia Raman para dilucidar el enlace que podría haberse formado entre el QS-GO, ya que sólo con la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier se puede dificultar su observación. De igual forma, se recomendaría implementar técnicas que permitan una mayor interacción entre dichos componentes como tratamientos químicos, térmicos o termo-químicos, con la finalidad de potenciar las propiedades brindadas por el GO.

Para obtener una estructura fibrilar en 3 dimensiones (andamio) mediante electrohilado se recomienda variar las condiciones de proceso en cuanto al voltaje, distancia aguja colector, flujo y solvente, así como también indagar sobre colectores óptimos para dicha finalidad.

9. REFERENCIAS

- Aguirre-Loredo, Rocío Yaneli, Adriana Inés Rodríguez-Hernández, Eduardo Morales-Sánchez, Carlos Alberto Gómez-Aldapa, and Gonzalo Velazquez. 2016. "Effect of Equilibrium Moisture Content on Barrier, Mechanical and Thermal Properties of Chitosan Films." *Food Chemistry* 196 (April): 560–66. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.065.
- Aguirre, Francisco. 2015. "Síntesis Y Caracterización de Capas Conductoras de Óxido de Grafeno (GO): Propiedades Vibracionales Bajo Condiciones Extremas de Presión Y Temperatura." *Trabajo Final Master En Materiales*. Universidad de Cantabria.
- ASTM F1635-11. 2016. "Standard Test Method for in Vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable" i: 1–7. doi:10.1520/F1635-11.2.
- Averous, L., and E. Pollet. 2012. "Biopol-2011 Special Issue." *Polymer Degradation and Stability*, 1851.
- Balanta, Danny, Carlos David Grande, and Fabio Zuluaga. 2010. "Extracción Y Caracterización de Quitosano Del Micelio de *Aspergillus Niger* Y Sus Aplicaciones Como Material Bioadsorbente En El Tratamiento De Aguas." *Revista Iberoamericana de Polímeros* 11 (5): 297–316.
- Belén, Fernandez, and Moraleta. Montes. 2013. "Optimización de Materiales Para Regeneración Ósea. Estudio de Las Interacciones de Hidroxiapatita Con Proteínas Y Preparación de Andamios Porosos." Universidad Complutense de Madrid.
- Beltrán-Patiño, Julian. 2013. "Extracción Y Caracterización de Quitosano Del Camarón Titi Y Su Aplicación En La Liberación Controlada de Un Fármaco." *Journal of Chemical Information and Modeling* 53 (9): 1689–99. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Bof, María Julieta, Valeria Carina Bordagaray, Delia Elisa Locaso, and María Alejandra García. 2015. "Chitosan Molecular Weight Effect on Starch-Composite Film Properties." *Food Hydrocolloids* 51. Elsevier Ltd: 281–94. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.05.018.
- Carvalho, D. 2006. "Use of the Genus *Artemia* in Ecotoxicity Testing" 144. doi:10.1016/j.envpol.2005.12.037.
- Casariego, Alicia, Raúl Díaz, Yadira Sergrañes, Olga M Nieto, and Carmen Durán. 2009. "Modelación de Las Propiedades Mecánicas de Películas de Quitosana" 19 (1): 7–12.
- Chávez Huerta, Adrian., and Marinela. Colina Rincón. 2012. "OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO ELABORADO A PARTIR DE LOS DESECHOS DE LA INDUSTRIA CANGREJERA." *Revista Iberoamericana de Polímeros* 13 (3): 77–88.
- Chen, Ji, Bowen Yao, Chun Li, and Gaoquan Shi. 2013. "An Improved Hummers Method for Eco-Friendly Synthesis of Graphene Oxide." *Carbon* 64 (1). Elsevier Ltd: 225–29. doi:10.1016/j.carbon.2013.07.055.
- Civantos Fernandez, Ana Fati ma. 2014. "Caracterización Físico-Química Y Biológica de Filmes de Quitosano Como Transportadores de La rhBMP-2 En La Regeneración Del Tejido Óseo."
- Depan, D., B. Girase, J. S. Shah, and R. D K Misra. 2011. "Structure-Process-Property

- Relationship of the Polar Graphene Oxide-Mediated Cellular Response and Stimulated Growth of Osteoblasts on Hybrid Chitosan Network Structure Nanocomposite Scaffolds.” *Acta Biomaterialia* 7 (9). Acta Materialia Inc.: 3432–45. doi:10.1016/j.actbio.2011.05.019.
- Depan, D., J.S. Shah, and R.D.K. Misra. 2013. “Degradation Mechanism and Increased Stability of Chitosan-Based Hybrid Scaffolds Cross-Linked with Nanostructured Carbon: Process–structure–functional Property Relationship.” *Polymer Degradation and Stability* 98 (11): 2331–39. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2013.08.007.
- Di, Alberto, Michael Sittinger, and Makarand V Risbud. 2005. “Chitosan : A Versatile Biopolymer for Orthopaedic Tissue-Engineering” 26: 5983–90. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.03.016.
- Dinescu, Sorina, Mariana Ionita, Andreea Madalina Pandele, Bianca Galateanu, Horia Iovu, Aurel Ardelean, Marieta Costache, and Anca Hermenean. 2014. “In Vitro Cytocompatibility Evaluation of Chitosan/graphene Oxide 3D Scaffold Composites Designed for Bone Tissue Engineering.” *Bio-Medical Materials and Engineering* 24 (6): 2249–56. doi:10.3233/BME-141037.
- Elango, Jeevithan, Jingyi Zhang, Bin Bao, Krishnamoorthy Palaniyandi, Shujun Wang, Wenhui Wu, and Jeya Shakila. 2016. “Rheological , Biocompatibility and Osteogenesis Assessment of Fish Collagen Scaffold for Bone Tissue Engineering.” *International Journal of Biological Macromolecules* 91. Elsevier B.V.: 51–59. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.05.067.
- Emanet, Melis, Emine Kazanç, Zehra Çobandede, and Mustafa Çulha. 2016. “Boron Nitride Nanotubes Enhance Properties of Chitosan-Based Scaffolds.” *Carbohydrate Polymers* 151: 313–20. doi:10.1016/j.carbpol.2016.05.074.
- Epure, Virginia, Marie Griffon, Eric Pollet, and Luc Avérous. 2011. “Structure and Properties of Glycerol-Plasticized Chitosan Obtained by Mechanical Kneading.” *Carbohydrate Polymers* 83 (2). Elsevier Ltd.: 947–52. doi:10.1016/j.carbpol.2010.09.003.
- Esteve, Laura Santos. 2013. “Síntesis Y Caracterización de Scaffolds Poliméricos Para La Ingeniería de Tejidos.”
- Fan, Lihong, Jiayan Yi, Jun Tong, Xiaoyu Zhou, Hongyu Ge, Shengqiong Zou, Huigao Wen, and Min Nie. 2016. “International Journal of Biological Macromolecules Preparation and Characterization of Oxidized Konjac Glucomannan / Carboxymethyl Chitosan / Graphene Oxide Hydrogel.” *International Journal of Biological Macromolecules* 91. Elsevier B.V.: 358–67. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.05.042.
- Fernanda, Luisa, and Alzate Diaz. 2014. “Caracterización Y Evaluación De Quitosano Como Potencial Biomaterial Para Aplicaciones En Ingeniería De Tejidos.”
- Figueira, Edgardo Maldonado. 2008. “Degradación Hidrolítica a Diferentes pH de Un Material Compuestp Poli(ácido láctico)/Quitosano. Proyecto de Ingeniería de Materiales, Opción Polímeros, Venezuela,” 5.
- Fiñana, Isaac Túnez, Aurora Galván Cejudo, and Emilio Fernández. 2016. “pH Y Amortiguadores : Tampones Fisiológicos,” 1–11.
- Freier, Thomas, Hui Shan, Karineh Kazazian, and Molly S Shoichet. 2005. “Controlling

- Cell Adhesion and Degradation of Chitosan Films by N -Acetylation” 26: 5872–78. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.033.
- Gabriel, Juan, A Rojas Quimbay, Carlos David, and Grande Tovar. 2015. “ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELICULAS POROSAS DEL NANOCOMPUESTO DE QUITOSANO/OXIDO DE GRAFENO.”
- Gabriela, Maria, Nogueira Campos, Lucia Helena, Innocentini Mei, Arnaldo Rodrigues, and Santos Jr. 2015. “Sorbitol-Plasticized and Neutralized Chitosan Membranes as Skin Substitutes” 18 (4): 781–90. doi:10.1590/1516-1439.025015.
- Garg, Tarun, Arsh Chanana, and Ravi Joshi. 2012. “Preparation of Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering Using Freeze Drying Technology.” *IOSR J. Pharm.* 2 (1): 72–73.
- Guerrero-contreras, Jesus. 2015. “Graphene Oxide Powders with Different Oxidation Degree , Prepared by Synthesis Variations of the Hummers Method.” *Materials Chemistry and Physics* 153. Elsevier B.V: 209–20. doi:10.1016/j.matchemphys.2015.01.005.
- Han, Donglin, Lifeng Yan, Wufeng Chen, and Wan Li. 2011. “Preparation of Chitosan / Graphene Oxide Composite Film with Enhanced Mechanical Strength in the Wet State.” *Carbohydrate Polymers* 83 (2). Elsevier Ltd.: 653–58. doi:10.1016/j.carbpol.2010.08.038.
- He, Jiankang, Ting Qin, Yaxiong Liu, Xiang Li, Dichen Li, and Zhongmin Jin. 2014. “Electrospinning of Nano Fi Brous Scaffolds with Continuous Structure and Material Gradients.” *Materials Letters* 137. Elsevier: 393–97. doi:10.1016/j.matlet.2014.09.045.
- Hsu, Shan Hui, Shu Wen Whu, Ching Lin Tsai, Yuan Hsuan Wu, Hui Wan Chen, and Kuo Huang Hsieh. 2004. “Chitosan as Scaffold Materials: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation.” *Journal of Polymer Research* 11 (2): 141–47. doi:10.1023/B:JPOL.0000031080.70010.0b.
- Huang, Zheng-ming, Y Zhang, M Kotaki, and S Ramakrishna. 2003. “A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites” 63: 2223–53. doi:10.1016/S0266-3538(03)00178-7.
- Islam, Atif, Tariq Yasin, Nafisa Gull, Shahzad Maqsood, Aneela Sabir, Muhammad Azeem, Muhammad Shafiq, Tahir Jamil, and Muhammad Hamid. 2016. “Fabrication and Performance Characteristics of Tough Hydrogel Scaffolds Based on Biocompatible Polymers.” *International Journal of Biological Macromolecules* 92. Elsevier B.V.: 1–10. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.07.010.
- Islam, Minhajul, Mubarak A Khan, and Mohammed Mizanur. 2015. “Preparation of Gelatin Based Porous Biocomposite for Bone Tissue Engineering and Evaluation of Gamma Irradiation Effect on Its Properties.” *Materials Science & Engineering C* 49. Elsevier B.V.: 648–55. doi:10.1016/j.msec.2015.01.066.
- Jeong, Da, Seung Mi, Hae Yeong, Hye-jin Min, and Rira Lee. 2015. “Bioactive Fish Collagen / Polycaprolactone Composite Nanofibrous Scaffolds Fabricated by Electrospinning for 3D Cell Culture.” *Journal of Biotechnology* 205. Elsevier B.V.: 47–58. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.01.017.
- Jing, Xin, Hao-Yang Mi, Max R. Salick, Travis M. Cordie, Xiang-Fang Peng, and Lih-Sheng Turng. 2015. “Electrospinning Thermoplastic Polyurethane/graphene Oxide

- Scaffolds for Small Diameter Vascular Graft Applications." *Materials Science and Engineering: C* 49: 40–50. doi:10.1016/j.msec.2014.12.060.
- Kanimozhi, K., S. Khaleel Basha, and V. Sugantha Kumari. 2016. "Processing and Characterization of chitosan/PVA and Methylcellulose Porous Scaffolds for Tissue Engineering." *Materials Science and Engineering C* 61. Elsevier B.V.: 484–91. doi:10.1016/j.msec.2015.12.084.
- Kanimozhi, K, S Khaleel Basha, and V Sugantha Kumari. 2016. "Fabrication of Chitosan Based Hybrid Porous Scaffolds by Salt Leaching for Soft Tissue Engineering" 3: 2468.
- Khan, Younus H., Atif Islam, Afsheen Sarwar, Nafisa Gull, Shahzad M. Khan, Muhammad A. Munawar, Saba Zia, Aneela Sabir, Muhammad Shafiq, and Tahir Jamil. 2016. "Novel Green Nano Composites Films Fabricated by Indigenously Synthesized Graphene Oxide and Chitosan." *Carbohydrate Polymers* 146. Elsevier Ltd.: 131–38. doi:10.1016/j.carbpol.2016.03.031.
- Kokubo, Tadashi, and Hiroaki Takadama. 2006. "How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity?" *Biomaterials* 27 (15): 2907–15. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- Libralato, G, E Prato, L Migliore, A M Cicero, and L Manfra. 2016. "A Review of Toxicity Testing Protocols and Endpoints with Artemia Spp ." *Ecological Indicators* 69. Elsevier Ltd: 35–49. doi:10.1016/j.ecolind.2016.04.017.
- Lim, Siew Shee, Chun Ye Chai, and Hwei-San Loh. 2017. "In Vitro Evaluation of Osteoblast Adhesion, Proliferation and Differentiation on Chitosan-TiO₂ Nanotubes Scaffolds with Ca²⁺ Ions." *Materials Science and Engineering: C* 76. Elsevier B.V.: 144–52. doi:10.1016/j.msec.2017.03.075.
- Liu, Mei, Yibin Zhou, Yang Zhang, Chen Yu, and Shengnan Cao. 2013a. "Food Hydrocolloids Preparation and Structural Analysis of Chitosan Films with and without Sorbitol." *Food Hydrocolloids* 33 (2). Elsevier Ltd: 186–91. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.03.003.
- . 2013b. "Preparation and Structural Analysis of Chitosan Films with and without Sorbitol." *Food Hydrocolloids* 33 (2). Elsevier Ltd: 186–91. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.03.003.
- . 2014. "International Journal of Biological Macromolecules Physicochemical , Mechanical and Thermal Properties of Chitosan Films with and without Sorbitol." *International Journal of Biological Macromolecules* 70. Elsevier B.V.: 340–46. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.06.039.
- Liu, Mingxian, Huanjun Zheng, Juan Chen, Shuangli Li, Jianfang Huang, and Changren Zhou. 2016. "Chitosan-Chitin Nanocrystal Composite Scaffolds for Tissue Engineering." *Carbohydrate Polymers* 152. Elsevier Ltd.: 832–40. doi:10.1016/j.carbpol.2016.07.042.
- Loretta, L, Laura Gioia, Daniela Izzo, Rosaria Rinaldi, Alessandro Sannino, and Francesca Gervaso. 2016. "Design and Characterization of Microcapsules-Integrated Collagen Matrixes as Multifunctional Three-Dimensional Scaffolds for Soft Tissue Engineering." *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 62. Elsevier: 209–21. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.05.009.

- Madihally, S V, and HW Matthew. 2012. "Porous Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering." *Biomaterials* 20 (12).
- Manfra, Loredana, Sara Canepa, Veronica Piazza, and Marco Faimali. 2016. "Ecotoxicology and Environmental Safety Lethal and Sublethal Endpoints Observed for Artemia Exposed to Two Reference Toxicants and an Ecotoxicological Concern Organic Compound." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 123. Elsevier: 60–64. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.08.017.
- Marcela, Lina, Duque Sánchez, Leonardo Rodríguez, and Marcos López. 2014. "ELECTROSPINNING : LA ERA DE LAS NANOFIBRAS" 14 (1): 10–27.
- Mármol, Zulay, Gisela Páez, Marisela Rincón, Karelen Araujo, and Cateryna Aiello. 2011. "Quitina Y Quitosano Polímeros Amigables . Una Revisión de Sus Aplicaciones Chitin and Chitosan Friendly Polymer . A Review of Their Applications." *Revista Tcnocientífica URU*, no. July: 53–58. doi:2244-775X.
- Martínez-Camacho, A. P., M. O. Cortez-Rocha, J. M. Ezquerro-Brauer, A. Z. Graciano-Verdugo, F. Rodríguez-Félix, M. M. Castillo-Ortega, M. S. Yáñez-Gómez, and M. Plascencia-Jatomea. 2010. "Chitosan Composite Films: Thermal, Structural, Mechanical and Antifungal Properties." *Carbohydrate Polymers* 82 (2): 305–15. doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.069.
- Mohammadi, Zahra, Abdorreza Sheikh Mehdi Mesgar, and Fariba Rasouli-Disfani. 2016. "Reinforcement of Freeze-Dried Chitosan Scaffolds with Multiphasic Calcium Phosphate Short Fibers." *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 61. Elsevier: 590–99. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.04.022.
- Muñoz, Gustavo, Carlos Valencia, Nora Valderruten, Eduardo Ruiz-Durántez, and Fabio Zuluaga. 2015. "Extraction of Chitosan from Aspergillus Niger Mycelium and Synthesis of Hydrogels for Controlled Release of Betahistine." *Reactive and Functional Polymers* 91–92: 1–10. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2015.03.008.
- Olivas-Armendáriz, I., P. García-Casillas, A. Martel-Estrada, R. Martínez-Sánchez, A. Martínez-Villafañe, and C.A. Martínez-Pérez. 2009. "Preparation and Characterization of Chitosan / Carbon." *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 8 (2): 205–11. doi:10.1002/pc.20651.
- Ortiz, Danilo, and Andrés Pretel. 2017. "Elaboración de Andamios a Partir de Quitosano-Pva-Óxido de Grafeno Por Medio de La Técnica de Electrohilado Para Su Posible Aplicación En Ingeniería de Tejidos." Universidad del Valle.
- Paula, Ana, Fernandes Barbosa, João Xavier De Araújo-júnior, Maria Lysete, and De Assis Bastos. 2014. "Evaluación Del Extracto de La Zeuheria Tuberculosa de Un Producto Para Cicatrización de Heridas." 22 (1): 165–72. doi:10.1590/0104-1169.3143.2385.
- Pérez, Oriela Pino, and Fanny Jorge Lazo. 2010. "Ensayo de Artemia: ÚTIL HERRAMIENTA DE TRABAJO PARA ECOTOXICÓLOGOS Y QUÍMICOS DE PRODUTOS NATURALES." *Rev. Protección Veg* 22 (1): 34–43.
- Raghubanshi, Himanshu, Shalate M Ngoben, Adeniyi Olugbenga, Ntaote David, Charity Wokwu, Eliazer Bobby, Ezekiel Dixon, Rajiv K Pandey, and Rajiv Prakash. 2016. "Journal of Industrial and Engineering Chemistry Synthesis of Graphene Oxide and Its Application for the Adsorption of Pb + 2 from Aqueous Solution." *Journal of*

- Industrial and Engineering Chemistry*. The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry, 1–10. doi:10.1016/j.jiec.2016.11.028.
- Ramakrishna, Seeram, Kazutoshi Fujihara, Wee-Eong Teo, Teik-Cheng Lim, and Zuwei Ma. 2005. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. 1sted. Singapur: World Scientific Printer.
- Ruan, Jing, Xiansong Wang, Zhang Yu, Zi Wang, Qing Xie, Dandan Zhang, Yazhuo Huang, et al. 2016. "Enhanced Physiochemical and Mechanical Performance of Chitosan-Grafted Graphene Oxide for Superior Osteoinductivity." *Advanced Functional Materials* 26 (7): 1085–97. doi:10.1002/adfm.201504141.
- Saravanan, S., C. Anjali, M. Vairamani, T. P. Sastry, K. S. Subramanian, and N. Selvamurugan. 2016. "Scaffolds Containing Chitosan, Gelatin and Graphene Oxide for Bone Tissue Regeneration in Vitro and in Vivo." *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 1–11. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.034.
- Scoffin, Katriona. 2011. "Scaling the Scaffolds : Control of Pore Size in Tissue Engineering Scaffolds." *American Laboratory*, 5.
- Shao, Guilin, Yonggen Lu, Fangfang Wu, Changling Yang, Fanlong Zeng, and Qilin Wu. 2012. "Graphene Oxide: The Mechanisms of Oxidation and Exfoliation." *Journal of Materials Science* 47 (10): 4400–4409. doi:10.1007/s10853-012-6294-5.
- Shao, Weili, Jianxin He, Qiming Han, Feng Sang, Qian Wang, Li Chen, Shizhong Cui, and Bin Ding. 2016. "A Biomimetic Multilayer Nanofiber Fabric Fabricated by Electrospinning and Textile Technology from Polylactic Acid and Tussah Silk Fibroin as a Scaffold for Bone Tissue Engineering." *Materials Science and Engineering: C* 67. Elsevier B.V.: 599–610. doi:10.1016/j.msec.2016.05.081.
- Sivashankari, P. R., and M. Prabakaran. 2016. "Prospects of Chitosan-Based Scaffolds for Growth Factor Release in Tissue Engineering." *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.043.
- Sun, Kai, Ruixin Li, Wenxue Jiang, Yufu Sun, and Hui Li. 2016. "Biochemical and Biophysical Research Communications Comparison of Three-Dimensional Printing and Vacuum Freeze-Dried Techniques for Fabricating Composite Scaffolds." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 477 (4). Elsevier Ltd: 1085–91. doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.050.
- Tharanathan, Remi. 2003. "Biodegradable Films and Composite Coatings: Past, Present and Future." *Food and Science Technology* 14: 71–78.
- Valencia, Raúl A, Yuliet Montoya, Simón Sánchez, Isabel C Ortiz, Lina M Hoyos, and John Bustamante. 2017. "Estudio in Vitro de Permeabilidad, Porosidad Y Crecimiento Celular En Membranas Electrohiladas Para Prótesis Vasculares." *Revista Colombiana de Cardiología* 24 (2). Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular: 182–90. doi:10.1016/j.rccar.2016.05.016.
- Vanhaecke, Paul, Guido Persoone, Christine Claus, and Patrick Sorgeloos. 1981. "Proposal for a Short-Term Toxicity Test with *Artemia Nauplii*." *Artemia Reference Center*.
- Yoo, Byung Min, Hye Jin Shin, Hee Wook Yoon, and Ho Bum Park. 2014. "Graphene and Graphene Oxide and Their Uses in Barrier Polymers." *Journal of Applied Polymer*

Science 131 (1). doi:10.1002/app.39628.