

ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE ANDAMIOS DE ACIDO POLILACTICO EN
PELICULAS DE QUITOSANO

OSCAR ALBERTO CADAVID MEJÍA
ANDREA STEFANNIA RAMIREZ NARVÁEZ

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERIA
ESCUELA DE INGENIERIA DE MATERIALES
SANTIAGO DE CALI

2020

ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE ANDAMIOS DE ACIDO POLILACTICO EN
PELICULAS DE QUITOSANO

OSCAR ALBERTO CADAVID MEJÍA
ANDREA STEFANNIA RAMIREZ NARVÁEZ

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

Directores: MAYRA ELIANA VALENCIA, MSc.

JOSE HERMINSUL MINA, PhD.

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA DE INGENIERIA DE MATERIALES

SANTIAGO DE CALI

2020

Nota de aceptación

Firma del evaluador

Firma del evaluador

Santiago de Cali, (20 de marzo de 2020)

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Olga Lucía por su amor, cariño, apoyo y dedicación durante mi vida. Por enseñarme desde pequeño el valor del conocimiento que me ha permitido llegar hasta quien soy.

A John por sus consejos, cariño y apoyo como hermano mayor que con actos han sido los pasos para seguir como persona.

A Lina quien ha sido mi apoyo durante los momentos más difíciles y disfrutado a su lado durante muchas alegrías. Por su gran amor que me ha expresado como amiga, mejor amiga y pareja. Sin ti no habría sido posible culminar exitosamente este proceso.

A Sthefannia por su compañerismo durante la realización de este proyecto y amistad que espero perdurará más allá de la terminación de nuestro ciclo universitario.

A mis amigos “Los de Atrás” donde descubrí que podemos asociarnos siendo raros, disfrutando de nuestras diferencias y gustos. Para Carlos, Karen, Joshua, Luis Fernando, Luis Carlos, Alvaro y especialmente a Nayhua, gracias por su amistad.

A mis amigos de la universidad que hicieron este viaje más divertido, con quienes compartí fracasos y aciertos. Entre ellos Paola, Angelica, Brian, Jeison, Vilmary, Esteban, Laura, Carolina, Andrea, Kelly, Mario, Natalia, Valeria, Lina, a todos aquellos que no nombro pero que nuestras vivencias permitieron acercar nuestros corazones y llamarnos amigos.

A mi familia por su apoyo, en especial a mis abuelos quienes estuvieron presentes en mi crianza y son fuente de inspiración en mis logros.

A mis hermanos Shaolin por su cariño, enseñanzas y filosofía que son un pilar de mis valores humanos.

A mis maestros y maestras que me han enseñado a lo largo de vidas su infinito conocimiento, que gracias a ellos me permiten estar aquí y ahora.

Al universo por la chispa que me concedió la vida.

Oscar

Primero que todo, deseo agradecerle a mi madre Emilia Narváez, por su amor y apoyo incondicional, por ser un gran ejemplo desde mi más tierna infancia, porque gracias a su carácter y su buen corazón he crecido y evolucionado como ser humano. A mi padre Luis Ramírez deseo agradecerle por todos sus consejos y sabiduría que me han ayudado a tomar decisiones sabiamente y por ese cariño que ha estado presente durante toda mi vida. A ambos por la paciencia y comprensión durante esta etapa universitaria y por regalarme esta maravillosa oportunidad.

A H. Javier Llanos Morales, deseo agradecerle profundamente por brindarme tanto amor y apoyo no solo como amigo sino también como pareja, quiero resaltar esa calidez humana tan bonita que lo hace único y que me ha brindado tanta felicidad y recuerdos bonitos, por compartirme un poco de su fortaleza y sabiduría pues me ha iluminado y dado fuerzas en momentos de oscuridad y dificultad.

A Oscar A. Cadavid, mi compañero en esta aventura, quiero agradecerle por tanto compromiso, sabiduría y comprensión, sin él esto no habría sido posible. A Lina Materon por todo el apoyo y el conocimiento que me ha regalado. A los dos los llevo en el corazón y recordaré gratamente todos los momentos que hemos compartido hasta ahora, deseo que sigamos construyendo memorias en el futuro.

A mis amigos de infancia Ricardo A. Viveros y Carlos A. Palacios, porque con el paso de los años he podido contar con su amistad, sabiduría, apoyo, cariño y su compañía me ha permitido crecer muchísimo como persona y ser humano.

A mis compañeros de carrera que en diferentes etapas de esta me brindaron su amistad, apoyo y me han regalado momentos únicos que podré recordar siempre con una sonrisa plasmada en el rostro: A Daniel Sánchez, Neufer Bonilla, Cristian Moyano, Jesica Beltrán, Diego A. Rincón, Luis Ibarguen, Andrés Parada y todos aquellos que no he podido nombrar pero que han aportado un granito de arena en la construcción de mi vida universitaria.

A Dios y a la vida misma por haber puesto en mi camino a todas las personas que he nombrado con anterioridad, porque cada paso que he dado ha sido parte de un plan más grande y las enseñanzas que me ha brindado esta experiencia universitaria han sido reconfortantes, enriquecedoras y maravillosas.

Andrea S.

Agradecemos a la magister y estudiante doctoral Mayra Valencia por su apoyo, asesoría y acompañamiento en el desarrollo de este proyecto.

Agradecemos al Doctor José Mina por su formación, enseñanza y colaboración durante la carrera y en especial durante este proyecto.

Agradecemos al Grupo de Materiales Compuestos con énfasis al grupo de polímeros por permitirnos hacer y culminar con éxito la parte final de nuestro proceso de educación.

En especial agradecemos a nuestros compañeros del laboratorio de polímeros por el cálido y afectuoso ambiente que juntos construimos.

Un reconocimiento a la labor de los profesores, funcionarios de laboratorio y funcionarios administrativos de la Escuela de Ingeniería de Materiales por la formación recibida, su apoyo y disposición.

Oscar y Andrea S.

Tabla de contenido.

RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. OBJETIVO GENERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	12
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.	13
3.1 BIOMATERIALES.....	13
3.1.1 BIOPOLIMEROS	13
3.1.1.1 Quitosano.....	13
3.1.1.2 Ácido Poliláctico	14
3.2 ANDAMIOS POLIMERICOS	15
3.2.1 TIPOS DE ANDAMIOS	15
3.2.2 TECNICAS DE OBTENCIÓN DE ANDAMIOS	16
3.3 PELICULAS POLÍMERICAS.....	20
3.3.1 TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE PELICULAS DE QUITOSANO.....	20
3.4 ESTADO DEL ARTE	21
3.4.1 ANDAMIOS DE PLA.....	21
3.4.2 ANDAMIOS DE QUITOSANO	24
3.4.4 Estudios realizados en la Universidad del Valle	26
4. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	28
5. METODOLOGÍA	29
5.1. MATERIALES Y EQUIPOS.....	29
5.1.1. Obtención de Andamios Electrohilados	29
5.1.2. Obtención de películas	29
5.2. MÉTODOS.....	30
5.2.1. CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS.....	30
5.2.2. OBTENCIÓN DE ANDAMIOS ELECTROHILADOS.....	31
5.2.2.1. OBTENCIÓN DE ANDAMIOS ELECTROHILADOS DE PLA.....	31
5.2.2.1.1 Andamios electrohilados de PLA con cloroformo.	31
5.2.2.1.2 Andamios electrohilados de PLA con mezcla Dimetilformamida-Acetona.....	31
5.2.2.2 CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS DE PLA.....	32
5.2.3. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO.....	32
5.2.4. OBTENCIÓN DEL MATERIAL COMPUESTO	33

5.2.4.1 CARACTERIZACIÓN DE PELICULAS DE QUITOSANO Y MATERIALES COMPUESTOS.....	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
6.1. CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS.....	35
6.2. ELABORACIÓN DE ANDAMIOS DE PLA CON CLOROFORMO.....	35
6.3. CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS DE PLA CON CLOROFORMO.....	38
6.4. ANDAMIOS PLA CON DMF Y ACETONA.....	40
6.4.1. Solución polimérica PLA con DMF y Acetona.....	40
6.5. CARACTERIZACIÓN POR SEM DE LOS ANDAMIOS FIBROSOS DE PLA CON MEZCLA DMF-ACETONA.	43
6.6. ELABORACIÓN DE PELÍCULAS COMPUESTAS DE QUITOSANO CON ANDAMIOS FIBROSOS DE PLA.	47
6.6.1. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS CON QUITOSANO.	47
6.6.2. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS COMPUESTAS.....	47
6.7. CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS COMPUESTAS DE QUITOSANO Y PLA	48
6.7.1.1. Ensayos de tensión	48
7. CONCLUSIONES.....	50
8. RECOMENDACIONES PARA FUTUROS ESTUDIOS.	51
9. BIBLIOGRAFÍA.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LA QUITINA Y EL QUITOSANO.	14
FIGURA 2. MÉTODOS DE SÍNTESIS DEL PLA	15
FIGURA 3. ESQUEMA DE LA TÉCNICA DE LIOFILIZACIÓN.....	16
FIGURA 4. ESQUEMA DE LA TÉCNICA DE LIXIVIADO DE PARTÍCULAS.	16
FIGURA 5. ESQUEMA DE LA TÉCNICA DE MOLDEADO POR FUSIÓN	17
FIGURA 6. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DE LA TÉCNICA DE SEPARACIÓN DE FASES.....	17
FIGURA 7. DIFERENTES UNIDADES DE ANDAMIOS POROSOS OBTENIDOS DE OPERACIONES BOOLEAN DE ESTÁNDAR PRIMITIVO.	18
FIGURA 8. ESQUEMA DE LA CONFORMACIÓN EN EL EQUIPO DE ELECTROHILADO VERTICAL	19
FIGURA 9. A) MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE FASES SOLIDO-LÍQUIDO Y LIOFILIZACIÓN. FABRICACIÓN DE ANDAMIOS REFORZADOS B) “POROUS SHELL” C) “SOLID-SHELL” Y D) “BEAM”	22
FIGURA 10. EQUIPO DE ELECTROHILADO.	29
FIGURA 11. VISCOSÍMETRO CAPILAR UBBELOHDE. TOMADO DE XYLEM ANALYTICS	30
FIGURA 12. METODOLOGÍA PARA ESTUDIO CON SOLVENTES.....	32
FIGURA 13. METODOLOGÍA PARA OBTENCIÓN DE PELÍCULAS COMPUESTAS.	33
FIGURA 14. MONTAJE DE ENSAYOS PARA TENSIÓN MECÁNICA.....	34
FIGURA 15. SEM DE ANDAMIOS ELECTROHILADAS DE PLA:CLOROFORMO AL 12%.	38
FIGURA 16. SEM DE ANDAMIOS ELECTROHILADAS DE PLA EN MEZCLA DE SOLVENTES A 12kV.....	43
FIGURA 17. SEM DE ANDAMIOS ELECTROHILADAS DE PLA EN MEZCLA DE SOLVENTES A 22kV.....	45
FIGURA 18. MICROGRAFÍA DE ANDAMIOS PRODUCIDOS CON SISTEMA DE SOLVENTES 30% DMF- 70% AC.	46

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. DATOS RELACIONADOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR PROMEDIO DEL QUITOSANO.	35
TABLA 2. DESCRIPCIÓN DE PARÁMETROS PARA DETERMINACIÓN DEL MEJOR SOLVENTE PARA ELABORAR FIBRAS ELECTROHILADAS DE PLA.	40
TABLA 3. SOLUCIÓN POLIMÉRICA DE PLA CON DMF Y ACETONA EN DIVERSAS CONCENTRACIONES PARA OBTENCIÓN DE FIBRAS ELECTROHILADAS EN VOLTAJES DE 12 kV Y 22 kV.....	41
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANDAMIOS OBTENIDOS A DIFERENTES TIEMPOS DE CORRIDA	42
TABLA 5. RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN POR PRUEBAS DE Tensión AL MATERIAL OBTENIDO	48

RESUMEN

En esta investigación se realizaron andamios fibrosos de ácido poliláctico (PLA) por el método de electrohilado, películas de Quitosano y se evaluó el efecto del reforzamiento de andamios fibrosos de PLA en películas de Quitosano. La obtención de andamios fibrosos por la técnica de electrohilado se realizó utilizando cloroformo y un sistema binario de solventes (Acetona-Dimetilformamida). La caracterización de los andamios fibrosos se realizó por medio de la microscopia electrónica de barrido (SEM). Las mejores fibras fueron obtenidas con el sistema binario de solventes en relación 70:30 respectivamente. La obtención de películas de Quitosano por medio de la técnica de evaporación de solvente, para aplicación deseada se eligió una concentración del polímero al 0.5% (p/v) en una solución de ácido acético al 2%. Finalmente, la evaluación del efecto del reforzamiento en el material compuesto evidenció una disminución de las propiedades mecánicas a tensión debido a la posible catálisis hidrolítica ácida del andamio fibroso de PLA.

Palabras clave: Electrohilado, andamios fibrosos, evaporación de solvente.

1. INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinar que combina áreas como biología, química, medicina, ingeniería mecánica, ciencia e ingeniería de materiales, entre otras. Con el fin de reparar, reemplazar e incluso mejorar desde tejidos hasta órganos completos a partir de generar elementos (andamios) donde puedan adherirse, crecer, proliferar y reproducirse células específicas o que estos materiales puedan inducir una diferenciación celular (Jiao et al., 2007)

Esta rama multidisciplinar posee gran importancia a nivel clínico debido a los buenos resultados ante traumatismos o enfermedades degenerativas en las que se ve involucrada la pérdida de cualquier tipo de tejido. Sin embargo, el desarrollo y avance de este tipo de investigaciones dependen de la formación académica de la población, la situación económica y las políticas regulatorias establecidas para la investigación, producción y comercialización de productos y servicios del país. En Colombia, la ingeniería de tejidos necesita un impulso en la mejora de la investigación, apoyo económico y político que regule productos producidos de estas investigaciones para lograr avances significativos en el área, pues aún cuenta con pocos estudios a diferencia de otros países (Ramírez & Ayala, 2016)

La matriz extracelular (MEC) es el conjunto de materiales que conforman un tejido, se encuentra conformada por una red de proteínas y polisacáridos los cuales son secretados localmente por células que hacen parte de dicho tejido. La MEC proporciona una integridad mecánica, señales para la proliferación y diferenciación celular, además, controla el transporte de nutrientes y productos de desecho. En la ingeniería de tejidos, el soporte elaborado y usado será uno que sirva como análogo a la matriz extracelular del órgano o tejido que ha sufrido algún daño para su posterior recuperación (Ramírez & Ayala, 2016)

El quitosano es un polímero de origen natural y de fácil procesamiento para la obtención de diferentes soportes, fibras, geles, etc. El cual presenta un rol de gran importancia en ingeniería de tejidos debido a su alta adhesión celular, proliferación, diferenciación de osteoblastos y mineralización. Por otra parte, el PLA que es un polímero sintético también es ampliamente utilizado en el campo biomédico debido a su biocompatibilidad y biodegradación, pero posee una alta hidrofobicidad, razón por la cual no es tan viable para interactuar con matrices ricas en agua, es por esto que, en varios estudios se ha recubierto con quitosano para mejorar dicha compatibilidad (Deepthi et al., 2016; Zeng et al., 2016)

Teniendo en cuenta lo anterior, se evalúa la posibilidad de obtener una película compuesta con quitosano y PLA para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

2. OBJETIVOS.

2.1.OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto sinérgico en las propiedades mecánicas de andamios fibrosos de ácido poliláctico en películas de quitosano.

2.2.OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar y caracterizar andamios fibrosos de ácido poliláctico mediante el proceso de electrohilado.
- Elaborar películas de quitosano mediante la técnica de evaporación de solvente.
- Evaluar el efecto de la incorporación de andamios fibrosos de ácido poliláctico en películas de quitosano mediante ensayos mecánicos.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.

3.1 BIOMATERIALES

Los biomateriales, son materiales diseñados para rellenar cavidades, brindar un soporte, generar tejidos, órganos, dispositivos de rehabilitación o implantes que reemplacen los tejidos naturales del cuerpo humano que se han visto afectados por alguna razón. Estos deben cumplir con la función para la que son diseñados de manera segura y sin presentar interacciones negativas con los tejidos vivos circundantes y ser estéticamente aceptables una vez estén en funcionamiento. Estos materiales pueden ser metales, cerámicos, polímeros y compuestos (Bauer, Schmuki, von der Mark, & Park, 2012).

Una vez que se ha implantado un material en el organismo, este se puede comportar de tres formas: la primera como material inerte, el cual puede producir el desarrollo de una cápsula de tejido fibroso alrededor del material implantado y será menos gruesa a medida que el material sea más biocompatible, la segunda como material bioactivo el cual puede crear uniones con el tejido vivo y finalmente material bioabsorbible el cual puede ser reabsorbido por el organismo (Piña Barba & Medina Molotla, 2004).

3.1.1 BIOPOLIMEROS

Un biopolímero es un polímero que interactúa con un sistema biológico para evaluar, curar, corregir o reemplazar algún tejido, órgano o función de este. Pueden ser orgánicos, inorgánicos o inertes, además de ser biocompatibles, los biopolímeros al igual que los polímeros son macromoléculas formadas por la unión covalente de pequeñas unidades moleculares llamadas meros, los cuales han sido obtenidos mediante un proceso de polimerización a partir monómeros. Las propiedades del biopolímero afectan a su grado de biodegradación, estos factores son:

- Cristalinidad
- Temperaturas de fusión y transición vítrea
- Peso molecular
- Su secuencia de distribución (al azar, en bloque...)
- Presencia de monómero residual o aditivos.

El desarrollo de los biopolímeros ha sido muy amplio y dentro de este grupo de biomateriales más utilizados se encuentran los sintéticos como el ácido poliláctico (PLA), ácido poli glicólico (PGA), ácido poli (láctico-co-glicólico)(PLGA), así mismo poli ϵ -caprolactona (PCL), alcohol polivinílico (PVA), y el polihidroxibutirato (PHB), que son una familia de poliésteres alifáticos usados frecuentemente en ingeniería de tejidos, así mismo se encuentran polímeros naturales como el quitosano, colágeno, gelatina, fibrina y agarosa (Barbucci, 2008; Calvo Santo-Rosa, 2013; Sultana, 2013; Tan et al., 2013)

3.1.1.1 Quitosano

El quitosano es una forma desacetilada de la quitina componente principal de los exoesqueletos de crustáceos como camarones, cangrejos y langostas, y el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa (Logithkumar et al., 2016; Muxika et al., 2017; Silva et al., 2012). Es un polímero de origen natural con una estructura lineal que consiste en enlaces $\beta(1-4)$ glicosídicos enlazados con residuos de D-glucosamina con un número variable posicionado al

azar de grupos N-acetil-D-glucosamina (NAG) como se muestra en la figura 1 (Pillai et al., 2009). Cuando el número de NAG es mayor al 50% se trata de quitina, y cuando el número de N-glucosamina es mayor al 50% se trata de quitosano. Las principales características del quitosano incluyen el grado de desacetilación (varía entre 50-95%) y su peso molecular (Rohl et al., 1991).

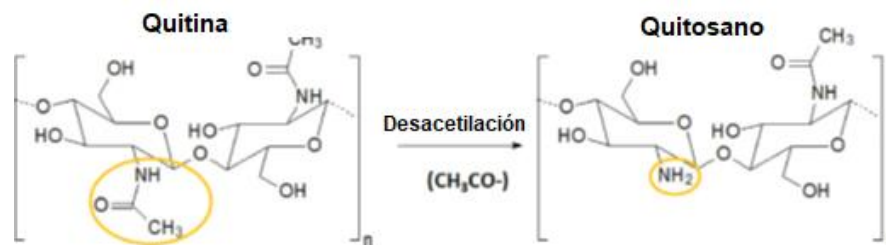


Figura 1. Estructuras químicas de la quitina y el quitosano. (Muxika et al., 2017)

El quitosano se caracteriza por sus propiedades bioactivas, biodegradables, antibacteriales y biocompatibles, adicionalmente posee una superficie de carácter hidrófilo. Un rol del quitosano en ingeniería de tejidos es la adhesión celular, proliferación y diferenciación de los osteoblastos y su mineralización (Aranaz et al., 2009; Di Martino et al., 2005; Logithkumar et al., 2016; Saravanan et al., 2016; Şenel & McClure, 2004; Seol et al., 2004). Solamente, la estructura de quitosano totalmente desacetilado es cristalina, los valores inferiores poseen una estructura semi cristalina.

El quitosano es soluble en ácidos orgánicos e inorgánicos (pK_a 6.5) y es insoluble en soluciones neutras y alcalinas (Illum et al., 2001). Dependiendo del ácido usado, se pueden formar conjugados de quitosano, esto genera un complejo que combina las propiedades del quitosano y el ácido usado.

La ventaja principal del uso del quitosano es la facilidad de procesamiento para la obtención de diferentes formas como geles, micropartículas, nanopartículas, nano fibras, andamios entre otros (Deepthi et al., 2016)

3.1.1.2 Ácido Poliláctico

El PLA es uno de los polímeros sintéticos más ampliamente utilizados en el campo biomédico debido a su biocompatibilidad y biodegradación, presenta una estructura hidrofóbica lineal que confiere un hilado excelente. Se degrada por hidrólisis no enzimática y sus bioproductos son eliminados a través del metabolismo celular. También ha sido utilizado debido a su quiralidad (L y D-ácido láctico), esto permite sintetizar PLA con diferentes estereoregularidades, como se muestra en la figura 2, las cuales influyen las propiedades fisicoquímicas, mecánicas, térmicas y sus características de degradación (Liu et al., 2017a; Santoro et al., 2016)

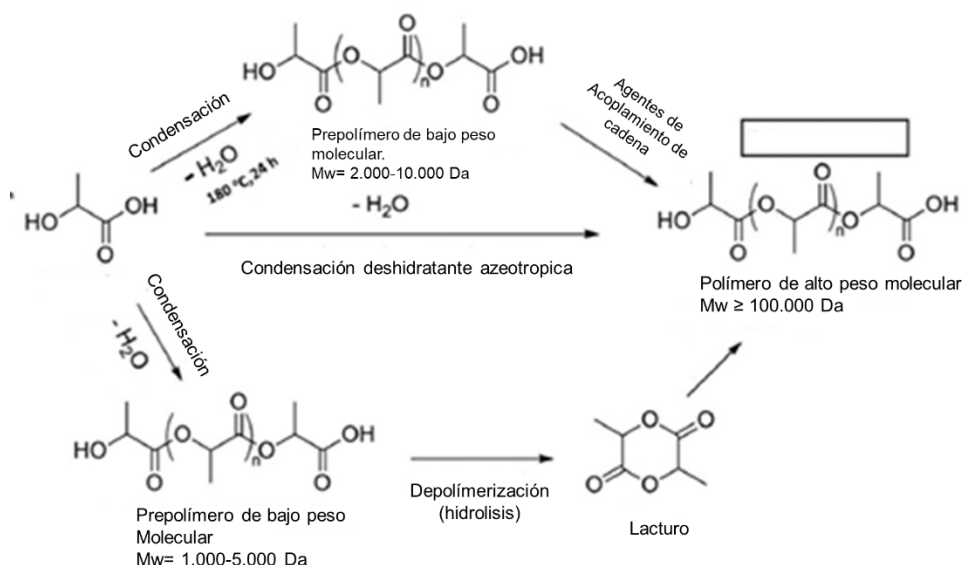


Figura 2. Métodos de síntesis del PLA (Ghalia & Dahman, 2017)

3.2 ANDAMIOS POLIMERICOS

Los andamios son estructuras porosas que proporcionan una conexión entre dos tejidos aislados y permiten el transporte de las células y moléculas al interior de los tejidos para promover su regeneración. El principal papel de los andamios es proveer un sustrato temporal en el cual las células se puedan adherir a la superficie y promover el crecimiento celular de estas o del tejido circundante a través de su estructura.

Inicialmente los andamios deben soportar la migración y proliferación celular y posteriormente deben permitir el intercambio de nutrientes como oxígeno y glucosa para garantizar la vida de las células, además deben proveer el marco inicial para que las células puedan soportar las condiciones de carga naturales en los tejidos u órganos (Moreno G, 2011).

3.2.1 TIPOS DE ANDAMIOS

Los andamios generalmente se clasifican en tres tipos que se describen a continuación:

Fibrosos: La estructura y diámetro de la fibra pueden afectar el comportamiento celular y el tamaño de poro de la matriz fibrosa regula la organización celular. Este tipo de andamios pueden imitar fácilmente la matriz extracelular nativa que consiste en proteínas fibrosas en nano escalas estructurales y adhesivas como el colágeno, elastina, fibronectina y laminina. Este método puede generar fibras alineadas y al azar dependiendo de su sistema de recolección (Liu et al, 2017)

Porosos: Este tipo de andamios proveen un área de superficie grande para la adhesión celular, son efectivos para su crecimiento y la fijación de tejidos funcionales (la Carrubba, Pavia, Brucato, & Piccarolo, 2008)

Hidrogeles: Compuestos por al menos dos componentes (Un sólido coloidalmente dispersado con cadenas largas y ramificadas y un líquido dispersante) funcionan como soportes celulares, apoyando el crecimiento celular (Roldán Vasco et al., 2016).

3.2.2 TECNICAS DE OBTENCIÓN DE ANDAMIOS

3.2.2.1 LIOFILIZACIÓN (FREEZE-DRYING)

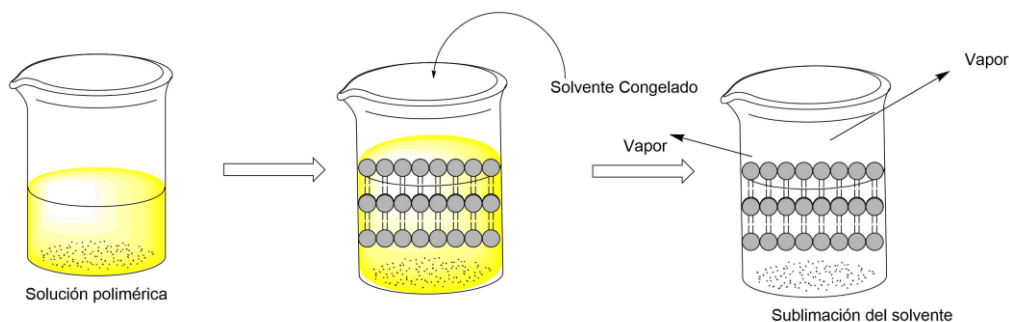


Figura 3. Esquema de la técnica de liofilización.

Consiste en la sublimación del solvente en disoluciones congeladas de polímero bajo una disminución de presión (vacío) y temperatura controlada (Llanos Galvis Isabel Cristina, 2015). Con este método se obtienen andamios con porosidad y tamaño de poro variable. Se realiza una solución con un disolvente y el polímero seleccionado para posteriormente realizar la liofilización de la solución que genera la sublimación del solvente como se evidencia en la figura 3. Mediante esta técnica se obtienen andamios altamente porosos (Sandonis O, 2015).

3.2.2.2 EMULSIFICACIÓN/LIOFILIZACIÓN (EMULSIFICATION/ FREEZE DRYING)

Se crea una emulsión de una solución polimérica (en un disolvente orgánico) mezclado con agua y se enfría rápidamente la emulsión para bloquear la estructura en estado líquido y retirar el disolvente y el agua mediante liofilización. Se obtienen polímeros sólidos con porosidades de 90-95%. Como desventaja podría plantearse la estructura de poro cerrado en la matriz, la cual impide la proliferación y migración celular (Roldán et al., 2016).

3.2.2.3 LIXIVIADO DE PARTICULAS (PARTICULATE LEACHING)

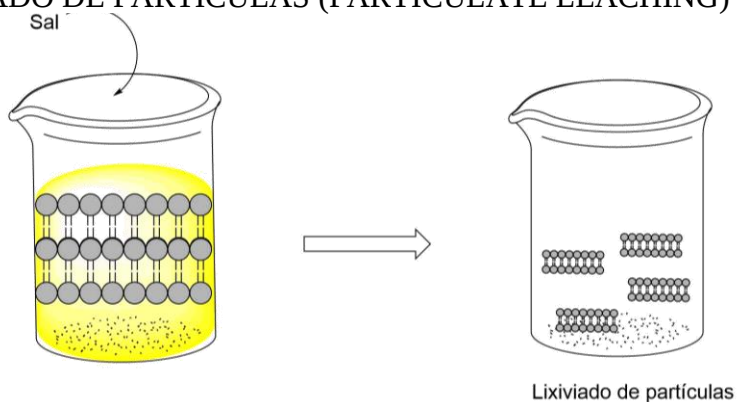


Figura 4. Esquema de la técnica de lixiviado de partículas.

Se basa en la dispersión de minerales o partículas orgánicas (agente porógeno) en una solución de polímero como se muestra en la figura 4, esta dispersión se realiza usando separación

de fases para producir estructuras porosas, pero tiene desventajas como el posible uso de disolventes tóxicos (Zeng et al., 2016).

3.2.2.4 ESPUMADO POR GAS (GAS FOAMING)

Los polímeros moldeados pueden ser presurizados con un gas como CO₂ hasta que esté saturado. La liberación de presión resulta en crecimiento y nucleación de burbujas dentro del material, estas burbujas alcanzan hasta 100 micrómetros. Se presenta un problema en este tipo de técnica y es que no siempre se alcanza alta interconectividad de poros, por eso se suele combinar con otra técnica como la de lixiviación de partículas para mejorar este aspecto (Sandonis O, 2015).

3.2.2.5 MOLDEADO POR FUSIÓN (MELT MOLDING)

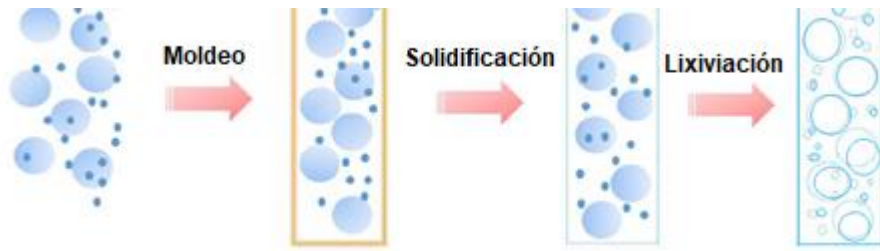


Figura 5. Esquema de la técnica de moldeo por fusión (Jitphuthi, Tangtrakulwanich, & Meesane, 2017)

Se introduce un porógeno, como gelatina en un molde para posteriormente verter el polímero en forma de polvo en dicho molde. Tras verter el polímero, se calienta el molde por encima de la temperatura de fusión de este y cuando se obtiene una mezcla solidificada de esta, se separa del molde y se introduce en un medio en el cual el porógeno es soluble y puede ser eliminado como se muestra en la figura 5. Mediante este método, se puede obtener andamios con formas, porosidad y tamaños de poros distintos (Sandonis O, 2015).

3.2.2.6 SEPARACIÓN DE FASES (PHASE SEPARATION O FREEZE DRYING)

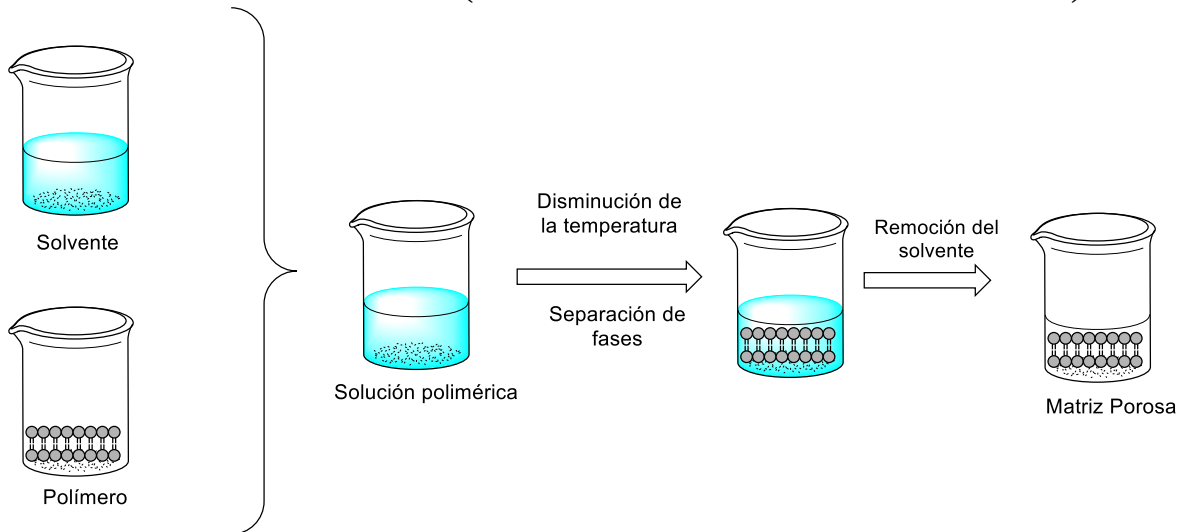


Figura 6. Esquema del procedimiento de la técnica de separación de fases

Es un método ampliamente utilizado para la obtención de andamios porosos, se consigue disolviendo el polímero en el disolvente, posteriormente se disminuye la temperatura controladamente de la disolución hasta producir una separación de fases líquido-líquido, y posteriormente se disminuye la temperatura hasta que se genera una solidificación de los componentes para obtener un sólido bifásico como se muestra en la figura 6, de esta manera el disolvente solidificado es eliminado mediante un proceso de sublimación, transformándose el espacio ocupado inicialmente por el disolvente en poros. (Sandonis O, 2015).

Mediante el ajuste de la concentración del polímero, usando diferentes solventes o variando la velocidad de enfriamiento, la separación de fases puede ocurrir a través de diferentes mecanismos, lo cual resulta en la formación de estructuras con diferentes morfologías. Los tamaños de poro dependen de la tasa de crecimiento de los cristales de hielo durante el proceso (Roldán et al., 2016).

3.2.2.7 IMPRESIÓN 3D

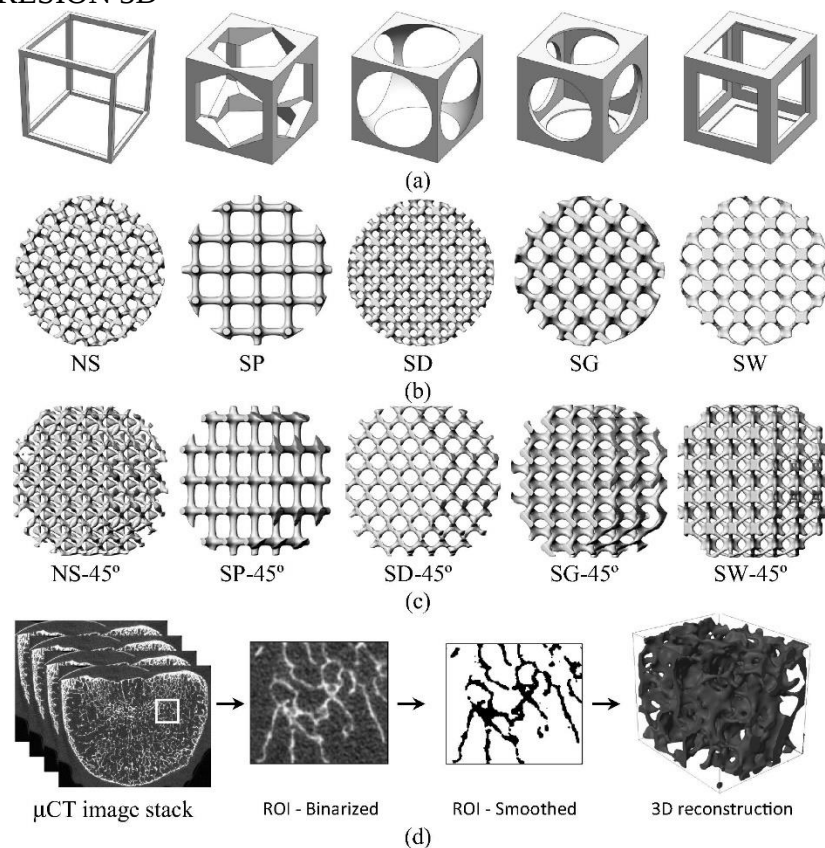


Figura 7. Diferentes unidades de andamios porosos obtenidos de operaciones Boolean de estándar primitivo. Tomado de (Gómez, Vlad, López, & Fernández, 2016)

Esta técnica combina el diseño mediante software con la tecnología de impresión, el cual permite reproducir geometrías y arquitecturas bien definidas en 3 dimensiones como se muestra en la figura 7 de tal manera que se provee una excelente plataforma para el estudio del efecto de las modificaciones en arquitectura de estos en su respuesta con células, analizando su efecto en respuestas inflamatorias y propiedades mecánicas. Debido a las estructuras obtenidas, la literatura ha reportado propiedades mecánicas significativamente elevadas en comparación con otras

técnicas como lixiviado de partículas, espumado por gas o moldeado por fusión. (Almeida et al., 2014; Serra et al., 2013)

3.2.2.8 ELECTROHILADO (ELECTROSPINNING)

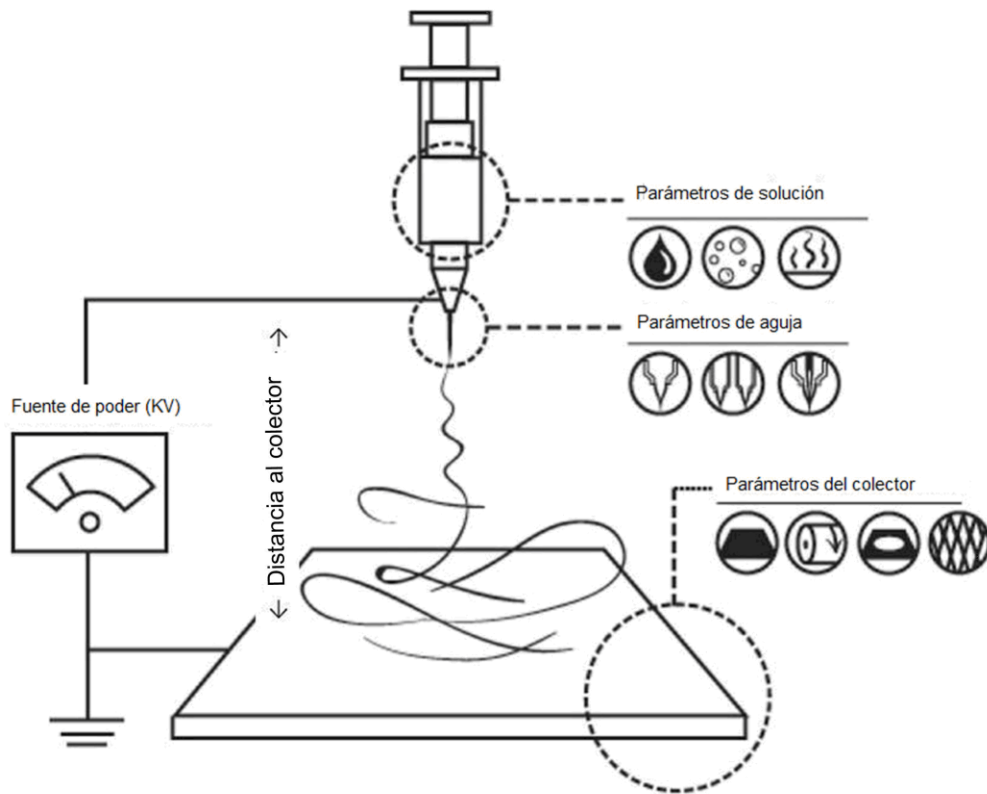


Figura 8. Esquema de la conformación en el equipo de electrohilado vertical tomado de (Sabino, Loaiza, & Rezende, 2017)

Este proceso ha ganado popularidad pues se pueden obtener andamios fibrosos tanto de polímeros sintéticos como naturales, con altas porosidades y una amplia distribución de diámetros de poro, una alta relación de volumen por superficie de área y similitudes morfológicas con las fibras de colágeno natural (Los diámetros de las fibras obtenidas están en el intervalo de varios micrómetros hasta menos de 100 nanómetros). Este proceso es una técnica de hilado de fibras accionado mediante un campo electrostático de alto voltaje usando una solución polimérica como se muestra en la figura 8. Los parámetros del proceso incluyen el flujo, potencial eléctrico generado y la distancia entre la punta emisora y el colector “air gap”. Los andamios obtenidos por esta técnica, poseen una estructura similar a la de la matriz extracelular, por esto son una promesa en la ingeniería de tejidos (Roldán et al., 2016).

3.3 PELICULAS POLÍMERICAS

Las películas poliméricas actúan como agentes de barrera ante elementos del medio exterior como humedad, vapor, entre otros. Sin embargo, permiten una permeabilidad parcial para intercambio de fluidos con el ambiente en el caso que se diseñe para este fin. Las propiedades de cada película varían de acuerdo con los polímeros y condiciones de obtención.

3.3.1 TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE PELICULAS DE QUITOSANO

3.3.1.1 METODO DE EVAPORACIÓN DE SOLVENTE (SOLVENT CASTING METHOD)

El método de evaporación de solvente es una metodología tradicional para la obtención de películas también llamado método húmedo. Consiste en la disolución del polímero en un solvente (ácido acético diluido para el quitosano) en un recipiente, el solvente debe ser evaporado completamente en un rango de temperaturas entre 20-50 °C. Este método es el más sencillo para obtener láminas de materiales poliméricos. Algunas de las aplicaciones incluyen ingeniería de tejidos, apósitos para heridas (wound dressing), matrices de liberación de medicamentos y empaque de alimentos (Balau et al., 2004; Dutta et al., 2009).

3.3.1.2 METODO TERMO MECANICO (THERMO MECHANICAL METHOD)

El método termo mecánico también llamado método seco, consiste en un proceso de fundición del polímero en polvo. En este método el quitosano es tratado previamente con plastificantes. Sin embargo, este polímero tiene una baja estabilidad térmica por lo cual, se degrada por debajo del punto de fusión. Este método es sencillo y deseable en muchos procesos de manufactura, en el caso particular del quitosano es bastante complicado por lo que se usa el método húmedo con mayor frecuencia (Gadgey & Sharma, 2017).

Existen reportes de la modificación del proceso usando el glicerol como plastificante no volátil que se mezcla con quitosano y ácido acético. Las películas obtenidas por este método se obtienen mediante el proceso de moldeado por compresión. Este método de obtención es más amigable con el medio ambiente debido a que no usa solventes y deseable debido a que es más rápido respecto al método húmedo a escalas industriales (Epure et al., 2011).

3.4 ESTADO DEL ARTE

3.4.1 ANDAMIOS DE PLA

Los polímeros basados en poliésteres alifáticos son uno de los más importantes materiales biodegradables debido a su compatibilidad y degradabilidad biológica. Debido a la facilidad en su síntesis y disponibilidad comercial estos materiales han sido usados ampliamente (Anju et al., 2020). Particularmente, el ácido poliláctico (PLA) es un poliéster con una estructura lineal hidrofóbica, el cual no presenta toxicidad donde sea implantado, el polímero posee dos configuraciones de isómeros las cuales son levógira (PLLA), dextrógira (PDLA) y su mezcla racémica (PDLLA) (Gunatillake et al., 2003; Liu et al., 2017b).

Algunas propiedades del PLA como es la hidrofobicidad intrínseca del material lo hacen poco viable para interactuar con diversas matrices ricas en agua, para ello se han desarrollado diversos estudios donde se usan recubrimientos con quitosano para mejorar su compatibilidad en dichas matrices. Estudios como el desarrollado por Zeng y otros, usaron una combinación de técnicas como moldeo por transferencia de resina asistida por vacío (VARTM), separación de fases, extracción de solvente y lixiviación de partículas para la obtención de andamios de PLA que posteriormente, se les realizó un recubrimiento con quitosano. Para controlar la porosidad y morfología de estos, se estudiaron el tamaño de partículas de NaCl y las diferentes concentraciones de PLA. Se observó una estructura de poros abiertos e interconectados, que generó una mejora significativa de la afinidad de este material en matrices ricas en agua, adicionalmente, propiedades mecánicas como resistencia a la compresión de los andamios recubiertos respecto a los andamios sin recubrimiento. Por lo tanto, se espera que los materiales recubiertos tengan una mejor compatibilidad dentro del cuerpo (Zeng et al., 2016).

Para buscar mejorar sus propiedades mecánicas o biológicas se buscan diferentes métodos de obtención de los andamios. Uno de ellos ha sido reforzar los andamios con el mismo material bajo una técnica similar de obtención de separación de fases sólido-líquido y posterior liofilización, con tres tipos de refuerzos diferentes llamados “*Porous Shell*”, “*Solid Shell*” y “*Beam*” respecto a un patrón que fue llamado mono andamio, en la figura 9 se ilustra el método de obtención de los andamios antes mencionados. El módulo de compresión y el esfuerzo máximo de compresión mejoran en los andamios reforzados respecto al mono andamio siendo el andamio reforzado por “*Beam*” el que presenta valores de propiedades más altos. Los andamios reforzados permitieron el incremento de la adherencia y proliferación del grupo de células (MC3T3-E1) respecto al andamio mono estructurado que presentó una menor adherencia celular (J.-E. Park & Todo, 2011).

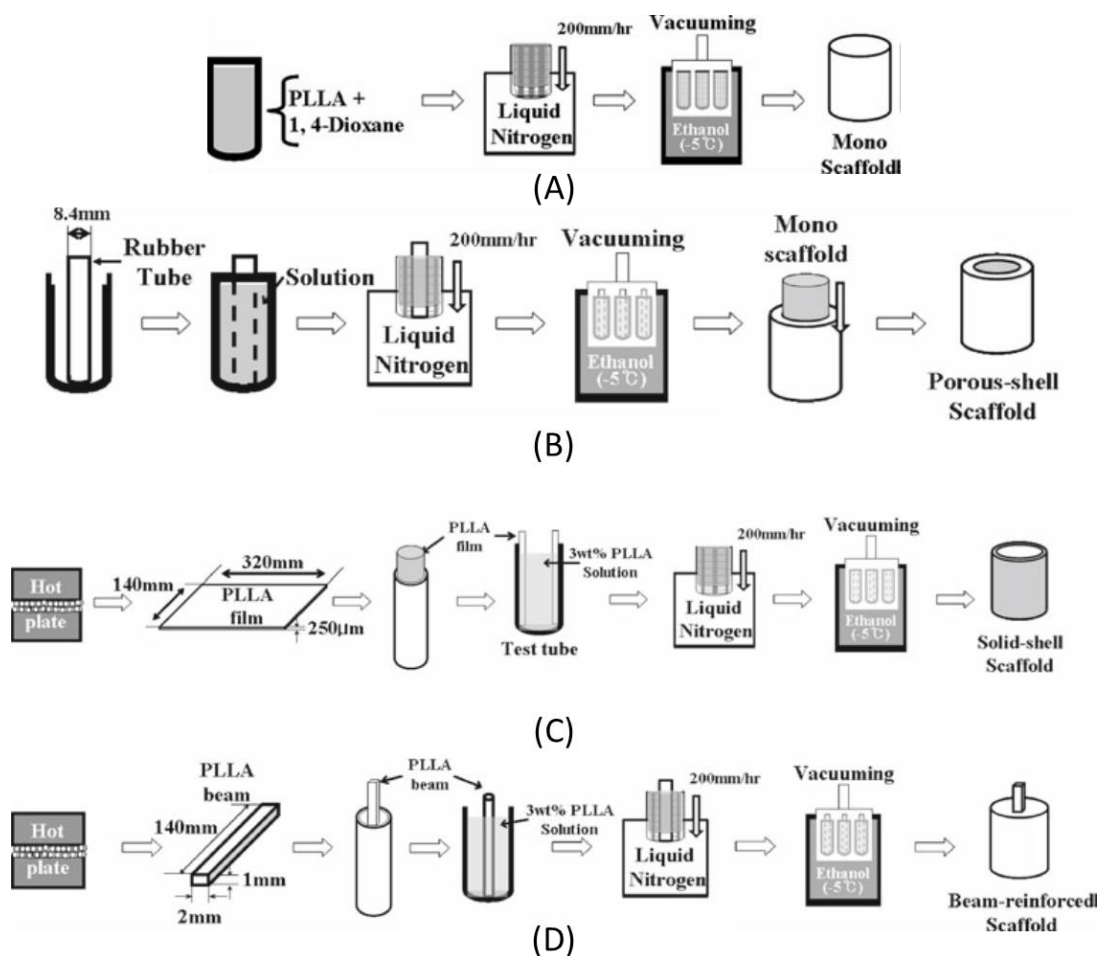


Figura 9. A) Métodos de separación de fases solido-líquido y liofilización. Fabricación de andamios reforzados B) “Porous Shell” C) “Solid-Shell” y D) “Beam”. Tomado de (J.-E. Park & Todo, 2011)

Los andamios de PLA presentan buena resistencia a compresión, sin embargo, la mineralización de estos no es tan eficiente cuando se realizan pruebas de biocompatibilidad. Para mejorar esta limitación biológica se buscan elementos que le confieran propiedades bioactivas. En la técnica de impresión 3D, se observa la fabricación de andamios compuestos de PLA (95%) y PEG (5%) con adición de partículas de biovidrio de fosfato de calcio biodegradable (G5) en una estructura ortogonal. También, se fabricaron andamios de quitosano con configuración diagonal y ortogonal. Ambas matrices PLA y quitosano evaluaron la respuesta monocitos/macrófagos evidenciando que la base de cada material induce la producción de diferentes sustancias. El PLA induce el aumento de algunas interleucinas como lo son IL-6, IL-12/23 e IL-10; mientras que el quitosano induce el aumento de la secreción de la TNF-alfa. Esto evidencia por qué la compatibilidad química en el material, las propiedades superficiales y la geometría de los andamios en la respuesta inmune al material. (Almeida et al., 2014).

Otra técnica en la cual se ha realizado la mineralización de andamios de PLA ha sido en la técnica de electrohilado, donde se han realizado andamios de PLLA y gelatina que se depositaron sobre una capa de PDLA previamente electrohilada y orientada en diferentes direcciones (0°, 15°, 30°, 45° y 90°). Posteriormente a la obtención de los andamios compuestos se realizó una sinterización de hidroxiapatita (HA). La orientación de las fibras tiene un pequeño efecto en las

propiedades mecánicas a compresión mejorando para una orientación de 30°. Sin embargo, el aumento de los tiempos de mineralización resulta en el aumento de las propiedades mecánicas. La adición directa de micropartículas de HA no tiene un efecto significativo en las propiedades mecánicas, pero sí tienen un efecto en la deposición de minerales en los andamios de PLLA/Gelatina (Andric et al., 2012).

El PLA, también, se ha utilizado para la generación de andamios mediante electrohilado, experimentando soluciones con diferentes concentraciones de PLA en cloroformo y variando parámetros como distancia al colector y voltaje, se ha encontrado una dependencia importante en la morfología del andamio y la concentración o viscosidad de la solución de PLA. Por medio de SEM se ha podido determinar que las fibras obtenidas mediante este tipo de solución presentan una superficie porosa (Pero si se usa un solvente con baja presión de vapor se produciría un decremento en esta topografía) y también se presentan nano fibras, como especifican Hidalgo y sus colaboradores. Tras dos semanas de ensayos con células se observó adhesión, proliferación de estas y biocompatibilidad debido a la semejanza con la matriz extracelular demostrando potencial PLA electrohilado como andamios para la regeneración de tejidos (Hidalgo, Sojot, Arvelo, & Sabino, 2013).

Mediante la técnica de electrohilado de PLA también se han realizado mezclas con quitosano que posteriormente son sometidas a un entrecruzamiento con glutaraldehído para aplicaciones de tejido del miocárdico. La orientación de las fibras fue dispuestas al azar y alineadas, las propiedades mecánicas aumentaban a esfuerzos de tensión a medida que la proporción de PLA de la mezcla aumentaba, encontrando la relación óptima de 7:1 de PLA-Quitosano respectivamente. La orientación de las fibras dispuestas en el mismo sentido aumento significativamente las propiedades mecánicas respecto a las fibras orientadas al azar, también, este tipo de fibras promovió las interacciones entre las células y el andamio tanto como la síntesis de la matriz extracelular (Liu et al., 2017b).

Mediante la técnica de lixiviado de partículas se ha realizado una mezcla de PLA y quitosano, donde evidenciaron que este tipo de material compuesto tenía una tendencia hidrofílica con facilidad para moldeo y posibilidad de realizar andamios tridimensionales. La velocidad de degradación de este material compuesto fue menor respecto al PLA (Li et al., 2003).

Para la obtención de materiales compuestos biodegradables a base de PLA y quitosano se han realizado combinación de técnicas como extracción de solvente, separación de fases liquido-sólido y liofilización para obtener andamios porosos con una estructura regular. Estos andamios demostraron la mejora de la hidrofobicidad del material. Los resultados en fluido corporal simulado (PBS) demostraron que la adición de quitosano retrasa la degradación de los andamios compuestos al tiempo que funciona como amortiguador de la degradación ácida del PLA (Wan et al., 2007).

Mediante la técnica de lixiviado de partículas se obtienen esponjas de PLA que posteriormente se sumergen en una solución de quitosano para recubrirlas y finalmente este andamio híbrido se lleva a liofilización, evidenciando una estructura macro porosa y de poros interconectados entre las dos estructuras. Los andamios híbridos tienen una mayor capacidad para absorber agua comparado con las esponjas sin recubrimiento, particularmente estos andamios híbridos presentaron una buena adhesión, proliferación y viabilidad celular. Este estudio sugiere que los andamios obtienen las propiedades mecánicas del PLA y compatibilidad celular del quitosano (Jiao et al., 2007).

Por medio de la técnica de electrohilado de PLA se ha estudiado el efecto de diferentes solventes puros y sistemas binarios de los mismos en la obtención de andamios fibrosos. Determinando de todos los sistemas estudiados, la combinación de solventes Acetona/Dimetilformamida obtuvo la mayor obtención de fibras libre de defectos. Posteriormente, se comprobó la mejor relación de solventes siendo 60/40 v/v respectivamente. Finalmente se experimentó con la concentración de polímero en la solución, determinando que concentraciones iguales o mayores a 12.5% p/v de PLA se obtienen fibras continuas y libre de defectos (R. Casasola et al., 2014a).

3.4.2 ANDAMIOS DE QUITOSANO

El quitosano es el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa lo que ha permitido su amplio uso en diferentes campos de aplicación (Rinaudo, 2006), entre los cuales se destaca en las área de aplicaciones médicas y farmacéuticas debido a sus propiedades biológicas mencionadas anteriormente además de sus propiedades hemostáticas (mecanismo para detener procesos hemorrágicos (Behrens et al., 2014)), que se relacionan con la carga positiva del material, mientras que las membranas de los glóbulos rojos se encuentran cargadas negativamente que permite su interacción (Croisier & Jérôme, 2013; P. J. Park et al., 2004).

El quitosano puede ser degradado en condiciones in vitro e in vivo por varias proteasas y principalmente por la lisozima. Actualmente han sido identificadas 3 quitinasas humanas las cuales poseen actividad enzimática sobre el quitosano. Esta degradación genera la formación de oligosacáridos (no tóxicos), los cuales pueden ser incorporados en rutas metabólicas o desechados. Debido a que la cristalinidad es inversa a la cinética de biodegradación, cuando el grado de desacetilación disminuye, la cristalinidad aumenta y por consiguiente aumenta su resistencia a la degradación (Funkhouser & Aronson, 2007).

El colágeno a pesar de tener similitud con la matriz extracelular (ECM) y el quitosano con los glucosaminoglicanos presentes en tejidos conectivos, epitelial y óseos, no pueden ser utilizados de manera individual en aplicaciones que deban soportar cargas por sus bajas propiedades mecánicas. Debido a ello, estructuras reforzadas por polímeros sintéticos como el PLA que poseen buenas propiedades mecánicas. Se ha utilizado una malla de PLA como refuerzo de andamios en matrices de colágeno, quitosano y colágeno/quitosano con propósitos de uso en regeneración de cartílago; los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo en las propiedades mecánicas a compresión, buena porosidad y estructura de poros interconectados (Haaparanta et al., 2014).

Se encuentran reportes de andamios compuestos de colágeno/quitosano/PLA que, comparados con andamios de PLA, presentaron una morfología compuesta de fibras más numerosas, con diámetros más pequeños y los tamaños de poros obtenidos se asemejaban a los presentes en la matriz extracelular, presentando una estructura mucho más biomimética que los de PLA solamente. Finalmente, en pruebas de hemocompatibilidad reportaron que el uso de quitosano y colágeno mejoró la biocompatibilidad en relación con el uso de PLA sin adiciones (Zhu, Ma, Xian, Zhou, & Fan, 2014).

Algunos refuerzos que se han usado para mejorar estas deficiencias han sido los nanotubos de óxido de titanio (TiO₂) que al ser adicionados al quitosano con iones de Ca²⁺ ha evidenciado una alta biocompatibilidad promoviendo adhesión, proliferación y una diferenciación de osteoblastos, además de un incremento de las propiedades mecánicas a compresión de los andamios respecto a las membranas de quitosano (Shee, Ye, & Loh, 2017).

También, se ha usado un compuesto de alginato-quitosano reforzado con fosfato tricálcico beta (β -TCP) para tejido osteocondral lo que evidencia una estructura porosa interconectada, con una viabilidad celular mayor al 70% indican la no toxicidad de los andamios (Algul, Sipahi, Aydin, Kelleci, & Ozdatli, 2015).

Se ha buscado la adición de altos contenidos de nano hidroxiapatita (nHA) (75% en peso) al quitosano con tamaños de poro entre los 200-700 μm mejorando las propiedades mecánicas de los andamios debido a una excelente dispersión de las partículas para la producción de andamios de geometrías complejas (Tsiourvas, Sapalidis, & Papadopoulos, 2016). Adicionalmente, con la adición de hidroxiapatita se ha empleado montmorillonita (MMT) para la fabricación de andamios macro esféricos por la aglomeración directa de las macro esferas sinterizadas, esto generó una reducción en la tasa de degradación del quitosano, por otra parte, mejoró la hemocompatibilidad y adsorción de proteínas. Además, incremento la resistencia a la compresión en comparación con andamios de quitosano puro (Vyas, Kaur, & Thirugnanam, 2017).

La adición de otras cargas cerámicas como la diatomita en membranas de quitosano en un porcentaje de 10% aumenta la rugosidad del material, mejora el módulo de Young en un 52%, también se evidencia el aumento de actividad en el cultivo celular (Tamburaci & Tihminlioglu, 2017). También, se han realizado refuerzo a la matriz de quitosano con fibras cortas de fosfato de calcio multifásico compuesto por hidroxiapatita (HA) fosfato beta tricálcico (β -TCP) y pirofosfato de calcio que aumento el tamaño del poro, densidad, resistencia a la compresión y módulo de Young, los cuales adicionalmente tienen una bioactividad in vitro debido a la formación de láminas de fosfato de calcio en medio de fluido corporal simulado (SBF) (Mohammadi, Mesgar, & Rasouli-disfani, 2016).

También se ha estudiado para andamios inyectables, la mezcla ternaria de quitosano, tripolifosfato de sodio (TPP) y nano hidroxiapatita (nHA) aumentando la adhesión de osteoblastos a los andamios, resistencia ultima a la compresión, y se han mejorado las propiedades mecánicas debido a la disminución del tamaño de poro (Uswatta, Okeke, & Jayasuriya, 2016).

3.4.4 Estudios realizados en la Universidad del Valle

Por medio de la técnica de electrohilado se han realizado andamios de Policaprolactona (PCL) y Ácido poliláctico (PLA), por medio de los análisis de micrografías realizadas por el microscopio electrónico de barrido (SEM) se pudo observar que las fibras de PLA tenían diámetros mayores a las fibras de PCL. Estos andamios no presentaron efectos tóxicos para las células como se pudo evidenciar en el ensayo de citotoxicidad, lo que permite su posible aplicación en ingeniería de tejidos (Lozano Valencia).

Es posible obtener andamios de PLA variando sus propiedades a partir del método de obtención de estos. Por medio de la técnica de electrohilado se obtuvieron andamios flexibles, la variación de parámetros tales como la distancia entre la punta y el plato colector y la velocidad de flujo. Encontró que a menor distancia boquilla-colector se obtenían mayores diámetros de fibra permaneciendo constante la velocidad de flujo, que genera un aumento en el área superficial de contacto de las fibras, evidenciando posteriormente una mayor velocidad de degradación hidrolítica. Al variar la velocidad de flujo manteniendo constante la distancia, se obtuvo una mayor área de contacto que posteriormente evidenció un aumento en la velocidad de degradación hidrolítica, siendo un resultado coherente al ser contrastado con la literatura existente (Vidal Bolaños & Roldan Varona, 2015).

Adicionalmente por medio de la técnica de moldeo por fusión se realizaron andamios de PLA usando como agente porógeno partículas de NaCl, evidenciando por medio de microscopia electrónica de barrido una matriz de poros interconectados debido a la discontinuidad de las paredes del andamio. Para la velocidad de enfriamiento se observó que los andamios sometidos a una mayor tasa de enfriamiento presentaron una mayor pérdida de masa en el ensayo de degradación hidrolítica. Determinado posiblemente por el tipo de enfriamiento usado, debido a que adquiere una estructura amorfa que permite que el fluido se introduzca con mayor facilidad respecto a una estructura cristalina que su empaquetamiento disminuye la capacidad de introducirse del fluido (Vidal Bolaños & Roldan Varona, 2015).

En la elaboración de andamios de PLA por las técnicas de electrohilado (andamios flexibles) y moldeo por fusión (andamios rígidos). Algunos de estos andamios se les realizó un recubrimiento de quitosano por medio de impregnación para evaluar el efecto del recubrimiento sobre los mismos. Se observó en los andamios rígidos que el tamaño promedio de poro era mayor al tamaño del agente porógeno, posiblemente debido a una falta de dispersión homogénea de las partículas lo que permitió su aglomeración y formando poros de mayor tamaño al esperado. Se evidenció que a mayor cantidad del agente porógeno se obtienen mayores porcentajes de porosidad en todas las condiciones estudiadas para los andamios rígidos (Maturana, 2016).

Por otra parte, en los andamios flexibles evidenció que el diámetro de las fibras formadas aumenta a medida que se disminuye la distancia entre la boquilla y el colector. Los andamios rígidos y flexibles mostraron una adhesión, maduración y crecimiento adecuado de células óseas. El recubrimiento de quitosano evidenció un aumento en la formación de la matriz extracelular por lo cual los andamios recubiertos tienen un mayor potencial en su aplicación en ingeniería de tejidos (Maturana, 2016).

Otro polímero ampliamente usado en el electrohilado es el alcohol polivinílico (PVA), donde se ha realizado una combinación de Quitosano/PVA con adición de óxido de grafeno (GO) para la obtención de andamios, se evidenció que cantidades grandes de esta adición generaba

irregularidades, discontinuidades y fibras de mayor diámetro. Se observó que el valor máximo de óxido de grafeno donde se encuentran sus propiedades mecánicas óptimas es de 0.5% debido a que adiciones mayores evidenciaban un decremento de sus propiedades mecánicas y adicionalmente presentaron toxicidad para ensayos en artemia salina (Ortiz Sarasty & Pretel Córdoba, 2017).

También, se han realizado andamios de quitosano con adición de óxido de grafeno mediante las técnicas de electrohilado y liofilización. Las láminas obtenidas mediante electrohilado sin adición de plastificante presentaron alta rigidez, por lo cual se usó como plastificante sorbitol. Las adiciones de GO aumentaron las propiedades mecánicas a tracción. Los andamios obtenidos por liofilización mostraron una estructura altamente porosa e interconectada que aumentaba su homogeneidad con poros uniformes y regulares a medida que se aumentaba la cantidad de GO. Adicionalmente en el ensayo de artemia salina no evidenció toxicidad (Villamarin Cabal & Silva Porras, 2017).

Adicionalmente, se han realizado andamios electrohilados y películas de quitosano, alcohol polivinílico y óxido de grafeno. La adición de óxido de grafeno en las películas generó un aumento de la resistencia a la tensión, rugosidad y disminución en la velocidad de degradación de estas. Adicionalmente se evidenció la deposición de una ligera capa de fosfato cálcico sobre la superficie del material mostrando un comportamiento bioactivo. Para los andamios electrohilados se evidenció una formación de estructura fibrilar adecuada, también se evidenció el aumento en la velocidad de degradación como se mencionó para las películas del mismo material. El aumento en el porcentaje de GO parece retardar la degradación del material incrementando su respuesta inflamatoria por lo que podrían ser aplicados en ingeniería de tejido óseo (Tamayo Marin et al., 2018).

4. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Desde hace algunos años, el ácido poliláctico (PLA) ha sido usado en diferentes tipos de andamios para aplicaciones médicas debido a sus propiedades mecánicas, además, se ha considerado bioabsorbible y biodegradable, esto permite que sea asimilado por sistemas biológicos. Debido a lo anteriormente mencionado, este material ha sido ampliamente estudiado individualmente, como mezcla de polímeros, copolimerización, con adiciones minerales, entre otras.

En este orden de ideas, el ácido poliláctico (PLA) es un excelente material debido a sus propiedades mecánicas a pesar de que sus propiedades biológicas son inferiores al compararlas con el quitosano. Por otro lado, el quitosano (CS) es un material deseable debido a que es fácilmente asimilado en diversos sistemas biológicos (mamíferos, plantas, suelos, entre otros), sin embargo, es un material que presenta bajas propiedades mecánicas. Por esta razón, se ha buscado mejorar el comportamiento mecánico del quitosano con diferentes materiales poliméricos y/o cerámicos por medio de diversas técnicas.

De acuerdo con lo anterior, se plantea el desarrollo de un material compuesto a partir de andamios de ácido poliláctico obtenidos por medio de electrohilado dentro de películas de quitosano obtenidas mediante el método húmedo de evaporación de solvente, esto permitió evaluar el posible efecto sinérgico en las propiedades mecánicas con una disminución mínima de las propiedades biológicas del compuesto respecto a sus componentes.

5. METODOLOGÍA

5.1. MATERIALES Y EQUIPOS.

5.1.1. Obtención de Andamios Electrohilados

Para la elaboración de los andamios se utilizó una resina biodegradable de Ácido poliláctico (PLA, M_w :112600g/mol) de la referencia INGENIO 2002D de la empresa Natureworks para extrusión. En cuanto a los disolventes, se utilizaron cloroformo estabilizado con etanol puro (CF, M_w =119.38g/mol) de la empresa PanReac Química S.L.U, acetona (AC, M_w =58.08g/mol) para análisis de la empresa Merck y N, N-Dimetilformamida (DMF, M_w =73.090g/mol) espectralizada de la empresa Fisher Chemical.

Para obtener los andamios electrohilados se hizo uso de un equipo de configuración vertical como se muestra en la figura 10 que utiliza una fuente de voltaje modelo ES30 de la empresa Gamma High Voltage Research, de la cual salen dos electrodos los cuales se conectan a la boquilla y al colector fijo. La velocidad de flujo de la solución era controlada mediante una bomba de referencia BS-8000 de la marca Braintree Scientific.



Figura 10. Equipo de electrohilado.

5.1.2. Obtención de películas

En el proceso de elaboración de películas, se utilizó quitosano (CS, M_w : 50000-190000g/mol) de bajo peso molecular referencia 448869 de la empresa Sigma Aldrich y Ácido Acético glacial (AcOH, M_w =60,05g/mol) de la empresa Honeywell Fluka.

La obtención de películas de quitosano y del material compuesto se realizó usando el método de evaporación de solvente para el cuál se hizo uso de un horno de convección por gravedad referencia 40GC, de la marca Quincy Lab, Inc.

5.2. MÉTODOS

5.2.1. CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS.

Viscosimetría capilar

Se utiliza esta técnica para determinar el peso molecular promedio viscoso M_v del quitosano usando como referencia las normas ASTM D445 (ASTM, 2019) y D446 (ASTM, 19 C.E.) para esto se utilizó un viscosímetro capilar Ubbelohde 0C, el cual se sumerge en un baño de agua a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Se vierte 12mL de solución en el capilar del viscosímetro a través de una propipeta, se lleva la solución 1cm por encima de A posteriormente se retira la propipeta y se deja fluir la solución, se registran los datos de tiempo que la solución tarda en descender desde A hasta B como se muestra en la figura 11. El M_v se calcula mediante la ecuación de Mark–Houwink que describe la dependencia de la viscosidad intrínseca de un polímero y su masa molecular promedio como se describe en la siguiente ecuación.

$$[\eta] = K * M_v^a$$

Ecuación 1. Viscosidad intrínseca.

Donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca, K y a son constantes que dependen de la naturaleza del polímero y el solvente a una temperatura determinada (IUPAC, 2008).

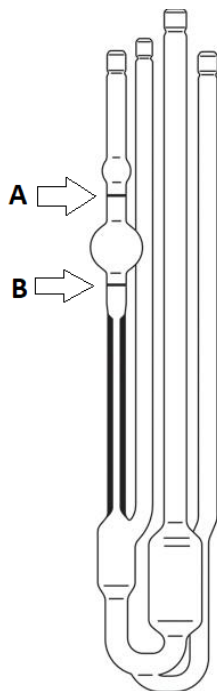


Figura 11. Viscosímetro capilar Ubbelohde. Tomado de Xylem Analytics (Xylem's analytics, n.d.)

Para el quitosano se preparó una solución acuosa de Ácido Acético 0.3M (CH_3COOH) y Acetato de sodio 0.2M (CH_3COONa), posteriormente en matraces aforados de 100mL se disponen diferentes concentraciones de quitosano (1×10^{-5} , 3×10^{-5} , 5×10^{-5} , 7×10^{-5} y 9×10^{-5} g/mL). Los valores reportados de las constantes k y a en el solvente a 25°C son 0.074 mL/g y 0.76 respectivamente (Rinaudo et al., 1993).

5.2.2. OBTENCIÓN DE ANDAMIOS ELECTROHILADOS.

5.2.2.1.OBTENCIÓN DE ANDAMIOS ELECTROHILADOS DE PLA.

5.2.2.1.1 Andamios electrohilados de PLA con cloroformo.

El polímero de PLA se disuelve en cloroformo quedando en concentraciones de 8%, 10%, 12%, 15% y 20%; esta solución polimérica se introduce en el sistema del equipo de electrohilado, que consiste en la introducción de dicha solución en una jeringa de 10 mL, la cual se adapta a un sistema de bombeo con una manguera de polipropileno, acoplada a la boquilla del equipo en acero inoxidable de 0.8 mm de diámetro. Se realizan corridas para determinar los parámetros ideales. Primero, se variaron los voltajes cambiando dos unidades en los rangos de 12 a 22 kV. Segundo, se varió la velocidad de flujo, como 0.8mL/h, 1mL/h, 2mL/h, 4mL/h y 8mL/h. Tercero, se varió la distancia de la punta emisora y el colector, entre 13, 15 y 17 cm.

5.2.2.1.2 Andamios electrohilados de PLA con mezcla Dimetilformamida-Acetona.

El Ácido Poliláctico se disolvió en un sistema binario de solventes para obtener una concentración del polímero de 12.5% (p/v), este sistema estaba compuesto por Acetona y Dimetilformamida a diferentes proporciones (v/v). Para la preparación de todas las soluciones los solventes fueron adicionados a una cantidad de polímero previamente pesada en un matraz aforado. Estas soluciones fueron realizadas mediante agitación magnética a una temperatura de 80 °C durante aproximadamente 16 h.

La solución polimérica se introdujo en una jeringa de 10 mL, la cual se bombeó por medio de una manguera de Nylon de 6 mm de la marca Parker acoplada a la boquilla del equipo de electrohilado en acero inoxidable de 0.8 mm de diámetro; esta se colocó en una bomba para controlar el flujo, la cual corresponde a 2 mL/h. La distancia entre la punta emisora y el colector fue 15 cm. El proceso de electrohilado fue realizado a dos diferentes voltajes generados de 12kV y 22kV. La concentración de la solución polimérica se mantuvo en 12.5% (p/v) a diferentes relaciones de solventes de Acetona y Dimetilformamida de 3:7, 2:3, 1:1, 3:2, 7:3 respectivamente. Finalmente, la mejor relación de solventes se recolectaron los andamios a tres diferentes tiempos (30, 45 y 60 min). Los andamios se almacenan en la lámina de aluminio a temperatura ambiente en un desecador.



Figura 12. Metodología para estudio con solventes.

5.2.2.2 CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS DE PLA

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La inspección morfológica de los andamios de PLA se realizó mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL modelo JSM 6490LV. Todas las muestras fueron recubiertas con una película fina de oro debido a que los materiales poliméricos cuentan con una baja conductividad eléctrica. Todas las muestras fueron ensayadas a un voltaje de 20kV por medio de electrones secundarios que proporcionan información topográfica de la muestra.

5.2.3. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO.

El quitosano se disolvió en una solución de ácido acético glacial en agua destilada a una concentración de 2% (v/v), con el propósito de obtener una concentración del polímero de 0.5% (p/v). Para la preparación de las películas el solvente fue adicionado a una cantidad de polímero previamente pesada en un matraz aforado. Estas soluciones fueron realizadas mediante agitación magnética a temperatura ambiente durante aproximadamente 16h.

Se depositó 200 mL de la disolución de quitosano en ácido acético en moldes de caucho de silicona. Se deja evaporar el solvente durante 24h, posteriormente se colocan dentro del horno a 35 °C durante 24h, finalmente se aumenta la temperatura a 38 °C durante 24 h, esto con el propósito de aumentar la temperatura progresivamente generando una evaporación controlada del solvente y evitar la formación de discontinuidades dentro de la película final. Las películas se almacenan a temperatura ambiente en un desecador.

5.2.4. OBTENCIÓN DEL MATERIAL COMPUESTO

La obtención del material compuesto se realizó a partir de los andamios electrohilados de PLA y la solución de quitosano. De este modo, se prepararon 200 mL de solución de quitosano para la elaboración de un andamio compuesto, se vertió la mitad de la misma en un molde de caucho siliconado y sobre dicha solución se depositó un andamio electrohilado de PLA, posteriormente se agregó el resto de la solución con el objetivo de mantener el andamio electrohilado lo más centrado posible dentro del compuesto. Las películas compuestas se dejaron reposando a temperatura ambiente durante 24 horas, posteriormente se llevaron a un horno con temperatura de 35 °C durante 24 horas y finalmente se aumentó la temperatura a 38 °C por otras 24 horas. El proceso de evaporación del solvente se realiza de la misma manera respecto a las películas de quitosano y finalmente la disposición de almacenamiento es igual a los andamios y películas.

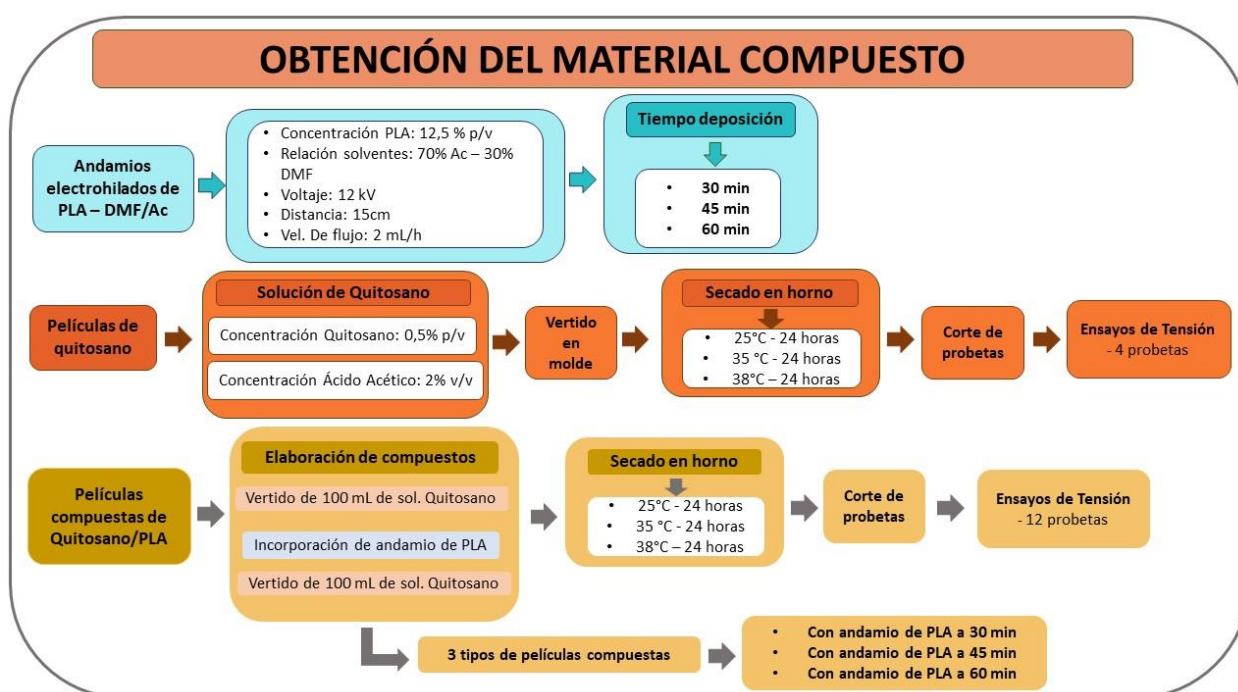


Figura 13. Metodología para obtención de películas compuestas.

5.2.4.1 CARACTERIZACIÓN DE PELICULAS DE QUITOSANO Y MATERIALES COMPUESTOS

Acondicionamiento de las películas

Las películas de quitosano y los materiales compuestos se cortaron y acondicionaron para el ensayo de tensión de acuerdo con la norma ASTM D6287. Las dimensiones de las probetas fueron acordes a la norma ASTM D882. El espesor de cada probeta fue determinado por medio de un micrómetro digital Mitutoyo No. 293-330. Las muestras fueron almacenadas en un desecador a una humedad relativa de 15% aproximadamente.

Resistencia a la tensión

Los ensayos de tensión fueron realizados en una máquina universal de ensayos Tinius Olsen modelo H50KS, con una celda de carga de 1000N, se realizaron los ensayos de acuerdo con la norma ASTM D882, la cual específica para películas poliméricas con menos de 1mm de espesor. La distancia entre mordazas corresponde a 50mm, el ancho de la película de 20mm y la velocidad de ensayo de 12.5 mm/min. En la figura 14 se observa una película siendo ensayada a tensión.



Figura 14. Montaje de ensayos para tensión mecánica.

Se realizaron en total 16 probetas para el ensayo de tensión: 4 películas patrón de quitosano y 4 de cada compuesto con variación de andamio fibroso de PLA, para 30 min, 45 min y 60 min de deposición.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS.

6.1.1. Viscosimetría capilar.

La viscosidad del quitosano obtenida mediante viscosimetría capilar fue realizada a las materias primas por Tamayo y Ruiz conforme a la metodología. Primero se calcula la viscosidad relativa, posteriormente la viscosidad específica se usa para hallar la viscosidad reducida hasta finalmente obtener la viscosidad intrínseca del polímero. El tiempo de caída del solvente (t_0) para el quitosano fue de 304.24s (Tamayo Marin et al., 2018)

Tabla 1. Datos relacionados para la determinación del peso molecular promedio del quitosano.

Concentración CS (g/mL)	t_i (s)	η_{rel}	η_{esp}	η_{red}
1×10^{-5}	322.82	1.06105892	0.06105892	610.58917
3×10^{-5}	359.92	1.18301241	0.18301241	610.04136
5×10^{-5}	389.99	1.28184283	0.28184283	563.685667
7×10^{-5}	391.85	1.28184283	0.28796735	411.381929
9×10^{-5}	463.87	1.52468706	0.52468706	582.985626

Con los datos de la tabla 1, se realizó el gráfico viscosidad reducida (η_{red}) vs concentración. Al linealizarlos el intercepto corresponde al valor de la viscosidad intrínseca para el quitosano el valor corresponde a 677.72mL/g. A partir de esta información, se procedió a determinar el peso molecular promedio por medio de la ecuación 1. Obteniendo para el quitosano un $M_w = 163275$ g/mol. Estos valores están dentro de los reportados para la aplicación en ingeniería de tejidos (Garcia et al., 2018).

Se ha evidenciado en los andamios de quitosano que la tasa de degradación disminuye a medida que aumenta su peso molecular debido a una mayor cristalinidad del material y la cantidad de enlaces glicosidos presentes. Los andamios de quitosano de bajo peso molecular evidenciaron una mejor adhesión y proliferación celular que los andamios que contenían el mismo material de alto peso molecular en andamios compuestos de colágeno (Tangsadthakun et al., 2007).

6.2. ELABORACIÓN DE ANDAMIOS DE PLA CON CLOROFORMO.

6.2.1. Soluciones de PLA en Cloroformo.

Para la obtención de los andamios de PLA con cloroformo primero se realizaron soluciones variando la concentración del PLA entre 8% a 15% (8, 10, 12, 15), también se realizó una solución al 20% pero esta presentaba una viscosidad bastante elevada por lo que no se utilizó. Todas estas soluciones se probaron en el equipo de electrohilado, la solución al 12% de PLA en cloroformo fue la que presentó mejor resultado al obtener la mayor cantidad de fibras en el colector y que fuera posible realizar el método, se evidenciaba una mayor área de fibras que se aglomeraban en una pequeña zona dentro del colector.

6.2.2. Determinación de parámetros para electrohilado.

Voltaje o diferencia de potencial generada entre la punta emisora y el plato colector (V).

Para la determinación de este parámetro se dejó una altura fija de 15 cm y un flujo de 2 mL/h con la solución polimérica PLA-Cloroformo al 12%, se realizaba una corrida por 10 a 20 minutos que permitía observar cómo se daba la producción de fibras saliendo de la punta emisora del equipo por un método de contraluz que consistía, en incidir un rayo de luz blanca en la zona posterior de la cámara de electrohilado, a continuación se observaba el colector para verificar cómo se recogían las fibras. Con este parámetro se pudo determinar que el mejor voltaje fue 18 kV.

De lo que se puede concluir a partir de la determinación de este parámetro es que a medida que se aumenta el voltaje, más rápido se evapora el solvente, por consiguiente, más rápido se tapaba la punta emisora del equipo de electrohilado. Pero, en el caso de esta solución polimérica, desde 12 kV se presentaba taponamiento, lo que llevaba a que no se colectara un andamio bien distribuido, sino sólo una zona donde se aglomeraban las fibras, lo que hacía que no fuera válido para el objetivo que se necesitaba alcanzar, un andamio de dimensiones 20 cm por 20 cm para su posterior utilización en el compuesto.

Altura o distancia de punta colectora del equipo de electrohilado a plato colector (h).

Este parámetro se determinó dejando un flujo fijo de 2mL/h y un voltaje de 18kV con la solución polimérica PLA-Cloroformo al 12%, para lo cual se realizaron corridas por 10 a 20 minutos donde se comenzó a variar la altura del plato colector para observar cuál era la altura ideal, variándola desde 13 a 17cm, para la formación de fibras electrohiladas. De este proceso se determinó que la altura ideal era de 15cm.

El parámetro de altura da cuenta de la distancia de la punta emisora al plato colector al dejarse fija en un valor determinado no genera un cambio significativo en la producción de fibras.

Velocidad de Flujo (v).

Para la definición del parámetro velocidad de flujo se dejan fijos los parámetros de altura a 15 cm y voltaje 18kV con una solución polimérica de PLA-Cloroformo al 12%, se realizaba una corrida de 10 a 20 minutos y se variaba el flujo para determinar cuál era la mejor velocidad para obtención de fibras. Este se varió entre 0.8 a 8mL/h.

De la medición de este parámetro se puede deducir que a mayores velocidades de flujo se disminuía la zona de recogida la placa y, por tanto, si antes sólo una zona era de aglomeración de fibras, en este caso se cerraba aún más el espacio, a una zona muy puntual y específica.

En el caso del flujo menor, 0,8mL/h, la solución se evaporaba mucho antes de llegar a la punta causando aglomeración del polímero dentro de la jeringa y taponamiento dentro de esta; esto siguió sucediendo hasta el caso del flujo de 2mL/h donde se podían obtener fibras. Se observó que, al aumentar la velocidad de flujo, el solvente no alcanzaba a evaporar lo suficiente y no se formaban

fibras, por el contrario, la solución prácticamente se depositaba sobre el colector formando una aglomeración de esta.

El trabajar con las soluciones poliméricas hechas a partir de cloroformo y PLA al 12% sirvió para la determinación de parámetros ideales para la obtención de andamios electrohilados, sin embargo, como se evidencia en la sección de caracterización de andamios por SEM, la formación de las fibras a partir de esta solución polimérica, siguiendo esta metodología no funciona para los andamios que se necesitaban en el compuesto que se realizó debido a tres razones principales; la primera, no se forma películas continuas y sólo se forman en una zona de la placa colectora, el andamio recolectado poseía formas irregulares e incluso se podía apreciar aglomeración de las fibras en algunas zonas. La segunda, se presentaba taponamiento constante de la aguja emisora del equipo electrohilado, esto sólo daba cuenta de que el solvente se evaporaba con demasiada rapidez antes de llegar al plato colector. La tercera, no se presentaba una formación de fibras aceptable para los andamios.

La formación de fibras electrohiladas depende de parámetros como: constante dieléctrica, la conductividad eléctrica, la tensión superficial y la solubilidad del polímero en dicho solvente. Para el cloroformo, estos valores son muy inferiores al compararlos con acetona y dimetilformamida. Se puede evidenciar al ver datos como los presentados en la tabla 2; según estos, se podría decir que el Cloroformo no es quizá el mejor solvente para obtener fibras electrohiladas en las mejores condiciones, debido a que parámetros como su conductividad eléctrica, su constante dieléctrica, su tensión superficial y la capacidad de disolver el polímero son demasiado inferiores a los otros dos solventes usados. (R. Casasola et al., 2014b)

6.3. CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS DE PLA CON CLOROFORMO.

En la figura 15, se pueden observar las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los andamios electrohilados con la solución de PLA cloroformo, en un rango de voltajes entre 16-22 kV.

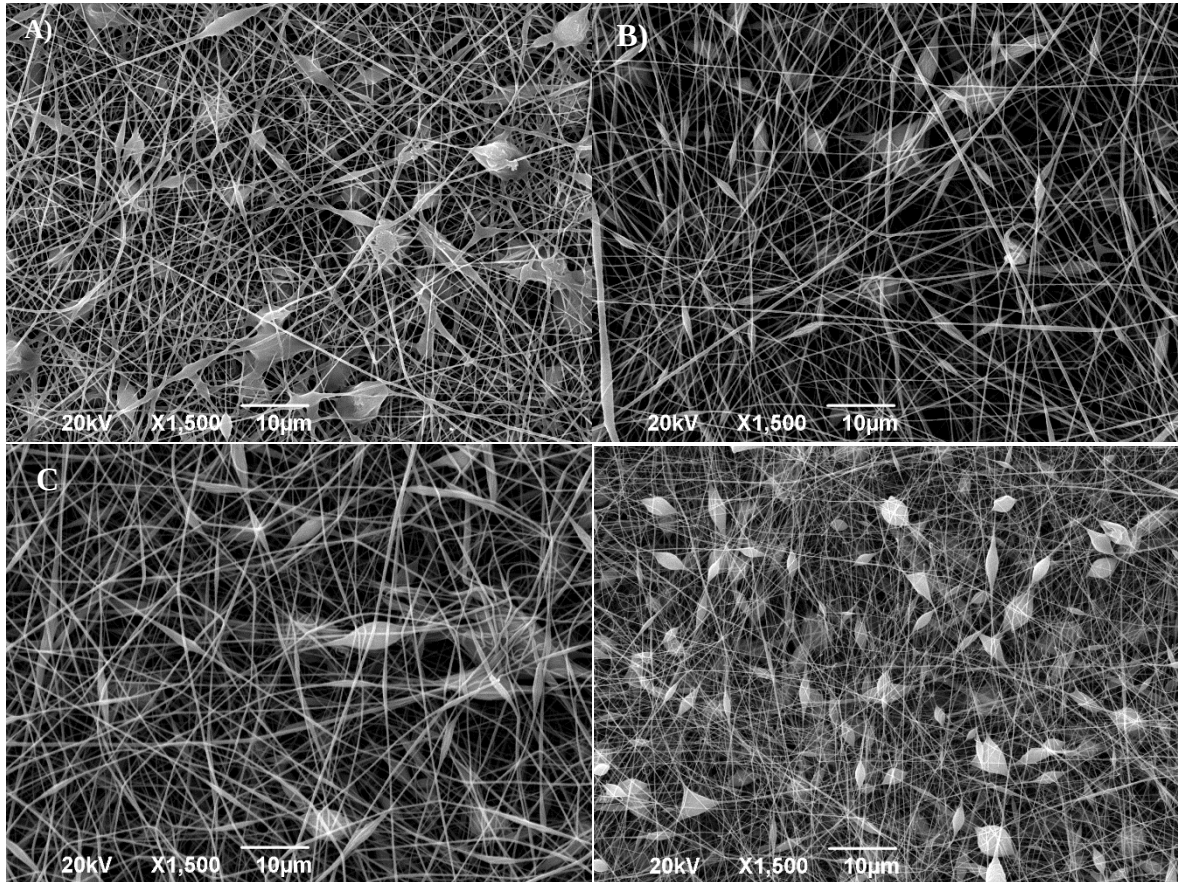


Figura 15. SEM de andamios electrohilados de PLA:Cloroformo al 12%. A) 16kV, B) 18kV, C) 20kV, D) 22kV.

Como se ha justificado previamente, la obtención de andamios electrohilados de PLA en disolución con cloroformo demostró ser un método, aunque efectivo en otras condiciones, para el objetivo buscado no era el indicado, debido a que se necesitaban películas de una cierta dimensión que en la disolución propuesta no se conseguían. Durante la elaboración, en la cámara de electrohilado constantemente se presentaban taponamientos alrededor de los primeros diez minutos de la corrida, adicionalmente, la formación de burbujas que imposibilitaban la formación de películas continuas, las cuales posteriormente fueron analizadas por SEM (microscopía óptica de barrido).

El análisis por SEM se realizó a andamios electrohilados a concentración de 12% de PLA en cloroformo, con distancia de la punta al colector (h) de 15cm y una velocidad de flujo de 2mL/h, lo que se varió para estos andamios fue el voltaje dentro de un rango entre 16kV a 22kV.

Como se presenta en la figura 15, las micrografías encontradas revelan la aparición de diversas cuentas (beads), las cuales no desaparecían a pesar de que se variara el voltaje, esto demuestra que el cloroformo no era el solvente adecuado para obtener las mejores fibras y por supuesto, los mejores andamios. Según Casasola, el uso de un solvente como el cloroformo el cual no posee una buena conductividad eléctrica y que adicionalmente, tiene un punto de ebullición relativamente bajo puede generar la formación de estas pequeñas cuentas. (Raffaella Casasola, 2016). Adicionalmente, Wanatong reporta que el incremento de densidad y el punto de ebullición en una diferencia muy grande entre la solubilidad de los parámetros de solvente puede ser responsable de la “cadena de cuentas”. En su estudio, las fibras mejoraron al incrementar la constante dieléctrica y el momento de dipolo de los solventes. (Wannatong et al., 2004)

Según lo presentado en la figura 15, la aplicación de voltajes más bajos o altos responde a una colección de fibras más grandes, con cuentas más grandes. Teniendo en cuenta, que, al aplicar incrementos de voltaje, se genera un aumento de campo electrostático y este a su vez, genera mayores fuerzas de este tipo, generando así la formación de “gotas” de mayor radio en la punta de la aguja del equipo de electrohilado. Esto adicional, a que la evaporación del solvente, cuando se aplican grandes voltajes se da más rápido, genera mayoritariamente cuentas en lugar de fibras continuas.

El cloroformo, como bien se sabe no posee una constante dieléctrica muy grande, su momento de dipolo no es tan grande comparado a un sistema de solventes, el cuál puede mejorar este por medio de la mezcla de dos solventes compatibles, adicionalmente, su punto de ebullición es muy bajo, lo que haría que a un voltaje determinado se evaporara rápidamente generando la formación de cuentas y no fibras continuas y uniformes como las que se estaban buscando.

El uso de otros sistemas de solventes, como el posteriormente usado, DMF-Acetona, se realizó basándose en literatura previa, los estudios de Casasola, definen que esta es la mejor mezcla para utilizar y con los parámetros previamente encontrados en las pruebas de corridas de electrohilado de PLA con cloroformo se establecieron las condiciones de velocidad de flujo (v) y altura de la punta de la aguja al colector de las fibras (h) (R. Casasola et al., 2014a)

6.4. ANDAMIOS PLA CON DMF Y ACETONA.

6.4.1. Solución polimérica PLA con DMF y Acetona.

Tabla 2. Descripción de parámetros para determinación del mejor solvente para elaborar fibras electrohiladas de PLA.

Solvente	Punto de ebullición (°C)	Conductividad eléctrica (μS/cm)	ε	σ (mN/m)	δ (cal ^{1/2} /cm ^{3/2})
Cloroformo	61	1,00E-04	4,8	27,2	9,3
Acetona	56	0,2	20,6	23,3	10
Dimetilformamida	153	6,00E-02	36,7	35	12,1

Donde ε es la constante dieléctrica del solvente, σ la tensión superficial del solvente y δ es el parámetro de solubilidad.

Según los datos de la tabla 2 y el estudio realizado por Casasola en 2014, la mejor forma de obtener fibras electrohiladas de PLA para la creación de andamios fibrosos sería la mezcla de solventes para ello basados en el previo estudio con cloroformo, primero se determinó cuál era la mezcla de solventes que presentaba mejor formación de andamios fibrosos. Como se evidencia en la tabla 3, se realizan corridas variando sólo dos veces la diferencia de potencial entre la punta emisora y el plato colector o el voltaje, pero se dejan fijos los parámetros ideales ya encontrados en el análisis previo como lo son distancia de 15 cm y velocidad de flujo 2mL/h.

La cantidad de solventes en la mezcla se fue variando como se presenta en la tabla 3 comenzando en una mezcla 70:30 DMF-Ac para así encontrar la mezcla que presentaba las mejores fibras, todo esto evidenciado por el análisis macroscópico (o visual) y el análisis microscópico mediante caracterización por SEM. Los resultados se presentan en la tabla 3.

Según los resultados obtenidos por el análisis de corridas, se puede determinar que el mejor voltaje para electrohilado de PLA con una mezcla de solventes DMF-Ac es de 12kV y que la mejor mezcla es de 30:70. Una explicación probable a este comportamiento se encuentra también en los hallazgos de Casasola y se puede explicar según la tabla 3. Donde los solventes DMF y Ac tienen unos parámetros de solubilidad mucho mejores que el cloroformo.

El hecho de combinar los dos solventes, DMF-Ac, genera un aumento en el punto de ebullición de la mezcla, permitiendo así la uniformidad de evaporación de los dos solventes en el proceso de electrohilado y así la formación de fibras. El DMF tiene un mayor punto de ebullición y también una mayor constante dieléctrica lo cual hace que la mezcla de solventes se genere una estabilidad. La combinación de 70% Acetona y 30% DMF sólo muestra que el polímero PLA es más afín a tener una disolución con la Acetona que con el DMF, que genera sólo un hinchamiento del polímero. (Sato et al., 2013)

Tabla 3. Solución polimérica de PLA con DMF y Acetona en diversas concentraciones para obtención de fibras electrohiladas en voltajes de 12 kV y 22 kV.

DMF	Ac	12 kV			22 kV		
		Observaciones		Tamaño de Fibra	Observaciones		Tamaño de fibra
		Macro	Micro	Micro	Macro	Micro	Micro
70	30	Salpicaduras en la placa Procedimiento discontinuo. Taponamiento de la aguja Placa obtenida de tamaño 20x20	Muchas cuentas y presencia de pocas fibras	Muy delgadas	Salpicaduras en la placa Procedimiento discontinuo, con interrupciones. Taponamiento mínimo de la aguja Placa obtenida de 20x20	La cantidad de cuentas al compararlo con las 12 kV disminuye considerablemente, sin embargo, las fibras son demasiado delgadas para el tamaño de cuenta	Muy delgadas
60	40	Salpicaduras en la placa en menor cantidad Procedimiento discontinuo. Taponamiento de aguja del equipo Deposito en placa de 20x20 aún se logra	La cantidad de cuentas disminuye respecto a la composición 70:30 sin embargo, poseen aún muchos defectos.	Delgadas	Salpicaduras mucho menores en la placa. Procedimiento con menores interrupciones. No hay taponamiento de la aguja. Deposito total en placa de 20x20.	La cantidad de cuentas disminuye	Delgadas
50	50	Se veía una película continua, no había presencia de salpicaduras. Procedimiento sin interrupción o continuo no había taponamiento de la aguja. Deposito totalmente uniforme en la placa de 20x20	La cantidad de cuentas sigue siendo constante y las fibras aún no son las mejores para el procedimiento	Medio	Se veía una película continua sin presencia de salpicaduras. Las fibras se recogían sobre la placa en un proceso continuo. El taponamiento de la aguja era esporádico. Deposito totalmente uniforme en una placa 20x20	La cantidad de cuentas aumenta considerablemente respecto a la relación 60:40 al mismo voltaje	Delgadas
40	60	Se presencia una película continua El procedimiento se realiza sin interrupción alguna. Se dan pequeños taponamientos pero son fácilmente solucionados. Se recogen placas con aspecto uniforme 20x20	Con esta proporción la cantidad de cuentas aún es significativa e insatisfactoria para realizar el procedimiento y obtener los mejores andamios.	Medio-grueso.	No se presenta una película continua. No hay presencia de salpicaduras. El procedimiento se realiza con muchas interrupciones. La aguja presentaba taponamiento semi constante. Las placas que se recogen no son de aspecto uniforme. Que no llegaba al tamaño de 20x20	Libre de cuentas.	Gruesas
30	70	Se presencia una película continua. Se genera un proceso sin interrupción No hay taponamiento de la aguja Se obtienen placas de tamaño uniforme de 20x20	La proporción de cuentas en esta composición disminuye bastante y se encuentra libre de defectos, por lo tanto es la mejor composición.	Gruesas	No se presenta película continua. Se genera proceso con interrupción constante. El taponamiento de la aguja era muy constante, aproximadamente menor a 3 minutos de iniciado el electrohilado. No se obtienen placas uniformes ni de un tamaño aceptable para ser andamio.	Libre de cuentas, con fibras más gruesas que la composición anterior.	Muy Gruesas

Según la información de las observaciones condensadas en la tabla 3, a los andamios obtenidos en voltajes de 12 kV y 22 kV, se decidió que la solución escogida para la obtención de los andamios fue una solución al 12,5% de PLA en una mezcla 30 DMF: 70 Ac en una corrida a 12 kV, 15 cm de distancia (h) y una velocidad de flujo 2mL/h.

Teniendo en cuenta estos parámetros, 12,5% de PLA en una mezcla 30:70 DMF-Ac a 12 kV, se realizó la reproducción de andamios en diversas probetas a diferentes tiempos de recolección en un rango entre 30 a 60 minutos por corrida, cada uno de ellos con características específicas, pero principalmente por su espesor, obteniendo así los resultados presentados en la tabla 4. El tiempo, en cuestión de la recolección de los andamios lo único que especifica es una formación de más capas y más fibras en la superficie colectora, lo cual permitiría con mayor facilidad crear un andamio con un mayor espesor.

Tabla 4. Características de los andamios obtenidos a diferentes tiempos de corrida

Tiempo de corrida (min)	Características del Andamio
30	Los Andamios se muestran como laminas muy finas, las cuales, no se pueden delaminar fácilmente del aluminio colector. Estos andamios no presentaron ningún tipo de taponamiento en su proceso de elaboración obteniéndose como una película continua con bordes poco definidos.
45	Las láminas obtenidas en este andamio comienzan a mostrarse un poco más gruesas, las cuales se pueden remover fácilmente del aluminio colector. El proceso de obtención se presentó sin ninguna interrupción, y se formó una película continua con bordes más definidos y con un espesor mucho mayor que las de 30 minutos
60	Los Andamios obtenidos en este tiempo de corrida fueron los más gruesos obtenidos, estos son de fácil remoción del aluminio colector. Se obtuvieron en un proceso sin interrupción debido a que en este punto la mezcla de solventes aún se encuentra dentro de su rango antes de que se evaporaran completamente. La obtención de estas fibras fue una película continua sin ningún tipo de beads y con un espesor superior a las dos anteriores.

6.5. CARACTERIZACIÓN POR SEM DE LOS ANDAMIOS FIBROSOS DE PLA CON MEZCLA DMF-ACETONA.

En la figura 16, se pueden observar las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los andamios producidos según la relación de solventes presentados en la tabla 3 a un voltaje de 12 kV (en la parte izquierda de la Tabla 3).

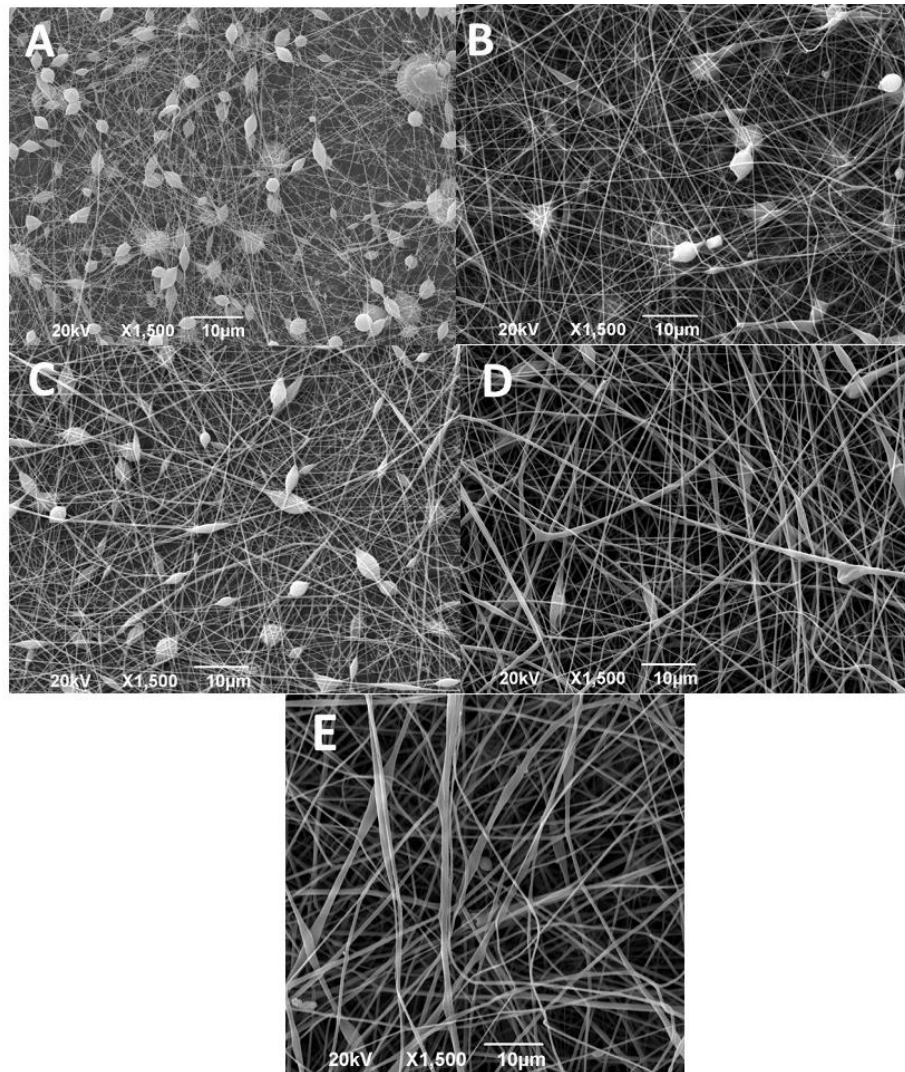


Figura 16. SEM de andamios electrohilados de PLA en mezcla de solventes a 12kV. **A)** 70% DMF – 30% Ac, **B)** 60% DMF – 40% Ac, **C)** 50% DMF – 50% Ac, **D)** 40% DMF – 60% Ac, **E)** 30% DMF – 70% Ac.

Durante el proceso de obtención del andamio (Fig. 16A) se observó en la cámara de electrohilado que la solución polimérica descendió desde la boquilla en forma de aspersión de pequeñas gotas, las cuales se depositaron sobre el aluminio en la placa colectora, esto se evidencia en la micrografía con la presencia de cuentas (beads) interconectadas por fibras delgadas.

Para la mezcla de solvente 60/40, (Fig. 16B), se evidencia que al disminuir la cantidad de DMF dentro de la solución, se estabiliza un poco más disminuyendo la cantidad de defectos presentes en el andamio, a pesar de esto, sigue siendo inadecuada debido al número de cuentas

(beads) aún presentes. Caso similar que ocurre con la mezcla de solvente 50/50, (Figura 16C), pues la cantidad de defectos entre las fibras se mantiene casi constante.

En la mezcla de solventes en proporción, 40/60 (Fig.16D), se puede ver claramente que, al aumentar la presencia de acetona en la solución, las fibras obtenidas son mucho más uniformes, gruesas y la cantidad de discontinuidades ha disminuido notoriamente. Finalmente, en la (figura 16E), donde se utilizó un porcentaje 70% Ac- 30% DMF, se puede observar que prácticamente las fibras se han formado libres de defectos y el grosor de estas parece ser mayor al de las anteriores composiciones.

Lo anterior, puede deberse a que la disminución de proporción de solvente con mayor punto de ebullición genera fibras con diámetro mayor, es decir, fibras más gruesas. Según Casasola y Wannatong (R. Casasola et al., 2014b)(Wannatong et al., 2004), se encuentra una relación similar entre el punto de ebullición del solvente y el diámetro de fibras en el electrohilado de PLA y Poliestireno, respectivamente. Esta correlación de punto de ebullición afecta por igual mezclas duales de solventes, donde al disminuir la proporción del solvente con mayor punto de ebullición presenta presencia de fibras más gruesas.

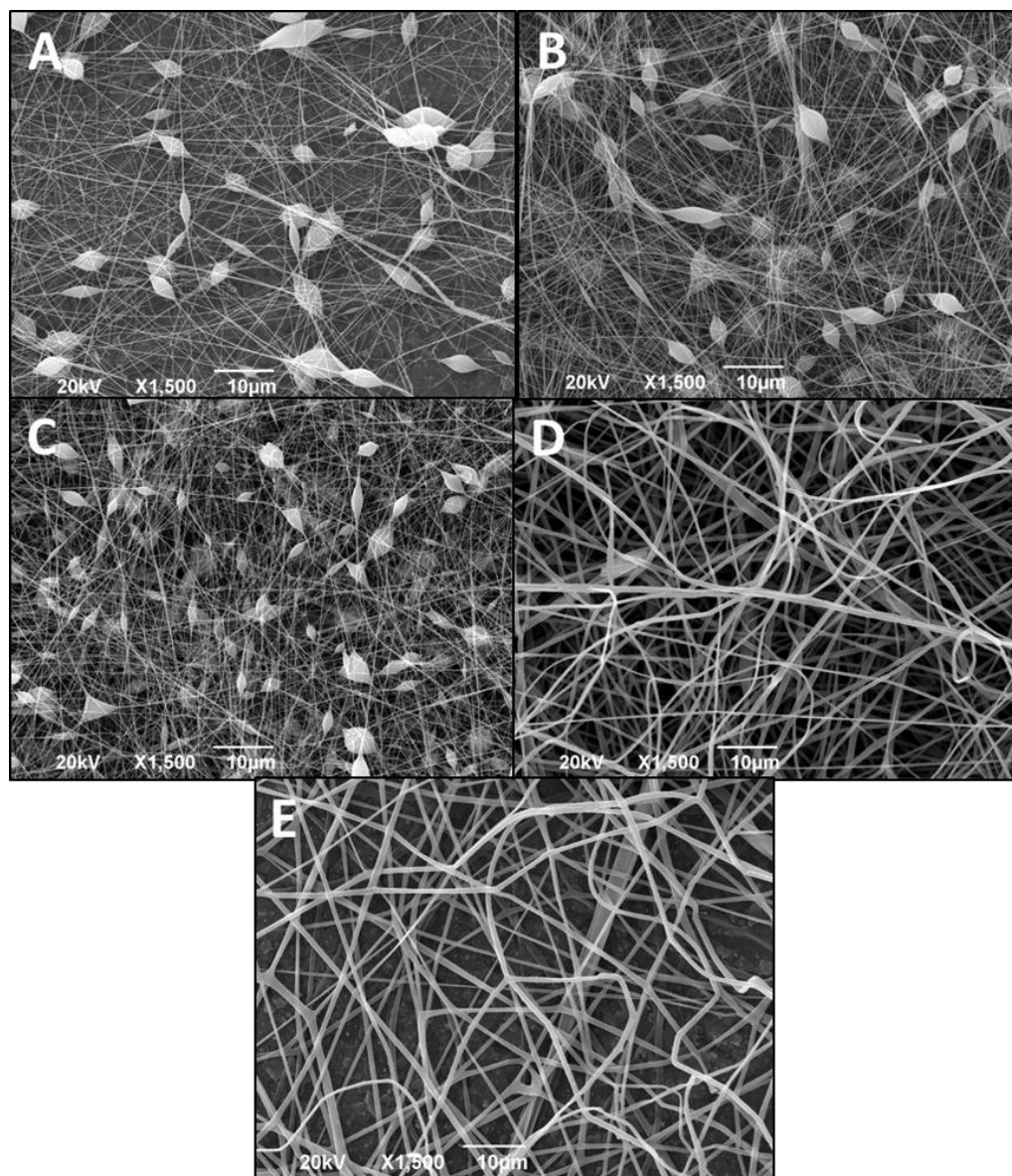


Figura 17. SEM de andamios electrohiladas de PLA en mezcla de solventes a 22kV A) 70% DMF – 30% Ac, B) 60% DMF – 40% Ac, C) 50% DMF – 50% Ac, D) 40% DMF – 60% Ac, E) 30% DMF – 70% Ac.

En la figura 17 se presentan las micrografías del proceso de obtención de andamios a 22 kV. Como se puede observar, en las concentraciones de Ac iguales o mayores a 60% se presenta una mejora en la obtención de andamios e incluso se observa una disminución de los defectos presentes respecto a las obtenidas a 12 kV, sin embargo, las fibras son demasiado delgadas, no presentan uniformidad en el diámetro y se observan algunas gotas (beads) (Fig. 17A-B). La cantidad de discontinuidades aumenta significativamente a una concentración de 50% DMF (Fig. 17.C) como un caso atípico que solo se evidencia en este voltaje rompiendo la tendencia que se aprecia en las otras concentraciones. Para los porcentajes de 40% DMF y 30% DMF se observó en las micrografías (Fig. 17D y E) un diámetro continuo en las fibras y la ausencia de gotitas (beads) esto se debe probablemente a que se evaporaron de manera más eficiente los solventes. Sin embargo, durante el proceso de electrohilado después de unos pocos minutos se taponaba

totalmente la boquilla impidiendo el paso de la solución, lo cual no lo hace apto para un proceso continuo de obtención de fibras, esto se presenta debido a la evaporación rápida del solvente.

Finalmente, de acuerdo con, los resultados morfológicos obtenidos de los andamios electrohilados de PLA se seleccionó el sistema binario de solventes 30% DMF- 70% Ac, a 12 kV pues no presentaba problemas de taponamiento al momento de electrohilar como en el caso de la misma solución a 22 kV, además, las fibras obtenidas con estos parámetros presentaban una mayor uniformidad en cuanto a espesor y no se evidenciaron defectos en las mismas.

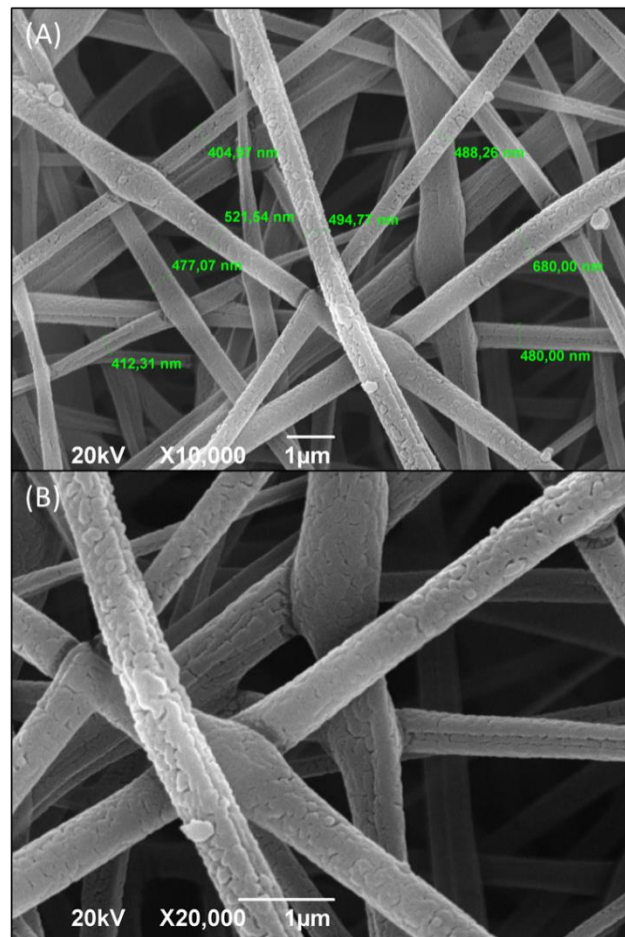


Figura 18. Micrografía de andamios producidos con sistema de solventes 30% DMF- 70% Ac.

En la figura 18A se presenta la micrografía del andamio obtenido a 12kV en donde se observa el espesor de diferentes fibras, este oscila entre 404.97nm y 680nm con un valor promedio de 494.87nm (0.494μm). En las aplicaciones de ingeniería de tejidos se buscan diámetros de fibras que se encuentren entre 0.14μm a 2.1μm. Las fibras lisas superficialmente presentan una menor densidad celular respecto a las fibras que presentan una superficie rugosa. La densidad celular aumenta con el aumento del diámetro de las fibras (Badami et al., 2006). Como se evidencia en la (Fig. 18B) se presenta una superficie rugosa en las fibras; de acuerdo con Ali (Ali et al., 2016), el incremento de la rugosidad y textura puede facilitar la respuesta y adhesión celular, por lo que es posible su aplicación en ingeniería de tejidos.

6.6. ELABORACIÓN DE PELÍCULAS COMPUESTAS DE QUITOSANO CON ANDAMIOS FIBROSOS DE PLA.

6.6.1. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS CON QUITOSANO.

Para la obtención de las películas compuestas, primero, se realizaron pruebas para determinar la concentración adecuada de Quitosano (CS), el método escogido para la realización es el método húmedo, debido a que a pesar de que no presenta las mejores condiciones para realizar la película es el más fácil de controlar. Para llevar a cabo la experimentación con las películas de Quitosano, se realizaron películas a concentraciones de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 3,0 % de Quitosano en una solución 2% de ácido acético previamente preparada con agua destilada. Al realizar las soluciones, se pudo determinar que la solución al 3,0% presentaba una consistencia bastante densa, con una viscosidad elevada que hacía imposible la formación de una película por el método propuesto.

Las películas se realizaron con soluciones de Quitosano en 2% de ácido acético en el rango de 0,5 a 2% de concentración del polímero. Para determinar la mejor concentración para la elaboración del compuesto se evaluó la mojabilidad del andamio electrohilado de PLA y la adhesión de este a la película de quitosano. El método usado, fue un método manual que permitió observar la delaminación del compuesto según la concentración del polímero y cómo fue el acople después de su obtención.

De acuerdo con lo anterior, se escogió la concentración de 0.5% de quitosano en 2% de ácido acético pues presentaba un mejor aspecto visual en comparación con los demás, se observó una menor cantidad de zonas blancas lo que indica una mayor humectabilidad del andamio fibroso de PLA dentro de la película de quitosano, adicional a ello, presentaba una mayor dificultad al momento de intentar delaminar el andamio de PLA dentro del compuesto.

6.6.2. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS COMPUESTAS.

Una vez definida la concentración óptima de la solución de quitosano, se prepararon los andamios compuestos en un molde de caucho siliconado incorporando los andamios fibrosos de PLA. De esta manera se obtienen 3 tipos de películas compuestas de quitosano y PLA, en donde la variación se da en el espesor del andamio fibroso de PLA incorporado en la solución producto del tiempo de electrohilado (30 min, 45 min y 60 min).

6.7. CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS COMPUESTAS DE QUITOSANO Y PLA.

6.7.1.1. Ensayos de tensión

El promedio de los datos obtenidos en dicho ensayo se presenta a continuación en la tabla 5 con su respectiva variación estándar, en donde Pat es la película patrón de quitosano, C30 la película compuesta con andamio fibroso de PLA a 30 min, C45 para la que tiene incorporado el andamio de PLA electrohilado a 45 min y finalmente C60 se les denominó a las probetas con andamios electrohilados a 60 min.

Tabla 5. Resultados de caracterización por pruebas de tensión al material obtenido

Formulación	Espesor película (mm)	Resistencia a la tensión (MPa)	Elongación (%)
Pat	0,01	54,55 ± 7,38	5,62 ± 2,93
C30	0,13	2,87 ± 0,59	13,84 ± 5,03
C45	0,15	1,79 ± 0,21	10,66 ± 5,22
C60	0,17	2,67 ± 0,29	16,49 ± 3,88

Los reforzamientos laminares de PLA realizados a matrices de Quitosano, como lo han demostrado diversos autores, mejoran y aumentan las propiedades mecánicas, sin embargo, en este estudio, como se puede observar en la tabla 5, el promedio de los valores obtenidos para las probetas medidas sólo con quitosano presentan un valor de 54.55 MPa y al medir las probetas con los andamios electrohilados con diversos tiempos éstos tienen unos valores que oscilan entre 1,79 a 2,87 MPa. Adicionalmente, el PLA tiene un módulo de tensión de 53 MPa (Henton et al., 2005). Lo que prueba una caída en las propiedades mecánicas del compuesto desarrollado, esto debido a diferentes razones presentadas a continuación:

Primero, las fibras electrohiladas de PLA presentan una alta área superficial debido al tamaño de las fibras lo que permite la interacción de estas con el solvente del quitosano, el cuál fue ácido acético. Adicionalmente, la porosidad de los andamios fibrosos de PLA, es alta; esto facilita la rápida penetración del solvente en los espacios entre fibras que posteriormente, en el medio ácido genera una hidrólisis en las zonas de interfaz inicialmente, para que el solvente penetre a mayor profundidad se requiere más tiempo de contacto con el solvente (Shi et al., 2012; Vieira et al., 2011).

Segundo, el pH es uno de los factores primordiales para que cualquier material funcione en su correcta medida y las propiedades sean las esperadas. Adicionalmente, este posee un fuerte impacto en el mecanismo de reacción y la cinética de reacción de un polímero llevándolo a tener diferentes estados o incluso a la degradación. En el marco de las aplicaciones biomédicas, la degradación es crucial para sistemas de entrega de medicamentos, regeneración de tejidos, etc.

En poliésteres, la degradación se da por tres diferentes caminos: catálisis ácida, catálisis básica o no catalizada. Para el PLA, esta se da por dos de estos, la catálisis ácida y la catálisis básica. En medio ácido la catálisis se encuentra favorecida por la cantidad de protones predominantes en el medio, lo cual genera que los enlaces estéricos del oligómero se hidrolicen. La degradación del PLA depende principalmente de una cinética global que corresponde a la formación o disociación de los enlaces estéricos terminales del polímero, los cuáles se degradan más rápido en comparación con los enlaces en el esqueleto de la fibra (Gorrasi & Pantani, 2018; Henton et al., 2005).

En resumen, durante este estudio, fibras electrohiladas de PLA fueron expuestas a un medio ácido, ácido acético, al realizar las películas compuestas con quitosano. Y como se ha mencionado previamente, el pH ácido de este medio pudo propiciar una catálisis hidrolítica de las cadenas de PLA en las fibras electrohiladas y así comenzar una degradación del material por medio del rompimiento de diversos enlaces estéricos, esto posiblemente puede explicar el decaimiento en las propiedades mecánicas de tensión del material (Gorrasi & Pantani, 2018).

Por otro lado, la elongación del material muestra un aumento significativo posiblemente debido a la suma de las contribuciones de las fibras segmentadas por la catálisis ácida. Cada contribución puede estar mediada por enlaces electrostáticos y enlaces de hidrogeno entre los fragmentos debido a que este tipo de degradación ocurre en los grupos hidroxilos terminales. En general estas contribuciones a nivel mecánico tienden a ser muy pequeñas y comportarse como defectos dentro de la película de quitosano (Gorrasi & Pantani, 2018).

La temperatura es un factor importante en la degradación del PLA debido a que puede acelerar la velocidad de degradación hidrolítica- Se espera que por debajo de la temperatura de transición vítrea (60-65°C para el PLA) la cinética de degradación del sistema sea considerablemente baja y a temperaturas entre 15-40°C permanezca relativamente estable el material. La temperatura de degradación del PLA se encuentra alrededor de 260-350°C de acuerdo a la literatura (Gorrasi & Pantani, 2018; Ndazi & Karlsson, 2011).

Sin embargo, el efecto sinérgico de la temperatura y un medio ácido puede incrementar la cinética de degradación del compuesto PLA-Quitano, generando así que su degradación se de en las condiciones realizadas y posiblemente explique la caída de propiedades mecánicas como lo es la tensión a la ruptura del compuesto. Adicionalmente, la propiedad de elongación debido a la posible degradación, como previamente se ha explicado, se debe a pequeñas cargas contribuyendo al aumento significativo de esta.

7. CONCLUSIONES

Los andamios de PLA obtenidos mediante la técnica de electrohilado usando como solvente cloroformo permitió determinar los parámetros de distancia al colector y velocidad de flujo de la corrida. El proceso de obtención de fibras fue interrumpido debido a constantes taponamientos en la boquilla del equipo de electrohilado lo cual no permitió crear un andamio sobre toda la superficie de la placa colectora.

La caracterización por SEM realizada a las fibras obtenidas de PLA en cloroformo evidenció la formación de “cuentas” o discontinuidades en un rango de voltajes de 16 KV a 20 KV, lo que corroboró que el solvente no fue el adecuado debido a que su bajo punto de ebullición y su baja conductividad eléctrica generaron la formación de las mencionadas cuentas, lo cual mostró que el andamio no es apto para su aplicación.

Se implementó el uso de un sistema binario de solventes en el proceso de electrohilado de PLA como lo fue el sistema Acetona-DMF en relación 70:30. Este sistema presentó un mayor punto de ebullición y una mayor conductividad eléctrica, lo cual permitió la obtención de fibras uniformes de mayor diámetro, además permitió la recolección de un andamio completo sobre toda la superficie del colector, estos se realizaron a dos voltajes 12 kV y 22 kV, teniendo los primeros como los efectivos debido a que fue posible recolectar completamente sin interrupciones.

Las micrografías obtenidas por SEM para los andamios electrohilados de PLA en Ac-DMF, presentan la formación de fibras continuas para la relación 70:30 Ac-DMF a 12 kV, lo cual las hace aptas para el estudio desarrollado.

Se obtuvieron películas de Quitosano mediante la técnica de evaporación de solvente, a una concentración de la solución de 0,5% (p/v) del polímero y 2% de ácido acético. Estas presentaron buenas propiedades mecánicas de resistencia a la tensión 54,55 MPa.

La incorporación de andamios fibrosos de PLA en películas de Quitosano mostró una disminución drástica de la resistencia a la tensión debido a la posible degradación del PLA por medio de una catálisis hidrolítica ácida en el medio en el que se encontró disuelto el quitosano y una posible contribución a la cinética de degradación por la temperatura de obtención de las películas.

8. RECOMENDACIONES PARA FUTUROS ESTUDIOS.

Como se pudo observar con esta investigación la técnica de evaporación de solventes para elaboración de películas compuestas de Quitosano reforzadas con Andamios fibrosos de Ácido Poliláctico no presenta una buena sinergia para obtener materiales con mejores propiedades mecánicas, por lo tanto se recomienda el uso de otras metodologías como sea el uso de liofilización, impresión 3D o coelectrohilado de los materiales cuidando, por supuesto, que el medio de interacción de los polímeros no se va influenciado por el pH y la temperatura causando una degradación catalítica del material como resultó en esta investigación.

Investigaciones también se pueden desarrollar estudiando el efecto de la temperatura, el pH, el tiempo de contacto entre los polímeros, entre otras condiciones, que permitan observar la degradación conjunta de los materiales y que establezcan una relación de como estos reaccionan en diversos ambientes y así poder probarlos en cuestión de biodegradabilidad.

La elaboración de Andamios Fibrosos de PLA puede estudiarse desde el uso de diversos sistemas binarios de solventes con alto punto de ebullición y una alta conductividad eléctrica que permitiera obtener fibras de menor tamaño, adicionalmente, se puede implementar un sistema automatizado para obtener fibras orientadas con el fin de mejorar la resistencia a tensión en la dirección del esfuerzo del andamio.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, A., Valencia, A., Phd, N. V. B., Carolina, F., Vázquez, V., K, T. V., José, J., Montesinos, M., Msc, E. A. M., Antonio, M., Pérez, Á., Prostodoncia, R. D. P. De, Rica, U. D. C., & Rica, C. (2016). Biocompatibilidad de andamios nanofibrilares con diferentes concentraciones de PLA / Hidroxiapatita Biocompatibility of Nanofibrous Scaffolds with Different Concentrations of PLA / Hydroxyapatite. *Basic Research - Laboratory*, 3(18), 51–62. <https://doi.org/10.15517/ijds.v0i0.25987>
- Almeida, C. R., Serra, T., Oliveira, M. I., Planell, J. A., Barbosa, M. A., & Navarro, M. (2014). Impact of 3-D printed PLA- and chitosan-based scaffolds on human monocyte/macrophage responses: Unraveling the effect of 3-D structures on inflammation. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 613–622. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.035>
- Andric, T., Wright, L. D., Taylor, B. L., & Freeman, J. W. (2012). Fabrication and characterization of three-dimensional electrospun scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 100 A(8), 2097–2105. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34045>
- Anju, S., Prajitha, N., Sukanya, V. S., & Mohanan, P. V. (2020). Complicity of degradable polymers in health-care applications. *Materials Today Chemistry*, 16, 100236. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2019.100236>
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., & Heras, A. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3, 203–230. <https://doi.org/10.2174/187231309788166415>
- ASTM. (19 C.E.). D446-12 Standard Specifications and Operating Instructions for Glass Capillary Kinematic Viscometers. *ASTM International*, 12(2017), 1–26. <https://doi.org/10.1520/D0446-12R17.2>
- ASTM. (2019). ASTM D445-19a, Standard Test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and Calculation of Dynamic Viscosity). *ASTM International*, 1–16. <https://doi.org/10.1520/D0445-19A>
- Badami, A. S., Kreke, M. R., Thompson, M. S., Riffle, J. S., & Goldstein, A. S. (2006). Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. *Biomaterials*, 27(4), 596–606. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.084>
- Balau, L., Lisa, G., Popa, M. I., Tura, V., & Melnig, V. (2004). Physico-chemical properties of Chitosan films. *Central European Journal of Chemistry*, 2(4), 638–647. <https://doi.org/10.2478/BF02482727>
- Barbucci, R. (2008). Hydrogels. In *Springer*.
- Behrens, A. M., Sikorski, M. J., & Kofinas, P. (2014). Hemostatic strategies for traumatic and surgical bleeding. In *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* (Vol. 102, Issue 11, pp. 4182–4194). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35052>
- Calvo Santo-Rosa, A. (2013). *Análisis y simulación numérica del proceso de biodegradación por hidrólisis de biopolímeros en aplicaciones biomédicas*. Universidad de Sevilla.

- Casasola, R., Thomas, N. L., Trybala, A., & Georgiadou, S. (2014a). Electrospun poly lactic acid (PLA) fibres: Effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter. *Polymer*, 55(18), 4728–4737. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.06.032>
- Casasola, R., Thomas, N. L., Trybala, A., & Georgiadou, S. (2014b). Electrospun poly lactic acid (PLA) fibres: Effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter. *Polymer*, 55(18), 4728–4737. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.06.032>
- Casasola, Raffaella. (2016). *Electrospinning of poly (lactic) acid for biomedical applications: analysis of solution properties and process parameters, drug encapsulation and release* [Loughborough University]. <https://dspace.lboro.ac.uk/2134/22949>
- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. In *European Polymer Journal* (Vol. 49, Issue 4, pp. 780–792). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>
- Deepthi, S., Venkatesan, J., Kim, S. K., Bumgardner, J. D., & Jayakumar, R. (2016). An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1338–1353. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.041>
- Di Martino, A., Sittering, M., & Risbud, M. V. (2005). Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. In *Biomaterials* (Vol. 26, Issue 30, pp. 5983–5990). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.016>
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. In *Food Chemistry* (Vol. 114, Issue 4, pp. 1173–1182). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>
- Epure, V., Griffon, M., Pollet, E., & Avérous, L. (2011). Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 947–952. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.003>
- Funkhouser, J. D., & Aronson, N. N. (2007). Chitinase family GH18: Evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evolutionary Biology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-96>
- Gadghey, K. K., & Sharma, G. S. (2017). Investigation of Mechanical Properties of Chitosan Based Films: a Review. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Technology*, 8(6), 93–102. <http://www.iaeme.com/IJARET/index.asp93http://www.iaeme.com/ijaret/issues.asp?JType=IJARET&VType=8&IType=6http://www.iaeme.com/ijaret/issues.asp?JType=IJARET&VType=8&IType=6http://www.iaeme.com/IJARET/index.asp94>
- Garcia, L. G. S., Guedes, G. M. de M., da Silva, M. L. Q., Castelo-Branco, D. S. C. M., Sidrim, J. J. C., Cordeiro, R. de A., Rocha, M. F. G., Vieira, R. S., & Brilhante, R. S. N. (2018). Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. *Carbohydrate Polymers*, 195, 662–669. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.091>
- Ghalia, M. A., & Dahman, Y. (2017). Biodegradable poly(lactic acid)-based scaffolds: synthesis

- and biomedical applications. *Journal of Polymer Research*, 24(5), 74. <https://doi.org/10.1007/s10965-017-1227-2>
- Gorrasi, G., & Pantani, R. (2018). Hydrolysis and biodegradation of Poly(lactic acid). *Advances in Polymer Science*, 279, 119–151. <https://doi.org/10.1007/12>
- Gunatillake, P. A., Adhikari, R., & Gadegaard, N. (2003). Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*, 5, 1–16. <https://doi.org/10.22203/eCM.v005a01>
- Henton, D. E., Gruber, P., Lunt, J., & Randall, J. (2005). Polylactic acid technology. *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*, 527–578.
- Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A. N., & Davis, S. S. (2001). Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 51, Issues 1–3, pp. 81–96). [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00171-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00171-5)
- IUPAC. (2008). Mark–Houwink equation. In *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. IUPAC. <https://doi.org/10.1351/goldbook.m03706>
- Jiao, Y., Liu, Z., & Zhou, C. (2007). Fabrication and characterization of PLLA-chitosan hybrid scaffolds with improved cell compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 80(4), 820–825. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31061>
- Li, L., Ding, S., & Zhou, C. (2003). Preparation and biological evaluation of PLA/chitosan composite materials. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi = Journal of Biomedical Engineering = Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi*, 20(3), 398–400.
- Liu, Y., Wang, S., & Zhang, R. (2017a). Composite poly(lactic acid)/chitosan nanofibrous scaffolds for cardiac tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1130–1137. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.101>
- Liu, Y., Wang, S., & Zhang, R. (2017b). Composite poly(lactic acid)/chitosan nanofibrous scaffolds for cardiac tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1130–1137. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.101>
- Llanos Galvis Isabel Cristina. (2015). *Fabricación Y Caracterización De Andamios Tridimensionales De Quitosano/Óxido De Grafeno/Plastificante Mediante El Método Liofilización*. 1–82.
- Logithkumar, R., Keshavnarayan, A., Dhivya, S., Chawla, A., Saravanan, S., & Selvamurugan, N. (2016). A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 151, 172–188. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.049>
- Maturana Peña, H.A. (2016). Desarrollo de scaffolds elaborados en pla/quitosano para su posible aplicación en regeneración de tejido óseo. Universidad del Valle.
- Moreno G, A. E. (2011). *Obtención Y Caracterización De Estructuras De Pla Tipo Andamio Para Bioingeniería Mediante Sinterizado*. Universidad Simón Bolívar.
- Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., & Caba, K. De. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1358–1368. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>

- Ndazi, B. S., & Karlsson, S. (2011). Characterization of hydrolytic degradation of polylactic acid/rice hulls composites in water at different temperatures. *Express Polymer Letters*, 5(2), 119–131. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.13>
- Ortiz Sarasty, D. E., & Pretel Córdoba, A. F. (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.
- Park, J.-E., & Todo, M. (2011). Development and characterization of reinforced poly(l-lactide) scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(5), 1171–1182. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4289-4>
- Park, P. J., Je, J. Y., Jung, W. K., Ahn, C. B., & Kim, S. K. (2004). Anticoagulant activity of heterochitosans and their oligosaccharide sulfates. *European Food Research and Technology*, 219(5), 529–533. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0977-3>
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. In *Progress in Polymer Science (Oxford)* (Vol. 34, Issue 7, pp. 641–678). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>
- Ramirez, D. A. R., & Ayala, R. D. P. Q. (2016). Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa en Colombia. [Universidad De Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A]. In *Situación Actual De La Ingeniería De Tejidos Y Medicina Regenerativa En Colombia* (Vol. 1, Issue 1). [https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/533/1/SITUACIÓN ACTUAL DE LA INGENIERIA DE TEJIDOS Y MEDICINA REGENERATIVA EN COLOMBIA.pdf](https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/533/1/SITUACIÓN_ACTUAL_DE_LA_INGENIERIA_DE_TEJIDOS_Y_MEDICINA_REGENERATIVA_EN_COLOMBIA.pdf)
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. In *Progress in Polymer Science (Oxford)* (Vol. 31, Issue 7, pp. 603–632). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Rinaudo, M., Milas, M., & Dung, P. Le. (1993). Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15(5), 281–285. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(93\)90027-J](https://doi.org/10.1016/0141-8130(93)90027-J)
- Rohl, L., Larsen, E., Linde, F., Odgaard, A., & Jorgensen, J. (1991). Tensile and compressive properties of cancellous bone. *J.Biomech.*, 24(0021-9290 (Print)), 1143–1149.
- Roldán Vasco, S., Vargas Isaza, C. A., Mejía Suaza, M. L., Zapata Giraldo, J., & Moncada Acevedo, M. E. (2016). *Ingeniería de tejidos y aplicaciones* (Instituto Tecnológico Metropolitano (ed.)). Fondo Editorial ITM. <https://doi.org/https://doi.org/10.22430/9789588743844>
- Sandonis O, I. (2015). *Andamios porosos*. Universidad del País Vasco.
- Santoro, M., Shah, S. R., Walker, J. L., & Mikos, A. G. (2016). Poly (lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 206–212.
- Saravanan, S., Leena, R. S., & Selvamurugan, N. (2016). Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1354–1365. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.112>

- Sato, S., Gondo, D., Wada, T., Kanehashi, S., & Nagai, K. (2013). Effects of various liquid organic solvents on solvent-induced crystallization of amorphous poly(lactic acid) film. *Journal of Applied Polymer Science*, 129(3), 1607–1617. <https://doi.org/10.1002/app.38833>
- Şenel, S., & McClure, S. J. (2004). Potential applications of chitosan in veterinary medicine. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 56, Issue 10, pp. 1467–1480). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.02.007>
- Seol, Y.-J., Lee, J.-Y., Park, Y.-J., Lee, Y.-M., Young-Ku, Rhyu, I.-C., Lee, S.-J., Han, S.-B., & Chung, C.-P. (2004). Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnology Letters*, 26, 1037–1041. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000032962.79531.fd>
- Serra, T., Planell, J. A., & Navarro, M. (2013). High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. *Acta Biomaterialia*, 9(3), 5521–5530. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.10.041>
- Shi, Q., Zhou, C., Yue, Y., Guo, W., Wu, Y., & Wu, Q. (2012). Mechanical properties and in vitro degradation of electrospun bio-nanocomposite mats from PLA and cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.042>
- Silva, T. H., Alves, A., Ferreira, B. M., Oliveira, J. M., Reys, L. L., Ferreira, R. J. F., Sousa, R. A., Silva, S. S., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2012). Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest. *International Materials Reviews*, 57(5), 276–306. <https://doi.org/10.1179/1743280412Y.0000000002>
- Sultana, N. (2013). *Biodegradable Polymer- Based Scaffolds for Tissue Engineering*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34802-0>
- Tamayo Marin, J. A., Ruiz Londoño, S., Valencia Zapata, M. E., & Mina, J. (2018). *Obtención y caracterización de nanocompuestos reforzados con óxido de grafeno para su posible aplicación en ingeniería de tejidos* (Vol. 10). Universidad del Valle.
- Tan, L., Yu, X., Wan, P., & Yang, K. (2013). Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review. *Journal of Materials Science and Technology*, 29(6), 503–513. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2013.03.002>
- Tangsadthakun, C., Kanokpanont, S., Sanchavanakit, N., Pichyangkura, R., Banaprasert, T., Tabata, Y., & Damrongsakkul, S. (2007). The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(2), 147–163. <https://doi.org/10.1163/156856207779116694>
- Vidal Bolaños, C. H., & Roldan Varona, C. (2015). *DESARROLLO DE ANDAMIOS DE PLA RÍGIDOS Y FLEXIBLES BIOACTIVOS CON QUITOSANO OBTENIDOS POR LA TÉCNICA DE ELECTROSPINNING Y MOLDEO POR FUSIÓN CON POSIBLE APLICACIÓN EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO*. Universidad del Valle.
- Vieira, A. C., Vieira, J. C., Ferra, J. M., Magalhães, F. D., Guedes, R. M., & Marques, A. T. (2011). Mechanical study of PLA-PCL fibers during in vitro degradation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(3), 451–460. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2010.12.006>

- Villamarin Cabal, Y. A., & Silva Porras, J. C. (2017). *No TELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE ANDAMIOS DE QUITOSANO CON ÓXIDO DE GRAFENO OBTENIDOS MEDIANTE TÉCNICAS DE LIOFILIZACIÓN Y/O ELECTROHILADO.itle*. Universidad del Valle.
- Wan, Y., Fang, Y., Wu, H., & Cao, X. (2007). Porous polylactide/chitosan scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 80(4), 776–789. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31025>
- Wannatong, L., Sirivat, A., & Supaphol, P. (2004). Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: Preliminary study on polystyrene. *Polymer International*, 53(11), 1851–1859. <https://doi.org/10.1002/pi.1599>
- Zeng, S., Cui, Z., Yang, Z., Si, J., Wang, Q., Wang, X., Peng, K., & Chen, W. (2016). Characterization of highly interconnected porous poly(lactic acid) and chitosan-coated poly(lactic acid) scaffold fabricated by vacuum-assisted resin transfer molding and particle leaching. *Journal of Materials Science*, 51(22), 9958–9970. <https://doi.org/10.1007/s10853-016-0203-2>