



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA  
CALIFORNIA**

Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño



**Síntesis de fibras de poli (HEMA-co-VP) a través de la técnica de electrohilado y su evaluación para aplicación como andamios en ingeniería de tejidos.**

Tesis

Para cubrir los requisitos necesarios para obtener el título de:  
Ingeniero en Nanotecnología

PRESENTA:

**Gabriela Irene Carballo López**

Director

Dr. Franklin D. Muñoz Muñoz

Programa Ingeniería en Nanotecnología

Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño (FIAD) - UABC

Codirector

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia

Departamento de Innovación Biomédica; Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)

Ensenada, Baja California, Octubre 2019.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

SÍNTESIS DE FIBRAS DE POLI (HEMA-CO-VP) A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE  
ELECTROFILADO Y SU EVALUACIÓN PARA APLICACIÓN COMO ANDAMIOS EN  
INGENIERÍA DE TEJIDOS.

TESIS

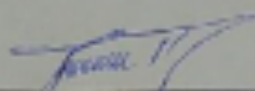
PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

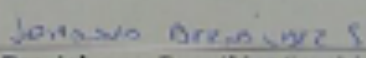
INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

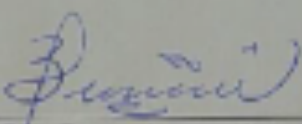
PRESENTA:

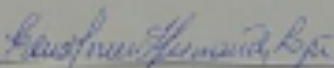
GABRIELA IRENE CARRALLO LÓPEZ

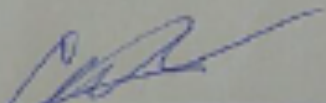
Aprobada por:

  
Dr. Franklin David Muñoz Muñoz  
Director

  
Dra. Johanna Bernáldez Sarabia  
Codirector

  
Dra. Eunice Vargas Viveros  
Sinodal

  
Dra. Edna Lorena Hernández López  
Sinodal

  
Dr. David Cervantes Vázquez  
Sinodal

Dedicatoria

A mis padres, hermano y amigos por su apoyo incondicional, paciencia e impulso para seguir adelante.

A la memoria de mis abuelos, Paula y Rodolfo; siempre quisieron lo mejor para mí y que me superara profesional y personalmente.

## AGRADECIMIENTOS

A la FIAD-UABC, mi alma máter, por la aportación del conocimiento, instalaciones y equipo humano, para hacer posible mi sueño profesional.

Al CNyN-UNAM, por abrirme las puertas de sus instalaciones y permitirme hacer uso de su capital humano.

A los proyectos FORDECYT-CONACYT 272894; DGAPA - UNAM - PAPIIT IN112117, IN110018, IN113219; y PAPIME PE100318 y PE101317, por la financiación para el desarrollo de esta tesis.

A mi tutor, mentor, profesor y amigo, el Dr. Franklin David Muñoz Muñoz; por su apoyo a lo largo de mi carrera y la realización de este proyecto de investigación, por su confianza e impulso siempre a dar lo mejor.

A mi codirectora, la Dra. Johanna Bernáldez Sarabia; por su apoyo, disciplina y confianza depositada en este proyecto, así como su contribución en la revisión y codirección de esta propuesta.

A la Dra. Edna Lorena Hernández López, por su apoyo a lo largo de mi carrera, su entrega y dedicación para mostrarme cosas y aprender. Por su paciencia y consejos, pero sobre todo por su gran humildad y amabilidad hacia mi persona.

A la Dra. Eunice Vargas Viveros, al Dr. Dante y a la Dra. Haydee López, por su motivación a lo largo de la carrera, y sus clases desafiantes que generaron un interés en mí en el área de Bionanotecnología.

Al Dr. Luis Villarreal y al maestro Erick Torres, por su hospitalidad, apoyo y generosidad, al prestarnos las instalaciones de ECITEC Valle de las Palmas, para el electrohilado de muestras, así como sus consejos y asesorías en el tema.

Al Dr. Ricardo Valdez, por su contribución con el análisis de TGA de las muestras del material propuesto en este proyecto.

Al Ing. Israel Gradilla, a Dr. Javier López y Dr. Gerardo Soto por su apoyo en el recubrimiento de oro y la caracterización morfológica de los materiales respectivamente, por medio de microscopía electrónica de barrido SEM.

Al Dr. Harvi Castillo, por su contribución y apoyo con la máquina de electrohilado.

Al Dr. Priscy Alfredo Luque Morales, por su contribución en el análisis de FTIR-ATR de los materiales propuestos en este proyecto.

Al M. C. David Domínguez por su contribución en la evaluación de los materiales propuestos por medio de espectroscopía XPS.

A cada uno de los integrantes del comité evaluador, Dra. Eunice Varga Viveros, Dr. David Cervantes y la Dra. Edna Lorena Hernández López, por su tiempo, disposición y consejos.

Al Departamento de Innovación Biomédica de CICESE, que me acogió por bastante tiempo y en donde pude enfocar mi conocimiento a Bionanotecnología.

Al Dr. Alexei Fredorovich Licea Navarro, por su apoyo a lo largo de mi estancia en el Departamento de Innovación Biomédica de CICESE, y su aprobación para la realización de las evaluaciones biológicas de este proyecto.

A mis mejores amigos, Gilberto, Luis, Mariana, Zisley, Fabiola, Itzel, Irma, Laura y Vanessa, por su comprensión, ánimos y apoyo a lo largo de mi carrera. Por mostrarme que hay personas que se quedan para dejar cosas positivas en tu vida.

A mis compañeros Géneva, Luis, Alejandra, Devani, Mario, Marimar y Norma; por su amistad, apoyo y momento vividos a lo largo de nuestra carrera. Gracias por su paciencia.

A mis padres y hermano, por su apoyo y cariño incondicional, aún en los peores momentos. Por sus enseñanzas y valores inculcados. Por la paciencia y la confianza depositada en mí y mis proyectos. Sin ustedes este logro no habría sido posible.

**“Por la realización plena del hombre”**

## RESUMEN

En este proyecto de investigación se realizó la síntesis y caracterización de un material polimérico en estado líquido, conformado por unidades de poli(2-hidroxietil metacrilato) [PHEMA] y poli(vinilpirrolidona) [PVP], generando así el copolímero: PHEMA-co-PVP. La síntesis se realizó a partir de los monómeros 2-hidroxietil metacrilato [HEMA] y N-vinilpirrolidona [NVP] (relación 3:1), por medio de la reacción de polimerización en cadena iniciada por radicales libres, usando peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como agente iniciador. Una vez aislado y purificado, con el copolímero líquido PHEMA-co-PVP se generaron soluciones poliméricas, usando DMF y etanol como disolventes. Posteriormente fueron procesadas por la técnica de electrohilado para obtener fibras de dicho material. El voltaje de electrohilado fue fijado en 20 kV, mientras que los demás parámetros típicos del proceso de electrohilado, tales como, distancia y velocidad de inyección, fueron ajustados hasta la obtención de materiales fibrosos. Los materiales resultantes fueron evaluados y caracterizados en su composición química por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS); en su morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM); y en sus propiedades térmicas por análisis termogravimétrico (TGA). Debido al potencial de este copolímero procesado en forma de fibras para su aplicación en la construcción de andamios celulares para la ingeniería de tejidos, se realizó una evaluación de citotoxicidad “*in vitro*”, usando fibroblasto dérmicos humanos, de la línea celular CCD-1112Sk. Los resultados de este trabajo indican que el material propuesto es un potencial candidato para su aplicación en el área biomédica.

## ABSTRACT

The synthesis and characterization of a material as a liquid polymer, which is composed of units of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) [PHEMA] and poly (vinyl pyrrolidone) [PVP] to render the copolymer PHEMA-co-PVP; were carried out in this research project. For the synthesis, the monomers 2-hydroxyethyl methacrylate [HEMA] and N-vinylpyrrolidone [NVP] (3: 1 ratio) were polymerized by a free-radical chain reaction, using hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as the initiating agent. Once isolated and purified, polymer solutions were prepared by dissolving the PHEMA-co-PVP liquid copolymer in DMF or ethanol. Subsequently these liquid formulations were processed by the electrospinning technique to obtain fibers. The electrospinning voltage was fixed at 20 kV, while the other typical parameters of the electrospinning process, such as distance and injection speed, were adjusted until obtaining fibrous materials. The resulting materials were evaluated and characterized in their chemical composition by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray photoelectronic spectroscopy (XPS); in its morphology by scanning electron microscopy (SEM); and in its thermal properties by thermogravimetric analysis (TGA). Due to the potential of this fiber-processed copolymer for application in the construction of cellular scaffolds for tissue engineering, an “*in vitro*” cytotoxicity evaluation was performed using human dermal fibroblasts, CCD-1112Sk cell line. The results of this work indicate that the proposed material is a potential candidate for its application in the biomedical area

## TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
Portada.....	1
Dedicatoria.....	3
Agradecimientos.....	4
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Tabla de contenidos.....	8
Lista de figuras.....	10
Lista de tablas.....	13
I. Introducción.....	14
II. Justificación.....	16
III. Hipótesis.....	17
IV. Objetivos.....	18
V. Marco teórico y antecedentes.....	18
• V.I Polímeros .....	18
• V.I.I Homopolímeros y copolímeros.....	19
• V.I.II Polímeros lineales, ramificados y entrecruzados.....	21
• V.I.III Hidrogeles.....	22
V.II Procesamiento de polímeros por la técnica de electrohilado.....	22
• V.II.I Variables de control en la técnica de electrohilado.....	24
• V.II.II Principales aplicaciones de las fibras electrohiladas.....	28
V.III Ingeniería de tejidos.....	30
• V.III.I Las fibras electrohiladas en la ingeniería de tejidos.....	31
V.IV PHEMA y PVP.....	32
• V.IV.I Polimerización de HEMA y NVP.....	33
• V.IV.I.I Mecanismo de polimerización en cadena.....	34

• V.IV.II Parámetros de la copolimerización.....	35
• V.IV.II.I Antecedentes de reactividad en copolímero de PHEMA/PVP.....	37
• V.IV.III Electrohilado de PHEMA y PVP.....	38
VI. Metodología.....	40
• VI.I Materiales.....	40
• VI.II Purificación de monómeros.....	41
• VI.III Síntesis de copolímeros PHEMA-co-PVP.....	41
• VI.IV Purificación de copolímero y obtención del grado de conversión.....	41
• VI.V Síntesis de homopolímeros.....	42
• VI.VI Preparación de disoluciones poliméricas de copolímero PHEMA-co-PVP.....	42
• VI.VII Electrodeposición de copolímero PHEMA-co-PVP.....	42
• VI.VIII Entrecruzamiento de fibras de copolímero PHEMA-co-PVP.....	43
• VI.IX Caracterización de materiales.....	43
• VI.IX.I Microscopía óptica y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	43
• VI.IX.II Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier con aditamento de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR).....	44
• VI.IX.III Espectroscopía de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X (XPS).....	44
• VI.IX.IV Caracterización termogravimétrica de los materiales.....	44
• VI.IX.V Ensayo de citotoxicidad.....	45
VII. Resultados y discusión.....	45
• VII.I Copolímero PHEMA-co-PVP (síntesis, purificación y grados de conversión).....	45
• VII.II Electrohilado de PHEMA-co-PVP.....	49
• VII.III Caracterización microscópica de materiales.....	51
• VII.IV Caracterización de materiales por FTIR-ATR.....	60
• VII.V Caracterización termogravimétrica.....	60
• VII.VI Caracterización química por XPS.....	63
• VII.VII Evaluación de citotoxicidad.....	66
VIII. Conclusiones.....	69
IX. Referencias bibliográficas.....	71
X. Anexos.....	88
• X.I Técnicas de caracterización.....	88
• X.I.I XPS.....	88
• X.I.II FTIR.....	89
• X.I.III SEM.....	90
• X.I.IV.TGA.....	92
• X.I.V. Ensayo de proliferación celular.....	94
• Glutaraldehído.....	94

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b>	Estructura química de los monómeros y sus correspondientes productos poliméricos para: (a) PHEMA; y (b) PVP. Se representan en la figura elementos importantes de los polímeros como son grado polimerización y unidad repetitiva.	19
<b>Figura 2</b>	Estructura química de algunos homopolímeros.	20
<b>Figura 3</b>	Formación de copolímero a partir de monómeros HEMA y NVP.	20
<b>Figura 4</b>	Representación esquemática de organización de copolímeros con ordenamiento: (a) alternada; (b) aleatoria; (c) en bloque; y (d) copolímero de injerto.	21
<b>Figura 5</b>	Representación esquemática de los diferentes ordenamientos en las cadenas de polímeros lineales, ramificados y entrecruzados.	21
<b>Figura 6</b>	Sistemas comunes de electrohilado compuestos de una fuente de voltaje, un sistema de inyección con jeringa y un sistema colector: configuración horizontal de colector plano (a) y configuración horizontal con colector cilíndrico rotatorio (b).	24
<b>Figura 7</b>	Imágenes digitales que muestran los tres estados de deformación de la gota de PVP, bajo la influencia de un incremento de campo eléctrico.	25
<b>Figura 8</b>	Esquema de aplicaciones de las fibras poliméricas fabricadas por la técnica de electrohilado.	29
<b>Figura 9</b>	Disciplinas que conforman o aportan a la ingeniería tisular o de tejidos.	30
<b>Figura 10</b>	Síntesis de polietileno a partir de etileno por polimerización por crecimiento en cadena-poliadición.	34
<b>Figura 11</b>	Mecanismo de polimerización por reacción en cadena. $I_2$ es el agente iniciador; I es la especie activa (radical libre); M es el monómero; P es la cadena en propagación; S es el agente de transferencia; $M_n$ y $M_m$ son las macromoléculas formadas; y k representa la constante de cada proceso.	34
<b>Figura 12</b>	Mecanismo de copolimerización: propagación de reacción en cadena, considerando uniones del monómero A o B a su propio homopolímero, y las uniones combinadas o cruzadas.	35
<b>Figura 13</b>	Esquema de estructuras probable de copolímeros de PHEMA/PVP, el cual contiene bloques de HEMA con inclusiones aisladas de NVP entre dichos bloques.	38
<b>Figura 14</b>	Indicadores de publicaciones en revistas internacionales de	

	investigaciones relacionadas con fabricación de fibras por electrohilado usando PVP (a-b) y PHEMA (c-d).	40
<b>Figura 15</b>	Esquema del ensamble y componentes del sistema de destilación a presión reducida utilizado para la purificación de NVP y HEMA.	41
<b>Figura 16</b>	Sistema de electrohilado utilizado para esta investigación. Sistema ubicado en ECITEC Valle de las Palmas.	43
<b>Figura 17</b>	Porcentaje de conversión de monómeros en el copolímero PHEMA-co-PVP, como función del tiempo de reacción, a 50°C. A partir de los 80 min se presenta la formación de hidrogeles o sólidos insolubles.	48
<b>Figura 18</b>	Viscosidad de la mezcla (monómeros y copolímero en crecimiento) en función del tiempo de reacción de polimerización, a 50°C.	48
<b>Figura 19</b>	Imagen obtenida por microscopía óptica de los materiales $CE_{DMF-20}$ formados después de su procesamiento por electrohilado.	53
<b>Figura 20</b>	Micrografías SEM de $CE_{DM-20}$ procesado por electrohilado a diferentes magnificaciones: x2,000 (a), x3,000 (b), x5,000 (c), x10,000 (d) y x20,000 (e).	55
<b>Figura 21</b>	Micrografía SEM de los materiales $CE_{Et}$ conteniendo 15% del copolímero PHEMA-co-PVP, con diferentes concentraciones de NaCl: (a-c) 2.0% de NaCl ( $CE_{Et-15:2}$ ); (d-f) 4.0% de NaCl ( $CE_{Et-15:4}$ ); y (g-i) 6.0% de NaCl ( $CE_{Et-15:6}$ ).	56
<b>Figura 22</b>	Micrografía SEM de material $CE_{Et-15:6}$ formado sobre malla de polipropileno.	56
<b>Figura 23</b>	Micrografías SEM de los materiales $CE_{Et}$ conteniendo 20% del copolímero PHEMA-co-PVP, con diferentes concentraciones de NaCl: NaCl; (a-c) 2.0% de NaCl ( $CE_{Et-20:2}$ ); (d-f) 4.0% de NaCl ( $CE_{Et-20:4}$ ); y (g-i) 6.0% de NaCl ( $CE_{Et-20:6}$ ).	57
<b>Figura 24</b>	Micrografías SEM de los materiales $CE_{Et}$ conteniendo 25% del copolímero PHEMA-co-PVP, con diferentes concentraciones de NaCl: NaCl; (a) 2.0% de NaCl ( $CE_{Et-25:2}$ ); (b) 4.0% de NaCl ( $CE_{Et-25:4}$ ); y (c) 6.0% de NaCl ( $CE_{Et-25:6}$ ).	58
<b>Figura 25</b>	Espectro FTIR-ATR de monómeros HEMA (a) y VP (b), y de copolímero PHEMA-co-PVP en diferentes presentaciones: (c) sin purificar [CM], (d) purificado [C] y (e) electrohilado [ $CE_{DMF-20}$ ].	61
<b>Figura 26</b>	Termograma de descomposición en peso en función de la	62

temperatura para monómeros HEMA (a) y VP (b), y de copolímero PHEMA-co-PVP en diferentes presentaciones: (c) sin purificar [CM], (d) purificado [C] y (e) electrohilado [ $CE_{DMF-20}$ ].

<b>Figura 27</b>	Espectro XPS de baja resolución para la muestra $CE_{Et-20:4}$ .	63
<b>Figura 28</b>	Espectro XPS de alta resolución para muestra $CE_{Et-20:4}$ . Se muestra la contribución de las señales de: oxígeno (a), carbono (b), nitrógeno (c), sodio (d) y cloro (e).	65
<b>Figura 29</b>	Resultados obtenidos del ensayo de proliferación celular MTS para diferentes muestras. En esta gráfica se encuentran dos controles uno positivo (DMSO) y otro negativo. Las muestras con denominación "g" establece que fueron tratadas con glutaraldehído para su recolección, anterior al ensayo de citotoxicidad. La puntuación "*" denota diferencia significativa baja en el análisis estadístico, mientras que "***" diferencias medianamente significativa y "****" diferencia significativa alta, entre las muestras analizadas y el control de muerte celular.	68
<b>Figura 30</b>	Descripción ilustrada del efecto fotoeléctrico presente en el análisis por XPS.	88
<b>Figura 31</b>	Conformación común de un Espectrómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier.	90
<b>Figura 32</b>	Conformación común de un Microscopio Electrónico de Barrido, este equipo fue facilitado por el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM (CNyN) para el análisis correspondientes a las muestras.	92
<b>Figura 33</b>	Esquema del sistema de TGA.	93
<b>Figura 34</b>	Estructura química de glutaraldehído. Este compuesto será usado como agente entrecruzante de las fibras poliméricas obtenidas por electrohilado del copolímero poli (HEMA-co-NVP).	94

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1</b>	Parámetros del proceso de electrohilado y las características que aportan o afectan en la formación de fibras poliméricas. El símbolo ↑ indica un aumento en la variable, mientras que el símbolo ↓ se refiere a una disminución en el parámetro.	29
<b>Tabla 2</b>	Variables de electrohilado de copolímero PHEMA-co-PVP, procesado a un voltaje de 20 kV, con una punta de jeringa de 0.25 mm y un tiempo de procesamiento de 30 min. “C” denota al copolímero PHEMA-co-PVP, “E” corresponde al copolímero que fue procesado por electrohilado, “M” indica que el copolímero no fue purificado previo al procesamiento de electrohilado, “x” hace referencia al disolvente (DMF o Et), “y” indica el porcentaje de copolímero en la disolución, y “z” se refiere al porcentaje de NaCl en la disolución.	52
<b>Tabla 3</b>	Resultados de transiciones térmicas y generación de residuos en determinaciones TGA de los materiales que hacen parte de esta investigación.	63
<b>Tabla 4</b>	Porcentajes de composición elemental estimadas de resultados XPS para las muestras CE <sub>Et-20:4</sub> .	64
<b>Tabla 5</b>	Valores de P obtenidos para el análisis de muestras de homopolímeros (PHEMA y PVP) y fibras electrohiladas CE <sub>DMF</sub> y CE <sub>Et</sub> .	68

## I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo que se ha evidenciado en el campo de los materiales ha sido muy significativo para el avance tecnológico de las últimas décadas, siendo dicho progreso, en coordinación con las necesidades que afronta la sociedad moderna, el principal impulsor para la búsqueda de nuevos y mejores materiales. De manera similar, la implementación de nuevas técnicas experimentales y su posterior escalamiento a nivel de producción industrial, hoy es impulsada por la demanda y competencia que ha surgido en el campo de los materiales. Por ello, actualmente se necesita de materiales cuyas propiedades sean concertadas a la medida de los requerimientos de la aplicación. Por todo lo anterior, la producción de nuevos materiales -o el mejoramiento de los ya disponibles- debe ser una práctica encaminada hacia la solución de los problemas considerados como prioritarios. Entre los cuales se encuentra: el manejo y la producción de energía, el almacenaje, el perfeccionamiento de reacciones químicas por medio de la catálisis heterogénea, la salud pública, el medio ambiente, entre otros. En todos estos aspectos, los materiales desempeñan un rol ya imprescindible.

Dentro del gran número de materiales que existen en la actualidad, algunos pueden considerarse como sobresalientes. De manera específica, durante las últimas décadas, los materiales poliméricos y los sistemas micro- y nanoestructurados han cobrado una significativa importancia y desempeñan un papel importante en las necesidades del mundo moderno. Una gran parte de materiales que se componen de sistemas tanto poliméricos como nanoestructurados, son usados en aplicaciones biomédicas como dispositivos implantables o sistemas de dosificación de fármacos, mientras que otros son utilizados como precursores para el diseño y construcción de catalizadores, entre otros. Sin embargo, los sistemas actuales de diseño y fabricación de estos materiales ha promovido la necesidad de potenciar sus aplicaciones incorporando nuevas propiedades que les permitan prevenir el desarrollo de infecciones producidas por microorganismos, incrementar su resistencia mecánica, o promover una respuesta específica al interactuar con el cuerpo humano, entre muchos otros (Luna, 2018).

En ese ámbito, cabe resaltar que con el surgimiento de las nanociencias y nanotecnología, ha sido notoria la necesidad de innovación tecnológica que promueva el desarrollo de nuevos materiales con mejores propiedades, a través de técnicas y metodologías que permitan su síntesis o faciliten su procesamiento a escalas de producción industrial. Entre estas destaca la técnica de electrohilado. Esta técnica ha despertado gran interés durante los últimos años debido a la posibilidad para fabricar fibras a micro- y nanoescala. Los materiales constituidos por este tipo de fibras han sido explorados para una gran variedad de aplicaciones, ya que esta técnica aporta características especiales como son: porosidad, amplia superficie por unidad de área, mejores propiedades biomédicas, entre otras (Kim 2017). Este tipo de propiedades hacen a estos materiales muy atractivos para aplicaciones biomédicas y biotecnológicas, entre las que se incluyen la ingeniería de tejidos, la fabricación de hilos de sutura, textiles y de elementos para cubrir heridas, la construcción de membranas de filtración y diversas aplicaciones médicas.

Las estrategias en ingeniería de tejidos para la construcción de andamios celulares se basan en que este tipo de estructura, que por lo general puede ser un polímero, proporciona un entramado que favorece la migración de células que utilizan dicha matriz para crear tejido. El uso de estos andamios se podría combinar entonces con células específicas obtenidas en cultivo celular con factores de crecimiento. Por lo tanto, un andamio debe ser no inmunogénico, no tóxico, biocompatible, biodegradable y de fácil manufactura (Loh y Choong, 2013). En consecuencia, el diseño y la construcción de un material ideal para su uso como andamio debe contener entonces una estructura interconectada por poros, que permita a las células migrar y funcionar dentro de estos confines, para que el tejido se regenere. De forma similar, debe proveer factores que estimulen la proliferación y diferenciación de células progenitoras u osteogénicas; y ser capaz de asimilar dentro tejido circundante, eliminando el potencial de contraer infecciones (Van Blitterswijk y de Boer, 2015). Entonces, la combinación de dos o más materiales para lograr este conjunto de características, es proyectada como estrategia eficiente para el diseño y síntesis de materiales para actuar como andamios.

Es aquí en donde la técnica de electrohilado sobresale por su versatilidad, ya que ha permitido procesar un amplio número de polímeros. No obstante, ésta técnica presenta una serie de variables que influyen significativamente en las características de los materiales a obtener, ya sea porque son inherentes a las características del polímero del cual se parte para realizar la síntesis, o bien porque su desempeño está relacionado con múltiples factores incluidos en el proceso.

En general, el principio de la técnica de electrohilado se basa en hacer girar soluciones poliméricas a través de altos campos eléctricos. Por lo tanto, su efectividad consiste en aplicar suficientes fuerzas eléctricas de tal forma que superen las fuerzas de la tensión superficial en la disolución del polímero. Así, a un voltaje determinado, finos flujos de disolución son expulsados desde el capilar de donde se inyecta la disolución polimérica, hacia un plato colector. De forma subsecuente, el flujo se mueve en la dirección del campo eléctrico, de manera que se elonga en función de las fuerzas externas e internas, lo que a su vez puede generar algunas inestabilidades en el proceso. Finalmente el disolvente se evapora y los segmentos de fibras son depositados de forma aleatoria u alineada, dependiendo del tipo de colector que se utilice (Chew, et al, 2006; Lipol y Rahman, 2016).

Es así como en el desarrollo experimental propuesto en este proyecto, el diseño y síntesis de un material polimérico con la capacidad de formar fibras poliméricas a través de la técnica de electrohilado, se destaca como una estrategia efectiva para la producción de materiales con características estructurales específicas que permiten controlar los grados de porosidad, hidrofiliidad y biodegradabilidad del producto. De esta manera, se pretende generar materiales con el potencial de actuar como andamios que favorezcan el crecimiento y proliferación de células específicas, y promuevan la regeneración de tejidos específicos, especialmente de piel o cartílago. Así, por la aplicación que se pretende abarcar con estos materiales, la metodología de síntesis propuesta involucra la combinación de dos polímeros que han demostrado una alta biocompatibilidad y baja citotoxicidad en aplicaciones biomédicas, como son el poli (2-hidroxietil metacrilato) [PHEMA] y el poli(N-

vinilpirrolidona) [PVP] (Arredondo y Londoño, 2009; Hung, et al, 2016). Adicionalmente, PHEMA se destaca por su alta hidrofiliidad, mientras que PVP aporta propiedades favorables para lograr la formación de fibras poliméricas por medio de electrohilado. Por consiguiente, el desarrollo de un copolímero PHEMA-co-PVP en estado líquido, a partir de la reacción de la mezcla de sus correspondientes monómeros; al igual que la optimización de las condiciones experimentales para obtener materiales compuestos por fibras; y la caracterización y evaluación citotóxica de dichos materiales; hacen parte de los objetivos de esta propuesta de investigación. En consecuencia, la contribución o novedad que aporta este proyecto consiste en sintetizar fibras por medio de la técnica de electrohilado, usando un copolímero sobre el que no se encuentra reportado este tipo de procesamiento. Caber resaltar que los productos generados en la ejecución de esta propuesta se encuentran dirigidos al sector biomédico que requieren del diseño y desarrollo de nuevos materiales con la capacidad para que actúen como soporte o andamio para la regeneración de tejidos blandos.

## II. JUSTIFICACIÓN

Hasta ahora, las fibras poliméricas electrohiladas han sido preparadas por aproximadamente 100 diferentes polímeros, incluyendo aquellos de origen sintético y natural. Todos estos materiales conformados por fibras también se han preparado por otras técnicas como la evaporación de disolvente o hilado de fundición. Sin embargo, incluso con el uso generalizado de la técnica de electrohilado, la afinación de este método es aún muy limitada a la hora de obtener materiales reproducibles y con control estricto en el diámetro de fibra y morfología (Haider et al., 2015). Por lo tanto, existe una gran área de oportunidad en la síntesis de fibras a partir de nuevas formulaciones poliméricas, encontrando condiciones reproducibles y usando sustancias químicas no tóxicas o procesos amigables con el ambiente.

Es evidente que las fibras electrohiladas juegan un papel ya primordial en el área de biomateriales. Los andamios construidos por fibras electrohiladas se pueden adaptar de acuerdo con el propósito de su uso. En esta aplicación, estos materiales actúan proporcionando un entorno adecuado a las células, lo que finalmente resulta en una mejor unión, proliferación y diferenciación (Haider et al, 2014; Ostrowska et al., 2014). Por lo tanto, todo esfuerzo enfocado en optimizar la técnica de electrohilado para impulsar el desarrollo de nuevos materiales con una proyección industrial, se considera sobresaliente e indispensable para la ingeniería de materiales.

Los tejidos de órganos complejos como el corazón, pulmón e hígado, aunque se han recreado con éxito en el laboratorio, aún se encuentran en fase de estudio y requieren de evaluaciones específicas antes de llegar a ser implantados en un paciente (NIBIB, 2013). Debido a ello, el desarrollo de materiales para su aplicación como andamios en la ingeniería de tejidos, presenta actualmente una enorme brecha de oportunidades de mejora en cuanto a su diseño, metodologías sintéticas, procesamiento, técnicas de análisis y escalamiento a niveles de producción industrial.

Los materiales poliméricos se han destacado significativamente en el campo biomédico, y su adaptabilidad representa aún una gran promesa para el futuro de la ingeniería de tejidos. Un gran número de polímeros presentan propiedades adecuadas para su uso como andamios, como son maleabilidad, adherencia, porosidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja toxicidad, entre otros. No obstante, el éxito en este tipo de aplicaciones depende en gran medida de factores como la estructura química del polímero, su composición, métodos de síntesis, copolimerización, procesado y manipulación, entre otros.

Por todo lo anterior, el presente trabajo de investigación busca la obtención de mezclas poliméricas en forma de copolímeros líquidos de HEMA y NVP. Estos dos polímeros se han caracterizado por ser biocompatibles y no citotóxicos en aplicaciones biomédicas. Adicionalmente, tanto los homopolímeros de HEMA como de NVP, han sido usados individualmente en la formación de fibras por la técnica de electrohilado. Sin embargo, copolímeros formados por estos dos monómeros no han sido utilizados para la síntesis de fibras por medio de electrohilado. Lo anterior destaca como el principal aporte de este trabajo de investigación. Por consiguiente, este trabajo documenta las condiciones experimentales para la preparación de copolímeros PHEMA-co-PVP por reacciones de polimerización en cadena iniciada por radicales libres, y la formación de fibras por la técnica de electrohilado, ajustando las variables del proceso, como son voltaje aplicado, velocidad y distancia de inyección, composición de la disolución, entre otros. Con los resultados obtenidos en esta investigación se espera que el copolímero PHEMA-co-PVP demuestre la capacidad para formar fibras con propiedades superiores a las reportadas por cada homopolímero, y ofrezca con ello, la visión de que este producto pueda ser comercializado en presentación de disoluciones poliméricas líquidas, que promuevan su exploración en futuras investigaciones que requieran síntesis y evaluación de fibras poliméricas en campos biomédicos.

### **III. HIPÓTESIS**

La polimerización de una mezcla de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) y N-vinilpirrolidona (NVP), bajo condiciones controladas de reacción en cadena por radicales libres, conducirá a la formación del copolímero PHEMA-co-PVP, en estado líquido y con las propiedades adecuadas para formar fibras por medio de la técnica de electrohilado. Por las propiedades hidrofílicas, biocompatibles, biodegradables, y de adhesión que presentan los componentes del copolímero, se espera que las fibras que resulten de su combinación, presenten las cualidades que pudieran tener una potencial aplicación como andamios en la ingeniería de regeneración de tejidos.

## IV. OBJETIVOS

### IV.I. Objetivo general

- Sintetizar el copolímero líquido a partir de la combinación de los monómeros 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) y N-vinilpirrolidona (NVP), para lograr la formación de fibras al procesar dicho copolímero por medio de la técnica de electrohilado; evaluar la citotoxicidad del material para determinar su potencial aplicación en la construcción de andamios para la ingeniería de regeneración de tejidos.

### IV.II. Objetivos específicos

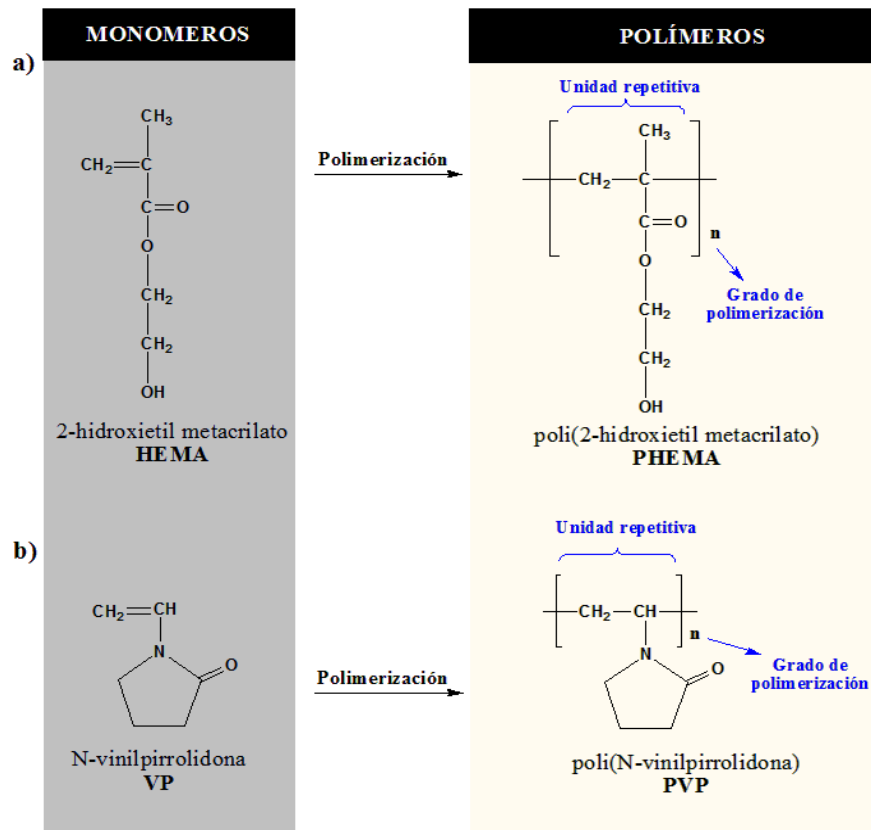
- Determinar la metodología de síntesis y purificación del copolímero PHEMA-co-PVP, usando la polimerización en cadena, iniciada por radicales libres, y optimizando las condiciones de reacción hasta obtener un copolímero líquido con alta viscosidad.
- Determinar experimentalmente las condiciones óptimas para sintetizar fibras a partir de copolímeros de PHEMA-co-PVP, mediante la técnica de electrohilado, variando composición de mezcla, disolvente, voltaje, velocidad, tiempo y distancia de inyección.
- Realizar el entrecruzamiento químico de las fibras de PHEMA-co-PVP, para lograr mejorar las propiedades de manipulación y reducir la solubilidad de las fibras en medios acuosos.
- Analizar los materiales conformados por fibras de los copolímeros PHEMA-co-PVP, en su composición química por espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) e infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR); su morfología por microscopía de barrido electrónico (SEM); y sus propiedades térmicas por análisis termogravimétrico (TGA).
- Evaluar la citotoxicidad de las fibras del copolímero PHEMA-co-PVP, usando protocolos preestablecidos para el análisis de materiales potencialmente aplicables en el sector biomédico.

## V. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

### V.I. Polímeros

La palabra “*polímero*” deriva del griego, exactamente de la suma de dos elementos como son el prefijo “*poli-*”, que es equivalente a “*muchos*”, y el sustantivo “*meros*”, que puede traducirse como “*partes*”. Por lo tanto, los polímeros se consideran macromoléculas constituidas por la unión de un número grande de moléculas más pequeñas. Estas moléculas, que se combinan entre sí covalentemente para formar las cadenas del polímero, se denominan

monómeros, y el proceso químico mediante el cual estos monómeros se unen se denomina polimerización. El grado de polimerización de un polímero indica el número de unidades constitutivas repetitivas que tiene una cadena de polímero (Odián 2004). Es común relacionar a los polímeros con compuestos que presentan altos pesos moleculares. En la **Figura 1** se representan algunos elementos característicos de los polímeros, y se esquematiza su organización estructural química, usando como ejemplo el PVP y PHEMA, los cuales hacen parte de esta investigación.



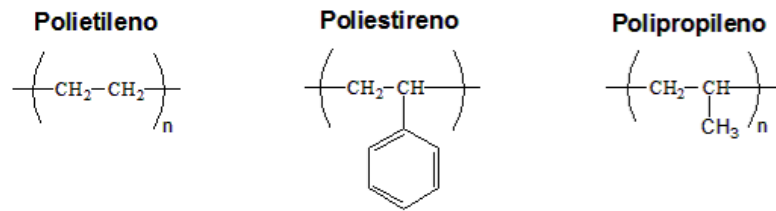
**Figura 1.** Estructura química de los monómeros y sus correspondientes productos poliméricos para: (a) PHEMA; y (b) PVP. Se representan en la figura elementos importantes de los polímeros como son grado de polimerización y unidad repetitiva.

Dependiendo de su origen, los polímeros pueden ser de origen sintético o natural. Los sintéticos contienen, por lo general, entre uno y tres tipos de diferentes unidades que se repiten. Por su lado, los naturales presentan estructuras mucho más complejas, como sucede en el ADN, las proteínas y la celulosa, entre otros.

### V.I.I. Homopolímeros y copolímeros.

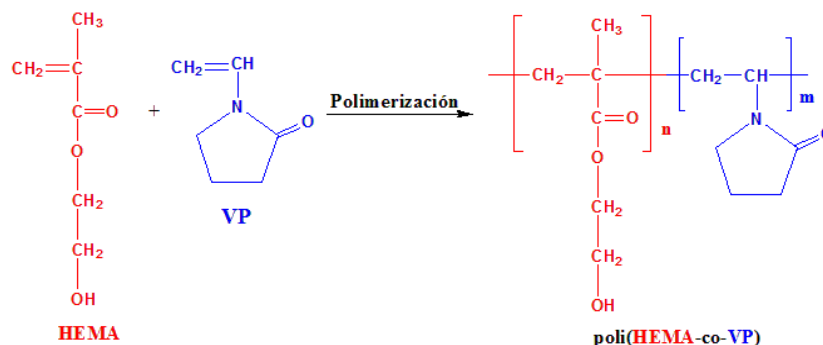
Se denomina homopolímero a las macromoléculas compuestas por un solo tipo de unidades constitutivas repetitivas, las cuales se unen a través de un mecanismo de polimerización único. Algunos ejemplos típicos de homopolímeros son: polietileno (PE), poliestireno (PS) y polipropileno (PP), cuyas estructuras químicas se muestran en la **Figura 2**. De forma similar,

los polímeros PVP y PHEMA (**Figura 1**), son también homopolímeros, ya que se componen de una sola unidad monomérica que corresponden a NVP y HEMA, respectivamente.



**Figura 2.** Estructura química de algunos homopolímeros.

Es posible sintetizar polímeros con más de un tipo de unidad repetitiva, es decir, que las cadenas tengan distintos constituyentes. Cuando una cadena se forma con dos tipos de unidades el material se denomina copolímero; para tres constituyentes diversos se llama terpolímero; para cuatro unidades distintas, cuaterpolímero, etc. Un ejemplo de copolímero se ilustra en la **Figura 3**, usando como monómeros NVP y HEMA. El orden de estos monómeros en la estructura del polímero puede ser muy variable. En el caso de los copolímeros se puede tener: copolímeros alternados, al azar o aleatorios, en bloque y de injerto.



**Figura 3.** Formación de copolímero a partir de monómeros HEMA y NVP.

### Copolímeros alternados.

En esta clase de copolímeros, las unidades repetitivas se alternan consecutivamente a lo largo de toda la cadena. En la **Figura 4.a** se esquematiza el orden de las unidades de un copolímero en su forma alternada, considerando las unidades repetitivas hipotéticas A y B.

### Copolímeros al azar o aleatorios.

Para estos no existe una secuencia definida en el ordenamiento de las unidades repetitivas a lo largo de la cadena (**Figura 4.b**).

### Copolímeros en bloque.

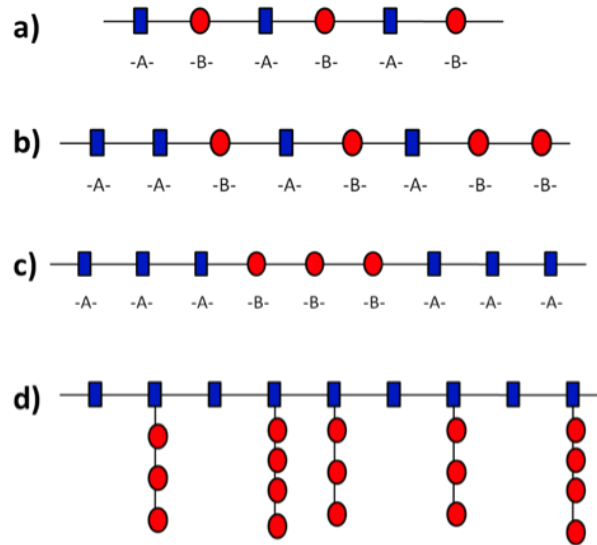
Se comprenden de secuencias completas de una sola de las unidades repetitivas, seguidas por secuencias completas de la otra unidad repetitiva (**Figura 4.c**).

### Copolímeros de injerto.

Estos presentan una cadena principal constituida por un solo tipo de unidad repetitiva, que tiene injertados lateralmente bloques de cadenas conformadas por el otro tipo de unidad repetitiva (**Figura 4.d**).

### **V.I.II. Polímeros lineales, ramificados y entrecruzados**

Frecuentemente, y para efectos didácticos, las cadenas que componen a los polímeros, tanto homopolímeros como copolímeros, son representadas como trazos continuos, tal como en la **Figura 5**.



**Figura 4.** Representación esquemática de organización de copolímeros con ordenamiento: (a) alternada; (b) aleatoria; (c) en bloque; y (d) copolímero de injerto.

Con ese mismo enfoque, se puede reconocer a los polímeros lineales como aquellos en que los monómeros se han unido en una longitud continua para formar las cadenas del polímero. Por su parte, los polímeros ramificados serían los que tienen cadenas secundarias que están unidas a la cadena principal, mientras que los polímeros entrecruzados serían los que tienen dos o más cadenas unidas por cadenas secundarias. El proceso de entrecruzamiento puede ser producido por reacciones químicas o por el uso de fotones o radiación de alta energía.



**Figura 5.** Representación esquemática de los diferentes ordenamientos en las cadenas de polímeros lineales, ramificados y entrecruzados.

Cuando los polímeros contienen grupos hidrofílicos, es decir grupos químicos que interactúan con el agua, el polímero se caracteriza por su alta solubilidad o por aumentar de tamaño absorbiendo grandes cantidades de dicho disolvente. La capacidad de absorción de agua dependerá de si la estructura del polímero es lineal, ramificada o entrecruzada.

### **V.I.III. Hidrogeles**

Los materiales conocidos como hidrogeles son redes poliméricas compuestas de polímeros hidrofílicos, con la capacidad de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos, sin disolverse bajo condiciones fisiológicas (Bhattacharai, et al, 2010). Éstos fueron los primeros materiales diseñados para su uso en el cuerpo humano y son reconocidos por su aplicación en la carga y liberación de fármacos, revestimiento de suturas, sensores, sustitutos de piel, entre otros. Estos materiales pueden ser clasificados según la naturaleza de sus uniones en la conformación de la estructura entrecruzada, en físicos (uniones débiles, generadas por las interacciones de los grupos funcionales que conforman la molécula), o químicos (la red se encuentra formada a través de enlaces covalentes). Por lo tanto, la capacidad de hinchamiento o la solubilidad de estos materiales depende de su grado o densidad de entrecruzamiento: una densidad de entrecruzamiento muy baja puede llegar a generar polímeros solubles, mientras que un grado de hinchamiento alto reduce su solubilidad pero a su vez puede disminuir su capacidad de absorción de agua. Por lo regular, los hidrogeles con altos grados de hinchamiento presentan propiedades de adhesión significativas.

De manera general, la solubilidad en agua o en otros disolventes orgánicos para algunos polímeros (incluyendo los lineales, ramificados y con baja densidad de entrecruzamiento), es un factor determinante que les permite ser procesados por diferentes técnicas (Soto y Oliva, 2012), entre las cuales se destaca la de electrohilado.

### **V.II. Procesamiento de polímeros por la técnica de electrohilado**

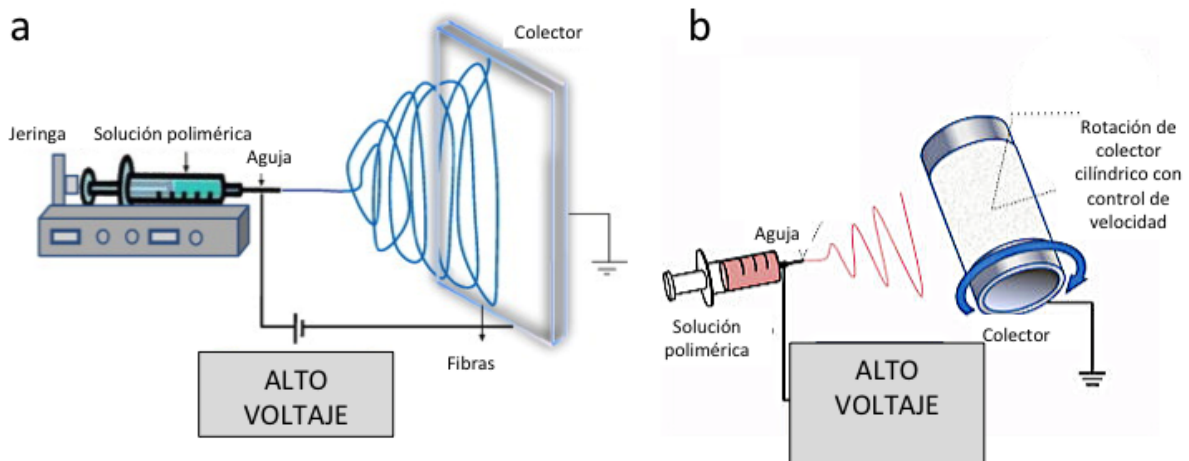
La técnica de electrohilado consiste en utilizar fuerzas eléctricas para producir fibras poliméricas con diámetros que van desde los 2 nm hasta varios micrómetros. Para ello utiliza disoluciones poliméricas que pueden ser de polímeros naturales o sintéticos (Sánchez, et al, 2013). Esta técnica ha ganado mucha atención dentro de la última década, no sólo por su versatilidad en cuanto al hilado de una amplia gama de polímeros, sino también por su capacidad de producción constante de fibras (Garg y Bowlin, 2011). Es así como las fibras generadas por este enfoque se destacan por presentar poros más pequeños y dispersión modulable, maleabilidad para adaptarse a diversos tamaños y formas, capacidad de control de composición química, y una relación superficie/volumen mayor, comparadas con las fibras comunes (Liang et al., 2007).

El electrohilado tiene sus orígenes muchos años atrás. Los fenómenos propios del *electrospray* fue observado por primera vez en 1897 por Rayleigh, luego estudiado en detalle por Zeleny en 1914, aplicarlo en fenómenos de electroaspiración, y finalmente patentado por Formhals en el año 1934. En sus trabajos, Formhals logró la producción de filamentos de polímeros utilizando una fuerza electrostática (Huang et al., 2003). Entre ellos se resalta la

primera patente (Patente 2116942) sobre electrohilado, en la que se produjeron fibras de acetato de celulosa a voltajes de 57 kV. Aunque a este trabajo le siguieron otra serie de patentes publicadas entre 1938 y 1940 (Patentes 2116942, 2160962 y 2187306), fue en el trabajo reportado por Taylor en 1969 (Sánchez, et al, 2013) en donde se sentaron las bases para el electrohilado. Aquel estudio de Taylor se basó en el estudio de chorros accionados eléctricamente. Es así entonces como surge el término electrohilado, que se deriva del fenómeno de “giro electrostático”, convirtiéndose en el término que se utiliza de manera generalizada, desde alrededor de 1994, aunque la técnica como tal tiene su origen hace alrededor de 85 años. No obstante, cabe resaltar que hasta el año de 2004, cerca de 50 patentes de polímeros procesados por electrohilado se habían reportado (Li y Xia, 2004).

Por lo general, el sistema de electrohilado se compone de tres partes principales: (i) un capilar a través del cual debe ser expulsada la disolución polimérica (aguja, cono, etc); (ii) un plato colector que puede ser una lámina de metal conductor, un mandril rotativo, etc., y (iii) una fuente de alto voltaje (en el rango de los kilo volts [kV]) que posee dos electrodos los cuales deben conectarse uno al lugar de salida de la disolución y otro directamente al plato colector, en el cual se depositarán las fibras posterior a la evaporación del disolvente estimulada por el voltaje aplicado (**Figura 6**) (Amalvy, 2013).

El proceso de electrohilado comienza cuando las cargas eléctricas se mueven dentro de la disolución polimérica mediante la aguja metálica. Esto causa una inestabilidad en el interior de la disolución dando como resultado la inducción de cargas en la gota del polímero. Al mismo tiempo, la repulsión recíproca de las cargas produce una fuerza que se opone a la tensión superficial y últimamente la disolución del polímero fluye en dirección del campo eléctrico. En otras palabras, los sistemas de electrohilado aprovechan el establecimiento de fuerzas electrostáticas entre los polímeros para producir fibras finas (en el orden nanométrico o micrométrico) a partir de disoluciones, mezclas y/o fundiciones de polímeros. Por lo tanto, un aumento adicional en el campo eléctrico causa que la gota esférica se deforme y asuma una forma cónica. En esta etapa, las nanofibras ultrafinas emergen de la gota cónica del polímero (cono de Taylor), que son recogidas en el colector metálico manteniendo optimizada la distancia. Un salto de carga estable sólo puede formarse cuando la disolución polimérica tiene suficiente fuerza de cohesión. Durante el proceso, las fuerzas de carga internas y externas causan el batido del líquido en dirección al colector. Este movimiento de batido permite a las cadenas del polímero dentro de la disolución estirarse y deslizarse una tras otra, lo que resulta en la formación de fibras con diámetros pequeños (Bae et al., 2013; Haider et al., 2013).



**Figura 6.** Sistemas comunes de electrohilado compuestos de una fuente de voltaje, un sistema de inyección con jeringa y un sistema colector: configuración horizontal de colector plano(a) y configuración horizontal con colector cilíndrico rotatorio (b). (Adaptado de Bhardwaj y Kundu 2010; y Rim et al., 2013).

Es necesario un voltaje de corriente directa en el rango de decenas de kV para generar el electrohilado, ya que su funcionamiento se basa en el principio de que mayores fuerzas de repulsión eléctrica mutuas separan a las fuerzas de tensión superficial más débiles en la disolución de polímero cargado (Sánchez, et al., 2013). Es por ello que se requiere que la mayoría de los polímeros sean disueltos en algunos disolventes específicos antes de iniciar el proceso de electrohilado. Otra condición necesaria para lograr la formación de fibras por medio de esta técnica, es que la disolución polimérica debe lograr fluir a través del tubo capilar (aguja de jeringa) por el que se realizará la inyección hacia el plato colector (Amalvy, 2013). La distancia entre el plato colector y el capilar, la velocidad de inyección y la composición de la disolución polimérica, entre otros factores, son variables importantes en el proceso de electrohilado. De manera general, cabe resaltar que el electrohilado es un proceso que se puede llevar a cabo a temperatura ambiente, bajo condiciones normales de presión, aunque para algunos casos es muy importante establecer un control de la temperatura para fundir un polímero, o de humedad del ambiente en el que se está procesando el polímero.

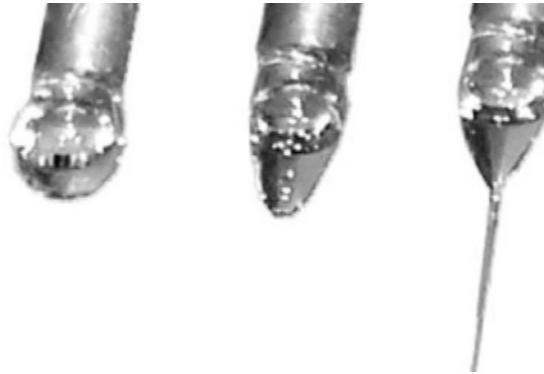
### V.II.I. Variables de control en la técnica de electrohilado

Existen factores críticos que afectan el proceso de electrohilado. Estos factores son clasificados en parámetros de electrohilado, disolución y parámetros ambientales. Los parámetros de electrohilado incluyen el campo eléctrico aplicado, la distancia entre la jeringa y el colector, el rango de flujo, y el diámetro de la jeringa. Los parámetros de disolución incluyen el disolvente, la concentración del polímero, viscosidad y conductividad de la disolución. Los parámetros ambientales incluyen la humedad relativa y la temperatura. Todos estos parámetros afectan directamente la generación de fibras electrohiladas suaves y sin la formación de partículas (perlas poliméricas). Por lo tanto, para poder entender mejor la técnica de electrohilado y la fabricación de nanofibras poliméricas, es esencial conocer a fondo los efectos de todos estos parámetros (Haider et al., 2015).

### **Efecto del voltaje aplicado**

Generalmente, se ha reportado que el flujo de corriente proveniente del alto voltaje suministrado en una disolución, a través de una aguja metálica, causa que una gota esférica se deforme en un cono Taylor y forme nanofibras ultrafinas a un voltaje crítico (**Figura 7**) (Laudenslager y Sigmund 2012). Este valor crítico de voltaje aplicado varía de polímero a polímero. La formación de nanofibras de pequeños diámetros con un incremento del voltaje aplicado, es atribuido a la extensión de la disolución polimérica en correlación con la carga de repulsión dentro del chorro del polímero (Sill y von Recum 2008).

El incremento en el voltaje aplicado más allá del valor crítico resulta en la formación de perlas o nanofibras perladas. El aumento en el diámetro y la formación de perlas o nanofibras perladas con el incremento del voltaje aplicado son atribuidos a una disminución en el tamaño del cono de Taylor y al aumento de la velocidad de chorro en el mismo rango de flujo. En algunos trabajos de investigación se ha reportado que el diámetro de las nanofibras incrementa con el aumento del voltaje aplicado. Este incremento en el diámetro ha sido atribuido al aumento de la longitud del chorro (Duque, et al, 2013; Narvaez, 2017).



**Figura 7.** Imágenes digitales que muestran los tres estados de deformación de la gota de PVP, bajo la influencia de un incremento del campo eléctrico (Laudenslager y Sigmund 2012).

### **Efecto de la velocidad de flujo de la disolución**

El flujo de la disolución polimérica a través de la aguja metálica determina la morfología de las nanofibras electrohiladas. Una fibra electrohilada uniforme y sin perlas podría prepararse a través de un índice de flujo crítico para una disolución polimérica. Este valor crítico varía con el polímero. Así, con el incremento de la velocidad de flujo por encima del valor crítico, se puede generar la formación de perlas (Narvaez, 2017). Lo anterior debido a que los aumentos y disminuciones en el índice de flujo afectan la formación y diámetro de nanofibras. En consecuencia, se prefiere un índice de flujo mínimo para lograr mantener un equilibrio entre la disolución polimérica que sale y el reemplazo de ese volumen de disolución por una nueva, durante la formación del chorro. Esto también permitirá la formación de un cono de flujo estable y, a veces, un flujo retrocedido (que sale directamente del interior de la aguja sin gotas o cono aparentes). Los flujos retenidos no son estables, y durante el proceso de electrohilado, éstos son reemplazados continuamente por flujos de cono. Como resultado de este fenómeno, se forman fibras con un amplio rango de diámetros

(Shamim et al., 2012). La formación indeseada de perlas y listones como estructuras con el incremento de la velocidad de flujo es atribuido a la no evaporación del disolvente y a una baja extensión de la disolución en el viaje entre aguja-colector metálico. Al mismo efecto también se le adiciona el aumento del diámetro de la fibra cuando se presenta un incremento de la velocidad de flujo. (Li y Wang 2013).

La formación de gotas o perlas también se atribuye a la influencia de la fuerza gravitacional (Shamim et al., 2012). Otro factor importante que puede causar defectos en la estructura de la fibra es la densidad de carga superficial, ya que esto afecta directamente la morfología de la fibra (Duque, et al 2013).

### **Efecto de la distancia entre aguja-colector y el diámetro de la aguja**

La distancia entre la punta de la aguja metálica y el colector juega un rol esencial en la determinación de la morfología de la fibra electrohilada, de forma similar a como ocurre con el campo eléctrico aplicado, viscosidad y velocidad de flujo. La morfología de una fibra puede verse fácilmente afectada por la distancia, ya que ésta depende del tiempo de depósito, el rango de evaporación e intervalo de inestabilidad (Matabola y Moutloali 2013). Numerosos grupos de investigación han estudiado el efecto de la distancia entre la punta de jeringa y el colector y concluyen que se forman fibras con defectos y aumentos en el diámetro cuando la distancia aguja-colector se mantiene corta, mientras que el diámetro de una fibra decrece cuando dicha distancia se aumenta (Matabola y Moutloali, 2013; Wang y Kumar, 2006).

### **Efectos de la concentración del polímero y viscosidad de la disolución**

El proceso de electrohilado se basa en el fenómeno del estiramiento uniaxial de un chorro cargado. Este estiramiento es significativamente afectado por el cambio en la concentración de la disolución polimérica. Por ejemplo, cuando la concentración de la disolución polimérica es baja, tanto el campo eléctrico aplicado como la tensión superficial causan el enredo de las cadenas del polímero, llevándolo a quebrarse en fragmentos, justo antes de alcanzar el colector (Haider et al., 2013; Pillay et al., 2013).

Estos fragmentos causan la formación de perlas o fibras que contienen perlas. Por lo tanto, es de esperar que un aumento en la concentración del polímero en la disolución, conduce al aumento en su viscosidad, lo que finalmente aumenta el enmarañamiento entre las cadenas del polímero al procesarse por esta técnica. Este enredo de cadenas supera la tensión superficial y finalmente resulta en una fibra electrohilada uniforme y sin perlas. Sin embargo, un aumento de la concentración del polímero por encima de un valor crítico, puede ocasionar que se obstaculice el flujo de la disolución entre la punta de la aguja, lo que puede resultar en una fibra defectuosa o aperlada (Reddy, 2013).

En cuanto a la morfología de las perlas, éstas presentan un cambio de forma que va desde un aspecto esférico, similar a una gota (con disoluciones de baja viscosidad), hasta un efecto de gota estirada o elipse (con disoluciones de alta viscosidad), a medida que se genera un cambio en la viscosidad de la disolución (Shamim et al., 2012).

### **Efecto de la conductividad de la disolución polimérica**

La conductividad de la disolución no sólo afecta la formación del cono de Taylor, sino que también ayuda a controlar el diámetro de las fibras. En una disolución con conductividad más baja, la superficie de la gota no tendrá suficiente carga para formar el cono de Taylor, lo que resulta en que no se producirá el electrohilado. En efecto, al incrementar la conductividad de la disolución por debajo del valor crítico, no sólo aumenta la carga en la superficie de la gota que forma el cono de Taylor, sino que también causa la disminución del diámetro de la fibra (Sun et al., 2014). En consecuencia, el aumento en la conductividad hacia valores superiores a un valor crítico, contribuyen a obstaculizar la formación del cono Taylor, y con ello, al proceso de electrohilado. Este fenómeno se puede explicar si se considera el proceso entero de electrohilado. Este proceso es dependiente de las fuerzas de Coulomb entre cargas de la superficie del fluido y la fuerza entre el campo eléctrico externo. Sin embargo, la formación del cono de Taylor es gobernado en gran parte por las fuerzas electroestáticas de las cargas superficiales formadas por la aplicación del campo eléctrico externo (cuando el componente del campo es tangencial a la superficie del fluido induce esta fuerza electrostática). La conductividad de una disolución de polímero podría entonces controlarse mediante la adición de una sal apropiada. Por lo tanto, la adición de sal afecta el proceso de electrohilado de dos maneras: (i) incrementa el número de iones en la disolución polimérica, lo que resulta en el aumento de la densidad de carga superficial en el fluido y de la fuerza electrostática generada por el campo eléctrico aplicado; y (ii) actúa incrementando la conductividad de la disolución polimérica, dando como resultado la disminución en el campo eléctrico tangencial a lo largo de la superficie del fluido. Sin embargo, cuando este campo eléctrico tangencial se reduce ampliamente con el aumento de la conductividad de la disolución, la fuerza electrostática a lo largo de la superficie del fluido disminuye, lo que afecta negativamente a la formación del cono Taylor. Las fuerzas Coulombianas y electrostáticas juntas influyen la elongación y adelgazan el flujo. La longitud de esta porción y el comportamiento de la región de chorro tiene una influencia significativa en el diámetro de las fibras (Angamma y Jayaram, 2011).

### **El rol del disolvente en el electrohilado**

La selección del disolvente es uno de los factores clave para la formación de una nanofibra electrohilada suave y sin perlas. Usualmente se necesitan dos cosas para tomar en cuenta a la hora de la selección del disolvente. Primero, los disolventes preferidos para el proceso de electrohilado contienen polímeros que son completamente solubles. Segundo, el disolvente debe tener un punto de ebullición moderado. Su punto de ebullición da una idea sobre la volatilidad de un disolvente. Generalmente, para esta técnica se utilizan disolventes volátiles, ya que sus altas tasas de evaporación fomentan la separación del disolvente de las fibras durante su trayecto desde la punta de la aguja hasta el colector. Sin embargo, los disolventes altamente volátiles se evitan principalmente porque sus bajos puntos de ebullición y altas tasas de evaporación causan el secado del chorro en la punta de la aguja. Este secado actúa bloqueando la punta de la aguja y, por lo tanto, dificultará el proceso de electrohilado. De manera similar, también se evitan los disolventes menos volátiles debido a que sus puntos de ebullición altos evitan su secado durante el vuelo del chorro de fibras. La deposición de fibras que contienen disolvente sobre el colector provocará la formación de nanofibras con cuentas o perlas (Narvaez, 2017). Numerosos grupos de investigación han estudiado los efectos del

disolvente sobre la morfología de las fibras (Kanani y Bahrami, 2011) y han concluido que, de forma similar al voltaje aplicado, el disolvente también afecta la homogeneidad o calidad de la fibra formada. Además, el disolvente también juega un papel vital en la fabricación de fibras altamente porosas. Esto puede ocurrir cuando se prepara una disolución de un polímero usando dos disolventes de diferente volatilidad. Para este caso, las diferentes velocidades de evaporación entre los dos disolventes conducirá a la separación de fases y, por lo tanto, dará como resultado la fabricación de fibras con morfologías altamente porosas (Narvaez, 2017).

### **Efecto de la humedad y la temperatura**

Recientemente se ha documentado que factores ambientales como la humedad relativa y la temperatura, también afectan el diámetro y la morfología de las fibras electrohiladas (Huan et al., 2015; Pelipenko et al., 2013).

La humedad causa cambios en el diámetro de las nanofibras al controlar el proceso de solidificación del chorro cargado. Sin embargo, este fenómeno depende de la naturaleza química del polímero. La humedad también juega un papel importante en la formación de fibras porosas cuando se usa el sistema de disolvente binario (Bae et al., 2013).

La temperatura causa dos efectos opuestos para cambiar el diámetro promedio de las fibras: (i) aumenta la tasa de evaporación del disolvente y (ii) disminuye la viscosidad de la disolución. Estos dos factores influyen por diferentes mecanismos, sin embargo, ambos conducen a una disminución en el diámetro medio de la fibra. Una observación similar fue reportada por Vrieze y colaboradores, usando acetato de celulosa (CA) y PVP (De Vrieze et al., 2009).

De forma generalizada, en la **Tabla 1** se resumen las características que aportan o afectan algunos de los parámetros que hacen parte del proceso de electrohilado, a la formación fibras poliméricas.

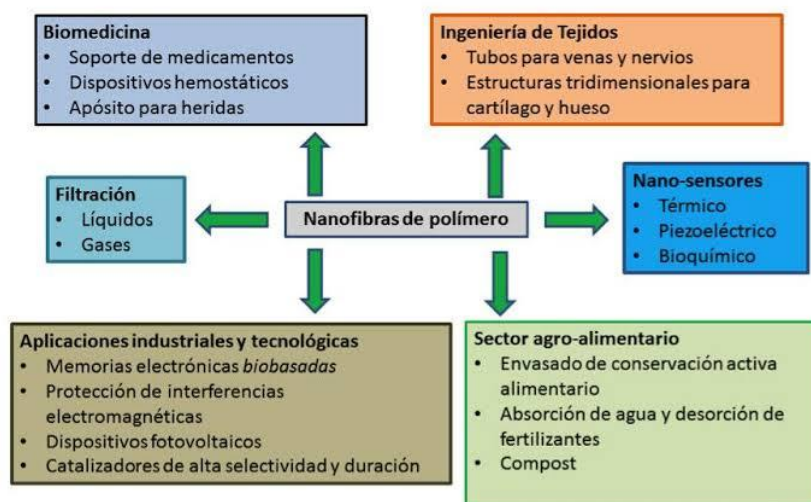
### **V.II.II. Principales aplicaciones de las fibras electrohiladas**

Recientemente un gran número de investigaciones se han comenzado a enfocar en buscar diversas aplicaciones para las fibras electrohiladas, ya que presentan ciertas ventajas conforme a otros materiales fibrosos. Entre dichas ventajas se encuentran: su alta relación superficie volumen, alta porosidad, y sus propiedades físicas y mecánicas. Cabe resaltar que estos aspectos pueden ser modificadas con la variación de los parámetros de electrohilado (Lipoh y Rahman, 2016).

Entre las aplicaciones de las fibras generadas por electrohilado destacan la fabricación de andamios para ingeniería de tejidos, generación de textiles, liberación controlada de fármacos, procesos de filtración, fabricación de membranas selectivas, inmovilización de enzimas, implantes vasculares, salud, biotecnología, ingeniería ambiental, defensa y seguridad, y almacenamiento energético (**Figura 8**).

**Tabla 1.** Parámetros del proceso de electrohilado y las características que aportan o afectan en la formación de fibras poliméricas. El símbolo ↑ indica un aumento en la variable, mientras que el símbolo ↓ se refiere a una disminución en el parámetro (Duque, et al, 2013).

<i>Parámetro</i>	<i>Característica que aporta</i>
Concentración de la solución de polímero	↑ Dificulta el paso de la solución a través del capilar.
	↓ Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al plato colector.
Tensión Superficial	↑ Aparición de defectos (beads) en las fibras.
	↓ Obtención de fibras lisas, para disminuir la tensión superficial se pueden adicionar solventes con baja tensión como el etanol.
Conductividad de la solución	↑ Mayor transporte de cargas, mayor estiramiento de la solución, fibras más delgadas.
	↓ Menor transporte de cargas, menor estiramiento de la solución, fibras más gruesas.
Voltaje	↑↑ Fibras gruesas, distorsión del jet, aparición de beads.
	↓ Poco impulso para llegada de la solución al plato colector.
Flujo de Salida	↑ Fibras más gruesas, beads con mayores tamaños.
	↓ Mayor tiempo para evaporación del solvente, fibras sin defectos.
Distancia aguja-colector	↑ Las fibras pueden romperse debido a su propio peso. Mayor estiramiento de la solución, obtención de fibras delgadas
	↑↑ Aparición de defectos (beads) en las fibras al trabajar con muy altas o muy bajas distancias
	↓↓ Poco tiempo para la evaporación del solvente por tanto, las fibras llegan húmedas al plato colector.
Humedad Relativa	↑ Aparición de poros en las nanofibras.



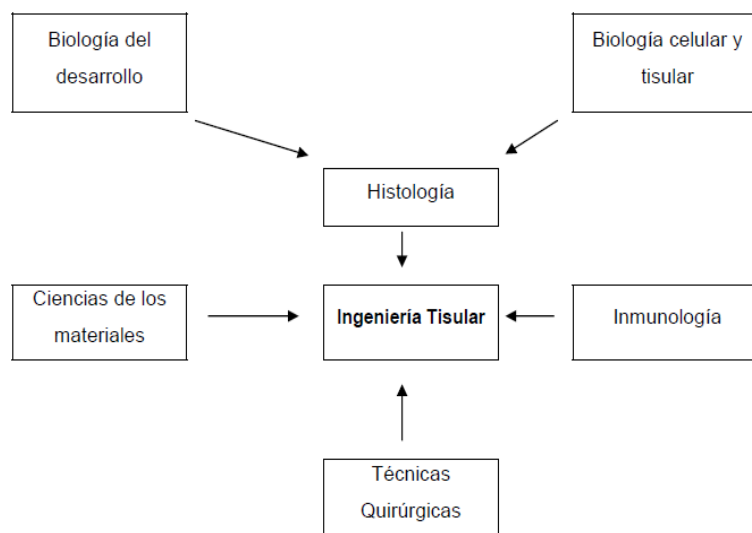
**Figura 8.** Esquema de aplicaciones de las fibras poliméricas fabricadas por la técnica de electrohilado (Perdiguero, 2016).

### V.III. Ingeniería de tejidos

La ingeniería tisular compone un área de la medicina regenerativa cuyo objetivo es la construcción de tejidos “*in vitro*” e “*in vivo*” de tipo autólogo, para su utilización terapéutica que permita restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos (Rosa 2013). La construcción de órganos y tejidos artificiales por ingeniería tisular es uno de los campos de investigación que ha experimentado mayor progreso durante los últimos años. Su aplicación en el campo de la medicina abre nuevas alternativas de tratamiento para pacientes con diferentes tipos de patologías y lesiones tisulares (Shapira et al., 2014).

Este campo se asienta en los conocimientos histológicos y recibe asimismo aportaciones de otras áreas y disciplinas que incluyen la biología, medicina y la ciencia e ingeniería de los materiales, entre otros (**Figura 9**). Este conjunto converge en el objetivo de construir tejidos nuevos y funcionales capaces de sustituir con eficacia terapéutica al tejido original dañado, partiendo de células procedentes de cultivos desarrollados previamente y de un material que actúe como soporte o andamiaje (Shi, 2014).

La ingeniería de tejidos por lo general requiere de biomateriales. Por lo tanto, estos deberán ser susceptibles a ser utilizados como andamios o subestructuras que permitan la integración de un tejido tridimensional similar a la estructura anatómica propia del tejido que requiere regenerarse, “siendo capaces de alojar y permitir el crecimiento, la reproducción y la renovación de las células incluidas en su seno y, a la vez, ser susceptibles de ser eliminados por el metabolismo propio del tejido que lo albergó” (Morrison 2014).



**Figura 9.** Disciplinas que conforman o aportan a la ingeniería tisular o de tejidos (López González 2006).

En la actualidad se han desarrollado tres mecanismos fundamentales en el campo de la ingeniería tisular, que permiten lograr la formación de un nuevo tejido. El primero consiste en

el diseño y posterior crecimiento de los tejidos fuera del cuerpo, para más tarde implantarlos a fin de reparar o sustituir los tejidos dañados. El ejemplo que mejor representa este mecanismo es el desarrollo de piel artificial para su uso en problemas de quemaduras. El segundo mecanismo consiste en utilizar un dispositivo de implante, que puede estar libre o cargado con determinados tipos de células, y también con factores de crecimiento y estímulo del sustrato biológico en el que asienta el biomaterial. Un ejemplo de este mecanismo es la regeneración guiada de tejido óseo para tratamientos de periodoncia (Ochoa, et al, 2015) Por último, un tercer mecanismo consiste en la sustitución de tejidos dañados a partir del desarrollo de dispositivos internos o externos conteniendo tejidos humanos, lo cual implica aislar las células del organismo, luego cargarlas en o sobre matrices estructurales, para finalmente ubicar el sistema de nuevo en el organismo o hacerlo funcionar desde fuera. Un ejemplo de esta estrategia de ingeniería tisular son los injertos vasculares con revestimientos celulares y matrices (Ochoa, et al, 2015).

En la actualidad, en los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos están registrados 95 protocolos terapéuticos que emplean diferentes modalidades de medicina regenerativa, sin embargo, estas medidas aún no han sido implementadas en México. Por ello, el interés de este trabajo se enfoca en la implementación de mejores técnicas, materiales y metodologías que generen opciones más viables y rentables para su utilización en ingeniería de tejidos. Es así como la propuesta de generar implantes biocompatibles a través de moléculas poliméricas sembradas con células autólogas, es una de las estrategias más eficiente. Sin embargo, las características básicas que estos polímeros deben tener son una alta porosidad, gran superficie de contacto celular, estructura constante, forma tridimensional y biocompatibilidad. Su función será la de dirigir el crecimiento celular, bien sea de los tejidos adyacentes o de las células sembradas en su interior (Campos, 2004). No obstante, estas cualidades han sido cumplidas tanto por los polímeros naturales, como sintéticos. Por lo tanto, el electrohilado es una técnica sencilla y económica que permite utilizar diferentes materiales para elaborar nanofibras con propiedades y características únicas, lo que permite ser aplicadas en las áreas biomédicas (Robles-García, et al, 2014).

### **V.III.I. Fibras electrohiladas en la ingeniería de tejidos**

En esta campo, la investigación en biomateriales juega un rol primordial (Amalvy, 2013). Cuando se comparan con otros procesos de generación de fibra, tales como el autoensamblaje y separación de fases, el electrohilado proporciona una manera más sencilla y de menor costo para producir materiales fibrosos.

Para la ingeniería de tejidos vivos, los andamios biodegradables son generalmente considerados elementos indispensables, ya que estos se usan temporalmente como plantillas de siembra celular, invasión, proliferación y diferenciación para la regeneración de los tejidos biológicamente funcionales o de la matriz extracelular. Esto ha ido en incremento con el surgimiento de la técnica de electrohilado, ya que permite generar andamios nanofibrosos para ingeniería de tejidos. Se ha reportado que estos andamios promueven positivamente las

interacciones célula-matriz y células-célula, con lo cual las células tienen una forma fenotípica normal y expresión génica (Shi, 2014).

El diámetro de las fibras electrohiladas es de magnitud similar a las fibrillas de la matriz extracelular, o que imita el ambiente natural del tejido, esto ha demostrado efectividad como sustrato para el crecimiento celular (Friess, 1998). De esta forma, el electrohilado se ha convertido en uno de los métodos de fabricación más extensamente usados para la generación de andamios nanofibrosos (Duque, et al, 2013).. Una gran variedad de nanofibras poliméricas han sido consideradas para su uso como andamios para la ingeniería de tejidos como cartílagos, áreas dérmicas, huesos, vasos sanguíneos arteriales, corazón y nervios (Lu, et al, 2013).

#### **V.IV. PHEMA y PVP**

Los polímeros hidrofílicos son de gran importancia e interés desde el punto de vista científico y práctico, puesto que estos son utilizados en aplicaciones tecnológicas, como por ejemplo como agentes floculantes para la purificación de aguas de desechos y naturales, y en la extracción y concentración de metales. En medicina y el área biológica estos son aplicados como sustituyentes del plasma, en la estabilización y purificación de algunos fermentos y para el control liberado de fármacos (Tajardos, 2013; Rapado, et al, 2016).. En particular, PHEMA representa a uno de los poliméricos sintéticos utilizados en la actualidad como material adhesivo y de restauración en aplicaciones biomédicas. PHEMA forma parte de las llamadas moléculas bifuncionales, las cuales poseen un extremo altamente hidrofílico, mientras que el otro extremo es de tipo hidrofóbico. En la **Figura 1** se muestra la estructura química del polímero PHEMA, y del monómero (HEMA) con el que se sintetiza por medio de una reacción de polimerización. El uso de PHEMA se ha estado introduciendo progresivamente en la Ingeniería Tisular (Berglund et al, 2004).

Entre otras aplicaciones, PHEMA ha sido usado para modificar la seda, otorgándole el incremento en las propiedades mecánicas. PHEMA se ha usado desde 1960 en diversas aplicaciones biomédicas, específicamente como componente de adhesivos dentales, en lentes de contacto, injertos vasculares, sustituto de tejidos blandos y sistemas de liberación de fármacos, gracias a su biocompatibilidad, alta permeabilidad para metabolitos pequeños, alta hidrofiliidad y resistencia a la adhesión de proteínas sanguíneas y células (Fernández, 2018).

Por otro lado, PVP es un polímero sintético que se obtiene de la polimerización radicalaria de NVP. En la **Figura 1** se muestra la estructura química del monómero, VP, y de su polímero correspondiente, PVP. Este polímero fue obtenido por primera vez en los años 30. Actualmente se comercializa como un polvo blanco, con olor característico débil y soluble en agua. Se usa como un tensoactivo no-iónico, es higroscópico y es comercializado con diferentes pesos moleculares. Además, es soluble en cloroformo, metanol, etanol, propilenglicol, trietanolamina y agua; e insoluble en ciclohexano, tolueno, parafina líquida y dietiléter. La naturaleza higroscópica del PVP es importante en muchas aplicaciones y depende de la humedad relativa del ambiente. Por ser no tóxico y químicamente estable, este polímero es utilizado en una variedad de productos farmacéuticos, aunque se utiliza

principalmente en formas sólidas. En tabletas sirve como aglutinante, aumenta la biodisponibilidad de fármacos, ya que se ha demostrado que mejora la disolución de fármacos poco solubles en comprimidos, cápsulas, gránulos y otros. Se destaca su uso en disoluciones oftálmicas, solubilizante para disoluciones orales, parenterales y tópicas; enmascara el sabor en soluciones orales, actúa como agente liofilizante para preparaciones inyectables u orales, como estabilizante en suspensiones, como adhesivo en sistemas transdérmico, y para disminuir la toxicidad en algunos preparados, entre otros (Tajardos, 2013) Este polímero también se usa en ámbitos de cosmética, artículos de higiene personal, pinturas, adhesivos, fabricación de lentes de contacto y es uno de los materiales sintéticos con más historia en el campo de las aplicaciones biomédicas. Con relación a lo anterior, se usó en la segunda guerra mundial como expansor o dilatador de plasma sanguíneo (Ravin et al., 1952), y fue el polímero elegido para preparar el primer conjugado inyectable polímero-fármaco (Jatzkewitz 1995). El PVP forma parte del grupo de componentes biocompatibles de primera elección en el diseño de biomateriales (Gómez, 2013).

Considerando las propiedades antes mencionadas, se espera que un copolímero conformado por unidades de PHEMA y PVP resulte eficiente en la formación de fibras poliméricas para la construcción de andamios celulares aplicados a la ingeniería de tejidos. La estrategia de sintetizar copolímeros se enfoca en desarrollar un material en estado líquido, que combine las características que presentan los homopolímeros de forma individual, tales como su alta hidrofiliidad para el caso de PHEMA, y tendencia a formar fibras por la técnica de electrohilado en PVP.

#### **V.IV.I. Polimerización de HEMA y NVP**

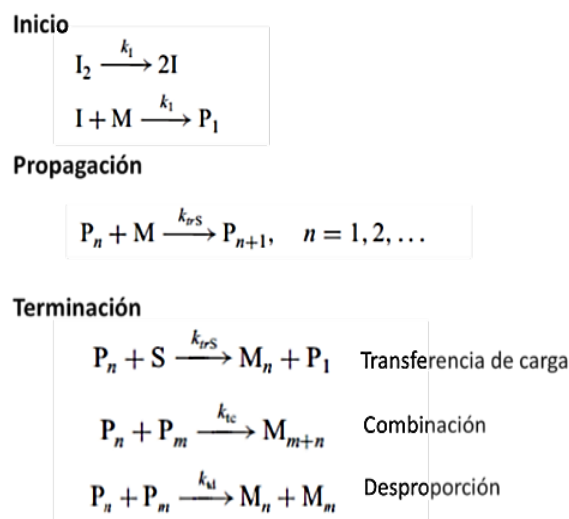
Los monómeros HEMA y NVP contienen dobles enlaces en su estructura, por lo que se consideran moléculas con insaturaciones en su estructura química (**Figura 1**). Evidentemente, las reacciones por las cuales se combinan los monómeros para generar moléculas más grandes se conocen con el término de polimerización. Sin embargo, existen muchos tipos de polimerizaciones y varios sistemas de clasificación o mecanismos de reacción para explicar este tipo de procesos. Pero, para el caso específico de moléculas insaturadas como HEMA y NVP, la síntesis de sus respectivos polímeros se describe como una polimerización de crecimiento en cadena y una poliadición. En la polimerización en cadena, los monómeros son incapaces de reaccionar sin un proceso de activación por medio de un iniciador, o bien, por interacción con alta energía. En la poliadición la conversión de monómeros en polímeros ocurre sin la generación de subproductos o moléculas pequeñas. Generalmente, el peso molecular del polímero que se sintetiza por esta vía crece rápidamente desde el momento en que se inicia la reacción (Odián 2004). A manera de ejemplo, en la **Figura 10** se muestra la reacción de polimerización del monómero con insaturaciones en su molécula, tal como el etileno, el cual se convierte después del proceso de polimerización en polietileno.



**Figura 10.** Síntesis de polietileno a partir de etileno por polimerización por crecimiento en cadena-poliadición (Odian, 2004).

#### V.IV.I.I. Mecanismo de polimerización en cadena

El mecanismo de reacción para este tipo de polimerización consta de tres pasos: Iniciación, propagación y terminación. Durante la iniciación se genera la especie activa que se adiciona a los monómeros. El iniciador puede ser un radical, un anión o un catión y se puede generar mediante radiación electromagnética, calor o reacciones químicas (**Figura 11: Inicio**). Entre la amplia gama de iniciadores químicos usados en esta clase de reacciones, se destacan el peróxido de benzoilo (BPO), el azoisobutironitrilo (AIBN) y el persulfato de potasio (Bouchti et al., 2013; Misra et al., 1980). Otros compuestos, entre los que se destaca el óxido de fenilbis(2,4,6-trimetilbenzoil) fosfina (BAPO), se usan como fotoiniciadores con respuesta a luz UV. En general, estos compuestos se descomponen térmicamente para generar especies radicalarias. La etapa de iniciación de la polimerización en cadena se complementa por la asociación de la especie activada con una molécula de monómero. En la propagación, un gran número de moléculas de monómeros son convertidas en polímero (**Figura 11: Propagación**). Finalmente, en la terminación, la polimerización puede culminar de tres maneras: por interacción del macroradical con un agente de transferencia; por combinación, cuando dos cadenas activadas (en crecimiento) del polímero se unen covalentemente para generar una sola cadena neutra; y por desproporción, cuando entre dos cadenas en crecimiento se presenta una transferencia de radicales para generar una de cadena con una insaturación y otra totalmente saturada (**Figura 11: Terminación**) (Bouchti et al., 2013; Odian 2004).

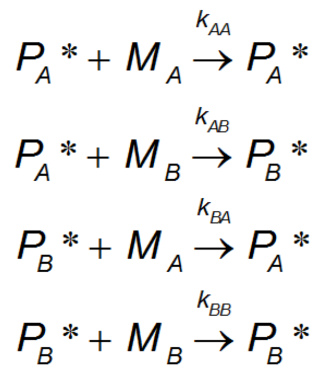


**Figura 11.** Mecanismo de polimerización por reacción en cadena.  $I_2$  es el agente iniciador;  $I$  es la especie activa (radical libre);  $M$  es el monómero;  $P$  es la cadena en propagación;  $S$  es el agente de transferencia;  $M_n$  y  $M_m$  son las macromoléculas formadas; y  $k$  representa la constante de cada proceso (Bouchti et al., 2013).

#### V.IV.II. Parámetros de la copolimerización

Los polímeros basados en un monómero tienen la limitante de que sus propiedades sólo se pueden variar en un intervalo modificando su peso molecular. Además, el número de monómeros disponibles que se pueden utilizar para obtener los polímeros, es reducido. Así, por todo lo anterior, el desarrollo de la tecnología y las necesidades de la vida diaria, han llevado como resultado hacia el desarrollo de polimerizaciones de dos o más monómeros de forma simultánea, para así lograr las propiedades deseadas. De esta manera el número de materiales que se pueden obtener es muy grande y con diversas propiedades (Byard, et al, 2017). En la **Figura 4** se muestra, de forma general, los tipos de copolímeros que se pueden formar al combinar dos monómeros diferentes. Sin embargo, para la mayoría de los casos, la composición del copolímero que se forma en un instante dado difiere significativamente de la composición de la mezcla reaccionante (Sharma 2011). Lo anterior se debe a que las reacciones que se presentan en este tipo de síntesis pueden ser: i) entre el monómero y el radical polimérico de la misma especie (homopropagación,  $k_{ii}$ ), y ii) entre el monómero y radical polimérico de otra especie (propagación cruzada,  $k_{ij}$ ). Por lo tanto, cabe esperar que estas dos constantes tienen diferente valor. Así, se considera que la reactividad de los radicales depende sólo de la identidad del monómero al final de la cadena. El esquema de polimerización se muestra en la **Figura 12**.

Entonces, para determinar la composición del copolímero que se forma es necesario conocer las velocidades de entrada de los monómeros (desaparición) al radical polimérico (Byard, et al, 2017).



**Figura 12.** Mecanismo de copolimerización: propagación de reacción en cadena, considerando uniones del monómero A o B a su propio homopolímero, y las uniones combinadas o cruzadas (Sharma 2011).

Las velocidades de desaparición de los monómeros están dadas por la ecuación 1 y 2:

$$-\frac{dM_A}{dt} = k_{AA} P_A M_A + k_{BA} P_B M_A \quad (\text{Ec. 1})$$

$$-\frac{dM_B}{dt} = k_{AB} P_A M_B + k_{BB} P_B M_B \quad (\text{Ec.2})$$

Así, al dividir la ecuación (1) entre la (2) se obtiene la relación de la velocidad a la cual entran los dos monómeros al copolímero:

$$-\frac{dM_A}{dM_B} = \frac{k_{AA} P_A M_A + k_{BA} P_B M_A}{k_{AB} P_A M_B + k_{BB} P_B M_B} \quad (\text{Ec. 3})$$

Por lo tanto, para eliminar las concentraciones de los radicales se hace uso de la suposición del estado estacionario, la cual establece que la concentración de cada especie de radical es constante. Para que esto ocurra se requiere que la velocidad con que se forman los radicales  $i$  o  $j$  sea igual a la velocidad con que desaparecen, tal como en la ecuación 4:

$$k_{AB} P_A^* M_B = k_{BA} P_B^* M_A \quad (\text{Ec. 4})$$

Al sustituir la ecuación (4) en la (3) se obtiene:

$$\frac{dM_A}{dM_B} = \frac{\frac{k_{AA} k_{BA} P_B M_A^2}{k_{AB} M_B} + k_{BA} P_B M_A}{k_{BB} P_B M_B + k_{BA} P_B M_A} \quad (\text{Ec. 5})$$

Por definición, los parámetros  $r_A$  y  $r_B$  se denominan como coeficientes de reactividad de los monómeros A y B, respectivamente.

$$r_A = \frac{k_{AA}}{k_{AB}} \quad (\text{Ec. 6})$$

$$r_B = \frac{k_{BB}}{k_{BA}} \quad (\text{Ec. 7})$$

Por lo tanto, al dividir la ecuación (5) por el factor  $k_{AB} P_B M_A$  y al sustituir las ecuaciones (6) y (7) en (5), se obtiene una ecuación que depende de los factores de reactividad y las concentraciones de monómero:

$$\frac{dM_A}{dM_B} = \frac{M_A (r_A M_A + M_B)}{M_B (M_A + r_B M_B)} \quad (\text{Ec. 8})$$

Existen diferentes alternativas para determinar experimentalmente los valores de los coeficientes de reactividad ( $r_A$  y  $r_B$ ), ya que dependiendo de su valor, estos pueden indicar que clase de copolímero tiene mayor probabilidad de formarse. Por ejemplo, un copolímero alternado (ver **Figura 4.a**) se cumple sí:

$$r_A = r_B = 0 \quad (\text{Ec. 9})$$

Para formar un copolímero alternado (**ver Figura 4.b**), es decir en los que la unidad monomérica se alterna sucesivamente a lo largo de la cadena polimérica, se debe cumplir la siguiente relación:

$$r_1 = 0 \text{ y } r_2 = 0. \quad (\text{Ec. 10})$$

La ecuación 10 es un indicativo de que el monómero no es proclive a polimerizar consigo mismo (Chanda, 2013).

Para conformar un copolímero en bloque (**ver Figura 4.c**) se requiere que se cumpla la siguiente relación:

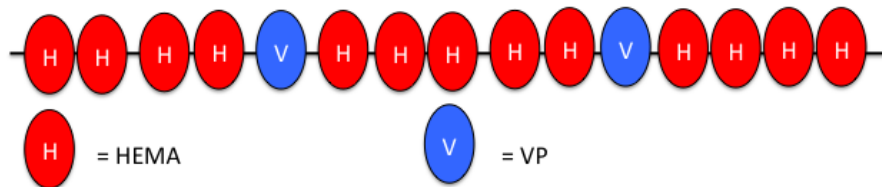
$$r_A \gg 1 \text{ y } r_B \gg 1 \quad (\text{Ec. 11})$$

Es importante resaltar que a pesar de que en la teoría es posible obtener copolímeros en bloque por radicales libres, en la realidad, dado que el tiempo de vida media de los radicales es muy corto, el control preciso de este tipo de estructura es muy limitado. Por consiguiente, para obtener estos copolímeros, experimentalmente es preferible optar por la copolimerización iniciada por aniones (Byard, et al, 2017). Por otro lado, los copolímeros de injerto (**Figura 4.d**) no se ajustan a este tipo de modelo predictivo, y su síntesis depende de diferentes estrategias para unir químicamente cadenas de un polímero sobre las cadenas de otro polímero principal.

#### **V.IV.II.I. Antecedentes de reactividad en copolímero de PHEMA-co-PVP**

Con base en lo anterior, es importante conocer la información publicada hasta el momento sobre los copolímeros que consisten de la combinación de PHEMA con PVP. Lo anterior con el objetivo de inferir los posibles arreglos estructurales que pueden presentar esta clase de materiales. Así, se ha encontrado que los copolímeros que parten de la estrategia de combinar HEMA con VP antes de iniciar la reacción de polimerización, producen coeficientes de reactividad para HEMA ( $r_H$ ) superiores a 1, mientras que para NVP ( $r_V$ ) se presentan valores muy bajos. Por ejemplo, Al-Issa y colaboradores (Al-Issa et al., 1985), determinaron valores para HEMA en 3.12, y para NVP en 0.05, en polimerización usando etanol como disolvente. En otra investigación, Reddy y colaboradores (Reddy et al., 1985) determinó coeficientes de 4.35 para HEMA y 0.06 para NBP, usando metanol como disolvente y el método de Fineman-Ross. Estos mismos autores determinaron por otro método (Kelen-Tudos) valores de 4.50 para HEMA y 0.02 para NVP. Gallardo y colaboradores (Gallardo et al., 1999) determinaron los valores  $r_H = 7.97$  y  $r_V = 0.077$ , para polimerizaciones realizadas en agua/etanol, usando la técnica de resonancia magnética nuclear de protónica (H-RMN). En otro trabajo de investigación, Faragalla y colaboradores (Faragalla et al., 2002) determinaron los coeficientes de reactividad de estos monómeros en copolímeros sintetizados en masa (sin disolventes), encontrándose valores de  $r_H = 8.18$  y  $r_V = 0.097$ . Por consiguiente, los resultados de las investigaciones relacionadas con el copolímero de PHEMA/PVP, indican

que contiene una mayor cantidad de HEMA, en forma de bloques, con la inclusión de unidades de NVP entre dichos bloques, tal como se esquematiza en la **Figura 13**. Esto se atribuye a que las evidencias experimentales han demostrado que HEMA, al presentar coeficientes superiores a 1, prefiere reaccionar consigo mismo, mientras que VP, al presentar coeficientes cercanos a cero (0), prefiere reaccionar con el otro monómero y no consigo mismo.



**Figura 13.** Esquema de estructura probable de copolímeros de PHEMA/PVP, el cual contiene bloques de HEMA con inclusiones aisladas de NVP entre dichos bloques.

#### V.IV.III. Electrohilado de PHEMA y PVP

El PVP es uno de los polímeros con mayores usos en el campo de la salud, como portador de compuestos farmacológicos, ya sea en combinación para generar hidrogeles o en la fabricación de fibras por medio de electrohilado (Dai, et al, 2012). Así mismo, fue declarado por la FDA como material seguro para aplicaciones en el área médica. Es por ello que muchos investigadores actualmente trabajan con este material para diversas aplicaciones (Rahma, et al, 2016; Dai, et al, 2012). En cuanto a las fibras electrohiladas de PVP, los primeros reportes de electrohilado de PVP K-30 fueron realizados por Bognitzki y colaboradores en 2001 (Bognitzki et al, 2001), usando un voltaje de 37 kV. Así mismo, destaca la aportación de Li y colaboradores en 2003 (Li, et al, 2003), quienes reportaron el electrohilado de PVP usando una disolución acuosa de etanol para generar materiales más amigables con el ambiente. Yoo y Kim (Yoo y Kim 2008), por otro lado, viendo la alta biocompatibilidad del PVP, realizaron estudios de las fibras de este material para su aplicación como apósitos en heridas. Kurniawan y colaboradores (Kurniawan, et al, 2016), han demostrado que las fibras de PVP forman complejos solubles en agua, al interactuar con una variedad de drogas hidrofílicas e hidrofóbicas, por lo tanto, destacan su potencial para los sistemas de carga y liberación de fármacos. Por último, uno de los trabajos que se destaca actualmente en este campo está relacionado con fibras electrohiladas de PVP con extracto de Mangosteen pericarp, aumentando con este sistema la tasa de liberación y el efecto antioxidante del extracto (Sriyanti, et a, 2018).

En la **Figura 14.a** se observa que el PVP procesado por la técnica de electrohilado se encuentra relacionado con alrededor de 541 reportes en revistas de investigación de circulación internacional, desde 2005 hasta lo recorrido de 2019. De estos, los países que han contribuido en el tema son China, con más de 300 investigaciones, Estados Unidos con 74, y Corea del Sur con 45 (**Figura 14.b**). México por su lado cuenta con 7 publicaciones que relacionan la síntesis de fibras de PVP por electrohilado. En adición, también se encuentran reportadas 2339 patentes alrededor del mundo para este tema, de las cuales 1223 han sido

registradas en la Oficina de Patentes de Estados Unidos, seguido por 627 registradas en Japón. México no cuenta con patentes que relacionan estos aspectos.

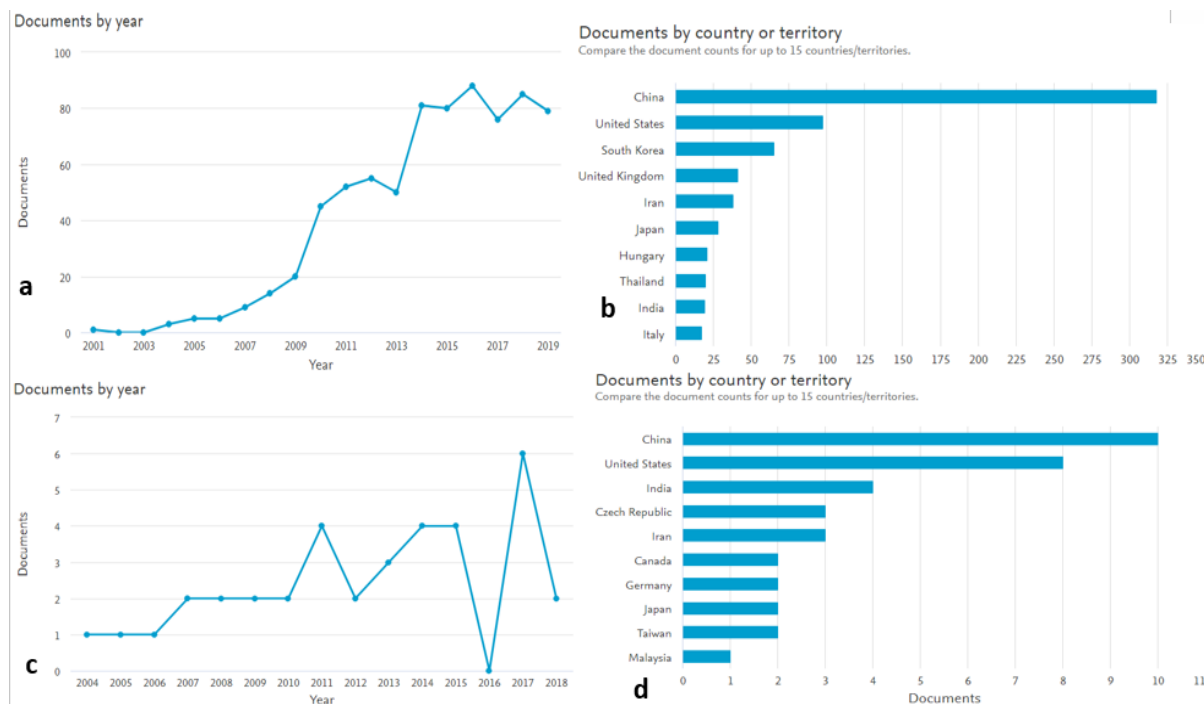
El PHEMA a diferencia de los materiales hidrofóbicos comunes, tiene buena solubilidad en los disolventes ecológicos como etanol y agua, lo que lo convierte en buen candidato para procesarlo por la técnica de electrohilado. En este aspecto, resalta uno de los primeros reportes que se relaciona con el desarrollo fibras para la construcción de sensores (Wang, et al, 2003). Zhang y colaboradores en 2011 (Zhang, et al, 2011) realizaron electrohilado de este polímero en disoluciones acuosas de etanol al 66.3 %, a un voltaje de 25 kV, para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

Ramalingam y colaboradores en 2013 (Ramalingam et al 2013) estudiaron los efectos de la concentración, velocidad de inyección, campo eléctrico y distancia entre colector y punta, para la optimización del proceso de electrohilado. Recientemente, Eroglu y colaboradores (Eroglu, et al, 2017) han reportado su exploración para encontrar las condiciones óptimas para generar fibras de PHEMA por medio de electrohilado, evaluando voltajes en el rango 10-25 kV, usando etanol como disolvente .

De este material se han encontrado 42 reportes en revistas internacionales (**Figura 14.c**) y 1072 patentes que lo relacionan con su uso para el desarrollo de fibras poliméricas por medio de electrohilado, desde el año 2004 a 2018. Los países que se destacan en el aspecto son China y Estados Unidos con 10 publicaciones cada uno, República Checa con 5, e India y Japón con 4 cada uno, entre otros (**Figura 14.d**).

La oficina de patentes de Estados Unidos son quienes registran un mayor número de patentes (820), seguido de Japón con 127. México no cuenta con publicaciones, ni patentes relacionadas con la fabricación de fibras basadas en el monómero HEMA o el polímero PHEMA, mediante electrohilado. Lo anterior se considera como un área de oportunidad para generar líneas de investigación relacionadas con los aspectos involucrados en esta investigación.

Cabe resaltar que en los diferentes repositorios o motores de búsqueda de literatura científica no se encuentra reportada la síntesis de fibras de copolímeros de PHEMA/PVP, usando la técnica de electrohilado. Esto resalta la importancia de este trabajo de investigación.



**Figura 14.** Indicadores de publicaciones en revistas internacionales de investigaciones relacionadas con fabricación de fibras por electrohilado usando PVP (a-b) y PHEMA (c-d). (Datos estimados desde Scopus, 2019 [www.scopus.com](http://www.scopus.com). Parámetros de búsqueda: electrospinning and polyvinyl pyrrolidone; electrospinning and 2-hydroxyethyl methacrylate. Fecha de consulta: 10 Octubre 2019).

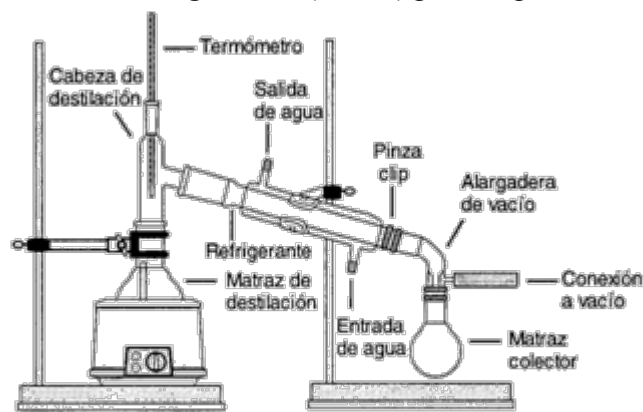
## VI. METODOLOGÍA

### VI.I. Materiales

2-Hidroxietil Metacrilato [HEMA] (98% con 200 ppm de monometil éter hidroquinona [MEH]), N-Vinilpirrolidona [VP] (98% con 100 ppm hidróxido de sodio [NaOH]) y la disolución tampón fosfato salino (PBS) 1X pH 7.4 fueron adquiridos de Sigma Aldrich<sup>®</sup>, México. Alcohol etílico absoluto, dietil éter (80%) y peróxido de hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (20%) fueron adquiridos de Golden Bell Reactivos<sup>®</sup>. Dimetilformamida [DMF] (99.9%), cloruro de sodio [NaCl] (99%), ácido clorhídrico [HCl] (32%) y glutaraldehído [C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>] (50%) fueron adquiridos de Fermont Reactivos<sup>®</sup>. Fibroblastos dermicos humanos CCD-1112Sk (ATCC CRL-2429) fueron suministrados por American Type Culture Collection (ATCC), el medio de cultivo celular Iscove's Modified Dulbecco's [IMDMM] 1X por STEMCELL Technologies<sup>®</sup>, el suero fetal bovino y tripsina/EDTA 0.025% por Thermo Scientific<sup>®</sup>, el reactivo (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) [MTS] del kit de ensayo de proliferación celular acuosa no radiactiva "CellTiter 96<sup>®</sup>" fue adquirido de Promega<sup>®</sup>, el PBS 1X pH 7.4 fue realizado en laboratorio y sulfato de estreptomicina con sodio de Penicilina G, que actúa como agente antibiótico/antimicótico, fue suministrado por Life Technologies Corporation<sup>®</sup>.

## VI.II Purificación de monómeros

NVP y HEMA fueron purificados por medio de destilación a presión reducida ( $P \lesssim 4 \text{ mm Hg}$ ) para lograr separar estas sustancias de los inhibidores de polimerización (NaOH y MEH, respectivamente). En la **Figura 15** se muestra un esquema del sistema de destilación utilizado para la purificación. Una bomba de diafragma fue utilizada para reducir la presión del sistema, mientras que una trampa de nitrógeno líquido fue instalada entre el sistema y la bomba para reducir la emisión de gases y proteger los mecanismos internos de la bomba. NVP fue destilado a  $50^\circ\text{C}$  y HEMA a  $40^\circ\text{C}$ . Los productos destilados fueron almacenados en envases de vidrio y sometidos a refrigeración ( $\approx 4^\circ\text{C}$ ) para su posterior uso.



**Figura 15.** Esquema del ensamble y componentes del sistema de destilación a presión reducida utilizado para la purificación de NVP y HEMA.

## VI.III. Síntesis de copolímero PHEMA-co-PVP

La síntesis de los copolímeros se realizó por medio de la adaptación de la metodología reportada por Faragalla y colaboradores (Faragalla et al., 2002). NVP y HEMA fueron mezcladas en una relación 1:3 (v/v) y transferidas a una ampollita de vidrio.  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue agregado como iniciador de polimerización a la mezcla monomérica, hasta alcanzar una concentración de 0.75% con respecto al volumen total de la mezcla. El contenido de la ampollita se colocó a burbujeo con nitrógeno gaseoso durante toda la reacción. Para activar la polimerización, las ampollitas fueron sumergidas en un baño de agua ajustado a  $50^\circ\text{C}$ , durante un tiempo entre 20 - 80 minutos. Finalizado ese tiempo, las muestras fueron retiradas del baño y extraídas de las ampollitas para su almacenaje o purificación.

El aumento en la viscosidad de la mezcla conforme los monómeros se convierten en copolímero, en dependencia del tiempo de reacción, fue evaluada durante el proceso por medio de un viscosímetro rotacional marca NDJ-8S.

## VI.IV. Purificación de copolímero y obtención del grado de conversión

Una vez completado el tiempo de reacción, los copolímeros fueron dispersados en dietil éter con la ayuda de un baño ultrasónico, durante 30 minutos. Después de 5 minutos en reposo, las dos fases líquidas formadas fueron separadas entre sí con la ayuda de una pipeta. La fase del polímero fue redispersada en dietil éter y sometida a un rotoevaporador para eliminar el

disolvente. Los copolímeros posteriormente fueron secados en una estufa de secado al vacío y finalmente pesados para determinar el grado de conversión de monómero en copolímero, mediante la ecuación siguiente.

$$\text{Grado de conversión} = \frac{\text{Peso de los monómeros (g)}}{\text{Peso del copolímero purificado (g)}} * 100 \quad (\text{Ec. 12})$$

#### **VI.V. Síntesis de homopolímeros**

Los monómeros NVP y HEMA fueron expuestos a reacción de forma individual, bajo las condiciones determinadas para la síntesis del copolímero PHEMA-co-PVP (sección 5.3.). De la misma forma, los homopolímeros fueron aislados y purificados con la misma metodología utilizada para el copolímero (sección 5.4). Esto con la finalidad de caracterizar los homopolímeros y comparar las propiedades de estos materiales contra las de los copolímeros PHEMA-co-PVP.

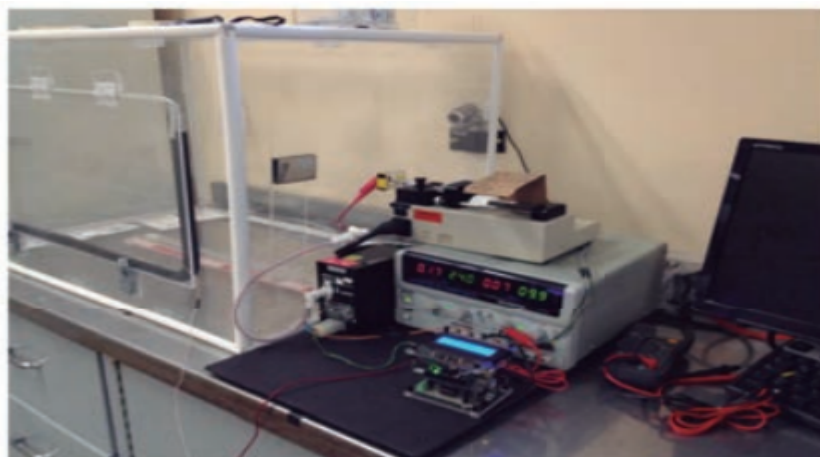
#### **VI.VI. Preparación de disoluciones poliméricas de copolímero PHEMA-co-PVP**

Se prepararon disoluciones del copolímero PHEMA-co-PVP utilizando dos disolventes diferentes: DMF y una disolución acuosa de etanol a 66.3% (w/w), hasta obtener disoluciones con la viscosidad deseada. Para algunas de las formulaciones preparadas con disolución de etanol fue adicionada una cantidad determinada de disolución acuosa saturada de NaCl, hasta completar rangos entre 2-6 % (v/v) de la disolución del copolímero.

#### **VI.VII. Electrodeposición de copolímero PHEMA-co-PVP**

Para la síntesis de fibras del copolímero propuesto en esta investigación se usó un equipo de electrohilado (**Figura 16**) implementado en los laboratorios de ECITEC de UABC, ubicado en la Unidad Valle de las Palmas, el cual consta de una fuente de alto voltaje con variación desde 1 a 20 kV, un inyector de jeringa con control de velocidad de volumen desde 0.01 a 10 mL/h, un colector de placa plana, un medidor de temperatura y humedad, y una cámara aislante construida de acrílico.

Para el electrodeposición de fibras, primero se ajustó la humedad de la cámara del equipo de electrohilado, no superior al 62%. Para ello se colocaron recipientes con agentes desecadores (silica gel) de forma previa al experimento. Luego, se cargaron las disoluciones poliméricas en jeringas de 5 mL con agujas de calibre 24 (0.55 mm x 0.25 mm) y se conectó a la terminal positiva del suministro DC de alta tensión. Posteriormente, se ajustó el caudal de la jeringa por medio del sistema inyector. La velocidad de inyección fue ajustada dependiendo de la viscosidad de la disolución. El voltaje utilizado fue de 20 kV. Una vez encendido el inyector y el voltaje, las fibras se depositaron sobre un colector plano de metal recubierto con cinta de aluminio, a una distancia determinada entre un rango de 15-22 cm, comprendido de la punta de la aguja al colector. Para algunos casos en los que la fibra no fue depositada de forma mayoritaria en el plato colector, se utilizó una malla de polipropileno (2 cm x 2 cm), la cual fue sujeta con cinta adhesiva justo en el centro del plato colector.



**Figura 16.** Sistema de electrohilado utilizado para esta investigación. Sistema ubicado en ECITEC Valle de las Palmas (Fotografía tomada de Velasco, et al, 2016).

Ya depositadas las nanofibras se colocaron en presencia de agentes desecantes durante una noche para eliminar completamente los residuos de disolventes. Por último, se retiró la película conformada por fibras desde la cubierta de aluminio, y se almacenó en recipientes de plástico para prevenir su contaminación. Las fibras depositadas sobre la malla de polipropileno fueron conservadas sin separarlas de dicho soporte.

#### **VI.VIII. Entrecruzamiento de fibras de copolímero PHEMA-co-PVP**

Para el entrecruzamiento de algunas fibras logradas por electrohilado del copolímero PHEMA-co-PVP, se sumergieron pequeños fragmentos de estos materiales en una disolución acuosa de glutaraldehído a una concentración 25%, durante 1 hora.

#### **VI.IX. Caracterización de materiales**

Tanto los materiales sintetizados conformados por fibras poliméricas, como los homopolímeros y las materias primas, fueron caracterizados y evaluados por medio de las siguientes técnicas:

##### **VI.IX.I. Microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Los materiales obtenidos de forma preliminar en los ensayos de procesamiento por electrohilado fueron observados por medio de un microscopio óptico de fluorescencia invertido digital de la marca Invitrogen® EVOS FL para corroborar luego los resultados con SEM. La microscopía SEM fue realizada en un microscopio de marca JEOL 5300, que cuenta con un voltaje de aceleración de 15 keV. Previo al análisis, y con la finalidad de aumentar la conductividad eléctrica de las muestras de PHEMA-co-PVP electrohiladas, cada muestra fue recubierta con oro durante 13 minutos, usando para ello una evaporadora térmica marca JEOL, modelo JEE-400, la cual trabaja a una presión de  $1 \times 10^{-3}$  Pa y a una corriente de 15 A.. Los análisis SEM fueron realizados a diferentes magnificaciones para un análisis posterior del diámetro y morfología de las fibras. Por último, las imágenes obtenidas fueron analizadas en el software ImageJ, para conocer la distribución de tamaños de las fibras generadas en el proceso de electrohilado.

### **VI.IX.II. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) con aditamento de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR).**

Se utilizó un espectrofotómetro marca Perkin Elmer Spectrum Two, el cual cuenta con aditamento de ATR con diamante y un elemento de enfoque de seleniuro de zinc en contacto directo con el diamante, este equipo se encuentra en las instalaciones de Bio1 Laboratorios de la FIAD-UABC. En este instrumento fueron analizados los monómeros HEMA y PVP, así como los copolímeros PHEMA-co-PVP (purificar y sin purificar) y las fibras obtenidas usando DMF en el procesamiento de electrohilado.

### **VI.IX.III. Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)**

Para el análisis elemental de las muestras compuestas por fibras se utilizó un equipo de la marca SPECS, ubicado en las instalaciones del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) de la UNAM. Este equipo trabaja con presiones hasta  $5 \times 10^{-10}$  Torr. El sistema está equipado con un analizador de electrones hemisférico modelo PHOIBOS 150 WAL y una fuente monocromática de rayos X modelo XRC 1000. Fue usada una fuente de Al K $\alpha$  a 110 W. Los análisis de alta resolución fueron realizados con una energía de paso de 50 eV.

Para la introducción a la cámara de análisis del equipo XPS, las muestras fueron sujetadas por un extremo del portamuestras usando cinta adhesiva de carbono; mientras que, por el otro extremo, fueron inmovilizadas por presión de una lámina metálica, la cual se sujetó al portamuestras con la ayuda de dos tornillos y tuercas. Una vez sujetas las muestras al portamuestras, estas fueron introducidas a la cámara de inserción del equipo XPS, y se sometió a alto vacío durante 24 horas o hasta alcanzar una presión aproximada de  $1 \times 10^{-8}$  Torr. Después, las muestras fueron trasladadas hacia la cámara de análisis del equipo. El análisis se realizó una vez esta sección alcanzara y se estabilizara en un vacío mínimo de  $1 \times 10^{-9}$  Torr. Para la evaluación, el área de análisis fue delimitada en una región cercana a la lámina que sujeta la muestra al portamuestras, pero tratando de no incidir sobre dicha pieza de metal; lo anterior con la intención de favorecer la recuperación de los electrones desprendidos de la muestra. De esta forma, se realizaron análisis de la composición química general de las muestras para identificar todos los elementos presentes, y luego se realizaron análisis de alta resolución en los elementos de interés, entre los que se destacan: carbono, nitrógeno y oxígeno.

Los resultados fueron analizados con el programa CasaXPS, para realizar las cuantificaciones de los elementos de la muestra, por medio de la estimación de las áreas bajo la curva de los espectros XPS.

### **VI.IX.IV. Caracterización térmica de los materiales.**

La estabilidad térmica de las muestras fue determinada en un equipo de análisis termogravimétrico (TGA), Q600 de la marca TA Instruments. Este instrumento de medición térmica también cuenta con la capacidad de realizar análisis de calorimetría de barrido diferencial (DSC). Las muestras analizadas estuvieron en un rango de entre 2 y 5 mg. El

análisis fue realizado con una rampa de calentamiento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , desde  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta  $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en atmósfera de nitrógeno con un flujo de  $100\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

#### **VI.IX.V. Ensayo de citotoxicidad**

Fibroblastos dérmicos humanos (línea celular CCD-1112Sk) fueron cultivados en el medio IMDM suplementado con suero fetal bovino (10%) y antibiótico/antimicótico (1%). Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 1X pH 7.4, para eliminar los restos de medio y finalmente removidas con tripsina para colocarlas en los pozos de la placa. Los ensayos biológicos se realizaron en placas de 96 pozos para cultivo celular, colocando  $1 \times 10^3$  células/pozo sobre los homopolímeros y las fibras de PHEMA-co-PVP. Cada material fue evaluado por triplicado. Después de 24 horas de incubación a condiciones estándar ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  a 5 %), el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco conteniendo el reactivo MTS, el cual actúa como indicador de viabilidad celular (Piedra, et al, 2012). Las células fueron incubadas durante 2 horas. Las absorbancias fueron determinadas en un espectrofotómetro UV-Vis Epoch® con el software Gen5® a 490 nm, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Promega, 2009; Promega, 2009a).

Los datos obtenidos del ensayo de citotoxicidad fueron posteriormente tratados a través de EXCEL® usando el análisis T de Student mediante muestras emparejadas, para observar diferencias significativas entre las muestras en comparación con el control de muerte celular (DMSO 10%). Así mismo, el valor del error relativo fue evaluado.

### **VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **VII.I. Copolímero PHEMA-co-PVP (Síntesis, purificación y grados de conversión)**

Para la síntesis del copolímero PHEMA-co-PVP se tomó como referencia el trabajo publicado por Faragalla y colaboradores (Faragalla et al., 2002), en donde sintetizaron este mismo copolímero sin el uso de disolventes (en masa), con el objetivo de determinar los coeficientes de reactividad de los monómeros HEMA y NVP. No obstante, al igual que los trabajos publicados por otros autores (Al-Issa et al., 1985; Reddy et al., 1985; Gallardo et al., 1999), en donde usaron disoluciones acuosas con etanol y metanol como disolvente para el medio de síntesis, todos coinciden en que el copolímero final resulta conformado preferentemente por una mayor cantidad de HEMA que de NVP. Por lo tanto, es de esperar que al polimerizar una mezcla de estos dos monómeros, la estructura química del copolímero formado contendrá principalmente bloques de HEMA, separados por unidades o segmentos cortos de NVP, tal como se esquematiza en la **Figura 13**.

Teniendo en cuenta esta tendencia se considera importante que previo al inicio de la reacción de polimerización, resulta conveniente que la elección de composiciones de mezcla de HEMA/NVP se ajuste a valores superiores a la unidad (1). En consecuencia, los parámetros de reactividad ya reportados para la mezcla HEMA/NVP, indican que frente a un exceso de NVP en dicha mezcla, es probable que la reacción conduzca hacia la formación de copolímeros irregulares compuestos simultáneamente de cadenas conformadas por bloques de HEMA separados por unidades de NVP, y de cadenas con segmentos terminales

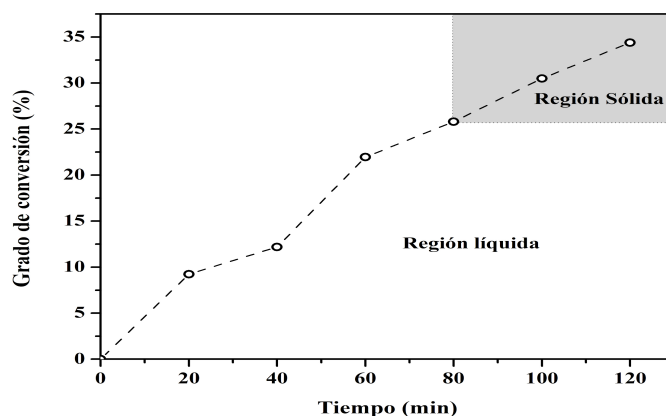
constituidos exclusivamente por bloques de NVP. Lo anterior corresponde al resultado del consumo de la totalidad de HEMA durante la reacción, y a la preferencia que el NVP ya tendría para reaccionar consigo mismo, una vez que todas las unidades de HEMA han sido consumidas. Es por ello que para esta investigación se decidió estudiar el comportamiento de la relación HEMA:NVP correspondiente a 3:1. Debido a que bajo condiciones normales estos dos monómeros se presentan en estado líquido, dicha relación fue medida en unidades de volumen.

Por lo general, todos los estudios experimentales que se llevan a cabo para estimar los parámetros de reactividad de dos monómeros en la formación de un polímero, limitan las condiciones de reacción para que la polimerización se complete hasta alcanzar porcentajes bajos de conversión de monómero a polímero, especialmente en un rango de 5 a 10 %. Esto debido a que valores superiores pueden conducir a un mal ajuste de las relaciones matemáticas deducidas para dicho fin, y además, por la posibilidad de generar copolímeros con viscosidad muy alta o polímeros sólidos insolubles, conforme se va estimulando la formación de ramificaciones o entrecruzamientos entre las cadenas de los polímeros, a medida que el grado de conversión aumenta. Sin embargo, para los objetivos de nuestra investigación, la exploración de valores del grado de conversión que conduzcan a copolímeros líquidos con viscosidad alta, fue necesaria. Lo anterior debido a que la formación de ramificaciones o entrecruzamiento no se considera un problema para el procesamiento de polímeros por electrohilado, siempre y cuando el copolímero formado siga siendo soluble en algunos disolventes orgánicos.

Por otro lado, es evidente que la polimerización, en medios acuosos, de un monómero como HEMA, promueve el entrecruzamiento entre sus cadenas y, por consiguiente, conduce a la formación de hidrogeles insolubles (Del Río, 2018). Es por ello que en este trabajo se eligió la polimerización de una mezcla de HEMA/NVP sin el uso de disolventes, bajo condiciones similares a las reportadas por Faragalla et al. (2002). Por todo lo anterior, se consideró determinante evaluar los grados de conversión de la mezcla monomérica a diferentes tiempos, con la intención de determinar las condiciones a las cuales se empieza a generar polímeros insolubles en el medio de reacción. En la **Figura 17** se muestra la dependencia del grado de conversión de monómero a polímero en la mezcla HEMA/NVP, con respecto al tiempo de reacción. En esta se observa que el grado de conversión aumenta de forma no lineal, conforme avanza el tiempo de reacción. Cabe resaltar que el grado de conversión fue estimado desde la **Ecuación 12**, mediante la diferencia en peso entre la cantidad total de los monómeros adicionados a la mezcla y el material obtenido al final de la reacción, el cual es previamente aislado o extraído en un proceso de purificación con disolventes. Así, en la **Figura 17** también se denota que a partir de los 80 minutos de reacción se generan polímeros insolubles que corresponden a un porcentaje de conversión por encima del 22 %. Se encontró que después de un proceso de secado a ambiente o bajo presión reducida, estos materiales no pueden volver a ser disueltos por la acción de disolventes orgánicos. En esta etapa se resalta que para estos copolímeros fueron ensayados sin éxito diferentes disolventes como DMF, cloroformo, diclorometano, entre otros. La insolubilidad de estos materiales es influenciada por los altos grados de entrecruzamiento promovidos por los radicales libres con los que se

dio inicio a la reacción, y a fenómenos de transposición de cadena (Odian 2004). En este punto es importante señalar que a diferencia del trabajo reportado por Faragalla y colaboradores (Faragalla et al. 2002), en esta investigación se utilizó  $H_2O_2$  como agente iniciador, en lugar de peróxido de benzoilo. La descomposición de  $H_2O_2$  genera la inclusión de grupos hidroxilo (-OH) en los puntos extremos de las cadenas poliméricas, mientras que la descomposición del peróxido de benzoilo para generar los radicales libres termina incorporando tanto grupos -OH como benzoilos. Aunque no está totalmente clara la relación directa del uso del peróxido de benzoilo con el aumento en la toxicidad de un material diseñado con fines biomédicos, se consideró para este trabajo que es más seguro el uso de  $H_2O_2$ , por el hecho de que conecta grupos funcionales -OH, los cuales ya hacen parte de las unidades estructurales de HEMA. Se recuerda que HEMA polimerizado (PHEMA) ha resultado de especial interés para aplicaciones biomédicas (Rabbi, et al, 2019; Hobzova, et al 2018), por lo que se esperaría que la incorporación de grupos -OH en los puntos terminales de cadena en un copolímero que contiene una alta proporción de PHEMA, no alterarían considerablemente el comportamiento químico de dicho material.

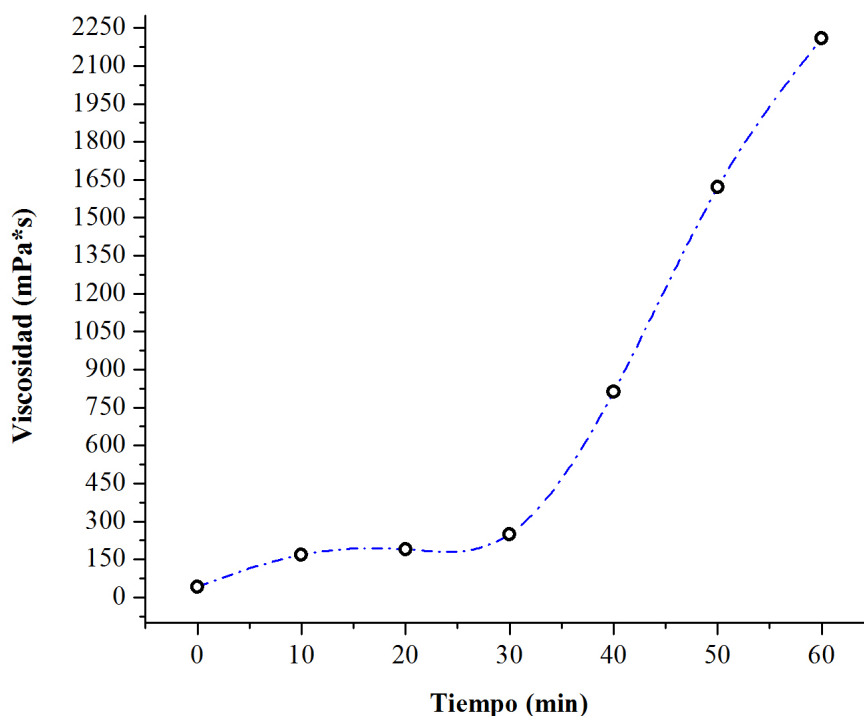
Después del proceso de purificación, todos los copolímeros PHEMA-co-PVP sintetizados a tiempos de reacción inferiores a los 80 minutos, presentaron insolubilidad en agua. A simple vista, al contacto de estos materiales con agua se observó la formación de aglomeraciones viscoelásticas con alta adherencia al tacto. Esto se atribuye al aumento en las asociaciones intermoleculares entre las cadenas del polímero, una vez interaccionan con las moléculas de agua. Este tipo de asociaciones por lo general están relacionadas con la formación de puentes de hidrógeno. Es importante considerar que tanto las estructura químicas de PHEMA como de PVP incluyen segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos. Las partes hidrofílicas, compuestas por el grupo -OH (en PHEMA) y el grupo amida (en PVP), prefieren asociarse con moléculas de agua, por lo que bajo esas condiciones el material tiende a absorber este disolvente. Por su lado, las partes hidrofóbicas, compuestas por las unidades seguidas de carbono-hidrógeno (C-H) en las dos estructuras, prefieren orientarse para formar asociaciones físicas de carácter hidrofóbico, las cuales pueden actuar como entrecruzamientos físicos transitorios, dificultando la solubilidad del material en los medios acuosos. Es así como el balance de este tipo de interacciones determina el comportamiento del material en cierto disolvente.



**Figura 17.** Porcentaje de conversión de monómeros en el copolímero PHEMA-co-PVP, como función del tiempo de reacción, a 50 °C. A partir de los 80 min se presenta la formación de hidrogeles o sólidos insolubles.

Finalmente, el estudio del porcentaje de conversión de la mezcla monomérica en copolímero (**Figura 17**) se convirtió en la mejor herramienta para definir el tiempo óptimo para finalizar la reacción de polimerización. Para este caso se encontró que dicho tiempo corresponde a los 60 minutos. En ese tiempo se obtiene un material con alta viscosidad, y a su vez, continúa siendo soluble en disolventes orgánicos como DMF, lo cual se muestra como una cualidad favorable para procesar el copolímero por medio de la técnica de electrohilado.

En la **Figura 18** se observa los cambios en la viscosidad de la mezcla que contiene a los monómeros (HEMA y NVP), conforme se convierten en copolímero, en dependencia del tiempo de reacción. La viscosidad de la mezcla fue evaluada hasta completar el tiempo óptimo (60 minutos), con la finalidad de establecer parámetros de control adicionales que permitan reproducir el material con mayor precisión. Se conoce que la viscosidad en un polímero aumenta conforme el peso molecular o el grado de entrecruzamiento también aumenta. En consecuencia, este parámetro nos brinda información importante sobre los cambios que se presentan en la mezcla, desde el momento en que es iniciada la polimerización. Para este caso, a los 60 minutos de reacción se obtiene una viscosidad de 2,210 mPa.s., obteniéndose un aumento de 98% en la viscosidad de la mezcla sin reaccionar (42 mPa.s). Caber recordar que la viscosidad determinada en este punto representa a la mezcla conformada por la fracción de monómeros sin reaccionar al tiempo t, y al copolímero formado a dicho tiempo, así como a las fracciones cortas de cadena que son propias del mecanismo de reacción de polimerización en cadena estimulada por radicales libres.



**Figura 18.** Viscosidad de la mezcla (monómeros y copolímero en crecimiento) en función del tiempo de reacción de polimerización, a 50°C.

## VII.II. Electrohilado de PHEMA-co-PVP

El procesamiento de materiales poliméricos por la técnica de electrohilado requiere el ajuste de varios parámetros, siendo los principales: composición de la disolución, voltaje, distancia, velocidad de inyección y humedad. Por lo tanto, determinar las condiciones óptimas para la generación de fibras requiere de la valoración y el ajuste de todas estas distintas variables que ofrece este proceso. Así, la variación de tan solo unos órdenes de magnitud en el voltaje aplicado o la composición de la disolución, desde un punto definido como óptimo, puede conllevar a que la fibra ya no se forme, o que su morfología o diámetro sea alterado. Incluso, la reproducción de experimentos con el ajuste exacto de algunas variables a valores reportados en la literatura para el hilado de un determinado polímero, no necesariamente garantiza la formación de materiales fibrosos, generalmente cuando los experimentos son reproducidos en diferentes sistemas de electrohilado. Esto se atribuye a las variaciones que pueden llegar a darse bajo condiciones que a menudo no son reportadas puntualmente en algunos trabajos, tales como humedad, temperatura ambiental, latitud y altitud. Sin lugar a dudas, un procesamiento que involucra y depende de la tasa de evaporación de un disolvente, por ejemplo, puede verse afectado por este tipo de factores.

Por todo lo anterior, en este trabajo se presentan las condiciones puntuales a las que el copolímero PHEMA-co-PVP fueron procesados hasta lograr la formación de fibra, y se omiten las condiciones experimentales a las cuales no se obtuvo producto, o bien cuando el producto no pudo ser recuperado del plato colector, o cuando el material obtenido no cumplió con las características deseadas para esta investigación (formación de recubrimientos laminados sin predominancia de fibras). De esta forma, en la **Tabla 2** se resumen las condiciones experimentales a las que fue expuesto el copolímero propuesto en esta investigación, para lograr la formación de fibras por electrohilado. En ella se muestra que el copolímero PHEMA-co-PVP [C] fue procesado por electrohilado [E] usando dos medios o disolventes diferentes: DMF y una disolución acuosa de etanol [Et]. Estas condiciones para la preparación de las disoluciones fueron probadas con base a estudios anteriores reportados para los homopolímeros PHEMA y PVP: DMF ha sido reportado como disolvente para el electrohilado de PVP (Domokos et al, 2019; Amith et al, 2018; Příkladný et al., 2007), mientras que disoluciones con altos contenidos de etanol han sido reportado como disolvente para el electrohilado de PHEMA (Eroglu et al, 2017; Ramalingam 2013). La mayoría de los trabajos reportados en la literatura para el electrohilado de PHEMA han explorado voltajes en el rango 20-45 kV, en los que generalmente han encontrado como valor óptimo 25 kV (Příkladný et al., 2007). Sin embargo, para esta investigación se exploró el voltaje de 20 kV como valor máximo, ya que este valor representa el voltaje límite permitido por el sistema de electrohilado utilizado para formar fibras del copolímero PHEMA-co-PVP. En ese sentido, también se destaca que los ensayos preliminares realizados a voltajes inferiores a 20 kV no arrojaron, a simple vista, la formación de fibra; aunque cabe resaltar que se requiere de una mayor exploración experimental que implique el ajuste de factores y la variación controlada de otros parámetros importantes del proceso a un rango de 10-20 kV, que permitan finalmente asegurar o descartar si bajo esas condiciones la producción de fibras de este material es un proceso factible. No obstante, la formación de fibras a un voltaje considerado

como el límite inferior del rango estudiado en otras investigaciones (20 kV), se considera como un logro importante dentro de los propósitos de esta investigación.

La adición de NaCl para aumentar la conductividad de la disolución de las formulaciones del copolímero en etanol, también fue evaluada tomando como base las investigaciones reportadas por Přádny et al., (2007). En la **Tabla 2** se encuentran registrado el porcentaje que representa la cantidad, en microlitros ( $\mu\text{L}$ ), adicionada de la disolución saturada de NaCl a una cantidad total 3 mL de la disolución del copolímero.

En primera instancia, cabe resaltar que las formulaciones líquidas que fueron preparadas con DMF como disolvente (materiales  $\text{CE}_{\text{DMF}}$ ), condujeron a la formación de fibras aisladas y de apariencia traslúcida, que crecieron con tendencia a adherirse sobre diferentes puntos dispersos en el volumen interno de la cámara de acrílico que compone el sistema de electrohilado. Se presume que en estos puntos puede acumularse carga electrostática, como resultado del alto voltaje aplicado y las condiciones ambientales generadas dentro de un sistema cerrado y aislado. Este tipo de cargas puede ocasionar que la dirección de crecimiento de la fibra sea diferente al área deseada para su lograr su acumulación y posterior recuperación. En ese aspecto, para esta investigación se observó que durante la aplicación del voltaje, una pequeña porción de las fibras del copolímero fueron acumuladas exclusivamente sobre los bordes del plato colector. Durante su formación, dichas fibras presentaron una forma u aspecto similar a las de un proceso natural de construcción de tela de araña. Sin embargo, con el transcurso de los minutos, una aparente relajación y compactación de estas fibras condujo la formación de materiales muy livianos y con baja resistencia al tacto, que presentaron una alta dificultad para su proceso de recuperación en la cámara de electrohilado. Por consiguiente, se recurrió a la estrategia de enrollado manual, en la que se utilizaron instrumentos como espátulas de acero, con la finalidad de lograr acumular una cantidad de fibras mínima que permitiera su evaluación y caracterización. Se destaca que el proceso de recuperación manual fue realizado una vez finalizado el proceso de electrohilado, con la fuente de voltaje en posición de apagado (OFF). Una vez expuestos al proceso de secado, el material recuperado del proceso presentó una mayor pérdida de volumen, pero a su vez mostró una mayor resistencia al tacto. Esto se atribuye a la pérdida de moléculas del disolvente por el proceso de evaporación y, en efecto, a la relajación viscoelástica y asociación intramolecular de las cadenas poliméricas.

Por otro lado, la inyección de formulaciones del copolímero preparadas con disolución acuosa de etanol al 66.3 % (materiales  $\text{CE}_{\text{Et}}$ ) en el sistema de electrohilado, condujo a la formación de materiales de color blanco aparentemente conformado por fibras, que recubrieron de forma preferente el área frontal del plato colector. No obstante, el recubrimiento presentó un crecimiento mayoritario en los bordes del plato colector, que se extendió progresivamente hacia el centro de dicha área durante la aplicación del voltaje. Para esta formulación también fue observado el direccionamiento del chorro desde la punta inyectora hacia otros sectores aislados de la cámara de electrohilado, aunque en una proporción mucho menor que la observada para los materiales  $\text{CE}_{\text{DMF}}$ . La incorporación de una pequeña fracción de malla de polipropileno en el plato colector es una estrategia

reportada por Přádný et al., (2007) y Gupta et al., (2005) para el electrohilado de copolímeros de PHEMA.

El tejido de polipropileno aporta distancias cercanas entre cada una de sus hebras, en las cuales las fibras electrohiladas pueden crecer como puente entre dos puntos equidistantes y acumularse durante un corto tiempo del proceso. En consecuencia, esta estrategia permite evaluar los materiales por microscopías electrónicas sin la necesidad de retirar o separar el material electrohilado de su soporte, resultando idónea para el electrohilado de materiales fibrosos que presentan baja resistencia mecánica, previo a su proceso de secado.

Finalmente, se destaca que variables como velocidad de flujo y distancia de inyección en la **Tabla 2**, fueron ajustados dependiendo de las propiedades de viscosidad de la disolución polimérica, así como de las intenciones de lograr reducir el desperdicio de disolución o de minimizar la atracción de gotas completas o chorros de disolución hacia el plato colector. Lo anterior es atribuido a fenómenos que se inducen cuando la velocidad de salida del líquido desde la punta del inyector, supera a la velocidad de atracción o formación de fibra en el plato colector y a la de evaporación del disolvente. De forma similar, se observa en la **Tabla 2** que aquellas formulaciones procesadas por electrohilado que contienen al copolímero PHEMA-co-PVP sin purificar ( $CME_{Et}$ ), requirieron de una distancia de inyección menor a las demás formulaciones. Lo anterior indica que tuvo que reducirse la distancia, para lograr que esta formulación acumulara cantidades equivalentes a las obtenidas con otros sistemas. Cabe resaltar que las formulaciones líquidas CME tienen una alta probabilidad de estar integradas por una mezcla del copolímero (C) y el monómero (M) sin reaccionar. Se recuerda que la reacción de polimerización se llevó a cabo hasta completar un 22 % de conversión de monómero en polímero. En consecuencia, una muestra del medio de reacción sin someterse al proceso de purificación, tendría un 78 % de probabilidad de contener fracciones de monómero sin reaccionar o de oligómeros (polímeros de cadena corta). Evidentemente, esto afectó las condiciones de procesamiento para estas formulaciones.

### VII.III. Caracterización microscópica de materiales

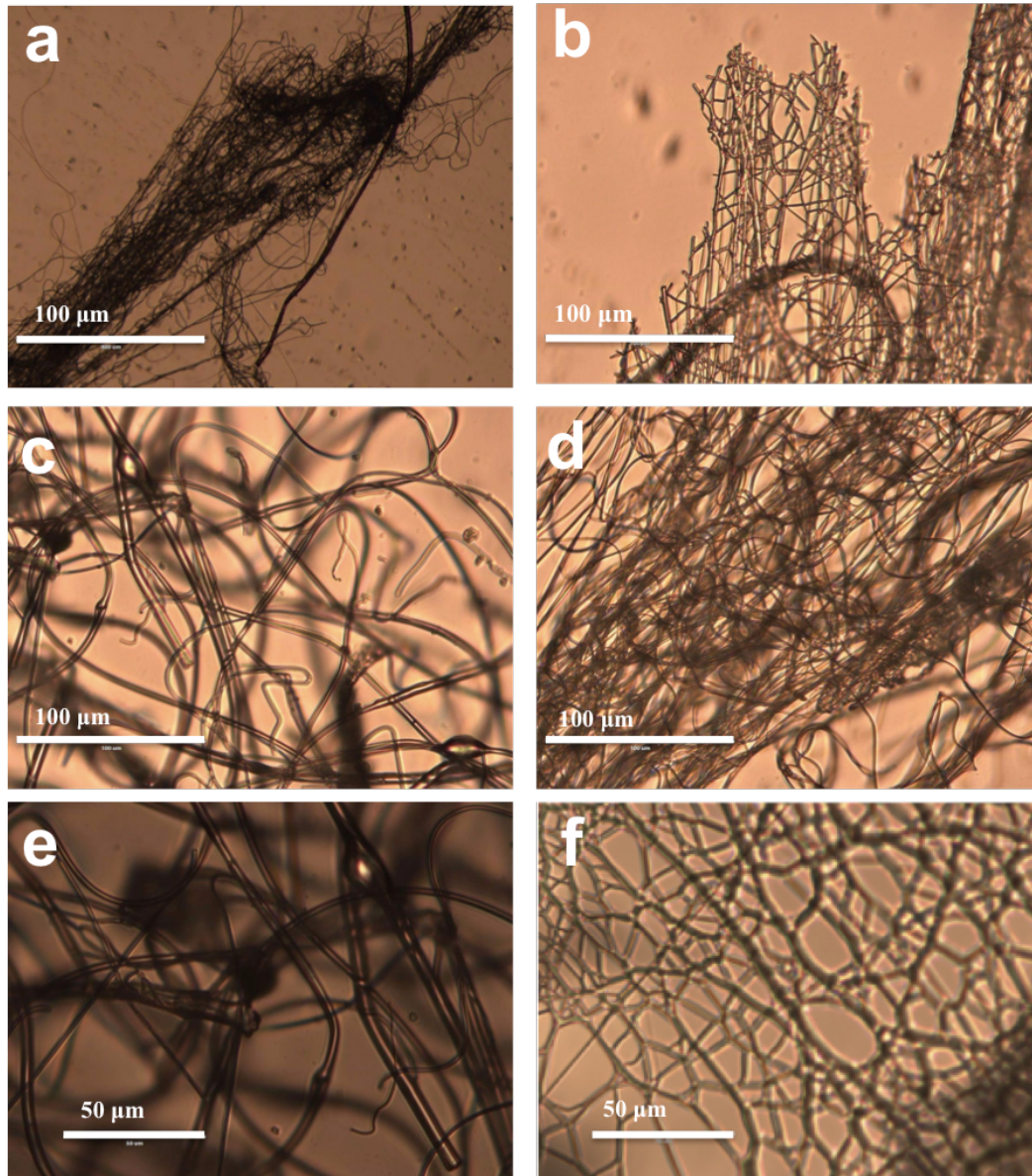
En la **Figura 19** se muestran las imágenes obtenidas por microscopía óptica de los materiales procesados por electrohilado de las formulaciones  $CE_{DMF}$ , a diferentes magnificaciones. Estos resultados fueron obtenidos entre 30-60 minutos posterior a su procesamiento por electrohilado, sin someter los materiales a un proceso de secado riguroso, por lo que se asume que el diámetro registrado de las fibras se debe a la sinergia del material polimérico y su capacidad de absorber el disolvente. Es importante resaltar que en la morfología de los materiales predomina la formación de fibras que se unen entre sí para formar redes (**Figura 19.b y 19.f**). En la mayoría de estas imágenes se puede estimar un diámetro aproximado a 1-3  $\mu m$ . Esta caracterización fue realizada como medida rutinaria para corroborar si la formulación expuesta a las condiciones de electrohilado había formado efectivamente materiales fibrosos. Por lo tanto, la observación de los materiales  $CE_{Et}$  por esta técnica no es mostrada en este trabajo.

**Tabla 2.** Variables de electrohilado de copolímero PHEMA-co-PVP, procesado a un voltaje de 20 kV, con una punta de jeringa de 0.25 mm y un tiempo de procesamiento de 30 min. “C” denota al copolímero PHEMA-co-PVP, “E” corresponde al copolímero que fue procesado por electrohilado, “M” indica que el copolímero no fue purificado previo al procesamiento de electrohilado, “x” hace referencia al disolvente (DMF o Et), “y” indica el porcentaje de copolímero en la disolución, y “z” se refiere al porcentaje de NaCl en la disolución.

Código de muestra (CE <sub>x-y:z</sub> )	[Copolímero] (% v/v)	Disolvente	NaCl (μL en 3 mL de sol : %)	Velocidad de inyección (mL.h <sup>-1</sup> )	Distancia (cm)	Temperatura (°C) / humedad (%)
CE <sub>DMF</sub>	20	DMF	---	1.75	22	22/33
CE <sub>Et-15</sub>	15	Etanol (ac.)	---	1.31	20	27/43
CE <sub>Et-15:2</sub>	15	Etanol (ac.)	58 : 2.0	1.31	20	26/46
CE <sub>Et-15:4</sub>	15	Etanol (ac.)	120 : 4.0	1.83	20	28/53
CE <sub>Et-15:6</sub>	15	Etanol (ac.)	187 : 6.0	1.83	20	28/55
CE <sub>Et-20:2</sub>	20	Etanol (ac.)	58 : 2.0	1.83	20	28/52
CE <sub>Et-20:4</sub>	20	Etanol (ac.)	120 : 4.0	1.83	20	28/55
CE <sub>Et-20:6</sub>	20	Etanol (ac.)	187 : 6.0	1.31	20	27/52
CE <sub>Et-25:2</sub>	25	Etanol (ac.)	58 : 2.0	2.5	20	25/59
CE <sub>Et-25:4</sub>	25	Etanol (ac.)	120 : 4.0	2.5	20	25/62
CE <sub>Et-25:6</sub>	25	Etanol (ac.)	187 : 6.0	2.5	20	25/62
CME <sub>Et-15:2</sub>	15	Etanol (ac.)	58 : 2.0	1.31	15	25/64
CME <sub>Et-15:6</sub>	15	Etanol (ac.)	187 : 6.0	1.31	15	25/64

La **Figura 20** muestra las micrografías SEM de las fibras electrohiladas a partir de la formulación CE<sub>DMF-20</sub>. En ellas se observa un diámetro variable, entre los nanómetros y las micras, específicamente en un rango de 300 nm - 2.6 μm, con una media de 995 nm, rango reportados anteriormente por Amith y colaboradores en 2018 (Amith, et al, 2018). En adición, también se observa, a diferentes magnificaciones y áreas de análisis, que aunque el material se compone de fibras de diferentes diámetros, cada fibra presenta una morfología homogénea, sin formación de defectos tipo perlas (esferas), distinguiéndose entrecruzamientos que unen fibras entre sí, para formar materiales tipo red, tal como se observó con la microscopía óptica (**Figura 19**). La reducción en el diámetro de fibra estimado desde las micrografías SEM, comparadas con la microscopía óptica, se atribuye al efecto del proceso de secado, el cual reduce la cantidad de disolvente que cada fibra puede absorber, y en efecto, promueve la interacción intermolecular entre las cadenas que componen el copolímero, y causan así, que el volumen del polímero también sea reducido.

Es importante recordar que aún con la morfología observada en la **Figura 20**, la formulación electrohilada usando DMF como disolvente, generó rendimientos relativamente bajos, en cuanto a la cantidad total (en mg) obtenido del material fibroso. Debido a que no se encontraron reportes en la literatura que relacionen el uso de NaCl en DMF para aumentar la conductividad de una disolución polimérica, y con ello mejorar los resultados de electrohilado; esta posibilidad no fue explorada en este trabajo de investigación.

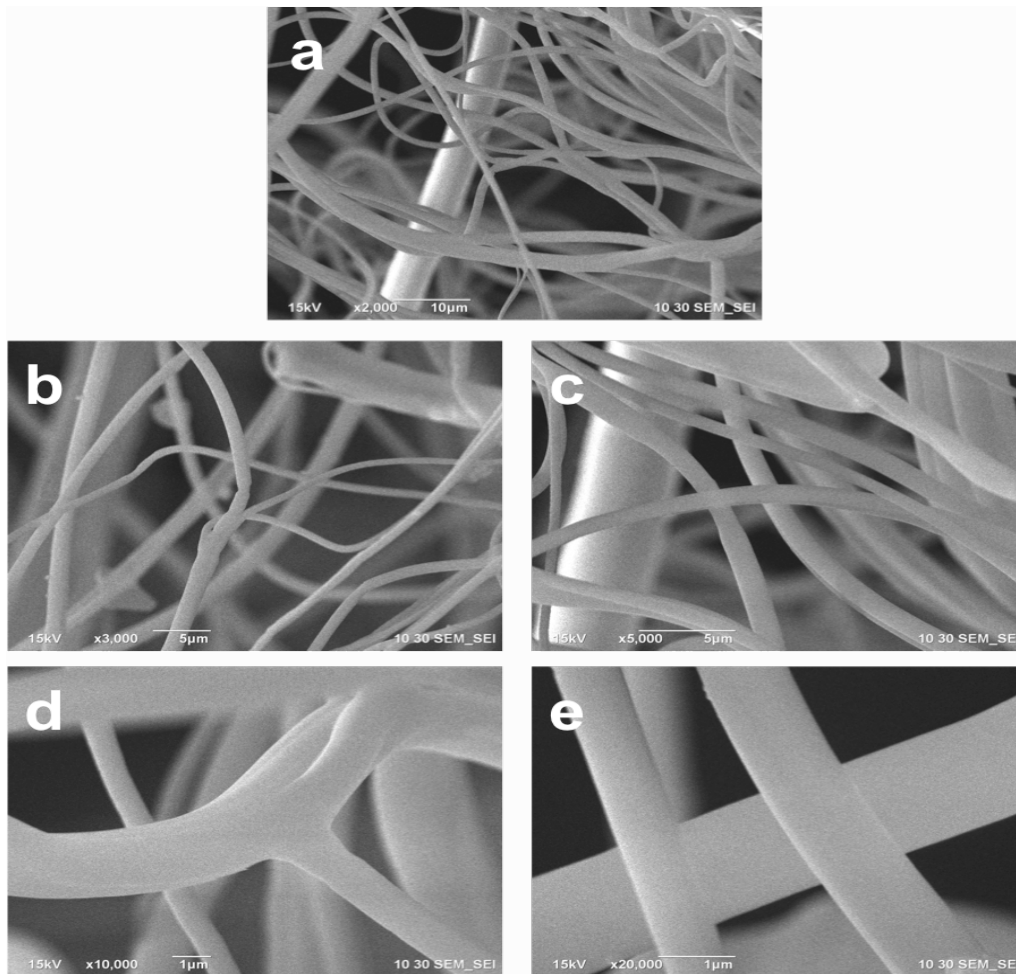


**Figura 19.** Imágenes obtenidas por microscopía óptica de los materiales  $CE_{DMF-20}$  formados después de su procesamiento por electrohilado.

Para los materiales formados por el procesamiento con electrohilado de las formulaciones de copolímero en una disolución acuosa de etanol (materiales  $CE_{Et}$ ; ver **Tabla 2**), durante la exposición de la disolución a una diferencia de voltaje, se observó que la cantidad del material depositado en el plato colector fue mínima, comparada con las logradas al adicionar disolución acuosa de NaCl a la mezcla del copolímero. Esta diferencia fue tan significativa,

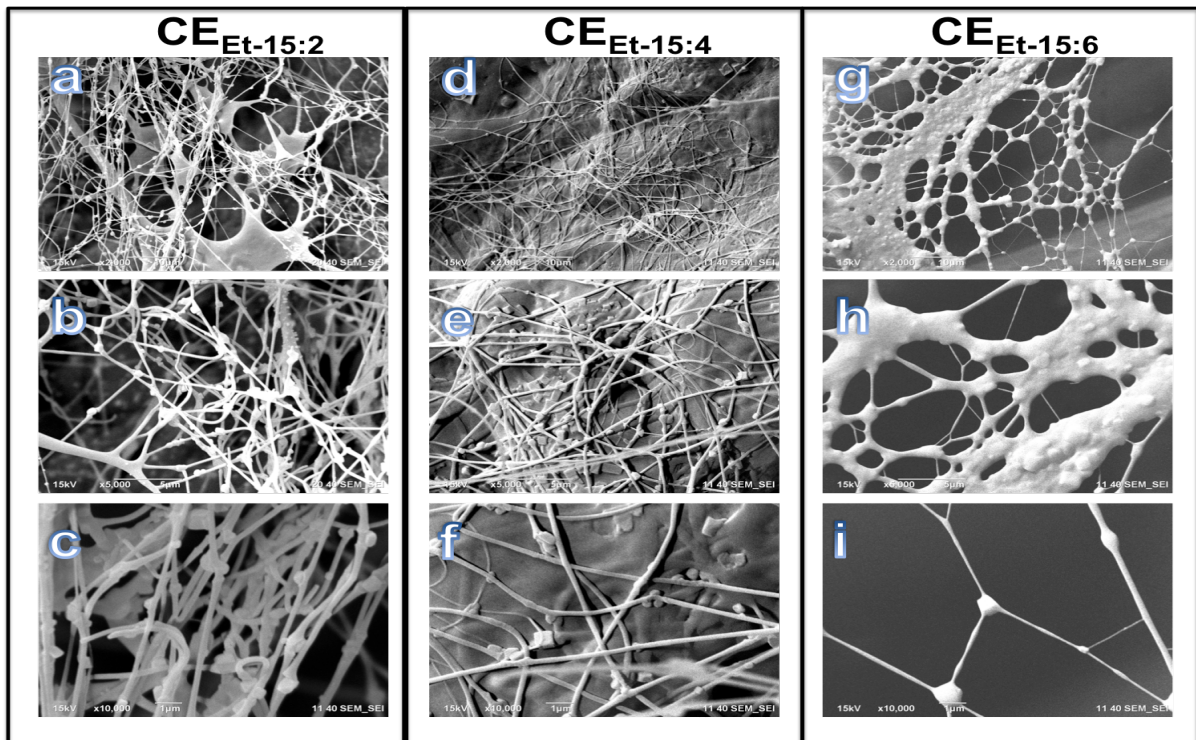
que la separación entre el material electrohilado en ausencia de la sal y el soporte, no fue posible por medios mecánicos. Se asumió que dicho material se componía especialmente de recubrimiento no fibroso, por lo que no se caracterizó dicho producto. Se resalta entonces que la adición de NaCl causó un aumento generalizado en la cantidad del material depositado después del proceso de electrohilado, y con ello, la separación mecánica entre el material y el soporte se vio mejorada.

En la **Figura 21** se observan las micrografías SEM de los materiales  $CE_{Et-15}$  formados por electrohilado y el efecto causado por la adición de NaCl a la disolución de copolímero. Aquí, se observa que el aumento en el contenido de NaCl de 2.0 (**Figura 21(a-c)**) a 4.0 % (**Figura 21(d-f)**) conduce a la disminución del diámetro de la fibra de un rango 100nm - 660nm a 140nm - 416nm. Además, la formación de láminas de recubrimiento (**Figura 21a**) también se ve reducida con este cambio en la composición de sal. Sin embargo, el aumento del porcentaje de NaCl a 6.0 % (**Figura 21(g-i)**) contribuye con el aumento en la generación de defectos en el material electrohilado, obteniéndose porciones mayoritarias de recubrimiento y zonas limitadas compuestas de fibras. Aunque las pocas fibras generadas presentan un diámetro menor (100nm - 304nm), este material no se considera como óptimo por su bajo rendimiento y la dificultad de recuperación desde el soporte. En la **Figura 22** se observa una micrografía SEM a baja magnificación, en la que se muestra que el material  $CE_{Et-15:6}$  fue evaluado desde la malla de polipropileno, ya que su separación mecánica desde el soporte de aluminio no fue posible. Esta dificultad de separación es típica cuando el recubrimiento logrado es no fibroso.

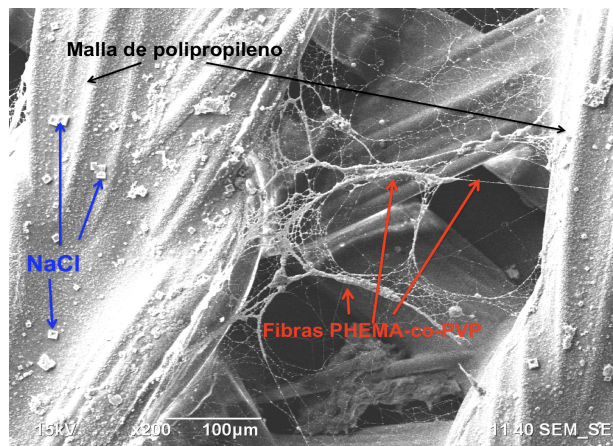


**Figura 20.** Micrografías SEM de  $CE_{DMF-20}$  procesado por electrohilado a diferentes magnificaciones: x2,000 (a), x3,000 (b), x5,000 (c), x10,000 (d), y x20,000 (e)

Es claro que las micrografías de la **Figura 21** muestran la presencia de gránulos o cristales distribuidos en las fibras. La adición de NaCl es sugerida por lo general en este tipo de procesos para aumentar la conductividad de la disolución polimérica (Duque, et al, 2013). Así mismo, se han reportado la presencia de pequeños cristales incrustados en fibras de poli(ácido acrílico) [PAA] (Beglou y Haghui, 2008) y más recientemente con poli(metil metacrilato) [PMMA] (Akhtar, et al, 2015). Para este caso, es evidente que debido a su morfología y a la composición misma de la disolución procesada, los cristales observados en las micrografías corresponden a la presencia de NaCl sólido, el cual es formado en el proceso de electrohilado, como producto de la evaporación del disolvente durante dicho proceso. Esto resulta congruente al observar que con el aumento en la concentración de sal, incrementa la cantidad de cristales dispersos a lo largo de los materiales que contienen fibras ( $CE_{Et-15:2}$  y  $CE_{Et-15:4}$ ; **Fig 21 (a-f)**) o de las que se constituyen principalmente de recubrimiento ( $CE_{Et-15:6}$ ; **Fig 21 (g-i)**).



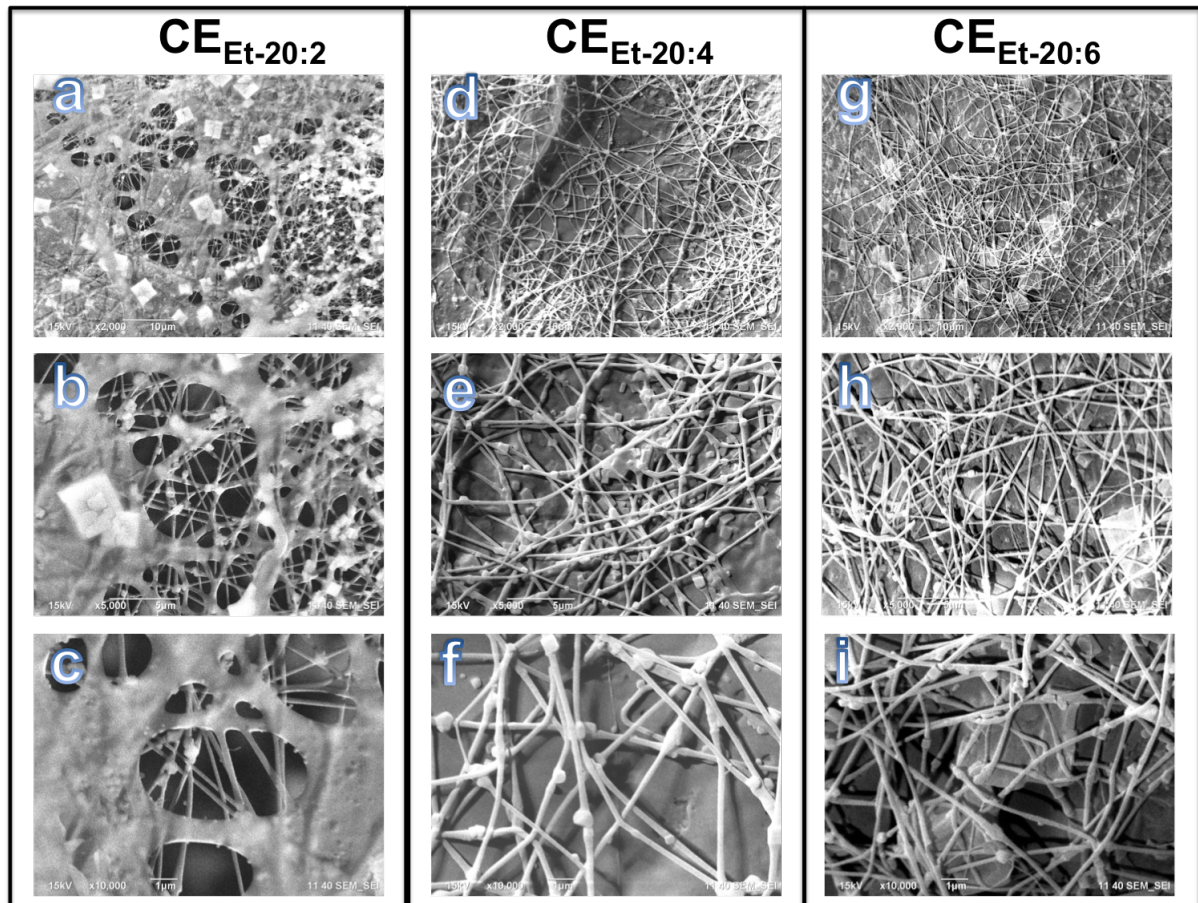
**Figura 21.** Micrografías SEM de los materiales  $CE_{Et}$  conteniendo 15 % del copolímero PHEMA-co-PVP, con diferentes concentraciones de NaCl: (a-c) 2.0 % de NaCl ( $CE_{Et-15:2}$ ); (d-f) 4.0 % de NaCl ( $CE_{Et-15:4}$ ); y (g-i) 6.0 % de NaCl ( $CE_{Et-15:6}$ ).



**Figura 22.** Micrografía SEM de material  $CE_{Et-15:6}$  formado sobre malla de polipropileno.

En la **Figura 23** se muestran las micrografías SEM de los materiales  $CE_{Et-20}$  formados por el procesamiento por electrohilado, en la presencia de NaCl, el cual fue adicionado para aumentar la conductividad de la disolución. De forma similar a los materiales  $CE_{Et-15}$  (**Figura 21 y 22**), fueron evaluados los efectos de la adición de NaCl en volúmenes necesarios para ajustar las concentraciones la disolución de copolímero en 2.0, 4.0 y 6.0 % (v/v), usando etanol como disolvente. Sin embargo, se observa que a bajas concentraciones de sal (**Figura 23(a-c)**), predomina la formación de recubrimiento no fibroso, con cristales de NaCl dispersos en la matriz polimérica formada. Aunque se distinguen algunas fibras uniendo láminas de recubrimiento, se considera que este material no es óptimo para los objetivos de

esta investigación, por componerse de un sistema que carece de fibras. Cabe resaltar que la separación de este material desde su soporte, presentó una alta dificultad, lo que está relacionado con la formación de recubrimientos no fibrosos. Sin embargo, el aumento en la concentración de sal a 4.0 % condujo a la formación de fibras con diámetros en el rango 150 nm - 400 nm, las cuales presentan dispersión de cristales de la sal a lo largo de cada fibra (Figura 23(d-f)).

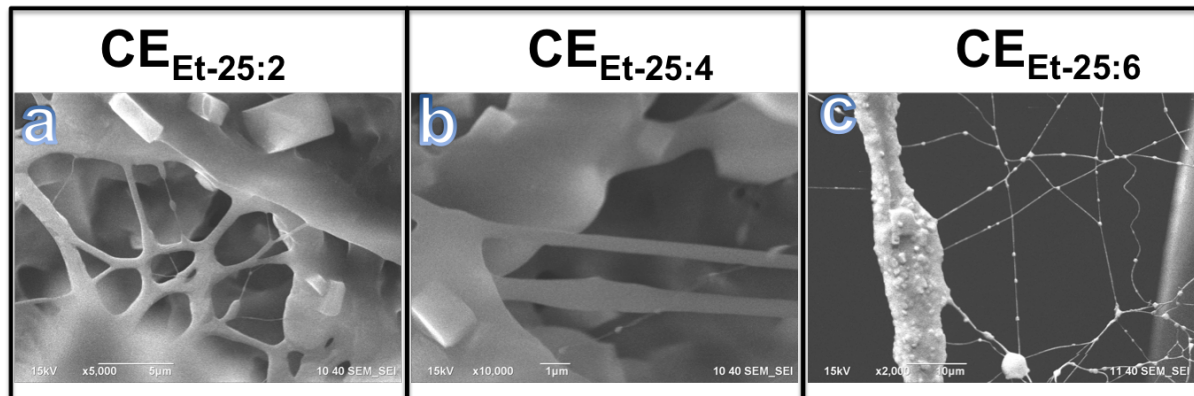


**Figura 23.** Micrografías SEM de los materiales  $CE_{Et}$  conteniendo 20 % del copolímero PHEMA-co-PVP, con diferentes concentraciones de NaCl: (a-c) 2.0 % de NaCl ( $CE_{Et-20:2}$ ); (d-f) 4.0 % de NaCl ( $CE_{Et-20:4}$ ); y (g-i) 6.0 % de NaCl ( $CE_{Et-20:6}$ ).

En la **Figura 23(g-i)** se observa que el aumento en la concentración de NaCl conlleva a una pequeña disminución en el diámetro de fibra (70 nm - 250 nm), pero debido al exceso de la sal, se aprecia la formación de cristales de NaCl de mayor tamaño, incluso de forma aislada a los componentes fibrosos. Con base en estos resultados, una concentración de sal ajustada a 4.0 % genera mejores cualidades en el material electrohilado, para la serie  $CE_{Et-20}$ .

En la **Figura 24** se muestran las micrografías SEM de los materiales  $CE_{Et-25}$ . En ella se observa que las formulaciones preparadas con un porcentaje de 2.0 (**Figura 24(a)**) y 4.0 % (**Figura 24(b)**) de NaCl forman, de manera predominante, recubrimientos no fibrosos, semejantes a matrices poliméricas que tienen dispersos cristales de la sal. Sin embargo, al

aumentar la concentración de NaCl a 6.0 % ((**Figura 24(c)**)), se observa la formación de fibras con un diámetro de 100 nm - 304 nm, que contienen pequeños cristales de NaCl a lo largo de su eje. Cabe resaltar que este material fue analizado desde la malla de polipropileno, debido a la dificultad que presentó para ser colectado desde el soporte de aluminio.



**Figura 24.** Micrografías SEM de los materiales  $CE_{Et}$  conteniendo 25 % del copolímero PHEMA-co-PVP, con diferentes concentraciones de NaCl: (a) 2.0 % de NaCl ( $CE_{Et-25:2}$ ); (b) 4.0 % de NaCl ( $CE_{Et-25:4}$ ); y (c) 6.0 % de NaCl ( $CE_{Et-25:6}$ ).

El análisis SEM revela que electrohilado del copolímero PHEMA-co-PVP, usando etanol/agua como disolvente, se ve beneficiado hacia la formación de fibras cuando las concentraciones (y por tanto sus viscosidades) decrecen, pero, se requieren de cantidades mayores de NaCl cuando la concentración del copolímero se aumenta. Sin embargo, en la práctica, cada que se aumentaron las concentraciones de copolímero, la dificultad para colectar o separar el recubrimiento obtenido después de aplicar la diferencia de voltaje, fue cada vez mayor, lo que resulta congruente con la formación de recubrimiento no fibroso en los procesos de cambio mostrados en las imágenes que componen las **Figuras 21-24**. Es importante señalar que las concentraciones altas de un polímero, justo por encima del valor crítico, puede ocasionar que se obstaculice el flujo de la disolución entre la punta de la aguja, lo que puede resultar en una fibra defectuosa o aperlada, afectando la tasa de crecimiento y la calidad del material fibroso (Reddy, 2013; Zhang et al., 2011).

En la literatura se han encontrado reportes de diámetros de fibra en rangos de 270 nm - 3.6  $\mu\text{m}$  para fibra electrohiladas de PHEMA (Zhang et al., 2011); y en rangos de 200 nm-1.8  $\mu\text{m}$  para fibras de PVP (Amith, et al, 2018). Por lo general, las fibras formadas a voltajes relativamente altos (superiores a 15 kV) y altas velocidades de inyección son gruesas, es decir, presentan diámetros en el orden de micras (Duque et al., 2013). Esto es originado por el aumento de la longitud de chorro de la disolución polimérica (Baumgarten, 1971). De esta manera, se puede inferir que las fibras logradas en este trabajo se encuentran en el rango de diámetros reportados por otros autores que han investigado el comportamiento de los homopolímeros de PHEMA y PVP. Así, en materia de rendimiento, resulta importante señalar que el copolímero propuesto presentó un mayor potencial a formar fibras en medios de etanol/ $H_2O$ , tal como lo han reportado otros autores para su homopolímero PHEMA (Přádný

et al., 2007; Gupta et al., 2005), comparado con el uso de DMF como disolvente, tal como lo han reportado para el homopolímero PVP (Amith, et al, 2018). Esto de cierta forma demuestra que el copolímero PHEMA-co-PVP propuesto presenta un mayor contenido de PHEMA (en estructura de bloques) que de PVP (con frecuencia alternada en la estructura del copolímero), tal como lo indican los estudios de los coeficientes de reactividad reportados en la literatura (Al-Issa et al., 1985; Reddy et al., 1985; Gallardo et al., 1999; Faragalla et al., 2002).

Por otro lado, la aplicación esperada a futuro para este copolímero es el andamiaje celular, por ello, se debe entender que para la fabricación de andamios celulares es necesario considerar varios aspectos fundamentales, entre ellos la geometría de las fibras. Una geometría homogénea, permitirá direccionar la regeneración tisular o la generación de tejido nuevo, así como de los sistemas de vascularización y de aquellos que permiten el intercambio de fluido y nutrientes biológicos. Esto también se relaciona con el descarte de los desechos que se generen, y en consecuencia, esta clase de materiales deben ser estructuras porosas con interconexión entre ellas (Walker, et al, 2017; Norman y Desai, 2006; Naira y Laurencin, 2007; Van Vlierberghe, et al, 2011). Por lo tanto, los materiales propuestos en este trabajo:  $CE_{DMF-20}$ ,  $CE_{Et-15-2}$ ,  $CE_{Et-15-4}$ ,  $CE_{Et-20-4}$  y  $CE_{Et-20-6}$ ; se adaptan por ahora a dichos requerimientos. Debido a que las formulaciones  $CME_{Et}$ , las cuales contienen el copolímero sin purificar, a simple vista y por su fuerte adhesión al soporte colector no generaron materiales fibrosos, se decidió descartarlos para su evaluación microscópica. Aparentemente un alto contenido de especies monoméricas sin reaccionar afectan drásticamente la formación de fibra.

Por último, se destaca que la evaluación microscópica demuestra la formación de fibras de un material cuya síntesis optimizada para su procesamiento por electrohilado no ha sido reportada hasta el momento en la literatura. Esto indica que las condiciones evaluadas para el procesamiento del material por electrohilado resultaron adecuadas para generar materiales fibrosos de PHEMA-co-PVP, utilizando dos disolventes diferentes. Sin embargo, es necesario la optimización del electrohilado de este material, y se abre con este trabajo la pauta para que en trabajos futuros se realice la exploración de concentraciones del copolímero a valores inferiores a 15 % (v/v).

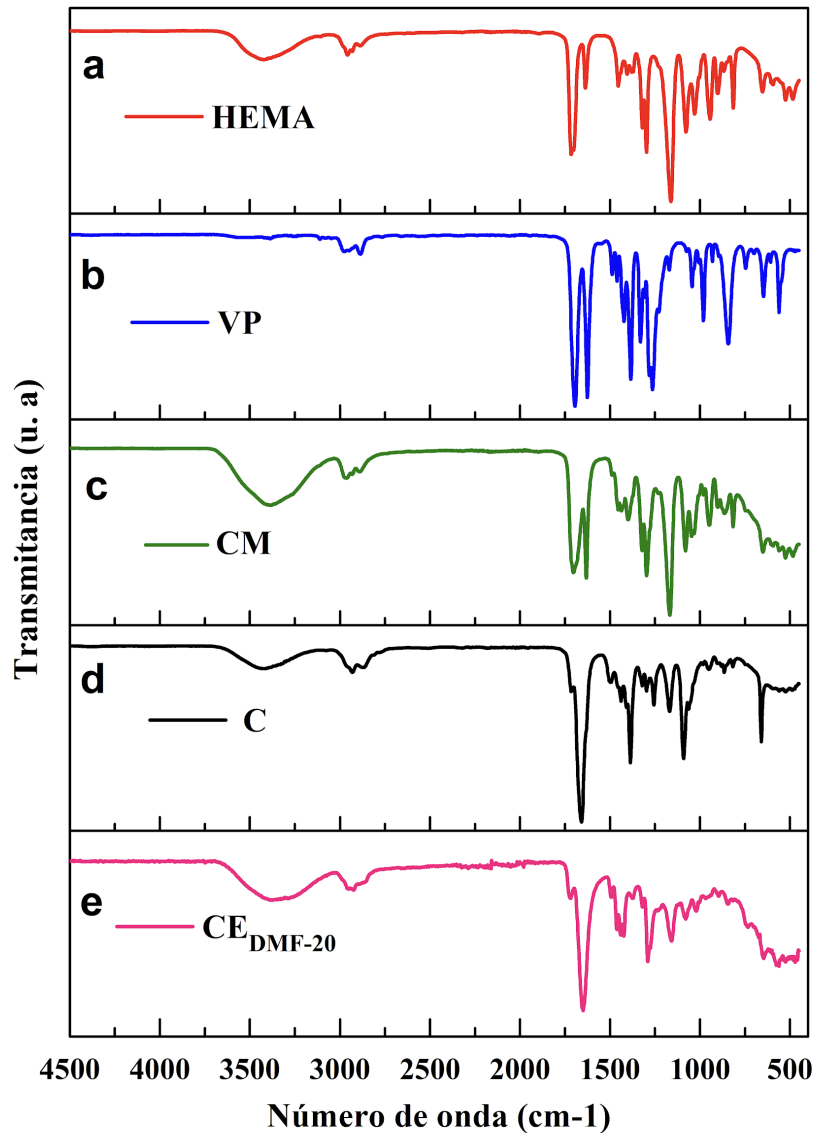
#### VII.IV. Caracterización de materiales por FTIR-ATR

Para esta investigación, la caracterización FTIR-ATR tiene la finalidad de demostrar que el proceso de polimerización y de purificación del copolímero líquido promueve cambios estructurales, y además, que el procesamiento por electrohilado no altera la estructura química del copolímero ya formado. Por ello, en la **Figura 25** se muestra el espectro de FTIR para los monómeros HEMA (**Figura 25a**) y VP (**Figura 25b**), así como para el copolímero PHEMA-co-PVP en diferentes presentaciones: sin ser sometido al proceso de purificación (CM; **Figura 25.c**); purificado (C; **Figura 25d**); y electrohilado usando DMF como disolvente, a una concentración del copolímero de 20 % (v/v) ( $CE_{DMF-20}$ ; **Figura 25e**).

En el espectro correspondiente al monómero HEMA (**Figura 25a**) se observan señales ubicadas a  $3422\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al grupo funcional hidroxilo (-OH), a  $3100$  y  $1410\text{ cm}^{-1}$  que son asignadas a las bandas de tensión y vibración simétrica y asimétrica del enlace C-H, respectivamente; y a  $1714\text{ cm}^{-1}$  que es atribuida a la presencia del grupo carbonilo (C=O) en la función éster de esta molécula (**Figura. 1**). Esta función química también presenta una señal a  $1320\text{ cm}^{-1}$  que indica la unión covalente sencilla C-O. Para este monómero, la señal ubicada a  $1636\text{ cm}^{-1}$  corresponde al doble enlace insaturado (C=C) entre átomos de carbono (Roy et al., 2011; Vargün y Usanmaz 2010). Por otro lado, para el monómero VP (**Figura 25b**) las señales características se ubican a  $3100$ ,  $1710$ ,  $1416$  y  $1291\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a la presencia de los enlaces C-H (tensión simétrica y asimétrica), C=O (tensión del grupo carbonilo), C-H (vibración) y C-N (tensión del grupo lactama) (Hemalatha et al., 2014; Ismail, et al, 2017). De forma similar que HEMA, el monómero VP presenta una señal a  $1630\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la señal C=C de la parte insaturada de la molécula (**Figura 1**). Cabe resaltar que la presencia de este enlace en determinada molécula se reconoce por otorgar una alta toxicidad (Yoshii, 1997). En consecuencia, el espectro FTIR para el copolímero líquido CM (**Figura 25.c**) muestra las señales características de los monómeros HEMA y VP, con una moderada intensificación de la banda correspondiente al enlace C=C. Lo anterior se atribuye a que el copolímero sin purificar tiene una alta probabilidad de contener monómero sin reaccionar. Dadas las aplicaciones esperadas de este material, resulta necesario lograr eliminar la presencia de este tipo de grupos, por ello, en este trabajo se evaluó la evolución de esta señal conforme el proceso de purificación del copolímero PHEMA-co-PVP, así como el del material electrohilado. Por consiguiente, en la **Figura 25.d** se demuestra que esta señal específica de C=C desaparece, pero las señales que corresponden a los grupos OH, C-H, C=O y CN propias de HEMA y VP polimerizados (PHEMA y PVP, respectivamente) se conservan en el espectro FTIR-ATR. Naturalmente, la señal correspondiente al grupo C=O es desplazada hacia  $1660\text{ cm}^{-1}$  en el copolímero purificado, debido a que con la polimerización se pierde el efecto inductivo del doble enlace C=C. Además, esta banda muestra un ensanchamiento, como producto de la contribución de los dos grupos carbonilo provenientes de la función éster para PHEMA y amida para PVP. De esta forma, queda demostrado que el proceso de purificación si ayuda a retirar restos de monómero desde el copolímero líquido. No obstante, por medio del espectro FTIR de la **Figura 25.e** también se demuestra que el proceso de electrohilado no afecta los grupos funcionales del copolímero, pese a los altos voltajes con los que se trabaja, ya que conserva las señales características del producto purificado. Entonces, la técnica de electrohilado se destaca como una herramienta efectiva para generar materiales fibrosos, sin alterar la composición química elemental de sus constituyentes.

#### VII.V. Caracterización termogravimétrica

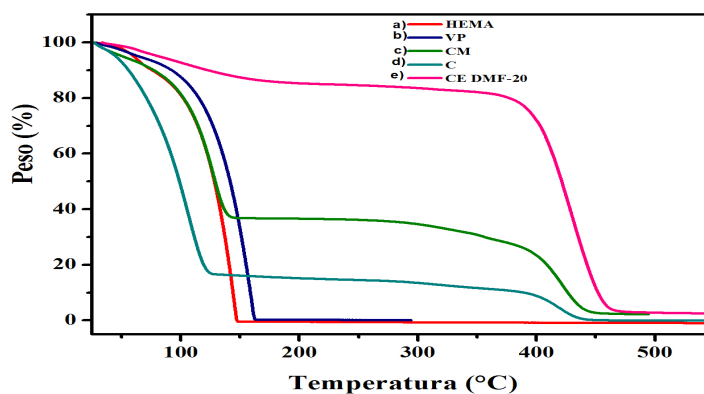
De forma similar a los estudios por espectroscopía FTIR, los análisis TGA nos brindan información relevante sobre las diferencias en las propiedades de degradación de las materias primas (monómeros), los procesos de purificación del copolímero propuesto y los materiales generados después de su procesamiento por electrohilado.



**Figura 25.** Espectro FTIR-ATR de monómeros HEMA (a) y VP (b), y del copolímero PHEMA-co-PVP en diferentes presentaciones: (c) sin purificar [CM], (d) purificado [C] y (e) electrohilado [CE<sub>DMF-20</sub>].

En la **Figura 26** se observa que los termogramas TGA de HEMA y VP presentan una tendencia de descomposición en una sola etapa, con una pérdida del 20 % del peso de la sustancia a temperaturas de 101 y 115 °C, respectivamente. Estas temperaturas correlacionan con los puntos de ebullición o de inflamabilidad de estas sustancias, que se caracterizan por presentarse en estado líquido, a condiciones normales (UK 1998). Cabe resaltar que tanto HEMA como VP a los 148 y 163 °C, respectivamente, no dejan ningún residuo de descomposición. Por otro lado, el copolímero sin purificar (CM), presenta una descomposición de dos etapas: la primera inicia a los 70 °C (20 % de pérdida de peso), mientras que la segunda se presenta alrededor de los 419 °C. La primera transición involucra la pérdida de humedad (Tsukada, et al, 1993; Passos, et al, 2016), que por lo general ocurre hasta los 100 °C, y además incluye las transiciones térmicas propias de los monómeros, ya que el copolímero sin purificar tiene una alta probabilidad de contener monómero residual. La segunda transición de CM se relaciona con la pérdida del anillo pirrolidónico por

descomposición de las fracciones de PVP (Vishwakarma et al., 2015). Este copolímero prácticamente no deja residuo por encima de los 440 °C. En cuanto al copolímero purificado (C), este también presenta descomposición en dos etapas, pero a diferencia de CM, su primera transición inicia a los 102 °C, ajustándose más a la transición experimentada por el monómero HEMA. No obstante, a esta temperatura se considera normal que materiales hidrofílicos presenten una pérdida de peso incluso por debajo de los 100 °C, debido a la humedad o agua asociada a este tipo de polímeros (Tsukada, et al, 1993). Aún con dicha pérdida de peso, para el copolímero C la primera transición se relaciona entonces a la presencia de unidades de PHEMA en su estructura, mientras que una segunda transición que ocurre alrededor de los 419 °C, es atribuida a las unidades de PVP en el polímero. De esta forma, para el copolímero C se deduce que la transición térmica asignada a la presencia de PHEMA representa el 60 % del material, mientras que la transición térmica asociada a la presencia de PVP representa al 40 % del copolímero. Este copolímero líquido ya deja un residuo equivalente al 2.4 % en peso. Esto es un indicativo de que el copolímero contiene cadenas entrecruzadas, por ello la descomposición térmica genera residuos de carbono. Finalmente, las fibras electrohiladas ( $CE_{DMF-20}$ ), cuentan también con dos transiciones térmicas: la primera ocurre en el rango de 50-160 °C, la cual corresponde a una pérdida del 10% del peso del material, y se atribuye al efecto sinérgico de la evaporación del agua y degradación de los grupos -OH y  $CH_3OH$  provenientes de los bloques de PHEMA; la segunda transición inicia a partir de los 390°C y corresponde a un proceso de ruptura general de cadenas poliméricas fuertemente asociadas (90 % del copolímero), tal como lo reportan Passos y colaboradores (Passos, et al, 2016). La reducción en la pérdida de peso a temperaturas inferiores a 400 °C para el material  $CE_{DMF-20}$ , en comparación con las otras muestras evaluadas, indican que el proceso de electrohilado del copolímero propuesto aumentan la resistencia térmica del material. **En la Tabla 3** se resumen todas las transiciones térmicas determinadas de los análisis TGA.



**Figura 26.** Termograma de descomposición en peso en función de la temperatura para monómeros HEMA (a) y VP (b), y copolímero PHEMA-co-PVP en diferentes presentaciones: (c) sin purificar [CM], (d) purificado [C] y (e) electrohilado [ $CE_{DMF-20}$ ].

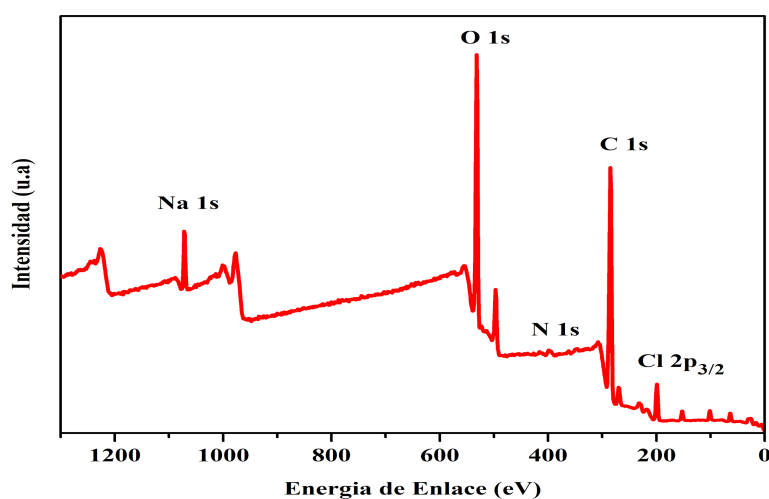
## VII.VI Caracterización química por XPS

La **Figura 27** muestra el espectro XPS de baja resolución para el copolímero PHEMA-co-PVP en disolución acuosa de etanol, el  $CE_{Et-20:4}$ , después de ser procesado por la técnica de

electrohilado. En ella se demuestra la presencia de los siguientes elementos: carbono (C 1s), oxígeno (O 1s) y nitrógeno (N 1s), los cuales hacen parte de la estructura química de PHEMA y PVP (**Figura 1**). Sin embargo, debido a que el procesamiento del material fue estimulado por adición de NaCl, para lograr aumentar la conductividad de la disolución del copolímero, en el espectro XPS de la Figura 27 se observa la contribución elemental de sodio (Na 1s) y cloro (Cl 2p<sub>3/2</sub>).

**Tabla 3.** Resultados de transiciones térmicas y generación de residuos en determinaciones TGA de los materiales que hacen parte de esta investigación.

Nombre de la muestra	T1 (°C)	T2(°C)	Residuo (%)
HEMA	101	--	0
VP	115	--	0
CM	70	419	0
C	102	400	2.4
CE <sub>DMF-20</sub>	50-160	390	5



**Figura 27.** Espectro XPS de baja resolución para la muestra CE<sub>Et-20:4</sub>.

Para los materiales propuestos en esta investigación, la señal correspondiente a nitrógeno (N 1s) correlaciona directamente con la presencia de PVP en el copolímero, ya que PHEMA no contiene a este elemento en su estructura. Así, debido a la estequiometría utilizada y esperada en la estructura química del copolímero PHEMA-co-PVP, la relación en intensidad de N 1s debe de ser menor a la de los otros elementos que son contribuidos tanto por PHEMA como PVP.

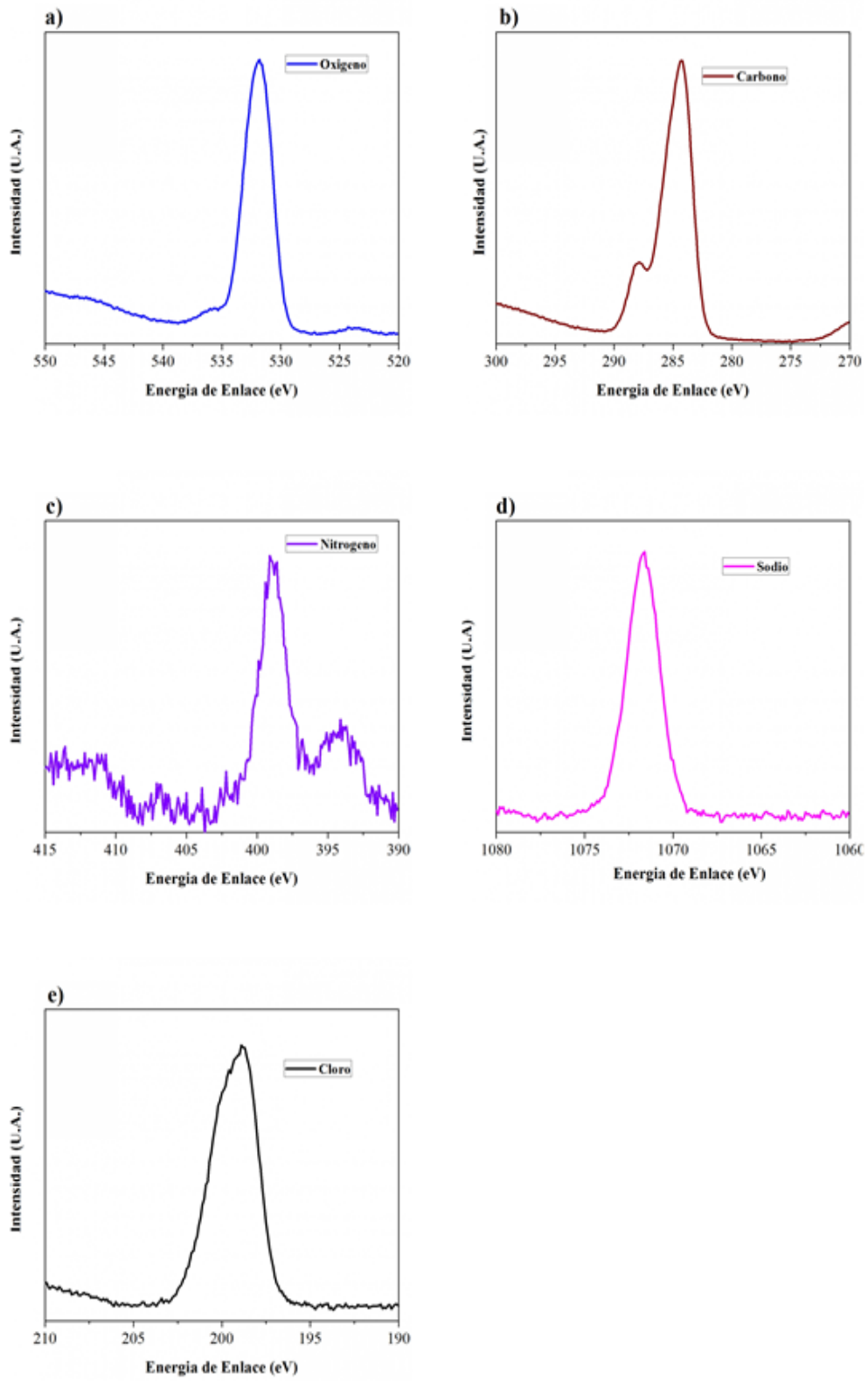
Para estudiar con más detalle la relación entre la contribución de los elementos que conforman las fibras propuestas en esta investigación, en la **Figura 28** se muestra el espectro XPS de alta resolución de la muestra CE<sub>Et-20:4</sub>. En esta se puede distinguir la contribución de la señal de O(1s) a 532 eV en un 21.29%, la cual proviene de la función química del grupo carbonilo (C=O) presente en la estructura química tanto de PHEMA como de PV, y del

enlace C-O de los grupos éster presentes exclusivamente en PHEMA (Castner, et al, 1996; Wu, et al, 2009). En cuanto a la señal de C (1s) se distingue el aporte a 284.5 eV, que es atribuido a los enlaces C-C que hacen parte de la cadena del polímero; y a 288.5 eV, que es una señal característica de los enlaces O-C=O y N-C=O aportados por PHEMA y PVP, respectivamente (Ali, et al, 2014; Wang, et al, 2016). Por otro lado, la señal de N (1s) ubicada a 399-398 eV, es un referente de la presencia de uniones N-C, característica de las fracciones aportadas por PVP al copolímero (Wang, 2016). Por último, las señales del Na (1s) a 1071 eV y del Cl (2p<sub>3/2</sub>) a 198.5-199 eV son congruentes con la presencia de NaCl en la muestra. Cabe resaltar que los materiales electrohilados no fueron sometidos a un proceso de lavado exhaustivo antes del análisis por espectroscopía XPS, lo que conlleva a un exceso de esta sal en el producto terminado. Además, tal como se observó en los estudios por microscopía SEM, algunos cristales de NaCl se encuentran inmersos en la matriz polimérica o dispersos a lo largo de las fibras electrohiladas. Por lo tanto, la contribución de los elementos Na y Cl eran esperadas en este estudio.

Los resultados XPS fueron analizados para realizar las cuantificaciones de los elementos de la muestra, por medio de la estimación de las áreas bajo la curva de cada espectro. En la **Tabla 4** se reportan los resultados de la composición elemental total de los elementos C, N, O, Na y Cl en las fibras. De ella se observa que estos materiales presentan una concentración mayor de C 1s (51.47 %), la cual es atribuida al aporte de los enlaces C-C, C-H, C-O presentes tanto en PHEMA como PVP. Sin embargo, a este porcentaje también contribuye el enlace C-N que está presente solamente en el grupo amida de PVP. En consecuencia, el porcentaje total estimado de N 1s (1.52 %) se considera como representativo para determinar la relación PHEMA:PVP en las fibras analizadas, al compararse con la contribución estimada de oxígeno del PHEMA. De esta forma, teniendo en cuenta que el porcentaje total de O 1s en la muestra corresponde a 21.29 %, y debido a que PVP aporta un solo átomo de oxígeno en su estructura, se considera entonces que el porcentaje de O 1s es igual a 1.52 % (concentración de N 1s). Por lo tanto, la contribución de O1s desde las unidades de PHEMA corresponde a un total 19.77 %. En adición, al considerarse que la estructura química de la unidad repetitiva de PHEMA aporta tres unidades de oxígeno, se estima que el porcentaje de O 1s unitario es de 6.59 %. Debido a que dicho porcentaje equivale a una unidad de PHEMA, se encuentra finalmente que la relación PHEMA:PVP en el copolímero es de 6.59:1.52, lo que indica el material se compone aproximadamente de 1 unidad de PVP por cada 4 unidades de PHEMA. Cabe resaltar que esta estimación se aproxima a la relación en volumen de monómeros usada para la síntesis del copolímero (HEMA:PVP de 3:1).

**Tabla 4.** Porcentajes de composición elemental estimadas de resultados XPS para las muestras CE<sub>Et-20:4</sub>

Elemento	Señal	Concentración (%)
Oxígeno	1s	21.29
Carbono	1s	51.47
Nitrógeno	1s	1.52
Sodio	1s	22.61
Cloro	2p	3.10



**Figura 28.** Espectros XPS de alta resolución para la muestra  $CE_{Et-20:4}$ . Se muestra la contribución de las señales de: oxígeno (a), carbono (b), nitrógeno (c), sodio (d) y cloro (e).

## VII.VII. Evaluación de citotoxicidad.

Los materiales con potenciales aplicaciones biomédicas deben de ser evaluados de forma exhaustiva para garantizar la seguridad del usuario final. En ese sentido, uno de los ensayos que se deben de realizar es el de proliferación celular, conocido como MTS o MTT. Éstos son ampliamente utilizados en biología celular para estudiar factores de crecimiento, citocinas, nutrientes y agentes citotóxicos.

En este trabajo, los ensayos de citotoxicidad se realizaron en fibroblastos dérmicos humanos de origen embrionario con la línea celular CCD-1112Sk. Ya se han establecido las ventajas del uso de los modelos “*in vitro*” para llevar a cabo la evaluación de los ensayos de toxicidad celular. Las células que habitualmente se utilizan en este tipo de cultivos son de origen embrionario o adulto, y se emplean en cultivos primarios recién obtenidos o tras su transformación en líneas celulares continuas. En esencia, las células embrionarias se adaptan con más facilidad al desarrollo en cultivo que las células derivadas de tejidos adultos normales (López González, 2006). Por todo ello, la elección de trabajar con fibroblastos embrionarios en este ensayo, fue crucial para los objetivos de esta investigación.

En la **Figura 29** se muestran los resultados obtenidos para la evaluación de citotoxicidad de los materiales propuestos. Para obtener parámetros comparativos también fueron evaluadas las respuestas de los homopolímeros PHEMA y VP a diferentes volúmenes, así como las fibras obtenidas por procesamiento con electrohilado del copolímero PHEMA-co-PVP, utilizando DMF ( $CE_{DMF}$ ) y etanol ( $CE_{Et}$ ) como disolventes. Cabe resaltar que con la intención de aumentar la resistencia al tacto de los materiales electrohilados, para lograr así su separación mecánica entre el recubrimiento y el plato colector, sin causar desgarres o fragmentaciones en las fibras, se realizó un tratamiento con glutaraldehído acuoso en presencia de HCl como catalizador. Este tratamiento fue realizado con el objetivo de entrecruzar las cadenas poliméricas de las fibras, por la formación de grupos éster como producto de la reacción de las terminales aldehído del glutaraldehído (agente entrecruzante) y los grupos hidroxilo (-OH) de PHEMA. A los materiales que fueron expuestos a este tratamiento se le asignó el subíndice -g, para indicar que contiene glutaraldehído como agente entrecruzante. Es también importante señalar que para esta prueba cada material fue evaluado por triplicado y fueron utilizados dos controles: uno negativo, conformado por células fibroblastos dérmicos línea celular CCD-1112Sk; y otro positivo, de DMSO 10%, como control de muerte.

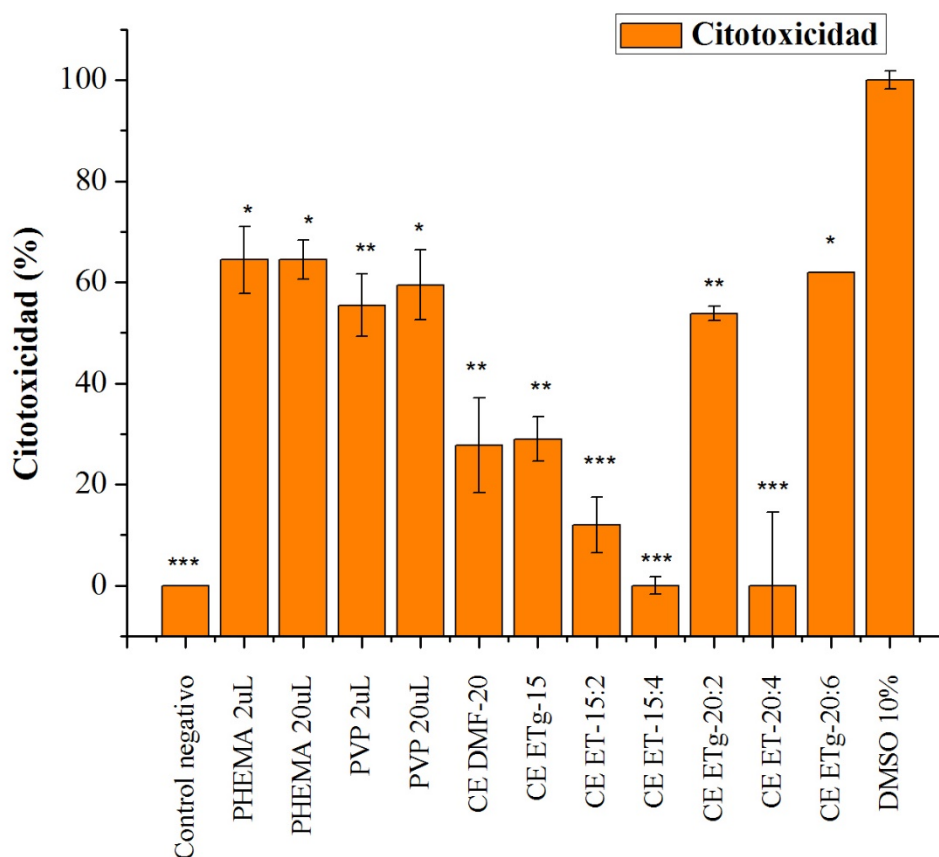
Los resultados mostrados en la **Figura 29** muestran que las fibras generadas usando DMF como disolvente ( $CE_{DMF-20}$ ) presentan una citotoxicidad de 27 %, siendo este valor menor a la obtenida para los respectivos homopolímeros PHEMA y PVP. Sin embargo, estos valores fueron reducidos para las muestras que fueron electrohiladas con otro disolvente (etanol/agua), como son las muestras nombradas con  $CE_{Et}$ . Es posible observar que realizando estos cambios la citotoxicidad del material se ve drásticamente disminuida, como

sucedió en las muestras  $CE_{Et-20:4}$ ,  $CE_{Et-15:4}$  y  $CE_{Et-15:2}$ . Sin embargo, es importante señalar que las muestras  $CE_{Eig-20:6}$ ,  $CE_{Eig-20:2}$ ,  $CE_{Eig-15}$ , es decir aquellas que fueron previamente tratadas con glutaraldehído, aumentan significativamente la toxicidad. Esto se puede atribuir a la posible presencia de trazas de este agente entrecruzante o a la oclusión de los grupos -OH proveniente de PHEMA (Schiler, et al, 2018).

El análisis estadístico para las muestras analizadas indicó que a valores de  $P < 0.05$ , las muestras presentan una citotoxicidad cercana al control de muerte celular (DMSO 10%), mientras que para valores de  $P > 0.05$ , con una diferencia significativa alta, la citotoxicidad se ve reducida notablemente comparada con el control de muerte celular. La **Tabla 5**, resume el análisis estadístico.

A modo de comparación, en estudios anteriores realizados para evaluar la toxicidad de los monómeros HEMA y VP, autores como Bouillaguet, Campos y Souza, determinaron el efecto altamente tóxico de estas sustancias (Bouillaguet et al, 2000; Campos, 2006; Souza et al, 1999). Sin embargo, se conoce que dicho efecto se ve disminuido al momento de inducir la polimerización de estos monómeros. Cabe resaltar que en esta investigación se logró sintetizar un copolímero en estado líquido, teniendo en cuenta que para lograrlo la reacción de copolimerización fue dirigida hasta alcanzar grados de conversión de monómero a polímero a valores relativamente bajos. No obstante, el proceso de purificación desempeña un rol importante para reducir la toxicidad del polímero, evitando que trazas de monómero sin reaccionar sigan presentes en el material.

En este trabajo también se tomó en cuenta los indicativos de la norma ISO 10993-5:2009 para la evaluación biológica de dispositivos médicos. En esta se indica que cuando se presenta una reducción en la viabilidad celular de más del 30%, se considera que los efectos citotóxicos en el material son altos, por lo que impide el uso de este material en el área biomédica (Genez, et al, 2016). Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta investigación indican que tanto el proceso de purificación del copolímero, así como su procesamiento por la técnica de electrohilado, condujo de forma sinérgica a la formación de un material que presenta menor toxicidad, comparado con los homopolímeros PHEMA y PVP. Lo anterior se considera un logro importante, teniendo en cuenta que el copolímero PHEMA-co-PVP, no ha sido reportado hasta el momento como una formulación procesable por la técnica de electrohilado.



**Figura 29.** Resultados obtenidos del ensayo de proliferación celular MTS para diferentes muestras. En esta gráfica se encuentran dos controles uno positivo (DMSO) y otro negativo. Las muestras con denominación "g" establece que fueron tratadas con glutaraldehído para su recolección, anterior al ensayo de citotoxicidad. La puntuación "\*" denota diferencia significativa baja en el análisis estadístico, mientras que "\*\*" diferencias medianamente significativa y "\*\*\*" diferencia significativa alta, entre las muestras analizadas y el control de muerte celular.

**Tabla 5.** Valores de P obtenidos para el análisis de muestras de homopolímeros (PHEMA y PVP) y fibras electrohiladas  $CE_{DMF}$  y  $CE_{Et}$ .

Muestra	Valor de P	Diferencia significativa de citotoxicidad con respecto a DMSO 10%
PHEMA 2 $\mu$ L	0.001	Baja
PHEMA 20	0.009	Baja
PVP 2	0.013	Media
PVP 20	0.002	Baja
$CE_{DMF-20}$	0.0175	Media
$CE_{Etg-15}$	0.0108	Media
$CE_{Et-15:2}$	0.052	Alta
$CE_{Et-15:4}$	0.24	Alta
$CE_{Etg-20:2}$	0.003	Baja
$CE_{Et-20:4}$	0.162	Alta
$CE_{Etg-20:6}$	0.003	Baja

## VIII. CONCLUSIONES

Se logró la síntesis del copolímero PHEMA-co-PVP a partir de los monómeros HEMA y VP (con 22 % de conversión de monómero en polímero), por medio de la polimerización en cadenas iniciada por radicales libres, bajo condiciones controladas de reacción (composición HEMA:VP de 3:1; temperatura de 50 °C; y bajo atmósfera inerte) que permitieran obtener un copolímero en estado líquido y soluble en disolventes orgánicos como DMF y etanol.

Se realizaron formulaciones disolviendo el copolímero PHEMA-co-PVP en DMF y en disolución acuosa de etanol, a diferentes concentraciones (15-25 % w/w), y se evaluó la formación de fibras por procesamiento por la técnica de electrohilado, bajo diferentes concentraciones de NaCl.

Se observó la formación de materiales recuperables desde el plato colector del sistema de electrohilado, después de aplicar dicho procesamiento a las formulaciones PHEMA-co-PVP, a un voltaje ajustado a los 20 kV, a distancias entre 15 y 22 cm, a temperaturas entre 22-28 °C, humedad entre 33-64 %, velocidades de inyección entre 1.31 y 1.83 mL.h<sup>-1</sup>, usando DMF o una disolución acuosa de etanol, como disolventes.

Los materiales electrohilados usando DMF como disolvente presentaron bajos rendimientos y una alta dificultad de recuperación o aislamiento desde el plato colector, pero presentaron una morfología característica de fibras con diámetros en un rango entre 300 nm – 2.6 µm.

Los electrohilados en etanol presentaron una mayor cantidad de depósito y mayor facilidad para recuperarlos desde el plato colector una vez fueron expuestos a las condiciones específicas de electrohilado, pero se encontró que esta cualidad aumentó con la adición de NaCl. Se determinó que un aumento en la concentración del copolímero requiere de un aumento en la concentración de NaCl para lograr la formación de fibras.

Se demostró la formación de copolímero PHEMA-co-PVP, conteniendo mayor cantidad de PHEMA que de PVP, a las condiciones de reacción y purificación propuestas en esta investigación, por medio de espectroscopía FTIR-ATR y XPS, y por análisis térmico TGA.

La microscopía óptica y SEM fueron de gran utilidad para determinar la formación de fibra o de recubrimiento bajo las condiciones evaluadas de electrohilado. Los cambios en la morfología de los materiales fibrosos, en función de la adición de NaCl, fueron observados con SEM.

Se utilizó glutaraldehído con el objetivo de entrecruzar las cadenas poliméricas de PHEMA-co-PVP electrohilado y mejorar su resistencia mecánica, Sin embargo, al evaluar la citotoxicidad de los materiales propuestos, se encontró que el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas con glutaraldehído induce toxicidad en el material. Los materiales electrohilados usando etanol como disolvente presentaron menor toxicidad, lo que los convierte en potenciales candidatos para su aplicación en biomedicina, según la ISO 10993-5:2009.



## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akhtar, M.N., Sulong, A.B., Karim, S., Azhari, C.H., y Raza, M.R. (2015). Evaluation of thermal, morphological and mechanical properties of PMMA/NaCl/DMF electrospun nanofibers: an investigation through surface methodology approach. *Iran Polym J.* 24 (12): 1025–103

Ali, N., Duan, X., Jiang, Z.-T., Goh, B. M., Lamb, R., Tadich, A., y Singh, P. (2014). Surface and interface analysis of poly-hydroxyethylmethacrylate-coated anodic aluminium oxide membranes. *Applied Surface Science*, 289: 560–563.

Al-Issa, M.A., Davis, T.P., Huglin, M.B., Yip, D.C.F. (1985). Copolymerizations involving N- vinyl-2-pyrrolidone. *Polymer* 26(12): 1869–74.

Amalvy, (2013). Nanotecnología e ingeniería de tejido. *Ciencia e Investigación Tomo 63 N° 3*.

Amith, V., Sridhar, R., Angadi, G., y Narashima Murthy, H.N. (2018). Synthesis and characterization of polyvinylpyrrolidone (PVP) nanofibrous thin films. *IOP Conference series: materials science and engineering*. 376(1): 012139.

Almany, L, y Seliktar, D. (2005). Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3d cell cultures. *Biomaterials* 26: 2467–77.

Angamma, C.J., Jayaram, S.H., (2011). Analysis of the effects of solution conductivity on electrospinning process and fiber morphology. *IEEE Trans. Ind. Appl.* 47 (3): 1109–1117.

Arredondo, A. y Londoño, M. (2009). Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Rev. Ing. Biomédica*. 38-94.

Badylak, S.F. (2005). Regenerative medicine and developmental biology: The role of the extracellular matrix. *Anat. Rec. B New Anat.* 36-41.

Bae, H.-S., Haider, A., Selim, K.M.K., Kang, D.-Y., Kim, E.-J., Kang, I.-K., (2013). Fabrication of highly porous PMMA electrospun fibers and their application in the removal of phenol and iodine. *J. Polym. Res.* 20 (7): 1–7.

Barnes, CP., Sell, SA., Knapp, DC., Walpoth, BH., Brand, DD., Bowlin, GL. (2007). Preliminary investigation of electrospun collagen and polydioxanone for vascular tissue engineering applications. *Int J Electrospun Nanofibers Appl* (1), 73–87.

Baumgarten, P.K., (1971). Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *J. Colloid Interface Sci.* 36 (1): 71–79.

Bat, E., (2016). Hydroxyethyl Methacrylate-based Nanocomposite Hydrogels with Tunable Pore Architecture. *JOTCSA* 3(3): 607-622.

Beglou, M.J., y Haghi, A.K. (2008) Electrospun biodegradable and biocompatible natural nanofibers: a detailed review. *Cellulose Chem. Technol.*, 42 (9-10): 441-462.

Bellan, LM y Craighead, HG. (2011) Applications of Controlled Electrospinning Systems. *Polym. Adv. Technol*, 22: 304 .

Berglund JD, Nerem RM, Sambanis A., (2004). Incorporation of Intact Elastin Scaffolds in Tissue Engineered Collagen-Based Vascular Grafts. *Tissue Engineering* (10), 1526-1535.

Bhardwaj, N. y Kundu, S. C., (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv*, 28(3): 325-47.

Bhattacharai, N., Gunn, J., Zhang M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 62: 83-89.

Bognitzki, M., Frese, T., Steinhart, M., Greiner, A., Wendorff, J.H., Schaper, A., Hellwing, M. (2001) Preparation of fibers with nanoscaled morphologies: Electrospinning of polymer blends. *Polym. Eng. Sci.* 41 (6): 982–989.

Bouchti, M., Hannache, H., Cherkaoui, O., (2013). Functional Polyamide 6.6 Fiber with N-Allyliminodiacetic Acid: Synthesis and Characterization. *Advances in Polymer Technology.* (32), 10-1002.

Bouillaguet, S., Wataha, J.C., Hanks, C.T., Cincchi, B., y Holz, J. (2000). Effects of sub-lethal concentrations of HEMA (2 – hydroxyethyl methacrylate) on THP – 1. *Dental materials*; 16: 213 – 217.

Bregni, C., Campodonico, A., Martínez M., Gerula, S., Steeman, G., y Radivozñuk, E., (1993). Preparación y caracterización de sistemas poliméricos para liberación controlada de drogas. *Acta Farm. Bonaerense* 12(2): 53-60.

Byard, S.J., Williams, M., McKenzie, B.E., Blanzs, A., y Armes, S.P. (2017). Preparation and Cross-Linking of All-Acrylamide Diblock Copolymer Nano-Objects via Polymerization-Induced Self-Assembly in Aqueous Solution. *Macromolecules.* 50 (4): 1482-1493.

Campos, A., González-Jaranay, M., Moreu, G. y Sánchez-Quevedo, M.C. (1993). Electron microprobe analysis in periodontal guided tissue regeneration. *Cell Biology International.* 17: 695-696.

Campos, A., Sánchez-Quevedo, M.C., Moreu, G., Rodríguez, I.A., y Alaminos, A. (2006). Evaluation of the cytotoxicity of 2 – hydroxymethyl – methacrylate (HEMA) used as biomaterial in tissue engineering. *Cytotherapy*; 8 (suppl 2): 46.

Campos Muñoz, A., (2004). *Cuerpo, histología y medicina. De la descripción microscópica a la Ingeniería Tisular. Discurso de ingreso.* Real Academia Nacional de Medicina: Madrid

Castner, D. G., Ratner, B. D., Hirao, A., & Nakahama, S. (1996). Characterization of Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate) (PHEMA) by XPS. *Surface Science Spectra*, 4(1): 14–20.

Chen, J.L., Chu, B., Hsiao, B.S. (2006). Mineralization of hydroxyapatite in electrospun nanofibrous poly (L-lactic acid) scaffolds. *J Biomed Mater Res* 79A: 307–17.

Chew, S.Y., Wen, Y., Dzenis, Y., Leong, K.W. (2006). The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine. *Curr Pharm Des.* (12): 4751–70.

Chanda, M. (2013). *Introduction to Polymer Science and Chemistry: A problem-solving Approach.* Second Edition. CRC Press Taylor & Francis Group: London.

Chong, E.J., Phan, T.T., Lim, I.J., Zhang, Y.Z., Bay, B.H., Ramakrishna, S. et al., (2007). Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Mater*; (3): 321–30.

Chun, I. (1995). *Fine fibers spun by electrospinning process from polymer solutions and polymer melts in air and vacuum: characterization of structure and morphology on electrospun fibers and developing a new process model.* Doctoral Dissertation The University of Akron, OH: Estados Unidos

Cooley, J. F. (1900). Improved Methods of and Apparatus for Electrically Separating the Relatively Volatile Liquid Component from the Component of Relatively Fixed Substances of Composite Fluids, United Kingdom Patent G.B. 6: 385.

Cooley, J F. (1902). Apparatus for Electrically Dispersing Fluids, U.S Patent No. 692631.

Cui, W., Zhou, S., Li, X., Weng, J. (2006). Drug-loaded biodegradable polymeric nanofibers prepared by electrospinning. *Tissue Eng* (12): 1070.

Daňková, J., Buzgo, M., Vejpravová, J., Kubičková, S., Sovková, V., Vysloužilová, L., Nečas, A. (2015). Highly efficient mesenchymal stem cell proliferation on poly- $\epsilon$ -caprolactone nanofibers with embedded magnetic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 10: 7307–7317.

Deitzel, J.M., Kleinmeyer, J., Harris, D., Beck Tan, N.C., (2001). The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* 42 (1): 261–272.

Del Río, R. (2018). Estudio mecánico de los adhesivos en dentición temporal mediante técnica de micropush out. Tesis de grado. Universidad Complutense de Madrid.

De Vrieze, S., Van Camp, T., Nelvig, A., Hagstrom, B., Westbroek, P., De Clerck, K., (2009). The effect of temperature and humidity on electrospinning. *J. Mater. Sci.* 44 (5): 1357–1362.

Domokos, A., Balogh, A., Dénes, D., Marosi, G., y Nagy, Z.K. (2019). Continuous manufacturing of orally dissolving webs containing a poorly soluble drug via electrospinning. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 130: 91-99.

Duque, L.M., Rodríguez, L. y López M. (2013), Electrospinning: la era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 14(1): 10-27

Dzenis, YA., Reneker, DH. (1994). Polymer Hybrid Nano/Micro Composites, In Proceedings of the American Society for Composites, Technical Conference, CRC Press: Newark, 9: 657.

Eid, M. (2008). In vitro release studies of vitamin B12 from poly N-vinyl pyrrolidone/starch hydrogels grafted with acrylic acid synthesized by gamma radiation. *Nuclear instruments and methods in Physics Research B* 266: 5020-5026.

Eroğlu, A. N., Aydin, R. S. T., Karakeçili, A., & Çalimli, A. (2017). Fabrication and Process Optimization of Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Nanofibers by Response Surface Methodology. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(1): 616–625.

Fang, J, Niu H, Lin T, Wang X., (2008). Applications of Electrospun Nanofibers. *Chin. Sci. Bull* (53): 2265

Faragalla, M.M., Hill, D.J.T., Whittaker, A.K., (2002). The copolymerization of N-vinyl-2-pyrrolidone with 2-hydroxyethyl methacrylate. *Polymer Bulletin* (47): 421-427.

Fertala A, Han WB, Ko FK. (2001). Mapping critical sites in collagen II for rational design of gene-engineered proteins for cell-supporting materials. *J Biomed Mater Res* 57:48–58.

Fernández, J. (2018). Avances en tecnología farmacéutica: lentes de contacto de hidrogel. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid: España

Fong, H., Chun, I., Reneker, D.H., (1999). Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* 40 (16): 4585–4592.

Formhals A, (1934). Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads. U.S. Patent No.1975504.

Friess W. (1998). Collagen—biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 45:113–36.

Gallardo, A., Lemus, A.R., Roman, J.S., Cifuentes A., Diez-Masa, J.C., (1999). Micellar electro- kinetic chromatography applied to copolymer systems with heterogeneous distribution. *Macromolecules*. (32): 610–7.

Genez, K., Posada, V., Fernández-Morales, P., y Ramírez, J. (2016). Evaluación citotóxica y biocompatibilidad de la aleación AZ31B para aplicaciones en ingeniería de tejidos óseos. *Prospect*. Vol. 14, No. 2.

Gómez Tajardos, M., (2013). *Nuevos Materiales de Interés Biomédico a partir de la Funcionalización de Vinilpirrolidona*. Universidad Complutense de Madrid: España

Gupta, P., Trenor, S.R., Long, E.T., y Wilkes, G.L. (2005). In Situ Photo-Cross-Linking of Cinnamate Functionalized Poly(methyl methacrylate-co-2-hydroxyethyl acrylate). *Fibers during Electrospinning*. *Macromolecules*, 37: 9211–9218.

Haider, A., Gupta, K.C., Kang, I.-K., (2014). Morphological effects of HA on the cell compatibility of electrospun HA/PLGA composite nanofiber scaffolds. *BioMed Res. Int.* ID 308306: 11.

Haider, A., Haider, S., Kang, I-K, (2015). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*. 11((8): 702-701.

Haider, S., Al-Zeghayer, Y., Ahmed Ali, F., Haider, A., Mahmood, A., Al-Masry, W., Imran, M., Aijaz, M., (2013). Highly aligned narrow diameter chitosan electrospun nanofibers. *J. Polym. Res.* 20 (4): 1–11.

Hemalatha, P., Veeraiah, M.K., Prasanna Kumar, S., Madegowda, N.M., y Manju, M. (2014). Reactivity Ratios of N-Vinylpyrrolidone - Acrylic Acid Copolymer. *American Journal of Polymer Science*. 4(1): 16-23

He, W., Horn, SW., Hussain, MD. (2007) Improved bioavailability of orally administered mifepristone from PLGA nanoparticles. *Int J Pharm* 334: 173–8.

Hobzova, R., Hrib, J., Sirc, J., Janouskova, O., Gatenholm, P. (2018). Embedding of Bacterial Cellulose Nanofibers within PHEMA Hydrogel Matrices: Tunable Stiffness Composites with Potential for Biomedical Applications. *Journal of Nanomaterials*, 5217095.

Huan, S., Liu, G., Han, G., Cheng, W., Fu, Z., Wu, Q., Wang, Q., (2015). Effect of experimental parameters on morphological, mechanical and hydrophobic properties of electrospun polystyrene fibers. *Materials* 8 (5): 2718.

Huang, L., McMillan, RA., Apkarian, RP., Pourdeyhimi, B., Conticello, VP., Chaikof, EL. (2000). Generation of synthetic elastin-mimetic small diameter fibers and fiber networks. *Macromolecules* 33: 2989–97.

Huang, ZM., Zhang, YZ., Kotaki, M., Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol*. 63(15): 2223-53.

Hung C.C., Kuo C.C., Weng N.K., Wu W.C., Chen B.Y., Cho C.J., Hsu I.J., Chiu Y.C., Chen W.C. (2016). Novel Highly Sensitive and Reversible Electrospun Nanofibrous Chemosensor-Filters Composed of Poly(HEMA-co-MNA) and bpy-F-bpy with Metal-Ion-Modulated Multicolor Fluorescence Emission. *Polym. J.* 48: 439–449.

Ipohorski, M., y Bozzano, P. (2013). Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales. *Ciencia e investigación*. Tomo 63. N° 3.

Ismail, Z., Kassim, S., y Amza, N. (2017). Development of hydrophilic Poly(*n*-vinylpyrrolidone) nanoparticles via inverse miniemulsion polymerization technique. *EGM*. 1885(1):020079.

Jatzkewitz, H. (1995). Peptamin(glycyl-L-leucyl-mescaline) bound to blood plasma expander (polyvinylpyrrolidone) as a new depot form of a biologically active primary amine mescaline. *Naturforsch Z (10b)*. 27-31.

Kanani, A., y Bahrami, S.H., (2011). Effect of changing solvents on poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibrous webs morphology. *J. Nanomater.* ID 724153.

Kim, Y. (2017). The use of polyolefins in industrial and medical applications. *Polyolefin fibers*. Segunda edición. Doi: 135-155. 10.1016/B978-0-08-101132-4.00005-9.

Kurniawan, A., Gunawan F., Tama Nugraha, A., Ismadji, S., y Wang, M. (2016). Biocompatibility and drug release behavior of curcumin conjugated gold nanoparticles from aminosilane-functionalized poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) electrospun nanofibrous mats. *International Journal of Pharmaceutics*, 516(1-2): 158-169.

Laudenslager, M.J., Sigmund, W.M., (2012). *Electrospinning Encyclopedia of Nanotechnology*. Springer Publishers, 769–775.

Liang, D, Hsiao BS, Chu B., (2007). Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*; (59): 1392–412.

Li, D., Wang, Y., Xia, Y. (2003) Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays. *Nano Lett* 2003, 3: 1167–1171

Li, D., Xia Y. (2004) Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel. *Adv Mater*; (16), 1151–70.

Li, WJ., Danielson, KG., Alexander, PG., Tuan, RS. (2003). Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly (epsilon-caprolactone) scaffolds. *J Biomed Mater Res* 67A: 1105–14.

Li, Z., Wang, C., (2013). *Effects of Working Parameters on Electrospinning. One-Dimensional Nanostructures*. Springer, Berlin, Heidelberg, 15–28.

Li, WJ., Laurencin, CT., Caterson, EJ., Tuan, RS., y Ko, FK. (2002). Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 60:613-21.

Lipol, L.S. y Rahman, Md.M. (2016). Electrospinning and Electrospun Nanofibers. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 6: 45-50.

Loh, Q.L. y Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng*. 19(6): 485-502.

López González, G. (2006). Evaluación biológica de la toxicidad por 2-Hidroxietil metacrilato (HEMA). Tesis inédita de doctorado. Universidad de Granada, Facultad de Medicina. Granada, España.

Lou, X. Munro, S. Wang, S., (2004). Drug release characteristics of phase separation pHEMA sponge materials, *Biomaterials* (25): 5071–5080.

Lu, T., Li, Y., Chen, T et al. (2013). Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Int J Nanomedicine*, 8: 337-350.

Luna, J. (2018). *Polímeros en medicina: aplicaciones actuales y tendencias futuras*. Interempresas.

Matabola, K.P., Moutloali, R.M. (2013). The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly(vinylidene fluoride) nanofibers-effect of sodium chloride. *J. Mater. Sci.* 48 (16): 5475.

Misra, B., Dogra, R. y Kaur, I. (1980) Grafting onto cellulose. V. Effect of complexing agents on Fenton's reagent ( $Fe^{2+}-H_2O_2$ ) -initiated grafting of poly(ethyl acrylate). *J. Polym. Sci. Polym Chem.* (18): 341-344.

Morrison, J. I. (2014). Editing our way to regeneration. *Cell Tissue Res.* 7356 (3), 533-537.

Naira, LS y Laurencin, CT. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32: 762–798.

Narváez Cadena, D.A. (2017). Influencia de solventes orgánicos en la morfología y propiedades mecánicas de fibras de polivilpirrolidona (PVP) fabricadas mediante Electrospinning. Carrera de Ingeniería Mecánica. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Repositorio: <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/13781>

National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering (NIBIB). (2013). Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa. <https://www.nibib.nih.gov/>

Norman, JJ y Desai, TA. (2006). Methods for fabrication of nanoscale topography for tissue engineering scaffolds. *Annals of Biomedical Eng.*; 34(1): 89–101.

Odian, G., (2004). Principles of Polymerization. 4th edition. John Wiley & Sons. USA.

Ostrowska, B., Jaroszewicz, J., Zaczynska, E., Tomaszewski, W., Swieszkowski, W., Kurzydowski, K.J., (2014). Evaluation of 3D hybrid microfiber/nanofiber scaffolds for bone tissue engineering. *Bull. Polish Acad. Sci. Tech. Sci.* 551–556.

Pelipenko, J., Kristl, J., Jankovic', B., Baumgartner, S., Kocbek, P. (2013). The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *Int. J. Pharm.* 456 (1): 125–134.

Perdiguero, M. (2016). Obtención de fibras poliméricas biodegradables en base a mezclas de PLA y PHB plastificadas. Tesis de grado. Universidad Politécnica de Madrid: España.

Piedra, M., Garzón, M.A., Sánchez, M.C., Alaminos M. (2012). Evaluación de la viabilidad celular y patrones apoptóticos en células madre aisladas de la pulpa dental humana. *Actual Med.* 97(786): 6-12.

Pillay, V., Dott, C., Choonara, Y.E., Tyagi, C., Tomar, L., Kumar, P., du Toit, L.C., Ndesendo, V.M.K., (2013). A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. *J. Nanomater.* ID 789289

Přádný, M., Martinová, L., Michálek, J. et al. (2007) Electrospinning of the hydrophilic poly (2-hydroxyethyl methacrylate) and its copolymers with 2-ethoxyethyl methacrylate. *Cent.Eur.J.Chem.* 5: 779.

Promega. (2009). CellTiter 96® Non-radioactive cell proliferation assay: Instructions for use products G4000 and G4100.

Promega. (2009)a. CellTiter 96® One solution cell proliferation assay. Instructions for use of products G3580, G3581 and G3582.

Puelloa, J., Afanasjevab, N., y Álvarez, M. (2013). Thermal properties and chemical composition of bituminous materials. *Road Materials and Pavement Design*, 14(2): 278-288.

Rabbi, M.A., Rahman, M.M., Minami, H., Hoque, S.M., Ahmad, H. (2019). Biocomposites of synthetic polymer modified microcrystalline jute cellulose particles and their hemolytic behavior. *Cellulose* (2019) 26: 8713–8727 DOI <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02706-4>

Ramalingam, N., Natarajan, TS., Rajiv, S. (2013). Development and characterization of electrospun Poly(2-hydroxy ethyl methacrylate) for tissue engineering applications. *Advances in polymer technology*. 32(3): 21348.

Ravin, H. A., Seligman, A. M., Fine, J., (1952). Polyvinyl pyrrolidone as a plasma expander. *New England Journal of Medicine* (247): 921-929

Reddy, B.S.R., Arshady, R., George, M.H., (1985). Copolymerization of N-vinyl-2-pyrrolidone with 2,4,5-trichlorophenyl acrylate and with 2-hydroxyethyl methacrylate. Reactivity ratios and molecular weights. *European Polymer Journal*. 21 (6): 511-515

Reddy, V., Krupakar Reddy, K., Ravindra , S. (2013). Effect of Optimization Parameters on the Diameter of PVP Fibers Fabricated by Electrospinning Technique. "International Conference on Advanced Nanomaterials & Emerging Engineering Technologies" (ICANMEET-20J3). 733-736. doi: 10.1109/ICANMEET.2013.6609400

Rim, N.G., Shin, C.S., & Shin, H., (2013). Current Approaches to Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering. *Biomedical Materials*, 8(1): 1-14.

Robles-García, M.A., Rodríguez, F., Márquez, E., Barrera, A., Aguilar, J., Del Toro, C. (2014). Aplicaciones biomédicas, textiles y alimentarias de nanoestructuras elaboradas por electrohilado. *Rev. Ciencias biológicas y de la salud*. 16 (2): 44-52

Rosa, V., (2013). What and where are the stem cells for Dentistry? *Singapore Dent J* 34(1): 13-18.

Roy, S., Yue, C., Venkatiman, S., Ma, L. (2011). Low temperature (below T<sub>g</sub>) thermal bonding of COC microfluidic devices using UV photografted HEMA-modified substrates: high strength, stable hydrophilic, biocompatible surface. *J. Mater. Chem.* (21): 15031-15040

Scopus (2019) <https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic>. Parámetros de búsqueda: electrospinning and polyvinylpyrrolidone, electrospinning and 2-hydroxyethyl methacrylate, Fecha de consulta: 10 de octubre 2019.

Shamim, Z., Saeed, B., Amir, T., Abo Saied, R., Rogheih, Damerchely., (2012). The effect of flow rate on morphology and deposition area of electrospun nylon 6 nanofiber. *J. Eng. Fabrics Fibers* 7 (4): 42.

Shapira, A., Kim, D-H., Dvir, Tal. (2014). Advanced micro- and nanofabrication technologies for tissue engineering. *Biofabrication* 6 (2): 020301.

Sharma, K.R., (2011). *Polymer Thermodynamics: Blends, Copolymers and Reversible Polymerization*. CRC Press. Taylor & Francis Group: Estados Unidos

Sill, T.J., Von Recum, H.A., (2008). Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29 (13): 1989–2006.

Soto, D., Oliva, H. (2012). Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: una revisión. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 32(2):154-175

Souza, C.A., Hebing, J., Souza, P.P. (1999). Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDCP – 23. *Dent Mat*; 15: 434 – 441.

Sriyanti, I., Edikresnha, D., Miftahul, M., Rachmawati, H., y Khairurrijal, K. (2016). Electrospun polyvinylpyrrolidone (PVP) nanofibers mats loaded by *Garcinia mangostana* L. Extracts. *Materials Sci Forum*. 880:11-14

Stuart, B. (2004). *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Wiley & Sons: Estados Unidos

Sun, B., Long, Y.Z., Zhang, H.D., Li, M.M., Duvail, J.L., Jiang, X.Y., Yin, H.L. (2014). Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Prog. Polym. Sci.* 39 (5): 862– 890.

Tsukada, M., Freddi, G., Monti, P., Bertoluzza, A., & Shiozaki, H. (1993). Physical properties of 2-hydroxyethyl methacrylate-grafted silk fibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 49(10): 1835–1844.

UK (1998) SIDS Initial Assessment Report on 1-Vinyl-2-pyrrolidone (draft). UK Health and Safety Executive.

Van Blitterswijk, C.A. y de Boer, J. (2015). *Degradation of biomaterials*. Tissue engineering. Segunda edición. Elsevier Inc.

Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Schacht, E. (2011). Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules*. 12 (5):1387–1408.

Vargün, E., y Usanmaz, A. (2010). Degradation of Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Obtained by Radiation in Aqueous Solution. *Journal of Macromolecular Science. Part A*, 47 (9): 882-891.

Vishwakarma, N.K, Patel, V. K, Hira, S.K., et al., (2015). Tadpole-shaped  $\beta$ -cyclodextrin-tagged poly(N-vinylpyrrolidone): synthesis, characterization and studies of its complexation with phenolphthalein and anti tumor activities *RSC Adv.* 5: 15547-15558

Walker, J.L., Santoro M. (2017). Processing and production of bioresorbable polymer scaffolds for tissue engineering. In book: *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications*: 181–203. DOI: 10.1016/B978-0-08-100262-9.00009-4

Wang, T., Kumar, S., (2006). Electrospinning of polyacrylonitrile nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* 102 (2): 1023–1029.

Wang, X., Yang, S., Drew, C., Samuelson, L.A., y Kumar, J. (2003). Reactive electrospinning of hydrogel nanofibers. *Polymer Preprints* 44 (2):108–109.

Wu, Y., Jiang, P., Jiang, M., Wang, T.-W., Guo, C.-F., Xie, S.-S., & Wang, Z.-L. (2009). The shape evolution of gold seeds and gold@silver core–shell nanostructures. *Nanotechnology*, 20(30): 305602.

Yoshii, E. (1997). Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J. Biomed. Mater. Res.* 37(4): 517-524.

Zeleny, J, (1914). The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces. *Phys Rev*, 3(2): 69-91

Zhang, B., Lalani, R., Cheng, F., Liu, Q., y Liu, L. (2011). Dual-functional electrospun poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *J Biomed Mater Res Part A* 99A:455–466.

## X. ANEXOS

### X.I. Técnicas de caracterización

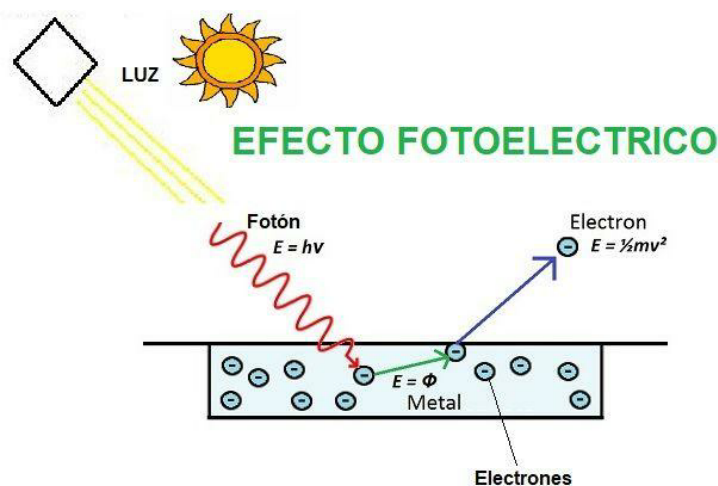
Existen diversos tipos de nanomateriales, con diferentes características, tamaños y aplicaciones, entre ellos las fibras poliméricas generadas por electrohilado, destacan como nanomateriales formados en 2D para un sin fin de áreas. El desarrollo actual de la Nanotecnología y la Nanociencias no sería posible sin la caracterización a través de técnicas de identificación de materiales. Es de suma importancia conocer las propiedades de los materiales: como su estructura, composición, morfología y propiedades térmicas, etc., para posteriormente darle aplicación específica a los mismos.

En la síntesis de nuevos materiales, las propiedades de éstos dependen no sólo de las propiedades de los materiales de partida, sino también de su morfología y las características interfaciales, por lo que es muy importante su determinación (Vargas, et al, 2013).

Aquí entra el rol fundamental que juegan las caracterizaciones, entre ellas podemos destacar las utilizadas para identificar el material propuesto en este trabajo de investigación. Tales como:

### X.I.I. XPS

La espectroscopía XPS (por sus siglas en inglés) consiste en la incidencia de un fotón de energía ( $h\nu$ ) desde los átomos situados más superficialmente en la muestra. Se provoca, por efecto fotoeléctrico, la emisión de fotoelectrones con una energía de ligadura que proporciona información sobre el átomo involucrado en dicha unión. Una vez se ha emitido el fotoelectrón, el átomo se relaja, emitiendo un fotón o un electrón (electrón Auger). La técnica XPS permite el análisis cuantitativo y cualitativo de todos los elementos, excepto el hidrógeno. La **Figura 30** describe mejor el efecto anteriormente mencionado.



**Efecto Fotoeléctrico** = Emisión de los electrones de un metal cuando incide sobre el metal una luz

**Figura 30.** Descripción ilustrada del efecto fotoeléctrico presente en el análisis por XPS. Fuente [www.areatecnologia.com](http://www.areatecnologia.com) Parámetros de búsqueda: Efecto fotoeléctrico. Fecha de consulta: 12 agosto 2019).

En este proyecto, la técnica XPS proporciona información sobre la composición elemental de los materiales constituidos por fibras, y también sobre la proporción de PVP incluida en el polímero. Esto se realizará por medio del análisis del espectro de alta resolución de la señal de nitrógeno (N) en el copolímero. Este elemento solo está presente en la estructura de las unidades de VP, y es ausente en la estructura de las unidades de HEMA. Por lo tanto, la información determinada por esta técnica, deberá ser congruente con los coeficientes de reactividad reportados en otras investigaciones para la formación de copolímeros de PHEMA/PVP.

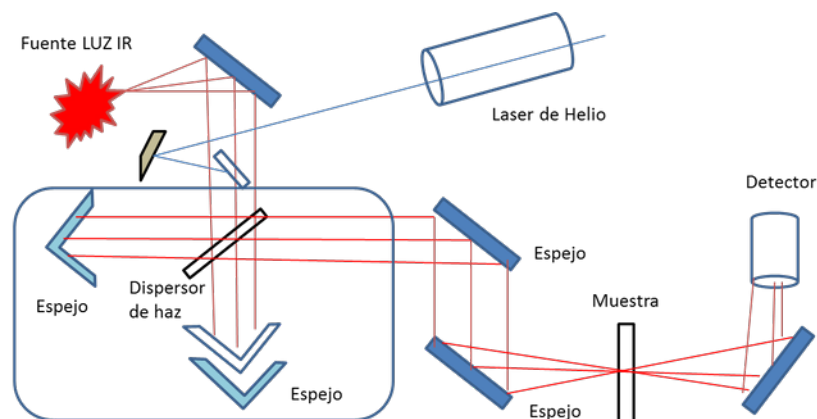
### **X.III. FTIR**

La espectroscopía vibracional fue una de las primeras técnicas espectroscópicas que encontró un uso extendido, en particular la espectroscopía de absorción infrarroja (IR) que recibe su nombre de la región del espectro electromagnético implicada. La región IR del espectro electromagnético se encuentra entre 12800-10  $\text{cm}^{-1}$ . Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los aparatos se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR): 12800-4000  $\text{cm}^{-1}$ , IR medio: 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ; IR lejano: 400-10  $\text{cm}^{-1}$ , siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales. Hoy en día, casi todos los instrumentos utilizados en espectroscopía infrarroja están equipados con sistema de análisis que utilizan transformadas de Fourier de haz sencillo.

Una de las grandes ventajas de la espectroscopía IR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre. Como en otros procesos de absorción de radiación electromagnética, la interacción de la radiación infrarroja con la materia provoca en ésta alguna alteración. En el caso que nos ocupa, esta alteración guarda relación con cambios en el estado vibracional de las moléculas. El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de ésta molécula. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia.

Los espectrofotómetros IR, básicamente, cuentan instrumento para medir la transmisión de radiación electromagnética de una muestra en función de la longitud de onda o del número de ondas. El elemento más importante debe permitir aislar la radiación de regiones espectrales definidas y permite diferenciar entre los distintos tipos de espectrofotómetros: no dispersivos, dispersivos y de transformada de Fourier (FT). En estos últimos se utiliza un interferómetro que permite una modulación de la radiación dependiente de la longitud de onda. Otro elemento esencial en los espectrofotómetros es una fuente de radiación que debe aportar la mayor intensidad posible en la región de longitud de onda que se está investigando. Las fuentes de radiación térmicas (sólido inerte calentado eléctricamente) son las más utilizadas, proporcionando una radiación continua, en contraste, el uso de fuentes láser suministra longitudes de onda muy concretas. El propósito del sistema óptico es transmitir la radiación desde la fuente al detector con la mínima pérdida. Los sistemas de lentes de vidrio o cuarzo

utilizados en otras regiones no tienen utilidad en el IR porque absorben radiación, de modo que se utilizan espejos de vidrio con un recubrimiento de oro o aluminio. El sistema óptico va equipado con un compartimento para la muestra, en el que ésta se sitúa en el camino de la radiación, bien mediante celdas u otros accesorios que permitan realizar medidas diferentes a la transmisión (por ejemplo, la reflectancia total atenuada, o ATR ). El detector se emplea para convertir la señal óptica en una señal eléctrica fácilmente medible, como el voltaje. Esto se consigue con la ayuda de equipos electrónicos para amplificar y digitalizar las señales (Serrano, 2005; Stuart 2004). El esquema de la Figura 31, detalla mejor lo anteriormente explicado.



**Figura 31.** Conformación común de un Espectrómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier.

Fuente [www.steemit.com](http://www.steemit.com). Parámetros de búsqueda: espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier. Fecha de consulta: 12 agosto 2019).

Esta técnica permite obtener información precisa de los grupos funcionales de los materiales a analizar. FTIR con ATR permite obtener esta información sin la necesidad de triturar las muestras poliméricas, como convencionalmente ocurre en los equipos de FTIR. De forma contraria, el aditamento ATR permite analizar superficies de materiales sólidos, obteniendo información de los grupos funcionales orientados específicamente hacia esa parte del material. Las muestras fueron evaluadas en un equipo un equipo Spectrum disponible en la Facultad de Arquitectura y Diseño de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Este equipo proporciona un espectro de absorción en la longitud de onda desde  $500$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Los materiales copoliméricos propuestos y los monómeros fueron evaluados en este equipo, con el fin de establecer las transformaciones que experimentan algunos grupos funcionales después de la reacción de polimerización.

### **X.I.III. SEM**

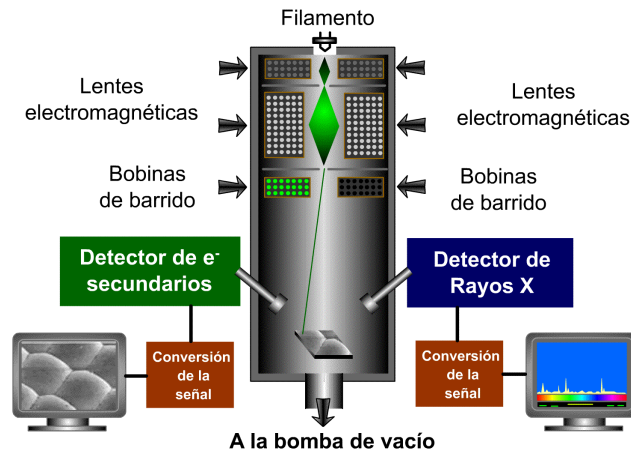
Para poder sobrepasar el límite de resolución de un microscopio óptico es necesario diseñar instrumentos que utilicen otras radiaciones diferentes a la luz visible para formar la imagen. En la década de 1920 diversos descubrimientos comprobaron que un haz de electrones acelerados en el vacío, además de recorrer trayectorias rectas, se comportaba también como una onda similar a la luz visible caracterizada por una longitud de onda  $100.000$  veces más

pequeña. Más aún, se encontró que el comportamiento de los electrones frente a campos eléctricos y magnéticos era similar al de la luz visible en espejos y lentes. Precisamente, un haz de electrones acelerados por un alto potencial eléctrico (25.000 Voltios) constituye la fuente de radiación de un microscopio electrónico de barrido (SEM por Scanning Electron Microscopy).

Un SEM moderno permite observar muestras con una resolución de unos 4 nanómetros con magnificaciones de hasta 300.000x. Se pueden obtener así imágenes de todo tipo de materiales estructurales o de material biológico con un mínimo de preparación previa y observar directamente todo tipo de superficies con una gran profundidad de foco. Para esto solamente es necesario asegurar que las muestras sean limpias, secas, resistentes al alto vacío del instrumento y buenas conductoras eléctricas. Si se trata de observar un material no conductor, normalmente se recubren las muestras con una delgada capa metálica.

Las imágenes de un microscopio electrónico se obtienen mediante la detección, procesamiento y visualización de las señales resultantes de las interacciones entre un haz de electrones de alta energía con la materia. Estas interacciones pueden proporcionar información sobre topografía, composición y estructura cristalográfica.

Todos los microscopios electrónicos de barrido constan de un cañón electrónico en una columna de alto vacío, del orden de  $10^{-5}$  mm de Hg, en la cual se genera un haz de electrones de alta energía (5 - 30 kV). Este haz es colimado por una serie de lentes electrónicas y focalizado sobre la muestra analizada. Los detectores registran las señales originadas por la interacción entre el haz de electrones y la muestra, que son procesadas y visualizadas en el sistema final de observación. El cañón electrónico es el primer componente de la columna del microscopio y es el que produce el haz de electrones. Consta de un filamento emisor de electrones que son luego acelerados por un ánodo polarizado positivamente a una tensión variable entre unos 5 y 30 kV. Este haz es luego colimado por una serie de lentes electrónicas y pequeñas aperturas hasta que es focalizado sobre la superficie de la muestra. Resulta intuitivo que el diámetro de este haz de electrones es uno de los factores que determina la resolución final de la imagen. Un sistema de bobinas desvía este haz de tal manera que una zona de la superficie de la muestra es continuamente explorada (scanning) y las señales resultantes son registradas por los detectores. La parte final de la columna del microscopio electrónico es la cámara con cierre de vacío que contiene la platina donde se coloca la muestra. Un conjunto de controles externos permite desplazar esta platina según los tres ejes (x, y, y z) y variar su orientación según dos ejes de rotación (Ipohorski y Bozzano, 2013). En esta cámara se colocan los detectores para registrar las distintas señales emitidas por la muestra. La figura 17 detalla mejor el sistema antes mencionado.



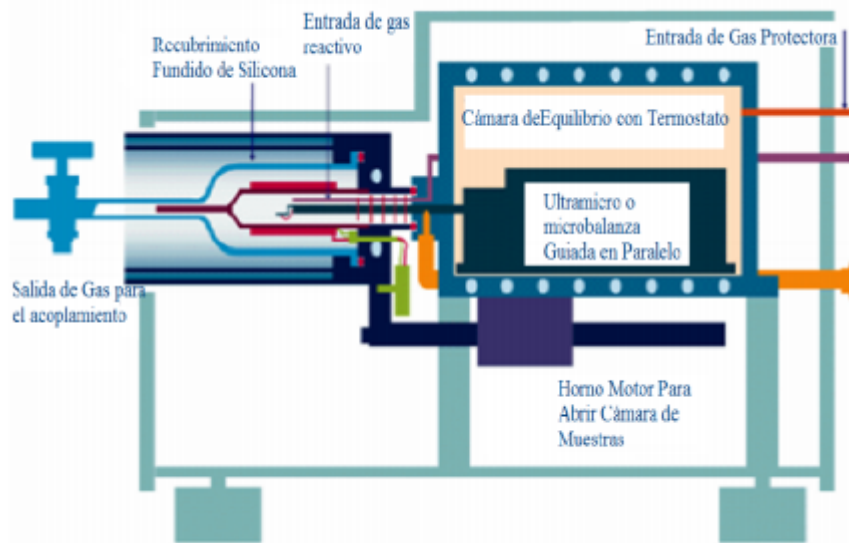
**Figura 32.** Conformación común de un Microscopio Electrónico de Barrido, este equipo fue facilitado por el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM (CNyN) para el análisis correspondientes a las muestras.

Fuente [www.quimica.unab.cl](http://www.quimica.unab.cl) Parámetros de búsqueda: microscopio electrónico de barrido esquema. Fecha de consulta: 12 agosto 2019).

#### X.IV. TGA

El Análisis por Termogravimetría (TGA) se define como la técnica en que se mide el porcentaje del peso de una muestra frente al tiempo o a la temperatura mientras se somete a un programa de temperatura controlado en una atmósfera específica. Lo habitual es que se produzca una pérdida de peso, sin embargo también es posible que haya una ganancia de peso en algunos casos. La atmósfera puede ser estática o dinámica con un caudal determinado (también se emplean condiciones de presión reducida) y los gases más habituales son Nitrógeno, aire, Argón y Dióxido de Carbono.

Una característica fundamental de la técnica TGA es que sólo permite detectar procesos en los que se produce una variación de peso tales como descomposiciones, sublimaciones, reducción, desorción, absorción, mientras que no permite estudiar procesos como fusiones, transiciones de fase. El equipo utilizado en TGA es principalmente una termobalanza que consta de 5 partes principales: una microbalanza electrónica y su equipo de control, un horno y los sensores de temperatura, un programador de temperatura, un controlador de la atmósfera (tipo de gas y caudal), y un dispositivo para almacenar los datos de peso y temperatura fundamentalmente (Puelloa, et al, 2013). La Figura 33, representa un esquema común de un equipo para realizar TGA.



**Figura 33.** Esquema del sistema de TGA (Puelloa, et al, 2013).

El primer componente de una termobalanza es una microbalanza. La posición del brazo se mide mediante un sensor óptico y cualquier desviación origina una corriente que se comunica a la bobina y la devuelve a la posición de equilibrio. Esto es importante para mantener la muestra en la misma posición dentro del horno. El segundo componente fundamental en una termobalanza es el horno, normalmente se emplea una resistencia eléctrica (de Pt, Rh o W) enrollada de manera que se eviten las interacciones magnéticas con la muestra y según el material se consiguen diferentes máximas (Puelloa, et al, 2013).

Para esta investigación, el análisis termogravimétrico proporciona información importante sobre las temperaturas de degradación del material propuesto. Las temperaturas de degradación de un polímero son diferentes a las de los homopolímeros (esta se ve aumentada por el aumento de peso), por lo tanto, por medio de esta técnica se obtuvo información relevante sobre el proceso de polimerización y su efecto sobre la resistencia térmica del material.

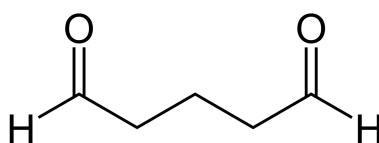
El equipo de TGA a utilizar para la ejecución de este proyecto es un TA instrument Q600, el cual se encuentra ubicado en laboratorios de Catálisis del CNyN-UNAM. Este equipo cuenta con la posibilidad de realizar simultáneamente un análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés). En el equipo se pueden determinar transiciones térmicas propias de los polímeros, como son temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalización ( $T_c$ ) y temperatura de fusión. En esta técnica se observa el cambio del flujo de calor de la muestra con respecto al cambio de temperatura. Para el análisis del copolímero poli (HEMA-co-VP) propuesto en esta investigación, la inclusión de unidades de VP sobre los bloques polimerizados de HEMA, afectará las transiciones térmicas experimentadas por los homopolímeros individuales de PHEMA y PVP.

#### **X.I.V. Ensayo de proliferación celular**

Los ensayos de proliferación son ampliamente utilizados en biología celular para estudiar factores de crecimiento, citocinas, nutrientes y agentes citotóxicos. Hay múltiples maneras de determinar el número de células en un ensayo de proliferación, entre ellas están el conteo directo de las células utilizando el microscopio ó un contador electrónico de partículas, ó un método indirecto donde por incorporación de precursores radioactivos ó por la medición de la actividad metabólica de enzimas celulares (Promega, 2009a). El Ensayo de Proliferación Celular, conocido comúnmente como ensayo colorimétrico MTT o MTS por utilizar compuestos de tetrazolium, es una colección de reactivos calificados que proveen de un método rápido y conveniente para determinar en ensayos el número de células viables en la proliferación, citotoxicidad, adherencia celular, quimiotaxis y apoptosis. El ensayo se lleva a cabo añadiendo al cultivo con la fracción a probar una premezcla de “Solución para teñir”; se deja incubando 4 horas para permitir la formación de las sales de formazán. El formazán es un precipitado cristalino producto de la reducción del MTT, que requiere de la disolución de dichos cristales antes de realizar la lectura de la absorbancia a 490nm . Esto indicará la cantidad de formazán producido, siendo esta lectura directamente proporcional al número de células metabólicamente activas o viables dentro del cultivo celular (Promega, 2009).

#### **X.II. Glutaraldehído**

El glutaraldehído es un agente de entrecruzamiento de uso común en polímeros que contienen grupos hidroxilo (-OH) en su estructura. La estructura del glutaraldehído es mostrada en la Figura 34. Los grupos aldehído de este compuesto, ubicados en cada extremo de la molécula, reaccionan con los grupos hidroxilo del polímero para formar grupos éster, los cuales actúan entrecruzando o sujetando dos cadenas del polímero, generando así una estructura tridimensional con la capacidad de absorber agua, sin disolverse.



**Figura 34.** Estructura química de glutaraldehído. Este compuesto será usado como agente entrecruzante de las fibras poliméricas obtenidas por electrohilado del copolímero poli (HEMA-co-NVP).

Fuente: [www.betelgeux.es](http://www.betelgeux.es), Parámetros de búsqueda: glutaraldehído estructura, Fecha de consulta: 12 de enero 2019.