



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

“Implementación del Sistema Colector *air gap* para la Obtención de Nanofibras con Orientación Axial Inducida Mediante Electrohilado”

PRESENTA:

Yatziri Daniela Orozco Alcaraz

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Química Farmacobióloga

DIRECTORA DE TESIS

D.C. Janett Betzabe González Campos

CO-DIRECTORA

D.C. Alejandra Pérez Nava

Morelia, Michoacán

Septiembre 2021

ABSTRACT

In tissue engineering, the design of nanofibrous scaffolds to mimic the native extracellular matrix is a great challenge, since the optimal combination of mechanical properties, biocompatibility, biodegradability, a high degree of alignment, and porosity is required. The electrospinning method is, until these days, the most adequate approach to produce non-woven nanofibrous materials; which match the aforementioned features. This technique offers versatility and efficiency in the production of continuous nanofibers with uniform diameter size, however, the arrangement of the nanofibers is mainly randomly when using the basic configuration. The fabrication of scaffolding materials based on aligned nanofibers mats is highly desirable to better mimic the native tissue microenvironment. In addition, scaffolds based on aligned nanofibrous meshes can guide the cell contact allowing cell-scaffold union, inducing aligned cell growth, and promoting the differentiation of specialized tissue such as preosteoblasts and neural tissue. Regarding the fabrication of aligned nanofibrous, the *air gap* method arises as an alternative to the basic electrospinning setup, where the collector are two parallel and conductive wires connected by an empty space between them, usually referred as *gap*. This innovative alteration of electrospinning setup results in a versatile, highly efficient, and low-cost alternative to fabricate non-woven nanofibrous with orientation degree up to 90%.

This Thesis presents the implementation of the electrospinning *air gap* configuration to the basic electrospinning unit, using solutions based on polyvinyl alcohol (PVA) due to it is a highly spinnable, biocompatible, biodegradable biopolymer with high mechanical properties. In addition, the use of the deep eutectic solvent (DES) composed of choline chloride:urea (ChCl:U) as a promoter of rugosity on the as-spun nanofibers surface was analyzed. These variations on the conventional electrospinning setup allowed to obtaining highly aligned nanofiber meshes with a high degree of porosity, minimizing the risk of cytotoxicity. These facts permitted the production of aligned microstructured scaffolding materials for tissue engineering. The resulting nanofibrous mats were characterized by field emission scanning electron microscopy. The acquired images were analyzed to determine the orientation degree, gradient colored maps, and statistics.

RESUMEN

En ingeniería de tejidos, el diseño de andamios nanofibrosos que asemejen a la matriz extracelular nativa es un gran reto, ya que se requiere el desarrollo de materiales con buenas propiedades mecánicas, biocompatibles, biodegradables, con alto grado de alineación y alta porosidad. El método de electrohilado es hasta la fecha la opción más viable para generar materiales constituidos por colecciones de nanofibras; los cuales cumplen con estas características. Esta técnica ofrece versatilidad, eficacia y la obtención de nanofibras continuas de diámetros uniformes, no obstante, la disposición de las nanofibras resulta siempre aleatoria cuando se emplea la configuración básica. La producción de andamios constituidos por nanofibras alineadas es más deseable debido a que éstas asemejan en mayor medida el microentorno del tejido vivo. Estos andamios basados en nanofibras alineadas son guía de contacto a las células al orientar la unión célula-nanofibra, induciendo el crecimiento alineado mientras se promueve la diferenciación celular de tejido especializado como preosteoblastos y tejido neural. Para la producción de colecciones de nanofibras alineadas, surge como alternativa una variante de la configuración básica de electrohilado, en donde se emplea un colector con dos electrodos estáticos colocados en paralelo con un espacio vacío entre ellos, denominado *gap*. Esta es una alternativa innovadora, versátil, de alta eficacia y bajo costo para la obtención de colecciones de nanofibras con un grado de alineación de hasta 90%.

En este trabajo de Tesis se presenta la implementación del electrohilado *air gap* a la configuración básica de electrohilado, empleando al alcohol polivinílico (PVA) como polímero base, al ser un biopolímero biocompatible, biodegradable, con buenas propiedades mecánicas y altamente electrohilable. Además, se analizó el uso del disolvente eutéctico (DES) cloruro de colina:urea (ChCl:U) como inductor de rugosidad en la superficie de las nanofibras. Estas variaciones en el equipo estándar de electrohilado permitieron la obtención de colecciones de nanofibras con alto grado de orientación y alto nivel de porosidad, con gran potencial para su aplicación en ingeniería de tejidos, minimizando riesgos en la producción y toxicidad. Las colecciones de nanofibras se caracterizaron mediante microscopia electrónica de barrido de emisión de campo, y las imágenes obtenidas se analizaron para la determinación del grado de orientación, mapas de color por gradiente y datos estadísticos.

Palabras claves: **Ingeniería de tejidos, disolvente eutéctico, PVA, alineadas, andamios.**

La presente Tesis de Licenciatura fue realizada en el Laboratorio de Polímeros y Materiales del IIQB-UMSNH, con el beneficio de la beca no. 30760 derivada del proyecto CONACyT-Ciencia Básica con clave A1-21845.

Los resultados de esta investigación han sido presentados en el XLII Encuentro Nacional de la AMIDIQ “Desafíos actuales de la investigación y docencia en ingeniería química”.

DEDICATORIA

A mi mamá Silvia por haberme apoyado a lo largo de la carrera, por su esfuerzo y dedicación para lograr este sueño. Gracias mamá, te quiero mucho.

A mi abuelita Carmen, por ser siempre mi mayor motivación y creer en mí, por sus palabras de aliento, sus apoyos secretos y sobre todo el gran amor, dedicación y ejemplo que me dio a lo largo de mi vida. Infinitamente gracias, te adoro con todo mi ser.

A la Dra. Janett Betzabe González Campos por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y brindarme las herramientas para lograr este proyecto. Gracias por todo, pero principalmente por creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Janett Betzabe González Campos, por su tiempo, su paciencia para resolver mis dudas y compartirme su conocimiento para realizar este proyecto.

A mi co-directora la D.C. Alejandra Pérez Nava por su apoyo, su tiempo, todas las recomendaciones, las grandes conversaciones que hicieron muy agradable el proceso de elaboración y principalmente, la paciencia para resolver una y otra vez todas mis dudas.

A mis sinodales la D.C. Judit Araceli Aviña Verduzco, la D.C Yliana López Castro, la Dra. Sandra Guadalupe Sánchez Ceja, el D.C. Juan Pablo García Merinos y el Q.F.B. Hilario Tellitud Sosa Ruíz, por el tiempo dedicado a la mejora de este trabajo.

A CONACYT por brindarme el Apoyo para la Formación de Recursos Humanos, dentro del proyecto “Producción de Biopolímeros Poco Electrohilables Empleando Disolventes No Convencionales” No. A1-21845 en el periodo Marzo-Mayo 2021 con No. de becario 30760.

A mis amigos por su ayuda, compañía y confianza a lo largo de la licenciatura dentro y fuera del aula, por los momentos inolvidables que pasamos juntos, por recordarme siempre que soy capaz de más y hacerme sentir que no estoy sola en los malos momentos. Gracias por todo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	5
3. HIPÓTESIS.....	6
4. OBJETIVO GENERAL.....	7
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
5. ANTECEDENTES.....	8
5.1 NANOTECNOLOGÍA	8
5.2 NANOFIBRAS.....	9
5.3 ELECTROHILADO.....	11
5.4 NANOFIBRAS ALINEADAS.....	17
5.5 ELECTROHILADO <i>AIR GAP</i>	19
5.6 APLICACIONES DE MATERIALES CONFORMADOS POR NANOFIBRAS ALINEADAS	22
5.7 ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA)	24
5.8 POROSIDAD EN BIOMATERIALES Y TÉCNICAS PARA PRODUCIR BIOMATERIALES POROSOS	26
5.9 DISOLVENTES EUTECTICOS PROFUNDOS (DES)	28
6. METODOLOGÍA	30
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	32
7.1 ELECTROHILADO <i>AIR GAP</i>	33
7.2 INFLUENCIA DE LA DISTANCIA DE TRABAJO.....	36
7.3 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DEL DES ChCl:U.....	37
7.4 INFLUENCIA DE LA APERTURA DEL <i>GAP</i>	39
7.5 ANÁLISIS DEL GRADO DE ORIENTACIÓN.....	41
7.6 EFECTO DEL DES EN LA MORFOLOGÍA DE LAS NANOFIBRAS	44
8. CONCLUSIONES.....	49
9. PERSPECTIVAS	51
10. REFERENCIAS.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las áreas de aplicación más comúnmente estudiadas para los nanomateriales.	9
Figura 2. Principales estructuras de las nanofibras: a) nanofibras entrelazadas o hiladas, b) nanofibras sólidas, c) nanofibras huecas y d) nanofibras porosas.....	10
Figura 3. Evolución del método de electrohilado a lo largo del tiempo.....	12
Figura 4. a) Esquema del procedimiento de electrohilado convencional y equipamiento básico. b) Colección de nanofibras con disposición aleatoria representativa.....	13
Figura 5. Modificaciones de la técnica de electrohilado para controlar la orientación de las nanofibras.	20
Figura 6. a) Esquema del método <i>air gap</i> ; b) Colección de nanofibras alineadas representativa.....	21
Figura 7. Estructura química del PVA.....	25
Figura 8. Reacción de polimerización para la síntesis del PVA.	26
Figura 9. Colección de nanofibras de PVA obtenidas mediante electrohilado estándar e histograma de distribución de diámetro de las nanofibras.....	32
Figura 10. a) Sistema <i>air gap</i> implementado dentro del equipo convencional de electrohilado; b) colector <i>air gap</i> implementado.	34
Figura 11. Imágenes FESEM de colecciones de nanofibras PVA+ChCl:U 0.5 %v/v colectadas a 1 cm de <i>gap</i> y distancia de trabajo variable: a) 5 cm, b) 8 cm y c) 11 cm.	37
Figura 12. Imágenes FESEM de nanofibras PVA obtenidas a 1 cm de apertura de <i>gap</i> y variando la concentración de ChCl:U: a) 0.5, b) 0.75 y c) 1 %v/v.....	39
Figura 13. Imágenes de FESEM, histogramas de orientación y distribución de diámetro de colecciones de nanofibras de PVA+ChCl:U 0.5 %v/v obtenidas con aperturas de <i>gap</i> de: a) 1 cm, b) 2 cm y c) 3 cm.....	41
Figura 14. Imágenes de FESEM correspondientes a colecciones PVA obtenidas mediante a) electrohilado estándar y electrohilado <i>air gap</i> ; b) sin DES y c) con 0.5 %v/v de DES. Las imágenes inscritas corresponden a los mapas de FFT.....	44
Figura 15. Mapas de colores e histogramas de las colecciones de nanofibras de a) PVA sin ChCl:U y b) PVA+ChCl:U 0.5 %v/v respectivamente.	45

Figura 16. Imágenes FESEM de nanofibras PVA con variación de ChCl:U; a) sin DES, b) 0.5 %v/v, c) 0.75 %v/v y d) 1 %v/v de DES obtenidas a 11 cm de distancia de trabajo y apertura de *gap* 2 cm. 46

Figura 17. Espectro de nanofibras a) PVA puro, b) PVA + DES 1 %v/v, c) PVA + DES 0.75 %v/v y d) PVA + DES 0.5 %v/v. 48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

#	Número
°C	Grados Celsius
μm	Micrómetro
3D	Tridimensional
%	Porcentaje
%p/p	Porcentaje peso/peso
%p/v	Porcentaje peso/volumen
%v/v	Porcentaje volumen/volumen
AC	Ácido cítrico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CES	Electrohilado de fuerza centrífuga
ChCl:U	Cloruro de colina:urea
cm	Centímetro
DES	Disolvente eutéctico
FESEM	Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo
FFT	Transformada de Fourier rápida
FTIR	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier
HBD	Donador de enlaces hidrógeno
LI	Líquidos iónicos
MEC	Matriz extracelular nativa
MES	Electrohilado magnético

mL/h	Mililitro por hora
mm	Milímetro
NaOH	Hidróxido de Sodio
nm	Nanómetro (1×10^{-9} m)
OH	Hidróxido
PCL	Policaprolactona
PVA	Alcohol polivinílico
PVC	Policloruro de vinilo
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
PVP	Polivinil pirrolidona
SFIE	Separación de fases inducida por evaporación del buen disolvente

1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología ha revolucionado diferentes áreas de la ciencia y la tecnología, logrando el desarrollo de novedosos materiales avanzados. Un ejemplo de ello, son los materiales conformados por colecciones de nanofibras, las cuales son estructuras finas y alargadas cuyo diámetro se encuentra en la escala nanométrica. Aunque existen diferentes métodos para su fabricación, la técnica de electrohilado es la estrategia más ampliamente empleada para la obtención de nanofibras¹. El método de electrohilado es una técnica versátil, eficaz y sencilla para fabricar nano y microfibras continuas de diámetros uniformes mediante la aplicación de un campo electrostático. El proceso de electrohilado consiste en suministrar una disolución polimérica a través de una jeringa cargada eléctricamente hacia un colector metálico. El campo eléctrico empleado proporciona a la disolución polimérica la fuerza suficiente para superar el valor crítico de su tensión superficial causando la elongación de la disolución y su eyección como *jets* finos, los cuales finalmente dan origen las nanofibras cuando son depositados en un colector metálico².

A través del método de electrohilado suelen obtenerse materiales constituidos por nanofibras que se depositan de manera aleatoria, como consecuencia de la inestabilidad causada por el campo electrostático en el *jet* polimérico durante su trayectoria al colector³. Dicha distribución otorga a las microestructuras atributos importantes, entre ellos una alta relación área superficial/volumen y porosidad interconectada que les destaca en aplicaciones como: medios filtrantes, sensores, sistema de administración de fármacos, revestimiento de heridas y en el desarrollo de andamios celulares. Las colecciones de nanofibras distribuidas aleatoriamente poseen características únicas, no obstante, existe particular interés en la fabricación de nanofibras alineadas, específicamente para el desarrollo de biomateriales enfocados a la ingeniería de tejidos especializados como: músculo liso, tejido nervioso y tendones⁴, o bien, para el desarrollo de dispositivos biomédicos de alta eficacia¹ y sistemas de mayor eficiencia para la liberación controlada de fármacos⁵.

Para el desarrollo de nuevos biomateriales, la relevancia de los andamios constituidos por nanofibras alineadas se debe a la semejanza que mantienen con el microentorno del tejido vivo⁶. Estudios recientes han demostrado que los andamios basados en nanofibras alineadas son capaces de proporcionar guía de contacto a las células al orientar la unión célula-nanofibra, induciendo el crecimiento alineado mientras se promueve la diferenciación celular de preosteoblastos⁷ y tejido neural⁸. La orientación de las nanofibras es crucial para el buen desempeño mecánico de los biomateriales, debido a que este atributo está íntimamente ligado a la durabilidad y a la mitigación de la respuesta adversa en el tejido vivo⁹. Las nanofibras con alto grado de alineación ofrecen múltiples ventajas para la ingeniería de tejidos, para el desarrollo de dispositivos biomédicos y sistemas de suministro de fármacos. Por esta razón, se han estudiado variaciones de la configuración estándar del proceso de electrohilado para la fabricación de colecciones de nanofibras con orientación axial ya que, empleando la configuración básica del proceso de electrohilado (aun cuando el *jet* polimérico mantiene una trayectoria en línea recta hacia el colector), la deposición de las nanofibras siempre es aleatoria.

Para lograr la alineación de las nanofibras comúnmente se recurre al uso de colectores giratorios operados a una velocidad de rotación superior a 2000 rpm¹⁰. Sin embargo, mediante la inducción mecánica, el grado de alineación de las nanofibras disminuye conforme aumenta el espesor de la colección de nanofibras. Adicionalmente, la alta velocidad de rotación en conjunto con la turbulencia del flujo de aire, son factores que deterioran el grado de orientación y suelen causar la ruptura de las nanofibras. Con el propósito de lograr la fabricación de nanofibras alineadas, se ha establecido una novedosa variante de la configuración básica del electrohilado denominada *air gap*. En el electrohilado *air gap* se emplean dos electrodos estáticos colocados en paralelo con un espacio vacío entre ellos, denominado *gap*. Esta disposición promueve la deposición paralela de las nanofibras logrando un grado de alineación de hasta 90%, dependiendo las condiciones de operación². La alta eficiencia del electrohilado *air gap* en la obtención de nanoestructuras axialmente orientadas depende de la distribución no uniforme de la densidad electrostática en los electrodos paralelos que componen al sistema colector. La disposición de los electrodos da lugar a la distribución lineal del campo eléctrico en el borde del

sistema colector con variaciones que producen el estiramiento de las nanofibras y guían su alineación a través del espacio vacío, mientras son depositadas¹.

En los últimos años, el equipo de trabajo del laboratorio de Biopolímeros y Materiales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), ha centrado sus investigaciones en la producción de biomateriales basados en colecciones de nanofibras de biopolímeros para su posible aplicación como andamios celulares en ingeniería de tejidos. Para este fin, se cuenta con un equipo de electrohilado TL-01 de NaBond Technologies Co[®] equipado con la configuración estándar, lo que a la fecha no ha permitido la producción de andamios celulares con alto grado de alineación que posibiliten el estudio de aplicaciones en ingeniería de tejidos especializados. Por esta razón, en el presente trabajo de Tesis se presenta la implementación de la configuración *air gap* en el equipo de electrohilado actual para la producción de colecciones de nanofibras de alcohol polivinílico (PVA) con alto grado de orientación uniaxial.

Por otra parte, el PVA es un polímero de alto valor biotecnológico por su carácter biodegradable, biocompatible, su alta electrohilabilidad en medio acuoso y buenas propiedades mecánicas, que lo hacen atractivo para la fabricación de nanofibras de resistencia superior¹¹. Entre sus aplicaciones como biomaterial destaca la liberación prolongada de fármacos, particularmente para el tratamiento de trastornos oculares⁵, andamios para regeneración de músculo¹², piel, y tejido muscular liso¹³.

A su vez, la fabricación de materiales porosos ha ganado interés para el desarrollo de biomateriales dado que la porosidad facilita la difusión celular en el andamio. Las estructuras porosas son relevantes para aplicaciones como biosensores, administración de fármacos y catálisis¹⁴. En ingeniería de tejidos, la porosidad es indispensable en los andamios para permitir la permeabilidad, el adecuado metabolismo celular, facilitar la adhesión y el crecimiento celular. Se han investigado diferentes técnicas para la fabricación de materiales porosos, como la inducción por evaporación de disolventes, lixiviación de partículas, inducción con gas, liofilización, entre otras. Específicamente, para la obtención de nanofibras porosas, una de las

técnicas más utilizadas es la inducción por pérdida de disolventes, donde una disolución porógena es requerida durante el procesamiento. Posterior al procesamiento, el agente porógeno es removido, dejando atrás espacios vacíos en las zonas en las que se encontraba disperso, dando así lugar a estructuras porosas¹⁵. Tomando ventaja de sus propiedades fisicoquímicas, los disolventes eutécticos (DES) son una alternativa novedosa a los disolventes orgánicos volátiles comúnmente empleados como agentes porógenos¹⁴ para fabricar sustratos poliméricos de alta porosidad.

En los últimos años, se ha incrementado el interés por el uso de los DES para la obtención de diversos materiales poliméricos debido a su naturaleza biocompatible y biodegradable, no toxicidad, reciclabilidad, alta disponibilidad y bajo costo; características que los posicionan como disolventes verdes. El término DES refiere líquidos cercanos a la composición eutéctica de las mezclas de sales cuaternarias de amonio y una especie donadora de hidrógeno. Los DES surgieron como una nueva generación de disolventes ecológicos que pueden ser preparados en estado puro y no son reactivos con el agua¹⁶. Recientemente, los DES han sido estudiados para generar estructuras con alto nivel de porosidad con la intención de mejorar la infiltración celular y mitigar la respuesta adversa⁹. Por lo anterior, adicionalmente a la obtención de colecciones de nanofibras alineadas, en el presente proyecto se plantea el estudio de la mezcla eutéctica cloruro de colina:urea (ChCl:U) como inductor de mesoporosidad en la superficie de las nanofibras alineadas fabricadas.

2. JUSTIFICACIÓN

La obtención de andamios constituidos por nanofibras alineadas es de gran interés en ingeniería de tejidos gracias al mimetismo que presentan con la matriz extracelular (MEC), sirviendo como guía de contacto a las células al orientar la unión célula-nanofibra e induciendo el crecimiento alineado. Dicha distribución otorga además a la estructura un mejor desempeño para la liberación controlada de fármacos.

Dadas las múltiples ventajas que ofrece una colección de nanofibras alineadas, en el presente proyecto se presenta la implementación del sistema colector *air gap* por ser un método fácilmente adaptable y de bajo costo que permite la obtención de materiales en tiempos de trabajo reducidos, además de no requerir aditamentos complejos adicionales a la configuración estándar con el que actualmente se cuenta en el Laboratorio de Polímeros y Materiales del IIQB-UMSNH. La versatilidad del dispositivo para la obtención de nanofibras alineadas amplía las opciones para la obtención de colecciones de nanofibras con diferentes características.

Adicionalmente a la implementación del sistema colector *air gap*, se presenta el uso de los disolventes denominados DES como agente inductor de la porosidad superficial en las nanofibras. Estos disolventes son ecológicos, biodegradables, de bajo costo, que pueden ser preparados en estado puro y no son reactivos con el agua. La adición de DES a las disoluciones procesadas mediante electrohilado *air gap* favorece la obtención de nanofibras con adecuado nivel de porosidad, lo cual es indispensable para la generación de andamios con fines de aplicación en ingeniería de tejidos al ser una propiedad crucial para la permeabilidad celular, metabolismo e infiltración, además de favorecer la adhesión y el crecimiento del tejido.

3. HIPÓTESIS

La incorporación del sistema de colección *air gap* facilitará la fabricación de materiales constituidos por nanofibras alineadas mediante el proceso de electrohilado con un costo mínimo de inversión. Mediante este método, la disposición alineada de las nanofibras será promovida por la diferencia de densidad electrostática que se distribuye en los electrodos paralelos.

Por otra parte, la inducción de porosidad superficial de las nanofibras se inducirá empleando la mezcla eutéctica ChCl:U como agente porógeno. La actividad porogénica de dicho DES ha sido demostrada previamente en nuestro grupo de trabajo para la obtención de microestructuras de alta porosidad.

4. OBJETIVO GENERAL

Obtener nanofibras con alto grado de alineación implementando el sistema colector *air gap* en el equipo de electrohilado, induciendo además porosidad en la superficie de las nanofibras con el uso del DES constituido ChCl:U como agente porógeno.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar el sistema colector *air gap* para su implementación el equipo de electrohilado TL-01 de NaBond Technologies Co[®].
- Establecer las condiciones de electrohilado adecuadas para la producción de colecciones de nanofibras con orientación inducida mediante con el método *air gap*; siendo PVA el polímero empleado como modelo de estudio.
- Definir la concentración (% v/v) adecuada del DES ChCl:U (1:2) durante el proceso de obtención de las colecciones de nanofibras para la generación de su porosidad superficial.
- Analizar la estructura microscópica de los materiales obtenidos mediante FESEM para la determinación de uniformidad de diámetro, grado de orientación y porosidad.

5. ANTECEDENTES

5.1 NANOTECNOLOGÍA

La nanociencia y la nanotecnología constituyen un área de investigación enfocada al estudio de los materiales donde convergen diversas ramas del conocimiento, permitiendo estudiar fenómenos únicos que ocurren a nivel atómico y molecular¹⁷. La nanotecnología estudia las diferentes estructuras de la materia con dimensiones del orden de una milmillonésima parte del metro (1×10^{-9}).

El término nanotecnología fue acuñado en 1974 por el profesor Norio Taniguchi de la universidad de Tokio, en su visión sobre cómo se podían manipular los átomos en la industria de los materiales semiconductores. La nanotecnología cuenta con un campo de estudio amplio, las posibles aplicaciones de los materiales nanoestructurados son ciertamente una de las razones del creciente interés en el tema (Figura 1)¹⁸. Es común encontrar nanoestructuras en la naturaleza y en el mismo cuerpo humano, por ejemplo: proteínas, ADN u orgánulos. Actualmente, una de las aplicaciones prácticas de la nanotecnología con gran impacto en ingeniería de tejidos es la producción de colecciones de nanofibras debido a que sus características fisicoquímicas abarcan un amplio abanico de aplicaciones.

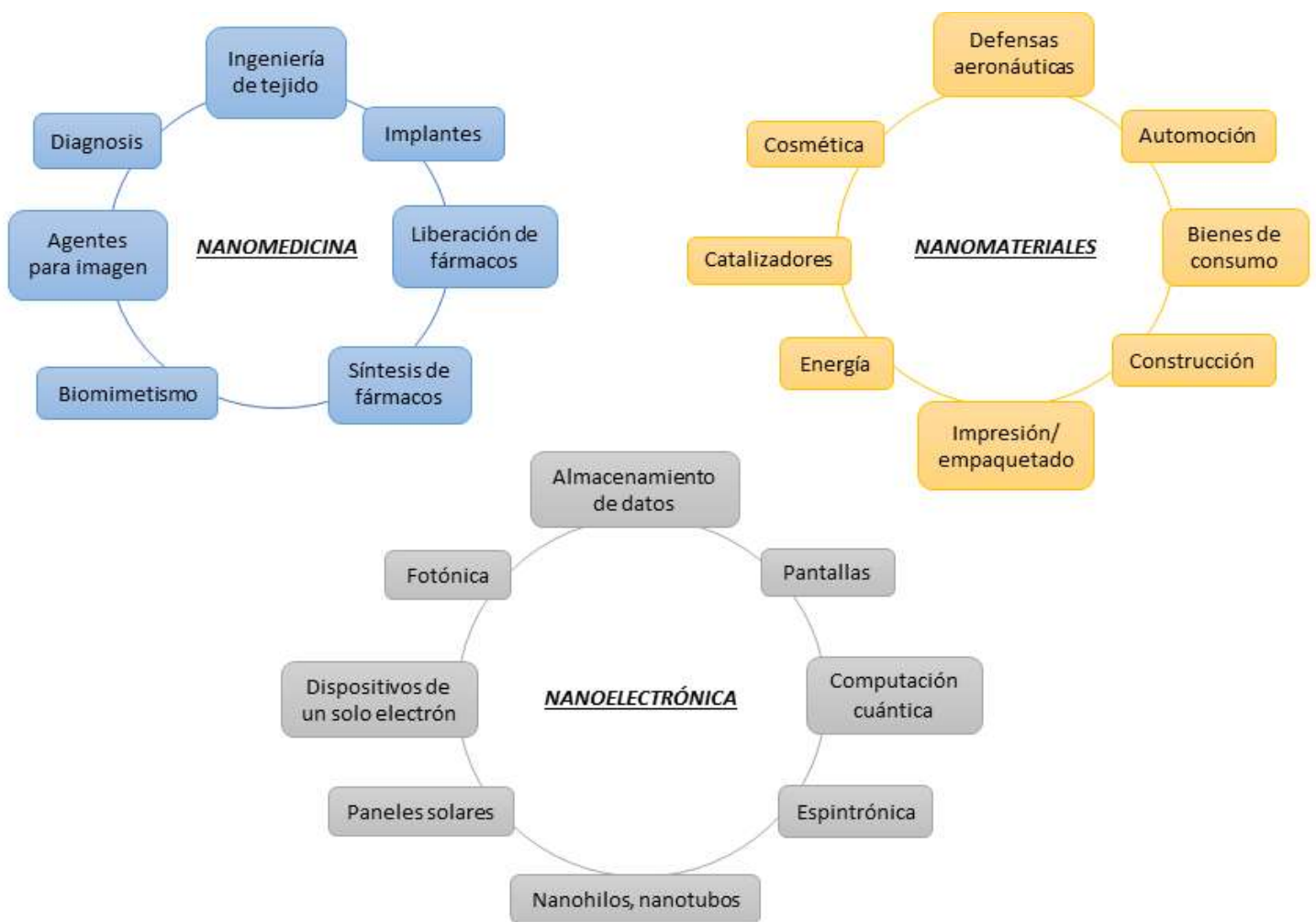


Figura 1. Áreas de aplicación más comúnmente estudiadas para los nanomateriales.

5.2 NANOFIBRAS

El término fibra se refiere a una estructura fina y alargada, denominándose “nanofibra” cuando posee un diámetro inferior a los 500 nm¹⁹. El término nano alude a la escala en la que se encuentra la dimensión de sus diámetros (1×10^{-9} m). Cuando la escala en la que se encuentran las fibras va de micro a nanómetros aparecen varias características sorprendentes, que no se presentan cuando el material se encuentra a escala macroscópica, entre ellas una alta relación

de área de superficie/volumen, flexibilidad en las funciones de la superficie y rendimiento mecánico superior, por ejemplo: rigidez y tensión. Estas propiedades hacen que las colecciones de nanofibras poliméricas sean candidatas óptimas para muchas aplicaciones importantes. Las nanofibras pueden obtenerse como estructuras aleatorias o con cierta orientación, es decir alineadas. Ambas formas de orientación resultan de gran utilidad para usos diversos.

Además de nanofibras con estructuras aleatorias y alineadas, existen ciertas modificaciones con el fin de mejorar sus características para aplicaciones específicas. Por ejemplo: a) nanofibras entrelazadas o tejidas: con estructuras similares a ciertos materiales y/o tejidos, b) nanofibras sólidas: utilizadas como guía de contacto para promover la regeneración celular, c) nanofibras huecas: para incorporar después otro material poco electrohilable, y d) nanofibras porosas: para favorecer la infiltración celular o de nutrientes, o nanofibras formadas por más de un polímero (Figura 2).

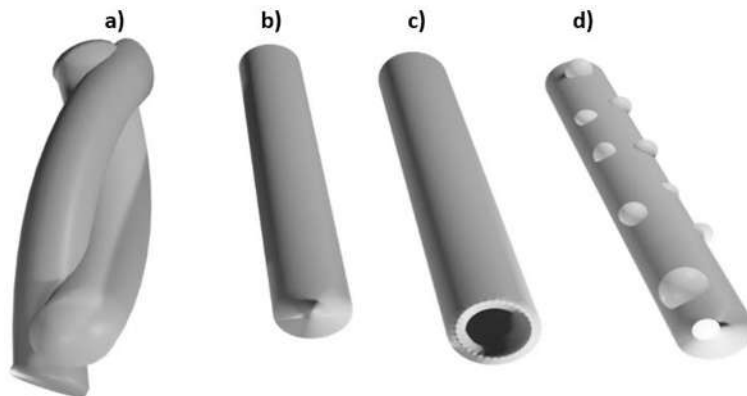


Figura 2. Principales estructuras de las nanofibras: a) nanofibras entrelazadas o hiladas, b) nanofibras sólidas, c) nanofibras huecas y d) nanofibras porosas.

Las nanofibras utilizadas en ingeniería de tejidos, deben contar con ciertas características para ser una buena opción como andamio celular, como la biocompatibilidad del material base y la semejanza con la matriz extracelular nativa (MEC), también deben ser biodegradables para que el andamio se degrade a medida que avance el crecimiento. Las propiedades mecánicas son de gran relevancia, ya que los materiales rígidos pueden inducir daño de implantación y/o dificultad para la regeneración por la reducida permeabilidad del material. Se han fabricado nanofibras

alineadas electrohiladas para la administración de fármacos o aplicaciones en ingeniería de tejidos. Algunos estudios sugieren que la alineación de las nanofibras es importante para dirigir el crecimiento celular y para la optimización de las características del andamio⁸. Existen varias técnicas de procesamiento para fabricar andamios de nanofibras, entre los que se pueden mencionar: *drawing*, hilado de fuerza centrífuga, el método isla-océano, separación de fases, autoensamblado y electrohilado, este último atrayendo gran atención debido a su facilidad de uso y versatilidad.

5.3 ELECTROHILADO

El término electrohilado, derivado de “hilado electrostático”, se comenzó a utilizar alrededor del año 1994. Entre los años de 1934 a 1944, Anton Formhals publicó una serie de patentes, describiendo un montaje experimental para la producción de filamentos poliméricos utilizando fuerza electrostática a partir de una disolución de polímero que se introduce en un campo eléctrico controlado. Las nanofibras de polímeros se forman por diferencia de cargas opuestas, donde se utiliza un electrodo conectado a la disolución y el otro a un colector metálico. Una vez expulsada la disolución polimérica de la aguja, el disolvente se evapora dando lugar a la formación de colecciones de nanofibras en el colector²⁰.

El proceso de electrohilado es el resultado de muchos años de investigación de múltiples científicos (Figura 3), y a partir de 1995 el número de publicaciones sobre electrohilado ha estado aumentando exponencialmente cada año.

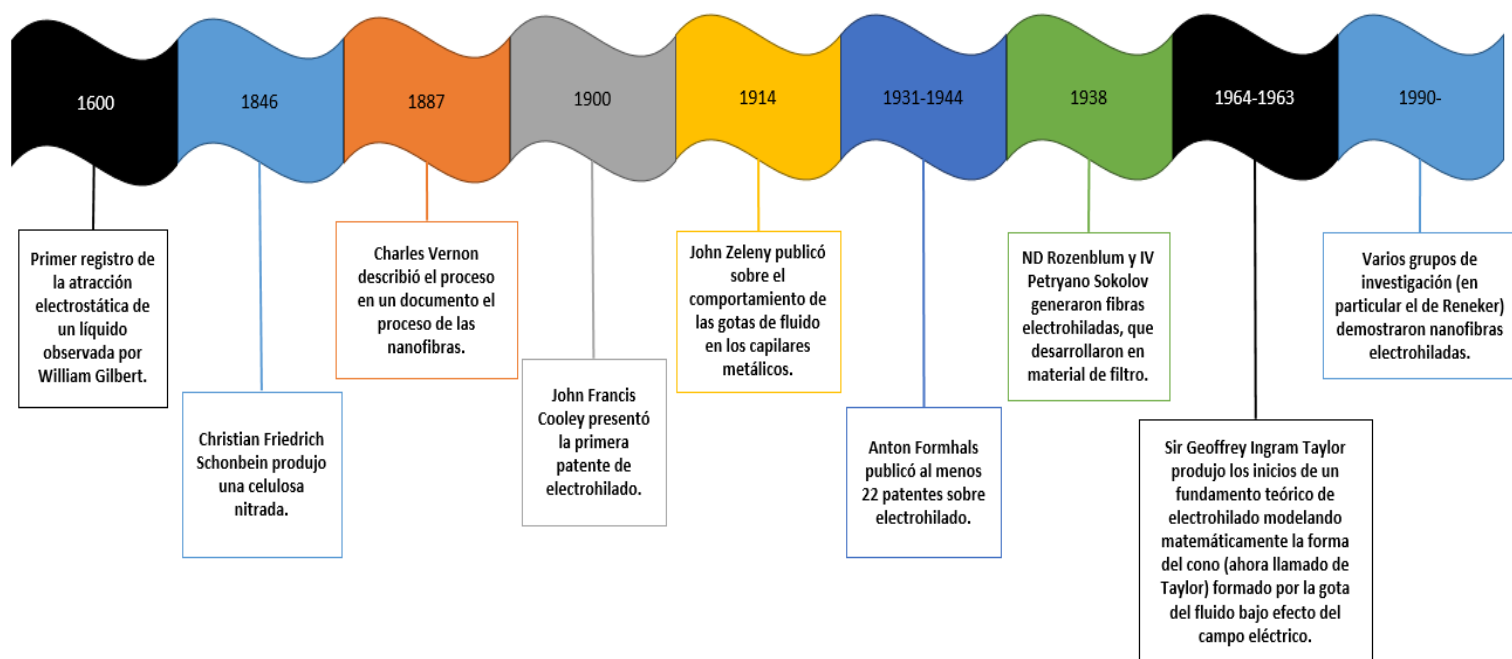


Figura 3. Evolución del método de electrohilado a lo largo del tiempo.

La técnica de electrohilado es un proceso que utiliza fuerza electrostática²¹ y permite la producción de colecciones de nanofibras. Este proceso es de gran popularidad debido a su configuración económica, versátil y la facilidad de producción comparada con otros métodos de generación de nanofibras. En un proceso sencillo, el fluido polimérico se suministra mediante una aguja para formar una pequeña gota en presencia de un campo eléctrico. Cuando el campo eléctrico es suficientemente fuerte, las cargas acumuladas en la superficie de la gota superan la tensión superficial para inducir la formación de gotículas que posteriormente se aceleran hacia un colector conectado a tierra. Mientras el disolvente se evapora, las gotículas poliméricas se fraccionan en *jets* que se estiran para producir nanofibras continuas y finas. Las nanofibras electrohiladas a menudo se colectan como estructuras orientadas al azar en superficies metálicas denominadas colectores²². El equipamiento básico de electrohilado consta de un tubo capilar o aguja de diámetro pequeño, una fuente de alto voltaje y un colector. La Figura 4a ilustra el esquema general del proceso, mientras que en la Figura 4b se muestra la imagen FESEM con la disposición aleatoria de las nanofibras obtenidas mediante el método de electrohilado convencional.

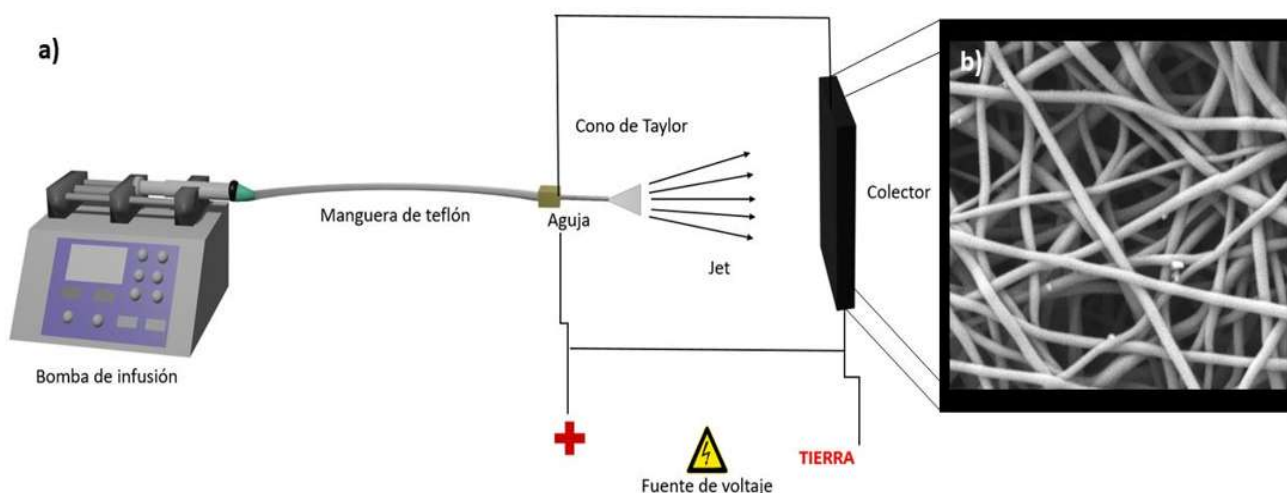


Figura 4. a) Esquema del procedimiento de electrohilado convencional y equipamiento básico. b) Colección de nanofibras con disposición aleatoria representativa²³.

La producción de colecciones de nanofibras mediante electrohilado convencional se logra usando fuerza eléctrica variable. Un campo eléctrico es la principal fuerza impulsora del proceso, lo que finalmente permite la formación del cono de Taylor y de los *jets* poliméricos. Cuando la fuerza electrostática producida por la aplicación del campo eléctrico que impulsa el proceso de inyección supera la tensión superficial de la disolución del polímero, da como resultado la formación del cono de Taylor en la punta de la aguja. Los *jets* poliméricos están influenciados por inestabilidades que surgen debido a la fuerza de repulsión entre el exceso de carga que rodea a las gotículas y su vértice hacia el colector.

En el método de electrohilado existen parámetros relacionados con: a) la operación y b) la disolución, los cuales pueden modificar las características de las nanofibras durante el proceso:

a) Parámetros de operación:

Distancia de trabajo: Es la distancia entre la punta de la aguja y el colector metálico. Se debe encontrar un balance de la distancia de trabajo ya que distancias demasiado cortas o demasiado largas darán como resultado la formación de perlas o defectos en la colección nanofibrosa. Especialmente, distancias cortas pueden ser ineficientes para la evaporación del

disolvente, lo cual puede afectar principalmente a la estructura de las nanofibras colectadas, provocar la ruptura de las nanofibras y la formación de defectos, observándose así una morfología irregular. Comúnmente, cuando se trabaja con mayores distancias se favorece el alargamiento de las nanofibras, obteniendo colecciones de nanofibras delgadas. Las distancias de trabajo cortas también están asociadas con la generación de nanofibras con diámetros de mayor dimensión.

Longitud de la aguja: la estabilidad del flujo de electrohilado depende en gran medida de la longitud de la aguja mediante la cual se suministra la disolución polimérica. Cuando la longitud es demasiado corta, el campo estabilizador de la punta de la aguja se reduce y la estabilidad de flexión se establecerá con mayor voltaje. Sin embargo, si la aguja se extiende más allá del electrodo, se observa una longitud de flujo estable más larga. Además debe contar con el diámetro adecuado para que la disolución fluya, evitando la formación de defectos, esto dependerá de otros parámetros como la velocidad de flujo, la disolución polimérica y su viscosidad²².

Voltaje: es un factor fundamental al ser el encargado de crear el campo electrostático que propicia la atracción de la disolución polimérica al colector. La aplicación de un alto voltaje puede atraer cantidades excesivas e innecesarias de la disolución hacia el colector, dando tiempo insuficiente para la evaporación del disolvente y resultando en la formación de perlas o cúmulos poliméricos en el colector o la ruptura de las nanofibras. Por el contrario, un voltaje bajo no proporciona la fuerza suficiente de atracción y por gravedad la disolución cae a la base de la cámara de electrohilado, por lo cual no se recolectan nanofibras. El aumento en el voltaje suele aumentar la longitud del flujo estable, esto se atribuye a un mayor entorno electrostático, sin embargo, este efecto no se aplica en todas las disoluciones²². Se ha demostrado que se crea un *jet* estable más largo aplicando una carga opuesta en la aguja, por ello, también se puede utilizar un campo eléctrico externo apropiado para amortiguar la perturbación mediante la aplicación de una fuerza de contracción sobre el flujo²⁴.

Colector: Existen varios tipos de colectores (placa fija, tambor rotatorio, mallas, entre otros), esto influye principalmente en la morfología de la colección de nanofibras. Por ejemplo, con el uso de un tambor rotatorio se recolectan nanofibras largas, alineadas y continuas alrededor del colector. En contraste, con el uso de una placa fija se obtienen colecciones planas con nanofibras dispuestas aleatoriamente. Por otro lado, el colector cargado facilita la estabilidad del *jet* en dos formas: i) ejerciendo mayor fuerza de inercia hacia el colector, y ii) favoreciendo el estiramiento del *jet* hacia el colector debido a que la carga opuesta ejerce un tirón direccional sobre las cargas del *jet* de electrohilado³.

Velocidad de flujo: es un factor muy importante ya que proporciona la cantidad de disolución eyectada por la aguja en un determinado tiempo. Una velocidad de flujo alta, expulsará disolución que posiblemente no sea aprovechada y resultará en la formación de perlas o cúmulos poliméricos en el colector. Por su parte, una velocidad de flujo baja alargará el tiempo de trabajo y no permitirá la formación del *jet*, creando gotas que pueden ser atraídas hacia el colector ya que el campo electrostático generado es capaz de atraer completamente la cantidad de disolución polimérica eyectada, en este caso se favorecerá la formación de películas y perlas en la colección de nanofibras.

b) Parámetros de la disolución:

Viscosidad: para el electrohilado la viscosidad se puede aumentar utilizando una disolución de polímero más concentrada o usando un polímero de mayor peso molecular. Se ha demostrado que aumentar la viscosidad da lugar a un *jet* más estable que permite el flujo constante y controlado de la disolución.

Tensión superficial: cuando la disolución polimérica cuenta con una tensión superficial alta se requerirá crear un campo electrostático mayor para vencer dicha tensión superficial, por ello se deberán manejar voltajes mayores. Altos valores de tensión superficial provocarán la presencia de perlas en las colecciones de nanofibras al generar resistencia y no permitir un flujo constante ni la óptima formación del cono de Taylor, repercutiendo así en la escasa formación de nanofibras.

Propiedades dieléctricas de la disolución: el uso de disolventes con alta conductividad, o alta constante dieléctrica, mejorara la electrohilabilidad de la disolución al aumentar la densidad de la carga del flujo. Sin embargo, el mismo factor también puede conducir a una menor longitud del flujo. Una disolución con mayor conductividad soportará la capacidad de carga, así como mayor estiramiento, por lo cual se podrían esperar nanofibras más delgadas. Por el contrario, disoluciones con menor conductividad, no serán capaces de soportar cargas altas y se obtendrán nanofibras más gruesas. Las propiedades dieléctricas de las disoluciones también pueden ser mejoradas mediante la adición de sales.

Disolvente: el método de electrohilado requiere de un disolvente capaz de evaporarse en el tiempo que dura el trayecto del *jet* desde la punta de la aguja hacia el colector, es decir, en distancias que permitan la formación de las nanofibras y su posterior deposición en el colector. También debe ser compatible con el polímero, de preferencia de bajo costo y amigable con medio ambiente. Es posible promover la evaporación del disolvente aplicando temperatura, flujos de aire o variando la distancia de trabajo. Un disolvente de baja presión de vapor contribuye a la formación de morfologías irregulares y complica la formación de nanofibras debido a la baja tasa de evaporación durante el trayecto aguja-colector.

c) Parámetros ambientales:

Temperatura: el control de la temperatura puede beneficiar el proceso de electrohilado al coadyuvar en la modulación de la tasa de evaporación. En algunos casos la aplicación de alta temperatura puede ayudar a la evaporación del disolvente, pero esta misma temperatura, en otros casos, puede afectar la estructura de las nanofibras provocando su ruptura. La selección de la temperatura óptima de trabajo está entonces en función del disolvente que se procesa; a su vez este parámetro está ligado a las condiciones de humedad.

Humedad: altos niveles de humedad puede contribuir a la formación de perlas y/o películas en el colector. Otros autores han demostrado que la aplicación de gradientes de humedad resulta en la formación de poros en la superficie de las nanofibras.

Flujo de aire: las corrientes de aire inducidas en el sistema de electrohilado pueden interferir con la trayectoria del *jet* hacia el colector. El control de los flujos de aire debe ser meticuloso en aras de evitar la ruptura de las nanofibras continuas, de otro modo puede inducirse una baja tasa de deposición de nanofibras, generar perlas en la colección de nanofibras o la ruptura de las mismas.

La variedad de parámetros mencionados hacen del método de electrohilado un procedimiento versátil y asequible para la fabricación de una amplia gama de materiales nanoestructurados; siendo fundamental la combinación personalizada de los parámetros para cada disolución que se procesa. El valor agregado que posee la técnica de electrohilado radica en el hecho de que a partir de diversas configuraciones de operación es posible la inducción de microarquitecturas porosas, huecas, multinivel o compuestas.

Por otra parte, la producción de nanofibras alineadas mediante el proceso de electrohilado a menudo es requerida para atender necesidades específicas. Particularmente en el campo biomédico, las colecciones compuestas por nanofibras con alto grado de orientación son deseables para la fabricación de biodispositivos, sistemas de liberación de fármacos y andamios celulares. Especialmente, en la ingeniería de tejidos, las nanofibras alineadas han demostrado la capacidad de modular el comportamiento celular, la migración y diferenciación celular, así como el ensamblaje de la MEC. Sin embargo, producir nanofibras alineadas por el método convencional de electrohilado no es factible debido a la inestabilidad causada en el *jet* como consecuencia de la fuerza electrostática aplicada¹.

5.4 NANOFIBRAS ALINEADAS

Con el uso de andamios compuestos por nanofibras alineadas es posible regular la migración, proliferación y diferenciación celular; actividades celulares cruciales para la ingeniería de tejidos. Algunos estudios han demostrado que las nanofibras pueden guiar el crecimiento de las neuritas para que se extiendan a lo largo del andamio siguiendo la dirección de alineación que mantienen las nanofibras, como resultado, el tejido cultivado es semejante a la jerarquía nativa

del tejido nervioso. Sin embargo, se ha sugerido que las señales de contacto proporcionadas por las nanofibras pueden ser mucho más complicadas que simplemente guiar neuritas para que se extienda a lo largo de ellas²⁵. Con el propósito de demostrar la influencia de la orientación de las nanofibras en el comportamiento celular, McDonald²⁶ demostró que las nanofibras alineadas compuestas por ácido poli-L-láctico pueden facilitar a los axones, sirviendo como guía para curar un defecto de lesión de la médula espinal, dicho estudio fue realizado empleando ratas como modelo animal. La mejora en el rendimiento curativo fue atribuida a la estructura altamente organizada de nanofibras, que imita en gran medida las estructuras de la MEC de la médula espinal²⁶.

La MEC nativa tiene una microarquitectura fibrosa que gobierna la adhesión celular, la proliferación, la migración y la diferenciación celular. Debido a que la MEC también ancla y apoya físicamente a las células, es deseable crear andamios miméticos para su uso en ingeniería de tejidos. El proceso de electrohilado crea microarquitecturas tridimensionales compuestas por nanofibras con alta proporción de área de superficie/volumen, lo que permite el aumento de los sitios de unión celular y el transporte de oxígeno o factores de crecimiento a través del andamio. La orientación aleatoria en las nanofibras, aunque, biocompatible y termo-resistente, no imita la estructura anisotrópica de la MEC nativa que se encuentra en tejidos como el nervioso, cardiovascular y muscular²⁷. Así pues, la alineación en los sustratos constituidos por nanofibras es una característica deseable y necesaria para múltiples usos biomédicos, por ello se han desarrollado varias modificaciones de la técnica de electrohilado para controlar la orientación de las nanofibras, incluidos los colectores giratorios como rodillos o discos, colectores auxiliares, colectores magnéticos, o bien el electrohilado de fuerza centrífuga y de inducción magnética. La mayoría de estos métodos permiten una orientación variable de las nanofibras pero están restringidos en términos de complejidad total de la colección de nanofibras, la tasa de rendimiento del proceso, la composición de las nanofibras, así como la longitud y densidad de la colección de nanofibras. Los principales métodos empleados para generar un alto grado de orientación en nanofibras se agrupan en la Figura 5.

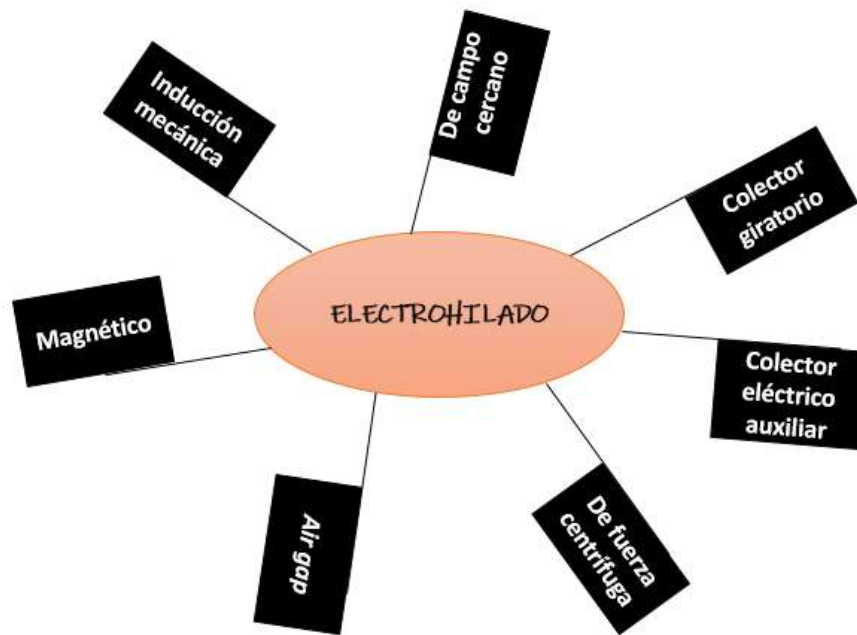


Figura 5. Modificaciones de la técnica de electrohilado para controlar la orientación de las nanofibras.

5.5 ELECTROHILADO AIR GAP

Entre las metodologías para la producción de colecciones de nanofibras alineadas destaca el método *air gap* debido a que es una técnica sencilla e innovadora que permite la obtención de un alto grado de orientación en colecciones de nanofibras mediante la implementación de un sistema colector constituido por electrodos conductores dispuestos en paralelo. Es un método versátil y asequible a bajo costo para ser adaptado al sistema convencional de electrohilado, cuyo prerequisite son un par de electrodos paralelos que cuenten con un espacio vacío o *gap*. El método no representa riesgos operacionales y permite la obtención del mayor grado de alineación reportado en la literatura hasta la fecha²⁸. La fabricación de colecciones de nanofibras mediante *air gap* ha ganado gran importancia en diversas áreas, entre ellas la ingeniería de

tejidos por el uso de disoluciones de gran interés en aplicaciones como andamios de tejidos especializados.

La técnica *air gap* fue descrita por primera vez en 2003 por Li y colaboradores²⁹, en su estudio se reportó la obtención de nanofibras con alto grado de orientación inducida mediante la implementación de un sistema colector constituido por dos barras metálicas paralelas empleadas a manera de colector. Básicamente, las nanofibras electrohiladas son recolectadas por dos electrodos cargados negativamente o conectados a tierra, separados por un espacio vacío denominado *gap* como se ilustra en la Figura 6²⁹. Esta adaptación a la técnica de electrohilado es un método sencillo y versátil que genera nanofibras alineadas uniaxialmente sobre áreas hasta de 50 cm de espacio vacío entre los electrodos que conforman al colector³⁰. Con ayuda de las interacciones electrostáticas, las nanofibras son estiradas a través del *gap* para formar una matriz paralela, como se ilustra en la Figura 6b.

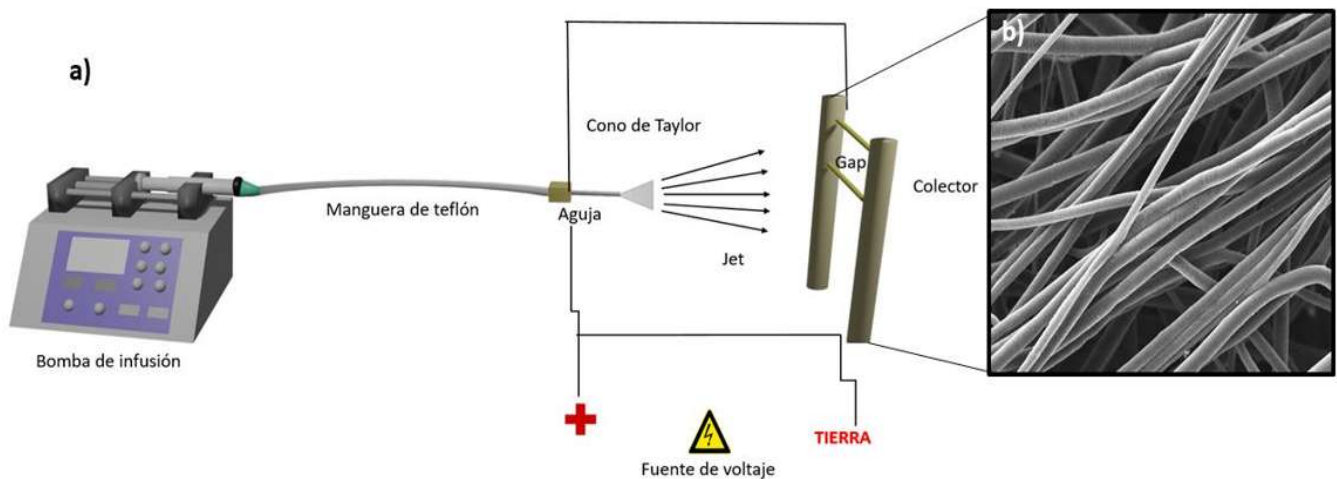


Figura 6. a) Esquema del método *air gap*; b) colección representativa de nanofibras alineadas²³.

A diferencia del sistema convencional de electrohilado, las líneas de campo eléctrico en torno al sistema colector se dividen en dos fracciones apuntando hacia los bordes opuestos del espacio vacío. Las nanofibras recién hiladas pueden ser consideradas como una cadena cargada positivamente conectada a través de un medio viscoelástico. En general, la fuerza electrostática

genera dos eventos que inducen la orientación axial: el primero, originado en la división del campo eléctrico provocando variaciones sobre la densidad electrostática en el sistema colector, mientras que el segundo afecta a las nanofibras cargadas induciendo la organización ordenada en la superficie de los dos electrodos. En particular, la fuerza electrostática se distribuye en la misma dirección que las líneas de campo eléctrico estirando los extremos de las nanofibras hacia un electrodo y subsecuentemente al segundo; este hecho da lugar a la formación de microestructuras organizadas en gradiente macro y microscópico.

De manera similar que en el procedimiento de electrohilado estándar, la deposición de las nanofibras en el sistema colector es promovida por la diferencia de cargas entre el *jet* polimérico y el colector. Mediante la configuración *air gap*, la disposición paralela de los electrodos induce el ensamble de nanofibras individuales en el electrodo más cercano; subsecuentemente la fuerza electrostática estira las nanofibras a través del *gap* permitiendo su deposición en el borde del segundo electrodo. Además, las nanofibras suspendidas a través del espacio vacío suelen poseer cargas residuales, de manera que la repulsión electrostática entre las nanofibras depositadas incrementa la orientación paralela de las nanofibras subsecuentes.

El método *air gap* ofrece como principal ventaja la obtención de colecciones de nanofibras altamente orientadas en periodos de trabajo más cortos respecto a métodos como el electrohilado de fuerza centrífuga e inducción mecánica¹. A diferencia del método de inducción magnética, mediante este protocolo es posible el procesamiento de disoluciones poliméricas sin requerir la adición de componentes magnéticos³. Adicionalmente, la implementación de los sistemas colectores *air gap* son accesibles a un costo mínimo, a diferencia de los equipamientos requeridos para la inducción asistida con electrodos auxiliares o los colectores móviles necesarios para efectuar el electrohilado a campo cercano²⁹.

Además de los parámetros que influyen en el proceso de electrohilado relacionados con las condiciones de operación, ambientales y propiedades de la disolución, en la variante *air gap* la apertura del *gap* tiene efectos importantes en la morfología de la microarquitectura. Aspectos como la orientación y densidad de las colecciones de nanofibras dependen del ancho del *gap* y

el tiempo de recolección. Las longitudes de *gap* más reducidas y los tiempos de recolección más largos llevan a la formación de matrices densas y de mayor grado de orientación.

Empleando > 1 cm como apertura de *gap* se ha reportado la obtención de nanofibras delgadas de diámetro promedio de 150 nm de polivinil pirrolidona (PVP), sin embargo, las nanofibras alineadas de diámetros delgados tienden a fracturarse por no ser suficientemente fuertes para soportar su propio peso ni el de las nanofibras subsecuentes²². Por otro lado, Balendu y colaboradores describieron las propiedades estructurales de una colección nanofibrosa de policaprolactona (PCL) con función de guía nerviosa, fabricando nanofibras individuales de PCL que van desde 400 a 1500 nm y utilizando tamaños de *gap* de 2.54 a 15.24 cm³¹. Por su parte, Lei y colaboradores describieron la obtención de estructuras nanofibrosas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con un *gap* de 8 cm⁴.

Para muchos investigadores, la técnica de *air gap* presenta como limitante la reducida área total de las colecciones de nanofibras como resultado del uso de aperturas reducidas en el *gap* del sistema colector. No obstante, se ha demostrado la satisfactoria obtención de colecciones de nanofibras de PCL con diámetros menores a 1 μm empleando una apertura de *gap* de hasta 50 cm.

Así mismo, este método permite la obtención de matrices de nanofibras alineadas biaxialmente, procesando capa por capa, para generar microestructuras reticuladas tridimensionales (3D) a bajo costo. La fabricación de colecciones de nanofibras axialmente orientadas potencializa la gama de propiedades y aplicaciones asociadas con la organización de microestructuras controladas²² en áreas como regeneración de tejido nervioso³¹ y ligamentos³².

5.6 APLICACIONES DE MATERIALES CONFORMADOS POR NANOFIBRAS ALINEADAS

Las nanofibras alineadas ofrecen propiedades atractivas para diseñar injertos vasculares debido a que pueden dirigir el crecimiento de las células del músculo liso con una orientación alineada de manera similar a los vasos naturales, y podrían promover el ensamblaje ordenado de

la MEC¹⁵. Por ejemplo, el infarto de miocardio, generalmente conocido como ataque cardíaco, es desencadenado por la oclusión de uno o más de los vasos sanguíneos (arterias coronarias) que suministran sangre al corazón, que puede resultar en la consiguiente reducción del suministro de nutrientes y oxígeno al músculo cardíaco (miocardio). Si el flujo sanguíneo no se restablece rápidamente, las células (cardiomiocitos) mueren dentro del miocardio por falta de sangre. Considerando que el corazón no puede repararse a sí mismo, después de sufrir daño, se forma tejido no funcional. En este sentido, los andamios conformados por nanofibras alineadas poseen propiedades mecánicas que son más adecuadas para el cultivo de células cardíacas, permitiendo restaurar la función mecánica, lo que podría permitir la contracción del tejido¹⁵.

Por otra parte, la lesión nerviosa es una complicación grave que requiere intervención inmediata para restaurar las funciones desde la maduración, ya que las neuronas no experimentan división celular. Por ello, el desarrollo de injertos nerviosos artificiales proporciona una alternativa a los autoinjertos convencionales para el tratamiento de defectos neurales²⁵. Algunos otros tejidos especializados, como ligamentos y tendones, requieren andamios nanofibrosos con excelentes propiedades mecánicas no solo para apoyar el tejido de cicatrización, sino también para proporcionar un punto favorable para la unión celular y la proliferación. También, a través del electrohilado se pueden fabricar estructuras nanofibrosas alineadas con alto grado de porosidad compuestas de polímeros bioactivos tipo colágeno, para la regeneración del tejido de la córnea.

En la literatura se ha descrito el variado y destacable uso de múltiples polímeros en la producción de nanofibras mediante el método de electrohilado, algunos ejemplos son; la polivinilpirrolidona (PVP) usada para generar colecciones de nanofibras alineadas para sistemas de administración de antibióticos²⁴, el ácido poli-L-láctico para la producción de nanofibras altamente alineadas para su aplicación en la regeneración nerviosa,⁸ la policaprolactona (PCL) en la generación de andamios nanofibrosos porosos para la ingeniería de tejidos óseos³³, y el alcohol polivinílico (PVA), el cual es uno de los polímeros más utilizados en ingeniería de tejidos para la generación de andamios nanofibrosos para inducir la proliferación de células endoteliales y células del músculo liso¹². El PVA se ha empleado en combinación con quitosano y colágeno

para generar andamios nanofibrosos como sustituto de piel¹³, todo esto gracias a sus características únicas como biocompatibilidad con el tejido humano y su baja absorción proteica.

5.7 ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA)

El PVA es un polímero que posee interesantes propiedades, entre ellas su alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. Su valor tecnológico destaca por su alta transmisión óptica, solubilidad en agua, termoestabilidad y su carácter no corrosivo. Su estructura posee grupos hidroxilo ramificados de su cadena central, como se muestra en la Figura 7, los cuales le confieren estado semicristalino debido a la presencia de enlaces de hidrógeno intermoleculares.



Figura 7. Estructura química del PVA.

La tensión superficial de las disoluciones acuosas de PVA varía con el peso molecular, la adición de agua reduce esta propiedad; en otras palabras, la tensión superficial de la disolución baja aún más a medida que la concentración de PVA aumenta³⁴. Existe una gran área de aplicación del PVA, destacando el sector farmacéutico y el biomédico. Los usos biomédicos del PVA incluyen partículas de embolización, lágrimas artificiales, lentes de contacto y cartílago artificial³⁴. Los nanocompuestos de PVA pueden incluir núcleos metálicos, no metálicos, entre otros³⁵.

Físicamente, el PVA es un polvo blanquecino y fino, insípido, inodoro y no tóxico. Es un polímero sintético, obtenido por primera vez en 1924 por Hermann y Haehnel por saponificación de poli(vinil éster) con una solución de hidróxido de sodio. Para la producción comercial de PVA,

la materia prima básica es el monómero acetato de vinilo. La saponificación del acetato de vinilo procede reemplazando al grupo éster de acetato de vinilo con grupos hidroxilo en un ambiente alcalino, resultando en un polímero lineal y semicristalino (Figura 8).

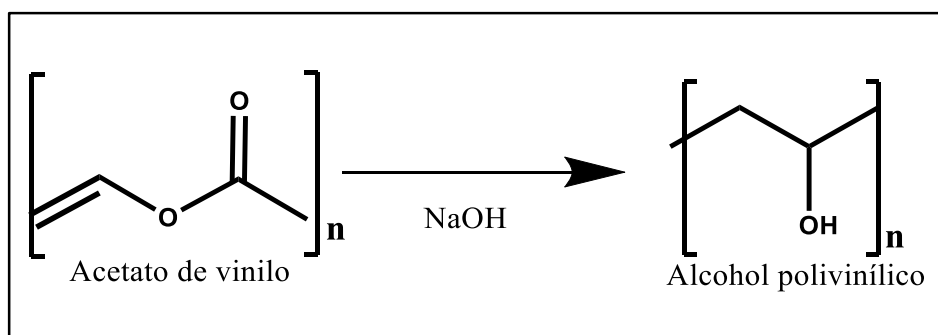


Figura 8. Reacción de polimerización para la síntesis del PVA.

El PVA desempeña un papel importante en los dispositivos biomédicos gracias a su buena solubilidad en agua, biodegradabilidad en tejido humano, biocompatibilidad, baja propiedad de absorción de proteínas, alta resistencia química y mecánica³⁵. El procesamiento de PVA a colecciones de nanofibras es posible debido a la alta constante dieléctrica que poseen sus disoluciones y su polarizabilidad, estos atributos hacen que el PVA sea altamente explorado para el desarrollo de biomateriales, optoelectrónicos, sensores, medios filtrantes, entre otros¹².

Recientes estudios han demostrado la eficacia de las nanofibras alineadas de PVA como guía de regeneración celular, por ejemplo para el posible uso en ingeniería de tejidos vasculares. Mediante el método de electrohilado coaxial empleando al PVA en combinación con gelatina se generaron nanofibras alineadas, y mediante un estudio de proliferación y migración de células de músculo liso de rata y células endoteliales de la vena umbilical humana, se observó un crecimiento celular continuo en la superficie, concluyendo que los andamios coaxiales PVA-gelatina promueven el crecimiento, migración celular y orientación del tejido¹².

En el desarrollo de biomateriales para ingeniería de tejidos, contar con un alto grado de alineación en las nanofibras del andamio no es suficiente para guiar un eficiente crecimiento

celular, es por ello que se han estudiado otras características necesarias como la inducción de porosidad en las nanofibras. Gracias a la microestructura porosa de las nanofibras, se facilitan notablemente la proliferación y migración celular, siendo así un requerimiento importante de los andamios para la ingeniería de tejidos.

5.8 POROSIDAD EN BIOMATERIALES Y TÉCNICAS PARA PRODUCIR BIOMATERIALES POROSOS

La porosidad es una medida de los espacios vacíos en un material y es una medición de la fracción del volumen de huecos sobre el volumen total. La presencia de porosidad es uno de los principales requisitos en el diseño de andamios para ingeniería de tejidos. Además de la biocompatibilidad, tanto en su forma original y degradada, los andamios deben poseer propiedades mecánicas apropiadas para proporcionar flexibilidad o rigidez adecuada según el medio celular. Además de la composición, la microestructura es un factor fundamental para el comportamiento celular, específicamente el andamio debe ser poroso y permeable para permitir la migración celular y el transporte de nutrientes.

El diseño de andamios con estructura, organización y propiedades adecuadas es indispensable para sus aplicaciones de uso final, siendo de mayor repercusión en el desarrollo de biomateriales para la regeneración de tejidos altamente especializados como tejido nervioso, gástrico y cardiovascular¹⁵. Se han estudiado diversas técnicas para generar estructuras porosas con características adecuadas para el desarrollo de tejidos especializados, incluyendo la fusión con disolventes, lixiviación de partículas, espumado de gas, liofilización, autoensamblaje, impresión 3D y electrohilado. Entre estos, el electrohilado se considera un método factible y prometedor para producir nanofibras con control sobre el tamaño y la geometría de los poros, la dimensión y orientación de las nanofibras. La gran superficie de contacto que poseen las nanofibras favorece la adhesión y el crecimiento de las células, mientras que es deseable una alta porosidad para favorecer la difusión de nutrientes y productos de desecho del implante.

Las colecciones nanofibrosas alineadas tienen una mayor densidad de empaquetamiento y un tamaño de poro reducido en comparación con las colecciones de nanofibras orientadas al

azar. El tamaño de poros y el diámetro de las nanofibras están estrechamente relacionados; diámetros de nanofibras más pequeños resulta en poros más pequeños. Por tanto, es difícil esperar porosidad en nanofibras alineadas. Sin embargo, a medida que aumenta el tamaño de los poros y la porosidad, las propiedades mecánicas disminuyen drásticamente³⁶. En otras palabras, obtener un andamio con fibras en nano o microescala, con macroporos, alto nivel de porosidad y buenas propiedades mecánicas no es un procedimiento trivial.

Para el desarrollo de biomateriales se requiere una estructura con porosidad interconectada, debido a que el aumento de la porosidad y el tamaño de poro proporcionan un entorno favorable para la infiltración celular mejorando la difusión de nutrientes y el transporte de desechos a través de los andamios. Los pequeños tamaños de poros en los andamios tradicionales impiden la infiltración celular *in vitro* y el crecimiento de tejido en el andamio *in vivo*, esto limita su potencial; aunque son útiles para algunas aplicaciones como apósitos para heridas cutáneas y regeneración del endotelio¹⁵.

Existen diferentes técnicas para generar porosidad en biomateriales, entre las que se pueden mencionar la recolección en líquido, la generación de patrones fibrosos electrohilados, el auto ensamblaje, la irradiación láser y la adición de un agente porógeno. En particular, la generación de porosidad empleando un agente porógeno, es un método directo, sencillo, accesible y de bajo costo, donde se añade un agente porógeno en la disolución o durante el electrohilado para crear grandes tamaños de poros. El porógeno puede ser una sal, un polímero, cristales de hielo o nanopartículas que pueden ser removidas por lixiviación, y que son mezclados simultáneamente con la disolución de polímero o colocado sobre el colector en el que se requiere una temperatura baja. Después o durante el electrohilado, el porógeno se elimina por disolución o evaporación, resultando en estructuras porosas. Un ejemplo de un agente porógeno es la sal de cloruro de sodio, aunque al ser retirada puede resultar en el colapso parcial de los macroporos vacíos¹⁵.

En la actualidad, la generación de estructuras nanofibrosas con alto nivel de porosidad es una característica bastante deseable, y la adición de un agente porógeno es una de las técnicas más utilizadas debido a que es una metodología sencilla, económica y compatible con el método

de electrohilado. Uno de los mayores retos presentados en esta técnica es encontrar un disolvente que cumpla con los requerimientos necesarios de un sistema en particular, además el cuidado del medio ambiente es algo completamente necesario. En este sentido, en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado con gran éxito la capacidad porogénica de los disolventes eutécticos profundos (DES) al ser empleados como el sistema “mal disolvente” en la técnica de separación de fases inducida por la evaporación del buen disolvente (SFIE). Los DES se caracterizan por ser disolventes amigables con el medio ambiente al ser biodegradables, no tóxicos, de fácil recuperación y con gran posibilidad de ser reutilizados en el proceso SFIE¹⁴.

5.9 DISOLVENTES EUTECTICOS PROFUNDOS (DES)

Los DES son mezclas de dos sustancias con alto punto de fusión capaces de asociarse, generalmente una sal de amonio cuaternaria y un agente complejante neutro³⁷. Surgen de la creciente demanda del desarrollo de métodos ecológicos y sostenibles, sustituyendo a los disolventes orgánicos como hexano, tetrahidrofurano, tolueno, acetonitrilo o metanol; disolventes convencionalmente utilizados como agentes porógenos debido a su capacidad de disolución, alto punto de ebullición y presión de vapor. Sin embargo, los disolventes orgánicos generalmente son volátiles, inflamables, explosivos y tóxicos para el ser humano y para el medio ambiente. Además de producir toxicidad aguda y crónica al experimentador, carcinogenicidad, toxicidad ecológica y no ser biodegradables.

Los DES son una subcategoría de los líquidos iónicos (LI), descritos por primera vez en 2001 por Abbott³⁸. A diferencia de la unión de iones binarios que define la estructura LI clásica, los DES se forman por la unión de una sal capaz de formar enlaces hidrógeno, con frecuencia haluros de amonio, con donador de enlaces hidrógeno (HBD por sus siglas en inglés Hydrogen Bond Donor)³⁹. Las propiedades físicas como viscosidad, conductividad y tensión superficial de los DES son similares a los LI a temperatura ambiente.

La mayoría de los DES se pueden preparar sencillamente, siendo disolventes de baja volatilidad, alta biodegradabilidad y alta tasa de reciclaje, características destacables para su uso

como inductor de porosidad en polímeros⁴⁰. Se han aplicado los DES como una alternativa ecológica a los disolventes moleculares en síntesis, particularmente reacciones catalizadas por metales y la síntesis de nanomateriales funcionales, además en electrodeposición, separación y solubilización de fármacos.

Se ha reportado el uso de urea (U) para formar DES con haluros de metales alcalinos que tienen puntos de fusión menores a 150°C. Este principio no se limita a las amidas, se puede aplicar a una amplia variedad de otros donantes de enlaces de hidrógeno, como ácidos, aminas y alcoholes³⁸. El cloruro es uno de los contra-aniones más empleados, siendo la única restricción sobre la especie aniónica el potencial de actuar como aceptor de enlaces hidrógeno³⁷.

Los DES se preparan mezclando el cloruro de colina (ChCl) como aceptor de enlaces hidrógeno (HBA) con el HBD correspondiente. El ChCl ha sido ampliamente utilizado como sal orgánica cuaternaria asociada con urea¹⁴. La mezcla requiere agitación constante y una temperatura de 80-90°C aproximadamente. El catión de amonio cuaternario ChCl, también es conocido como catión de colinio, este catión no es tóxico y tiene un costo relativamente bajo⁴⁰. La relativa rigidez conformacional de la urea, en comparación con algunos de los otros complejos orgánicos comúnmente empleados (glicoles por ejemplo), hace posible la obtención de un buen sistema ChCl:U³⁷.

El uso del DES ChCl:U como agente porógeno se ha probado exitosamente para la generación de materiales porosos basados en quitosano puro empleando la técnica SFIE, resultando en el desarrollo de una metodología sencilla, de bajo costo y amigable con el ambiente para la generación de materiales porosos con aplicaciones como andamios celulares¹⁴.

Por lo anteriormente expuesto, la presente Tesis de Licenciatura propone, además de la implementación del sistema colector *air gap* al electrohilado convencional para la generación de colecciones de nanofibras alineadas, el procesamiento de combinaciones del polímero PVA y volúmenes discretos del DES ChCl:U, con el propósito de estudiar su efecto como agente porógeno en las colecciones de nanofibras con organización alineada.

6. METODOLOGÍA

Disolución de PVA: El PVA (peso molecular 89,000 – 98,000 kDa, de Sigma–Aldrich®) se disolvió en agua destilada para obtener una disolución al 8 %p/v, la mezcla se mantuvo a 90°C en estufa durante 8 h.

Preparación del DES: Se utilizaron cloruro de colina y urea de Sigma-Aldrich® para la obtención de la mezcla de ChCl:U en proporción 2:1 p/p. Para tal fin, ambos componentes se llevaron a sequedad por separado en estufa a 90°C durante 24 h; transcurrido este lapso, se mezclaron los sólidos y se mantuvieron a 80°C durante aproximadamente 24 h, hasta obtener una disolución transparente.

Disolución de PVA/DES: con la disolución de PVA 8 %p/v y la mezcla de ChCl:U 2:1, se realizaron tres mezclas:

- 1 %p/p DES disuelto en 10 mL de disolución de PVA 8 %p/v.
- 0.75 %p/p DES disuelto en 10 mL de disolución de PVA 8 %p/v.
- 0.5 %p/p DES disuelto en 10 mL de disolución de PVA 8 %p/v.

Preparadas a temperatura ambiente y con agitación hasta su completa homogenización.

Electrohilado *air gap*: las disoluciones de base PVA se cargaron en una jeringa conectada a una manguera de teflón equipada con una aguja de electrohilado #6 (23G, diámetro interno 0.33 mm). La aguja del sistema de suministro fue conectada al electrodo positivo. Mediante una bomba de infusión se suministró un flujo de 0.2 mL/h. La producción de colecciones de nanofibras alineadas fue analizada variando los siguientes parámetros de operación: voltaje, distancia de trabajo aguja-colector y apertura del *gap* del sistema colector. Las colecciones de nanofibras se construyeron utilizando un sistema *air gap* conformado por un par de cables de cobre dispuestos en paralelo y conectados a tierra, el diseño del colector se detalla en la sección de resultados.

Tratamiento post-electrohilado, extracción del DES: a las muestras nanofibrosas se le realizaron tres lavados con metanol, con la finalidad de extraer el DES. Posteriormente se llevaron a secado a temperatura ambiente.

Determinación del grado de orientación: los datos estadísticos, histogramas de orientación, patrones FFT y mapas de color fueron obtenidos mediante el análisis de imágenes de FESEM en el software ImageJ (<https://imagej.net/software/fiji/>), a través de las herramientas *Directionality* y *OrientationJ*.

Obtención de espectro FTIR: los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Nicolet iS10 de Thermo Scientific usando la técnica ATR.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El PVA posee alta electrohilabilidad en medio acuoso, permitiendo la obtención de colecciones de nanofibras de alta calidad. Las microestructuras de PVA se caracterizan por presentar nulo o bajo contenido de defectos, poseer alta porosidad e interconectividad; siendo principalmente fabricadas mediante el método de electrohilado convencional²⁸, suelen presentar disposición aleatoria y baja distribución de diámetro promedio como se muestra en la Figura 9.

Utilizando los siguientes parámetros: una velocidad de flujo de 0.6 mL/h, un voltaje de 11 kV, 15 cm de distancia de trabajo y temperatura ambiente, condiciones previamente establecidas en el grupo de trabajo, se fabricó la colección de nanofibras de la Figura 9, la cual fue obtenida y caracterizada a manera de control aleatorio.

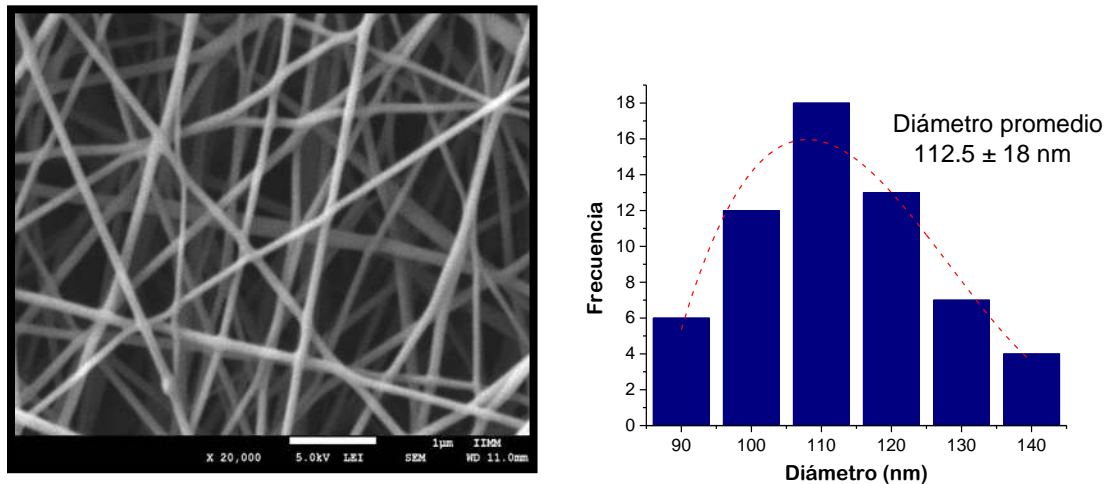


Figura 9. Colección de nanofibras de PVA obtenidas mediante electrohilado estándar e histograma de distribución de diámetro de las nanofibras²³.

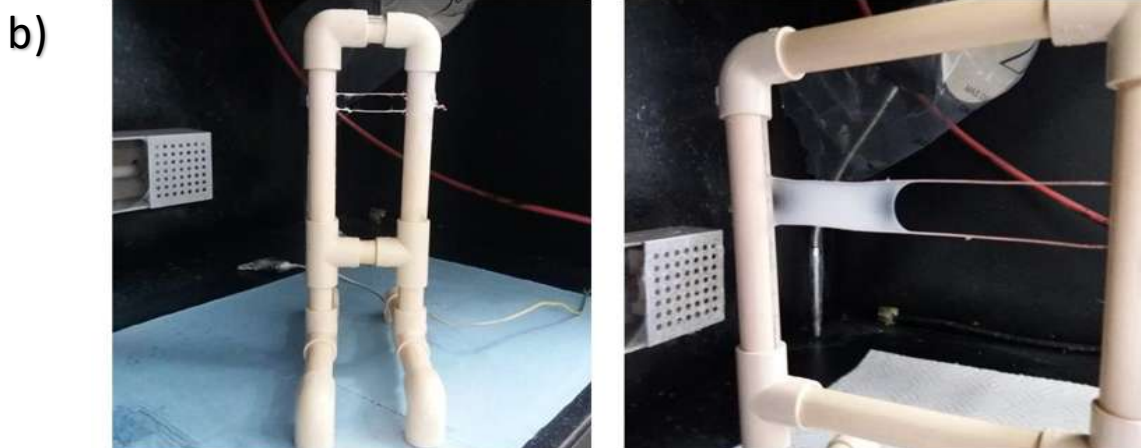
7.1 ELECTROHILADO *AIR GAP*

La implementación y adaptación del sistema *air gap* en el equipo de electrohilado convencional TL-01 (NaBond Technologies Co[®], IIQB-UMSNH) no fue un procedimiento complejo. La única variación consistió en reemplazar los colectores estándar (placa metálica y rodillo giratorio) por un nuevo aditamento como sistema colector que se muestra en la Figura 10.

El sistema colector *air gap* diseñado consta de dos electrodos de cobre de longitud ajustable y dispuestos en paralelo, soportados en una base tubular de policloruro de vinilo (PVC). Durante los experimentos de electrohilado, el sistema colector conforma el contraelectrodo que, por diferencia de carga, permite el ensamble de la colección de nanofibras.

a)





**Figura 10. a) Sistema *air gap* implementado dentro del equipo convencional de electrohilado.
b) Colector *air gap* implementado.**

Para el estudio de la implementación de esta variante de electrohilado se seleccionó el PVA como modelo de estudio. Atributos como su alta constante dieléctrica, solubilidad en agua, biocompatibilidad y biodegradabilidad, entre otras características, lo hace un material de fácil procesamiento a colecciones de nanofibras de alta calidad. Adicionalmente, se procedió a incluir la mezcla eutéctica ChCl:U como agente porógeno, en aras de estudiar su efecto sobre la morfología superficial de las nanofibras de PVA.

El proceso de electrohilado de las disoluciones de PVA y PVA+ChCl:U fue efectuado extrapolando las condiciones de electrohilado convencional y ajustando los parámetros de operación. Los parámetros de operación empleados para la obtención de las colecciones de nanofibras de PVA que se discuten en esta sección se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros utilizados para la obtención de nanofibras.

No. de muestra	ChCl:U (%v/v)	<i>gap</i> (cm)	Amplitud (cm)	Voltaje (kV)	Velocidad de flujo (mL/h)
Control <i>air gap</i>	No	2	11	13	0.4
1	1	2	11	14	0.2
2	0.5	2	11	12	0.2
3	0.75	2	11	11	0.2
4	0.5	1	11	9	0.2
5	1	1	11	11	0.2
6	0.75	1	11	11	0.2
7	0.5	1	8	10	0.2
8	1	1	8	11	0.2
9	1	1	5	9	0.2
10	0.5	1	5	11	0.2
11	0.75	1	8	10	0.2
12	0.75	1	5	8	0.2
13	0.5	3	11	9	0.2

Para los experimentos de electrohilado se prepararon disoluciones de PVA+ChCl:U a porcentaje variable (0.5, 0.75 y 1 %v/v), todas las disoluciones fueron suministradas mediante una bomba de infusión a flujo constante de 0.2 mL/h y temperatura ambiente. La aplicación de alto voltaje (entre 8-14 kV) produjo la fuerza electrostática suficiente para la elongación de las gotas poliméricas de PVA hasta formar el cono de Taylor. Posteriormente, la subdivisión de los *jets*, tras la evaporación del disolvente, facilitó la deposición de las nanofibras en el colector *air gap*. A diferencia del sistema convencional de electrohilado, los colectores del método *air gap* presentan diferencia en la distribución de densidad de carga electrostática. Este hecho, teóricamente, induce la deposición ordenada de las nanofibras hacia un electrodo y posteriormente hacia el segundo, ocasionando la organización paralela de las nanofibras promovida por las cargas residuales presentes en la microestructura.

Todas las disoluciones representadas en la Tabla 1 fueron electrohilables, sin embargo, la obtención de colecciones con alto grado de orientación y libres de defectos fue un proceso complicado. A continuación se discuten los resultados más representativos en términos de morfología, topología, uniformidad y grado de orientación.

7.2 INFLUENCIA DE LA DISTANCIA DE TRABAJO

La distancia entre los electrodos es un factor de gran relevancia en el proceso de electrohilado, ya que, durante la trayectoria del *jet* desde la punta de la aguja hasta el colector procede la evaporación del disolvente. La selección adecuada de la distancia de trabajo es un parámetro útil para la obtención de colecciones de nanofibras con diámetros uniformes. Por ello su influencia fue evaluada procesando disoluciones PVA+ChCl:U 0.5 %v/v a distancias de 5, 8 y 11 cm configurando el sistema colector *air gap* con una apertura (*gap*) de 1 cm. En la Figura 11 se pueden observar las imágenes FESEM de las microestructuras obtenidas.

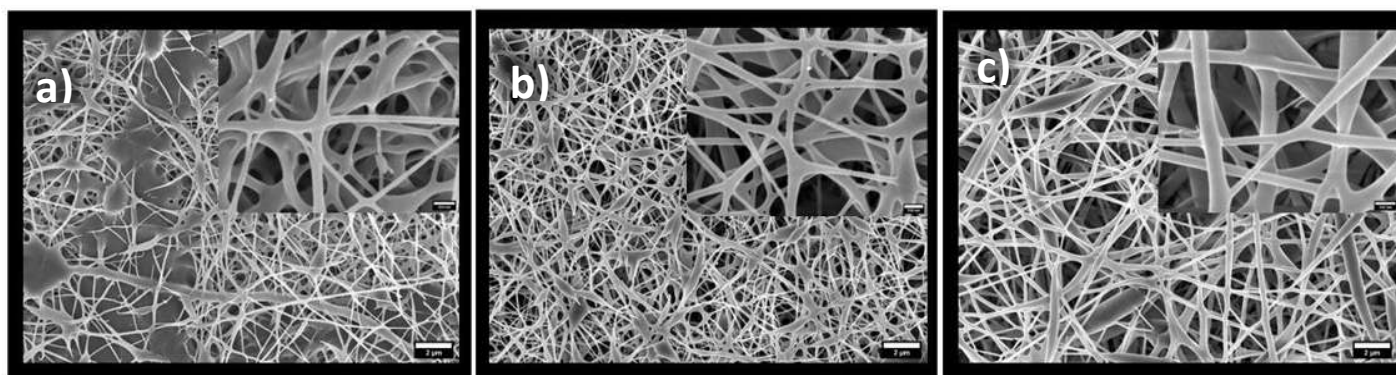


Figura 11. Imágenes FESEM de colecciones de nanofibras PVA+ChCl:U 0.5 %v/v colectadas a 1 cm de *gap* y distancia de trabajo variable: a) 5 cm, b) 8 cm y c) 11 cm.

En la Figura 11a se puede observar que empleando una distancia de trabajo de 5 cm procedió la deposición de nanofibras húmedas, hecho que queda de manifiesto con la presencia

de nanofibras fusionadas. En el caso de la muestra de la Figura 11b, obtenida a 8 cm de distancia de trabajo, se observan colecciones más definidas y con menos fusión de nanofibras, pero aun con defectos. Por otro lado, en la muestra de la Figura 11c, obtenida a una distancia de trabajo de 11 cm, se observan nanofibras más definidas, con una mayor uniformidad en el tamaño de los diámetros y destaca la menor presencia de defectos.

Así pues, las distancias de 5 y 8 cm resultan ineficaces para la obtención de nanofibras a partir de la disolución PVA+ChCl:U 0.5 %v/v, ya que promovieron la deposición de nanofibras húmedas, induciendo la fusión de nanofibras y la presencia de defectos de tamaño importante. Es decir, el aumento en la distancia de trabajo favoreció la obtención de nanofibras con diámetros más uniformes y menos defectos.

7.3 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DEL DES ChCl:U

Con el propósito de investigar la repercusión de la adición de la mezcla eutéctica en el electrohilado de PVA, se procedió a procesar disoluciones con concentración variable del DES ChCl:U, manteniendo 11 cm como la distancia de trabajo. Experimentalmente se observó que al aumentar la concentración del DES (0.5-1 %v/v), la electrohilabilidad del PVA se ve disminuida por el aumento de la viscosidad a consecuencia de su gelación. La influencia de la concentración del DES en la microestructura obtenida mediante electrohilado se confirmó mediante el análisis morfológico de las nanofibras de PVA (Figura 12).

Manteniendo 1 cm como apertura constante del *gap* entre los electrodos, se procesaron las mezclas PVA+ChCl:U 0.5 %v/v, PVA+ChCl:U 0.75 %v/v y PVA+ChCl:U 1 %v/v. En la Figura 12 se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM por sus siglas en inglés). Las concentraciones de la mezcla eutéctica ChCl:U de 0.75 y 1 %v/v (Figuras 12b y c respectivamente), presentaron un alto contenido de defectos e irregularidades a lo largo de las nanofibras; mientras que la concentración de la mezcla eutéctica

de 0.5 %v/v promovió la obtención de colecciones de nanofibras con mayor uniformidad y menor contenido de defectos (Figura 12a).

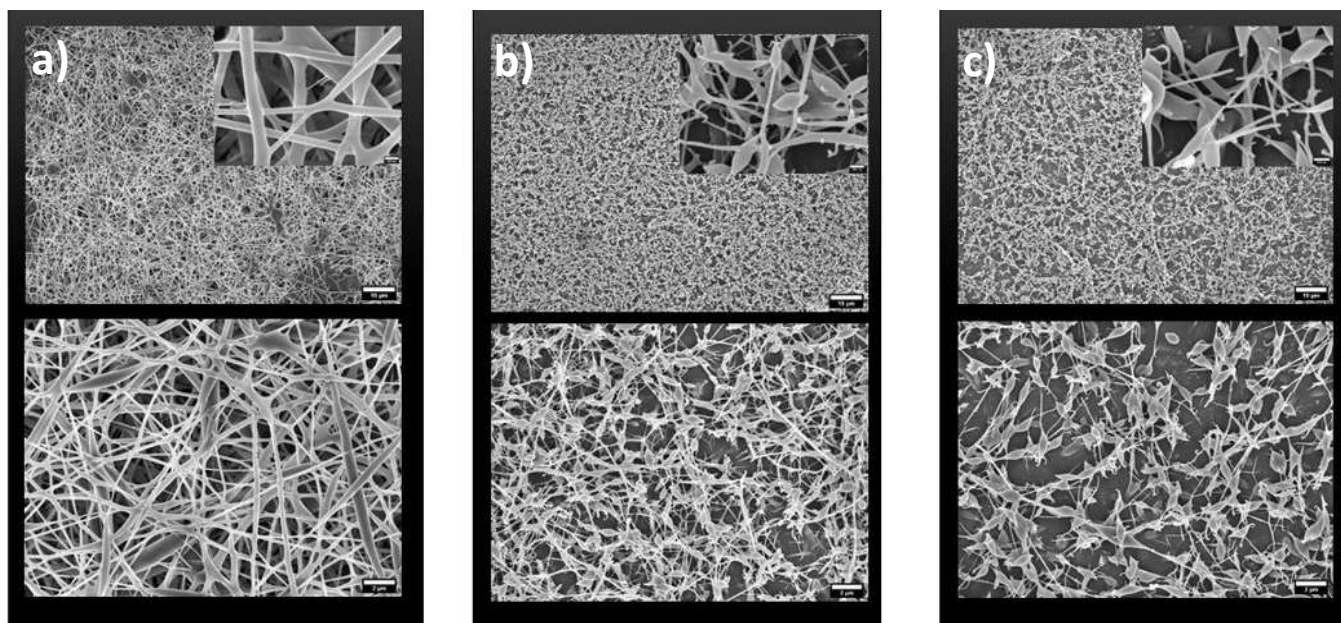


Figura 12. Imágenes FESEM de nanofibras PVA obtenidas a 1 cm de apertura de *gap* y variando la concentración de ChCl:U: a) 0.5, b) 0.75 y c) 1 %v/v.

En el caso de la muestra de la Figura 12c, obtenida a la mayor concentración 1 %v/v de ChCl:U, se observaron pocas nanofibras continuas, en su mayoría defectos y un alto contenido de nanofibras rotas. En la Figura 12b, correspondiente a PVA+ChCl:U 0.75 %v/v, se observó la presencia de nanofibras con un alto contenido de defectos. A partir de los resultados obtenidos, se pone de manifiesto que la electrohilabilidad de PVA disminuye al aumentar la concentración del DES ChCl:U, este hecho puede ser asociado al efecto de gelación que ejerce la mezcla eutéctica sobre la disolución de PVA. En otras palabras, la muestra obtenida a partir del procesamiento de PVA+ChCl:U 0.5 %v/v presentó potencial para continuar el estudio de inducción de orientación, mientras que las concentraciones mayores al 0.5 %v/v del DES ChCl:U comprometen la electrohilabilidad del PVA.

En las microestructuras de la Figura 12 se observó que el grado de orientación de las colecciones de nanofibras obtenidas a 1 cm de apertura del *gap* es reducido, siendo apenas del 30% para la Figura 12a; los grados de orientación de las muestras de las Figuras 12b y 12c no pudieron ser determinados debido a la presencia de defectos. La apertura del *gap* a 1 cm resultó restringida para favorecer la distribución irregular de la densidad electrostática necesaria para promover el ensamble ordenado de las nanofibras, y por ende no se observó gradiente de orientación predominante.

7.4 INFLUENCIA DE LA APERTURA DEL GAP

De acuerdo con la literatura, el espacio vacío entre los electrodos (*gap*), favorece la orientación axial, llegando a obtener grados de orientación de hasta el 90%, en comparación con el uso de algún colector estándar (como las placas fijas utilizada en el método convencional), donde básicamente se obtienen muestras con organización aleatoria, o el uso de tambores giratorios, donde se llega a obtener un bajo grado de orientación. El método *air gap* es una innovadora propuesta para obtener un alto grado de orientación empleando aditamentos versátiles y de bajo costo. La apertura del *gap* entre los electrodos que integran al sistema colector, desde luego, es el factor de mayor influencia sobre el grado de orientación. En la Figura 13 se muestran las imágenes de FESEM obtenidas a partir de la disolución PVA+ChCl:U 0.5 %v/v con variación de apertura de *gap* de 1, 2 y 3 cm. Las determinaciones de orientación fueron calculadas tomando como ángulo principal $87.8^\circ \pm 10^\circ$.

La muestra de la Figura 13a, obtenida a 1 cm de *gap*, presentó un grado de orientación del 29%, en su imagen de FESEM se observaron zonas con fusión de nanofibras con diámetro promedio de 182 ± 32 nm. Por otro lado, la imagen de FESEM de la Figura 13b obtenida a 2 cm de *gap*, posee una microestructura compuesta por colecciones de nanofibras libres de defectos y más delgadas; el histograma de distribución de diámetro muestra tendencia Gaussiana deseable y diámetro promedio de 174 ± 30 nm. Adicionalmente, la muestra obtenida a 2 cm de

gap posee un grado de orientación del 67%; un valor notablemente superior respecto de las otras dos muestras (Figuras 13a y c).

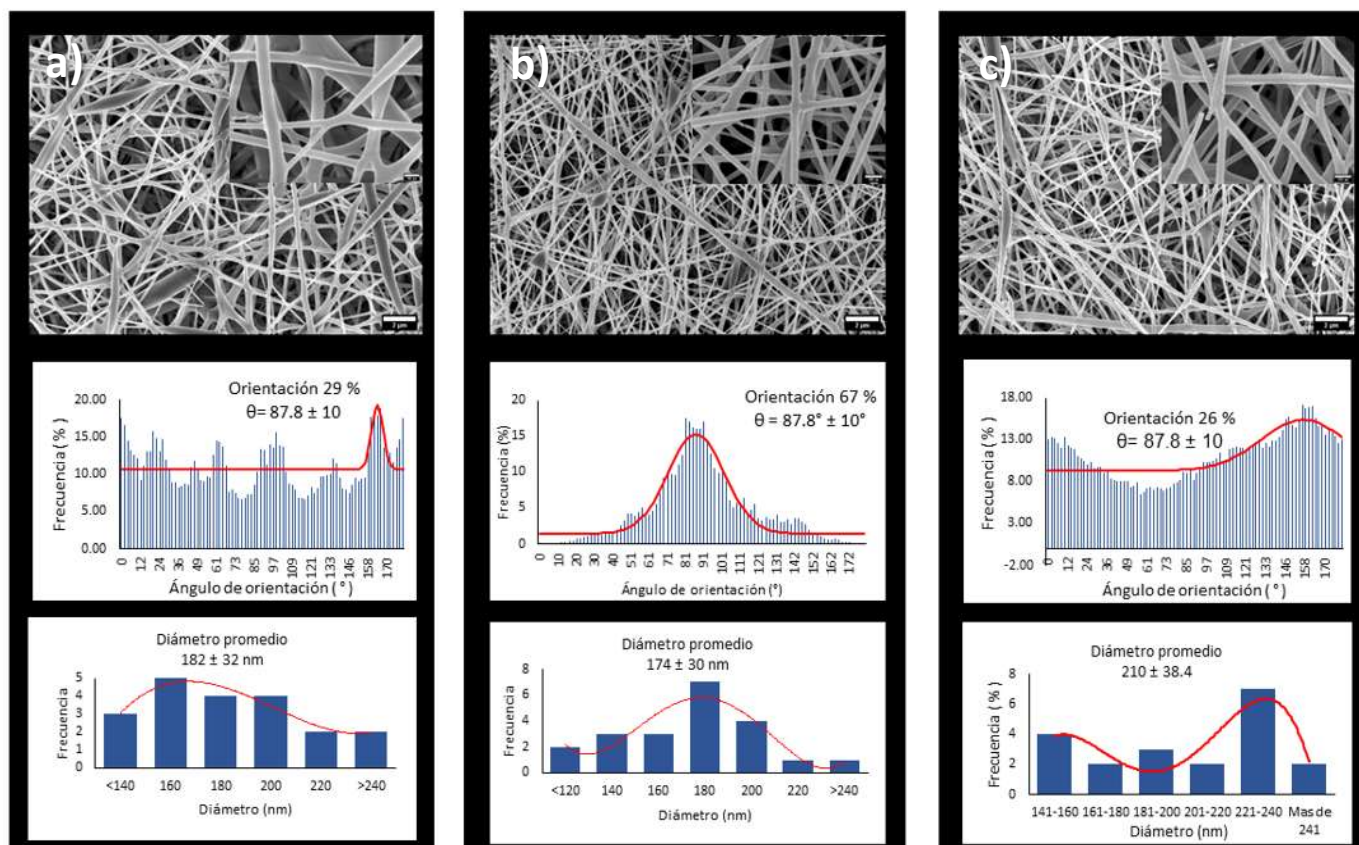


Figura 13. Imágenes de FESEM, histogramas de orientación y distribución de diámetro de colecciones de nanofibras de PVA+ChCl:U 0.5 %v/v obtenidas con aperturas de *gap* de: a) 1 cm, b) 2 cm y c) 3 cm.

En la imagen de FESEM de la Figura 13c (muestra obtenida a 3 cm de *gap*), se observaron colecciones de nanofibras libres de defectos, sin embargo, el incremento en la apertura del *gap* da lugar a la ruptura de algunas nanofibras. El histograma de orientación exhibe la baja inducción de la orientación, alcanzando solamente el 26% de orientación. El deterioro del grado orientación axial puede estar fuertemente relacionado con la ruptura de las nanofibras, como consecuencia del incremento de la apertura del *gap*. La colección de la Figura 13c presenta un diámetro

promedio de 210 ± 38 nm, mientras que el histograma demuestra una mayor distribución del tamaño de diámetro respecto a las otras muestras obtenidas.

En cuanto al tamaño de los diámetros que muestran los histogramas de la Figura 13, se observó una distribución de diámetros más amplia en la muestra de la Figura 13a, aun cuando el diámetro promedio es 182 ± 32 nm, los diámetros de las nanofibras se presentaron mayormente distribuidos. Mientras que en la Figura 13b, se observó el histograma de diámetros con tendencia Gaussiana deseable, observando una mayor tendencia de 180 y 200 nm de diámetro con un promedio de 174 ± 30 nm, siendo más uniforme esta muestra y con diámetros más delgados. Por otro lado, el histograma de la Figura 13c refleja la obtención de nanofibras gruesas y con amplia distribución de diámetro, cuyas dimensiones se agrupan en dos tendencias: a 140-160 nm y 221-240 nm.

En este orden de ideas, la muestra de la Figura 13b obtenida empleando 2 cm de *gap* resultó ser la de mayor grado de orientación, menor cantidad de defectos, con un porcentaje mayor de orientación y diámetros uniformes. Dicha apertura brinda el estiramiento adecuado de las nanofibras sin llegar a la ruptura o acumulación, permitiendo abarcar los extremos paralelos del *gap*. Con base en estos resultados puede inferirse que aperturas de *gap* de 1 cm no son suficientemente efectivas para generar la diferencia de densidad electrostática, ni el estiramiento necesario para la producción de microarquitecturas alineadas bajo las condiciones experimentales estudiadas; además de promover la obtención de diámetros mayores, generar mayor porcentaje de defectos y rupturas. Por otra parte, una apertura de *gap* de 3 cm, y distancia de trabajo de 11 cm, son condiciones que propician la ruptura de las nanofibras resultando en colecciones con bajo grado de orientación.

7.5 ANÁLISIS DEL GRADO DE ORIENTACIÓN

La determinación del grado de orientación suele basarse en el compendio de información cualitativa y cuantitativa que deriva del análisis de las microestructuras. Así, la información

generada del estudio mediante FESEM es útil para calcular los porcentajes de alineación axial a partir de herramientas digitales. Para tales determinaciones, se emplearon las herramientas *OrientationJ* y *Directionality* del software ImageJ, el cual permite también la generación de mapas de distribución de intensidad mediante la transformada de Fourier rápida, o mapas FFT por sus siglas en inglés (*Fast Fourier Transform*). Los patrones de FFT de muestras con disposición aleatoria suelen presentar distribución circular, mientras que la distribución de intensidad de las muestras alineadas comúnmente es en forma elíptica^{41, 42}. En las micrografías de la Figura 14 es notable la inducción de la orientación en las muestras obtenidas mediante electrohilado *air gap* (Figuras 14b y c). La imagen de la muestra PVA de la Figura 14a representó el control aleatorio, el cual presentó un fortuito 18% como grado de orientación respecto a $87.8^\circ \pm 10^\circ$; el patrón de FFT posee distribución de intensidad completamente en forma circular al no tener gradiente de orientación preferente.

Por otro lado, la Figura 14b de la muestra de PVA, obtenida en total ausencia del DES ChCl:U (*gap* de 2 cm y 11 cm de distancia de trabajo), arrojó una distribución de intensidad con tendencia semielíptica en el mapa FFT, congruente con el grado de orientación del 50% que presentó respecto al ángulo principal $87.8^\circ \pm 10$.

Finalmente, la muestra PVA+ChCl:U 0.5 %v/v de la Figura 14c (obtenida a 2 cm de apertura de *gap* y 11 cm distancia de trabajo), presentó en su FFT un patrón de distribución de intensidad que tiende a la forma ovalada, en concordancia con el grado de orientación del 67% que posee. Este resultado demostró la eficacia del método *air gap* en la inducción de orientación, superando el valor de orientación de la muestra fabricada mediante el método convencional en al menos 4 veces.

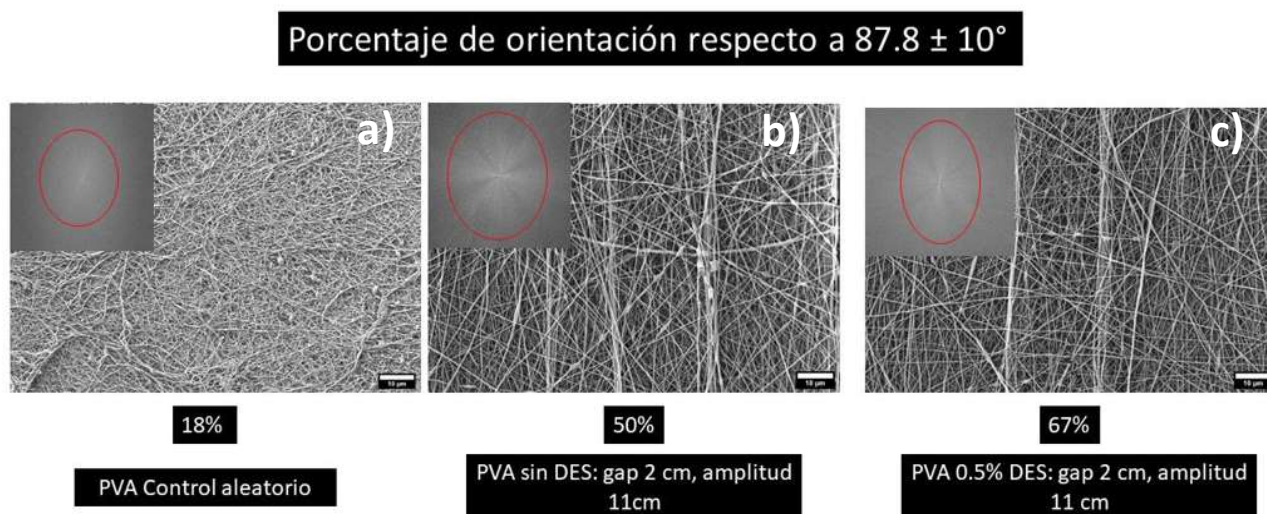


Figura 14. Imágenes de FESEM correspondientes a colecciones PVA obtenidas mediante a) electrohilado estándar y electrohilado *air gap*; b) sin DES y c) con 0.5 %v/v de DES. Las imágenes inscritas corresponden a los mapas de FFT.

Es notable que la adición de la concentración 0.5 %v/v del DES ChCl:U favoreció la obtención de colecciones nanofibras con el mayor grado de orientación del estudio, y en comparación con las colecciones de nanofibras de PVA generadas en medio acuoso (Figuras 14b y c).

Como se puede observar en los mapas de color de la Figura 15, a partir de la clasificación por colores de los gradientes de orientación, se distingue la preferencia hacia el eje Y. En el caso de la colección nanofibrosa de PVA, procesada sin DES, se observaron gradientes a 90° en color rojo, 45° en color azul y a -45° en verde. Mientras que en la colección de nanofibras de PVA+ChCl:U 0.5 %v/v es predominante el gradiente de orientación hacia los 90° , en color rojo; en concordancia el histograma presenta distribución de orientación con preferencia hacia los 90° y reflejó un grado de orientación del 75%, siendo este el mayor grado de orientación obtenido en el grupo de estudio.

El aumento en el grado de orientación de la colección de nanofibras obtenidas a partir de PVA+ChCl:U 0.5 %v/v, en comparación con la obtenida de la disolución sin DES, puede atribuirse

a la mejora de las propiedades de la disolución de PVA por efecto del DES. Es factible inferir que la adición del DES favorece la mejora del entorno dieléctrico, la viscosidad y tensión superficial, principalmente, dotando de mayor electrohilabilidad bajo la configuración *air gap* a la disolución PVA+ChCl:U 0.5 %v/v.

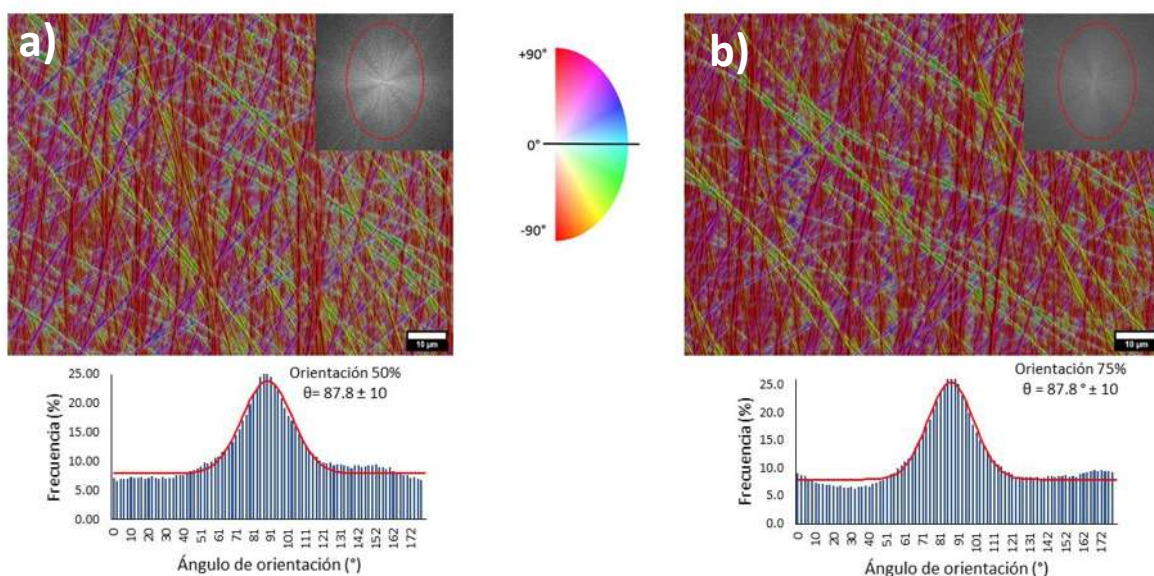


Figura 15. Mapas de colores e histogramas de las colecciones de nanofibras de a) PVA sin ChCl:U y b) PVA+ChCl:U 0.5 %v/v respectivamente.

7.6 EFECTO DEL DES EN LA MORFOLOGÍA DE LAS NANOFIBRAS

El DES ChCl:U es un disolvente con características sobresalientes, como su baja toxicidad y su carácter no corrosivo, además de ser amigable con el medio ambiente. Con el uso de este DES en el grupo de trabajo se ha logrado la obtención de materiales con mesoporosidad, demostrando la potencial habilidad y uso de la mezcla eutéctica ChCl:U como agente porógeno para la producción de materiales porosos basados en el biopolímero quitosano. En un intento

por expandir su utilidad como porógeno hacia otras entidades poliméricas, como se ha venido discutiendo, se ideó su incorporación a disoluciones acuosas de PVA.

En la literatura y en nuestro equipo de trabajo, se han obtenido estructuras con altos niveles de porosidad inducida por dicho DES en el procesamiento tanto de películas delgadas como mediante el electrohilado de quitosano^{14, 23, 43}. Sin embargo, su uso para el electrohilado de las disoluciones de PVA+ChCl:U no presentó tal efecto.

En las imágenes de las Figuras 16b, 16c y 16d se pudo observar la ausencia de mesoporosidad en la superficie de las nanofibras. No obstante, la superficie de las nanofibras presenta un aspecto rugoso que destaca en comparación con la superficie lisa de las nanofibras de PVA (Figura 16a) obtenida en ausencia del ChCl:U. Cabe destacar que se ha reportado que este tipo de modificación superficial (rugosidad) se ha logrado empleando variaciones de humedad⁴⁴ y a partir de mezclas binarias de disolvente⁴⁵. Dichas estructuras poseen alentadoras aplicaciones como sensores, catalizadores, en envasado de alimentos, tratamiento de agua, y particularmente en ingeniería de tejidos como andamio celular, en donde se distinguen por presentar mayor habilidad de adhesión.

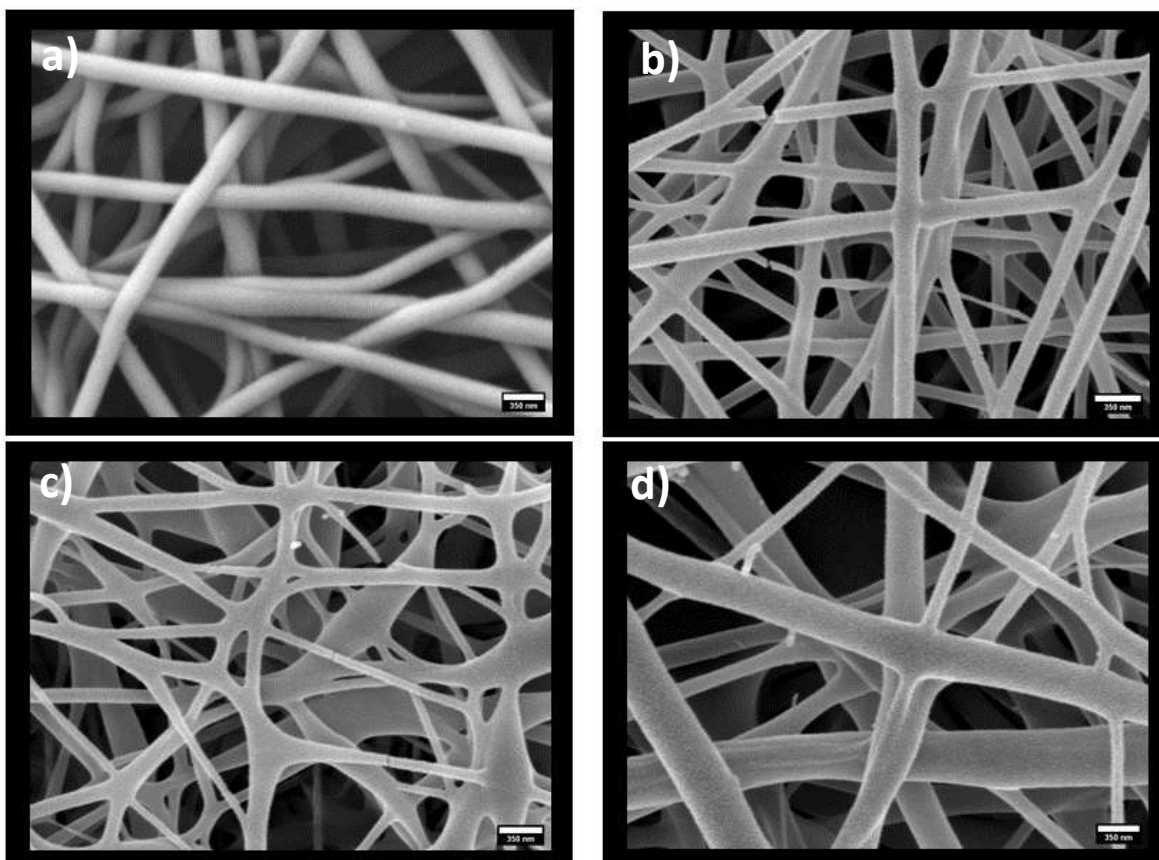


Figura 16. Imágenes FESEM de nanofibras PVA con variación de ChCl:U; a) sin DES, b) 0.5 %v/v, c) 0.75 %v/v y d) 1 %v/v de DES obtenidas a 11 cm de distancia de trabajo y apertura de *gap* 2 cm.

Aun cuando el uso del DES ChCl:U en este sistema no ha resultado favorable como agente porógeno, ha resultado una herramienta sobresaliente para inducir un aumento en el grado de orientación de las nanofibras de PVA procesadas mediante electrohilado *air gap*. Inesperadamente, el procesamiento del PVA con el DES resultó en la inducción de rugosidad como estructura secundaria en la superficie de las nanofibras. Cabe destacar que estos resultados no han sido antes reportados, por lo que es un hallazgo importante en el área de materiales.

En la literatura se ha reportado la producción de nanofibras de PVA con un 19.8 %p/v del DES ChCl:ácido cítrico (CA) (1:1) encapsulado, produciendo nanofibras lisas dispuestas

aleatoriamente con un diámetro promedio de $0.4 \mu\text{m}$ ⁴⁶. También, se han fabricado nanofibras de PVA posteriormente impregnadas con el DES ChCl:etilen glicol (EG); la presencia del DES en la membrana genera redes para la conductividad iónica con un aumento considerable de la conductividad de 22 mS/cm , sobrepasando incluso la conductividad del DES por sí mismo⁴⁷. Por su parte, el DES ChCl:manosa en una relación molar 2:1, se empleó para producir nanofibras basadas en mezclas de PVA-DES, PVA-DES-miel y PVA-DES-ácido acetilsalicílico, demostrando un gran potencial para el diseño de mecanismos de liberación de fármacos empleando un sistema de bajo costo y biodegradable⁴⁸.

A pesar de que se han empleado previamente los DES para su uso en mezcla con PVA para su electrohilado, en nuestro conocimiento, no existen reportes del procesamiento mediante electrohilado de la mezcla PVA + DES ChCl:U y menos aún reportes que refieran el favorecimiento del grado de orientación por el uso de DES ChCl:U en el electrohilado *air gap* de PVA, ni la inducción de morfología secundaria.

Por otra parte, la incorporación del DES para la obtención de nanofibras origina algunas modificaciones en el espectro de FT-IR de los materiales. En la Figura 17 se muestra el conjunto de espectros comparativos de PVA puro y las mezclas PVA + DES a concentración variable (de 0.5 a 1 %v/v). En la Figura 17a se observa el espectro característico del PVA puro, el cual presenta una señal ancha correspondiente a la vibraciones característica del grupo -OH en aproximadamente 3300 cm^{-1} , en 2927 cm^{-1} la vibración del estiramiento asimétrico del enlace C-H y simétrico en 2899 cm^{-1} , en 1070 cm^{-1} aparece la vibración de estiramiento del enlace C-O, y en 848 cm^{-1} la vibración fuera del plano del grupo -OH⁴⁹. Tomando dicho espectro como referencia, se observa que la muestra PVA + DES 0.5 %v/v es la que presenta mayor semejanza con el espectro del PVA puro.

En las muestras de PVA obtenidas de las mezclas PVA + DES (Figuras 17b, c y d), la vibración del enlace -OH se desplaza hacia números de onda mayores respecto del espectro de PVA puro, al igual que las vibraciones de los enlaces C-H entre 3000 y 2900 cm^{-1} , y la vibración correspondiente al enlace C-O alrededor de 1080 cm^{-1} . Así mismo, las perturbaciones en la vibración de -OH (3400 cm^{-1}) y la presencia de la banda en 1656 cm^{-1} pueden asociarse a

remanentes del DES que persisten aún después del proceso de remoción; siendo congruentes con vibraciones de estiramiento del enlace N-H y C=O de los componentes $\text{ChCl:U}^{50, 51}$. Esto es congruente al observarse señales más evidentes conforme incrementa la concentración del DES en la mezcla con PVA. No obstante, es destacable la preservación de las bandas de vibración en 1420 y 1330 cm^{-1} , asociadas a la región cristalina del PVA⁵², que permiten descartar cambios en la estructura química del polímero PVA por efecto del procesamiento. En la literatura se ha descrito que el DES empleado, además de ejercer un efecto plastificante, es una alternativa versátil y biocompatible en el desarrollo biomateriales; ya que su presencia en películas de quitosano no tiene efectos tóxicos, por lo cual estos materiales son propuestos para el desarrollo de materiales biomédicos¹⁴.

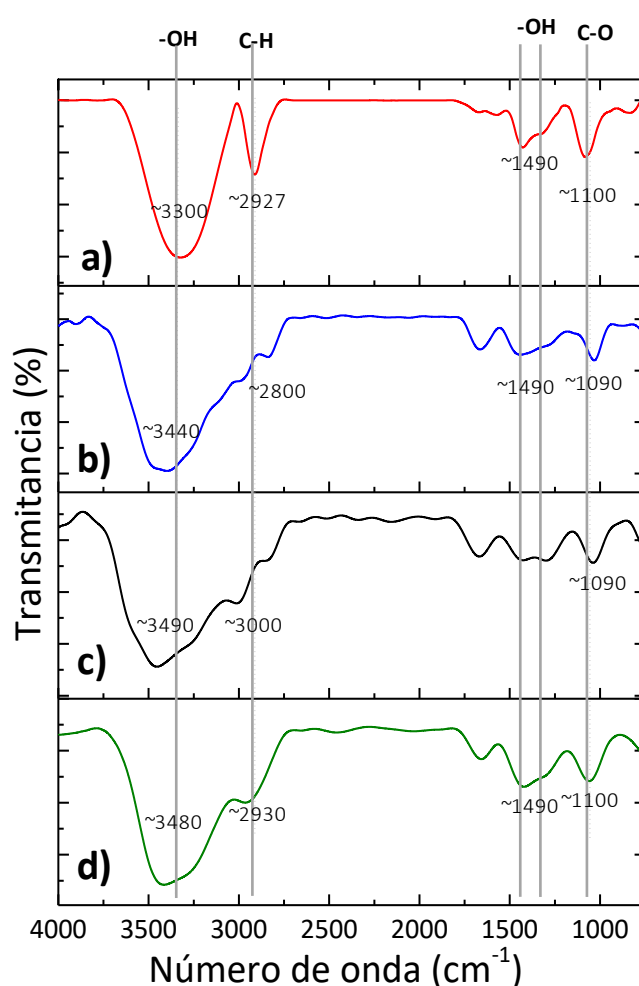


Figura 17.Espectro de nanofibras a) PVA puro, b) PVA + DES 1 %v/v, c) PVA + DES 0.75 %v/v v d) PVA + DES 0.5 %v/v.

8. CONCLUSIONES

- Se diseñó un sistema colector para efectuar el electrohilado *air gap* y se implementó exitosamente en la unidad de electrohilado del Laboratorio de Polímeros y Materiales del IIQB de la UMSNH para la fabricación de nanofibras alineadas.
- Se establecieron condiciones para producir colecciones de nanofibras de PVA con grado de orientación del 75% mediante el método *air gap*, siendo los parámetros más adecuados los siguientes: *gap* 2cm, concentración del DES ChCl:U 0.5 %v/v, distancia de trabajo 11 cm y velocidad de flujo 0.2 mL/h, produciendo nanofibras de PVA de alta calidad con un diámetro promedio de 180 ± 44 nm.
- La adición de concentraciones superiores al 1 %v/v del DES ChCl:U (1:2) induce la gelación de PVA en medio acuoso.
- Se estudió la influencia del DES ChCl:U (1:2) en la fabricación de microarquitecturas de PVA. Aunque el DES no ejerce el papel de agente porógeno en la disolución de PVA, se logró obtener nanofibras con superficie rugosa. Dichas estructuras son de especial interés en el desarrollo de andamios celulares, cuya singular topología es relevante para el aumento de adhesión celular.
- Mediante el análisis de espectroscopia de FT-IR se observó la influencia del DES en la estructura de PVA, ultimando que a menor porcentaje de DES mayor semejanza con el espectro de PVA puro. La preservación de las bandas características de PVA en las muestras obtenidas del procesamiento de PVA + DES es destacable, hecho que permite descartar cambios en la estructura química del polímero PVA en las muestras electrohiladas con el DES.

- El uso del DES ChCl:U 0.5 %v/v en el electrohilado *air gap* de PVA, favoreció el grado de orientación de las nanofibras respecto del sistema de PVA puro. Este es un hallazgo de gran importancia en el área, el cuál no ha sido previamente reportado en la literatura.
- Los materiales obtenidos fueron analizados mediante FESEM y, con base en estas imágenes se realizaron las determinaciones de diámetro, ángulo y grado de orientación, y patrones de distribución de intensidad FFT mediante herramientas digitales asequibles.

9. PERSPECTIVAS

- Estudiar el procesamiento de diferentes polímeros mediante el método *air gap*, así como el uso de mayor apertura de *gap* para la obtención de colecciones de nanofibras de mayor dimensión.
- Caracterizar mecánicamente las colecciones alineadas y mediante pruebas de degradación en medios específicos, además de pruebas de hinchamiento, entre otras.
- Corroborar la eficacia de las colecciones de nanofibras alineadas como andamios celulares en comparación con microestructuras aleatorias.
- Realizar la caracterización fina mediante FESEM, con mayor resolución, de las colecciones de nanofibras para la evaluación puntual de la rugosidad superficial de la microestructura y su influencia en el crecimiento celular.
- Estudiar la eficacia de las microestructuras alineadas en áreas relacionadas con la liberación de fármacos.

10. REFERENCIAS

1. Park, S. H.; Yang, D.-Y., Fabrication of aligned electrospun nanofibers by inclined gap method. *Journal of Applied Polymer Science* **2011**, *120* (3), 1800-1807.
2. Mi, H.-Y.; Salick, M. R.; Jing, X.; Crone, W. C.; Peng, X.-F.; Turng, L.-S., Electrospinning of unidirectionally and orthogonally aligned thermoplastic polyurethane nanofibers: Fiber orientation and cell migration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2015**, *103* (2), 593-603.
3. Yuan, H.; Zhou, Q.; Zhang, Y., Improving fiber alignment during electrospinning. In *Electrospun Nanofibers*, Afshari, M., Ed. Woodhead Publishing: 2017; pp 125-147.
4. Lei, T.; Xu, Z.; Cai, X.; Xu, L.; Sun, D. J. L., New insight into gap electrospinning: toward meter-long aligned nanofibers. *Langmuir* **2018**, *34* (45), 13788-13793.
5. Hernández, E.; Cruz, R.; Robledo, F.; Santoyo, L., Caracterización del alcohol polivinílico usado en recubrimientos de base acuosa. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **2007**, *38* (2), 15-25.
6. Chew, S. Y.; Mi, R.; Hoke, A.; Leong, K. W. J. B., The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation. **2008**, *29* (6), 653-661.
7. Chen, X.; Fu, X.; Shi, J.-g.; Wang, H., Regulation of the osteogenesis of pre-osteoblasts by spatial arrangement of electrospun nanofibers in two- and three-dimensional environments. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2013**, *9* (8), 1283-1292.
8. Wang, H. B.; Mullins, M. E.; Cregg, J. M.; Hurtado, A.; Oudega, M.; Trombley, M. T.; Gilbert, R. J. J. o. n. e., Creation of highly aligned electrospun poly-L-lactic acid fibers for nerve regeneration applications. **2008**, *6* (1), 016001.
9. Baker, B. M.; Gee, A. O.; Metter, R. B.; Nathan, A. S.; Marklein, R. A.; Burdick, J. A.; Mauck, R. L. J. B., The potential to improve cell infiltration in composite fiber-aligned electrospun scaffolds by the selective removal of sacrificial fibers. **2008**, *29* (15), 2348-2358.
10. Courtney, T.; Sacks, M. S.; Stankus, J.; Guan, J.; Wagner, W. R., Design and analysis of tissue engineering scaffolds that mimic soft tissue mechanical anisotropy. *Biomaterials* **2006**, *27* (19), 3631-3638.
11. Perilla, J. E., Tendencias en la síntesis de alcohol polivinílico de alto peso molecular. *Revista Ingeniería e Investigación* **1998**, (41), 29-32.
12. Merkle, V. M.; Tran, P. L.; Hutchinson, M.; Ammann, K. R.; DeCook, K.; Wu, X.; Slepian, M. J., Core-shell PVA/gelatin electrospun nanofibers promote human umbilical vein endothelial cell and smooth muscle cell proliferation and migration. *Acta Biomaterialia* **2015**, *27*, 77-87.
13. Lin, H.-Y.; Kuo, Y.-J.; Chang, S.-H.; Ni, T.-s., Characterization of electrospun nanofiber matrices made of collagen blends as potential skin substitutes. *Biomedical Materials* **2013**, *8* (2), 025009.
14. Delgado-Rangel, L. H.; Huerta-Saquero, A.; Eufrazio-García, N.; Meza-Villezas, A.; Mota-Morales, J. D.; González-Campos, J. B., Deep eutectic solvent-assisted phase separation in chitosan solutions for the production of 3D monoliths and films with tailored porosities. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *164*, 4084-4094.
15. Sun, B.; Jiang, X.-J.; Zhang, S.; Zhang, J.-C.; Li, Y.-F.; You, Q.-Z.; Long, Y.-Z. J. J. o. M. C. B., Electrospun anisotropic architectures and porous structures for tissue engineering. **2015**, *3* (27), 5389-5410.
16. Perna, F. M.; Vitale, P.; Capriati, V., Deep eutectic solvents and their applications as green solvents. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2020**, *21*, 27-33.
17. Mendoza Uribe, G.; Rodríguez-López, J. L. J. P. I., La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. **2007**, *14* (29), 161-186.
18. Poole, C. P.; Owens, F. J., *Introducción a la nanotecnología*. Reverté: 2007.

19. Nakata, K.; Fujii, K.; Ohkoshi, Y.; Gotoh, Y.; Nagura, M.; Numata, M.; Kamiyama, M. J. M. R. C., Poly (ethylene terephthalate) Nanofibers Made by Sea-Island-Type Conjugated Melt Spinning and Laser-Heated Flow Drawing. **2007**, *28* (6), 792-795.
20. Huang, Z.-M.; Zhang, Y.-Z.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. J. C. s.; technology, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **2003**, *63* (15), 2223-2253.
21. Tucker, N.; Stanger, J. J.; Staiger, M. P.; Razzaq, H.; Hofman, K. J. J. o. e. f.; fabrics, The history of the science and technology of electrospinning from 1600 to 1995. **2012**, *7* (2_suppl), 155892501200702S10.
22. Li, D.; Wang, Y.; Xia, Y. J. N. I., Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays. **2003**, *3* (8), 1167-1171.
23. Pérez-Nava, A., "Funcionalización *in situ* y Post-síntesis de Nanofibras Electrohiladas para la producción de Materiales Avanzados". *Tesis de doctorado. IIQB. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo* **2021**.
24. Wang, L.; Chang, M.-W.; Ahmad, Z.; Zheng, H.; Li, J.-S. J. C. E. J., Mass and controlled fabrication of aligned PVP fibers for matrix type antibiotic drug delivery systems. **2017**, *307*, 661-669.
25. Xie, J.; Liu, W.; MacEwan, M. R.; Bridgman, P. C.; Xia, Y. J. A. n., Neurite outgrowth on electrospun nanofibers with uniaxial alignment: the effects of fiber density, surface coating, and supporting substrate. **2014**, *8* (2), 1878-1885.
26. Hurtado, A.; Cregg, J. M.; Wang, H. B.; Wendell, D. F.; Oudega, M.; Gilbert, R. J.; McDonald, J. W., Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly-l-lactic acid microfibers. *Biomaterials* **2011**, *32* (26), 6068-6079.
27. Young, R. E.; Graf, J.; Miserocchi, I.; Van Horn, R. M.; Gordon, M. B.; Anderson, C. R.; Sefcik, L. S. J. P. O., Optimizing the alignment of thermoresponsive poly (N-isopropyl acrylamide) electrospun nanofibers for tissue engineering applications: A factorial design of experiments approach. **2019**, *14* (7), e0219254.
28. Pérez-Nava, A.; Mota-Morales, J. D.; García-Carvajal, Z. Y.; Herrera-Rodríguez, S. E.; Arrevillaga-Boni, G.; Azanza-Ricardo, C. L.; Vazquez-Lepe, M. O.; Gonzalez-Campos, J. B. J. F.; Polymers, Eco-friendly production of metallic nanoparticles in polymeric solutions and their processing into biocompatible composites. **2018**, *19* (1), 156-169.
29. Robinson, A. J.; Pérez-Nava, A.; Ali, S. C.; González-Campos, J. B.; Holloway, J. L.; Cosgriff-Hernandez, E. M. J. M., Comparative analysis of fiber alignment methods in electrospinning. **2021**, *4* (3), 821-844.
30. Beachley, V.; Wen, X. J. M. S.; C, E., Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. **2009**, *29* (3), 663-668.
31. Jha, B. S.; Colello, R. J.; Bowman, J. R.; Sell, S. A.; Lee, K. D.; Bigbee, J. W.; Bowlin, G. L.; Chow, W. N.; Mathern, B. E.; Simpson, D. G. J. A. b., Two pole air gap electrospinning: fabrication of highly aligned, three-dimensional scaffolds for nerve reconstruction. **2011**, *7* (1), 203-215.
32. Sell, S. A.; McClure, M. J.; Ayres, C. E.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L., Preliminary Investigation of Airgap Electrospun Silk-Fibroin-Based Structures for Ligament Analogue Engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2011**, *22* (10), 1253-1273.
33. Nguyen, T.-H.; Bao, T. Q.; Park, I.; Lee, B.-T. J. J. o. B. A., A novel fibrous scaffold composed of electrospun porous poly (ϵ -caprolactone) fibers for bone tissue engineering. **2013**, *28* (4), 514-528.
34. Tao, J. J. W. P. I., USA, Effects of Molecular weight and Solution Concentration on Electrospinning of PVA. **2003**.
35. Aslam, M.; Kalyar, M. A.; Raza, Z. A., Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites. *Polymer Engineering & Science* **2018**, *58* (12), 2119-2132.
36. Park, J.-Y.; Lee, I.-H., Controlled release of ketoprofen from electrospun porous polylactic acid (PLA) nanofibers. *Journal of Polymer Research* **2011**, *18* (6), 1287-1291.

37. Ashworth, C. R.; Matthews, R. P.; Welton, T.; Hunt, P. A. J. P. C. C. P., Doubly ionic hydrogen bond interactions within the choline chloride–urea deep eutectic solvent. **2016**, *18* (27), 18145-18160.
38. Abbott, A. P.; Boothby, D.; Capper, G.; Davies, D. L.; Rasheed, R. K. J. J. o. t. A. C. S., Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. **2004**, *126* (29), 9142-9147.
39. Hammond, O. S.; Bowron, D. T.; Edler, K. J. J. G. C., Liquid structure of the choline chloride-urea deep eutectic solvent (reline) from neutron diffraction and atomistic modelling. **2016**, *18* (9), 2736-2744.
40. Polimerik, M. J. M. J. o. A. S., Utilization of deep eutectic solvent (DES) as porogen in the fabrication of polymeric monolithic capillary column. **2019**, *23* (4), 667-676.
41. Ayres, C. E.; Jha, B. S.; Meredith, H.; Bowman, J. R.; Bowlin, G. L.; Henderson, S. C.; Simpson, D. G. J. J. o. B. S., Polymer Edition, Measuring fiber alignment in electrospun scaffolds: a user's guide to the 2D fast Fourier transform approach. **2008**, *19* (5), 603-621.
42. Clemons, T.; Bradshaw, M.; Toshniwal, P.; Chaudhari, N.; Stevenson, A.; Lynch, J.; Fear, M.; Wood, F.; Iyer, K. S. J. R. a., Coherency image analysis to quantify collagen architecture: Implications in scar assessment. **2018**, *8* (18), 9661-9669.
43. Ponce Hernandez, R. L., "Síntesis de películas porosas a base de qbiopolímeros empleando disolventes eutécticos profundos (DES)". *Facultad de QFB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*. **2021**.
44. Zaarour, B.; Zhu, L.; Huang, C.; Jin, X. J. N. r. l., Controlling the secondary surface morphology of electrospun PVDF nanofibers by regulating the solvent and relative humidity. **2018**, *13* (1), 1-11.
45. Zaarour, B.; Zhu, L.; Jin, X. J. C., A review on the secondary surface morphology of electrospun nanofibers: formation mechanisms, characterizations, and applications. **2020**, *5* (4), 1335-1348.
46. Mano, F.; Aroso, I. M.; Barreiros, S.; Borges, J. P.; Reis, R. L.; Duarte, A. R. C.; Paiva, A., Production of Poly(vinyl alcohol) (PVA) Fibers with Encapsulated Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) Using Electrospinning. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2015**, *3* (10), 2504-2509.
47. Rahman, S. M.; Mohd Said, S. B.; Subramanian, B.; Long, B. D.; Kareem, M. A.; Soin, N., Synthesis and Characterization of Polymer Electrolyte Using Deep Eutectic Solvents and Electrospun Poly(vinyl alcohol) Membrane. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2016**, *55* (30), 8341-8348.
48. Qingmiao Zhang, Z. L., Wenkun Zhang, Ting Huang, Jingjing jiang, Yu Ren, Ruiqi Zhang, Wen Li, Xiaoli Zhang y Qin tu, Fabrication of green poly(vinyl alcohol) nanofibers using natural deepeutectic solvent for fast-dissolving drug delivery. *RSC Advances* **2021**, (2,2021).
49. Alhosseini, S. N.; Moztafzadeh, F.; Mozafari, M.; Asgari, S.; Dodel, M.; Samadikuchaksaraei, A.; Kargozar, S.; Jalali, N. J. I. j. o. n., Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. **2012**, *7*, 25.
50. Madhurambal, G.; Mariappan, M.; Mojumdar, S. J. J. o. t. a.; calorimetry, Thermal, UV and FTIR spectral studies of urea–thiourea zinc chloride single crystal. **2010**, *100* (3), 763-768.
51. Zhang, H.; Lang, J.; Lan, P.; Yang, H.; Lu, J.; Wang, Z. J. M., Study on the dissolution mechanism of cellulose by ChCl-based deep eutectic solvents. **2020**, *13* (2), 278.
52. Asran, A. S.; Razghandi, K.; Aggarwal, N.; Michler, G. H.; Groth, T. J. B., Nanofibers from blends of polyvinyl alcohol and polyhydroxy butyrate as potential scaffold material for tissue engineering of skin. **2010**, *11* (12), 3413-3421.