



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

TESIS

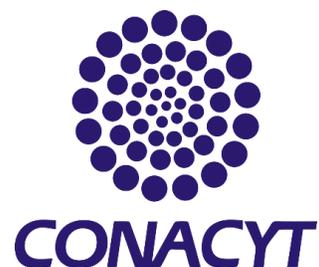
“Funcionalización *in situ* y Post-síntesis de Nanofibras Electrohiladas para la Producción de Materiales Avanzados”

Que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Químicas presenta:
M. C. Q. Alejandra Pérez Nava

Directora:
D. C. Janett Betzabe González Campos

Co-Director:
D. C. Josué David Mota Morales

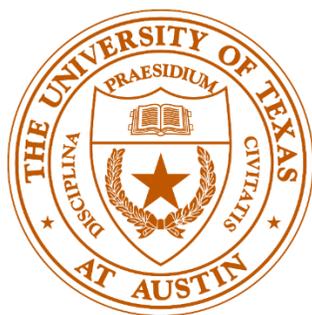
Morelia, Michoacán; Marzo de 2021



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Laboratorio de Polímeros y Materiales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH en colaboración con el Laboratorio de Polímeros del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada perteneciente a la UNAM. Este trabajo ha sido financiado por el CONACyT a través de los proyectos SS, IMSS, ISSSTE-CONACyT 2016-2018 No. 261425, SEP-CONACyT Ciencia Básica 2016-2019 No. 252774, CONACyT Ciencia Básica 2017-2018 A1-S-21845, la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH y a través de la beca de Doctorado CONACyT No. 305145.



Esta investigación ha sido realizada con la valiosa contribución del Laboratorio de Electroquímica del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable de la UAEMéx-UNAM y del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto de Neurobiología de la UNAM.



El enriquecimiento de este trabajo fue posible mediante una beca de movilidad al extranjero otorgada por el CONACyT en la convocatoria 291276 para la realización de una estancia de investigación en el Departamento de Ingeniería Biomédica de la Escuela de Ingeniería Cockrell, perteneciente a la Universidad de Texas en Austin, bajo la tutoría de la Dra. Elizabeth Cosgriff-Hernandez.

Los resultados generados durante la realización de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes Congresos:

- 2016** II Congreso Internacional y IV Congreso Nacional de Químico Farmacobiología. Morelia, Michoacán, México.
- 2017** XIII Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica. Villahermosa, Tabasco, México.
- 2017** XXXVIII Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero, México.
- 2017** 13^a Reunión de Internacional de Investigación en Productos Naturales. Morelia, Michoacán, México.
- 2017** 12^o Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación. Morelia, Michoacán, México.
- 2018** XXXIX Encuentro Nacional de la Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. San José del Cabo, Baja California Sur, México.
- 2018** 2^o Foro del Posgrado en Ciencias Químicas. Morelia, Michoacán, México.
- 2018** AIChE Annual Meeting. Pittsburgh, Pensilvania, EUA.
- 2018** 13^o Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación. Morelia, Michoacán, México.
- 2019** XV Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica. Cuernavaca, Morelos, México.
- 2019** XL Encuentro Nacional de la Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. Huatulco, Oaxaca, México.
- 2019** 3^{er} Foro del Posgrado en Ciencias Químicas. Morelia, Michoacán, México.
- 2020** XLI Encuentro Nacional de la Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero, México.
- 2020** IX Congreso Nacional de la Sociedad de Ciencia y Tecnología de Membranas, A.C. Santiago Querétaro, Querétaro, México.
- 2020** 15^o Congreso Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación. Morelia, Michoacán, México.
- 2020** XXXIII Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México.

Agradecimientos

Agradezco a la D. C. Betzabe González Campos por su acertada dirección y por la confianza que siempre ha depositado en mí para la realización de los proyectos. Gracias por el interés en mi crecimiento académico y por permitirme aprender tanto a su lado. No tengo palabras para expresar cuán trascendental ha sido usted en mi formación académica y en mi vida personal. ¡Es usted la mejor asesora del mundo!

A mi co-director de tesis, D. C. Josué D. Mota Morales, le agradezco su tutoría y los recursos aportados para la realización de este proyecto.

A mis sinodales, el D. C. Manuel Arroyo Albiter, la D. C. Yliana López Castro y el D. C. Luis Chacón García por su valiosa contribución en el desarrollo de este trabajo de investigación; al D. C. Chacón García además le agradezco las facilidades otorgadas en el laboratorio de Diseño Molecular para la realización de experimentos cruciales de este proyecto. A los técnicos del IIQB-UMSNH, del IIMM-UMSNH, del CFATA-UNAM por cuyo trabajo ha sido posible la discusión de esta Tesis.

Al D. C. Bernardo A. Frontana Uribe por las concesiones otorgadas en el Laboratorio de Electroquímica del CCIQS UNAM-UAEMéx. Al grupo de investigación del D. C. Ataúlfo Martínez Torres del INB de la UNAM por los experimentos realizados en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular.

A la PhD. Elizabeth Cosgriff-Hernandez por su contribución en mi desarrollo profesional, por su dedicación en mi aprendizaje y los consejos dados. Le agradezco muy especialmente por brindarme un lugar en su laboratorio y darme la oportunidad de aprender de su experiencia en torno a los biomateriales. Al grupo de trabajo Cosgriff-Hernández: Prachi, Dana, Megan, Gabriel y Andrew, quienes estuvieron siempre disponibles para resolver mis dudas. Gracias por incorporarme a las actividades dentro de la UT, por ayudarme a mejorar mi comunicación en su idioma siempre e integrarme a su gran familia. Hook'em!

A mis compañeros del Laboratorio de Polímeros y Materiales, Luis y Estefanía: espero que tengan siempre buenos recuerdos del tiempo que compartimos en el laboratorio, en los seminarios y congresos. A mis colaboradores de la Facultad de QFB-UMSNH: Noemí, Noé, Yatziri y Santiago, quienes participaron activamente en esta investigación. Gracias chicos por su dedicación y por hacer posible la conclusión de muchos experimentos. Espero haber contribuido en su crecimiento y aprendizaje así como ustedes han contribuido en el mío.

A mi compañero de vida, Mario. Gracias por acompañarme en esta importante etapa, por no dejarme perder el rumbo e impulsarme cuando sentí desistir. Gracias por aportar tus conocimientos y tu punto de vista en mi trabajo.

Dedicatoria

*A mi familia. Soy muy afortunada de tener personas tan maravillosas en mi vida.
Gracias por creer en mí.*

ÍNDICE

	pág
Índice de figuras.....	II
Índice de tablas.....	IV
Abreviaturas, simbología y fórmulas.....	V
Resumen.....	VI
Abstract.....	VIII
Capítulo I. Introducción.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Justificación.....	5
1.2. Objetivo general.....	7
1.2.1. Objetivos específicos.....	7
1.2.2. Metodología general.....	7
Capítulo II. Marco teórico.....	8
2. Generalidades de las nanofibras.....	9
2.1. Electrohilado.....	11
2.1.1. Factores que influyen en el proceso de electrohilado.....	15
2.1.1.1. Parámetros de la disolución.....	16
2.1.1.2. Parámetros de la configuración del equipo.....	18
2.1.1.3. Parámetros ambientales.....	21
2.1.2. Aplicaciones de las nanofibras.....	22
2.1.3. Optimización de las aplicaciones de los materiales basados en nanofibras....	24
Capítulo III. Funcionalización post-electrohilado mediante inmovilización no covalente.....	28
3.1. Material ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO ₄ ⁻	29
3.1.1. Antecedentes.....	29
3.1.2. Hipótesis.....	32
3.1.3. Metodología.....	32
3.1.4. Resultados.....	33
3.1.5. Conclusiones del capítulo.....	42
Capítulo IV. Funcionalización post-electrohilado mediante inmovilización covalente.....	43
4.1. Materiales bioconjugados con colágeno tipo I.....	44
4.1.1. Antecedentes.....	44
4.1.2. Hipótesis.....	50
4.1.3. Metodología.....	51
4.1.4. Resultados.....	52
4.1.4.1. Biomateriales NF-CTS/COL.....	52
4.1.4.2. Biomateriales NF-PVA/COL.....	73
4.1.5. Conclusiones del capítulo.....	84
Capítulo V. Sección experimental.....	85
Publicaciones.....	97
Referencias.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

		pág
Figura 1.	Producción de nanofibras mediante electrohilado.....	11
Figura 2.	Número de publicaciones indexadas entre el año 2000 y 2020 referentes a la producción de nanofibras de acuerdo a los buscadores SciFinder y Google Académico.....	12
Figura 3.	Breve cronología de la historia del electrohilado.....	13
Figura 4.	a) Esquematización de la trayectoria de los jets poliméricos durante el proceso de electrohilado y b) representación de las perturbaciones asociadas a la inestabilidad del jet polimérico.....	14
Figura 5.	Imágenes de FE-SEM de colecciones de nanofibras obtenidas mediante electrohilado con distinta disposición: a) aleatorias, b) alineadas, c) reticuladas, y d) patrones curvos; y con variaciones estructurales: e) sólidas, f) porosas, g) coaxiales y h) huecas.....	15
Figura 6.	Principales sistemas de suministro para electrohilado.....	19
Figura 7.	Principales colectores empleados para electrohilado.....	21
Figura 8.	Estrategias de obtención de materiales avanzados durante el electrohilado: a) procesamiento de disoluciones compuestas y b) control de la organización de la microestructura; c) modificaciones post-electrohilado.....	25
Figura 9.	Configuraciones de electrohilado que facilitan el control de la microestructura.....	26
Figura 10.	Estructuras químicas del monómero EDOT y del polímero PEDOT:ClO ₄ ⁻	29
Figura 11.	Estructura química del alcohol polivinílico (PVA)	31
Figura 12.	Esquema del material compuesto ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO ₄ ⁻	32
Figura 13.	Metodología para la obtención de los materiales compuestos ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO ₄ ⁻ ...	32
Figura 14.	a) Electrodo vidrio-ITO recubiertos con NF-PVA; imágenes de FE-SEM de b) NF-PVA colectadas sobre sustrato de ITO (5 h) y c) NF-PVA control.....	33
Figura 15.	a) Imágenes de FE-SEM del electrodo de ITO recubierto con NF-PVA (5 h) y b) histograma de distribución de diámetro de las NF-PVA.....	34
Figura 16.	a) Mapeo elemental obtenido del análisis FE-SEM del electrodo de ITO recubierto con NF-PVA, b) mapeo de In, c) mapeo de Sn y d) espectro EDS de la misma muestra (5 h).....	35
Figura 17.	Condiciones de electropolimerización de PEDOT:ClO ₄ ⁻ y mecanismo.....	36
Figura 18.	Fotografías de los electrodos de ITO recubiertos con NF-PVA a distintos tiempos de electrohilado a) antes y b) después de la electropolimerización de PEDOT (tiempo de electrohilado: izquierda a derecha 5, 2, 1, 0,5 h); c) fotografía de microscopio óptico del material ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO ₄ ⁻ (5 h)	36
Figura 19.	Voltamperogramas de a) 20 ciclos de electropolimerización de PEDOT:ClO ₄ ⁻ sobre el sustrato ITO/NF-PVA obtenido a 2 h de electrohilado y b) ciclo 20 del proceso de polimerización de PEDOT de los compósitos obtenidos a distinto tiempo de electrohilado.....	38
Figura 20.	Ciclos de carga-descarga de los materiales ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO ₄ ⁻	39
Figura 21.	Espectros de absorción UV-Vis de los materiales ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO ₄ ⁻ en fase a) conductora y b) neutra.....	40
Figura 22.	Imágenes de FE-SEM del electrodo de ITO/NF-PVA (5 h) a) antes y b) después de la electropolimerización de PEDOT:ClO ₄ ⁻	41
Figura 23.	Composición de las fibras de colágeno.....	44
Figura 24.	Estructura química del quitosano (CTS).....	47

Figura 25.	Estrategias de funcionalización post-electrohilado de nanofibras de a) quitosano y b) PVA mediante la bioconjugación covalente de colágeno tipo I.....	51
Figura 26.	Imágenes FE-SEM después de 8 horas de procesamiento en el equipo de electrohilado de las disoluciones de quitosano.....	52
Figura 27.	Análisis comparativo de las estructuras observadas en FE-SEM de las muestras I, II y III.....	54
Figura 28.	Microfotografías de colecciones de nanofibras de CTS obtenidas a partir de la disolución A:B 80:20 con 1.5%p/v de CTS bajo diferentes configuraciones de electrohilado: a) muestra IV, b) V y c) VI.....	56
Figura 29.	a) Microfotografía de colecciones de nanofibras de CTS obtenidas a partir de la disolución A:B 80:20 con 2%p/v de CTS y b) histograma de distribución de diámetro.....	57
Figura 30.	a) Espectro EDS de las colecciones de nanofibras de CTS obtenidas mediante la disolución A:B 80:20 y b) Espectro FT-IR comparativo de HFIP y colección de nanofibras de quitosano puro.....	58
Figura 31.	Micrografías de los sustratos obtenidos a partir del procesamiento de la disolución CTS _A	60
Figura 32.	Mecanismo de funcionalización covalente de colecciones de NF-CTS con COL.....	61
Figura 33.	Acoplamiento CTS con COL.....	61
Figura 34.	Espectro FT-IR comparativo entre NF-CTS, COL y el material híbrido NF-CTS/COL a) espectro completo (4000 a 700 cm ⁻¹) y b) ampliación de la región de 1750 a 750 cm ⁻¹	62
Figura 35.	Acoplamiento NF-CTS con COL incluyendo DMAP como segundo agente de transferencia	63
Figura 36.	FT-IR comparativo de NF-CTS y los materiales híbridos variando los agentes de transferencia a) espectro completo (4000 a 700 cm ⁻¹) y b) ampliación de la región de 1750 a 750 cm ⁻¹	64
Figura 37.	Acoplamiento NF-CTS con COL variando el medio de reacción.....	65
Figura 38.	FT-IR de los materiales conjugados NF-CTS/COL variando el medio de reacción a) espectro completo (4000 a 700 cm ⁻¹) y b) ampliación de la región de 1750 a 750 cm ⁻¹	65
Figura 39.	Imágenes de FE-SEM de COL a) puro y b) recuperado de acoplamiento, c) espectro comparativo de FT-IR de las muestras de colágeno a) y b)	66
Figura 40.	Acoplamiento NF-CTS con COL variando el tiempo de reacción.....	67
Figura 41.	Espectro comparativo del acoplamiento NF-CTS/COL a distinto tiempo de reacción.....	67
Figura 42.	Acoplamiento NF-CTS con COL variando la carbodiimida.....	68
Figura 43.	Espectro de FT-IR de soportes de CTS funcionalizados con COL a) espectro completo (4000 a 700 cm ⁻¹) y b) ampliación de la región de 1800 a 700 cm ⁻¹	68
Figura 44.	Termograma de DSC comparativo del material híbrido NF-CTS /COL, NF-CTS y COL.....	69
Figura 45.	Termograma de TGA comparativo del material híbrido NF-CTS/COL, NF-CTS y COL.....	71
Figura 46.	Micrografías de NF-CTS a) sin colágeno y b) con colágeno conjugado; c) cinética de hinchamiento de ambos sustratos.....	72
Figura 47.	a) Micrografía de FE-SEM de las colecciones de NF-PVA obtenidas y b) histograma de la distribución de diámetro promedio.....	73
Figura 48.	Condiciones para la funcionalización de NF-PVA con COL y mecanismo de la reacción.....	74
Figura 49.	Espectro de FT-IR de soportes de NF-PVA funcionalizados con COL a) espectro completo (4000 a 700 cm ⁻¹) y b) ampliación de la región de 1800 a 700 cm ⁻¹	75
Figura 50.	Termograma de DSC comparativo del material híbrido NF-PVA/COL, NF-PVA y COL.....	76
Figura 51.	Termograma de TGA comparativo del material híbrido NF-PVA/COL, NF-PVA y COL.....	78
Figura 52.	Micrografías de NF-PVA a) sin colágeno y b) con colágeno conjugado; c) cinética de hinchamiento de ambos sustratos.....	79
Figura 53.	Curvas de tensión-deformación correspondientes a NF-PVA y NF-PVA/COL realizadas en seco y en condiciones de humedad.....	80

Figura 54.	Microfotografías de campo oscuro de cultivos de la línea celular HEK-293 sobre a) NF-PVA, b) NF-PVA + COL tratado sin acoplantes, materiales funcionalizados NF-PVA/COL preparados variando la estequiometría de los acoplantes: c) 1:1 y d) 1:5.....	82
Figura 55.	Esquema de las probetas empleadas para las mediciones de propiedades mecánicas, valores expresados en mm.	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales métodos de producción de nanofibras.....	pág 9
Tabla 2.	Parámetros de electrohilado de las disoluciones CTS_M	53

ABREVIATURAS, SIMBOLOGÍA Y FÓRMULAS

3D	Tridimensional	HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
%	Porcentaje	HOBt	1-hidroxibenzotriazol
%p/p	Porcentaje peso a peso	In	Indio
%p/v	Porcentaje peso a volumen	ITO	Óxido de indio dopado con estaño
%v/v	Porcentaje volumen a volumen	J/g	Joules/gramo
°C	Grados Celsius	K	Potasio
μL	Microlitros	kV	Kilovolts
μm	Micrómetros	mg	Miligramos
AA	Ácido acético	Mg	Magnesio
ATF	Ácido trifluoroacético	mm	Milímetro
C	Carbono	MPa	Megapascal
cm	Centímetros	N	Nitrógeno
cm⁻¹	Centímetros recíprocos	Na	Sodio
ClO₄⁻	Anión perclorato	NaOH	Hidróxido de sodio
COL	Colágeno	NF-CTS	Nanofibras de quitosano
CTS	Quitosano	NF-PVA	Nanofibras de alcohol polivinílico
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida	NH₂	Grupo amino
DCM	Diclorometano	nm	Nanómetros
DES	Disolvente punto eutéctico bajo	O	Oxígeno
DMAc	Dimetilacetamida	OH	Grupo hidroxilo
DMAP	4-dimetilaminopiridina	PCL	Policaprolactona
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco	PEDOT	Poli(etilendioxitiofeno)
DSC	Calorimetría diferencial de barrido	PEO	Óxido de polietileno
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	PEG	Polietilenglicol
EDS	Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X	PLA	Ácido poliláctico
EDOT	Etilendioxitiofeno	PLLA	Ácido L-poliláctico
ePTFE	Politetrafluoroetileno	PSS	Sulfonato de poliestireno
eq	Equivalentes molares	PVA	Alcohol polivinílico
FE-SEM	Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo	rpm	Revoluciones por minuto
FFT	Trasformada de Fourier rápida	Sn	Estaño
FT-IR	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier	T	Temperatura
H	Horas	T. a.	Temperatura ambiente
HEK-293	Células embrionarias de riñón humano	TFE	2,2,2-Trifluoro etanol
		TGA	Análisis termogravimétrico
		THF	Tetrahidrofurano
		XPS	Espectroscopia fotoeléctrica de rayos X

RESUMEN

Las colecciones de nanofibras son de gran interés en el desarrollo de novedosos materiales con una amplia variedad de aplicaciones tecnológicas e industriales. La técnica de electrohilado es la estrategia más adecuada para la producción de nanofibras ya que facilita el diseño de nuevos materiales con propiedades únicas que surgen como resultado de sus dimensiones nanométricas. Sin embargo, el diseño de materiales avanzados hace imperativo el estudio de estrategias que permitan el perfeccionamiento de los materiales poliméricos nanoestructurados mediante procedimientos físicos y químicos que potencialicen sus aplicaciones.

Con el propósito de contribuir al desarrollo de metodologías que favorezcan el desarrollo de materiales avanzados constituidos por nanofibras, en la presente investigación se analizan estrategias de funcionalización de colecciones de nanofibras durante la etapa de producción y posterior al electrohilado. En términos de funcionalización post-electrohilado, se han obtenido materiales heteroestructurados compuestos por nanofibras de alcohol polivinílico/poli(3,4-etilendioxitiofeno):perclorato (NF-PVA)/PEDOT:ClO₄⁻ mediante la electropolimerización del polímero conductor PEDOT sobre colecciones de NF-PVA. La inmovilización no covalente de PEDOT:ClO₄⁻ sobre la matriz de NF-PVA induce un comportamiento electroquímico reversible que favorece su potencial aplicación en el desarrollo de materiales para el almacenamiento de energía.

Por su parte, mediante la funcionalización covalente post-electrohilado se han preparado biomateriales híbridos compuestos por nanofibras de quitosano/colágeno (NF-CTS/COL) y nanofibras de PVA/colágeno (NF-PVA/COL) bajo el esquema de conjugación covalente de COL. La obtención de los materiales biomiméticos se ha realizado mediante reacciones de amidación y esterificación respectivamente, asistidas con carbodiimidas. Estas estrategias de bioconjugación representan una novedosa alternativa que permite la incorporación de COL sin requerir su solubilización; evitando así su desnaturalización y el deterioro de la bioactividad de COL, riesgo implicado durante su procesamiento mediante electrohilado y otros métodos. La incorporación de COL a los sustratos conformados por nanofibras otorga mayor capacidad de adhesión celular *in vitro* de las células embrionarias

de riñón humano 293 (HEK-293), respecto a los sustratos sin modificar. La evaluación *in vitro* del material NF-PVA/COL no solo demuestra la afinidad del material funcionalizado con las células HEK-293, sino que además promueve la proliferación celular; resultados prometedores en el desarrollo de andamios celulares con miras a la regeneración de tejidos especializados.

Así, el compendio de información aportada por el presente trabajo de investigación constituye un notable aporte para la producción de materiales avanzados estructurados por nanofibras con repercusión en el ámbito de los biomateriales y materiales electroactivos.

PALABRAS CLAVE

Nanofibras, electrohilado, funcionalización, materiales avanzados, biomateriales

ABSTRACT

Nanofiber constructs are of great interest in the development of innovative materials for a wide range of industrial and technological applications. In this sense, electrospinning is the most straightforward approach that allows the fabrication of nanofibers. Electrospun nanofibers have facilitated the design of novel materials, whose main advantages are related to their unique properties conferred by their nano-scale dimensions. Nonetheless, the development of advanced materials makes imperative the study of strategies that allow for the functionalization of nanostructured polymeric materials through physical and chemical approaches in order to enhance their applications.

With the aim to contribute to the progress of methodologies that allow the development of specialized electrospun nanofibrous materials, in the present investigation strategies such as the functionalization of as-spun nanofiber mats during the production stage and post-electrospinning are analyzed. In the case of post-electrospinning functionalization, heterostructured materials composed by poly(vinyl alcohol)/poly(3,4-ethylenedioxythiophene):perchlorate (NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻) have been produced through PEDOT electropolymerization onto PVA nanofibrous mats surface. The non-covalent immobilization of PEDOT:ClO₄⁻ displays reversible electrochemical properties that underscores its potential application for the production of energy storage materials.

Regarding to post-electrospinning covalent functionalization, hybrid biomaterials composed by chitosan nanofibers/collagen (NF-CTS/COL) and poly(vinyl alcohol)/collagen (NF-PVA/COL) have been developed through covalent conjugation of collagen (COL). The achievement of these biomimetic materials has been accomplished via amidation and esterification reactions respectively, enabled by carbodiimides. Both bioconjugation reactions propose innovative alternatives that allow the incorporation of COL avoiding its solubilization. COL solubilization involves its denaturalization and decreases its bioactivity, disadvantages related not only by collagen's electrospinning but also by common processing procedures. The incorporation of COL into electrospun nanofibrous mats confers greater cell adhesion ability in HEK-293 cells, in contrast to non-functionalized substrates. The *in vitro* citocompatibility evaluation of NF-PVA/COL shows affinity between HEK-293

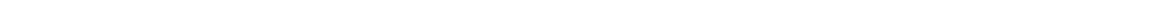
cells and NF-PVA/COL hybrid material in addition to cell proliferation improvement; these results are promising for the development of highly specialized scaffolds focused on tissue engineering.

Thus, the compilation of the knowledge provided by the present investigation conforms a significant contribution for the production of nanostructured advanced materials based on electrospun fibers relevant for the design of biomaterials and electroactive materials.

KEY WORDS

Nanofibers, electrospinning, functionalization, advanced materials, biomaterials

Capítulo I.



Introducción

1. Introducción

Las estructuras fibrosas, conformadas por filamentos continuos y elongados, son ubicuos en la naturaleza, desempeñando importantes funciones que han inspirado la síntesis de materiales fibrosos, por lo que el avance tecnológico ha hecho posible el redescubrimiento de métodos de obtención de sustratos poliméricos constituidos por colecciones de micro y nanofibras que mimetizan la estructura de componentes naturales, así como sus funciones. Los sustratos porosos estructurados por colecciones de nanofibras son materiales con propiedades útiles como alta área superficial y porosidad. Estos atributos les confieren especial interés para un amplio espectro de aplicaciones en varias áreas de innovación. Entre las aplicaciones más destacadas se enlistan: la absorción y separación de contaminantes, catálisis, sensores, capacitores y biomateriales.

El método de electrohilado se ha distinguido como el procedimiento más eficaz para la producción de nanomateriales conformados por colecciones de nanofibras. A través de esta técnica es posible procesar un gran número de polímeros naturales y sintéticos, sus mezclas, y compósitos con materiales de diferente naturaleza: cerámicos o metálicos. El auge de la técnica es debido a la variada morfología de las nanoestructuras que puede obtenerse a partir del control de los parámetros de operación y de la versatilidad del equipo para la obtención de colecciones de fibras sólidas, huecas y porosas, así como estructuras jerárquicas con orientación inducida. El procesamiento de compósitos a través de electrohilado ha generado materiales con características deseables para el desarrollo tecnológico. Sin embargo, el procesamiento de algunos compósitos ha resultado complejo debido a la dificultad en la homogenización de los componentes o por el detrimento de las propiedades del compósito final, hecho que limita el desarrollo de materiales avanzados. El objetivo de superar estas limitantes de la técnica de electrohilado ha alentado el estudio de modificaciones que derivan en configuraciones avanzadas del equipamiento básico, o bien en funcionalizaciones post-electrohilado, de modo tal que la potencialización de las aplicaciones de estas nanoestructuras puede llevarse a cabo durante el proceso de electrohilado mediante variaciones en la configuración básica del equipo, o a través de modificaciones posteriores al procesamiento.

El perfeccionamiento de materiales avanzados es un área de estudio en crecimiento constante dada la necesidad del desarrollo de materiales y biomateriales más eficientes, selectivos y de mayor rendimiento. Las estrategias de modificación post-electrohilado mediante inmovilización covalente y no covalente permiten la incorporación de componentes lábiles al proceso de electrohilado; como es el caso del colágeno (COL), ya que el electrohilado puede inducir su desnaturalización. En este sentido, la presencia de grupos funcionales situados en las ramificaciones de las cadenas de los polímeros facilita su funcionalización, ayudando a la obtención de materiales bioactivos que son más adecuados para el estudio de sus aplicaciones debido a la potencialización de sus propiedades.

En el presente trabajo de investigación se estudian las modificaciones no covalentes y covalentes de colecciones de nanofibras de alcohol polivinílico (PVA) y quitosano (CTS), los cuales son polímeros con alto valor biotecnológico, que al presentar grupos funcionales –OH y –NH₂ permiten su funcionalización para la incorporación de moléculas de interés biomédico y electroquímico.

A través del estudio de funcionalizaciones no covalentes post-electrohilado se detalla la obtención de materiales ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻ con notable actividad como capacitores, cuya obtención combina dos novedosos métodos de síntesis: el electrohilado y la electropolimerización. Por su parte, las funcionalizaciones covalentes post-electrohilado son analizadas para la obtención de biomateriales a partir de la incorporación de COL a dos tipos de sustratos citocompatibles: colecciones de nanofibras de PVA (NF-PVA) y de CTS (NF-CTS). Si bien, el electrohilado del COL ha dado lugar a colecciones de nanofibras de alta calidad, se ha demostrado que tal procesamiento reduce su bioactividad como consecuencia de la desnaturalización inducida por el disolvente. La relevancia de este estudio recae en la preservación de la bioactividad del COL, propiedad fundamental para el desarrollo de andamios destinados a la ingeniería de tejidos. Las bioconjugaciones realizadas para la funcionalización de las NF-CTS y NF-PVA, han dado como resultado la producción de biomateriales NF-CTS/COL y NF-PVA/COL a partir de procesos de amidación y esterificación respectivamente, asistidos con carbodiimidas. La incorporación post-electrohilado de COL presenta gran repercusión en la adhesión y proliferación celular de la

línea HEK-293, correspondiente a células embrionarias de riñón humano. En el ensayo preliminar se han evaluado los materiales NF-PVA/COL que presentan alentadoras propiedades en materia de regeneración de tejidos.

Así, a partir de los estudios mencionados, la presente Tesis Doctoral busca contribuir a la expansión del conocimiento y dominio referentes a la preparación de biomateriales fabricados mediante la técnica de electrohilado, y su prominente potencial en el desarrollo de materiales especializados.

1.1. Justificación

Los polímeros presentan gran versatilidad para la obtención de variados y novedosos sustratos debido a que es posible funcionalizarlos adicionando componentes con propiedades de gran interés en diversas áreas de la ciencia, además de que pueden ser procesados por diferentes metodologías para la obtención de materiales con microarquitecturas con propiedades únicas. El método más utilizado para la obtención de colecciones de nanofibras es el electrohilado. Su versatilidad permite la fabricación de materiales nanoestructurados de gran repercusión para el desarrollo de aplicaciones enfocadas al medio ambiente, catálisis, industria farmacéutica, sensores, medicina e ingeniería de tejidos, por citar algunas. Sin embargo, la diversificación de los nanomateriales poliméricos a través de estrategias de funcionalización es un área de investigación de auge reciente y con potencial repercusión en el desarrollo de materiales avanzados.

El diseño de materiales basados en colecciones de nanofibras tiene como objetivo desarrollar propiedades puntuales que permitan optimizar su desempeño y enfocar sus aplicaciones de manera selectiva. En este trabajo de tesis, dicho propósito se aborda a partir de estrategias generales para lograr la diversificación de los sustratos nanoestructurados: la modificación post-fabricación y la funcionalización durante la producción a través de la inducción de microarquitecturas con orden controlado.

Estas estrategias de modificación contribuyen al desarrollo de materiales electroactivos con prometedoras aplicaciones en el almacenamiento de energía, al desarrollo de biomateriales enfocados a la ingeniería de tejidos enriquecidos con colágeno (polímero natural cuya bioactividad es susceptible a deterioro durante el procesamiento mediante el electrohilado), con sobresaliente citocompatibilidad ante células embrionarias de riñón humano HEK-293.

Por lo anterior, la presente Tesis Doctoral contribuye a la ciencia de los materiales aportando mayor entendimiento respecto a la técnica de electrohilado, al procesamiento de los polímeros PVA y CTS, así como a estrategias de funcionalización posterior a la etapa

de producción de colecciones nanofibras; marcando la pauta para el desarrollo de materiales con notables aplicaciones en sectores de interés tecnológico.

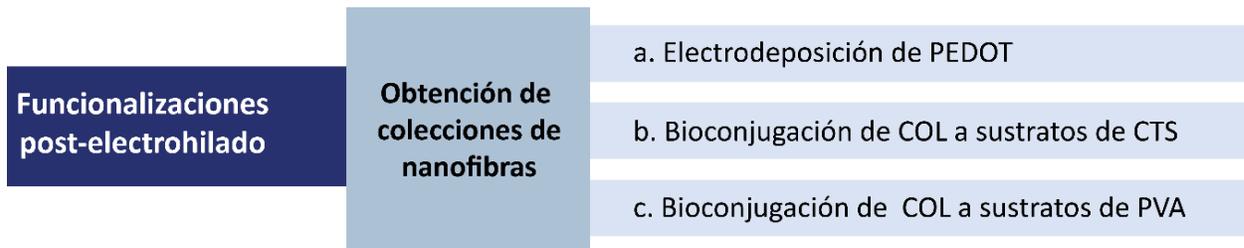
1.2. Objetivo general

Estudiar estrategias que permitan la obtención de materiales avanzados a través de funcionalizaciones post-fabricación de microarquitecturas producidas mediante la técnica de electrohilado.

1.2.1. Objetivos específicos

- A. Obtener sustratos nanoestructurados mediante el electrohilado de PVA y CTS para realizar estudios de funcionalización.
- B. Obtener el material electroactivo compuesto ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻ a través de la inmovilización no covalente de PEDOT:ClO₄⁻ sobre electrodos de ITO/NF-PVA mediante la técnica de electrodeposición.
- C. Fabricar biomateriales NF-CTS/COL y NF-PVA/COL mediante la conjugación covalente de COL vía protocolos de amidación y esterificación.

1.3. Metodología general



Capítulo II.

Marco teórico

2. Generalidades de las nanofibras

Las nanofibras son materiales flexibles con un amplio rango de aplicación que comprende distintas áreas de estudio, entre las más destacadas se enlistan: filtración, sensores, textiles de protección, almacenamiento de energía, ingeniería de tejidos y biomateriales en general. Si bien el término *nanofibras* definía a fibras de diámetro individual no mayor a 100 nm, la actualización de esta definición ha sido extendida para incluir estructuras fibrosas cuyo diámetro individual es inferior a 1 μm .¹ Las colecciones de nanofibras suelen conformar estructuras porosas, interconectadas, de elevada área superficial y propiedades físicas, químicas y biológicas significativamente superiores respecto a otros materiales.² Dichos atributos únicos, aunados a la naturaleza propia del material base, trascienden hasta novedosas propiedades con aplicaciones en todas las áreas tecnológicas.

En términos de fabricación, se ha reportado una amplia diversidad de métodos de producción de nanofibras,³ los principales se enlistan en la Tabla 1. No obstante, la técnica de electrohilado (*electrospinning*, en inglés) es la más ampliamente utilizada debido a la versatilidad que ofrece para la fabricación de una vasta gama de materiales, además de que mediante esta técnica se puede controlar el tamaño de los diámetros, la morfología y estructura de las nanofibras producidas.¹

Tabla 1. Principales métodos de producción de nanofibras.

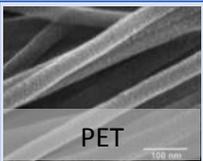
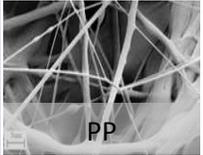
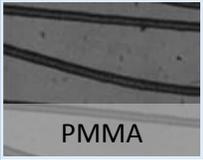
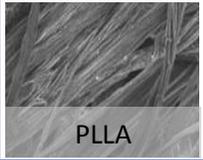
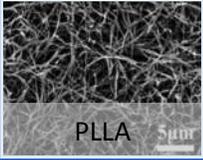
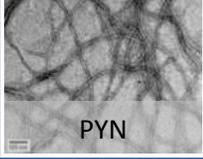
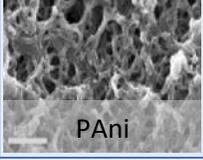
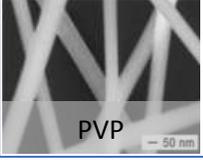
Método	Principio	Rango de diámetro	Morfología representativa
<i>Isla-en-el-mar</i> ⁴	Separación de componentes	>800 nm	 PET
<i>Soplado por fusión</i> ⁵	Soplado de polímeros fundidos	>800 nm	 PP

Tabla 1. Principales métodos de producción de nanofibras (continuación).

Escritura directa⁶	Moldeado de polímeros en disolución	>50 nm	 PMMA
Hilado flash⁷	Aplicación simultánea de calor y presión a fluidos poliméricos	>200 nm	 PLLA
Separación de fase⁸	Inducción de separación de fase en disolución	50-500 nm	 PLLA 5 μm
Auto-ensamblaje⁹	Inducción de auto-organización molecular en disolución	<100 nm	 PYN
Dispersión de disolvente¹⁰	Precipitación en no-disolvente	~100 nm	 CNFs
Hilado de fuerza centrífuga¹¹	Aplicación de fuerza centrífuga en polímeros fundidos	>100 nm	 PLLA-PVP
Producción hidrotermal¹²	Inducción de la formación de nanofibras mediante alta temperatura y presión en disoluciones enriquecidas con electrolitos	50-120 nm	 PAni
Electrospinning¹³	Inducción electrostática por efecto de alto voltaje	10 nm - 1 μm	 PVP 50 nm

2.1. Electrohilado

En las últimas décadas el uso del electrohilado ha ganado popularidad en el sector científico e industrial debido a que permite la fabricación a bajo costo de sustratos constituidos por fibras ultrafinas y continuas mediante inducción electrostática. El equipamiento básico consiste en un sistema de suministro para la disolución polimérica, equipado con una bomba de infusión programable, un generador de alto voltaje y un colector metálico. El colector puede ser fijo, con movimiento controlado o de geometría variable,³ el esquema general del proceso se muestra en la Figura 1.

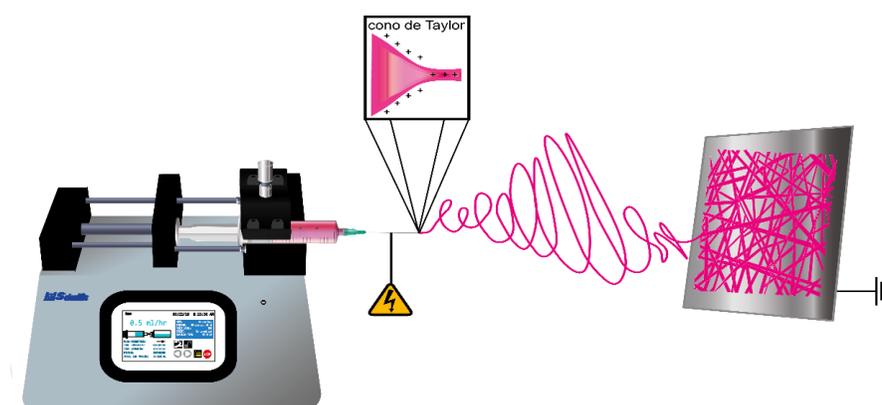


Figura 1. Producción de nanofibras mediante electrohilado.

El electrohilado consiste en suministrar una disolución polimérica mediante una aguja metálica y eléctricamente cargada a través de un campo eléctrico. El alto voltaje aplicado otorga la fuerza eléctrica necesaria para superar la tensión superficial de la gota del polímero, causando su deformación y elongación hasta la formación del cono de Taylor (ver Figura 1). La subsecuente eyección de jets poliméricos origina la producción de nanofibras que son atraídas hasta el colector, que suele ser operado a polaridad opuesta o aterrizado. Durante la trayectoria aguja-colector ocurre la evaporación de la fracción correspondiente al disolvente en el jet polimérico. Finalmente, la construcción del sustrato procede por la superposición aleatoria de las nanofibras producidas constantemente.¹⁴

La producción continua de las nanofibras promueve el ensamblado de complejas microarquitecturas con alta mesoporosidad interconectada. La técnica de electrohilado es reconocida como el procedimiento más eficiente para la producción de nanofibras poliméricas, en los últimos años ha presentado un notable aumento en la incidencia de reportes científicos como se ilustra en la Figura 2.

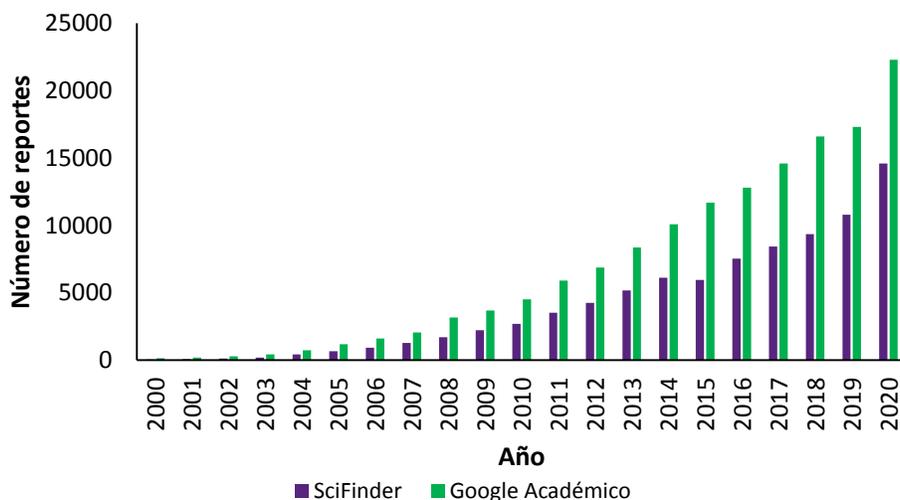


Figura 2. Número de publicaciones indexadas entre el año 2000 y 2020 referentes a la producción de nanofibras de acuerdo a los buscadores SciFinder y Google Académico.

Si bien el método de electrohilado ha adquirido mayor notoriedad en las últimas décadas, la utilización de la fuerza electrostática para la fabricación de fibras micro y nanométricas se remonta al periodo comprendido entre 1902 y 1944, años en los que John Cooley y Anton Formhals publicaron una serie de patentes referentes al proceso de hilado electrostático hasta lograr su comercialización en la industria textil.² El proceso de electrohilado integra conocimientos de mecánica de fluidos y su inestabilidad frente a un campo eléctrico para la producción de estructuras fibrosas,¹⁵ el compendio de los principales descubrimientos involucrados se resume en la Figura 3.

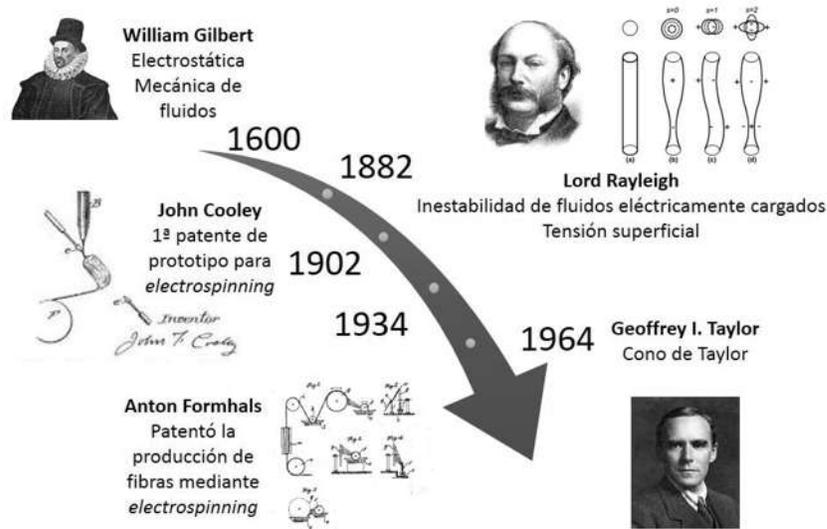


Figura 3. Breve cronología de la historia del electrohilado.

La eficacia del electrohilado está vinculada con tres teorías que explican el fundamento involucrado en la obtención de nanofibras: 1) La teoría de la carga en el fluido, que establece que durante el electrohilado la generación de cargas en el fluido suministrado ocurre por la polarización del campo eléctrico generado al aplicar potencial positivo y negativo, induciendo la carga.¹⁶ 2) La teoría sobre la deformación de las gotículas poliméricas sometidas a alto voltaje, descrita en 1964. Geoffrey I. Taylor estableció que cuando se someten volúmenes discretos de líquidos eléctricamente conductores a campos eléctricos, el equilibrio entre la fuerza del campo eléctrico y la tensión superficial origina deformaciones estables de las gotículas de fluidos no viscosos, newtonianos y viscoelásticos. Así mismo, explicó que cuando el voltaje supera el potencial crítico revierte el equilibrio deformando las gotas poliméricas hasta estructuras cónicas, con ángulo de 98.6°, estructura que actualmente es conocida como el cono de Taylor. Además Taylor demostró que dicha estructura cónica es fundamental para la formación de los jets poliméricos que preceden a las nanofibras.¹⁷ 3) La inestabilidad del jet en su recorrido hacia el colector. Durante los experimentos de electrohilado se ha observado que conforme el jet polimérico es expulsado del cono de Taylor usualmente sigue trayectorias rectas en la primera fase, precedidas por trayectorias complejas causadas por la inestabilidad de flexión

durante su recorrido a través del campo eléctrico hasta llegar al colector,¹⁸ Figura 4. Durante éste trayecto el jet polimérico experimenta procesos de estiramiento y adelgazamiento como consecuencia de la fuerza eléctrica;¹⁹ las perturbaciones más comunes asociadas a la inestabilidad causada por la fuerza eléctrica se ilustran en la Figura 4.

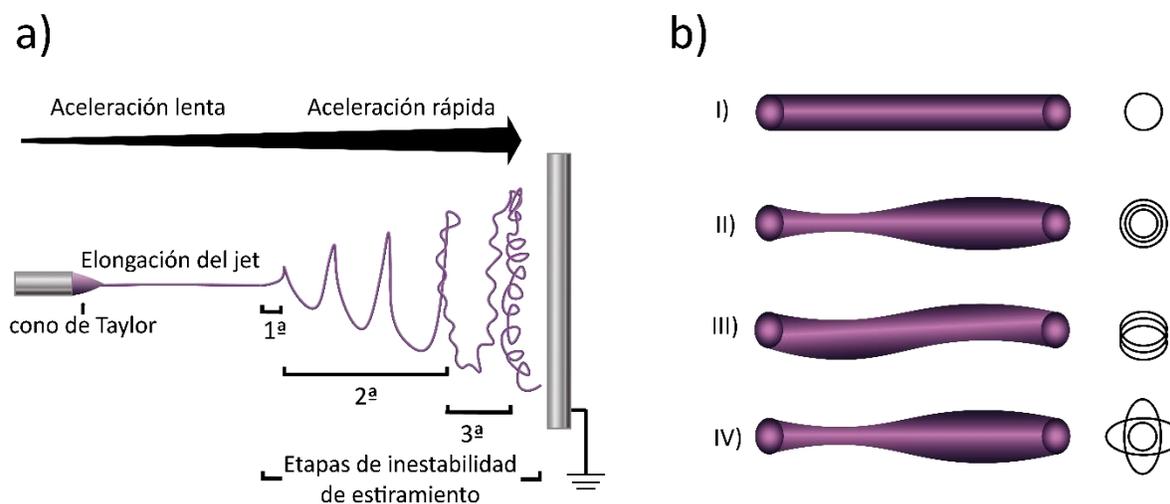


Figura 4. a) Esquematación de la trayectoria de los jets poliméricos durante el proceso de electrohilado y b) representación de las perturbaciones asociadas a la inestabilidad del jet polimérico.

El equilibrio adecuado de los parámetros operacionales y las propiedades de la disolución es determinante para la fabricación de nanofibras libres de defectos y de diámetros uniformes, características que denotan la adecuada calidad de los sustratos. La amplia variedad de polímeros y compósitos que pueden ser electrohilados, aunada a la diversidad de complejas microarquitecturas que pueden obtenerse son las razones principales que definen al método de electrohilado como una técnica versátil y asequible para la producción de nanofibras a escala industrial o de laboratorio.²⁰

Mediante electrohilado es posible el procesamiento de un sinnúmero de polímeros naturales, sintéticos y sus mezclas, además de disoluciones y suspensiones conteniendo materiales cerámicos y metálicos; hecho que amplía el horizonte de aplicación de los

materiales producidos. En términos de la morfología, los sustratos pueden presentar disposición aleatoria, alineada o bien integrando patrones, pueden componerse por nanofibras sólidas, huecas, con porosidad superficial y coaxiales o también denominadas núcleo-coraza, como las que se ilustran en la Figura 5.

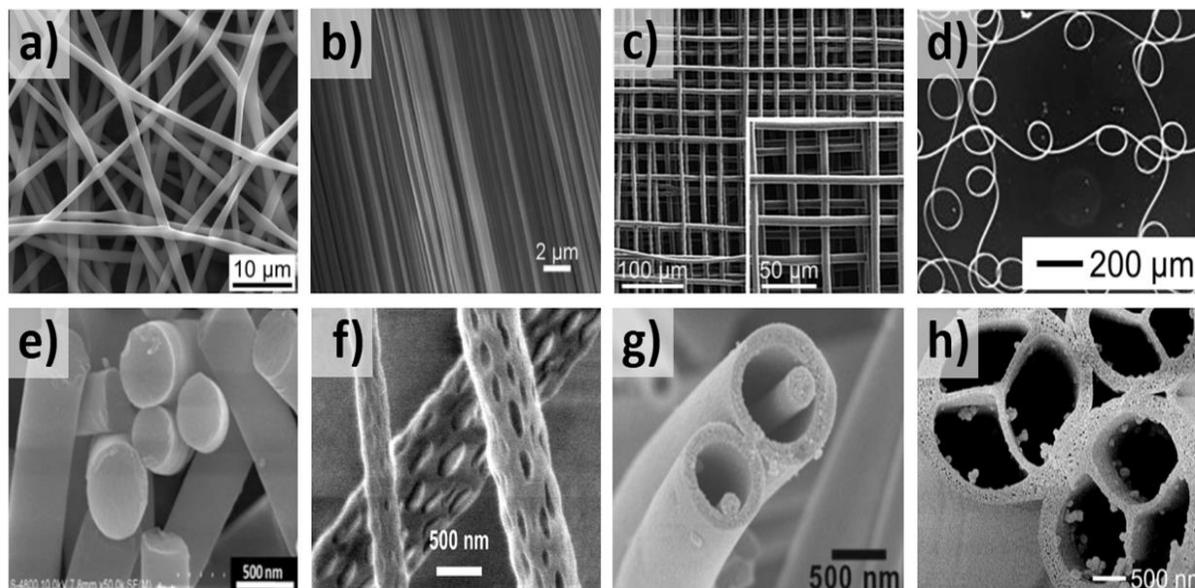


Figura 5. Imágenes de FE-SEM de colecciones de nanofibras obtenidas mediante electrohilado con distinta disposición: a) aleatorias,²¹ b) alineadas,²² c) reticuladas,²³ y d) patrones curvos;²⁴ y con variaciones estructurales: e) sólidas,²⁵ f) porosas,²⁶ g) coaxiales²⁷ y h) huecas.²⁸

La producción exitosa de colecciones de nanofibras es gobernada por factores que abarcan desde las propiedades de la disolución que se procesa y las condiciones de operación del equipo de electrohilado hasta parámetros ambientales,¹⁴ los cuales se abordan a detalle a continuación.

2.1.1. Factores que influyen en el proceso de electrohilado

Los parámetros de trabajo son factores importantes para comprender no solo la naturaleza del proceso de electrohilado sino también la conversión de una disolución polimérica a colecciones de nanofibras mediante dicha técnica. Estos parámetros son

comúnmente clasificados en tres grupos: parámetros relativos a la disolución, a la configuración del equipo y parámetros ambientales.^{14, 19}

2.1.1.1. Parámetros de la disolución

Concentración del polímero. La concentración del polímero desempeña un rol importante en la fabricación de nanofibras. Con el propósito de comprender la influencia de la concentración del polímero se describen cuatro tipos de concentración crítica, desde muy baja hasta alta.²⁹

Si la concentración es muy baja, la formación de micro y nanopartículas poliméricas es promovida. En tal caso, el fenómeno de *electrospray* reemplaza al proceso de electrohilado debido a la baja viscosidad y alta tensión superficial en la disolución. Cuando la concentración es un poco baja respecto al valor requerido para ser electrohilable, se genera una mezcla de nanofibras y perlas.³⁰⁻³²

La concentración óptima si bien no se confina a un valor específico, se define como aquella que permite la obtención de nanofibras libres de defectos y con diámetros uniformes. Las concentraciones altas, superiores a la concentración óptima comúnmente originan fibras de diámetros fuera de la nanoescala con morfología helicoidal y estructuras tipo microlistones.³³ Adicionalmente, la viscosidad de la disolución está íntimamente relacionada con la concentración de la misma.

Peso molecular. El peso molecular del polímero también tiene un impacto importante en la morfología de las nanofibras. En principio, el peso molecular refleja el entrelazamiento de las cadenas poliméricas en la disolución, es decir la viscosidad de la disolución. El procesamiento de disoluciones de polímeros con bajo peso molecular tiende a originar perlas a lo largo de las nanofibras; por ende mayor peso molecular produce mejor calidad en las nanofibras.³⁴ Los polímeros de peso molecular alto favorecen también la formación de micro-listones incluso a concentraciones bajas. Algunos autores han reportado que el procesamiento de polímeros de alto meso molecular a bajas

concentraciones permiten la obtención de microarquitecturas ordenadas en patrones complejos.³⁵

Es importante señalar que el peso molecular no es un factor crucial ni determinante para llevar a cabo el electrohilado siempre que la disolución polimérica mantenga suficientes interacciones intramoleculares que permitan el proceso, tal es el caso de algunos oligómeros que pueden ser exitosamente electrohilados a concentraciones superiores al 30%p/v.³⁶

Tensión superficial. La tensión superficial es un factor determinante en el proceso, esta propiedad está íntimamente ligada al tipo de disolvente empleado ya que influencia la morfología de las nanofibras producidas.³⁷⁻³⁹ Con la reducción de la tensión superficial, manteniendo constante la concentración, es posible promover la obtención de nanofibras libres de defectos. La tensión superficial puede ser modificada mediante ajustes en la proporción del disolvente cuando se emplean mezclas de disolventes, sin embargo, esta variación también altera la tensión superficial.³³

Conductividad. La conductividad de la disolución está en función del tipo de polímero, el disolvente y los aditivos empleados, cuando éstos son incorporados. Típicamente, los biopolímeros son polielectrolitos en la naturaleza, de tal forma que la presencia de iones incrementa la habilidad de transporte de carga del jet polimérico inducido por el campo eléctrico. Este hecho resulta en la formación deficiente de nanofibras en contraste con polímeros sintéticos.⁴⁰ La conductividad de una disolución puede ser ajustada mediante la incorporación de sales o componentes metálicos. La adición de estos componentes comúnmente promueve la obtención de nanofibras con diámetros de menor dimensión.⁴¹

Viscosidad. La viscosidad es una propiedad determinante para la morfología de las nanofibras. Existen valores críticos de viscosidad que permiten la formación de fibras continuas y libres de defectos; disoluciones con baja viscosidad no favorecen la producción de nanofibras de buena calidad, en estos caso la tensión superficial es el factor dominante, mientras que altos valores de viscosidad resultan en la fuerte eyección de jets que tampoco

logran ser eficientes en la formación de nanofibras.⁴² Es importante considerar que si bien la viscosidad es fácilmente ajustada al modificar la concentración polimérica, ambas propiedades también están fuertemente ligadas al peso molecular.^{34, 43}

Disolvente. El principal criterio de selección de un disolvente para electrohilado suele estar relacionado con la solubilidad del polímero que se desea procesar. No obstante, el disolvente empleado es un factor fundamental para equilibrar otros parámetros relativos a las características de la disolución, tales como la conductividad, constante dieléctrica, viscosidad y tensión superficial.⁴⁴

La presión de vapor que presente el disolvente o la mezcla de disolventes empleados repercute en el tiempo de secado de las nanofibras, y debe considerarse para la selección de la distancia óptima de trabajo, el voltaje a aplicar e incluso la velocidad de suministro.³²

2.1.1.2. Parámetros de la configuración del equipo

Voltaje. El voltaje es, sin duda, uno de los factores determinantes para la obtención exitosa de nanofibras. Solamente el voltaje superior al voltaje umbral es capaz de producir la eyección del jet desde el cono de Taylor. Sin embargo, a mayor voltaje puede ocurrir la formación de defectos, mientras que voltajes reducidos suelen producir la elongación deficiente de la gota polimérica sin llegar al cono de Taylor.

Su influencia en el diámetro promedio de las nanofibras es controversial. Un amplio número de investigaciones sugieren que la aplicación de alto voltaje origina la formación de nanofibras de diámetros mayores, empleando PVA disuelto en agua como modelo.³⁹ En contraste a esta hipótesis, otro amplio grupo de reportes argumenta que la aplicación de altos voltajes favorece la disminución de los diámetros al incrementar la fuerza electrostática repulsiva en el jet cargado, empleando poli(ferroceno-dimetilsilano) (PFS) en dimetil acetamida/acetona como modelo.⁴⁵

Otros autores, descartan la influencia del voltaje en la dimensión del diámetro de las nanofibras producidas empleando óxido de polietileno (PEO) como modelo de estudio.⁴⁶

Por lo anterior, se puede inferir que el voltaje puede influir en la dimensión del diámetro promedio pero el nivel de significancia varía dependiendo de otros factores asociados a la disolución y factores operacionales.

Velocidad de flujo. La velocidad de flujo es otro de los factores importantes durante el proceso. Comúnmente, el suministro a baja velocidad de flujo es recomendado en un periodo breve para dar lugar a la polarización de la disolución, posteriormente es recomendable el incremento discreto del suministro. Cuando la velocidad de flujo es alta, ocurre la producción de nanofibras con defectos y con diámetros mayores debido a la alteración en el proceso de evaporación del disolvente y la disminución de la fuerza de estiramiento.¹⁴

El equipamiento estándar de electrohilado incluye un sistema de suministro constituido por una aguja metálica conectada mediante una manguera o directamente a una jeringa, dependiendo del tipo de unidad de electrohilado. Algunas variaciones realizadas en el sistema de suministro han sido desarrolladas en aras de incrementar la tasa de producción de nanofibras,⁴⁷ para ello se han incorporado accesorios de agujas múltiples.^{48, 49} En la Figura 6 se ilustran los principales tipos de sistemas de suministro.

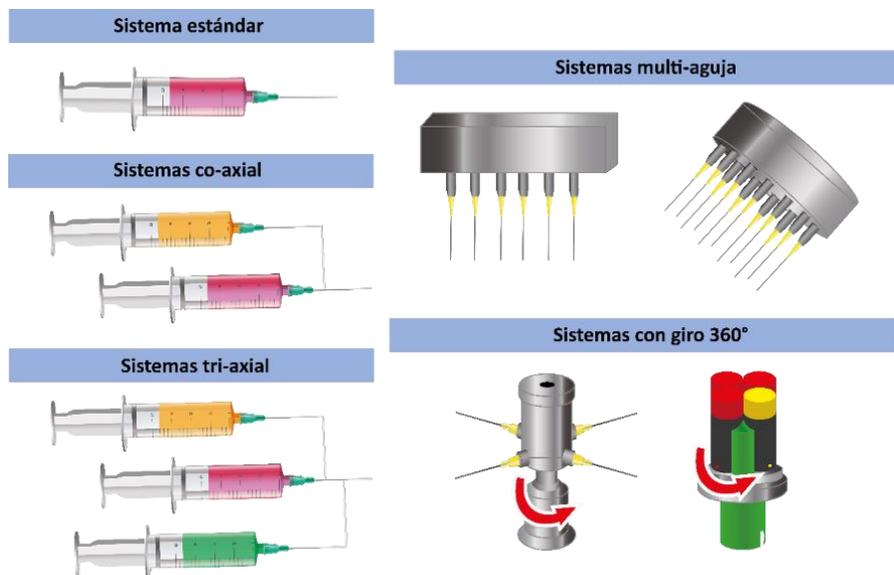


Figura 6. Principales sistemas de suministro para electrospinning.

Sistemas más complejos, como el co-axial⁵⁰ y tri-axial,⁵¹ son opciones que facilitan la obtención de nanofibras compuestas, las cuales presentan estructuras núcleo-coraza. Otros sistemas de suministro con rotación, propios para la variante de electrohilado de fuerza centrífuga, adaptan sistemas de agujas múltiples⁵² o multicanal que permiten la fabricación simultánea de nanofibras de polímeros diferentes.⁵³

Distancia de trabajo. La distancia de trabajo, o también referida como distancia aguja-colector, es de gran repercusión en la morfología y diámetro de las nanofibras. Cuando se opera en distancias de trabajo cortas se provoca la recolección de nanofibras húmedas, ya que el tiempo de traslado del jet al colector es insuficiente para la adecuada evaporación del disolvente. El aumento en la distancia de trabajo también puede generar la producción de defectos a lo largo de las nanofibras debido a la disminución de la fuerza de atracción electrostática.^{45, 54} Las distancias de trabajo óptimas deben ser determinadas a partir del balance de la fuerza electrostática, la velocidad de flujo y las propiedades de la disolución.

Geometría del colector. Durante el proceso de electrohilado, el colector actúa como el sustrato conductor que atrae al jet polimérico cargado desde el cono de Taylor. Los sustratos de aluminio y acero inoxidable son ampliamente reportados a manera de colectores. La vasta variedad de morfologías de las microarquitecturas compuestas por nanofibras son inducidas fundamentalmente por el tipo de colector empleado.¹⁹ Las variaciones en el tipo de colector y su geometría le otorgan al método de electrohilado gran parte de su versatilidad, Figura 6.

Las modificaciones en los sistemas de recolección pretenden mejorar el control de la deposición de las nanofibras para la obtención de microarquitecturas con disposición aleatoria, reticuladas, altamente alineadas e integrando patrones complejos donde la longitud de las nanofibras varía desde micrómetros hasta centímetros.

Dentro de los colectores estáticos, los más simples y más ampliamente utilizados, se distinguen dos tipos: las placas metálicas que facilitan la obtención de nanofibras

depositadas de manera aleatoria y las barras paralelas, ya sea metálicas o magnéticas, que guían la deposición alineada de las nanofibras. Los colectores de movimiento rotacional como rodillos, ruedas y discos tienen el propósito de integrar sustratos compuestos por nanofibras altamente alineadas. Los colectores adaptados a plataformas con movimiento X-Y ó X-Y-Z ofrecen control superior en la inducción de patrones complejos.¹⁴

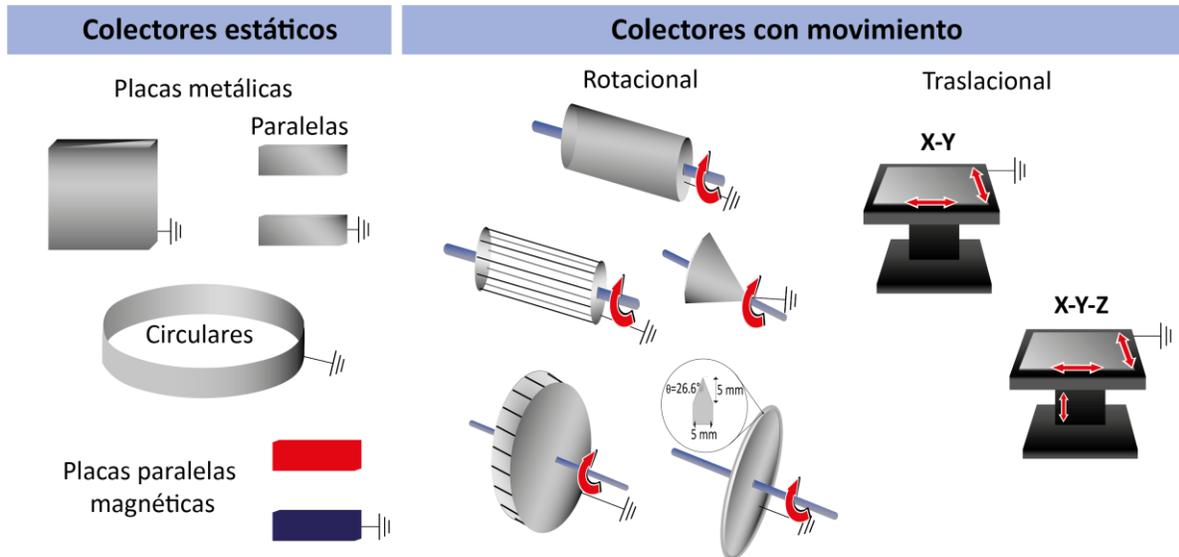


Figura 7. Principales colectores empleados para electrohilado.

2.1.1.3. Parámetros ambientales

Temperatura. La temperatura de la cámara de electrohilado es un factor que suele intervenir directamente en la velocidad de evaporación del disolvente y por ende, favorece la producción de nanofibras de diámetro más reducido.⁵⁴

Humedad. De manera similar a la temperatura, la humedad ambiental o inducida durante el proceso de electrohilado está fuertemente relacionada con la velocidad de evaporación del disolvente. En condiciones de humedad baja, aumenta la velocidad de secado de las nanofibras como consecuencia de la rápida evaporación del disolvente, si bien este hecho promueve la disminución del diámetro también puede provocar la fractura de

las nanofibras. Por el contrario, bajo condiciones de humedad alta tienden a producir nanofibras de diámetro mayor debido a que puede ocurrir la neutralización de los jets cargados, disminuyendo la fuerza de estiramiento.⁵⁵

Adicionalmente, se ha demostrado recientemente que la humedad también afecta la morfología de la superficie de las nanofibras. Alta porosidad en las nanofibras puede producirse cuando el proceso de electrohilado se lleva a cabo bajo condiciones de humedad alrededor de 60 y 70%.⁵⁶

2.1.2. Aplicaciones de las nanofibras

Las aplicaciones de los sustratos compuestos por nanofibras están fuertemente influenciadas por las propiedades y características de cada polímero. Sin embargo, se puede afirmar que el abanico de aplicación de estos materiales poliméricos nanoestructurados cada vez es más amplio y versátil. El potencial para el desarrollo de novedosas aplicaciones abarca áreas como filtración, catálisis, dispositivos electrónicos, baterías de ion litio, biomedicina y reforzamiento de otros materiales, entre otras.⁵⁷

Reforzado de materiales. A microescala, una de las aplicaciones más importantes es la capacidad que poseen para reforzar distintos compósitos de fibras de carbono, vidrio y kevlar. De manera similar, las nanofibras y películas delgadas pueden desempeñar tal función, con este tipo de reforzado, los compósitos finales pueden exhibir propiedades estructurales y mecánicas superiores.⁵⁸

Filtración. El desarrollo de sistemas de filtración constituye un área importante de estudio dentro del ámbito ingenieril, siendo importante para la alta eficiencia de los filtros la reducción de los canales y poros para la retención adecuada de gotas y partículas en el mismo. Tomando ventaja de la alta especificidad de la superficie, la porosidad interconectada, la alta permeabilidad y el control en el tamaño de poro de las nanofibras generadas mediante el electrohilado, es factible la obtención de filtros más eficientes y selectivos.⁵⁹

Catálisis. En los procedimientos de catálisis heterogénea el catalizador es inmovilizado en soportes sólidos. En este sentido, las colecciones de nanofibras integran sustratos que ofrecen mejor desempeño como consecuencia de su mayor área de contacto y alta porosidad que benefician la cinética de dispersión. Las matrices poliméricas además ejercen un efecto protector para las nanoestructuras metálicas, cuando éstas son la base del catalizador, evitando su desactivación por coalescencia o bien la lixiviación de las mismas.

Un paso crucial en los procesos catalíticos es la remoción y el reciclaje del catalizador una vez finalizada la reacción. La inmovilización del catalizador en nanofibras facilita la recuperación del catalizador del medio de reacción y favorece la incorporación a sistemas de flujo continuo. Tal eficacia promueve el desarrollo de sistemas de catálisis química, electroquímica, fotocatálisis y biocatalizadores.¹⁵

Baterías y dispositivos de almacenamiento de energía. Las nanofibras electrohiladas han ganado gran interés en la fabricación de electrodos almacenadores de baterías de iones litio debido a los patrones bajos de difusión en contraste con los sistemas comúnmente empleados, además de la rápida intercalación cinética debida a la alta relación superficie-volumen y la disminución de la resistencia de transferencia de carga y de la resistencia interna en las celdas.^{15, 19, 60}

Distribución de fármacos y otras moléculas activas. Los sistemas de liberación de fármacos se emplean para mejorar la eficiencia en la distribución o bien para garantizar el reparto conveniente en los entornos fisiológicamente adecuados. Los soportes poliméricos ofrecen múltiples ventajas para este proceso, dichas matrices poliméricas han resultado muy prometedoras para la distribución de agentes terapéuticos, genes y factores de crecimiento, entre otras.¹⁵

El estudio de biomateriales poliméricos como acarreadores es promisorio para aplicaciones biomédicas a mediano y largo plazo, particularmente en la prevención de infecciones post-quirúrgicas, quimioterapia local post-operatoria, y para regeneración de

hueso y piel, debido a que los andamios electrohilados permiten mayor especificidad en cuanto al sitio de liberación en el organismo.

Algunos de los fármacos integrados a este tipo de sistemas de distribución son: ibuprofeno, ketoprofeno, indometacina, diclofenaco, meloxicam, ácido acetilsalicílico, aloe vera, anti neoplásicos y quimioterapéuticos como paclitaxel, doxorubicina, carmofur, entre otros.^{19, 61, 62}

Ingeniería de tejidos. La regeneración de tejidos es un área multidisciplinaria de estudio que involucra el uso de andamios o matrices que provean soporte a las células guiando el crecimiento de las mismas. Para la regeneración tisular es necesario que el andamio mimetice de manera adecuada la microarquitectura y topografía del entorno extracelular además de la alta biocompatibilidad de los mismos.^{14, 15}

En este contexto, los materiales electrohilados ofrecen importantes ventajas como las propiedades superficiales, biodegradabilidad, porosidad, propiedades mecánicas y semejanza con la matriz extracelular que promueve la proliferación celular.⁶³ Adicionalmente, este tipo de soportes pueden ser enriquecidos para cubrir los requerimientos propios de líneas celulares altamente específicas.⁶⁴

2.1.3. Optimización de las aplicaciones de los materiales basados en nanofibras

Dado que la aplicación de los materiales es intrínseca a su composición, el enriquecimiento de los sustratos electrohilados es una asignatura en progreso constante. La potencialización de las propiedades y aplicaciones puede abordarse mediante la etapa de fabricación a partir del: i) procesamiento de compósitos, ii) control de la organización de la microarquitectura; o bien a través de procedimientos post-fabricación, Figura 8.

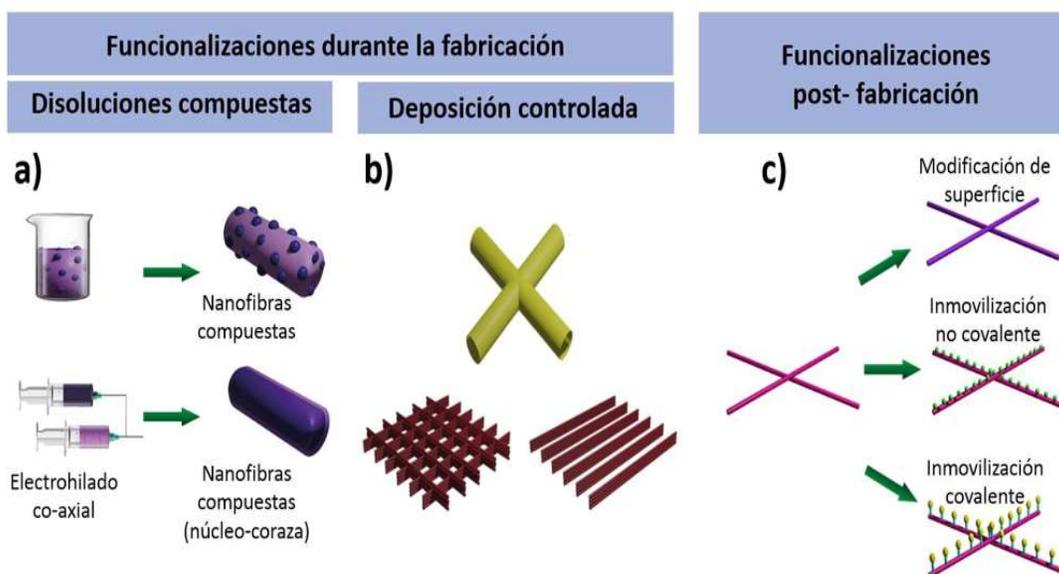


Figura 8. Estrategias de obtención de materiales avanzados durante el electrohilado: a) procesamiento de disoluciones compuestas y b) control de la organización de la microestructura; c) modificaciones post-electrohilado.

Respecto a la optimización durante la etapa de producción, estrategias como el electrohilado coaxial y el procesamiento de mezclas de polímeros, suspensiones o emulsiones compuestas son comúnmente estudiadas para el enriquecimiento y optimización de aplicaciones de las colecciones de nanofibras durante la fabricación. La funcionalización de materiales mediante la producción nanofibras compuestas es una estrategia ampliamente utilizada, principalmente para incorporar componentes cerámicos, como hidroxiapatita,^{65, 66} o materiales metálicos.⁶⁷ Principalmente, el procesamiento de mezclas poliméricas y nanopartículas de metales nobles es de gran relevancia para incrementar la respuesta óptica o conductora de las colecciones de nanofibras,^{68, 69} y adicionalmente tiene gran repercusión en biomedicina; ya sea con propósitos relacionados con la ingeniería de tejidos,^{70, 71} el revestimiento de heridas⁷² o el desarrollo de biodispositivos.⁷³

Por otra parte, la inducción de la organización de la microarquitectura implica el control absoluto de la deposición de las nanofibras durante la etapa de fabricación. Esta

estrategia toma ventaja de la permisibilidad que ofrece la configuración de electrohilado a partir de la incorporación de los diversos sistemas de recolección que facilitan la promoción de la orientación y la construcción de estructuras bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D),^{74, 75} las principales variaciones de electrohilado se ilustran en la Figura 9.

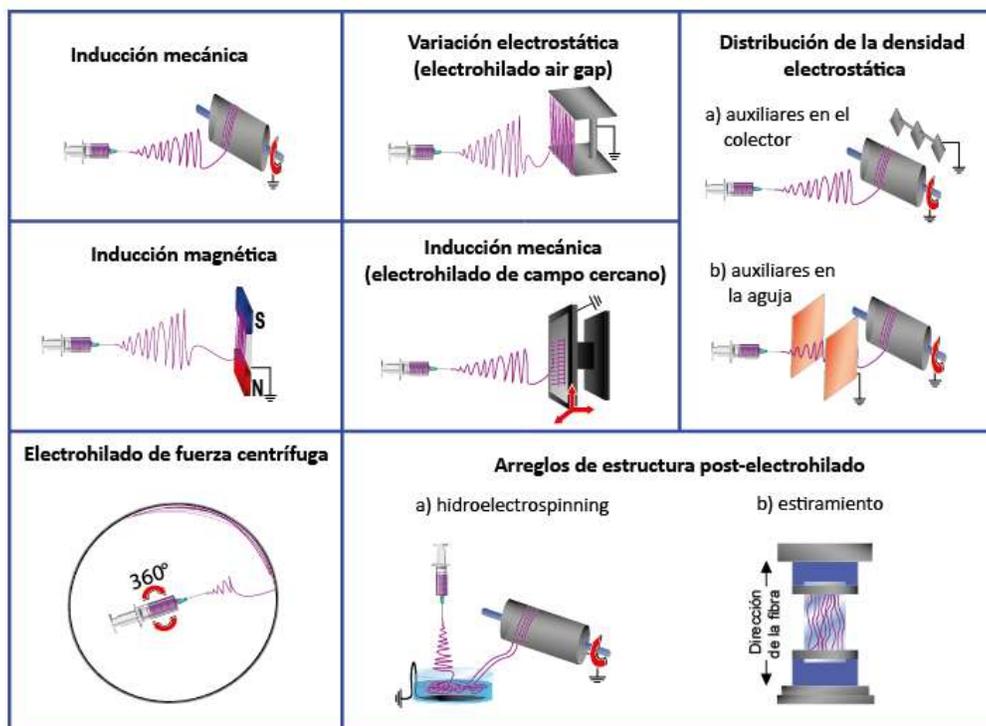


Figura 9. Configuraciones de electrohilado que facilitan el control de la microestructura.

Las estrategias de modificación post-electrohilado son alternativas que permiten la incorporación de propiedades específicas en el polímero nativo. Estas estrategias se clasifican en varias aproximaciones: i) la modificación de la superficie, ii) la inmovilización covalente, iii) la inmovilización no covalente y iv) el arreglo de la estructura. La modificación de la superficie de las nanofibras tiene como objetivo transformar grupos funcionales adyacentes de la cadena polimérica mediante procesos físicos o químicos, con lo que se busca proveer la generación de materiales biomiméticos con mejores capacidades de adhesión celular⁷⁶ o inducir el carácter hidrofílico/hidrofóbico.⁷⁷ Las técnicas de

modificación de superficie más eficientes son: tratamiento con plasma, irradiación con haz de electrones, implantación iónica e irradiación ultravioleta o gamma.

Los métodos de modificación física y química son técnicas que permiten la conjugación de moléculas y macromoléculas de baja electrohilabilidad o susceptibles al proceso de electrohilado pero de especial interés para el desarrollo de materiales avanzados y de alta especificidad.⁷⁸⁻⁸⁰ El método a elección depende de la existencia de grupos funcionales disponibles en el sustrato, la naturaleza de la entidad a incorporar y la aplicación objetivo del material funcionalizado.

En los siguientes capítulos de este trabajo de Tesis se presentan las estrategias de funcionalización post-fabricación no covalente para el desarrollo del material electroactivo ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻, y covalente para la obtención de biomateriales híbridos NF-CTS/COL y NF-PVA/COL como potenciales andamios celulares para la regeneración de tejidos.

Capítulo III.

Funcionalización post-electrohilado mediante inmovilización no covalente

3.1. Material ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻

3.1.1. Antecedentes

3.1.1.1. Poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT)

El poli(3,4-etilendioxitiofeno) o PEDOT es uno de los polímeros conductores más ampliamente estudiados para el desarrollo de materiales electroactivos debido a atributos como su estabilidad térmica y electroquímica, su alta conductividad, resistencia a la humedad, transparencia óptica y bajo potencial de oxidación. Sus propiedades mecánicas y eléctricas están altamente ligadas al contraíón u otros dopantes secundarios y los hacen candidatos atractivos para el desarrollo de dispositivos bioelectrónicos, sensores, capacitores, baterías recargables, celdas fotovoltaicas y fotodiodos debido sus propiedades fisicoquímicas dinámicas, biocompatibilidad, capacidad de retención de la conductividad y la facilidad que ofrecen para la funcionalización; adicionalmente posee habilidad de carga/descarga reversible.⁸¹

El PEDOT puede ser sintetizado mediante la polimerización del monómero etilendioxitiofeno (EDOT), ambas estructuras se presentan en la Figura 10. El proceso de polimerización puede ser realizado mediante oxidación química, fase vapor y más comúnmente a través de electropolimerización;⁸² a partir de los métodos de síntesis electroquímica es posible la obtención de películas conductoras delgadas con mejores características de adhesión, conductividad y estabilidad.⁸¹

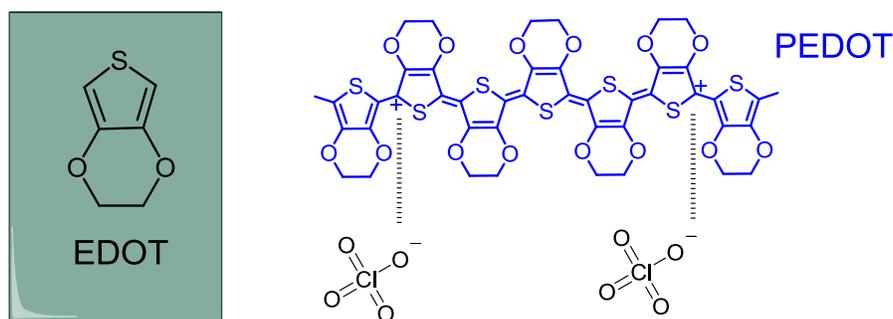


Figura 10. Estructuras químicas del monómero EDOT y del polímero PEDOT:ClO₄⁻.

3.1.1.2. Óxido de indio y estaño (ITO)

El óxido de indio dopado con estaño (ITO, por sus siglas en inglés) es uno de los óxidos conductores más empleado en el desarrollo de películas delgadas transparentes. Debido a su excelente estabilidad y propiedades es comúnmente estudiado bajo el enfoque de la electroquímica, fotoelectroquímica y electrocatálisis. Su desempeño óptico y electrónico puede ser ajustado para promover desempeños específicos a partir de su combinación con otros materiales de interés en el área de la optoelectrónica,^{83, 84} por ello, es común el estudio de compósitos enriquecidos con polímeros conductores como el PEDOT.

Los óxidos metálicos, como el ITO, son comúnmente soportados en sustratos de vidrio para facilitar su aplicación como electrodos. En este sentido, dichos electrodos vidrio-ITO resultan ser alternativas eficientes para la preparación de películas de PEDOT mediante el proceso de electropolimerización, en los cuales además facilitan la obtención de materiales compuestos de alto rendimiento y reciclables.⁸⁵

3.1.1.3. Alcohol polivinílico (PVA)

El PVA es un polímero sintético que se distingue por la versatilidad de sus aplicaciones. Es un polímero lineal con aspecto de polvo blanco, semicristalino, inodoro e insípido, con asombrosas propiedades ópticas y alta resistencia dieléctrica. La obtención de este polímero tiene lugar a partir de la polimerización de monómeros de acetato de vinilo con la posterior saponificación para la final obtención del polímero con distintos grados de desacetilación. Los atributos fisicoquímicos y mecánicos son regidos por la presencia de los grupos -OH ramificados de la cadena central (Figura 11). A partir de diversas técnicas de procesamiento es posible obtener hidrogeles, membranas, películas delgadas, esferas, fibras y nanofibras.^{86, 87} A partir de diversos compósitos basados en PVA se han desarrollado aplicaciones orientadas al desarrollo de optoelectrónicos, biosensores y supercapacitores, entre otros, donde las nanoestructuras de PVA aportan valor agregado dada su alta área superficial.^{88, 89}

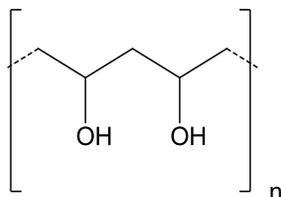


Figura 11. Estructura química del alcohol polivinílico (PVA).

3.1.1.4. Materiales electroactivos PVA/PEDOT

La combinación de NF-PVA y polímeros conductores, como el PEDOT es de especial interés para el desarrollo de materiales con propiedades electroquímicas. El electrohilado de mezclas PVA/PEDOT se ha llevado a cabo de manera eficaz con el propósito de ejercer mayor control en la topografía de los materiales compuestos, produciendo heteroestructuras tipo núcleo-coraza. Así, las colecciones de NF-PVA han resultado novedosas plataformas que facilitan la obtención de materiales con comportamiento electroquímico reversible, microestructura controlada y, adicionalmente, previenen el deterioro de la película de PEDOT.^{60, 90, 91}

No obstante, el electrohilado de compósitos PVA/PEDOT es una estrategia que puede reducir el desempeño electroquímico del polímero conductor como resultado de su internalización en la matriz de PVA. A diferencia de los métodos reportados, en este capítulo se detalla la preparación de compósitos NF-PVA/PEDOT obtenidos a partir de la funcionalización no covalente mediante la electropolimerización de PEDOT sobre la superficie de las NF-PVA. Dicha estrategia permite la obtención de materiales electroactivos ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻ tipo multicapa, como se ilustra en la Figura 12. La distribución de PEDOT:ClO₄⁻ sobre la superficie de las NF-PVA favorece la actividad electroquímica del compósito final.

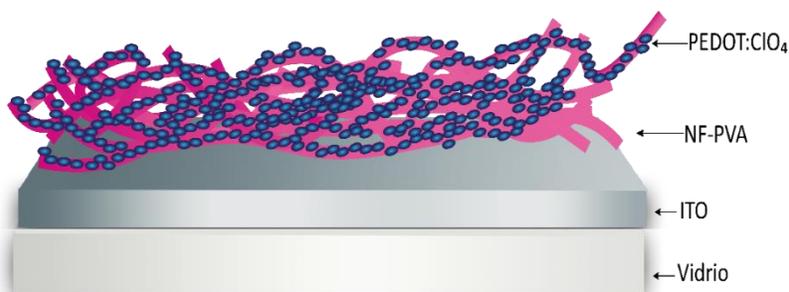


Figura 12. Esquema del material compuesto ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻.

3.1.2. Hipótesis

Los electrodos de vidrio-ITO pueden ser modificados con NF-PVA al utilizarse como colectores durante el proceso de electrohilado. Los electrodos compuestos vidrio-ITO/NF-PVA promoverán la deposición de PEDOT:ClO₄⁻ mediante la técnica de electropolimerización; la microarquitectura de las NF-PVA soportadas en los sustratos de vidrio-ITO inducirán la organización del PEDOT:ClO₄⁻ durante el proceso de electrosíntesis.

3.1.3. Metodología

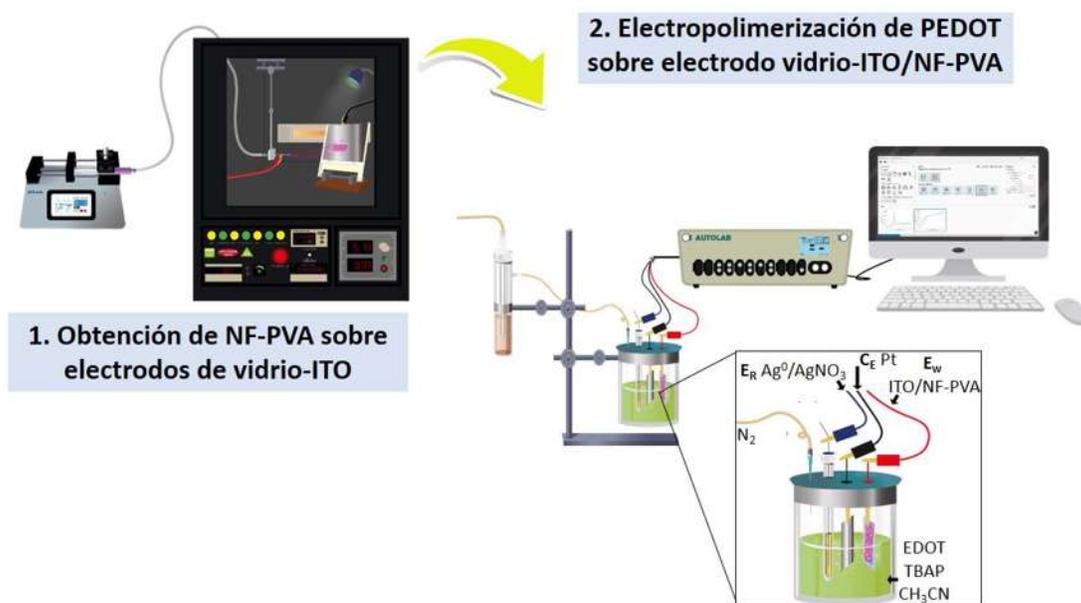


Figura 13. Metodología para la obtención de los materiales compuestos ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻.

3.1.4. Resultados

La preparación del material compuesto se inició realizando el electrohilado de PVA directamente sobre electrodos de ITO, empleados a manera de colector. Se realizaron variaciones en el tiempo de trabajo de 0.5 a 9 h con el propósito de obtener sustratos de distintos espesores; la Figura 14 muestra electrodos ITO/NF-PVA representativos, la morfología de las NF-PVA depositadas sobre el sustrato de ITO y la muestra control.

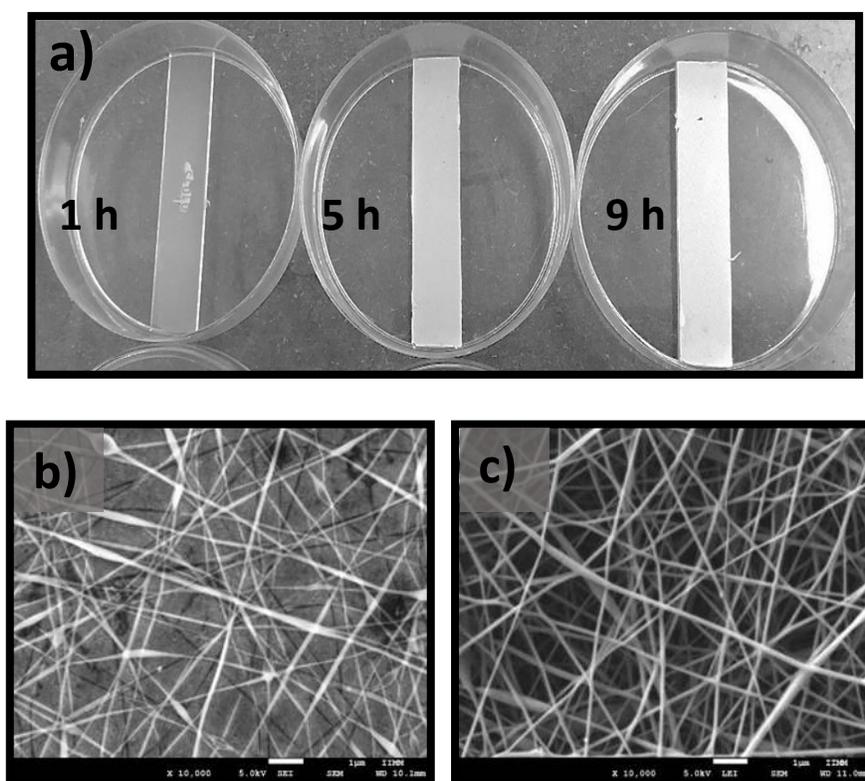


Figura 14. a) Electrodo vidrio-ITO recubierto con NF-PVA; imágenes de FE-SEM de b) NF-PVA colectada sobre sustrato de ITO (5 h) y c) NF-PVA control.

El análisis de los sustratos ITO/NF-PVA mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FE-SEM), Figura 15, corroboró la distribución uniforme de las NF-PVA con diámetros promedio de 163 nm, estas integran estructuras superpuestas de

manera aleatoria con un bajo contenido de defectos que pueden ser atribuidos a la interferencia en la dispersión de la densidad electrostática ejercida por el sustrato de vidrio del electrodo de ITO.

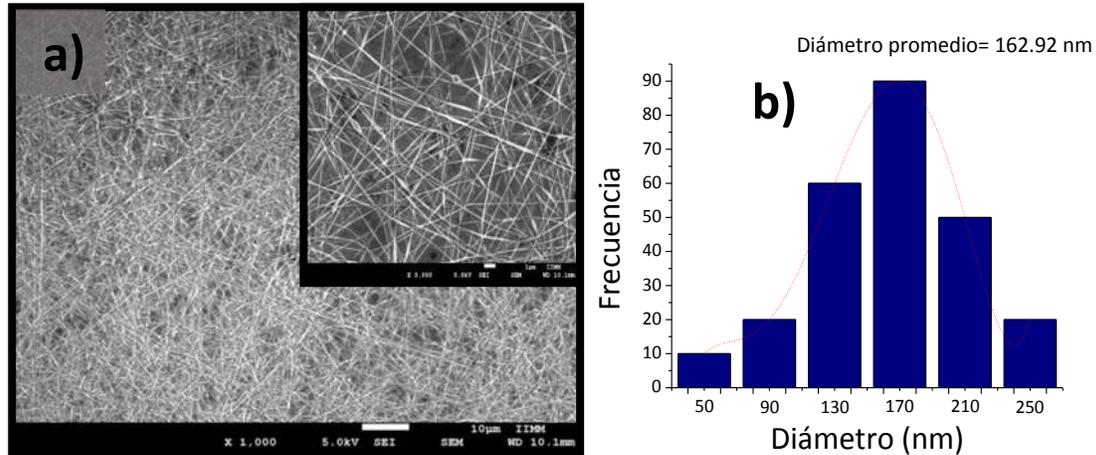


Figura 15. a) Imágenes de FE-SEM del electrodo de ITO recubierto con NF-PVA (5 h) y b) histograma de distribución de diámetro de las NF-PVA.

En el mapeo elemental de la Figura 16 se aprecia la distribución homogénea de los componentes del ITO, los cuales proporcionan una conductividad suficiente a la colección de NF-PVA haciendo posible su observación microscópica prescindiendo de su recubrimiento por erosión catódica previa. En la Figura 16 también se aprecia el espectro EDS del electrodo ITO/NF-PVA, el cual muestra las energías de enlace correspondientes a Sn e In debido al óxido metálico dopado y contribuciones del polímero PVA a través las energías de C y O, además de las componentes al sustrato de vidrio (K, Na, Mg).

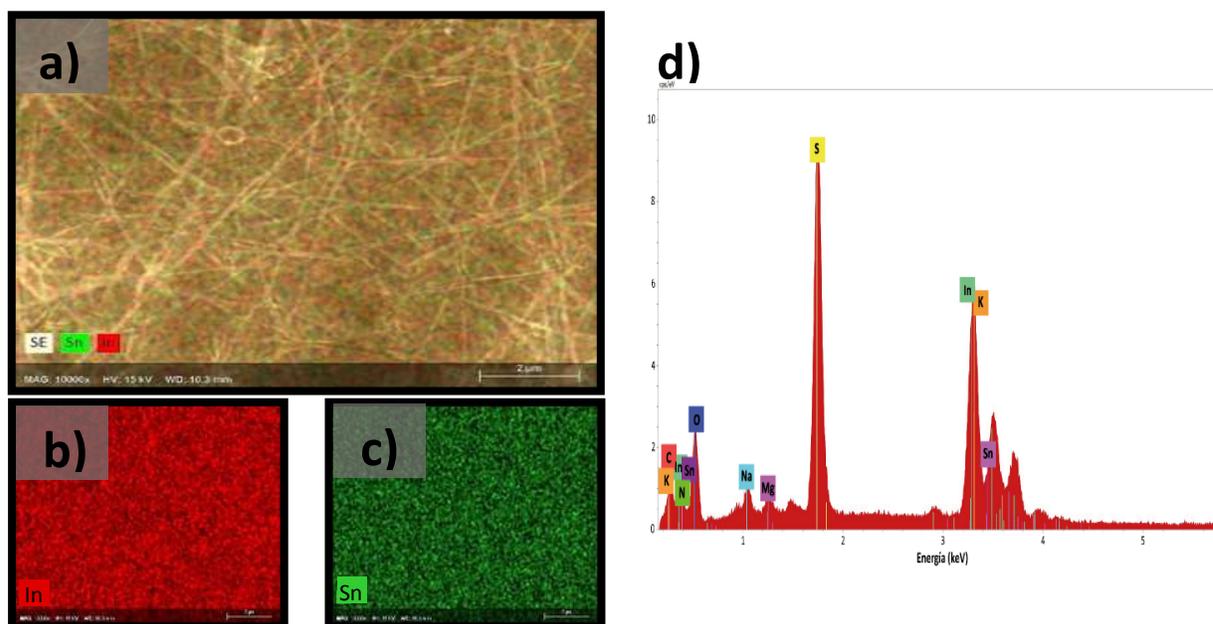


Figura 16. a) Mapeo elemental obtenido del análisis FE-SEM del electrodo de ITO recubierto con NF-PVA, b) mapeo de In, c) mapeo de Sn y d) espectro EDS de la misma muestra (5 h).

Posteriormente, se realizó la evaluación del proceso de electropolimerización del monómero EDOT para la obtención del material compuesto ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻. La preparación electroquímica de PEDOT involucra la oxidación de los monómeros EDOT en la superficie del electrodo de trabajo, la reacción de polimerización ocurre a través de la electrooxidación de EDOT mediante la formación de cationes radicales del monómero (EDOT^{•+}) promoviendo la formación del dímero, oligómeros y finalmente dando lugar al polímero estabilizado por contraiones perclorato (PEDOT:ClO₄⁻), el mecanismo se detalla en la Figura 17. La compleja estructura resultante de este proceso es referida en la literatura como una película azul.⁸⁵ En concordancia con esta descripción, los sustratos modificados ITO/NF-PVA presentaron variación importante de color y textura después de la deposición del polímero conductor PEDOT:ClO₄⁻, como se aprecia en la Figura 18.

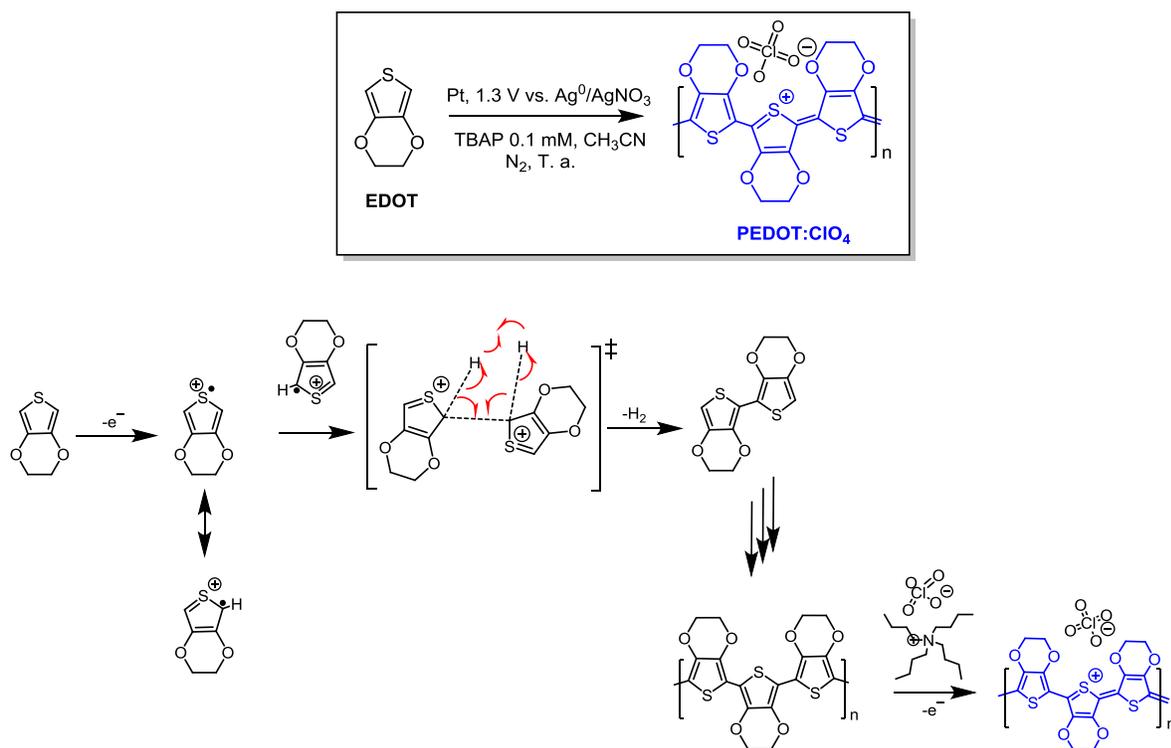


Figura 17. Condiciones de electropolimerización de PEDOT:ClO₄⁻ y mecanismo.

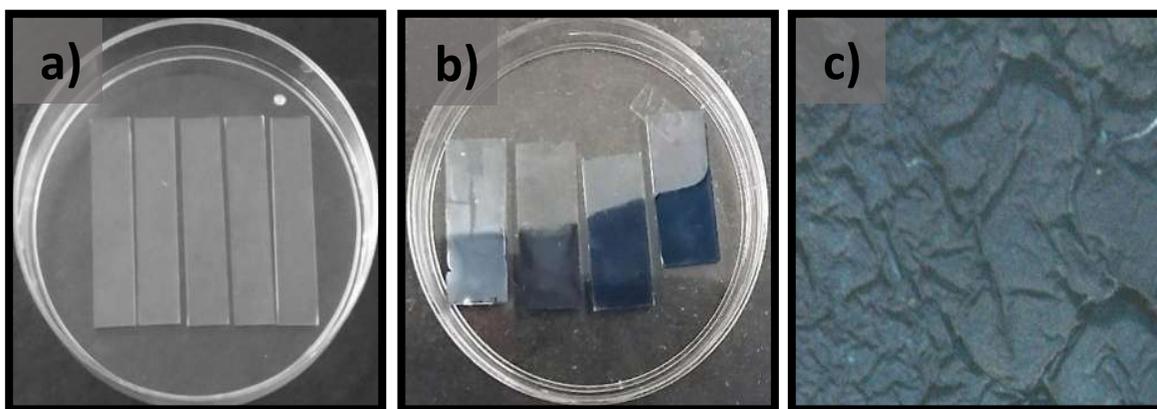


Figura 18. Fotografías de los electrodos de ITO recubiertos con NF-PVA a distintos tiempos de electrohilado a) antes y b) después de la electropolimerización de PEDOT (tiempo de electrohilado: izquierda a derecha 5, 2, 1, 0.5 h); c) fotografía de microscopio óptico del material ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻ (5 h).

La polimerización de PEDOT y su electrodeposición sobre los sustratos ITO/NF-PVA procede de manera simultánea; las variaciones en el espesor de la matriz de PVA repercuten en la tonalidad de la película de PEDOT, siendo más tenue en los electrodos recubiertos a mayor tiempo de trabajo (Figura 18b). La polimerización y deposición de PEDOT:ClO₄⁻ sobre los sustratos ITO/NF-PVA obtenidos a 0.5, 1, 2 y 5 h de electrohilado se monitoreó mediante voltametría cíclica, el voltamperograma representativo se presentan en la Figura 19, el material ITO/NF-PVA obtenido a 9 h de electrohilado fue descartado debido a la alta densidad de la colección de NF-PVA.

Las curvas obtenidas mediante potenciodinámica se componen por la variación de corriente en función del potencial aplicado, los cuatro electrodos analizados (0.5 a 5 h de electrohilado) presentan el comportamiento electroquímico característico de materiales electroactivos de base PEDOT. En el grupo de voltamperogramas de la Figura 19 se aprecia el pico de potencial de oxidación de EDOT en 1.15 V, que refiere el proceso de crecimiento de PEDOT:ClO₄⁻.⁸⁵ Por otra parte, la forma cuasi rectangular simétrica que exhiben los curvas de voltametría cíclica indican la reversibilidad electroquímica de los materiales ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻, hecho que se asocia al transporte de carga.⁹⁰

Los electrodos ITO/NF-PVA a 0.5 y 1 h de electrohilado presentan mayor eficiencia para la polimerización de PEDOT:ClO₄⁻, al exhibir mayor densidad de corriente a 1.15 V se infiere mayor contenido del polímero conductor. Asimismo, puede apreciarse que la densidad de corriente disminuye conforme aumenta el tiempo de electrohilado de PVA (2 y 5 h); debido a la menor superficie de ITO expuesta para la electrodeposición de PEDOT:ClO₄⁻ su contenido es menor.

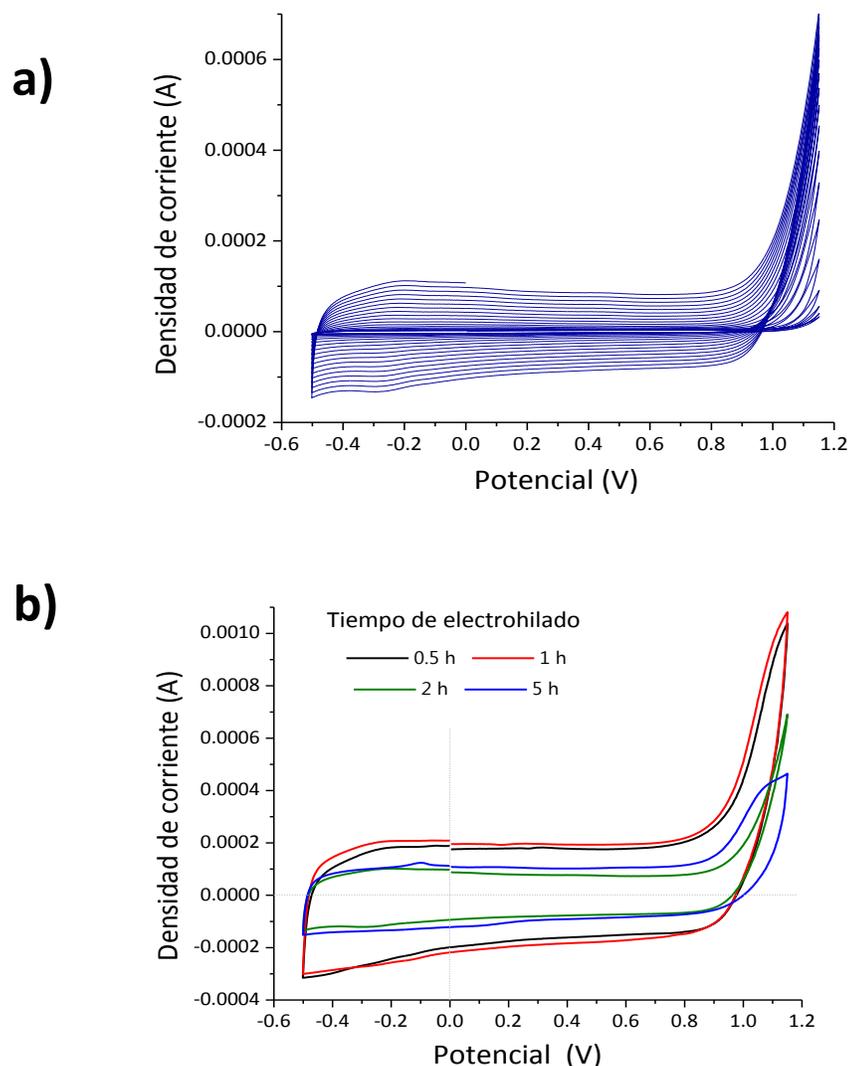


Figura 19. Voltamperogramas de a) 20 ciclos de electropolimerización de PEDOT:ClO₄⁻ sobre el sustrato ITO/NF-PVA obtenido a 2 h de electrohilado y b) ciclo 20 del proceso de polimerización de PEDOT de los compósitos obtenidos a distinto tiempo de electrohilado.

Adicionalmente, se realizaron ciclos de carga-descarga a los cuatro materiales compuestos, los que se muestran en la Figura 18. En los cronopotenciogramas se puede apreciar una perturbación en la forma triangular durante la descarga. Dicha alteración es causada por la resistencia interna del electrodo, que suele ser denominada *iR-drop*.⁹⁰ Observando la Figura 20, es posible inferir que el incremento en el tiempo de electrohilado favorece la disminución de la resistencia interna apreciándose la ausencia del *iR-drop* en el

material ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻ obtenido a 5 h de electrohilado (gráfico azul), el cual en el voltamperograma de la Figura 19 presenta menor concentración del polímero conductor.

La disminución del tiempo de electrohilado de PVA repercute en la velocidad de liberación de carga. Comparando las curvas de carga-descarga es posible apreciar que a menor tiempo de electrohilado el tiempo de propagación de carga es menor, es decir la descarga procede más rápidamente. Comparando los ciclos de carga-descarga de los cuatro compósitos analizados es posible inferir mayor habilidad de retención de carga en el compósito ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻ con 5 h de electrohilado. Esta habilidad está asociada a mayor capacidad de almacenamiento de energía en microcompósitos y proyecta a la capacidad del material para el desarrollo de supercapacitores.⁶⁰

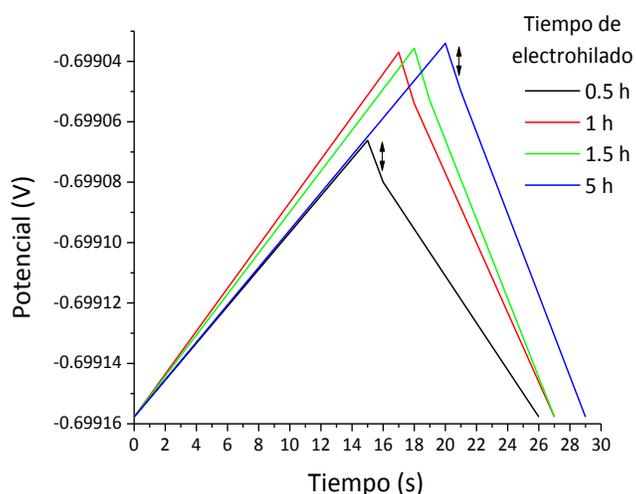


Figura 20. Ciclos de carga-descarga de los materiales ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻.

En la Figura 21 se comparan los espectros de absorción UV-Vis de los cuatro materiales ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻ en fase conductora y neutra. En el grupo de espectros en fase conductora (Figura 21a), se aprecian dos bandas de absorción: la primera, ubicada a 294 nm/ $\lambda_{\text{máx}}$ corresponde a las transiciones del sustrato ITO, mientras que la banda de absorción de 362 nm/ $\lambda_{\text{máx}}$ es atribuida a la presencia de los aniones ClO₄⁻.⁹² En la fase de neutra, o fase de descarga de la Figura 21b, los materiales ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻ reflejan cambios importantes respecto a la fase de conductora. Este conjunto de espectros presenta

como tendencia dos bandas de absorción: la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ a 600 nm/ $\lambda_{\text{máx}}$,⁹³⁻⁹⁵ y a 900 nm/ $\lambda_{\text{máx}}$ la banda atribuida a deformaciones estructurales en el polímero conductor PEDOT como consecuencia del transporte de carga.⁹² El tiempo de electrohilado de PVA sobre los sustratos de vidrio-ITO influye en la intensidad de las bandas de absorción, siendo evidente que al incrementar el tiempo de electrohilado disminuye la absorbancia del compuesto en la fase conductora.

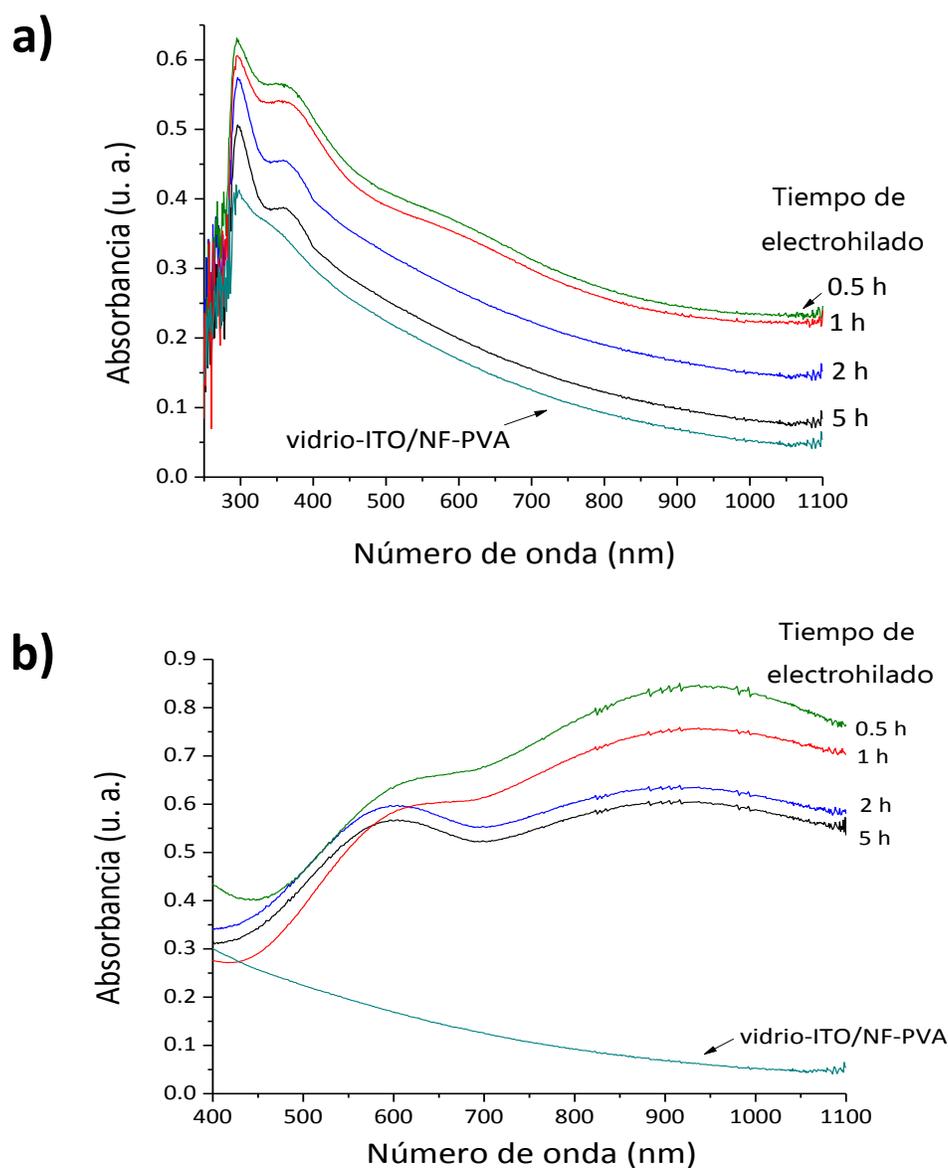


Figura 21. Espectros de absorción UV-Vis de los materiales ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻ en fase a) conductora y b) neutra.

En la Figura 22 se comparan las imágenes de FE-SEM del sustrato ITO/NF-PVA y el material ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻ obtenidos a 5 h de electrohilado. Es posible apreciar que la colección de NF-PVA es una matriz que permite la incorporación uniforme del polímero conductor PEDOT, la deposición de PEDOT:ClO₄⁻ no está confinada a la superficie de la matriz de PVA sino que se distribuye sobre la microarquitectura integrada por las NF-PVA sin que el proceso deteriore la estructura nanométrica ni la porosidad.

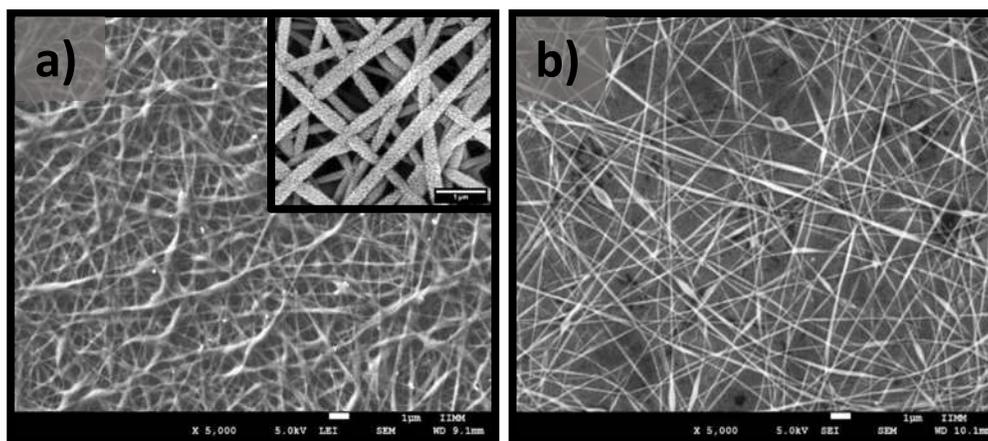


Figura 22. Imágenes de FE-SEM del electrodo de ITO/NF-PVA (5 h) a) antes y b) después de la electropolimerización de PEDOT:ClO₄⁻.

Este hecho demuestra además, la utilidad del sustrato de NF-PVA como plataforma para la obtención de nanoarquitecturas de polímeros orgánicos y expande su potencial aplicación hacia el ámbito de los materiales electrónicos flexibles.

3.1.5. Conclusiones del capítulo

- Los electrodos de ITO son colectores eficientes para el electrohilado de PVA; el proceso de obtención de colecciones de nanofibras procede de manera comparable a las condiciones estándar.
- La microarquitectura integrada por las NF-PVA sobre los electrodos de ITO induce la organización de PEDOT:ClO₄⁻ durante el proceso de electropolimerización integrando nanoestructuras del polímero conductor. Con base en los resultados de los ciclos de carga-descarga, este hecho aumenta la electroactividad del compósito ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻.
- La combinación de la técnica de electrohilado y electropolimerización integran una estrategia efectiva y novedosa para la fabricación de electroactivos ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻ mediante funcionalización no covalente con potencial aplicación en almacenamiento de energía.

Capítulo IV.

Funcionalizaciones post-electrohilado mediante inmovilización covalente

4.1. Materiales bioconjugados con colágeno tipo I

4.1.1. Antecedentes

4.1.1.1. Colágeno (COL)

El término colágeno (COL) denomina a una superfamilia de macromoléculas que incluye más de 50 tipos de colágeno y proteínas tipo colágeno. Los distintos tipos de colágeno existen como estructuras jerárquicas formadas por largas fibras que a su vez son integradas por fibrillas compuestas a partir de una hélice triple de secuencias peptídicas específicas, Figura 23. Desde el punto de vista biomecánico, son de mayor interés los colágenos fibrosos tipo I, II y III.

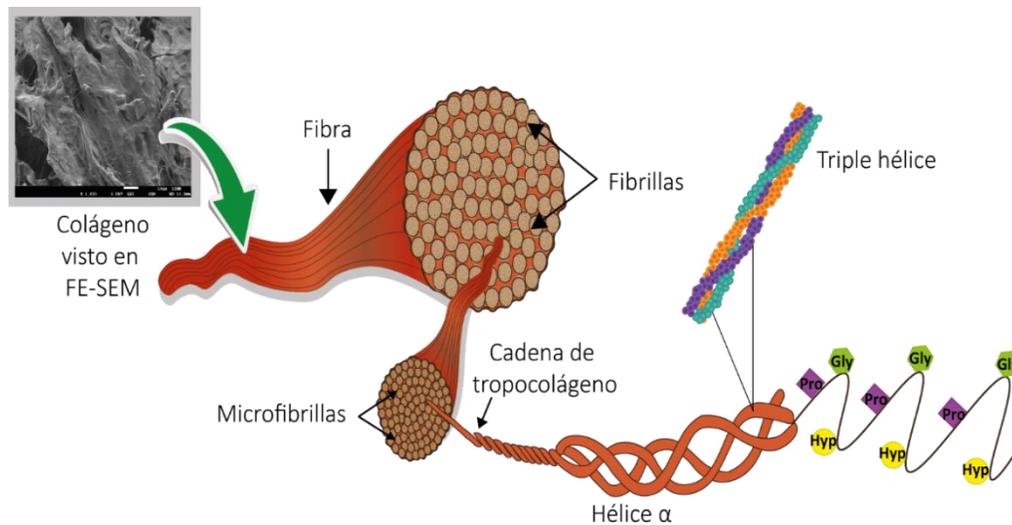


Figura 23. Composición de las fibras de colágeno.

El COL tipo II se encuentra distribuido en tejidos específicos y casi limitado al tejido cartilaginoso; el COL tipo III solo se encuentra en tejidos relativamente elásticos como piel embrionaria, pulmones y vasos sanguíneos. Por su parte, el COL tipo I está presente en piel, tendones, huesos, córneas, pulmones y tejido vascular principalmente, siendo la proteína más abundante en los mamíferos y el principal componente extracelular de diversos tipos de tejido.

Sus extraordinarias propiedades mecánicas le confieren importantes actividades en los distintos tejidos, por ejemplo: en tendones y ligamentos el COL es el encargado de transmitir la fuerza del músculo hacia el hueso, en tejido óseo y dentina es responsable de la resistencia a la fractura, la matriz rica en COL que rodea a las células contráctiles en piel y vasos sanguíneos propicia la función eficiente de éstos. Sin embargo, la función del COL no solo se limita a aportar estabilidad mecánica; la disposición ordenada de las fibrillas de colágeno confiere transparencia a la córnea del ojo.

Los compósitos base COL existen de manera natural en los mamíferos enriqueciendo las matrices extracelulares y proporcionando valor agregado para el tejido específico, por ejemplo: minerales y proteoglicanos.^{96, 97} Debido a que es el principal componente de la matriz extracelular, la obtención de soportes para cultivo celular y regeneración tisular basados en COL ha sido ampliamente estudiada, siendo posible el procesamiento de compósitos de este biopolímero para la obtención de andamios porosos,⁹⁸ hidrogeles⁹⁹ y nanofibras.¹⁰⁰

Tomando en cuenta que el electrohilado es la técnica más adecuada para la obtención de nanofibras, aunado al conveniente carácter que posee el COL para la generación de biomateriales, el electrohilado de este biopolímero se ha vislumbrado como una estrategia de gran impacto en la ingeniería de tejidos. Existen reportes de una extensa gama de materiales de base COL obtenidos a través de electrohilado, entre los más populares destacan las combinaciones con hidroxiapatita,¹⁰¹ elastina,¹⁰² policaprolactona (PCL),¹⁰³ ácido poliláctico (PLLA)¹⁰⁴ y alcohol polivinílico (PVA).¹⁰⁵

Si bien los resultados de ensayos *in vitro* e *in vivo* de los materiales compuestos con nanofibras de COL han dado buenos resultados para el cultivo celular, aspectos como la inesperada alta solubilidad de los soportes en agua o medios fisiológicos han expuesto el riesgo que implica el procesamiento de COL para la obtención de colecciones de nanofibras. Debido a su baja solubilidad, su electrohilado está condicionado al procesamiento de sus disoluciones en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) o 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), disolventes que otorgan buena electrohilabilidad pero comprometen la estabilidad de su

unidad fundamental: la triple hélice.^{100, 106, 107} Este hecho exhorta al estudio de estrategias, como su inmovilización covalente o no covalente, las cuales son más convenientes para la incorporación de COL a nanoestructuras sin comprometer su estabilidad. Tales estrategias son promisorias alternativas cuyo objetivo principal es preservar la bioactividad de este biopolímero permitiendo su potencial uso en andamios celulares avanzados y dispositivos biomédicos como córneas sintéticas.¹⁰⁸

En este sentido, polímeros de alta citocompatibilidad como el quitosano (CTS) y el PVA son candidatos adecuados para el estudio de bioconjugaciones covalentes ya que poseen en su estructura grupos funcionales susceptibles a amidación y esterificación que puede ser promovida mediante el uso de carbodiimidas y agentes de transferencia.

4.1.1.2. Quitosano (CTS)

El término quitosano (CTS) hace referencia a una familia de copolímeros lineales derivados de la quitina, constituidos por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina distribuidas de manera aleatoria y unidas mediante enlaces glucosídicos β -1,4 (Figura 24), diferenciándose por el contenido de D-glucosamina dependiendo del grado de desacetilación. En general, el término CTS hace referencia a polímeros tipo aminopolisacáridos de carácter policatiónico que presentan gran interés por sus propiedades físicas y químicas.^{109, 110} La solubilidad del CTS es fuertemente dependiente del pH, la presencia de grupos amino primarios libres en las unidades de D-glucosamina posibilita la protonación del polímero favoreciendo su solubilidad, por lo cual la preparación de disoluciones de este biopolímero en medio ácido ha sido ampliamente reportada con fines de explorar su procesamiento.¹¹¹

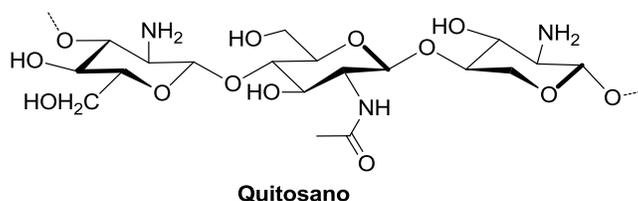


Figura 24. Estructura química del CTS.

El procesamiento de CTS y sus mezclas con otros polímeros ha dado lugar a la obtención de materiales como hidrogeles, membranas, micro/nanopartículas, andamios, esponjas y nanofibras, destinados a diversas aplicaciones biomédicas entre las que destacan los sistemas de distribución de genes y fármacos, recubrimientos antimicrobianos para heridas, así como andamios para la ingeniería de tejidos. El alto valor biotecnológico que presenta el CTS en el ámbito de la biomedicina y especialmente en la ingeniería de tejidos, es motivado por la capacidad que posee para proveer entornos tridimensionales que mimetizan las matrices extracelulares naturales, entorno que favorece el cultivo de tejidos, además de estimular la proliferación celular e inducir la histoarquitectura. Adicionalmente al efecto hemostático ya conocido, se ha reportado que aumenta la actividad tumoricida de los macrófagos y la capacidad de regular la secreción de mediadores inflamatorios bloqueando terminales nerviosas y por consiguiente reduciendo la sensación de dolor.¹¹²

Con el propósito de mejorar o sumar propiedades específicas al CTS, se ha investigado su modificación química, generalmente realizando injertos de moléculas pequeñas en los grupos adyacentes a la cadena central. El CTS presenta tres tipos de grupos funcionales nucleofílicos: un grupo $-NH_2$ en el C-2, un grupo $-OH$ secundario en el C-3 y un $-OH$ primario en el C-6. La mayoría de las funcionalizaciones tienen como objetivo propiciar la solubilidad o aumentar el efecto antimicrobiano. Entre los grupos funcionales que se pueden insertar su estructura destacan: alquilos, alquilos de cadena larga, arilos, tioles, guanidilos, aminoácidos y péptidos así como derivados de amonio.¹¹³

El procesamiento de las disoluciones de CTS a nanofibras no es un procedimiento trivial debido a su baja electrohilabilidad. En general, las metodologías para el electrohilado

de CTS se basan en dos estrategias: la más usual es la preparación de mezclas de CTS y polímeros generalmente sintéticos de alta electrohilabilidad, como el PVA, ácido poliláctico (PLA), óxido de polietileno (PEO),¹¹⁴ entre otros, sin embargo, la concentración de CTS en el compósito final suele ser inferior al 2%p/p.^{115, 116} La segunda estrategia recurre al uso de disolventes y mezclas de disolventes capaces de romper la estructura cristalina, específicamente ácido trifluoroacético/diclorometano (ATF/DCM) o disoluciones de ácido acético al 90%v/v. Si bien la mezcla de ATF/DCM da lugar a soportes nanoestructurados de calidad, la formación del trifluoroacetato de CTS confiere alta solubilidad a los sustratos y limita su uso en medios acuosos o disoluciones fisiológicas. A su vez, el procesamiento de CTS en ácido acético concentrado es condicionado a sus variedades de menor peso molecular, las cuales requieren un tratamiento alcalino para reducir su viscosidad, procedimiento que puede reducir el grado de acetilación.^{110, 114} Otros métodos indirectos para la obtención de nanofibras de CTS son el procesamiento de quitina y su subsecuente tratamiento para la desacetilación combinado tratamiento alcalino (NaOH) y alta temperatura o irradiación gamma en disoluciones de HFIP.^{117, 118}

La exploración de condiciones eficientes para el electrohilado de disoluciones de CTS de medio a alto peso molecular continúa siendo una asignatura pendiente. La anhelada obtención de sus nanoestructuras, sin duda aportaría a aplicaciones biomédicas trascendentales como andamios para la ingeniería de tejidos, dispositivos diversos y materiales de relevancia en el medioambiente como membranas para tratamiento de aguas residuales y desalinización o filtros purificadores de aire.

4.1.1.2.1. Materiales híbridos CTS/COL

Las combinaciones de CTS y COL son de gran importancia, si bien esta combinación no ocurre en la naturaleza, los materiales compuestos CTS/COL presentan varias ventajas: como potencial condrogénico y osteogénico, en regeneración de tejido nervioso, en la inducción de regeneración muscular, así como en sistemas de suministro de fármacos.

En general, la adición de COL a materiales de CTS ha dado como resultado superficies bioactivas en forma de geles, películas y esponjas que influyen en el comportamiento celular.¹¹⁹

La obtención de colecciones de nanofibras de combinaciones CTS/COL se ha explorado siempre empleando disolventes que pueden desnaturalizar la estructura bioactiva del COL,¹²⁰ este hecho destaca la necesidad de realizar otro tipo de protocolos para la inclusión segura del COL como pueden ser retención física, entrecruzamiento o modificaciones superficiales covalentes.^{106, 108, 121}

4.1.1.3. Alcohol polivinílico (PVA)

En materia de biomateriales, el PVA es un polímero sintético altamente valorado por su facilidad para el procesamiento, la variedad estructural de sus materiales y su carácter biodegradable y citocompatible. La combinación con biopolímeros, fármacos y macromoléculas bioactivas han permitido el desarrollo de andamios celulares, sistemas de liberación de fármacos y prótesis sintéticas.¹²² Debido a la inexistente bioactividad del PVA, se han llevado a cabo procedimientos de retención mediante de moléculas bioactivas interacciones electrostáticas o por enlace de hidrógeno con nanopartículas metálicas, óxidos metálicos u óxido de grafeno con el propósito de enriquecer sus estructuras; a su vez, la transformación química de sus grupos –OH que permite la inserción de funciones acetilo, carbamato, éter, éster e incluso modificaciones para estrategias de química *click*.⁸⁶

4.1.1.3.1. Materiales híbridos PVA)/COL

El procesamiento de compósitos integrados por PVA/COL ha dado resultados favorables en materia de andamiaje celular, la combinación tiene como objetivo aumentar las propiedades mecánicas y flexibilidad en el compósito obtenido del electrohilado, propiedades que suelen reducirse en las nanofibras de COL.¹²³

Los compósitos finales obtenidos de la combinación PVA/COL presentan atributos favorables, como la mayor elasticidad de los materiales, que afecta directamente la adherencia, proliferación y diferenciación celular.¹⁰⁵ No obstante, el tipo de disolvente que solubiliza y dota de un entorno dieléctrico adecuado al COL es el mismo que compromete su integridad fisicoquímica.

Por lo antes expuesto, en este capítulo se estudian estrategias de inmovilización covalente de COL fibroso a partir de protocolos de amidación vía anhídridos mixtos y esterificación para el desarrollo de los biomateriales enriquecidos post-electrohilado NF-CTS/COL y NF-PVA/COL, respectivamente. Para tal propósito, el COL es procesado en su forma fibrosa, evitando su procesamiento en disoluciones, en aras de preservar su estructura bioactiva. Tomando ventaja de la excelente biocompatibilidad que ostentan tanto el CTS como el PVA y la disponibilidad de grupos funcionales $-NH_2$ y $-OH$, la presente propuesta busca aportar alternativas que permitan incorporar al COL fibroso andamios celulares.

4.1.2. Hipótesis

La funcionalización covalente de COL a sustratos integrados por nanofibras de polímeros como el CTS y el PVA es posible vía estrategias de amidación y esterificación asistidas por carbodiimidas y agentes de transferencia. La incorporación de COL fibroso post-electrohilado, suspendido en el medio de reacción, permitirá la obtención de materiales nanoestructurados híbridos citocompatibles con aplicación en ingeniería de tejidos.

4.1.3. Metodología

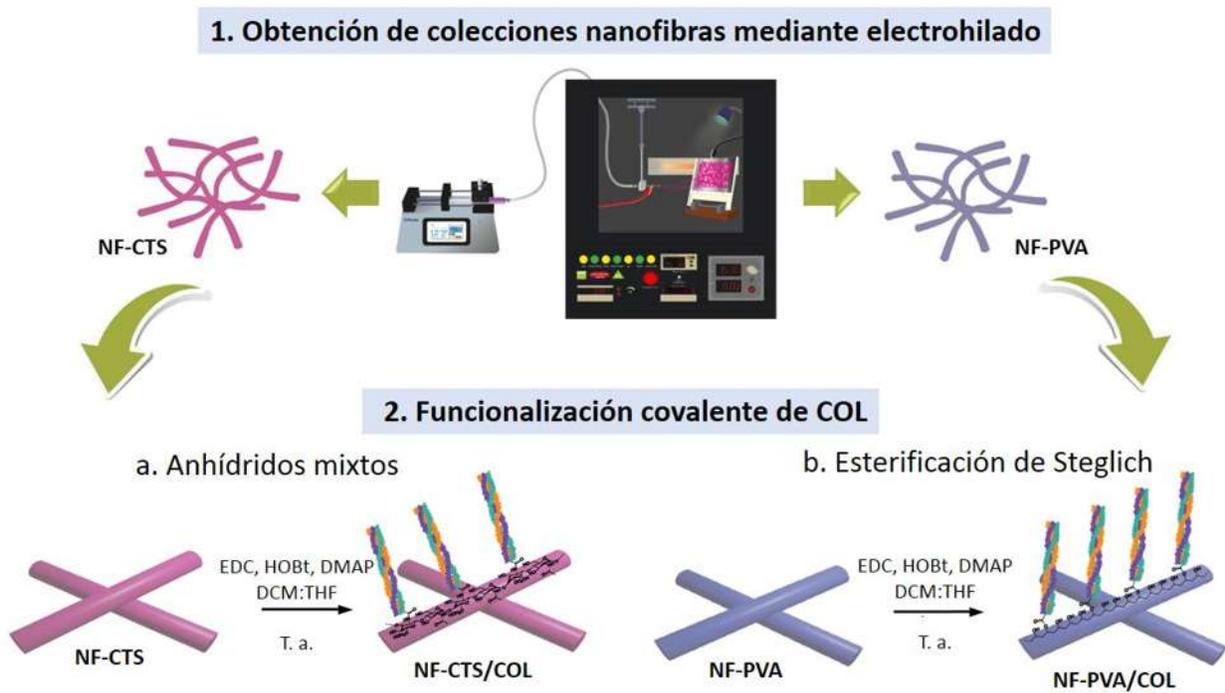


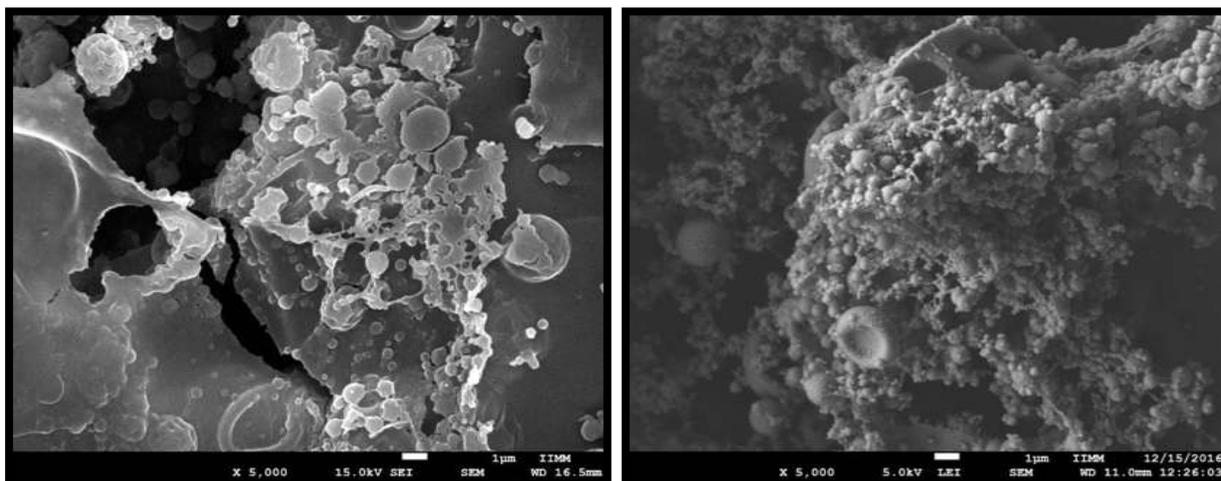
Figura 25. Estrategias de funcionalización post-electrohilado de nanofibras de a) CTS y b) PVA mediante la bioconjugación covalente de COL tipo I.

4.1.4. Resultados

4.1.4.1. NF-CTS/COL

Sustratos nanoestructurados de CTS

Se inició la exploración de los parámetros del proceso de electrohilado de quitosano para la producción de nanofibras de CTS empleando hexafluoroisopropanol (HFIP) como disolvente para una disolución de 0.8%p/v, modificando algunas estrategias reportadas.^{118, 121} Como se observa en la Figura 26, el análisis estructural mediante FE-SEM de los materiales resultantes demuestra la baja electrohilabilidad que presentan las disoluciones de CTS, siendo evidente el alto contenido de defectos y la nula presencia de nanofibras.



Configuración

Voltaje (kV)	19
Distancia (cm)	15
Temperatura (°C)	30
Velocidad de flujo (µL/h)	250
Colector	Fijo
Diámetro de aguja (mm)	0.4

Figura 26. Imágenes FE-SEM después de 8 h de procesamiento en el equipo de electrohilado de las disoluciones de CTS.

Durante el procesamiento de las disoluciones poliméricas electrohilables fue posible apreciar la elongación de la gota polimérica suministrada, dicho estiramiento es conocido como cono de Taylor y es una estructura fundamental para la formación del jet que finalmente da origen a las nanofibras. Sin embargo, durante el procesamiento de las disoluciones que originaron las estructuras de la Figura 26, la elevada volatilidad que presenta el disolvente empleado no favoreció la formación del jet.

En aras de facilitar el procesamiento del CTS mediante la disminución de la velocidad de evaporación del disolvente, se ideó la formación de mezclas con un polímero de arrastre. En 2005, Geng¹¹⁰ y colaboradores reportaron la obtención de nanofibras de CTS empleando disoluciones concentradas de ácido acético, sin embargo éstas presentan alta viscosidad y baja electrohilabilidad, lo que reduce el éxito del procesamiento. Considerando los reportes existentes al respecto, se decidió procesar mezclas de dos disoluciones de CTS preparadas bajo distintas condiciones: la disolución A (CTS 0.8%p/v en HFIP) y la disolución B (CTS 3%p/v en ácido acético 80%v/v). Las mezclas de A y B se denominaron CTS_M, la preparación se detalla en la sección experimental. Empleando la técnica de electrohilado estándar, se procesaron las disoluciones CTS_M en distintas proporciones de la mezclas A:B. Las configuraciones de los parámetros exploradas referentes a la unidad de electrohilado se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de electrohilado de las disoluciones CTS_M.

Parámetro	Muestra I	Muestra II	Muestra III
Mezcla A:B	60:40	70:30	80:20
Conc. CTS (%p/V)	1	1	1
pH	4	4	4
Velocidad de flujo (μL/h)	500	500	500
Distancia (cm)	20	20	20
Temperatura (°C)	ambiente	ambiente	ambiente
Voltaje (kV)	18	18	18
Diámetro de aguja (mm)	0.6	0.6	0.6
Colector	rotatorio	Rotatorio	fijo

En la Figura 27 se muestran las imágenes de FE-SEM de las colecciones de nanofibras obtenidas empleando las configuraciones de la Tabla 2. Se observa un mayor contenido de nanofibras en el soporte nanoestructurado correspondiente a muestra III obtenida del procesamiento de la mezcla CTS_M (A:B en proporción 80:20). La notoria mejoría en la calidad de la arquitectura de los materiales es congruente con la mayor facilidad de procesamiento y la formación continua del jet que esta misma proporción presentó durante el tiempo de electrohilado. Por su parte, la muestra I presenta un alto contenido de imperfecciones, aglomerados poliméricos de tamaño considerable a lo largo de las escasas nanofibras formadas como se aprecia en la Figura 27.

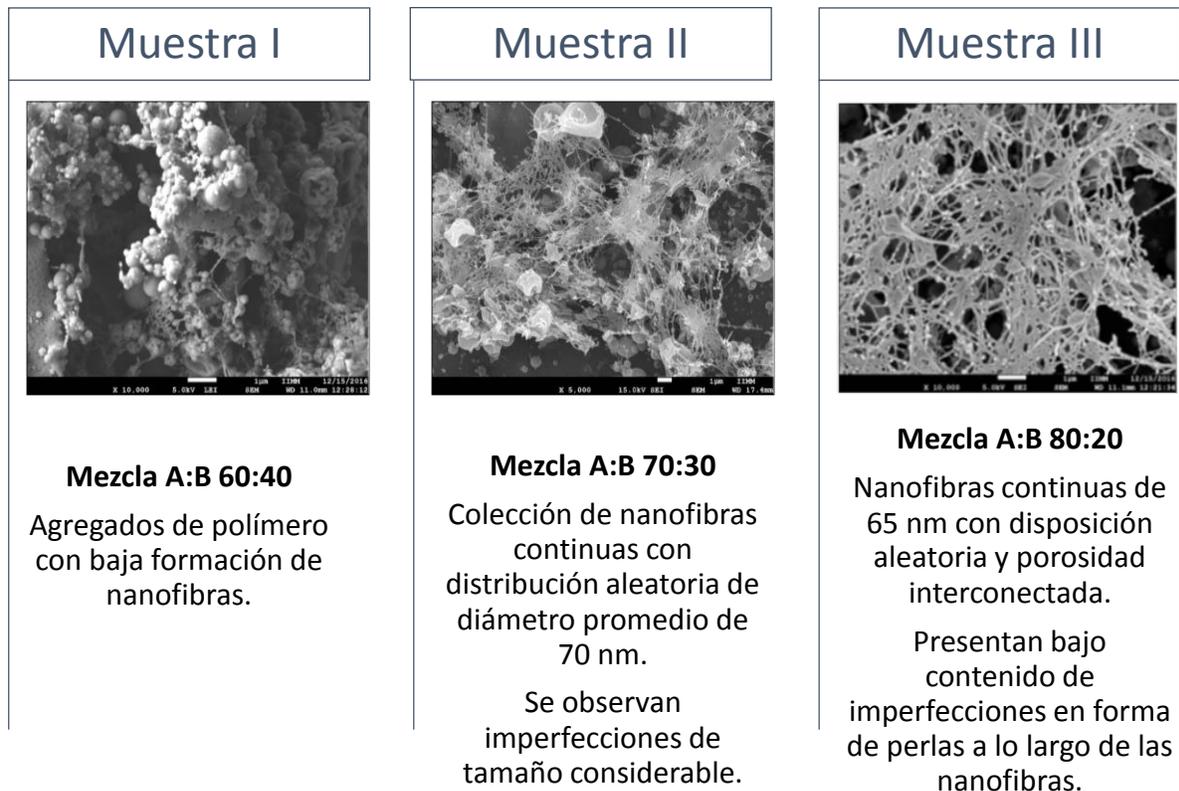
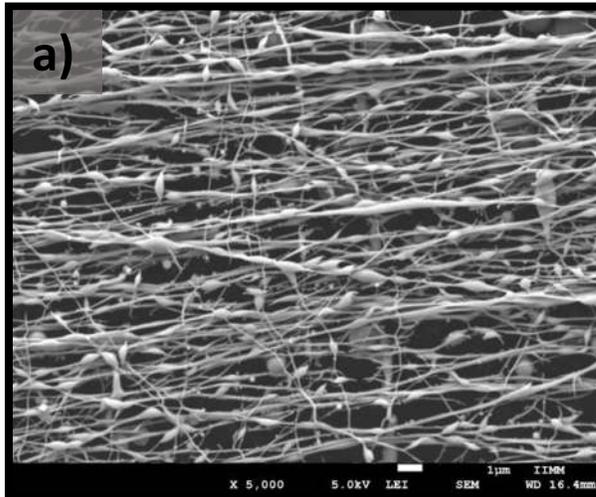


Figura 27. Análisis comparativo de las estructuras observadas en FE-SEM de las muestras I, II y III.

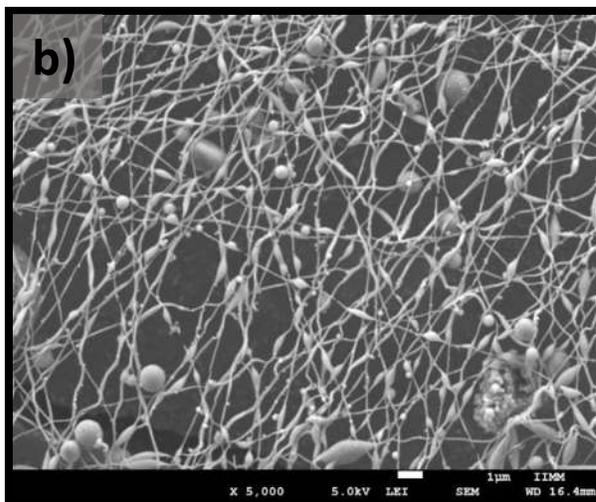
El análisis comparativo de las muestras II y III pone de manifiesto que el aumento en la proporción de A en la mezcla A:B favorece la obtención de sustratos más regulares, logrando disminuir considerablemente las imperfecciones. Aun cuando el contenido de defectos es significativo también puede apreciarse que exhibe mayor contenido de nanofibras con diámetros menores a los 100 nm.

Teóricamente, la viscosidad de la disolución a electrohilar es un factor clave para la producción de nanofibras de buena calidad sin la presencia de defectos; disoluciones de baja viscosidad no permiten la obtención de nanofibras continuas ni de morfología homogénea, mientras que las concentraciones muy altas del polímero también presentan dificultades para el procesamiento. La concentración del polímero repercute en la viscosidad de la disolución, por ello, se decidió modificar la concentración de CTS en las mezclas, ajustando la concentración del polímero a 1.5%p/v directamente en la mezcla de proporción 80:20. El procesamiento de estas disoluciones dio origen a los sustratos de la Figura 28. Comparando las micrografías correspondientes a las muestras IV y V de la Figura 28 se puede apreciar la inducción de la orientación como consecuencia del tipo de colector empleado. La intención de reducir la velocidad de flujo dio origen a nanofibras con menor contenido de defectos a lo largo de cada una de ellas, sin embargo también se originaron defectos de mayor tamaño en el material colectado.

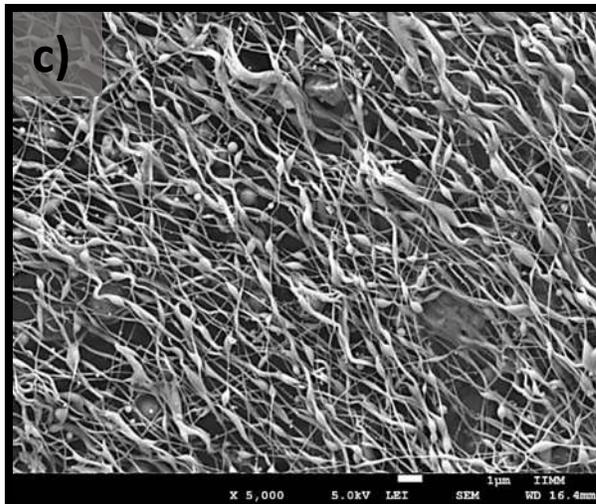
Con respecto a las imágenes de la Figura 28, la muestra VI fue obtenida a partir del aumento de la distancia entre los electrodos, la disminución del voltaje y el aumento de la temperatura a 40°C como estrategia para reducir el contenido de defectos; sin embargo no se obtuvieron los resultados esperados. La temperatura aplicada favorece la rápida evaporación de los disolventes sin permitir el estiramiento de las nanofibras hacia el colector. Derivado de la rápida pérdida del disolvente se observan nanofibras de diámetro mayor a 200 nm.



Muestra IV	
Mezcla A:B	80:20
Conc. CTS (%p/V)	1.5
pH	4
Velocidad de flujo (µL/h)	400
Distancia (cm)	15
Temperatura (°C)	ambiente
Voltaje (kV)	15
Diámetro de aguja (mm)	1
Colector	rotatorio



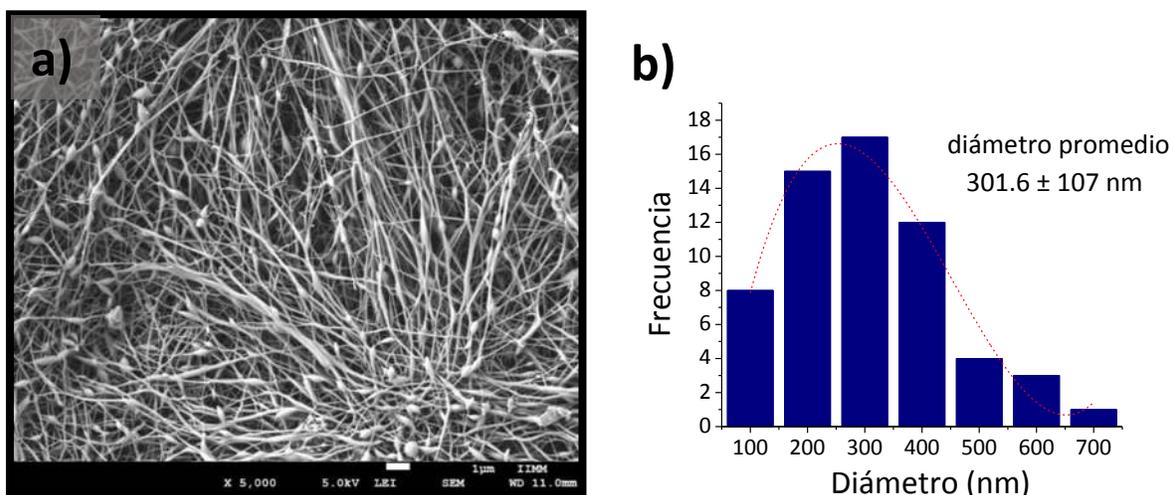
Muestra V	
Mezcla A:B	80:20
Conc. CTS (%p/V)	1.5
pH	4
Velocidad de flujo (µL/h)	300
Distancia (cm)	15
Temperatura (°C)	ambiente
Voltaje (kV)	15
Diámetro de aguja (mm)	1
Colector	fijo



Muestra VI	
Mezcla A:B	80:20
Conc. CTS (%p/V)	1.5
pH	4
Velocidad de flujo (µL/h)	300
Distancia (cm)	17
Temperatura (°C)	40
Voltaje (kV)	12
Diámetro de aguja (mm)	1
Colector	rotatorio

Figura 28. Microfotografías de colecciones de nanofibras de CTS obtenidas a partir de la disolución A:B 80:20 con 1.5%p/v de CTS bajo diferentes configuraciones de electrohilado: muestras a) IV, b) V y c) VI.

A la par, se trabajó una mezcla A:B 80:20 con CTS 2% p/v, bajo la configuración que se resume en la Figura 29, la muestra VII es la colección de NF-CTS que presenta las mejores características de todas las colecciones obtenidas. El empleo de una aguja con diámetro interno menor requirió la disminución de la velocidad de flujo, y para su obtención también fue necesaria la disminución de la temperatura. En la micrografía de la Figura 29a destacan nanofibras más lisas de diámetros cercanos a los 302 nm. A pesar de los defectos existentes a lo largo de las NF-CTS, la obtención de estos sustratos es un logro experimental de alta relevancia para el estudio de sustratos nanoestructurados de CTS puro, ya que estas colecciones de nanofibras son insolubles en medios acuosos a diferencia de los reportados en la literatura.



Muestra VII

Colector	Rotatorio
Flujo (µL/h)	100
Distancia (cm)	17
Temperatura (°C)	30
Voltaje (kV)	12
Aguja (mm)	0.5

Figura 29. a) Microfotografía de colecciones de nanofibras de CTS obtenidas a partir de la disolución A:B 80:20 con 2%p/v de CTS y b) histograma de distribución de diámetro.

El análisis cualitativo EDS de las colecciones de nanofibras de CTS puro de la Figura 30 no indica la presencia de flúor, lo anterior evidencia la ausencia de remanentes del disolvente HFIP empleado para la obtención de las nanoestructuras, lo que elimina el riesgo de citotoxicidad. La información aportada por el espectro EDS es congruente con los resultados de FT-IR comparativos en el espectro de la Figura 30b. La alta solubilidad en medios acuosos que presentan las nanofibras de CTS obtenidas a partir de disoluciones en ATF/DCM es una limitante para la exploración de sus aplicaciones, sin embargo, las colecciones de nanofibras generadas a partir de CTS_M (mezcla A:B en por proporción 80:20) resultan insolubles en: DCM, tetrahidrofurano (THF), agua y los medios de cultivo celular DMEM y McCoys' 5A, facilitando el estudio de sus potenciales aplicaciones en el área biomédica.

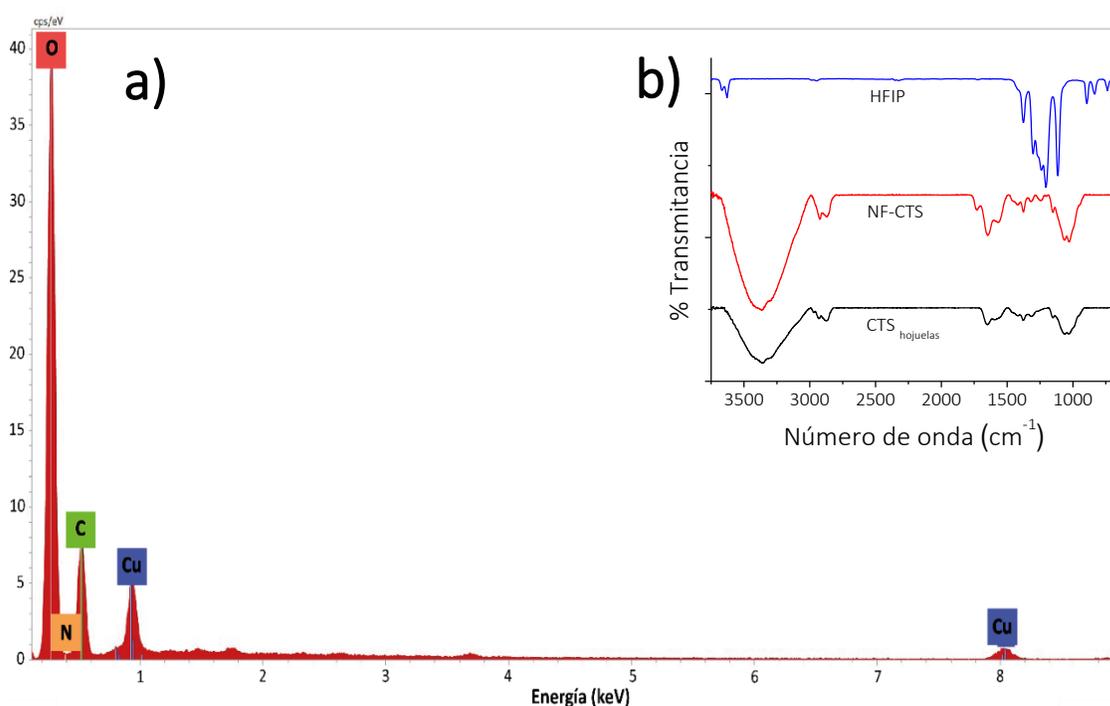
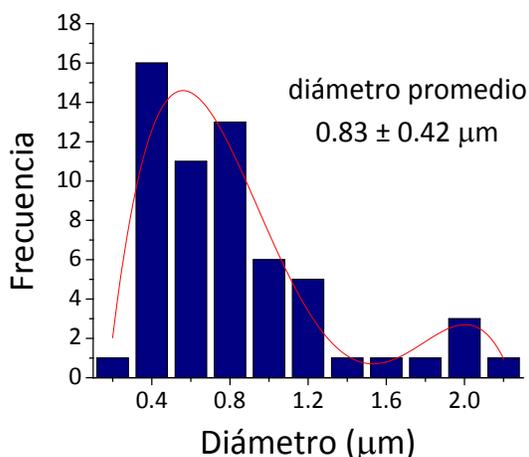
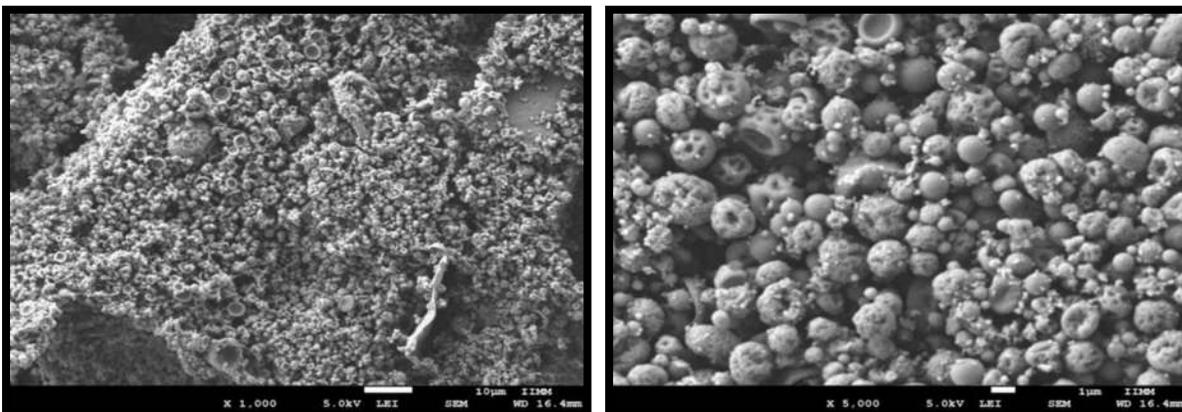


Figura 30. a) Espectro EDS de las colecciones de nanofibras de CTS obtenidas mediante la disolución A:B 80:20 y b) Espectro FT-IR comparativo de HFIP y colección de nanofibras de CTS puro.

El procesamiento de biopolímeros como la quitina, celulosa o CTS suelen presentar dificultades para el electrohilado como consecuencia de su baja solubilidad. Recientemente se ha recurrido al uso de disolventes de punto eutéctico profundo, DES por sus siglas en inglés, para facilitar el proceso de electrohilado de este tipo de biopolímeros. Los DES suelen ser integrados por dos o más componentes cuyas interacciones por enlaces por puente de hidrógeno dan lugar a mezclas de bajo punto de fusión respecto a sus componentes, y se desempeñan eficientemente como disolventes en condiciones donde los disolventes orgánicos tradicionales o medios acuosos no resultan tan eficientes.¹²⁴⁻¹²⁶

Como estrategia alternativa a las mezclas CTS_M se realizaron experimentos de electrohilado de CTS disuelto en ácido acético concentrado (80%v/v) recurriendo a un bajo porcentaje del DES (0.5%v/v) formado entre cloruro de colina y urea (CHCl:Urea 2:1) para promover su conductividad y plasticidad, a esta disolución se le denominó CTS_A. Como resultado del procesamiento de la disolución CTS_A se obtuvieron las superficies de la Figura 31.

El proceso de electrohilado usualmente se emplea para la obtención de nanofibras, sin embargo, lo que puede parecer una disolución inapropiada para la obtención de nanofibras puede originar otros tipos de sustratos micro y nanoestructurados, como las colecciones de microesferas que se presentan en la Figura 31. Posterior a la obtención se procede a la extracción del DES, proceso que genera mesoporosidad en la superficie de las microesferas.



Condiciones de obtención	
Colector	Fijo
Flujo (µL/h)	500
Distancia (cm)	15
Temperatura (°C)	40
Voltaje (kV)	12
Aguja (mm)	1

Figura 31. Micrografías de los sustratos obtenidos a partir del procesamiento de la disolución CTS_A.

Ensayos de acoplamiento NF-CTS/COL

El CTS ha sido objeto de estudio para diversas modificaciones, siendo el grupo-NH₂ el más reactivo,¹²¹ por lo que la formación de grupos funcionales carboxamida para el anclaje covalente de COL es factible. El procedimiento de acoplamiento NF-CTS/COL consiste en promover la formación de enlaces tipo amida entre el extremo carboxílico de algún aminoácido presente en la triple hélice del COL y los grupos -NH₂ libres en las unidades de CTS. Este proceso es promovido por la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP), agentes de acoplamiento que actúan como activadores del

extremo carboxílico del COL para facilitar la formación de enlaces carboxamida con la colección de NF-CTS mediante el mecanismo que se presenta en la Figura 32. La experimentación se inició haciendo reaccionar los sustratos NF-CTS con COL en proporción 1:5 equivalentes, empleando la dupla de agentes de acoplamiento EDC:HOBt en equivalentes molares 1:1, Figura 33.

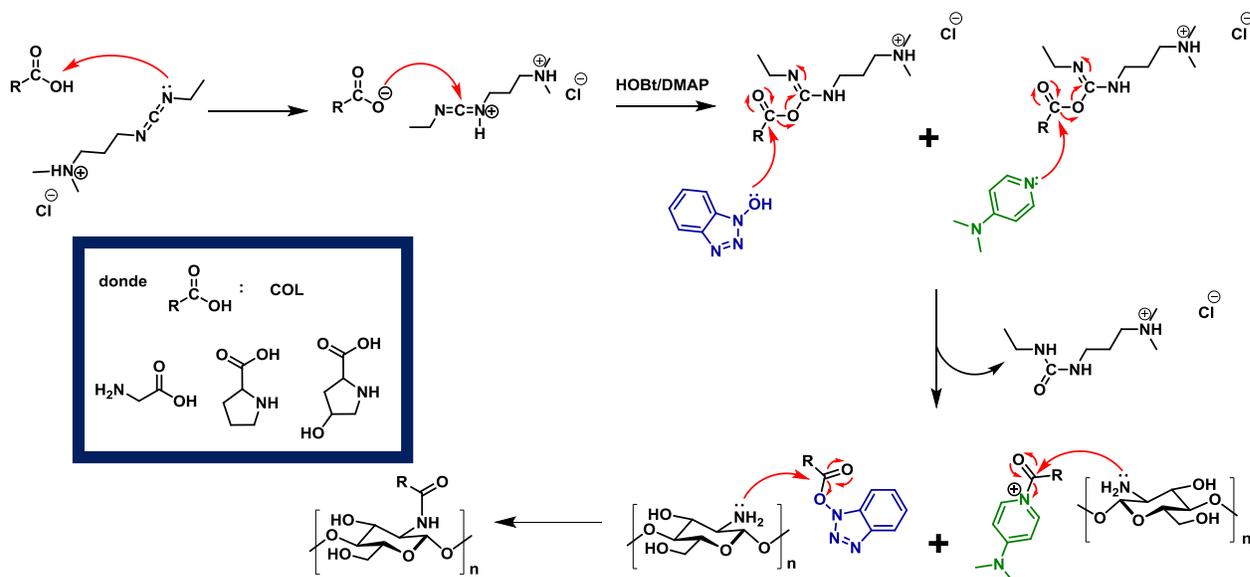


Figura 32. Mecanismo de funcionalización covalente de colecciones de NF-CTS con COL.

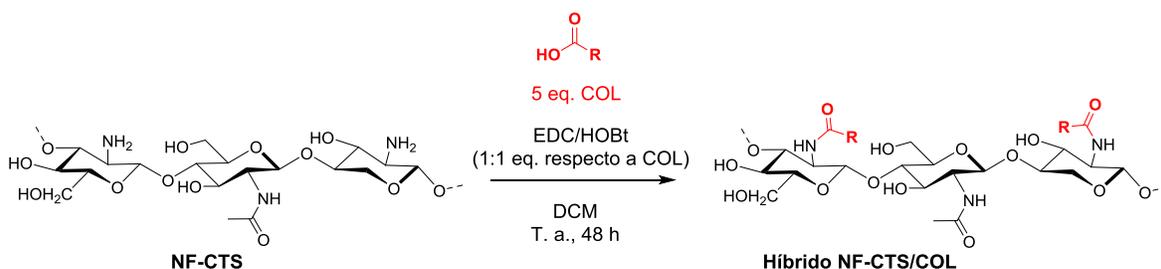


Figura 33. Acoplamiento CTS con COL.

El espectro de FT-IR de la Figura 34 correspondiente al COL nativo presenta modos de vibración del grupo funcional amida: A y B correspondientes al estiramiento del enlace N-H en 3296 cm^{-1} característico en las proteínas, así como bandas de vibración del grupo

funcional amida: I en 1634 cm^{-1} , II en 1560 cm^{-1} y III entre 1373 y 1230 cm^{-1} . El NF-CTS se distingue por el traslape de las vibraciones de tensión de los grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$ entre 3664 y 3231 cm^{-1} , las señales en 2969 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} y 2869 cm^{-1} características de las vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico del enlace C-H, a 1656 y 1557 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de flexión del grupo amino, mientras que el grupo de señales entre 1150 y 1022 cm^{-1} corresponden a vibraciones de estiramiento del enlace C-O-C.^{127, 128}

En el espectro comparativo de la Figura 34 se aprecia diferencias en los modos de vibración correspondientes al material híbrido resultante del acoplamiento. Entre las principales diferencias que presenta el espectro del híbrido destaca la señal entre 3500 y 3200 cm^{-1} que presenta menor influencia de la vibración por estiramiento del N-H con respecto al espectro de NF-CTS, así como los modos de vibración correspondientes a amida que se observan en 1626 cm^{-1} (amida I), 1532 cm^{-1} (amida II) y en 893 cm^{-1} la vibración del enlace C-N-C.

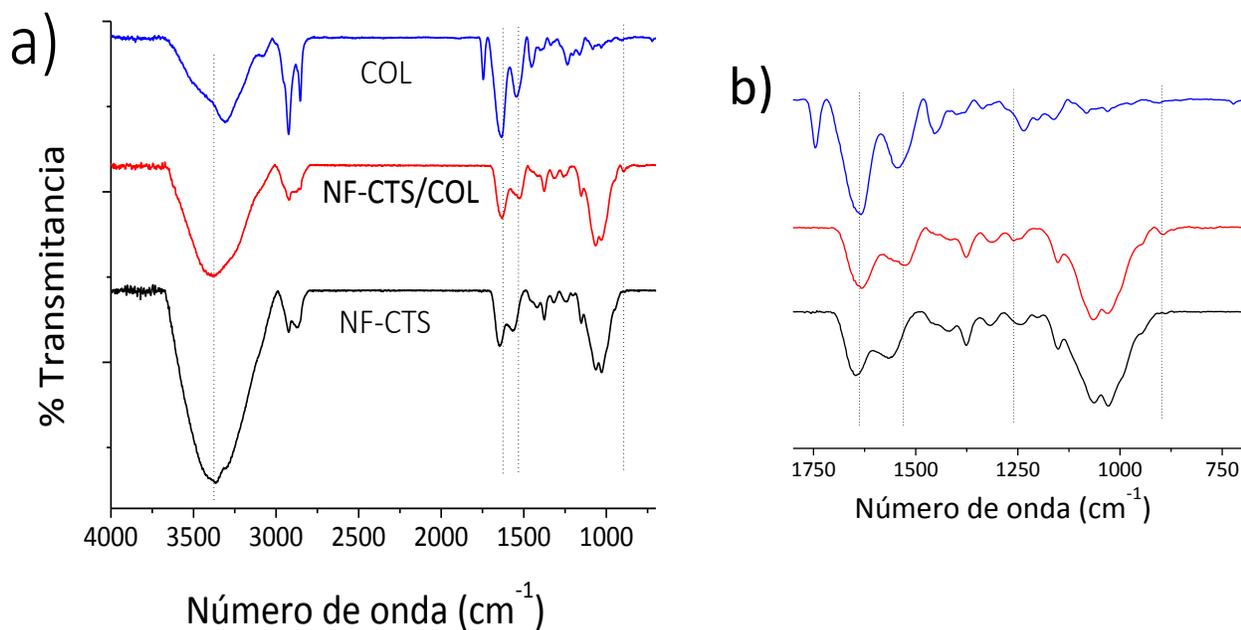


Figura 34. Espectro FT-IR comparativo entre NF-CTS, COL y el material híbrido NF-CTS/COL a) espectro completo (4000 a 700 cm^{-1}) y b) ampliación de la región de 1750 a 750 cm^{-1} .

Con el propósito de favorecer la amidación, se incluyó un segundo agente de transferencia: el 4-dimetilaminopiridina (DMAP), bajo el esquema de reacción de la Figura 35.

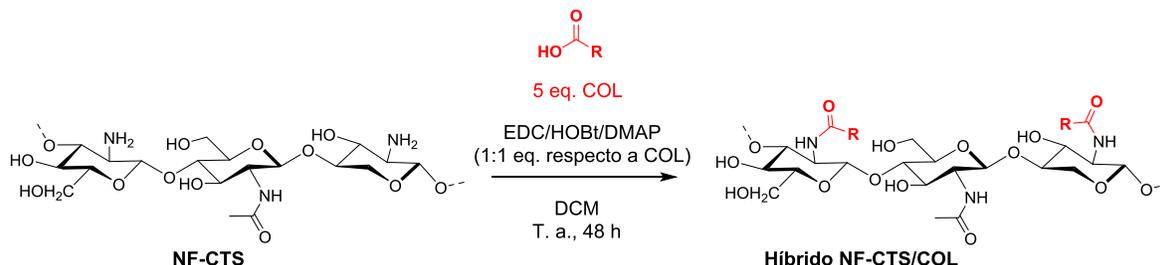


Figura 35. Acoplamiento NF-CTS con COL incluyendo DMAP como segundo agente de transferencia.

La incorporación de un segundo agente de transferencia coadyuva en la formación de enlaces carboxamida entre la colección de NF-PVA y COL. El comparativo de los espectros de FT-IR de los materiales híbridos NF-CTS/COL obtenidos empleando EDC/HOBt y EDC/DMAP/HOBt se presenta la Figura 36. El material híbrido obtenido de la combinación EDC/DMAP/HOBt presenta modos de vibración de las funciones amida I por la vibración de estiramiento del enlace C=O acoplado a la vibración de estiramiento fuera del plano del enlace C-N en 1632 cm^{-1} , el grupo amida II en 1543 cm^{-1} por el acoplamiento de la vibración de flexión del enlace N-H y el estiramiento del enlace C-N, y el grupo amida III en 1445 cm^{-1} por acoplamiento de las vibraciones de flexión del enlace N-H. El estiramiento del enlace C-N con contribución de las vibraciones por flexión del enlace C-C se observa en 1083 cm^{-1} traslapado con la vibración del enlace glucosídico del CTS que usualmente se aprecia en la región comprendida entre 1131 y 939 cm^{-1} ; además se observan señales de pequeña intensidad entre 900 y 800 cm^{-1} correspondientes a vibraciones conjuntas de los enlaces C-N y C-C así como C-N-C respectivamente.

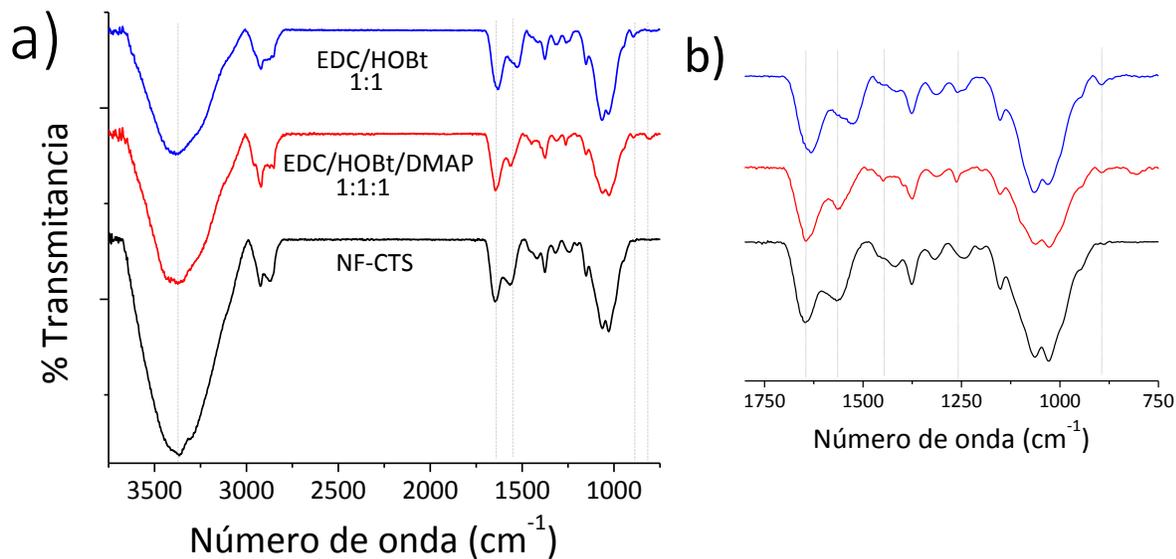


Figura 36. FT-IR comparativo de NF-CTS y los materiales híbridos variando los agentes de transferencia a) espectro completo (4000 a 700 cm^{-1}) y b) ampliación de la región de 1750 a 750 cm^{-1} .

Variando el medio de reacción, se realizó un experimento de acoplamiento con incremento de los equivalentes poliméricos bajo el esquema de reacción de la Figura 37. En la Figura 36 se presenta el espectro FT-IR comparativo de los materiales obtenidos de dicho experimento, donde es posible apreciar que el acoplamiento se ve favorecido cuando se emplea DCM/THF como medio de reacción. En el espectro de la Figura 38 que corresponde al material CTS/COL obtenido en la mezcla de los disolventes DCM/THF (1:1 eq.) presenta un patrón de señales definidas correspondientes a los modos vibracionales de amida, que en la literatura se asignan como COL nativo: banda de amida I (1645 cm^{-1}) y II (1262 cm^{-1}) cuya forma e intensidad corresponden a regiones de COL. [97] En el espectro completo se aprecia la señal de -OH entre 3388 y 3219 cm^{-1} con menor traslape de tensión de $-\text{NH}_2$, congruente con el tipo de modificación planteada.

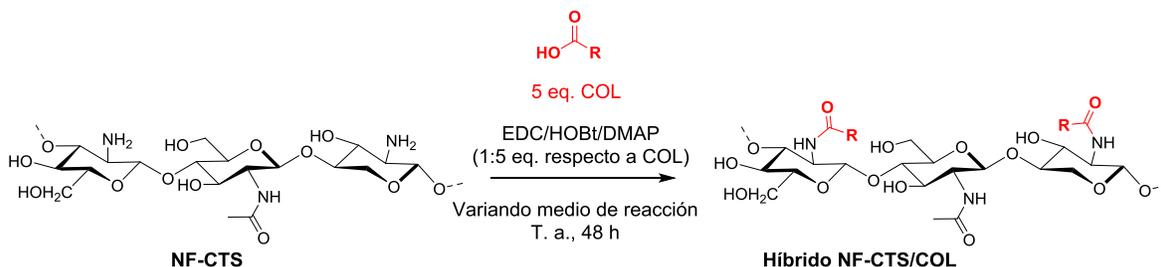


Figura 37. Acoplamiento NF-CTS con COL variando el medio de reacción.

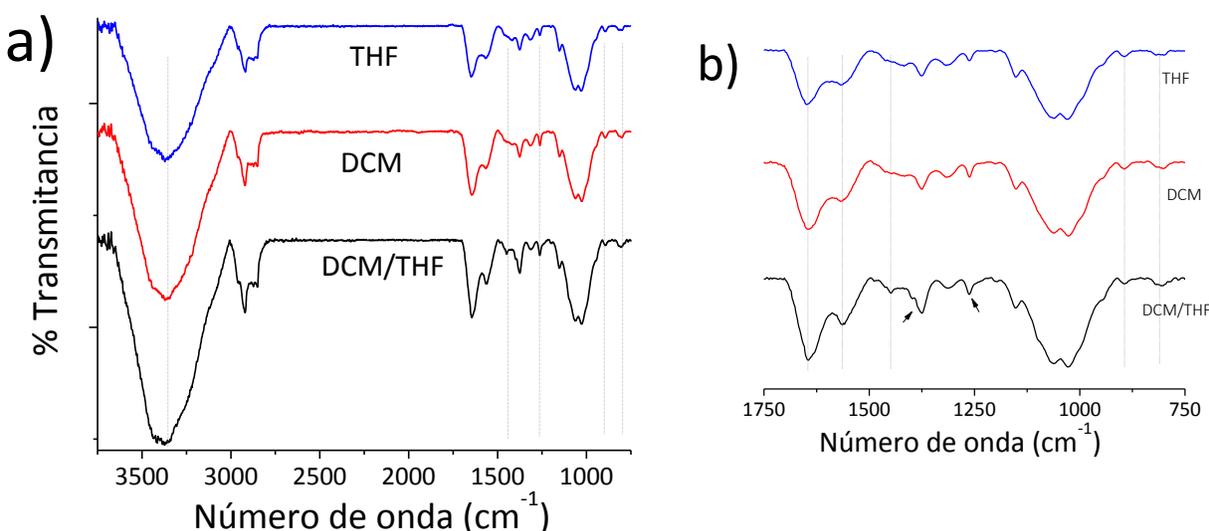


Figura 38. FT-IR de los materiales conjugados NF-CTS/COL variando el medio de reacción a) espectro completo (4000 a 700 cm^{-1}) y b) ampliación de la región de 1750 a 750 cm^{-1} .

La mezcla DCM/THF no compromete físicamente la estabilidad del COL como puede observarse en las micrografías de la Figura 39, además de la similitud física que se aprecia en las microfotografías, el espectro de FT-IR de la Figura 39 permite observar la permanencia de las bandas vibracionales correspondientes a la función carboxamida. El COL nativo muestra bandas muy características en FT-IR correspondientes a los modos de vibración de amida I en 1635 cm^{-1} con un brazo en 1653 cm^{-1} , amida II en 1543 cm^{-1} y amida III en 1240 cm^{-1} .¹⁰⁰ En los espectros se puede apreciar el mismo patrón de modos vibracionales entre la muestra de COL puro y COL recuperado sin reaccionar del acoplamiento, principalmente en las bandas asignadas a amida I (1653 cm^{-1} y su brazo

correspondiente en 1653 cm^{-1}) y amida III que suelen asociarse a la conformación de la triple hélice, caso contrario a lo reportado para muestras reconstituidas de COL electrohilado.¹²⁹

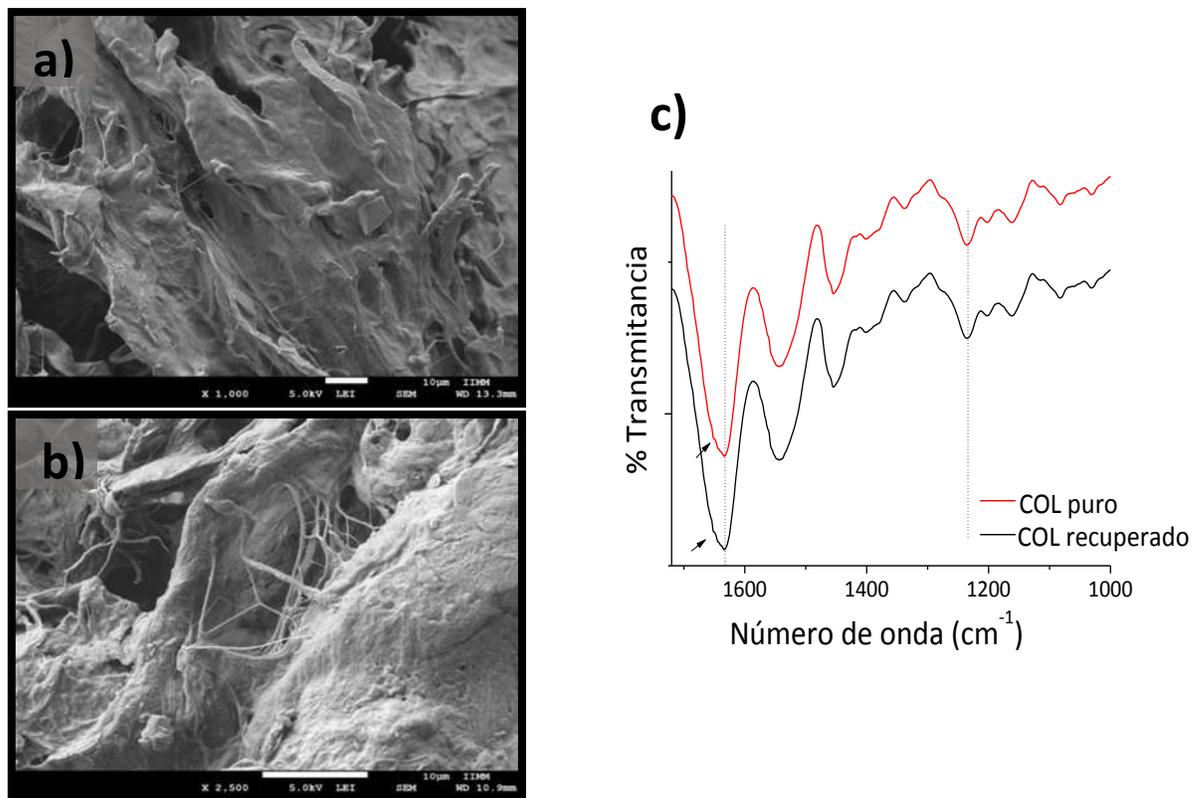


Figura 39. Imágenes de FE-SEM de COL a) puro y b) recuperado de acoplamiento, c) espectro comparativo de FT-IR de las muestras de COL a) y b).

Con el propósito de determinar el tiempo adecuado para la reacción de acoplamiento NF-CTS/COL, se realizó el ensayo de la Figura 40 variando el tiempo de reacción a 12, 24 y 48 h. Los espectros FT-IR generados se muestran en la Figura 41. En dicho conjunto de espectros se aprecia que 12 h de reacción es un lapso insuficiente para la definición de los modos de vibración del grupo amida discutidas previamente, mientras que a 24 y 48 h, las bandas de vibraciones son más intensas y no presentan diferencias significativas entre ellas, con base en lo anterior se estableció como tiempo adecuado de reacción 24 h.

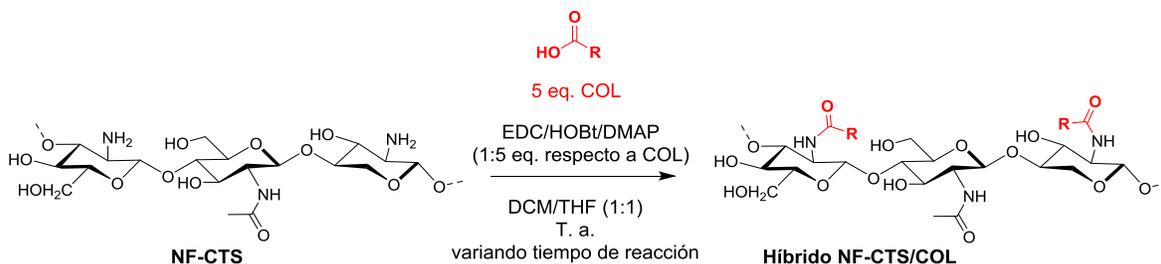


Figura 40. Acoplamiento NF-CTS con COL variando el tiempo de reacción.

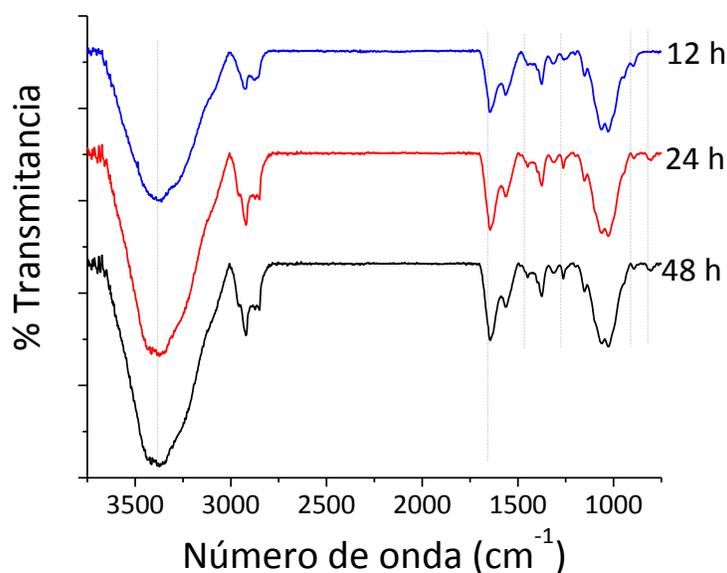


Figura 41. Espectro comparativo del acoplamiento NF-CTS/COL a distinto tiempo de reacción.

El papel que desempeña la carbodiimida durante el proceso de funcionalización es activar al carbonilo del COL para propiciar la amidación, por ello, como parte final de la estandarización del proceso de funcionalización, se realizó la evaluación de la eficiencia de la EDC en comparación con otro agente acoplante: la N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) cuyas condiciones se detallan en la Figura 42.

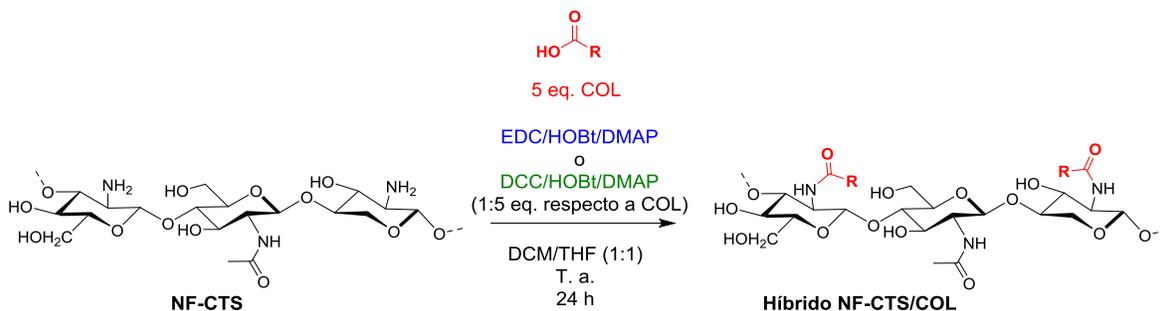


Figura 42. Acoplamiento NF-CTS con COL variando la carbodiimida.

El análisis comparativo de los espectros de FT-IR de la Figura 43 de los materiales funcionalizados empleando diferente agente acoplante muestra en el espectro correspondiente al experimento con EDC un menor traslape de la vibración de $-\text{NH}_2$ en la señal correspondiente a $-\text{OH}$ entre 3500 y 3300 cm^{-1} , congruente con la N-acilación que implica el acoplamiento. Así mismo, la posición e intensidad de las señales correspondientes a carboxamida I (1649 cm^{-1}), II (1561 cm^{-1}) y III (1459 cm^{-1}) indica que la amidación se ve favorecida cuando se emplea la carbodiimida EDC, este hecho puede ser atribuido al impedimento estérico de los reactantes y de la propia DCC.

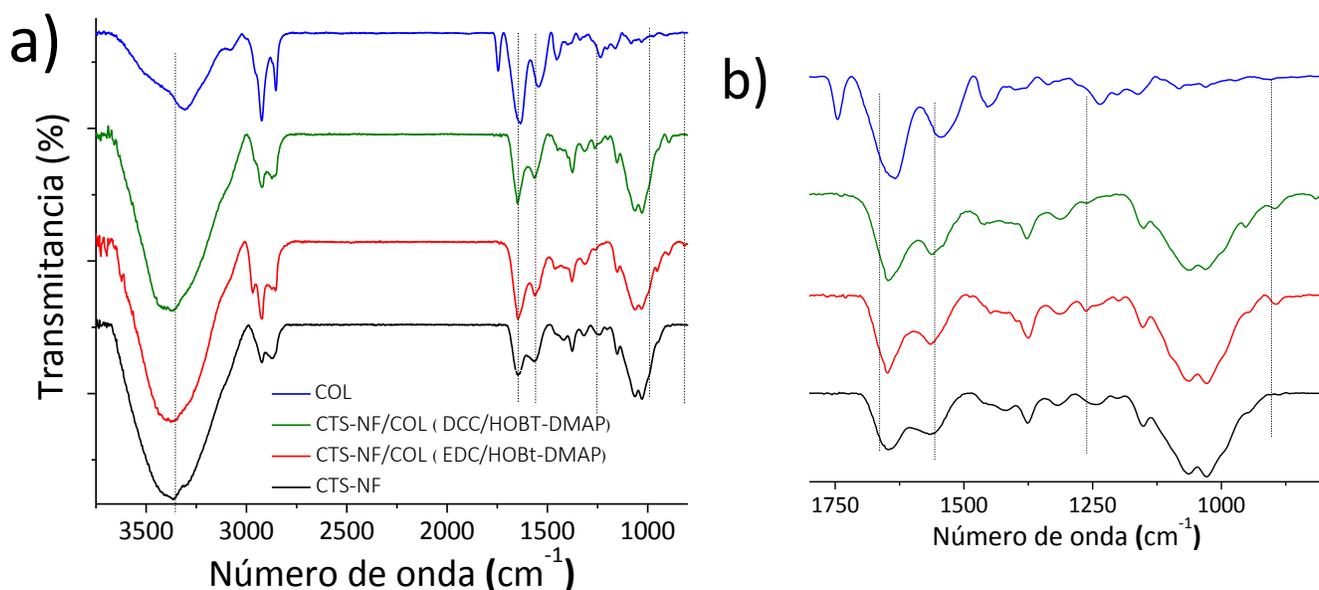


Figura 43. Espectro de FT-IR de soportes de CTS funcionalizados con COL a) espectro completo (4000 a 700 cm^{-1}) y b) ampliación de la región de 1800 a 700 cm^{-1} .

Como parte importante de la caracterización de los materiales híbridos NF-CTS /COL obtenidos, se realizó su análisis térmico. Los termogramas obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido, DSC por sus siglas en inglés, de los componentes poliméricos puros se muestran en la Figura 44. En el termograma correspondiente a las colecciones de NF-CTS se aprecia un exoterma a 286.93°C con una entalpía de 122 J/g, este evento térmico corresponde a la degradación del polímero debido a la descomposición de los grupos amino presentes en su cadena central.¹³⁰ A su vez, en el termograma del COL es posible observar tres transiciones térmicas: la endoterma en 217.84°C con una entalpía de 8.89 J/g se atribuye al proceso de desnaturalización por la modificación conformacional de la triple hélice debido la pérdida de los enlaces de hidrógeno, posteriormente experimenta el proceso de degradación que procede en dos etapas, observándose como eventos endotérmicos en 308.14 y 320.38°C con entalpías de 0.30 y 3.33 J/g, respectivamente.¹³¹

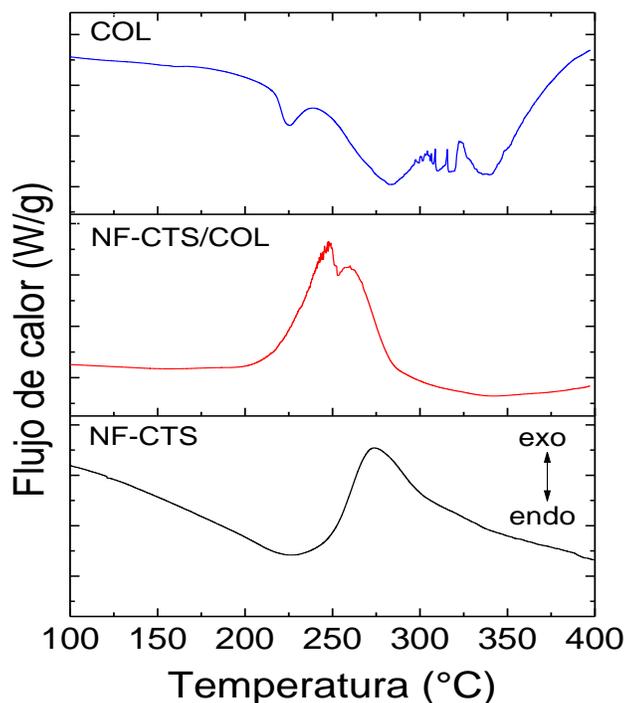


Figura 44. Termograma de DSC comparativo del material híbrido NF-CTS /COL, NF-CTS y COL.

Por otro lado, la curva DSC del material acoplado NF-CTS/COL presenta dos eventos térmicos; la primera exoterma que se observa en 231°C con una entalpía de 315.08 J/g es atribuida al proceso de deshidratación del anillo de piranosa funcionalizado; evento térmico que de acuerdo con la literatura puede observarse en 225 y 280°C para CTS N-acilado,¹³²⁻¹³⁴ mientras que la degradación del material procede a menor temperatura respecto al CTS puro; cerca de los 260.23°C. El análisis comparativo de las curvas de DSC del material funcionalizado NF-CTS/COL y de los componentes poliméricos puros, evidencia la obtención de sustratos funcionalizados mediante una modificación covalente, ya que el termograma del material híbrido resultante presenta variaciones en el comportamiento térmico respecto a los componentes poliméricos puros. La evidencia que aporta el estudio del comportamiento térmico mediante DSC es congruente con la formación de enlaces carboxamida que se ha discutido previamente a partir de los espectros de FT-IR de los materiales acoplados.¹³⁵

El análisis mediante DSC es altamente relevante para la caracterización de los sustratos modificados químicamente. A partir del comportamiento térmico que presentan los materiales enriquecidos NF-CTS/COL en contraste con los perfiles térmicos de los polímeros de forma individual, y con la evidencia aportada por FT-IR, es posible asumir la existencia de la interacción covalente entre el sustrato NF-CTS y COL planteada para la obtención de los sustratos enriquecidos.

El análisis termogravimétrico, TGA por sus siglas en inglés, de los polímeros puros y del material acoplado se presenta en la Figura 45. La curva de TGA de la NF-CTS presenta una transición entre 60 y 115°C atribuida a la pérdida de humedad que representa el 6.1% de la masa total del CTS, el evento térmico que sucede entre 240 y 300°C está relacionado con la despolimerización del CTS, con una pérdida del 42.3% de su peso inicial; de acuerdo a la literatura, a temperaturas superiores a 330°C se presenta la descomposición química del polímero, la pirólisis de polisacáridos origina la ruptura aleatoria de enlaces glucosídicos con la subsecuente formación de ácidos grasos de cadena corta.^{120, 133, 135} Por su parte, el termograma del COL presenta entre 60 y 120°C la pérdida de agua ligada correspondiente

al 10.8% del peso total de la muestra, entre 290-340°C se observa un segundo evento térmico que representan la pérdida de 51.9% del peso originada por la fragmentación de la macromolécula, y acorde a la literatura la calcinación del COL procede a temperatura superior a 450°C.^{120, 136}

A su vez, el material híbrido NF-CTS/COL presenta un evento térmico entre 60 y 100°C como resultado de la pérdida de agua ligada que corresponde al 4.5% del peso total de la muestra; sabiendo que los polisacáridos son altamente higroscópicos, la disminución del porcentaje de agua ligada que presenta el material híbrido respecto de los componentes puros, puede atribuirse a la menor afinidad que mantiene con ésta derivado de su nueva asociación supramolecular. En la curva de TGA se aprecia otro evento térmico entre 200 y 220°C que se asocia a la deshidratación del anillo de piranosa N-modificado, en concordancia a los reportes de la literatura; con la disminución del 40.4% del peso total.^{120, 133, 135} La descomposición del material acoplado tiene lugar alrededor de los 250°C. Con la evidencia aportada por las técnicas de caracterización empleadas se puede inferir la formación del material híbrido NF-CTS/COL como resultado de la bioconjugación.

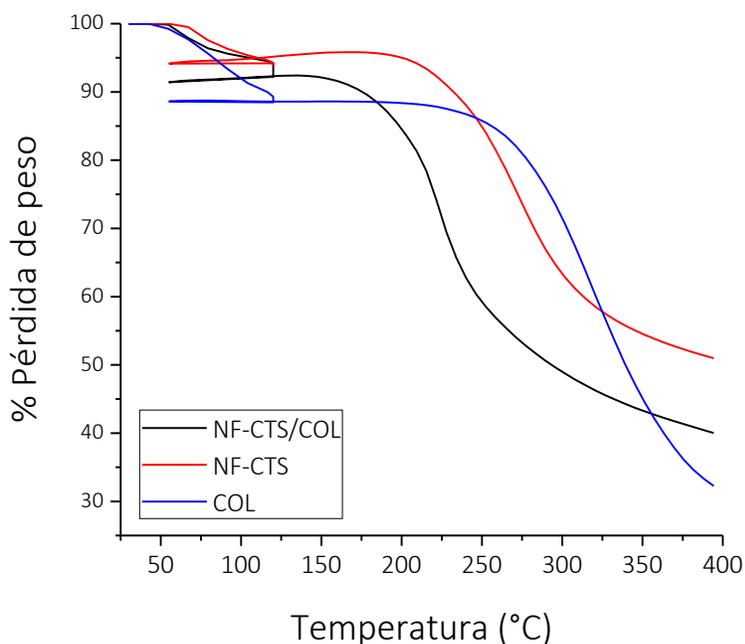


Figura 45. Termograma de TGA comparativo del material híbrido NF-CTS/COL, NF-CTS y COL.

En la micrografía de la Figura 46 se puede observar la modificación superficial de las nanofibras sin que el proceso de amidación destruya la microarquitectura del sustrato. La modificación de la microarquitectura de las NF-CTS por efecto de la bioconjugación con COL también causa variaciones en la retención de humedad. La colección de NF-CTS sin funcionalizar presenta un máximo de absorción de humedad del 900% a los 40 min de inmersión en el medio acuoso, valor que se mantiene estable durante las 48 h del estudio de acuerdo con la cinética de hinchamiento mostrada en la Figura 44c. El material híbrido NF-CTS/COL presenta un máximo de absorción del 1000% respecto a su peso seco, valor que es alcanzado a los 35 min de inmersión y permanece constante durante el tiempo de estudio.

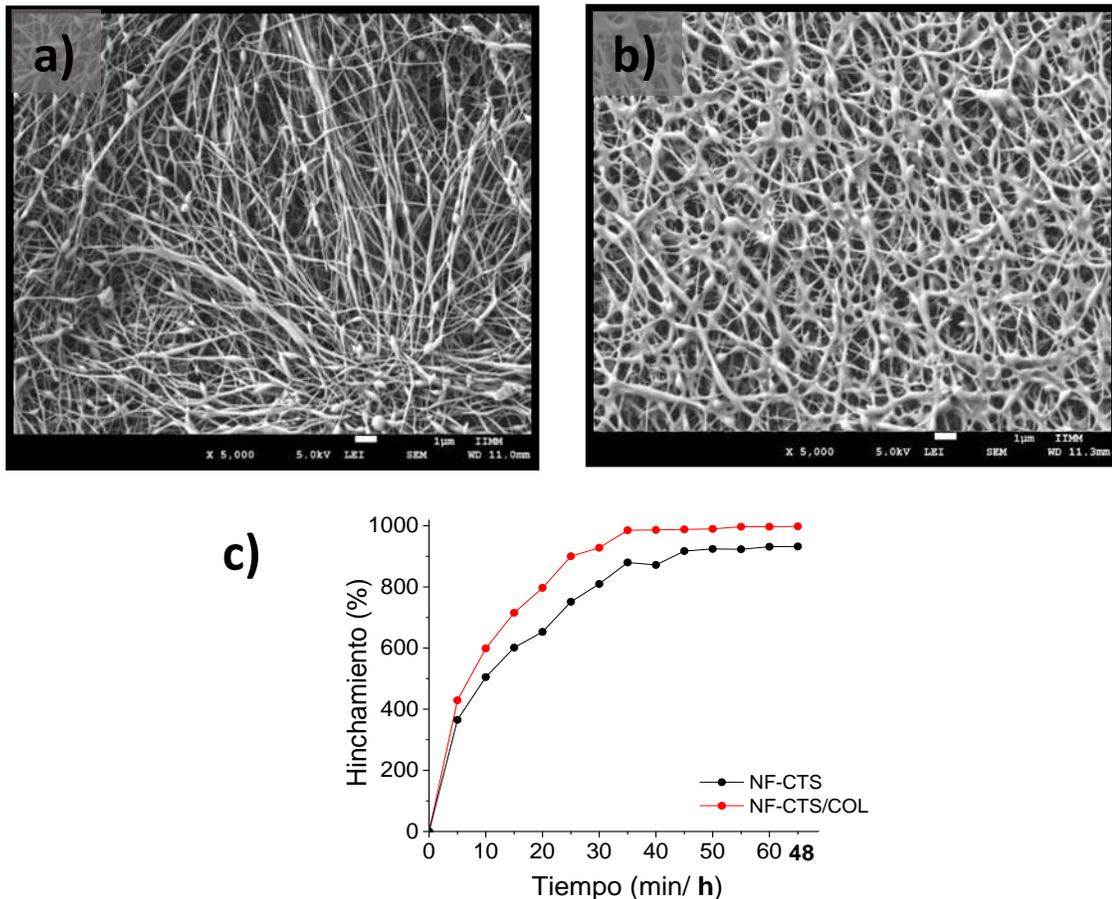


Figura 46. Micrografías de NF-CTS a) sin colágeno y b) con colágeno conjugado; c) cinética de hinchamiento de ambos sustratos.

Sin embargo, la complejidad que presenta el procesamiento de CTS mediante la técnica de electrohilado, limita la realización de estudios de citocompatibilidad; la baja tasa de deposición de las NF-CTS origina sustratos de baja densidad y limitada dimensión.

4.1.4.2. NF-PVA/COL

Sustratos nanoestructurados de PVA

Dentro de la clasificación de los polímeros sintéticos el PVA se distingue por su alto valor tecnológico, el cual presenta grandes cualidades como biomaterial, principalmente por su adecuada biocompatibilidad y el carácter biodegradable que posee, además de su extraordinaria facilidad para el procesamiento y la diversificación de materiales poliméricos. El PVA es un polímero altamente electrohilable, por lo que a partir de disoluciones de este polímero y siguiendo la metodología previamente descrita,¹²⁷ se obtuvieron colecciones de nanofibras (NF-PVA) de excelente calidad como se muestra en la Figura 47. En las colecciones que se muestran destaca la interconectividad de los sustratos integrados por nanofibras de diámetros cercanos a los 120 nm.

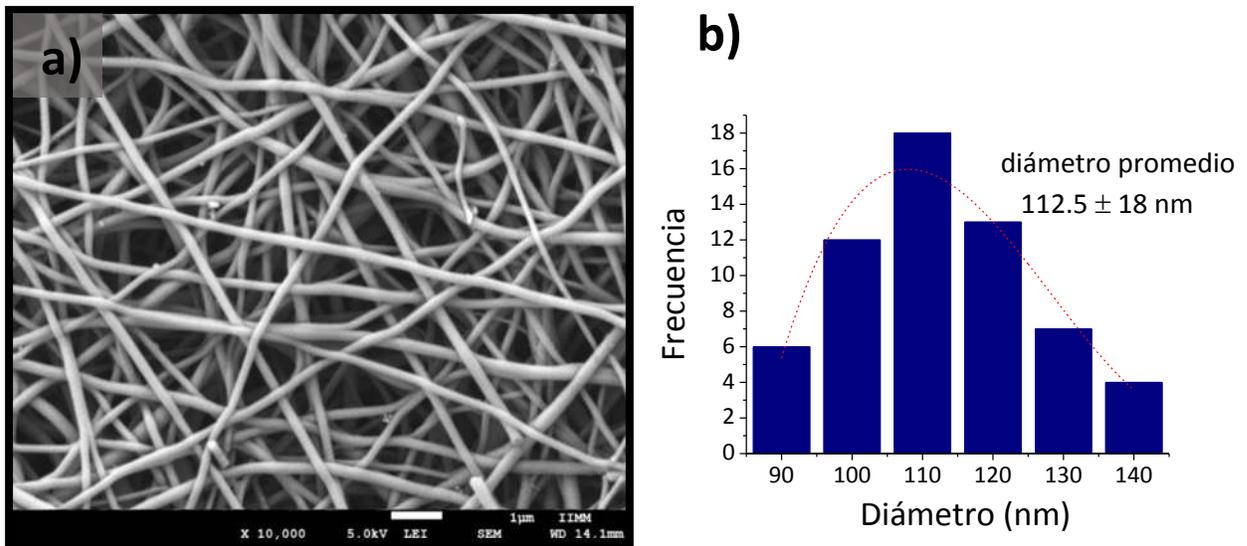


Figura 47. a) Micrografía de FE-SEM de las colecciones de NF-PVA obtenidas y b) histograma de la distribución de diámetro promedio.

La facilidad para el procesamiento de PVA hace posible diseñar diferentes materiales compuestos tomando ventaja de la alta disponibilidad de grupos –OH presentes a lo largo de su estructura, los cuales permiten también el estudio del anclaje covalente de COL bajo condiciones ajustadas de esterificación de Steglich.¹³⁷

Ensayos de acoplamiento NF-PVA/COL

El procedimiento de acoplamiento NF-PVA/COL consiste en promover la formación de enlaces tipo éster entre el extremo carboxílico activado de alguno de los aminoácidos presentes en la hélice triple y los grupos –OH expuestos a lo largo de las NF-PVA, este proceso es promovido por la EDC que funciona como agente de acoplamiento, y los agentes de transferencia HOBt y DMAP, en la Figura 48 se presentan las condiciones del acoplamiento y su mecanismo.

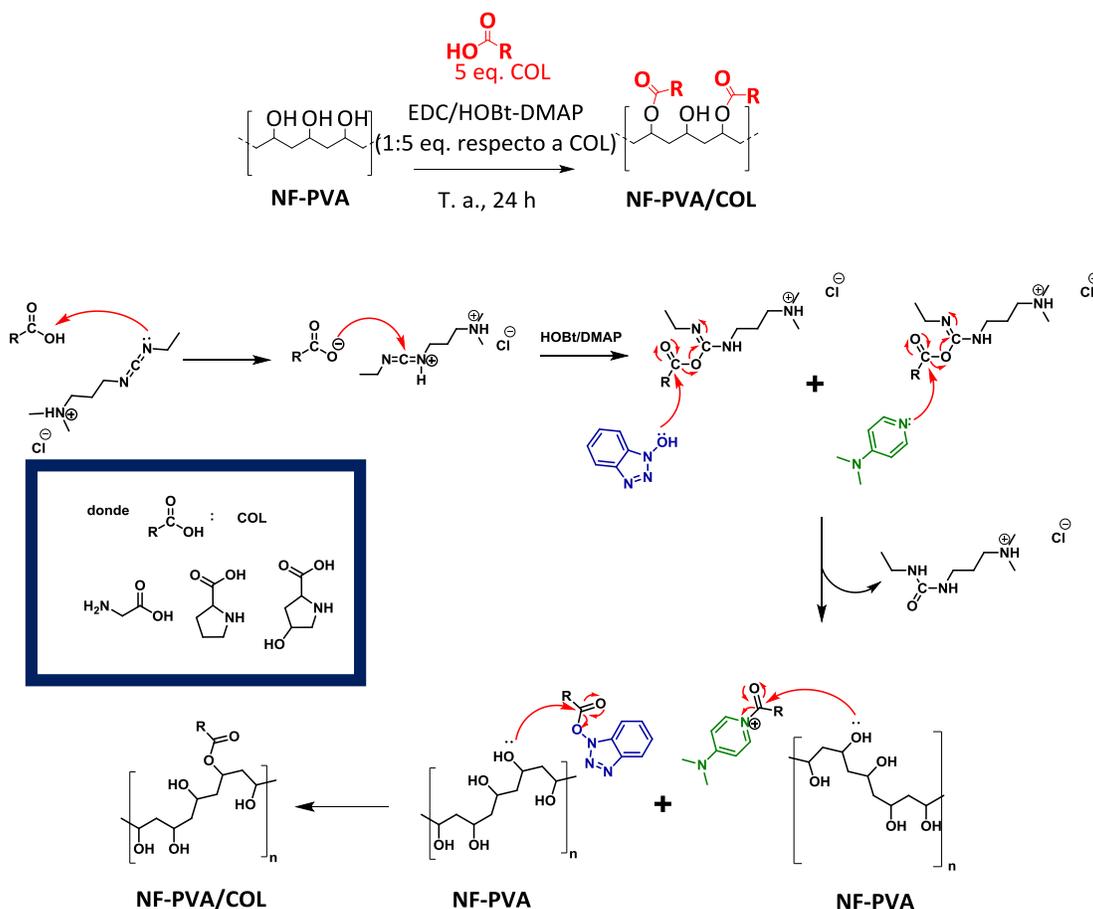


Figura 48. Condiciones para la funcionalización de NF-PVA con COL y mecanismo de la reacción.

Las condiciones de funcionalización empleadas para el experimento fueron extrapoladas de la bioconjugación NF-CTS /COL que mostró mejores resultados. Posterior a las reacciones de acoplamiento, se caracterizaron los materiales mediante FT-IR, la Figura 49 presenta los espectros FT-IR de COL y NF-PVA puros así como del material resultante de la reacción de esterificación (EDC, DMAP/HOBt en DCM/THF, 24 h y temperatura ambiente). El espectro FT-IR típico de PVA presenta las vibraciones características del grupo –OH entre 3674 y 2995 cm^{-1} , en 2927 cm^{-1} la vibración del estiramiento asimétrico del enlace C-H y simétrico en 2877 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 O-H.^{127, 138}

En comparación, el material resultante de la reacción de esterificación presenta nuevos modos de vibración en la región de la huella dactilar; como las vibraciones en 1657 y 1375 cm^{-1} correspondientes vibraciones del grupo éster, así como de amida II en 1549 cm^{-1} y amida III en 1454 cm^{-1} propias del COL conjugado a las nanoestructuras de PVA. En concordancia con la reacción de esterificación, también se aprecia en el espectro del material NF-PVA/COL el aumento en la intensidad de la vibración en 3305 cm^{-1} atribuida a la vibración del grupo –OH con contribución del grupo amida (3019 cm^{-1}), así como la ausencia de la vibración en 848 cm^{-1} que correspondía a la vibraciones del enlace O-H.

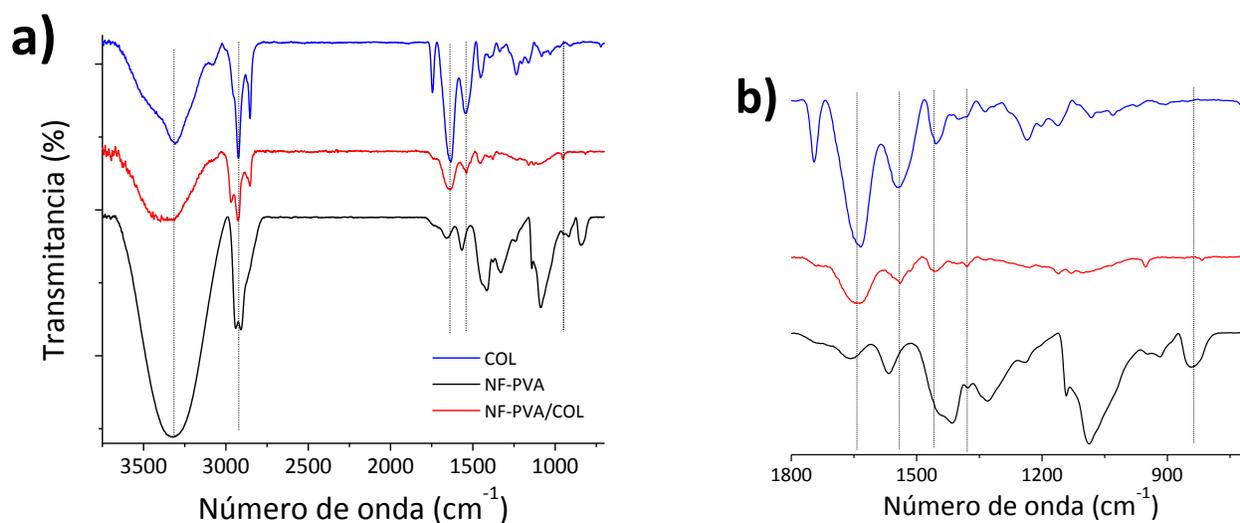


Figura 49. Espectro de FT-IR de soportes de NF-PVA funcionalizados con COL a) espectro completo (4000 a 700 cm^{-1}) y b) ampliación de la región de 1800 a 700 cm^{-1} .

El análisis del comportamiento térmico del material modificado NF-PVA/COL, y el comparativo con las curvas obtenidas mediante el análisis DSC de los componentes por separado se presentan en la Figura 50. El termograma del PVA puro presenta un endoterma en 229.11°C con una entalpía de 73.65 J/g; evento térmico atribuido a la fusión de las zonas cristalinas del PVA. La descomposición del polímero puro se observa a partir de 250°C como un evento endotérmico.¹³⁹

Como ya se describió anteriormente, el termograma del COL presenta tres endotermas: en 217.84°C con una entalpía de 8.89 J/g se observa el proceso de desnaturalización del polímero deshidratado, como resultado de la modificación conformacional que sufre la triple hélice por la pérdida de los enlaces de hidrógeno, posteriormente experimenta el proceso de degradación que procede en dos etapas entre 308.14 y 320.38°C con entalpías de 0.30 y 3.33 J/g.

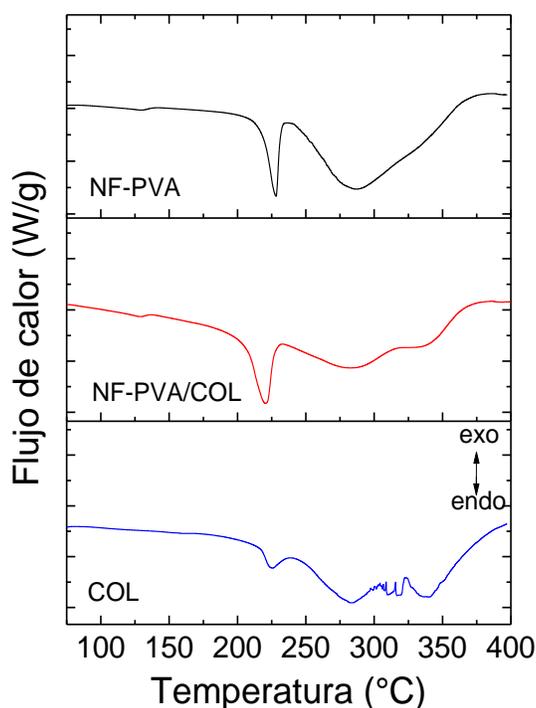


Figura 50. Termograma comparativo del material híbrido NF-PVA/COL, NF-PVA y COL.

El perfil térmico del material NF-PVA/COL en contraste presenta dos eventos endotérmicos. La temperatura de fusión de la fase cristalina del PVA en el material funcionalizado se observa en 225.11°C con una entalpía de 72.76 J/g, es decir, la temperatura de fusión del material NF-PVA/COL se desplaza a menor temperatura respecto del PVA puro (229°C), mientras que la temperatura de descomposición del material inicia a 321.31°C con una entalpía de 79.04 J/g; una temperatura de descomposición considerablemente mayor respecto del PVA puro.

De acuerdo a la literatura, una depresión en la temperatura de fusión de un polímero, es evidencia de su modificación estructural.¹⁴⁰ El material funcionalizado posee mayor estabilidad térmica respecto del PVA puro, aumentando su temperatura de descomposición en al menos 70°C. Asimismo, se observa que la descomposición se presenta en una sola etapa, por lo que la modificación del COL también es evidente. Este comportamiento térmico particular de la muestra funcionalizada, en conjunto con la evidencia proporcionada por los espectros FT-IR, evidencian la exitosa funcionalización de las NF-PVA.

Las curvas de TGA del COL, NF-PVA y NF-PVA/COL se muestran en la Figura 51, en el termograma obtenido mediante TGA correspondiente a COL se observa la pérdida de agua ligada entre 60 y 120°C que representa un 10.8% del peso total de la muestra, entre 290-340°C se observa un segundo evento térmico debido a la fragmentación de la macromolécula con la pérdida del 51.9% del peso.^{120, 136}

En el termograma de NF-PVA se aprecia la pérdida del 70% del peso de la muestra entre 270-320°C relacionada con la descomposición térmica por deshidratación del polímero, mientras que a arriba de 330°C tiene lugar la pirólisis.¹⁴¹⁻¹⁴³ En la curva de TGA del material híbrido NF-PVA/COL se observa la pérdida de agua ligada entre 50 y 70°C representando un 4% del peso total, posteriormente se aprecia otro evento térmico entre 228 y 295°C atribuido a la descomposición térmica del PVA por la pérdida de H₂O, representando una disminución del 30% del peso de la muestra; el evento térmico que

sucede entre 315 y 360°C puede atribuirse a la fragmentación del COL, la cual en el termograma de COL puro aparece entre 290 y 340°C.^{120, 136}

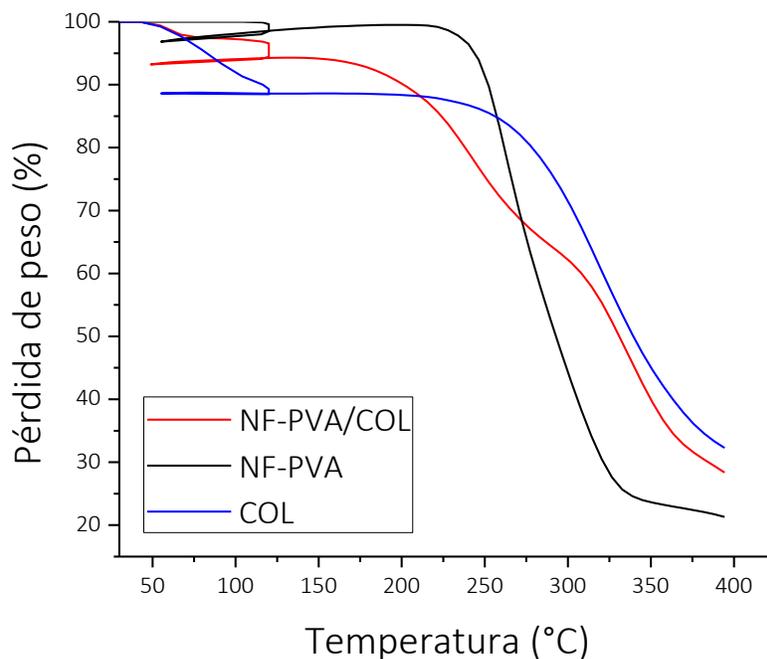


Figura 51. Termograma de TGA comparativo del material híbrido NF-PVA/COL, NF-PVA y COL.

Con la evidencia aportada por los análisis térmicos y la espectroscopia FT-IR se evidencia la formación del material híbrido NF-PVA/COL como resultado de la bioconjugación bajo las condiciones de esterificación señaladas. En la micrografía de la Figura 52 se aprecia la morfología de este material bioconjugado NF-PVA/COL, el proceso de esterificación de COL a la colección de NF-PVA produce variaciones en la topografía del andamio, no obstante se preserva la microarquitectura del sustrato electrohilado NF-PVA. El proceso de funcionalización post-electrohilado vía inmovilización covalente reduce la capacidad de retención de humedad en el material híbrido NF-PVA/COL, este material posee la habilidad de retener el 490% de humedad respecto a su peso seco, este valor máximo se alcanza a los 55 min de inmersión y es constante durante el lapso de estudio de

48 h, tal y como lo muestra la cinética de hinchamiento mostrada en la Figura 52c. El sustrato NF-PVA sin modificar presenta un valor de hinchamiento del 502%, ligeramente mayor al del sustrato modificado NF-PVA/COL, éste valor máximo es alcanzado a los 60 min de inmersión en el medio acuoso sin registrar pérdida de peso al menos durante 48 h.

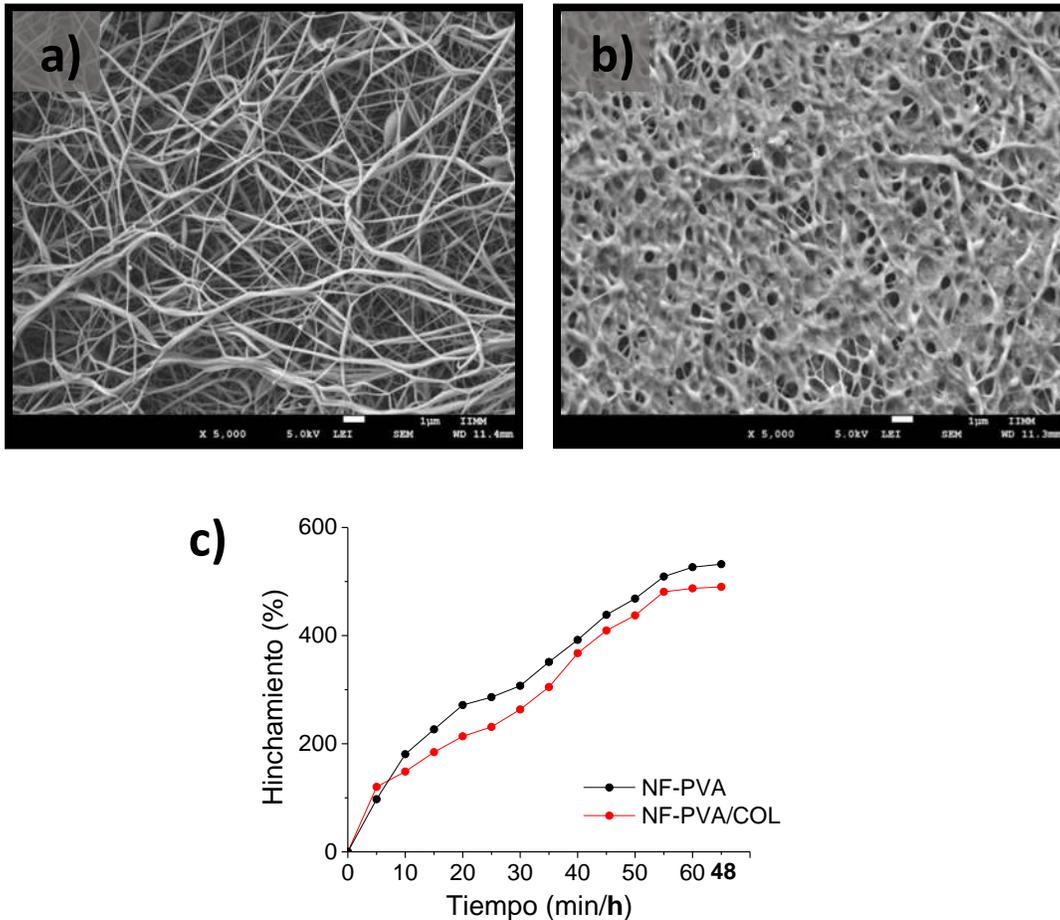


Figura 52. Micrografías de NF-PVA a) sin colágeno y b) con colágeno conjugado; c) cinética de hinchamiento de ambos sustratos.

Las propiedades mecánicas de los materiales NF-PVA y NF-PVA/COL se muestra en las curvas tensión-deformación mostradas en la Figura 53. La evaluación de las propiedades mecánicas de COL puro no fue realizada debido a que, como se ha mencionado con anterioridad, su procesamiento para la formación de colecciones de nanofibras o películas delgadas implica la preparación de disoluciones en condiciones que deterioran sus

propiedades biomecánicas. En la Figura 53 se presentan las curvas de tensión-deformación de los materiales NF-PVA y NF-PVA/COL analizadas en condiciones en seco y húmedo a temperatura ambiente. Se presentan los datos de módulo de Young (MPa), esfuerzo último de ruptura (MPa), tensión de ruptura (MPa) y elongación de ruptura (%).

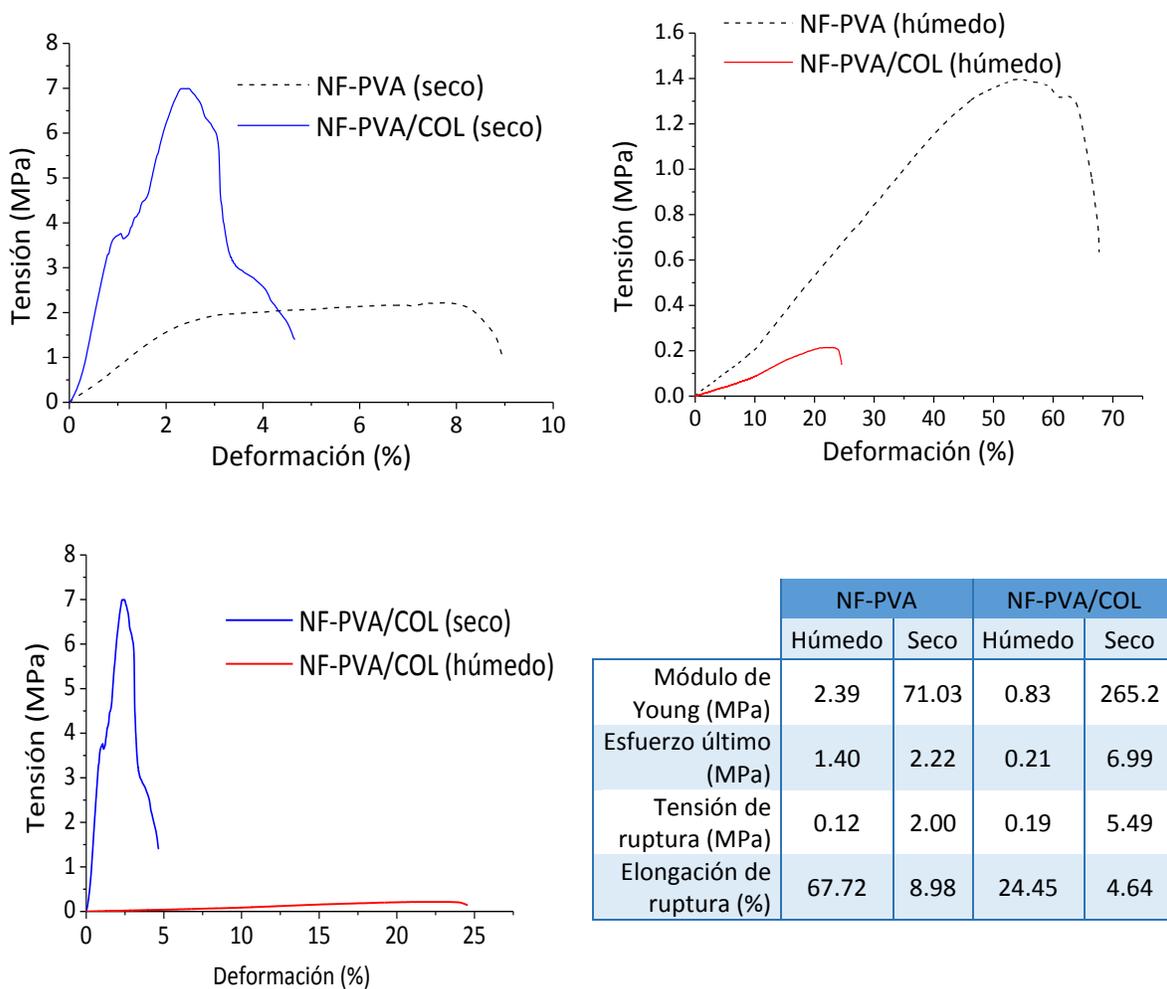


Figura 53. Curvas de tensión-deformación correspondientes a NF-PVA y NF-PVA/COL realizadas en seco y en condiciones de humedad.

El estiramiento uniaxial de los materiales NF-PVA y NF-PVA/COL genera curvas de tensión-deformación complejas como resultado de la disposición aleatoria de las nanoestructuras de PVA. En comparación con la NF-PVA sin modificar, la bioconjugación de

COL le confiere al material híbrido NF-PVA/COL mejores propiedades mecánicas, que se reflejan como valores mayores del módulo de Young, tensión de ruptura y esfuerzo último de tensión en el ensayo en seco. Particularmente, el módulo de Young de 265.2 MPa y el esfuerzo último de tensión de 6.99 MPa son valores cercanos a los reportados para compósitos de COL obtenidos mediante electrohilado.^{63, 144, 145} Aunque la elongación de ruptura decrece alrededor de un 51% como consecuencia del proceso de esterificación del COL, el valor que presenta el material funcionalizado NF-PVA/COL es comparable con aquellos reportados en la literatura para muestras de COL entrecruzado.^{146, 147}

La evaluación de las propiedades mecánicas en húmedo permite el análisis de los biomateriales en condiciones más semejantes a entornos fisiológicos. En condiciones de humedad, el material híbrido NF-PVA/COL presenta propiedades mecánicas disminuidas, pero con un incremento 5.3 veces mayor en el porcentaje de elongación a la ruptura respecto al estudio en seco del mismo material. El decremento de las propiedades mecánicas en condiciones de humedad puede relacionarse con cambios en las interacciones intramoleculares de PVA y COL al ser sumergidos en el medio acuoso.^{63, 146}

Bajo condiciones de humedad, el sustrato sin modificar NF-PVA presenta mejor rendimiento mecánico respecto al material híbrido NF-PVA/COL. Este hecho puede ser relacionado con los cambios estructurales originados en la superficie del sustrato de NF-PVA como consecuencia del proceso de esterificación con COL fibroso; procedimiento en el cual el COL es integrado como partículas finas sin ser disuelto y que causa la reticulación del sustrato funcionalizado.

Por otra parte, la evaluación de la viabilidad de los sustratos enriquecidos con COL se efectuó en células HEK-293 correspondientes a células embrionarias de riñón humano, en la Figura 54 se muestran los resultados del ensayo. La línea celular HEK-293 es adecuada para la investigación de citocompatibilidad de biomateriales debido a alta tasa de reproducibilidad, además esta línea celular posee características de metabolismo y adhesión que permiten su uso como modelo de células epiteliales, endoteliales y fibroblastos.¹⁴⁸

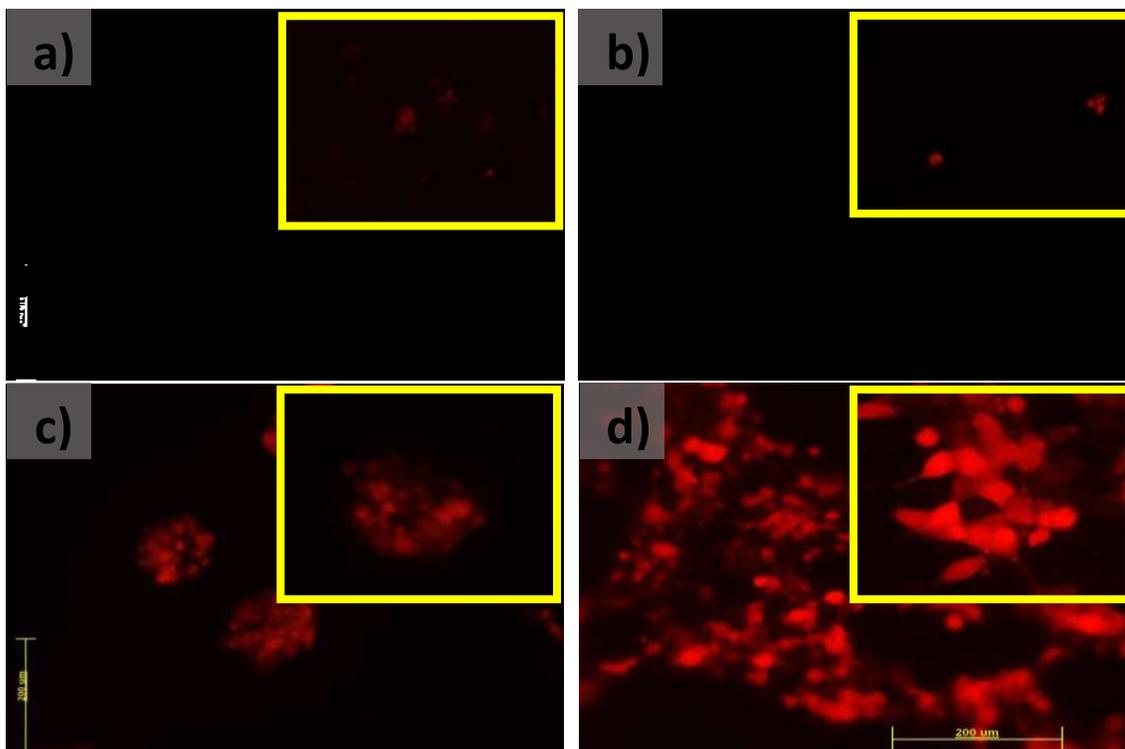


Figura 54. Microfotografías de campo oscuro de cultivos de la línea celular HEK-293 sobre a) NF-PVA, b) NF-PVA + COL tratado sin acoplantes, materiales funcionalizados NF-PVA/COL preparados variando la estequiometría de los acoplantes: c) 1:1 y d) 1:5.

En las micrografías se puede apreciar que aun cuando las colecciones de NF-PVA poseen una microarquitectura de excelente calidad que mimetiza la matriz extracelular, no poseen propiedades biológicas que faciliten el anclaje de las células con la formación de una mínima cantidad de agregados de células. Por su parte, la incorporación de COL a través de la bioconjugación post-electrohilado demuestra la viabilidad de los materiales NF-PVA/COL (relación 1:5 COL:acoplantes) permitiendo la adhesión y proliferación celular de las células HEK-293. Comparando las imágenes 54b y c es posible inferir que las condiciones de la reacción de acoplamiento repercuten fuertemente en la capacidad de adhesión del material NF-PVA/COL por efecto de la funcionalización más eficiente con COL, siendo más efectiva la relación COL:acoplantes 1:5 para el fomento de las propiedades biológicas del material.

Para el ensayo de citocompatibilidad, se preparó también la muestra NF-PVA + COL, bajo las mismas condiciones pero en ausencia de los acoplantes, este material presenta resultados semejantes a la NF-PVA sin funcionalizar con la presencia de algunos agregados de células. Este hecho permite descartar la retención física de COL en el sustrato electrohilado NF-PVA, corroborando que la funcionalización de COL en la superficie de la NF-PVA es una ruta viable para su anclaje efectivo. Los resultados del análisis de citocompatibilidad de los sustratos funcionalizados NF-PVA/COL arrojados por el ensayo preliminar realizado con la línea celular HEK-293 son prometedores avances que demuestran la viabilidad del método de funcionalización covalente post-electrohilado de COL a colecciones de nanofibras permitiendo la generación de material citocompatibles.

4.1.5. Conclusiones del capítulo

- La electrohilabilidad del CTS puro es favorecida empleando mezclas de disolventes basadas en HFIP. Las mezclas de HFIP/ácido acético 80:20 permiten la obtención de colecciones de nanofibras de CTS puro con diámetros promedio de 302 nm resistentes a medios acuosos.
- El uso del DES ChCl:Urea como aditivo para el procesamiento de quitosano de peso molecular medio permite la obtención de colecciones de microesferas de diámetro promedio 0.83 μm mediante el fenómeno de *electrospray*.
- El protocolo de amidación asistido por los agentes EDC/HOBt/DMAP permite la funcionalización covalente de las nanofibras de CTS con COL. Los materiales NF-CTS/COL difieren en el comportamiento térmico y la capacidad de hinchamiento, además de los cambios estructurales y morfológicos encontrados mediante FE-SEM y FT-IR. No obstante, la baja tasa de deposición de las nanofibras de CTS limita el estudio de las propiedades mecánicas y los ensayos de citocompatibilidad.
- En contraste, la facilidad en el procesamiento y la alta electrohilabilidad de PVA permite la exploración de estrategias de funcionalización post-electrohilado de los sustratos nanoestructurados de PVA a través de la esterificación de COL.
- El procedimiento de esterificación promovido por la triada EDC/HOBt/DMAP permite aumentar el valor biotecnológico de las colecciones de NF-PVA. La obtención del material híbrido bioconjugado NF-PVA/COL quedó demostrada mediante los análisis DSC, TGA, FT-IR, FE-SEM, así como del análisis de sus propiedades mecánicas y los perfiles de hinchamiento.
- La funcionalización post-electrohilado de NF-PVA con COL da lugar a biomateriales con mejor rendimiento mecánico, adecuada citocompatibilidad para el cultivo de la línea celular HEK-293, en comparación con las NF-PVA sin modificar.
- La incorporación de COL mediante estrategias de inmovilización post-electrohilado a sustratos citocompatibles es factible para el desarrollo de andamios celulares.

Capítulo V.

Sección experimental

A. Materiales y métodos

1. Material ITO/PVA/PEDOT:ClO₄⁻

1.1. Obtención de las nanofibras de PVA

Para la preparación de las disoluciones de PVA al 8%p/v, se disolvió PVA (CAS 9002-89-5, Sigma-Aldrich) en agua destilada a 90°C durante 12 h. Una vez preparada la disolución se vertió en una jeringa de plástico conectada a manguera de teflón con aguja de electrohilado 22G y se procedió a colocar en la bomba de suministro.

Para la obtención de nanofibras de PVA se reemplazó el colector metálico por electrodos de vidrio-ITO. Previo al proceso de electrohilado, los electrodos vidrio-ITO (KINTEC, 10 Ω) se limpiaron con agua destilada y algodón, posteriormente se realizó limpieza en ultrasonido con etanol, agua y acetona por lapsos de 5 min con cada disolvente. Finalmente, los electrodos fueron llevados a sequedad a 90°C en estufa. Los electrodos limpios se sujetaron con goma adhesiva y posteriormente se conectaron a tierra. El proceso de electrohilado se llevó a cabo empleando un equipo de electrohilado TL-01 de NaBond Technologies Co., aplicando 17 kV con una velocidad de inyección de 600 μL/h, la distancia de trabajo empleada fue de 12 cm. Durante el procesamiento se mantuvo la temperatura interna a 40°C con tiempos de electrohilado de 0.5, 1, 2, 5 y 9 h.

1.2. Funcionalización por deposición de PEDOT

El proceso de funcionalización se realizó mediante la electropolimerización de EDOT (3,4-etilendioxitiofeno). Para la obtención del polímero conductor PEDOT se preparó una disolución 0.5mM de EDOT (Sigma-Aldrich) y 0.1 mM de TBAP (perclorato de tertbutilamonio, Fulka con grado de pureza ≥99%) en acetonitrilo anhidro (Sigma-Aldrich, con grado de pureza 98.9%) bajo atmósfera de N₂ (INFRA Ultra, con grado de pureza 99.999%).

El proceso de electrooxidación de los monómeros de EDOT se realizó desde un potencial inicial de -0.5 V hasta potencial de oxidación de 1.3 V aplicado a una celda de 3

electrodos: E_R =electrodo de referencia $Ag^0/AgNO_3$ ($AgNO_3/ TBAP$ (0.01/0.1 M) en acetonitrilo), C_E =contraelectrodo placa de Pt paralelamente dispuesto al E_W =electrodo de trabajo vidrio-ITO/NF-PVA. La deposición PEDOT sobre el electrodo vidrio-ITO/NF-PVA procedió de manera simultánea al proceso de polimerización, generando una película azul de tonalidad variable.

2. Materiales bioconjugados con colágeno tipo I

2.1. Material híbrido NF-CTS/COL

2.1.1. Obtención de las microarquitecturas

Disolución de CTS medio peso molecular (CTS_M)

Para la preparación de la disolución de CTS (CAS 9012-76-4, PCode 101573140, Sigma-Aldrich) para electrohilado (denominada disolución CTS A:B) se prepararon distintas proporción de las disoluciones A y B que se detallan a continuación.

- *Disolución A*: disolución de CTS al 0.7% p/v en HFIP (Sigma-Aldrich) con agitación magnética durante 6 h a $-4^\circ C$.
- *Disolución B*: disolución de CTS al 3% p/v preparada en disolución acuosa de ácido acético 80%v/v con agitación magnética durante 6 h a temperatura ambiente.

Las mezclas de las disoluciones A:B se prepararon con agitación magnética durante 1 h a temperatura ambiente.

Disolución de CTS de alto peso molecular (CTS_A)

Para la exploración de condiciones de electrohilado se preparó una disolución al 2% p/v de CTS (CAS 9012-76-4, PCode 1001412898, Sigma-Aldrich) en disolución concentrada de ácido acético (J. T. Baker) al 80% v/v con agitación magnética durante 4 h a $60^\circ C$. Posterior a ese lapso, se adicionó un volumen correspondiente al 0.5% v/v del DES cloruro de colina:urea (ChCl:Urea) a la disolución CTS_A y se mantuvo la agitación durante 1 h a temperatura ambiente. El DES ChCl:Urea se preparó mezclando ChCl (Sigma-Aldrich) y urea

(Sigma-Aldrich) en una relación molar 1:2, la mezcla de ambos sólidos se mantuvo en estufa a 80°C durante 8 h hasta adquirir aspecto líquido e incoloro.

2.1.2. Funcionalizaciones

Los ensayos de conjugación de COL fibroso (COL tipo I, CAS 9007-34-5, Sigma-Aldrich) a las nanoestructuras de CTS se realizaron mediante amidación vía anhídridos mixtos. Para el proceso se sometió a reacción un segmento del sustrato de nanofibras de CTS y COL fibroso con estequiometría 1:5 M, el proceso fue asistido por el sistema tricomponente EDC/DMAP-HOBt como agentes de acoplamiento/transferencia (Sigma-Aldrich, cada uno con equivalencia molar 1:1 respecto a COL) y se empleó una mezcla molar 1:1 de DCM:THF como medio de reacción. La mezcla de disolventes fue secada previamente en mallas moleculares de 4 Å. Las funcionalizaciones se efectuaron a temperatura ambiente, bajo atmósfera de argón y con agitación magnética suave durante 24 h. La recuperación del material conjugado CTS/COL se realizó empleando DCM y metanol.

2.2. Material híbrido NF-PVA/COL

2.2.1 Obtención de las microarquitecturas

La disolución para electrohilado se preparó disolviendo 8%p/v de PVA (CAS 9002-89-5, Sigma-Aldrich) en agua destilada a 90°C, la temperatura se mantuvo durante 8 h con agitación magnética.

Para el proceso de electrohilado se vertió la disolución de PVA en manguera de Teflón equipada con aguja para electrohilado 20G, la producción de las colecciones de nanofibras se realizó empleando las condiciones estandarizadas en nuestro grupo de trabajo para la unidad de electrohilado TL-01 de NaBond Technologies Co.: voltaje 15 kV, temperatura 40°C, distancia aguja-colector 15 cm, y velocidad de inyección 600 µL/h.

2.2.2 Funcionalizaciones

Para los ensayos de conjugación de COL a los soportes nanoestructurados de PVA se emplearon EDC/DMAP-HOBt como agentes de acoplamiento/transferencia en mezcla 1:1 de DCM:THF, el disolvente fue secado previamente en mallas moleculares de 4 Å. Las funcionalizaciones se efectuaron a temperatura ambiente, bajo atmósfera de argón y con agitación magnética suave durante 24 h. La recuperación del material conjugado CTS/COL se realizó empleando DCM y metanol.

2.2.3 Entrecruzamiento

Para el procedimiento se disolvió ácido cítrico (10%p/p, Sigma-Aldrich) en etanol al 96%v/v (Sigma-Aldrich), se ajustó el pH de la disolución a 2 adicionando HCl 0.4 M. Las colecciones de nanofibras de PVA y PVA-COL fueron dejados en inmersión durante 24 h. Transcurrido el lapso de la reacción de entrecruzamiento se procedió a realizar tres inmersiones más por lapsos de 1 h cada uno, empleando el siguiente orden: etanol 96%v/v, metanol, metanol. Finalmente, los materiales se llevaron a sequedad a temperatura ambiente sujetando los extremos para evitar la deformación de los materiales.

B. Técnicas de caracterización

Análisis de fuerza de tensión y módulo de Young

Para la determinación de las propiedades mecánicas de los materiales fue necesario cortar probetas con la forma que se ilustra en la Figura 55 en concordancia con la norma ASTM D638. Las mediciones de fuerza de tensión y módulo de Young fueron realizadas en un equipo universal Zwick/Roell modelo Z005 del CFATA-UNAM. Las mediciones fueron verificadas por triplicado para cada muestra realizando los ensayos en seco y húmedo a velocidad de 5 mm/min a temperatura ambiente. Para los ensayos en húmedo las muestras fueron inmersas en disolución fisiológica durante 15 min previo al experimento. Las mediciones del módulo de Young, resistencia a la tracción, tensión de tracción a la rotura y elongación a la rotura fueron calculadas de las curvas de tensión-deformación.

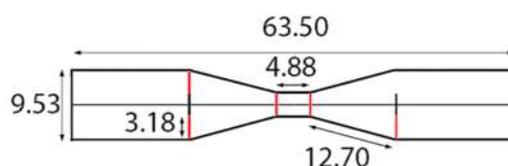


Figura 55. Esquema de las probetas empleadas para las mediciones de propiedades mecánicas, valores expresados en milímetros.

Análisis termogravimétrico (TGA)

Los termogramas fueron obtenidos empleando un Analizador Termogravimétrico modelo TGA/DSC 2 simultáneo Mettler Toledo del CFATA-UNAM. Los termogramas fueron graficados y analizados mediante el software OriginPro 9.0.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los termogramas fueron obtenidos empleando un calorímetro diferencial de barrido DSC Q200 de TA Instruments, los análisis térmicos fueron realizados bajo atmósfera dinámica de argón (50 mL/min). Los termogramas fueron graficados y analizados en el software OriginPro 9.0.

Ciclos de descarga y carga galvanostática (CDC)

Los ensayos de carga-descarga se realizaron utilizando el sistema de 3 electrodos: E_R=electrodo de referencia Ag⁰/AgNO₃ (AgNO₃/ TBAP (0.01/0.1 M) en acetonitrilo), C_E=contraelectrodo placa de Pt paralelamente dispuesto al E_W=electrodo de trabajo vidrio-ITO/NF-PVA. Para los experimentos se aplicó una intensidad de corriente de 10 mA desde potencial de -0.5 hasta 1.15 V a velocidad de barrido de 0.05 V/s empleando un potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT302N (Metrohm) operado desde el software Nova 2.0.

Determinación de diámetro promedio

Los diámetros promedio de las colecciones de micro y nanofibras fueron calculadas a partir de la medición de 60 diámetros individuales empleando el software ImageJ, las mediciones fueron realizadas en imágenes de FE-SEM adquiridas a 5,000 magnificaciones. Los valores de diámetro promedio y desviación estándar (DE) se calcularon empleando las funciones de Excel PROMEDIO y DESVESTA que corresponden a las siguientes fórmulas respectivamente:

$$\text{Ecuación 1. Promedio } (\bar{x}) = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

$$\text{Ecuación 2. DE}(\sigma) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

Los histogramas se graficaron mediante la función HISTOGRAMA de Excel.

Espectroscopia de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis)

Los espectros de UV-Vis fueron obtenidos en espectrofotómetro Genesys 10S de Thermo Fischer Scientific, empleando una celdas de cuarzo. La adquisición de los espectros se realizó en el rango de 200 a 1100 nm.

Espectroscopia de fotoemisión de rayos X (XPS)

El análisis de superficie XPS se realizó en espectrómetro ESCALAB 250Xi de Thermo Scientific con monocromador de Al (XR15) operado a 20 eV, los espectros generados fueron analizados mediante el software OriginPro 9.0.

Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de IR fueron obtenidos en espectrofotómetro Nicolet iS10 de Thermo Scientific usando la técnica de ATR. Todos los espectros fueron graficados y analizados en el software OriginPro 9.0.

Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)

Los materiales producidos fueron analizados en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) JOEL JSM-7600F con filamento incandescente de W, del Instituto de Investigaciones en Metalurgia y Materiales de la UMSNH. La preparación de las colecciones de nanofibras se realizó mediante pulverización catódica de cobre para la obtención de imágenes por la técnica de electrones secundarios; el dispositivo ITO/NF-PVA/PEDOT:ClO₄⁻ fue analizado sin preparación previa. Las micrografías fueron procesadas en el software ImageJ para el ajuste de las barras de escala. Los análisis elementales de las muestras mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX) fueron realizados en el mismo equipo.

Solubilidad y cinéticas de hinchamiento

Las colecciones de nanofibras y los materiales híbridos se cortaron en cuadrados de 1 cm x 1 cm para los ensayos de solubilidad y cinéticas de hinchamiento. Para la evaluación de la solubilidad las muestras fueron inmersas en disolventes orgánicos, disoluciones fisiológicas y medios de pH variable durante 24 h a temperatura ambiente.

Para las cinéticas de hinchamiento se registró el peso seco de la muestra en estudio para su posterior inmersión durante distintos lapsos, para el registro del peso de la muestra

se retiró el exceso de medio acuoso con ayuda de un algodón. Las cinéticas de hinchamiento se construyeron graficando los porcentajes de retención de humedad (% H) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ecuación 3. } \% H = \left(\frac{P_{húmedo} - P_{seco}}{P_{seco}} \right) 100$$

Voltametría cíclica

La polimerización potenciodinámica de EDOT a PEDOT se monitoreó voltametría cíclica durante 20 ciclos a velocidad de barrido de 0.05 V/s empleando un potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT302N (Metrohm) operado desde el software Nova 2.0, los experimentos fueron realizados utilizando el sistema de 3 electrodos: E_R=electrodo de referencia Ag⁰/AgNO₃ (AgNO₃/ TBAP (0.01/0.1 M) en acetonitrilo), C_E=contraelectrodo placa de Pt paralelamente dispuesto al E_W=electrodo de trabajo vidrio-ITO/NF-PVA.

C. Ensayos *in vitro*

Citocompatibilidad/toxicidad

Las células embrionarias de riñón humanas HEK-293 fueron cultivadas en frascos T25 a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y empleando los siguientes medios suplementados: DMEM (Gibco®, cat. # 11995-040), suero fetal bovino 10% (FBS Gibco®, cat. # 10437-028) y penicilina-estreptomicina 1% (10,000 U/mL, Gibco®, cat. # 15140). El medio de cultivo fue reemplazado cada dos días. Cuando la monocapa de los cultivos celulares alcanzó confluencia del 90%, las células fueron pasadas por tripsina y cultivadas nuevamente. Los andamios NF-PVA/COL y los controles (NF-PVA, NF-PVA + COL) fueron recortados en cuadrados de 0.5 mm² y esterilizados con luz UV por lapsos de 10 min cada lado. Los andamios fueron fijados al fondo de cajas Petri de 35 mm. Para el cultivo, las células HEK-293 fueron transferidas desde frascos T25, y se realizó monitoreo cada 24 h. Transcurridas 48 h después del cultivo de las células en los andamios, el medio de cultivo se reemplazó, y se adicionaron 2.5 µL de adenovirus Ad-eGFP (3.3 x 10⁷ VP/mL). Las células fijadas en la superficie de las cajas Petri fueron analizadas como control para la evaluación de citocompatibilidad de cada andamio (n=6 para cada muestra). El análisis detallado de morfología celular se enfocó en el área del soma, número y longitud. Los siguientes datos fueron empleados como comparativos de los agregados de las células: número de aglomerados por área, número de células por agregado, y área del agregado. Las imágenes de los cultivos fueron adquiridas en un microscopio confocal LSM510 Zeiss, usando un objetivo 20X Zeiss Plan-APOCHROMAT, NA = 0.8, WD = 0.55 mm (Cat. No. 440641-9911). Las características de las células y de los agregados fueron determinadas mediante el software ImageJ. El análisis ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Turkey fue realizado empleando el software GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

El ensayo de proliferación celular EdU fue realizado empleando los materiales NF-PVA y NF-PVA/COL frente a la línea celular HEK-293; para ambos materiales, cuatro replicados fueron estudiados. La tasa de proliferación se determine mediante el conteo de

células a tiempos variables de cultivo: 24, 48 y 72 h. El marcaje EdU permitió la visualización de las células capaces de sintetizar ADN. El índice del marcaje (LI) fue estimado como el porcentaje de núcleos celulares que exhibían el indicador EdU respecto al total de núcleos teñidos con DAPI. Los andamios se sujetaron en cubreobjetos de vidrio (12 mm - Electron Microscopy Cat. # 72196-12), y las se sembraron células HEK-293 en cada uno de los cubreobjetos. Cuatro pocillos con área superficial de 2 cm² (ASi Alkali Scientific Inc., Cat. TP9004) se emplearon para sostener los andamios. La densidad de células sembradas fue de 0.05 x 10⁶ células por pocillo, concentración determinada mediante cámara de Neubauer. El ensayo de proliferación EdU se realizó como se describe a continuación: se disolvió una disolución stock de EdU [10 µM] en DMSO. 10 µL de una disolución stock (10 mM) se disolvió en 5 mL de medio de cultivo, previamente atemperado, para preparar 20 µL la disolución para el marcaje celular EdU. El volumen correspondiente a la mitad del medio de cultivo de las células HEK-293 fue reemplazado con un volumen igual de la disolución del marcador EdU (concentración final de 10 µM). Las células fueron incubadas en atmósfera de CO₂ al 5% durante 2 h. Cada cubreobjetos fue transferido a un nuevo pocillo, se adicionó 1 mL de formaldehído al 3.7% en PBS a cada pocillo y se llevaron nuevamente a incubación durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se removió el formaldehído y las células se lavaron dos veces con 1 mL de BSA 3% en PBS (1:1). La disolución de los lavados se removió y, posteriormente, se adicionó 1 mL de 0.5% Triton® X-100 en PBS (1:1) a cada pocillo; las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. El buffer de permeabilización fue removido de las células para realizar posteriormente dos lavados con 1 mL of 3% BSA en PBS (1:1) cada uno. La disolución de los lavados se removió y se adicionó un coctel de reacción a cada muestra, se procedió a dejar transcurrir la reacción durante 30 min protegiendo las muestras de la luz. Después de este lapso, el coctel fue removido, cada pocillo fue lavado nuevamente con 1 mL de 3% BSA en PBS (1:1). Las células marcadas fueron montadas con VECTASHIELD®, los núcleos fueron teñidos con DAPI para la obtención de imágenes mediante microscopia de epifluorescencia empleando un objetivo de 10X para el conteo de las células en las imágenes digitales.

Para el análisis estadístico, los datos fueron normalizados calculando el LI de cada replicado. Para la determinación del efecto de los andamios NF-PVA/COL durante los tres lapsos de cultivo de las células marcadas con EdU, se realizó un estudio ANOVA bidireccional con la prueba Bonferroni empleando el software GraphPad versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

Publicaciones

Eco-friendly Production of Metallic Nanoparticles in Polymeric Solutions and Their Processing into Biocompatible Composites

Alejandra Pérez-Nava¹, Josué D. Mota-Morales², Zaira Y. García-Carvajal³, Sara E. Herrera-Rodríguez³, Gerardo Arrebillaga-Bon³, Cristy L. Azanza-Ricardo², Milton O. Vazquez-Lepe⁴, and J. Betzabe Gonzalez-Campos^{1*}

¹Biological and Chemical Research Institute, UMNSH, Ciudad Universitaria, Morelia 58030, México

²Center of Applied Physics and Advanced Technology, UNAM, Querétaro 76230, México

³Medical and Pharmaceutical Biotechnology Department, CIATEJ, Guadalajara 44270, México

⁴Engineering Projects Department, University of Guadalajara, Guadalajara 45100, México

(Received August 4, 2017; Revised October 20, 2017; Accepted October 24, 2017)

Abstract: Silver and gold nanoparticles were produced and embedded in poly(vinyl alcohol) (PVA) and chitosan (CTS) solutions by the photoreduction of metallic salt precursors triggered by direct sunlight irradiation, in which the polymers acted as reducing, dispersing and stabilizing agents. Sunlight photoreduction can be standardized using a constant UV index regardless of the season. This strategy was found to be an improvement over other common energy sources used to trigger the reduction of metal ions, including UV light irradiation and high-temperature reduction with mechanical stirring. The resulting PVA/metal nanoparticle and CTS/metal nanoparticle composite solutions were processed into thin films and nanofiber composites. *In vitro* testing of the cytotoxicity and biocompatibility demonstrates that the film composites are non-toxic and biocompatible with the HT-29 human colon cancer cell line. Promotion of HT-29 cell growth using our hybrid composites was observed, in contrast to other studies in which colloidal NPs were tested. Therefore, a sustainable approach for the one-step preparation of biocompatible polymer/metallic nanoparticle composites is reported.

Keywords: Biocompatible composites, Photoreduction, Metallic nanoparticles, Cytotoxicity, HT-29 cells

Introduction

Silver and gold nanoparticles (AgNP and AuNP) are of great interest due to their fascinating applications in science and industry derived from their unique optical, electronic and biomedical properties, which are intrinsic to their nanometric dimensions [1]. Among different reported routes for the synthesis of metal nanoparticles (MNP), the chemical reduction of metal ions is still the most widely applied technique owing to the improved size and shape control; however, many potentially hazardous, common chemical agents are normally used, thus limiting the application of the resulting nanoparticles in biomedical devices.

Modifications of these methodologies have been explored in an effort to avoid or reduce the use of reducing, stabilizing and dispersing agents [2-4]. In this context, polymers can simultaneously act as reducing, stabilizing and dispersing agents, representing an interesting alternative for the reduction of metallic salts [5-9]. Specifically, the use of nontoxic materials, such as biopolymers, reduce the environmental risk and are conducive to new strategies for the green and rapid synthesis of metal nanoparticles [9]. Likewise, with regards to sustainability; sunlight can be used to induce the reduction of the salt precursor [8]. Chitosan (CTS) and poly(vinyl alcohol) (PVA) are attractive to this end since both polymers are good reducing agents for noble metal salts

[7-13]. They are low-cost and versatile polymers that can be easily processed into multiple shapes in one and two dimensions, including thin films and nanofibers. Additionally, their biocompatibility, biodegradability and non-toxicity make them ideal for biomedical applications. Composite materials based on these polymers and MNP have demonstrated antibacterial and fungicidal activity and enhanced mechanical, optical and chemical properties [8-15]. Polymer-based hybrid composites have very useful and unique properties in therapeutic devices; they can work as a therapeutic cure for diabetes and its complications [16], as wound-dressing materials [17,18], as drug-delivery systems [19], as biosensors [17] and in functional applications [21] and have excellent properties for the removal of organochlorine pesticides from water [22]. In particular, electrospun Ag- and Au-containing polymer nanofiber collections have been investigated for biomedical applications [23-30]. Therefore, biomimetic scaffolds can be produced with specific characteristics to induce native-like cellular activities, and inorganic/composite nanofibers have exclusive advantages for applications in this area.

The effectiveness of noble metal nanoparticles, such as gold and silver, as antimicrobial agents and in wound healing is well known and has been extensively studied [23-30]; however, their cyto- and genotoxicity towards mammalian cells may limit their use in biomaterials and hence is of concern. Several studies on the effect of particle size, shape and crystal structure on the degree of toxicity have been reported [31,32]. Nonetheless, it has been demonstrated that

*Corresponding author: jbgonzalez@umich.mx

Review

Comparative analysis of fiber alignment methods in electrospinning

Andrew J. Robinson,¹ Alejandra Pérez-Nava,² Shan C. Ali,¹ J. Betzabe González-Campos,² Julianne L. Holloway,³ and Elizabeth M. Cosgriff-Hernandez^{1,*}

SUMMARY

Fabrication of anisotropic materials is highly desirable in designing biomaterials and tissue-engineered constructs. Electrospinning has been broadly adopted due to its versatility in producing non-woven fibrous meshes with tunable fiber diameters (from 10 nm to 10 μ m), microarchitectures, and construct geometries. A myriad of approaches has been utilized to control fiber alignment of electrospun materials to achieve complex microarchitectures, improve mechanical properties, and provide topographical cellular cues. This review provides a comparative analysis of the techniques developed to generate fiber alignment in electrospun materials. A description of the underlying mechanisms that drive fiber alignment, setup variations for each technique, and the resulting impact on the aligned microarchitecture is provided. A critical analysis of the advantages and limitations of each approach is provided to guide researchers in method selection. Finally, future perspectives of advanced electrospinning methodologies are discussed in terms of developing a scalable method with precise control of microarchitecture.

INTRODUCTION

Nanofiber and microfiber materials have grown in popularity in numerous fields, including tissue engineering, bioprosthetics, drug delivery, and biosensors, due to their unique properties.¹ In particular, these fibrous materials provide large surface area-to-volume ratios, interconnected porosity, and diverse mechanical properties. Many methods can be used to synthesize nanofiber meshes, including phase separation, template synthesis, drawing, and self-assembly.^{2,3} However, these methods are time consuming, limited in fiber length, and may be unable to produce continuous fiber scaffolds.^{2,4} Comparatively, electrospinning offers a distinct advantage over other methods as it allows for relatively rapid production of continuous fiber meshes, can be used with a broad range of materials, and is highly tunable. Polymers, ceramics, and composites have all been used in electrospinning.⁵ Ceramic nanofibers via electrospinning have been fabricated utilizing a composite solution with subsequent sintering, calcination, or chemical conversion.⁶ This material diversity makes electrospinning a well-suited method in the production of fibrous constructs for applications in biomedical engineering.

Electrospinning is an electrostatically driven micro- and nanofiber fabrication technique that enables the rapid and cost-effective fabrication of non-woven fibrous constructs.⁷⁻⁹ This fiber formation technique setup typically utilizes a syringe pump to dispense a polymer solution through a charged needle. Increasing the applied voltage on the needle allows for the electrostatic force to overcome the solution

Progress and potential

Electrospinning is a widely used technique for the fabrication of non-woven fibrous materials. Methods to induce electrospun fiber alignment provide researchers with new tools to guide cellular behavior, expand mechanical properties, and improve a variety of physical properties. This comparative analysis provides a detailed description of popular methods to generate fiber alignment and mesh anisotropy. A discussion of the advantages, disadvantages, and setup variations is provided for each method to guide researchers on method selection for a given application. Although significant progress has been made to advance electrospinning processes, there remains a need for continued improvements to address reproducibility, inhomogeneity of microarchitecture, and scalability of meshes in both size and production rate. Overall, the versatility and expanding control of microarchitecture has secured a growing role for aligned electrospinning methods in advanced manufacturing of medical devices.



Referencias

1. Zdraveva, E.; Fang, J.; Mijovic, B.; Lin, T., 11 - Electrospun nanofibers. In *Structure and Properties of High-Performance Fibers*, Bhat, G., Ed. Woodhead Publishing: Oxford, 2017; pp 267-300.
2. Wei, Q.; Tao, D.; Xu, Y., 1 - Nanofibers: principles and manufacture. In *Functional Nanofibers and their Applications*, Wei, Q., Ed. Woodhead Publishing: 2012; pp 3-21.
3. Nemati, S.; Kim, S.-j.; Shin, Y. M.; Shin, H., Current progress in application of polymeric nanofibers to tissue engineering. *Nano Convergence* **2019**, *6* (1), 36.
4. Nakata, K.; Fujii, K.; Ohkoshi, Y.; Gotoh, Y.; Nagura, M.; Numata, M.; Kamiyama, M., Poly(ethylene terephthalate) Nanofibers Made by Sea–Island-Type Conjugated Melt Spinning and Laser-Heated Flow Drawing. *Nakata, K., Fujii, K., Ohkoshi, Y., Gotoh, Y., Nagura, M., Numata, M., & Kamiyama, M. (2007). Poly (ethylene terephthalate) Nanofibers Made by Sea–Island-Type Conjugated Melt Spinning and Laser-Heated Flow Drawing. Macromolecular Rapid Communications* **2007**, *28* (6), 792-795.
5. Han, W.; Bhat, G. S.; Wang, X., Investigation of Nanofiber Breakup in the Melt-Blowing Process. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2016**, *55* (11), 3150-3156.
6. Yifang, L., Fabrication of Micro/Nano optical Fiber by Electrospinning Direct-writing. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* **2017**, *167*, 012027.
7. Kim, S. Y.; Purnama, P.; Kim, S. H., Fabrication of poly(l-lactide) fibers/sheets using supercritical fluid through flash-spinning process. *Macromolecular Research* **2010**, *18* (12), 1233-1236.
8. Shao, J.; Chen, C.; Wang, Y.; Chen, X.; Du, C., Early stage evolution of structure and nanoscale property of nanofibers in thermally induced phase separation process. *Reactive and Functional Polymers* **2012**, *72* (10), 765-772.
9. Wang, C.; Chen, Q.; Xu, H.; Wang, Z.; Zhang, X., Photoresponsive Supramolecular Amphiphiles for Controlled Self-Assembly of Nanofibers and Vesicles. *Advanced Materials* **2010**, *22* (23), 2553-2555.
10. Gumel, A. M.; Annuar, M. S. M.; Ishak, K. A.; Ahmad, N., Carbon Nanofibers-Poly-3-hydroxyalkanoates Nanocomposite: Ultrasound-Assisted Dispersion and Thermostructural Properties. *Journal of Nanomaterials* **2014**, *2014*, 264206.
11. Ren, L.; Pandit, V.; Elkin, J.; Denman, T.; Cooper, J. A.; Kotha, S. P., Large-scale and highly efficient synthesis of micro- and nano-fibers with controlled fiber morphology by centrifugal jet spinning for tissue regeneration. *Nanoscale* **2013**, *5* (6), 2337-2345.
12. Pan, L. J.; Pu, L.; Shi, Y.; Sun, T.; Zhang, R.; Zheng, Y. O., Hydrothermal Synthesis of Polyaniline Mesostructures. *Advanced Functional Materials* **2006**, *16* (10), 1279-1288.
13. Li, D.; Xia, Y., Fabrication of Titania Nanofibers by Electrospinning. *Nano Letters* **2003**, *3* (4), 555-560.
14. Kishan, A. P.; Cosgriff-Hernandez, E. M., Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2017**, *105* (10), 2892-2905.
15. Xue, J.; Wu, T.; Dai, Y.; Xia, Y., Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chemical Reviews* **2019**, *119* (8), 5298-5415.
16. Rutledge, G. C.; Fridrikh, S. V., Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59* (14), 1384-1391.
17. Shin, Y. M.; Hohman, M. M.; Brenner, M. P.; Rutledge, G. C., Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Polymer* **2001**, *42* (25), 09955-09967.

18. Wendorff, J. H.; Agarwal, S.; Greiner, A., *Electrospinning: materials, processing, and applications*. John Wiley & Sons: 2012.
19. Li, Z.; Wang, C., *One-dimensional nanostructures: electrospinning technique and unique nanofibers*. Springer: 2013.
20. Zhang, C.; Li, Y.; Wang, P.; Zhang, H., Electrospinning of nanofibers: Potentials and perspectives for active food packaging. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2020**, *19* (2), 479-502.
21. Celebioglu, A.; Uyar, T., Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems: polymer-free nanofibers from cyclodextrin derivatives. *Nanoscale* **2012**, *4* (2), 621-631.
22. Edmondson, D.; Cooper, A.; Jana, S.; Wood, D.; Zhang, M., Centrifugal electrospinning of highly aligned polymer nanofibers over a large area. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22* (35), 18646-18652.
23. Brown, T. D.; Dalton, P. D.; Hutmacher, D. W., Direct Writing By Way of Melt Electrospinning. *Advanced Materials* **2011**, *23* (47), 5651-5657.
24. Xin, Y.; Reneker, D. H., Hierarchical polystyrene patterns produced by electrospinning. *Polymer* **2012**, *53* (19), 4254-4261.
25. Mou, F.; Guan, J.-g.; Shi, W.; Sun, Z.; Wang, S., Oriented Contraction: A Facile Nonequilibrium Heat-Treatment Approach for Fabrication of Maghemite Fiber-in-Tube and Tube-in-Tube Nanostructures. *Langmuir* **2010**, *26* (19), 15580-15585.
26. Bognitzki, M.; Czado, W.; Frese, T.; Schaper, A.; Hellwig, M.; Steinhart, M.; Greiner, A.; Wendorff, J. H., Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Advanced Materials* **2001**, *13* (1), 70-72.
27. Chen, H.; Wang, N.; Di, J.; Zhao, Y.; Song, Y.; Jiang, L., Nanowire-in-Microtube Structured Core/Shell Fibers via Multifluidic Coaxial Electrospinning. *Langmuir* **2010**, *26* (13), 11291-11296.
28. Zhao, Y.; Cao, X.; Jiang, L., Bio-mimic Multichannel Microtubes by a Facile Method. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (4), 764-765.
29. Deitzel, J. M.; Kleinmeyer, J.; Harris, D.; Beck Tan, N. C., The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* **2001**, *42* (1), 261-272.
30. Eda, G.; Shivkumar, S., Bead-to-fiber transition in electrospun polystyrene. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *106* (1), 475-487.
31. Fong, H.; Chun, I.; Reneker, D. H., Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* **1999**, *40* (16), 4585-4592.
32. Lee, K. H.; Kim, H. Y.; Bang, H. J.; Jung, Y. H.; Lee, S. G., The change of bead morphology formed on electrospun polystyrene fibers. *Polymer* **2003**, *44* (14), 4029-4034.
33. Yang, Q.; Li, Z.; Hong, Y.; Zhao, Y.; Qiu, S.; Wang, C.; Wei, Y., Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **2004**, *42* (20), 3721-3726.
34. Koski, A.; Yim, K.; Shivkumar, S., Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters* **2004**, *58* (3), 493-497.
35. Zhao, Y. Y.; Yang, Q. B.; Lu, X. F.; Wang, C.; Wei, Y., Study on correlation of morphology of electrospun products of polyacrylamide with ultrahigh molecular weight. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **2005**, *43* (16), 2190-2195.
36. McKee, M. G.; Layman, J. M.; Cashion, M. P.; Long, T. E., Phospholipid Nonwoven Electrospun Membranes. *Science* **2006**, *311* (5759), 353.
37. Haghi, A. K.; Akbari, M., Trends in electrospinning of natural nanofibers. *Physica Status Solidi (a)* **2007**, *204* (6), 1830-1834.

38. Pham, Q. P.; Sharma, U.; Mikos, A. G., Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Microfiber and Multilayer Nanofiber/Microfiber Scaffolds: Characterization of Scaffolds and Measurement of Cellular Infiltration. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (10), 2796-2805.
39. Zhang, C.; Yuan, X.; Wu, L.; Han, Y.; Sheng, J., Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal* **2005**, *41* (3), 423-432.
40. Zong, X.; Kim, K.; Fang, D.; Ran, S.; Hsiao, B. S.; Chu, B., Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer* **2002**, *43* (16), 4403-4412.
41. Huang, C.; Chen, S.; Lai, C.; Reneker, D. H.; Qiu, H.; Ye, Y.; Hou, H., Electrospun polymer nanofibres with small diameters. *Nanotechnology* **2006**, *17* (6), 1558-1563.
42. Sukigara, S.; Gandhi, M.; Ayutsede, J.; Micklus, M.; Ko, F., Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning—part 1: processing parameters and geometric properties. *Polymer* **2003**, *44* (19), 5721-5727.
43. Zhang, Y.; Ouyang, H.; Lim, C. T.; Ramakrishna, S.; Huang, Z.-M., Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2005**, *72B* (1), 156-165.
44. Pattamaprom, C.; Hongrojjanawiwat, W.; Koombhongse, P.; Supaphol, P.; Jarusuwannapoo, T.; Rangkupan, R., The Influence of Solvent Properties and Functionality on the Electrospinnability of Polystyrene Nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering* **2006**, *291* (7), 840-847.
45. Yuan, X.; Zhang, Y.; Dong, C.; Sheng, J., Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. *Polymer International* **2004**, *53* (11), 1704-1710.
46. Reneker, D. H.; Chun, I., Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* **1996**, *7* (3), 216-223.
47. Zhou, F.-L.; Gong, R.-H.; Porat, I., Mass production of nanofibre assemblies by electrostatic spinning. *Polymer International* **2009**, *58* (4), 331-342.
48. Xu, Y.; Li, X.; Xiang, H.-F.; Zhang, Q.-Q.; Wang, X.-X.; Yu, M.; Hao, L.-Y.; Long, Y.-Z., Large-Scale Preparation of Polymer Nanofibers for Air Filtration by a New Multineedle Electrospinning Device. *Journal of Nanomaterials* **2020**, *2020*, 4965438.
49. Xie, S.; Zeng, Y., Effects of Electric Field on Multineedle Electrospinning: Experiment and Simulation Study. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2012**, *51* (14), 5336-5345.
50. Sruthi, R.; Balagangadharan, K.; Selvamurugan, N., Polycaprolactone/polyvinylpyrrolidone coaxial electrospun fibers containing veratric acid-loaded chitosan nanoparticles for bone regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2020**, *193*, 111110.
51. Huang, C.-K.; Zhang, K.; Gong, Q.; Yu, D.-G.; Wang, J.; Tan, X.; Quan, H., Ethylcellulose-based drug nano depots fabricated using a modified triaxial electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *152*, 68-76.
52. Kancheva, M.; Toncheva, A.; Manolova, N.; Rashkov, I., Advanced centrifugal electrospinning setup. *Materials Letters* **2014**, *136*, 150-152.
53. Wang, L.; Chang, M.-W.; Ahmad, Z.; Zheng, H.; Li, J.-S., Mass and controlled fabrication of aligned PVP fibers for matrix type antibiotic drug delivery systems. *Chemical Engineering Journal* **2017**, *307*, 661-669.
54. Ki, C. S.; Baek, D. H.; Gang, K. D.; Lee, K. H.; Um, I. C.; Park, Y. H., Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. *Polymer* **2005**, *46* (14), 5094-5102.
55. Nezarati, R. M.; Eifert, M. B.; Cosgriff-Hernandez, E., Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology. *Tissue Engineering Part C: Methods* **2013**, *19* (10), 810-819.

56. Casper, C. L.; Stephens, J. S.; Tassi, N. G.; Chase, D. B.; Rabolt, J. F., Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. *Macromolecules* **2004**, *37* (2), 573-578.
57. Shabafrooz, V.; Mozafari, M.; Vashaei, D.; Tayebi, L., Electrospun Nanofibers: From Filtration Membranes to Highly Specialized Tissue Engineering Scaffolds. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2014**, *14* (1), 522-534.
58. Jiang, S.; Chen, Y.; Duan, G.; Mei, C.; Greiner, A.; Agarwal, S., Electrospun nanofiber reinforced composites: a review. *Polymer Chemistry* **2018**, *9* (20), 2685-2720.
59. Li, Y.; Yin, X.; Yu, J.; Ding, B., Electrospun nanofibers for high-performance air filtration. *Composites Communications* **2019**, *15*, 6-19.
60. Mohd Abdah, M. A. A.; Abdul Rahman, N.; Sulaiman, Y., Enhancement of electrochemical performance based on symmetrical poly-(3,4-ethylenedioxythiophene) coated polyvinyl alcohol/graphene oxide/manganese oxide microfiber for supercapacitor. *Electrochimica Acta* **2018**, *259*, 466-473.
61. Bosworth, L. A.; Turner, L.-A.; Cartmell, S. H., State of the art composites comprising electrospun fibres coupled with hydrogels: a review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2013**, *9* (3), 322-335.
62. Torres-Giner, S.; Pérez-Masiá, R.; Lagaron, J. M., A review on electrospun polymer nanostructures as advanced bioactive platforms. *Polymer Engineering & Science* **2016**, *56* (5), 500-527.
63. Delgado-Rangel, L. H.; Hernández-Vargas, J.; Becerra-González, M.; Martínez-Torres, A.; Prokhorov, E.; González Campos, J. B., Development of Collagen/Poly(vinyl alcohol)/Chondroitin Sulfate and Collagen/Poly(vinyl alcohol)/HA Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering. *Fibers and Polymers* **2019**, *20* (12), 2470-2484.
64. Mitchell, A. C.; Briquez, P. S.; Hubbell, J. A.; Cochran, J. R., Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomaterialia* **2016**, *30*, 1-12.
65. Al-Wafi, R.; Mansour, S. F.; Ahmed, M. K., Mechanical, microstructural properties and cell adhesion of Sr/Se-hydroxyapatite/graphene/polycaprolactone nanofibers. *Journal of Thermoplastic Composite Materials* **2020**, 0892705720912781.
66. Mohandesnezhad, S.; Pilehvar-Soltanahmadi, Y.; Alizadeh, E.; Goodarzi, A.; Davaran, S.; Khatamian, M.; Zarghami, N.; Samiei, M.; Aghazadeh, M.; Akbarzadeh, A., In vitro evaluation of Zeolite-nHA blended PCL/PLA nanofibers for dental tissue engineering. *Materials Chemistry and Physics* **2020**, *252*, 123152.
67. Chen, C.; Tang, Y.; Vlahovic, B.; Yan, F., Electrospun Polymer Nanofibers Decorated with Noble Metal Nanoparticles for Chemical Sensing. *Nanoscale Research Letters* **2017**, *12* (1), 451.
68. Spivak, M. Y.; Bubnov, R. V.; Yemets, I. M.; Lazarenko, L. M.; Tymoshok, N. O.; Ulberg, Z. R., Gold nanoparticles - the theranostic challenge for PPPM: nanocardiology application. *EPMA Journal* **2013**, *4* (1), 18.
69. Tang, L.; Duan, F.; Chen, M., Green synthesis of silver nanoparticles embedded in polyaniline nanofibers via vitamin C for supercapacitor applications. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* **2017**, *28* (11), 7769-7777.
70. Balakrishnan, S. B.; Thambusamy, S., Preparation of silver nanoparticles and riboflavin embedded electrospun polymer nanofibrous scaffolds for in vivo wound dressing application. *Process Biochemistry* **2020**, *88*, 148-158.
71. Saderi, N.; Rajabi, M.; Akbari, B.; Firouzi, M.; Hassannejad, Z., Fabrication and characterization of gold nanoparticle-doped electrospun PCL/chitosan nanofibrous scaffolds

- for nerve tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2018**, *29* (9), 134.
72. He, M.; Chen, M.; Dou, Y.; Ding, J.; Yue, H.; Yin, G.; Chen, X.; Cui, Y. J. P., Electrospun silver nanoparticles-embedded feather keratin/poly (vinyl alcohol)/poly (ethylene oxide) antibacterial composite nanofibers. *Polymers* **2020**, *12* (2), 305.
 73. Baei, P.; Hosseini, M.; Baharvand, H.; Pahlavan, S., Electrically conductive materials for in vitro cardiac microtissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2020**, *108* (5), 1203-1213.
 74. Park, Y.-S.; Kim, J.; Oh, J. M.; Park, S.; Cho, S.; Ko, H.; Cho, Y.-K., Near-Field Electrospinning for Three-Dimensional Stacked Nanoarchitectures with High Aspect Ratios. *Nano Letters* **2020**, *20* (1), 441-448.
 75. Nezarati, R. M.; Eifert, M. B.; Dempsey, D. K.; Cosgriff-Hernandez, E., Electrospun vascular grafts with improved compliance matching to native vessels. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2015**, *103* (2), 313-323.
 76. Manakhov, A.; Kedroňová, E.; Medalová, J.; Černočová, P.; Obrusník, A.; Michlíček, M.; Shtansky, D. V.; Zajíčková, L., Carboxyl-anhydride and amine plasma coating of PCL nanofibers to improve their bioactivity. *Materials & Design* **2017**, *132*, 257-265.
 77. Sheikh, F. A.; Zargar, M. A.; Tamboli, A. H.; Kim, H., A super hydrophilic modification of poly(vinylidene fluoride) (PVDF) nanofibers: By in situ hydrothermal approach. *Applied Surface Science* **2016**, *385*, 417-425.
 78. Kaur, S.; Ma, Z.; Gopal, R.; Singh, G.; Ramakrishna, S.; Matsuura, T., Plasma-Induced Graft Copolymerization of Poly(methacrylic acid) on Electrospun Poly(vinylidene fluoride) Nanofiber Membrane. *Langmuir* **2007**, *23* (26), 13085-13092.
 79. Rim, N. G.; Shin, C. S.; Shin, H. J. B. m., Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. *Biomedical Materials* **2013**, *8* (1), 014102.
 80. Yoo, H. S.; Kim, T. G.; Park, T. G., Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, *61* (12), 1033-1042.
 81. del Valle, M.; Ramírez, A.; Hernández, L.; Armijo, F.; Díaz, F.; Arteaga, G. J. I. J. E. S., Influence of the Supporting Electrolyte on the Electrochemical Polymerization of 3, 4-Ethylenedioxythiophene. Effect on p-and n-Doping/Undoping, Conductivity and Morphology. *International Journal of Electrochemistry* **2016**, *11*, 7048-7065.
 82. Donahue, M. J.; Sanchez-Sanchez, A.; Inal, S.; Qu, J.; Owens, R. M.; Mecerreyes, D.; Malliaras, G. G.; Martin, D. C., Tailoring PEDOT properties for applications in bioelectronics. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2020**, *140*, 100546.
 83. Zhou, N.; Buchholz, D. B.; Zhu, G.; Yu, X.; Lin, H.; Facchetti, A.; Marks, T. J.; Chang, R. P. H., Ultraflexible Polymer Solar Cells Using Amorphous Zinc-Indium-Tin Oxide Transparent Electrodes. *Advanced Materials* **2014**, *26* (7), 1098-1104.
 84. Yu, Z.; Perera, I. R.; Daeneke, T.; Makuta, S.; Tachibana, Y.; Jasieniak, J. J.; Mishra, A.; Bäuerle, P.; Spiccia, L.; Bach, U., Indium tin oxide as a semiconductor material in efficient p-type dye-sensitized solar cells. *NPG Asia Materials* **2016**, *8* (9), e305-e305.
 85. Palma-Cando, A. U.; Frontana-Uribe, B. A.; Maldonado, J. L.; Hernández, M. R., Control of Thickness of PEDOT Electrodeposits on Glass/ITO Electrodes from Organic Solutions and its Use as Anode in Organic Solar Cells. *Procedia Chemistry* **2014**, *12*, 92-99.
 86. 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.

87. Kamoun, E. A.; Kenawy, E.-R. S.; Chen, X., A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research* **2017**, *8* (3), 217-233.
88. Rose, A.; Guru Prasad, K.; Sakthivel, T.; Gunasekaran, V.; Maiyalagan, T.; Vijayakumar, T., Electrochemical analysis of Graphene Oxide/Polyaniline/Polyvinyl alcohol composite nanofibers for supercapacitor applications. *Applied Surface Science* **2018**, *449*, 551-557.
89. Cao, F.; Guo, S.; Ma, H.; Gong, J., ITO Electrode Modified by α -K6[P2W18O62] Hybrid Nanofibers for Nitrite Determination. *Electroanalysis* **2012**, *24* (2), 418-424.
90. Mohd Abdah, M. A. A.; Zubair, N. A.; Azman, N. H. N.; Sulaiman, Y., Fabrication of PEDOT coated PVA-GO nanofiber for supercapacitor. *Materials Chemistry and Physics* **2017**, *192*, 161-169.
91. Zubair, N. A.; Rahman, N. A.; Lim, H. N.; Sulaiman, Y., Production of Conductive PEDOT-Coated PVA-GO Composite Nanofibers. *Nanoscale Research Letters* **2017**, *12* (1), 113.
92. Rudd, S.; Murphy, P. J.; Evans, D. R., Diffusion controlled vapour deposition of mixed doped PEDOT. *Synthetic Metals* **2018**, *242*, 61-66.
93. Patra, S.; Munichandraiah, N., Supercapacitor studies of electrochemically deposited PEDOT on stainless steel substrate. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *106* (2), 1160-1171.
94. Massoumi, B.; Alipour, N.; Fathalipour, S.; Jaymand, M., Nanostructured poly(2,2'-bithiophene-co-3,4-ethylenedioxythiophene): Synthesis, characterization, and properties. *High Performance Polymers* **2015**, *27* (2), 161-170.
95. Del-Oso, J. A.; Frontana-Uribe, B. A.; Maldonado, J.-L.; Rivera, M.; Tapia-Tapia, M.; Roa-Morales, G., Electrochemical deposition of poly[ethylene-dioxythiophene] (PEDOT) films on ITO electrodes for organic photovoltaic cells: control of morphology, thickness, and electronic properties. *Journal of Solid State Electrochemistry* **2018**, *22* (7), 2025-2037.
96. Ottani, V.; Martini, D.; Franchi, M.; Ruggeri, A.; Raspanti, M., Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron* **2002**, *33* (7), 587-596.
97. Fratzl, P., Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction. In *Collagen: Structure and Mechanics*, Fratzl, P., Ed. Springer US: Boston, MA, 2008; pp 1-13.
98. Sionkowska, A.; Kaczmarek, B., Preparation and characterization of composites based on the blends of collagen, chitosan and hyaluronic acid with nano-hydroxyapatite. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *102*, 658-666.
99. Lou, J.; Stowers, R.; Nam, S.; Xia, Y.; Chaudhuri, O., Stress relaxing hyaluronic acid-collagen hydrogels promote cell spreading, fiber remodeling, and focal adhesion formation in 3D cell culture. *Biomaterials* **2018**, *154*, 213-222.
100. Bürck, J.; Heissler, S.; Geckle, U.; Ardakani, M. F.; Schneider, R.; Ulrich, A. S.; Kazanci, M., Resemblance of Electrospun Collagen Nanofibers to Their Native Structure. *Langmuir* **2013**, *29* (5), 1562-1572.
101. Ribeiro, N.; Sousa, S. R.; van Blitterswijk, C. A.; Moroni, L.; Monteiro, F. J., A biocomposite of collagen nanofibers and nanohydroxyapatite for bone regeneration. *Biofabrication* **2014**, *6* (3), 035015.
102. Aguirre-Chagala, Y. E.; Altuzar, V.; León-Sarabia, E.; Tinoco-Magaña, J. C.; Yañez-Limón, J. M.; Mendoza-Barrera, C., Physicochemical properties of polycaprolactone/collagen/elastin nanofibers fabricated by electrospinning. *Materials Science and Engineering: C* **2017**, *76*, 897-907.
103. Dippold, D.; Cai, A.; Hardt, M.; Boccaccini, A. R.; Horch, R.; Beier, J. P.; Schubert, D. W., Novel approach towards aligned PCL-Collagen nanofibrous constructs from a benign solvent system. *Materials Science and Engineering: C* **2017**, *72*, 278-283.

104. Fiqrianti, I. A.; Widiyanti, P.; Manaf, M. A.; Savira, C. Y.; Cahyani, N. R.; Bella, F. R. J. J. o. f. b., Poly-L-lactic Acid (PLLA)-Chitosan-collagen electrospun tube for vascular graft application. *Journal of Functional Biomaterials* **2018**, *9* (2), 32.
105. Wu, Z.; Kong, B.; Liu, R.; Sun, W.; Mi, S. J. N., Engineering of corneal tissue through an aligned PVA/collagen composite nanofibrous electrospun scaffold. *Nanomaterials* **2018**, *8* (2), 124.
106. Zeugolis, D. I.; Khew, S. T.; Yew, E. S. Y.; Ekaputra, A. K.; Tong, Y. W.; Yung, L.-Y. L.; Hutmacher, D. W.; Sheppard, C.; Raghunath, M., Electro-spinning of pure collagen nanofibres – Just an expensive way to make gelatin? *Biomaterials* **2008**, *29* (15), 2293-2305.
107. Fiorani, A.; Gualandi, C.; Panseri, S.; Montesi, M.; Marcacci, M.; Focarete, M. L.; Bigi, A. J. J. o. M. S. M. i. M., Comparative performance of collagen nanofibers electrospun from different solvents and stabilized by different crosslinkers. *Journal of Materials Science* **2014**, *25* (10), 2313-2321.
108. Ye, J.; Shi, X.; Chen, X.; Xie, J.; Wang, C.; Yao, K.; Gao, C.; Gou, Z., Chitosan-modified, collagen-based biomimetic nanofibrous membranes as selective cell adhering wound dressings in the treatment of chemically burned corneas. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2* (27), 4226-4236.
109. Ohkawa, K.; Cha, D.; Kim, H.; Nishida, A.; Yamamoto, H., Electrospinning of Chitosan. *Macromolecular Rapid Communications* **2004**, *25* (18), 1600-1605.
110. Geng, X.; Kwon, O.-H.; Jang, J., Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials* **2005**, *26* (27), 5427-5432.
111. Sencadas, V.; Correia, D. M.; Areias, A.; Botelho, G.; Fonseca, A. M.; Neves, I. C.; Gomez Ribelles, J. L.; Lanceros Mendez, S., Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87* (2), 1295-1301.
112. Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Sudheesh Kumar, P. T.; Nair, S. V.; Tamura, H., Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances* **2011**, *29* (3), 322-337.
113. Sahariah, P.; Másson, M., Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure–Activity Relationship. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (11), 3846-3868.
114. Elsabee, M. Z.; Naguib, H. F.; Morsi, R. E., Chitosan based nanofibers, review. *Materials Science and Engineering: C* **2012**, *32* (7), 1711-1726.
115. Hardiansyah, A.; Tanadi, H.; Yang, M.-C.; Liu, T.-Y., Electrospinning and antibacterial activity of chitosan-blended poly(lactic acid) nanofibers. *Journal of Polymer Research* **2015**, *22* (4), 59.
116. Bolaina-Lorenzo, E.; Martínez-Ramos, C.; Monleón-Pradas, M.; Herrera-Kao, W.; Cauch-Rodríguez, J. V.; Cervantes-Uc, J. M., Electrospun polycaprolactone/chitosan scaffolds for nerve tissue engineering: physicochemical characterization and Schwann cell biocompatibility. *Biomedical Materials* **2016**, *12* (1), 015008.
117. Homayoni, H.; Ravandi, S. A. H.; Valizadeh, M., Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers* **2009**, *77* (3), 656-661.
118. Min, B.-M.; Lee, S. W.; Lim, J. N.; You, Y.; Lee, T. S.; Kang, P. H.; Park, W. H., Chitin and chitosan nanofibers: electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers. *Polymer* **2004**, *45* (21), 7137-7142.
119. Kaczmarek, B.; Sionkowska, A., Chitosan/collagen blends with inorganic and organic additive—A review. *Advances in Polymer Technology* **2018**, *37* (6), 2367-2376.
120. Shanmugasundaram, N.; Ravichandran, P.; Neelakanta Reddy, P.; Ramamurthy, N.; Pal, S.; Panduranga Rao, K., Collagen–chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells. *Biomaterials* **2001**, *22* (14), 1943-1951.

121. Cheng, Y.; Ramos, D.; Lee, P.; Liang, D.; Yu, X.; Kumbar, S. G., Collagen Functionalized Bioactive Nanofiber Matrices for Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2014**, *10* (2), 287-298.
122. Teodorescu, M.; Bercea, M.; Morariu, S., Biomaterials of Poly(vinyl alcohol) and Natural Polymers. *Polymer Reviews* **2018**, *58* (2), 247-287.
123. Peng, Z.; Shen, Y., Study on Biological Safety of Polyvinyl Alcohol/Collagen Hydrogel as Tissue Substitute (I). *Polymer-Plastics Technology and Engineering* **2011**, *50* (3), 245-250.
124. Li, P.; Sirviö, J. A.; Haapala, A.; Liimatainen, H., Cellulose Nanofibrils from Nonderivatizing Urea-Based Deep Eutectic Solvent Pretreatments. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9* (3), 2846-2855.
125. Mukesh, C.; Mondal, D.; Sharma, M.; Prasad, K., Choline chloride–thiourea, a deep eutectic solvent for the production of chitin nanofibers. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *103*, 466-471.
126. Sousa, A. M. M.; Souza, H. K. S.; Uknalis, J.; Liu, S.-C.; Gonçalves, M. P.; Liu, L., Improving agar electrospinnability with choline-based deep eutectic solvents. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, *80*, 139-148.
127. Pérez-Nava, A.; Mota-Morales, J. D.; García-Carvajal, Z. Y.; Herrera-Rodríguez, S. E.; Arrebillaga-Boni, G.; Azanza-Ricardo, C. L.; Vazquez-Lepe, M. O.; Gonzalez-Campos, J. B., Eco-friendly Production of Metallic Nanoparticles in Polymeric Solutions and Their Processing into Biocompatible Composites. *Fibers and Polymers* **2018**, *19* (1), 156-169.
128. González-Campos, J. B.; Mota-Morales, J. D.; Kumar, S.; Zárate-Triviño, D.; Hernández-Iturriaga, M.; Prokhorov, Y.; Lepe, M. V.; García-Carvajal, Z. Y.; Sanchez, I. C.; Luna-Bárceñas, G., New insights into the bactericidal activity of chitosan-Ag bionanocomposite: The role of the electrical conductivity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *111*, 741-746.
129. Muyonga, J. H.; Cole, C. G. B.; Duodu, K. G., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry* **2004**, *86* (3), 325-332.
130. Corazzari, I.; Nisticò, R.; Turci, F.; Faga, M. G.; Franzoso, F.; Tabasso, S.; Magnacca, G., Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polymer Degradation and Stability* **2015**, *112*, 1-9.
131. Bozec, L.; Odlyha, M., Thermal Denaturation Studies of Collagen by Microthermal Analysis and Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* **2011**, *101* (1), 228-236.
132. Guinesi, L. S.; Cavalheiro, É. T. G., The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. *Thermochimica Acta* **2006**, *444* (2), 128-133.
133. Zawadzki, J.; Kaczmarek, H., Thermal treatment of chitosan in various conditions. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *80* (2), 394-400.
134. Tamer, T. M.; Hassan, M. A.; Omer, A. M.; Valachová, K.; Eldin, M. S. M.; Collins, M. N.; Šoltés, L., Antibacterial and antioxidative activity of O-amine functionalized chitosan. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *169*, 441-450.
135. Neto, C. G. T.; Giacometti, J. A.; Job, A. E.; Ferreira, F. C.; Fonseca, J. L. C.; Pereira, M. R., Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydrate Polymers* **2005**, *62* (2), 97-103.
136. Pati, F.; Adhikari, B.; Dhara, S., Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology* **2010**, *101* (10), 3737-3742.
137. Tsakos, M.; Schaffert, E. S.; Clement, L. L.; Villadsen, N. L.; Poulsen, T. B., Ester coupling reactions – an enduring challenge in the chemical synthesis of bioactive natural products. *Natural Product Reports* **2015**, *32* (4), 605-632.

138. de Souza Costa-Júnior, E.; Pereira, M. M.; Mansur, H. S., Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2009**, *20* (2), 553-561.
139. Geethanjali, R.; Subhashini, S., Functionalization of PVA to synthesize p-vinyl benzene sulfonate terpolymers – a comparative study of anticorrosion, adsorption and activation properties of the terpolymers on mild steel in 1 M HCl. *RSC Advances* **2016**, *6* (103), 100748-100758.
140. Zhang, R.; Xu, X.; Cao, B.; Li, P., Fabrication of high-performance PVA/PAN composite pervaporation membranes crosslinked by PMDA for wastewater desalination. *Petroleum Science* **2018**, *15* (1), 146-156.
141. Bursali, E. A.; Coskun, S.; Kizil, M.; Yurdakoc, M., Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activities of boron/starch/polyvinyl alcohol hydrogels. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *83* (3), 1377-1383.
142. Zhao, C.-X.; Liu, Y.; Wang, D.-Y.; Wang, D.-L.; Wang, Y.-Z., Synergistic effect of ammonium polyphosphate and layered double hydroxide on flame retardant properties of poly(vinyl alcohol). *Polymer Degradation and Stability* **2008**, *93* (7), 1323-1331.
143. Ghanbari, D.; Salavati-Niasari, M.; Sabet, M., Preparation of flower-like magnesium hydroxide nanostructure and its influence on the thermal stability of poly vinyl acetate and poly vinyl alcohol. *Composites Part B: Engineering* **2013**, *45* (1), 550-555.
144. Huang, G. P.; Shanmugasundaram, S.; Masih, P.; Pandya, D.; Amara, S.; Collins, G.; Arinze, T. L., An investigation of common crosslinking agents on the stability of electrospun collagen scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2015**, *103* (2), 762-771.
145. Meng, L.; Arnoult, O.; Smith, M.; Wnek, G. E., Electrospinning of in situ crosslinked collagen nanofibers. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22* (37), 19412-19417.
146. Luo, X.; Guo, Z.; He, P.; Chen, T.; Li, L.; Ding, S.; Li, H., Study on structure, mechanical property and cell cytocompatibility of electrospun collagen nanofibers crosslinked by common agents. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *113*, 476-486.
147. Dulnik, J.; Denis, P.; Sajkiewicz, P.; Kotbuk, D.; Choińska, E., Biodegradation of bicomponent PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibers electrospun from alternative solvent system. *Polymer Degradation and Stability* **2016**, *130*, 10-21.
148. Malm, M.; Saghaleyni, R.; Lundqvist, M.; Giudici, M.; Chotteau, V.; Field, R.; Varley, P. G.; Hatton, D.; Grassi, L.; Svensson, T.; Nielsen, J.; Rockberg, J., Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. *Scientific Reports* **2020**, *10* (1), 18996.