



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE
HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**SÍNTESIS DE PELÍCULAS POROSAS A BASE DE
BIOPOLÍMEROS EMPLEANDO DISOLVENTES
EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES).**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA**

PRESENTA:

ROCIO LIZETH PONCE HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. JANETT BETZABE GONZÁLEZ CAMPOS

CO-DIRECTOR:

M.C. LUIS HUMBERTO DELGADO RANGEL



MORELIA, MICHOACÁN ENERO DE 2021

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Adela Hernández Jiménez

Abel Ponce Ramírez

Por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, siempre motivándome para alcanzar mis logros entre ellos este. No alcanzan las palabras para expresar el orgullo que siento por tener unos padres ejemplares.

A MIS HERMANOS

Abel Ponce Hernández

José Miguel Ponce Hernández

A MIS TIOS

Marcela Hernández Jiménez

Daniel Alcázar Uribe

Por su cariño y apoyo incondicional, además de arroparme en su casa como una hija más, la confianza que me brindan es inigualable.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron para la realización de este trabajo de tesis fuera posible.

En primer lugar quiero agradecer a mis asesores de tesis.

A la Dra. Janett Betzabe González Campos gracias por su dedicación, apoyo y comprensión, por estar pendiente en todo momento y por confiar en mi para llevar a cabo este proyecto.

Al M.C. Luis Humberto Delgado Rangel por su apoyo incondicional, dirigiéndome correctamente durante todo el tiempo trabajando juntos, por compartir todos tus conocimientos conmigo, por la paciencia, ayuda y consejos que han permitido llevar a cabo este proyecto.

A mis revisores de tesis, a las Doctoras Yliana López Castro y Judit Araceli Aviña Verduzco, al Q.F.B. Oscar Muños López, al Doctor Rafael Zamora Vega y al Doctor Juan Pablo García Merinos. Gracias por sus sugerencias, consejos y apoyo en la revisión de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio de biopolímeros, a mis amigos y a mi familia, gracias por el apoyo, comprensión y confianza depositada en mí.

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE	III
ABSTRACT	V
RESUMEN	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	5
3. HIPÓTESIS	6
4. OBJETIVOS	7
4.1 OBJETIVO GENERAL	7
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
5. ANTECEDENTES	8
5.1 POLÍMEROS EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS	8
5.2 QUITOSANO	9
5.3 QUITOSANO Y SUS COMBINACIONES PARA EL DESARROLLO DE ANDAMIOS CELULARES.....	12
5.4 COLÁGENO	13
5.5 COLAGENO Y SUS COMBINACIONES PARA EL DESARROLLO DE ANDAMIOS CELULARES.....	14
5.6 ALCOHOL POLIVINÍLICO	15
5.7 PVA Y SUS COMBINACIONES PARA EL DESARROLLO DE ANDAMIOS CELULARES.....	16
5.8 SULFATO DE CONDROITINA.....	16
5.9 SULFATO DE CONDROITINA Y SUS COMBINACIONES PARA EL DESARROLLO DE ANDAMIOS CELULARES.....	18
5.10 TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN DE MATERIALES POROSOS.	18
5.11 SEPARACIÓN DE FASE INDUCIDA POR EVAPORACIÓN (EIPS).....	20
5.12 DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES).....	21
5.13 CLORURO DE COLINA-UREA (ChCl-U)	23

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1 ASPECTOS GENERALES.....	25
6.2 OBTENCIÓN DE PELÍCULAS POROSAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE SEPARACIÓN DE FASE INDUCIDA POR EVAPORACIÓN DE SOLVENTE (EIPS).....	25
6.3 PRUEBAS DE HINCHAMIENTO	29
6.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO POR EMISIÓN DE CAMPO.....	29
6.5 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PORO	29
6.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO.....	30
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
7.1 PELÍCULAS POROSAS DE CTS/CG	31
7.1.1 CTS/CG 1:1.....	31
7.1.2 CTS/CG 2:1.....	33
7.1.3 CTS/CG 3:1.....	35
7.2 PELÍCULAS POROSAS DE CTS/PVA	43
7.2.1 CTS/PVA 1:1.....	43
7.2.2 CTS/PVA 2:1.....	44
7.2.3 CTS/PVA 3:1.....	46
7.3 PELÍCULAS POROSAS DE CTS/CS	52
7.3.1 CTS/CS 1:1.....	52
7.3.2 CTS/CS 2:1.....	54
7.3.3 CTS/CS 3:1.....	57
7.4 PELÍCULAS POROSAS DE CTS/PVA/CG	64
7.4.1 CTS/PVA/CG 1:1 Y CTS/PVA/CG 1:2.....	64
7.4.2 CTS/PVA/CG 2:1.....	64
7.4.3 CTS/PVA/CG 3:1.....	66
7.5 PELÍCULAS POROSAS DE PVA/CG.....	71
7.5.1 PVA/CG 1:1 Y PVA/CG 3:1.....	71
7.5.2 PVA/CG 2:1.....	71
8. CONCLUSIONES.....	74
9. PERSPECTIVAS.....	76
10. BIBLIOGRAFÍA	77

ABSTRACT

Tissue engineering is an area of research to address problems related to tissue repair and regeneration therapies, its main objective is based on the use of biomaterials as biological substitutes, that is, as three-dimensional (3D) scaffolds. Highly porous materials provide the ideal environment as scaffolds for tissue regeneration. These scaffolds can guide tissue formation and cell growth since, due to their structure; they mimic the functions of the extracellular matrix.

The development of cell scaffolds requires the use of biocompatible, non-toxic and non-carcinogenic compounds, with the ability to stimulate different cellular functions, with adequate mechanical behavior during sufficient time to guarantee a good regeneration process, and which can be metabolized by the body after fulfilling its function; chitosan (CTS), collagen (CG), chondroitin sulfate (SC) and polyvinyl alcohol (PVA) are biopolymers that have ideal characteristics for the manufacture of biomaterials in the form of 3D scaffolds since they possess these characteristics.

This thesis work presents the production of porous materials based on CTS/CG, CTS/PVA, CTS/SC, CG/PVA and CTS/CG/PVA mixtures using a novel, versatile, low-cost, simple and effective technique based on separation evaporation induced phase (EIPS) and, using the deep eutectic solvent choline chloride/urea as a non-solvent system. The structure of the biomaterials obtained has a high potential for biocompatibility and is very attractive for subsequent study of cytobiocompatibility.

RESUMEN

La ingeniería de tejidos es un área de investigación que nace como respuesta a problemas relacionados con terapias de reparación y regeneración de tejidos, entre sus objetivos está el uso de biomateriales que funcionen como sustitutos biológicos y que cumplan la función de andamios tridimensionales (3D). Para lograr la función de andamios celulares se requiere la producción de materiales altamente porosos que proporcionen el entorno adecuado para la regeneración de los tejidos dañados. Estos andamios pueden guiar la formación del tejido y el crecimiento celular ya que, debido a su estructura mimetizan las funciones de la matriz extracelular.

Para el desarrollo de andamios celulares con características adecuadas se requiere del uso de compuestos biocompatibles, no tóxicos ni carcinógenos, con capacidad de estimular distintas funciones celulares, que desarrollen un comportamiento mecánico adecuado durante suficiente tiempo para garantizar un buen proceso de regeneración y que puedan ser metabolizados por el organismo después de cumplir su función; el quitosano (CTS), el colágeno (CG), el sulfato de condroitina (CS) y el alcohol polivinílico (PVA) son biopolímeros que poseen características ideales para la fabricación de biomateriales en forma de andamios 3D ya que poseen estas características.

Este trabajo de tesis presenta la producción de materiales porosos basados en mezclas CTS/CG, CTS/PVA, CTS/SC, CG/PVA y CTS/CG/PVA empleando una técnica novedosa, versátil, de bajo costo, simple y efectiva basada en la separación de fase inducida por evaporación (EIPS) y empleando el disolvente eutéctico profundo cloruro de colina/urea como un sistema no disolvente. La estructura de los biomateriales obtenidos tiene un alto potencial de biocompatibilidad y resulta muy atractiva para su posterior estudio de citobiocompatibilidad.

Palabras clave: Quitosano, ChCl: U, Andamios celulares, EIPS, DES.

1. INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejidos constituye actualmente una de las áreas de investigación más atractivas para el desarrollo de sustitutos biológicos para reparar, restaurar o regenerar tejidos dañados [1]. Requiere de biomateriales específicos, tales como andamiajes o matrices extracelulares artificiales altamente porosas, lo cual permite una mejor proliferación de las células y favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) [2]. Estos andamiajes además deben de tener la capacidad de estimular funciones celulares de adhesión, migración, crecimiento, diferenciación y organización de tejidos, de esta forma, se obtienen materiales que mimetizan la estructura de la matriz extracelular. Para el desarrollo de andamiajes que cumplan estos requerimientos, la selección de un material adecuado es de primordial importancia, para lo que se toman en cuenta aspectos como: la biocompatibilidad, un comportamiento mecánico adecuado durante suficiente tiempo para garantizar un buen proceso de regeneración, no ser tóxico ni carcinógeno y ser metabolizado en el organismo después de cumplir su función [3,4]. Entre los materiales que reúnen estas características básicas se incluyen los elaborados con polímeros naturales, sintéticos y semisintéticos como el quitosano (CTS), el colágeno (CG), el sulfato de condroitina (CS) y el alcohol polivinílico (PVA); biopolímeros en los cuales está basado este trabajo de tesis.

El CTS es un biopolímero con un alto potencial para su uso como componente de biomateriales ya que posee propiedades biológicas únicas, entre las que se incluyen: su biocompatibilidad, biodegradabilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica y nula toxicidad. Estas propiedades se deben a su similitud química con algunos componentes de la matriz extracelular presente en los tejidos, como el sulfato de condroitina, el sulfato de queratán y el ácido hialurónico, esto permite su uso para la fabricación de andamios celulares para ingeniería de tejidos. Adicionalmente, su gran versatilidad para ser procesado facilita la obtención de biomateriales en forma de películas, esponjas, hidrogeles, micro y nano partículas, así como nanofibras [5,6]. No obstante, su uso se ve limitado por las dificultades experimentales que se presentan dada su baja solubilidad en agua, de ahí la

necesidad de utilizar disolventes como el ácido trifluoroacético (un disolvente altamente tóxico), y del uso de equipos que no son de tan fácil acceso; tal es el caso del equipo requerido para llevar a cabo el proceso de liofilización.

Por su parte, el CG uno de los principales componentes de la matriz extracelular, es una proteína fibrosa relativamente insoluble en agua, se encuentra especialmente en cartílago, huesos y piel, y su principal función es mecánica y de soporte [3]. Por lo anterior, es considerado como uno de los principales materiales para construir sustitutos artificiales para tejidos u órgano dañados [7]. Sin embargo, su procesamiento dista de ser algo trivial dada su baja solubilidad en los disolventes comúnmente utilizados y el largo periodo de tiempo para obtener la solución, siendo el hexafluoroisopropanol (HFIP) uno de los pocos disolventes que logra disolver esta proteína.

El CS forma parte del grupo de los glicosaminoglicanos, que son importantes constituyentes estructurales de la matriz extracelular del cartílago [8], se organizan en agregados de alto peso molecular (proteoglicanos) cuya forma principal se denomina agreganos [9]. Los proteoglicanos contribuyen a aportar al cartílago sus propiedades mecánicas y elásticas [8]. En los tejidos de la articulación, se ha demostrado que el CS modifica el proceso de muerte por condrocitos, mejora el equilibrio anabólico/catabólico de la matriz del cartílago extracelular, reduce algunos factores pro inflamatorios y catabólicos, reduce las propiedades de resorción de los osteoblastos de hueso subcondral [10], y estimula la síntesis de colágeno [9]. Es fácil de disolver en agua y normalmente es usado para potencializar las propiedades de adhesión en andamiajes celulares.

El PVA es un polímero sintético posee características ideales para su uso en aplicaciones biomédicas, es soluble en agua, totalmente biodegradable y biocompatible [11]; además, presenta buenas propiedades elásticas y mecánicas, siendo estas características de gran importancia para su uso en conjunto con otros biopolímeros para la formación de películas porosas para fines de andamiaje.

El CTS y el CG son polímeros naturales que no existen juntos como mezclas en la naturaleza, pero sus propiedades individuales, han sido empleadas para producir materiales con propiedades estructurales y mecánicas únicas. Por su parte, la adición del CS a andamios de CTS o CG mejora la adhesión celular [8]. En el caso del PVA, este polímero ha sido usado junto con CTS y CG para mejorar las propiedades elásticas y mecánicas en

los andamios celulares [11]. Por lo anterior, este trabajo de tesis presenta el análisis de las condiciones para la preparación de materiales porosos, con una alta relación área superficial/volumen, utilizando diferentes mezclas basadas en CTS, CG, CS Y PVA, de tal forma que los materiales generados presenten características adecuadas para su posterior estudio como andamios celulares otorgadas por la combinación y potencialización de las propiedades individuales de los componentes.

La producción de materiales porosos suele involucrar métodos costosos y poco accesibles como la lixiviación de partículas o la liofilización [12]. En este sentido, la implementación de la metodología basada en la separación de fase inducida por evaporación o EIPS (por las siglas en inglés “*Evaporation Induced Phase Separation*”) para la fabricación de materiales porosos es una alternativa efectiva y simple para la fabricación de biomateriales. Recientemente, el grupo de trabajo del laboratorio de biopolímeros y biomateriales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB), ha reportado el desarrollo de esta metodología para la producción de materiales porosos basados en CTS puro empleando como sistema no disolvente un disolvente eutéctico profundo (DES) basado en cloruro de colina/urea ChCl/U [12]. Los DES son disolventes dentro del marco de la llamada “Química verde” [13], por lo que este proyecto representa la primera investigación sobre el uso de DES como sustituyentes de disolventes orgánicos en este tipo de metodología, proporcionando una técnica de bajo costo, sencilla, accesible y amigable con el ambiente, ya que además de emplear disolventes verdes, éstos pueden reutilizarse, lo que no genera productos de desecho contaminantes derivados del proceso [12].

El uso de los DES como sistema no disolvente es deseable para el desarrollo de la metodología EIPS cuando se requiere evaporar disolventes poco volátiles como el agua o el ácido acético [12]. Las mezclas eutécticas de bajo punto de fusión se recuperan fácilmente y son reutilizadas varias veces [14]. Los DES pueden ser fácilmente obtenidos con la mezcla simple de sus componentes, usando temperaturas entre 80 °C y 100 °C, además, la mayoría de los componentes usados en la preparación de DES son: biodegradables, biocompatibles, biorenovables, baratos, seguros y capaces de formar mezclas eutécticas a través de interacciones de puentes de hidrogeno [13].

Como se mencionó anteriormente, la implementación de la metodología EIPS empleando DES como sistema no disolvente ha permitido la obtención de materiales porosos de CTS en forma de monolitos y películas delgadas, los cuales han demostrado efectividad en la inhibición del crecimiento de biopelículas de *Vibrio cholerae* [12] y como soporte catalítico. Además, sus características estructurales y manejabilidad han dado pie al inicio de pruebas para su uso como andamio celular en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) en la Ciudad de México.

Con base en esta nueva aportación al desarrollo de metodologías sustentables para la producción de materiales porosos con características estructurales únicas, y en la efectividad de la implementación de esta la técnica para el desarrollo de materiales basados en biopolímeros, el presente trabajo de tesis presenta la fabricación de materiales porosos basados en las mezclas CTS/CG, CTS/PVA, CTS/CS, CG/PVA y CTS/CG/PVA mediante la técnica EIPS empleando el DES ChCl-U como sistema no disolvente. Esta técnica ha sido estandarizada dentro del grupo de trabajo utilizando el CTS puro [12], por lo que se explora la variación de los parámetros y su efecto en las características estructurales de materiales porosos basados en mezclas mencionadas con la finalidad de obtener materiales porosos con propiedades potenciadas derivadas de la sinergia de las propiedades individuales de los componentes.

2. JUSTIFICACIÓN

Los materiales poliméricos porosos son de gran interés para su estudio como andamios celulares en ingeniería de tejidos debido a sus características estructurales, que resultan ideales debido a su alta relación área superficial/volumen, alta porosidad, interconectividad de poros, estabilidad térmica y buena resistencia química y mecánica. Actualmente, las técnicas más empleadas para la producción de materiales poliméricos porosos son la lixiviación de partículas [15], liofilización [16] e impresión 3D [17], las cuales necesitan de equipos especializados que suelen ser costosos y de acceso limitado.

La EIPS es una alternativa sencilla y económica a las metodologías convencionales de producción de materiales porosos. Esta técnica se probó exitosamente para la obtención de materiales porosos basados en quitosano puro incorporando como sistema no disolvente disolventes biodegradables, esta modificación a la técnica resulta en una alternativa novedosa y amigable con el medio ambiente. Además, la versatilidad de su configuración permite procesar una gran variedad de biopolímeros. Por estas razones, este proyecto explora la aplicación de la técnica EIPS, estandarizada por nuestro equipo de trabajo, para la producción de materiales porosos basados en combinaciones de soluciones poliméricas de CTS, CG, PVA y CS, con lo cual se busca potencializar las características requeridas para su posible uso como andamios celulares debido a las características individuales de los componentes.

3. HIPÓTESIS

Recientemente en nuestro grupo de trabajo se han producido materiales porosos de quitosano puro empleando la técnica de separación de fase inducida en solución la cual ha resultado ser un aporte importante al área debido a que es una técnica sencilla, de bajo costo, amigable con el ambiente, versátil y muy accesible debido a que se requiere un mínimo de equipo para su ejecución. Los materiales obtenidos han resultado efectivos para la inhibición del crecimiento de biopelículas de la bacteria *Vibrio cholerae* y como soportes catalíticos, además, su estructura ha llamado la atención para su uso andamio celular para el estudio del mecanismo de crecimiento de fibroblastos de cicatriz hipertrófica, lo cual está siendo estudiado actualmente en el Instituto Nacional de Rehabilitación en la Ciudad de México.

Dada la versatilidad de la técnica EIPS que incluye el uso del DES ChCl:U como sistema no disolvente, se propone extender su estudio para la fabricación de materiales porosos basados en mezclas de CTS con CG, CS y PVA, los cuales además de ser biopolímeros altamente biodegradables por su composición, presentaran características estructurales y mecánicas únicas, por lo que existe la posibilidad de obtener materiales porosos basados en estas mezclas con propiedades mejoradas para su posible aplicación como andamios celulares.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y caracterizar películas porosas a base de mezclas CTS/CG, CTS/PVA, PVA/CG, CTS/CS y CTS/PVA/CG con características deseables para su posible aplicación como andamios celulares en ingeniería de tejidos, mediante la metodología tipo EIPS empleando el DES ChCl-U como agente porógeno.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar mezclas de polímeros: CTS/CG, CTS/PVA, PVA/CG, CTS/CS y CTS/PVA/CG.
- Procesar las mezclas anteriores mediante la técnica EIPS para la fabricación de películas porosas incorporando el DES ChCl-U como agente porógeno, siguiendo la metodología propuesta en nuestro grupo de trabajo para la producción de películas de CTS puro [12].
- Caracterizar las películas porosas obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido, pruebas de hinchamiento y espectroscopia de infrarrojo.

5. ANTECEDENTES

5.1 POLÍMEROS EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS.

La ingeniería de tejidos constituye un campo de investigación y desarrollo que aplica los conocimientos de la bioingeniería, ciencias de la vida, química, entre otras, para resolver problemas clínicos y quirúrgicos asociados a la pérdida del tejido o al fallo funcional de órganos [18]. Las especies normalmente implicadas en la ingeniería de tejidos son células vivas, así como sus componentes extracelulares que participan en el desarrollo de dispositivos que permitan y favorezcan la reparación de un órgano o tejido dañado [19] a la par de que ocurre la formación de tejido nuevo, así como de los sistemas de vascularización, [2].

Desde un punto de vista estructural, cualquier sistema que pretenda utilizarse como soporte para conseguir un crecimiento celular tridimensional y que busque aprovechar los productos que las propias células generan para la reparación de la matriz extracelular, deben tener características específicas que son esenciales para conseguir las funciones de nutrición celular, división, multiplicación, generación, ordenación y consolidación del tejido. Como se puede observar en la Figura 1, la biocompatibilidad está muy relacionada con la actividad superficial, pues de ello depende que el sistema polímero/células/matriz extracelular sea aceptado o rechazado por el receptor. Además de estas características, cualquier diseño del material debe presentar buenas características biofuncionales; como soporte debe ofrecer la suficiente estabilidad e integridad para mantener las condiciones óptimas del proceso regenerativo, al mismo tiempo debe poseer un carácter biodegradable de tal forma que cuando se ha logrado la función de soporte, debe desaparecer por biodegradación o bioreabsorción. Se deben conocer los mecanismos biodegradativos que conducen a la desintegración del polímero soporte, así como la naturaleza de los productos que se generan como consecuencia del proceso degradativo y los efectos que pueden llegar a provocar [20].

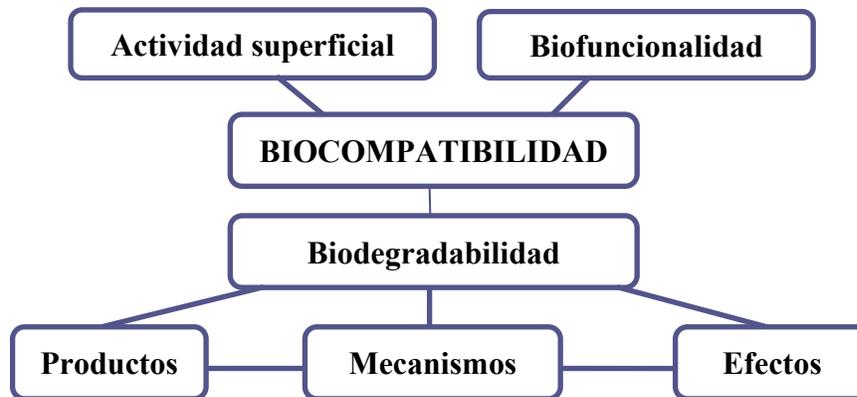


Figura 1. Principales factores que afectan al carácter biocompatible de materiales.

El uso de polímeros en el campo biomédico para la regeneración o sustitución de tejidos no funcionales, conlleva a la formación de una interface con el sistema biológico, que requiere una alta biocompatibilidad del polímero [21,22]. Los polímeros biocompatibles se pueden obtener de fuentes naturales o sintéticas, y al ser introducidos en un sistema biológico pueden ser catalogados como biomateriales poliméricos o biopolímeros [21,23].

En las últimas décadas se han realizado una importante cantidad de estudios dedicados a la obtención de materiales a base de biopolímeros para diferentes aplicaciones biomédicas, siendo el quitosano (CTS) y el colágeno (CG) dos de los biopolímeros más atractivos para su uso en la ingeniería de tejidos. Colorado y colaboradores [24] basados en su investigación sobre el uso de biomateriales en ingeniería de tejido de piel, concluyeron que entre los biomateriales de mayor uso clínico se encuentran los basados en colágenos naturales o extraídos y en CTS, con ventajas como alta adherencia y vascularidad que permiten un restablecimiento total del tejido en corto tiempo [24]. Tanto el CTS como el CG pueden usarse de manera individual, combinados entre ellos o con otros polímeros como el sulfato de condroitina (CS) y el alcohol polivinílico (PVA).

5.2 QUITOSANO (CTS)

El CTS se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza, y fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar la quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos al cual llamo “quitina modificada”. Más adelante, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quien la denomina “quitosano” [25]. La quitina está presente en el exoesqueleto de artrópodos y zooplancton marinos, también se encuentra formando parte de la pared de algunas familias de hongos y levaduras [26,27]. Para la obtención del CTS a partir de la quitina se realiza la desacetilación de la misma, dejando libre el grupo amino del carbono 2, sin embargo, este proceso nunca llega al 100% y por ello el CTS se clasifica como un copolímero [27], compuesto por unidades de β (1,4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) como se puede observar en la Figura 2.

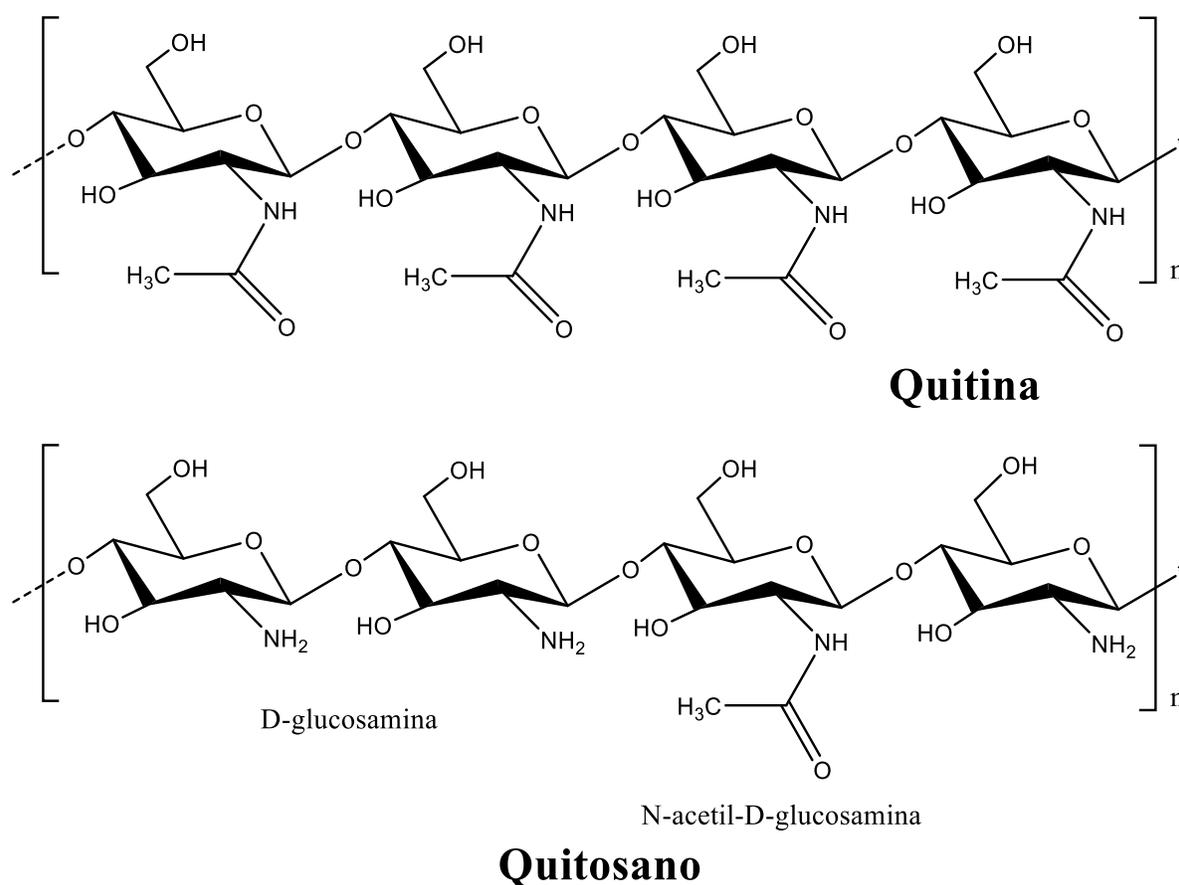


Figura 2. Comparación de las estructuras químicas de la quitina y el quitosano.

El porcentaje de grupos amino ($-NH_2$) libres en la molécula es lo que se denomina grado de desacetilación y está estrechamente vinculado con su solubilidad y reactividad [28]. Como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-acetilo, aumenta la capacidad hidrofílica del CTS y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas (ácido acético, fórmico, clorhídrico, entre otros), e insoluble en disolventes orgánicos y soluciones acuosas neutras o débilmente ácidas [29]. En el caso de la reactividad, la protonación de los grupos amino del CTS en medio ácido le confiere un carácter altamente reactivo [30].

La estructura química del CTS permite importantes interacciones químicas, la naturaleza de estas interacciones depende de dos parámetros, el grado de desacetilación y el grado de ionización de sus grupos amino e hidroxilo. Alcohol, amida, amina y otras funciones presentes en la estructura del quitosano están involucrados en la formación de enlaces hidrógeno con varios sustratos o enlaces intramoleculares, cuando el grado de acetilación y de ionización es cero, la posibilidad de un enlace de hidrógeno es mínima [31]. El CTS puede considerarse como un polielectrolito catiónico en forma de solución diluida debido a la protonación de los grupos (NH_2) en medios ácidos.

Entre algunas de sus características biológicas, el CTS posee dos interesantes propiedades, es un material biodegradable y bioabsorbible, dado que la N-acetilglucosamina es similar a la glucosamina una estructura presente en la mayoría de las macromoléculas de los órganos y tejidos del cuerpo humano. En el organismo, el CTS es biodegradado por hidrólisis de los enlaces glucosídicos que unen las unidades N-acetilglucosamina y la glucosamina dando como productos de degradación compuestos no tóxicos que son fácilmente eliminados [29]. Algunas otras propiedades funcionales del quitosano son: biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, agente hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, antiolesterolémica y antioxidante [32]. También presenta propiedades cicatrizantes importantes, igualmente propiedades inhibitorias sobre el crecimiento de numerosos parásitos e infecciones. Además de propiedades inmunológicas, antitumorales, antibacterianas y antifúngicas [31], debido a la interacción de los grupos aminos protonados del polímero con las cargas negativas presentes en las paredes celulares bacterianas que dan lugar a cambios en la permeabilidad de la membrana (acción bactericida) junto con la inhibición de la síntesis de ARNm y proteínas por la unión del quitosano al ADN (acción bacteriostática) [29].

En el campo de la ingeniería de tejidos, el CTS al ser mucoadhesivo tiene la facilidad de adherirse a tejidos blandos o duros [33]. Es considerado uno de los mejores materiales para ser utilizado como soporte o andamio celular, gracias a la versatilidad para ser procesado en diferentes formas, películas, esponjas, hidrogeles, etc.; además interacciona favorablemente con las células y con el medio, gracias a ello es un excelente candidato para terapias de regeneración celular [34]. Álzate-Díaz y colaboradores [35] caracterizaron y evaluaron CTS comercial y experimental, logrando obtener películas porosas de CTS comercial conformadas por electrohilado, las cuales generaron una membrana tridimensional altamente porosa.

La quitina y el CTS, así como algunos de sus derivados son usados en oftalmología para la elaboración de lentes de contacto, en la elaboración de vendajes, curación de huesos, el desarrollo de tejido óseo y en el desarrollo de nuevos productos para la prevención de caries [36]. Por otra parte, en la industria farmacéutica los materiales porosos basados en estos biopolímeros tienen una gran demanda en aplicaciones como sistemas de control de liberación de drogas, para la reconstrucción y fabricación de tejidos.

5.3 QUITOSANO Y SUS COMBINACIONES PARA EL DESARROLLO DE ANDAMIOS CELULARES

Una cualidad importante es la posibilidad de desarrollar materiales porosos basados en CTS combinado con otros polímeros. Cheng y colaboradores [37] demostraron que la gelatina puede ser exitosamente mezclada con CTS para preparar películas suaves, elásticas y con alta afinidad al tejido nervioso. Estas películas resultaron altamente hidrofílicas y con propiedades mecánicas adecuadas.

Empleando la técnica de liofilización, se han producido películas CG-CTS a partir de CG proveniente de piel de tilapia y CTS proveniente de camarón, las cuales demostraron buenas características de absorción, hinchamiento y propiedades térmicas [38]. Este material fue estudiado con enfoque en su potencial terapéutico en afecciones epidérmicas. Estas películas se sintetizaron empleando la técnica de liofilización, obteniendo materiales con características interesantes [39].

La combinación CG/CTS se ha explorado en la producción de andamiajes tridimensionales tipo esponjas como potencial biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Los compósitos de CG/CTS fueron formulados como andamiajes 3D similares a una esponja, aplicando la técnica de separación de fase inducida térmicamente, mejor conocida como liofilización [40].

Otra combinación de gran interés es la de CTS con PVA. Se han modificado fibras de PVA con quitosano para la síntesis de un andamio nanofibroso por electrohilado, con características fisicoquímicas y biológicas mejoradas que, en comparación con los andamios de PVA puro, satisfacen mejor las características para el crecimiento de distintos tipos de células [41].

Existen reportes de la preparación y caracterización de andamios CTS-PVA obtenidos por liofilización para determinar el potencial en el desarrollo de viabilidad de células óseas. La variación en la proporción de CTS y PVA afecta el comportamiento mecánico y biológico del material, mientras que al aumentar la cantidad de CTS el andamio se obtienen mejores propiedades de hinchamiento debido a la presencia de grupos hidrofílicos en una mezcla PVA-CTS [42].

Otra aplicación importante de la combinación CTS-PVA es el desarrollo de nanofibras de PVA funcionalizadas con quitosano y obtenidas por electrohilado para su potencial aplicación en el tratamiento de aguas para la adsorción de cobre. Estas nanofibras funcionaron adecuadamente, no obstante, el tiempo de obtención de una colección de nanofibras funcional puede llegar a sobrepasar las 90 h [43].

5.4 COLÁGENO (CG)

El CG es el principal componente del tejido conectivo y la proteína estructural más abundante de origen animal, es uno de los principales componentes de la matriz extracelular de tejidos de mamíferos, incluyendo la piel, hueso, cartílago, tendón y ligamento. Dadas sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y el reconocimiento de las células, se ha convertido en uno de los materiales más populares para su uso en la ingeniería de tejidos [44].

El CG es una proteína fibrosa secretada por las células en los tejidos conectivos [45]. La fase previa a la formación de CG es intracelular: series de tres aminoácidos se ensamblan en tándem formando cadenas de polipéptidos, llamadas cadenas α (alfa), separadas entre sí a través de puentes de hidrógeno intramoleculares. Esta molécula está conformada por dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$, y cada cadena está conformada por más de 1000 aminoácidos. El CG es insoluble en agua así como en la mayoría de los disolventes orgánicos más comunes debido a la gran cantidad de entrecruzamiento covalente que presenta. A pesar de esto, puede solubilizarse sin sufrir desnaturalización usando sales neutras o soluciones acidas [46,47].

Las principales características del colágeno son su gran resistencia a la tensión y su relativa inextensibilidad [48]. Asimismo, posee excelentes propiedades físicas como la biocompatibilidad, biodegradabilidad y estabilidad mecánica, así como propiedades de unión celular, provee también las señales apropiadas para procesos de crecimiento celular, guiando la formación de tejidos, su función es mecánica y de soporte, por lo que es un componente importante de la matriz extracelular [49].

5.5 COLÁGENO Y SUS COMBINACIONES PARA EL DESARROLLO DE ANDAMIOS CELULARES

El CG es un polímero altamente utilizado en ingeniería de tejidos, ya sea como componente único o en combinación con otros polímeros. Nyga y colaboradores [50] sintetizaron hidrogeles de CG tipo I que contiene células de cáncer colorrectal HT29 para simular una masa densa de cáncer artificial. Las esponjas a base de colágeno se han utilizado durante mucho tiempo como andamios para la ingeniería de tejidos dérmicos. Entre algunas de las aportaciones, Chun-Mei y colaboradores [51] elaboraron esponjas porosas de CG-CTS conformadas por liofilización para la siembra de perfusión de fibroblastos dérmicos humanos.

Sung y colaboradores [52] simularon una matriz extracelular con una esponja porosa de CG-CTS obtenida por liofilización, la cual poseía una estructura altamente porosa adecuada para la adhesión y crecimiento celular. Por otra parte, Lin y colaboradores

[53] sintetizaron y caracterizaron esponjas porosas de CG- ácido hialurónico (HA)-CTS conformadas por liofilización para ensayos de cultivo celular obteniendo andamios porosos altamente biocompatibles en la proliferación de fibroblastos.

5.6 ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA)

El PVA es un polímero sintético de estructura química relativamente simple, biocompatible, soluble en agua [54,55] y con capacidad de hinchamiento en agua debido a sus grupos hidroxilos (OH) de la cadena principal (Figura 3), tiene bajo costo y es inocuo [56]. El PVA es producido en dos etapas: La primera consiste en la polimerización del acetato de vinilo en acetato de polivinilo, mientras que en la segunda se lleva a cabo la hidrólisis parcial del polivinil acetato para la obtención del PVA [57,58]. La polimerización del acetato de vinilo ocurre mediante un mecanismo de radicales libres, usualmente en una solución alcohólica (metanol, etanol) [58].

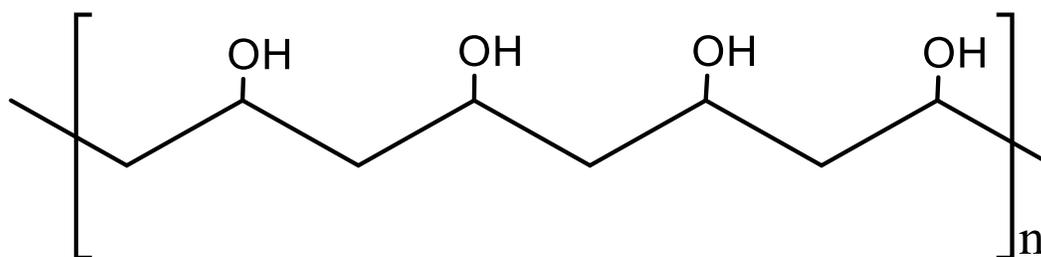


Figura 3. Estructura química del PVA.

Se pueden alcanzar diferentes grados de hidrólisis del PVA variando el contenido de grupos acetato en el polímero. Esto afecta la solubilidad, las propiedades químicas, la cristalinidad y el comportamiento del material final [59]. El PVA es un polvo blanco, insípido e incoloro, tiene un punto de fusión de entre 180 °C y 220 °C y es soluble en agua pero insoluble en disolventes orgánicos comunes [56].

Diversos estudios han demostrado repetidamente que el PVA puede ser degradado solo en presencia de especies de *Pseudomonas* [58]. La capacidad biodegradativa resulta interesante ya que permite el diseño y la preparación de una gran variedad de sistemas con

propiedades diversas mediante la incorporación de PVA en sistemas tanto no biodegradables como biodegradables, proporcionándoles además una excelente biocompatibilidad [20]. Se ha utilizado en mezclas y compuestos con polímeros naturales ya que su carácter hidrófilo y con capacidad filmogénica le confiere cierto grado de compatibilidad con materiales poliméricos naturales; además de mejorar las propiedades mecánicas de los materiales obtenidos [60].

Por todas estas características, el desarrollo de materiales innovadores basados en PVA representa una oportunidad comercial en varios campos de aplicación, tales como preparación de materiales plásticos [61] biomedicina, farmacia e ingeniería de tejidos, entre otros [57].

5.7 PVA Y SUS COMBINACIONES PARA EL DESARROLLO DE ANDAMIOS CELULARES

En 2019, Peng y colaboradores estudiaron las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad de hidrogeles de PVA con diferentes concentraciones de CTS [62]. Estos hidrogeles presentaron alta hidrofiliidad, excelentes propiedades de hinchamiento, propiedades fisicoquímicas y mecánicas estables, así como baja toxicidad y excelente adhesión y proliferación celular. En el mismo año, Lynda y colaboradores fabricaron un andamio poroso de PVA modificado con ácido cítrico para obtener un polímero biodegradable con subproductos no tóxicos. Los autores reportaron que los andamios de PVA no presentan toxicidad y son biocompatibles con células vasculares de músculo liso, promoviendo su potencial aplicación en el área médica [63]

En 2017, Seda Ceylan y colaboradores utilizaron diferentes concentraciones de PVA con almidón para preparar criogeles. Los criogeles entrecruzados químicamente con glutaraldehído, mostraron alto potencial para ser aplicados como andamios en ingeniería de tejidos [64]

5.8 SULFATO DE CONDROITINA (CS)

El CS es un polisacárido perteneciente a los glucosaminoglicanos sulfatados, compuesto por dos monosacáridos: el ácido D-glucurónico y la N-acetyl-D-galactosamina (Figura 4) [65] que se incorpora a las moléculas de agregano durante la síntesis por condrocitos [66]. Usualmente se encuentra asociado a proteínas conformando proteoglicanos [65]. Es un importante componente del cartílago articular humano y de otros tejidos blandos (figura 5), donde colabora en la retención del agua para dotar de incompresibilidad [67]. Las glicoproteínas o glucoproteínas son moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios glúcidos, simples o compuestos. Destacan entre otras funciones la estructural y el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas [68].

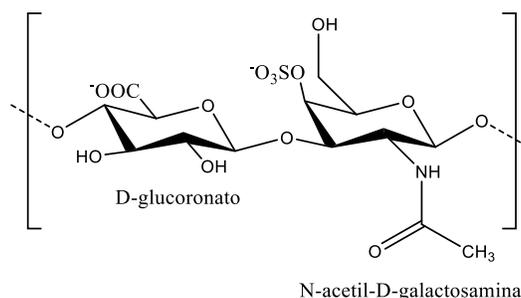


Figura 4. Estructura química del sulfato de condroitina.

En los tejidos de las articulaciones, se ha demostrado que el CS modifica el proceso de muerte por condrocitos, mejora el equilibrio anabólico/catabólico de la matriz del cartílago extracelular, reduce algunos factores proinflamatorios y catabólicos, así como reduce las propiedades de resorción de los osteoblastos de hueso subcondral [9]. Además, el CS estimula la síntesis de colágeno [8]. Por estas razones, su incorporación en mezclas de biopolímeros biocompatibles es altamente deseable para la producción de películas porosas para su uso como andamios celulares.

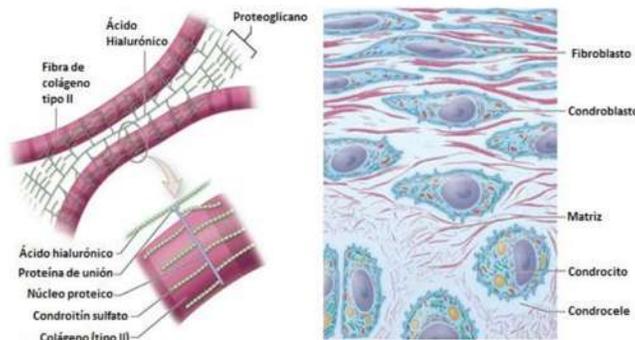


Figura 5. Esquema de la estructura histológica del cartílago. Tomado de [59].

5.9 SULFATO DE CONDROITINA Y SUS COMBINACIONES PARA EL DESARROLLO DE ANDAMIOS CELULARES

Entre algunas de las aplicaciones de andamios celulares que incorporan el CS se encuentran las esponjas para la liberación controlada del factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, propuesta por Yoon y colaboradores [69] para mejorar la formación de hueso. La esponja porosa se fabricó implementando la técnica de liofilización y reticulación de la solución acuosa de CS–CTS. Por otra parte, en 2012 Anisha y colaboradores [70] elaboraron esponjas porosas compuestas de CTS–HA-CS preparadas mediante liofilización para el cultivo de fibroblastos dérmicos humanos. Los autores reportaron que los nanocompuestos poseen una porosidad del 67 % y mejoraron la hinchazón y capacidad de coagulación de la sangre.

En 2016, Cellet y colaboradores [71] sintetizaron y caracterizaron hidrogeles de CS potencializados con PVA y nanopartículas de HA para brindarle mayor resistencia y bioactividad en el estudio de biocompatibilidad en tejidos subcutáneos.

5.10 TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN DE MATERIALES POROSOS.

Los materiales porosos poseen características ideales para su aplicación andamios en ingeniería de tejidos debido a que poseen una alta relación área superficial/volumen con

poros lo suficientemente grandes para injertar células, además de estar diseñados para disolverse o degradarse, liberando factores de crecimiento, creando nuevos poros en los que las células vivas puedan penetrar y proliferar [72].

Existen diversas metodologías para la producción de andamios porosos 3D como lo son:

- **Electrospinning o electrohilado:** es una técnica que permite la creación de micro y nanofibras a través de un chorro de solución polimérica eléctricamente cargada o de polímero en estado fundido [17]. Entre las limitaciones de esta técnica esta la necesidad de cumplir con características específicas como el uso de solventes adecuados, la presión de vapor del solvente correcta, viscosidad y tensión superficial no tan alta, la distancia adecuada entre el capilar y el colector, así como una fuente de poder que supere la viscosidad de la solución para formar y sostener el chorro.
- **Lixiviación de partículas:** en esta técnica las sustancias como la sal, ceras, azúcares y nanopartículas son utilizados como agentes porógenos, para conseguir matrices tridimensionales con porosidad controlada. Después de la evaporación del solvente, las partículas porogénicas se eliminan de la matriz polimérica mediante disolución selectiva a altas temperaturas, y la etapa final consiste en la liofilización a fin de asegurar un secado completo manteniendo la estabilidad de las estructuras porosas. Las temperaturas elevadas pueden producir lixiviación de cantidades excesivas de soluto o deterioro de los componentes [15, 73].
- **Liofilización:** esta técnica se basa en la utilización de soluciones homogéneas de un sistema polimérico en un disolvente de punto de congelación elevado. La solución se enfría hasta temperaturas inferiores a la de solidificación del sistema y el disolvente se elimina por sublimación al vacío manteniendo el sistema congelado [16]. Debido al requerimiento de bajas temperaturas y presión de vacío, esta técnica es poco accesible y de costo elevado.

- **Bioprinting 3D:** es el proceso de creación de patrones o estructuras donde se colocan células en un espacio cerrado usando tecnologías de impresión 3D. el resultado inmediato de la técnica no es un órgano funcional y viable, se necesitan de largos periodos de tiempo para que los tejidos bioimpresos se fusionen, compacten y maduren; estos procesos se llevan a cabo en biorreactores específicos para cada etapa del proceso [17], esto hace que la técnica sea sumamente cara y poco viable.

Dentro de las metodologías para la producción de materiales porosos destaca la separación de fase, al ser una técnica simple, accesible y de bajo costo. La separación de fase puede inducirse en solución empleando un sistema no disolvente (*non-solvent induced phase separation*, **NIPS**), térmicamente (*thermally induced phase separation*, **TIPS**) [74] o por evaporación del solvente (*evaporation induced phase separation*, **EIPS**).

En la metodología clásica de tipo NIPS, se adiciona a la disolución polimérica un disolvente en el cual el polímero no es soluble lo que induce el cambio de fase. Por su parte, la metodología tipo TIPS involucra cambios drásticos de temperatura, comúnmente la disolución polimérica es templada hasta el punto de congelación y el disolvente es retirado por un proceso de liofilización. Por su parte, la técnica EIPS involucra la separación de fase mediante la evaporación del buen solvente. Las películas porosas producidas en este trabajo se han obtenido empleando la técnica EIPS, por lo que esta técnica se describe más profundamente a continuación.

5.11 SEPARACIÓN DE FASE INDUCIDA POR EVAPORACIÓN (EIPS)

La EIPS, es una metodología eficaz, económica y simple para producir materiales con estructura porosa [75]. Un sistema típico contiene el polímero o mezclas de polímeros, un buen solvente y un no solvente los cuales son miscibles entre sí [76]. La separación de fase líquido-líquido se logra mediante la evaporación controlada (temperatura, humedad relativa) del buen solvente de una solución polimérica monofásica inicialmente homogénea [77]. Con la evaporación del buen solvente, las gotas enriquecidas del no solvente crecen y

se unen para ser más grandes, la solución de polímero se ve obligada a separarse en dos fases: la fase rica en polímero y la fase pobre en polímero; en este punto la fase rica en polímero se separará de la fase pobre en polímero. Una vez evaporado el buen solvente, el mal solvente se encuentra formando una red con la matriz del(los) polímero(s) [78]. La estructura porosa se forma al extraer el mal solvente, el cual deja espacios vacíos tras su eliminación [75]. La concentración de polímero, el tipo de solvente, el espesor de la disolución, el tipo y concentración del no solvente [77], la temperatura y circulación de aire [79] son parámetros importantes para contralar debido a que influyen de forma significativa la fase de desarrollo de la morfología y la formación de los poros en el material [75].

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se han producido materiales porosos basados en CTS puro mediante la técnica EIPS empleando como sistema no disolvente (mal solvente) un disolvente eutéctico profundo (DES) [12]. Esto ha resultado ser un aporte importante al área debido a que es una técnica sencilla, de bajo costo, amigable con el ambiente, versátil y muy accesible debido a que se requiere un mínimo de equipo para su ejecución. Los materiales obtenidos han resultado efectivos para la inhibición del crecimiento de biopelículas de la bacteria *Vibrio cholerae* y como soportes catalíticos. Además, su estructura ha llamado la atención para su uso andamio celular para el estudio del mecanismo de crecimiento de fibroblastos de cicatriz hipertrófica, lo cual está siendo estudiado actualmente en el Instituto Nacional de Rehabilitación en la Ciudad de México, por esta razón, en este trabajo de tesis se presenta la producción de películas porosas compuestas por mezclas de CG, CTS, PVA o CS.

Gran parte de la innovación y contribución a la técnica EIPS es el uso de un DES como sistema no disolvente, ya que, es importante mencionar, que éste es el primer reporte del uso de este tipo de disolventes en esta técnica, aunado al hecho de que dadas sus características es posible reutilizarlos en el proceso, por lo que no se generan desechos contaminantes derivados de la ejecución de esta técnica [12].

5.12 DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES)

Los disolventes orgánicos principalmente utilizados para la producción de materiales porosos, como pueden ser cloroformo, hexano, etc., provienen del petróleo, por lo que su uso en un futuro es insostenible. Todos ellos son volátiles, inflamables, en muchos casos son tóxicos y no biodegradables, por lo que el impacto medioambiental es muy negativo [12]. Un disolvente ideal, en teoría, debe ser seguro tanto para los seres humanos como para el medio ambiente, siendo su uso y obtención también sostenible.

Los DES son considerados disolventes de última generación como un alternativa sostenible, mucho menos inflamable, no volátil respecto de los disolventes orgánicos. Además, los DES puede disolver sustancias con las que los disolventes convencionales tienen grandes dificultades. Estos disolventes se obtienen al calentar dos o más sólidos inmiscibles en una proporción determinada que sufren un cambio de fase sólido-líquido a una temperatura determinada llamada punto eutéctico, donde se comporta como si fuese un líquido puro [12]. Estos disolventes poseen un punto de fusión menor que el de sus componentes individuales por lo que a temperatura ambiente se encuentran en estado líquido. Pueden ser fácilmente obtenidos mezclando sus componentes, los cuales son compuestos biodegradables, biocompatibles, biorenovables, baratos, seguros y capaces de formar mezclas eutécticas a través de interacciones de puentes de hidrógeno [14].

Los DES pueden ser clasificados en cuatro tipos con base en sus propiedades y composición [80].

- Tipo I: contienen una sal de amonio cuaternaria y un haluro metálico. Debido al uso de haluros metálicos anhidros para su preparación, estos DES son generalmente más caros y tóxicos.
- Tipo II: son parecidos a los del tipo I, pero tienen en su estructura haluros metálicos hidratados, lo que los hacen más baratos, generando una amplia variedad de mezclas eutécticas a baja temperatura.
- Tipo III: son los más importantes desde el punto de vista químico debido a su facilidad de preparación y a su potencial uso como disolventes sostenibles. Están formados, generalmente, por una sal de amonio cuaternaria con alto punto de fusión

y carácter aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA), que interactúa con compuestos que tienen carácter dador de hidrógeno (HBD).

- Tipo IV: se forman combinando un haluro metálico con un ácido de Lewis o de Brønsted.

En los DES de tipo III, la adición del haluro metálico hidratado hace que se establezcan enlaces de hidrógeno entre los dos componentes, de manera que la carga del anión de la sal se deslocaliza, disminuyendo la fuerza del enlace iónico entre el catión y el anión de la sal y, por tanto, la energía de la red cristalina hasta distorsionarla totalmente. Esta disrupción de la estructura cristalina da lugar a una disminución del punto de fusión de la mezcla. La nueva estructura formada está constituida por una red extensa de enlaces de hidrógeno entre los componentes, en donde existen huecos o agujeros. Esta estructura está menos ordenada y su densidad disminuye. Cuanto más fuerte es la interacción entre los componentes, mayor es la depresión del punto de fusión [12].

La toxicidad de estas mezclas eutécticas, sobre todo de aquellas que provienen de fuentes naturales es prácticamente nula [81], mientras que su biodegradabilidad es extraordinariamente alta [82]. La formación de cualquier DES, a partir de sus componentes es extraordinariamente sencilla, no genera ningún tipo de subproducto y no necesita ninguna etapa de purificación, por ende, son considerados disolventes ecológicos. Además, la alta solubilidad en agua de los componentes del DES hace que la adición de esta genere una nueva capa orgánica líquida con los productos orgánicos, precipitando estos en algunos casos, por lo que el tratamiento final de las reacciones llevadas a cabo en DES es muy simple y económico [12]. Sin embargo, poseen algunos inconvenientes siendo el mayor de ellos su alta densidad y viscosidad.

5.13 CLORURO DE COLINA:UREA (ChCl:U)

También conocido como relina, fue el primer DES usado, en síntesis, está conformado por cloruro de colina (ChCl) con un punto de fusión de 302 °C y urea (U) con un punto de fusión de 134 °C, en una proporción 1:2 (Figura 6); la interacción es tan fuerte

que el punto de fusión en el punto eutéctico es de 12 °C, lo que supone una disminución de 122 °C respecto al ideal [12]. El ChCl es un nutriente esencial, puede ser extraído de la biomasa, y es considerado parte de las vitaminas del complejo B. La U juega un papel vital en el metabolismo de los compuestos que contienen nitrógeno en la vida de los seres vivos, además de ser el fertilizante nitrogenado más comercializado [83]. La U actúa como donador de enlaces H, mientras tanto, el ChCl toma el papel de aceptor de enlaces hidrógeno. Muchas sales de amonio y especies complejantes orgánicas (ChCl y U respectivamente) están fácilmente disponibles como producto a granel permitiendo su aplicación para síntesis de nuevos materiales, estudios de catálisis, solubilización de fármacos, entre otros [84].

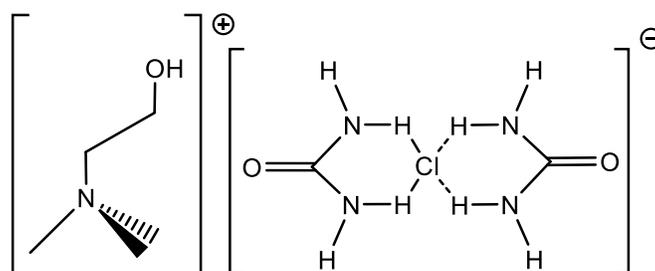


Figura 6. Formación de complejos en un DES. El DES ChCl-U tiene un punto eutéctico en una proporción 1:2 en 12 °C. Tomado de [67].

La aplicación de estos disolventes para la preparación de materiales poliméricos con funciones, características estructurales y morfológicas mejoradas es relativamente reciente en el ámbito de investigación. Se ha reportado el uso de mezclas eutécticas de ChCl/ácido cítrico como agente plastificante para películas de quitosano; en la cual, el DES contribuye a homogeneizar la dispersión formadora de película, [20] brindándole una mayor resistencia a la tracción [85]. Simultáneamente, se ha demostrado que el DES ChCl-U es un plastificante potencial para películas de quitosano-carboximetilcelulosa que promueve la conductividad de protones y la estabilidad de la película ante la disociación en el agua [86].

En este trabajo implementamos una alternativa sencilla, ecológica y además económica para la formación de materiales porosos mediante el uso del DES no volátil ChCl-U como sistema no solvente, a distintas combinaciones de biopolímeros insolubles en solventes orgánicos volátiles comunes. A partir de una modificación a la técnica EIPS estandarizada en el grupo de trabajo para para la producción de materiales porosos basados en CTS puro [12], la cual consiste en la adición del DES como sistema no solvente a las soluciones de polímeros con la posterior evaporación del buen solvente acuoso y la extracción liquido/liquido del DES con metanol.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 ASPECTOS GENERALES

Se prepararon materiales en forma de películas porosas utilizando los siguientes reactivos:

Quitosano en forma de polvo obtenido de la cascara de camarón con un grado de desacetilación $\leq 75\%$ (CTS), colágeno tipo 1 obtenido de tendón de Aquiles de bovino (CG), cloruro de colina con una pureza $\geq 98\%$ (ChCl), urea con una pureza $\geq 98\%$ (U) y 1,1,1,3,3,3,hexafluor-2-propanol con una pureza $\geq 99\%$ (HFIP), Alcohol polivinílico (PVA, Mw 89,000-98,000, + 99% hidrolizado), Sulfato de condroitina obtenido de la tráquea de bovina (CS): todos de la marca Sigma-Aldrich. Ácido acético (AAc) de la marca J. T. Baker, con una pureza de 99.94%.

6.2 OBTENCIÓN DE PELÍCULAS POROSAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE SEPARACIÓN DE FASE INDUCIDA POR LA EVAPORACIÓN DE SOLVENTE (EIPS)

Las diferentes mezclas de CTS, CG, PVA y CS con el DES, se prepararon a partir de mezclas de las siguientes disoluciones de cada polímero descritas en la Tabla 1 con el DES.

Tabla 1. Soluciones poliméricas empleadas para la preparación de mezclas poliméricas/DES.

Polímero	Disolvente	Concentración del polímero	Temperatura
CTS	Ácido acético al 40%	2 %	Ambiente
CG	HFIP	2.5 %	Ambiente
PVA	Agua destilada	2 %	90 °C
SC	Agua destilada	2.5 %	Ambiente

La preparación del DES se realizó mezclando ChCl y U en una proporción molar 1:2, manteniendo la mezcla a 80 °C hasta obtener una mezcla homogénea. Este DES se etiquetó como: ChCl: U.

La metodología EIPS es un proceso que consta de las siguientes etapas:

La metodología EIPS es un proceso que consta de tres etapas:

1. **Obtención de las mezclas de los polímeros** (Figura 7 A y B): Se prepararon mezclas CTS/CG, CTS/PVA, PVA/CG, CTS/CS y CTS/PVA/CG en las proporciones descritas en la Tabla 2. A estas diluciones previamente se les agregó cuidadosamente el DES ChCl:U para evitar la formación de aglomerados, manteniendo en agitación magnética constante a temperatura ambiente. Una vez obtenida cada solución homogénea de las mezclas poliméricas con el DES, se colocaron en cajas Petri empleando diferentes volúmenes: 12, 10, 8, 6 y 4 mL, etiquetando cada una respectivamente. Cabe destacar que el orden en que se agregan las soluciones a la mezcla es de vital importancia para mantener una dispersión adecuada de los polímeros, debido a la insolubilidad de estos en el DES ChCl:U.

Se emplearon proporciones 3:1, 2:1 y 1:1 v/v de mezcla de polímeros respecto del DES las cuales se prepararon como se describe a continuación en la Tabla 2:

Tabla 2. Preparación de las mezclas de los polímeros con el DES.

Proporción polímeros/DES	Solución CTS 2%	Solución CG 2.5 %	Solución PVA 2 %	Solución SC 2.5 %	ChCl:U
CTS/CG	1:1	20 mL	20 mL	----	40 mL
	2:1	15 mL	15 mL	----	15 mL
	3:1	15 mL	15 mL	----	10 mL
CTS/PVA	1:1	10 mL	----	10 mL	20 mL
	2:1	15 mL	----	15 mL	15 mL
	3:1	15 mL	----	15 mL	10 mL
PVA/CG	1:1	----	10 mL	10 mL	20 mL
	2:1	----	10 mL	10 mL	10 mL
	3:1	----	15 mL	15 mL	10 mL
CTS/CG	1:1	8 mL	----	8 mL	16 mL
	2:1	10 mL	----	10 mL	10 mL
	3:1	15 mL	----	15 mL	10 mL
CTS/PVA/CG	1:1	5 mL	5 mL	5 mL	15 mL
	2:1	7 mL	7 mL	7 mL	10 mL
	3:1	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
	1:2	3 mL	3 mL	3 mL	18 L

2. **Evaporación de disolvente acuoso** a 60 °C por aproximadamente 24 horas. (Figura 7C).
3. **Extracción del ChCl:U con metanol.** Realizando lavados con aproximadamente 6 mL en cada película, en intervalos de dos horas entre cada lavado hasta un total de diez lavados por película, para posteriormente llevar a secado en estufa a 60 °C. Para acelerar el proceso de secado, se realizaron lavados con acetona a cada película antes de llevar a la estufa (Figura 7D).

Adicionalmente a los pasos anteriores se realiza la neutralización de las muestras con hidróxido de sodio 0.5 M con el propósito de neutralizar los grupos amino protonados (NH_3^+) del quitosano y evitar la redisolución de las películas. Para esto, se cubre cada película y se deja reposar 30 min, después de este tiempo se mide el pH. Se retira el NaOH y se realizan lavados con agua destilada hasta obtener un pH neutro. Finalmente se secan las películas a 60 °C por intervalos de 5 minutos para evitar que se adhieran a la caja de Petri (Figura 7E).

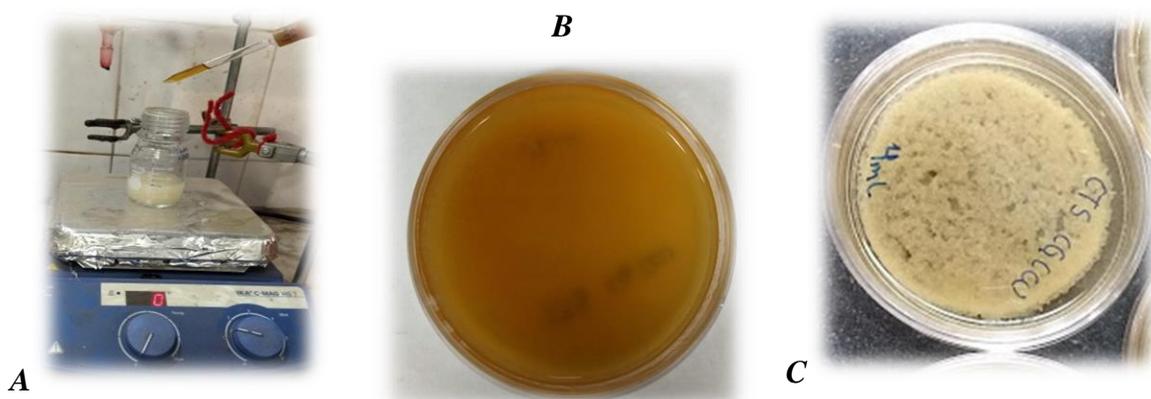




Figura 7. Metodología general del proceso de síntesis de películas porosas mediante la técnica EIPS. A) Mezcla de solución de polímeros con el DES; B) Mezcla polímero/DES en cajas Petri; C) películas después de la evaporación del disolvente acuoso; D) películas después de la extracción del DES y E) Película final después del secado.

6.3 PRUEBAS DE HINCHAMIENTO (%H)

Es importante conocer las características de hinchamiento de los materiales ya que esta propiedad influye en el desempeño mecánico de los materiales así como en la difusión del soluto a través de los mismos. El porcentaje de hinchamiento (% H) se determinó en agua destilada y solución salina (NaCl 0.9 %) a temperatura ambiente, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% H = \left(\frac{W_0 + W_d}{W_d} \right) \times 100$$

Donde W_d y W_0 son los pesos de la muestra seca y húmeda respectivamente. Se determinó la cinética de hinchamiento registrando los pesos de las muestras en intervalos de 10 minutos hasta completar 60 minutos. El exceso de líquido fue removido antes de la determinación del peso de cada muestra.

6.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO POR EMISIÓN DE CAMPO (FESEM)

Las características micro estructurales de las películas porosas se analizaron empleando un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo Jeol JSM 7600F.

6.5 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PORO

Para la determinación del tamaño de poro se utilizó el programa Image J, en el cual se analizaron las imágenes SEM haciendo las mediciones de la longitud de la apertura de aproximadamente 250. Los datos obtenidos se procesaron en el programa OriginPro 8, con el que se obtuvo el tamaño promedio y las gráficas de distribución correspondientes.

6.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (FTIR)

Las interacciones moleculares entre los componentes se analizaron mediante espectroscopia de infrarrojo de transformación de Fourier en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, utilizando un accesorio ATR en el rango de 4000-650 cm^{-1} , la resolución se ajustó a 4 cm^{-1} y los espectros mostrados son un promedio de 32 barridos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los objetivos planteados, la primera parte del proyecto consistió en la producción de películas porosas analizando los diferentes parámetros para encontrar las mejores condiciones para su obtención.

Para la preparación de las películas se usaron cada una de las mezclas de los polímeros, las cuales fueron procesadas por la metodología tipo EIPS descrita en el apartado 6.2. Se emplearon proporciones volumétricas: 1:1, 2:1 y 3:1 mezcla de polímeros/DES, por lo que las etiquetas empleadas en adelante indican esta proporción. Por ejemplo, las películas porosas CTS/CG 1:1, se refiere al uso de una mezcla CTS/CG en proporción 1:1 respecto del DES ChCl/U.

El mecanismo de formación de poros se muestra en la Figura 8. Mediante la técnica de EIPS, la separación del sistema en dos fases (la fase rica en polímero y la fase pobre en polímero) se lleva a cabo mediante la inducción de inestabilidad termodinámica de la solución acuosa de polímeros inicialmente homogénea, inducida por la adición del DES y la evaporación del solvente acuoso [12]. La adición de un no solvente al sistema de polímeros-solvente reduce la interacción entre los polímeros y el solvente [87]. Este fenómeno favorece la segregación de la solución de polímeros, de la misma manera que el aumento de la concentración de polímeros reduce a su vez el carácter de solvatación a medida que se evapora el buen disolvente de la solución. La evaporación del buen solvente causa la precipitación de los polímeros, disminuyendo constantemente la relación solvente/no solvente y formando así una matriz continua de polímeros. Por el contrario, los poros se forman debido al flujo de DES en pequeños dominios a través de la matriz polimérica [88], quedando los huecos de esos dominios después de la extracción del DES con metanol, donde los polímeros son insolubles, y dejando así los poros en el material.

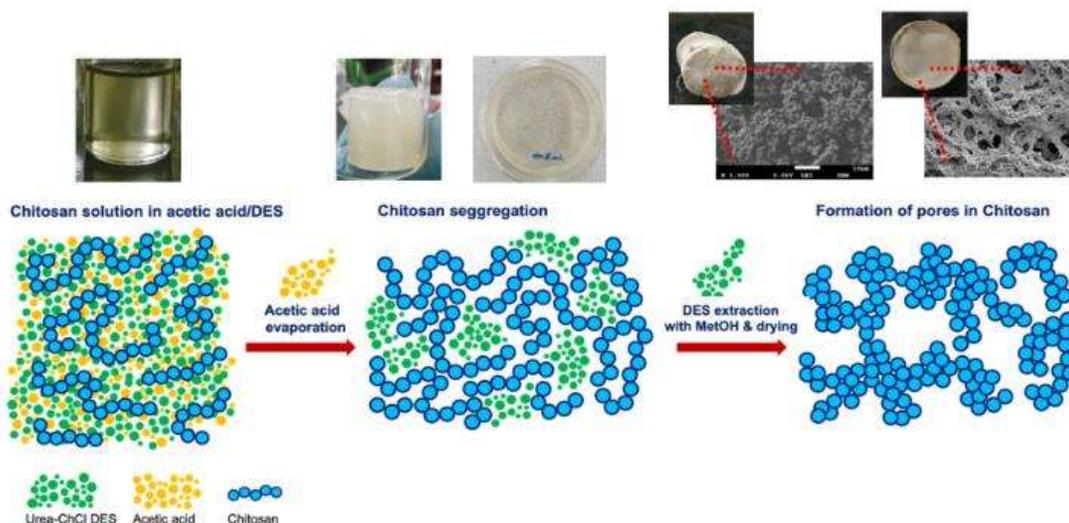


Figura 8. Esquematación del proceso para la formación de materiales porosos de quitosano mediante EIPS. Tomada de [12]

7.1 PELÍCULAS POROSAS DE CTS/CG

7.1.1 CTS/CG 1:1

De los diferentes volúmenes ensayados en las cajas de Petri de 60 mm de diámetro, se obtuvieron películas finas, parcialmente completas, de color amarillo claro y flexibles como se observa en la Figura 9A. En las imágenes obtenidas por FESEM (Figuras 9B y C) se puede observar una superficie rugosa con presencia de algunos poros aislados de aproximadamente 1 a 3 μm de diámetro. La baja producción de poros puede atribuirse a un alto contenido de DES lo que provoca que la matriz polimérica no logre formar una red que encapsule al DES, por lo cual al momento de evaporarse el buen solvente, los polímeros simplemente se precipitan formando películas densas muy delgadas al final del proceso. Ya que las películas obtenidas en esta proporción (CTS/CG 1:1) son muy delgadas y no poseen una cantidad adecuada de poros, se propuso disminuir la cantidad de DES probando en una proporción 2:1.

Adicionalmente, se observa que el material no se modifica a nivel microscópico después del proceso de neutralización (Figura 9C).

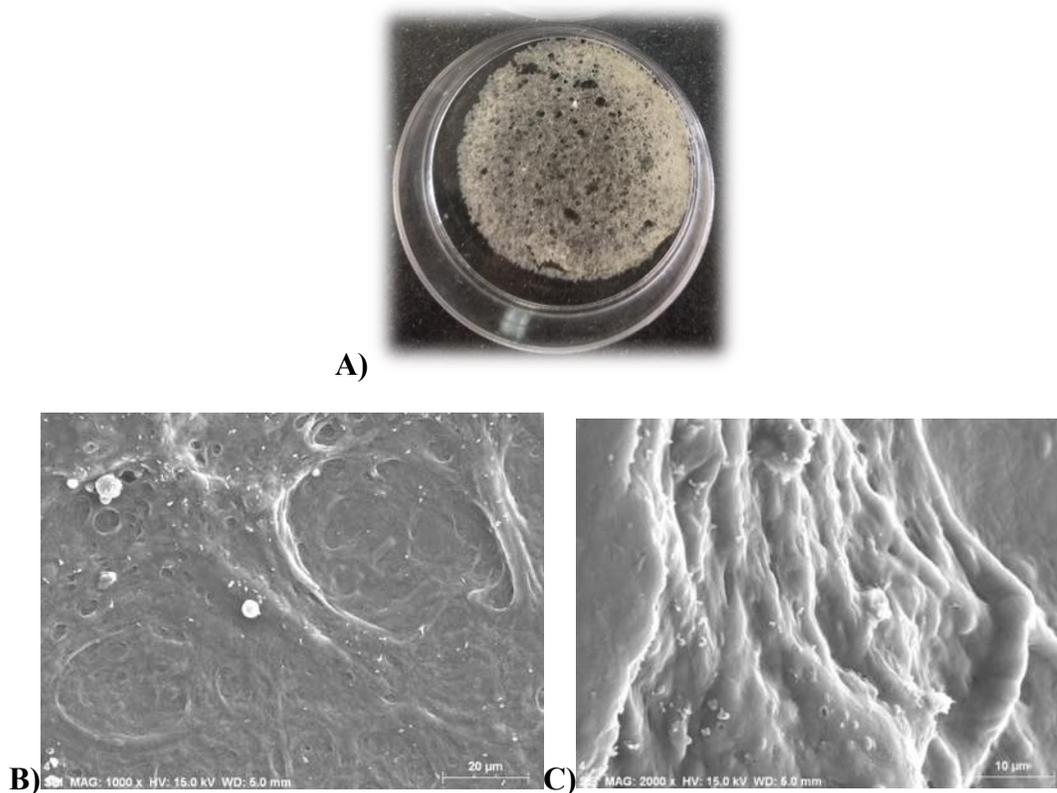


Figura 9. A) Imagen del material CTSCG 1:1 obtenido; B) y C) Microestructura SEM del material a 1000x y 2000x respectivamente.

Se realizaron pruebas de hinchamiento en agua destilada de las muestras obtenidas de las películas CTS/CG 1:1. Las películas formaron un gel transparente, esto se origina posiblemente porque las cadenas de CTS en las películas obtenidas continúan protonadas, por lo cual se disuelven fácilmente en agua.

Para evitar la redisolución de las películas, se neutralizaron empleando disoluciones de NaOH 0.05, 0.1, 0.5 y 1 M y posteriormente se sometieron a pruebas de hinchamiento para la obtención de las cinéticas correspondientes. En la Figura 10A se observa que las películas neutralizadas con NaOH 0.05 y 0.1 M alcanzan el máximo porcentaje de hinchamiento en los primeros minutos y posteriormente comienzan a perder un porcentaje de líquido, esto puede deberse a que la concentración tan baja de NaOH no logra neutralizar en su totalidad la película y con el paso del tiempo comienza a fragmentarse. La película CTS/CG 1:1 0.5 M es capaz de hincharse hasta en un 600 % de su peso inicial, a diferencia de las anteriores, esta película es más resistente a la degradación y ruptura al momento de manipularla.

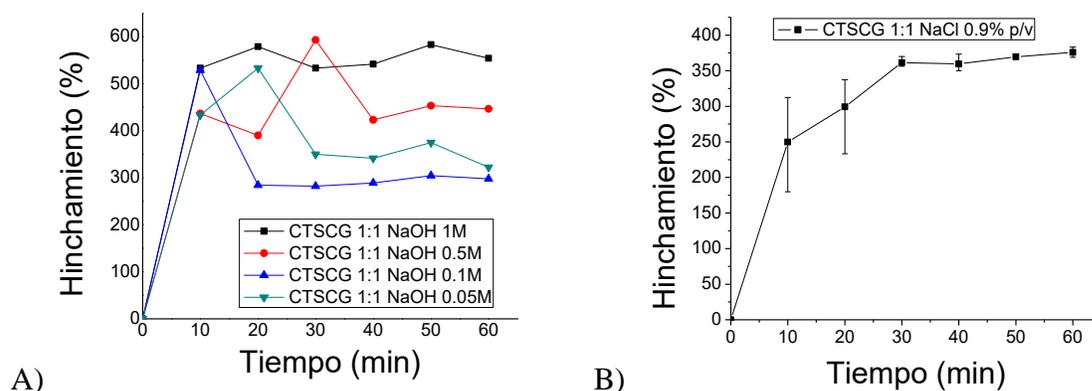


Figura 10. A) Comparación de la cinética de hinchamiento muestras CTSCG 1:1 neutralizadas con diferentes concentraciones de NaOH. B) Cinética de hinchamiento de la película CTSCG 1:1 neutralizada con NaOH 0.5 M en NaCl 0.9 % p/v.

Tras elegir el medio de neutralización de 0.5 M, se realizó la cinética de hinchamiento de esta misma muestra en NaCl 0.9 % p/v como se muestra en la Figura 10B presentando un porcentaje de hinchamiento muy similar; es capaz de hincharse hasta en un 400 % de su peso inicial alcanzando el máximo a los 60 min aproximadamente.

7.1.2 CTS/CG 2:1

Como se puede ver en la Figura 11A, las características macroscópicas de las películas generadas a partir de esta proporción CTS/CG, son más semejantes a las observadas en las películas de CTS puro (Figura 11B) procesadas por la metodología EIPS respecto de la proporción CTS/CG 1:1.

Se observa que al aumentar la proporción de CTS/CG en la mezcla de polímeros/DES se favorece la producción de poros tal y como se muestra en las imágenes SEM de la Figura 11B y C, la superficie rugosa es menos densa que en las películas CTS/CG 1:1; y hay presencia de poros grandes interconectados, con una mayor cantidad de poros aislados de aproximadamente 2-3 μm .

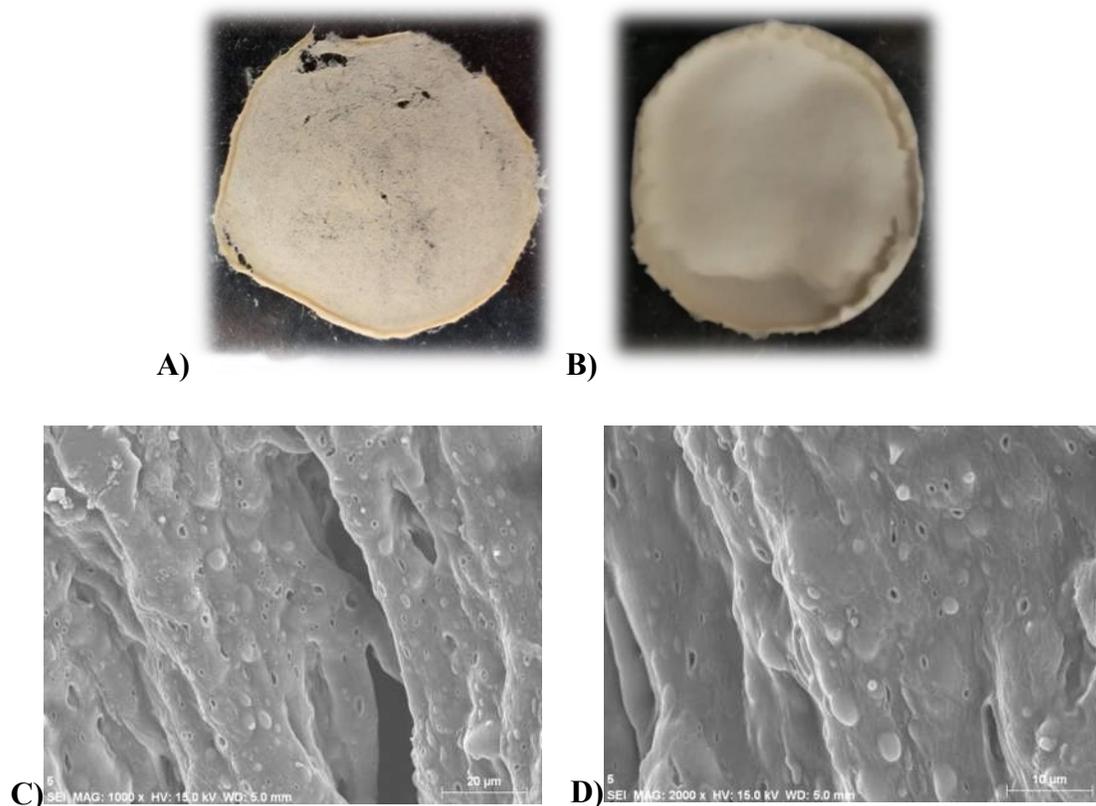


Figura 11. A) Imagen del material CTSCG 2:1 obtenido; B) Imagen de la película de CTS solo; C) y D) Microestructura SEM del material a 1000x y 2000x respectivamente.

Las pruebas de hinchamiento se realizaron posterior a la neutralización de las películas obtenidas usando NaOH 0.5 M (este medio se eligió por haber dado mejores resultados en la proporción CTS/CG 1:1), las pruebas se hicieron en agua destilada y en NaCl 0.9 % p/v a temperatura ambiente obteniendo la cinética mostrada en la Figura 12. Esta película es capaz de hincharse en agua hasta un 500 % de su peso inicial en los primeros 10 min, mientras que en NaCl 0.9% p/v se hincha paulatinamente hasta alcanzar su máximo a los 60 min. En ambos medios, la película es de fácil manipulación y estable.

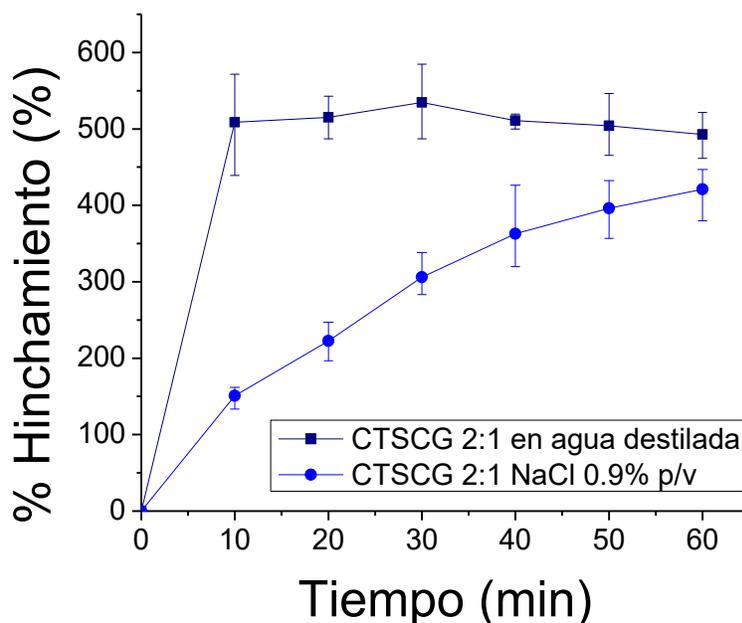


Figura 12. Cinética de hinchamiento de la película CTS/CG 2:1 en agua destilada y NaCl 0.9 % p/v, neutralizada con NaOH 0.5 M.

Debido a que se observó que el aumento en la proporción de la mezcla CTS/CG respecto del DES favorece la producción de poros en la mezcla CTS/CG, se propuso aumentar la cantidad de la mezcla de los polímeros a una proporción 3:1.

7.1.3 CTS/CG 3:1

Se obtuvieron películas de color ligeramente amarillo, de apariencia macroscópica más homogénea que las anteriores (Figura 13A). El procesamiento en esta proporción permite obtener películas completas, ligeramente más gruesas de la orilla pero igualmente porosas posiblemente por que al momento de evaporar el buen solvente el polímero se va adhiriendo a las paredes del recipiente, lo que crea una forma ligeramente cóncava. En la estructura microscópica de la Figura 13B, se observa una superficie completamente distinta a las películas CTS/CG 1:1 y 2:1; en esta proporción el aumento de poros interconectados a lo largo de toda la superficie de la película es evidente y presenta pocas zonas densas. En la Figura 13C se observa a detalle la estructura de los poros interconectados. Con estos

resultados se comprueba, como se mencionó anteriormente (sección 7.1.1 y 7.1.2) que para esta mezcla de polímeros lo ideal es disminuir la proporción del DES para obtener una porosidad adecuada.

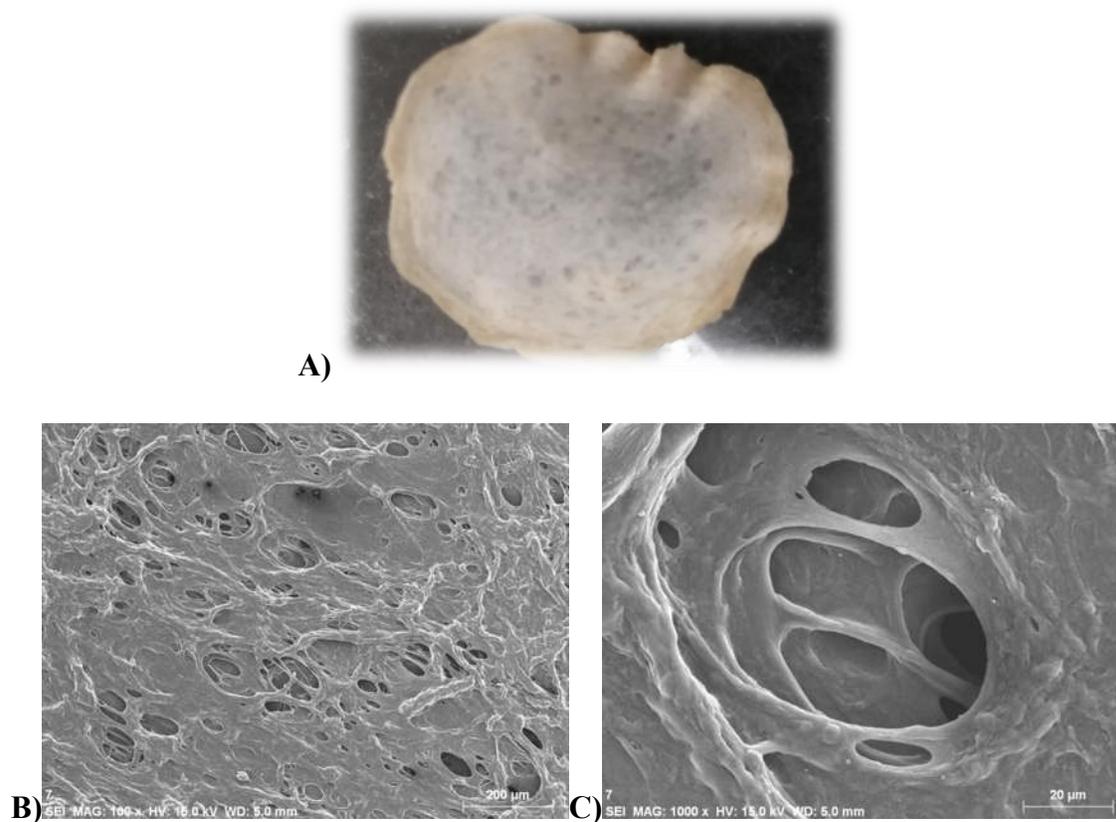


Figura13. A) Imagen del material CTSCG 3:1 obtenido; B) y C) Microestructura SEM del material a 100x y 1000x respectivamente.

El histograma de la distribución de tamaños de poro se muestra en la Figura 14, se observa que, de 250 poros analizados, 140 tienen un tamaño de poro menor a 20 μm con un mínimo de 4.97 μm , un máximo de 196.66 μm y un tamaño promedio de los poros de 132.74 μm con un error de $\pm 9.84 \mu\text{m}$. El tamaño obtenido de los poros, así como la interconectividad que se observa, vuelve atractiva esta combinación para su uso en ingeniería de tejidos como andamios celulares.

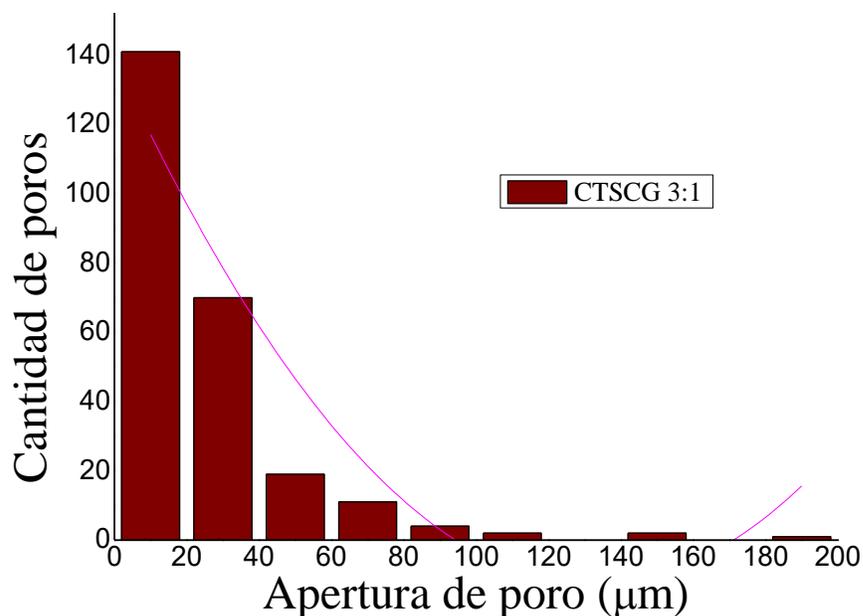


Figura 14. Histograma de distribución del tamaño de los poros de la película CTSCG 3:1 neutralizada.

De las pruebas de hinchamiento en agua destilada y en disolución de NaCl 0.9 % p/v a temperatura ambiente de la películas neutralizadas con NaOH 0.5 M, se obtuvo la cinética mostrada en la Figura 15. Esta película es capaz de hincharse en ambos medios hasta un 240 % de su peso inicial en los primeros 10 min, tomando apariencia de esponja blanquecina de fácil manipulación y muy estables.

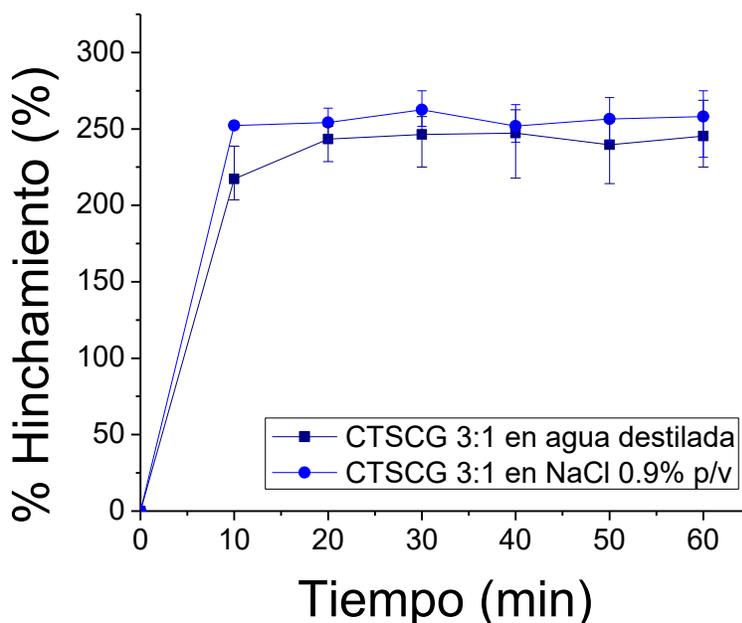


Figura 15. Cinética de hinchamiento de la película CTS/CG 3:1 en agua destilada y NaCl 0.9 % p/v, neutralizada con NaOH 0.5M.

Adicionalmente, para evaluar el comportamiento de esta mezcla de polímeros al someterlas a distintas temperaturas, se colocaron en agua destilada dos muestras de las películas CTS/CG 1:1, CTS/CG 2:1, CTS/CG 3:1. Una muestra de cada combinación se colocó en la estufa a 60 °C y otra en baño de arena a 37 °C. Obteniendo como resultado una estabilidad en todas las películas hasta por 30 días, con lo cual se puede asegurar que las películas pueden cumplir con su función de andamio al no disolverse o degradarse en medios acuosos a la temperatura fisiológica.

La Figura 16 muestra los espectros de FTIR de CTS y CG puros y la película CTS/CG 3:1. El espectro del CTS muestra las vibraciones características de este biopolímero; se observa el traslape característico de las vibraciones de los grupos NH₂ y OH en 3368 cm⁻¹ y a 3278 cm⁻¹ respectivamente, la vibración del grupo C-H en 2811 cm⁻¹, del grupo C=O de amida I en 1651 cm⁻¹, de flexión del grupo N-H de NH₂ en 1557 cm⁻¹ [89,90]. La banda 1420 cm⁻¹ de flexión del CH₂ debido a reordenamientos de enlaces hidrógeno en la orientación más favorable de los grupos primarios OH, en 1318 cm⁻¹

pertenecen al enlace CH_3 del grupo acetilo y la vibración plana de los grupos OH del alcohol. Por último, en 1060 cm^{-1} y 1025 cm^{-1} las bandas de absorción correspondientes al estiramiento asimétrico del grupo C-O-C [12]. Por su parte, el espectro FTIR del CG muestra las vibraciones características del grupo amida A (N-H) en 3295 cm^{-1} , en 1638 cm^{-1} la vibración asociada a la amida I (C=O), en 1537 cm^{-1} la vibración del grupo amida II (C-N, N-H) y en 1186 cm^{-1} la vibración correspondiente a la amida III (C-N, H-H) [91,92].

El espectro FTIR de la película CTS/CG 3:1 muestra características de ambos componentes. Se observa una banda ancha entre 3000 y 3500 cm^{-1} correspondiente al traslape de las vibraciones los grupos NH_2 del CTS y el CG y OH del CTS. El traslape de estas vibraciones y la generación de la banda con gran amplitud se debe a la formación de puentes de hidrógeno entre estos grupos funcionales a lo largo de las cadenas poliméricas. Es evidente un desplazamiento de esta banda respecto de la posición en los componentes puros, lo que indica una interacción entre los polímeros a través de la interacción entre estos grupos en la mezcla. Esto puede verificarse con el cambio en intensidad y posición de las vibraciones características de estos grupos a números de onda menores, como es el caso de la vibración del grupo amida I desplazada en la mezcla a 1647 cm^{-1} .

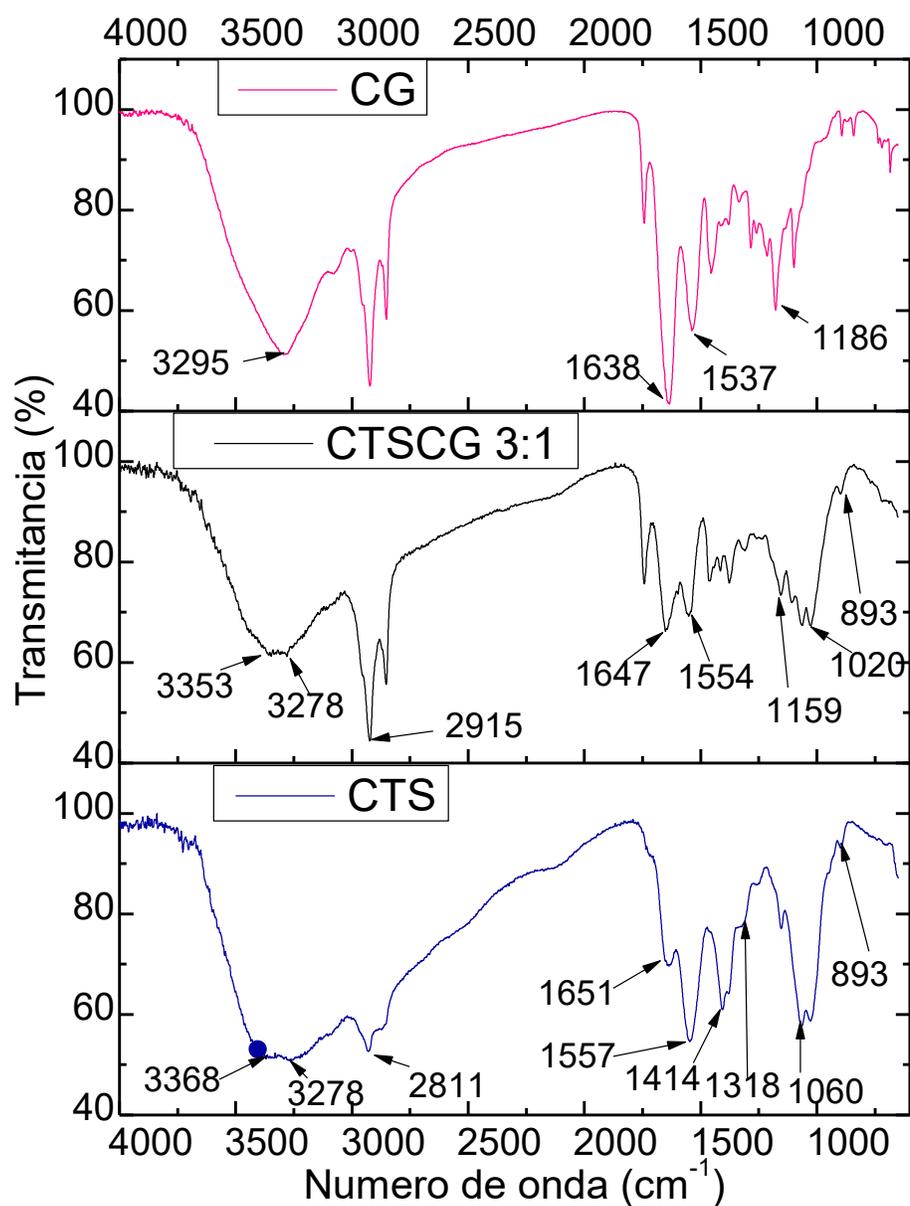


Figura 16. Espectros de FTIR del material CTS/CG 3:1, así como los espectros correspondientes del CTS y CG.

En la Figura 17 se muestra el espectro FTIR del ChCl:U y de las películas CTSCG 1:1, 2:1 y 3:1. El ensanchamiento o aparición de algunas vibraciones en el espectro de las muestras es causado por el ChCl:U que aún se encuentra dentro de la matriz polimérica, en

este caso en la película CTSCG 1:1 se observan ligeros cambios en las vibraciones del espectro, particularmente en las señales correspondientes a 1744 cm^{-1} , 1436 cm^{-1} y 1081 cm^{-1} , estos cambios en las señales permiten inferir que el ChCl:U detectado en las muestras analizadas es mínimo y en cantidades variables.

En el espectro IR de la muestra CTS/CG 1:1 se puede observar que las señales ubicadas de 3700 cm^{-1} a 2700 cm^{-1} son más parecidas a las señales presentes en el CTS puro para esta misma región, mientras que los espectros IR de las muestras CTS/CG 2:1 y 3:1 son más parecidas a las señales del CG puro de esta misma región. Por otro lado, en la muestra CTS/CG 1:1 no se observan señales características del DES, específicamente las señales a 1744 cm^{-1} y 1436 cm^{-1} lo cual puede atribuirse a lo que se comentó en la sección 7.1.1, es decir, que los polímeros no logran encapsular al DES. Mientras que en los espectros de las muestras CTS/CG 2:1 y 3:1 las señales características para el DES logran observarse con mayor claridad. El análisis de estos dos espectros hace pensar que el DES interacciona principalmente con el CTS.

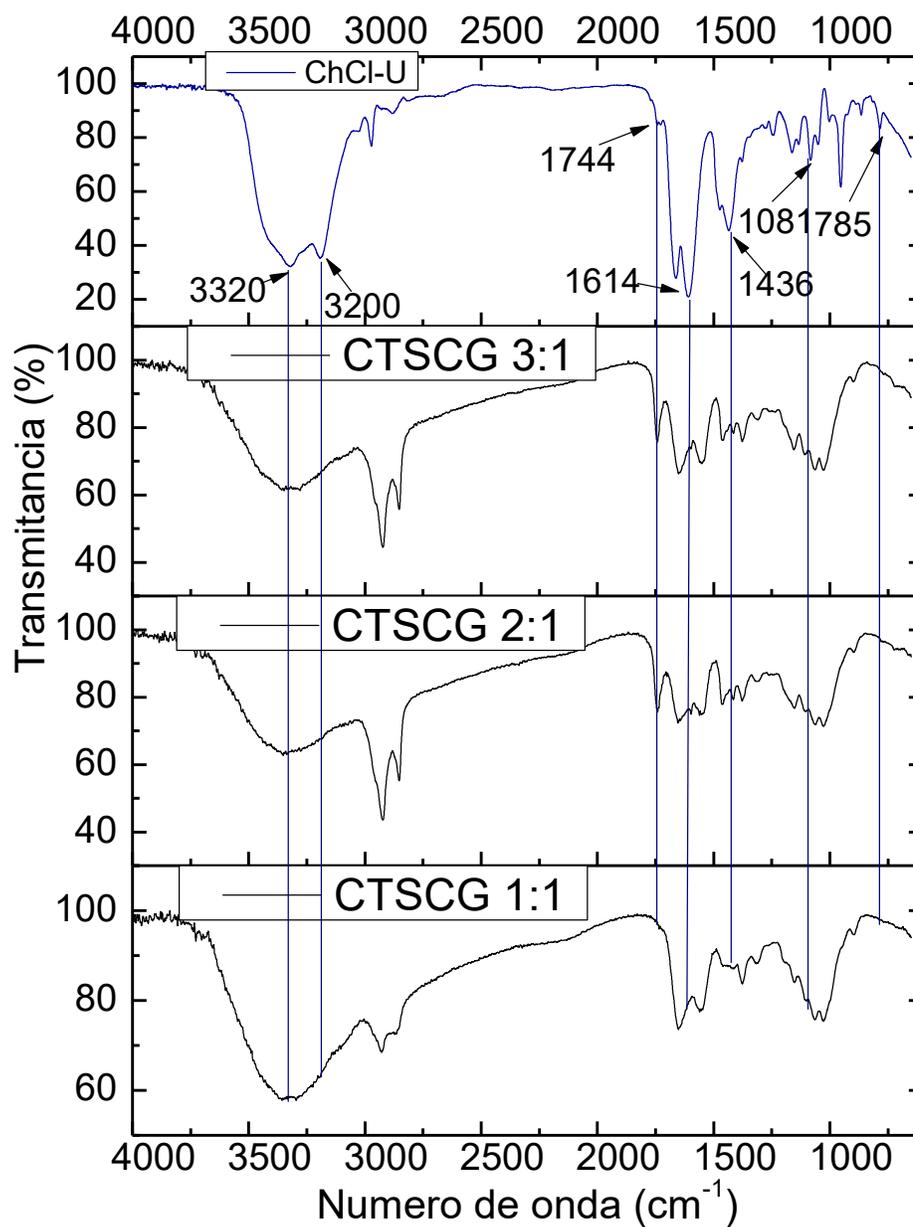


Figura 17. Espectros de FTIR de los materiales CTSCG 3:1, 2:1 y 1:1, así como el espectro correspondiente al ChCl:U.

7.2 PELÍCULAS POROSAS DE CTS/PVA

7.2.1 CTS/PVA 1:1

En la Figura 18A se muestra una fotografía de la película obtenida, estas películas son muy flexibles comparadas con las de la mezcla CTS/CG, de apariencia lisa y brillante y semi transparente, está última característica sugiere la baja presencia de porosidad. En la Figura 18B y C se muestra la estructura microscópica mediante las imágenes SEM del material en las cuales se puede apreciar que presentan una forma irregular, rugosa y densa a nivel superficial, con la mínima presencia de poros pequeños aislados de aproximadamente 2-4 μm . Siguiendo con la misma teoría de las películas anteriores, la ausencia de los poros puede atribuirse a la saturación del DES en el sistema debido a su mayor proporción respecto de la solución de la mezcla de polímeros.

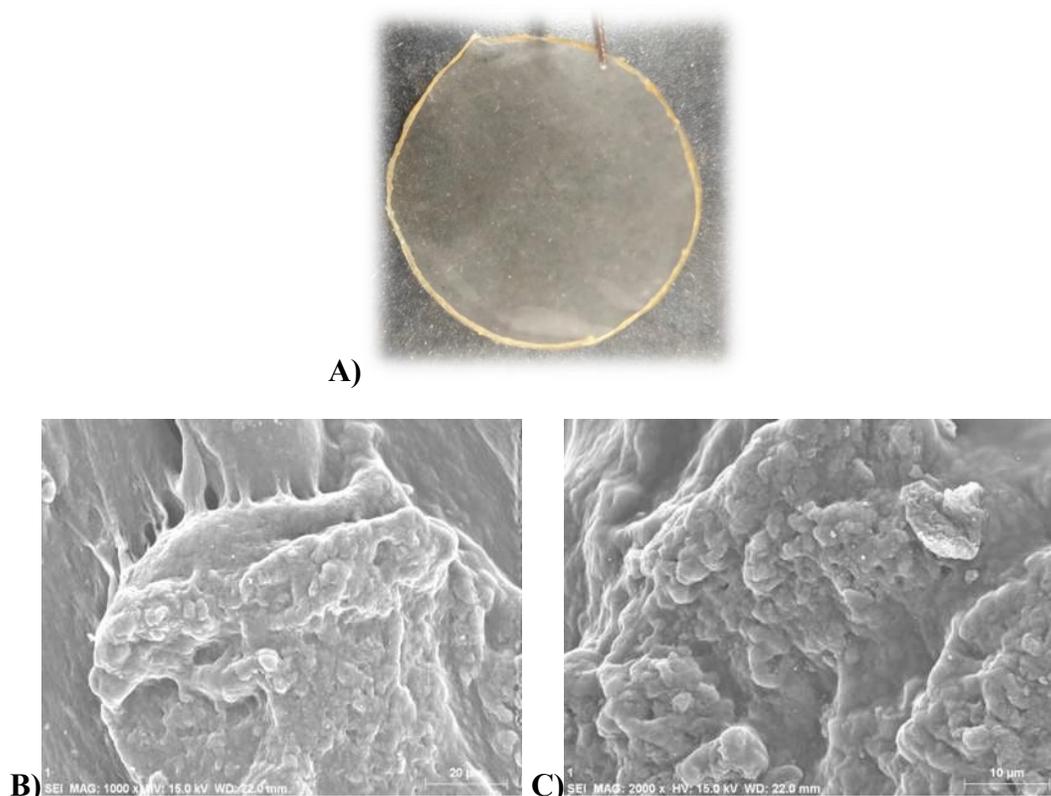


Figura18. A) Imagen del material CTSPVA 1:1obtenido; B) y C) Microestructura SEM del material a 1000x y 2000x respectivamente.

En la Figura 19 se muestra la cinética de hinchamiento en agua destilada y en disolución de NaCl 0.9 % p/v a temperatura ambiente. Bajo las condiciones de la prueba, la

Síntesis de películas porosas a base de biopolímeros incorporando Disolventes Eutécticos Profundos (DES).

superficie de esta película toma apariencia gelatinosa, lo cual puede atribuirse a la elevada solubilidad del PVA en agua. Alcanza un aumento de hasta un 300% de su peso inicial en agua, a diferencia del reportado en NaCl 0.9 % p/v en el cual solo se hincha hasta un 250% de su peso inicial.

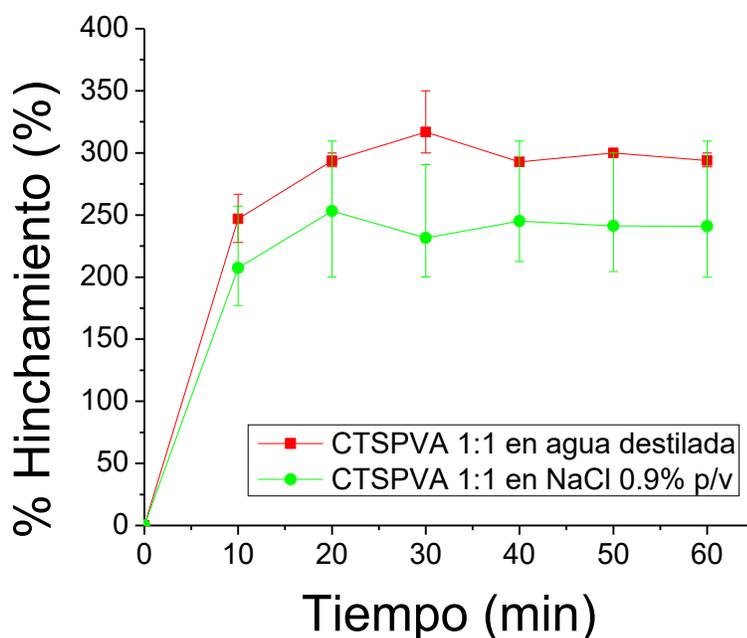


Figura 19. Cinética de hinchamiento de la película CTSPVA 1:1 neutralizada con NaOH 0.5M en agua destilada y NaCl 0.9 % p/v.

7.2.2 CTS/PVA 2:1

En la Figura 20A se muestra la apariencia macroscópica de la película obtenida, siendo esta muy delgada, flexible, de apariencia lisa, brillante y transparente. De manera general, la transparencia es un indicativo de la formación de una película densa sin la presencia de poros, lo cual se puede confirmar con las imágenes SEM en la Figura 20B donde se observa una superficie más homogénea en comparación con las películas CTS/PVA 1:1. En la Figura 20C, se observa que la película es rugosa con ausencia de poros, lo que indica que en esta mezcla de polímeros la proporción de DES con respecto de los polímeros no favorece la formación de poros.

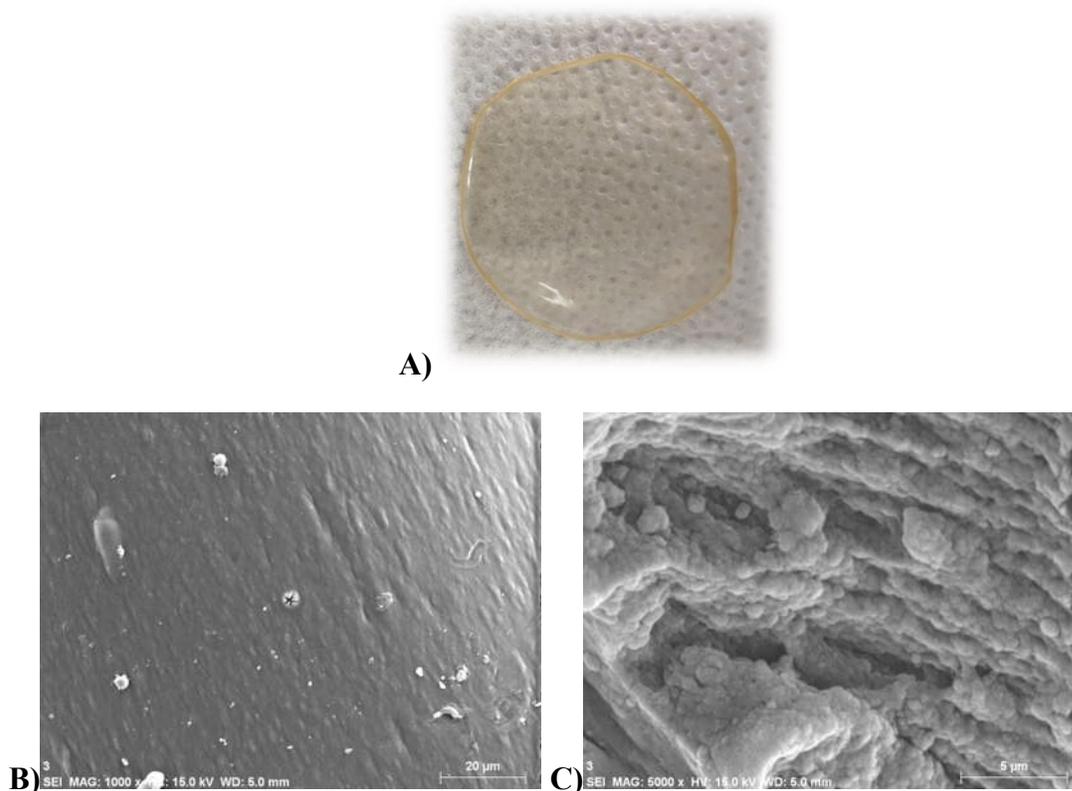


Figura 20. A) Imagen del material CTSPVA 2:1 obtenido; B) y C) Microestructura SEM del material a 1000x y 5000x respectivamente.

La cinética de hinchamiento en la Figura 21 muestra que la película es capaz de hincharse hasta en un 400 % de su peso inicial en agua, mientras que en NaCl 0.9 % p/v el porcentaje de hinchamiento es menor, alcanzando un 300 % de su peso inicial, siendo mayor el índice de hinchamiento de estas películas con respecto de las películas CTS/PVA 1:1.

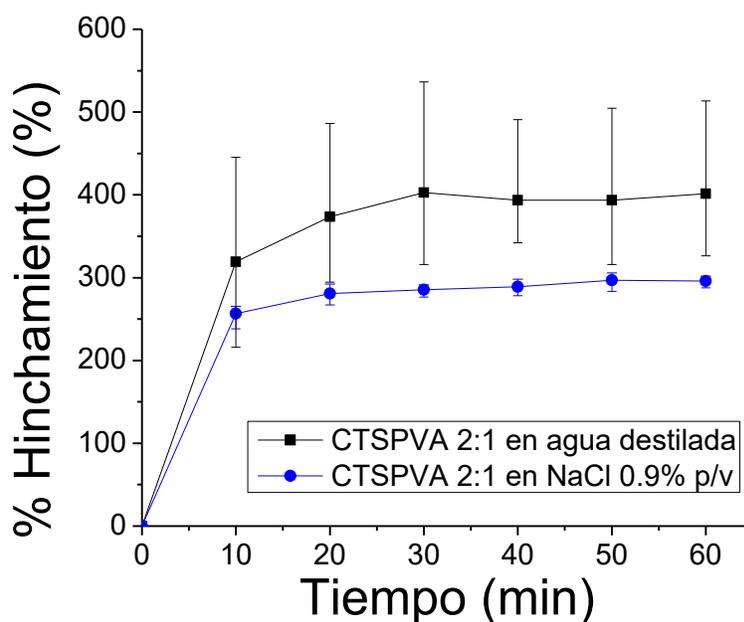


Figura 21. Cinética de hinchamiento de la película CTSPVA 2:1 neutralizada con NaOH 0.5M en agua destilada y NaCl 0.9 % p/v.

7.2.3 CTS/PVA 3:1

La apariencia macroscópica de la película obtenida aumentando la proporción de la mezcla de polímeros respecto del DES se muestra en la Figura 22A la cual mantiene la transparencia como indicativo de la formación de una película densa sin la presencia de porosidad. Esto se confirma con el análisis de las imágenes FESEM de las Figuras 22B y C. Se observa una superficie ligeramente rugosa con apariencia de estrías en la superficie de la película. Posiblemente la ausencia de poros en esta combinación de polímeros puede deberse a una separación de fases debido a la insolubilidad de los polímeros en el DES, lo que puede no favorecer la formación de la red CTSPVA-DES causando la precipitación de los polímeros en forma de película continua.

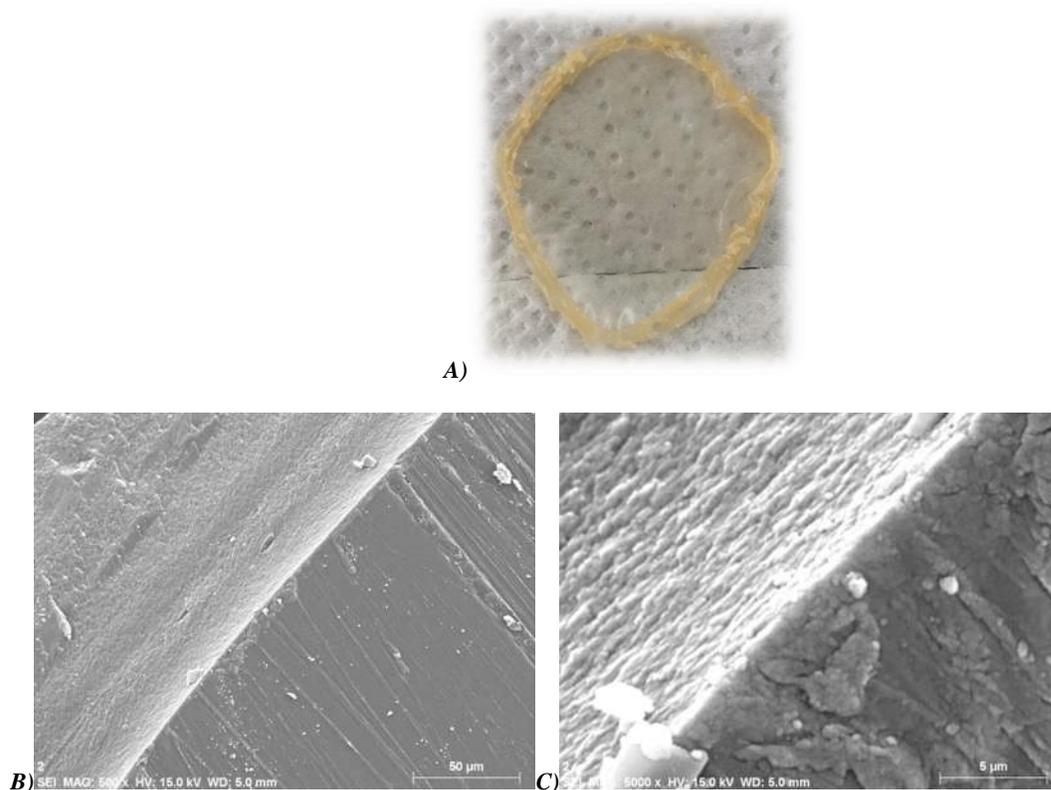


Figura22. A) Imagen del material CTSPVA 3:1 obtenido; B) y C) Microestructura SEM del material a 500x y 5000x respectivamente.

En la Figura 23 se muestra que la película es capaz de hincharse hasta en un 400 % de su peso inicial en agua, mientras que en NaCl 0.9 % p/v el porcentaje de hinchamiento es menor al alcanzando hasta un 250 % de su peso inicial. Por su parte, la película después del hinchamiento mantiene su apariencia macroscópica y no aumentan su tamaño.

En comparación con trabajos previos de andamios electrohilados de CGPVACS que reportan un porcentaje de hinchamiento máximo de 250 % en agua [93], las películas obtenidas por esta técnica presentan un % de hinchamiento en agua de casi el doble del reportado para las nanofibras de CGPVACS, esto puede ser benéfico debido a que el hinchamiento del material favorece la absorción de fluidos del cuerpo y para la transferencia de nutrientes celulares y metabolitos a través del material.

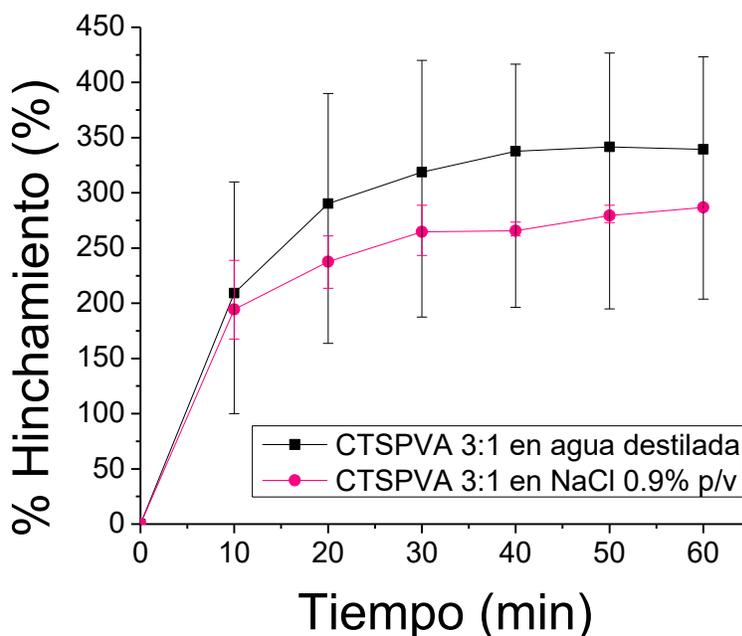


Figura 23. Cinética de hinchamiento de la película CTSPVA 3:1 neutralizada con NaOH 0.5M en agua destilada y NaCl 0.9 % p/v.

La Figura 24 muestra los espectros FTIR del CTS y del PVA puros y de la película CTS/PVA 3:1. El espectro del CTS puro muestra las vibraciones características de éste polímero, discutidas en el apartado anterior (7.1.3). Por su parte, el espectro FTIR del PVA puro despliega las señales características del grupo OH en 3290 cm^{-1} , en 2929 cm^{-1} y 2851 cm^{-1} se aprecian las vibraciones características del estiramiento de grupos C-H, mientras que las vibraciones de los grupos C-O y C=O del grupo acetato del PVA se encuentran en 1750 cm^{-1} . En 1572 cm^{-1} se observa la vibración del grupo C-OH, en 1426 cm^{-1} la vibración del grupo CH₃, en 1320 cm^{-1} de grupo OH primario y finalmente en 1154 y 1083 cm^{-1} las vibraciones de los grupos C-O [94, 95]. Por su parte, el espectro FTIR de la película CTS/PVA 3:1 muestra la presencia de CTS en la región entre 3000 y 3600 cm^{-1} a través de las vibraciones características de los grupos NH₂ traslapadas con las vibraciones OH de ambos polímeros debido a la formación de enlaces por puente de hidrógeno. En 2925 cm^{-1} y 2844 cm^{-1} se encuentran las vibraciones características de los grupos C-H del PVA; estas vibraciones se muestran con menor intensidad en el espectro del CTS, pero son muy

notorias en el espectro de la película CTSPVA 3:1, lo que puede estar relacionado con las interacciones de ambos polímeros. Otra diferencia se encuentra a 1752 cm^{-1} en el espectro de la película CTSPVA 3:1, señal característica del PVA que no se encuentra en el espectro del CTS, de la misma manera, a 1554 cm^{-1} se puede observar una disminución en la intensidad de esta vibración con respecto al espectro del CTS, esto puede deberse a la formación de enlaces C-OH alcoholes con el PVA. Por otro lado, se puede observar una disminución en la intensidad en la vibración a 1322 cm^{-1} proveniente de los grupos OH con respecto del espectro del PVA, lo que puede relacionarse con la formación de enlaces de por puente de hidrógeno entre ambos polímeros.

La comparación entre los espectros de los componentes puros y el correspondiente a la mezcla permite observar el parecido del espectro de la película CTSPVA 3:1 con el espectro del PVA puro, particularmente en la región de 3600 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} , esto puede estar relacionado con la afinidad del CTS por el DES, lo cual hace que este polímero interactúe mayormente con el ChCl:U.

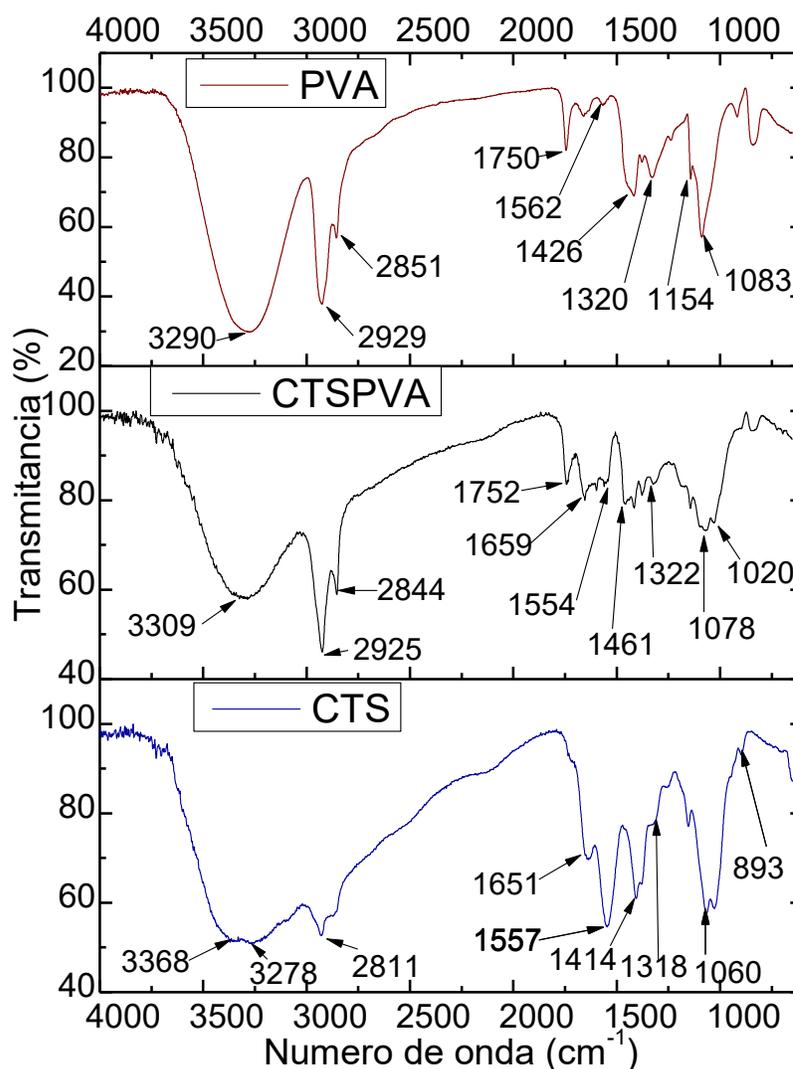


Figura 24. Espectros de FTIR del material CTS/PVA 2:1, y del CTS y PVA puros.

En la Figura 25 se muestra la comparación de los espectros FTIR del ChCl:U y de las películas CTSPVA 1:1, 2:1 y 3:1. En la película CTSPVA 2:1 se puede observar una disminución de la intensidad de la vibración en la región 3500 a 3000 cm^{-1} previamente descrita. Se aprecia un aumento en la intensidad de la vibración en 1744 cm^{-1} en los espectros de las películas CTSPVA 1:1, 2:1 y 3:1; señal característica del ChCl:U , esto puede relacionarse con la interacción de los polímeros con el DES en la matriz, el cual no

es extraído en su totalidad. De la misma manera, en 1081 cm^{-1} se puede observar el aumento en la intensidad de las vibraciones de los espectros de las películas de CTSPVA, particularmente en la proporción 3:1.

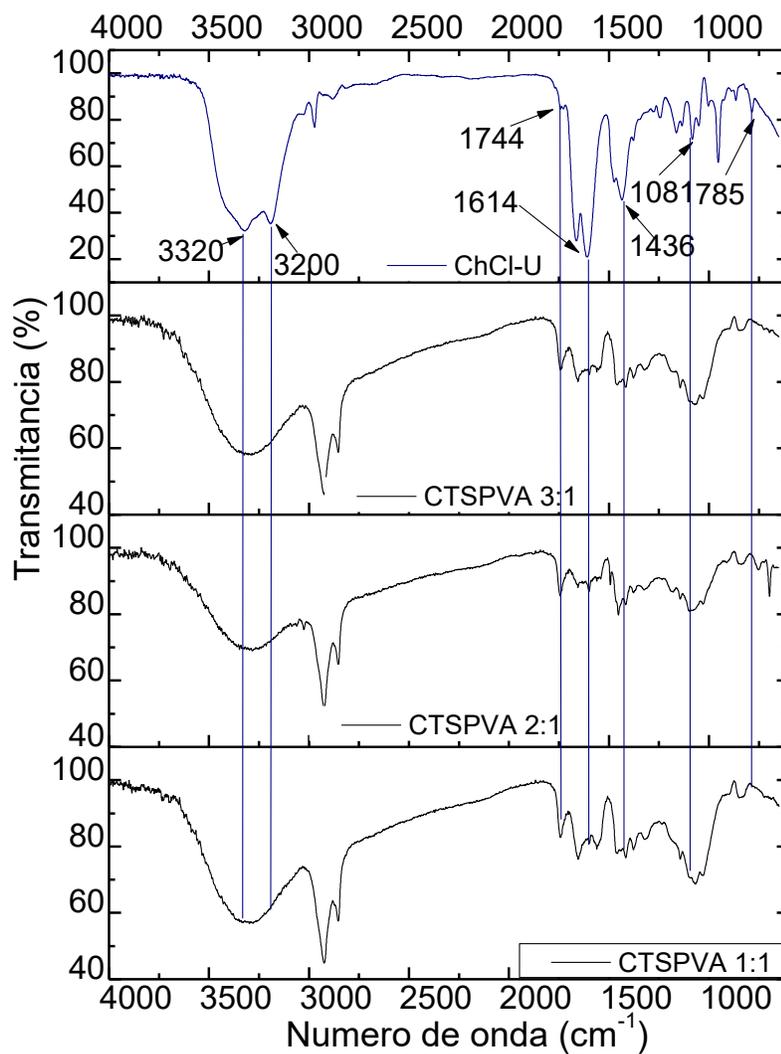


Figura 25. Espectros de FTIR de los materiales CTSPVA 3:1, 2:1 y 1:1, y del DES ChCl:U.

7.3 PELÍCULAS POROSAS DE CTS/CS

7.3.1 CTS/CS 1:1

En la Figura 26A se muestra la apariencia macroscópica de la película obtenida a partir de la combinación CTS/CS, después de la neutralización dichas películas poseen una apariencia distinta a las obtenidas de CTS solo (Figura 11B), son de color ligeramente amarillento, con aspecto brillante y lisa. Se lograron obtener películas completas siendo un poco más gruesas de la orilla. Macroscópicamente poseen una apariencia similar a las películas de CTSPVA, la diferencia principal es que en esta combinación si hubo formación de poros lo cual se evidencia en las Figuras 26B y C. Se muestran una superficie irregular, con apariencia de esponja y con la presencia de poros interconectados de tamaño aproximado de $0.0922 \mu\text{m}$.

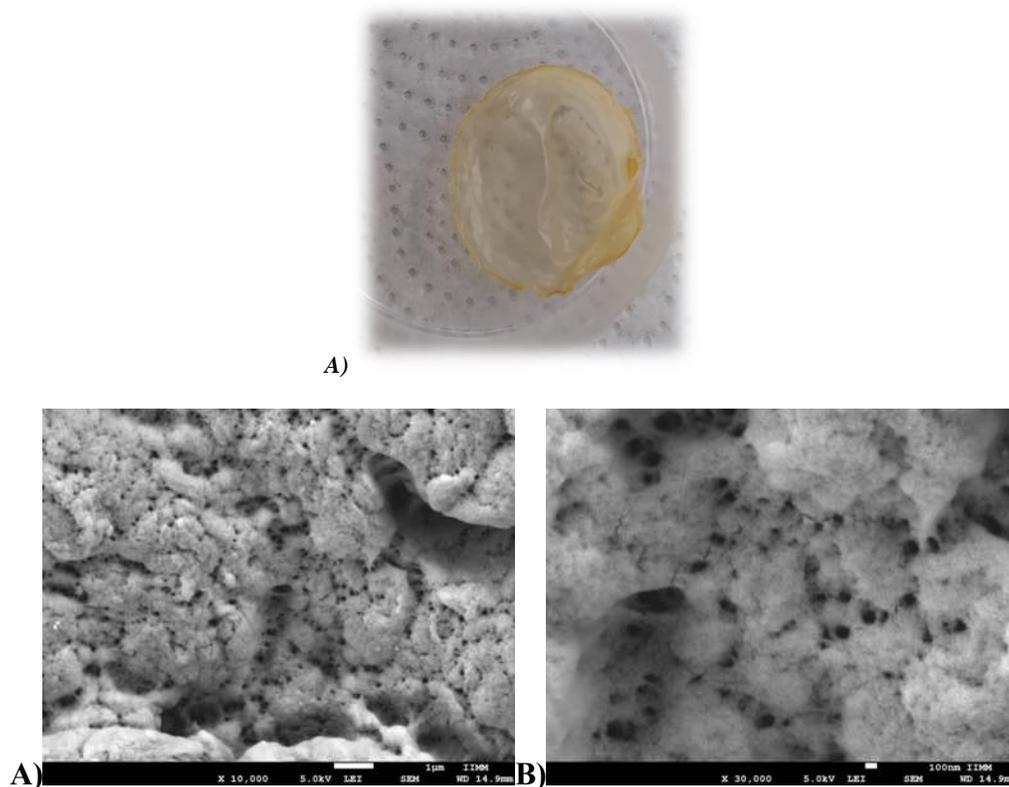


Figura 26. A) película CTSCS 1:1. Microestructura SEM del material a B) 10,000x y C) 30,000x respectivamente.

En la Figura 27, se muestra el histograma de la distribución de tamaño de poro en la cual se observa que, de 200 poros analizados, al menos 120 tienen una apertura de poro de entre 0.05 a 0.15 μm , con un mínimo de 0.032 μm y un máximo de 0.269 μm . Además el tamaño promedio de los poros es de 0.0922 μm con un error de ± 0.0021 μm . El análisis de la porosidad muestra que estos materiales poseen una estructura con características atractivas respecto a su porosidad, no obstante, se observa la presencia de poros de tamaño nanométrico, por lo que se propuso continuar con la metodología propuesta y aumentar la proporción de polímeros con respecto del DES con la finalidad de aumentar el tamaño de poro.

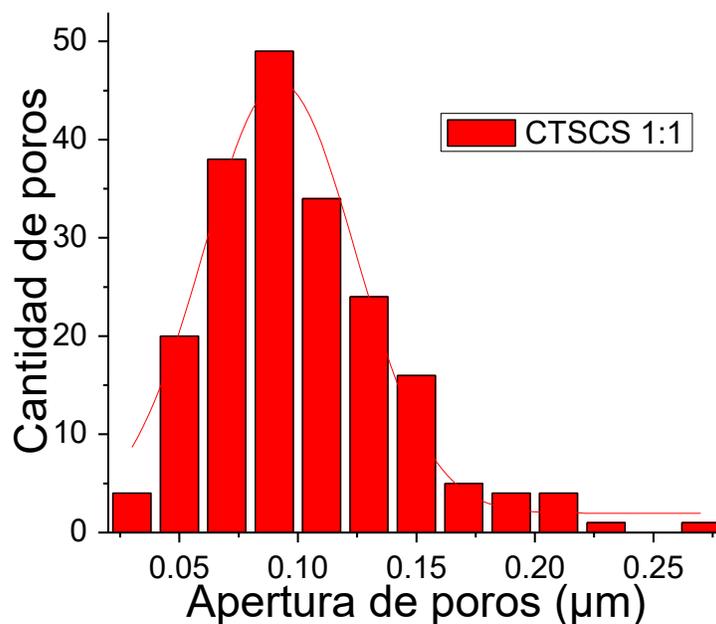


Figura 27. Histograma de distribución del tamaño de los poros de la película CTSCS 1:1 neutralizada.

Las pruebas de hinchamiento en agua destilada y en disolución de NaCl 0.9% p/v a temperatura ambiente de la película neutralizada arrojó la cinética mostrada en la Figura 28. Esta película es capaz de hincharse en agua hasta un 250 % de su peso inicial en los primeros 10 min, mientras que en NaCl 0.9% p/v se hincha paulatinamente hasta alcanzar su máximo a los 60 min. La apariencia de la película no cambia significativamente después

del hinchamiento, mantienen su estructura pero pueden fragmentarse si no se manipulan cuidadosamente.

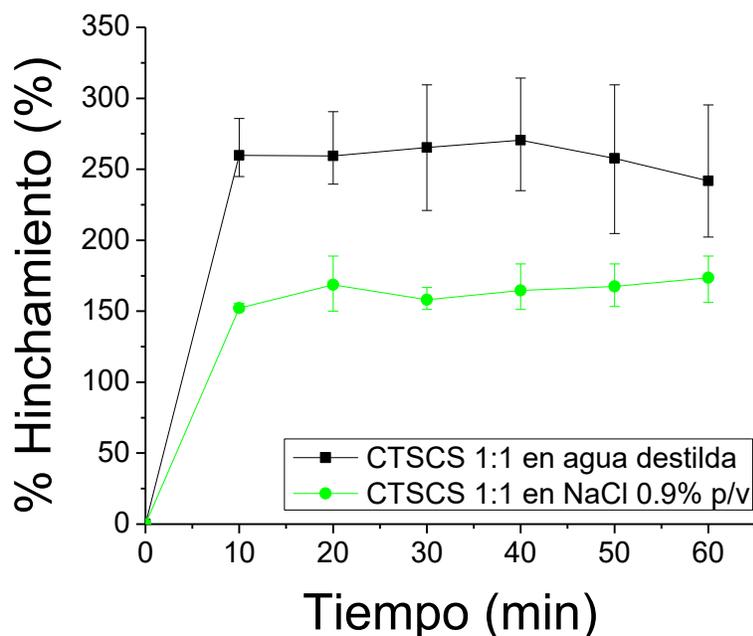


Figura 28. Cinética de hinchamiento de la película CTSCS 1:1 neutralizada con NaOH 0.5M en agua destilada y NaCl 0.9 % p/v.

7.3.2 CTS/CS 2:1

En la Figura 29A se muestra la apariencia macroscópica de la película obtenida a partir de la combinación CTS/CS 2:1. Resulta una película de color ligeramente amarillo, con aspecto brillante y lisa, se lograron obtener películas completas siendo un poco más gruesas de la orilla. La microestructura porosa se evidencia en las Figuras 29B y C. Se observa una superficie más densa respecto de las películas CTS/CS 1:1, además de que los poros presentes en esta película disminuyen considerablemente en cantidad y tamaño. Esto podría asociarse a que posiblemente el DES no se incorporó adecuadamente al momento de hacer permitiendo la precipitación continua de los polímeros en algunas zonas de la película.

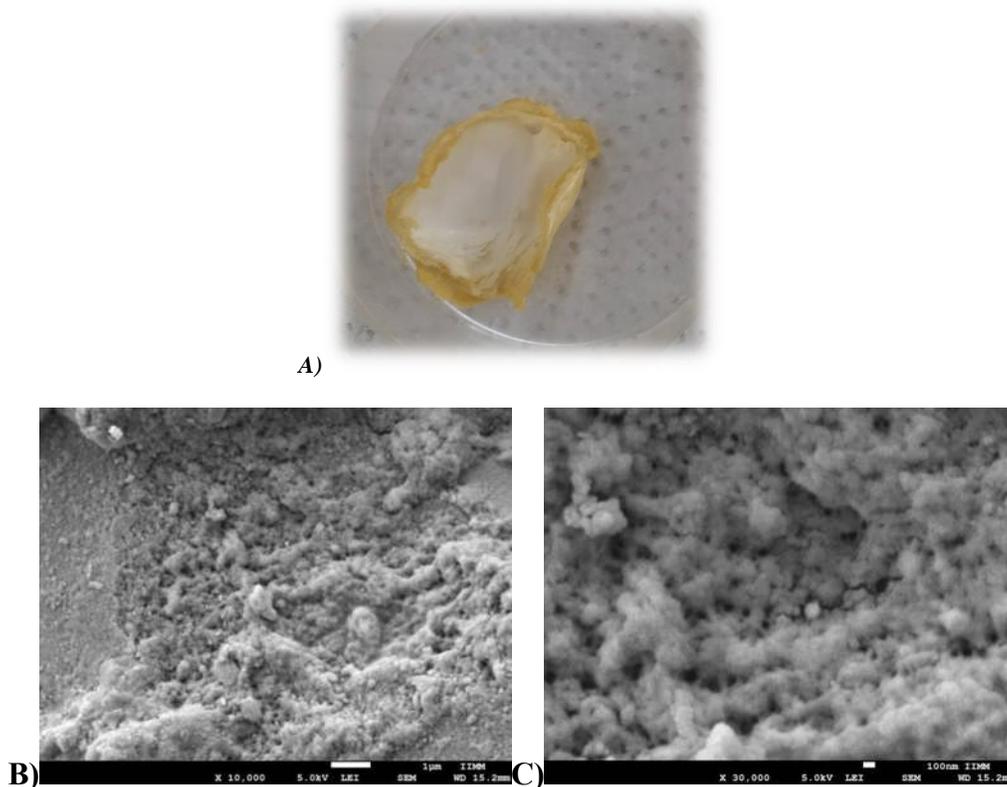


Figura 29. A) Imagen del material CTSCS 2:1. Microestructura SEM del material a B) 10,000x y C) 30,000x respectivamente.

En la Figura 30 se muestra la distribución del tamaño de poro; de 100 poros medidos, aproximadamente 60 tienen una apertura de poro menor a 50 nm, con un mínimo de 17.41 nm y un máximo de 301.11 nm, con un tamaño promedio de los poros es de 239.53 nm con un error de ± 18.95 nm. Los poros presentes en esta película son de tamaño considerablemente más grandes que los presentes en la película CTSCS 1:1, no obstante, la producción de poros se vio disminuida.

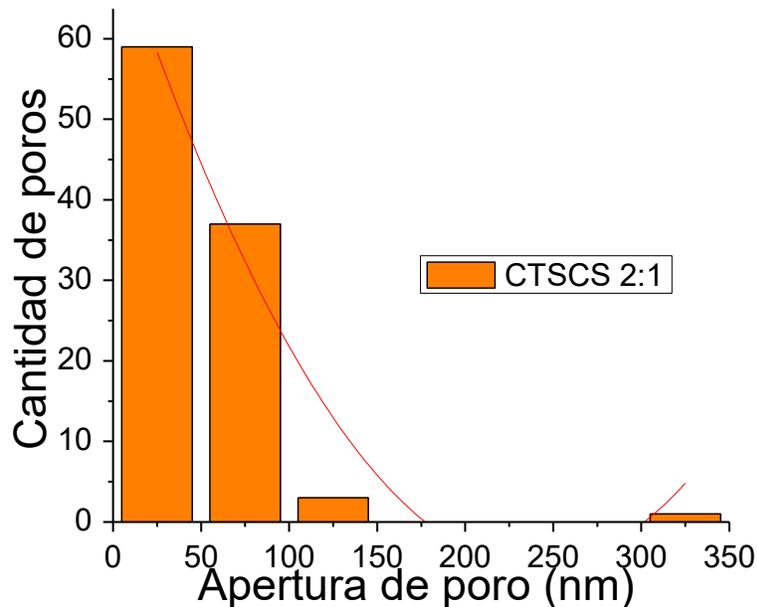


Figura 30. Histograma de distribución del tamaño de los poros de la película CTSCS 2:1 neutralizada.

Mediante las pruebas de hinchamiento realizadas a temperatura ambiente en agua destilada y en disolución de NaCl 0.9 % p/v (Figura 31), se puede observar que la película es capaz de hincharse hasta en un 320 % de su peso inicial, alcanzando el máximo en los primeros 20 min, mientras que en NaCl 0.9 % p/v alcanza hasta un 240 % de su peso inicial, en comparación con las películas CTS/CS 1:1 el porcentaje de hinchamiento de estas es superior. Es fácil de manipular al no romperse ni deshacerse, teniendo un comportamiento similar en ambos medios. La película conserva sus características macroscópicas estructurales al hincharse.

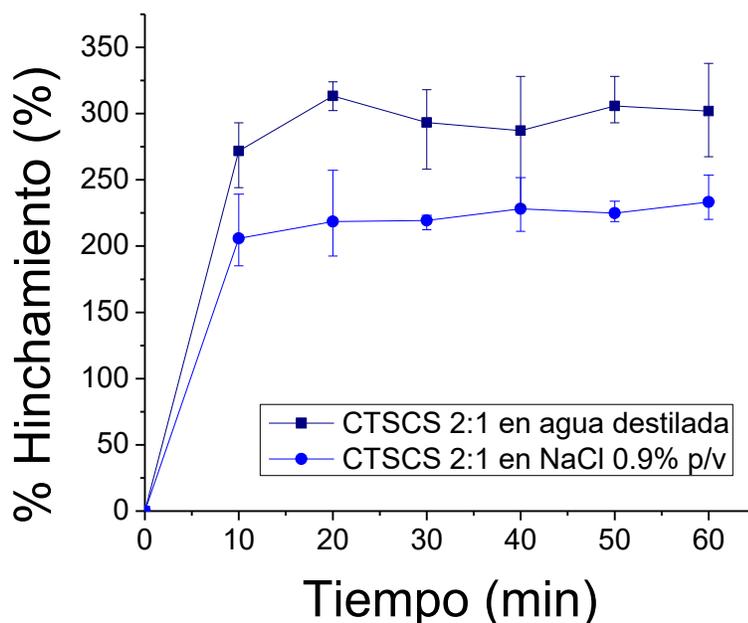


Figura 31. Cinética de hinchamiento de la película CTSCS 2:1 neutralizada con NaOH 0.5M en agua destilada y NaCl 0.9 % p/v.

7.3.3 CTS/CS 3:1

La estructura macroscópica de la película obtenida a partir de la combinación CTS/CS 3:1 se muestra en la Figura 32A. Se obtiene una película de color ligeramente amarillo, con aspecto brillante y lisa, y se lograron obtener películas completas. La formación de una estructura porosa se evidencia en las imágenes FESEM de las Figuras 32B y C. Se aprecia una superficie rugosa con apariencia de esponja con un aumento evidente en la cantidad de poros respecto de las películas CTS/CS 1:1 y 2:1. Esto puede atribuirse al aumento en la proporción de la mezcla de polímeros respecto al DES. Posiblemente, en esta mezcla las cadenas poliméricas interaccionan fuertemente entre ellas dando lugar a una red densa, la cual permite interaccionar con el DES favorablemente encapsulándolo como pequeñas burbujas y dando como resultado la formación de pequeños poros al extraerlo del sistema.

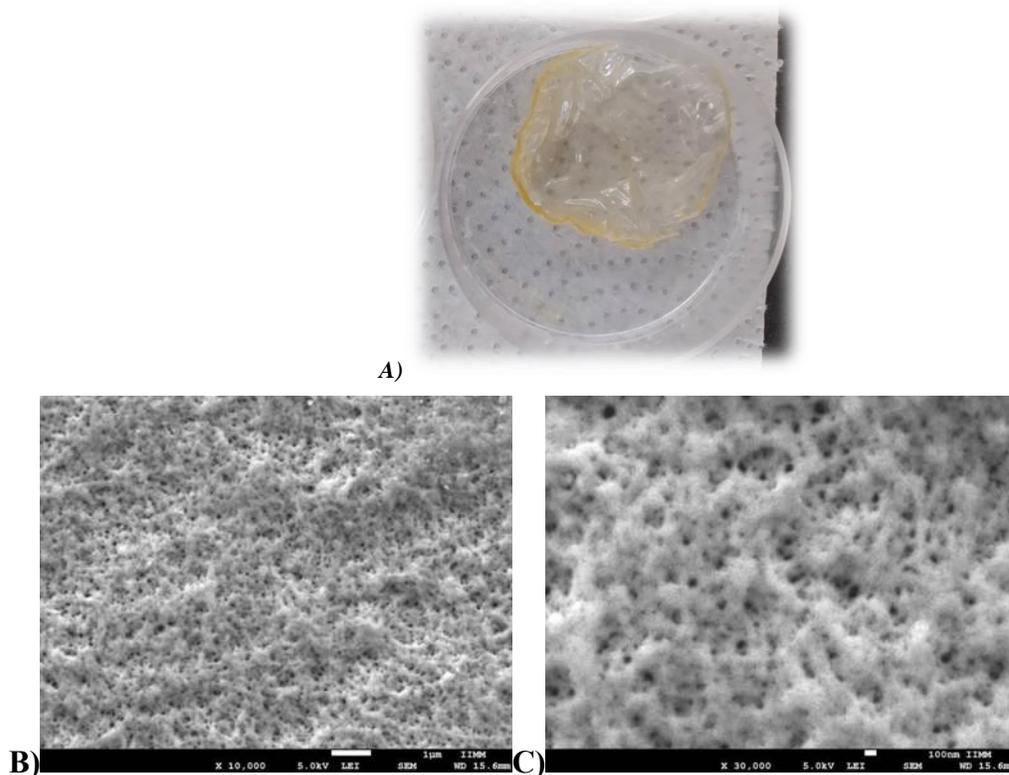


Figura 32. A) Película del material CTSCS 3:1. Microestructura SEM del material a B) 10,000x y C) 30,000x respectivamente.

El histograma de distribución de tamaño de poro se muestra en la Figura 33; de 500 poros medidos, un aproximado de 200 poros tienen una apertura de poro de $0.5 \mu\text{m}$, con un mínimo de $0.02 \mu\text{m}$ y un máximo de $0.255 \mu\text{m}$, y un tamaño promedio de $0.0596 \mu\text{m}$, con un error de $\pm 0.0012 \mu\text{m}$.

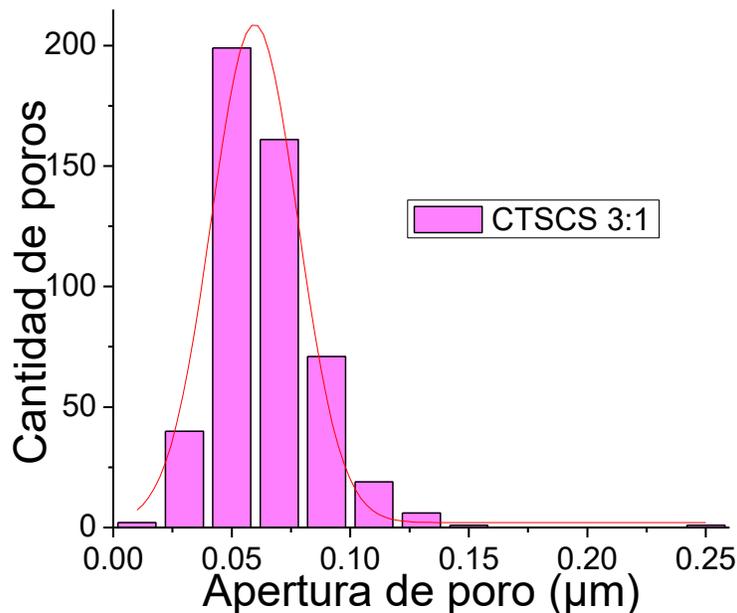


Figura 33. Histograma de distribución del tamaño de los poros de la película CTSCS 3:1 neutralizada.

Mediante las pruebas de hinchamiento realizadas a temperatura ambiente en agua destilada y en disolución de NaCl 0.9% p/v, se determinó que las películas son estables y de fácil manipulación al no romperse ni deshacerse. Como se puede observar en la Figura 34, la película es capaz de hincharse hasta en un 450 % de su peso inicial en agua, mientras que en la disolución de NaCl 0.9% p/v, el porcentaje de hinchamiento es menor llegando a alcanzar el 300 % de su peso inicial. Esta combinación presenta el mayor porcentaje de hinchamiento en comparación con las películas CTS/CS 1:1 y 2:1 ya que el aumento de la cantidad de poros interconectados puede favorecer la retención del agua. Este material posee un hinchamiento 2.5 veces mayor al reportado en películas de colecciones de nanofibras de CGPVACS [93].

Los resultados obtenidos con los materiales CTSCS 1:1, 2:1 y 3:1, hacen que esta combinación de polímeros sea atractiva para ser utilizados como andamios celulares en ingeniería de tejidos ya que se genera una estructura altamente porosa con alta relación área/superficial volumen.

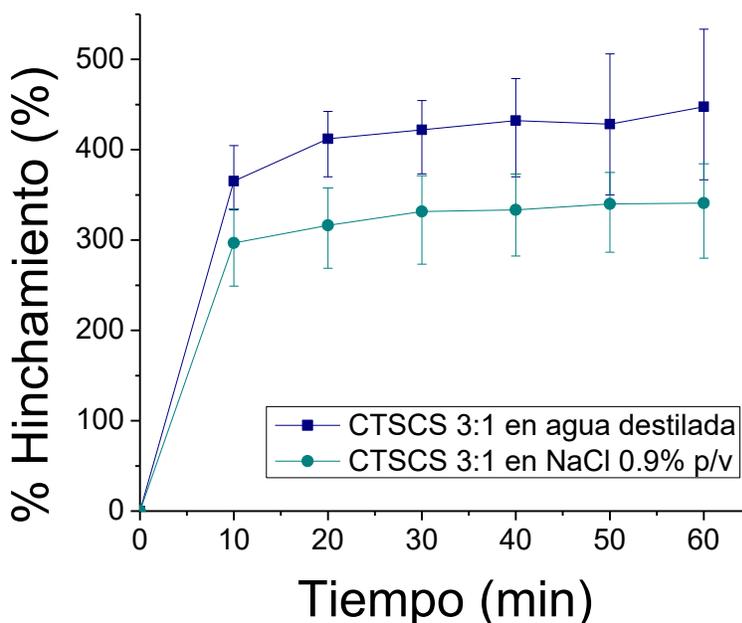
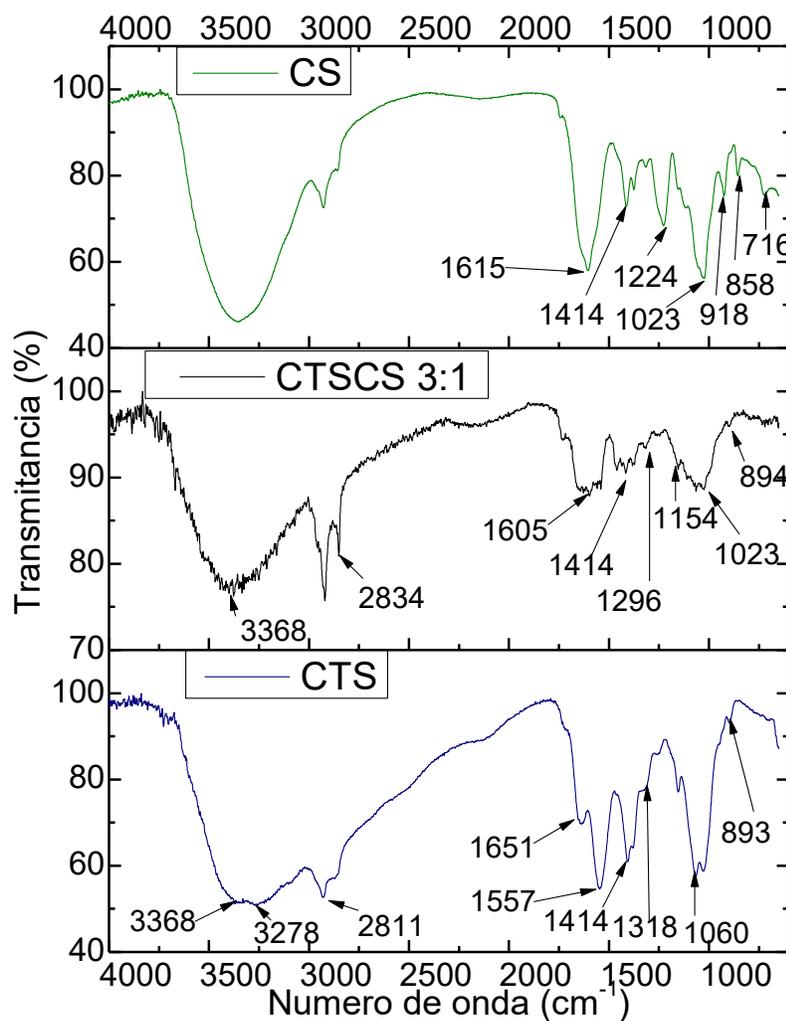


Figura 34. Cinética de hinchamiento de la película CTSCS 2:1 neutralizada con NaOH 0.5M en agua destilada y NaCl 0.9 % p/v.

En la Figura 35 se muestra la comparación de espectro de FTIR del CTS en forma de película, del CS y de la película de CTSCS 3:1. Entre las vibraciones características del CS se encuentran el estiramiento de los grupos C-O en 1023 cm^{-1} , en 1224 cm^{-1} se aprecia la señal característica del estiramiento del enlace S=O del grupo sulfónico del N-acetyl-D-galactosamina, en 1615 cm^{-1} y 1414 cm^{-1} las vibraciones del grupo COOH, y las vibraciones en 918 cm^{-1} , 858 cm^{-1} y 716 cm^{-1} asociadas a la posición del grupo S=O [96,97]. En el espectro FTIR de la película CTSCS 3:1 se observan cambios en la intensidad de las vibraciones de los grupos amino a 3368 cm^{-1} , así como en 2834 cm^{-1} de los grupos C-H del CTS, esto podría atribuirse a la interacción entre los polímeros por medio de puentes de hidrógeno. Por otro lado, se puede observar un ensanchamiento en la vibración en 1605 cm^{-1} , y una disminución en la intensidad de la vibración en 1557 cm^{-1} que puede atribuirse a las interacciones químicas de los grupos NH_2 y OH de ambos polímeros. De la misma manera, en 1023 cm^{-1} se puede observar una notoria disminución en la intensidad esta vibración en la película CTSCS 3:1, la cual puede estar relacionada con la formación de enlaces por puente de hidrógeno entre los grupos C-O del CTS y del CS. El

espectro de la película CTSCS 3:1 no presenta similitud mayor con el de alguno de los componentes puros, esto podría asociarse a que ambos polímeros interactúan de manera similar con el DES.



Gráfica 35. Espectros de FTIR del material CTSCS 3:1, así como los espectros correspondientes del CTS y CS.

En la Figura 36 se muestra la comparación de los espectros FTIR del ChCl:U y de las películas CTSCS 1:1, 2:1 y 3:1. Se puede apreciar la presencia del DES en la matriz polimérica por la presencia de la vibración característica de este en 1744 cm^{-1} . En la película CTSPVA 1:1 se puede observar un aumento de la intensidad en la vibración en la región $3500\text{ a }3000\text{ cm}^{-1}$ posiblemente asociado a una mayor proporción de DES en la matriz polimérica. En las películas CTSCS 2:1 y 3:1 se puede apreciar un aumento en la intensidad de las vibraciones en 1614 cm^{-1} , 1436 cm^{-1} provenientes del ChCl:U. La presencia de DES remanente en las películas no representa un problema, ya que como se ha mencionado, el ChCl:U es un disolvente orgánico no tóxico, el cual no interfiere en las propiedades del material como andamio celular, más aún, puede aumentar la conductividad térmica del material y hacer la función de agente plastificante [86].

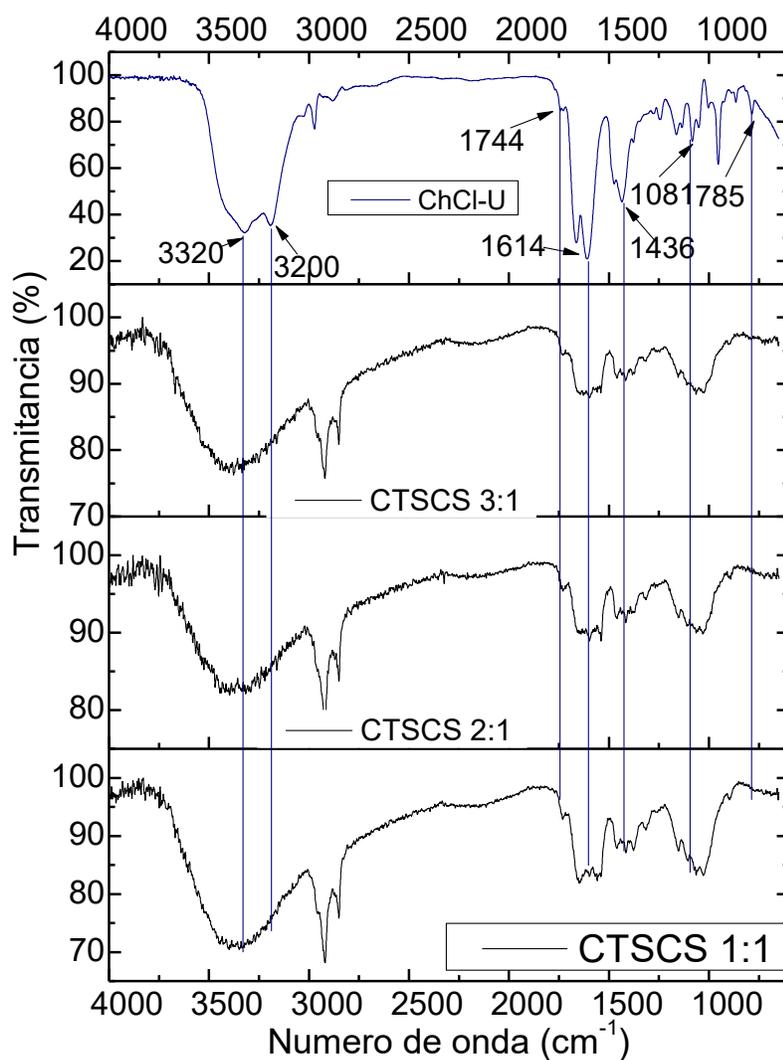


Figura 36. Espectros de FTIR de los materiales CTSCS 3:1, 2:1 y 1:1, y del ChCl:U.

7.4 PELÍCULAS POROSAS DE CTS/PVA/CG

7.4.1 CTS/PVA/CG 1:1 y CTS/PVACG 1:2

A partir de la incorporación de mezclas de polímeros tricomponente la interacción con el DES puede no favorecerse y complicar el proceso EIPS, tal y como se muestra en la Figura 37A, ya que la mezcla de los polímeros CTS/PVA/CG 1:1 no se incorporó adecuadamente con el DES, por lo que no es posible la formación del material en forma de película. Para analizar el comportamiento de esta mezcla de polímeros durante su procesamiento por la técnica EIPS, se decidió probar el aumento de la proporción de DES con respecto de la mezcla de polímeros. No obstante, como se muestra en la Figura 37B, el aumento de DES en el sistema no favorece la formación de películas en esta mezcla polimérica.

Posiblemente, las cadenas poliméricas al encontrarse en forma de mezcla tricomponente no permite que interaccionen entre ellas. Adicionalmente, al momento de la evaporación del solvente, los polímeros no precipitan y son arrastrados por el metanol. Por esta razón, estas combinaciones se descartaron totalmente al no poder recuperar los polímeros.

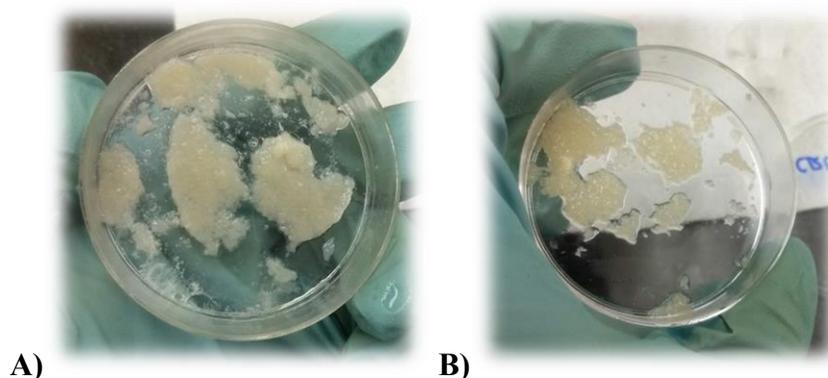


Figura 37. A) Película CTSCGPVA 1:1 durante los lavados con metanol. B) Película CTSPVACG 1:2 durante los lavados con metanol.

7.4.2 CTS/PVA/CG 2:1

El aumento en la proporción de polímeros en estas mezclas con respecto del DES favoreció la formación de películas, obteniendo piezas pequeñas. En la Figura 38A se muestra una fotografía del material obtenido, de color ligeramente amarillento opaco con apariencia macroscópica porosa similar a las películas de CTS puro (Figura 11B). Con base en su apariencia macroscópica se esperaba una porosidad elevada, no obstante, como se muestra en las Figuras 38A y B las imágenes FESEM del material presentan una superficie irregular rugosa, con presencia de poros aislados de tamaño variable, siendo la superficie en su mayoría densa.

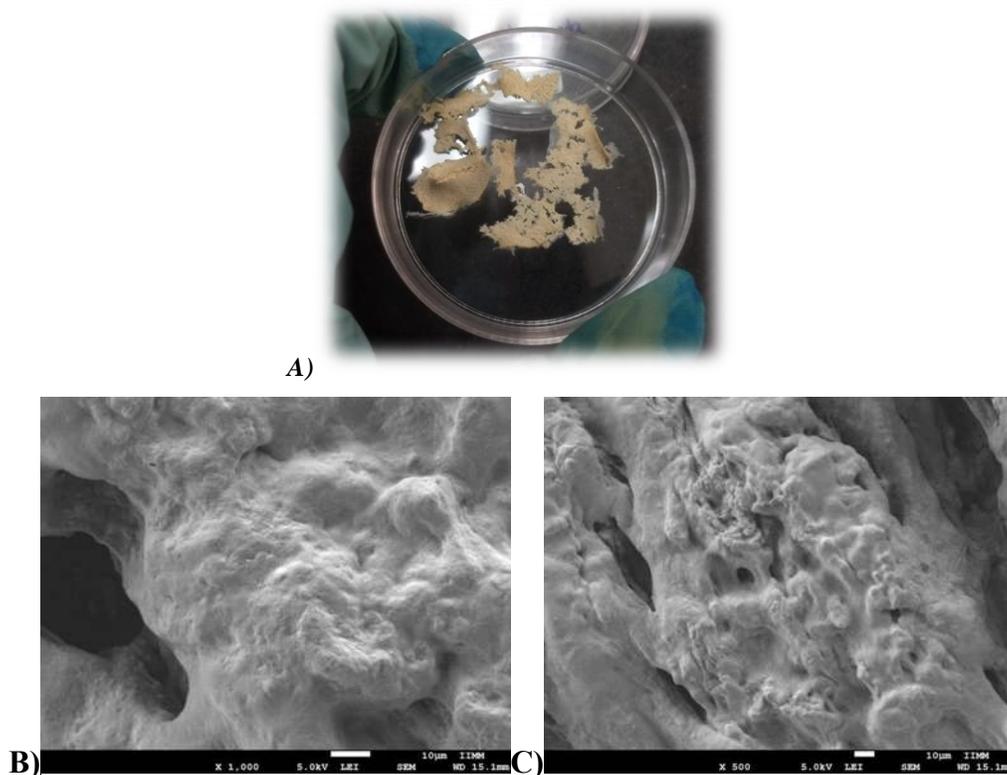
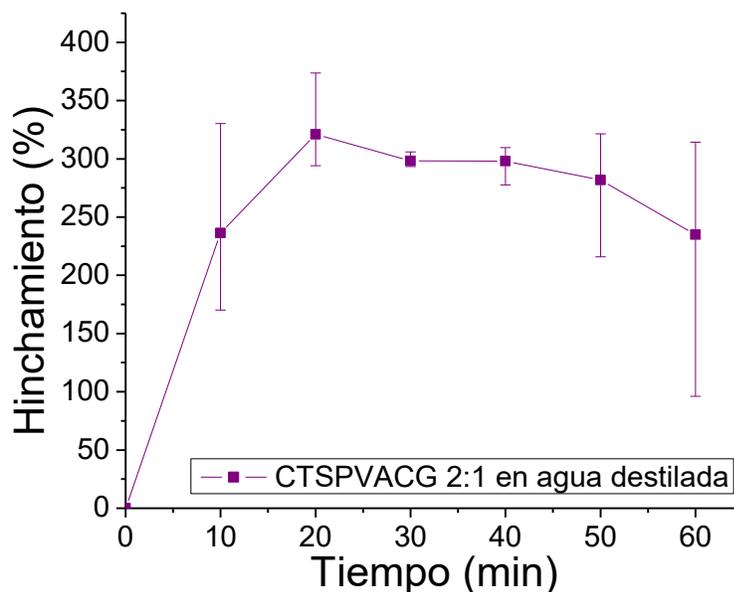


Figura38. A) Imagen del material CTS/PVA/CG 2:1. Microestructura SEM del material a B) 1000x y C) 500x respectivamente

De la cinética de hinchamiento (Figura 39) se puede observar que la película es capaz de hincharse hasta en un 340 % de su peso inicial en agua destilada, se observó que las películas alcanzan su máximo en los primeros 20 min, pero desafortunadamente se desintegran con el paso del tiempo siendo muy complicado el trabajar con ellas y no se

logra recuperar la película. Esto podría atribuirse a que los polímeros no interaccionan entre ellos para formar la matriz polimérica, lo que permite su redisolución en el agua.



Gráfica 39. Cinética de hinchamiento de la película CTSPVACG 2:1 neutralizada con NaOH 0.5M en agua destilada.

7.4.3 CTS/PVA/CG 3:1

La ejecución de la técnica EIPS en la mezcla tricomponente CTS/PVA/CG genera películas con la apariencia macroscópica mostrada en la Figura 40A, obteniendo un material de color ligeramente amarillo opaco; no fue posible obtener películas completas solo fragmentos de ellas. El aumento en la proporción de polímeros con respecto del DES favorece la formación de la película, pero aun así no se logra la obtención de piezas completas. La microestructura de estos materiales presenta una superficie completamente densa e irregular, con la presencia de una cantidad limitada de poros aislados (Figuras 40B

y C). Esto se debe posiblemente a que las interacciones iónicas entre biopolímeros/DES no permiten la separación entre las cadenas poliméricas.

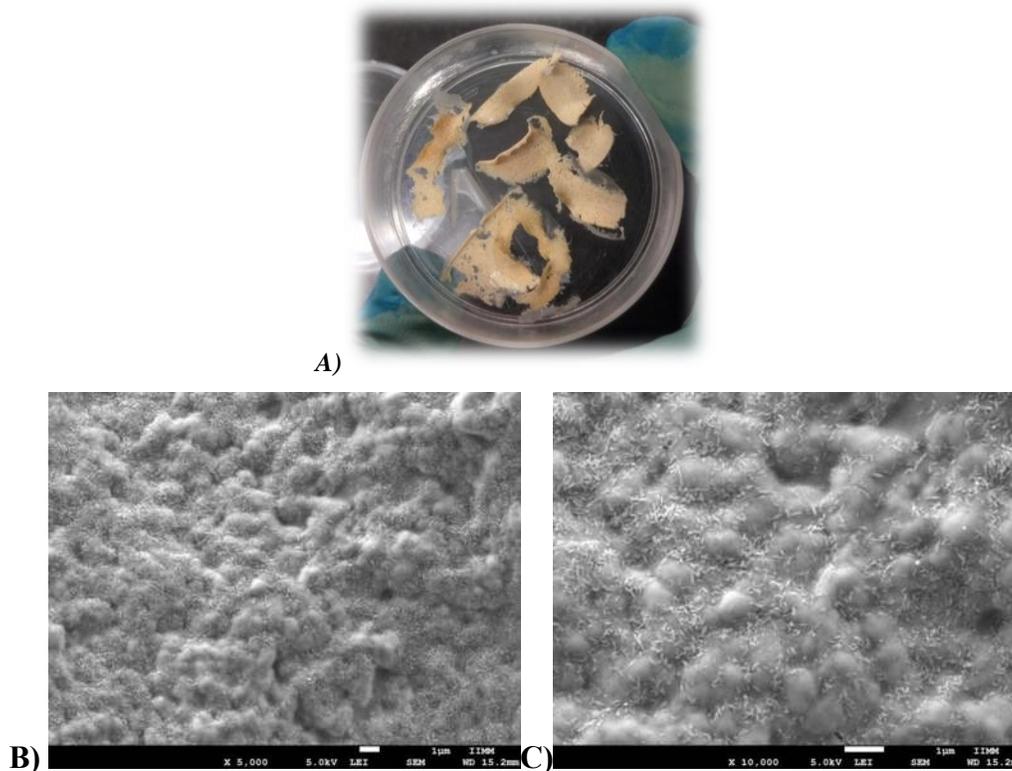
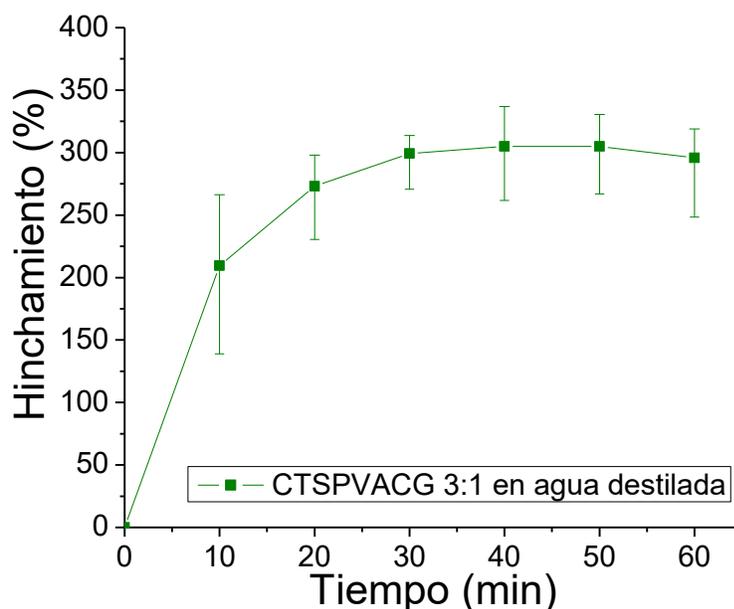


Figura 40. A) Imagen del material CTS/PVA/CG 3:1. Microestructura SEM del material a B) 5000x y C) 10,000x respectivamente.

A partir de la cinética de hinchamiento de este material (Figura 41) se muestra que la película es capaz de hincharse hasta en un 300 % de su peso inicial en agua destilada, alcanzando su máximo en los primeros 30 min de igual manera, estas películas se desintegran a partir de los 50 min, son de difícil manipulación y no se logran recuperar. Por lo anterior, la formación de película no es viable esta combinación de polímeros.



Gráfica 41. Cinética de hinchamiento de la película CTSPVACG 3:1 neutralizada con NaOH 0.5M en agua destilada.

La Figura 42 muestra la comparación del espectro de FTIR de CTS en forma de película, el CG, el PVA y la película de CTSPVACG 2:1. Desafortunadamente, no se logran apreciar claramente las señales posicionadas de 3500 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} por interferencias al momento del análisis. En la película CTSPVACG 2:1 se observa la vibración en 1744 cm^{-1} muy característica del PVA. Por otro lado, se pueden apreciar cambios significativos en la intensidad y posición de varias vibraciones, entre ellas un ensanchamiento en 1658 cm^{-1} que podría ser atribuido a las interacciones químicas de los grupos C-O de los tres polímeros; así como un aumento en la intensidad de la vibración en 1556 cm^{-1} por la formación de puentes de hidrógeno de los grupos NH_2 del CG y el CTS. Por último, se puede observar un desplazamiento en la vibración en 1098 cm^{-1} por la interacción de los grupos acetilo, la cual cambia de 1060 cm^{-1} hasta 1098 cm^{-1} .

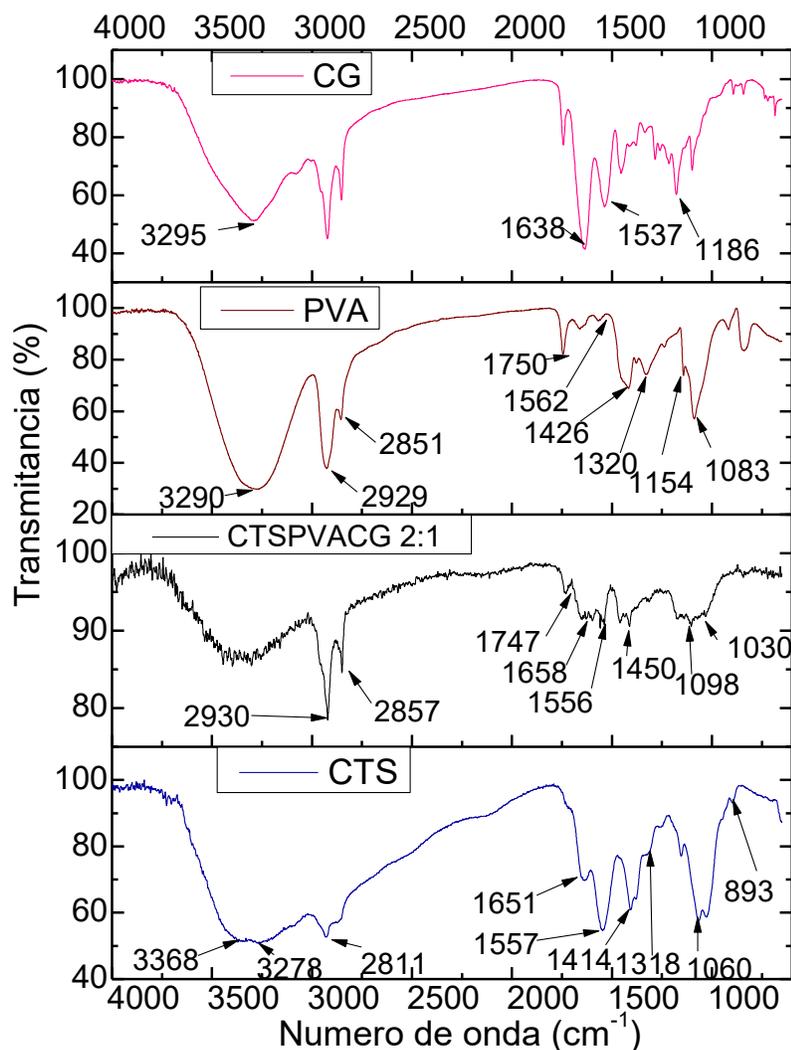


Figura 42. Espectros de FTIR del material CTPVACGS 3:1, y de CTS, CG y PVA puros.

En la Figura 43 se muestra la comparación de los espectros FTIR del ChCl:U y de las películas CTSPVACG 2:1 y 3:1, en la cual se pueden apreciar en ambas películas el aumento en la intensidad de la vibración característica del DES en 1744 cm^{-1} , lo que puede indicar que el DES está interactuando con la mezcla de los polímeros. En la película CTSPVACG 3:1 se puede apreciar el aumento de la intensidad en las vibraciones en 1436 cm^{-1} y 1081 cm^{-1} , esto puede deberse a una mayor cantidad de DES dentro de la matriz polimérica.

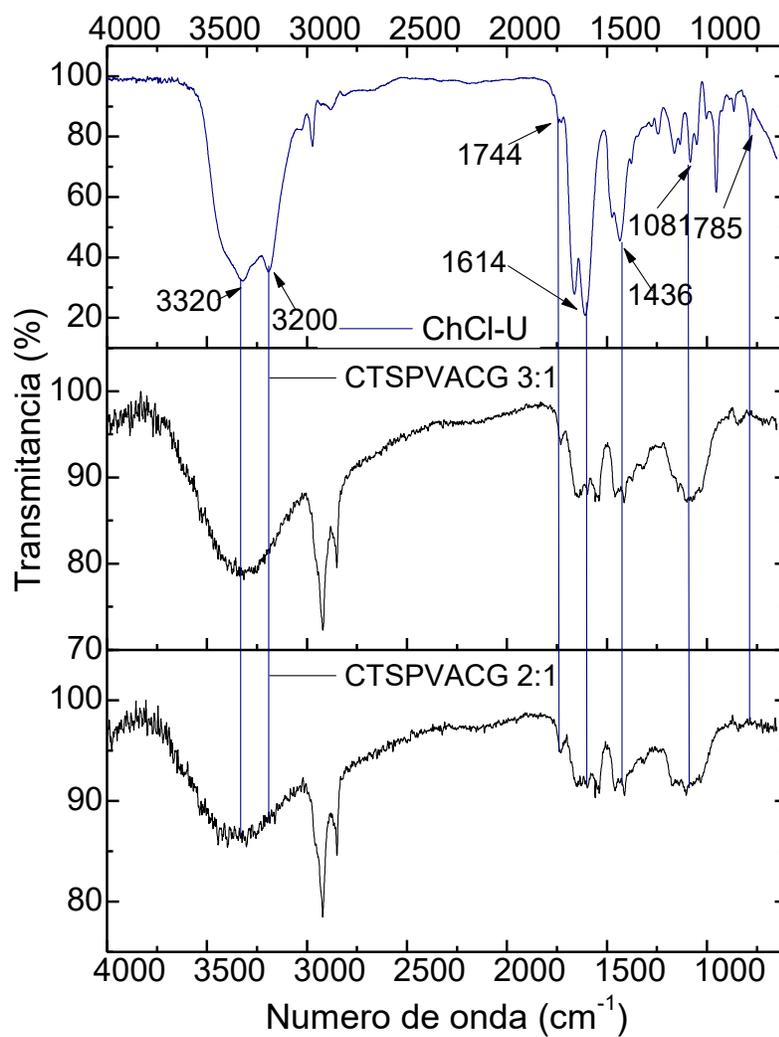


Figura 43. Espectros de FTIR de los materiales CTSPVACG 3:1, 2:1 y 1:1, y del DES ChCl:U.

7.5 PELÍCULAS POROSAS DE PVA/CG

7.5.1 PVACG 1:1 y 3:1

Finalmente, se probó la combinación PVA/CG, iniciando con una proporción 1:1 para la ejecución de la técnica EIPS para la fabricación de películas porosas. En esta mezcla se pudo observar que los polímeros no se incorporaron correctamente por lo que no se logró la formación de una película. Al momento de realizar los lavados con metanol para extraer el DES, la mezcla de polímeros también es arrastrada por el metanol formando una especie de coágulo como se puede observar en la Figura 44A.

Por otro lado, al aumentar la proporción de la mezcla polimérica, en las películas PVA/CG 3:1 se presentó una visible segregación de modo que solo se lograron recuperar los bordes (Figura 44B). Por lo tanto, ambas combinaciones se descartaron totalmente al no obtener películas y perder los materiales en el proceso.

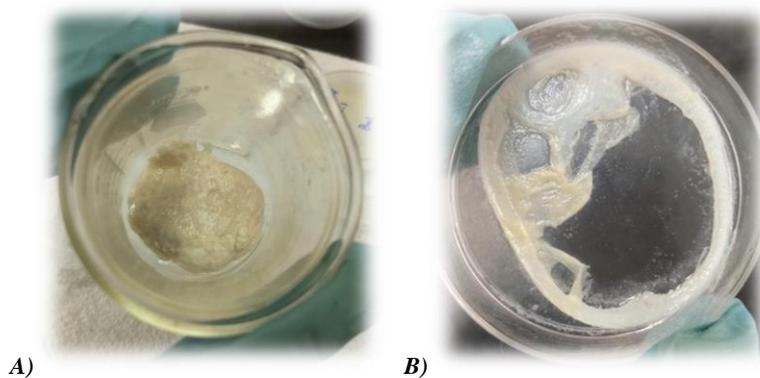


Figura 44. A) Película PVACG 1:1 B) Película PVACG 3:1

7.5.2 PVACG 2:1

En la Figura 45 se muestra una fotografía de la película obtenida una vez procesada la mezcla PVA/CG 2:1 mediante la técnica EIPS, se observa la obtención de una película de color blanquecino, lo que sugiere presencia de porosidad. No obstante, tal y como se observa en las Figuras 45B y C, la microestructura consta de una superficie totalmente irregular, densa sin la presencia aparente de poros en la superficie.

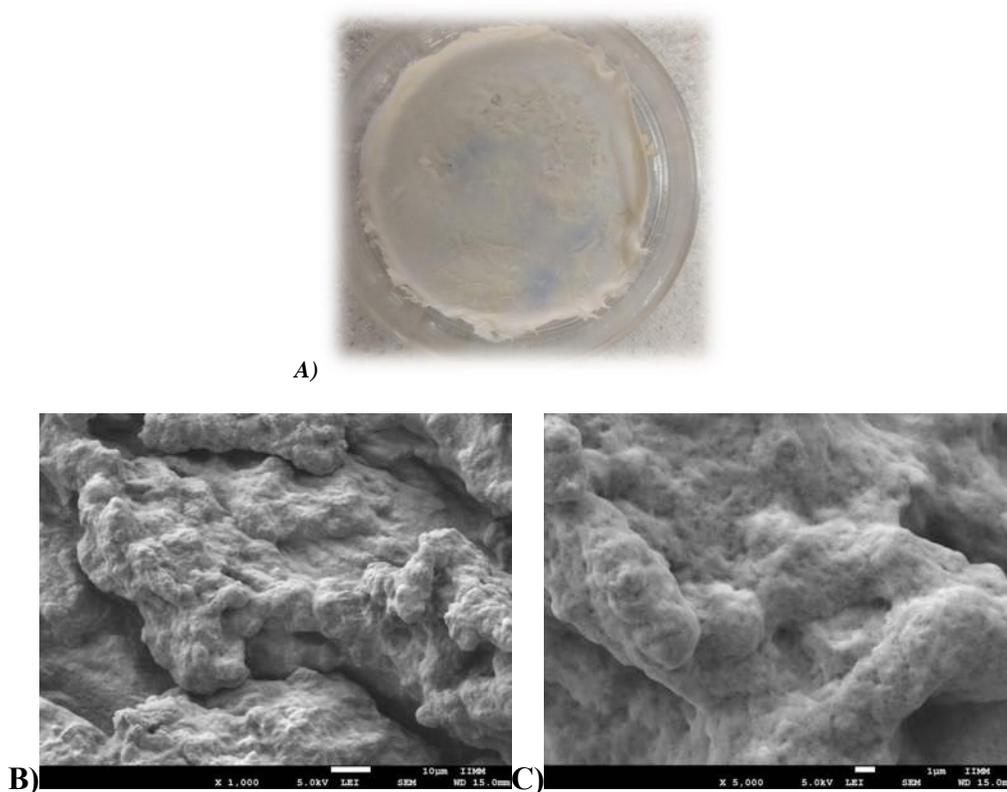


Figura 45. A) Imagen del material PVA/CG 2:1. Microestructura SEM del material a B) 1000x y C) 5000x respectivamente.

Durante las pruebas de hinchamiento (Figura 46) se observó que la película es capaz de hincharse hasta en un 550 % de su peso inicial en agua destilada, alcanzando su máximo en los primeros 10 min, posterior a ello comienza a desintegrarse rápidamente. Por estas razones, esta combinación se descartó al no obtener poros y por no poder recuperar el material en el proceso.

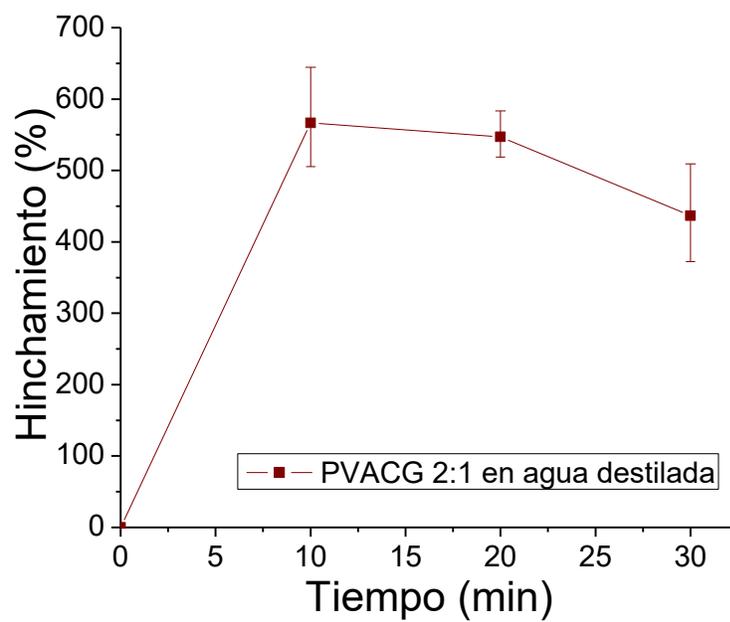


Figura 46. Cinética de hinchamiento de la película PVACG 2:1 neutralizada con NaOH 0.5M en agua destilada.

8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación se estudió la síntesis y caracterización estructural de películas porosas de quitosano (CTS), colágeno (CG), alcohol polivinílico (PVA) y sulfato de condroitina (CS) con potencial aplicación en ingeniería de tejidos. Con base en el análisis mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM), espectroscopía de infrarrojo (FTIR), determinación de tamaño de poro y pruebas de hinchamiento se puede concluir lo siguiente:

- En la mezcla de polímeros CTS/CG, la proporción 3:1 presenta una buena interacción entre ambos polímeros lo que favorece la obtención de una matriz polimérica uniforme que permite la difusión del agente porógeno (DES) dentro de la red polimérica para la correcta formación de poros, generando una película porosa estable en agua destilada por un lapso mínimo de 30 días, y poros interconectados con un tamaño promedio de 130 μ m. Estas características son adecuadas para la aplicación propuesta en este proyecto.
- Empleando las mezclas CTS/PVA se facilita la obtención de películas como piezas completas y con la mayor flexibilidad de todas las combinaciones probadas, no obstante, dichos materiales tienen nula presencia de poros, lo que sugiere es debido a la precipitación inadecuada de los polímeros. Por ello, para la aplicación que se pretende para estos materiales no son de gran utilidad.
- La combinación CTS/CS en proporción 3:1 resulto adecuada para su procesamiento mediante la técnica EIPS, generando películas porosas con las características prometedoras para su posible aplicación como andamio celular, teniendo una porosidad similar a la película CTSCG 3:1. Se necesita trabajar en

la técnica para lograr obtener poros más grandes, dejándose como perspectiva para trabajos futuros.

- Las mezclas tricomponente: CTSPVACG y PVACG fueron descartadas al no ser posible la formación de películas y solo poder recuperar fragmentos de los polímeros, adicionalmente en estas combinaciones no hubo formación de poros. Lo anterior, se atribuye a una baja interacción entre los componentes, lo cual no favorece la precipitación de una matriz homogénea y genera la pérdida de los componentes durante el proceso de extracción con metanol.

Basado en los resultados anteriores se puede concluir que la metodología EIPS es una técnica versátil que permite el procesamiento de mezclas poliméricas bicomponente. No obstante, es necesario que los componentes interaccionen a nivel molecular para favorecer la formación la precipitación homogénea de la matriz y para inducir el encapsulamiento del agente porógeno (DES) y por ende, la formación de porosidad. La metodología EIPS empleando DES como agente porógeno para la síntesis de materiales porosos es una alternativa ecológica altamente efectiva, al ser una metodología simple de aplicar, versátil y más económica que otras metodologías comúnmente aplicadas.

PERSPECTIVAS

- Implementar el uso de otros DES en la metodología EIPS, con la finalidad de analizar si el mecanismo de formación de poros es afectado por el DES.
- Analizar diferentes condiciones en la mezcla CTSCS para la obtención de poros de mayor tamaño.
- Considerar otras mezclas de polímeros para la generación de películas porosas empleando la metodología EIPS, para analizar si el mecanismo de formación de poros es afectado por la naturaleza de las mezclas.
- Probar las películas porosas generadas en este trabajo de tesis como andamios celulares, mediante el cultivo de distintas células.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European spine journal*, 17(4), 467-479.
- [2] Sabino, M. A., Loaiza, M., Dernowsek, J., Rezende, R., & Da Silva, J. V. (2017). Técnicas para la fabricación de andamios poliméricos con aplicaciones en ingeniería de tejidos (techniques for manufacturing polymer scaffolds with potential applications in tissue engineering). *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 37(2), 120-146.
- [3] Vallet, M. (2006). Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos. Informe científico. Madrid, España. Universidad de Complutense.
- [4] Abraham, G.; Coracciolo, P.; Buffa, F. & Cuadrado, T. (2017). Diseño y preparación de matrices poliméricas porosas para ingeniería de tejidos biológicos. *Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Buenos Aires*, 59, 12-2017, 115-130.
- [5] Corsello, F.; Peruzzo, P. & Amalvy, J. (2015). Preparación y caracterización de películas de quitosano modificadas con nano cristales de celulosa. INIFTA: Universidad Nacional de la Plata.
- [6] Osorio, M., Henao, L., Velásquez, J., Cañas, A., Restrepo, L., Gañán-Rojo, F., & Castro, I. (2017). *Biomedical applications of polymeric biomaterials*. *Dyna*, 84(201), 241-252.
- [7] Armelin, E. (2002). Síntesis y caracterización de nuevas poliésteramidas: estudio de sus propiedades. Tesis Doctoral. Barcelona, España. Universidad Politécnica de Cataluña.
- [8] Santos, F. A., Ochoa, D., & García, A. G. (2011). Actualización de la eficacia de condroitín sulfato y sulfato de glucosamina en el tratamiento de la artrosis. *Actualidad en farmacología y terapéutica*, 9(2), 97-108.

- [9] Fernández Dorta, Lilia (2016). Glucosamina y sulfato de condroitina en el tratamiento de la osteoartritis. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 47(2), 93-99.
- [10] Wilde, L, Raynauld, P., Martel, J., Beaulieu, A., Bessette, L., Morin, F., & Pelletier, J. (2011). Chondroitin sulphate reduces both cartilage volume loss and bone marrow lesions in knee osteoarthritis patients starting as early as 6 months after initiation of therapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study using MRI. *Annals of the rheumatic diseases*, 70(6), 982-989.
- [11] Paradossi, G., Cavalieri, F., Chiessi, E. et al. (2003). Poly(vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 14, 687–691.
- [12] Delgado-Rangel, L. H., Huerta-Saquero, A., Eufrazio-García, N., Meza-Villezas, A., Mota-Morales, J. D., & González-Campos, J. B. (2020). Deep eutectic solvent-assisted phase separation in chitosan solutions for the production of 3D monoliths and films with tailored porosities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 4084-4094.
- [13] Vidal Vides, C. (2013). Disolventes eutécticos profundos (DES, Deep Eutectic Solvents): nuevos disolventes biorenovables en catálisis homogénea mediada por metales de transición. Trabajo fin de máster, Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Universidad de Oviedo.
- [14] Alonso, D.; Baeza, A.; Chinchilla, R.; Gómez, C.; Guillena, G.; Maset, X.; Pastor, I.; Ramón, D.; Níguez, D. & Saavedra, B. (2018). Mezclas eutécticas como alternativa sostenible a los disolventes convencionales en Química Orgánica. *An. Quím.* 114 (2), 79-87.
- [15] HERRERA, L. A. C. (2017). Modificación superficial de andamios electrohilado de policaprolactona mediante plasma de aire para su uso potencial en ingeniería de tejidos (Doctoral dissertation, Centro de Investigación Científica de Yucatán). 7-11
- [16] Hernandez, C. F., Gonzales, R. G., Martinez, J. P., & Exposito, L. P. (2017). Obtención de andamios de colágeno para la restauración de tejido del miocardio. *Revista Cubana de Ingeniería*, 7(3) 12-24.
- [17] Sabino, M. A., Loaiza, M., Dernowsek, J., Rezende, R., & Da Silva, J. V. (2017). Andamios poliméricos con aplicaciones en ingeniería de tejidos (techniques for

- manufacturing polymer scaffolds with potential applications in tissue engineering). *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 120-146.
- [18] FLORES, MFLORES, J., DOMINGUEZ, M., & FLORES, M. (2015). Síntesis y caracterización de un biomaterial para su uso en ingeniería de tejidos de piel.
- [19] Heineken, F., Skalak, R. (1991). Tissue engineering: a brief overview. *Journal Biomechanical Engineering*, 113, 111-120.
- [20] Lasa, B. V., del Barrio, J. S. R., Bravo, A. L., & Ruiz, A. G. (2000). "Ingeniería de tejidos": contribución de los polímeros al desarrollo de los procesos de regeneración tisular. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (No. 1, pp. 5-18). Real Sociedad Española de Química.
- [21] Cortés, M. G. R., Díaz, B. M. V., & Perilla, J. E. (2008). Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. *Ingeniería e Investigación*, 28(1), 57-71.
- [22] Rosero, M. (2003). Estudio de los biomateriales para el desarrollo de endoprotesis. Tesis de grado, Ingeniería Mecánica y Mecatrónica, Universidad Nacional de Colombia, pp. 101-102.
- [23] Ratner, B; Hoffman, A.; Schden, F. & Lemons, J. (2013). *Biomaterials Science: An introduction to Material in Medicine*. ELSEVIER: Waltham, USA. 3ra edición.
- [24] Colorado, A. C., Agudelo, C. A., Moncada, A., & Elena, M. (2013). Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: revisión. *Revista Ingeniería Biomédica*, 7(14), 11-23.
- [25] Velásquez, C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 4(2), 91.
- [26] Hernández, I. (2013). Revisión bibliográfica La quitosana: un producto bioactivo de diversas aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 25(3), 97-110.
- [27] Elizalde, M. (2015). Síntesis y caracterización de compuestos precursores de moléculas híbridas quitosano-aminoácidos. Tesis de licenciatura. Michoacán, México. UMSNH.
- [28] Fuentes, S., Retuert, J., & Gonzalez, G. (2008). Preparation and properties of chitosan hybrid films from microwave irradiated solutions. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 53(2), 1511-1514.

- [29] Salcedo-Bellido, I. (2014). Nanocomposites de quitosano y montmorillonita como protectores de la permeabilidad celular de oxitetraciclina. Universidad de Granada.
- [30] Expósito Harris, R. (2010). Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones).
- [31] Mendoza, M. (2006). Síntesis y caracterización de un biopolímero a base de quitosano y gomas de origen natural. Tesis de licenciatura. Michoacán, México. UMSNH.
- [32] Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., & Heras, Á. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current chemical biology*, 3(2), 203-230.
- [33] Kumar, M. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*, 104(12), 6017-6084.
- [34] Espinoza, E. (2007). Propiedades físicas y biológicas de dos tipos de esponjas de quitosano, para su aplicación como biomaterial.
- [35] Álzate Díaz, L. F. (2014). Caracterización y evaluación de quitosano como potencial biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Tesis de grado, Ingeniería de Materiales, Universidad San Buenaventura de Cali, pp.
- [36] Skaugrud Oyvind. (1991) Chitosan-new biopolymer for cosmetic & drugs. *Drug & cosmetic industry*. 1991, 148, 5, 24.
- [37] Cheng, M., Deng, J., Yang, F., Gong, Y., Zhao, N., & Zhang, X. (2003). Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials*, 24(17), 2871-2880.
- [38] Zamora Mora, V., Sibaja Ballesteros, M., & Vega Baudrit, J. (2010). Diseño de un biofilm a partir de colágeno de pieles de tilapia y de quitosano de camarón como soporte para aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 11(7), 607-619.
- [39] Rojas-Chaves, M., Alvarenga-Venutolo, S., Zamora, V., Madrigal, S., Vega, J., Calvo, L., & Centeno, C. (2011). Elaboración de apósitos biológicos del colágeno de la dermis de tilapia y del quitosano del exoesqueleto de camarón y evaluación

- preliminar de su potencial terapéutico en afecciones epidérmicas. Vicerrectoría de Investigación y Extensión, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- [40] Ramos, M., Mora, V. Z., Rodríguez, G., Ballesteros, M. D. R. S., Carballo, S. M., & Correa, M. I. L. (2012). Andamiajes tridimensionales tipo esponjas basados en bioconjugados colágeno-quitosano como potencial biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Innotec*, (7 ene-dic), 43-48.
- [41] Alhosseini, S., Moztaizadeh, F., Mozafari, M., Asgari, S., Dodel, M., Samadikuchaksaraei, A. & Jalali, N. (2012). Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *International journal of nanomedicine*, 7, 25.
- [42] Melo, J. S. O., Tarazona, S. R., García, J. C. Á., Ballén, A. B., Puello, H. R. S., Ballesteros, A. C. V & Forero, D. M. M. (2019). Preparación y caracterización de un sistema polimérico bioartificial (Scaffold) hecho de quitosano (QT) y alcohol polivinílico (PVA) con potencial en el desarrollo de viabilidad de células. *Aprovechamiento de la semilla de aguacate* (Persea americana Mill.), 93.
- [43] Gómez Campo, A., & Osorno Valencia, I. (2016). Desarrollo de nanofibras de PVA funcionalizadas con quitosano y obtenidas por electrohilado para su potencial aplicación en el tratamiento de aguas con cobre. Tesis de grado, Ingeniería de Materiales, Universidad San Buenaventura de Cali, pp. .
- [44] Moncada Acevedo, M. E., Zea, G., & Andrea, J. (2016). Evaluación de andamios de colágeno construidos con la técnica de electrospinning para aplicación en ingeniería de tejido epitelial.
- [45] Coronilla, B. G. D., Negrete, J. A. T., & Ortega, I. A. Q. (2018). Extracción y purificación de colágeno tipo I para aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Jóvenes en la ciencia*, 4(1), 2549-2553.
- [46] Chandrakasan, G., Torchia, G. & Piez, k. (1976). Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. *J. Biol. Chem.* 251: 6062 –6067
- [47] Gross, J., Highberger, J. H., & Schmitt, F. O. (1955). Extraction of collagen from connective tissue by neutral salt solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 41(1), 1–7

- [48] Alter, M. J. (2004). Los estiramientos. Editorial Paidotribo. Capitulo 3. Pag. 35 – 37.
- [49] Song, E., Kim, S. Y., Chun, T., Byun, H. J., & Lee, Y. M. (2006). Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*, 27(15), 2951-2961.
- [50] Nyga, A., Loizidou, M., Emberton, M., & Cheema, U. (2013). A novel tissue engineered three-dimensional in vitro colorectal cancer model. *Acta biomaterialia*, 9(8), 7917-7926.
- [51] Ding, C. M., Zhou, Y., He, Y. N., & Tan, W. S. (2008). Perfusion seeding of collagen–chitosan sponges for dermal tissue engineering. *Process Biochemistry*, 43(3), 287-296.
- [52] Kim, S. E., Cho, Y. W., Kang, E. J., Kwon, I. C., Lee, E. B., Kim, J. H., ... & Jeong, S. Y. (2001). Three-dimensional porous collagen/chitosan complex sponge for tissue engineering. *Fibers and Polymers*, 2(2), 64-70.
- [53] Lin, Y. C., Tan, F. J., Marra, K. G., Jan, S. S., & Liu, D. C. (2009). Synthesis and characterization of collagen/hyaluronan/chitosan composite sponges for potential biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 5(7), 2591-2600.
- [54] Jiang, S., Liu, S., & Feng, W. (2011). PVA hydrogel properties for biomedical application. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 4(7), 1228-1233.
- [55] Ding, B., Kim, H. Y., Lee, S. C., Shao, C. L., Lee, D. R., Park, S. J. & Choi, K. J. (2002). Preparation and characterization of a nanoscale poly (vinyl alcohol) fiber aggregate produced by an electrospinning method. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 40(13), 1261-1268.
- [56] Hassan, C. M., & Peppas, N. A. (2000). Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *In Biopolymers· PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites* (pp. 37-65).
- [57] Gonzalez, J. (2013). Hidrogeles compuestos basados en polivinilalcohol para aplicaciones biomédicas (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ingeniería. Argentina).

- [58] Chiellini, E., Corti, A., D'Antone, S., & Solaro, R. (2003). Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science*, 28(6), 963-1014.
- [59] Gulrez, S. y Al-Assaf, S. y Phillips, G.O.(2011) Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications in Molecular and Environmental Bioengineering, *in Analysis and Modeling to Technology Applications*, A. Carpi, Editor..
- [60] CATZIM, A. (2020). Biocompatibilidad de membranas de mezclas de PVA/PAMPS de superficie microporosa. Tesis de grado. P. 18-20
- [61] Cabrera, J., Paredes, C., Urday, E., & Santiago, J. (2007). Preparación y caracterización de películas de alcohol polivinílico conteniendo nanopartículas de TiO₂.
- [62] L. Peng et al. (2019). Characterization of a novel polyvinyl alcohol / chitosan porous hydrogel combined with bone marrow mesenchymal stem cells and its application in articular cartilage repair, *BMC Musculoskelet. Disord.*, 7, 1–12, (2019)
- [63] V. Thomas. (2019). An electrospun citric acid modified polyvinyl alcohol scaffold for vascular tissue engineering, *Bioact. Compat. Polym.*, 1–17
- [64] S. Ceylan, D. Göktürk, D. Demir, M. Damla Özdemir, and N. Bölgen.(2017) Comparison of additive effects on the PVA/starch cryogels: Synthesis, characterization, cytotoxicity, and genotoxicity studies, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, 22, 1–10.
- [65] Landa, G., & Irusta, S. (2018). Desarrollo de andamios fibrosos de policaprolactona/sulfato de condroitin/ácido hialurónico para regeneración de cartílago. Trabajo de grado. Escuela de ingeniería y arquitectura, Universidad de Zaragoza.
- [66] Hochberg, M. C. (2010). Structure-modifying effects of chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: an updated meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of 2-year duration. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18, S28-S31.
- [67] Baeurle, S. A., Kiselev, M. G., Makarova, E. S., & Nogovitsin, E. A. (2009). Effect of the counterion behavior on the frictional–compressive properties of chondroitin sulfate solutions. *Polymer*, 50(7), 1805-1813.

- [68] Paz, R. J. G., Baudrit, J. R. V., & Hernández, K. Z. R. (2015). Ingeniería de tejidos y biocompatibilidad: nanomateriales biomiméticos, agua, mineralización y respuesta celular.
- [69] Park, Y. J., Lee, Y. M., Lee, J. Y., Seol, Y. J., Chung, C. P., & Lee, S. J. (2000). Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate–chitosan sponge for guided bone regeneration. *Journal of controlled release*, 67(2-3), 385-394.
- [70] Anisha, B. S., Sankar, D., Mohandas, A., Chennazhi, K. P., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2013). Chitosan–hyaluronan/nano chondroitin sulfate ternary composite sponges for medical use. *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1470-1476.
- [71] Cellet, T. S. P., Martins, J. T., Pereira, G. M., Hernandes, L., & Rubira, A. F. (2016). Synthesis of (polyvinyl alcohol)-chondroitin sulfate hydrogels and hydroxyapatite for use as scaffolds in tissue engineering: In vivo study of biocompatibility in subcutaneous tissues.
- [72] Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 18-23.
- [73] Tornello, P. R. C., Ballarin, F. M., González, M. A., Comas, D. S., Cuadrado, T. R., & Abraham, G. A. Obtención y Caracterización de Estructuras Porosas para Aplicaciones Biomédicas.
- [74] Jung, J. T., Kim, J. F., Wang, H. H., Di Nicolo, E., Drioli, E., & Lee, Y. M. (2016). Understanding the non-solvent induced phase separation (NIPS) effect during the fabrication of microporous PVDF membranes via thermally induced phase separation (TIPS). *Journal of Membrane Science*, 514, 250-263.
- [75] Zhao, J., Luo, G., Wu, J., & Xia, H. (2013). Preparation of microporous silicone rubber membrane with tunable pore size via solvent evaporation-induced phase separation. *ACS applied materials & interfaces*, 5(6), 2040-2046.
- [76] Hong, Y., Gao, C., Shi, Y., & Shen, J. (2005). Preparation of porous polylactide microspheres by emulsion-solvent evaporation based on solution induced phase separation. *Polymers for advanced technologies*, 16(8), 622-627.

- [77] Jansen, J. C., Macchione, M., & Drioli, E. (2005). High flux asymmetric gas separation membranes of modified poly (ether ketone) prepared by the dry phase inversion technique. *Journal of membrane science*, 255(1-2), 167-180.
- [78] Pervin, R., Ghosh, P., & Basavaraj, M. G. (2019). Tailoring pore distribution in polymer films via evaporation induced phase separation. *RSC advances*, 9(27), 15593-15605.
- [79] Macchione, M., Jansen, J. C., & Drioli, E. (2006). The dry phase inversion technique as a tool to produce highly efficient asymmetric gas separation membranes of modified PEEK. Influence of temperature and air circulation. *Desalination*, 192(1-3), 132-141.
- [80] Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical reviews*, 114(21), 11060-11082.
- [81] Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., AlNashef, I. M., Mirghani, M. E., & Saheed, O. K. (2013). Are deep eutectic solvents benign or toxic?. *Chemosphere*, 90(7), 2193-2195.
- [82] Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica chimica acta*, 766, 61-68.
- [83] Yadav, A., & Pandey, S. (2014). Densities and viscosities of (choline chloride+ urea) deep eutectic solvent and its aqueous mixtures in the temperature range 293.15 K to 363.15 K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 59(7), 2221-2229.
- [84] Ashworth, C. R., Matthews, R. P., Welton, T., & Hunt, P. A. (2016). Doubly ionic hydrogen bond interactions within the choline chloride–urea deep eutectic solvent. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(27), 18145-18160.
- [85] Tomé, L., Baião, V., da Silva, W., & Brett, C. (2018). Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. *Appl Mater Today* 10: 30–50.
- [86] Wong, C. Y., Wong, W. Y., Walvekar, R., Loh, K. S., Khalid, M., & Lim, K. L. (2018). Effect of deep eutectic solvent in proton conduction and thermal behaviour of chitosan-based membrane. *Journal of Molecular Liquids*, 269, 675-683.

- [87] Jiang, Q., & Hasan, S. K. (2014). Phase Separated Fibrous Structures: Mechanism Study and Applications. In *Lightweight Materials from Biopolymers and Biofibers* (pp. 127-141). American Chemical Society.
- [88] M. Di Luccio, R. Nobrega, C.P. Borges. (2000). Microporous anisotropic phase inversión membranes from bisphenol-A polycarbonate: study of a ternary system, *Polymer* 41 4309–4315
- [89] Hernández Cocoletzi, H., Águila Almanza, E., Flores Agustin, O., Viveros Nava, E. L., & Ramos Cassellis, E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*, 22(3), 57-60.
- [90] Colina, M., Ayala, A., Rincón, D., Molina, J., Medina, J., Ynciarte, R., & Montilla, B. (2014). Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos. Escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 15(1), 21-43.
- [91] Gómez-Castellanos, S. L., Villarreal-Gómez, L. J., Ng, T., Vera-Graziano, R., Iglesias, A. L., & Serena-Gómez, E. (2017). Caracterización química de membranas de colágeno para la regeneración guiada de hueso. In *Memorias del Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica* (Vol. 2, No. 1, pp. 259-262).
- [92] Coronilla, B. G. D., Negrete, J. A. T., & Ortega, I. A. Q. (2018). Extracción y purificación de colágeno tipo I para aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Jóvenes en la ciencia*, 4(1), 2549-2553.
- [93] Delgado-Rangel, L. H., Hernández-Vargas, J., Becerra-González, M., Martínez-Torres, A., Prokhorov, E., & Campos, J. B. G. (2019). Development of Collagen/Poly (vinyl alcohol)/Chondroitin Sulfate and Collagen/Poly (vinyl alcohol)/HA Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering. *Fibers and Polymers*, 20(12), 2470-2484.
- [94] Rivas Yepes, L. (2015). Evaluación de la proliferación de células madre de pulpa dental en matrices de pva y quitosano. Universidad EIA, Tesis Doctoral 32-39.
- [95] Mansur, H. S., Sadahira, C. M., Souza, A. N., & Mansur, A. A. (2008). FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering: C*, 28(4), 539-548.

- [96] Ramírez Rivera, L. M. (2013). Síntese de complexos nanoestruturados formados por óxidos de ferro e sulfato de condroitina. 60-66.
- [97] Foot, M., & Mulholland, M. (2005). Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate using chemometric techniques. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 38(3), 397-407.