

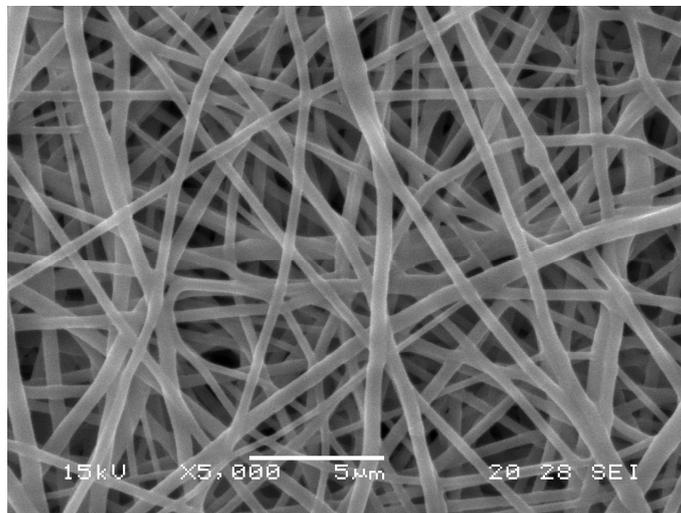


UNIVERSIDAD NACIONAL
DE MAR DEL PLATA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
FACULTAD DE INGENIERÍA

“NANOFIBRAS POLIURETÁNICAS Y COMPUESTAS DE INTERÉS BIOMÉDICO”



PROYECTO FINAL PRESENTADO POR FLORENCIA MONTINI BALLARIN
PARA ASPIRAR AL GRADO DE INGENIERO EN MATERIALES

DIRECTOR: DR. GUSTAVO ABRAHAM

CO-DIRECTOR: DR. FABIÁN BUFFA

MAR DEL PLATA, MARZO DE 2009



RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Índice

Resumen	6
1. Introducción	7
1.1 Nanotecnología y nanomateriales	7
1.2 Ingeniería de tejidos	7
1.3 Métodos de obtención de matrices tridimensionales porosas.....	12
1.4 Nanoestructuras fibrosas en el campo biomédico.....	13
1.5 Electrospinning	14
1.5.1 Variables del proceso de electrospinning.....	17
1.5.1.1 Viscosidad / concentración	18
1.5.1.2 Conductividad / densidad de carga de la solución.....	19
1.5.1.3 Tensión superficial	20
1.5.1.4 Peso molecular y polidispersidad del polímero	20
1.5.1.5 Momento dipolar y constante dieléctrica	20
1.5.1.6 Velocidad de flujo	21
1.5.1.7 Campo eléctrico / voltaje.....	21
1.5.1.8 Distancia entre la boquilla y el colector	22
1.5.1.9 Parámetros ambientales	22
1.5.2 Estructura de las fibras producidas por electrospinning	23
1.6 Polímeros conductores en aplicaciones biomédicas.....	24
1.6.1 Polianilina (PANI).....	26
1.7 Nanotubos de carbono (CNT)	27
2. Objetivos.....	29
3. Materiales	30
4. Métodos	32
4.1 Preparación de soluciones y suspensiones	32
4.2 Obtención de matrices poliuretánicas nanofibrosas no tejidas mediante electrospinning	33
4.3 Caracterización morfológica	35
4.4 Evaluación de la conductividad	36
5. Resultados y Discusión.....	39
5.1 Preparación de matrices nanofibrosas de Tecoflex 60D.....	39
5.1.1 Propiedades intrínsecas de la solución	39
5.1.2 Parámetros de procesamiento	42
5.1.2.1 Voltaje aplicado	42
5.1.2.2 Distancia entre la boquilla y el colector	46
5.1.2.3 Gradiente de potencial	48
5.1.2.4 Velocidad de flujo	49
5.2 Matrices nanofibrosas conductoras de Tecoflex 60D	53
5.2.1 Serie SWCNT	54
5.2.1.1 Efecto del contenido de SWCNT en la morfología de la matriz	54
5.2.1.2 Efecto del gradiente de potencial en matrices nanofibrosas conductoras de Tecoflex 60D / 1,0 % SWCNT.....	59
5.2.1.3 Efecto del solvente en la suspensión de SWCNT y	

<i>morfología de matrices nanofibrosas de Tecoflex 60D</i>	59
5.2.2 <i>Serie PANI</i>	62
5.2.2.1 <i>Efecto del contenido de PANI en la morfología de la matriz</i>	62
5.2.1.2 <i>Efecto de borde en matrices nanofibrosas conductoras de Tecoflex 60D</i>	66
5.3 <i>Conductividad de matrices nanocompuestas</i>	70
5.3.1 <i>Conductividad a.c. y d.c. a partir de medidas de impedancia</i>	70
5.3.2 <i>Conductividad d.c. a partir del método de cuatro puntos</i>	75
6. <i>Conclusiones</i>	77
7. <i>Referencias</i>	78
8. <i>Trabajo futuro</i>	83
<i>Anexo I:</i> Descripción de algunas técnicas de preparación de matrices porosas	85
<i>Anexo II:</i> Nanofibras poliméricas para aplicaciones en ingeniería de tejidos y dispositivos para implantes o prótesis.....	92
<i>Anexo III:</i> Síntesis y caracterización de nanotubos de carbono (SWCNT) y polianilina (PANI)	100
<i>Anexo IV:</i> Micrográficas SEM de otras condiciones experimentales estudiadas	102

Listado de Figuras

Fig. 1: Esquema de las etapas seguidas en un procedimiento de ingeniería de tejidos: 1) extracción de células, 2) cultivo para expansión, 3) sembrado en matriz con o sin factores de crecimiento, 4) cultivo <i>in vitro</i> , 5) implantación del tejido diseñado en el lugar dañado (<i>in vivo</i>)	11
Fig. 2: Equipo básico para la técnica de electrospinning	15
Fig. 3: Esquema de diversas configuraciones para electrospinning. Diferentes tipos de boquillas: (A) boquilla de punta múltiple, (B) sistema de liberación simple, y (C) agujas concéntricas. Distintos tipos de colectores: (A) estacionario (substrato conductor conectado a tierra), (B) mandril, (C) bobina, y (D) marco metálico.	17
Fig. 4: Efecto de la concentración de la solución en la estructura de las fibras electrohiladas de P(D,L-LA): A:20 % en peso; B: 25 %; C: 30 %; D: 35 %.	19
Fig. 5: Efecto del voltaje aplicado en el diámetro fibra eyectada.	21
Fig. 6: Efecto de la distancia de deposición en la estructura de las fibras electrohiladas. a) 2,0 cm (fibras redondas) b) 0,5 cm (fibras planas).	22
Fig. 7: Fibras de PEO electrohilado con sección transversal circular.	23
Fig. 8: Fotografía de fibras planas (a) y perlas colapsadas (b) producidas por electrospinning	24
Fig. 9: Fotografía de fibras ramificadas (a) y divididas (b) formadas por electrospinning.	24
Fig. 10: Estructura química idealizada de Tecoflex	30
Fig. 11: Micrografía SEM de SWCNT	31
Fig. 12: Micrografía SEM de PANI	31
Fig. 13: Fotografía del equipo de electrospinning empleado en este trabajo (Laboratorio de Polímeros Biomédicos, INTEMA)	35
Fig. 14: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF, $f = 1 \text{ mL/h}$; $V = 12 \text{ kV}$; $d = 10 \text{ cm}$.	39
Fig. 15: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 83:17, $f = 1 \text{ mL/h}$; $V = 12 \text{ kV}$; $d = 10 \text{ cm}$.	40
Fig. 16: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1 \text{ mL/h}$; $V = 12 \text{ kV}$; $d = 10 \text{ cm}$.	40
Fig. 17: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 6% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1 \text{ mL/h}$; $V = 12 \text{ kV}$; $d = 10 \text{ cm}$.	41
Fig.18: Micrografía de SEM X3000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1 \text{ mL/h}$; $V = 15 \text{ kV}$; $d = 15 \text{ cm}$.	42
Fig. 19: Distribución de diámetros medida en la Figura 18.	43
Fig. 20: Micrografía de SEM X3000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1 \text{ mL/h}$; $V = 17 \text{ kV}$; $d = 15 \text{ cm}$.	43
Fig. 21: Distribución de diámetros medida en la Figura 20.	44
Fig. 22: Micrografía de SEM X3000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1 \text{ mL/h}$; $V = 20 \text{ kV}$; $d = 15 \text{ cm}$.	44
Fig. 23: Distribución de diámetros medida en la Figura 22.	45
Fig. 24: Diámetro medio en función del voltaje aplicado.	45
Fig. 25: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1 \text{ mL/h}$; $V = 15 \text{ kV}$; $d = 10 \text{ cm}$.	46
Fig. 26: Distribución de diámetros medida en la Figura 25.	46
Fig. 27: Diámetro medio en función de la distancia entre la aguja y el colector.	47
Fig. 28: Esquema de la trayectoria del microchorro mostrando las regiones de inestabilidad y el ángulo del cono descrito por el haz.	48
Fig. 29: Diámetro medio en función de la relación V/d .	49
Fig. 30: Micrografía de SEM X3000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1 \text{ mL/h}$; $V = 12 \text{ kV}$; $d = 10 \text{ cm}$.	49

Fig. 31: Distribución de diámetros medida en la Figura 30.	50
Fig. 32: Micrografía de SEM X2000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 0,5$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 12$ cm.	50
Fig. 33: Distribución de diámetros medida en la Figura 32.	51
Fig. 34: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 0,3$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 12$ cm.	51
Fig. 35: Distribución de diámetros medida en la Figura 34.	52
Fig. 36: Diámetro medio en función de la velocidad de flujo para tres relaciones V/d .	52
Fig. 37: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 0,5% SWCNT.	54
Fig. 38: Distribución de diámetros medida en la Figura 37.	54
Fig. 39: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 1% SWCNT.	55
Fig. 40: Distribución de diámetros medida en la Figura 39.	55
Fig. 41: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 1,5% SWCNT.	56
Fig. 42: Distribución de diámetros medida en la Figura 41.	56
Fig. 43: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 2% SWCNT.	57
Fig. 44: Distribución de diámetros medida en la Figura 43.	57
Fig. 45: Diámetro medio de fibra en función del contenido de SWCNT.	58
Fig. 46: Diámetro medio en función de la relación V/d .	59
Fig. 47: Micrografía de SEM X5000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:IPA 50:50, $f = 0,5$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 12$ cm.	60
Fig. 48: Distribución de diámetros de la Figura 47.	60
Fig. 49: Micrografía de SEM X5000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:IPA 50:50, $f = 0,5$ mL/h; $V = 20$ kV; $d = 15$ cm.	61
Fig. 50: Distribución de diámetros de la Figura 49.	61
Fig. 51: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 0,5% PANI.	62
Fig. 52: Distribución de diámetros medida en la Figura 51.	62
Fig. 53: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 1,0% PANI.	63
Fig. 54: Distribución de diámetros medida en la Figura 53.	63
Fig. 55: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 1,5% PANI.	64
Fig. 56: Distribución de diámetros medida en la Figura 55.	64
Fig. 57: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 2,0% PANI.	65
Fig. 58: Distribución de diámetros medida en la Figura 57.	65
Fig. 59: Diámetro medio en función del porcentaje de PANI.	66
Fig. 60: Esquema del lugar de extracción de cada muestra. 1) Figura 61, 2): Figura 63 y 3) Figura 57.	67
Fig. 61: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 2% PANI extraído de la posición 1 (borde).	67
Fig. 62: Distribución de diámetros medida en la Figura 61.	68
Fig. 63: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 2% PANI extraído de la posición 2.	68
Fig. 64: Distribución de diámetros medida en la Figura 63.	69
Fig. 65: Diámetro medio de fibra en función del lugar de extracción de la muestra.	69
Fig. 66: Conductividad ac en función de la frecuencia para Tecoflex y nanocompuestos.	70
Fig. 67: Conductividad ac en función de la frecuencia para la serie SWCNT.	70
Fig. 68: Conductividad ac en función de la frecuencia para la serie PANI.	71
Fig. 69: Curva de impedancia para Tecoflex y nanocompuestos.	73
Fig. 70: Curva de impedancia para la serie SWCNT.	74
Fig. 71: Curva de impedancia para la serie PANI.	74
Fig. 72: Conductividad dc en función del porcentaje de nanopartículas agregadas.	75
Fig. 73: Conductividad dc en función del porcentaje de nanopartículas agregadas para la serie SWCNT.	76

Listado de Tablas

Tabla 1: Muestras y parámetros de procesamiento estudiados	34
Tabla 2: Espesor de las matrices obtenidas.	53
Tabla 3: Composición de los nanocompuestos y matrices preparadas	53

Resumen

La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa buscan el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren los tejidos dañados y la funcionalidad de los órganos. La comunidad científica está realizando un intenso esfuerzo en la investigación de diversas estrategias que permitan avanzar en dirección a este objetivo. Los avances de la nanotecnología pueden dar respuesta a las numerosas cuestiones relacionadas con los problemas asociados a los implantes tradicionales. Las matrices poliméricas nanofibrosas imitan la arquitectura a nanoescala de la matriz extracelular natural. Esta característica estimula y favorece la expresión de señales específicas, y en combinación con factores de crecimiento, proteínas y agentes terapéuticos tiene una influencia importante en la actividad celular tanto *in vitro* como *in vivo*. La técnica de electrospinning resulta muy versátil y atractiva para la preparación de matrices nanofibrosas y ofrece una oportunidad para manipular y controlar el área superficial, diámetro de fibra, porosidad y tamaño de poro de las matrices preparadas.

En este trabajo se presenta la preparación y caracterización de matrices poliuretánicas y nanocompuestas obtenidas mediante la técnica de electrospinning. Para examinar el efecto en la morfología de las nanofibras obtenidas y las condiciones óptimas de procesamiento se variaron los parámetros principales del procesamiento. Si bien los principios de la técnica son sencillos, el proceso de electrospinning resulta complejo. Las variables estudiadas mostraron tener una influencia en la macro y micromorfología de los sistemas preparados. El agregado de nanopartículas (nanotubos de carbono y nanotubos de polianilina) permitió la preparación de nanocompuestos con morfología propia y propiedades conductoras. Las matrices nanofibrosas obtenidas resultan de interés para su potencial aplicación en dispositivos biomédicos e ingeniería de tejidos.

1. Introducción

1.1 Nanotecnología y nanomateriales

Uno de los principales retos científicos actuales, tanto en ciencia básica como aplicada, es la obtención de materiales nanoestructurados (nanopartículas, nanocristales, nanotubos, nanofibras, nanoesferas, nanovarillas, nanoclusters, nanofilms, nanocompuestos, nanofases, etc.) y el estudio de sus propiedades para una amplia demanda de aplicaciones. La nanotecnología representa un enfoque conceptual relativamente nuevo que aprovecha aquellas propiedades de la materia que dependen críticamente de las dimensiones submicrométricas (típicamente menores de 100 nm), y la aplicación de los conocimientos adquiridos de la creación de materiales, estructuras y equipos útiles. La investigación y desarrollo en estos ámbitos abren la posibilidad de comprender nuevos fenómenos y así desarrollar nuevas propiedades a los niveles macro, micro y nanoscópico. En los últimos años, la Unión Europea, Estados Unidos y Japón invirtieron cuantiosos recursos públicos (miles de millones de euros) para fomentar la investigación de las nanotecnologías. El desarrollo a nanoescala no sólo permite obtener mejores propiedades sino también producir materiales completamente nuevos. En este sentido, los nanomateriales pueden tener la respuesta a los diversos problemas asociados a los implantes tradicionales y pueden proporcionar nuevos materiales que constituyan una alternativa innovadora e interesante para mejorar las propiedades y comportamiento de los materiales convencionales. Los materiales nanoestructurados exhiben un conjunto de propiedades fisicoquímicas únicas y superiores a los materiales convencionales (propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas, magnéticas, catalíticas, citocompatibilidad, alta área superficial, funcionalidad superficial) [1].

1.2 Ingeniería de tejidos

Anualmente se realizan millones de procedimientos quirúrgicos que requieren el uso de tejidos u órganos sustitutos para reparar o reemplazar los que sufren de alguna patología o están dañados. Entre las aproximaciones tradicionales para la sustitución de tejidos y órganos se encuentran los implantes biológicos (autoinjerto o reconstrucción quirúrgica, aloinjerto o transplante, xenoinjerto) y los dispositivos biomédicos basados en biomateriales [2, 3, 4, 5, 6].

i) Autoinjerto o autoplastia (autografting): involucra la extracción de tejidos sanos de un determinado lugar del paciente para transplantarlo en otra parte del mismo paciente. Los injertos autólogos típicamente producen los mejores resultados clínicos, dado que no existen causas para el rechazo inmune. Sin embargo, existen varios problemas asociados con esta terapia, infección y dolor en la zona, pérdida de sangre, necesidad de transfusión (con los riesgos inherentes), entre otros.

ii) Aloiinjerto o homoplastia (allografting): en este procedimiento se extraen tejidos u órganos de un donante y se transplantan a un paciente. El donante debe haber fallecido recientemente en el caso de extracción de corazón, riñón, hígado, páncreas o hueso, pero se puede extraer pulmón y riñón de donantes vivos. Aunque la tecnología de trasplantes ha mejorado notablemente en las últimas décadas con el desarrollo de drogas anti-rechazo el problema principal reside en la escasa disponibilidad de donantes, dado que la demanda de donantes humanos ha superado altamente la oferta.

iii) Xenoinjerto (xenografting): involucra el implante de tejidos de otras especies, previamente tratados para reducir las reacciones de antigeneicidad, eventos de trombosis, calcificación, etc. El empleo de pericardio bovino, convenientemente tratado, como válvula cardíaca preparada a partir de materiales de origen biológico y la piel porcina liofilizada para la cobertura temporal de quemaduras hasta que sea posible la realización del autoinjerto, constituyen dos ejemplos del uso de tejidos provenientes de individuos de otra especie.

iv) Dispositivos biomédicos basados en biomateriales: la ciencia y tecnología de biomateriales ha permitido la creación de materiales y dispositivos biomiméticos para reemplazar, aumentar o extender diversas funciones realizadas por los sistemas biológicos. Los ejemplos son numerosos y van desde dispositivos de asistencia cardíaca hasta prótesis de cadera o implantes de mamas. Muchos de estos sistemas han producido un enorme beneficio y un impacto positivo. Los materiales empleados en estas terapias están, sin embargo, sujetos a fatiga, fractura, toxicidad, inflamación, desgaste, y no se remodelan con el tiempo (crecimiento, cambio de forma, respuesta, etc.). Además, los dispositivos actuales tampoco se comportan fisiológicamente como tejidos u órganos. Por ejemplo, los dispositivos de asistencia cardíaca están diseñados para terapias temporarias hasta la disponibilidad de un órgano donado. Los biomateriales clínicos actuales proveen casi exclusivamente una función mecánica, debido a que no tienen componentes metabólicos con los cuales desarrollar funciones tisulares activas.

Todas las terapias descritas hasta aquí han tenido y tienen hoy en día un importante impacto médico aunque poseen serias limitaciones. Para sobrellevar las limitaciones de las aproximaciones convencionales se están desarrollando nuevas tecnologías entre las que se incluyen la extracción de tejidos y órganos de animales transgénicos y la terapia de genes. Sin embargo, la clonación y la terapia génica involucran diversos aspectos técnicos, económicos, políticos y éticos en discusión y que deberán resolverse antes de que estén disponibles como metodologías maduras para aplicaciones clínicas.

La ingeniería de tejidos (*tissue engineering*) surgió a finales del siglo XX como una aproximación alternativa e interdisciplinaria para sobrellevar las limitaciones de las terapias tradicionales para el tratamiento de falla o reemplazo de órganos, las que están relacionadas principalmente con la dificultad de obtener tejidos u órganos para su trasplante y la falta de una recuperación funcional completa, constituyendo éste uno de los principales problemas mundiales en el sistema de salud. La denominación “ingeniería de tejidos” se propuso en una reunión auspiciada por la National Science Foundation en 1987 [7], donde se definió este campo de investigación y desarrollo como [8]:

“La aplicación de los principios y métodos de ciencias de la ingeniería y la vida para el conocimiento fundamental de la relación entre estructura-función en tejidos normales y patológicos de mamíferos y el desarrollo de substitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de tejidos u órganos”

Una década después D.F. Williams [9] definió ingeniería de tejidos como *“la persuasión del cuerpo para curarse a si mismo, ayudado por la presencia de células apropiadas, biomoléculas y estructuras de soporte en situaciones donde la evolución ha determinado que el ser humano no tiene más la potencia propia de regeneración”*

Las bases de la ingeniería de tejidos son amplias y abarcan un espectro amplio de fundamentos científicos que incluyen diversas disciplinas que se complementan: ciencias químicas, biológicas y médicas (bioquímica, biomecánica, biología celular, inmunología, fisiología, anatomía, etc.), ingenierías (ciencia y tecnología de materiales, mecánica computacional, cinética química y dinámica de fluidos), bio y nanotecnologías (cultivo celular, separación de células y transferencia genética), entre otras. En este contexto resulta necesario el desarrollo de tecnologías y metodologías para satisfacer la alta demanda existente.

Los dispositivos para ingeniería de tejidos comprenden **biomateriales** con composición química y arquitectura apropiadas para constituir una matriz extracelular artificial o andamiaje (*scaffold*) en la que tienen lugar los procesos celulares de adhesión, diferenciación y crecimiento celular que estructuren espacialmente tejidos concretos. Por otro lado, la ingeniería de tejidos involucra **células**, que pueden ser propias del paciente o no. El empleo de células propias (obtenidas por biopsia) o células madre (*stem cells*), tiene las ventajas de los autoinjertos pero con los problemas asociados con la baja disponibilidad. A menos que las células puedan obtenerse del mismo paciente, el origen de las células constituye el principal problema de la técnica *in vitro*. La incorporación de **señales biológicas** que regulen las funciones celulares (factores de crecimiento) otorga mayor especificidad y funcionalidad a la matriz [10]. El tejido desarrollado con la matriz (tissue-engineered construct) puede implantarse en el sitio requerido de manera tal que se integre homogéneamente con el tejido natural circundante [11].

Para alcanzar esta función, los materiales deben poseer una micro/nanoestructura porosa, velocidad de degradación o bioestabilidad controlada, estabilidad mecánica y arquitectura espacial adecuada a la aplicación. Dependiendo de la aplicación puede preferirse que el material se reabsorba *in vivo* con determinada cinética sincronizada con el crecimiento del tejido. Este proceso requiere que los productos de degradación sean no tóxicos y que ingresen en alguna ruta metabólica. En algunos casos se pueden emplear materiales no biorreabsorbibles [12].

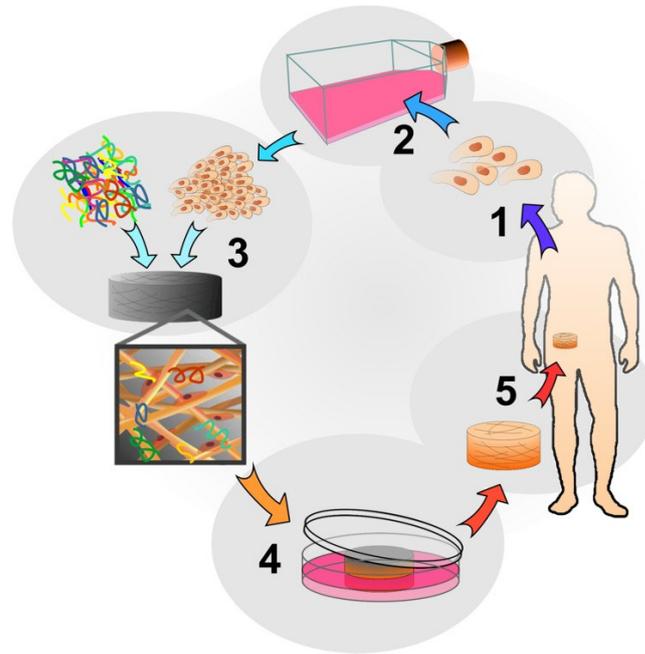
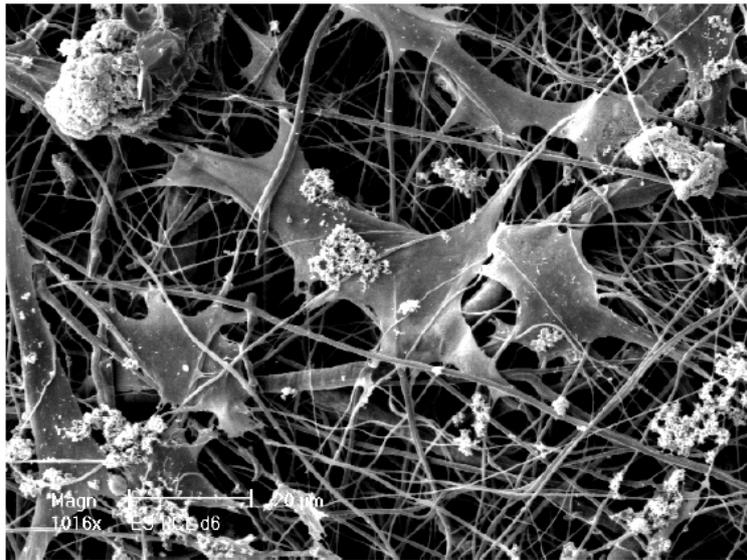


Figura 1: Esquema de las etapas seguidas en un procedimiento de ingeniería de tejidos: 1) extracción de células, 2) cultivo para expansión, 3) sembrado en matriz con o sin factores de crecimiento, 4) cultivo *in vitro*, 5) implantación del tejido diseñado en el lugar dañado (*in vivo*).



Micrografía de la etapa 4) del esquema anterior mostrando el cultivo *in vitro*

Las matrices ideales para ingeniería de tejidos deben cumplir los siguientes requerimientos:

- 1) ser biocompatible
- 2) ser biorreabsorbible, remodelable o bioestable (dependiendo de la aplicación)
- 3) en el caso de ser biorreabsorbible, la cinética debe estar en sincronización con el proceso de reparación o regeneración
- 4) ser altamente poroso con una relación área-volumen alta

- 5) ser altamente permeable para facilitar la difusión
- 6) poseer un apropiado intervalo de tamaño de poro
- 7) poseer propiedades mecánicas adecuadas
- 8) proporcionar una superficie apropiada para permitir la adhesión celular, promover el crecimiento celular, y mantener las diferentes funciones celulares
- 9) ayudar a la formación de la matriz extracelular promoviendo las funciones celulares
- 10) facilidad para portar drogas o factores de crecimiento

1.3 Métodos de obtención de matrices tridimensionales porosas

Desde un punto de vista físico las matrices o andamiajes pueden clasificarse en tres grupos: sólidos porosos celulares, textiles y sistemas inyectables. Según la terminología empleada por la ASTM [13] los sólidos porosos se clasifican también en tres grupos: interconectados (poros abiertos), no interconectados (poros cerrados) o una combinación de ambos. Ashby y Gibson [14] clasifican a los sólidos porosos en espumas y estructuras tipo “panal de abejas” (*honeycomb*), arreglos regulares bidimensionales de poros poligonales.

El número de publicaciones científicas relacionadas con matrices para aplicaciones biomédicas se incrementó notablemente en la última década, hecho que revela un alto y sostenido interés en el diseño y preparación de matrices porosas [15]. Teniendo en cuenta los requisitos indispensables que debe reunir una matriz extracelular artificial, la tecnología de procesamiento para su producción debe poseer un control importante de las propiedades macro y microestructurales. El comportamiento viscoso de los polímeros por encima de su temperatura de transición vítrea o temperatura de fusión y su solubilidad en diferentes solventes orgánicos, determina la aplicación de una amplia variedad de técnicas para preparar matrices poliméricas porosas [16, 17, 18]. No existe una forma universal de crear matrices porosas, la elección de la técnica más apropiada resulta entonces crítica y depende de cada material polimérico y la aplicación específica [19].

Algunas de las técnicas para la preparación de matrices tridimensionales porosas usando polímeros naturales o sintéticos se describen en el Anexo I.

1.4 Nanoestructuras fibrosas en el campo biomédico

Los nanomateriales y materiales nanoestructurados muestran una mayor capacidad para interactuar con biomoléculas, células y otras estructuras biológicas de tamaño similar en el rango micro y nanométrico. Estas características los hacen interesantes para potenciales aplicaciones biomédicas [20]. En un sentido amplio, las fibras con diámetro menor a 1 micrón se las denomina nanofibras. Las nanofibras generan una estructura altamente porosa de alta relación área superficial/volumen. Por ejemplo, las fibras con diámetro 100 nm poseen una relación superficie/masa de aproximadamente 100 m²/g. Las matrices nanofibrosas poliméricas exhiben un amplio espectro de propiedades superficiales (hidrofilicidad, hidrofobicidad), propiedades mecánicas superiores (rigidez, resistencia a la tracción), y porosidad, comparados con otras formas de procesar el material. La conductividad eléctrica, funcionalidad superficial y otras propiedades están determinadas por la composición específica del material.

Dado que los tejidos naturales y órganos poseen componentes con dimensiones nanométricas y las células interactúan y crean matrices extracelulares nanoestructuradas, las características biomiméticas y excelentes propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales juega un rol clave en la estimulación del crecimiento celular y en la regeneración guiada de tejidos [1].

Las matrices extracelulares nanoestructuradas artificiales imitan la matriz extracelular natural de los tejidos y órganos, pueden fabricarse con geometrías que permitan rellenar defectos anatómicos y obtener las propiedades mecánicas necesarias para soportar el crecimiento celular. Asimismo pueden contener factores de crecimiento, drogas, principios activos y genes para estimular la regeneración de tejidos. Sin embargo, los estudios de las interacciones célula-nanofibra, y la comprensión completa de la influencia de las nanofibras en las rutas bioquímicas y los mecanismos de las señales que regulan el comportamiento celular requieren aún de mayor investigación.

Las aplicaciones potenciales de las estructuras nanofibrosas en el campo biomédico son enormes y prometedoras [21,22]: matrices para regeneración y/o reparación de tejidos y órganos (injertos vasculares, nervios, piel, cartílago, huesos, músculos cardíacos, vejiga, córneas, expansión y diferenciación de células madres), vectores para liberación de principios bioactivos, dispositivos biomédicos implantables, instrumentación y diagnóstico médico, tejidos de protección contra agentes infecciosos y medioambientales, aplicaciones dentales y cosméticas [23, 24, 25, 26]. Las matrices

nanofibras que contienen agentes terapéuticos se emplean en liberación controlada de fármacos (agentes antibióticos, antiinflamatorios, antibacterianos, antimicrobiales, factores de crecimiento, etc.), piel artificial, reparación de vasos sanguíneos, apósitos para heridas y adhesivos postoperatorios. En la piel, las matrices medicadas previenen la inflamación y simultáneamente dirigen la regeneración de células y el curado. Se ha reportado también el uso de nanofibras de polímeros tanto biodegradables como no degradables (poliuretánicos) como recubrimiento de *stents*, en un esfuerzo para mejorar sus prestaciones [27, 28].

En el Anexo II se describen con mayor detalle diversas aplicaciones biomédicas de sistemas nanofibrosos.

Existen al presente diversas tecnologías de nanofabricación (*top-down o bottom-up*) tales como separación de fases (Anexo I), autoensamblado (*self-assembly*) (Anexo I), electrohilado (*electrospinning*), deposición química de vapor, ataque químico (*chemical etching*), nanoimpresión (*nano-imprinting*), fotolitografía y otras litografías.

1.5 Electrospinning

La tecnología de **electrospinning** constituye uno de los métodos de procesamiento de vanguardia que presenta mayores ventajas para la producción de nanofibras. La técnica tiene la habilidad única de producir nanofibras de diferentes materiales y geometrías, bajo costo, relativamente alta velocidad de producción y simplicidad en el diseño del equipamiento. Si bien el proceso se conoce desde 1934, hasta mediados de la década del '90 no existió mucho interés en su uso para la obtención de fibras. Desde entonces se han electrohilado muchos polímeros sintéticos y naturales, cerámicos y compuestos, para obtener fibras continuas de unos pocos nanómetros hasta algunos micrones que generan una membrana hilada no tejida altamente porosa [29]. Una vez optimizado el proceso las fibras resultantes no requieren de una etapa extensa de purificación como, por ejemplo, los whiskers submicrométricos, las nanovarillas inorgánicas y los nanotubos de carbono.

La técnica de electrospinning constituye una vía sencilla y sumamente versátil para la producción de fibras de dimensiones micro y submicrométricas (por ejemplo, es posible ajustar las condiciones del proceso para obtener fibras de 3 nm a 10 μm). Sin embargo, es un proceso sumamente complejo que depende de numerosos parámetros. El equipo básico se compone de cuatro componentes (**Figura 2**): un **reservorio** (jeringa)

de solución o material fundido que se conecta a un tubo capilar (aguja de diámetro interno de 400 μm a 800 μm), una **bomba de infusión a jeringa** que permite suministrar un flujo constante y controlado, una **fuentes de alto voltaje** y un **sistema colector**, que en el caso más sencillo es placa metálica conectada a tierra sobre la que se deposita el material electrohilado.

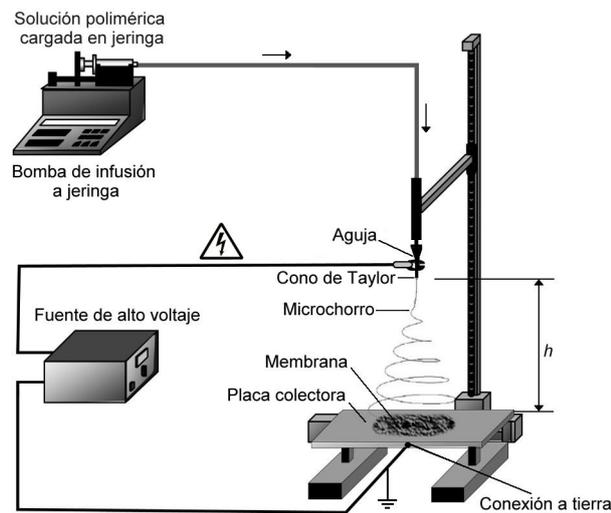


Figura 2: Equipo básico para la técnica de electrospinning.

Cuando se aplica un voltaje del orden de 5 a 30 kV, la gota de la solución del polímero (o del fundido) pendiente de la aguja se electrifica fuertemente, y las cargas inducidas se distribuyen uniformemente sobre la superficie. En consecuencia, la gota experimenta dos tipos de fuerzas electrostáticas: la fuerza de repulsión entre las cargas superficiales y la fuerza coulombica ejercida por el campo eléctrico externo. Bajo la acción de estas interacciones, la gota se distorsiona en forma de un objeto cónico, conocido como cono de Taylor. En estas condiciones, la tensión superficial y la fuerza eléctrica están en equilibrio. Una vez que la resistencia del campo eléctrico alcanza un determinado valor crítico, las fuerzas electrostáticas repulsivas pueden superar la tensión superficial de la solución de polímero. Esta situación es inestable, provocando la expulsión de un microchorro líquido cargado de la boquilla de la aguja. Este microchorro electrificado sufre estiramiento y movimientos tipo latigazo (*whipping*), dando lugar a la formación de hilos largos y delgados. A medida que el chorro líquido se deforma continuamente y se evapora el solvente (o solidifica el fundido), el diámetro de las fibras se reduce drásticamente. El estrechamiento del chorro durante el proceso de

electrospinning se debe a la presencia de diversas inestabilidades asociadas con el microchorro electrizado. Particularmente, la regularidad y el diámetro final de las fibras dependerán fuertemente de la inestabilidad de *whipping*, que es el modo inestable por excelencia en electrospinning. La aparición de esta inestabilidad genera una flexión del microchorro. La obtención de fibras con pequeños diámetros se consigue gracias al estiramiento y aceleración del filamento fluido en la región de la inestabilidad.

Los componentes básicos de electrospinning pueden modificarse de muy diversas maneras, lo que confiere a esta técnica una enorme versatilidad. Por ejemplo, el empleo de un sistema de dosificación de soluciones con múltiples jeringas logra la cobertura de un área mayor y aumenta la velocidad de producción de nanofibras. Empleando agujas coaxiales (concéntricas) se producen nanofibras compuestas con un corazón de un material distinto que la capa superficial (**Figura 3**). El polímero interior puede incorporar un agente terapéutico de interés y formar parte de estructuras nanofibrosas tipo núcleo-cáscara, donde el polímero exterior regula la liberación sostenida del agente. Por otro lado, también existen diversos diseños del sistema colector. Los colectores estacionarios dan como resultado nanofibras al azar mientras que los colectores en forma de mandriles, bobinas o marcos de metal producen nanofibras alineadas. El tipo de colector y su velocidad de rotación determinan el grado de alineación de las fibras. Esta alineación también puede obtenerse mediante el uso de determinados arreglos de electrodos.

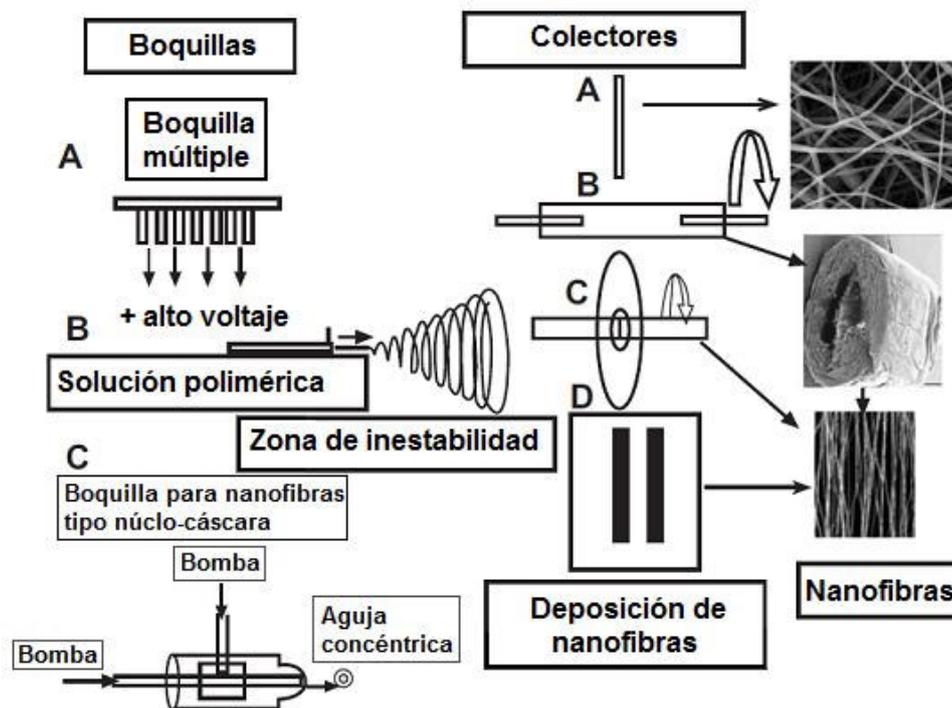


Figura 3: Esquema de diversas configuraciones para electrospinning.

Diferentes tipos de boquillas:

(A) boquilla de punta múltiple, (B) sistema de liberación simple, y (C) agujas concéntricas.

Distintos tipos de colectores:

(A) estacionario (substrato conductor conectado a tierra), (B) mandril, (C) bobina, y (D) marco metálico [25].

1.5.1 Variables del proceso de electrospinning

El control de la morfología y textura superficial de las nanofibras producidas por el proceso de electrospinning depende de un gran número de parámetros, entre los que se encuentran:

- aspectos termodinámicos del solvente y del polímero, tales como la presión de vapor, temperatura de cristalización y de transición vítrea, solubilidad del polímero en el solvente o mezcla de solventes, su peso molecular y su distribución de pesos moleculares;
- propiedades intrínsecas de la solución: viscosidad intrínseca, concentración, conductividad eléctrica y tensión superficial;
- variables del proceso: voltaje aplicado, distancia entre la aguja y la placa colectora, velocidad de flujo de la solución;

- parámetros ambientales: temperatura de la solución y humedad en la cámara de electrospinning.

1.5.1.1 Viscosidad / concentración

La viscosidad de la solución polimérica (que depende de la concentración del polímero) es uno de los principales determinantes de la morfología y tamaño de las fibras poliméricas electrohiladas. La relación entre la viscosidad del polímero y/o la concentración en las fibras obtenidas por electrospinning se estudió en un gran número de sistemas. Influyen también otros factores como las características propias del polímero (peso molecular, polidispersidad, grado de ramificación), el tipo de solvente, la temperatura y la presencia de aditivos [30]. Todos estos factores juegan un papel vital en la iniciación y estabilización de una estructura fibrosa.

Dependiendo de las propiedades reológicas de la solución pueden producirse diferentes estructuras: perlas o gotas aisladas, fibras con perlas, y fibras. Para un polímero con determinado peso molecular, el efecto de la concentración en la ruptura del microchorro de solución puede describirse por medio de dos concentraciones críticas, C_i y C_f , que definen la transición morfológica de una estructura que sólo contiene perlas dispersas a una estructura constituida solamente por fibras. A concentraciones de polímero por debajo de C_i , el enmarañamiento de cadenas en la solución (*entanglement*) es insuficiente y se produce una dispersión de gotas (*electrospray*) (**Figura 4**). Entre C_i y C_f , se obtiene una combinación de perlas y fibras, y cuando la concentración se aumenta por encima de C_f se producen solamente fibras [31, 32]. A mayor concentración que la concentración de enmarañamiento (C_f) se forman fibras libres de perlas. En soluciones muy concentradas, y por lo tanto muy viscosas, la gota se seca en la punta de la aguja por evaporación del solvente, antes de que se pueda formar el microchorro. Esto impide el proceso de electrospinning [24].

El número de Berry (Be) proporciona una indicación importante de la conformación molecular y juega un rol fundamental en la capacidad de formar fibras y en el control del diámetro de las mismas. Este número adimensional es el producto de la viscosidad intrínseca y la concentración de la solución polimérica ($Be = [\eta].C$). Para cada sistema existen rangos de Be entre los cuales la conformación de las cadenas poliméricas en solución permite obtener diversas morfologías mencionadas anteriormente.

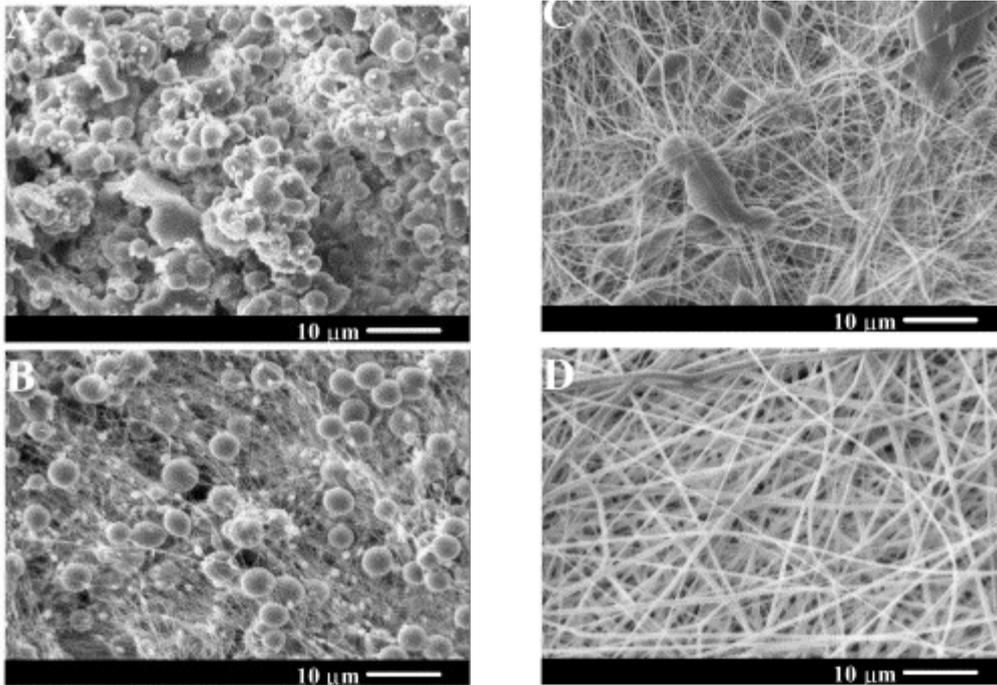


Figura 4: Efecto de la concentración de la solución en la estructura de las fibras electrohiladas de P(D,L-LA): A:20 % en peso; B: 25 %; C: 30 %; D: 35 % [30].

En general se observa que el diámetro de las fibras producido por electrospinning aumenta con el aumento de la concentración de la solución. Por otro lado, un aumento en el diámetro de las fibras se correlaciona directamente con un descenso del área superficial de las matrices electrohiladas.

1.5.1.2 Conductividad / densidad de carga de la solución

El aumento de la conductividad de la solución o la densidad de carga puede utilizarse para producir fibras más uniformes con menor presencia de gotas o perlas. Una forma de aumentar la conductividad de la solución consiste en el agregado de sal o alcohol al solvente, resultando en fibras más lisas con presencia de pocas perlas. Por otra parte, el agregado de sustancias que reducen la conductividad de la solución, como por ejemplo el tetraclorometano, produce perlas de mayor tamaño. El agregado de surfactantes catiónicos evita la formación de perlas, mientras que los surfactantes no iónicos producen la formación de perlas. Por lo tanto, los surfactantes con carga aumentan la conductividad de la solución y la densidad de la carga neta, produciendo un aumento en la inestabilidad por *whipping* y produciendo fibras más uniformes [30]. La incorporación de nanotubos de SWCNT o PANI mejora notablemente la resistencia

mecánica y la conductividad eléctrica de las fibras. Uno de los principales problemas asociados con las nanopartículas es el logro de dispersiones o distribuciones homogéneas.

1.5.1.3 Tensión superficial

La tensión superficial influye en la morfología y tamaño de las fibras electrohiladas. El agregado de etanol a las soluciones poliméricas baja la tensión superficial. La forma de las fibras resultantes depende de si el etanol se comporta como un solvente o no. En los casos en donde el etanol es buen solvente del polímero la formación de perlas disminuye, por el contrario, cuando el etanol no es solvente del polímero, la formación de perlas aumenta [24].

1.5.1.4 Peso molecular y polidispersidad del polímero

Algunos investigadores estudiaron la dependencia de la morfología y tamaño de las fibras electrohiladas con el peso molecular del polímero. Gupta *et al.* [33] determinaron la concentración crítica de superposición de cadenas (C^*) para una serie de polimetilmetacrilatos (PMMA) con distinto peso molecular. En ese trabajo se encontró que C^* disminuye con el aumento del peso molecular. Manteniendo todas las condiciones del proceso de electrospinning constantes, se observó que cuando se incrementa el peso molecular se redujo el número de perlas y gotas. Las fibras uniformes se obtuvieron a concentraciones seis o más veces mayor que C^* , independientemente del peso molecular.

Además, los polímeros con una distribución de pesos moleculares más estrecha formaron fibras a concentraciones menores que los polímeros con mayor polidispersidad.

1.5.1.5 Momento dipolar y constante dieléctrica

Existen escasos estudios que investigan sistemáticamente el efecto del momento dipolar y la constante dieléctrica en las propiedades de las fibras, dado que estos parámetros son difíciles de aislar [24]. Se estudió el electrohilado del poliestireno en 18

solventes distintos, y los únicos solventes que resultaron exitosos tenían valores altos de momento dipolar.

1.5.1.6 Velocidad de flujo

En general, se encontró que bajas velocidades de flujo producen fibras con menores diámetros. Altas velocidades de flujo resultan en fibras con perlas, ya que las fibras no tienen tiempo de secarse antes de llegar al colector [24].

1.5.1.7 Campo eléctrico / voltaje

Uno de los parámetros más estudiados dentro de las variables controlables es el efecto del voltaje aplicado (**Figura 5**). A bajos voltajes, una gota suspendida de la punta de la aguja origina un microchorro a partir del cono de Taylor, produciendo un hilado libre de perlas (asumiendo que la fuerza del campo eléctrico es suficiente para superar la tensión superficial). A medida que se aumenta el voltaje, el volumen de la gota en la aguja disminuye, produciendo una disminución en el cono de Taylor. El microchorro se origina desde la superficie líquida en la aguja, y se observan más perlas. Si se aumenta el voltaje más aún, el jet se mueve alrededor del final de la aguja, no se observa el cono de Taylor; y bajo estas condiciones, se obtienen muchas perlas en las fibras producidas [24]. En cuanto a la influencia del voltaje en el diámetro de las fibras obtenidas, se observó que cuando el voltaje aplicado aumenta, la velocidad del microchorro aumenta y la solución se libera de la aguja más rápidamente. En general, el diámetro de las fibras disminuye cuando el voltaje aplicado aumenta [30].

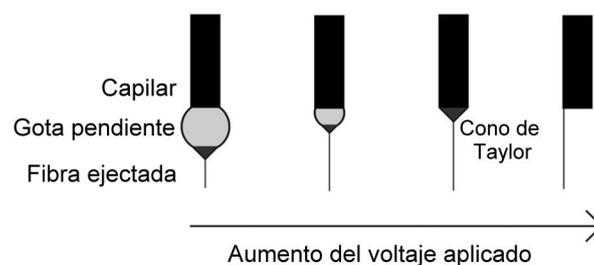


Figura 5: Efecto del voltaje aplicado en el diámetro fibra eyectada [51].

1.5.1.8 Distancia entre la boquilla y el colector

Variando la distancia entre la punta y el colector, como otra aproximación para controlar la morfología y tamaño de las fibras, se encontró que se requiere una distancia mínima para otorgarles a las fibras suficiente tiempo para secarse antes de alcanzar el colector (**Figura 6**). A distancias que son muy cercanas o muy lejanas, se observó la presencia de perlas [24]. En el caso de distancias muy cercanas, la estructura obtenida se debe a que las fibras o gotas que alcanzan la superficie del substrato están húmedas, esto conlleva al colapso, aplastamiento o coalescencia de las fibras. A distancias muy grandes de deposición, en cambio, el solvente se evapora completamente y en consecuencia se obtiene una estructura abierta con fibras redondeadas [30].

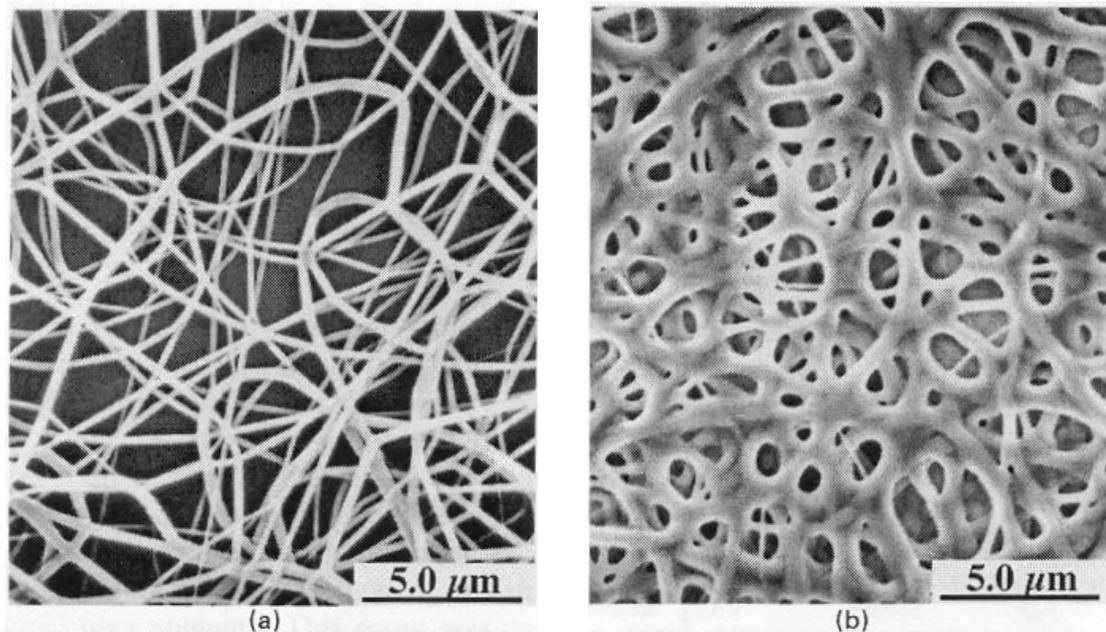


Figura 6: Efecto de la distancia de deposición en la estructura de las fibras electrohiladas. a) 2,0 cm (fibras redondas) b) 0,5 cm (fibras planas) [30].

1.5.1.9 Parámetros ambientales

Los efectos de los parámetros ambientales (por ejemplo temperatura y humedad) en el proceso de electrospinning se estudiaron muy poco. Mit-Uppatahm *et al.* [34] procesaron fibras de poliamida-6 en un rango de temperaturas desde los 25°C hasta 60°C. Encontraron que el aumento de la temperatura produce fibras con un menor

diámetro, y atribuyeron esta disminución a un descenso en la viscosidad de la solución polimérica a altas temperaturas [24]. Casper *et al.* [35] variaron la humedad al procesar soluciones de poliestireno por electrospinning. Su trabajo muestra que el aumento de la humedad resulta en una estructura con poros circulares pequeños en la superficie de las fibras y un aumento mayor de la humedad conlleva a la coalescencia de los poros. También se realizó electrospinning bajo vacío para obtener mayores campos eléctricos; en estas condiciones se producen fibras e hilados de mayores diámetros.

1.5.2 Estructura de las fibras producidas por electrospinning

Las fibras pueden presentar una variedad de secciones transversales: fibras redondas, ramificadas, planas, divididas y con perlas colapsadas con varios polímeros. Un ejemplo de fibras redondas se observa en la **Figura 7**.

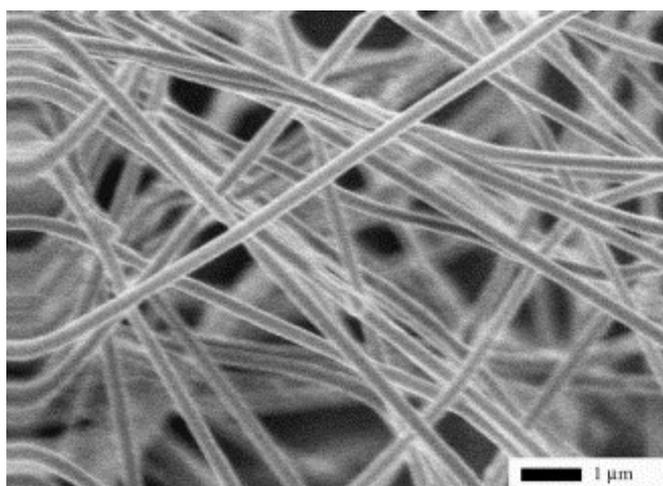


Figura 7: Fibras de PEO electrohilado con sección transversal circular [30].

Las fibras planas presentes en la **Figura 8** pueden generarse por el colapso de fibras huecas durante la evaporación del solvente. Una fibra hueca con morfología tipo perlas con microfibras pueden también colapsar y formar una estructura como la que se observa en la **Figura 8**. En la **Figura 9** se observan ejemplos de fibras ramificadas y divididas. La evaporación del solvente y la elongación del flujo del microchorro cambian la forma y la carga por unidad de área presente en el microchorro. El balance de la fuerza eléctrica y la tensión superficial cambia rápidamente, de modo que la forma del microchorro se vuelve inestable. Este microchorro inestable reduce su carga local por unidad de área superficial al despedir un microchorro menor desde la superficie del

microchorro primario. Esta inestabilidad conlleva a la formación de fibras ramificadas. Las fibras divididas se forman al dividirse el microchorro primario en dos microchorros menores a partir del microchorro primario [30].

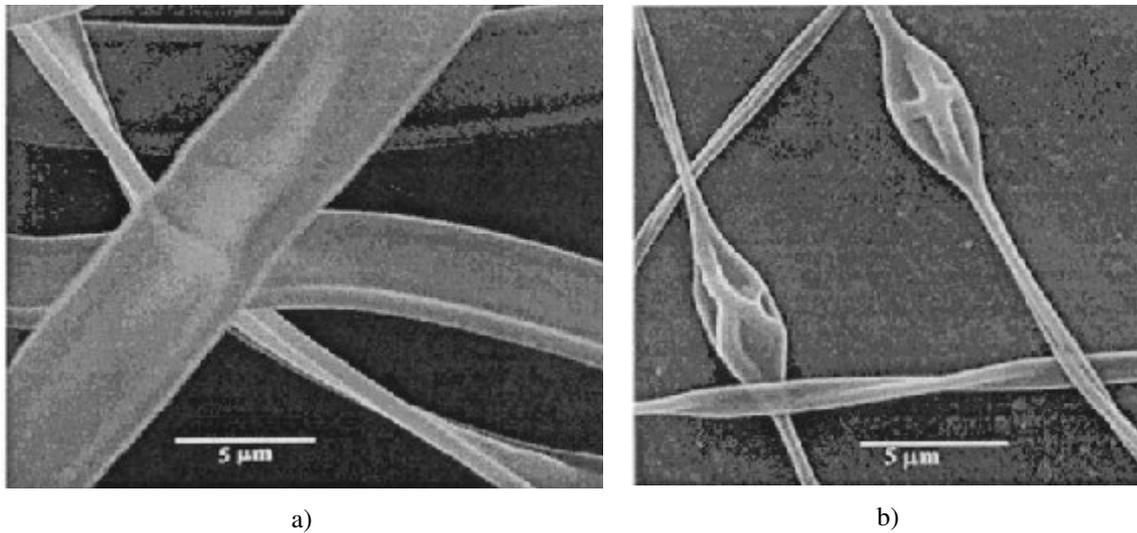


Figura 8: Fotografía de fibras planas (a) y perlas colapsadas (b) producidas por electrospinning [30].

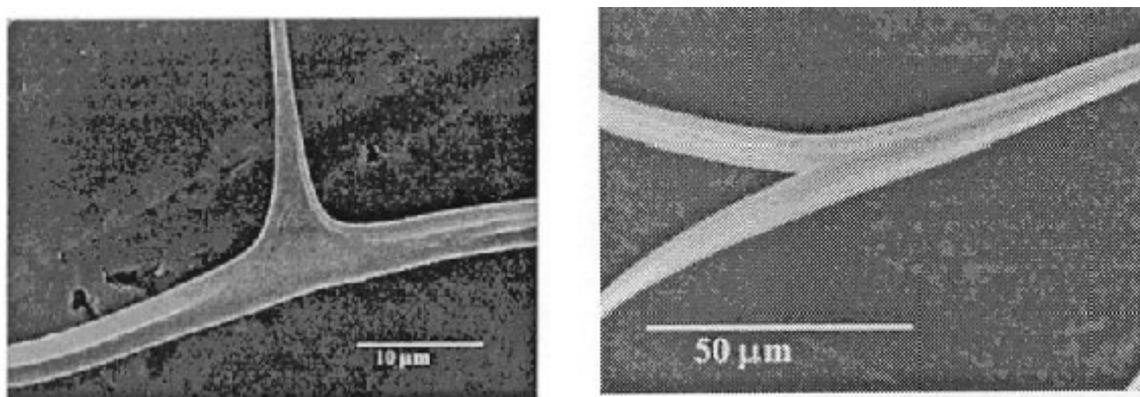


Figura 9: Fotografía de fibras ramificadas (a) y divididas (b) formadas por electrospinning [30].

1.6 Polímeros conductores

Las familias de polímeros conductores más comunes incluyen poliacetileno, polipirrol (PPy), politiofeno, polianilina (PANI) y poli(para-fenileno vinileno) [36]. La conductividad en estos materiales surge de la presencia de enlaces dobles conjugados a lo largo del esqueleto de una estructura que de otra manera sería aislante. En la conjugación, se presentan enlaces dobles y simples alternadamente entre los átomos de carbono. Cada unión en la cadena contiene una unión “sigma” (σ) localizada que forma

un enlace químico fuerte y cada enlace doble también contiene una unión “pi” (π) menos fuertemente localizada. La conductividad se imparte a los polímeros a través del uso de un ión dopante, el cual debe introducirse en la estructura para portar la carga en la forma de electrones extras. El dopante neutraliza la cadena inestable cuando el polímero se encuentra en su forma oxidada. Dependiendo de la carga y movilidad del dopante, la aplicación de un potencial a través de un film de polimérico conductor, genera un flujo de iones por adentro o por afuera del film, que perturba la estabilidad de la cadena resultando en el paso de carga a través del film.

Los polímeros conductores se fabrican por una variedad de métodos que son de naturaleza química o electroquímica [37].

Los estudios de las aplicaciones de los polímeros conductores en biomedicina se expandieron en los últimos años con el descubrimiento en 1980 de la compatibilidad con varias moléculas biológicas como las usadas en biosensores. Para mediados de 1990, se reportó que los polímeros conductores eran capaces de modular la actividad celular por medio de estimulación eléctrica, incluyendo adhesión celular, migración, síntesis de ADN y secreción de proteínas. Muchos de estos estudios se realizaron con células nerviosas, óseas, cardíacas y musculares, que responden a impulsos eléctricos. Muchos polímeros conductores presentan un número importante de ventajas para aplicaciones biomédicas, entre las que se incluyen biocompatibilidad, habilidad para atrapar y liberar controladamente moléculas biológicas, habilidad para transferir carga desde una reacción bioquímica, y el potencial de alterar fácilmente las propiedades eléctricas, químicas, físicas para adaptarse mejor a la naturaleza de aplicaciones específicas. Estas características únicas son útiles en aplicaciones como biosensores, en matrices para ingeniería de tejidos, sondas neuronales, dispositivos de liberación controlada de drogas, y bio-actuadores.

En aplicaciones biológicas, los polímeros conductores exhiben muchas ventajas sobre otro tipo de materiales electroactivos. Los polímeros conductores son baratos, fáciles de sintetizar y versátiles, ya que sus propiedades pueden modularse fácilmente por una amplia gama de moléculas que se pueden atrapar o usar como dopantes. Además, los polímeros conductores permiten controlar el nivel y duración de la estimulación eléctrica para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Estos polímeros se pueden procesar para crear substratos con alta área superficial, aspecto muy importante en ingeniería de tejidos [38].

1.6.2 Polianilina (PANI)

La polianilina (PANI) es uno de los polímeros conductores más prometedores debido a sus propiedades únicas (que incluyen conductividad eléctrica controlable, estabilidad ambiental, reacciones redox, y biocompatibilidad [38]) y sus numerosas aplicaciones, como recubrimientos anticorrosivos, baterías, sensores, membranas separadoras, recubrimientos antiestáticos y blindaje para interferencias electromagnéticas [39]. Recientemente, se exploró el uso de PANI para aplicaciones biomédicas, incluyendo ingeniería de tejidos. Los investigadores justifican el uso de los polímeros conductores en la hipótesis que una cantidad de funciones celulares, como unión, proliferación, migración, y diferenciación pueden ser moduladas a través de la estimulación eléctrica [36]. En base a esta hipótesis, se desarrollaron matrices inteligentes para ingeniería de tejidos cardíacos y/o neuronales. Los polímeros conductores brindan superficies potencialmente interesantes para el cultivo celular ya que sus propiedades (por ejemplo carga superficial, habilidad de mojado, y cambios dimensionales y conformacionales) pueden ser alteradas reversiblemente por reducción u oxidación química o electroquímica. Mattioli-Belmonte *et al.* [40] fueron los primeros en demostrar que PANI es biocompatible *in vitro* y en estudios *in vivo* en animales a largo plazo. Sin embargo, estos grupos investigaron el comportamiento de films en vez de nanofibras. Díaz *et al.* [41] produjeron nanofibras de PANI mezclada con poliestireno (PS) y/o óxido de polietileno (PEO) [36]. Los estudios recientes demostraron que la PANI y sus derivados se comportan como sustratos biocompatibles, ya que tanto los mioblastos cardíacos H9c2 [36, 42] como las células de feocromocitoma PC12 presentan buena adherencia, crecimiento y/o diferenciación [39].

La biocompatibilidad de los polímeros electroactivos se mejora al mezclarlos con materiales bioactivos (por ejemplo, PANI con colágeno y gelatina). Un problema que obstaculiza la aplicación de los polímeros conductores es su baja solubilidad y procesabilidad. La solubilidad de la PANI se mejora al unir covalentemente grupos laterales o polímeros, como el poli(etilen glicol) y el poli(ácido acrílico), en el esqueleto de PANI. La mayoría de los grupos investigaron las propiedades biológicas en la forma de membranas (filmes) en lugar de nanofibras. En un trabajo reciente Li *et al.* [36] reportaron el comportamiento de nanofibras electrohiladas compuestas de PANI y gelatina, empleando concentraciones de PANI entre 0,66 y 5,33 % m/m. Sus resultados

muestran que las fibras se vuelven más homogéneas y su diámetro disminuye al aumentar la concentración de PANI.

1.7 Nanotubos de carbono (SWCNT)

Desde su descubrimiento, los nanotubos de carbono (SWCNT) encontraron diversos usos tecnológicos entre las que se incluyen aplicaciones biomédicas [43] y los estudios acerca de su citotoxicidad están en pleno desarrollo [44]. Dado que la matriz juega un rol crucial en ingeniería de tejidos, la incorporación de SWCNT como soporte estructural en las mismas tiene una influencia directa sobre las propiedades de las matrices resultantes.

El desarrollo de materiales poliméricos cargados con SWCNT u otras nanopartículas/nanofibras no sólo ofrece la posibilidad de mejorar las propiedades mecánicas de una matriz, sino también introducir una funcionalidad adicional mediante la incorporación de nanofases con características particulares.

Los SWCNT se emplean en cantidades muy pequeñas y aunque no son biodegradables pueden eliminarse rápidamente del organismo vivo. Esto significa que las matrices diseñadas con polímeros biorreabsorbibles y SWCNT pueden ser apropiadas para el desarrollo de sistemas de soporte para ingeniería tisular. Los principales problemas que quedan por resolver en la preparación de materiales nanocompuestos son la dispersión y la adhesión nanopartícula/matriz, así como el control en la orientación y alineación. El principal obstáculo para el uso de SWCNT es su elevada tendencia a agruparse en forma paralela formando racimos difíciles de separar y por lo tanto prácticamente insolubles en cualquier solvente. Una de las técnicas empleadas para dispersar homogéneamente los SWCNT y mejorar su solubilidad consiste en la funcionalización covalente con grupos funcionales polares o no polares, que favorecen además la compatibilidad de los SWCNT y la matriz polimérica. La funcionalización también juega un papel preponderante, ya que estos grupos pueden actuar como iniciadores de polimerización (*grafting from*) [45,46].

Si bien la motivación inicial para el empleo de nanopartículas es la capacidad de proveer un refuerzo mecánico, la conductividad eléctrica de las mismas puede ser una herramienta muy útil para mejorar la funcionalidad de los materiales. Existen evidencias de que los SWCNTs pueden estimular el crecimiento celular, acelerando y dirigiendo el

crecimiento de células [47]. Los SWCNTs pueden también funcionalizarse para permitir la liberación de principios bioactivos (enzimas, proteínas, etc). [43,48].

2. Objetivos del proyecto

El presente proyecto final tiene por objetivo general la preparación y caracterización de matrices poliuretánicas y nanocompuestas obtenidas mediante la técnica de electrospinning. En particular en este trabajo se busca:

- Poner a punto de la técnica de electrospinning de soluciones poliuretánicas con o sin nanopartículas (nanotubos de carbono y nanotubos de polianilina).
- Optimizar los parámetros del proceso para preparación de matrices nanofibras poliuretánicas y/o compuestas.
- Caracterizar la morfología (micro y nanoestructura) de los materiales preparados.
- Estudiar algunas propiedades de las membranas nanofibras obtenidas en vista a su potencial aplicación en dispositivos biomédicos e ingeniería de tejidos.

La técnica de electrospinning se encuentra disponible desde hace muy poco tiempo en el Laboratorio de Polímeros Biomédicos de INTEMA. El desarrollo de este trabajo contribuye al conocimiento de diversos aspectos del proceso de electrospinning de soluciones poliméricas, con las dificultades experimentales propias de la puesta a punto de una técnica nueva.

3. Materiales

Se empleó un poli(éter uretano) segmentado alifático, Tecoflex 60D (Noveon Inc.). Este poliuretano, empleado en diversos dispositivos cardiovasculares, tiene grado médico, característica que indica la calidad de un biomaterial desde el punto de vista de su aceptabilidad para uso en dispositivos médicos [49]. Por lo tanto el material se sintetizó en condiciones especiales, evitando el empleo de aditivos no esenciales y de potenciales contaminantes. La formulación de Tecoflex 60D está diseñada para su procesamiento mediante la preparación de soluciones (grado solución), que se diferencia de las formulaciones grado extrusión, dado que no contienen lubricantes que intervienen en el proceso de fusión. Tecoflex pertenece a una familia de poliuretanos termoplásticos que están disponibles en durezas 80 Shore A, 85 Shore A, 93 Shore A y 60 Shore D. En el presente trabajo se ha seleccionado la formulación con mayor dureza, es decir 60D, que está sintetizado a partir de 4,4'-diisocianatodieciclohexilmetano (H₁₂MDI), 1,4-butanodiol (BDO) y politetrametiléneterglicol (PTMG) de peso molecular 1000 KDa.

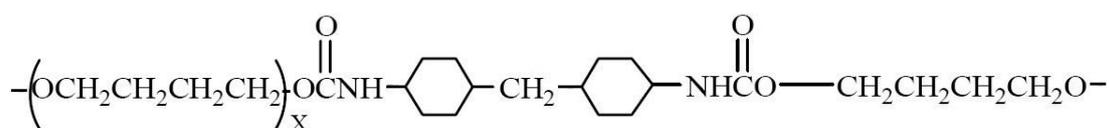


Figura 10: Estructura química idealizada de Tecoflex.

Para la preparación de nanofibras nanocompuestas se emplearon dos tipos de nanopartículas: 1) nanotubos de carbono de pared simple (SWNT) sintetizados por el proceso CoMoCat (South West Nanotechnologies, Norman, Oklahoma, EEUU) y 2) nanotubos de polianilina protonados (PANI) sintetizados y caracterizados en el Laboratorio de Biomateriales del Departamento de Física e Química, Instituto de Ciências Exatas (ICE), Universidad Federal de Itajubá, Minas Gerais, Brasil, a cargo del Dr. Álvaro A. A. de Queiroz. En el Anexo III se detalla el proceso seguido para sintetizar y caracterizar los SWCNT y el PANI.

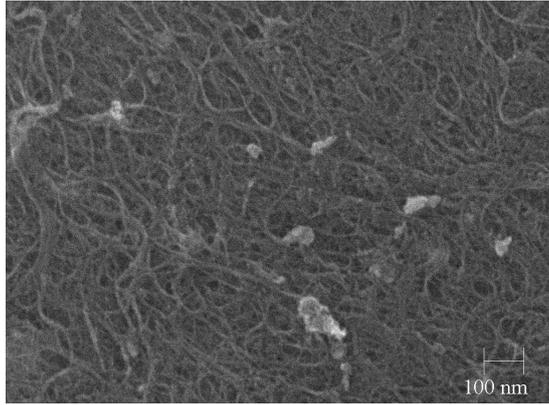


Figura 11: Micrografía SEM de SWCNT.

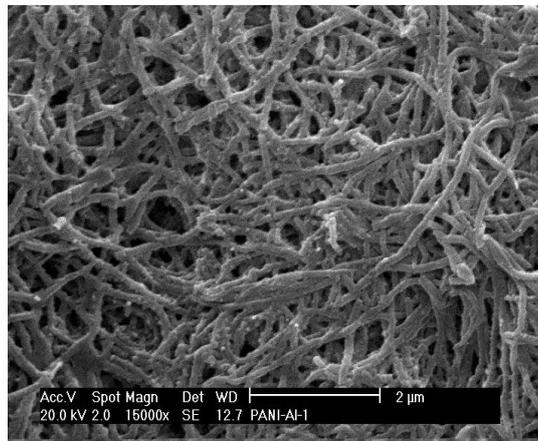


Figura 12: Micrografía SEM de PANI

4. Métodos

4.1 Preparación de soluciones y suspensiones

Tecoflex 60D se disuelve completamente en cloroformo, *N,N*-dimetilformamida (DMF) y *N,N*-dimetilacetamida, mientras que en otros solventes orgánicos presenta distintos porcentajes de hinchamiento. Los mayores niveles de hinchamiento se observan en dioxano (500%), diclorometano (700%) y tetrahidrofurano (THF) (900%). Tecoflex 60D es insoluble en acetona, hexano, ciclohexano, metanol, etanol, isopropanol (IPA) y metiletilcetona.

Las soluciones se prepararon disolviendo el polímero en el solvente en un baño termostático, manteniendo la temperatura por debajo de la temperatura de ebullición del solvente. En el caso en que se utilizó una mezcla de solventes primero se disolvió el polímero en el mejor solvente y luego se agregó el otro. La disolución completa del poliuretano llevó un promedio de tres días por cada solución.

Las suspensiones poliuretano/nanopartícula de distinta concentración polímero/solvente y nanopartícula/polímero se prepararon utilizando solventes orgánicos (o mezclas de solventes) que disuelvan el Tecoflex 60D y al mismo tiempo permitan mantener una suspensión estable de las nanopartículas. Los nanotubos de carbono se suspenden correctamente en amidas (como DMF y *N*-metilpirrolidona), ciclopentanona, ϵ -caprolactona y *o*-diclorobenceno [54, 55]. Los solventes orgánicos próticos, como los alcoholes, no son buenos solventes, aunque el IPA ha sido utilizado para suspender nanotubos durante el lavado [45].

Las nanopartículas tienden a aglomerarse por la atracción ejercida por las fuerzas de Van der Waals. Para obtener una buena dispersión de las mismas en la solución y luego en la matriz se suspendieron las nanopartículas utilizando un sonicador Sonics Vibra Cell 130W/20kHz con una punta de 6 mm de diámetro (División Cerámicos INTEMA). Las nanopartículas se suspendieron en THF por 2 minutos al 50% de potencia del equipo. Luego la suspensión se agregó a la solución polimérica en DMF y una vez homogeneizada la mezcla se sonicó durante 2 minutos al 50% de potencia. En el caso de formulaciones con 1,5 y 2 % de nanopartículas se empleó un mayor tiempo de sonicación (siempre en ciclos de 2 minutos al 50% de potencia) para lograr una mejor suspensión.

4.2 Obtención de matrices poliuretánicas nanofibrosas no tejidas mediante electrospinning

En este trabajo se variaron algunas propiedades intrínsecas de la solución polimérica y parámetros del procesamiento para optimizar la preparación de nanofibras poliuretánicas de morfología controlada. La **Tabla 1** resume las muestras y parámetros de procesamiento estudiados.

- Sección 5.1.1- propiedades intrínsecas de la solución poliuretánica:
Solvente: DMF:THF (100:0, 83:17, 50:50) y DMF:IPA (50:50)
Concentración, C (% m/V): 6 y 12,5
Contenido de nanopartículas (% m/m): 0; 0,5; 1; 1,5 y 2 (*Sección 5.2*)
- Sección 5.1.2 - parámetros del proceso:
Voltaje aplicado, V (kV): 12, 15, 17, 20
Distancia aguja – placa colectora, h (cm): 10, 12, 15
Velocidad de flujo de la solución, f (mL/h): 0,3; 0,5; 1

Tabla 1: Muestras y parámetros de procesamiento estudiados

Flujo (mL/h)	1							0,5					0,3		
Distancia (cm)	10			12	15			10			12	15	10	12	15
Voltaje (kV)	10	12	15	15	15	17	20	10	12	15	15	20	12	15	20
V/d (kV/cm)	1	1,2	1,5	1,25	1	1,1333	1,3333	1	1,2	1,5	1,25	1,3333	1,2	1,25	1,3333
Tecoflex 6% DMF:THF 50:50	fig 1 (A IV)	fig 17	fig 2 (A IV)		fig 3 (A IV)	fig 4 (A IV)	fig 5 (A IV)								
Tecoflex 12,5% DMF:IPA 50:50											fig 47	fig 49			
Tecoflex 12.5% DMF:THF															
100:0		fig 14		fig 8 (A IV)											
83:17		fig 15		fig 9 (A IV)			fig 10 (A IV)		fig 11 (A IV)		fig 12 (A IV)	fig 13 (A IV)	fig 14 (A IV)	fig 15 (A IV)	
50:50		fig 16- 30	fig 25		fig 18	fig 20	fig 22		fig 16 (A IV)		fig 32	fig 17 (A IV)	fig 18 (A IV)	fig 34	fig 19 (A IV)
Tecoflex 12.5% DMF:THF 50:50															
0,5% SWCNT											fig 37				
1,0% SWCNT								fig 6 (A IV)	fig 7 (A IV)	fig 8 (A IV)	fig 39				
1,5% SWCNT											fig 41				
2,0% SWCNT											fig 43				
0,5% PANI											fig 51				
1,0% PANI											fig 53				
1,5% PANI											fig 55				
2,0% PANI											fig 57- 61-63				



Figura 13: Fotografía del equipo de electrospinning empleado en este trabajo (Laboratorio de Polímeros Biomédicos, INTEMA)

4.3 Caracterización morfológica

La evaluación de la microestructura se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de los distintos materiales obtenidos variando la composición y los parámetros de procesamiento. Para estudiar la morfología de las membranas y nanofibras, las muestras se metalizaron con Au/Pd y se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (JEOL Modelo JSM-6460LV, Laboratorio de

Microscopía, UNMdP) El análisis de las micrografías SEM se realizó empleando el programa Image-ProPlus para la determinación de la distribución de diámetros de las fibras con la colaboración de la Dra. Azul González (Laboratorio de Mediciones y Procesos de Señales, Área Imágenes, Fac. de Ingeniería, UNMdP). Para examinar la distribución y orientación de las nanopartículas se enviaron membranas al Centro Atómico Bariloche para su estudio mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Lamentablemente el espesor de las membranas enviadas (100 μm) no permitió la transmisión de electrones, por lo que las muestras para los futuros estudios se prepararán directamente sobre las grillas de cobre que se utilizan en TEM.

4.4 Evaluación de la conductividad

La evaluación de la conductividad de las membranas nanocompuestas se llevó a cabo mediante dos métodos: medidas de impedancia y medidas de conductividad por el método de cuatro puntas (*four probe method*).

Las mediciones de impedancia se realizaron empleando un impedancímetro Hewlett Packard 4284A (División Cerámicos de INTEMA), con la colaboración del Dr. Leandro Ramajo. Se prepararon matrices con distintos porcentajes de nanopartículas conductoras (0, 0,5, 1, 1,5 y 2% de SWCNT y PANI). Para efectuar las mediciones eléctricas se cortaron muestras con geometría cuadrada (4 cm x 4 cm) y se colocaron electrodos apropiados sobre los materiales.

En general para la caracterización dieléctrica de cualquier sistema se emplea una configuración tipo C_pD , que representa un material no ideal formado por un condensador en paralelo con una resistencia. La información obtenida para dicha configuración se expresa en términos de capacidad en paralelo y tangente de pérdida. Mediante las **Ecuaciones 1** y **2** es posible transformar los datos a valores de permitividad real e imaginaria, que se usarán luego para caracterizar las membranas nanocompuestas.

$$C_p = \frac{\epsilon \cdot \epsilon_0 \cdot A}{d} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$\tan(\delta) = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Donde ϵ_0 es la permitividad del vacío ($8,85 \cdot 10^{-12}$ F/m), A y d representan el área y el espesor de la muestra, mientras que ϵ' y ϵ'' la parte real e imaginaria de la permitividad.

Mediante la **Ecuación 3** se calculó la conductividad a.c.:

$$\sigma_{ac} = \epsilon_0 \cdot \epsilon'' \cdot \omega \quad (\text{Ecuación 3})$$

Para comparar los resultados experimentales obtenidos por medidas de impedancia (conductividad a.c.) con las medidas de conductividad determinadas por método de cuatro puntas (conductividad d.c.), se calculó primero la impedancia de las muestras a partir de las **Ecuaciones 4, 5 y 6**. Del gráfico de Z'' en función de Z' se obtuvo la resistencia R por extrapolación de la impedancia a frecuencia cero, [52]. Finalmente, con la **Ecuación 7** se calculó la conductividad d.c.

$$R_p = \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot \omega \cdot C_p \cdot \text{tg}(\delta)} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$Z' = \frac{R_p}{1 + (2 \cdot \pi \cdot \omega \cdot C_p \cdot R_p)^2} \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$Z'' = \frac{R_p^2 \cdot 2 \cdot \pi \cdot C_p \cdot \omega}{1 + (2 \cdot \pi \cdot \omega \cdot C_p \cdot R_p)^2} \quad (\text{Ecuación 6})$$

$$\sigma_{dc} = \frac{d}{R \cdot A} \quad (\text{Ecuación 7})$$

La medición de la conductividad por el método de cuatro puntas se efectuó con la colaboración con el Dr. Vinoy Thomas, investigador del Center for Nanoscale Materials and Biointegration, University of Alabama at Birmingham (UAB), USA. Las mediciones de la respuesta corriente – voltaje de las muestras se realizaron a temperatura ambiente con una fuente de corriente Keithley 220 y un electrómetro Keithley 6517A. El uso de cuatro puntas elimina los errores de medición debidos a la resistencia de la punta, la variación de resistencia de cada punta y la resistencia de contacto entre el metal de la punta y el material. Siguiendo este método, los valores de

la conductividad se obtuvieron a partir de la aplicación de corriente eléctrica y la medición del potencial de acuerdo con la siguiente relación:

$$\sigma = \frac{\ln 2}{\pi} \frac{I}{dV} \quad \text{(Ecuación 8)}$$

donde: σ = conductividad eléctrica ($\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), I = corriente eléctrica (A), V = potencial y d = espesor de la muestra (cm).

5. Resultados y Discusión

5.1 Preparación de matrices nanofibrosas de Tecoflex 60D

5.1.1 Propiedades intrínsecas de solución

Para estudiar el comportamiento de las soluciones poliuretánicas en el proceso de electrospinning, se prepararon soluciones de distinta concentración de polímero utilizando diferentes solventes y mezclas de solventes en distintas proporciones.

El efecto del solvente se examinó en soluciones de concentración 12,5% m/V en la que se emplearon DMF, DMF:THF 83:17 y DMF:THF 50:50. Las **Figuras 14, 15 y 16** muestran las morfologías obtenidas empleando $V/d = 1,2$ kV/cm.

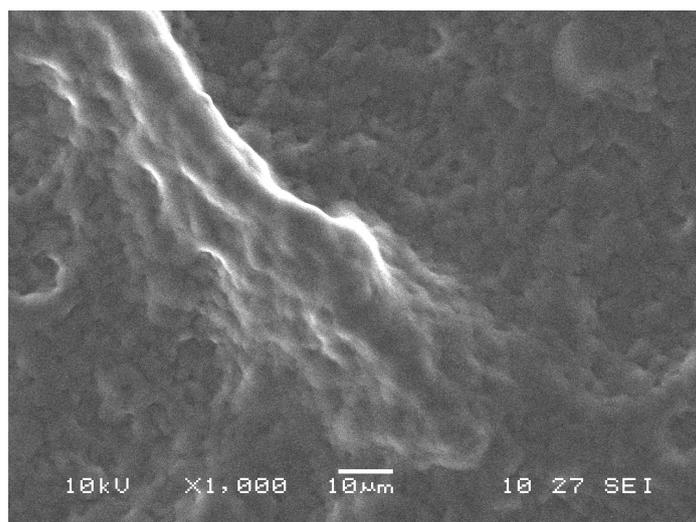


Figura 14: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF, $f = 1$ mL/h; $V = 12$ kV; $d = 10$ cm.

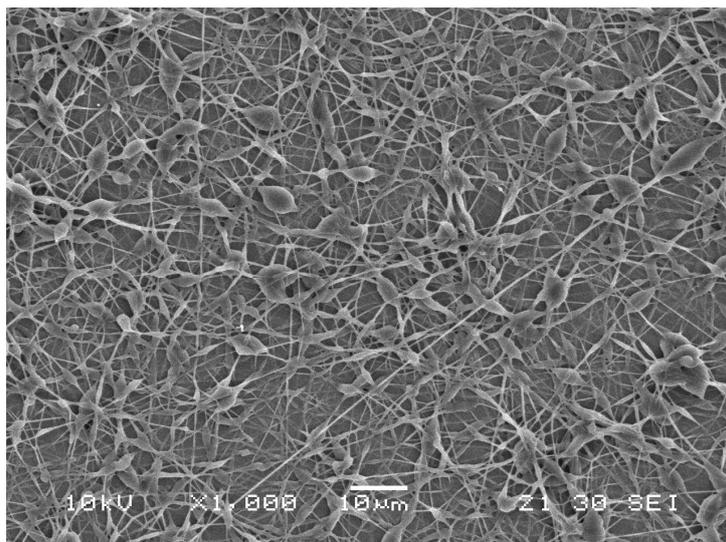


Figura 15: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 83:17, $f = 1$ mL/h; $V = 12$ kV; $d = 10$ cm.

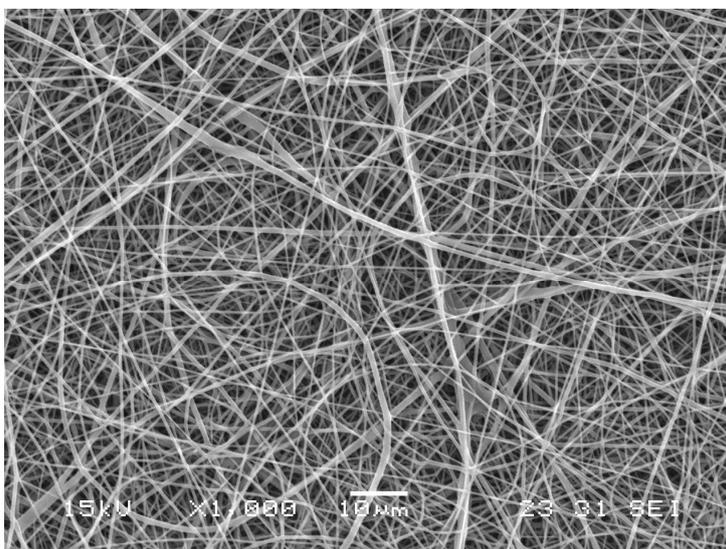


Figura 16: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1$ mL/h; $V = 12$ kV; $d = 10$ cm.

Como puede observarse el tipo y proporción de solvente tiene un efecto significativo en la obtención de estructuras fibrosas. En la solución polimérica con DMF, se obtuvo una estructura no fibrosa constituida por perlas superpuestas (**Figura 14**). Al incorporar 17 % de THF a la solución (**Figura 15**) el contenido de perlas disminuye y se forman fibras. Aumentando el porcentaje de THF a 50% se obtuvo una estructura completamente fibrosa (**Figura 16**), con un diámetro medio de fibras de 596 ± 223 nm. En el proceso de electrospinning el solvente se evapora casi completamente en la trayectoria que recorre el microchorro entre los electrodos durante el tiempo de proyección. Si bien DMF es un buen solvente del poliuretano, posee un punto de

ebullición alto (153 °C) por lo que no llega a evaporarse completamente antes de llegar al colector, produciendo gotas o perlas que contienen aún una fracción importante de solvente. El solvente residual genera la unión de las perlas formando lagunas. Por este motivo se incorporó al DMF una determinada cantidad de un solvente con menor punto de ebullición (THF), manteniendo siempre el sistema completamente disuelto. El THF posee una temperatura de ebullición de 66°C, mucho menor que DMF y cuando se incorporó en un 50% favoreció notablemente la formación de fibras.

Manteniendo la mezcla de solventes que permitió la formación de estructuras nanofibrosas (DMF:THF 50:50) se disminuyó la concentración al 6% m/V para explorar la posibilidad de obtener fibras de menor diámetro. La **Figura 17** muestra la morfología de la matriz obtenida.

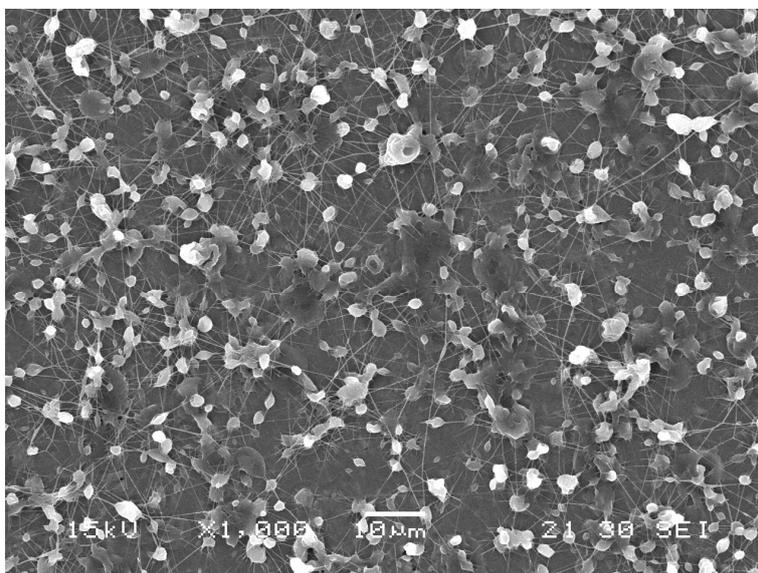


Figura 17: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 6% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1$ mL/h; $V = 12$ kV; $d = 10$ cm.

El efecto de la concentración en la morfología obtenida puede observarse comparando las **Figuras 16** y **17**. La solución de concentración 6% se encontró por debajo de la concentración crítica que permite la formación de fibras, dando lugar a una típica morfología de perlas y fibras (*beaded fibers*). Como era de esperar, la variación de los parámetros del procesamiento con esta solución no mostró ningún cambio en la morfología de los sistemas obtenidos (Anexo IV). Por lo tanto, para el resto de los estudios se seleccionó la concentración 12,5 %, que posee la viscosidad requerida para la generación de enmarañamiento de cadenas que conduce a la formación de fibras.

5.1.2 Parámetros del procesamiento

Los parámetros del procesamiento estudiados se muestran en la **Tabla 1**. Para visualizar el efecto de los cambios en un parámetro dado se mantuvieron constantes los demás.

5.1.2.1 Voltaje aplicado

Para estudiar el efecto del voltaje aplicado en la morfología de fibras obtenidas se fijó una velocidad de flujo de 1 mL/h y una distancia boquilla-colector de 15 cm. Las **Figuras 18, 20 y 22** muestran las morfologías obtenidas.

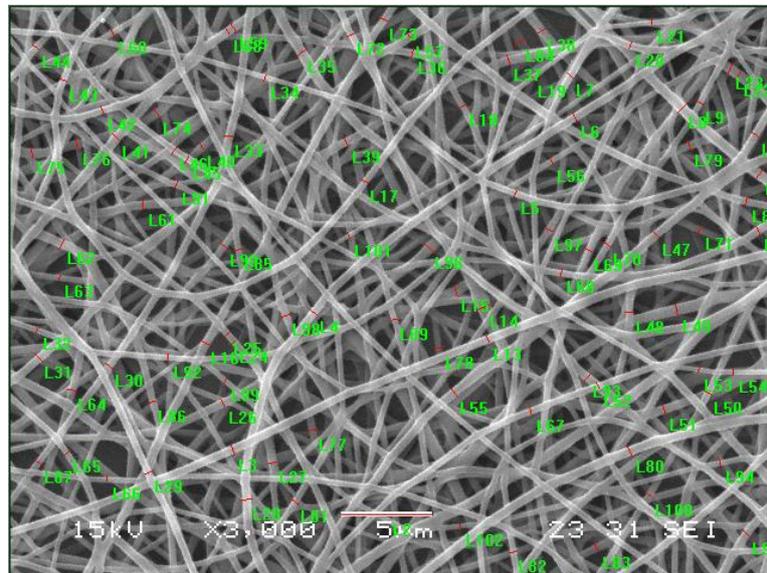


Figura 18: Micrografía de SEM X3000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 15$ cm.

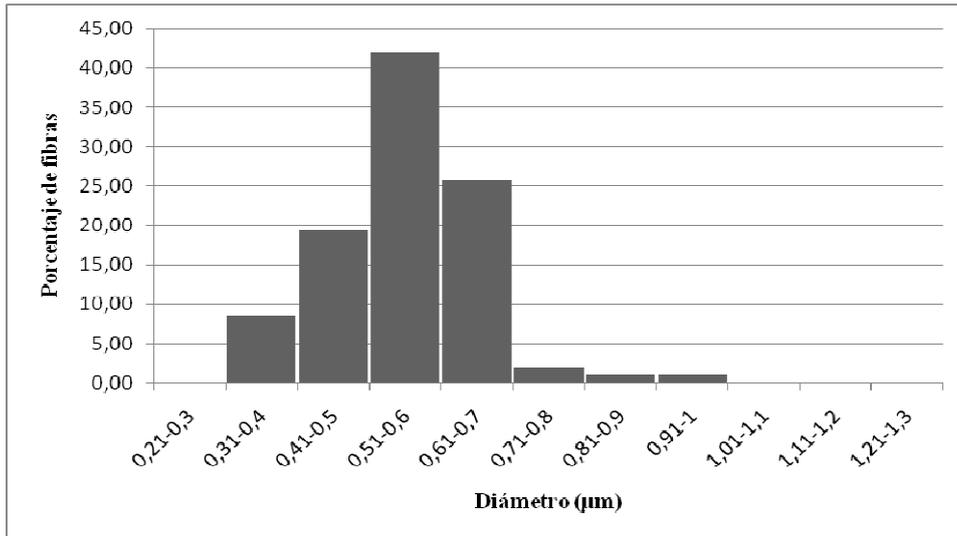


Figura 19: Distribución de diámetros medida en la Figura 18.

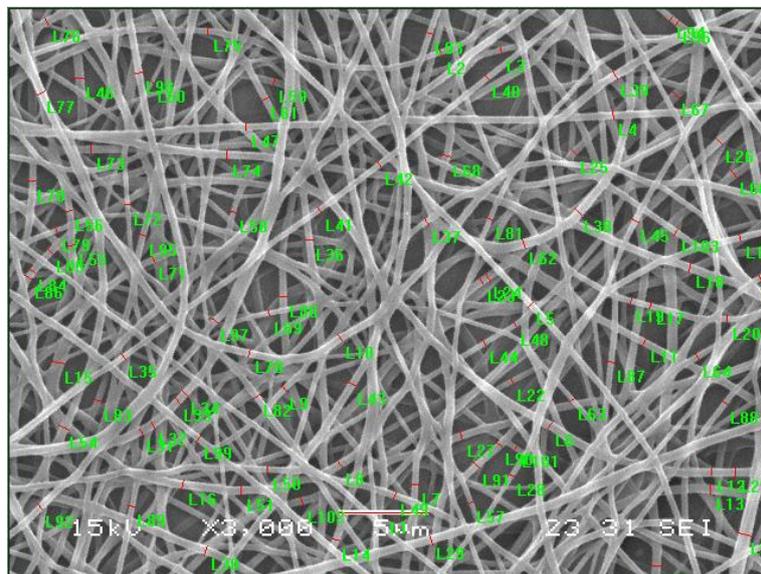


Figura 20: Micrografía de SEM X3000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1$ mL/h; $V = 17$ kV; $d = 15$ cm.

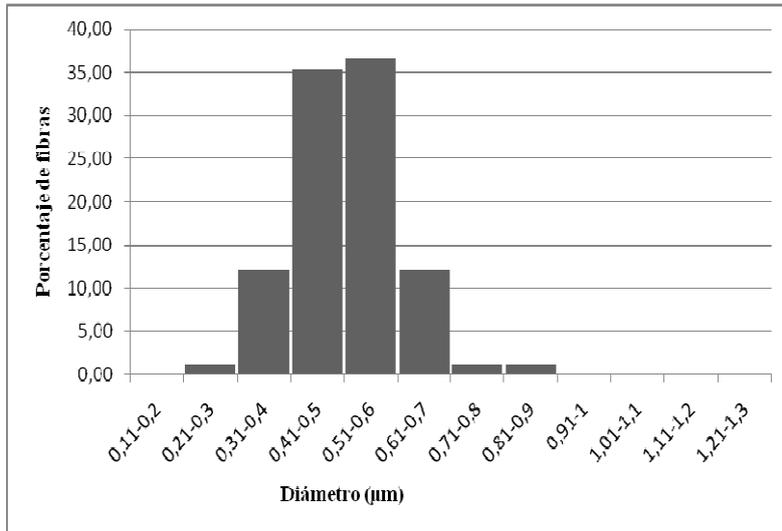


Figura 21: Distribución de diámetros medida en la Figura 20.

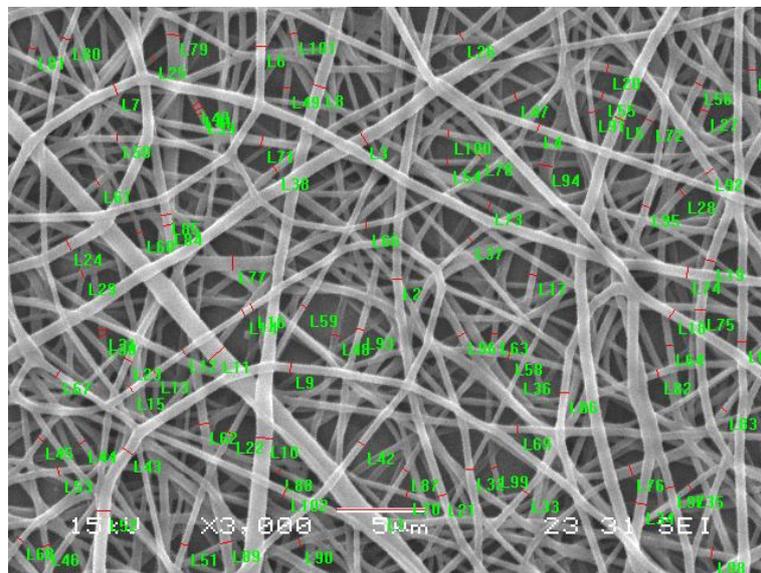


Figura 22: Micrografía de SEM X3000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1$ mL/h; $V = 20$ kV; $d = 15$ cm.

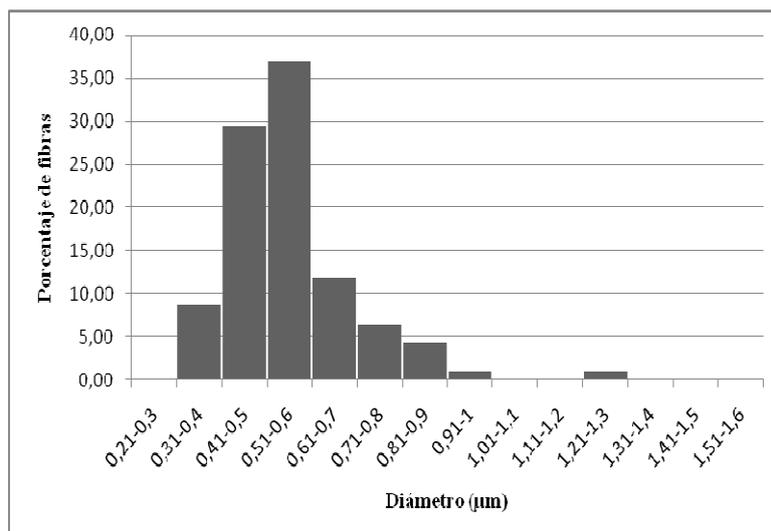


Figura 23: Distribución de diámetros medida en la Figura 22.

No se observa ningún cambio aparente en las morfologías de las fibras obtenidas. Al analizar la distribución de diámetros (**Figuras 19, 21 y 23**) los histogramas no presentan cambios significativos y mantienen la distribución unimodal con un máximo entre los 400 y 600 nanómetros.

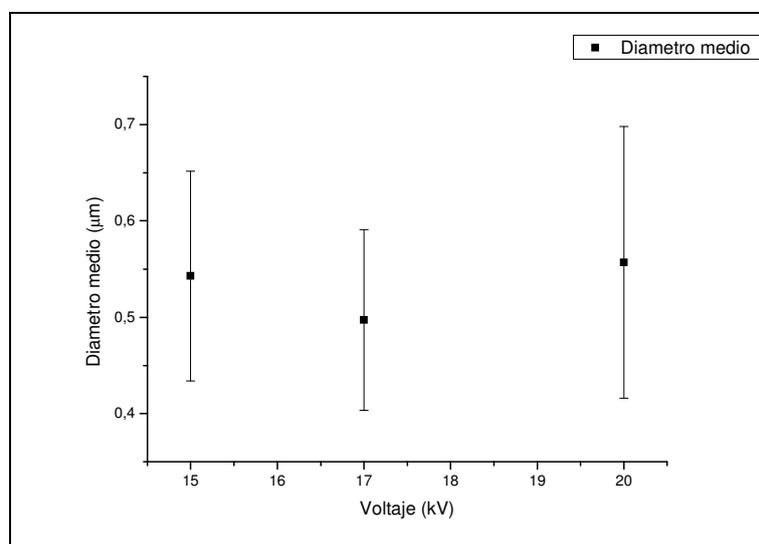


Figura 24: Diámetro medio en función del voltaje aplicado.

Como puede observarse en la **Figura 24** la variación del diámetro medio no revela ninguna tendencia en función del voltaje aplicado. Por lo tanto en el rango de voltaje aplicado no se producen cambios significativos a la estructura obtenida.

5.1.2.2 Distancia entre la boquilla y el colector

Para explorar el efecto de la distancia entre la boquilla y el colector en la morfología de fibras obtenidas se fijó una velocidad de flujo de 1 mL/h y un voltaje de 15 kV. Las **Figuras 25** y **18** muestran las morfologías obtenidas.

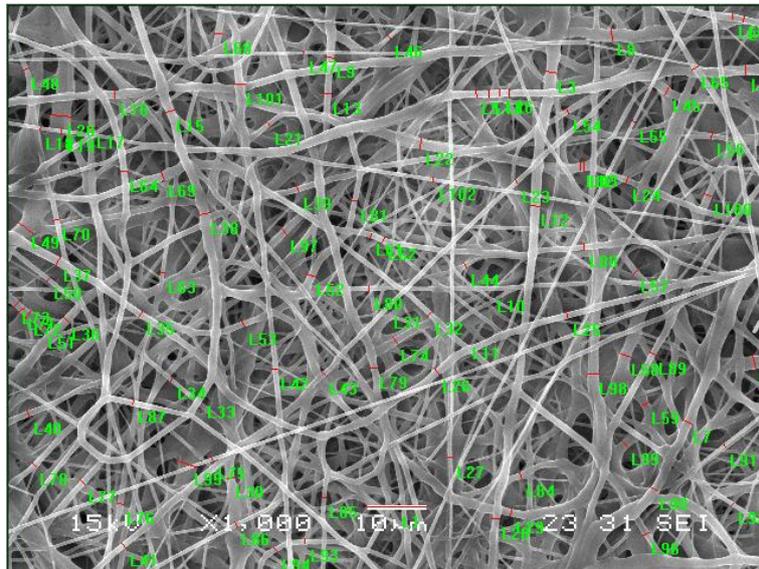


Figura 25: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 10$ cm.

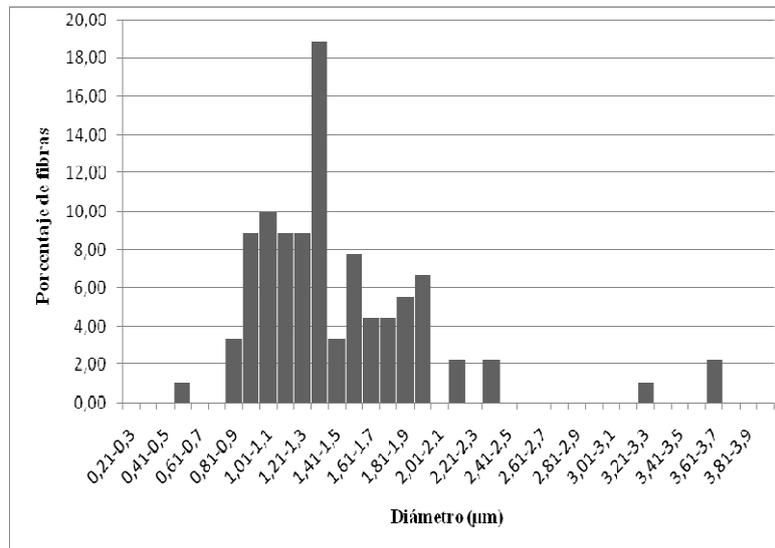


Figura 26: Distribución de diámetros medida en la Figura 25.

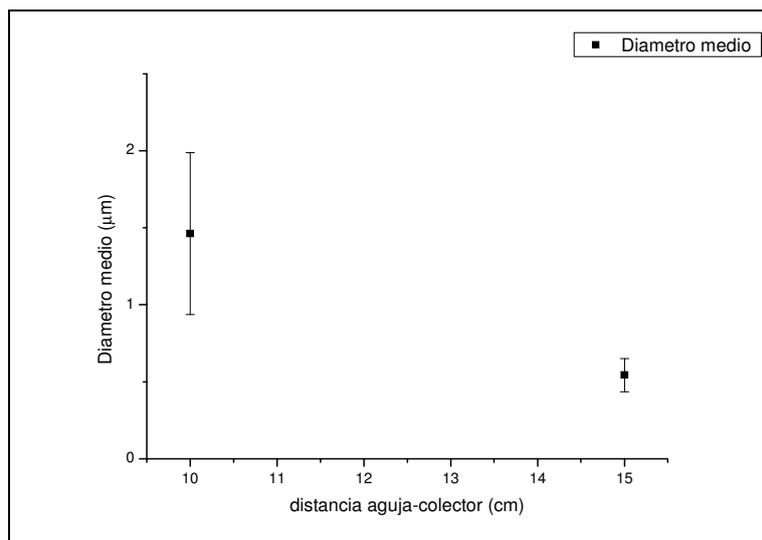


Figura 27: Díametro medio en función de la distancia entre la aguja y el colector.

En la **Figura 27** se observa claramente que la distancia boquilla - colector afecta el diámetro medio de las fibras obtenidas. Una disminución en la distancia de 5 cm (de 15 a 10 cm) produjo una distribución más dispersa con mayor diámetro medio, mientras que la estructura procesada a 15 cm produjo una estructura nanofibrosa con una distribución unimodal.

Para seleccionar una distancia apropiada para llevar a cabo los siguientes estudios se tuvo en cuenta no sólo la estructura obtenida a nivel microscópico, sino también el tamaño macroscópico de la matriz generada. La distancia boquilla - colector determina el tamaño del área cubierta por las fibras. A menor distancia menor área de cobertura (**Figura 28**). Por este motivo se tomó una decisión de compromiso y el resto de los estudios se realizaron a 12 cm de distancia entre la boquilla y el colector.

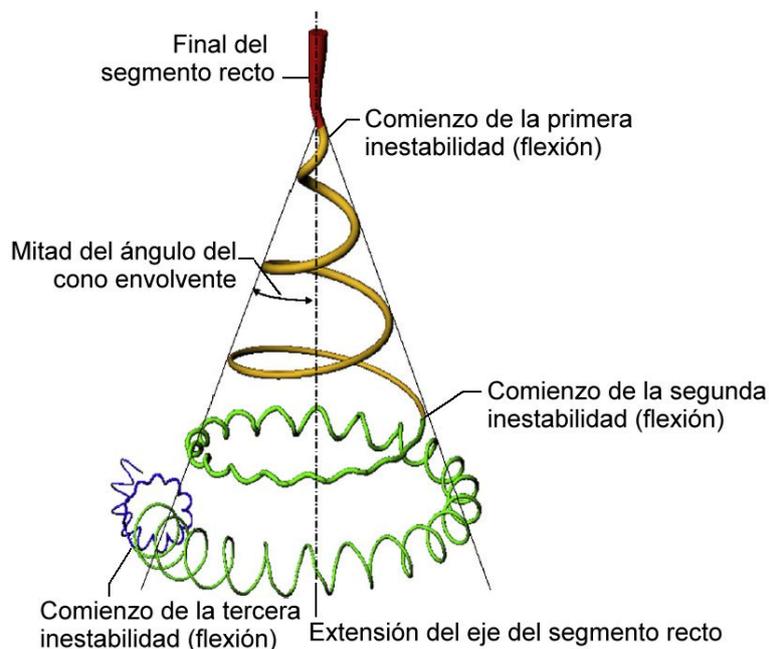


Figura 28: Esquema de la trayectoria del microchorro mostrando las regiones de inestabilidad y el ángulo del cono descrito por el haz.

5.1.2.3 Gradiente de potencial

Luego de analizar el efecto del voltaje aplicado (Sección 5.1.2.1) y de la distancia boquilla – colector (Sección 5.1.2.2) resulta interesante analizar la influencia del gradiente de potencial (V/d) en la morfología de las fibras obtenidas en el proceso de electrospinning.

En la **Figura 29** se grafica el diámetro medio de fibras en función del gradiente de potencial V/d en el rango 1 – 1,5 kV/cm (**Tabla 1**). Para gradientes en el intervalo 1 – 1,33 kV/cm no se observaron cambios significativos en el diámetro de fibra ni en su homogeneidad. La mayor diferencia se presentó para la relación $V/d = 1,5$ kV/cm, valor en el que se incrementó tanto el diámetro medio como la desviación estándar. Por lo tanto, para los estudios de suspensiones que incorporan nanopartículas se empleó una relación $V/d = 1,25$, o sea que para una distancia $d = 12$ cm se aplicó un voltaje $V = 15$ kV.

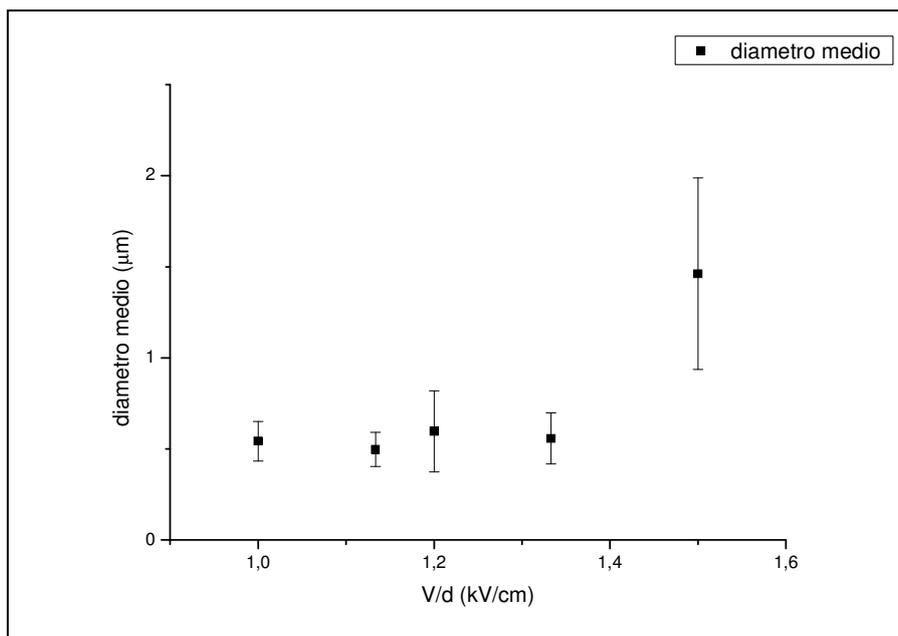


Figura 29: Diámetro medio en función de la relación V/d .

5.1.2.4 Velocidad de flujo

Se estudiaron tres velocidades de flujo distintas: 0,3 mL/h, 0,5 mL/h y 1 mL/h (Figuras 30, 32 y 34).

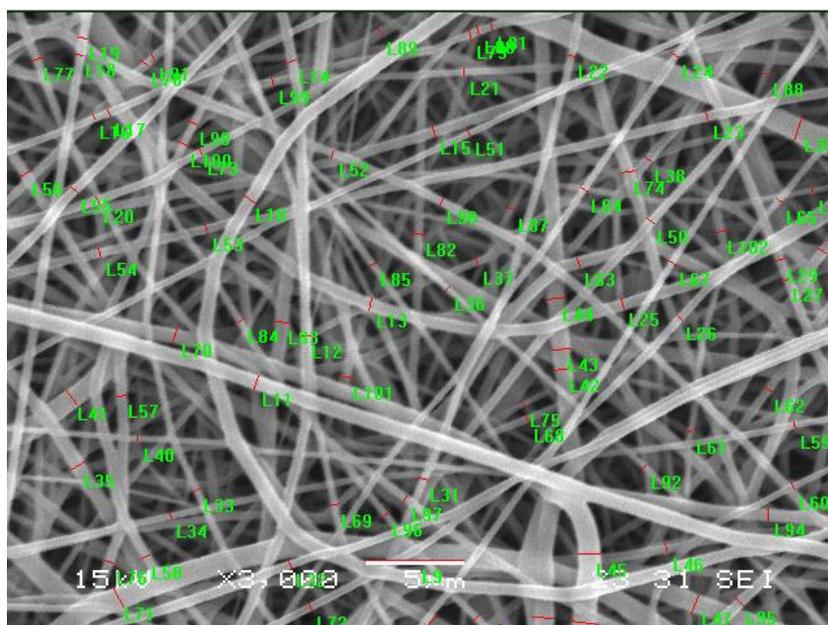


Figura 30: Micrografía de SEM X3000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1$ mL/h; $V = 12$ kV; $d = 10$ cm.

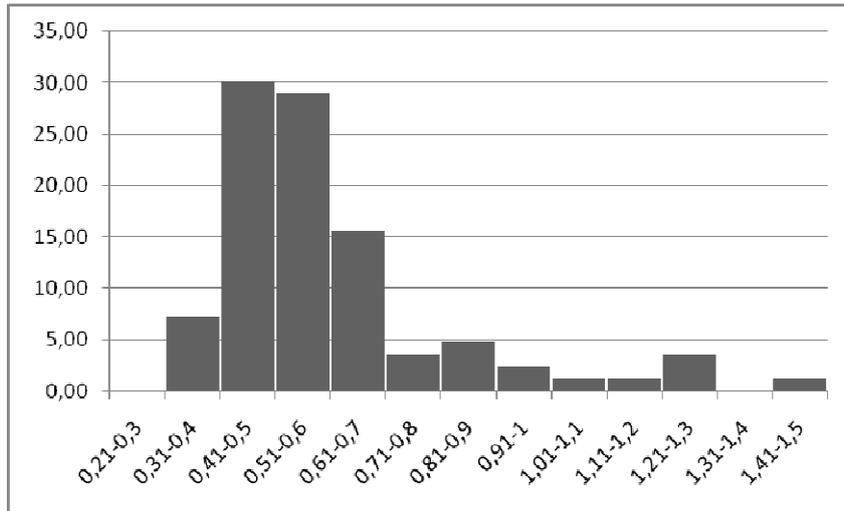


Figura 31: Distribución de diámetros medida en la Figura 30.

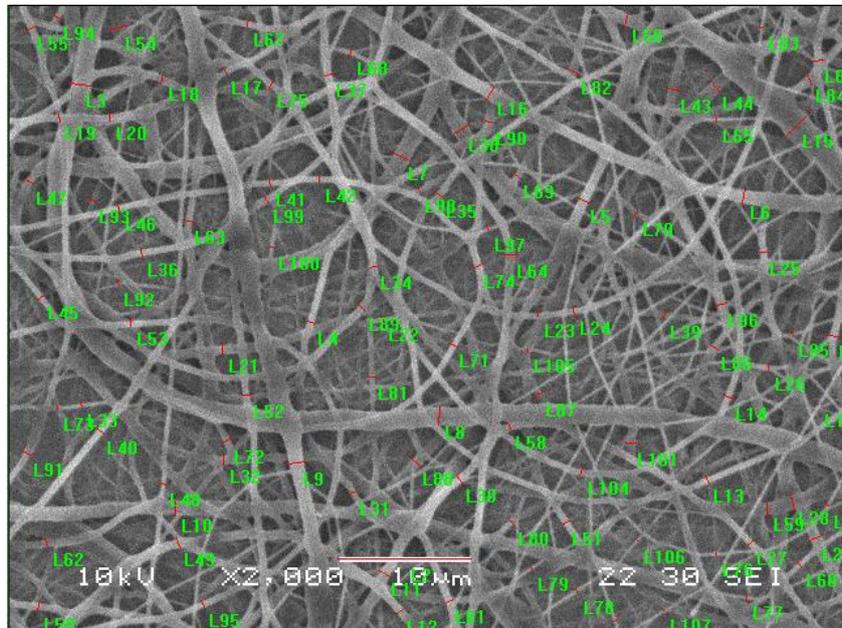


Figura 32: Micrografía de SEM X2000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 0,5$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 12$ cm.

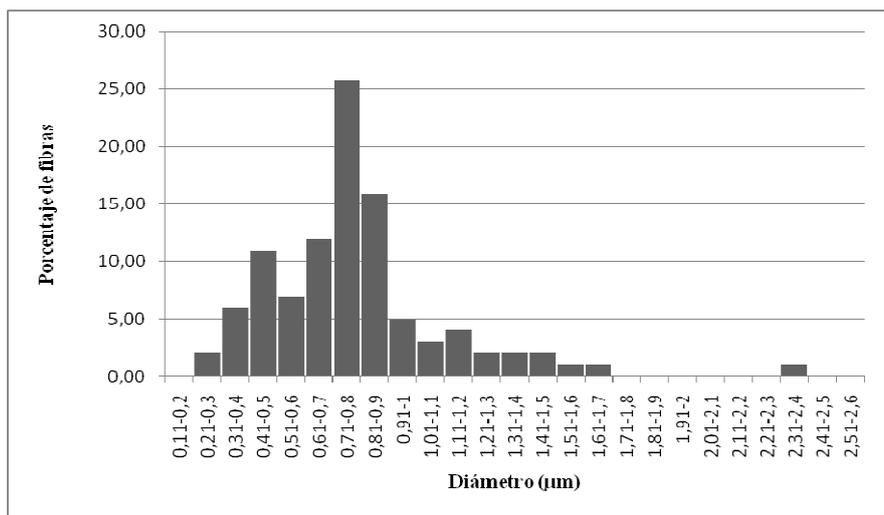


Figura 33: Distribución de diámetros medida en la Figura 32.

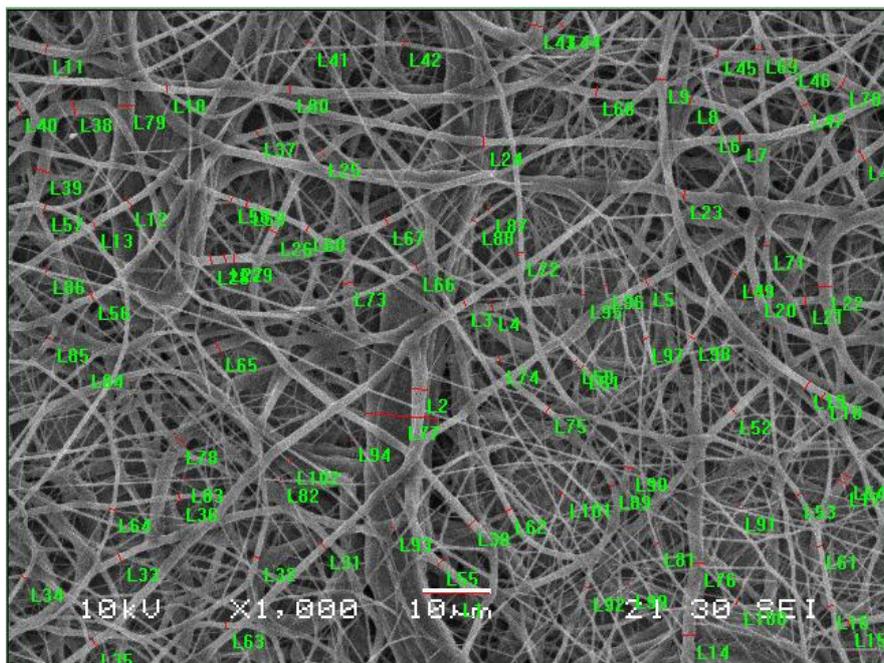


Figura 34: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 0,3$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 12$ cm.

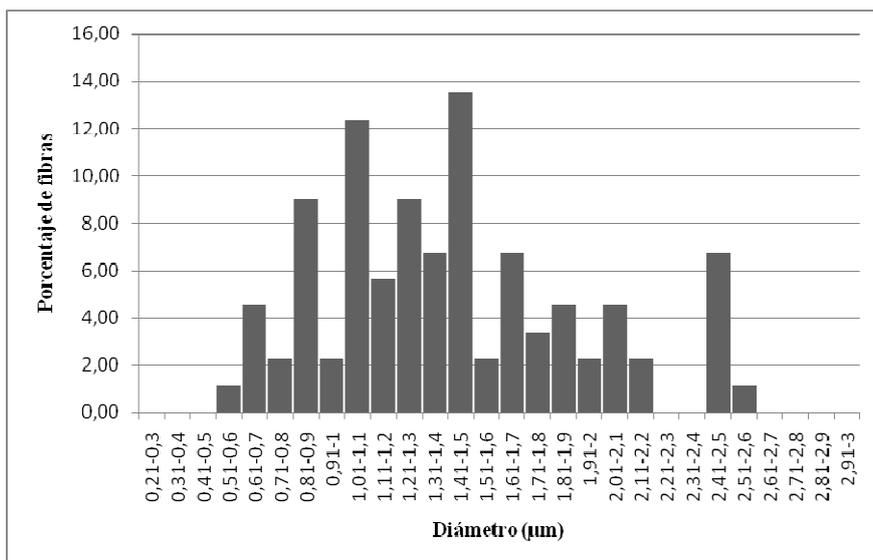


Figura 35: Distribución de diámetros medida en la Figura 34.

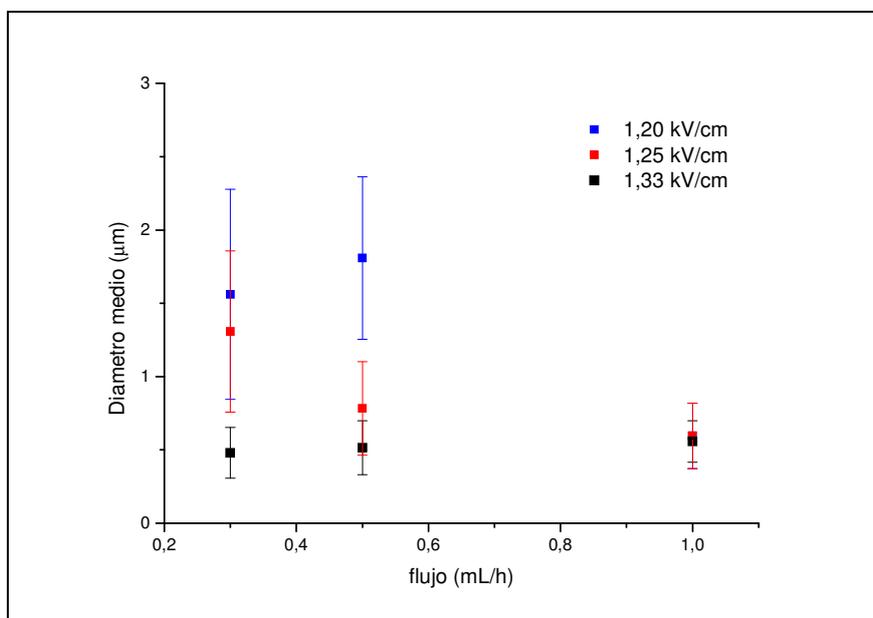


Figura 36: Diámetro medio en función de la velocidad de flujo para tres relaciones V/d .

Los histogramas (**Figuras 31, 33 y 35**) muestran que la distribución de fibras más uniforme (unimodal) se obtuvo con una velocidad de flujo de 1 mL/h. A menores velocidades de flujo la distribución de diámetros resultó más dispersa (mayor desviación estándar). En la **Figura 36** se observa como varía el valor medio del diámetro de fibras para distintas velocidades de flujo y gradientes de potencial (V/d). El diámetro medio de fibras resultó independiente de la relación V/d para una velocidad de flujo de 1 mL/h.

Tabla 2: Espesor de las matrices obtenidas.

Velocidad de flujo (mL/h)	Espesor medio (mm)	Desviación estándar
0,3	0,028	0,013
0,5	0,030	0,017
1,0	0,066	0,024

Por otra parte, la uniformidad en el espesor de la matriz fibrosa disminuyó con el aumento de la velocidad de flujo (**Tabla 2**). Las matrices más homogéneas se obtuvieron con la menor velocidad de flujo (0,3 mL/h). Sin embargo, el tiempo de procesamiento es una variable muy importante, y menor velocidad de flujo implica mayor tiempo de procesamiento para obtener el espesor deseado. Por lo tanto, analizando tanto la estructura obtenida como la homogeneidad de espesor, se seleccionó una velocidad de flujo de 0,5 mL/h como parámetro óptimo para la preparación de matrices nanocompuestas.

5.2 Matrices nanofibras conductoras de Tecoflex 60D

Las matrices poliuretánicas nanocompuestas se prepararon a partir de dispersiones de SWCNT o PANI en mezcla de solventes DMF:THF 50:50. Se emplearon los siguientes parámetros de procesamiento: velocidad de flujo = 0,5 mL/h, Voltaje = 15 kV y distancia boquilla – colector = 12 cm ($V/d = 1,25$).

Tabla 3: Composición de los nanocompuestos y matrices preparadas

Serie SWCNT	Serie PANI
1) Tecoflex 60D / 0,5% SWCNT	1) Tecoflex 60D / 0,5% PANI
2) Tecoflex 60D / 1,0% SWCNT	2) Tecoflex 60D / 1,0% PANI
3) Tecoflex 60D / 1,5% SWCNT	3) Tecoflex 60D / 1,5% PANI
4) Tecoflex 60D / 2,0% SWCNT	4) Tecoflex 60D / 2,0% PANI

5.2.1 Serie SWCNT

5.2.1.1 Efecto del contenido de SWCNT en la morfología de la matriz

1) Tecoflex 60D / 0,5% SWCNT

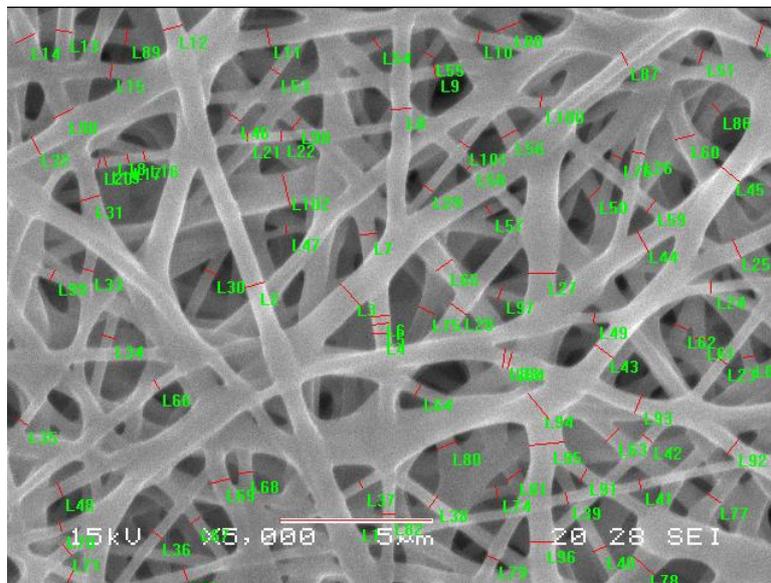


Figura 37: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 0,5% SWCNT.

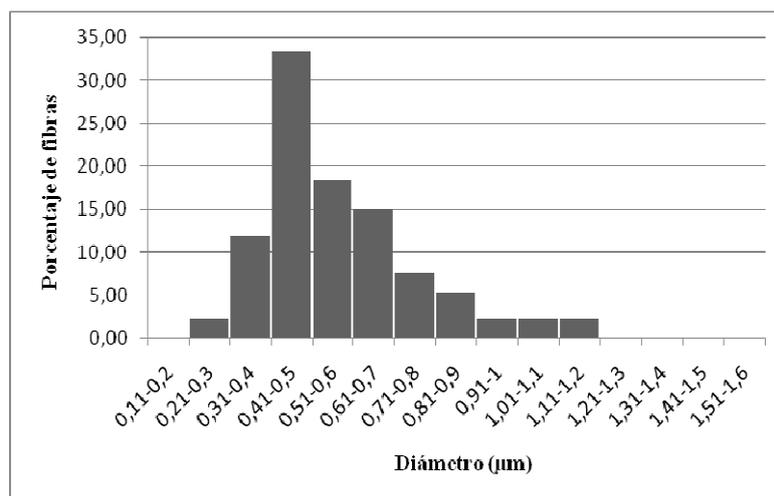


Figura 38: Distribución de diámetros medida en la Figura 37.

2) Tecoflex 60D / 1,0% SWCNT

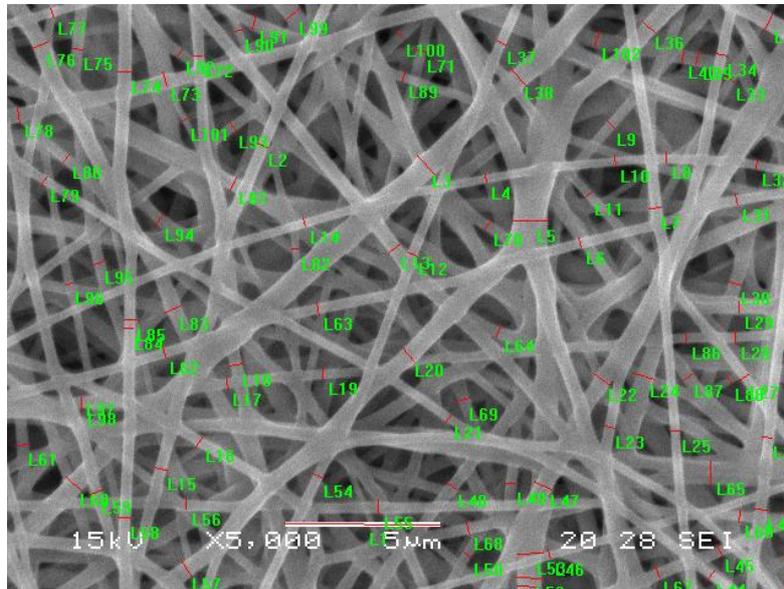


Figura 39: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 1% SWCNT.

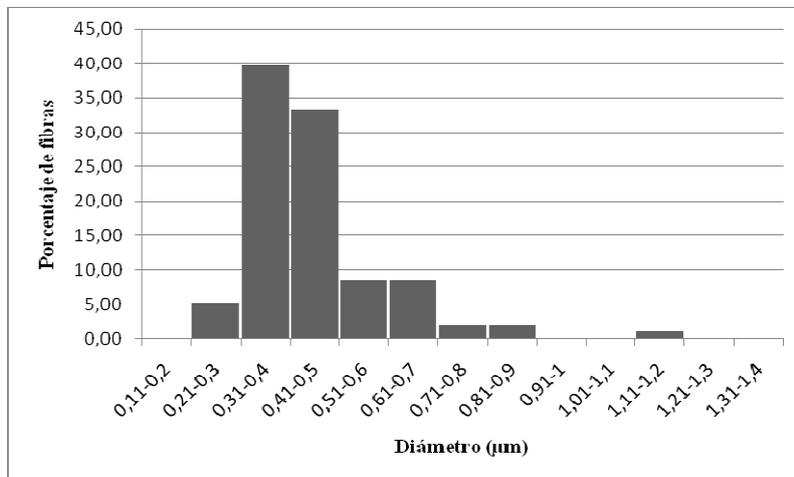


Figura 40: Distribución de diámetros medida en la Figura 39.

3) Tecoflex 60D / 1,5% SWCNT

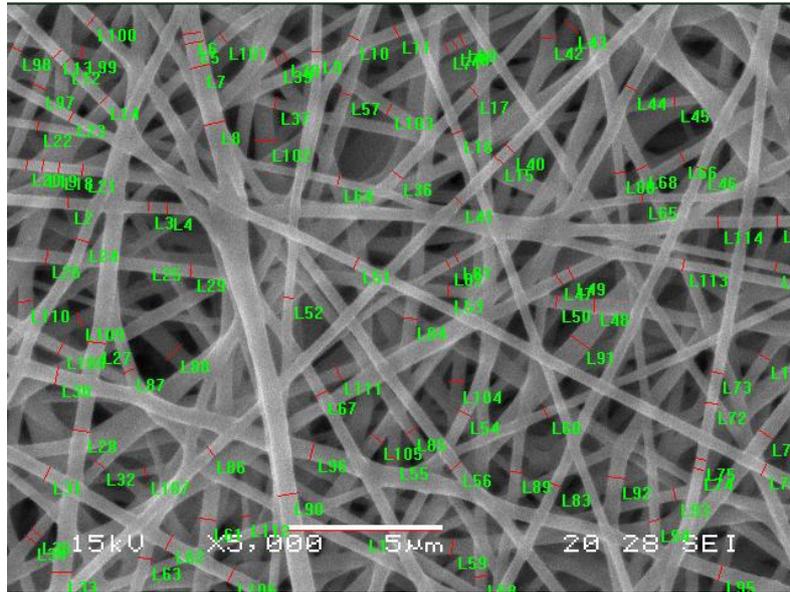


Figura 41: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 1,5% SWCNT.

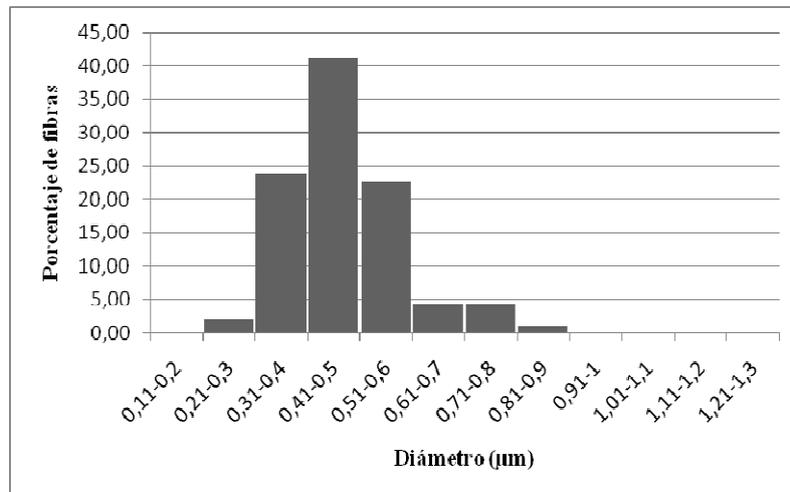


Figura 42: Distribución de diámetros medida en la Figura 41.

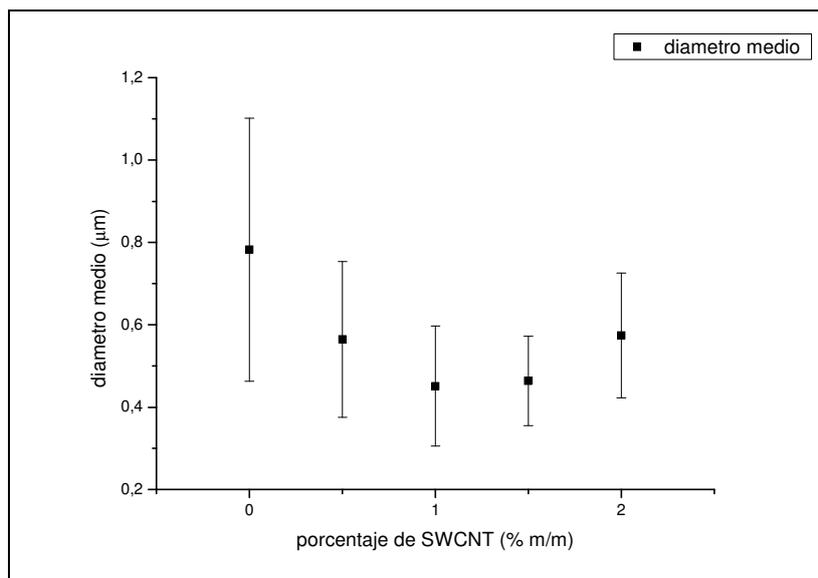


Figura 45: Diámetro medio de fibra en función del contenido de SWCNT.

Los histogramas mostrados en las **Figuras 38, 40, 42 y 44** indican que existe una distribución unimodal para todas las concentraciones de SWCNT. La distribución se tornó más estrecha al aumentar la concentración de nanopartículas hasta 1,5%, valor a partir del cual se presentó una distribución más ancha (**Figura 45**). El diámetro medio disminuyó para 1,0% de SWCNT hasta $\Phi_{1\%} = 0,451 \mu\text{m}$ y se mantuvo prácticamente constante para 1,5% de SWCNT ($\Phi_{1,5\%} = 0,464 \mu\text{m}$). Este efecto es el esperado ya que los nanotubos de carbono son nanopartículas conductoras y como se comentó en la sección 1.5.1.2 el aumento en la conductividad de la solución produce una disminución en el diámetro de fibras y una mayor homogeneidad. Además las micrografías muestran que las fibras tienen el aspecto de varillas más rectas que en el caso del material sin nanopartículas.

En el caso de la matriz con 2% de SWCNT, el diámetro medio resultó mayor. Si bien la densidad de carga presente es mayor, el resultado obtenido puede relacionarse con la dificultad que presentó la dispersión de las nanopartículas. A medida que se incrementó el contenido de nanopartículas la dispersión de las mismas en la solución resultó más difícil. Los nanotubos de carbono no se suspenden bien en THF, y se forman aglomerados que pueden influir en el diámetro de fibras preparadas.

5.2.1.2 Efecto del gradiente de potencial en matrices nanofibrosas conductoras de Tecoflex 60D / 1,0 % SWCNT

El efecto del gradiente de potencial, en el intervalo de V/d 1 – 1,5 kV/cm, en la morfología de las matrices resultantes se estudió con la formulación nanocompuesta de 1% SWCNT. Se fijó la velocidad de flujo en 0,5 mL/h. La **Figura 46** presenta la variación del diámetro medio en función de la relación V/d . En el Anexo IV se presentan las micrografías de SEM y los histogramas correspondientes a las condiciones analizadas.

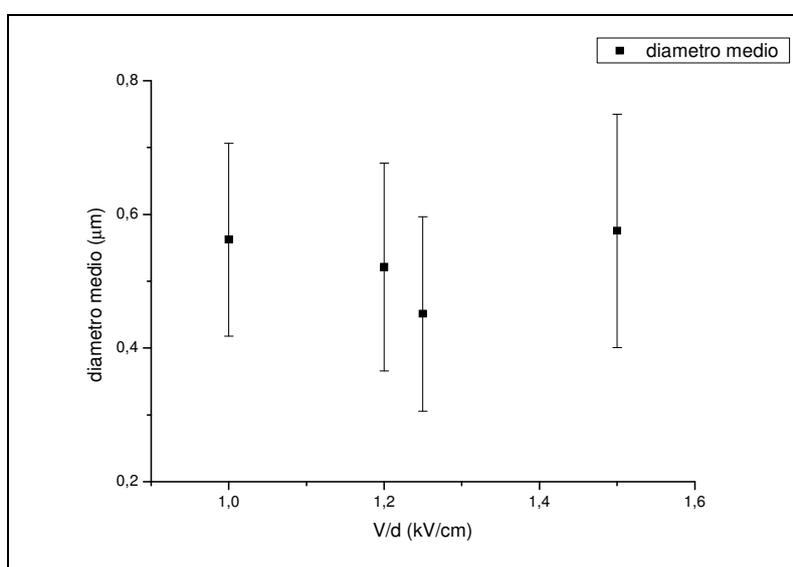


Figura 46: Diámetro medio en función de la relación V/d .

Puede observarse que el diámetro medio no varía significativamente para los valores de V/d explorados. Este comportamiento resultó similar al observado en el caso de las soluciones poliméricas sin nanopartículas. Para la relación $V/d = 1,25$ kV/cm, se observó que el diámetro medio es menor (y la desviación estándar también) que en los demás gradientes estudiados. Por lo tanto el gradiente de potencial empleado para la preparación de matrices nanofibrosas nanocompuestas (similar al empleado para matrices sin nanopartículas) resultó el más apropiado.

5.2.1.3 Efecto del solvente en la dispersión de SWCNT

Debido a la dificultad observada en la suspensión de los nanotubos de carbono en THF, se exploró la posibilidad de utilizar otro solvente. Considerando que la elección

del THF se efectuó para introducir un solvente de bajo punto de ebullición que permita la formación de fibras ($T_{eb} = 66^{\circ}\text{C}$, Sección 5.1.1), se optó por emplear isopropanol ($T_{eb} = 82,4^{\circ}\text{C}$) en una mezcla de DMF:IPA 50:50. El IPA permite una muy buena suspensión de los nanotubos de carbono, aunque no disuelve el Tecoflex 60D. En cuanto a los parámetros del proceso de electrospinning se utilizaron los valores empleados para los estudios con THF ($f = 0,5 \text{ mL/h}$, $V = 15 \text{ kV}$, $d = 12 \text{ cm}$) y otra relación V/d ($f = 0,5 \text{ mL/h}$, $V = 20 \text{ kV}$, $d = 15 \text{ cm}$). Las **Figuras 47 y 49** muestran las morfologías obtenidas.

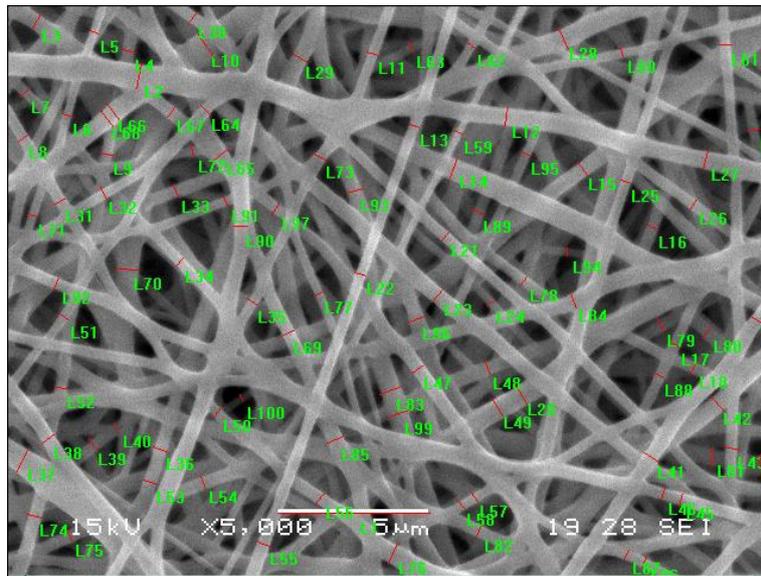


Figura 47: Micrografía de SEM X5000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:IPA 50:50, $f = 0,5 \text{ mL/h}$; $V = 15 \text{ kV}$; $d = 12 \text{ cm}$.

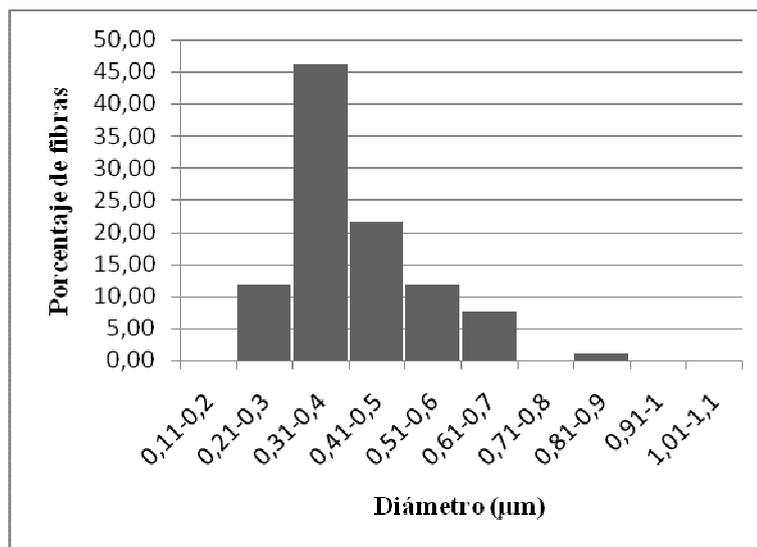


Figura 48: Distribución de diámetros de la Figura 47.

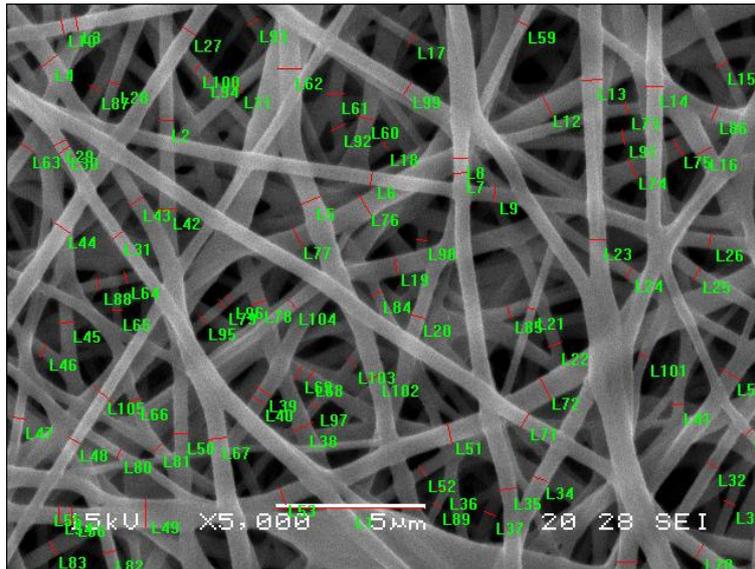


Figura 49: Micrografía de SEM X5000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:IPA 50:50, $f = 0,5$ mL/h; $V = 20$ kV; $d = 15$ cm.

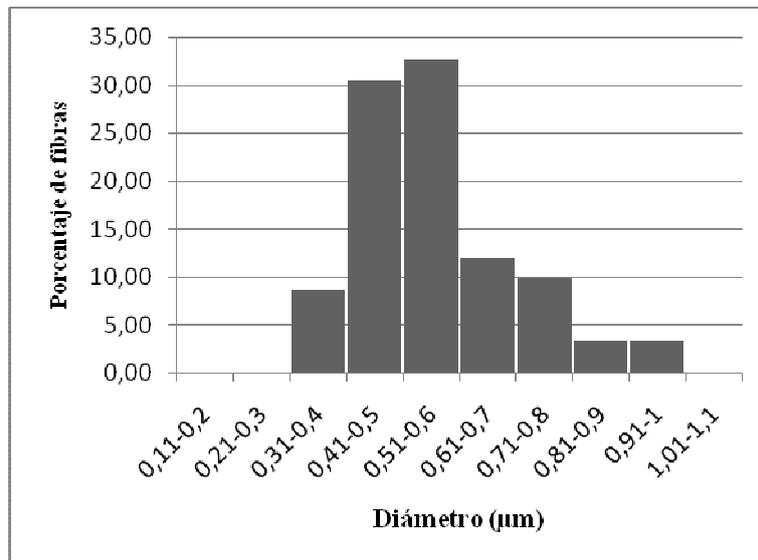


Figura 50: Distribución de diámetros de la Figura 49.

Del análisis de las micrografías y de los histogramas de distribución de diámetros se concluye que tanto el empleo de IPA como de THF genera fibras de morfología homogénea y diámetro medio del orden de los 500 nm, 405 ± 115 nm (**Figura 48**) y 554 ± 143 nm (**Figura 50**). Si bien el IPA suspende mejor los SWCNT, la disminución de la capacidad de la mezcla de solventes para disolver el Tecoflex 60D genera la formación de microgeles que inhomogéinizan la solución y perjudican el proceso de electrospinning.

5.2.2 Serie PANI

5.2.2.1 Efecto del contenido de PANI en la morfología de la matriz

1) Tecoflex 60D / 0,5% PANI

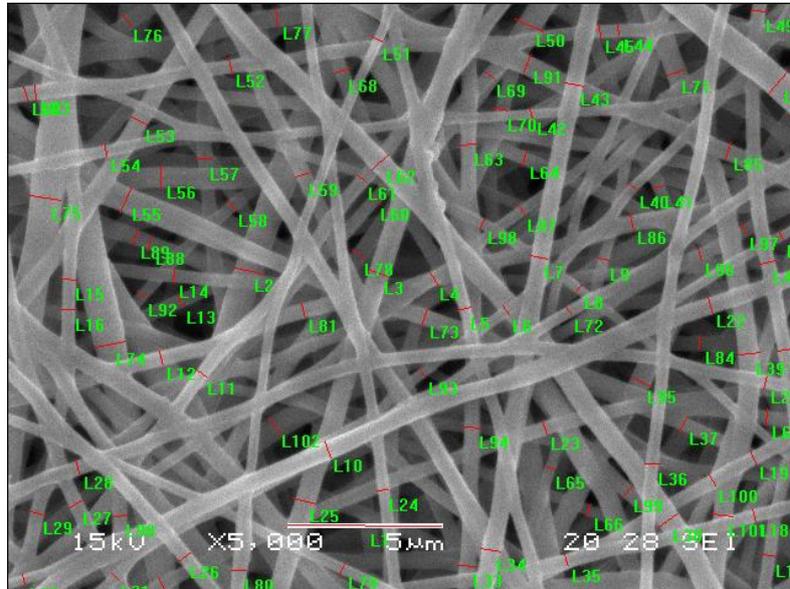


Figura 51: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 0,5% PANI.

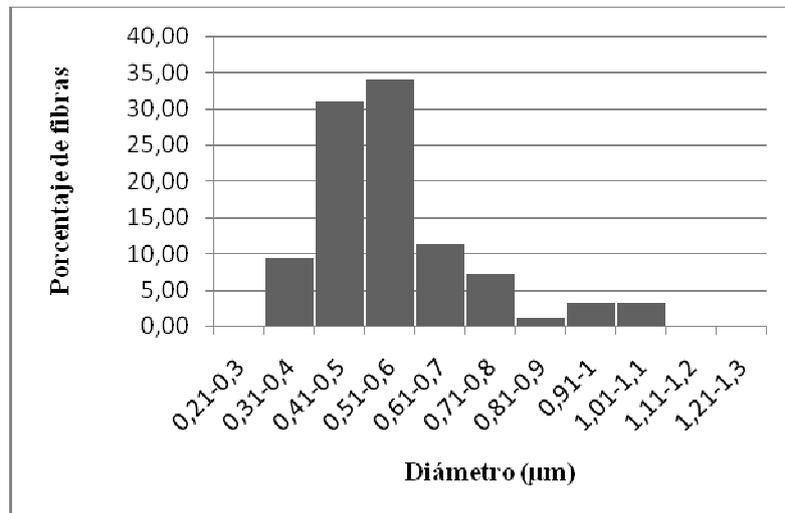


Figura 52: Distribución de diámetros medida en la Figura 51.

2) Tecoflex 60D / 1,0% PANI

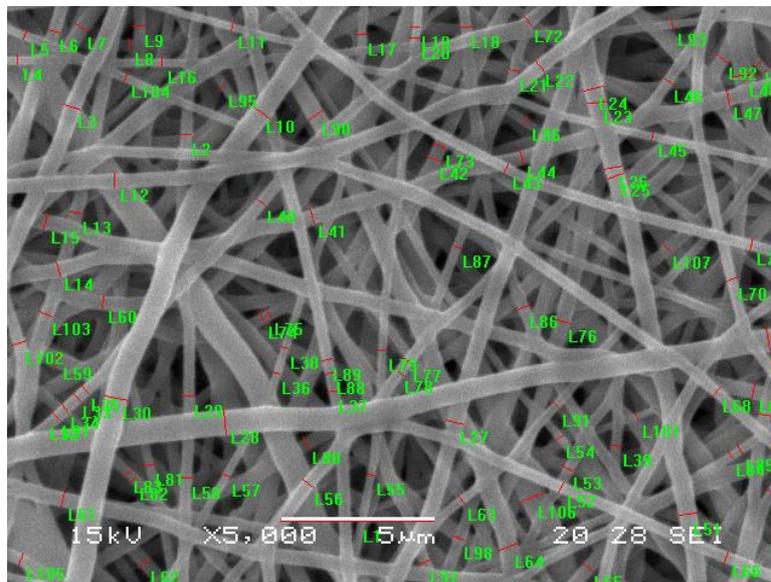


Figura 53: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 1,0% PANI.

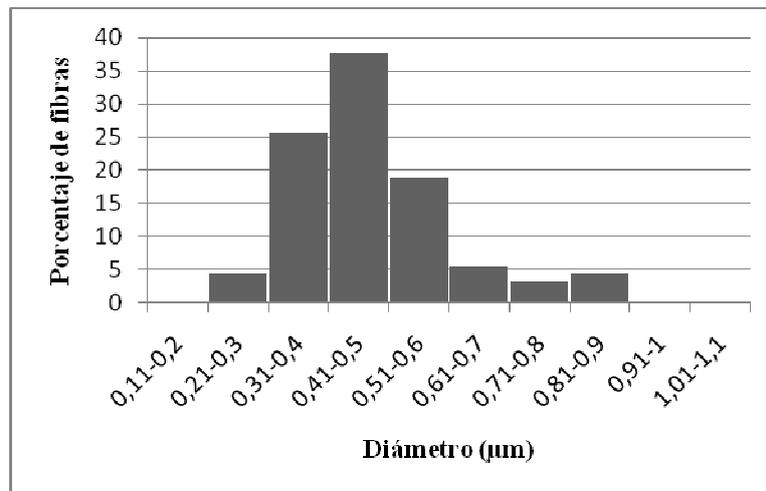


Figura 54: Distribución de diámetros medida en la Figura 53.

3) Tecoflex 60D / 1,5% PANI

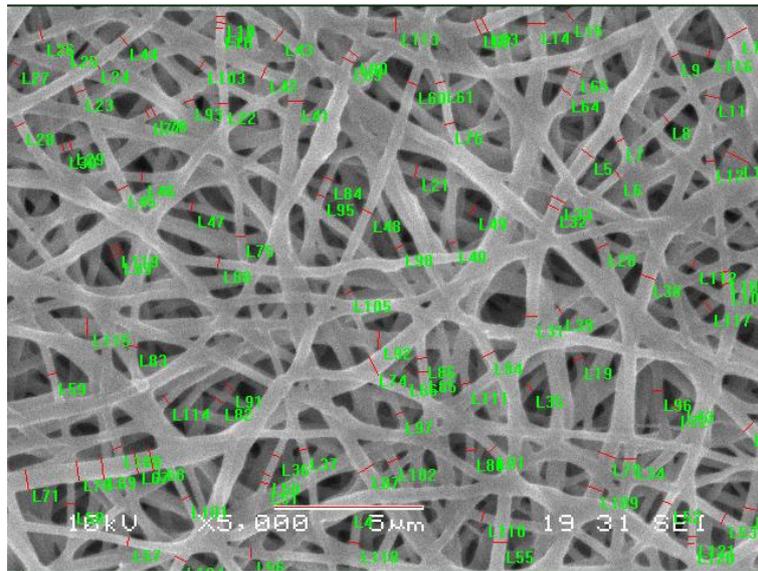


Figura 55: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 1,5% PANI.

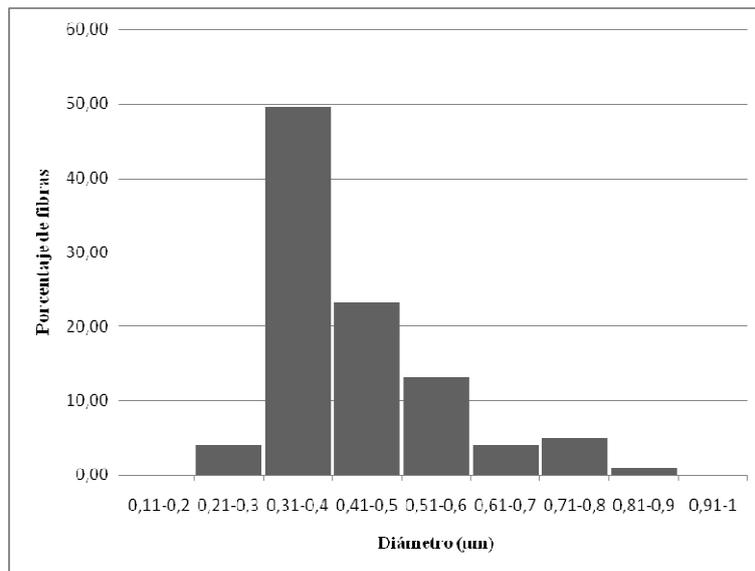


Figura 56: Distribución de diámetros medida en la Figura 55.

4) Tecoflex 60D / 2,0% PANI

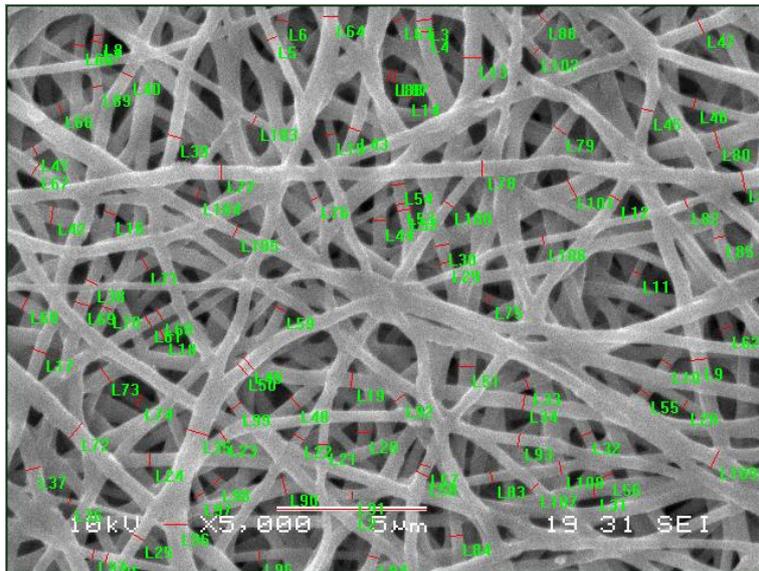


Figura 57: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 2,0% PANI.

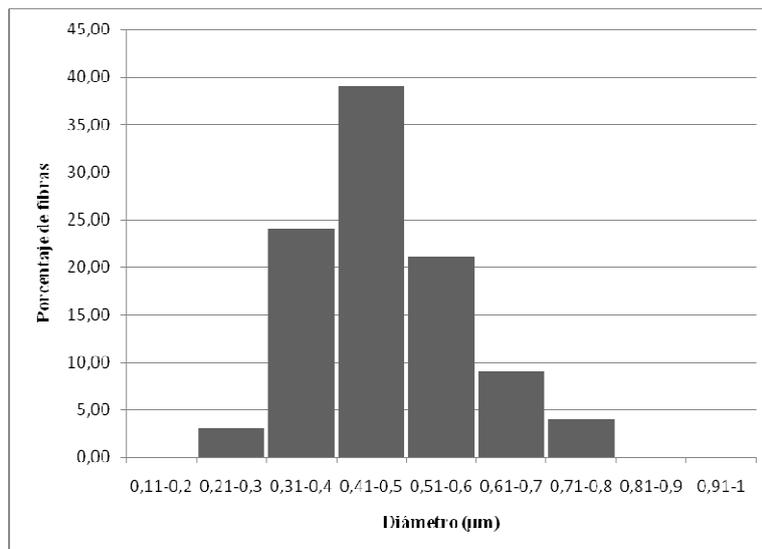


Figura 58: Distribución de diámetros medida en la Figura 57.

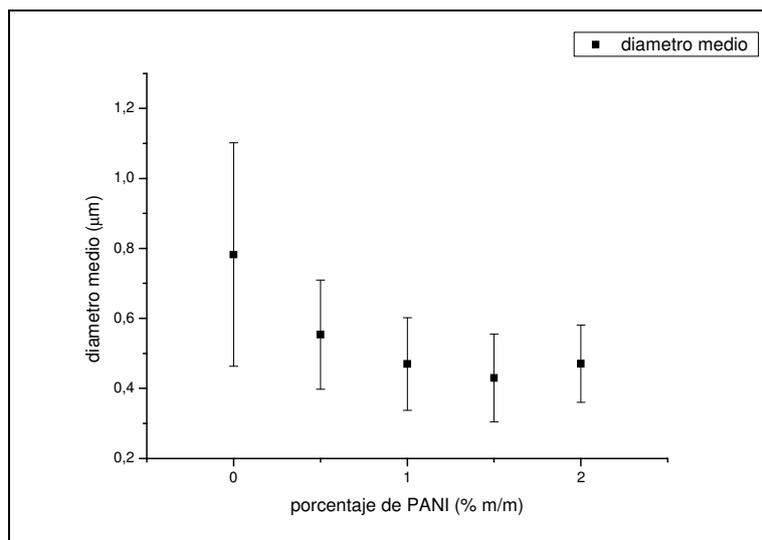


Figura 59: Diámetro medio en función del porcentaje de PANI.

A medida que se incrementó la concentración de PANI (**Figuras 51, 53, 55 y 57**) la estructura fibrosa resultó más homogénea. Los histogramas correspondientes (**Figuras 52, 54, 56 y 58**) muestran en todos los casos una distribución unimodal. Con el aumento de la densidad de carga la moda se desplazó hacia valores más pequeños. El ancho de la distribución disminuyó con el incremento de la concentración de nanopartículas hasta 1,5% de PANI. La **Figura 59** muestra la variación del diámetro medio con el contenido de PANI. Las fibras nanocompuestas mostraron un diámetro medio menor que las fibras de Tecoflex 60D sin nanopartículas, que exhibieron un diámetro medio de $0,78 \pm 0,32 \mu\text{m}$ (**Figura 33**). El diámetro medio disminuyó con el contenido de PANI. Como en el caso de las nanofibras compuestas con nanotubos de carbono, este efecto es el esperado, ya que los nanotubos de PANI son partículas conductoras y producen un aumento en la conductividad de la solución que conduce a una disminución en el diámetro de fibras. La formulación con 2% de PANI repite la misma tendencia observada para la formulación con 2% de SWCNT, donde el diámetro medio aumenta ligeramente. Nuevamente, la dificultad presentada en la dispersión de este contenido de nanopartículas se evidenció en la formación de fibras de un diámetro ligeramente mayor.

5.3.1 Efecto de borde en matrices nanofibrosas conductoras de Tecoflex 60D / PANI

En el caso de las matrices con nanopartículas de PANI se observó que la estructura nanofibrosa presentó un ordenamiento diferente según la región de la matriz

en que se extrajo la muestra. La **Figura 60** muestra las regiones donde se analizó la matriz. Las **Figuras 61, 63 y 57**, muestran las micrografías obtenidas para la posición 1, 2 y 3 respectivamente.

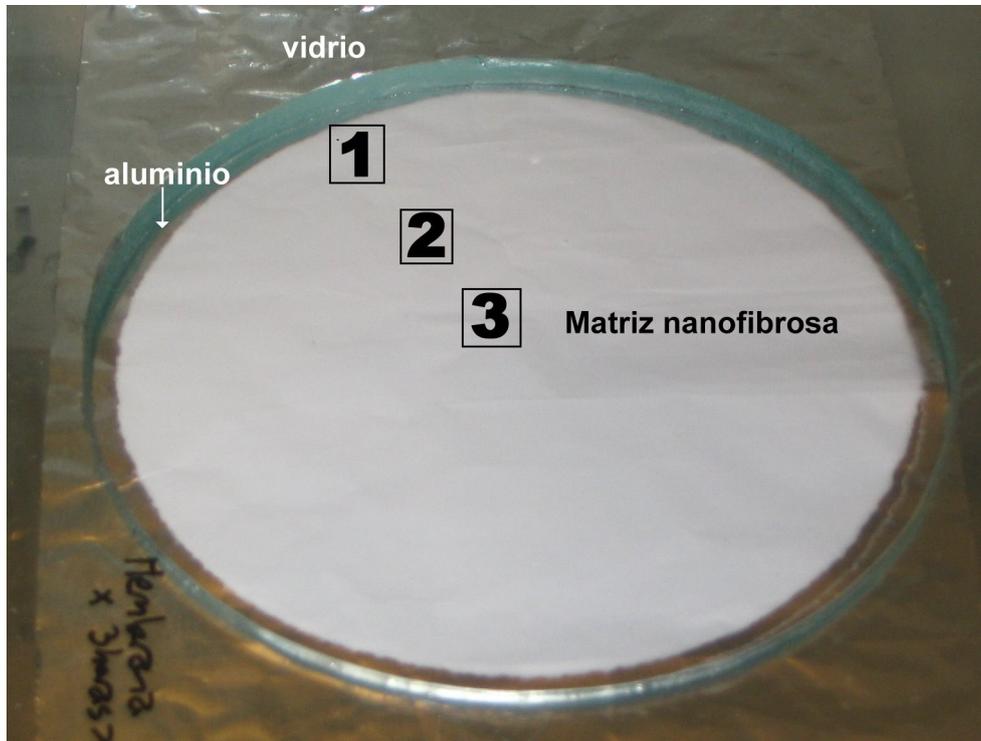


Figura 60: Esquema del lugar de extracción de cada muestra.
1) Figura 61, 2): Figura 63 y 3) Figura 57.

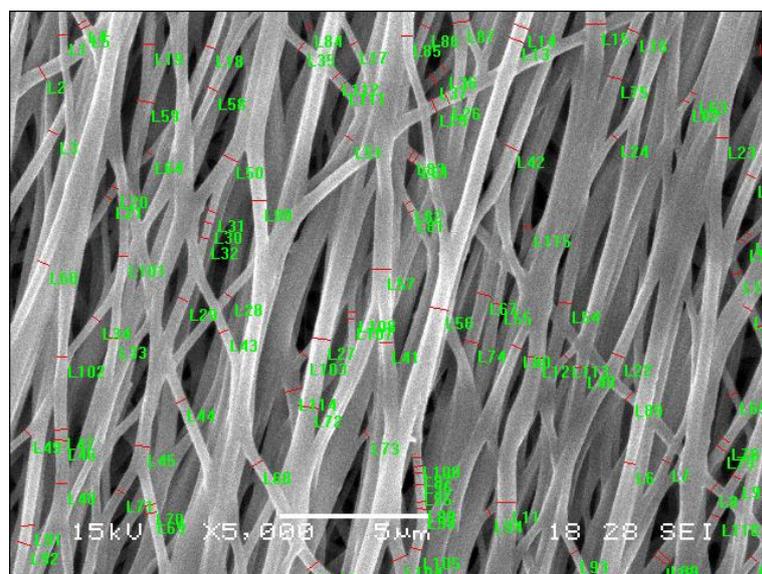


Figura 61: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 2% PANI extraído de la posición 1 (borde).

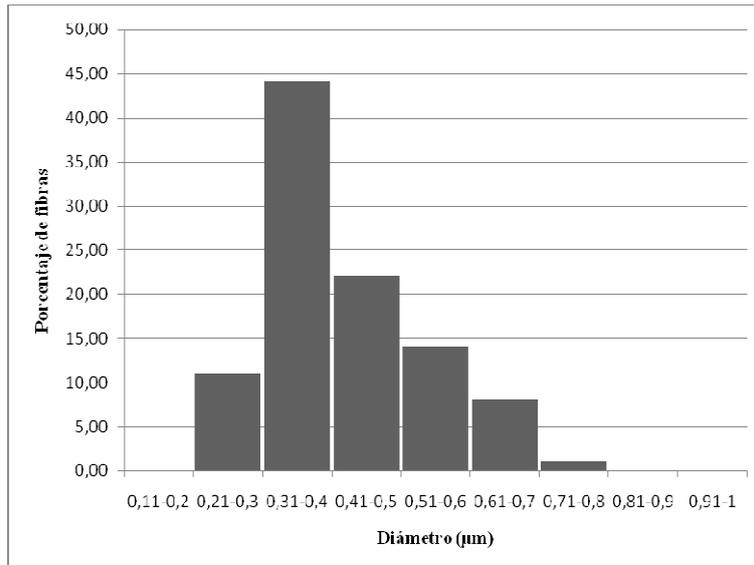


Figura 62: Distribución de diámetros medida en la Figura 61.

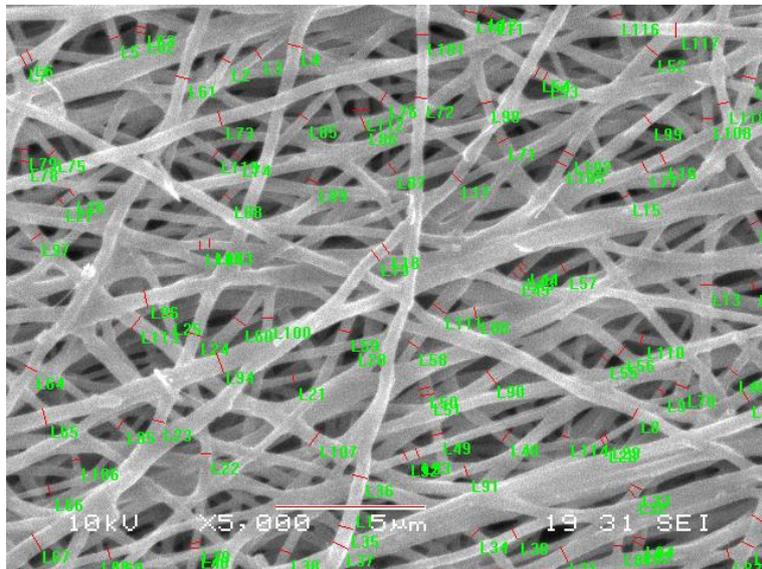


Figura 63: Micrografía de SEM X5000 de Tecoflex 60D / 2% PANI extraído de la posición 2.

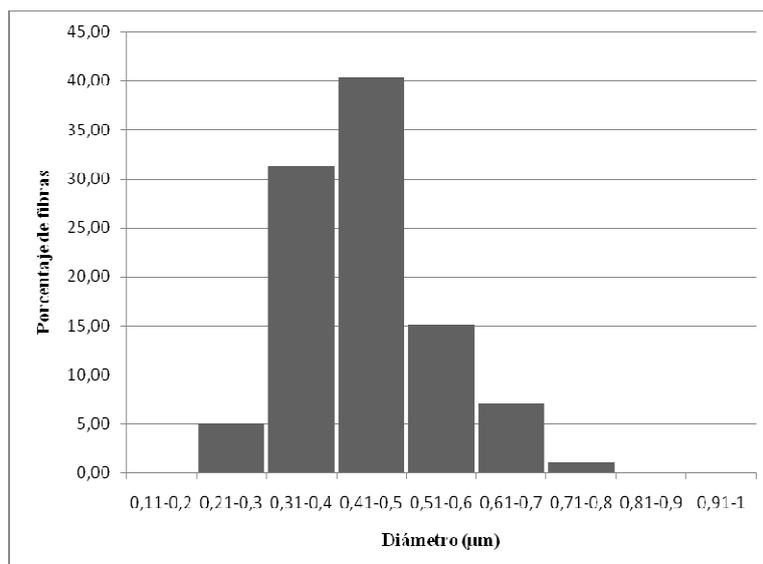


Figura 64: Distribución de diámetros medida en la Figura 63.

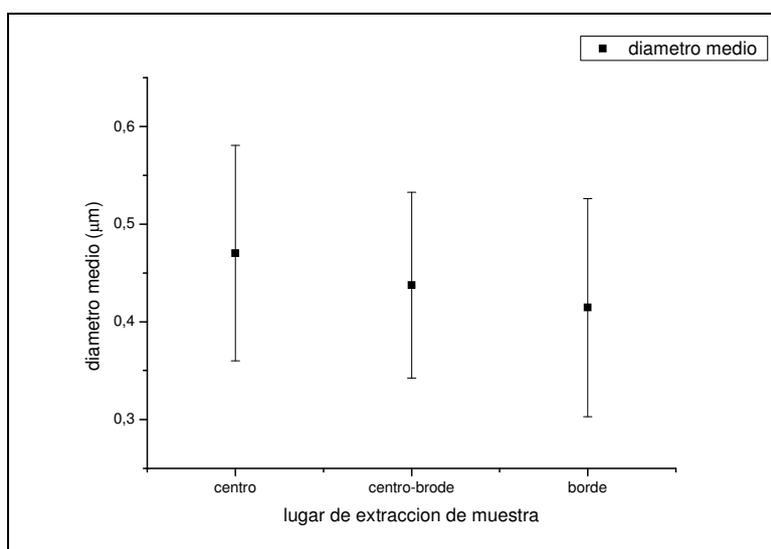


Figura 65: Diámetro medio de fibra en función del lugar de extracción de la muestra.

Comparando las estructuras obtenidas se observa que las fibras tienden a alinearse a medida que se acercan al borde de la matriz. La superficie de la placa metálica (electrodo) circular posee una discontinuidad al limitarse con una placa circular de vidrio que tiene un espesor de 4 mm. Este escalón con un material no conductor introdujo un efecto de borde en donde se colectan las nanofibras. La deposición de nanofibras conductoras cargadas sobre el borde del vidrio induce una acumulación de cargas que actúa como electrodo. De esta manera se forman dos electrodos cercanos que producen la alineación de las fibras y una variación en el diámetro de las mismas. Al comparar los histogramas de distribución de diámetros (**Figuras 62, 64 y 58**) se observa

como la moda se desplaza hacia diámetros menores. Por otro lado, en la **Figura 65** se observa que el diámetro medio disminuye al mismo tiempo que la alineación de las nanofibras aumenta. La alineación uniaxial de nanofibras genera cambios en las propiedades de la matriz en particular en las propiedades mecánicas (resistencia mecánica) y biológicas (orientación y crecimiento de células cultivadas *in vitro*) [50].

5.3 Conductividad de matrices nanocompuestas

5.3.1 Medidas de impedancia

La **Figura 66** presenta las curvas de conductividad a.c. en función de la frecuencia aplicada obtenidas a partir de las medidas de impedancia para todas las matrices analizadas. En las **Figuras 67** y **68** se observa como varía la conductividad de cada serie (SWCNT y PANI) a medida que aumenta el porcentaje de nanopartículas.

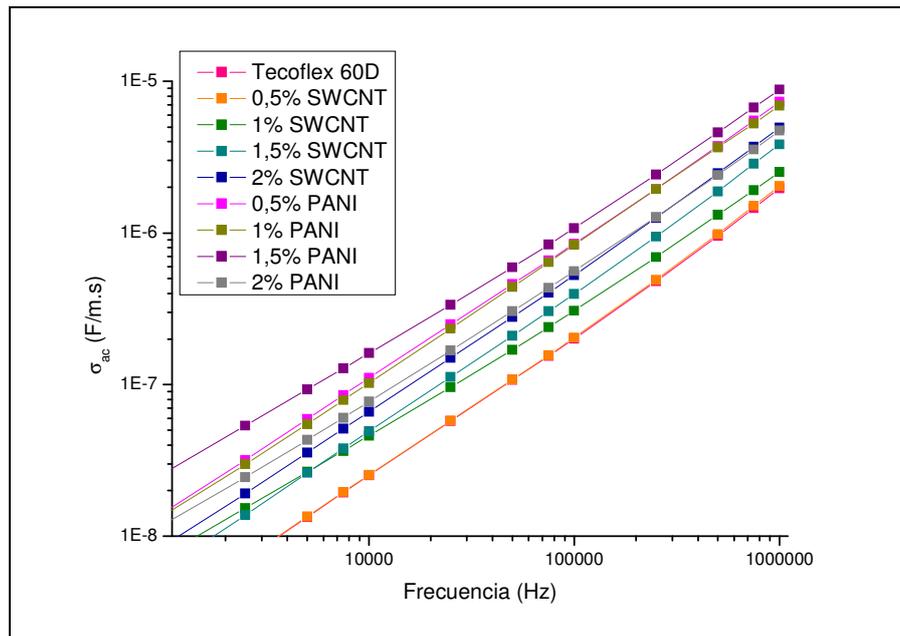


Figura 66: Conductividad ac en función de la frecuencia para Tecoflex y nanocompuestos.

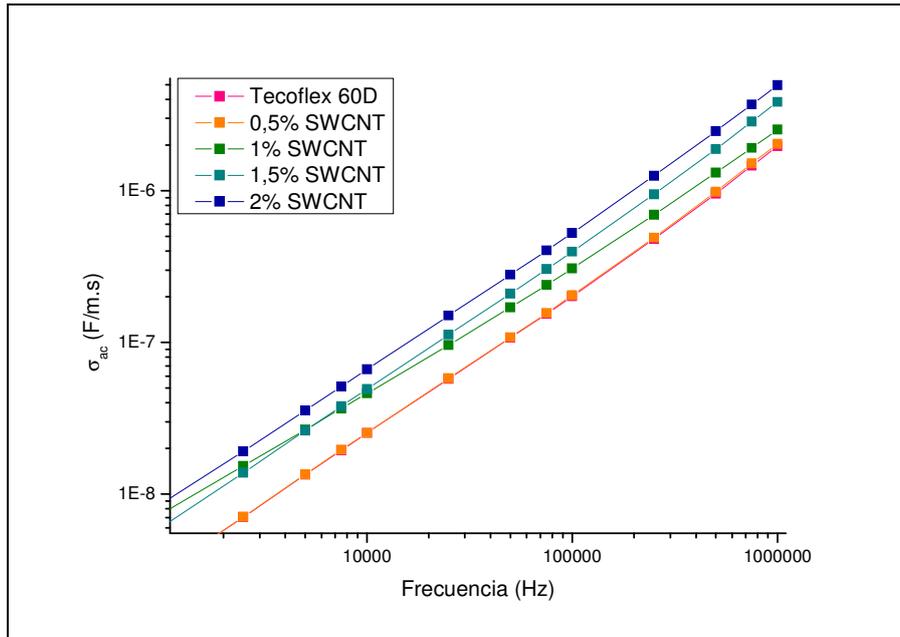


Figura 67: Conductividad ac en función de la frecuencia para la serie SWCNT.

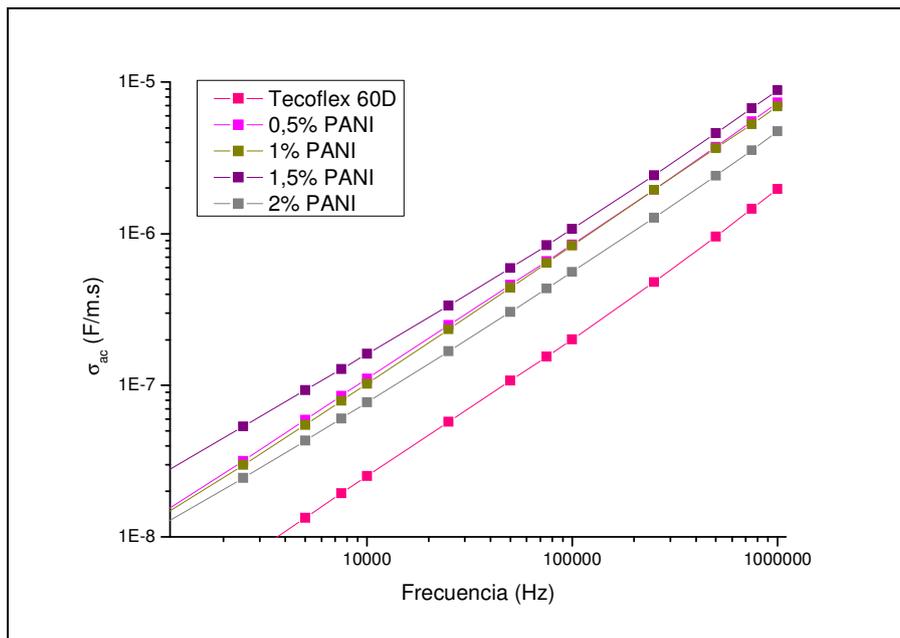


Figura 68: Conductividad ac en función de la frecuencia para la serie PANI.

Como se observa en la **Figura 66** las matrices con nanopartículas de PANI poseen una conductividad mayor que las matrices de la serie SWCNT. Los valores de conductividad de la serie SWCNT, presentaron el comportamiento esperado (**Figura 67**). El aumento del contenido de SWCNT produjo un aumento en la conductividad. La matriz con 0,5% de SWCNT no presentó cambios significativos con respecto al

Tecoflex sin SWCNT, pero para contenidos mayores del 1% de SWCNT se observó un aumento importante en la conductividad. En la serie PANI se observó la misma tendencia exceptuando la medida de la muestra con 2% PANI, la cual presentó una conductividad menor que las otras muestras. Este hecho puede atribuirse a una mala suspensión de las nanopartículas en la matriz, que impide la conexión entre las mismas y por ende un camino conductor de los electrones. Seoul *et al.* compararon la conductividad de fibras electrohiladas de PVDF con nanotubos de carbono con la conductividad de membranas finas preparadas por *spin-casting* [53]. Las fibras exhibieron un umbral de percolación mayor para la transición aislante-conductor. Por otro lado, a diferencia de la serie de SWCNT, con un contenido de nanopartículas de 0,5% se obtuvo un aumento considerable en la conductividad.

Por otro lado, se calcularon los valores de impedancia real e imaginaria para cada muestra. La **Figura 69** presenta las curvas obtenidas. El objetivo de este cálculo es, como se describió en la sección métodos (4.4), obtener los valores de conductividad d.c. para cada material a partir de la **Ecuación 7** y comparar con las medidas de conductividad d.c. obtenidas por el método de cuatro puntas. Este análisis no se realizó, ya que el equipo utilizado no mide a frecuencias menores a los 25 Hz y se necesitan de estos valores para poder analizar y simular correctamente el comportamiento dieléctrico del material mediante el software Zview, que proporciona el valor de $Z_0 = R$ para calcular σ_{dc} . En su lugar se realizó el análisis de las curvas de impedancia para evaluar si la tendencia anteriormente descrita se cumple.

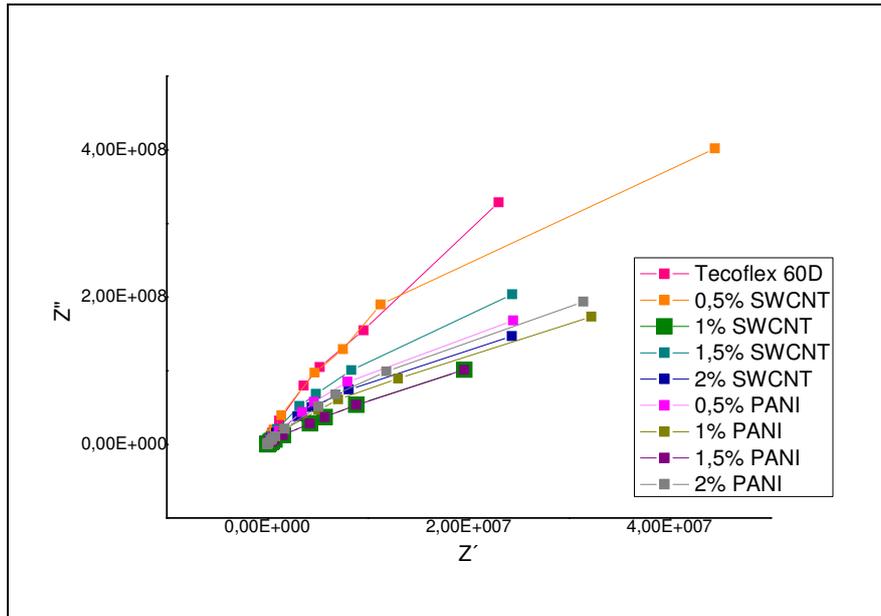


Figura 69: Curva de impedancia para Tecoflex y nanocompuestos.

En la **Figura 69** se observa que las curvas de impedancia se cierran más para la serie PANI que para la serie SWCNT. Este comportamiento es el esperado, debido a que el mayor cerramiento de las curvas indica mayor conductividad del material. Por lo tanto, se observa que los resultados de conductividad a.c. mantienen la misma tendencia observada para la impedancia de los materiales. Al realizar un análisis más profundo se ven algunas diferencias. Por ejemplo, la muestra con 2% SWCNT es un poco más conductora que las muestras de 0,5% y 2% de PANI, comportamiento que en la **Figura 66** no se presenta. Otro resultado que llama la atención es el hecho que la muestra con 1% SWCNT se comporta igual que la de 1,5% PANI, resultado que no se observa en el análisis de las conductividades a.c. y que se atribuye a un error de cálculos.

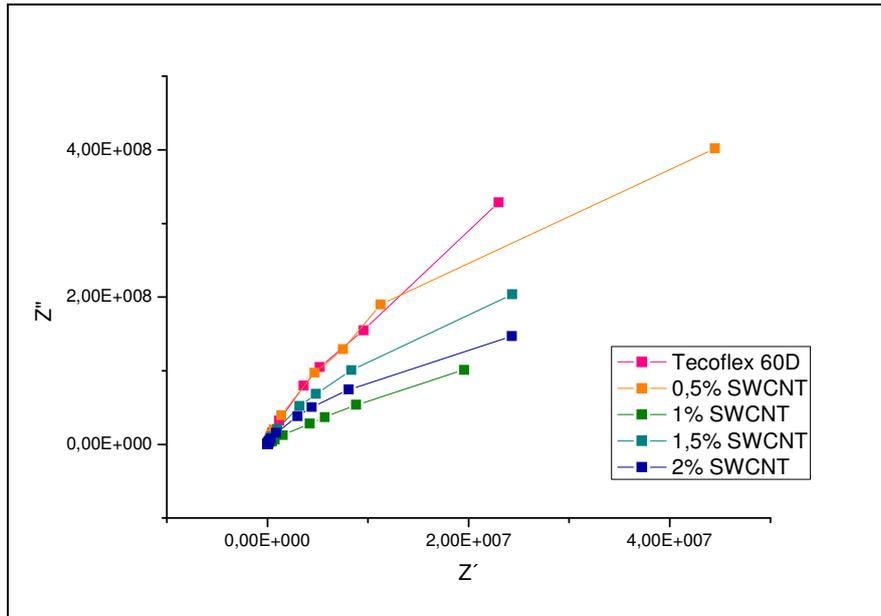


Figura 70: Curva de impedancia para la serie SWCNT.

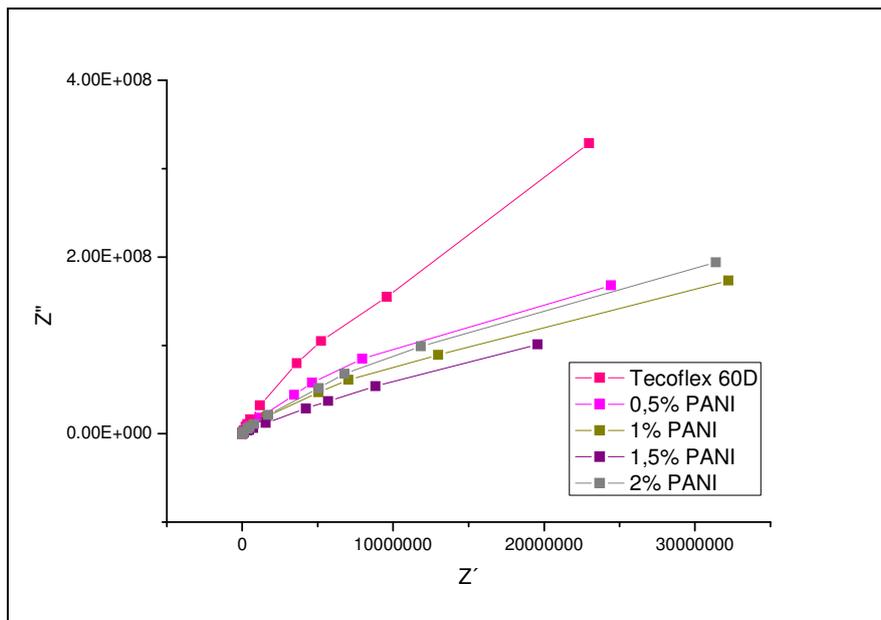


Figura 71: Curva de impedancia para la serie PANI.

Las **Figuras 70** y **71** presentan las curvas obtenidas para las series SWCNT y PANI por separado. En estos gráficos se observa un aumento de la conductividad con el incremento de contenido de nanopartículas. En el caso de la **Figura 70** se presenta un comportamiento inusual por parte de la muestra con 1% SWCNT, la cual parece ser más conductora que las demás matrices. En la **Figura 71** también se observa un comportamiento inesperado ya que la muestra con 2% de PANI es menos conductora que las de 1% y 1,5% de PANI. No obstante, este comportamiento también se observó

en el análisis de conductividad a.c. y se le atribuye a la mala dispersión de las nanopartículas en la solución. Al no poseer más puntos en la curva de impedancia, no se pudo graficar la media circunferencia típica, y por lo tanto no es posible establecer que lo observado represente la tendencia de la curva completa.

Los resultados de esta sección requieren de la realización de mediciones adicionales que permitan evaluar los datos de manera estadística.

5.3.2 Medidas de conductividad d.c.

La **Figura 72** presenta las medias de conductividad d.c. para la serie SWCNT y dos muestras con 0,5% y 1% de PANI. Como puede observarse las matrices con nanopartículas de PANI son más conductoras que las matrices de la serie SWCNT. Este comportamiento está de acuerdo con los otros análisis de propiedades eléctricas de las muestras.

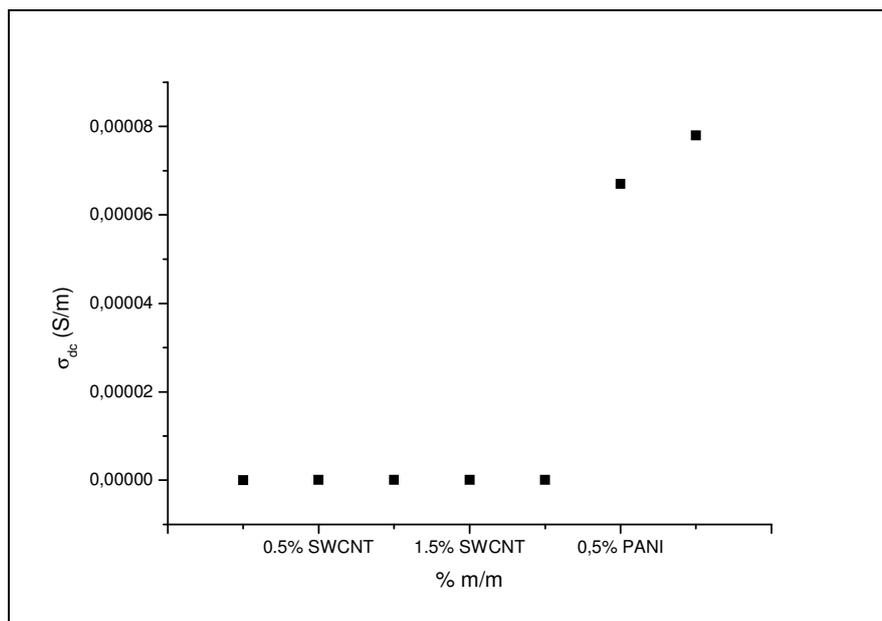


Figura 72: Conductividad dc en función del porcentaje de nanopartículas agregadas.

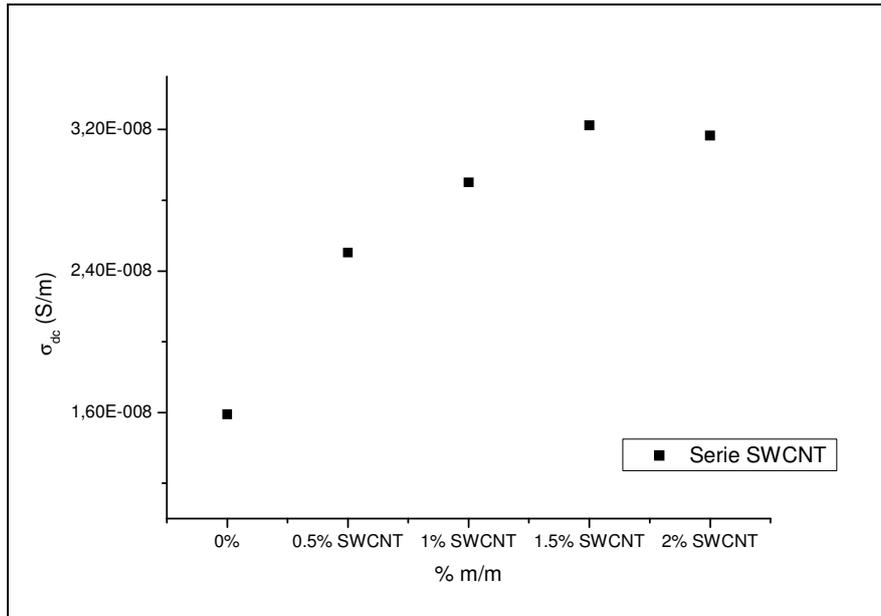


Figura 73: Conductividad dc en función del porcentaje de nanopartículas agregadas para la serie SWCNT.

Al analizar la serie SWCNT por separado (**Figura 73**) se observa que un incremento en el porcentaje de carga produce un aumento de la conductividad del material. En el caso de la muestra con 2% SWCNT se observa que la conductividad disminuye. Este resultado se debe a la mala dispersión de las nanopartículas en la solución y por lo tanto a la falta de un camino conductor de los electrones.

La literatura sobre el comportamiento eléctrico de matrices nanofibras nanocompuestas es sumamente escasa, y esta temática constituye un tema actual de interés para aplicaciones biomédicas.

6. Conclusiones

Se prepararon matrices poliuretánicas nanofibrosas no tejidas mediante técnica de electrospinning de soluciones poliméricas en solventes orgánicos (con o sin nanopartículas). Si bien los principios de la técnica son sencillos, el proceso de electrospinning resulta complejo debido al número de variables involucradas y a la interrelación de las mismas. Una vez establecidos los solventes apropiados y la concentración límite por encima de la cual es posible la obtención de fibras continuas, los parámetros principales del procesamiento mostraron una influencia en la macro y micromorfología de los sistemas preparados.

El agregado de nanopartículas (nanotubos de carbono y nanotubos de polianilina) permitió la preparación de nanocompuestos con morfología propia y propiedades conductoras. El contenido y dispersión de las nanopartículas juega un papel importante en la procesabilidad de este tipo de matrices. La distribución de diámetros de las nanofibras resultó en todos los casos unimodal y desplazada hacia valores menores con respecto a las nanofibras sin partículas.

El desarrollo de matrices nanofibrosas, nanocompuestas y bioactivas mediante la técnica de electrospinning constituye una aproximación biomimética que se encuentra actualmente en plena evolución. Las potenciales aplicaciones de estos biomateriales en el campo biomédico justifican el avance en su investigación.

7. Referencias

- [1] Zhang L., Webster T. J., Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration, *Nano Today*, 4, 66 – 80, **2009**.
- [2] Langer R. S., Vacanti J. P., Tissue Engineering, *Science*, 260, 920 – 926, **1993**.
- [3] Mooney D. J., Mikos A. G., Growing New Organs, *Scientific American*, April **1999**.
- [4] Langer R. S., Vacanti J. P., Tissue Engineering: The Challenges Ahead, *Scientific American*, April **1999**.
- [5] Chapekar M. S., Tissue Engineering: Challenges and Opportunities, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)*, 53, 617 – 620, **2000**.
- [6] Hoerstrup S. P., Lu L., Lysaght M. J., Mikos A. G., Rein D., Schoen F. J., Temenoff J. S., Tessmar J., Vacanti J. P., in: *Biomaterials Science*, 2nd. Ed., Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E., (Editors), Elsevier Academic Press, **2004**. Chapter 8.
- [7] Skalak R., Fox C. F., Proceedings of the Tissue Engineering Workshop, Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26 – 29, **1988**, Alan Liss, New York.
- [8] Nerem R. M., Tissue Engineering: The Hope, the Hype, and the Future, *Tissue Eng.*, 12 (5), 1143 – 1150, **2006**.
- [9] D. F. Williams, *The Williams Dictionary of Biomaterials*, Liverpool University Press, UK, **1999**. p. 318.
- [10] Deuel T. F., Zhang N., Growth Factors, in: *Principles of Tissue Engineering*, 2nd. Ed., Lanza R. P., Langer R., Vacanti J. (Editors), Academic Press, USA, **2000**.
- [11] Moroni L., Elisseff J. H., Biomaterials engineered for integration, *Materials Today*, 11 (5), 44 – 51, **2008**.
- [12] Liu Y., *et al.*, Composite articular cartilage engineered on a chondrocyte-seeded aliphatic polyurethane sponge, *Tissue Engineering*, 10, 1084 – 1092, **2004**.
- [13] American Standard for Testing and Methods, ASTM D883-99. *Standard Terminology relating to Plastics*, **1999**.
- [14] Ashby M. F., Gibson L. J., *Cellular solids: Structure and Properties*, 2nd. Ed. University Press, Cambridge, UK, **1997**.

- [15] Hutmacher D. W., in: *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, R. L. Reis, J. San Román, (Editores). CRC Press, Boca Raton, FL. USA, **2005**. Chapter 6.
- [16] Karp J. M., Dalton P. D., Shoichet M. S., Scaffolds for tissue engineering, *MRS Bulletin* 28, 301 **2003**.
- [17] Ma, P. X., Elisseeff, J., *Scaffolding in Tissue Engineering*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **2005**.
- [18] Thomson R. C., Shung A. K., Yaszemski M. J., Mikos A. G., in: *Principles of Tissue Engineering*, 2nd. Ed., Lanza, R. P., Langer R., Vacanti J. (Editors), Academic Press, USA, **2000**. Chapter 21.
- [19] Abraham G. A., Caracciolo P. C., Buffa F., Cuadrado T. R., Diseño y preparación de matrices poliméricas porosas para ingeniería de tejidos biológicos, *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 59, 1 – 15, **2007**. (ISSN: 0365-1185)
- [20] Mikhailovsky, S. V., Mikhailovska, L. I., Nikolaev, V. G., Chernyshev, V. I., Sarnatskaya, V. V., Bardakhivskaya, K., Nikolaev, A. V., Sakhno, L. A., Use of high surface nanofibrous materials in medicine, in: *Nanoengineered Nanofibrous Materials*, Guceri S. *et al.* (Eds.), Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, **2004**. p. 245 – 256.
- [21] Lannutti J., Reneker D., Ma T., Tomaski D., Farson D., Electrospinning for tissue engineering scaffolds, *Mat. Sci. Eng*, C27, 504 – 509, **2007**.
- [22] Venugopal J., Zhang Y. Z., Ramakrishna S., Electrospun nanofibres: biomedical applications, *Proc. IMechE Part N: J. Nanoeng. Nanosyst.*, 218, 35 – 43, **2005**.
- [23] Ramakrishna S., Fujihara K., Wee-Eong Teo, Yong T., Ma Z., Ramaseshan R., Electrospun nanofibers: solving global issues, *Materials Today*, 9 (3), 40 – 50, **2006**.
- [24] Pham Q. P., Sharma U., Mikos A. G., Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review, *Tissue Eng.*, 12 (5), 1197 – 1211, **2006**.
- [25] Kumbar S. G., Nukavarapu S. P., James R., Hogan M. V., Laurencin C. T., Recent Patents on Electrospun Biomedical Nanostructures: An Overview, *Recent Patents on Biomedical Engineering*, 1 (1), 68 – 78, **2008**.

- [26] Zhang Y., Lim C. T., Ramakrishna S., Huang Z. M., Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications, *J. Mater. Sci.: Mater. in Med.*, 16, 933 – 946, **2005**.
- [27] Reneker, D.H., Smith, D.J., Kataphinan, W., Improved Stent for Use in Arteries, WO05079339, **2005**.
- [28] Kuraishi K., *et al.*, Development of nanofiber-cover stents using electrospinning: in vitro and acute phase in vivo experiments, *J. Biomed. Mat. Res. (Appl. Biomater.)*, 88B, 230 – 239, **2009**.
- [29] Greiner A., Wendorff J.H. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 2 – 36, **2007**.
- [30] Hsu, C.-M., Electrospinning of poly(ϵ -caprolactone), Master of Science Thesis, Worcester Polytechnic Institute, **2003**.
- [31] Tao J., Shivkumar S. Molecular weight dependent structural regimes during the electrospinning of PVA, *Mater. Letters*, 61, 2325 – 2328, **2007**.
- [32] Shenoy S. L., Douglas Bates W., Frisch H. L, Wnek G. E. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer–polymer interaction limit, *Polymer*, 46, 3372 – 3384, **2005**.
- [33] Gupta, P., Elkins, C., Long, T.E., Wilkes, G.L. Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer*, 46, 4799, **2005**.
- [34] Mit-Uppatham, C., Nithitanakul, M., Supaphol, P. Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. *Macromol. Chem. Phys.*, 205, 2327, **2004**.
- [35] Casper, C.L., Stephens, J.S., Tassi, N.G., Chase, D.B., Rabolt, J.F. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules*, 37, 573, **2004**.
- [36] Li, M., Guo, Y., Wei, Y., MacDiarmid, A.G., Lelkes P. I., Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications, *Biomaterials*, 27, 2705 – 2715, **2006**.
- [37] Green, R.A. Lovell, N. H., Wallace, G. G., Poole-Warren L. A., Leading Opinion: Conducting polymers for neural interfaces: Challenges in developing an effective long-term implant, *Biomaterials*, 29, 3393 – 3399, **2008**.

- [38] Guimard N.K., Gomez N., Schmidt C.E. Conducting polymers in biomedical engineering, *Prog. Polym. Sci.*, 32, 876 – 921, **2007**.
- [39] Huang, L., Hu J., Lang, L., Wang, X., Zhang, P., Jing X., Wang, X., Chen, X., Lelkes, P. I., MacDiarmid, A. G., Wei, Y. Synthesis and characterization of electroactive and biodegradable ABA block copolymer of polylactide and aniline pentamer, *Biomaterials*, 28, 1741 – 1751, **2007**.
- [40] Mattioli-Belmonte, M., Giavaresi, G., Biagini, G., Virgili, L., Giacomini, M., Fini, M., et al. Tailoring biomaterial compatibility: in vivo tissue response versus in vitro cell behavior, *Int. J. Artif. Organs*, 26(12), 1077 – 1785, **2003**.
- [41] Díaz M., Pinto N. J., Gao J., MacDiarmid A. G. Electrospinning nanofibers of polyaniline and polyaniline/(polystyrene and polyethylene oxide) blends, in: *Proceeding of the national conference on undergraduate research (NCUR)*. Lexington, Kentucky, 15 – 17, **2001**.
- [42] Bidez III P. R., Li S., MacDiarmid, A. G., Venancio E. C., Wei, Y. Lelkes, P. I., Polyaniline, an electroactive polymer, supports adhesion and proliferation of cardiac myoblasts, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 17 (1-2), 199 – 212, **2006**.
- [43] Harrison B.S., Atala A., Carbon nanotube applications for tissue engineering, *Biomaterials*, 28, 344 – 353, **2007**.
- [44] Flahaut E., Durrieu M.C., Remy-Zolghadri M., Bareille R., Baquey C.H. Study of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes, *J. Mater. Sci.*, 41, 2411 – 2416, **2006**.
- [45] Buffa F., Hu H., Resasco D.R. Side-Wall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes with 4-Hydroxymethylaniline Followed by Polymerization of ϵ -Caprolactone, *Macromolecules*, 38, 8258 – 8263, **2005**.
- [46] Buffa F., Abraham G. A., Grady B. P., Resasco D. E. Effect of nanotube functionalization on the properties of single-walled carbon nanotube/polyurethane composites, *J. Polym. Sci. Part B: Polym Phys.* 45 (4), 490 – 501, **2007**.
- [47] Zanello L. P., Zhao B., Hu H., Haddon R. C. Bone Cell Proliferation on Carbon Nanotubes, *Nanoletters*, 6 (3) 562 – 267, **2006**.
- [48] Bianco A., Kostarelos K., Partidos C. D., Prato M. Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes, *Chem. Commun.*, 571 – 577, **2005**.
- [49] D. F. Williams, *The Williams Dictionary of Biomaterials*, Liverpool University Press, **1999**. p. 205.

- [50] Thomas V., Jose M. V., Chowdhury S., Sullivan J. F., Dean D.R., Vohra, Y. K., Mechano-morphological studies of aligned nanofibrous scaffolds of polycaprolactone fabricated by electrospinning, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 17 (9), 969 – 984, **2006**.
- [51] Sill T. J., von Recum H. A., Review Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials*, 29, 1989 – 2006, **2008**.
- [52] Harun M. H., Saion E., Kassim A., Hussain M. Y., Mustafa I. S., and Ali Omer M. A., Temperature Dependence of AC Electrical Conductivity of PVA-PPy-FeCl₃ Composite Polymer Films, *Malaysian Polymer Journal (MPJ)*, 3(2), 24 – 31, **2008**.
- [53] Seoul, C., Kim, Y.-T., Baek, C.-K., Electrospinning of poly(vinylidene fluoride)/dimethylformamide solutions with carbon nanotubes, *J. Polym. Sci., Polym. Phys.*, 41 (13), 1572 – 1577, **2003**.
- [54] Fagan S. B., Souza Filho A. G., Lima J. O. G., Mendes Filho J., Ferreira O. P., Mazali I. O., Alves O. L., Dresselhaus M. S. 1,2-Dichlorobenzene Interacting with Carbon Nanotubes, *Nano Letters*, 4 (7), 1285–1288, **2004**.
- [55] Ausman K. D., Piner R., Lourie O., Ruoff R. S., Organic Solvent Dispersions of Single-Walled Carbon Nanotubes: Toward Solutions of Pristine Nanotubes, *J. Phys. Chem. B*, 104 (38), pp 8911–8915, **2000**.

8. Trabajo futuro

Determinación del tamaño y distribución de poros

Una de las variables más importantes que afectan las propiedades mecánicas y la funcionalidad de los sistemas porosos poliméricos empleados en ingeniería de tejidos y dispositivos biomédicos es la estructura porosa. La regeneración de tejidos específicos guiada con materiales sintéticos depende del grado de porosidad, el tamaño y forma del poro, y la continuidad o interconectividad de los poros dentro del andamiaje polimérico o compuesto.

La determinación de la distribución de tamaños de poro, volumen total de poros y área superficial puede efectuarse mediante diversas técnicas. El Laboratorio de Polímeros Biomédicos de INTEMA cuenta con un porosímetro de extrusión de líquidos (LEP). El LEP es un instrumento que permite la medición de permeabilidad de líquidos, volumen de poros y distribución de tamaños de poro ampliamente utilizado en la caracterización de materiales porosos usados en la industria, biotecnología, farmacia, filtración, alimentos, biomateriales y medio ambiente. El LEP no emplea sustancias tóxicas como mercurio que pongan en riesgo la salud de operarios o el medio ambiente. La presión requerida es casi un orden de magnitud menor que la requerida por un porosímetro de intrusión de mercurio, por lo que puede usarse para materiales sensibles a la presión, como los materiales preparados en este proyecto.

Determinación del ángulo de contacto

Entre las variables que se requieren conocer previamente para efectuar los estudios de porosimetría se encuentra la tensión superficial material-líquido. La técnica de ángulo de contacto permite la medición de esta propiedad superficial. Al mismo tiempo el conocimiento del ángulo de contacto proporciona información sobre la hidrofiliidad del material.

Evaluación de la dispersión y orientación de nanopartículas

Se realizarán estudios mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanofibras preparadas sobre los soportes de cobre que se emplean en TEM.

Determinación de propiedades mecánicas y nanomecánicas de compuestos

Los ensayos a escala micro y nanométrica, como la nanoindentación instrumentada, surgen como una herramienta muy potente en la elucidación del comportamiento de biomateriales y dispositivos, tanto en el ámbito de la investigación académica como en la industria. Las técnicas de nanoindentación basadas en el registro continuo de la carga aplicada por el indentador y la profundidad de la penetración con resolución en la carga del orden de $1\mu\text{N}$ y en la profundidad del orden de 1nm posibilitan la obtención detallada de curvas carga-deformación. Estas permiten la determinación de distintas propiedades mecánicas del material a nivel local y en la vecindad de su superficie (dureza, módulo elástico, tensión de fluencia, comportamiento viscoelástico, resistencia al rayado, tenacidad a la fractura, propiedades tribológicas, etc.) y por lo tanto se pueden aplicar al estudio de polímeros, biomateriales y tejidos.

En colaboración con el grupo del Prof. Shing-Chung Wong (University of Akron, USA), quien posee una amplia y reconocida experiencia así como el equipamiento fundamental para la obtención y caracterización de nanofibras, se planean concretar estudios para examinar las ventajas del refuerzo a nanoescala y sus mecanismos de deformación en morfologías confinadas.

Anexo I

Descripción de algunas técnicas de preparación de matrices porosas

- Procesado de fibras:

Mallas de fibras no tejidas (*non-woven fiber mesh*): las mallas consisten en fibras individuales aglomeradas según un diseño tridimensional con poros de tamaño variable y altamente interconectados. La ventaja de estas mallas es su gran área superficial para la fijación de células y rápida difusión de nutrientes para la supervivencia y crecimiento celular. Sin embargo, la falta de estabilidad estructural necesaria para su empleo *in vivo* y la dificultad para controlar precisamente el tamaño de poro y la porosidad constituyen importantes desventajas que condujeron al desarrollo de la técnica de fibras unidas o interconectadas.

Fibras unidas (*fiber bonding*): en este procedimiento las fibras pueden interconectarse formando redes. La elección del disolvente, inmiscibilidad de los dos polímeros y sus temperaturas de fusión relativas también limita la aplicación general de esta técnica a otros polímeros. Además, la exposición a elevadas temperaturas puede transformar las fibras en dominios esféricos y los residuos de disolvente pueden ser peligrosos para las células y los órganos.

- Técnicas de disolución de partículas:

Evaporación de solvente y disolución de partículas (*solvent casting - particulate leaching*): es una de las técnicas más comúnmente usadas para la fabricación de matrices porosas. Esta técnica involucra la disolución de un polímero en un solvente volátil y la colada de la solución en un molde que contiene un porógeno (partículas con tamaño predeterminado, como sal, azúcar, parafina u otros). Luego de evaporar el solvente, el porógeno se elimina por disolución con agua u otro solvente específico del porógeno. Aunque este proceso puede resultar en matrices con un bajo grado de interconectividad, esta puede aumentarse al llenar el molde con porógenos humedecidos, previo al agregado de la solución del polímero. La humedad ayuda a fusionar las partículas de porógeno para asegurar una estructura interconectada una vez que el porógeno es removido.

Recientemente, se modificó esta técnica para crear matrices con poros esféricos de alta uniformidad (**Figura 1**). Para este procesamiento, se unen entre sí esferas de parafina por medio de un tratamiento térmico para formar una estructura tridimensional dentro de un molde, creando un alto grado de interconectividad. Luego, se vierte la solución del polímero sobre las esferas de parafinas y se endurece. Finalmente, se disuelve la parafina con hexano y se obtiene una estructura altamente porosa (95%).

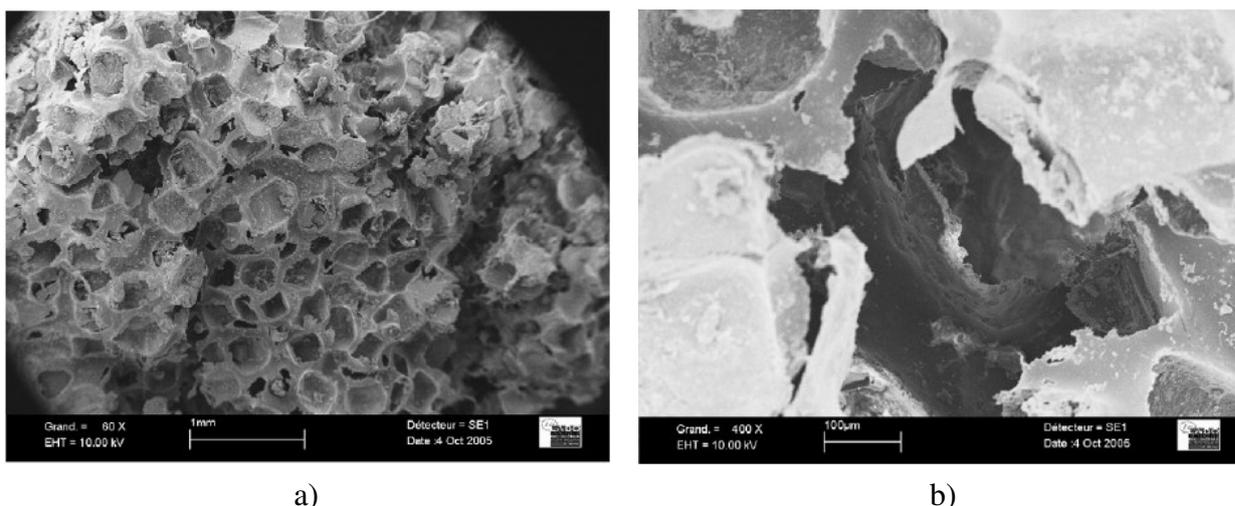


Figura 1: Matrices porosas de poli(ácido láctico) y carbonato apatita nanocrystalina preparadas por evaporación de solvente y disolución de partículas.

- Técnicas de separación de fases:

Separación de fases inducida térmicamente (*thermally-induced phase separation*): bajo determinadas condiciones un sistema multicomponente homogéneo se torna termodinámicamente inestable y tiende a separarse en fases para disminuir la energía libre del sistema. La separación de fases líquido-líquido de una solución polimérica con temperatura crítica de solución superior se induce disminuyendo la temperatura. El sistema se separa en dos fases, una fase rica en polímero y otra pobre, formando una estructura bicontinua. La fase rica en polímero solidifica después de la eliminación del solvente, por ejemplo mediante sublimación, y se obtiene la matriz porosa. Un pequeño cambio en los parámetros del proceso puede afectar significativamente la morfología del soporte poroso resultante.

La separación sólido-líquido puede realizarse mediante cristalización del solvente en una solución polimérica. Luego de la eliminación de los cristales de solvente, mediante sublimación o intercambio de solvente, se producen poros en el espacio

originalmente ocupado por los cristales de solvente. Esta técnica, conocida como liofilización, permite obtener matrices con porosidad de hasta 90% y tamaño medio de poro en el rango de 15 a 35 μm . Para introducir poros de mayor tamaño se emplean técnicas combinadas con disolución de partículas.

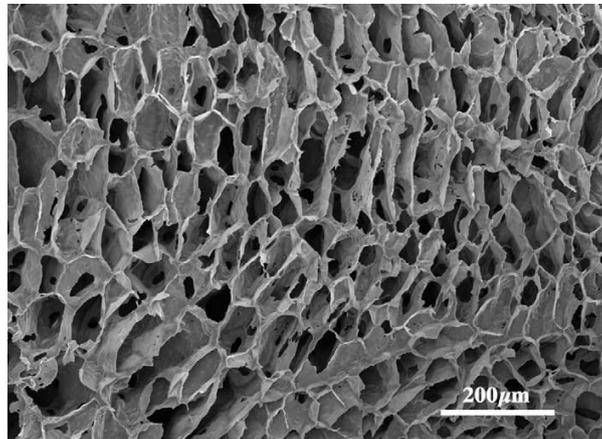


Figura 2: Micrografía electrónica de barrido de una matriz de PLLA fabricada usando *solid-liquid phase separation*.

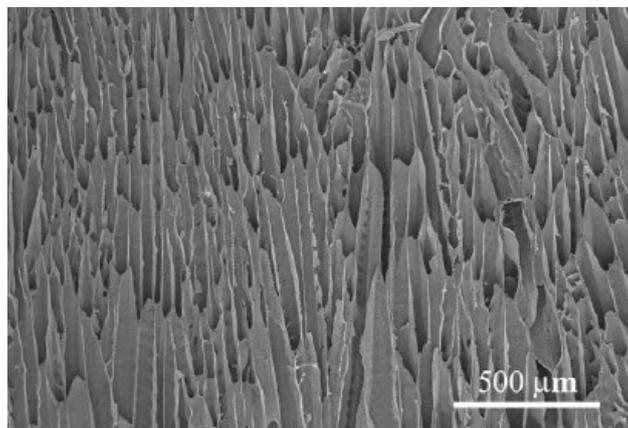


Figura 3: Micrografía electrónica de barrido de una matriz de PLLA con arquitectura microtubular orientada.

Inversión de fases y remoción de partículas (*phase inversion - particulate leaching*): esta técnica se emplea para obtener soportes con un alto grado de macroporosidad interconectada. El proceso involucra la dispersión de un agente porogénico (normalmente cristales de glucosa) en una solución de PLGA en dimetilsulfóxido. La mezcla se congela en un molde y luego se agrega un no solvente del PLGA (por ejemplo agua). Este no solvente produce la separación de fases del PLGA y su solidificación. El agua también solvata al porógeno produciendo su

eliminación por disolución. Como en otros casos los parámetros críticos pueden modificarse para obtener diferentes estructuras.

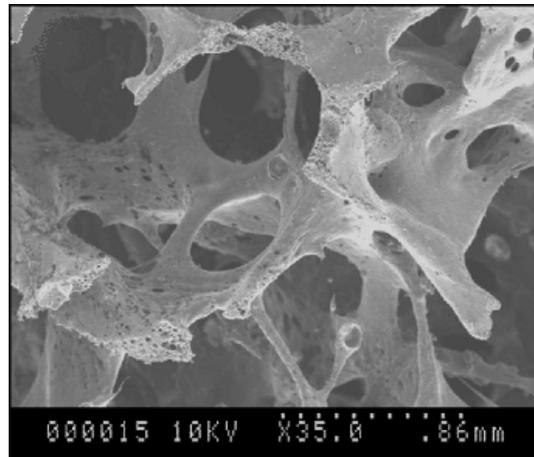


Figura 4: Matrices altamente porosas para aplicaciones en ingeniería de tejido óseo producidos por *phase inversion/particulate leaching*.

- Técnicas de diseño de arquitecturas tridimensionales:

Tecnologías de procesamiento mediante modelado rápido (*rapid prototyping, RP* o *solid free-form, SFF*): permiten la fabricación de matrices con un control muy preciso de la micro y macroestructura, produciendo piezas tridimensionales de geometría compleja a partir de multicapas y empleando programas de diseño asistido por computadora. De esta manera se puede controlar la morfología, geometría y forma total de la matriz, permitiendo la creación de andamiajes que se ajustan a los sitios con defectos anatómicos a partir de la imagen obtenida mediante tomografía computada del paciente. Aunque estas tecnologías tienen limitaciones en cuanto a la selección de materiales, costo y potencial degradación térmica de polímeros, resolución de canales por mm^3 , entre otros, el avance en el desarrollo de nuevas tecnologías ofrece un potencial importante en el campo de la ingeniería de tejidos, donde se requiere una matriz a medida y precisamente controlada.

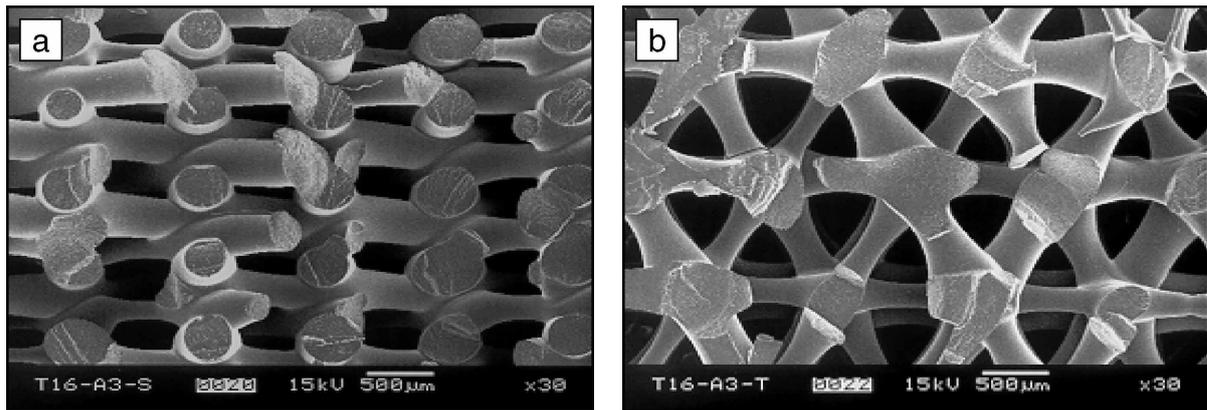


Figura 5: Matrices altamente porosas para aplicaciones en ingeniería de tejido óseo producidas por rapid prototyping.

- Técnicas para obtención de materiales nanoestructurados

Autoensamblado o autoorganización molecular (*molecular self-assembly*): se refiere a un ensamblaje cooperativo y reversible de componentes predefinidos en una superestructura ordenada. El autoensamblado es un proceso clave para la vida (por ejemplo síntesis de proteínas). Desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos, el autoensamblado puede usarse para diseñar diferentes topografías superficiales en la escala micro y nanométrica para fomentar la adhesión celular, migración, función, e integración de tejidos; para establecer un microambiente local controlado por medio de la funcionalización de biomateriales para generar esfuerzos mecánicos en escala micro y nanométrica que afecten las interacciones entre los biomateriales y las células; y para posicionar precisamente las células en la superficie de la matriz para controlar la interacción celular. Sin embargo, estas estructuras no son muy estables debido a las interacción no covalentes, como puentes de hidrógeno, uniones iónicas, etc., entre las moléculas ensambladas.

Electrospinning (*ver sección 1.5*)

- Otras técnicas alternativas:

Agregación de micropartículas (*microparticle aggregation*): consiste en la agregación de micropartículas poliméricas por métodos físicos o químicos. La porosidad obtenida en este tipo de matrices puede controlarse fácilmente por el diámetro

de las microesferas, las que crean intersticios cuando las partículas se agregan. Estas matrices pueden servir como portadores de agentes bioactivos reteniendo en los intersticios, por ejemplo, factores de crecimiento que pueden liberarse en forma gradual en condiciones fisiológicas interviniendo en los procesos celulares del microambiente de la matriz y los tejidos vecinos.

Espumado de compuesto polímero-cerámico: esta técnica permite preparar matrices con una resistencia a la compresión superior a los materiales no reforzados con la misma porosidad, por lo que resultan de interés para aplicaciones en regeneración de tejidos óseos. Se incluyen fibras cortas o partículas de hidroxiapatita (HA) y un agente porogénico (microesferas de gelatina o cristales de sal) en una solución de, por ejemplo, poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y cloruro de metileno. Después de la evaporación del disolvente, la eliminación del porógeno permite la obtención de espumas compuestas de celda abierta con PLGA reforzado con fibras de HA.

Espumado por gas a alta presión (*gas foaming*): se exponen discos de PLGA a una alta presión de dióxido de carbono (5,5 MPa, 25°C) para permitir la saturación de gas en el polímero. La reducción de la presión de gas a la presión ambiente produce la nucleación y expansión del dióxido de carbono disuelto, generando macroporos. Este proceso genera una superficie no porosa y una estructura mayormente formada por poros cerrados, morfología que no resulta conveniente para el sembrado celular. Por lo tanto debe combinarse con la técnica eliminación de partículas para generar los poros abiertos.

Referencias:

- Abraham G. A., Caracciolo P. C., Buffa F., Cuadrado T. R., Diseño y preparación de matrices poliméricas porosas para ingeniería de tejidos biológicos, *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 59, 1 – 15, **2007**. (ISSN: 0365-1185)
- Ma, P. X., Elisseeff, J., *Scaffolding in Tissue Engineering*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **2005**.
- Peter X. Ma, Scaffolds for tissue fabrication, *Materials Today*, **2004**.
- Jeffrey M. Karp, Paul D. Dalton, Molly S. Shoichet, Scaffolds for Tissue Engineering, *MRS Bulletin*, **2003**.

- Xuejun Wen, Donglu Shi, Ning Zhang, Chapter U: Applications of Nanotechnology in Tissue Engineering, *Handbook of Nanostructured Biomaterials and Their Applications in Nanobiotechnology* (Edited by H. S. Nalwa) Volume 1: Pages (1–23).

Anexo II

Nanofibras poliméricas para aplicaciones en ingeniería de tejidos y dispositivos para implantes o prótesis

Apósitos y piel

Los materiales normalmente empleados para apósitos tienen las siguientes características: 1) hemoestáticos, 2) eficiencia como barrera bacterial, 3) absorción de exudados en exceso (fluidos de la herida), 4) proveer y mantener un ambiente húmedo, 5) indoloro para los pacientes y fácil de remover, y 6) bajo costo. Los apósitos obtenidos por electrospinning pueden satisfacer los requerimientos de alta permeación de gases y protección de la herida de infecciones y deshidratación. La clave de los apósitos es la producción de una estructura ideal, que brinde una mayor porosidad y buenas propiedades de barrera [1]. Frecuentemente, se usan nanofibras de poliuretanos (PU) y policaprolactona (PCL) para apósitos debido a sus buenas propiedades de barrera y permeabilidad al oxígeno. Los apósitos semipermeables, muchos de los cuales son de PU, promueven la cicatrización de la herida. Los apósitos a partir de membranas nanofibrosas muestran una pérdida de vapor de agua controlada, excelente permeabilidad al oxígeno, y promueven el drenaje de fluidos, propiedad atribuida a la porosidad y propiedades inherentes del poliuretano [2].

Algunos estudios prueban que los fibroblastos dérmicos sembrados en matrices biocompatibles de polímeros sintéticos y fibras naturales pueden soportar la adhesión celular, proliferación, y forman una matriz extracelular en los confines de las matrices. Bhattarai *et al.* [3] utilizaron PCL y colágeno para la preparación de matrices nanofibrosas para lograr substitutos dérmicos. Se estudió intensamente, la morfología celular e interacciones con el biomaterial desde que ellos brindaron la clave de la biocompatibilidad, el éxito clínico de los dispositivos implantados y tejidos reparados. El diseño de matrices porosas debe proveer superficies para la adhesión celular y mantener la estabilidad mecánica en el sitio defectuoso del anfitrión. Las matrices deben mantener su integridad estructural durante la manipulación e implantación por parte del médico en el sitio defectuoso del paciente. Luego de la cirugía, la estructura debe proveer suficiente soporte biomecánico durante el proceso de regeneración del tejido y

degradación de la matriz [1]. Estas demandas reflejan la importancia de obtener un tamaño de poro, un diámetro de fibra, una orientación de fibras y/o poros determinados, ya que todos estos factores son importantes para el desarrollo de piel artificial.

Vasos sanguíneos

Los injertos sanguíneos están destinados para el reemplazo de vasos sanguíneos dañados u ocluidos. Las nanomatrices tridimensionales diseñadas y fabricadas a partir de colágeno y el material natural segregado por la célula pueden usarse para sembrar células de músculo liso (SMCs) para que imiten los vasos sanguíneos naturales de pequeño diámetro. Los estudios sugieren que las células de músculo liso desarrollan la función, morfología, forma, y arquitectura celular de un vaso normal una vez implantadas en la matriz. La matriz extracelular que rodea a las células del tejido vascular cumple y reúne las propiedades necesarias para proveer las propiedades biomecánicas del tejido [1]. Las matrices de poli(glicolida-co- ϵ -caprolactona) tienen propiedades mecánicas elásticas y permiten la promoción de la adhesión de SMCs y la posterior formación de tejido [2].

Los vasos sanguíneos naturales y sanos del cuerpo humano, poseen un revestimiento de células endoteliales que resisten activamente la trombosis y la deposición de proteínas de plasma al liberar prostaciclina, sulfato de heparina, y otros anticoagulantes [2]. Las matrices de poli(L-lactida-co- ϵ -caprolactona) (P(LLA-CL)) se procesaron para obtener fibras al azar y fibras alineadas para imitar la matriz extracelular adecuada para la proliferación de SMCs y células endoteliales [2,1]. Se usaron estas células, de músculo liso, y fibroblastos humanos en las capas internas, medias y externas respectivamente de conductos vasculares. El desafío clave es lograr el alineamiento, arquitectura, tipos de células abundantes, y el comportamiento adecuado en cada capa celular. Si se logra un desarrollo exitoso y se aprueba para uso clínico, esta nueva tecnología puede reemplazar a los otros injertos vasculares, reduciendo el costo de la cirugía de bypass en un 10% y otros costos hospitalarios también, mejorando la productividad y calidad de vida de las personas que se someten a procedimientos de este tipo [1].

Tejido neuronal

La reparación del tejido neuronal es un precioso concepto de tratamiento en el cuidado de la salud humana ya que impacta directamente en la calidad de vida. Es bien conocido que luego de sufrir un trauma o una enfermedad el sistema nervioso central no se puede regenerar por sí solo. Las heridas de los nervios periféricos conllevan a la pérdida del control neuronal en segmentos denervados del cuerpo y pérdidas severas de habilidades de los pacientes. Tradicionalmente, para reparar las regiones dañadas o enfermas del SNC se usan injertos de nervios periféricos o trasplante de tejidos, no obstante trae acarreado los problemas típicos de los auto y aloinjertos [2,1]. Dos opciones se discuten en la literatura: o utilizar materiales sintéticos para que actúe como puente entre el hueco de los nervios dañados, con aplicaciones locales y controladas de factores de crecimiento; o utilizar guías biodegradables sembradas con cultivos de células de Schwann. El nervio degenerado se elimina por acción conjunta de estas células y los macrófagos infiltrados.

Evans *et al.* [4] utilizaron matrices de PLLA para intentar guiar la regeneración de nervios periféricos. Yang *et al.* [5] estudiaron el comportamiento de nanofibras (500-300 nm) de PLLA alineadas y al azar con células madres neuronales, la adhesión y diferenciación para la regeneración del nervio.

El colágeno, componente principal de la matriz extracelular, se usa ampliamente en prótesis quirúrgicas y en reparación de nervios. La propiedad adhesiva del colágeno con varios tipos de células permite su supervivencia por largo tiempo y proliferación. El colágeno cumple un doble rol, sirve como un marco físico para los nervios que se regeneran, facilitando la fijación y movimiento de las células por medio de la entrega de proteínas de la matriz y moléculas específicas de adhesión; y como fuente de varios factores trópicos para la regeneración de axones [1].

Bellamkonda *et al.* [6] describen una matriz mejorada que proporciona un substrato para el crecimiento y una guía direccional del tejido neuronal, y puentea exitosamente los nervios dañados y tiene otras aplicaciones potenciales para ingeniería de tejidos. La arquitectura de la matriz está compuesta principalmente por nanofibras orientadas. Por lo menos el 75% de estas fibras (con diámetros entre 400-1000 nm) están orientadas entre los 20° de la dirección uniaxial. Estas nanofibras están apiladas o pueden tener separadores compuestos por hidrogeles y también se los fabrica en forma

tubular. El implante nanoporoso puede comprender uno o más agentes bioactivos que ayudan al crecimiento, reparación y regeneración celular. El implante tridimensional nanoporoso orientado fabricado por electrospinning imita la estructura del colágeno y otras estructura fibrilares, ayudando a la regeneración y migración celular. En la regeneración del tejido nervioso periférico, este tipo de matriz brinda señales orientadas para guiar a las células de Schwann y eventualmente junta las dos terminales nerviosas [7].

Tejido óseo

El hueso es un material nanocompuesto que consiste en una plantilla (*template*) de hidrogel blando basado en proteínas (colágeno, laminina, fibronectina, vitronectina), agua y componentes inorgánicos duros (hidroxiapatita, HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). El 70% de la matriz ósea está compuesta de HA que posee dimensiones nanométricas. Las otras proteínas que componen la matriz extracelular del hueso también tienen dimensiones nanométricas [8].

Naturalmente, los huesos se vuelven más resistentes por la nucleación de hidroxiapatita entre los huecos nanométricos de las moléculas de colágeno [9]. El diseño de nuevos nanomateriales que poseen excelentes propiedades mecánicas y además tienen una nanoestructura biomimética, mejora las funciones de los condrocitos y las células óseas. Además, los nanomateriales presentan propiedades de superficie únicas (como la topografía, la química, sus propiedades de mojado y energía superficial) debido a su aumento significativo de área superficial y rugosidad. Los estudios demuestran que los materiales nanoestructurados con propiedades de superficie favorables promueven las interacciones de las proteínas, lo que estimula más eficientemente el crecimiento del hueso, en comparación con otros materiales [8].

Para obtener matrices más resistentes que imiten el comportamiento del hueso, se fabricaron membranas porosas híbridas de PLA/HA mediante electrospinning. Se cultivaron osteoblastos (MG-63) en membranas de PLLA/HA, y se investigó la capacidad de adhesión y crecimiento celular. Se observó una mejor adhesión y crecimiento celular en las matrices con nanopartículas de HA. Zhang *et al.* [10] fabricaron una matriz compuesta de poli(butileno succinato) (PBSU) / wollastonita / apatita para ingeniería de tejidos óseos. Los datos de SEM obtenidas muestran la deposición de las apatita sobre la superficie de las fibras. Recientemente, Osathanon *et*

al. [11] desarrollaron un compuesto de polímero/fosfato de calcio para aplicaciones en tejido óseo. Estas nanofibras compuestas promueven la actividad de la fosfatasa alcalina de osteoblastos así como también la expresión del gen marcador de osteoblastos (mRNA) para soportar la maduración del hueso tanto *in vitro* como *in vivo*, en un modelo defectuoso de cráneo de ratón [8,9].

Cartílago

En ingeniería de tejido de cartílago, las células elegidas para la regeneración de cartílago son los condrocitos y células madres mesenquimales (MSCs), el tipo de célula elegido determina la estrategia del tejido de cartílago *in vivo*. Un amplio rango de biomateriales naturales y sintéticos en distintas formas se usaron para soportar condrocitos de MSCs *in vitro/in vivo*. Los tejidos exitosos para la reparación de defectos de cartílago de tamaño crítico requieren tres elementos importantes: una fuente de células segura y de fácil acceso, un ambiente de cultivo controlable con un medio condrogénico, y una matriz biocompatible tridimensional con características estructurales favorables para la unión, proliferación, condrogénesis celular *in vitro*, y eventualmente integración funcional *in vivo* [1].

Hubo un gran interés en la incorporación de condrocitos o células madre en matrices electrohiladas tridimensionales poliméricas o compuestas. Por ejemplo, Li *et al.* [12] investigaron la condrogénesis de MSCs en una matriz nanofibrosa electrohilada de poli(caprolactona). La diferenciación de las células madre en condrocitos es comparable a un cultivo precipitado de células establecido. Sin embargo, las nanofibras, al ser fácilmente fabricadas y modificadas, poseen mejores propiedades mecánicas para superar las desventajas del uso de precipitados de células y, por lo tanto, se presentan como candidatos ideales para el trasplante de células madre durante la reparación clínica de cartílago [8]. Lee *et al.* [13] reportaron matrices porosas de colágeno / quitosano (CS) / glucosaminoglucano (GAG) cargados con TGF- β 1, el cual presenta una liberación controlada de TGF- β 1 y promueve la regeneración del cartílago. Más aún, el agregado de CS a la matriz de colágeno mejora las propiedades mecánicas y estabilidad de la red de colágeno al inhibir la acción de la colagenasa [1].

Las matrices nanofibrosas poliméricas por si solas o en combinación con otros materiales y estructuras se usan exitosamente como implantes o prótesis. Varios polímeros tanto naturales como sintéticos y su combinación se electrohilaron en estructuras tridimensionales o revestimientos para implantes metálicos. La incorporación de matrices nanofibrosas en la estructura del implante tiene varias ventajas que incluyen una mayor área superficial, menor fricción, biocompatibilidad mejorada, y la habilidad de liberar agentes terapéuticos en el lugar de la implantación [7].

Andersen *et al.* [14] desarrollaron un globo expandible revestido en la capa superficial con nanofibras electrohiladas para usos en procedimientos de angioplastia. Estos globos tienen baja fricción superficial y propiedades hidrofílicas. Varios polímeros como nylon, poliuretanos, poliolefinas, y/o polímeros fluorados se depositaron en la capa superficial del globo para crear un catéter expandible. Además, presenta la posibilidad de incorporar en la matriz nanofibrosa de por lo menos una sustancia farmacéuticamente activa. En el mismo sentido, Andersen *et al.* [15] describieron un dispositivo de embolización, este consiste en un eje o cable guía de metal sólido y/o no expandible el cual se recubre con una matriz electrohilada nanofibrosa en la superficie exterior. Este enfoque provee un espesor de recubrimiento uniforme con fricción superficial reducida, evitando de esta forma alterar las dimensiones del implante. Los recubrimientos nanofibrosos realizados de poli(etilenimina) diazoniodiolato, se usan como reservorio de una sustancia farmacéutica activa. Dubrow *et al.* [16] describen varios dispositivos médicos, como catéteres, implantes (dentales y ortopédicos), injertos vasculares, que utilizan matrices nanofibrosas para mejorar el área superficial de los mismos. La adición de una nanoestructura en la superficie mejora las propiedades del dispositivo en distintas formas, aumentando la hidrofobicidad, adhesión y biointegración. Lee *et al.* [17] describen un dispositivo vaso-oclusor que incluye un corazón y una matriz nanofibrosa electrohilada superficial. El centro es de metal con distintas geometrías. La matriz nanofibrosa está hecha con polímeros biodegradables o sintéticos. El dispositivo vaso-oclusor se utiliza para generar embolias en aneurismas localizados en los vasos sanguíneos de los humanos, pero también puede usarse en cualquier lugar que requiera oclusión tanto en humanos como en animales. Matsuda *et al.* [18] describieron

dispositivos médicos que comprenden matrices nanofibrosas electrohiladas de colágeno laminadas para uso médico y como órganos artificiales. Ouyang *et al.* [19] usaron matrices nanofibrosas compuestas por poliéster sintético en combinación con otros biopolímeros (colágeno, quitosano, ácido hialurónico y sulfato de condroitina) como materiales para implantes. La combinación de las nanofibras sintéticas con los biopolímeros mejora las propiedades mecánicas así como también la bioactividad de la matriz nanofibrosa y puede ser usado como materiales protéticos para reparar varios tejidos como ligamentos, tendones, pared abdominal y piso pélvico. Los implantes con matrices nanofibrosas biopoliméricas ofrecen varias ventajas entre las que se incluyen, mejor biocompatibilidad, flexibilidad y menor fricción [7].

Referencias:

- [1] J. Venugopal, Sharon Low, Aw Tar Choon, S. Ramakrishna, Interaction of cells and nanofibers scaffolds in tissue engineering, *Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 84B, 34 – 48, **2008**.
- [2] J. Venugopal, Y. Z. Zhang, S. Ramakrishna, Electrospun nanofibers: biomedical applications, *Proc. IMechE*, Vol. 218 Part N, **2005**.
- [3] Bhattarai S. R., Bhattarai N., Yi H. K., Cha D. I., Kim H. Y., Novel biodegradable electrospun membrane: scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 25, 2595 – 2602, **2004**.
- [4] Evans G. R., Brandt K., Widmer M. S., Gupta P. K., Mikos A. G., Williams J., Nabawi A., Patrick C. W. Jr., In vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration, *Biomaterials*, 20, 1109 – 1115, **1999**.
- [5] Yang F., Murugan R., Wang S., Ramakrishna S., Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid)aligned fibers and their potential in tissue engineering, *Biomaterials*, 26, 2603 – 2610, **2005**.
- [6] Bellamkonda R.V., Kim Y., Kumar S. Nanofilament Scaffold for Tissue Regeneration: WO06096791, **2006**.
- [7] Sangamesh G. Kumbar, Syam P. Nukavarapu, Roshan James, MaCalus V. Hogan, Cato T. Laurencin, Recent Patents on Electrospun Biomedical Nanostructures: An Overview, *Recent Patents on Biomedical Engineering*, 1 (1), 68 – 78, **2008**.
- [8] Lijie Zhang, Thomas J. Webster, Review: Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration, *Nano Today*, 4, 66 – 80, **2009**.

- [9] Seema Agarwal, Joachim H. Wendorff, Andreas Greiner, Feature Article: Use of electrospinning technique for biomedical applications, *Polymer*, 49, 5603 – 5621, **2008**.
- [10] Zhang D, Chang J, Zeng Y., Fabrication of fibrous poly(butylene succinate)/wollastonite/apatite composite scaffolds by electrospinning and biomimetic process *J Mater Sci Mater Med* ,19(1), 443 – 449, **2008**.
- [11] Osathanon T., Linnes M.L., Rajachar R.M., Ratner B.D., Somerman M.J., Giachelli C.M. Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 29, 4091, **2008**.
- [12] W.J. Li, R. Tuli, C. Okafor, A. Derfoul, K.G. Danielson, D.J. Hall, et al., A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, 26, 599, **2005**.
- [13] Lee J. E., Kim K. E., Kwon I. C., Kim H. J., Seong S. C., Lee M. C., Effects of controlled released TGF- β 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold, *Biomaterials*, 25, 4163 – 4173, **2004**.
- [14] Andersen, E. A Balloon for Use in Angioplasty with an outer Layer of Nanofibers: WO05105171, **2005**.
- [15] Andersen, E., Smith, D., Reneker, D. Medical Device: WO05039664, **2005**.
- [16] Dubrow, R.S., Bock, L.A., Daniels, R.H., Hardev, V.D., Niu, C., Sahi, V. Medical device applications of nanostructured surfaces: US2006204738, **2006**.
- [17] Lee, E., Seifert, P.S. Embolic Device Made of Nanofibers: WO04045425, **2004**.
- [18] Matsuda, T., Kitoaki, S.: JP321484, **2004**.
- [19] Ouyang, H. Netted tissue-engineering stand: CN1895687, **2007**.

Anexo III

Síntesis y caracterización de nanotubos de carbono (SWCNT) y polianilina (PANI)

SWCNT

Los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) usados en este estudio se obtuvieron mediante el método CoMoCAT, desarrollado por el Dr. Daniel Resasco y col. en la Universidad de Oklahoma [1], el cual emplea un polvo de Co-Mo soportado sobre sílica que cataliza el crecimiento selectivo de SWNT por desproporcionalización de CO. El ajuste de los parámetros de esta reacción permite el control de la estructura de los nanotubos [2,3].

Los SWCNT utilizados en este trabajo tienen un diámetro promedio de 0.8 nm. Los restos del catalizador se eliminan por un proceso de purificación que conlleva dos etapas. Primero, el material crudo se lleva a un horno a 250°C durante 10 horas, a fin de oxidar las especies de Co y Mo remanentes. La segunda etapa consiste en la disolución del catalizador en una solución de HF (33% en agua), seguido por un abundante lavado con agua. El material resultante tiene una excelente calidad, lo que fue verificado por TEM, SEM y la relación entre las bandas D/G obtenidas en el espectro Raman, así como un bajo contenido de impurezas (< 0.3% de metales), lo que fue determinado por un análisis con XPS.

PANI

Los nanotubos de PANI se depositaron polarográficamente sobre películas finas de aluminio (Alcoa, 99.99%, 30.0 µm, 2 V) empleando una solución de anilina (Sigma-Aldrich, 99.0%, 2.2 mM) y ácido sulfúrico (Merck, 1 M) a temperatura ambiente. El crecimiento de nanotubos se terminó en un ciclo de potencial a -100 mV con referencia al electrodo de calomel saturado (SCE), de tal manera que el PANI esté en el estado reducido y alcance una carga de 30 mC. Posteriormente el PANI se recuperó después de la disolución de los electrodos de aluminio cubiertos con el polímero conductor. La solución resultante se centrifugó (3000 g) y el precipitado se lavó exhaustivamente con agua destilada y etanol para eliminar el exceso de iones y monómeros. El producto final se secó bajo vacío a 40°C durante 24 h.

Los nanotubos de PANI se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) en un equipo Phillips, XL30 (UNIFEI, Brasil). La protonación del PANI se confirmó mediante espectroscopía UV/Visible, realizada en un espectrofotómetro Varian 634. Para este análisis el PANI electrodepositado en la superficie del aluminio se disolvió en N-metilpirrolidona (NMP). Las propiedades eléctricas de la interfase PANI-Al se estudiaron analizando la curva de densidad de corriente en función del voltaje aplicado (J vs V) empleando un electrómetro Keithley (K237).

El análisis microestructural efectuado por SEM muestra los nanotubos de PANI obtenidos mediante este proceso. El mecanismo de formación de nanotubos parece involucrar una nucleación inicial en microcavidades, adquiriendo la forma como resultado del proceso de oxidación del film de aluminio metálico. En este caso, la formación de nanotubos se debe a la nucleación de moléculas de anilina en los poros formados en el aluminio, cuando la oxidación tiene lugar. Luego la polimerización avanza con el aumento de nuevas moléculas que pueden interaccionar para formar una nanoestructura fibrosa de PANI.

Referencias:

- [1] Resasco D. E., Alvarez W. E, Pompeo F., Balzano L., Herrera J. E., Kitiyanan B., and Borgna A. A Scalable Process for Production of Single-walled Carbon Nanotubes (SWNTs) by Catalytic Disproportionation of CO on a Solid Catalyst , *J. Nanoparticle Res.*, 4, 131 – 136, **2002**.
- [2] Alvarez W. E., Pompeo F., Herrera J. E., Balzano L., Resasco D. E. Characterization of Single-Walled Carbon Nanotubes (SWNTs) Produced by CO Disproportionation on Co–Mo Catalysts, *Chem. Mater.*, 14, 1853 – 1858, **2002**.
- [3] Herrera J. E., Balzano L., Pompeo F., Resasco D. E. Raman Characterization of SWNT of Various Diameters Obtained by Catalytic Disproportionation of CO, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 3, 133, **2003**.

Anexo IV

Micrografías SEM de otras condiciones experimentales estudiadas

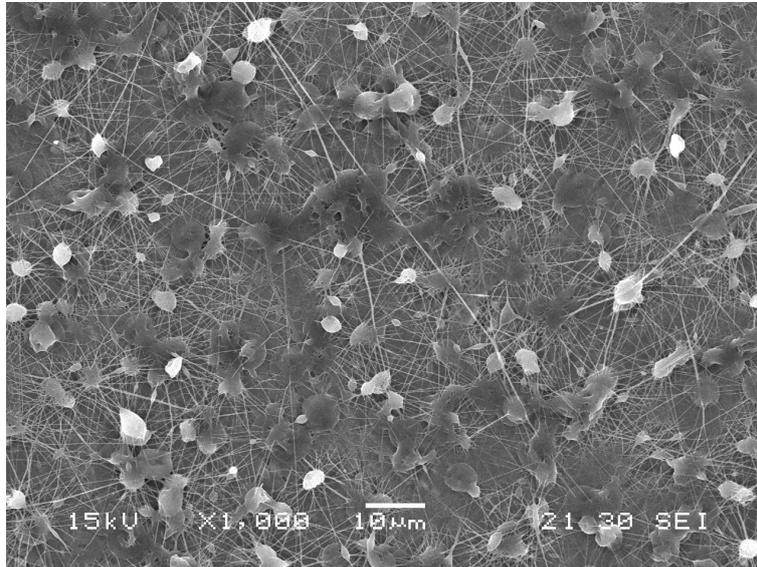


Figura 1: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 6% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1$ mL/h; $V = 10$ kV; $d = 10$ cm.

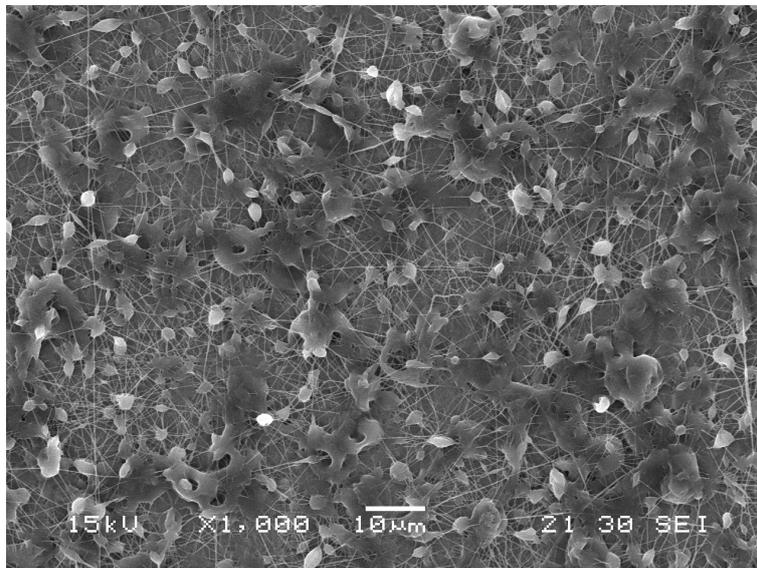


Figura 2: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 6% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 10$ cm.

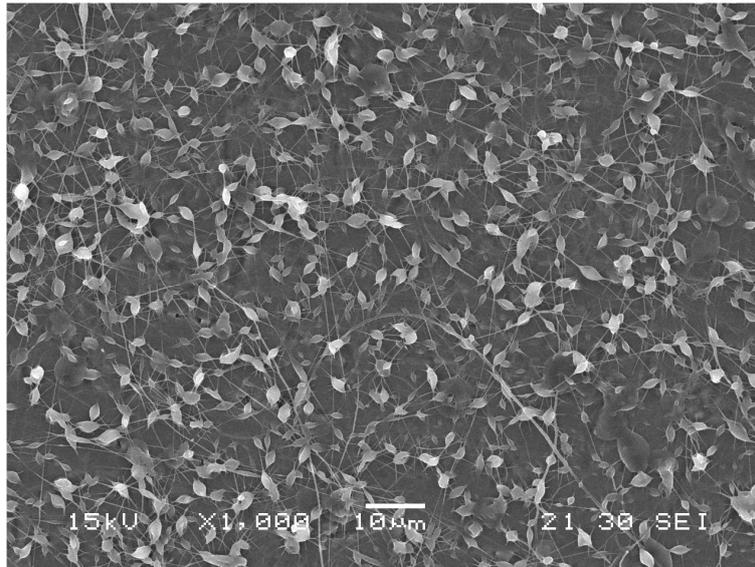


Figura 3: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 6% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 15$ cm.

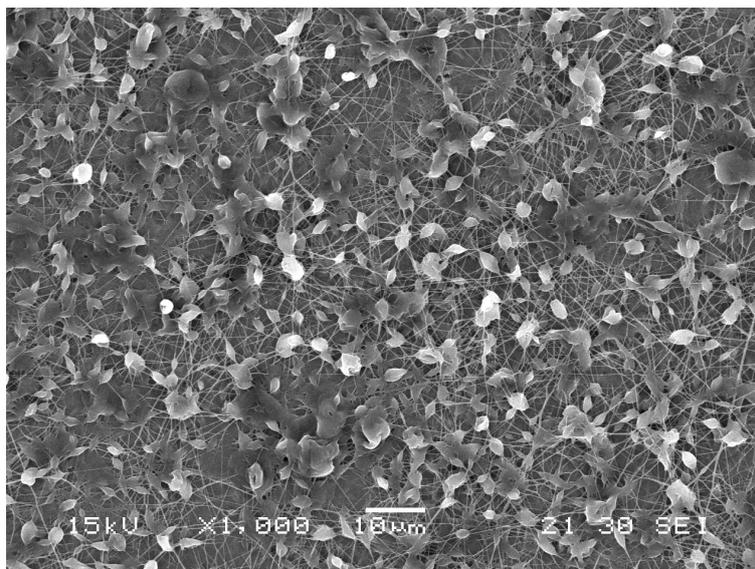


Figura 4: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 6% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1$ mL/h; $V = 17$ kV; $d = 15$ cm.

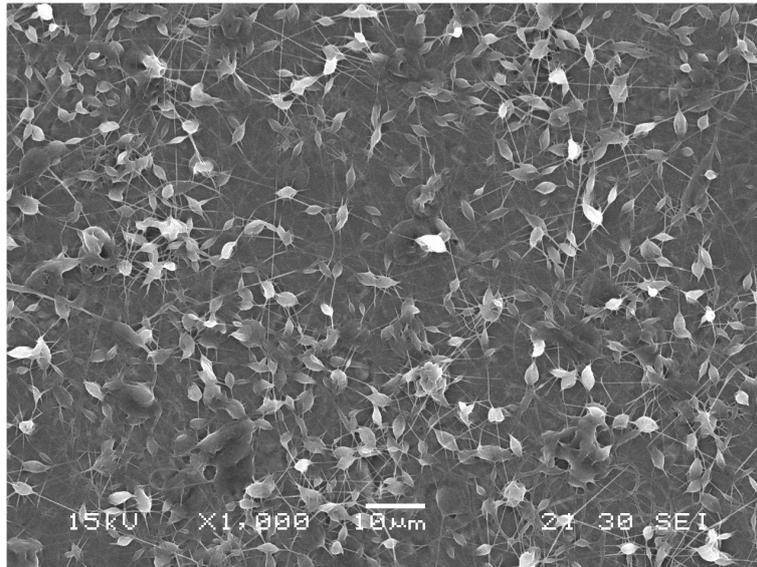


Figura 5: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 6% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 1$ mL/h; $V = 20$ kV; $d = 15$ cm.

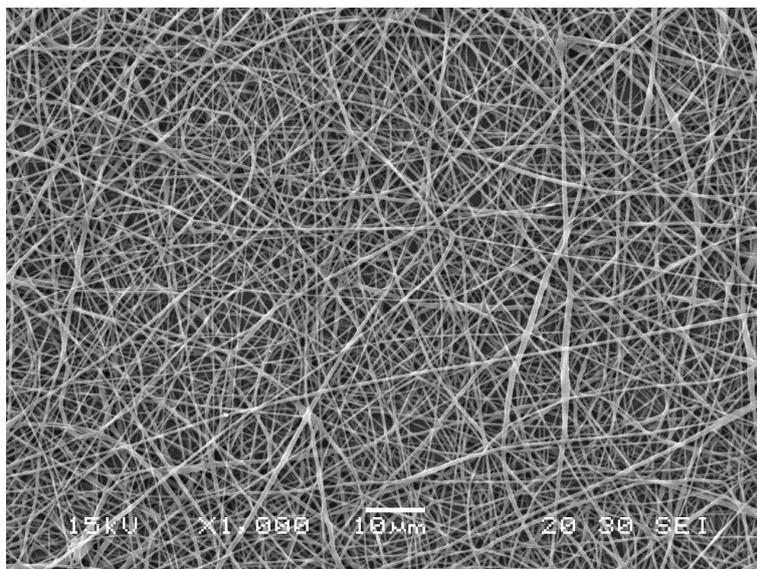


Figura 6: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50 con 1% m/m SWCNT, $f = 0,5$ mL/h; $V = 10$ kV; $d = 10$ cm.

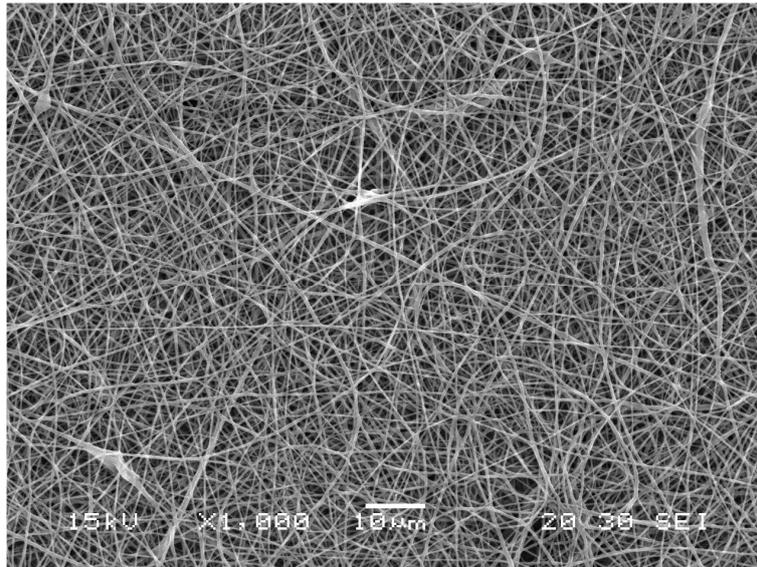


Figura 7: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50 con 1% m/m SWCNT, $f = 0,5$ mL/h; $V = 12$ kV; $d = 10$ cm.

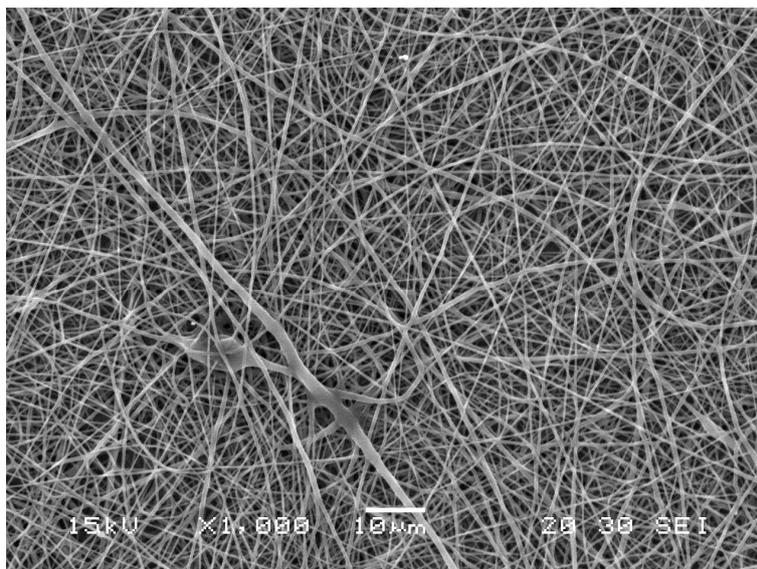


Figura 7: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50 con 1% m/m SWCNT, $f = 0,5$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 10$ cm.

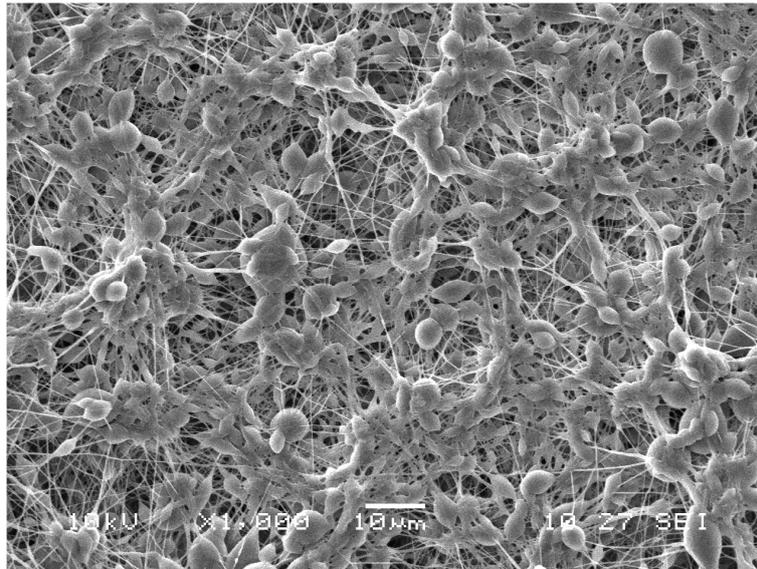


Figura 8: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF, $f = 1$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 12$ cm.

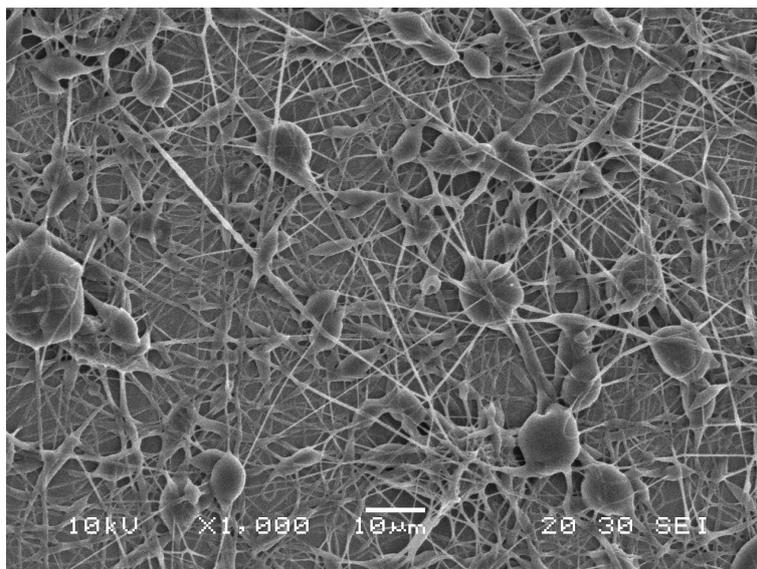


Figura 9: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 83:17, $f = 1$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 12$ cm.

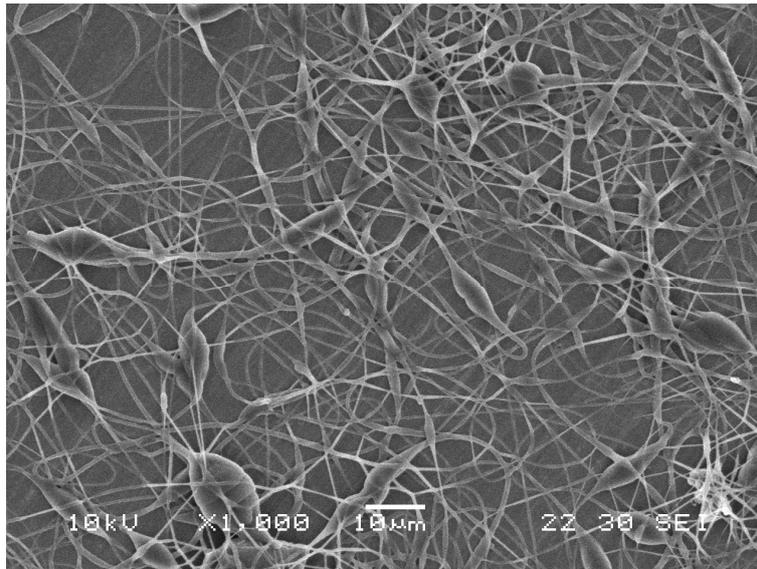


Figura 10: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 83:17, $f = 1$ mL/h; $V = 20$ kV; $d = 15$ cm.

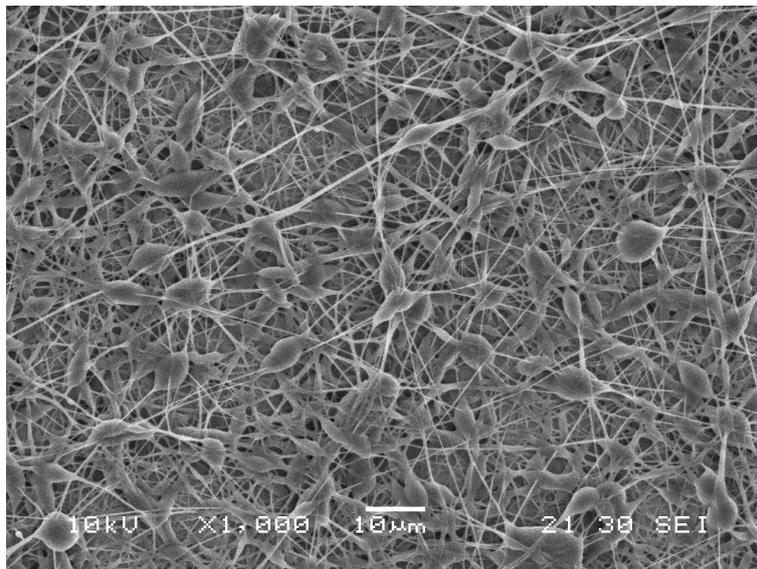


Figura 11: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 83:17, $f = 0,5$ mL/h; $V = 12$ kV; $d = 10$ cm.

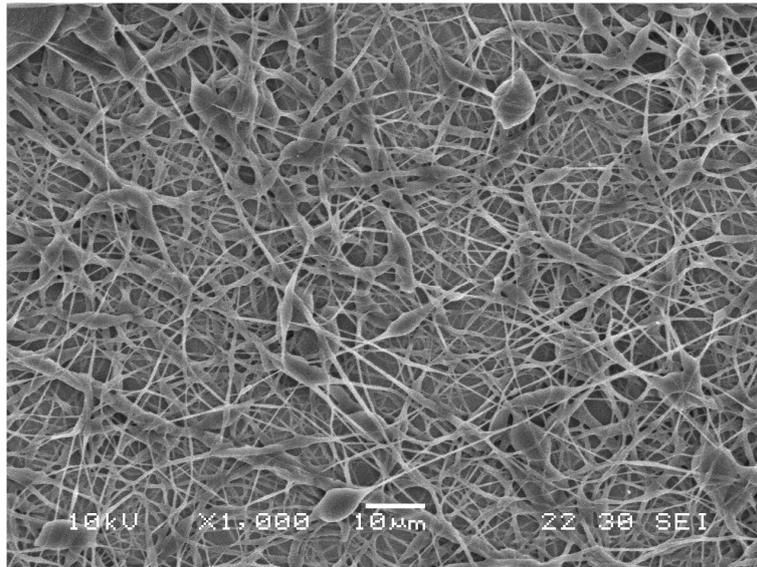


Figura 12: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 83:17, $f = 0,5$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 12$ cm.

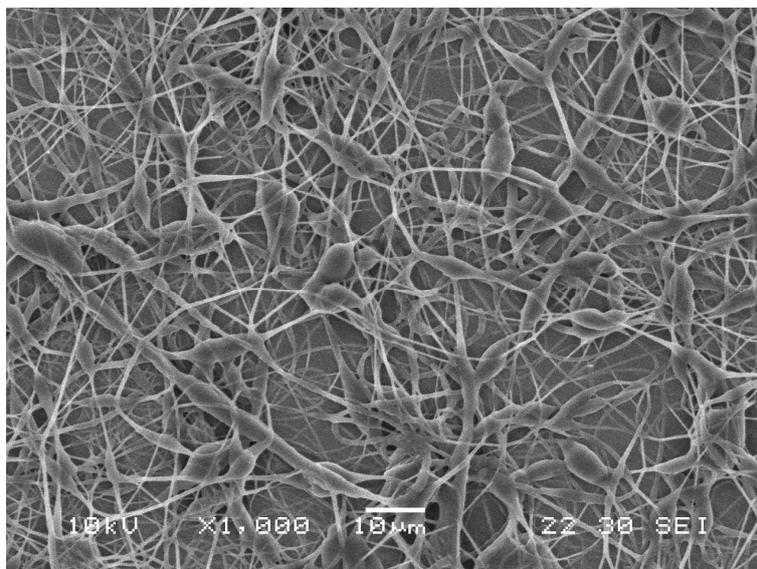


Figura 13: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 83:17, $f = 0,5$ mL/h; $V = 20$ kV; $d = 15$ cm.

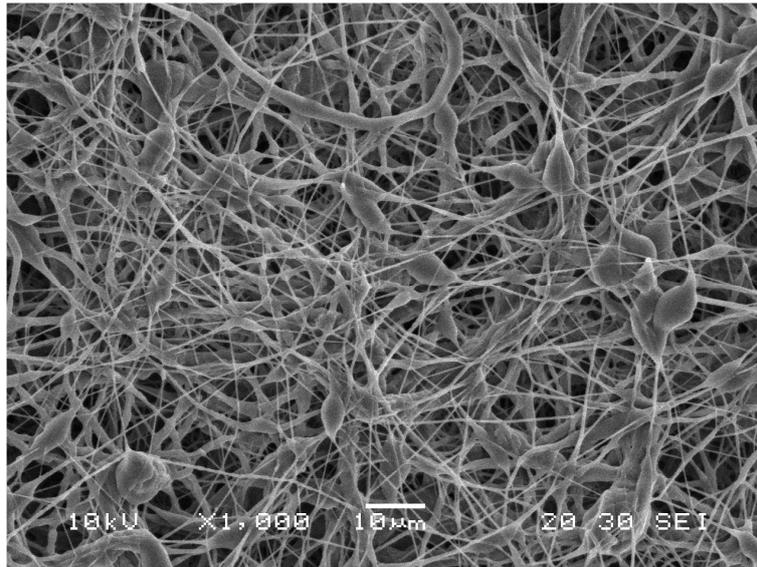


Figura 14: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 83:17, $f = 0,3$ mL/h; $V = 12$ kV; $d = 10$ cm.

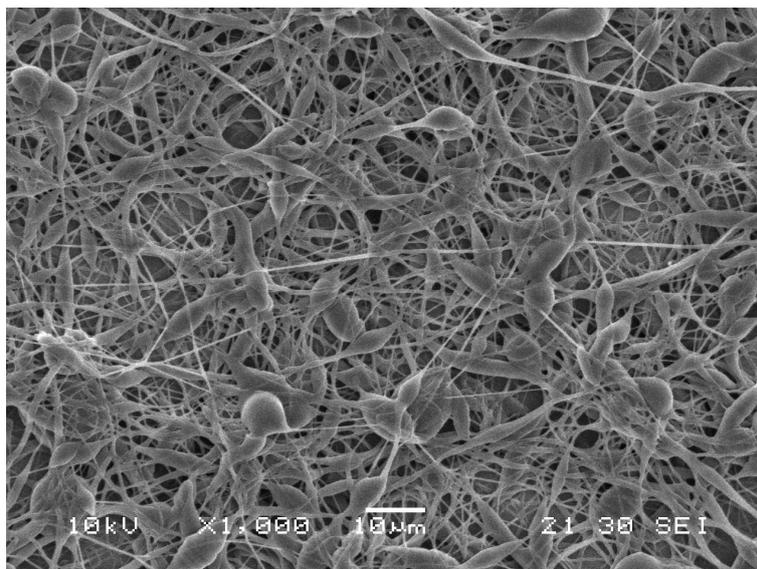


Figura 15: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 83:17, $f = 0,3$ mL/h; $V = 15$ kV; $d = 12$ cm.

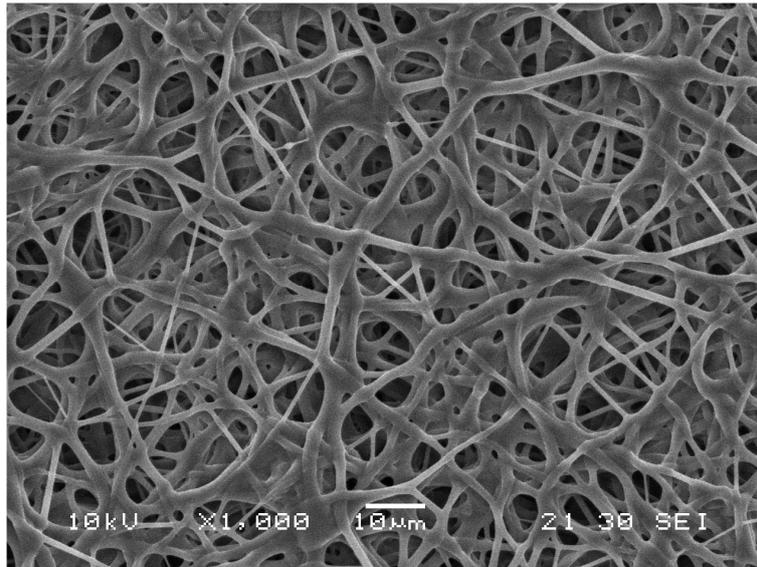


Figura 16: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 0,5$ mL/h; $V = 12$ kV; $d = 10$ cm.

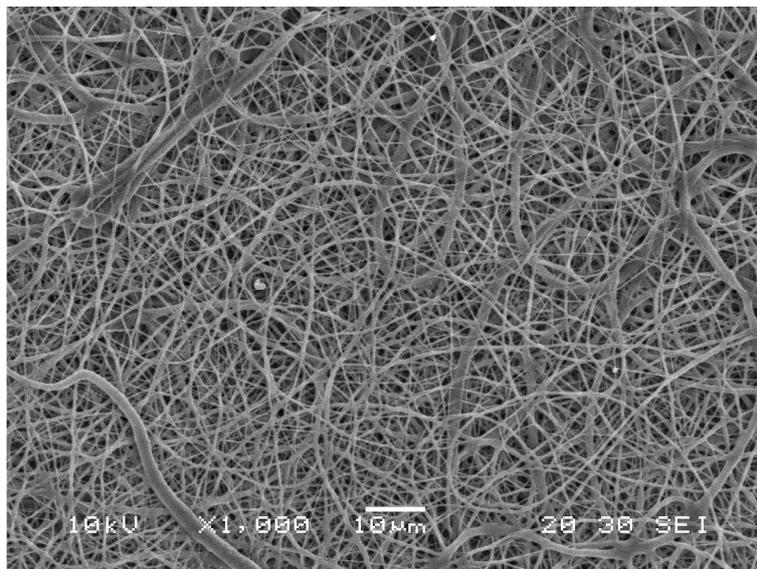


Figura 17: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 0,5$ mL/h; $V = 20$ kV; $d = 15$ cm.

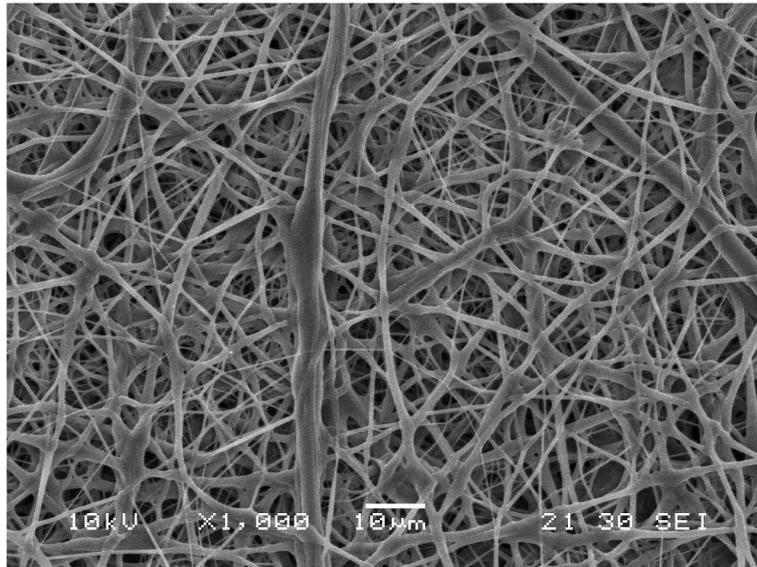


Figura 18: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 0,3$ mL/h; $V = 12$ kV; $d = 10$ cm.

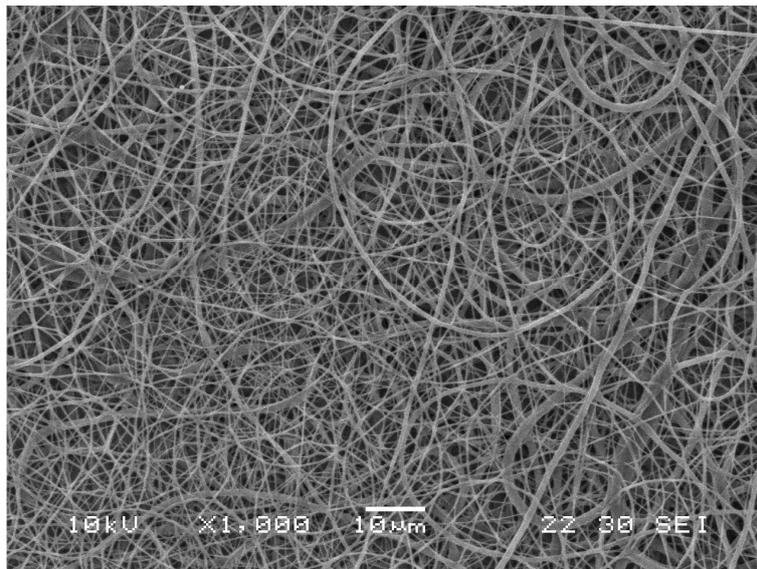


Figura 19: Micrografía de SEM X1000 de la estructura obtenida luego del proceso de electrospinning de una solución 12,5% m/V de Tecoflex 60D en DMF:THF 50:50, $f = 0,3$ mL/h; $V = 20$ kV; $d = 15$ cm.

Agradecimientos

- A mi Director, Dr. Gustavo Abraham, por confiar en mí, y acompañarme en este camino con toda su valiosa experiencia, su calidez humana y estímulo.
- A mi Co-Director, Dr. Fabián Buffa, por las ideas y sugerencias de gran valor para el desarrollo de este Trabajo Final.
- Al Dr. Vinoy Thomas, por su colaboración.
- A mis compañeros del Laboratorio: Luciana, Raúl y Pablo por su invaluable compañía.
- A Azul y Leandro por su asistencia y buena predisposición.
- A Euge, Sol, Melu, Luli, Maca y Euge por estar siempre.
- A Belu, por su amistad incondicional.
- A Ale, por su alegría, su amistad y su toque de color en mi vida.
- A mis padres por su apoyo, paciencia y por su afecto de todos los días.
- A mi hermano Seba y a toda mi familia, infaltables en todo este proceso.
- A Marcelo, por su amor, paciencia y tolerancia y por acompañar mis proyectos.