

# Fabricación y Caracterización Fisicoquímica de Andamios Electrohilados de PLA y PLA-HAp para su uso en Vasos Sanguíneos

K. Pérez-Pérez<sup>1\*</sup>, E. Cortés-Ortiz<sup>2</sup>, G. Ruiz-Velasco<sup>2</sup>, R. Olayo-Valles<sup>2</sup>, J. Morales-Corona<sup>2</sup>, R. Olayo-González<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Eléctrica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, México

<sup>2</sup> Departamento de Física, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, México

\*cbi2142014660@titlani.uam.mx

## Resumen

En este trabajo se construyeron por medio de la técnica de electrohilado, andamios con geometría cilíndrica de poliácido láctico (PLA) y poliácido láctico-hidroxiapatita (PLA-HAp) los cuales pueden ser usados en la reconstrucción de arterias. Los andamios se caracterizaron por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Difracción de Rayos X (XRD) y Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR). Los resultados de XRD indican que el andamio de PLA-HAp tiene picos que muestran la incorporación de la HAp a las fibras del PLA y ATR-FTIR señala la integración de hidroxilos, los cuales pueden ayudar a la adhesión y proliferación de células, por lo que puede constituir una alternativa para su aplicación en la reparación de vasos sanguíneos.

**Palabras clave:** Caracterización fisicoquímica, Electrohilado, Hidroxiapatita, Poliácido láctico, Vasos sanguíneos.

## 1. Introducción

La Ingeniería de Tejidos (IT) se considera una disciplina relativamente nueva, teniendo un campo de investigación y desarrollo multidisciplinario que aplica los conocimientos de la bioingeniería, química, física y biología, para resolver problemas clínicos y quirúrgicos (reparación, regeneración y reemplazo) asociados a la pérdida de tejidos o al fallo funcional de órganos. Recientemente se ha tenido un mayor interés en esta disciplina gracias a sus importantes ventajas con respecto al trasplante tradicional de órganos [1].

El concepto de restaurar vasos sanguíneos surge de la necesidad de asistir a pacientes que presenten enfermedades cardiovasculares como lo es la Enfermedad de Arteria Coronaria (EAC), enfermedad que sucede generalmente cuando existe acumulación de placa, provocando que las arterias se angosten y limiten la irrigación sanguínea que va al corazón. Para lograrlo, se requiere combinar esencialmente andamios fabricados de biopolímeros degradables y células de tejido muscular.

Existen diferentes técnicas que permiten la fabricación de estructuras tridimensionales que sirven de soporte para la regeneración de un tejido específico, sin embargo una de las técnicas más usadas es

el electrohilado [2], produciendo fibras con dimensiones de diámetros similares al tamaño de las fibrillas naturales presentes en la matriz extracelular (MEC). De esta forma se imita al ambiente natural del tejido y se muestra la efectividad que aporta como sustrato para el crecimiento celular. Estos soportes son también conocidos como andamios, estructuras que desempeñan distintos roles [3].

Ravi *et al.* (2009), menciona que materiales poliméricos como el teflón, el poliácido láctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA), tienen propiedades mecánicas apropiadas para ser usados en la IT. Conocer características como la elasticidad, en la fabricación de estos andamios, es importante pues eventualmente soportarán ciclos de bombeo, contracción y expansión de sus paredes al paso de la sangre. Estos materiales son biocompatibles y bioabsorbibles. Pruebas de cultivo celular *in vitro* mostraron que estos materiales pueden usarse en la regeneración de venas y arterias [4]. Por otro lado, la hidroxiapatita (HAp) en los tejidos mineralizados reviste una gran importancia ya que se ha demostrado que es un material biocompatible con distintas aplicaciones biomédicas. Actualmente se estudia para determinar cómo interactúa con los sistemas biológicos y al menos se conocen tres diferentes orígenes de esta: sintética, coralina y bobina. Dependiendo de su origen son los resultados que se obtienen y su aplicación puede ser diferente [5]. La incorporación de HAp en este trabajo es valiosa pues es el elemento que aporta una mayor rigidez a los andamios permitiendo que no se colapsen, siendo estos impermeables.

Las propiedades fisicoquímicas de los materiales participan de forma importante para favorecer la adhesión, proliferación, diferenciación y supervivencia de las células [6]. Es por eso que los andamios se caracterizan mediante técnicas estándares para polímeros como Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Difracción de Rayos X (XRD) y Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR) [7-10].

## 2. Metodología

Por medio de la técnica de electrohilado, se fabricó un andamio de PLA y otro de PLA-HAp. Para el andamio de PLA se disolvió 2.4 g de PLA en 18 mL de cloroformo a concentración del 12 % V/V y antes de iniciar el proceso de electrohilado se agregaron 2 mL de alcohol con el fin de disminuir la solubilidad del PLA. Para el andamio de PLA-HAp se siguió el mismo procedimiento y se le agregó 2 % de HAp en relación con el peso del PLA. Las condiciones experimentales para fabricar los andamios fueron ajustados a un voltaje de 20 kV, separación entre la aguja y el colector de 20 cm a una razón de inyección de 1 mL/h con una temperatura de 30 °C a aproximadamente 29 Hz.

Para poder observar la morfología y determinar el diámetro promedio de las fibras se empleó SEM. El voltaje fue ajustado a 30 kV y las muestras requirieron de una preparación previa la cual consistió en un recubrimiento de oro. Posteriormente, para conocer la temperatura de fusión y cristalización de los andamios electrohilados de PLA y PLA-HAp se utilizó DSC. En este estudio fue necesario tomar muestras entre 5 mg y 10 mg, las cuales fueron encapsuladas en “charolas” de aluminio. Aquí, se realizaron calentamientos y enfriamientos a 10 °C/min en un rango que fue desde 10 °C hasta 200 °C. Luego, para analizar la cristalinidad de los andamios se empleó XRD y la preparación de las muestras básicamente radicó en la colocación de una “película” sobre el portamuestras de bajo fondo, donde se manejó un ángulo de barrido  $2\theta$  en un rango de 2° a 70°. Finalmente, se realizó un estudio de ATR-FTIR a los materiales con el fin de poder determinar los grupos funcionales presentes. Una de las ventajas de esta técnica fue que no se requirió de una preparación específica de las muestras, por lo que sólo se necesitó recortar secciones de 2 cm x 2 cm de los diferentes andamios. Para cada muestra se realizaron 32 barridos en un rango de longitud de onda que fue desde 4000  $\text{cm}^{-1}$  hasta 700  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1 Microscopía Electrónica de Barrido

En la Fig. 1 se presentan micrografías del andamio de PLA tomadas de la pared lateral del cilindro. En a) se puede apreciar que las fibras son continuas y están distribuidas de manera uniforme en toda la región de observación. En b) se muestran fibras que tienen diferentes diámetros y se percibe la formación de poros por donde es posible introducir células para formar un tejido tridimensional. En ambas imágenes se distingue que las fibras se encuentran orientadas en una dirección preferencial siendo esta hacia el eje de giro del cilindro colector.

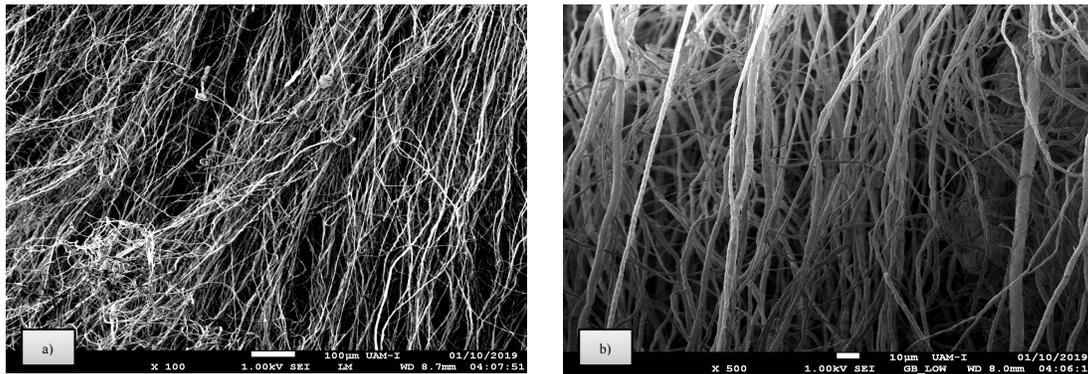


Fig. 1. SEM del andamio de PLA.

En la Fig. 2 se exhiben micrografías del andamio de PLA-HAp. En a) se muestra una toma macroscópica del cilindro donde se puede apreciar un espesor de pared aproximado de 0.2 mm y un diámetro de 3.0 mm, correspondiente al diámetro colector. También se visualiza en el fondo la formación de partículas aplastadas del material ocasionadas posiblemente por la interacción con el colector metálico en donde se depositó el andamio. En b) se muestra la pared interna del tubo y se aprecia la formación de perlas aplastadas, además se observan fibras alineadas con el eje de rotación del cilindro.

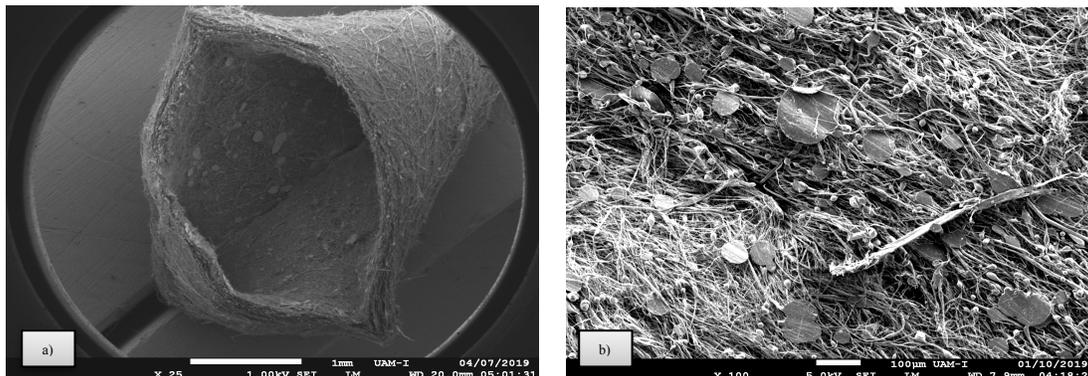


Fig. 2. SEM del andamio de PLA-HAp.

En la Fig. 3 es posible observar la distribución de tamaños de fibras del PLA. Las fibras, como se mostró anteriormente, se encuentran alineadas y presentan una distribución de  $(1.8 \pm 1.0) \mu\text{m}$ .

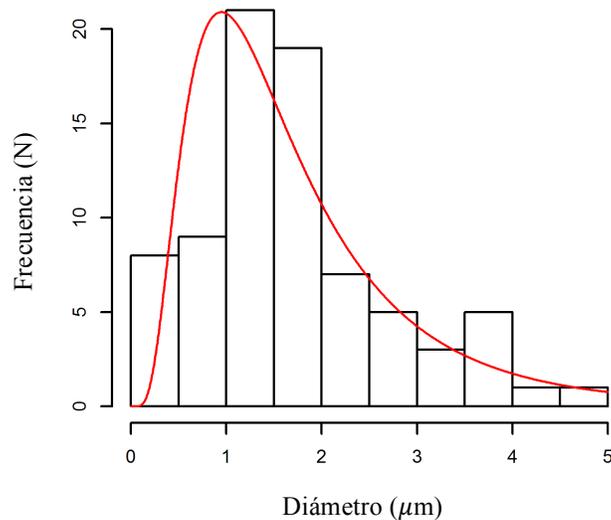


Fig. 3. Distribución de tamaños de fibras del PLA.

### 3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido

Los resultados se pueden observar en la Fig. 4. En a) se muestra que para el PLA la temperatura de cristalización fue de  $99^\circ\text{C}$ , mientras que la temperatura de fusión fue de  $168^\circ\text{C}$ ; temperaturas cercanas a los rangos reportados en la literatura. La interacción del PLA con las partículas de HAP ocasionó que disminuyera la temperatura de cristalización llegando a  $91^\circ\text{C}$  tal como se visualiza en b). Además, es posible notar que la temperatura de fusión igual sufrió cambios, aunque fueron mínimos, esta ahora tomó un valor de  $167.5^\circ\text{C}$ .

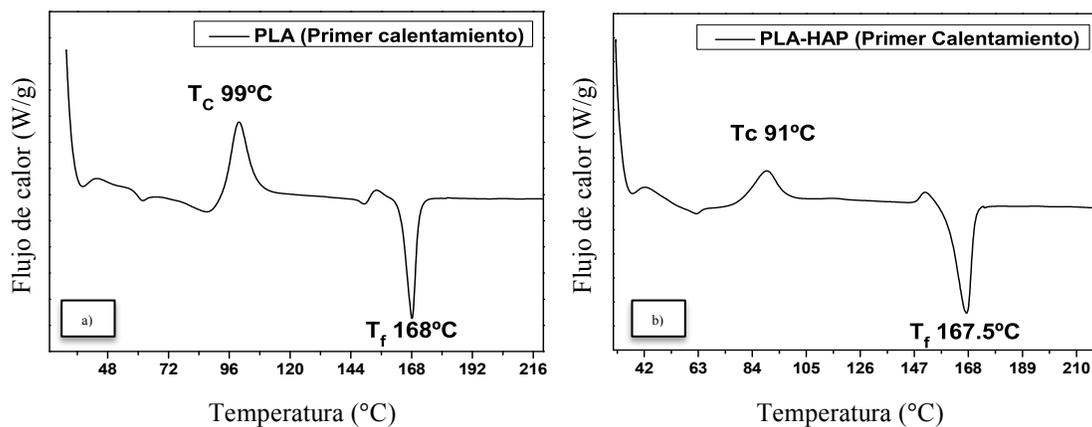


Fig. 4. DSC de los andamios de PLA y PLA-HAp.

### 3.3 Difracción de Rayos X

Los patrones de difracción de Rayos X se pueden observar en la Fig. 5. Es posible percibir que el PLA es un material amorfo. Por otro lado, en el andamio de PLA-HAp se muestran picos de la HAp, en  $2\theta=29.5^\circ$  y  $2\theta=31.8^\circ$ .

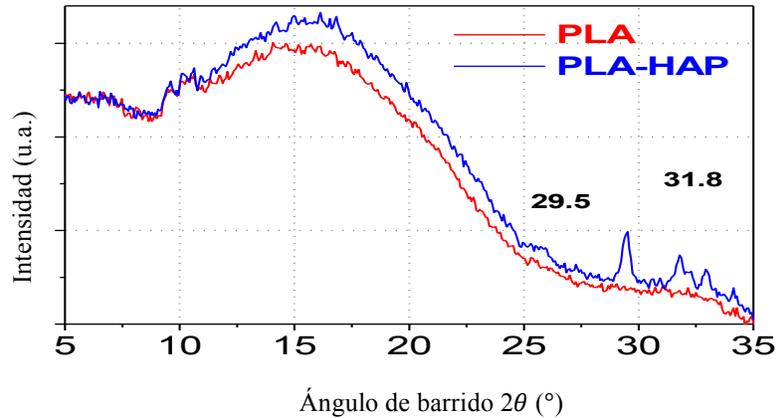


Fig. 5. XRD de los andamios de PLA y HAp.

### 3.4 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada

En la Fig. 6 se muestran los espectros infrarrojos de cada uno de los andamios donde se observan los modos vibracionales de los diferentes grupos funcionales correspondientes al polímero empleado (PLA), así como los grupos funcionales de la HAp en el caso del andamio de PLA-HAp. Para el andamio de PLA en  $1750\text{ cm}^{-1}$ , se presenta un pico característico y se atribuye al doble enlace de carbono-oxígeno (C=O), mientras que en  $1183$  y  $1082\text{ cm}^{-1}$ , se adjudica al enlace simple de carbono-oxígeno (C-O). Por último, para el andamio de PLA-HAp, la zona comprendida entre  $3700\text{ cm}^{-1}$  y  $3430\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la vibración de grupos hidroxilos OH<sup>-</sup> que forman parte de la estructura apatita.

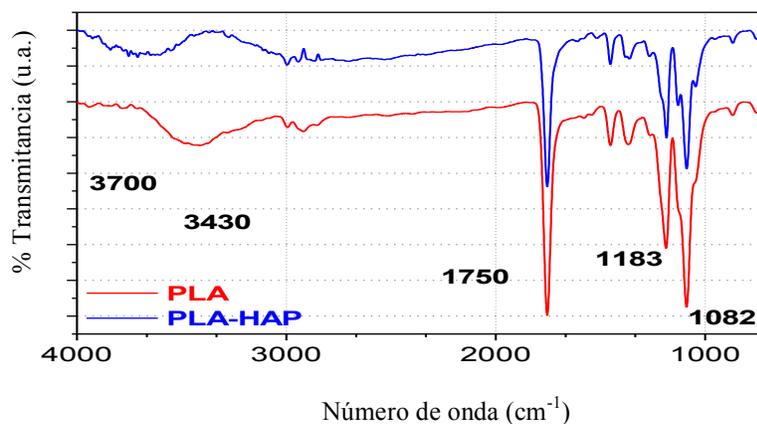


Fig. 6. ATR-FTIR de los andamios de PLA y PLA-HAp.

## 4. Conclusiones

Los andamios cilíndricos fabricados con PLA y PLA-HAp están formados con fibras de tamaño micrométrico y alineadas con el eje de rotación del cilindro colector, estos presentan una pared de 0.2 mm y un diámetro promedio de 3.0 mm aproximadamente. ATR-FTIR muestra los picos característicos del PLA y exhibe la incorporación de la HAp a las fibras del PLA, confirmado también por XRD. DSC indica que las partículas de HAp pueden actuar como sitios de nucleación permitiendo la cristalización a menores temperaturas. Es deseable que los andamios no presenten formación de perlas, tal como ocurrió en los andamios sin HAp.

La biocompatibilidad juega un papel importante en la realización de estos andamios, pues en un vaso sanguíneo es indispensable que se evite la formación de coágulos y trombos, además de que se permita la integración al sistema biológico sin ocasionar alteraciones a éste. Se ha evidenciado que un recubrimiento por medio de plasma con polipirrol (PPy) o polipirrol-yodo (PPy-I) aumenta la biocompatibilidad de los materiales, tal como mostraron Islas-Arteaga *et al.* (2019) y Flores-Sánchez *et al.* (2017) [11, 12]. Los materiales aquí descritos tienen capacidad para ser usados en el cultivo de miocitos o fibroblastos con el fin de ayudar en la restauración de arterias, potencial que se vería favorecido con el recubrimiento de una película delgada de PPy o PPy-I.

## Declaración de conflictos de interés

"Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés para este trabajo".

## Agradecimientos

Agradecemos el apoyo del laboratorio de Microscopía Electrónica y del Laboratorio de Análisis Cuantitativo por Difracción de Rayos X, ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

## Referencias

- [1] G. F. Falke & A. Atala. "Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular". *Arch. Agent. Pediatr*, vol. 98, no. 2, pp. 103-115, 2000.
- [2] H. Fong, I. Chun & D. H. Reneker. "Beaded nanofibers formed during electrospinning". *Polymer*, vol. 40, no. 16, pp. 4585-4592, 1999.
- [3] M. Zilberman. "Active implants and scaffolds for tissue regeneration". 2011<sup>th</sup> Ed. USA: Springer, 2011.
- [4] S. Ravi, Z. Qu & E. L. Chaikof. "Polymeric materials for tissue engineering of arterial substitutes". *Vasc*, vol. 17, no. 1, pp. 45-54, 2009.
- [5] M. García-Garduño & J. Reyes-Gasga. "La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica". *TIP Rev. Esp. Cienc. Quim. Biol*, vol. 9, no. 2, pp. 90-95, 2006.
- [6] D. Osorio, R. Godínez, J. Morales & R. Olayo. "Desarrollo y caracterización de andamios para aplicaciones en sistema nervioso", in *Mem. Cong. Nac. Ing. Biom*, vol. 5, no. 1, pp. 298-301, 2018.

- [7] E. Cortés. “Andamios electrohilados de PHB para su uso en Ingeniería de Tejidos”. Tesis de Maestría. Departamento de Física. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, México. 2019.
- [8] G. W. Höhne, W. Hemminger & H. J. Flammersheim. “An introduction for practitioners” in *Differential Scanning Calorimetry*, 1<sup>st</sup> Ed. USA: Springer, 1996.
- [9] B.D. Cullity & J. W. Weymouth. “Elements of X-Ray Diffraction”. London: Prentice Hall, 1957.
- [10] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch. “Principles of Instrumental Analysis”. 6<sup>th</sup> Ed. USA: Thomson Brooks/Cole, 2006.
- [11] N. C. Islas-Arteaga *et al.* “Electrospun Scaffolds with Surfaces Modified by Plasma for Regeneration of Articular Cartilage Tissue: A Pilot study in Rabbit”. *Int. J. Polym. Mater.*, vol. 68, no. 2, pp. 1089-1098, 2019.
- [12] M. G. Flores-Sánchez *et al.* “Scaffolds of polylactic acid/hydroxyapatite coated by plasma with polypyrrole-iodine for the generation of neo-tissue-bone *in vivo*: Study in rabbit”. *Int. J. Polym. Mater.*, vol. 67, no. 7, pp. 427-437, 2018.