



Biofuncionalización de superficies a base de fibroína para su potencial uso en aplicaciones cardiovasculares

Carlos Augusto Murillo Usuga

Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en Ingeniería de Materiales

Asesora

Diana Marcela Escobar Sierra, Doctor (PhD)

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ingeniería de Materiales

Medellín, Antioquia, Colombia

2021

Cita	C.A Usuga, Escobar [1]
Referencia Estilo IEEE (2020)	[1] C.A. Usuga, D.M. Escobar Sierra “Biofuncionalización de superficies a base de fibroína para su potencial uso en aplicaciones cardiovasculares”, Tesis de maestría, Maestría en Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia, 2021.



Maestría en Ingeniería de Materiales.

Grupo de Investigación Biomateriales.

Centro de Investigación Ambientales y de Ingeniería (CIA).



Centro de Documentación de Ingeniería (CENDOI)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes.

Decano/Director: Jesús Francisco Vargas Bonilla.

Jefe departamento: Francisco Javier Herrera.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Índice general

Índice general	IV
Índice de figuras	2
Índice de tablas	8
1. Introducción	12
1.1. Introducción y planteamiento del problema	12
1.2. Objetivos	14
1.2.1. General	14
1.2.2. Específicos	14
2. Marco Teórico	15
2.1. Anatomía de los conductos vasculares	15
2.1.1. Arterias	17
2.1.2. Venas	18
2.1.3. Válvulas cardíacas	19
2.2. Esfuerzos de presión y propiedades mecánicas de los conductos vasculares	20
2.2.1. Relación entre el tamaño de los vasos sanguíneos, el flujo y la presión de la sangre	22

2.3. Sangre	23
2.3.1. Coagulación de la sangre	24
2.3.1.1. Cascada de coagulación	24
2.4. Enfermedades cardiovasculares	27
2.4.1. Aterosclerosis	27
2.4.2. Trombosis y embolia	28
2.4.3. Tratamientos para las enfermedades cardiovasculares	30
2.5. Biomateriales	30
2.5.1. Injerto vascular	33
2.5.1.1. Biomateriales utilizados para fabricar injertos vasculares artificiales	33
2.5.1.1.1. Fibroína como biomaterial para la fabricación de injertos vasculares	34
2.5.1.1.2. Polivinil alcohol como biomaterial para la fabricación injertos vasculares	36
2.5.1.2. Funcionalización superficial de biomateriales destinados a la fabricación de injertos vasculares	39
2.5.1.3. Mecanismo de acción de la heparina	41
2.6. Caracterizaciones y evaluaciones asociadas a los injertos vasculares artificiales .	43
2.6.1. Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier	43
2.6.2. Microscopía electrónica de barrido	44
2.6.3. Análisis termogravimétrico	45
2.6.4. Ensayos de tracción	45
2.6.5. Ángulo de contacto	47
3. Obtención y Caracterización de Fibroína	50
3.1. Introducción	50

3.2. Metodología	51
3.2.1. Preparación de las muestras y proceso de extracción	51
3.2.2. Diseño experimental para la optimización del proceso de extracción	52
3.2.3. Caracterización de la fibroína extraída	53
3.2.3.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	53
3.2.3.2. Análisis termogravimétrico (TGA)	54
3.3. Resultados y discusión	54
3.3.1. Análisis estadístico del proceso de extracción	55
3.3.2. Caracterización de la fibroína extraída	59
3.3.2.1. Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier	59
3.3.2.2. Análisis termogravimétrico	61
3.3.3. Conclusiones	62
4. Fabricación de superficies a base de fibroína	64
4.1. Introducción	64
4.2. Metodología	66
4.2.1. Diseño experimental para la preparación de películas	66
4.2.2. Caracterización de las películas obtenidas	69
4.2.2.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	69
4.2.2.2. Propiedades mecánicas	69
4.2.2.3. Ángulo de contacto	69
4.2.2.4. Microscopía electrónica de barrido	70
4.2.2.5. Perfiles de degradación	70
4.3. Resultados y discusión	71
4.3.1. Análisis espectroscópico	71

4.3.2.	Propiedades mecánicas	75
4.3.2.1.	Módulo elástico y límite elástico	75
4.3.2.2.	Resistencia a la tracción	85
4.3.2.3.	Elongación en la ruptura	87
4.3.3.	Propiedades superficiales	90
4.3.3.1.	Ángulo de contacto	90
4.3.3.2.	Microscopía electrónica de barrido	95
4.3.4.	Perfiles de degradación	100
4.3.5.	Potenciales aplicaciones de los materiales formulados	102
4.4.	Conclusiones	107
5.	Biofuncionalización de Superficies a Base de Fibroína	109
5.1.	Introducción	109
5.2.	Metodología	110
5.2.1.	Biofuncionalización de fibroína con heparina y fabricación de películas	110
5.2.1.1.	Biofuncionalización de fibroína por acople de carbodiimida .	110
5.2.1.2.	Biofuncionalización de fibroína por aprovechamiento de interacciones electrostáticas	111
5.2.2.	Evaluación y caracterización de los materiales biofuncionalizados . . .	114
5.2.2.1.	Evaluación de antitrombogenicidad de los materiales biofuncionalizados	114
5.2.2.2.	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	115
5.2.2.3.	Análisis termogravimétrico (TGA)	116
5.2.2.4.	Microscopía electrónica de barrido	116
5.2.2.5.	Ángulo de contacto	116
5.2.2.6.	Propiedades mecánicas	116

5.3. Resultados y discusión	117
5.3.1. Evaluación de antitrombogenicidad de los materiales biofuncionalizados	117
5.3.2. Análisis espectroscópico	122
5.3.3. Análisis termogravimétrico	124
5.3.4. Efecto de la biofuncionalización en las propiedades superficiales	127
5.3.4.1. Microscopía electrónica de barrido	127
5.3.4.2. Ángulo de contacto	129
5.3.5. Efecto de la biofuncionalización en las propiedades mecánicas	131
5.4. Conclusiones	134
6. Conclusiones y perspectivas	136
6.1. Conclusiones	136
6.2. Perspectivas	138
A. Acta de aprobación para la prueba de recalcificación de sangre	139
Bibliografía	143

Índice de figuras

2.1. Estructura de los vasos sanguíneos	16
2.2. Representación de la circulación cardiovascular	16
2.3. Representación del corte transversal de una arteria	17
2.4. Representación de las diferentes venas presentes en el cuerpo	18
2.5. Micrografía de una válvula cardíaca humana	19
2.6. Representación de los componentes de la presión en los vasos sanguíneos	20
2.7. Relación entre los conductos vasculares del circuito sistémico	22
2.8. Composición de la sangre	23
2.9. Representación esquemática de la cascada de coagulación	25
2.10. Representación de la aterosclerosis en una arteria	28
2.11. Fotografía de un accidente cerebrovascular	29
2.12. Segmento de implante cardiovascular fabricado con ePTFE	30
2.13. Mujer de Teotihuacan con implantes dentales	31
2.14. Camino desde la investigación básica en biomateriales, a dispositivos médicos, y la aplicación clínica	32
2.15. Aplicaciones más comunes de biomateriales en el cuerpo humano	33
2.16. Estructura de láminas- β antiparalelas de la fibroína	35
2.17. Esquema de producción de PVA	37

2.18. Solubilidad del PVA como función del grado de hidrólisis	38
2.19. Mecanismo de reacción entre el PVA y glutaraldehído	38
2.20. Esquemas de funcionalización	40
2.21. Unidad repetitiva de risacárido trisulfatado presente en la estructura de la heparina	41
2.22. Cadena de 5 unidades de monosacáridos responsable de la actividad anticoagulante	42
2.23. Mecanismos hipotéticos de la interacción heparina-AT-III	42
2.24. Representación ideal de la cadena de heparina	43
2.25. Vibraciones moleculares típicas entre pares de átomos	44
2.26. Esquema de los componentes de un TGA y ejemplo de un análisis termogravimétrico	45
2.27. Esfuerzo de tensión generado en una barra rectangular	46
2.28. Barra rectangular antes y después de aplicar un esfuerzo de deformación	46
2.29. Curva típica esfuerzo vs deformación	47
2.30. Ecuación de Young para la determinación del ángulo de contacto	48
2.31. Modelo de una gota de líquido sobre una superficie	49
3.1. Capullos del gusano de seda <i>Bombyx Mori</i>	51
3.2. Diagrama esquemático para el proceso de desgomado, separación y secado de la fibroína	52
3.3. Fibroína luego del proceso de extracción, lavado y secado	54
3.4. Superficies de respuesta para la extracción de fibroína	58
3.5. Espectro IR de la fibroína extraída	59
3.6. Esquema de vibración de amidas en la cadena de fibroína	60
3.7. Termograma para la muestra de fibroína extraída	62
4.1. Esquema de fabricación de películas a base de fibroína	67

4.2. Esquema de interacción entre las moléculas de fibroína y PVA a través de enlaces de hidrógeno inducidos por la adición de glicerol	72
4.3. Espectros infrarrojo para muestras de fibroína, PVA, fibroína/PVA, fibroína/glicerol y muestra 3	73
4.4. Ampliación de la zona característica de la tensión $-C=O$ para muestras de fibroína, PVA, fibroína/PVA, fibroína/glicerol y muestra 3	74
4.5. Curvas de esfuerzo deformación para todas las formulaciones del diseño experimental de la Tabla 4.2	78
4.6. Gráfico de medias para el módulo elástico donde se representa la dependencia respecto a la proporción fibroína:glicerol (a) y proporción PVA:glutaraldehído (b) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40 (%)	79
4.7. Gráfico de medias para el módulo elástico donde se representa la dependencia respecto a la proporción fibroína:glicerol (a) y proporción PVA:glutaraldehído (b) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 70/30 (%)	80
4.8. Gráfico de medias para el módulo elástico donde se representa la dependencia respecto a la proporción fibroína:glicerol (a) y proporción PVA:glutaraldehído (b) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 80/20 (%)	81
4.9. Gráfico de medias para el módulo elástico donde se representa la dependencia respecto a la relación fibroína/PVA (a), proporción fibroína:glicerol (b), y proporción PVA:glutaraldehído	82
4.10. Gráfico de medias para el límite elástico donde se representa la dependencia respecto a la relación fibroína/PVA (a), proporción fibroína:glicerol (b), y proporción PVA:glutaraldehído	84
4.11. Gráfico de medias para la resistencia a la tracción, donde se representa la dependencia respecto a la relación fibroína/PVA (a), proporción fibroína:glicerol (b), y proporción PVA:glutaraldehído	86
4.12. Gráfico de medias para la elongación en la ruptura donde se representa la dependencia respecto a la proporción fibroína:glicerol (a) y la proporción PVA:glutaraldehído (b) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40(%)	88
4.13. Gráfico de medias para la elongación en la ruptura donde se representa la dependencia respecto a la proporción fibroína:glicerol (a) y la proporción PVA:glutaraldehído (b) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 70/30(%)	89

4.14. Gráfico de medias para la elongación en la ruptura donde se representa la dependencia respecto a la proporción fibroína:glicerol (a) y la proporción PVA:glutaraldehído (b) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 80/20 (%)	90
4.15. Gráfico de medias para la elongación en la ruptura donde se representa la dependencia respecto a la relación fibroína/PVA (a), fibroína:glicerol (b), y PVA:glutaraldehído (c)	91
4.16. Gráficos de medias para el ángulo de contacto respecto a los factores del diseño experimental (a); Relación fibroína/PVA, (b); Proporción fibroína:glicerol , (c); Proporción PVA:Glutaraldehído	93
4.17. Fotografías de las mediciones de ángulo de contacto para todas las formulaciones planteadas en el diseño experimental mostrado en la Tabla 4.2	94
4.18. Micrografías SEM para la muestra blanco a 500 aumentos (a) y 1000 aumentos (b).	96
4.19. Micrografías SEM para las muestras 1, 2 y 3 a 500 y 1000 aumentos	97
4.20. Micrografías SEM para las muestras 10, 11 y 12 a 500 y 1000 aumentos	98
4.21. Micrografías SEM para las muestras 19, 20 y 21 a 500 y 1000 aumentos	99
4.22. Perfiles de degradación para todas las muestras planteadas en el diseño experimental mostrado en la Tabla 4.4	101
4.23. Gráfico de medias para el porcentaje de degradación respecto a la relación fibroína/PVA (a) y la proporción PVA:glutaraldehído (b)	101
4.24. Gráficos de barras para todas las propiedades mecánicas medidas en el diseño experimental mostrado en la Tabla 4.2 (Primera parte)	104
4.24. Gráficos de barras para todas las propiedades mecánicas medidas en el diseño experimental mostrado en la Tabla 4.2 (Parte final)	105
5.1. Esquema experimental de la biofuncionalización por acople de carbodiimida (Ilustración propia)	111
5.2. Reacción de acople de carbodiimida entre la fibroína y la heparina (Ilustración propia)	112
5.3. Esquema del modelo de interacción electrostática entre fibroína y heparina (Ilustración propia)	113

5.4. Esquema experimental para la prueba de recalcificación en dispositivos médicos para contacto con sangre (Ilustración propia)	115
5.5. Fotografía de la muestra 3 sin biofuncionalizar, biofuncionalizada por acople de carbodiimida (EDC/NHS), y biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas luego de tener contacto con sangre recalcificada durante 6 horas.	118
5.6. Modelo esquemático de la interacción de la sangre con el material biofuncionalizado, donde se muestra la formación del complejo AT-III-Heparina y su acción de bloqueo frente a la adhesión de coágulos (Ilustración propia).	119
5.7. Cuantificación de masa de coágulos a tiempo cero	120
5.8. Cuantificación de masa de coágulos a 15 días de incubación en PBS	121
5.9. Comparación de la masa de coágulos adheridos a la superficie de los materiales biofuncionalizados a tiempo cero y a 15 días	122
5.10. Espectros infrarrojo de heparina, muestra 3 de control, muestra 3 biofuncionalizada por acople de carbodiimida y muestra 3 biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas	123
5.11. Termogramas para las muestras de heparina, muestra 3 de control, muestra 3 biofuncionalizada por acople de carbodiimida y muestra 3 biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas	125
5.12. Termogramas y derivadas de heparina (a), muestra 3 de control (b), muestra 3 biofuncionalizada por acople de carbodiimida (c), y muestra 3 biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas (d).	126
5.14. Fotografías de las mediciones de ángulo de contacto para la muestra de control y biofuncionalizada por acople de carbodiimida y aprovechamiento de interacciones electrostáticas	131
5.15. Comparación de los ángulos de contacto para la muestra 3 de control, biofuncionalizada por acople de carbodiimida (EDC/NHS) y por aprovechamiento de interacciones electrostáticas.	131
5.16. Curvas esfuerzo vs deformación para la muestra 3 sin biofuncionalizar (control), funcionalizada por acople de carbodiimida y por aprovechamiento de interacciones electrostáticas.	132

-
- 5.17. Gráfico de barras donde se compara el efecto de la biofuncionalización en las propiedades mecánicas donde se reconoce: (a); Módulo elástico, (b); Límite elástico, (c); Resistencia a la tracción, (d); Elongación en la ruptura. 133

Índice de tablas

2.1. Valores de referencia de algunos conductos vasculares medidos por varios autores	21
2.2. Factores relacionados a la cascada de coagulación	26
2.3. Composición promedio de aminoácidos encontrados en una cadena de fibroína .	36
3.1. Factores y niveles para la extracción de fibroína	53
3.2. Porcentaje de fibroína extraída	56
3.3. Tabla ANOVA para el diseño de optimización de extracción de fibroína	57
3.4. Relación de factores óptima para maximizar la extracción de fibroína desde el capullo de gusano de seda	57
4.1. Diseño factorial general para la formulación de películas a base de fibroína . . .	68
4.2. Nomenclatura para todas las formulaciones del diseño experimental	68
4.3. Diseño experimental para el análisis de homogeneidad por microscopía electrónica de barrido	70
4.4. Diseño experimental para el análisis de degradación	71
4.5. Valores promedio de la resistencia a la tracción, elongación en la ruptura, módulo elástico y límite elástico para todas las formulaciones del diseño experimental	76
4.6. Tabla ANOVA y validación de supuestos para el módulo elástico	78
4.7. Tabla ANOVA y validación de supuestos para el límite elástico	83
4.8. Tabla ANOVA y validación de supuestos para la resistencia a la tracción	86

4.9. Tabla ANOVA y validación de supuestos para la elongación en la ruptura	87
4.10. Tabla ANOVA para el ángulo de contacto	92
4.11. Ángulo de contacto para todas las formulaciones planteadas en el diseño experimental mostrado en la Tabla 4.2	93
4.12. Tabla ANOVA para los perfiles de degradación según el diseño experimental planteado en la Tabla 4.4	100
4.13. Valores de referencia de algunos conductos vasculares medidos por varios autores	103
5.1. Números de onda para algunas de las bandas de interés de la muestra 3 de control, biofuncionalizada por acople de carbodiimida, por aprovechamiento de interacciones electrostáticas y heparina	123
5.2. Ángulo de contacto para la muestra de control y biofuncionalizada por acople de carbodiimida y aprovechamiento de interacciones electrostáticas	130
5.3. Valores promedio de la resistencia a la tracción, elongación en la ruptura, módulo elástico y límite elástico para la muestra 3 de control, biofuncionalizada por acople de carbodiimida y biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas.	132

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo según las estadísticas presentadas por la Organización Mundial de la Salud, en particular, las enfermedades isquémicas del corazón representan más del 20 % de las causas de muerte en Colombia, por esta razón, resulta necesario desarrollar estrategias para el tratamiento de dichas enfermedades, ya que en algunos casos los pacientes necesitarán el reemplazo del conducto afectado, siendo la alternativa más común el uso de injertos autólogos, los cuales, a pesar de ser los más utilizados, se ven limitados por la poca disponibilidad de tejido que se puede obtener de cada paciente para este tratamiento, sumado al tiempo de espera que requiere el acondicionamiento físico y celular para que este funcione correctamente. Basado en lo anterior, una aproximación que ha tomado relevancia en estas investigaciones consiste en obtener biomateriales que sean compatibles y que tengan propiedades antitrombogénicas y mecánicas que puedan sustituir un conducto vascular nativo, teniendo así una alternativa más accesible y compatible.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antitrombogénica de superficies (películas) a base de fibroína, las cuales fueron obtenidas por *solvent casting*, para ello, se optimizó el proceso de extracción de fibroína a partir del capullo del gusano de seda *Bombyx Mori* en medio básico de Na_2CO_3 (ac) usando un diseño experimental 2^3 con dos puntos centrales en el cual se evaluaron diferentes relaciones Capullos/ Na_2CO_3 , temperaturas y tiempos de extracción. Los resultados mostraron que la mejor extracción se logra con una relación capullos/ Na_2CO_3 de 0.2, y una temperatura de 80°C durante 4.5 horas de extracción.

Luego de lo anterior, se planteo un diseño experimental 3^3 para la fabricación de películas a base de fibroína, y se utilizó polivinil alcohol (PVA) entrecruzado con glutaraldehído en bajas cantidades para mejorar sus propiedades mecánicas, finalmente, se incluyó glicerol en las formulaciones para inducir la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas de fibroína y PVA. Como variables de respuesta de este diseño se estudiaron el modulo elástico, límite elástico, resistencia a la tracción y porcentaje de elongación en la ruptura. Los resultados del diseño experimental muestran que la mayoría de las formulaciones obtenidas tienen potencial mecánico para ser utilizadas en la fabricación de implantes cardiovasculares artificiales, sin embargo, las formulaciones con 80 % de fibroína, tienden a ser inestables mecánicamente, y entre el compilado de las demás formulaciones, la muestra 3 presentó algunas de las propiedades mecánicas y superficiales más interesantes, mostrando una alta capacidad de elongación antes de la ruptura, buena resistencia a la degradación y un ángulo de contacto apropiado para dispositivos usados en contacto con sangre, por tal razón, dicha muestra fue biofuncionalizada con heparina por acople de carbodiimida y por aprovechamiento de interacciones electrostáticas.

Los resultados de la biofuncionalización muestran que los materiales obtenidos por ambas técnicas presentan actividad antitrombogénica, sin embargo, las muestras biofuncionalizadas por aprovechamiento de interacciones electrostáticas tienden a perder actividad luego de 15 días, permitiendo una deposición superficial de coágulos aproximada del 429 % comparada con

la prueba a tiempo cero, por tal motivo, se concluyó que la mejor técnica de biofuncionalización fue por acople de carbodiimida ya que bajo dicha técnica las muestras presentaron una deposición superficial de coágulos del 32 % comparada con el análisis a tiempo cero.

Palabras clave: Fibroína, polivinil alcohol, injerto vascular, heparina, propiedades antitrombogénicas, superficie.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Introducción y planteamiento del problema

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo según datos de la Organización Mundial de la Salud [1], entre éstas, existe una patología asociada a las enfermedades isquémicas del corazón, accidentes cardiovasculares y tromboembolismo llamada trombosis, la cual representa el mayor porcentaje de esta cifra [2].

Comúnmente, los tratamientos para las enfermedades cardiovasculares de este tipo consisten en dosis periódicas de algún medicamento como Warfarina o Heparina, teniendo este último gran relevancia debido a su alta capacidad anticoagulante, sin embargo, en el caso de que un episodio de trombosis requiera el reemplazo del conducto vascular afectado, las alternativas existentes consisten en el acondicionamiento de un injerto vascular autólogo o la fabricación de un injerto vascular artificial.

En el caso de los injertos vasculares autólogos; la poca disponibilidad de tejido, el tiempo de espera para su acondicionamiento físico, el rechazo biológico y los problemas relacionados con la dilatación y estenosis del injerto, representan las principales limitaciones de estos [3], por otra parte, la fabricación de injertos vasculares artificiales ha venido siendo una alternativa popular para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares que requieran el reemplazo del conducto afectado, para lo cual se utilizan algunos materiales poliméricos como el politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), polietilentereftalato (PET), polivinil-alcohol (PVA), ácido poliláctico y poliuretanos de diferentes naturalezas [3, 4], además de biopolímeros como la fibroína, una proteína fibrosa que permite la inmovilización de heparina a través de sus grupos amino terminales, y con la cual se pueden fabricar injertos vasculares que permitan el crecimiento de células endoteliales. [5–8].

A pesar de las virtudes que ofrecen los biomateriales como alternativa para la fabricación de injertos vasculares artificiales, se ha documentado que la formación de plaquetas sobre la superficie de estos ha sido el origen de las fallas en la mayoría de los casos [9–15], resultando

así necesario mejorar los materiales destinados a esta aplicación con el fin de inhibir dicha formación plaquetaria sobre su superficie, lo que se logra a través de la inmovilización de una sustancia anticoagulante como la heparina sobre la superficie del material que está en contacto con la sangre, de este modo, se garantiza que el injerto vascular artificial pueda tener un comportamiento similar al conducto vascular nativo, tanto por las propiedades mecánicas que brindan los polímeros previamente mencionados, como una mayor hemocompatibilidad dada por la biofuncionalización con heparina, lo que hace que se inhiba la adhesión de plaquetas sobre la superficie del material [16].

De los materiales mencionados previamente, la fibroína tiene algunas ventajas dadas por su estructura molecular, entre éstas, la biocompatibilidad y una variedad de propiedades mecánicas y fisicoquímicas le permiten ser usada como base en la fabricación de injertos vasculares [17, 18], en especial, brinda la posibilidad de inmovilizar heparina sobre los grupos amino terminales de su cadena a través de un acople de carbodiimida [19], además de poderse suspender sobre otros polímeros biocompatibles como el PVA a fin de complementar sus propiedades mecánicas [20–23], de este modo, el uso de fibroína como material base para la fabricación de injertos vasculares artificiales plantea un panorama positivo en el tratamiento de enfermedades coronarias que requieran de estos dispositivos.

El objetivo de esta investigación fue evaluar superficies a base de fibroína para su potencial uso en la fabricación de implantes vasculares artificiales, para ello se prepararon diferentes formulaciones utilizando PVA como soporte para la fibroína, y posteriormente se obtuvo un material biofuncionalizado por inmovilización de heparina sobre la fibroína, la evaluación de la capacidad antitrombogénica se realizó mediante la prueba de recalcificación de sangre durante periodos de tiempo de hasta 6 horas para el primer día, y se repitió luego de incubar los materiales durante 15 días en plasma pobre en plaquetas.

1.2. Objetivos¹

1.2.1. General

Evaluar superficies a base de fibroína biofuncionalizadas con heparina como material potencialmente útil para aplicaciones cardiovasculares.

1.2.2. Específicos

- Extraer fibroína a partir de los capullos del gusano de seda *Bombyx mori* y caracterizar sus propiedades fisicoquímicas.
- Fabricar superficies a base de fibroína y caracterizar sus propiedades morfológicas, fisicoquímicas y resistencia mecánica.
- Biofuncionalizar con heparina las superficies obtenidas con miras a mejorar su actividad antitrombogénica.
- Evaluar el efecto de la biofuncionalización en las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y morfológicas de las superficies fabricadas.

¹La descripción completa de los tipos de superficie a trabajar se encuentra en la sección de Metodología.

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1. Anatomía de los conductos vasculares

Los conductos vasculares son estructuras tubulares que se encargan de transportar sangre hacia cuerpo y de regreso al corazón, entre estos, los más abundantes son las arterias y las venas [24]. En términos generales, cada uno de estos vasos sanguíneos posee estructuras independientes, sin embargo, conservan entre ellos algunas similitudes, por ejemplo, todos ellos tienen lumen, el cual es el tejido interno que tiene contacto directo con el flujo de sangre, y se caracteriza en las arterias por ser más delgado que en las venas, lo que permite mantener la presión de la sangre en movimiento a través del sistema circulatorio, además de lo anterior, tanto las venas como las arterias están estructuradas en tres capas, conocidas como túnica externa, túnica media y túnica íntima como se muestra en la Figura 2.1.

En el cuerpo, el transporte de sangre se da a través del circuito sistémico y el circuito pulmonar como se observa en la Figura 2.2 [25]; Primero, las arterias sistémicas llevan sangre rica en oxígeno a los tejidos, luego del intercambio gaseoso, la sangre con menos oxígeno, el cual ha sido dejado en las células, regresa al corazón a través de las venas sistémicas. Por otra parte, en el circuito pulmonar, las arterias transportan sangre con poco oxígeno a través de los pulmones con el fin de realizar intercambio gaseoso, luego las venas pulmonares regresan sangre oxigenada hasta el corazón y así comenzar nuevamente el ciclo a través del circuito sistémico.

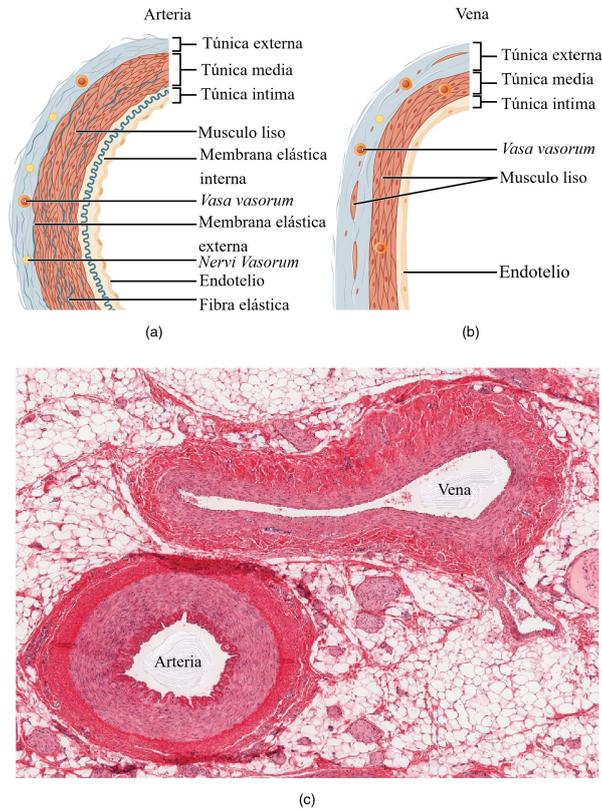


Figura 2.1: Estructura de los vasos sanguíneos (a) Arterias, (b) Venas, (c) Corte transversal de ambos conductos (Esquema adaptado de [25]).

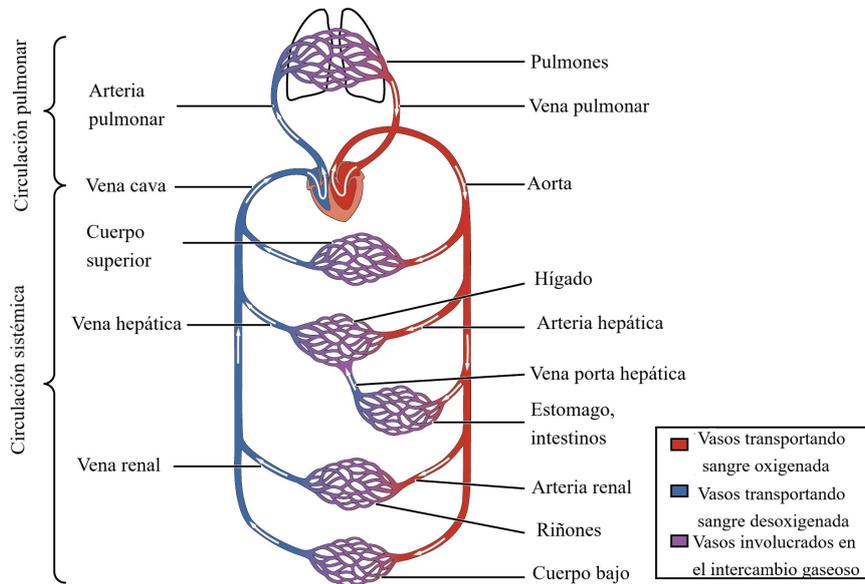


Figura 2.2: Representación de los circuitos sistémico y pulmonar en el sistema circulatorio (Esquema adaptado de [25])

2.1.1. Arterias

Las arterias son aquellos conductos vasculares encargados transportar sangre oxigenada desde el corazón hacia los tejidos, en su anatomía, estos conductos están conformados por tres capas como se muestra en la Figura 2.3: la túnica íntima, la cual es la capa más interna de este conducto, está compuesta por el endotelio, que a su vez está cubierto por tejidos elásticos y se encarga de liberar endotelina, una serie de péptidos que contraen los músculos lisos dentro de la pared del vaso sanguíneo y aumenta la presión arterial, por su parte, el tejido elástico le da al conducto vascular elasticidad y fuerza. La túnica media consiste en células musculares lisas con fibras elásticas, estando todo este sistema organizado en forma circunferencial alrededor de la arteria y siendo las fibras elásticas, compuestas principalmente de colágeno las que soportan las células musculares lisas, finalmente, la túnica adventicia, o externa, es la más fuerte de estas capas y está compuesta principalmente por fibras elásticas y colágeno, característica que evita que estos conductos vasculares se sobre expandan [24, 25].

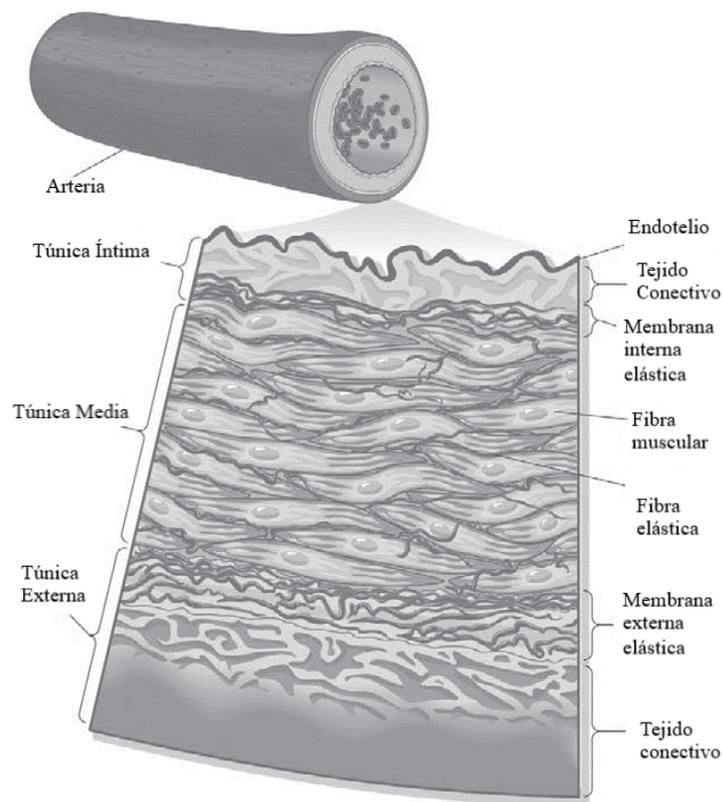


Figura 2.3: Representación del corte transversal de una arteria, donde se distinguen las tunicas externa, media e íntima y sus principales componentes (Esquema adaptado de [24])

2.1.2. Venas

Las venas son aquellos conductos vasculares que llevan la sangre hacia el corazón, y a excepción de las venas pulmonares, su función principal es hacer que la sangre con poco oxígeno viaje desde los tejidos hacia este órgano.

En el cuerpo hay dos grandes venas; la vena cava superior, encargada de transportar sangre desde la parte superior del cuerpo hacia la aurícula derecha del corazón, y la vena cava inferior, encargada de liberar sangre desde la parte inferior del cuerpo hacia la aurícula derecha. En general, la anatomía de la vena es similar a la de las arterias como se muestra en la Figura 2.4, sin embargo, al ser conductos vasculares de baja presión, las venas más largas están equipadas con un tejido adicional conocido como válvula cardíaca, la cual se encarga de mantener el flujo de la sangre en una sola dirección.

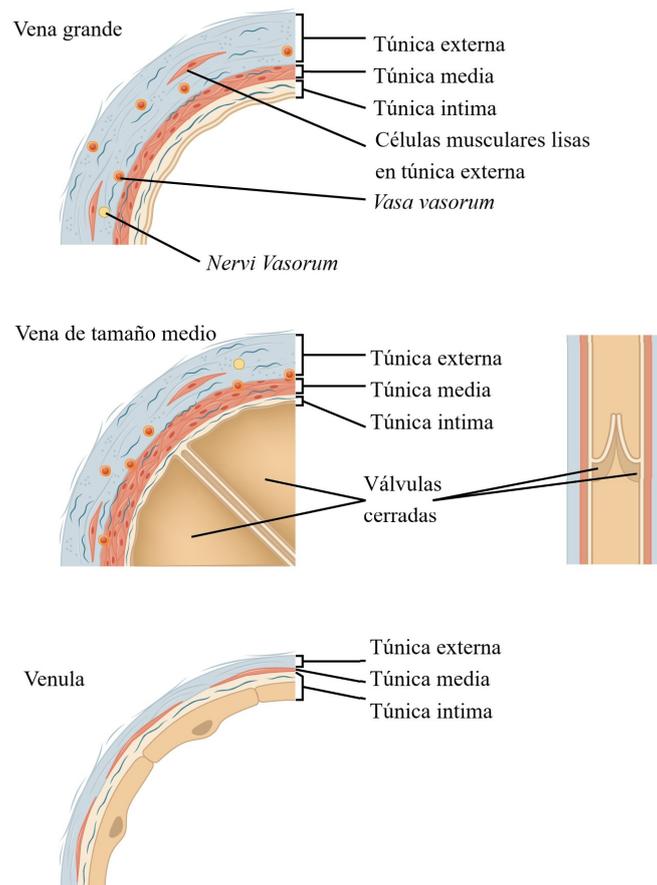


Figura 2.4: Representación de las diferentes venas presentes en el cuerpo, se distinguen las venas grandes, de tamaño medio y las vénulas (Esquema adaptado de [25])

2.1.3. Válvulas cardíacas

Las válvulas cardíacas humanas están compuestas por una matriz de tres capas, las cuales, desde la capa más interna, hasta la más externa, se conocen como ventricular, esponjosa y fibrosa [3]. En la Figura 2.5 se pueden observar dichas capas, las cuales cumplen una función específica de acuerdo a su composición; la capa ventricular está compuesta en su mayoría de fibras de elastina alineadas radialmente, y debido a la alta concentración de estas fibras, esta capa asegura que este conducto vascular regrese a su forma original cuando hay alguna acción mecánica sobre el mismo, la capa esponjosa está principalmente compuesta de glicosaminoglucuronanos y colágeno en menor cantidad, el cual forma un *scaffold* natural en la válvula cardíaca, y le da la función de distribuir el esfuerzo relacionado con el ciclo cardíaco, finalmente, la capa fibrosa está compuesta principalmente de colágeno denso, el cual está organizado de forma circunferencial, lo que le permite mantener la presión durante el ciclo cardíaco debido a las capas de colágeno inelástico [26].

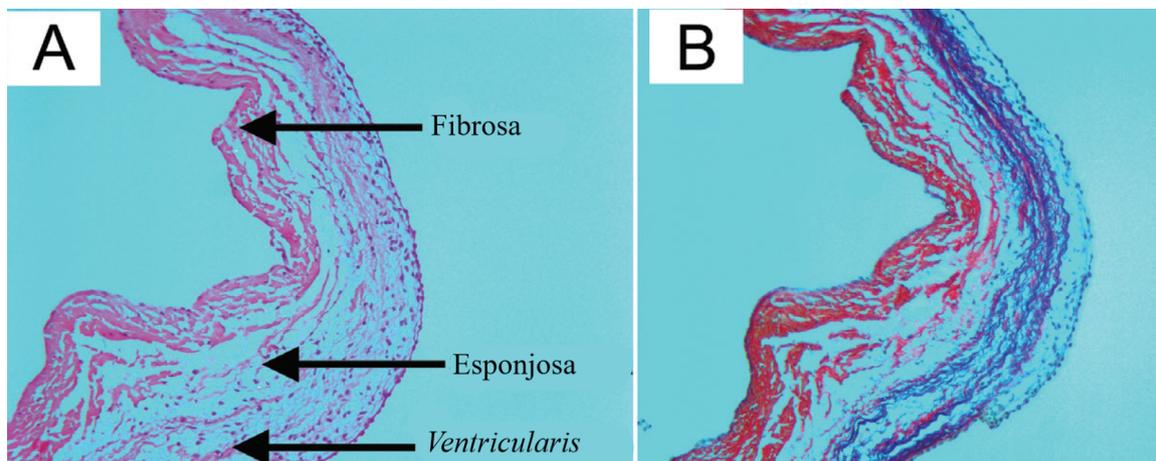


Figura 2.5: Micrografía de una válvula cardíaca humana, compuesta por las capas ventricular, esponjosa y fibrosa.(Esquema adaptado de [26])

Además de lo anterior, las válvulas cardíacas están compuestas por múltiples células, incluidas las células endoteliales, células valvulares intersticiales, fibroblastos, células musculares lisas y células nerviosas, cada una con una función específica, de las cuales, resalta el papel de las células endoteliales, las cuales están alineadas perpendicularmente al anillo de la válvula cardíaca y están encargadas de proteger la misma de reacciones inmunes, degeneración y la formación de trombos, y por lo tanto, son las encargadas de proteger las válvulas cardíacas de enfermedades coronarias como la trombosis.

2.2. Esfuerzos de presión y propiedades mecánicas de los conductos vasculares

La presión sanguínea se define como la fuerza por unidad de área que ejerce la sangre sobre las paredes de los conductos vasculares, y se divide en dos componentes principales, correspondientes al máximo y al mínimo de presión que se miden en el ciclo de pulso de un paciente con un esfigmomanómetro, conocidos como presión sistólica y presión diastólica respectivamente, los cuales, en un paciente normal tienen valores de aproximadamente 120 mm Hg (0.016 MPa) y 80 mm Hg (0.011 MPa), de este modo, la presión del pulso será la diferencia entre estos dos valores.

La Figura 2.6 esquematiza el comportamiento normal de la presión sistólica y la presión diastólica, en ella se observa que estos valores cambian dependiendo del conducto vascular al cual se le mide la presión, y se observa que las arterias soportan presiones significativamente más altas que las venas [25, 27], por lo tanto, teniendo en cuenta que estos conductos están sometidos a constantes esfuerzos relacionados con el flujo de sangre a través de los mismos, se encuentra que factores como el diámetro del conducto, la presión sanguínea y la velocidad de flujo de sangre influirán significativamente en el esfuerzo que el conducto en cuestión debe soportar [25].

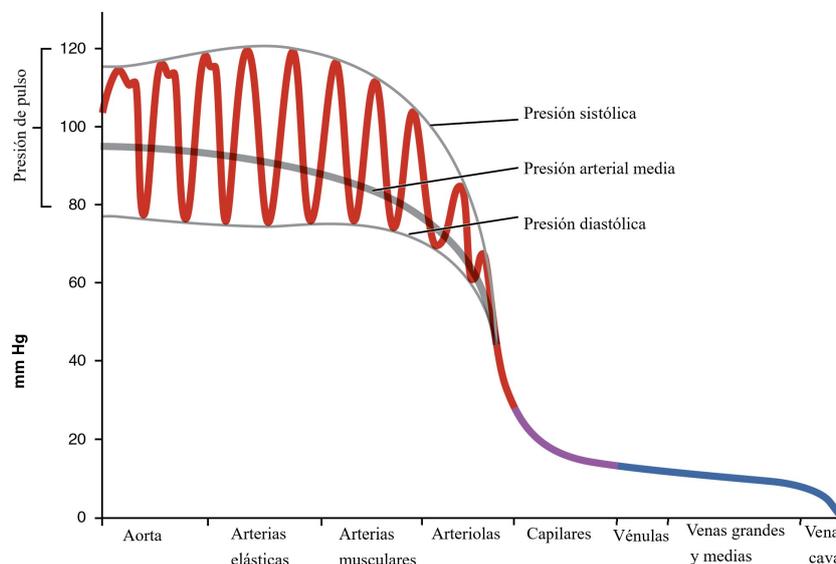


Figura 2.6: Representación de los componentes de la presión en los vasos sanguíneos, se incluyen la presión sistólica, la presión diastólica, la presión media arterial y la presión de pulso. (Imagen adaptada de [25])

Basado en lo anterior, existen algunas consideraciones a tener en cuenta cuando se requiere medir las propiedades mecánicas de un conducto vascular, debido a que la composición absoluta de éste dependerá de su naturaleza [25], y por lo tanto, sus propiedades mecánicas

estarán afectadas por la cantidad de tejido muscular, elastina y colágeno que éste tenga, además de la configuración estructural de estas sustancias en los conductos[28]. Por otra parte, se ha encontrado que las propiedades mecánicas de un conducto vascular pueden cambiar si dicho conducto está afectado por alguna enfermedad o si se trata de un mismo conducto entre un paciente vivo y uno muerto [29].

A pesar de lo anterior, se puede decir que los conductos vasculares se comportan de forma similar en términos de sus propiedades mecánicas, y algunos autores han estudiado dicho comportamiento y lo han modelado matemáticamente [28–31], obteniendo algunos valores que sirven de referencia al momento de caracterizar propiedades como el módulo elástico, el esfuerzo de ruptura y el porcentaje de elongación al momento de la ruptura. Algunos de estos valores se encuentran referenciados en la Tabla 2.1, donde se encuentran mediciones de conductos extraídos de autopsias, de cirugías, y mediciones *in vivo* hechas a través de ciclos de pulso.

Conducto Vascular	Módulo elástico (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Elongación en la ruptura (%)	Referencia
Arteria coronaria *	1.42	0.027	20.0	C. Van Andel. et. Al [32], Hao-Yang Mi. et. al, [33]
Arteria mamaria interna	1.18	0.1	35.1	Hao-Yang Mi. et. al. [33]
Aorta (L-T)**	0.250 - 0.0567	~ 1.0	~ 100 - 200	Frederick H. et. Al [27]
Carótida (L-T)**	0.188 - 0.0823	~ 1.0	~ 100 - 90	Frederick H. et. Al [27]
Vena Cava (L-T)**	0.319 - 0.191	~ 3.0	~ 100 - 60	Frederick H. et. Al [27]
Arteria carótida ***	0.15 ± 0.04, 0.89 ± 0.27, 0.75 ± 0.29	N/A	N/A	T. Khamdaeng et. al.[34]

Tabla 2.1: Valores de referencia de algunos conductos vasculares medidos por varios autores. *: Muestras tomadas de pacientes muertos, **: Direcciones longitudinal y transversal del conducto medido respectivamente, ***: Valores correspondientes a las capas del conducto, elastina, elastina-colágeno y fibras de colágeno respectivamente, medidas *in-vivo* utilizando el modelo de resortes paralelos con datos de correlación cruzada 1D en la radiofrecuencia de ultrasonido

2.2.1. Relación entre el tamaño de los vasos sanguíneos, el flujo y la presión de la sangre

Al rededor del cuerpo humano las arterias y las venas tienen diferentes longitudes y diámetros dependiendo del lugar en el que se encuentren, y según de estos tamaños, el esfuerzo al que estarán sometidos por el flujo sanguíneo será diferente también [25]. Las Figuras 2.7 (a) y (b) muestran como los capilares, a pesar de ser significativamente más pequeños que los demás conductos vasculares, representan el máximo de área transversal en el cuerpo, lo anterior debido a que este tipo de conducto es el más abundante en el cuerpo comparado con cualquier otro tipo, por su parte, la Figura 2.7 (c) muestra como la presión sanguínea disminuye a medida que viaja desde las arterias hasta los capilares, lo que se explica debido a que la vaso constricción y la vaso dilatación de las arterias son significativamente más importantes en la regulación del flujo sanguíneo que la vaso constricción y la vaso dilatación de los demás conductos vasculares [25], del mismo modo, Figura 2.7 (d) muestra como la velocidad del flujo sanguíneo baja a medida que la sangre viaja desde las arterias hasta los capilares, lo que permite que haya mayor tiempo para los procesos de intercambio que ocurren en dichos capilares.

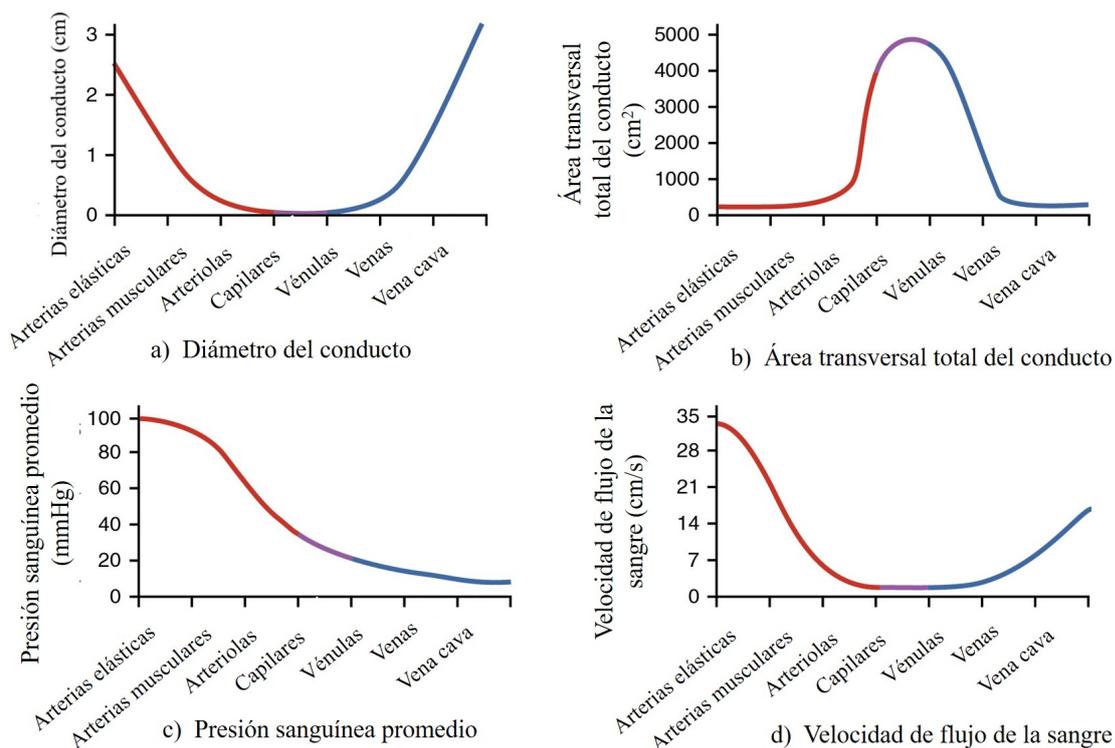


Figura 2.7: Relación entre los conductos vasculares del circuito sistémico, se observan: (a) diámetro del conducto vascular, (b) área transversal total, (c) presión de sangre medía y, (d) velocidad del flujo de sangre. (Adaptado de [25])

2.3. Sangre

La sangre se considera un tejido conectivo, el cual tiene como funciones principales llevar oxígeno y nutrientes al cuerpo, así como remover suciedades de las células de éste [25].

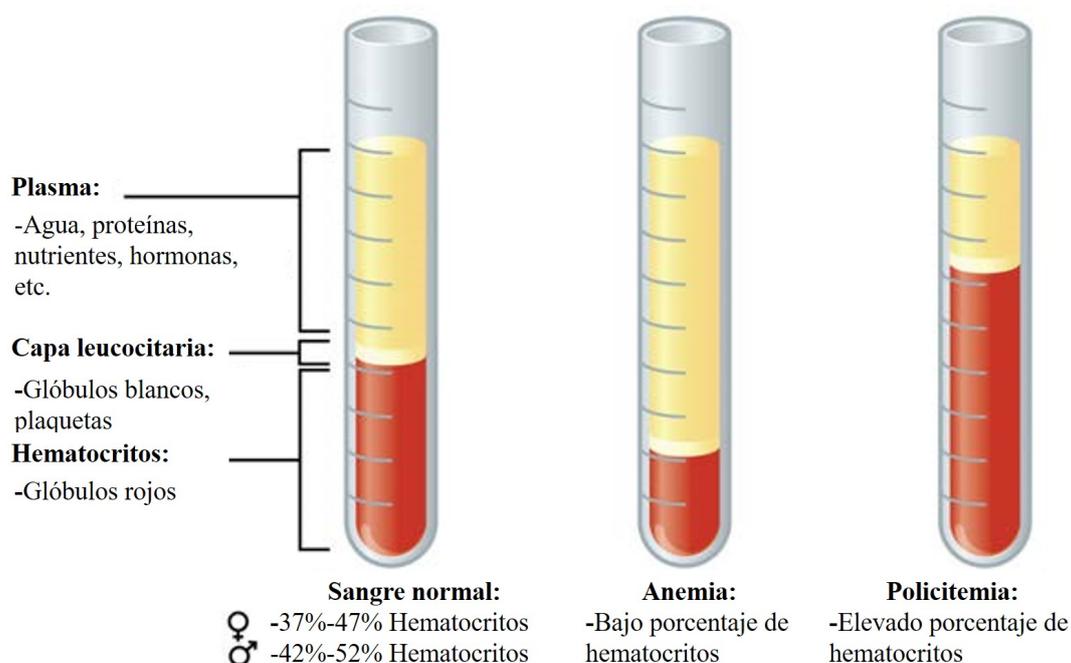


Figura 2.8: Elementos celulares de la sangre, compuesta principalmente de agua, proteínas, glóbulos blancos y glóbulos rojos, entre otros (Imagen adaptada de [25]).

En el plasma, la sangre está compuesta principalmente por tres proteínas:

- **Albumina:** Es la más abundante, y representa casi un 54 % de las proteínas presentes en el plasma, su función principal es el transporte de ácidos grasos y hormonas esteroides.
- **Globulinas:** se catalogan como alfa, beta y gama globulinas. Las alfa y beta globulinas se encargan del transporte de hierro, lípidos y de vitaminas A, D, E y K a las células, finalmente las gama globulinas se consideran anticuerpos y hacen parte del sistema inmune.
- **Fibrinógeno:** Es la proteína menos abundante de la sangre, ocupando al rededor del 7 % del contenido del plasma, sin embargo, su presencia es de vital importancia ya que es la proteína que esta involucrada en la coagulación de la sangre.

2.3.1. Coagulación de la sangre

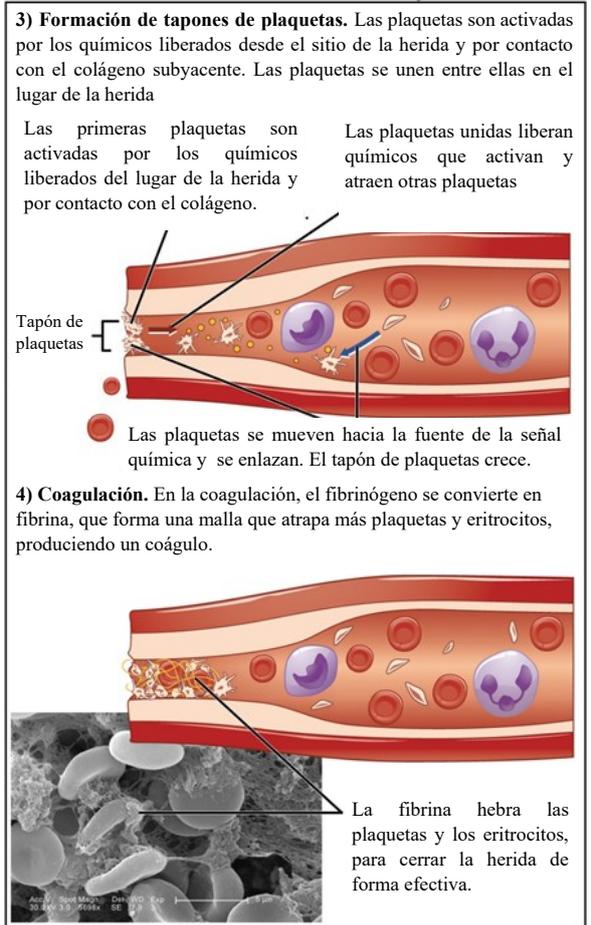
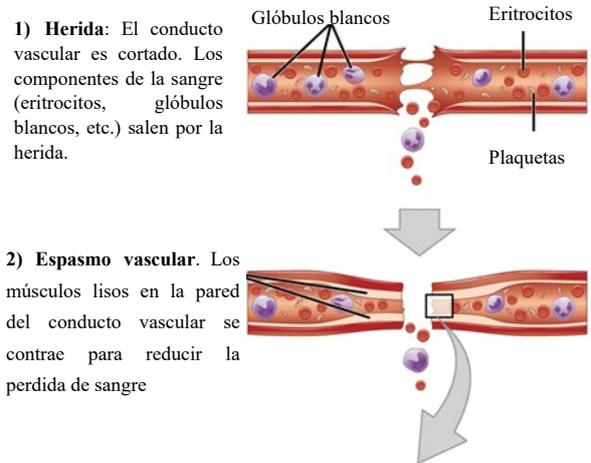
La coagulación de la sangre es un proceso que se lleva a cabo en el cuerpo con fin el de mantener en equilibrio la fluidez sanguínea, proceso que se conoce como hemostasia, y que consiste en una regulación dinámica afectada por múltiples factores como las infecciones, herencia genómica, enfermedades sistémicas o locales como el cáncer, agentes externos, entre otras [35]. Este proceso es considerado de vital importancia ya que permite controlar las hemorragias producidas por alguna herida y, de forma general, representa la transformación del fibrinógeno soluble en una red insoluble de fibrina debido a la acción de la trombina en la cascada de coagulación. [36].

2.3.1.1. Cascada de coagulación

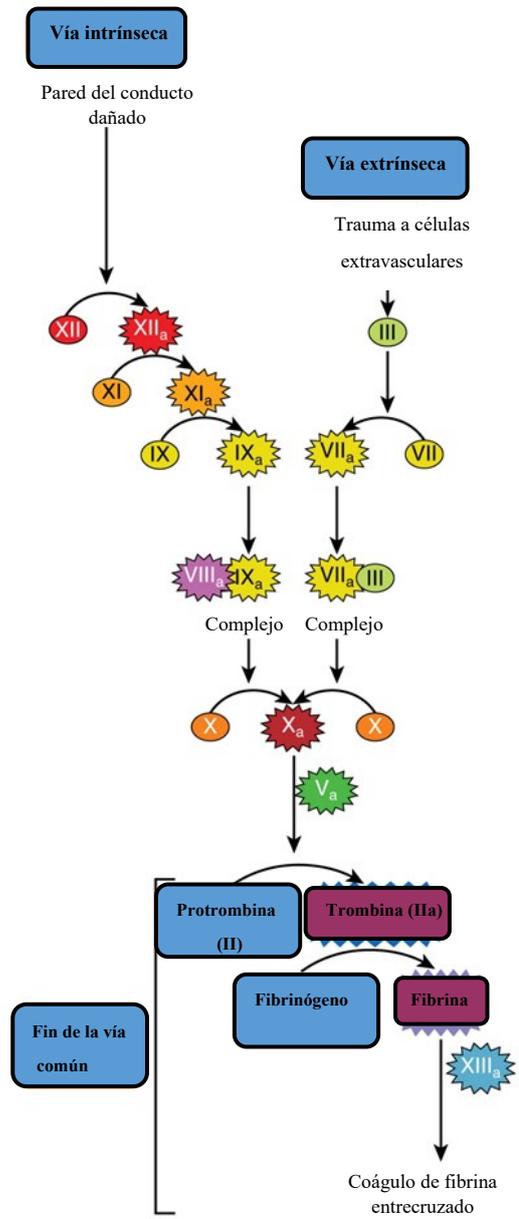
La cascada de coagulación es un complejo mecanismo mediante el cual una serie sustancias químicas, conocidas como factores, son activados de forma secuencial de tal modo que la activación de uno de estos factores, da lugar a la activación del factor siguiente, finalizando todo este proceso en la generación de trombina [35]. En el cuerpo, la cascada de coagulación se puede activar mediante dos vías: la vía extrínseca, la cual se activa por un trauma, y la vía intrínseca, la cual se activa por daños internos en la pared de un conducto vascular como se muestra en la Figura 2.9 [25], encontrándose ambas vías de la cascada de coagulación en una tercera vía que se conoce como la vía común. El listado completo de todos los factores relacionados con la cascada de coagulación, su naturaleza química, origen fisiológico, y la vía mediante la cual se activan se encuentran documentados en la Tabla 2.2.

En la vía extrínseca, la cascada de coagulación se activa cuando ocurre un daño en los tejidos, así, cuando las células extra vasculares dañadas entran en contacto con el plasma sanguíneo, se libera el factor III, seguido de iones Ca^{2+} (factor IV) y el factor VII, el cual es activado por el factor III, formando un complejo enzimático que activa el factor X que a su vez activa la vía común. Por su parte, en la vía intrínseca, la cascada de coagulación se activa cuando el factor XII tiene contacto con algún material extraño, una vez esto ocurre, el factor XII realiza una serie de reacciones químicas que activan el factor XI y luego el factor IX, mientras las sustancias liberadas por las plaquetas aumentan la velocidad de dichas reacciones. Finalmente, el factor VII de las plaquetas y las células endoteliales se combinan con el factor IX para formar un complejo enzimático que activa el factor X, llegando así a la vía común.

Una vez las vías intrínseca y extrínseca se encuentran en la vía común, y ésta se activa, se produce fibrina para sellar la vena herida, de este modo, una vez activado el factor X por cualquiera de estas dos vías, la protrombina convierte el factor II (protrombina inactiva) en la enzima activa de la trombina, que se convierte posteriormente en el factor I (fibrinógeno soluble) en las cadenas de fibrina insoluble, finalmente, el factor XIII estabiliza el coagulo de fibrina [25, 37].



A) Pasos generales de la coagulación.



B) Cascada de síntesis de fibrina

Figura 2.9: Representación esquemática de la cascada de coagulación (Imagen adapta de[25]).

Finalmente, dado que la cascada de coagulación es un mecanismo del cuerpo para cicatrizar las heridas, ésta no se considera mala, sin embargo, un desorden caracterizado por fallas en la cascada de coagulación, conocido como trombocitosis, genera un excesivo número de plaquetas, lo que a su vez propicia la formación excesiva de coágulos en la sangre, y posteriormente trombosis, por este razón, evitar que la cascada de coagulación se active es fundamental en los casos donde se presenta esta patología [38], por esta razón, existen fármacos anticoagulantes que intervienen directamente en este mecanismo, y los cuales se dividen en tres grandes grupos; anticoagulantes clásicos, antiagregantes y nuevos anticoagulantes. En general, los anticoagulantes (clásicos y nuevos anticoagulantes) actúan inhibiendo la síntesis de factores de la coagulación a nivel hepático o inhibiendo indirectamente la acción de trombina, entre estos, los más populares son: Warfarina, Heparina, Rivaroxabán, Apixabán y Dabigatrán [39]. Los antiagregantes actúan inhibiendo la liberación de sustancias plaquetarias que favorecen la adhesión y agregación de las mismas, entre estos los más populares son el ácido acetil salicílico y el Clopidogrel.

Factores de coagulación				
Factor	Nombre	Tipo de molécula	Fuente	Vía de coagulación
I	Fibrinógeno	Proteína de plasma	Hígado	Común; convertido en fibrina
II	Protrombina	Proteína de plasma	Hígado*	Común; convertido en trombina
III	Tromboplastina tisular o factor tisular	Mezcla de lipoproteínas	Células dañadas y plaquetas	Extrínseca
IV	Iones de calcio	Iones inorgánicos en plasma.	Dieta, plaquetas, matriz ósea.	Todo el proceso
V	Proacelerina	Proteína de plasma	Hígado, plaquetas	Extrínseca e intrínseca
VI	No usado	No usado	No usado	No usado
VII	Proconvertin	Proteína de plasma	Hígado*	Extrínseca
VIII	Factor antihemolítico A	Factor proteico del plasma	Plaquetas y células endoteliales	Intrínseco; resultados de la deficiencia en la hemofilia A
IX	Factor antihemolítico B (componente de tromboplastina plasmática)	Proteína de plasma	Hígado*	Intrínseca; resultados de la deficiencia en la hemofilia B
X	Factor de Stuart-Prower (trombocinasa)	Proteína	Hígado*	Extrínseca e intrínseca
XI	Factor antihemolítico C (antecedente de tromboplastina plasmática)	Proteína de plasma	Hígado	Intrínseca; resultados de deficiencia en la hemofilia C
XII	Factor de Hageman	Proteína de plasma	Hígado	Intrínseco; Inicia la coagulación <i>in vitro</i> también activa la plasmina.
XIII	Factor de estabilización de la fibrina	Proteína de plasma	Hígado, plaquetas	Estabiliza la fibrina; retarda la fibrinolisis

Tabla 2.2: Factores relacionados a la cascada de coagulación. *: Necesita vitamina K. (Adaptado de [25])

2.4. Enfermedades cardiovasculares

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo [1], y de éstas, se ha reportado que el mayor porcentaje de muertes están relacionados con la trombosis [2]. En Colombia, estas enfermedades representaron más del 20 % de los decesos ocurridos en 2018 según las cifras del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) [40], por esta razón, resulta importante entender el origen de estas enfermedades y los tratamientos disponibles actualmente para su tratamiento.

Existe una variedad de patologías asociadas a las enfermedades cardiovasculares, y en general, el problema de la mayoría de ellas consiste en que impiden el flujo natural de la sangre a través de los conductos vasculares, de este modo, en las arterias, se considera que una de las patologías más graves es la aterosclerosis, una enfermedad crónica que se caracteriza por la deposición de grasas, colesterol, calcio y otras sustancias en la capa íntima de las arterias [25], así, cuando estos depósitos son lo suficientemente grandes pueden causar heridas al interior del conducto vascular, lo que activa la cascada de coagulación en la parte interna de dicho conducto, y finaliza con la formación de un coágulo de sangre llamado trombo, por lo tanto, resulta importante entender el mecanismo de formación de la aterosclerosis, el proceso de coagulación de la sangre, y finalmente, el proceso de formación de trombos en los conductos vasculares con el fin de determinar cuál es el tratamiento más adecuado para cada paciente. [25, 26, 41].

2.4.1. Aterosclerosis

La aterosclerosis es una patología que suele ser relacionada con el corazón, sin embargo, puede ocurrir en cualquier arteria del cuerpo y se refiere a una obstrucción de éstas por acumulación de grasas, colesterol, y plaquetas como se muestra en la Figura 2.10, teniendo como consecuencia la obstrucción y endurecimiento de estos conductos vasculares, de este modo, cuando el conducto está totalmente obstruido, el flujo sanguíneo se verá restringido, condición conocida como isquemia, lo que causa que las células no tengan suficiente oxígeno y se produzca una hipoxia [41–43].

El progreso de esta patología es lento, y se sabe que los factores principales que afectan su evolución incluyen el tabaquismo, hipertensión, herencia familiar, obesidad, diabetes, alto consumo alcohólico, falta de actividad física y alta circulación de lípidos en la sangre, así, los tratamientos para esta patología incluyen cambio en la dieta y ejercicio, además, si es lo suficientemente grave, su tratamiento puede incluir una angioplastia o una cirugía de derivación coronaria [25].

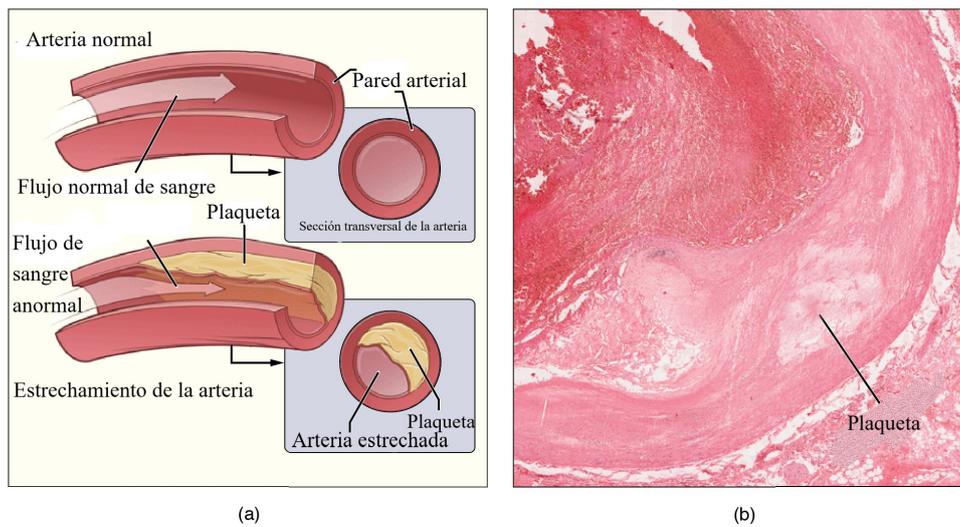


Figura 2.10: (a) Representación de la aterosclerosis en una arteria, (b) Micrografía de una placa formada en una arteria coronaria (Imagen adaptada de [25])

2.4.2. Trombosis y embolia

La trombosis es una patología corporal que está asociada a problemas cardiovasculares como las enfermedades isquémicas del corazón, accidentes cardiovasculares y tromboembolismo, siendo la responsable directa de estos tres desordenes [2], razón por la cual es de vital importancia estudiar dicha patología debido a la alta tasa de muertes que se presentan en el mundo por enfermedades de este tipo [1].

El mecanismo de formación y transporte de trombos en la sangre no es del todo conocido, sin embargo, a través de los últimos cincuenta años se han desarrollado algunos modelos que tratan de explicar dichos fenómenos mediante un mecanismo en el cual la formación de un trombo en el sistema vascular del cuerpo es consecuencia de la activación de la cascada de coagulación al interior de las venas o arterias [38]. En una primera aproximación, esta activación se da cuando se presenta una herida al interior de los conductos vasculares, lo que genera en la primera etapa del mecanismo una respuesta inmunológica en el cuerpo que trata de cerrar dicha herida produciendo trombina en este lugar, etapa es conocida como iniciación, la cual es seguida de una etapa de amplificación, en la que la trombina liberada activa la cascada de coagulación en la sangre, finalmente, comienza una producción masiva de trombina en el lugar de la herida, lo que promueve el mecanismo de ruptura del fibrinógeno en fibrina, y esta última forma una plaqueta que, al crecer indefinidamente al interior de la vena o arteria, produce la trombosis, por otra parte, la embolia es una consecuencia natural de la trombosis, y consiste en la migración del trombo desde su lugar de origen hasta los distintos caminos del sistema circulatorio [44–46].

En la Figura 2.11 se observa la intervención quirúrgica de un paciente con un accidente cerebrovascular agudo, se distinguen en ella el coágulo y su efecto de interrupción del flujo (a), el efecto de la recanalización del conducto luego de la intervención quirúrgica (b) y el coágulo

extraído (c), como se observa en la figura, algunas patologías cardiovasculares requieren de intervención quirúrgica debido al avance mismo ésta, y dependiendo de su naturaleza, dichas intervenciones podrán ser a través de *stents* o, en algunas ocasiones, el reemplazo total del conducto vascular afectado.



Figura 2.11: (a) Fotografía de un accidente cerebrovascular agudo causando un defecto de llenado lineal dentro de la arteria, (b) recanalización completa luego de la captura del coágulo con un *stent*, (c) fotografía del coágulo atrapado con el *stent* [47].

Por otra parte, la formación de una herida al interior del sistema vascular del cuerpo no es la única forma en que se origina una trombosis en el mismo, por ejemplo, los pacientes intervenidos quirúrgicamente para reemplazar parte de este sistema por un injerto vascular artificial enfrentan con muy altas probabilidades el problema de que una trombosis se presente nuevamente, pero esta vez sobre la superficie del material que se ha implantado en el cuerpo, reportándose cifras de fallas de 63.5 % cuando los injertos tienen diámetros inferiores a 6 mm [16], o cuando los injertos son puestos en áreas de poco flujo sanguíneo [48], dicho fenómeno de formación de plaquetas, y posterior adhesión de trombos sobre el material se explica debido a la alteración del equilibrio termodinámico que se da cuando la sangre entra en contacto con un material extraño [49, 50], lo que interviene en la estructura natural de la sangre y reorganiza las moléculas de agua presentes en ésta mientras las separa de las moléculas de proteína que son más afines químicamente con el material del implante, de este modo, estas proteínas comienzan a depositarse sobre la superficie interna del material y, una vez estos depósitos de proteínas son lo suficientemente grandes, estos forman plaquetas sobre la superficie del injerto y una posterior

trombosis como se muestra en la Figura 2.12 [51, 52].



Figura 2.12: Segmento de implante cardiovascular fabricado con ePTFE con deposición de coágulos [52].

2.4.3. Tratamientos para las enfermedades cardiovasculares

Existen varios tratamientos para las enfermedades cardiovasculares dependiendo de cuál sea la naturaleza de la misma y los factores asociados a dichas enfermedades como la obesidad, el consumo de tabaco, la edad, entre otras [41, 53], en específico, cuando la enfermedad está relacionada con la obstrucción de un conducto vascular, los tratamientos estarán enfocados en el uso de fármacos o de *stents* que permitan la continuidad del flujo sanguíneo, sin embargo, en el caso de la intervención con un *stent*, los leucocitos migran dentro de la capa de musculo liso del conducto, secretando citocinas y factores de crecimiento que promueven la proliferación de células musculares lisas y la migración y producción de matriz extracelular, resultando todo esto en hiperplasia neointimal y contribuyendo a la restenosis [51]. Por otra parte, si la enfermedad está relacionada con problemas de coagulación, su tratamiento consistirá en el uso de fármacos anticoagulantes [54], no obstante, en el caso de que el conducto vascular requiera ser reemplazado, se tendrá que disponer de un injerto vascular, para lo cual la alternativa más común es la implantación de injertos vasculares autólogos, los cuales se han visto limitados debido a la poca cantidad de tejido que puede ser extraído de los pacientes, sumado a los largos tiempos de espera que requiere su acondicionamiento físico y celular [14], de este modo, los tratamientos más modernos consisten en el diseño, funcionalización e implantación de injertos vasculares artificiales, los cuales deben cumplir con varias propiedades como la biocompatibilidad y propiedades mecánicas que puedan mimetizar el comportamiento de un conducto vascular natural.

2.5. Biomateriales

A pesar de que la definición de biomaterial ha evolucionado desde sus primeras investigaciones, estos se pueden entender como todos aquellos materiales naturales o sintéticos que están destinados a soportar o tomar la función completa de algún tejido no funcional en el cuerpo humano, y su desarrollo ha estado presente en la ingeniería desde hace aproximadamente 70 u 80 años, por lo que se le considera una ciencia relativamente nueva [55], sin embargo, existen

registros del uso de biomateriales que datan de miles de años atrás, incluidos ojos de vidrio, narices metálicas y dientes de marfil encontrados en momias egipcias o esqueletos hallados en Teotihuacan como la que se muestra en la Figura 2.13, donde se observa el esqueleto de una mujer de aproximadamente 40 años con un implante dental que data de hace aproximadamente 1600 años en Teotihuacan (Mexico) [56].



Figura 2.13: Mujer de Teotihuacan con implantes dentales [56]

Actualmente la definición de biomaterial ha evolucionado según el desarrollo de la química, la biología, la ingeniería y la medicina, así, uno de las primeras definiciones, acuñada por la Junta Consultiva de la Universidad de Clemson para Biomateriales en 1976 definió a los biomateriales como una “sustancia sistémica y farmacológicamente inerte diseñada para implantación o incorporación en sistemas vivos”, luego, en 1999, la Sociedad Europea de Biomateriales, en la Primera Conferencia de Consenso definió un biomaterial como un “material no viable utilizado en un dispositivo médico, destinado a interactuar con sistemas biológicos”, y posteriormente refino dicha definición en la Segunda Conferencia de Consenso en 2005 como un “material destinado a interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” [56]¹, finalmente, en la última Conferencia de Consenso, realizada en 2018, se han tenido en cuenta algunos aspectos para actualizar dicha definición y, para esto, el centro de atención se concentró en las propiedades de los biomateriales, de este modo, se considera como biomaterial a todos los materiales que puedan cumplir con el siguiente listado de propiedades [57]:

- Que sea biocompatible, es decir, que no sea tóxico, carcinogénico, alérgico, etc.
- Que tenga propiedades físicas similares a las del tejido a tratar o reemplazar (densidad, forma, porosidad, rugosidad, etc.).
- Que tenga propiedades mecánicas apropiadas según la aplicación.
- Que tenga una vida útil apropiada según el tejido u órgano tratado.
- Que tenga propiedades químicas similares a las del tejido a tratar (Hidrofobicidad o hidrofílicidad, grupos funcionales, etc.).

¹Todas las definiciones dadas fueron tomadas textualmente del libro *Fundamentals of Biomaterials*, **Vasif Hasirci y Nesrin Hasirci**, 2009 [56] con el fin de no alterar las definiciones dadas por las diferentes entidades académicas mencionadas.

- Que sea procesable y esterilizable sin dificultades.
- Que tenga bioactividad apropiada según la aplicación, es decir, ser mayoritariamente inerte, pero puede tener cierta bioactividad inducida para cumplir alguna función específica (por ejemplo, superficies funcionalizadas para evitar la coagulación en implantes vasculares).
- Que sea económico y esté disponible.

Teniendo en cuenta todas estas propiedades, se puede observar entonces que los biomateriales comprenden una amplia gama de disciplinas, que unen a la biología, la química, la física, la ingeniería y la medicina [58], y tienen como objetivo principal el desarrollo de dispositivos médicos comúnmente utilizados en prótesis ortopédicas, dentales, oftalmológicas, cirugía reconstructiva o implantación de injertos vasculares, además de abarcar también materiales para suturas quirúrgicas, bioadhesivos o cementos para hueso, y para ello, el camino que deben seguir los biomateriales comprenderá el diseño ingenieril del mismo, pruebas *in vitro* o *in vivo*, adaptación clínica y, finalmente, la producción industrial del dispositivo como se muestra en la Figura 2.14 [55].

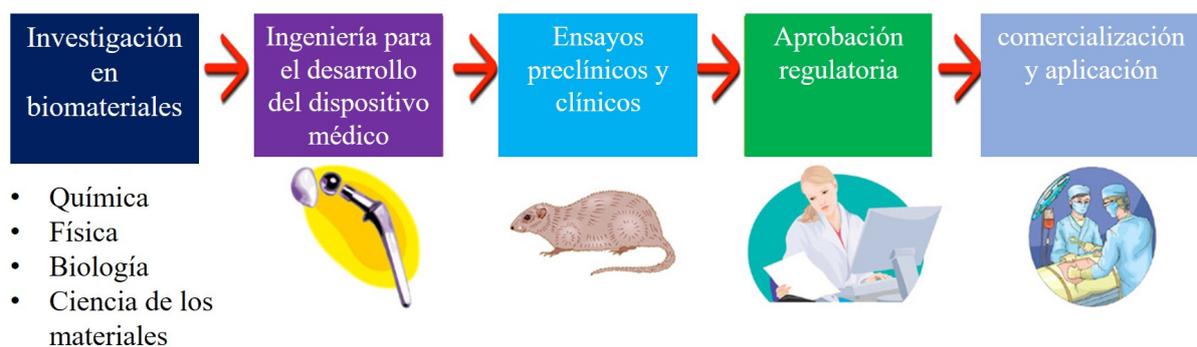


Figura 2.14: Camino desde la investigación básica en biomateriales, a dispositivos médicos, y la aplicación clínica. (Imagen adaptada de [55])

En la Figura 2.15 se puede observar una amplia variedad de aplicaciones que relacionan los biomateriales con distintas partes del cuerpo, abarcando desde materiales metálicos para tornillos o remplazo total de cadera, como materiales cerámicos para huesos, hasta polímeros de diferentes naturalezas para reparación de cartílago, ligamentos o partes del sistema vascular, por lo tanto, el tipo específico de biomaterial que se desee fabricar dependerá exclusivamente de la parte del cuerpo que se desee tratar, y de la aplicación específica que cumplirá en esta parte del cuerpo, de tal forma que todas las propiedades mencionadas previamente se cumplan. En las próximas secciones, se enfatizará en los injertos vasculares, y específicamente, se tratarán la fibroína de seda y el polivinil alcohol como materiales viables para la fabricación de los mismos.

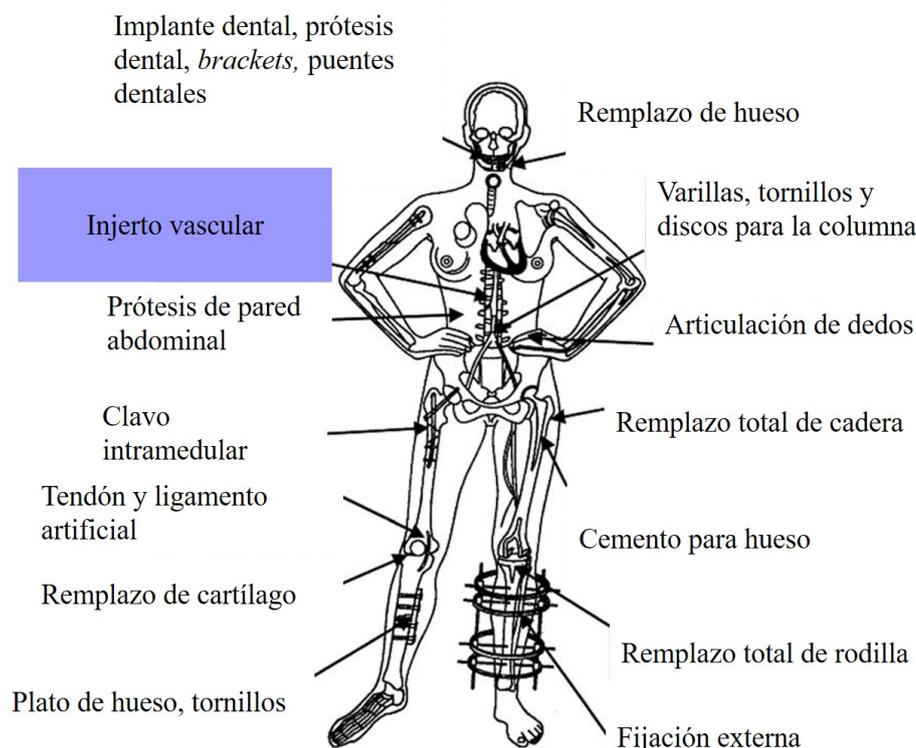


Figura 2.15: Aplicaciones más comunes de biomateriales en el cuerpo humano (Imagen adaptada de [59])

2.5.1. Injerto vascular

Un injerto vascular es un dispositivo tubular destinado al reemplazo de conductos vasculares afectados por enfermedades coronarias [60–64], estos dispositivos pueden ser autólogos o artificiales. Los injertos vasculares autólogos consisten en tejidos extraídos y adaptados de los pacientes, por otra parte, los injertos vasculares artificiales consisten en materiales poliméricos que tratan de mimetizar las propiedades biológicas y mecánicas de los conductos vasculares nativos, así, basado en las limitaciones que resultan del acondicionamiento de los injertos autólogos, un nuevo enfoque ha tomado protagonismo en el desarrollo de injertos vasculares, en el cual se pretende fabricar dicho injerto con biopolímeros naturales, teniendo en cuenta que el uso de estos incluye un amplio espectro de aplicaciones debido a la complejidad del sistema circulatorio y la función específica que tendría el material de reemplazo [61].

2.5.1.1. Biomateriales utilizados para fabricar injertos vasculares artificiales

Para que un material sea considerado como apto para implantarse, éste debe cumplir algunas propiedades generales como resistencia a las infecciones, biocompatibilidad, buenas

propiedades mecánicas y resistencia a la abrasión [65].

En la actualidad existe una diversidad de materiales poliméricos utilizados para fabricar injertos vasculares, entre los que se destacan el politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) [11, 66], polivinil alcohol (PVA) [20, 22, 67–69] y poliuretanos de diferentes naturalezas [15, 70–73], teniendo estos últimos un particular protagonismo debido al buen balance que presentan entre las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad, además de comportarse mecánicamente de forma similar a los conductos vasculares nativos y teniendo mejor desempeño si se compara con otros materiales [74, 75], sin embargo, en algunos estudios se ha logrado encontrar que estos tienden a degradarse en el cuerpo causando aneurismas [76], lo que pone en duda su uso en la fabricación de implantes vasculares artificiales.

Basado en lo anterior, recientemente se ha planteado la idea de fabricar injertos vasculares con biopolímeros naturales [61], ya que estos se caracterizan por su alta biocompatibilidad, entre ellos, la fibroína se caracteriza ya que debido a su estructura química, la incorporación de biomoléculas como la heparina, se logra fácilmente a través de los grupos reactivos de esta proteína [19, 77, 78], sin embargo, su limitación principal consiste en la disminución de su resistencia mecánica cuando se solubiliza en sistemas ternarios, por tal motivo, esta proteína suele ser usada en forma de mezcla con otros polímeros que ayuden a mejorar estas propiedades mecánicas [21, 22, 67, 79–81]. Por otra parte, el polivinil alcohol ha ganado popularidad debido a que sus propiedades mecánicas se pueden adaptar dependiendo de la forma en que se procese [82–85], haciendo a este material muy versátil para diferentes aplicaciones, incluyendo las mezclas con fibroína.

2.5.1.1.1. Fibroína como biomaterial para la fabricación de injertos vasculares

La fibroína es una proteína que puede ser extraída del capullo del gusano de seda *Bombyx Mori*, y su uso ha sido reportado por más de 3000 años en la producción de prendas de alta resistencia [86], su estructura química se caracteriza por la repetición de la secuencia de amino ácidos glicina-alanina-glicina-alanina-glicina-serina (Gli-Ala-Gli-Ala-Gli-Ser), los cuales se organizan en una estructura de lámina- β antiparalela como se muestra en la Figura 2.16 [19]. Esta configuración resulta particularmente interesante ya que la formación de enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares, sumado a las fuerzas de Van der Waals fuertes que se dan entre las láminas- β le proporcionan a este material una estabilidad estructural que se refleja en la resistencia mecánica del mismo cuando se utiliza como seda [87, 88].

La composición de la fibroína se divide principalmente de glicina y alanina, y presenta 3 cadenas polipeptídicas principales; la cadena pesada, que pesa alrededor de 391 kDa, la cadena ligera, que pesa alrededor de 25.8 kDa y está asociada a la cadena pesada a través de un único enlace disulfuro, y la P25, que pesa alrededor de 25 kDa y está asociada a la cadena pesada a través de interacciones hidrofóbicas, además, las propiedades mecánicas de la fibroína se atribuyen principalmente a la cadena pesada [89], de este modo, en dicha cadena, la composición de aminoácidos no reactivos representa la mayoría de residuos, ocupando más del 75 % de su

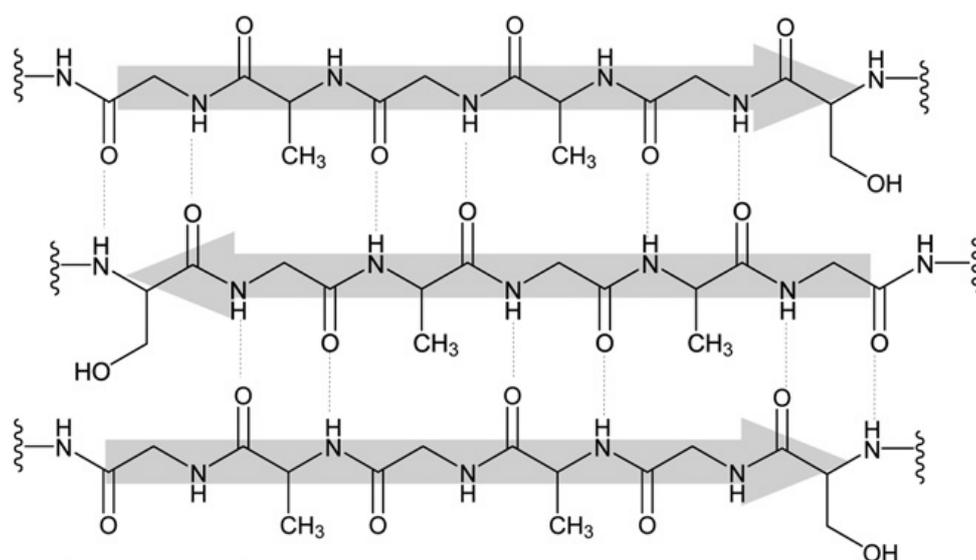


Figura 2.16: Estructura de láminas- β antiparalelas de la fibroína, compuesta principalmente por la secuencia de aminoácidos Gli-Ala-Gli-Ala-Gli-Ser [19].

composición molar, sin embargo, como se muestra en la Tabla 2.3, esta cadena tiene otros grupos funcionales reactivos como ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina y tirosina, los cuales representan juntos aproximadamente el 19 % de su composición, haciéndola viable para realizar una inmovilización de moléculas bioactivas como la heparina.

A pesar de lo anterior, algunos autores han reportado problemas con las propiedades mecánicas de la fibroína cuando ésta no se trabaja como seda sino como material regenerado [88, 90–94], lo que comúnmente se logra solubilizando esta proteína en un sistema ternario H₂O: C₂H₅OH:CaCl₂ (8:2:1) o en soluciones altamente iónicas como las de LiBr, que posteriormente pasan por un proceso de diálisis y evaporación de solvente, de este modo se genera un material quebradizo y poco útil para aplicaciones biomédicas. Con lo anterior, la fibroína tendría más relevancia como material para la fabricación de implantes vasculares si se aprovecha su estructura molecular como medio de anclaje para moléculas bioactivas como la heparina, lo anterior se explica debido a la presencia de algunos aminoácidos reactivos de su estructura molecular tales como serina, treonina, tirosina, ácido aspártico y ácido glutámico, los cuales le permiten a esta proteína ser modificada superficialmente mediante la inmovilización de heparina sobre su superficie utilizando el acople de carbodiimida o aprovechamiento de interacciones electrostáticas [95, 96], así, para el caso particular de la fibroína, es posible activar primero la heparina con N-hidroxisuccinimida (NHS) para luego anclarla de forma covalente sobre la fibroína [97] y lograr su funcionalización superficial sin necesidad de recurrir a técnicas más complejas como la funcionalización con plasma o vía aminólisis [16], de este modo, una vez usada la fibroína como medio para anclar la heparina, sus propiedades mecánicas pueden ser mejoradas formulando mezclas con otro polímero como el polivinil alcohol (PVA).

Aminoácido	Residuos (#)	Mol (%)
Alanina	1593	30.3
Arginina	14	0.3
Asparagina	20	0.4
Ácido aspártico	25	0.5
Cisteína	5	0.1
Glutamina	10	0.2
Ácido glutámico	30	0.6
Glicina	2415	45.9
Histidina	5	0.1
Isoleucina	13	0.2
Leucina	7	0.1
Lisina	12	0.2
Metionina	4	0.1
Fenilalanina	29	0.6
Prolina	14	0.3
Serina	635	12.1
Treonina	47	0.9
Triptófano	11	0.2
Tirosina	277	5.3
Valina	97	1.8

Tabla 2.3: Composición promedio de aminoácidos encontrados en una cadena de fibroína, se distinguen en verde (■): aminoácidos reactivos con un porcentaje en mol inferior al 0.5 % . En morado (■): aminoácidos reactivos con un porcentaje en mol superior al 0.5 % (Tabla adaptada de [19])

2.5.1.1.2. Polivinil alcohol como biomaterial para la fabricación injertos vasculares

El polivinil alcohol (PVA) es un polímero cuya estructura química se caracteriza por tener un grupo hidroxilo libre en su unidad primaria conocida como vilnil alcohol, la cual, cuando se encuentra como monómero tiende a ser inestable, y a reorganizarse en su tautómero acetaldehído, así, la forma tradicional de producir PVA se da por la polimerización del vinil acetato a polivinil acetato, seguido de un proceso de hidrólisis que tiene como producto final el PVA [98], de este modo, en la producción industrial de PVA, el grado de hidrólisis de este polímero dependerá de lo completa que sea la reacción mostrada en la Figura 2.17, y dicho parámetro afectará las propiedades finales del PVA, impactando directamente su solubilidad y cristalinidad como se muestra en la figura 2.18, donde se observa la solubilidad del PVA en agua con respecto a su grado de hidrólisis, en ésta se puede notar como altos grados de hidrólisis disminuyen la solubilidad del PVA a 20°C y 40°C, teniendo así que aumentar la temperatura por encima de 70°C para lograr una completa disolución de este polímero [69].

En aplicaciones biomédicas y farmacéuticas, el PVA se usa ampliamente debido a que no es citotóxico, y puede ser altamente bioadherente [69], además de que su fácil procesamiento permite obtener aplicaciones ajustables a las necesidades específicas de las diferentes

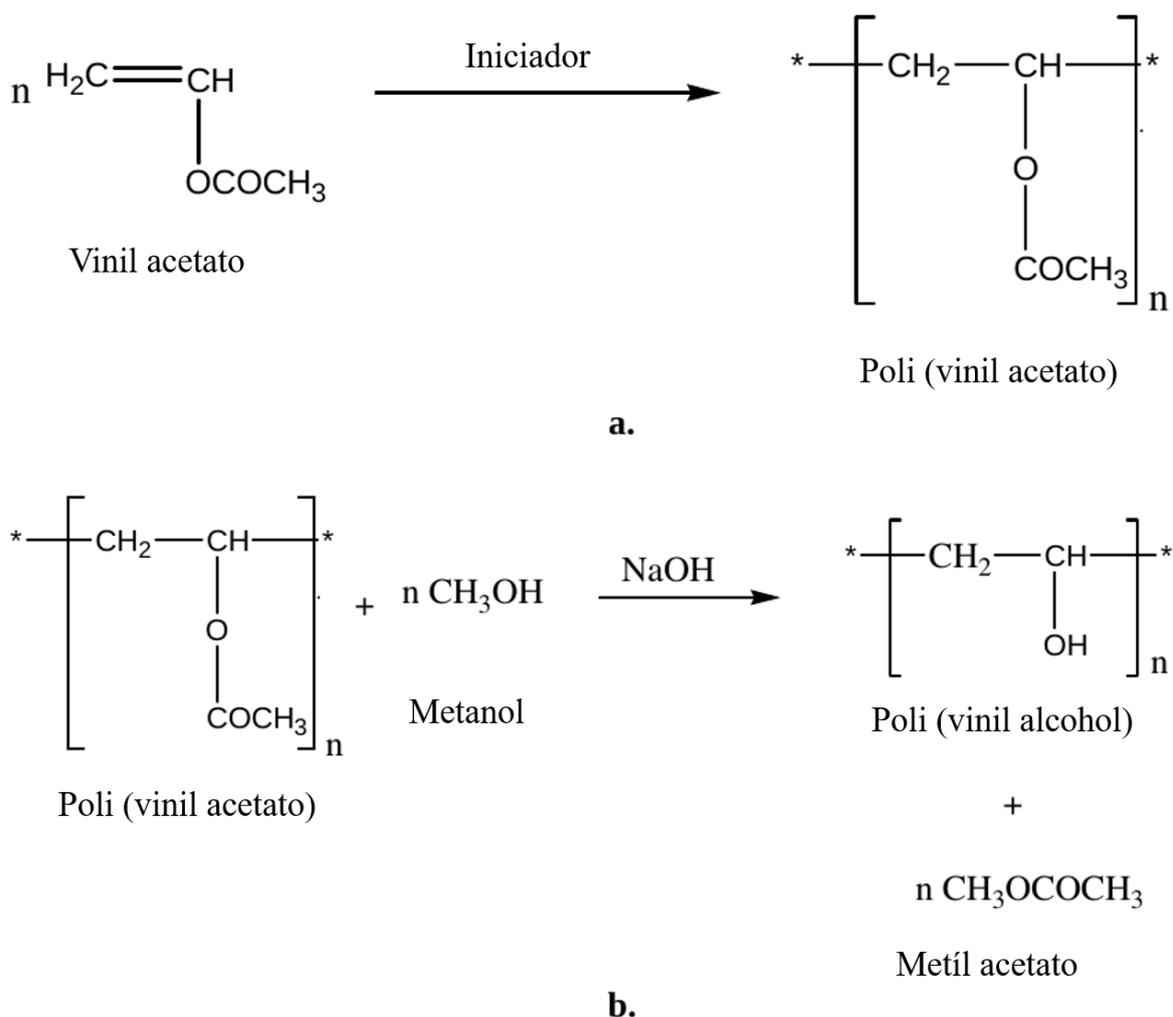


Figura 2.17: Polimerización de vinil acetato, seguido de hidrólisis del mismo para la producción de PVA (Figura adaptada de [98])

investigaciones, ya sea como material biodegradable [84, 99], liberadores de fármacos [79], estructuras de andamio [82], o fabricación de dispositivos para aplicaciones cardiovasculares [100–103], por lo tanto, dependiendo del tipo de aplicación que se busque, el PVA debe ser entrecruzado con el fin de obtener las propiedades mecánicas deseadas [104], así, para lograr este objetivo, tradicionalmente se utilizan mono o dialdehídos como glutaraldehído, acetaldehído, formaldehído, entre otros, dando como resultado la reacción que se muestra en la Figura 2.19. Este esquema de reacción es de gran relevancia debido a que este tipo de entrecruzamiento es el preferido al momento de utilizar el PVA como medio de soporte de proteínas funcionalizadas, ya que otro tipo de sustancias de entrecruzamientos como el ácido cítrico, o cualquier otro tipo de ácidos resultan en la inactivación de las proteínas funcionalizadas, haciendo prácticamente inviable la preparación de sistemas tipo fibroína-heparina/PVA [105].

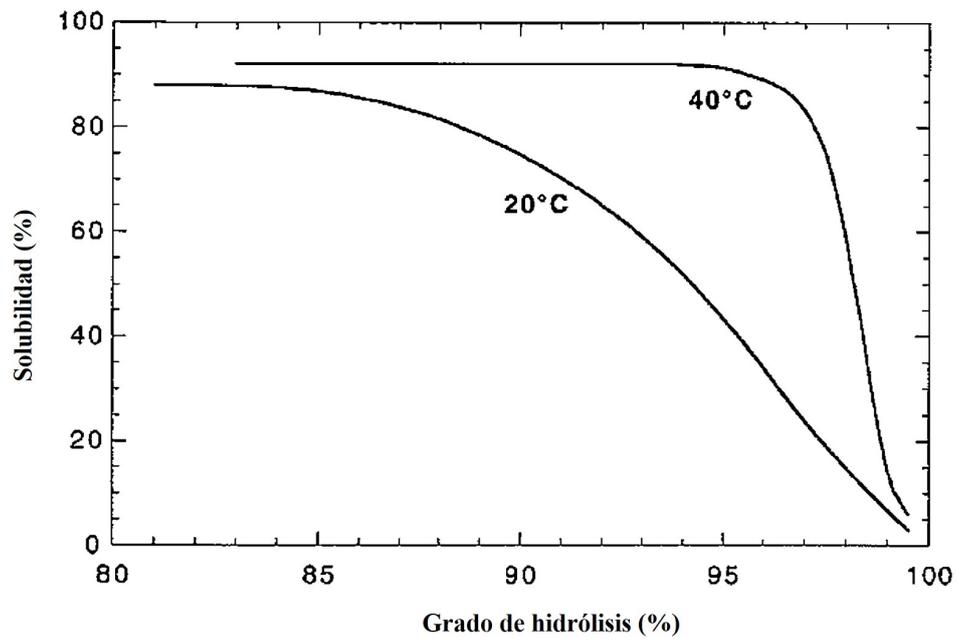


Figura 2.18: Solubilidad del PVA como función del grado de hidrólisis a 20°C y 40°C (Figura adaptada de [69])

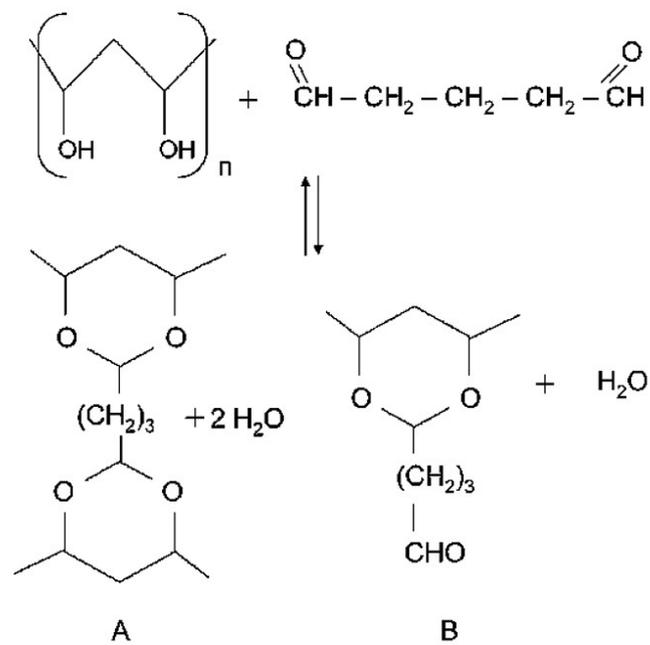
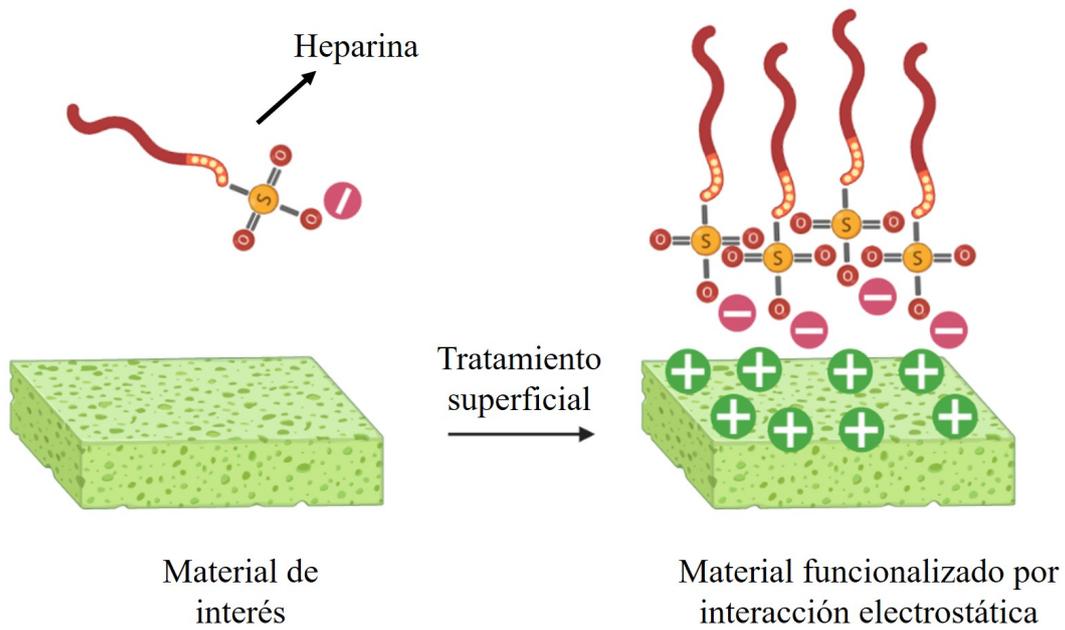


Figura 2.19: Mecanismo de reacción entre el PVA y glutaraldehído [105]

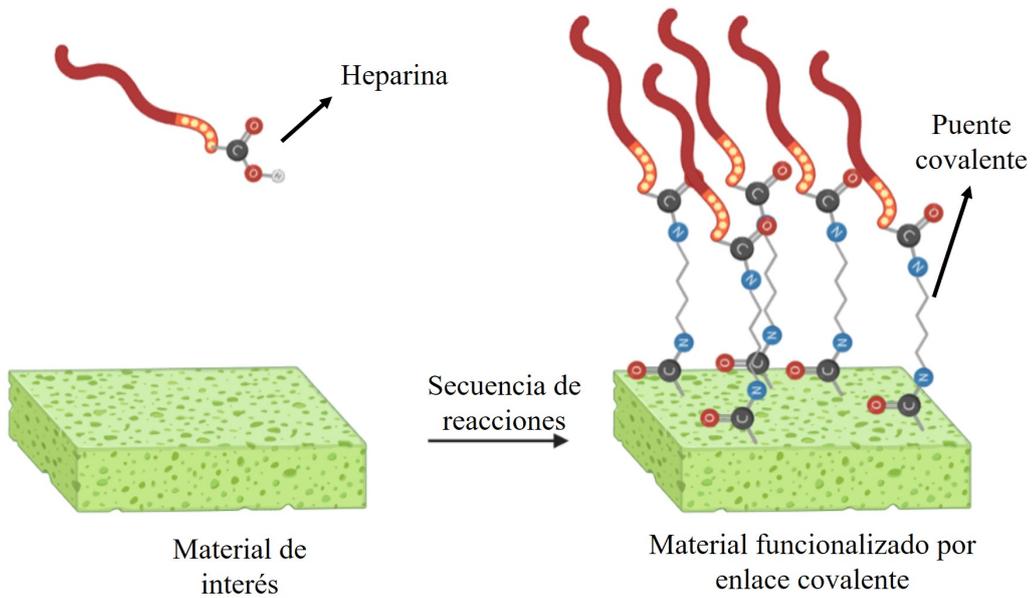
2.5.1.2. Funcionalización superficial de biomateriales destinados a la fabricación de injertos vasculares

Cuando un material extraño, como los polímeros mencionados en secciones anteriores, entra en contacto con la sangre, las proteínas en ésta tienden a adsorberse sobre la superficie de dicho material, dado que la interacción sangre-polímero es favorable termodinámicamente a la formación superficial de plaquetas, y por lo tanto, favorece la formación de trombos [50], por esta razón, funcionalizar la superficie de estos materiales es indispensable para evitar que se formen plaquetas sobre la superficie de los mismos, para esto, la estrategia principal consiste en inmovilizar fármacos anticoagulantes, como la heparina, sobre la superficie del polímero.

Existen varios métodos para funcionalizar la superficie de los injertos vasculares poliméricos utilizando heparina [106], sin embargo, todos estos métodos se pueden agrupar en dos grandes categorías: inmovilización física por interacciones electrostáticas, en la cual se aprovecha la alta carga negativa de la heparina para adherirla a una superficie cargada positivamente, y la inmovilización química, en la cual se busca introducir un grupo funcional sobre la superficie del polímero y acoplar a éste la heparina a través de enlaces covalentes. En la Figura 2.20 se esquematizan ambas formas de funcionalización, en ella se puede observar que cuando se funcionaliza a través de aprovechamiento de interacciones electrostáticas (Figura 2.20a), se aprovecharán los grupos sulfato de la molécula de heparina, que están cargados negativamente para permanezcan anclados a una superficie previamente cargada positivamente, por otra parte, en el caso de la funcionalización por formación de enlaces covalentes (Figura 2.20b), la heparina se activa previamente para crear un puente de anclaje entre ésta y el material de interés, y para este propósito, el material en cuestión debe tener grupos reactivos para que la reacción pueda ocurrir [107], de este modo, dichos grupos pueden ser inherentes al material, como las aminas primarias terminales de las proteínas, o introducidos en la superficie de éste a través de tecnologías como el plasma o reacciones químicas como la aminólisis [108, 109]. Nótese además, que a diferencia de la funcionalización por aprovechamiento de interacciones electrostáticas, la funcionalización por formación de enlaces covalentes aprovecha los grupos ácido carboxílico de la heparina, debido a que es común que dicho grupo se utilice para la formación de enlaces amida como puente de anclaje con el material de interés [9, 12, 110–112].



(a) Esquema de funcionalización por aprovechamiento de interacciones electrostáticas



(b) Esquema de funcionalización por formación de enlaces covalentes

Figura 2.20: Esquemas de funcionalización por aprovechamiento de interacciones electrostáticas y por formación de enlaces covalentes (Ilustración propia)

2.5.1.3. Mecanismo de acción de la heparina

como se ha mencionado previamente, entre los distintos anticoagulantes conocidos hasta el momento, la heparina es el más utilizado tanto como fármaco inyectable, como sustancia para la funcionalización de distintos materiales y dispositivos médicos que tienen contacto con la sangre [54, 113, 114], de este modo, entender su química y acción biológica resulta indispensable.

La heparina es el miembro más altamente sulfatado de la familia de los glicosaminoglucuronanos [114], lo que le da una alta carga negativa y le permite interactuar electrostáticamente con varias proteínas como factores de crecimiento, proteasas y quimiocinas [4]. Su estructura química se caracteriza por la repetición de la unidad trisulfatada de disacáridos mostrada en la 2.21:

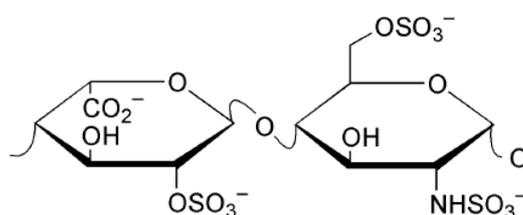


Figura 2.21: Unidad repetitiva de disacárido trisulfatado presente en la estructura de la heparina. [115]

Este polisacárido normalmente se obtiene por extracción de la mucosa porcina o bobina, y desde esta fuente se logra una mezcla polidispersa que contiene cadenas de diferentes pesos moleculares [114, 115], entre las cuales, se ha logrado demostrar que la repetición de 5 unidades de monosacáridos mostrada en la Figura 2.22 es la que posee actividad anticoagulante [116, 117], propiedad que es atribuida a la formación de enlaces entre ésta y la antitrombina-III (A-TII), lo que da como resultado la catálisis de la acción de la AT-III para neutralizar la trombina y prevenir la ruptura del fibrinógeno en fibrina [3], sin embargo, esta parte del mecanismo de acción no es del todo conocida, y se ha hipotetizado que dicho fenómeno se puede modelar de 3 maneras según se muestra en la Figura 2.23 [118]:

1. La heparina se enlaza primero con la AT-III, y todo este complejo se enlaza a la trombina.
2. La heparina se enlaza primero a la trombina, y posteriormente este complejo completo se enlaza a la AT-III.
3. Ocurre un enlazamiento simultáneo entre la AT-III y la trombina con la heparina.

Para entender mejor estos tres modelos, vistos desde la perspectiva molecular, se considera la representación mostrada en la Figura 2.24, la cual corresponde a un esquema ideal de una cadena de heparina y en la que se pueden reconocer tres dominios principales alrededor de la

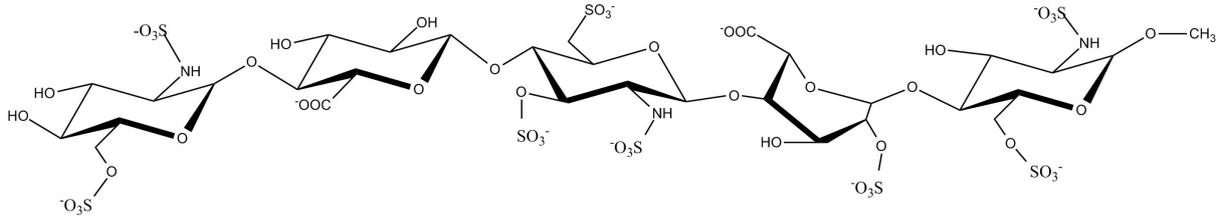


Figura 2.22: Cadena de 5 unidades de monosacáridos responsable de la actividad anticoagulante [116]

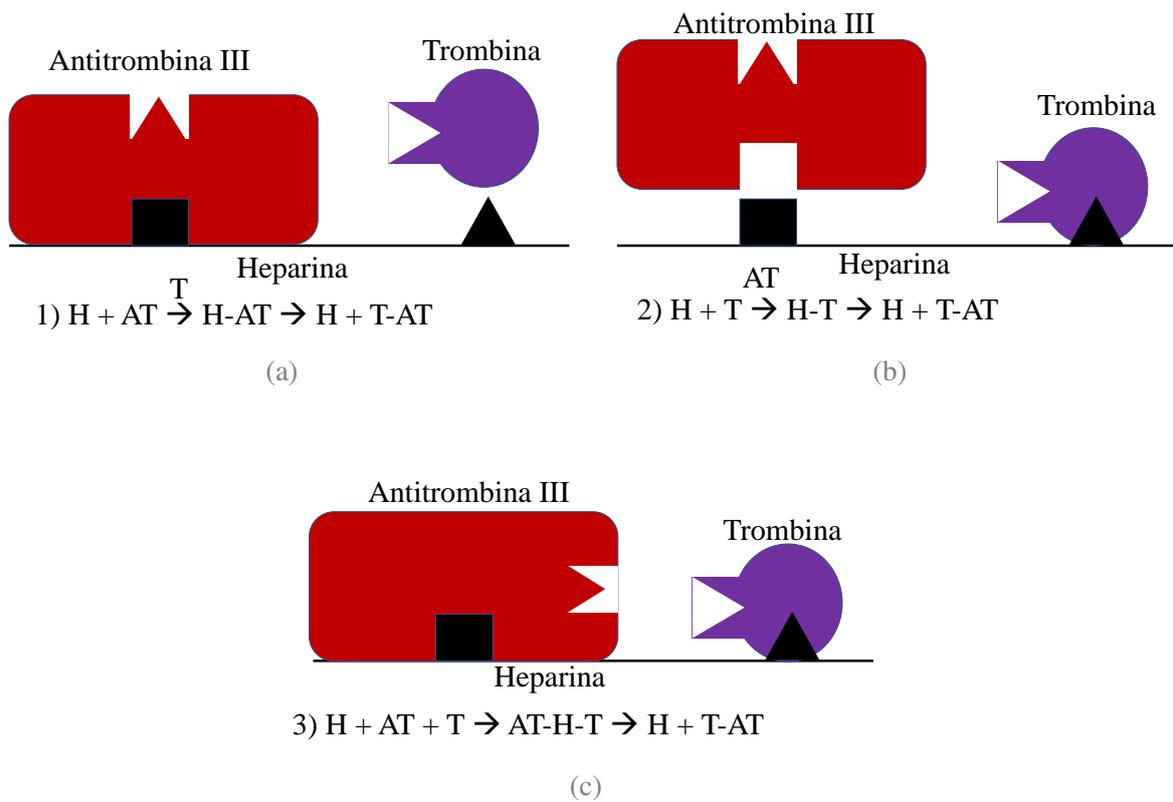


Figura 2.23: Mecanismos hipotéticos de la interacción heparina-AT-III (Imagen adaptada de [118]).

misma: dominio N-acetilado (NA), dominio N-sulfatado (NS) y el dominio mixto (NA/NS), entre estos, el dominio NS es el que contiene la secuencia de pentasacáridos (AT-bd) mostrados en la Figura 2.22, y que es responsable de la actividad anticoagulante de la heparina, secuencia caracterizada por un monosacárido central trisulfatado, considerado el marcador del sitio activo, y que actúa directamente en la inhibición del Factor Xa y la trombina, las cuales son las últimas dos proteasas de la cascada de coagulación [119].

Finalmente, la consecuencia de cualquiera de estos 3 modelos es la misma, es decir, se produce un efecto catalítico en la acción de la AT-III, y esto evita que el fibrinógeno produzca fibrina, por lo tanto, se evitará la formación de plaquetas y de trombosis en los sitios donde esté presente la heparina.

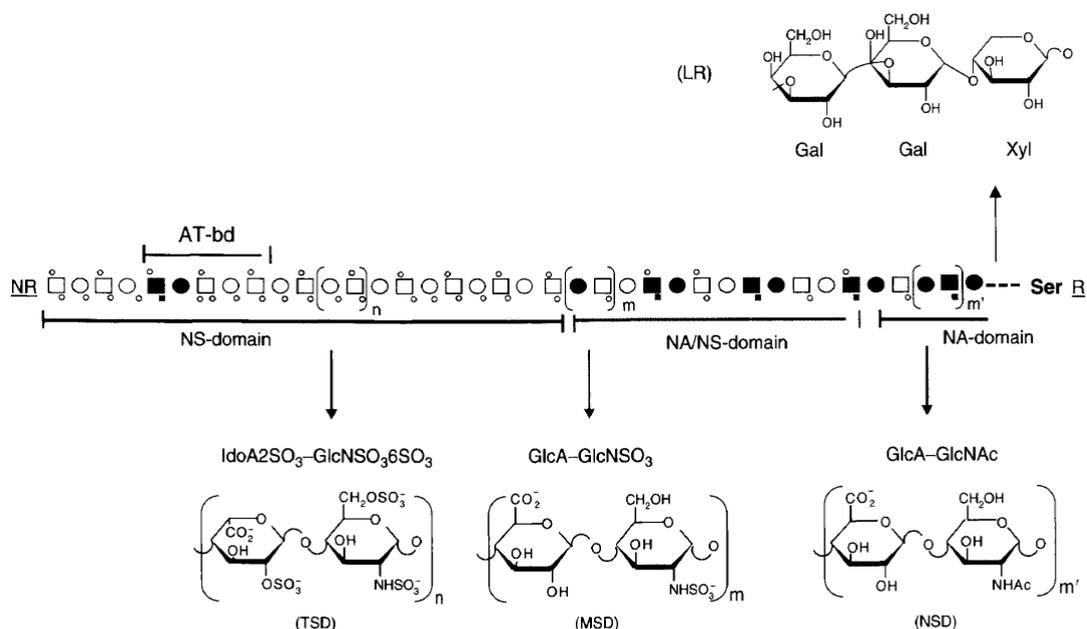


Figura 2.24: Representación ideal de la cadena de heparina donde se representan los dominios N-acetilado (NA), N-sulfatado (NS) y el dominio mixto (NA/NS) [119]

2.6. Caracterizaciones y evaluaciones asociadas a los injertos vasculares artificiales

Existen diversas técnicas relacionadas con la caracterización y evaluación de los materiales destinados a la fabricación de injertos vasculares artificiales, así, en las siguientes secciones se hará una breve descripción de algunas de las técnicas con las que se caracterizaron los materiales formulados en el presente proyecto con el fin de evaluar y comparar dichas propiedades con las de un conducto vascular nativo u observar la eficacia de la biofuncionalización.

2.6.1. Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja se usa para identificar la presencia de algunos grupos funcionales en las moléculas según los cambios energéticos que se dan en éstas cuando realizan una transición entre estados vibracionales o rotacionales como se muestra en la Figura 2.25 [120], para ello, esta técnica utiliza energías de radiación con números de onda entre 12800 cm^{-1} y 10 cm^{-1} , sin embargo, el rango más utilizado en la identificación molecular corresponde al que va desde 4000 hasta 670 cm^{-1} y, dependiendo del grupo funcional específico, se dará un modo vibracional que se podrá observar en su correspondiente número de onda en un espectro IR.

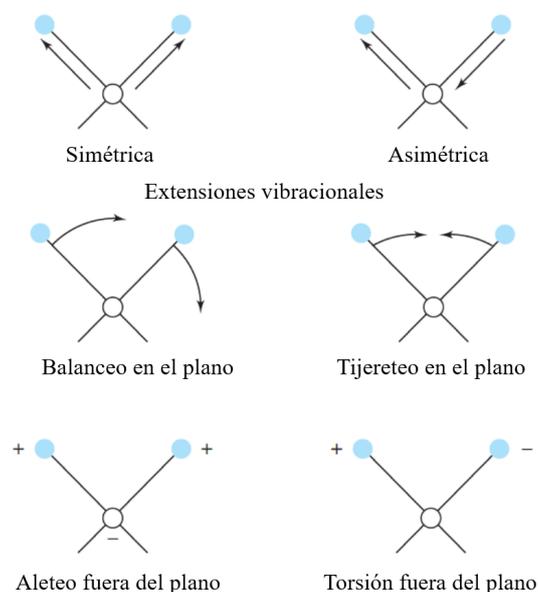


Figura 2.25: Vibraciones moleculares típicas entre pares de átomos, los signos + y - indican movimientos hacia el plano en las dos direcciones perpendiculares al mismo (Imagen adaptada de [120])

Para el caso particular del presente proyecto, esta técnica ha sido utilizada para determinar la configuración estructural de la fibroína extraída, para determinar las interacciones fibroína-PVA-glicerol cuando se prepararon las superficies Fibroína/PVA, y para determinar la formación de nuevos enlaces amida cuando se hace el acople de la heparina sobre la fibroína, por lo tanto, la explicación de cada una de estas caracterizaciones se hará en el capítulo correspondiente al estudio en cuestión.

2.6.2. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido hace parte de las técnicas de obtención de imágenes de alta resolución que utilizan electrones en lugar de luz, para este propósito, dichos electrones son producidos desde fuentes como filamentos de tungsteno, LaB_6 , emisores Schottky, entre otras, además, para la detección de las imágenes, se utilizan lentes magnéticos axialmente simétricos. Esta técnica de microscopía es ampliamente utilizada en la ciencia para la observación superficial de diferentes tipos de materiales o tejidos biológicos, en el caso particular del presente proyecto, esta técnica fue utilizada para la observación de la morfología de las superficies a base de fibroína.

2.6.3. Análisis termogravimétrico

Los análisis termogravimétricos se usan comúnmente para estudiar los cambios de peso de una muestra dada como función de la temperatura en una atmósfera controlada, este tipo de análisis puede dar información cuantitativa relevante de las temperaturas de descomposición, oxidación, vaporización, sublimación y desorción de diferentes tipos de muestras [120]. Un equipo tradicional de análisis termogravimétrico está compuesto por una microbalanza para medir la masa en función del tiempo o la temperatura, un horno, un sistema de purga de gas inerte o reactivo según la necesidad del análisis, y un sistema de control por computador, finalmente, luego del análisis, se obtiene un resultado similar al que se ejemplifica en la Figura 2.26b, en la cual se observa la cuantificación total de volátiles y carbono total en una muestra de ejemplo. En el caso del presente proyecto, dicha técnica fue usada para estudiar la descomposición de la fibroína como función de la temperatura y la descomposición de las muestras biofuncionalizadas para la verificación de las mismas.

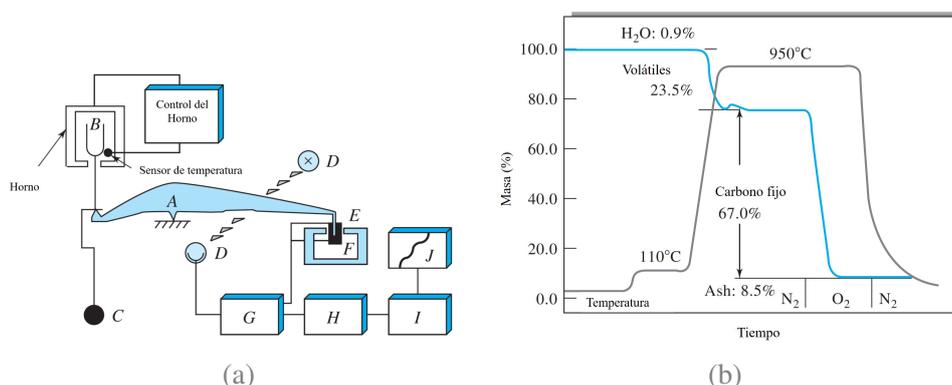


Figura 2.26: Esquema de los componentes de un TGA y ejemplo de un análisis termogravimétrico (Imagen adaptada de [120])

2.6.4. Ensayos de tracción

Los ensayos de tracción son un tipo de prueba mecánica que se realiza con el fin de monitorear como un material se deforma en función de una fuerza aplicada a una velocidad de deformación constante [121], para ello, se considera una barra de cualquier material como se muestra en la Figura 2.27, así, cuando se aplica un fuerza sobre este material, el esfuerzo aplicado estará dado por la Ecuación 2.1:

$$E(MPa) = \frac{F(N)}{A(mm^2)} \quad (2.1)$$

Donde:

- F : Fuerza normal aplicada
- A : Área transversal de la barra

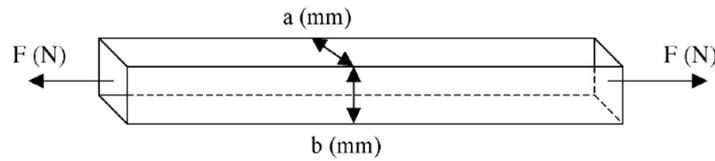


Figura 2.27: Esfuerzo de tensión generado en una barra rectangular (Imagen tomada de [121])

De este modo, la deformación dl generada en una barra de longitud l_0 al aplicar un esfuerzo E estará dada por la ecuación 2.2 como se muestra en la Figura 2.28:

$$S = \frac{dl}{l_0} \quad (2.2)$$

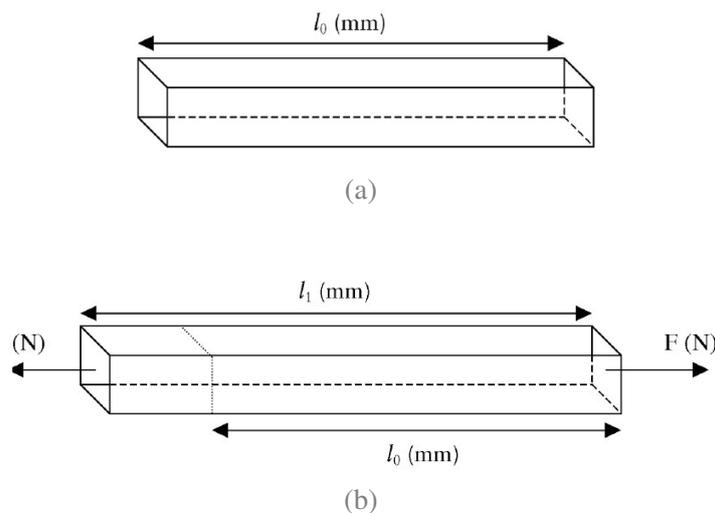


Figura 2.28: Barra rectangular antes y después de aplicar un esfuerzo de deformación (Imagen tomada de [121])

En el caso de los polímeros, existen varios parámetros que pueden afectar el comportamiento mecánico del material como la cristalinidad, grado de entrecruzamiento, la orientación de las cadenas poliméricas, entre otros [122], por lo tanto, la clasificación de cada polímero dependerá del balance que haya entre estos factores y su comportamiento podrá ser como se muestra en la Figura 2.29, en la que se ilustra el comportamiento típico de un material sometido a un esfuerzo constante, y donde se identifican las respuestas clásicas de dicho material, es decir, el modulo elástico, el cual da idea de la rigidez del polímero, y corresponde a la pendiente de toda la primera zona lineal de una curva esfuerzo vs deformación, el límite elástico, el cual es el valor de esfuerzo máximo en el cual se cumple la linealidad mencionada, y da una

idea del máximo esfuerzo que se puede aplicar a un material sin que éste tenga deformaciones plásticas, la resistencia a la tracción, el cual es el valor de esfuerzo al cual el material comienza a deformarse de forma permanente, la elongación en la ruptura o falla, que es el porcentaje máximo de estiramiento del material antes de su ruptura, y el esfuerzo de ruptura, el cual corresponde al valor de esfuerzo en el máximo porcentaje de elongación [121–124]. En el caso del presente proyecto, estos ensayos se utilizaron para caracterizar el módulo elástico, límite elástico, resistencia a la tracción y la elongación en la ruptura de todos los materiales formulados.

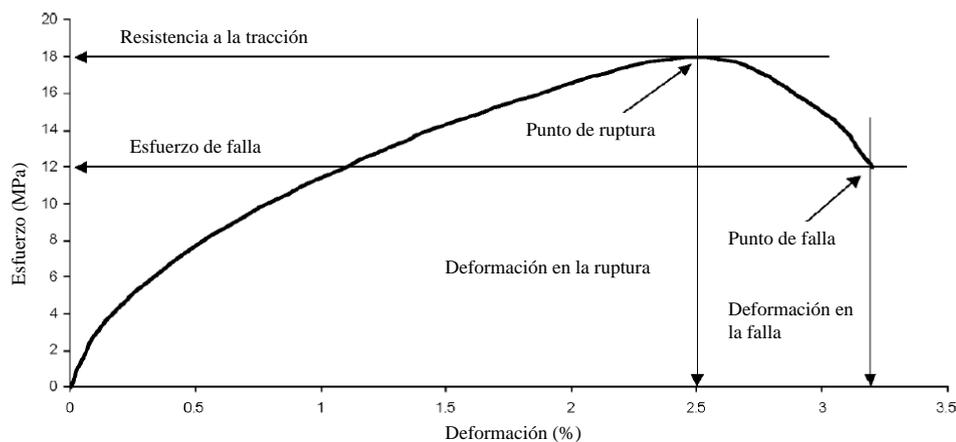


Figura 2.29: Curva típica esfuerzo vs deformación (Imagen adaptada de [121])

2.6.5. Ángulo de contacto

La humectabilidad es una propiedad superficial de los materiales que afecta las respuestas biológicas de estos cuando son implantados, y se ha encontrado en diversos estudios que las superficies hidrofílicas tienden a mejorar las primeras etapas de la adhesión, proliferación y diferenciación de diferentes tipos de células en comparación con las superficies hidrofóbicas [111, 125–129], de este modo, caracterizar esta propiedad superficial es indispensable en todos los materiales destinados al contacto con el cuerpo, lo que se hace a través de la medición del ángulo de contacto (θ), el cual se define como el ángulo que se forma en el lugar donde se unen tres fases [130], por ejemplo, en la unión sólido-líquido-gas como se muestra en la Figura 2.30, en la cual se observa que esta propiedad depende también de la tensión superficial (γ) del líquido que está en contacto con el material, propiedad que puede entenderse como una fuerza perpendicular a la superficie de un líquido y que apunta hacia el interior del mismo con el fin reducir el área de la interfaz de éste, así, cuando se hace el balance de fuerzas interfaciales sólido-gas (γ^{SG}), sólido-líquido (γ^{SL}) y líquido-gas (γ^{LG}), se puede obtener el ángulo de

contacto de un líquido respecto a un sólido según la ecuación de Young como se muestra en la Figura 2.30 [131].

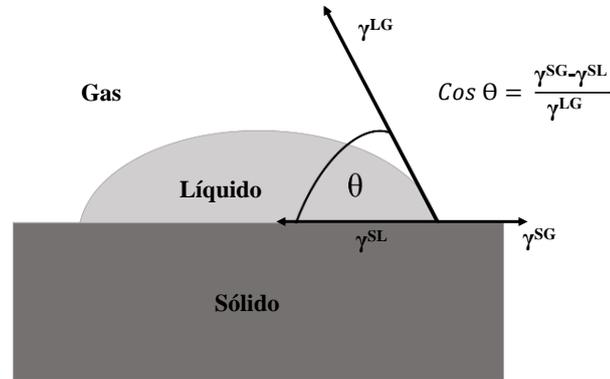


Figura 2.30: Ecuación de Young para la determinación del ángulo de contacto (Imagen adaptada de [131])

Existen diversas formas de medir el ángulo de contacto, ya sea de forma directa utilizando equipos ópticos que calculan esta propiedad a través de la ecuación de Young, o de forma indirecta a través de medidas de la fuerza de tensión superficial según la ecuación de Laplace utilizando el plato de Wilhelmy [130], siendo el primer método ventajoso para sistemas biológicos ya que éste permite depositar gotas del líquido de interés (agua, plasma sanguíneo, soluciones, etc.) directamente sobre la superficie del tejido o biomaterial que se está estudiando, obteniéndose así una aproximación más real del sistema, de este modo, la medida de mojabilidad dependerá del ángulo θ que se forme entre el líquido y el sólido como se muestra en la Figura 2.31, en donde se observa una superficie altamente hidrofílica (Figura 2.31a), donde la gota de líquido se esparce totalmente sobre el sólido, una superficie parcialmente hidrofílica (Figura 2.31b), donde el esparcimiento de la gota de líquido sobre el sólido es limitada, y una superficie hidrofóbica, donde la gota no se esparcirá sobre la superficie del sólido, o lo hará muy poco (Figura 2.31c), así, a pesar de existir algunas diferencias en la comunidad científica acerca de esta definición, la mayoría de autores definen la mojabilidad de un sistema en base al ángulo θ de la siguiente manera [131]:

1. Si $\theta = 0$, el líquido moja completamente la superficie del sólido.
2. Si $0 < \theta \leq 30$, el líquido moja la superficie del sólido.
3. Si $30 < \theta \leq 89$, el líquido moja parcialmente el sólido.
4. Si $\theta \geq 90$, el líquido no moja la superficie del sólido.

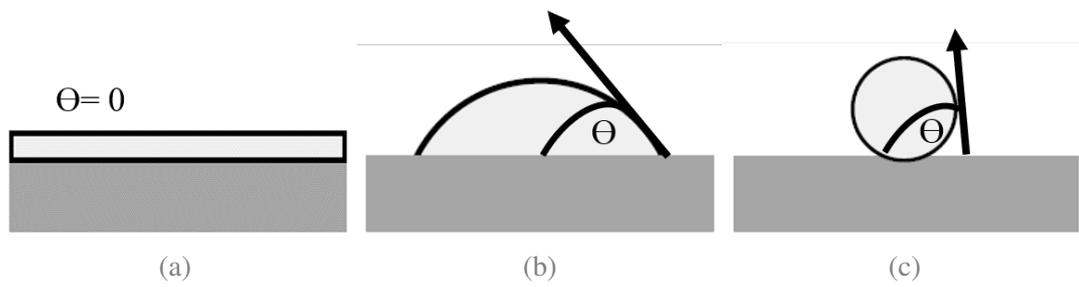


Figura 2.31: Modelo de una gota de líquido sobre una superficie solida [131]

Capítulo 3

Obtención y Caracterización de Fibroína

3.1. Introducción

La fibroína es una proteína secretada por varias especies de gusanos de seda conocidas como *Bombyx Mori* para fabricar sus capullos, en este proceso, el gusano de seda produce dicha proteína desde su glándula posterior y, paralelo a esto, esta especie produce sericina desde su glándulas media y anterior. En el capullo, la fibroína es el principal constituyente, equivalente a un porcentaje entre 70-80 %, el resto de la masa del capullo, corresponde a la sericina, la cual funciona como adhesivo en el capullo y mantiene unida toda su estructura [89].

Como material, la fibroína tiene diversas aplicaciones, las cuales pueden abarcar desde la industria textil [132, 133] hasta las aplicaciones biomedicas [17, 66, 134], en las cuales se aprovechan las propiedades mecánicas y biocompatibilidad mencionados en la sección 2.5.1.1.1 para la construcción de plataformas de crecimiento celular, ingeniería de tejidos, liberadores de medicamentos y materiales para el contacto con la sangre [19].

En el presente capítulo, se mostrará el procedimiento que se siguió para la optimización del proceso de extracción de la fibroína de los capullos del gusano de seda, la cual se realizó utilizando soluciones de $\text{Na}_2\text{CO}_3(ac)$ a diferentes temperaturas y tiempos, de este modo, en el diseño experimental planteado, se estudió como afectan los factores experimentales utilizados el porcentaje de seda extraída de los capullos.

3.2. Metodología

3.2.1. Preparación de las muestras y proceso de extracción

Los capullos de gusano de seda *Bombyx Mori* utilizados en este proyecto fueron adquiridos en la Corporación Para el Desarrollo de la Sericultura del Cauca (CORSEDA), estos, previo a su tratamiento se ven como se muestra en la Figura 3.1.



Figura 3.1: Capullos del gusano de seda *Bombyx Mori* proporcionados por CORSEDA (Fotografía propia)

Estos capullos están compuestos principalmente por las proteínas fibroína y sericina, siendo la primera una seda bastante resistente que forma la barrera del capullo, y la segunda la encargada de mantener adherida la fibroína para formar una estructura estable [19, 86]. La separación de estas proteínas del capullo se hace normalmente en un medio levemente básico, y se conoce como desgomado, como se observa en la Figura 3.2, donde se muestra el procedimiento que se siguió para realizar la extracción de fibroína. Primero, los capullos fueron cortados en fragmentos de aproximadamente 5 mm², posteriormente, estos fragmentos fueron tratados con una solución 0.01 M de Na₂CO_{3(ac)} de tal forma que se mantuvo la relación Na₂CO₃/Capullos (m/m) entre 0.2 y 0.4, la temperatura entre 60 °C y 80 °C, y los tiempos de extracción entre 3 y 6 horas, finalmente, la fibroína desgomada se separó manualmente de la solución de sericina, se lavó con abundante agua destilada y se secó en estufa durante 24 horas a 30°C, una vez terminado este proceso, la fibroína se pesó y se reportó como porcentaje en masa respecto a la

masa inicial de capullos.

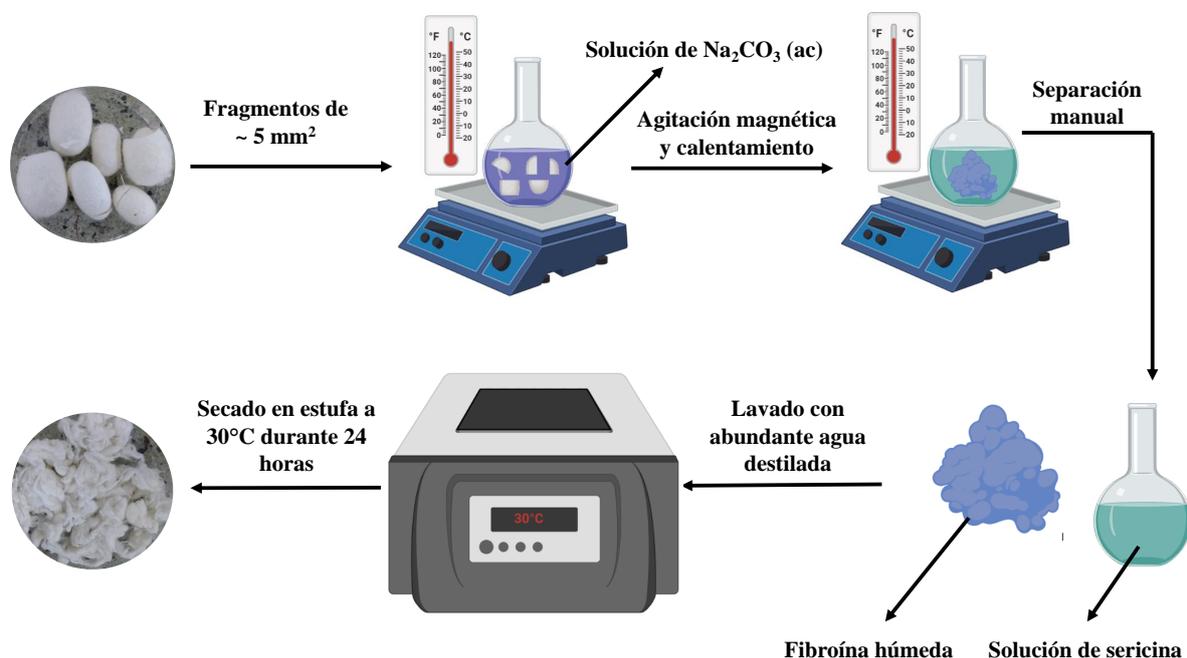


Figura 3.2: Diagrama esquemático para el proceso de desgomado, separación y secado de la fibroína (Ilustración propia)

3.2.2. Diseño experimental para la optimización del proceso de extracción

Para optimizar el proceso de desgomado descrito anteriormente, se planteó un diseño factorial 2³ con dos puntos centrales, el cual se utilizó con el fin de determinar los factores que influyen en el proceso de extracción [135–137], así, para el caso de estudio, los factores trabajados fueron: Temperatura, relación Na₂CO₃/Capullos y tiempo de extracción, y la variable de respuesta estudiada fue el porcentaje de fibroína extraída.

El diseño experimental completo y los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando el software Statgraphics Centurion 17[®], los factores trabajados y sus respectivos niveles se muestran en la Tabla 3.1. Para este estudio de optimización, cada combinación de factores y niveles fue realizada 3 veces, y cada punto central fue realizado 2 veces por bloque, como resultado, el diseño experimental completo fue de 30 corridos, además, el diseño experimental fue aleatorizado para evitar sesgo estadístico. La significancia de los factores fue estudiada mediante análisis de varianza (ANOVA), de este modo, los factores con un valor **p** menor a 0.05 tuvieron significancia estadística sobre el porcentaje de fibroína extraída con un 95 % de confianza [138], finalmente, para la validación de cada análisis de varianza se realizaron las siguientes pruebas de verificación para los supuestos de dicho modelo [135, 138]:

1. Distribución normal de los residuales de los datos, para ello se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, cuyas hipótesis son:
 - H_0 : Los residuales proceden de una distribución normal.
 - H_1 : Los residuales no proceden de una distribución normal.

2. Homoscedasticidad de las varianzas entre poblaciones, para ello se usó la prueba de Bartlett, cuyas hipótesis son:
 - H_0 : Las varianzas de las poblaciones son iguales.
 - H_1 : Al menos dos varianzas entre las poblaciones son distintas.

3. Independencia de los residuales, para ello se hizo la prueba de Durbin-Watson, cuyas hipótesis son:
 - H_0 : La correlación entre los residuales del modelo es cero. Son independientes.
 - H_1 : Al menos un par de residuales son dependientes entre si.

Factores	Niveles		
A: Temperatura (°C)	60	80	70
B: Na ₂ CO ₃ /Capullos (g/g)	0.2	0.4	0.3
C: Tiempo de extracción (h)	3	6	4.5

Tabla 3.1: Diseño experimental para la optimización del proceso de extracción de fibroína donde se reconocen el nivel mínimo, máximo, y el punto central respectivamente de cada uno de los factores

3.2.3. Caracterización de la fibroína extraída

La fibroína obtenida bajo las mejores condiciones observadas en la sección anterior fue cortada en pequeños fragmentos y separada para realizar las siguientes caracterizaciones:

3.2.3.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis estructural, presencia de grupos funcionales y configuración de la fibroína extraída se realizó mediante espectroscopía infrarroja utilizando un equipo **SHIMATZU IR-TRACER 100**, para este propósito, se barrió el rango espectral entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} durante 24 ciclos.

3.2.3.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis de pérdida de masa de la fibroína extraída fue realizado utilizando un equipo **TGA Q500** de **TA Instruments** en atmósfera de nitrógeno a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. El barrido completo se realizó en el rango de temperatura entre 25°C y 900°C.

3.3. Resultados y discusión

Al final de cada proceso de extracción, lavado y secado de fibroína, ésta adquirió la apariencia mostrada en la Figura 3.3, una vez esto, se cuantificó la masa de fibroína obtenida y se calculó el porcentaje en masa respecto al peso inicial de los capullos según la Ecuación 3.1, finalmente, los resultados obtenidos en cada una de las condiciones del diseño experimental se utilizó para el análisis estadístico del proceso de extracción.

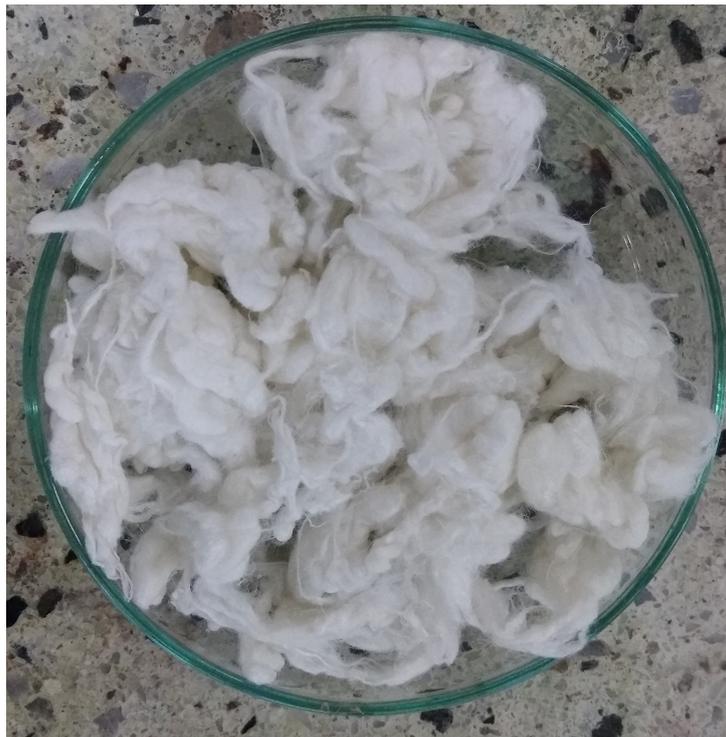


Figura 3.3: Fibroína luego del proceso de extracción, lavado y secado (Fotografía propia)

$$\mathbf{Fib_E}(\%) = \left[\frac{m(\mathbf{Fib_E})}{m(\mathbf{Cap})} \right] * 100\% \quad (3.1)$$

Donde:

- Fib_E : Porcentaje de fibroína extraída.
- $m(\text{Fib}_E)$: Masa de fibroína extraída en gramos.
- $m(\text{Cap})$: Masa inicial de capullos en gramos.

3.3.1. Análisis estadístico del proceso de extracción

La separación, y posterior extracción de fibroína trabajada en este diseño experimental, aprovecha la composición de las proteínas que forman el capullo del gusano de seda, la cual se ha reportado que tiene aproximadamente alrededor de 72–81 % de fibroína, y 19–28 % de sericina [89]. La sericina, debido a su composición de amino ácidos altamente polares (serina, treonina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico y glutamina) [139, 140] es una proteína que permite su disolución en medios acuosos levemente básicos, así como también a temperaturas entre 50 °C y 60 °C [141]. La fibroína, por otra parte, está compuesta principalmente por glicina y alanina [19], los cuales son aminoácidos poco polares, lo que hace que esta proteína sea altamente hidrofóbica, por lo tanto, cuando el capullo del gusano de seda se somete a un tratamiento básico a temperaturas superiores a 50 °C, se obtendrá una madeja de fibroína que puede ser separada fácilmente de la solución resultante de sericina.

Los resultados del diseño experimental planteado en la Tabla 3.1 se encuentran documentados en la Tabla 3.2, sin embargo, para analizar los mismos, la variable de respuesta tuvo que ser transformada a una distribución normal, lo anterior, aunque no es un requisito fundamental para realizar un análisis de varianza (ANOVA) [142], se hizo debido a que los supuestos mencionados en la Sección 3.2.2 sí son un requisito obligatorio para que el ANOVA tenga validez [135, 138], por lo tanto, dado que utilizando los datos obtenidos directamente del diseño experimental no se cumplían los supuestos del ANOVA, se procedió a realizar una transformada de potencia sobre estos, de este modo, una vez hecha la transformación, se corroboró la normalidad de los datos transformados con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, obteniéndose un valor $P = 0.15811$, que permite aceptar la hipótesis nula de dicha prueba con un 95 % de confianza¹.

Los valores correspondientes a la transformación de potencia se muestran en la última columna de la Tabla 3.2, el modelo matemático que maximiza el porcentaje de fibroína extraída con un valor de ajuste de $R^2 = 86.87 \pm 5.9\%$ se muestra en la Ecuación 3.2, y el análisis de varianza de los datos transformados se muestra en la Tabla 3.3, finalmente, las pruebas estadísticas que validan los supuestos de dicho análisis se encuentran en la última parte de esta tabla.

$$\text{Fib}_{EN}(UT) = -187.58 + 3.31T - 193.85R_{NC} + 40.62t_i + 2.33TR_{NC} - 0.51Tt_i + 43.61R_{NC}t_i - 0.53TR_{NC}t_i \quad (3.2)$$

¹Ho: Los valores provienen de una distribución normal

Donde:

- **Fib_{EN}**: Datos transformados del porcentaje de fibroína extraída.
- **T**: Temperatura en °C.
- **t_i**: Tiempo en horas.
- **R_{NC}**: Relación Na₂CO₃/Capullos (g/g)
- **UT**: Unidades de transformación, equivalentes a $\% * (C + h + C * h)$

Temperatura (°C)	Na ₂ CO ₃ /Capullos (g/g)	Tiempo de extracción (h)	Fibroína extraída (%)	Datos transformados (UT)
60	0.2	3.0	35.233 ± 6.571	2.074 ± 0.831
60	0.2	6.0	72.286 ± 3.732	27.344 ± 6.238
60	0.4	3.0	31.479 ± 8.222	1.717 ± 0.708
60	0.4	6.0	75.540 ± 5.568	33.670 ± 10.944
80	0.2	3.0	73.796 ± 0.791	29.682 ± 1.422
80	0.2	6.0	73.852 ± 3.671	30.068 ± 6.631
80	0.4	3.0	72.990 ± 0.376	28.251 ± 0.650
80	0.4	6.0	73.668 ± 4.511	29.887 ± 8.084
70	0.3	4.5	74.320 ± 2.382	30.818 ± 4.539

Tabla 3.2: Porcentaje de fibroína extraída según el diseño experimental mostrado en la Tabla 3.1 y los datos transformados a una distribución normal

Basado en los resultados de la suma de cuadrados (*SS*) y los valores *P* de la tabla ANOVA, se concluye que la temperatura (*P*= 0.0009), el tiempo de extracción (*P*= 0.0004) y la interacción entre estas dos variables (*P*= 0.0007), tienen significancia estadística en el porcentaje de fibroína extraída, lo anterior, junto a los resultados mostrados en la Figura 3.4 indican que para los niveles seleccionados en este diseño experimental, se pueden obtener porcentajes de extracción de fibroína superiores a un 69 % independiente de la relación Na₂CO₃/Capullos que se trabaje, siempre y cuando, los valores de temperatura y tiempo de extracción se elijan de tal forma que la relación de estas variables esté en las zonas amarilla, naranja y roja que se observan en la Figura 3.4, donde se muestra además los valores de porcentaje en cada franja de la Figura 3.4b.

Estos resultados permiten concluir que en los niveles escogidos para el diseño experimental planteado en la Tabla 3.1, todas las relaciones Na₂CO₃/Capullos serán suficientes para solubilizar la sericina presente en los capullos, pero dado que este proceso requiere mantener los capullos en constante reacción con esta solución, a unas temperaturas dadas, la mejor forma de obtener los mejores rendimientos, según la Figura 3.4b será en toda la franja roja de ésta, donde se muestra que se puede mantener un porcentaje de extracción entre 74 y 76 % manteniendo la temperatura constante durante tiempos superiores a 5.5 horas, así, según el modelo obtenido

Fibroína extraída (%)	Suma de cuadrados (SS)	Estadístico F	Valor P
A:Temperatura	704.442	20.18	0.0009
B:Na ₂ CO ₃ /Capullos	4.74566	0.14	0.7193
C:Tiempo	877.518	25.14	0.0004
AB	14.3634	0.41	0.5343
AC	761.775	21.82	0.0007
BC	15.7291	0.45	0.5159
ABC	7.378	0.21	0.6546
Bloque	153.346	4.39	0.06
Error total	383.95		
Total corregido	2923.25		
Supuestos ANOVA	Prueba estadística		
Normalidad de residuos	Kolmogorov-Smirnov		0.6524
Varianza de poblaciones	Bartlett		0.2530
Independencia de residuos	Durbin-Watson		0.0712

Tabla 3.3: Tabla ANOVA para el diseño de optimización de extracción de fibroína

en la Ecuación 3.2, los valores predichos para maximizar el porcentaje de fibroína extraída serán los mostrados en la Tabla 3.4, por lo tanto, el valor máximo posible de porcentaje que se puede lograr extraer de los capullos del gusano de seda bajo esta metodología será 76.88 %, así, sabiendo que en el capullo la fibroína representa entre 72–81 % de la masa del mismo [89], se puede concluir que el proceso de optimización fue exitoso.

Factor	Nivel		
	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura (°C)	60	80	60
Na ₂ CO ₃ /Capullos (g/g)	0.2	0.4	0.4
Tiempo (h)	3	6	6

Tabla 3.4: Relación de factores óptima para maximizar la extracción de fibroína desde el capullo de gusano de seda

Finalmente, con el fin de verificar la validez del modelo mostrado en la Ecuación 3.2, para la cual se calculó que la combinación de factores óptima que maximizan el proceso de extracción son las mostradas en la Tabla 3.4, se realizaron tres replicas independientes utilizando estos valores, obteniéndose un valor promedio de fibroína extraída de 74.76 ± 4.16 %, lo que indica un grado de ajuste apropiado con el modelo obtenido y demuestra la validación del mismo.

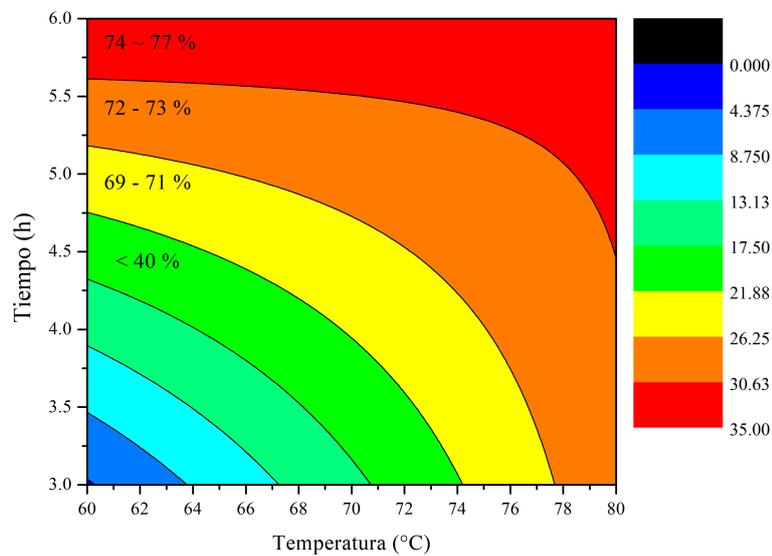
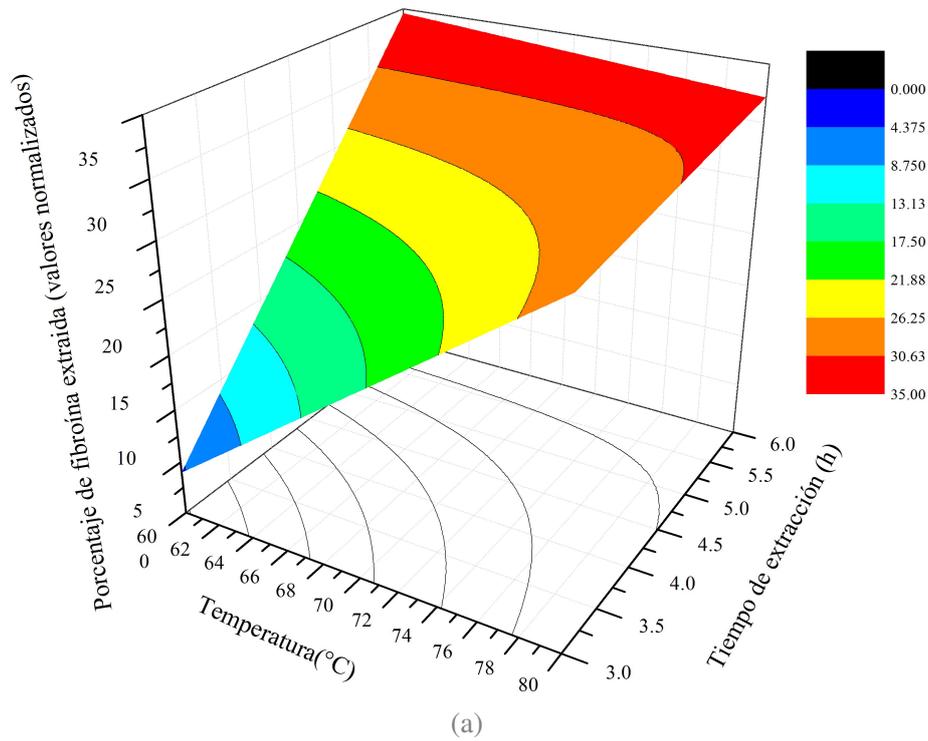


Figura 3.4: Respuesta para la extracción de fibroína, (a): Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el porcentaje de fibroína extraída a un valor constante de relación $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{capullos} = 0.4$, (b): Contorno del efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el porcentaje de fibroína extraída a un valor constante de relación $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{capullos} = 0.4$

3.3.2. Caracterización de la fibroína extraída

La fibroína obtenida bajo las mejores condiciones encontradas en la sección anterior, fue cortada en pequeños fragmentos con el fin de realizar las siguientes caracterizaciones:

3.3.2.1. Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier

El la Figura 3.5 se presenta el espectro IR de la fibroína extraída bajo las mejores condiciones de la sección anterior, dicho espectro fue analizado en el rango de 1800 cm^{-1} hasta 500 cm^{-1} debido a que en esta región se puede observar la presencia de las bandas principales que identifican la configuración estructural de esta proteína [143].

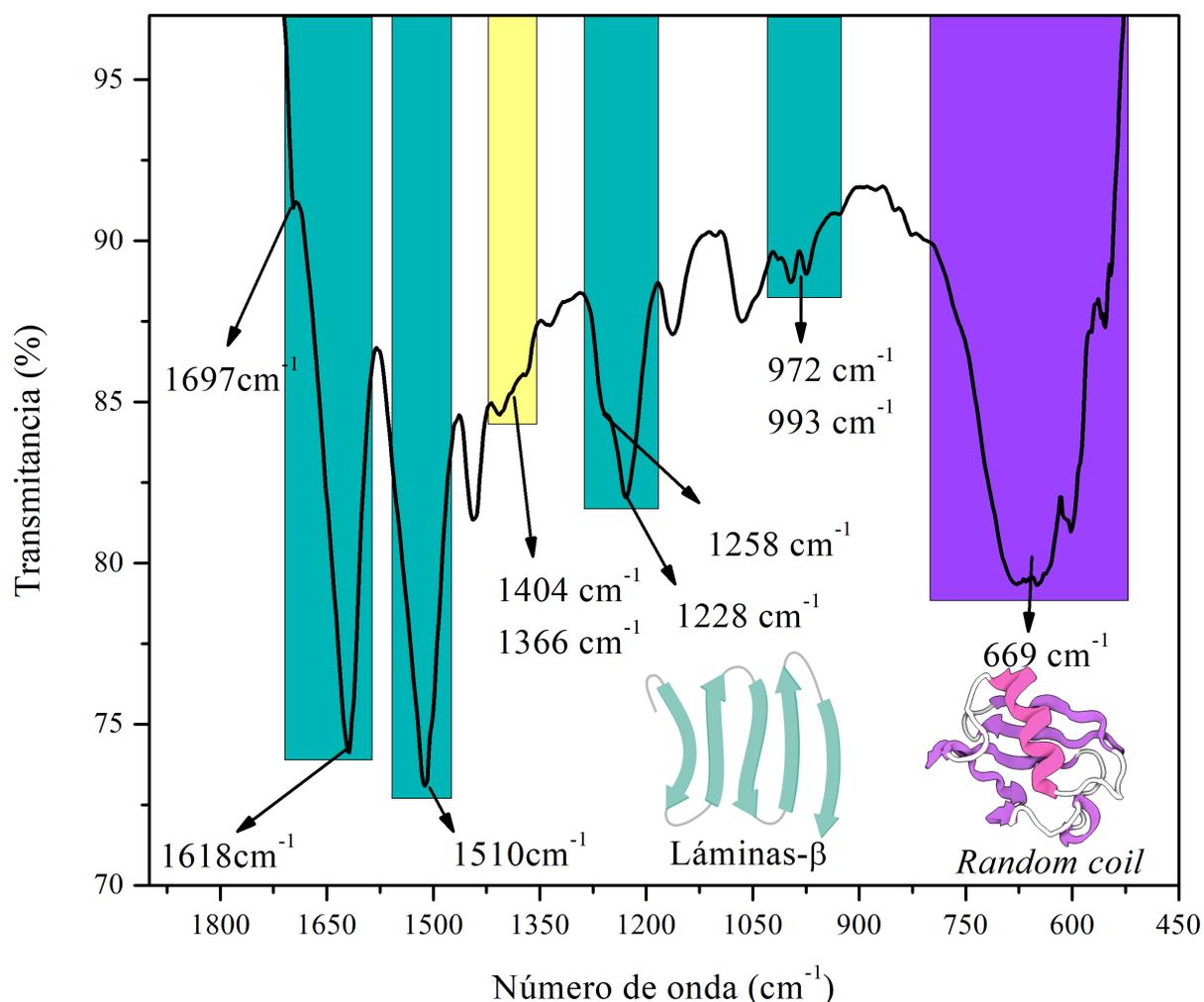


Figura 3.5: Espectro IR de la fibroína extraída, se distinguen en verde (■) las bandas de las amidas I, II y III de la configuración de láminas $-\beta$, en morado (■) la banda característica de la configuración *Random coil* de la fibroína y en amarillo (■) la banda característica de serina presente en los residuos de sericina

La secuencia de aminoácidos presentes en la fibroína puede organizarse en tres estructuras principales conocidas como seda I, seda II y seda III. La seda I corresponde a la fibroína en su estado natural, es decir, en el capullo, la seda II corresponde a la fibroína en seda hilada por el gusano de seda, y la seda III corresponde a la estructura que adquiere la fibroína en solución, conocida como fibroína regenerada [144], además de éstas, la fibroína puede organizarse en tres estructuras secundarias: aleatoria, estructura α y estructura β [87], de este modo, con el fin de determinar las diferentes configuraciones del producto extraído, se analizaron las bandas vibracionales de las amidas presentes en esta proteína, las cuales se utilizan normalmente en la identificación de dichas configuraciones moleculares [145].

En el espectro IR mostrado en la Figura 3.5, se observa que las bandas más intensas corresponden a las señales de 1618 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} , 1228 cm^{-1} y 669 cm^{-1} , de éstas, las tres primeras corresponden respectivamente a las vibraciones tradicionales de las amidas I, II y III de la estructura de la fibroína [146], que son la clave para identificar la configuración de láminas $-\beta$ que da a la fibroína su resistencia mecánica, y la última, corresponde a la torsión del grupo $-\text{OCN}$ que se da en la configuración conocida como *random coil*, la cual se presenta de forma natural en la fibroína hilada [144]. En la región de la amida I, la banda de 1618 cm^{-1} indica que las amidas presentes en cadenas adyacentes están vibrando en fase como se esquematiza en la Figura 3.6a, además de esto, esta banda está acompañada de una pequeña señal en 1697 cm^{-1} , la cual se explica debido a que las amidas presentes en la misma cadena no vibran en fase como se esquematiza en la Figura 3.6b, lo que es una característica común en la configuración de láminas $-\beta$ antiparalelas de la estructura proteica de la fibroína, por lo tanto, se deduce que dicha configuración prima sobre otras configuraciones [147], finalmente, la ausencia de una banda en los alrededores de 1649 cm^{-1} indica que la fibroína extraída no presenta estructuras secundarias tipo hélice [146].

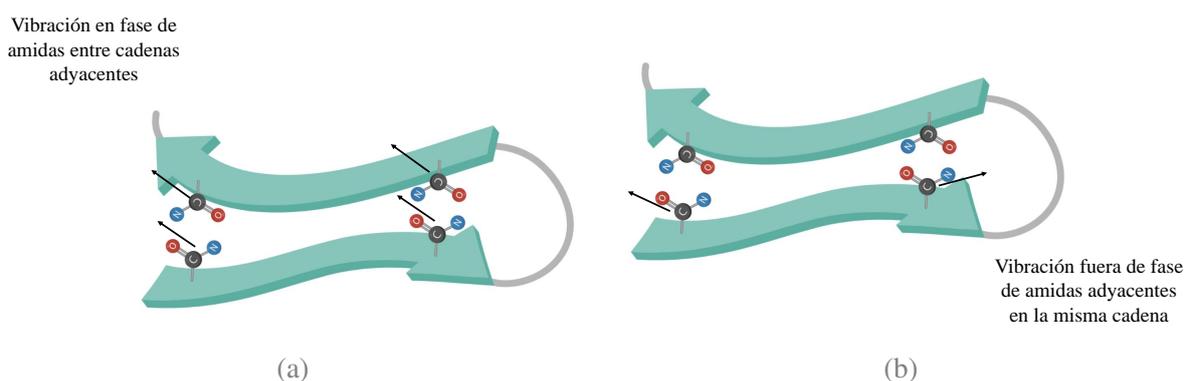


Figura 3.6: Esquema de vibración de amidas en la cadena de fibroína, se distinguen la vibración en fase entre amidas de cadenas adyacentes (a), y la vibración fuera de fase entre amidas adyacentes de la misma cadena (b) (Ilustración propia)

La zona correspondiente a la amida II de la estructura de la fibroína se caracteriza también por los modos acoplados entre láminas $-\beta$, en particular, la banda característica de esta zona corresponde a la señal en 1510 cm^{-1} , la cual es típica de la extensión C-C de los residuos

de tirosina presentes en la cadena de fibroína [148], la zona correspondiente a la amida III se caracteriza por las bandas de 1258 cm^{-1} y 1228 cm^{-1} , la primera, debido a la conformación de láminas $-\beta$, y la segunda, relacionada con estructuras secundarias como las láminas $-\alpha$, la cual se caracteriza por la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo y amino de los enlaces peptídicos, lo que explica que esta banda sea levemente más intensa que la primera [146–152]. Finalmente, las bandas mostradas a 972 cm^{-1} y 993 cm^{-1} corresponden al balanceo CH_2 que se encuentran en las secuencias $(\text{Ala-Gly})_n$ típicas de las conformaciones de láminas $-\beta$ [146, 148].

Por último, dado que la fibroína caracterizada es producto de un proceso de extracción, se espera que luego de dicho proceso queden residuos de sericina, lo cual puede evidenciarse por la presencia de las bandas en 1404 cm^{-1} y 1366 cm^{-1} (en amarillo), las cuales están asociadas al aminoácido serina, el cual está presente en grandes cantidades en la sericina, pero poco en la fibroína [153], de este modo, dada la poca intensidad de esta banda, se concluye que pertenece a la sericina presente en la muestra como residuo del proceso de extracción.

3.3.2.2. Análisis termogravimétrico

La Figura 3.7 muestra el termograma de la fibroína extraída con los mejores parámetros obtenidos del diseño experimental mostrado en la sección 3.2.2, en ésta, se pueden apreciar tres regiones de interés en las que se observan pérdidas de masa a medida que la temperatura del sistema aumenta:

La primera región corresponde al rango de temperatura entre 30°C y 185°C , en el cual se pierde el 4.45 % del peso de la muestra, y que se explica debido a la pérdida de la humedad que queda en la muestra desde el ambiente, o remanentes de agua atrapados entre las fibras luego del proceso de extracción. Las regiones dos y tres corresponden a los rangos de temperatura que van desde 200°C hasta 360°C y 360°C hasta 480°C respectivamente. A diferencia de la primera, la región dos se caracteriza por un cambio abrupto de peso, el cual encuentra su punto de inflexión aproximadamente a 314.6°C , posterior al cual comienza la tercera etapa de descomposición, que encuentra estabilidad aproximadamente a 500°C . Las etapas dos y tres, están relacionadas con el proceso de degradación de la proteína, la cual, según varios estudios se da en dos etapas diferentes, relacionadas con la degradación de la cadena molecular de la proteína y posterior descomposición de los aminoácidos presentes en la misma [91, 154], proceso en el cual la muestra pierde aproximadamente el 45.7 % y 11.3 % de su masa respectivamente para cada descomposición, dejando al final un residuo de 24.1 %.

Finalmente, como se mencionó en el análisis de IR, la fibroína extraída contiene algunos residuos de sericina, los cuales se pueden evidenciar en la tercera región del termograma presentado. Esta región ha sido estudiada recientemente [155], y los autores reportan un porcentaje de pérdida de masa entre 400°C y 500°C , lo cual concuerda con los datos reportados en el presente trabajo, por lo tanto, se puede concluir que en esta etapa también se presentó un cambio de masa debido a la descomposición de la sericina presente como residuo del proceso

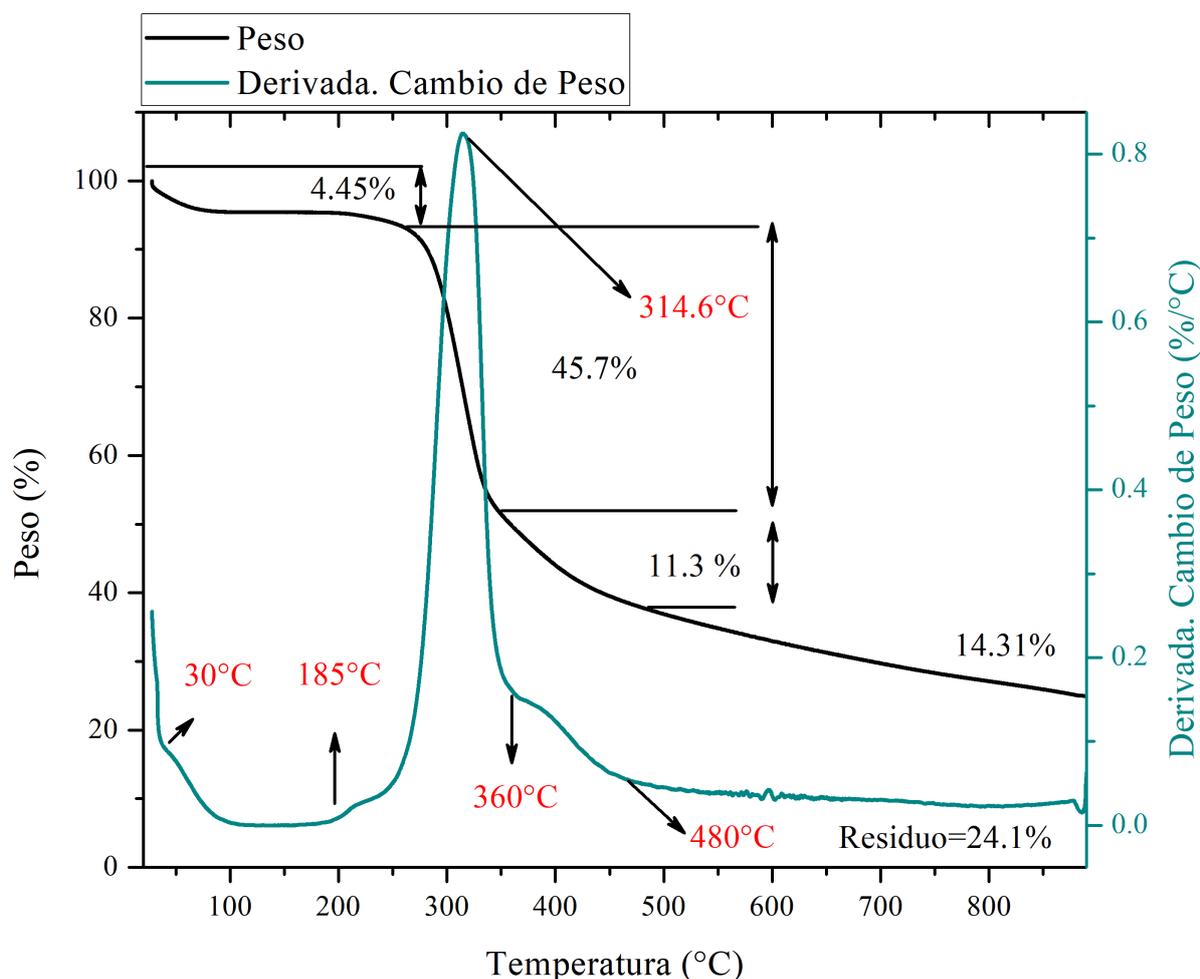


Figura 3.7: Termograma para la muestra de fibroína extraída: (—) Peso (%), (—) Cambio de peso (%/°C)

de extracción.

3.3.3. Conclusiones

El proceso de obtención de fibroína a partir del capullo de gusano de seda *Bombyx Mori* se realizó de forma exitosa siguiendo un diseño experimental 2^3 con dos puntos centrales en cual se estudiaron como factores del proceso de extracción las variables: Temperatura, relación $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{Capullos}$ y tiempo de extracción en los niveles mostrados en la tabla 3.1, de éste, se pueden realizar las siguientes conclusiones:

- De acuerdo con los resultados de la Tabla 3.3, los únicos factores que afectan el rendimiento de la extracción de fibroína en los niveles trabajados son la temperatura ($P=0.0112$), el tiempo de extracción ($P=0.0090$) y la interacción entre estos dos factores ($P=$

0.0103), razón por la cual, cualquier valor para la relación $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{Capullos}$ podrá ser trabajado sin alterar el rendimiento de la extracción.

- Los resultados del modelo estadístico explican el 86.61 % de los resultados experimentales, razón por la cual, los parámetros optimizados se pueden trabajar con una confianza del 95 % según la prueba estadística de falta de ajuste ($P=0.1883$).
- El análisis por Espectroscopía IR muestra que el extracto de fibroína posee mayoritariamente configuración de láminas $-\beta$, sin embargo, parte de dicha proteína se encuentra en una configuración de *Random coil*, la cual, puede ser transformada por procesos químicos o físicos según sea la necesidad.
- El espectro IR del extracto muestra que parte de la sericina del proceso de extracción quedó en la fibroína extraída, estos resultados fueron confirmados por las descomposiciones superiores a 400°C mostradas en el termograma y corroborados según la literatura.
- El termograma de la muestra extraída es razonable con otros encontrados en la literatura, y muestran en su totalidad la descomposición de la fibroína con el aumento de temperatura.

Capítulo 4

Fabricación de superficies a base de fibroína

4.1. Introducción

Para que un material sea apto para ser usado en la fabricación de injertos cardiovasculares, éste debe tener algunas características generales que le permitan ser biocompatible mientras mantiene su integridad estructural, la cual está dada por sus propiedades mecánicas [156]. En el caso de los materiales destinados al contacto con la sangre, evitar la coagulación de ésta cuando entra en contacto con dicho material es el principal objetivo a cumplir debido al complejo mecanismo de coagulación que se activa una vez la sangre entra en contacto con estos materiales como se mostró en la sección 2.3.1 [36]. Por otra parte, en términos mecánicos, el material en cuestión debe tener la capacidad de resistir los esfuerzos a los que estarían sometidos los conductos vasculares nativos, es decir, el material a utilizar para la fabricación de un conducto vascular, debe ser apto para resistir los esfuerzos a los que estará sometido dependiendo del tipo concreto de conducto que se desee fabricar [26].

La fibroína, a pesar de tener una excelente resistencia mecánica cuando se utiliza en forma de seda, pierde significativamente sus propiedades mecánicas cuando se trata con soluciones básicas de $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{ac})$ y se solubiliza en sistemas ternarios del tipo $\text{H}_2\text{O}:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}:\text{CaCl}_2$ debido a la alta tasa de descomposición de la fibroína en péptidos bajo estas condiciones [20, 133, 157–160], por esta razón, una manera de mejorar estas propiedades mecánicas consiste en preparar mezclas entre la fibroína y otros polímeros como poli-(éster-uretano) [161], quitosano [162], colágeno [143, 163], poliuretanos [96], poliacrilamida/poliuretano [164] y polivinilalcohol (PVA) [21, 22], entre estos, el PVA resulta especialmente interesante debido a que es biocompatible y biodegradable, sumado a sus buenas propiedades mecánicas, las cuales se explican por los puentes de hidrógeno que se pueden formar gracias los grupos hidroxilo presentes en su estructura, esto, sumado a la posibilidad de mejorar dichas propiedades mecánicas realizando un entrecruzamiento de dichos grupos [82–85, 104, 105, 165], además de

lo anterior, fabricar un material compuesto por una mezcla entre PVA y fibroína solubilizada en sistemas ternarios $H_2O:C_2H_5OH:CaCl_2$ puede ser aprovechado debido a que la ruptura de fibroína en péptidos aumenta el número de grupos amino terminales en su estructura molecular, razón por la cual, dicha proteína tendrá más puntos de anclaje para una posterior biofuncionalización a través de la inmovilización de heparina sobre estos grupos [97, 166].

A pesar de lo anterior, se deben tener en cuenta dos consideraciones generales cuando se preparan materiales basados en mezclas fibroína/PVA en las que se necesita entrecruzar el PVA: la primera consideración se basa en que estas mezclas son termodinámicamente inestables, y tienden a separarse durante el tiempo de preparación del material final [22, 67, 79], por lo tanto, se debe recurrir a la ayuda de un agente externo que ayude a estas fases a permanecer en forma de mezcla homogénea durante dicho proceso, para ello, un plastificante ampliamente utilizado en la formulación de materiales poliméricos, y que ha demostrado ser de gran ayuda en estos casos es el glicerol, ya que puede mejorar la interacción molecular entre la fibroína y el PVA debido a que éste puede inducir la interacción intermolecular por enlaces de hidrógeno entre las cadenas poliméricas de ambas sustancias, y como consecuencia, el material final será homogéneo [20, 167]. Por otra parte, la segunda consideración se basa en la elección del entrecruzante adecuado para el PVA, y para este propósito, existen diversas alternativas como el ácido cítrico, bórax, o aldehídos como el glutaraldehído [83, 85, 165, 168], sin embargo, de estas sustancias se conoce que, a valores de pH bajos, como los del ácido cítrico, se daña la estructura de las biomoléculas [105], por lo tanto, si se usan entrecruzantes ácidos en la formulación del material, se corre el riesgo de desactivar la proteína biofuncionalizada, además, se sabe que el glutaraldehído puede ser citotóxico si se utiliza en concentraciones altas [169, 170], por lo tanto, una alternativa interesante para dar solución a dicho inconveniente, consiste en el tratamiento del material final con ácido L-glutámico, lo que mejora significativamente su bicompatibilidad [171, 172], además, se ha reportado que el uso de glutaraldehído en bajas concentraciones es una herramienta útil para inmovilizar proteínas sobre biomateriales, y ha mostrado específicamente una mejora en aquellos destinados a aplicaciones cardiovasculares debido a que presentan menor antigenicidad y tienen mayor estabilidad contra el daño proteolítico [173–175].

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se debe hacer un balance de las necesidades del material que se quiere formular, de este modo, en el caso del presente proyecto, se decidió utilizar glutaraldehído en bajas concentraciones como entrecruzante ya que el material puede ser tratado posteriormente con ácido L-glutámico si es la necesidad, la fibroína biofuncionalizada utilizada en la mezcla polimérica no perderá actividad como efecto del entrecruzamiento del PVA, y su uso puede ayudar a que la fibroína biofuncionalizada quede inmovilizada en el material final, por lo tanto, se podrá obtener un material a base de fibroína que utilizará las aminas terminales de esta proteína para inmovilizar heparina, que además tendrá buena resistencia mecánica gracias al uso de PVA parcialmente entrecruzado, y estas fases podrán permanecer homogéneas en el material gracias a la ayuda del glicerol en el sistema final.

En este capítulo se describirá la metodología que se utilizó para la preparación de películas fibroína/PVA, para las cuales, se utilizó glutaraldehído en bajas cantidades para entrecruzar el PVA, además, con el fin de evitar la separación de fases entre la fibroína y el

PVA se utilizó glicerol, el cual aumenta las interacciones intermoleculares por puentes de hidrógeno, favoreciendo que dichas fases permanezcan en forma de mezcla homogénea. Las caracterizaciones estarán enfocadas en sus propiedades mecánicas y superficiales. Finalmente, los resultados de estas caracterizaciones serán comparados con los de los conductos vasculares nativos con el fin de plantear las potenciales aplicaciones de estos materiales a la fabricación de conductos vasculares artificiales.

4.2. Metodología

4.2.1. Diseño experimental para la preparación de películas

Para la preparación de las películas a base de fibroína, se procedió a solubilizar esta proteína en un sistema ternario $\text{CaCl}_2:\text{H}_2\text{O}:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ en relación molar 1:2:8 como se ha reportado previamente en otros estudios [18, 144, 176]. Primero, la fibroína extraída de los capullos del gusano de seda según la metodología optimizada del Capítulo 3 fue cortada en pequeños fragmentos, posterior a esto, los fragmentos se agregaron lentamente en la solución ternaria a 60°C y puestos en agitación magnética durante dos horas, luego de esto, con el fin de eliminar las sales utilizadas en la disolución de fibroína, ésta fue puesta en diálisis contra agua destilada a $\text{pH}=7$ durante cuatro días en membranas de acetato de celulosa haciendo recambio del agua destilada cada 2 horas durante las primeras 12 horas, luego cada 5 horas hasta completar los cuatro días. Este proceso ya ha sido utilizado en estudios anteriores del grupo de investigación BioMat [177], y se encontró por análisis de EDS que luego de terminar la diálisis, no quedan trazas de las sales usadas en el proceso, para el cual, una vez terminado, se determinó la concentración final de la solución de fibroína por gravimetría pesando el residuo sólido de la misma una vez ésta fue puesta a evaporación.

Luego de terminar el proceso de solubilización, diálisis, y cálculo de la concentración final de la fibroína, las películas se fabricaron según el esquema de la Figura 4.1. Primero, se hizo reaccionar PVA (Sigma Aldrich, 130kD, 99 % hidrolizado) en solución al 8 % con solución de glutaraldehído al 25 % (Sigma Aldrich) durante 10 minutos, posteriormente, se agregaron las soluciones de fibroína y el glicerol y se le permitió al sistema evolucionar durante una hora, luego de pasado este tiempo, se tomaron 10 ml de cada formulación y se depositaron en posos de acero al carbono anti adherentes durante 96 horas a 30°C , finalmente, las películas fueron retiradas de los posos anti adherentes y almacenadas para posteriores análisis. Todas las proporciones entre los reactivos mencionados previamente se calcularon según el diseño experimental descrito a continuación.

El diseño experimental que se planteó para la formulación de las diferentes películas corresponde a un diseño factorial general 3^3 , en éste, los factores de interés planteados fueron: relación fibroína/PVA (%), proporción PVA:glutaraldehído (g:g) y proporción fibroína:glicerol (g:g), los niveles correspondientes a dicho diseño experimental se muestran en la la Tabla

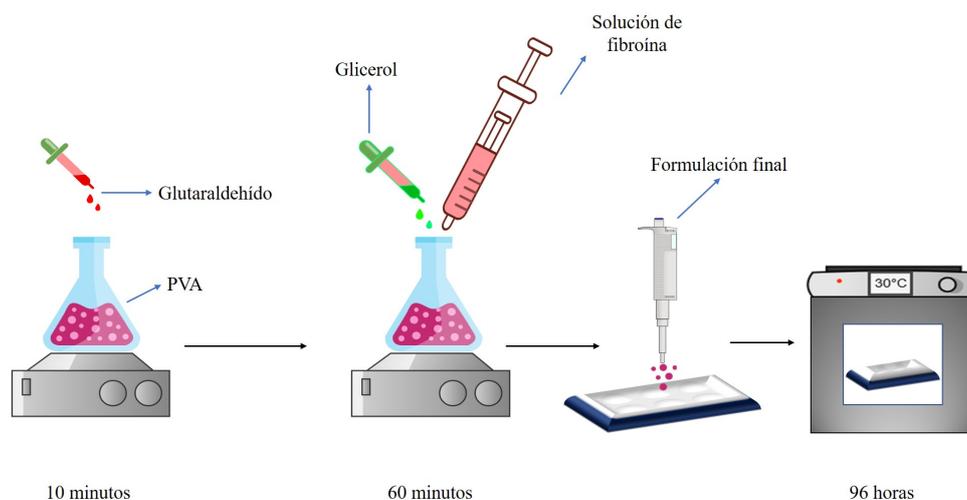


Figura 4.1: Esquema de fabricación de películas a base de fibroína (Ilustración propia)

4.1, y la nomenclatura de todas las formulaciones se muestra en la Tabla 4.2. Todos los cálculos estadísticos y el esquema del diseño experimental fueron realizados en el software Statgraphics Centurion 17 ®. Para el estudio en cuestión, cada combinación de factores y niveles fue realizada 3 veces, como resultado, el diseño experimental completo fue de 81 corridos, luego, dichos corridos fueron aleatorizados para evitar sesgo estadístico [135]. La significancia estadística de los factores fue estudiada mediante análisis de varianza (ANOVA), así, los factores con un valor P menor a 0.05 tuvieron significancia estadística sobre las variables de respuesta estudiadas con un 95 % de confianza [138], finalmente, para la validación de cada análisis de varianza se realizaron las siguientes pruebas de verificación para los supuestos de dicho modelo [135, 138]:

1. Distribución normal de los residuales de los datos, para ello se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, cuyas hipótesis son:
 - H_0 : Los residuales proceden de una distribución normal.
 - H_1 : Los residuales no proceden de una distribución normal.
2. Homoscedaticidad de las varianzas entre poblaciones, para ello se usó la prueba de Levene, cuyas hipótesis son:
 - H_0 : Las varianzas de las poblaciones son iguales.
 - H_1 : Al menos dos varianzas entre las poblaciones son distintas.
3. Independencia de los residuales, para ello se hizo la prueba de Durbin-Watson, cuyas hipótesis son:
 - H_0 : La correlación entre los residuales del modelo es cero. Son independientes.
 - H_1 : Al menos un par de residuales son dependientes entre si.

Factor	Unidades	Tipo	Niveles		
A:Fibroína/PVA	%	Categorico	60/40	70/30	80/20
B:PVA:Glutaraldehído	g:g	Categorico	100:0.8	100:0.9	100:1
C:Fibroína:Glicerol	g:g	Categorico	3:0.5	3:1	3:2

Tabla 4.1: Diseño factorial general para la formulación de películas a base de fibroína

Código de la muestra	Fibroína/PVA (%)	PVA:Glutaraldehído (g:g)	Fibroína:Glicerol (g:g)
1	60/40	100:0.8	3:0.5
2	60/40	100:0.8	3:1
3	60/40	100:0.8	3:2
4	60/40	100:0.9	3:0.5
5	60/40	100:0.9	3:1
6	60/40	100:0.9	3:2
7	60/40	100:1	3:0.5
8	60/40	100:1	3:1
9	60/40	100:1	3:2
10	70/30	100:0.8	3:0.5
11	70/30	100:0.8	3:1
12	70/30	100:0.8	3:2
13	70/30	100:0.9	3:0.5
14	70/30	100:0.9	3:1
15	70/30	100:0.9	3:2
16	70/30	100:1	3:0.5
17	70/30	100:1	3:1
18	70/30	100:1	3:2
19	80/20	100:0.8	3:0.5
20	80/20	100:0.8	3:1
21	80/20	100:0.8	3:2
22	80/20	100:0.9	3:0.5
23	80/20	100:0.9	3:1
24	80/20	100:0.9	3:2
25	80/20	100:1	3:0.5
26	80/20	100:1	3:1
27	80/20	100:1	3:2

Tabla 4.2: Nomenclatura para todas las formulaciones del diseño experimental mostrado en la Tabla 4.1

Finalmente, para la caracterización de estas formulaciones se plantearon otros diseños experimentales según las necesidades de cada propiedad estudiada, dejando en algunos casos uno o más factores del diseño experimental fijos, así, la descripción de estos diseños se explicará en cada una de las secciones de caracterización.

4.2.2. Caracterización de las películas obtenidas

Como se mencionó previamente, la caracterización de las 27 películas formuladas según la Tabla 4.2 varía dependiendo de los intereses propios de cada propiedad analizada, por tal motivo, en algunos casos se dejaron factores del diseño experimental fijos con el fin de estudiar el cambio en las variables de respuesta respecto a los demás factores, de este modo, solo las propiedades mecánicas y ángulo de contacto fueron calculados para todas las 27 formulaciones, para todas las demás, se seleccionaron un grupo de muestras basados en algunos criterios que se explicaran a continuación.

4.2.2.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La totalidad de propiedades caracterizadas en los materiales formulados depende fuertemente de la interacción que se da por la formación de enlaces de hidrógeno entre los tres componentes principales de la mezcla polimérica (fibroína, PVA y glicerol) [20], por lo tanto, el análisis espectroscópico será la base de entendimiento para explicar el comportamiento de las demás caracterizaciones, de este modo, para estudiar dicha interacción se utilizó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, para este propósito, se prepararon películas de: fibroína, PVA, mezcla fibroína/PVA, mezcla de fibroína/glicerol y la muestra 3 de la Tabla 4.2 ya que, como se verá en la sección de resultados, dicha muestra presentó algunas de las propiedades más interesantes. Las películas en cuestión fueron analizadas en un equipo **SHIMATZU IR-TRACER 100**, para este análisis se barrió el rango espectral entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} durante 24 ciclos.

4.2.2.2. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los materiales destinados a la fabricación de injertos vasculares son las primeras en orden de importancia dados los esfuerzos a los que estos estarán sometidos, de este modo, la resistencia mecánica de todas las películas del diseño experimental mostrado en la Tabla 4.2 fueron analizadas según la norma ASTM D-638 [178] en una máquina universal de ensayos **Shimadzu UH-X**, de estas pruebas se calcularon para cada película la resistencia a la tracción, porcentaje de elongación en la ruptura, módulo elástico y el límite elástico, finalmente, todos los análisis y cálculos relacionados con este diseño se realizaron según la descripción mostrada en la Sección 4.2.1.

4.2.2.3. Ángulo de contacto

Las medidas de mojabilidad en todos los materiales que se trabajan para la fabricación de injertos cardiovasculares son la segunda propiedad importante de estos debido a que el

ángulo de contacto proporciona información importante respecto a la histocompatibilidad y hemocompatibilidad de dichos materiales [179–181], por lo tanto, es una propiedad que requiere valores específicos de ángulo de contacto [129, 182], de este modo, todas las películas formuladas en el diseño experimental mostrado en la Tabla 4.2 fueron analizadas en un goniómetro **DataPhysics OCA 15EC**, utilizando gotas de 1 μl de volumen y se determinó el ángulo de contacto de cada una de ellas con agua. Todas las muestras se midieron por triplicado y su resultado se expresó como el promedio de los mismos con su desviación estándar.

4.2.2.4. Microscopía electrónica de barrido

Los materiales formulados para el presente proyecto deben ser homogéneos en toda estructura ya que la fibroína será usada como punto de anclaje para la heparina, por lo tanto, se debe garantizar que el material obtenido no presente separación entre las fases principales del mismo (fibroína y PVA) ya que se ha encontrado que dicha mezcla tiende a ser inestable termodinámicamente, y que el glicerol puede mejorar la interacción entre la fibroína y el PVA a través de la inducción de interacciones intermoleculares por puentes de hidrógeno, favoreciendo la homogeneidad de la mezcla [20], partiendo de esto, la verificación de dicha homogeneidad se realizó fijando el valor de la proporción PVA:glutaraldehído en 100:0.8 (g:g), y se variaron las proporciones fibroína:glicerol, obteniéndose el diseño experimental 3² mostrado en la Tabla 4.3, así, se analizó como la variación de glicerol afectó la estructura del polímero final, para esto se utilizó un equipo de microscopía electrónica de barrido **SEM JEOL JSM-6490LV** y se tomaron 2 micrográficas de cada muestra a 500X y 1000X respectivamente. Todas las muestras analizadas en esta sección se enumeraron igual que en Tabla 4.2 con el fin de mantener homogeneidad en la nomenclatura.

Factor	Unidades	Tipo	Niveles		
A:Fibroína/PVA	%	Catagórico	60/40	70/30	80/20
B:Fibroína:Glicerol	g:g	Catagórico	3:0.5	3:1	3:2

Tabla 4.3: Diseño experimental para el análisis de homogeneidad por microscopía electrónica de barrido

4.2.2.5. Perfiles de degradación

Conocer como se degradan los materiales formulados es de vital importancia ya que este análisis permitirá establecer los tiempos que dicho material podrá realizar alguna función específica en el cuerpo humano si es implantado. Para este análisis, se parte de la idea de que la degradación del mismo dependerá principalmente del grado de entrecruzamiento que logre el material en cuestión como han encontrado previamente algunos autores [85, 105, 183], en el caso particular de este proyecto, el entrecruzamiento se realiza sobre el PVA, así, para realizar los perfiles de degradación, se dejó fijo el valor de la proporción fibroína:glicerol en 3:2 (g:g), y se variaron las proporciones PVA:glutaraldehído, de este modo, el diseño experimental resultante para el

análisis de los perfiles de degradación corresponde a un 3^2 como se muestra en la Tabla 4.4. El análisis de velocidad de degradación se hizo realizando una modificación de la norma ASTM F1634-95 [184]. Brevemente, se tomaron fragmentos de 5 mm^2 de las muestras formuladas en el presente diseño experimental, se pesaron y se tomaron dichas masas como las medidas a tiempo cero, luego de esto, las muestras fueron sumergidas en solución amortiguadora de fosfato (PBS) a $\text{pH} = 7.0$ y puestas en una incubadora de CO_2 durante 24 horas, 7 días y 15 días respectivamente. El medio de PBS de las muestras fue cambiado cada 2 días. Una vez terminados los tiempos mencionados anteriormente, todas las muestras fueron puestas a secar a 30°C durante 24 horas y finalmente pesadas. Todas las muestras anteriores se realizaron por triplicado, los datos finales se reportaron como porcentaje de pérdida de masa en función del tiempo. Finalmente, las muestras analizadas se enumeraron igual que en el diseño de formulación de películas (Tabla 4.2) con el fin de mantener homogeneidad en la nomenclatura.

Factor	Unidades	Tipo	Niveles		
A:Fibroína/PVA	%	Categorico	60/40	70/30	80/20
B:PVA:Glutaraldehído	g:g	Categorico	100:0.8	100:0.9	100:1

Tabla 4.4: Diseño experimental para el análisis de degradación

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Análisis espectroscópico

Las propiedades mecánicas y superficiales de los materiales formulados dependen fuertemente de la forma en que sus componentes interactúan, por lo tanto, entender esta interacción resulta importante para explicar dichas propiedades. En la Figura 4.2 se propone un esquema de esta interacción, en ésta se observa que las moléculas de glicerol se pueden ubicar entre cadenas de fibroína y PVA, funcionando como intermediario a través de puentes de hidrógeno, lo que evitaría la separación de fases de una mezcla basada en estos dos polímeros. Esquemas similares han sido propuesto por otros autores para lograr materiales más resistentes basados en otros polímeros [185, 186], de este modo, como se verá más adelante, la muestra 3 de las formulaciones planteadas en en la Tabla 4.2 presenta algunas de las propiedades más interesantes de dicho conglomerado desde el punto de vista mecánico y superficial, por lo tanto, dicha muestra fue elegida con el objetivo de verificar la interacción propuesta, y para ello, se realizó un análisis por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier a películas de:

1. Fibroína.
2. PVA.
3. Mezcla fibroína/PVA.

4. Mezcla fibroína/glicerol.

5. Película de la muestra 3.

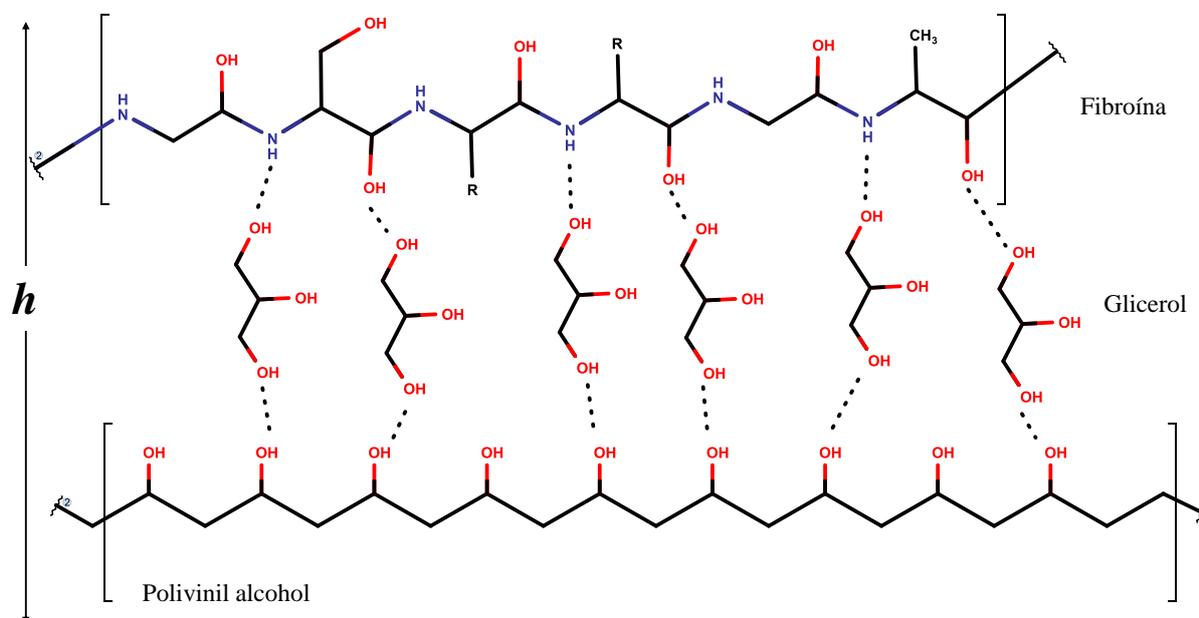


Figura 4.2: Esquema de interacción entre las moléculas de fibroína y PVA a través de enlaces de hidrógeno inducidos por la adición de glicerol (Ilustración propia)

Con estos análisis, se buscó entender como cambian las interacciones de hidrógeno cuando se pasa de tener fibroína y PVA puros, a tener mezclas fibroína/PVA, fibroína/glicerol y la mezcla completa de una de las formulaciones (muestra 3 de la Tabla 4.2), cabe resaltar, que para las mezclas fibroína/PVA y fibroína/glicerol, se mantuvieron las proporciones de la muestra 3 con el fin de que los análisis fueran comparables, de este modo, se hizo seguimiento de algunos modos espectrales característicos de las interacciones de hidrógeno en mezclas poliméricas como la tensión de grupos **-O-H** y tensión del grupo carbonilo **-C=O** [187–191].

En la Figura 4.3 se presentan los espectros infrarrojos de las muestras mencionadas anteriormente, en ésta se resaltan dos zonas de interés, marcadas en amarillo claro y verde claro respectivamente con el fin de facilitar la lectura de los resultados. Toda la zona resaltada en amarillo claro, corresponde principalmente a las bandas relacionadas con la tensión de los grupos **-O-H**, en esta zona se puede observar como la intensidad de la banda de 3280 cm^{-1} disminuye cuando se comparan los espectros para el PVA (—) y la mezcla fibroína/PVA (—), este resultado sugiere que hay una mayor cantidad de puentes de hidrógeno entre cadenas de PVA cuando se encuentran solas que cuando están en forma de mezcla fibroína/PVA, lo que explica que este tipo de mezclas tienda a separarse, ya que el PVA tendería a formar más fácilmente enlaces de hidrógeno entre cadenas homónimas que con las cadenas de fibroína, además de esto, cuando se observa esta misma banda entre las muestras de fibroína (—) y

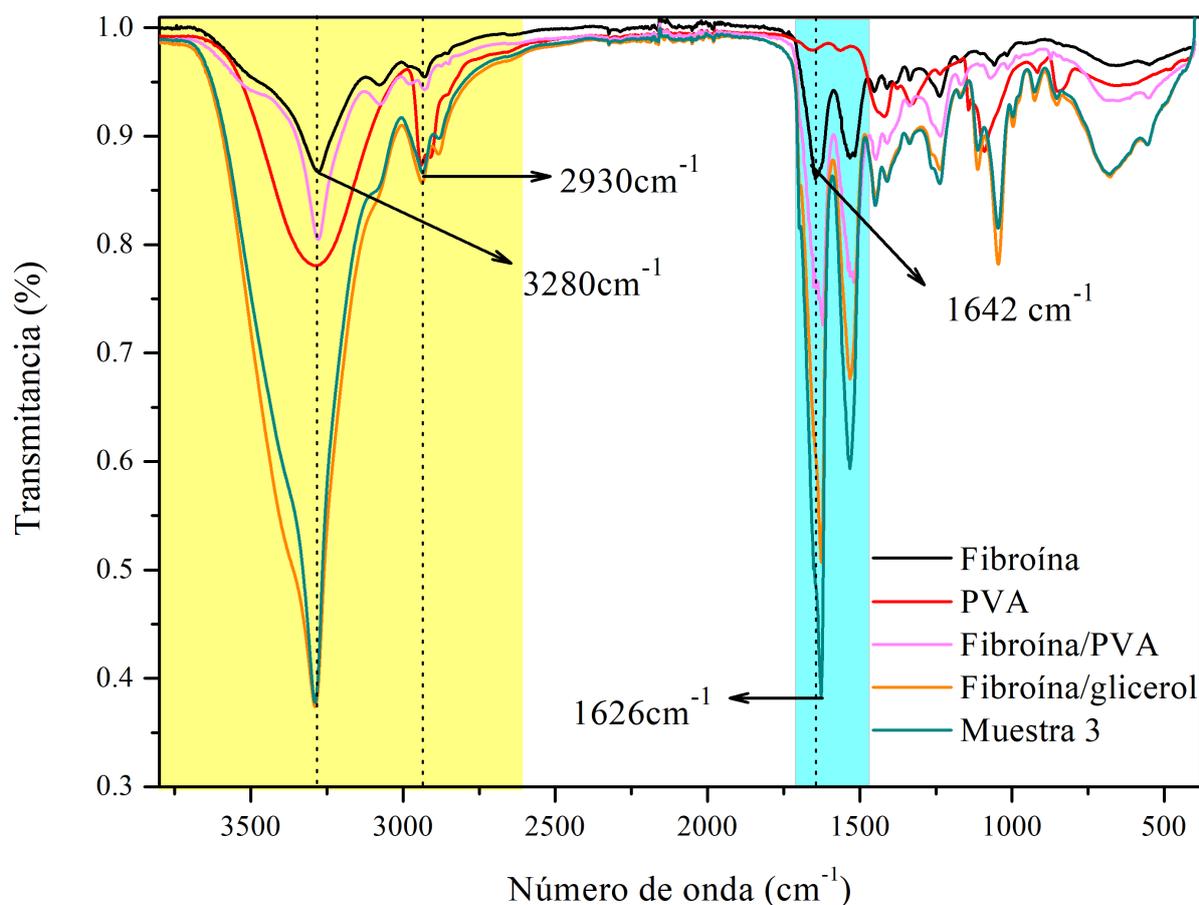


Figura 4.3: Espectros infrarrojo para muestras de: fibroína (—), PVA (—), fibroína/PVA (—), fibroína/glicerol (—) y muestra 3 (—).

la mezcla fibroína/glicerol (—), se puede observar un aumento bastante considerable en la intensidad de esta banda en la mezcla fibroína/glicerol, lo que indica que la adición de glicerol induce la formación de enlaces de hidrógeno entre cadenas de fibroína como han encontrado otros autores [192], efecto que se puede notar observando tanto el cambio en la intensidad de la banda en 3280 cm^{-1} como en la banda a 2930 cm^{-1} , la cual tiene una intensidad muy baja para la muestra de fibroína, y aumenta con la adición de glicerol, lo que generalmente se explica debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre dímeros de ácidos carboxílicos de los residuos de diferentes aminoácidos en la estructura de la fibroína, y que tiene como consecuencia un aumento en esta banda, de este modo, un aumento en los puentes de hidrógeno a través de este grupo funcional aumentará la intensidad de estas bandas como se ha reportado en otros estudios [148, 187, 188], estos efectos se pueden observar también para la muestra 3 (—), donde se nota que, comparado con la fibroína y el PVA solos, las bandas en 3280 cm^{-1} y a 2930 cm^{-1} tienen un aumento de intensidad considerable, lo que indica que la adición de glicerol a las mezclas fibroína/PVA tiene como consecuencia un aumento en los enlaces de hidrógeno entre dichas cadenas poliméricas, lo que finalmente se verá reflejado en la intensidad de las bandas a 3280 cm^{-1} y 2930 cm^{-1} .

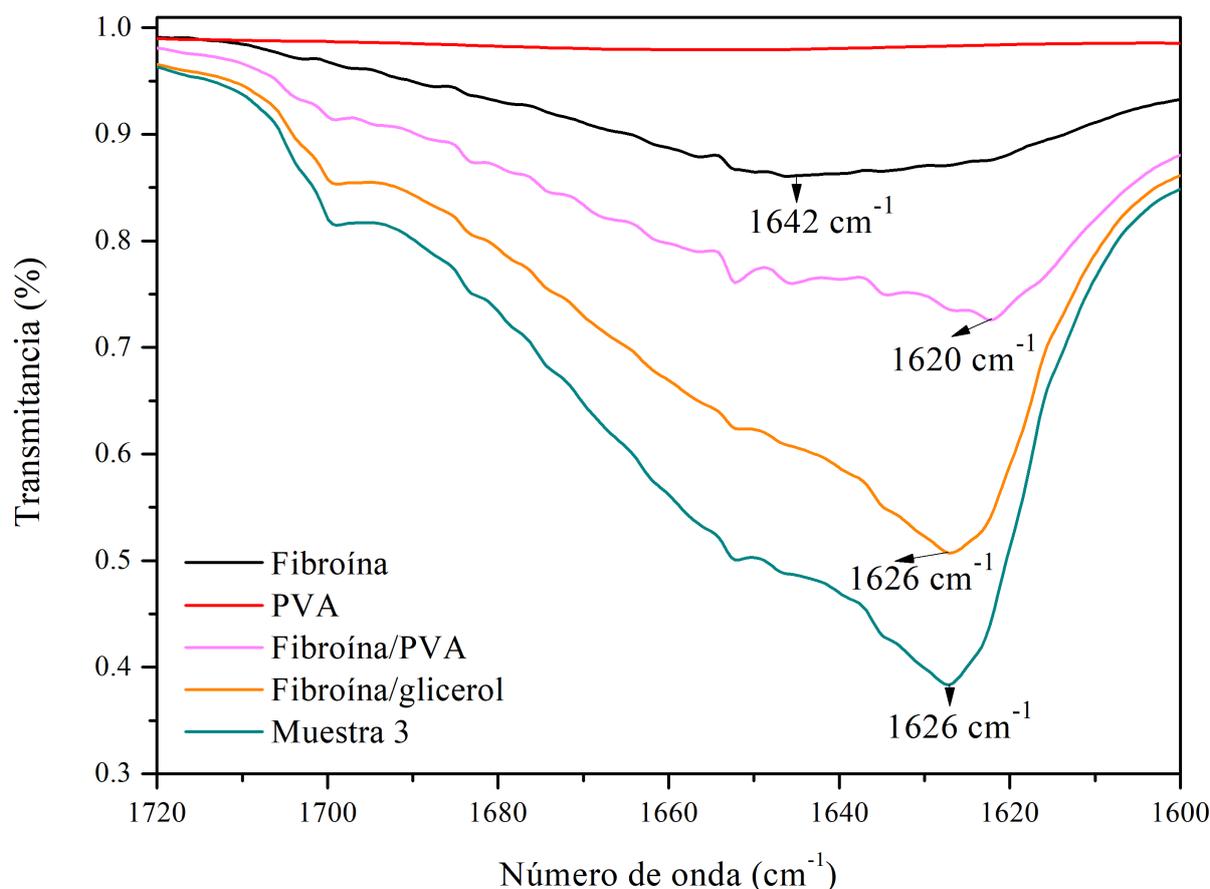


Figura 4.4: Ampliación de la zona característica de la tensión $-C=O$ para muestras de: fibroína (—), PVA (—), fibroína/PVA (—), fibroína/glicerol (—), Muestra 3 (—).

Otra zona de interés con la que se puede verificar el aumento de los enlaces de hidrógeno en las muestras formuladas está señalada en azul claro, la cual corresponde a la zona de tensión del grupo carbonilo ($-C=O$), esta banda es de particular interés debido a que es bastante sensible a la formación de enlaces de hidrógeno ya que, cuando este grupo funcional se asocia a través de un enlace de hidrógeno, la banda tiende a desplazarse a números de onda menores, además del aumento en la intensidad de la misma, como se observa en el espectro, donde la banda de estos grupos se presenta a 1642 cm^{-1} para la fibroína, y baja hasta 1626 cm^{-1} para la muestra 3, sumado al evidente aumento en la intensidad de dicha banda, este cambio se puede notar mejor en la Figura 4.4, donde se observa que esta banda parte de 1642 cm^{-1} para la fibroína, pasando a 1620 cm^{-1} para la mezcla fibroína/PVA, y concluyendo en 1626 cm^{-1} para la mezcla fibroína/glicerol y la muestra 3, mostrando en ese orden un aumento en la intensidad de esta banda, de este modo, se concluye que la adición de glicerol en las formulaciones estimula la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas de fibroína y PVA, y por lo tanto, funciona como intermediario entre estas dos cadenas para lograr un material homogéneo como se verá en las siguientes caracterizaciones.

4.3.2. Propiedades mecánicas

En la sección anterior se analizó el comportamiento de la mezcla fibroína/PVA/glicerol desde el punto de vista espectroscópico, y se ha concluido que la presencia del glicerol en estas mezclas induce la formación de interacciones de hidrógeno entre dichos componentes, de este modo, partiendo de estas interacciones, se analizarán las caracterizaciones mecánicas de todas las formulaciones mostradas en el esquema del diseño experimental de la Tabla 4.2.

Los resultados de las caracterizaciones mecánicas de todas las formulaciones se encuentran registrados en la Tabla 4.5, todas las curvas esfuerzo vs deformación que dan cuenta de dichos resultados se encuentran registradas en la Figura 4.5, en la que se muestra la curva promedio de las tres replicas realizadas a cada una de las formulaciones según la metodología explicada en la Sección 4.2.1, en esta figura, los resultados se separaron de tal forma que la Figura 4.5a corresponde a todas las formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40 (%), la Figura 4.5b a todas las formulaciones con relación fibroína/PVA 70/30 (%), y la Figura 4.5c a todas las formulaciones con relación fibroína/PVA 80/20 (%).

Los resultados registrados en la Tabla 4.5 y la Figura 4.5, muestran que todas las variables de respuesta estudiadas presentan una variabilidad amplia a lo largo de todo el diseño experimental, por lo tanto, teniendo en cuenta que los diferentes conductos vasculares al rededor del cuerpo humano, presentan una variedad de propiedades mecánicas, la diversidad de aplicaciones que se pueden tener de las 27 formulaciones planteadas en términos de la fabricación de conductos vasculares es amplia también, además de lo anterior, los resultados estadísticos mostraron que cada una de las variables de respuesta depende de forma diferente de los factores planteados en el diseño experimental, por tal motivo, cada una de éstas será analizada de forma independiente en las siguientes secciones.

4.3.2.1. Módulo elástico y límite elástico

En los materiales poliméricos, la zona elástica corresponde a toda la región en una curva esfuerzo vs deformación en la que la relación entre estos dos parámetros es lineal, por lo tanto, en toda esta zona se cumple que, una vez retirado el esfuerzo aplicado sobre el material, éste volverá a su forma original, de este modo, el límite elástico corresponderá al valor máximo de esfuerzo para el cual se cumple la relación mencionada [121]. Por otra parte, el módulo elástico se define como la relación entre los valores del esfuerzo aplicado y la deformación obtenida a ese esfuerzo, por lo tanto, el módulo elástico se puede calcular como la pendiente de dicha zona lineal y se define según la Ecuación 4.1, en donde σ es el esfuerzo y ϵ corresponde al valor de deformación al esfuerzo σ aplicado sobre el material.

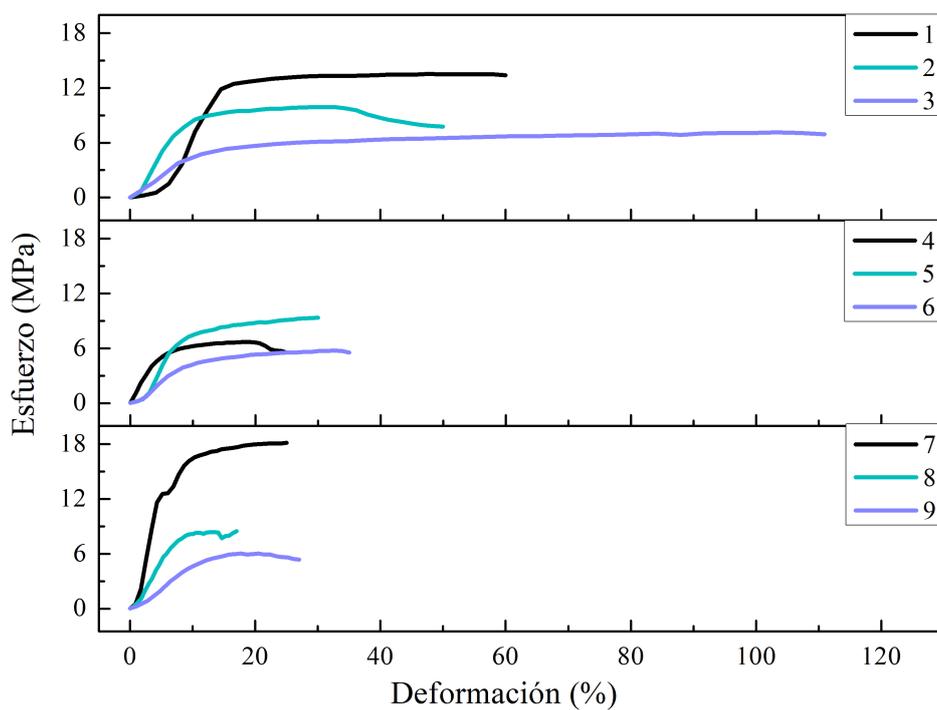
$$E = \frac{d\sigma}{d\epsilon} \quad (4.1)$$

Muestra	SF/PVA (%)	PVA:GA (g:g)	SF:GOL (g:g)	Resistencia a la tracción (MPa)	Elongación en la ruptura (%)	Módulo elástico (MPa)	Límite elástico (MPa)
1	60/40	100:0.8	3:0.5	13.43 ± 1.30	45.79 ± 20.99	164.50 ± 45.75	10.62 ± 1.26
2	60/40	100:0.8	3:1	9.39 ± 1.24	34.50 ± 14.11	146.67 ± 24.15	6.71 ± 0.56
3	60/40	100:0.8	3:2	7.51 ± 0.23	119.76 ± 20.57	66.57 ± 7.95	4.49 ± 0.38
4	60/40	100:0.9	3:0.5	6.95 ± 0.85	15.90 ± 9.35	152.93 ± 67.39	4.50 ± 0.59
5	60/40	100:0.9	3:1	8.81 ± 1.13	33.51 ± 4.03	126.47 ± 28.51	5.16 ± 0.66
6	60/40	100:0.9	3:2	5.84 ± 0.18	48.75 ± 27.27	54.73 ± 8.60	3.51 ± 0.01
7	60/40	100:1	3:0.5	17.73 ± 1.82	27.87 ± 12.48	360.06 ± 38.37	12.39 ± 1.72
8	60/40	100:1	3:1	8.13 ± 1.61	14.74 ± 5.44	108.29 ± 16.07	6.38 ± 0.73
9	60/40	100:1	3:2	6.12 ± 0.35	26.87 ± 15.33	51.65 ± 7.87	4.52 ± 0.43
10	70/30	100:0.8	3:0.5	17.04 ± 5.15	42.58 ± 27.26	187.13 ± 44.10	13.27 ± 3.44
11	70/30	100:0.8	3:1	11.58 ± 0.46	53.92 ± 10.00	131.38 ± 11.20	7.84 ± 0.27
12	70/30	100:0.8	3:2	6.42 ± 0.56	37.38 ± 12.39	73.36 ± 19.21	3.52 ± 0.27
13	70/30	100:0.9	3:0.5	16.28 ± 8.26	18.82 ± 14.95	267.25 ± 39.96	13.25 ± 6.27
14	70/30	100:0.9	3:1	8.46 ± 0.40	24.66 ± 5.95	116.70 ± 25.01	5.44 ± 0.58
15	70/30	100:0.9	3:2	6.20 ± 1.05	20.64 ± 3.23	80.95 ± 40.40	4.04 ± 0.50
16	70/30	100:1	3:0.5	14.50 ± 3.48	14.85 ± 6.48	204.84 ± 24.69	11.86 ± 2.68
17	70/30	100:1	3:1	6.27 ± 0.59	26.18 ± 5.33	67.61 ± 12.97	4.61 ± 0.65
18	70/30	100:1	3:2	3.93 ± 0.23	15.98 ± 0.95	44.05 ± 4.28	3.10 ± 0.37
19	80/20	100:0.8	3:0.5	12.57 ± 3.93	37.22 ± 15.87	110.52 ± 18.40	9.42 ± 2.57
20	80/20	100:0.8	3:1	11.05 ± 0.30	35.88 ± 9.89	110.60 ± 50.93	8.07 ± 0.35
21	80/20	100:0.8	3:2	3.81 ± 0.21	20.56 ± 4.23	25.05 ± 1.24	3.45 ± 0.17
22	80/20	100:0.9	3:0.5	18.50 ± 0.76	53.38 ± 11.62	211.28 ± 40.93	11.65 ± 0.73
23	80/20	100:0.9	3:1	11.97 ± 1.51	50.41 ± 25.06	87.98 ± 8.74	8.25 ± 0.43
24	80/20	100:0.9	3:2	5.08 ± 1.55	26.93 ± 9.52	34.42 ± 4.57	3.90 ± 0.84
25	80/20	100:1	3:0.5	14.70 ± 0.97	34.71 ± 8.21	156.66 ± 35.06	10.14 ± 1.57
26	80/20	100:1	3:1	8.34 ± 0.64	27.23 ± 5.58	85.59 ± 7.40	6.42 ± 0.66
27	80/20	100:1	3:2	4.06 ± 0.28	24.95 ± 6.90	26.88 ± 0.80	3.39 ± 0.44

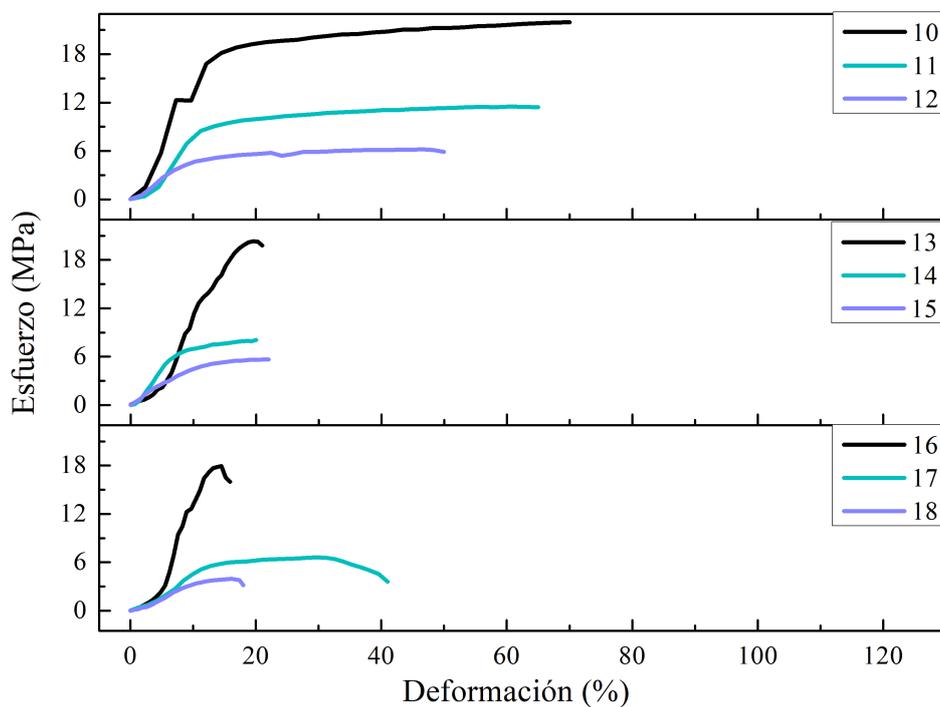
Tabla 4.5: Valores promedio de la resistencia a la tracción, elongación en la ruptura, módulo elástico y límite elástico para todas las formulaciones del diseño experimental. Los códigos significan; SF: Fibroína, PVA: Poli vinil alcohol, GA: Glutaraldehído, GOL: Glicerol

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza mostrados en la Tabla 4.6, el módulo elástico depende con significancia estadística de la relación fibroína/PVA ($P= 0.0002$), la proporción fibroína:glicerol ($P= 0.0000$) y las interacciones de factores fibroína/PVA - PVA:glutaraldehído ($P= 0.0009$) y PVA:glutaraldehído - Fibroína:glicerol ($P= 0.0001$), razón por la cual, todos los factores del diseño experimental tienen significancia estadística sobre esta variable de respuesta [135, 138].

Según los resultados mostrados en la Figura 4.5a, el módulo elástico para las formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40 (%) disminuye con la adición de glicerol según la dependencia mostrada en la Figura 4.6a, lo que se puede explicar basado en el esquema de interacciones mostrado en la Figura 4.2, donde se planteó que las moléculas de glicerol se posicionan entre cadenas de fibroína y PVA, generando una separación h entre ambas cadenas, y les permite interactuar a través de puentes de hidrógeno, por lo tanto, un aumento en la concentración de

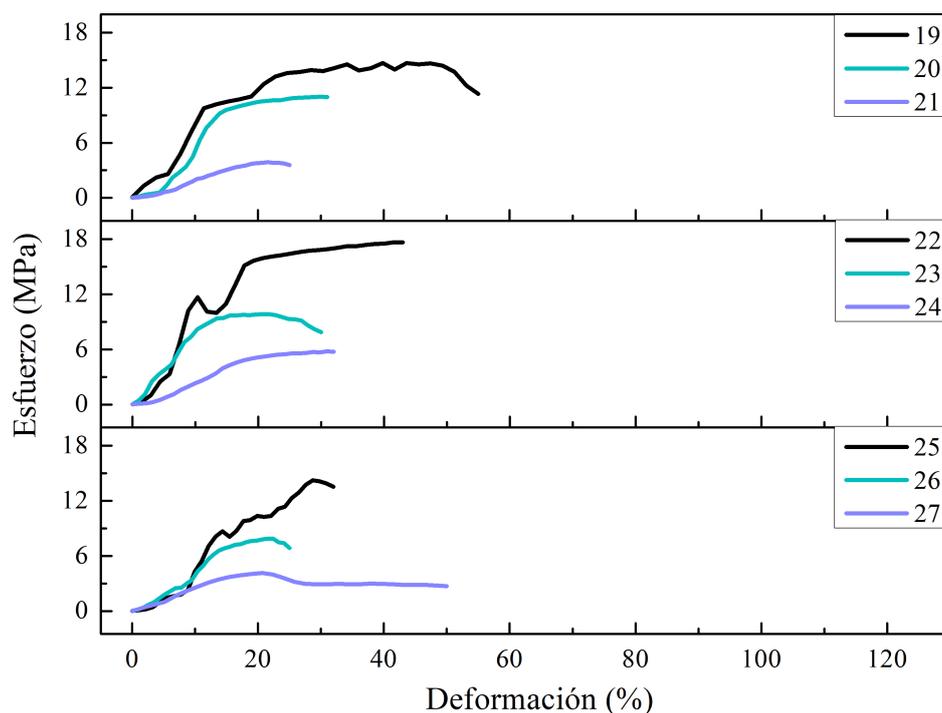


(a) Formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40



(b) Formulaciones con relación fibroína/PVA 70/30

Figura 4.5: Curvas de esfuerzo vs deformación para todas las formulaciones del diseño experimental de la Tabla 4.2 (Primera parte)



(c) Formulaciones con relación fibroína/PVA 80/20

Figura 4.5: Curvas de esfuerzo vs deformación para todas las formulaciones del diseño experimental de la Tabla 4.2, donde se reconocen las formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40 (a), las formulaciones con relación fibroína/PVA 70/30 (b), y las formulaciones con relación fibroína/PVA 80/20 (c) (Parte final)

Módulo elástico	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrática	F	Valor P
Efectos Principales					
A:Fibroína/PVA	2.8108	2	1.4054	9.6000	0.0002
B:PVA:Glutaraldehído	0.2525	2	0.1263	0.8600	0.4270
C:Fibroína:Glicerol	31.2700	2	15.6350	106.8300	0.0000
Interacciones					
AB	3.1309	4	0.7827	5.3500	0.0009
AC	0.7782	4	0.1945	1.3300	0.2691
BC	4.1429	4	1.0357	7.0800	0.0001
RESIDUAL	9.07417	62	0.1464		
TOTAL (Corregido)	51.4594	80			
Supuestos ANOVA					
Prueba estadística					
Normalidad de residuos	Kolmogorov-Smirnov				0.6301
Igualdad de varianzas	Levene				0.4440
Independencia de residuos	Durbin-Watson				1.9993

Tabla 4.6: Tabla ANOVA y validación de supuestos para el módulo elástico

glicerol en el sistema lleva a un mayor porcentaje de puentes de hidrógeno entre el PVA y la fibroína como se mostró en el análisis espectroscópico de la Sección 4.3.1, y por lo tanto, los grupos hidroxilo relacionados con esta interacción permitirán una separación más amplia

entre ambas cadenas (valores de h más altos), y como consecuencia, el movimiento entre ellas resultará más fácil y fluido, generando materiales menos rígidos como lo muestran los resultados, algunos autores han encontrado resultados similares [20, 185, 186, 193], donde se usan diferentes sustancias para promover interacciones de hidrógeno entre cadenas poliméricas para lograr el efecto mencionado.

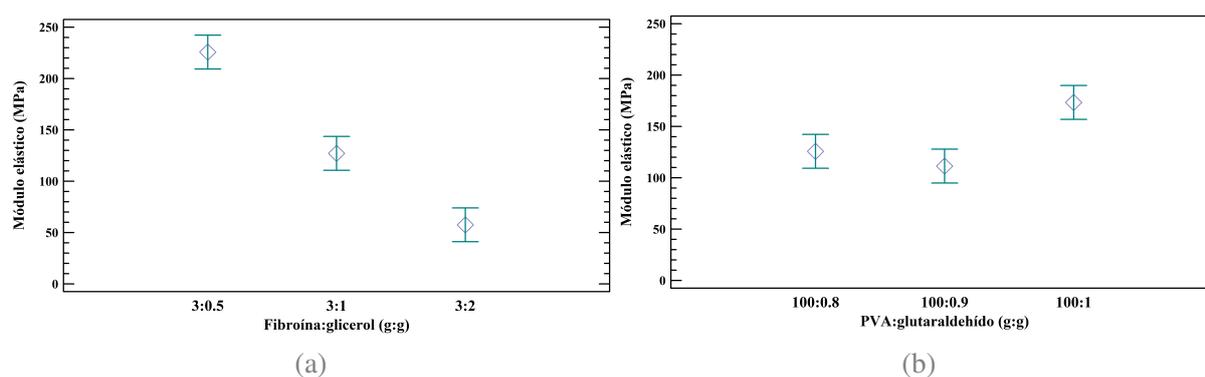


Figura 4.6: Gráfico de medias para el módulo elástico donde se representa la dependencia respecto a la proporción fibroína: glicerol (a) y proporción PVA: glutaraldehído (b) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40 (%)

Por otra parte, cuando se analiza la dependencia del módulo elástico respecto a la proporción PVA: glutaraldehído a esta misma relación fibroína/PVA (Figura 4.6b), se observa que solamente en los materiales con la mayor cantidad de glutaraldehído se nota el efecto de este factor sobre la variable de respuesta, donde se encuentra un aumento en la rigidez para las muestras con proporción PVA: glutaraldehído 100:1 (g:g), estos resultados proporcionan información parcial respecto a los grados de entrecruzamiento del material, sin embargo, según el comportamiento mostrado la Figura 4.6b, este efecto solo se nota para la proporción PVA: glutaraldehído mencionada, lo que se explica basado en la estructura semicristalina del PVA, en la cual existe una alta interacción entre sus cadenas a través de puentes de hidrógeno que se modifica con la adición de un agente entrecruzante, y por lo tanto, la forma en que se organiza su red tridimensional también se vera modificada [194, 195], de este modo, una vez se ha realizado la reacción de entrecruzamiento, el cambio en la disposición tridimensional del PVA inducirá estructuras más rígidas como muestran los resultados, sin embargo, se debe tener en cuenta que el efecto del glutaraldehído en las formulaciones es muy pequeño comparado con el efecto que tiene la adición de glicerol como se muestra en la Tabla 4.6, donde la suma de cuadrados (SS) indica que tanto afecta el factor a la variable de respuesta, y por lo tanto, a medida que su valor se incrementa, dicho factor tendrá mayor influencia en el resultado [132, 135, 138], así, según los resultados, la adición de glicerol tendrá un efecto mucho más notable sobre el módulo elástico de los materiales formulados ($SS= 31.2700$) que la adición de glutaraldehído ($SS= 0.2525$), lo que se explica debido a que los aumentos sucesivos en la proporción fibroína: glicerol permiten mayor movilidad molecular entre cadenas de PVA y fibroína, generando un cambio en el módulo elástico que varía en promedio desde 225.77 ± 11.09 MPa hasta 57.56 ± 11.09 MPa para todas las formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40 (%), mientras que los aumentos en la

cantidad de glutaraldehído generan un cambio en el módulo elástico que varían en promedio desde $125.77 \text{ MPa} \pm 11.09$ hasta $173.33 \pm 11.09 \text{ MPa}$ a esta misma relación de fibroína/PVA, lo que demuestra que el efecto de la movilidad entre ambas cadenas poliméricas, que genera materiales menos rígidos, es superior al efecto entrecruzante del glutaraldehído.¹

Los resultados anteriores se ven mejor cuando se analizan las formulaciones con relación fibroína/PVA 70/30 (%) mostrados en la Figura 4.7, en ésta, la tendencia respecto a la proporción fibroína:glicerol es similar a la encontrada para la relación fibroína/PVA 60/40 (%), sin embargo, el efecto de la proporción PVA:glutaraldehído es totalmente diferente, y no muestra una tendencia clara, lo que demuestra el fuerte efecto que tiene la adición de glicerol a las formulaciones, y lo superior que es este efecto comparado con el del entrecruzante, que en este caso, se ve completamente enmascarado al disminuir el PVA en un 10% en la formulación, lo que muestra que en los rangos trabajados, el grado de entrecruzamiento solo se nota para aquellas formulaciones con mayor cantidad de PVA.

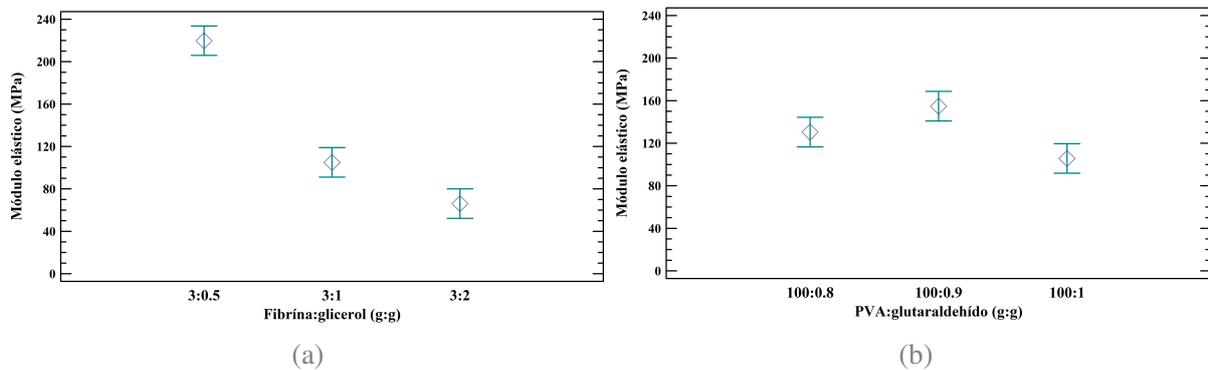


Figura 4.7: Gráfico de medias para el módulo elástico donde se representa la dependencia respecto a la proporción fibroína:glicerol (a) y proporción PVA:glutaraldehído (b) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 70/30 (%)

Finalmente, los resultados de las formulaciones con relación fibroína:PVA 80/20 (%) mostrados en la Figura 4.8 confirman los comportamientos mostrados para todas las demás relaciones fibroína/PVA, sin embargo, solamente hasta que la concentración de fibroína es del 80%, se nota el efecto de ésta proteína sobre el módulo elástico del material, donde se observa que esta propiedad cae desde $136.81 \pm 7.36 \text{ MPa}$ para la relación fibroína/PVA 60/40 (%) hasta $94.44 \pm 7.36 \text{ MPa}$ para la relación fibroína/PVA 80/20 (%), de este modo, basado en el esquema de interacciones mostrado en la Figura 4.2, cuando la concentración de fibroína en la formulación del material es lo suficientemente alta, la separación h entre cadenas de fibroína y PVA será más grande, y la movilidad entre estas cadenas será más fluida, por lo tanto, el material en cuestión será menos rígido como consecuencia de este efecto [185, 186].

Todos los resultados anteriores muestran el comportamiento del módulo elástico respecto a las proporciones fibroína:glicerol y PVA:glutaraldehído para cada una de las relaciones

¹Las desviaciones estándar reportadas en estas comparaciones corresponden a la medida de variabilidad de muestreo, razón por la cual estos valores son iguales con un 95% de confianza

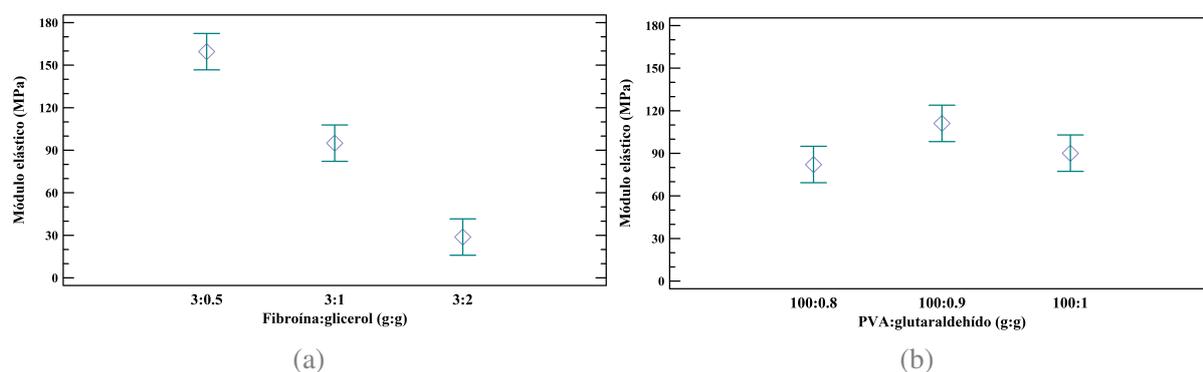


Figura 4.8: Gráfico de medias para el módulo elástico donde se representa la dependencia respecto a la proporción fibroína:glicerol (a) y proporción PVA:glutaraldehído (b) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 80/20 (%)

fibroína/PVA, y se ha visto que para cada una de estas relaciones, la adición de glicerol tiene un impacto más notorio sobre esta variable de respuesta, y se ha concluido que, a pesar de que los resultados del análisis de varianza muestran que existe un efecto estadístico relacionado con el uso del glutaraldehído, este solo se nota para las formulaciones con mayor cantidad de PVA (60%) y de glutaraldehído.

En la Figura 4.9 se muestra el gráfico de medias del módulo elástico para todas las 27 formulaciones del diseño experimental según su dependencia respecto a la relación fibroína/PVA, la proporción fibroína:glicerol, y la proporción PVA:glutaraldehído respectivamente, en ésta se puede notar que el módulo elástico no varía significativamente entre las formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40 (%) y 70/30 (%) respectivamente, sin embargo, cuando esta relación pasa a ser 80/20 (%), se puede observar que dicho valor disminuye, por lo tanto, para todas las formulaciones con esta última relación fibroína/PVA los valores del módulo elástico serán menores si se comparan con las otras dos relaciones, lo anterior indica que para esta relación, los materiales formulados serán menos rígidos, y en consecuencia, se deformarán más al mismo valor de esfuerzo si se compara con las otras relaciones fibroína/PVA, este comportamiento se puede explicar debido a la interacción que se forma entre las estructuras moleculares de la fibroína-glicerol-PVA [20, 186] como se esquematizó en la Figura 4.2, donde se observa que las moléculas de glicerol se ubican entre moléculas de fibroína y moléculas de PVA, permitiéndoles interactuar entre ellas a través de puentes de hidrógeno, y separándolas una distancia h , así, cuando esta interacción se induce en materiales poliméricos que tienen cierto grado de entrecruzamiento, su rigidez disminuye, efecto que se ha utilizado previamente por otros autores para lograr materiales con un balance deseado entre dichas propiedades por inducción de puentes de hidrógeno [185], de este modo, para el sistema de estudio de este proyecto, un aumento en la concentración de glicerol en el sistema lleva a un mayor porcentaje de puentes de hidrógeno entre el PVA y la fibroína, y los grupos hidroxilo relacionados con esta interacción permiten una separación más amplia entre ambas cadenas (valores de h más altos), por lo tanto, el movimiento de ambas cadenas

resulta más fácil y fluido, generando materiales menos rígidos[20]. Además de lo anterior, la Figura 4.9c demuestra que a lo largo de todo el diseño experimental, la adición de glutaraldehído prácticamente no afecta esta variable de respuesta, por lo que se puede considerar que la adición de este entrecruzante tendrá un afecto prácticamente nulo sobre la rigidez final del material.

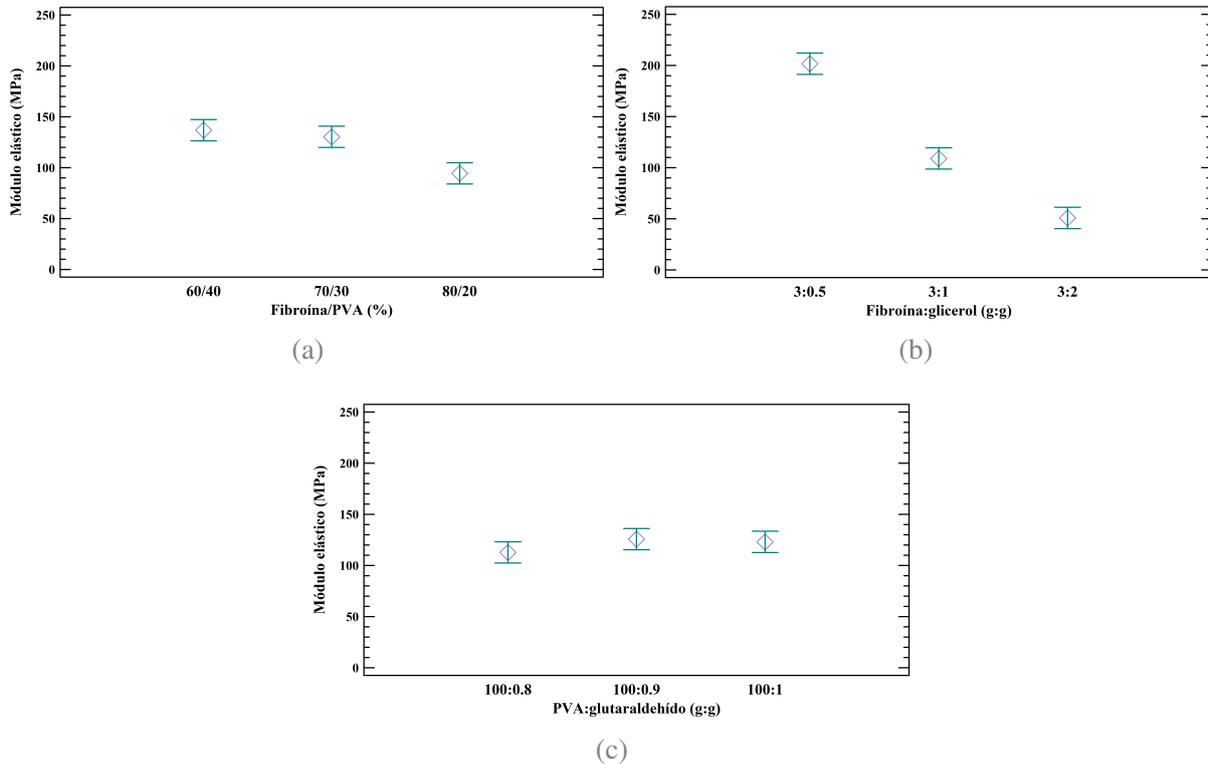


Figura 4.9: Gráfico de medias para el módulo elástico donde se representa la dependencia respecto a la relación fibroína/PVA (a), proporción fibroína:glicerol (b), y proporción PVA:glutaraldehído

Basado en lo anterior, se concluye que, al rededor de todo el diseño experimental, el factor que más influye sobre el módulo elástico, y por lo tanto sobre la rigidez de los materiales, es la proporción fibroína:glicerol ya que los aumentos sucesivos de este plastificante genera separaciones más altas entre las cadenas de fibroína y PVA, lo que facilita la movilidad entre éstas y genera materiales menos rígidos.

Una vez analizados los resultados obtenidos para el módulo elástico de los materiales obtenidos bajo el diseño experimental, se procederá a mostrar los resultados para el límite elástico, el cual corresponde al valor máximo de esfuerzo que puede soportar un material sin sufrir deformaciones permanentes, y que se encuentra en el límite de la región lineal de las curvas esfuerzo vs deformación mostradas en la Figura 4.5, para las cuales, el análisis de varianza se muestra en la Tabla 4.7, en la que se observa que el límite elástico depende con significancia estadística de la proporción fibroína:glicerol ($P= 0.0000$), y de las interacciones de factores fibroína:glicerol - PVA:glutaraldehído ($P= 0.0008$), y fibroína/PVA - fibroína:glicerol ($P= 0.0015$), razón por la que el límite elástico de los materiales depende, en principio, de los tres

factores del diseño experimental, sin embargo, al igual que sucedió para el módulo elástico, los valores de la suma de cuadrados observados en la Tabla 4.7 muestran que el aporte de las interacciones de factores previamente mencionadas tienen un valor poco significativo sobre la variable de respuesta, lo que sugiere que el límite elástico de los materiales formulados depende fuertemente de la cantidad de glicerol que se utilice, y que en los rangos trabajados para los demás factores es poco significativo, destaca además, que esta variable de respuesta no depende de la relación fibroína/PVA como se muestra en la Figura 4.10a.

Límite elástico	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrática	F	Valor P
Efectos Principales					
A:Fibroína/PVA	13.4303	2	6.7152	2.34	0.1345
B:PVA:Glutaraldehído	9.9819	2	4.9910	1.5400	0.2223
C:Fibroína:Glicerol	675.2140	2	337.6070	104.2200	0.0000
Interacciones					
AB	70.7731	4	17.6933	5.4600	0.0008
AC	64.3304	4	16.0826	4.9600	0.0015
BC	18.4097	4	4.6024	1.4200	0.2377
RESIDUAL	200.8480	62	3.2395		
TOTAL (Corregido)	1052.9900	80			
Supuestos ANOVA	Prueba estadística				Valor P
Normalidad de residuos	Kolmogorov-Smirnov				0.0595
Igualdad de varianzas	Levene				0.1780
Independencia de residuos	Durbin-Watson				1.9993

Tabla 4.7: Tabla ANOVA y validación de supuestos para el límite elástico

Los resultados anteriores, encuentran su explicación debido a la formación de interacciones intermoleculares por puentes de hidrógeno que se dan entre cadenas de fibroína y PVA, las cuales son inducidas por el glicerol, este tipo de interacciones ha sido estudiado en diversas ocasiones, y se ha encontrado que la adición de glicerol como plastificante induce una alta movilidad entre los diferentes componentes de un material [196], y como consecuencia, la resistencia del mismo a los esfuerzos es menor dado que el glicerol interrumpe las interacciones intermoleculares entre moléculas de PVA, y favorece las interacciones fibroína-glicerol-PVA, las cuales se pueden considerar “*enlaces de sacrificio*”(…), como lo reportan Xiaobo Hu et. al [186], y algunos otros autores, los cuales recurren a la formación de enlaces de hidrógeno entre diferentes capas de un material utilizando sustancias como poliácridamidas [193], ácido metacrílico [185] y diaminotriazina [167] para lograr efectos similares en las propiedades mecánicas de sus materiales, de este modo, cuando la cantidad de glicerol aumenta en el material, su capacidad de soportar esfuerzos sin sufrir deformaciones permanentes será menor dada la alta movilidad que tendrán las moléculas de fibroína y PVA, lo que hará que sea más difícil que vuelvan a la configuración estructural previa al esfuerzo aplicado.

En conclusión, a pesar de que el módulo elástico y el límite elástico muestran alguna dependencia estadística respecto a la relación fibroína/PVA, y la proporción

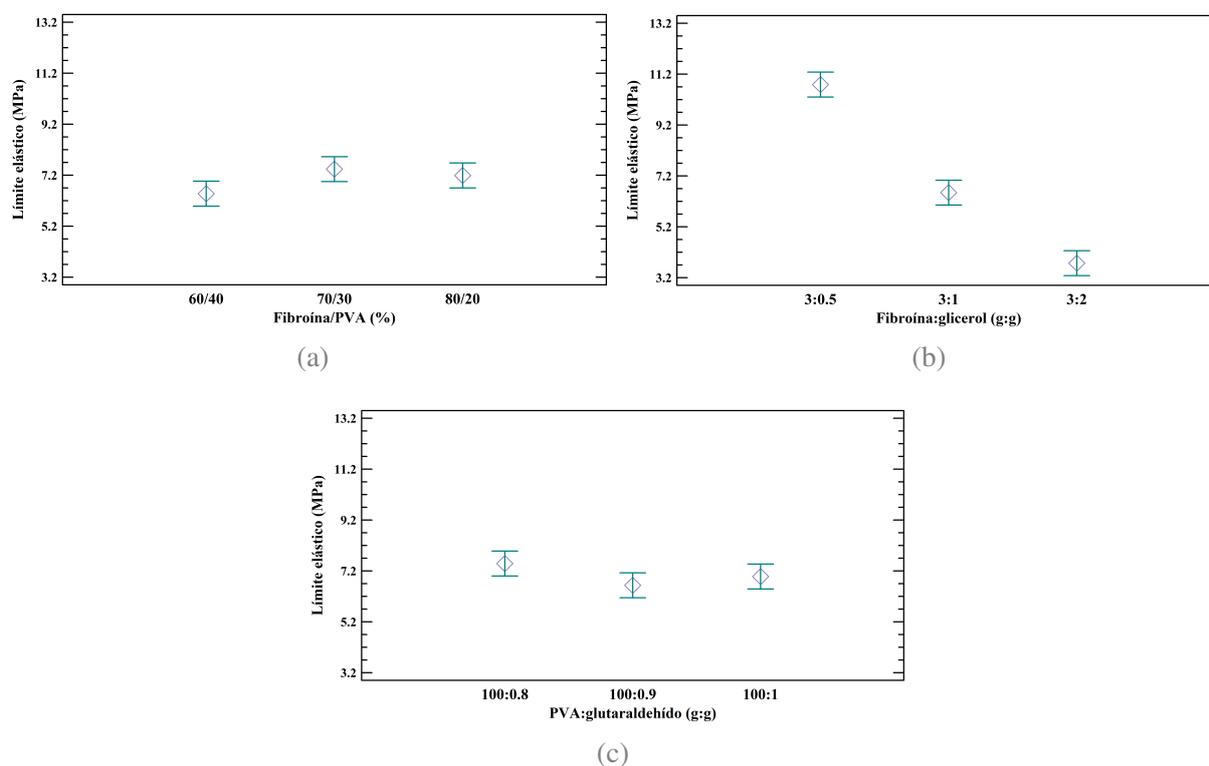


Figura 4.10: Gráfico de medias para el límite elástico donde se representa la dependencia respecto a la relación fibroína/PVA (a), proporción fibroína:glicerol (b), y proporción PVA:glutaraldehído

PVA:glutaraldehído, estos efectos solo son notorios en las interacciones entre estos y otros factores en el modelo matemático del análisis de varianza, y por lo tanto, este efecto es poco significativo si se compara con el efecto generado por la adición de glicerol sobre ambas variables, de este modo, teniendo en cuenta que la presencia de este plastificante induce un aumento de las interacciones intermoleculares por puentes de hidrógeno del tipo fibroína-glicerol-PVA, a medida que la concentración de éste aumenta en las formulaciones, la distancia entre fibroína y PVA aumenta, generando una alta movilidad entre estas cadenas, lo que genera materiales menos rígidos como lo demuestra el comportamiento del módulo elástico, el cual varía en promedio desde 201.74 ± 7.36 MPa hasta 50.81 ± 7.36 MPa para las proporciones fibroína:glicerol 3:0.5 (g:g) y 3:2 (g:g) respectivamente a lo largo de todo el diseño experimental, y a su vez, reduce la capacidad de los materiales de soportar esfuerzos sin sufrir deformaciones permanentes como se observa en los resultados para el límite elástico a estos mismos valores de proporción fibroína:glicerol, los cuales varían desde 10.79 ± 0.35 MPa hasta 3.76 ± 0.35 MPa ² al rededor de todo el diseño experimental. ³

²En la Tabla 2.1 se muestran algunos valores de referencia de propiedades mecánicas medidas por diferentes autores sobre tejidos, además de esto, en la Tabla 4.13 disponible al final del capítulo se muestran algunos valores tanto de tejidos nativos como de dispositivos fabricados por otros autores, los cuales servirán de referencia para las potenciales aplicaciones de los materiales fabricados

³Las desviaciones estándar reportadas en estas comparaciones corresponden a la medida de variabilidad de muestreo, razón por la cual estos valores son iguales con un 95 % de confianza

4.3.2.2. Resistencia a la tracción

Una vez un material ha superado su zona elástica, comenzará la zona de deformaciones plásticas, la cual se caracteriza porque el material adquiere deformaciones permanentes hasta llegar a su deformación máxima de ruptura, en esta zona, se puede encontrar la resistencia a la tracción de un material, la cual corresponde al esfuerzo máximo al cual el material puede someterse antes de comenzar a romperse, de este modo, basado en los resultados mostrados en la Figura 4.5 y el análisis de varianza mostrado en la Tabla 4.8, se observa que la resistencia a la tracción de los materiales formulados depende con significancia estadística de la proporción fibroína:glicerol ($P= 0.0000$) y de las interacciones de factores fibroína/PVA - PVA:glutaraldehído ($P= 0.0005$) y fibroína/PVA - fibroína:glicerol ($P= 0.0192$), teniendo estas interacciones de factores un aporte relativamente pequeño sobre la variación de medias de la resistencia a la tracción al igual que se vio para el módulo elástico y límite elástico, estos resultados se ven con mayor claridad en la Figura 4.11, en la cual se observa que la variación de medias para todo el diseño experimental prácticamente no varía respecto a las relaciones fibroína/PVA (Figura 4.11a) y las proporciones PVA:glutaraldehído (Figura 4.11c), lo que muestra nuevamente que las interacciones intermoleculares entre las cadenas de fibroína y las de PVA a través de puentes de hidrógeno inducidas por la adición de glicerol permite la movilidad de dichas cadenas cuando éstas se someten a esfuerzos, por lo tanto, a medida que el esfuerzo aumenta, el efecto del plastificante superará los efectos de los demás factores, y como consecuencia, el material se romperá a esfuerzos menores como se ha encontrado previamente en otros estudios [99, 193, 196, 197], donde el uso de plastificantes en materiales fibrosos inducen comportamientos mecánicos similares y que, en los resultados obtenidos en este diseño experimental muestran que la resistencia a la tracción cambió desde 14.63 ± 0.44 MPa para las proporciones fibroína:glicerol de 3:0.5 (g:g), hasta 5.44 ± 0.44 MPa para las proporciones fibroína:glicerol de 3:2 (g:g), mientras los cambios en esta variable de respuesta respecto a los demás factores van desde 9.32 ± 0.44 MPa para las relaciones fibroína/PVA de 60/40 (%) hasta 10.00 ± 0.44 MPa para las relaciones fibroína/PVA de 80/20 (%) y desde 10.31 ± 0.44 MPa para las proporciones PVA:glutaraldehído de 100:0.8 (g:g) hasta 9.30 ± 0.44 MPa para las proporciones PVA:glutaraldehído de 100:1 (g:g)⁴, lo que demuestra que el efecto del plastificante es significativamente mayor al efecto de los demás factores debido a que su uso reduce las fuerzas de van der Waals entre las cadenas poliméricas debido al incremento de la movilidad molecular [194], y por o tanto, su resistencia a la tracción será menor.

⁴Las desviaciones estándar reportadas en estas comparaciones corresponden a la medida de variabilidad de muestreo, razón por la cual todos estos valores son iguales con un 95 % de confianza

Resistencia a la tracción	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrática	F	Valor P
Efectos Principales					
A:Fibroína/PVA	9.3925	2	4.6963	0.7400	0.4832
B:PVA:Glutaraldehído	13.6283	2	6.8141	1.0700	0.3500
C:Fibroína:Glicerol	1149.66	2	574.8280	90.0700	0.0000
Interacciones					
AB	148.677	4	37.1692	5.8200	0.0005
AC	81.254	4	20.3135	3.1800	0.0192
BC	54.0213	4	13.5053	2.1200	0.0894
RESIDUAL	395.666	62	6.3817		
TOTAL (Corregido)	1852.29	80			
Supuestos ANOVA		Prueba estadística			Valor P
Normalidad de residuos	Kolmogorov-Smirnov				0.2282
Igualdad de varianzas	Levene				0.3240
Independencia de residuos	Durbin-Watson				1.9870

Tabla 4.8: Tabla ANOVA y validación de supuestos para la resistencia a la tracción

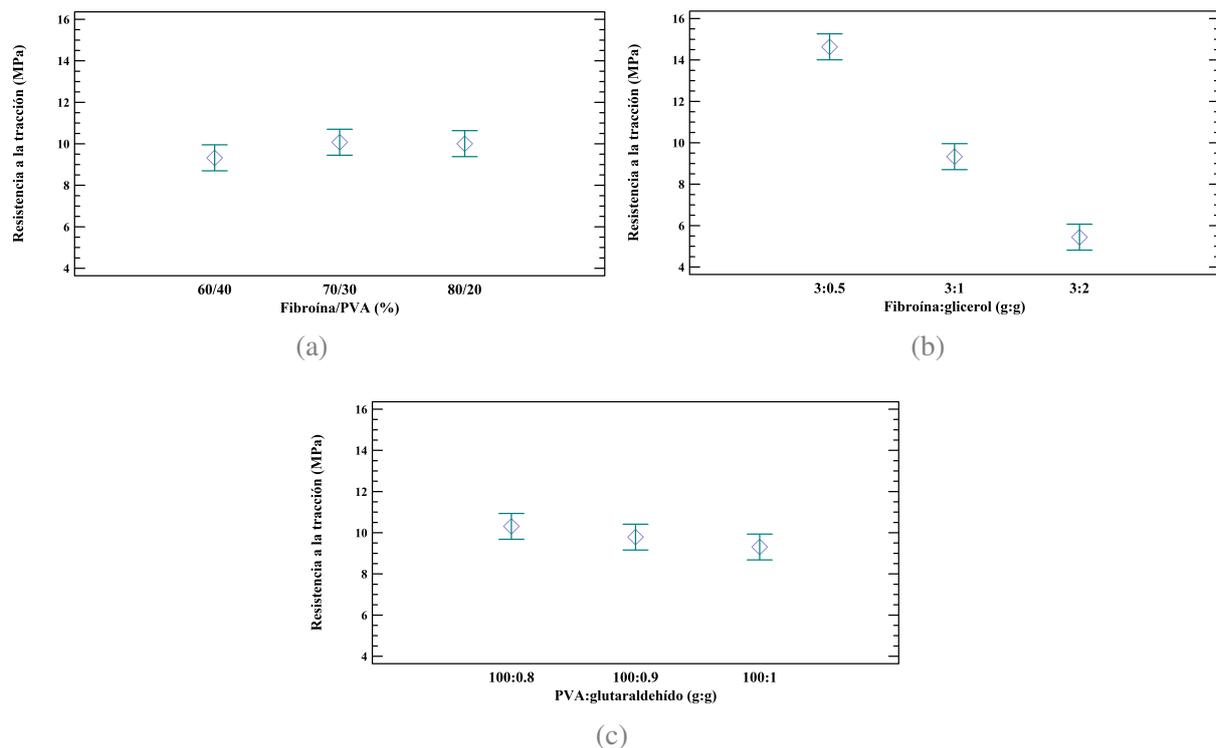


Figura 4.11: Gráfico de medias para la resistencia a la tracción, donde se representa la dependencia respecto a la relación fibroína/PVA (a), proporción fibroína:glicerol (b), y proporción PVA:glutaraldehído

4.3.2.3. Elongación en la ruptura

Luego de que un material pasa por la zona plástica, y ha superado la resistencia a la tracción, éste puede seguir deformándose hasta su ruptura, y el valor de deformación al cual esto se ha dado, se conoce como la elongación en la ruptura, así, según los resultados mostrados en la Figura 4.5 y el análisis de varianza mostrado en la Tabla 4.9, esta variable depende con significancia estadística de la relación fibroína/PVA ($P= 0.0202$), la proporción PVA:glutaraldehído ($P= 0.0000$) y las interacciones de factores fibroína/PVA - PVA:glutaraldehído ($P= 0.003$) y fibroína/PVA - fibroína:glicerol ($P= 0.0000$), razón por la cual, esta propiedad depende con significancia estadística de los tres factores del diseño experimental, siendo la relación fibroína/PVA, y la proporción PVA:glutaraldehído los factores que más influyen en esta variable de respuesta de acuerdo con los resultados de la suma de cuadrados ($SS= 2117.38$ y $SS= 7815.65$ respectivamente), sin embargo, se destaca que las interacciones de factores también influyen de manera significativa sobre la variable de respuesta. El comportamiento de estos resultados difieren bastante de las demás propiedades mecánicas mostradas en secciones anteriores, ya que el efecto del entrecruzante es significativamente mayor comparado con éstas, por lo que los resultados sugieren que el grado de entrecruzamiento logrado en el PVA, y su posterior interacción con las cadenas de fibroína afectaran la capacidad de elongación del material final.

Elongación en la ruptura	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrática	F	Valor P
Efectos Principales					
A:Fibroína/PVA	2117.38	2	1058.6900	4.1600	0.0202
B:PVA:Glutaraldehído	7815.65	2	3907.8200	15.3600	0.0000
C:Fibroína:Glicerol	481.482	2	240.7410	0.9500	0.3938
Interacciones					
AB	6324.81	4	1581.2000	6.2100	0.0003
AC	9623.85	4	2405.9600	9.4600	0.0000
BC	1646.89	4	411.7220	1.6200	0.1809
RESIDUAL	15774.8	62	254.4320		
TOTAL (Corregido)	43784.9	80			
Supuestos ANOVA	Prueba estadística				
Normalidad de residuos	Kolmogorov-Smirnov				0.5493
Igualdad de varianzas	Levene				0.1780
Independencia de residuos	Durbin-Watson				2.3342

Tabla 4.9: Tabla ANOVA y validación de supuestos para la elongación en la ruptura

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 4.12, la elongación en la ruptura para las formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40 (%) aumenta significativamente para aquellas con proporción fibroína:glicerol 3:2 (g:g) según la tendencia mostrada en la Figura 4.12a, y disminuye con el aumento de la proporción PVA:glutaraldehído según la tendencia mostrada en la Figura 4.12b. La explicación de estos resultados radica, por parte de la proporción fibroína:glicerol, en que la movilidad inducida por este plastificante en la formulación del

material polimérico disminuye la fragilidad del mismo, y como consecuencia, el material aumenta su capacidad de estiramiento [196], por su parte, para explicar el comportamiento respecto a la proporción PVA:glutaraldehído, se tiene en cuenta que, cuando la reacción de entrecruzamiento entre el PVA y el glutaraldehído se hace en condiciones normales, y libres de medios ácidos, como las planteadas en este diseño experimental, algunos autores han encontrado que para concentraciones de glutaraldehído inferiores al 5 %, el PVA tiende a tener una estructura tridimensional más compacta a medida que aumenta el porcentaje de este entrecruzante, y por lo tanto, estos materiales tendrán menor capacidad de elongación, por el contrario, cuando las concentraciones de glutaraldehído superan el 5 %, sus moléculas no podrán encontrar fácilmente un espacio óptimo entre las cadenas de PVA para realizar el entrecruzamiento [105, 168], por lo tanto, cuando la concentración de glutaraldehído supera el 5 %, el comportamiento del material cambia respecto a su capacidad de elongación, lo anterior concuerda con los resultados del presente proyecto, ya que las formulaciones planteadas se pensaron para concentraciones de glutaraldehído que varían entre el 0.10 % y el 0.36 %, de este modo, se concluye que, a pesar de que los grados de entrecruzamiento del PVA son relativamente similares, las diferencias entre los diferentes niveles son suficientes para afectar significativamente la capacidad de elongación de los materiales que tienen una relación fibroína/PVA de 60/40 (%).

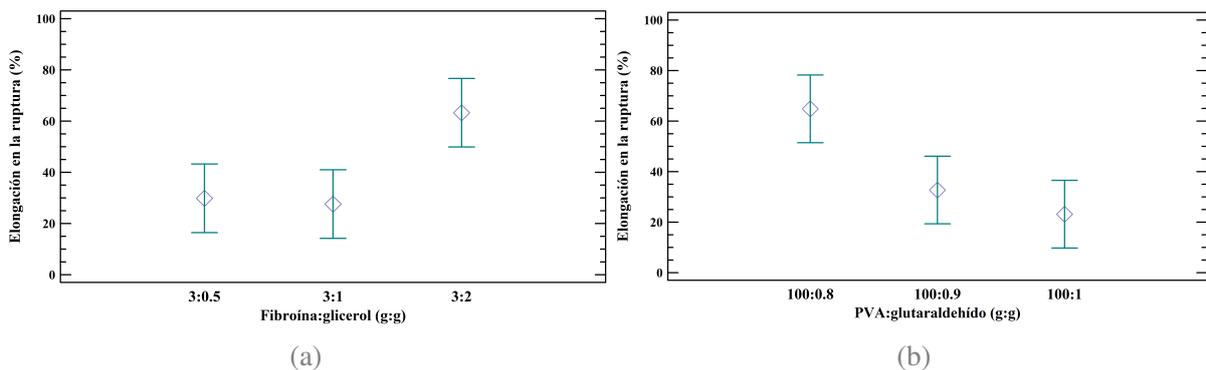


Figura 4.12: Gráfico de medias para la elongación en la ruptura donde se representa la dependencia respecto a la proporción fibroína:glicerol (a) y la proporción PVA:glutaraldehído (b) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40(%)

Cuando se pasa a la relación fibroína/PVA 70/30 (%), se observa que los materiales prácticamente no cambian su capacidad de elongación respecto a la proporción fibroína:glicerol como se muestra en la Figura 4.13a, lo que sugiere que un aumento en la movilidad molecular inducida por la adición de glicerol, no tiene un efecto significativo en la capacidad de elongación de los materiales con esta relación fibroína/PVA, sin embargo, el cambio respecto a la relación fibroína/PVA 60/40 (%) se nota bastante cuando se utiliza la mayor cantidad de glicerol como se observa en las Figuras 4.12a y 4.13a, teniendo un cambio en esta propiedad que varía desde 119.76 ± 20.57 % para la muestra 3, hasta 37.38 ± 12.39 % para la muestra 12, las cuales corresponden a aquellas que usan la menor cantidad de glutaraldehído y mayor cantidad de glicerol para las relaciones fibroína/PVA 60/40 (%) y 70/30 (%) respectivamente, lo que muestra el gran efecto que tiene esta combinación de factores sobre

la capacidad de elongación del material. Por su parte, el comportamiento de esta variable de respuesta respecto a la proporción PVA:glutaraldehído conserva el mismo que se observó en las formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40 (%), sin embargo, destaca que para las formulaciones con la menor proporción PVA:glutaraldehído, los materiales obtienen una disminución considerable en su capacidad de elongación, pasando de aproximadamente 64.83 ± 9.02 (%) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40 (%) hasta 44.62 ± 4.06 (%) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 70/30 (%), lo que muestra que a un mismo nivel de entrecruzamiento, las formulaciones con la mayor cantidad de PVA tienen más capacidad de elongación.

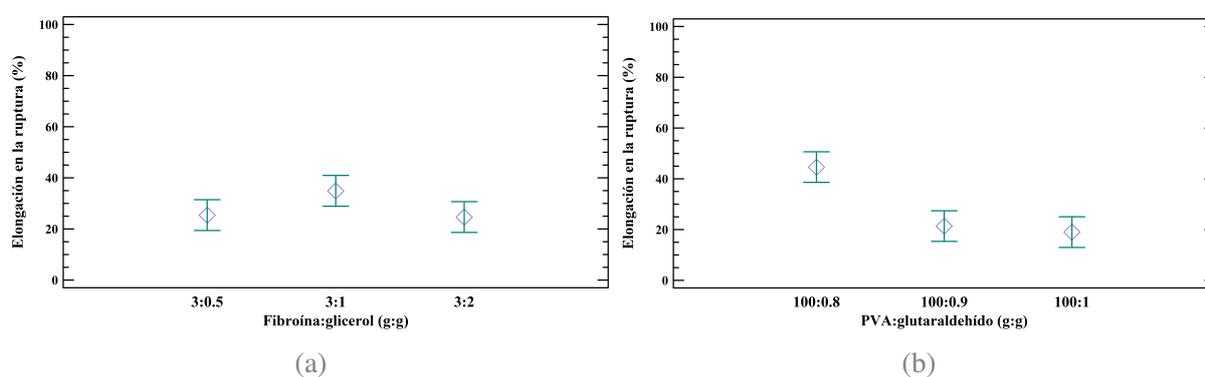


Figura 4.13: Gráfico de medias para la elongación en la ruptura donde se representa la dependencia respecto a la proporción fibroína:glicerol (a) y la proporción PVA:glutaraldehído (b) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 70/30(%)

Finalmente, cuando la relación fibroína/PVA sube hasta 80/20 (%), la elongación de los materiales se comporta de forma aproximadamente constante, como se muestra en la Figura 4.14, donde no se observa un cambio significativo para esta variable respecto a las proporciones fibroína:glicerol y PVA:glutaraldehído respectivamente, sin embargo, las formulaciones con menor cantidad de glutaraldehído siguen siendo las que poseen mayor capacidad de elongación, lo que verifica que los materiales con menor cantidad de entrecruzante van a tener estructuras tridimensionales menos compactas como se mencionó previamente, lo que les dará una mayor capacidad de elongación frente a la aplicación de esfuerzos.

Para observar en conjunto todos los resultados previamente analizados, se comparan las medias para todo el diseño experimental como se muestra en la Figura 4.15, en ésta se observa que la dependencia de la elongación en la ruptura con la relación fibroína/PVA no es del todo clara, sin embargo, la Figura 4.15a muestra que todas las formulaciones con relación fibroína/PVA igual a 60/40 (%) tienen porcentajes de elongación más altos comparados con las relaciones 70/30 (%) y 80/20 (%) respectivamente, no habiendo diferencia estadísticamente significativa entre estas dos últimas relaciones, lo que indica que mayores porcentajes de PVA en la formulación llevará a materiales con un porcentaje de elongación más altos debido a la capacidad de esta sustancia a deformarse [67, 83, 104, 105, 168], además, el uso de glicerol parece no afectar significativamente la capacidad de elongación de los materiales como se observa en la Figura 4.15b, sin embargo, se destaca que para la proporción fibroína:glicerol más alta en las

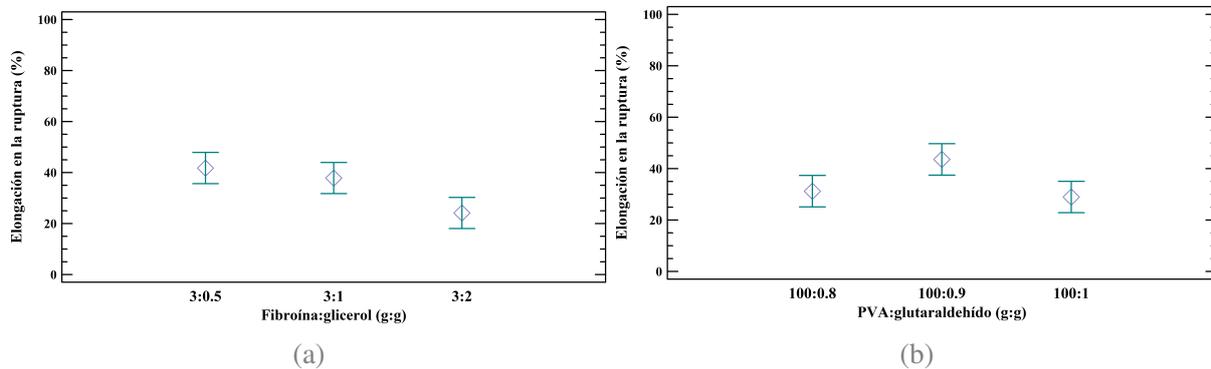


Figura 4.14: Gráfico de medias para la elongación en la ruptura donde se representa la dependencia respecto a la proporción fibroína:glicerol (a) y la proporción PVA:glutaraldehído (b) para las formulaciones con relación fibroína/PVA 80/20 (%)

formulaciones con una relación fibroína/PVA igual a 60/40 (%), el porcentaje de elongación es significativamente mayor que para todos los demás materiales, obteniéndose, por ejemplo, una capacidad de elongación de $119.76 \pm 20.57\%$ para la muestra 3. Finalmente, se concluye que las muestras con las proporciones PVA:glutaraldehído más pequeñas tendrán mayor capacidad de elongación como se muestra en la Figura 4.15c, lo anterior, debido a que para estas concentraciones de glutaraldehído las redes tridimensionales de los polímeros utilizados en las diferentes formulaciones serán menos compactas, y por lo tanto, podrán deformarse más a medida que se les aplica un esfuerzo como han encontrado otros autores [105, 168, 196].

4.3.3. Propiedades superficiales

4.3.3.1. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto de un material da la medida de mojabilidad del mismo respecto a un líquido particular, y a su vez, esta medida de mojabilidad hace referencia a la facilidad que tiene dicho líquido a esparcirse sobre la superficie del material [130, 131], en particular, cuando se habla de biomateriales para ingeniería de tejidos, dicha propiedad es de gran relevancia ya que, como se dijo en la Sección 2.5, los biomateriales deben cumplir con algunas propiedades para que se les considere como biocompatibles, y entre estas propiedades, se ha encontrado que la hidrofiliidad ayuda a la adhesión y proliferación celular [198, 199]. Por otra parte, cuando se trata de materiales para contacto con la sangre, a pesar de que también requieren ser hidrofílicos, se ha encontrado que estos deben tener un balance entre sus dominios hidrofóbicos e hidrofílicos [182, 200], y por lo tanto, es un tipo de aplicación específica que no necesariamente se ve beneficiada por ángulos de contacto extremadamente bajos, y se ha encontrado que el mejor desempeño se da en superficies moderadamente hidrofílicas, con valores de ángulo de contacto en el rango $\theta = 48^\circ - 65^\circ$, ya que en éste se presenta mejor adhesión de células endoteliales,

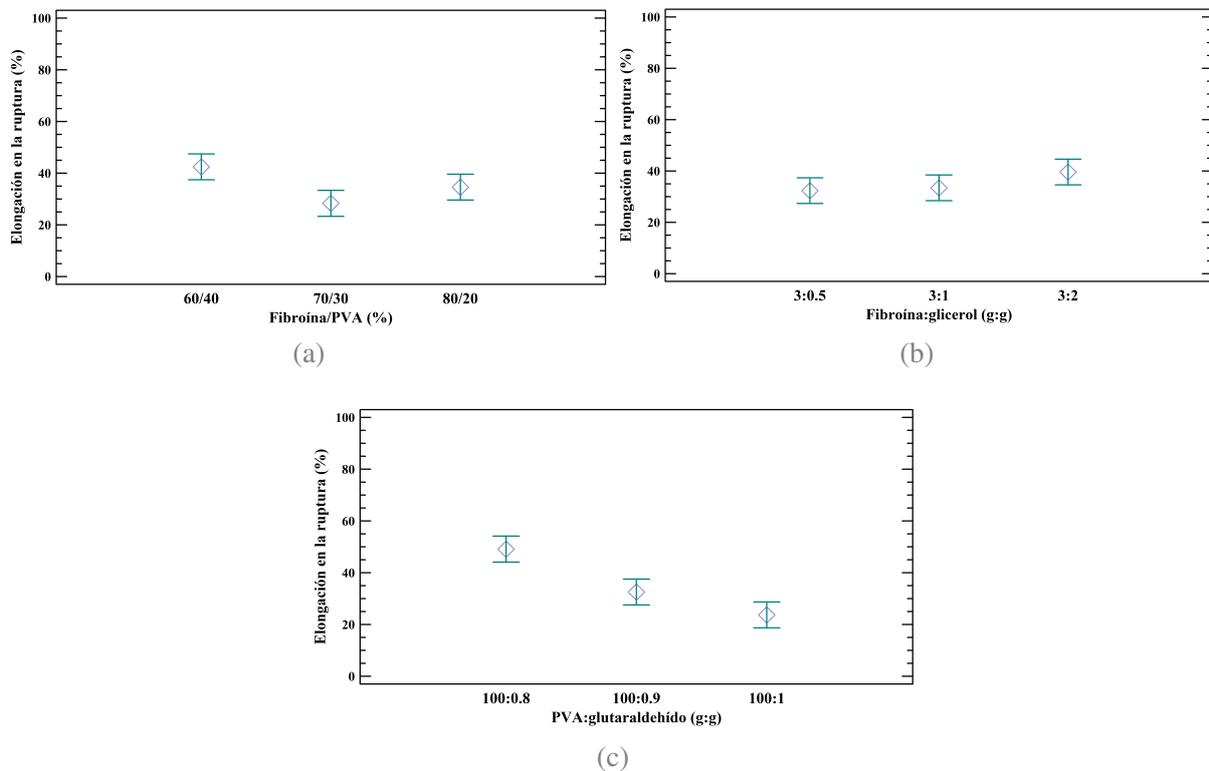


Figura 4.15: Gráfico de medias para la elongación en la ruptura donde se representa la dependencia respecto a la relación fibroína/PVA (a), fibroína:glicerol (b), y PVA:glutaraldehído (c)

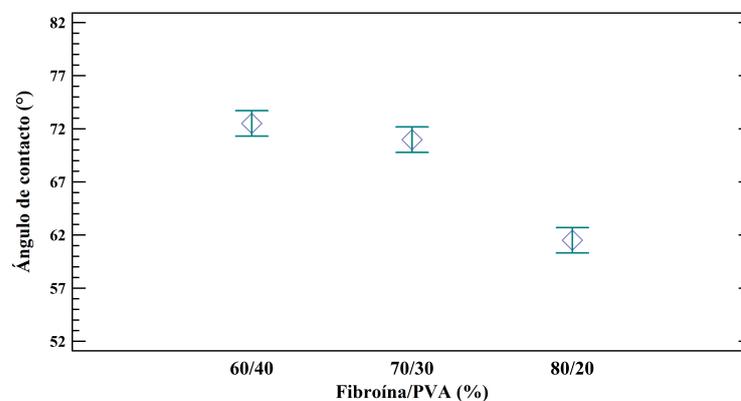
se evita la adsorción de proteínas, y se ve disminuida la coagulación de la sangre que está en contacto con el biomaterial [49, 129, 201].

Los resultados de las mediciones de ángulo de contacto para todas las formulaciones planteadas en el diseño experimental de la Tabla 4.2 se muestran en la Tabla 4.11, el gráfico de medias del ángulo de contacto para todo el diseño experimental respecto a cada uno de los factores analizados se muestra en la Figura 4.16, además, la evidencia fotográfica de estas mediciones se muestran en la Figura 4.17, finalmente, el análisis de varianza y las validaciones de los supuestos para dicho análisis estadístico se muestra en la Tabla 4.10.

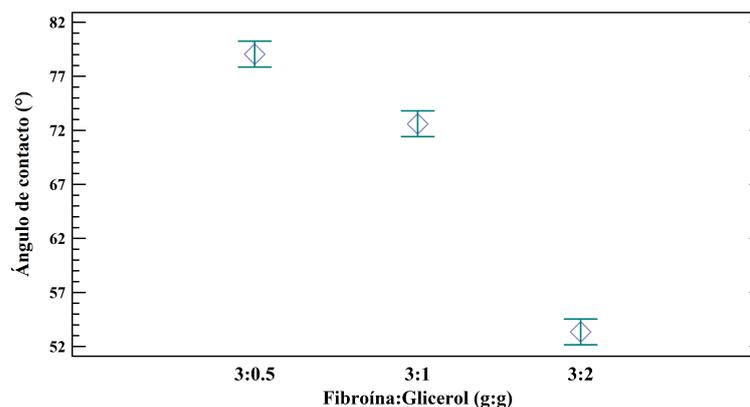
Ángulo de contacto	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrática	F	Valor P
Efectos Principales					
A:Fibroína/PVA	1918.61	2	959.3070	32.5000	0.0000
B:PVA:Glutaraldehído	1192.57	2	596.2830	20.2000	0.0000
C:Fibroína:Glicerol	9655.18	2	4827.5900	163.5600	0.0000
Interacciones					
AB	1104.65	4	276.1620	9.3600	0.0000
AC	602.006	4	150.5010	5.1000	0.0013
BC	251.148	4	62.7870	2.1300	0.0880
RESIDUAL	1829.93	62	29.5150		
TOTAL (Corregido)	16554.1	80			
Supuestos ANOVA	Prueba estadística				
Normalidad de residuos	Kolmogorov-Smirnov				0.9844
Igualdad de varianzas	Levene				0.8340
Independencia de residuos	Durbin-Watson				2.1826

Tabla 4.10: Tabla ANOVA para el ángulo de contacto

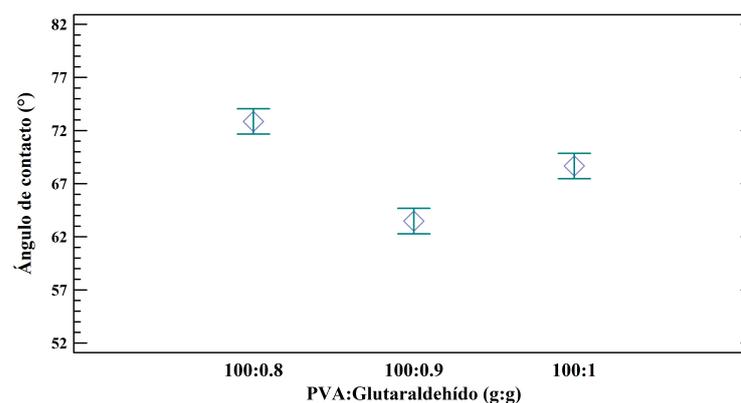
Muestra	Ángulo de contacto (°)
1	90.77 ± 9.99
2	76.00 ± 4.32
3	61.03 ± 1.91
4	79.83 ± 2.72
5	76.20 ± 2.72
6	52.83 ± 9.26
7	84.2 ± 5.28
8	77.20 ± 2.55
9	56.10 ± 0.26
10	74.97 ± 3.92
11	85.60 ± 1.51
12	59.07 ± 4.96
13	80.10 ± 3.66
14	67.53 ± 2.27
15	37.83 ± 4.05
16	94.37 ± 4.72
17	80.73 ± 4.25
18	58.60 ± 8.07
19	78.53 ± 1.51
20	67.57 ± 3.76
21	62.17 ± 3.07
22	65.57 ± 1.70
23	64.90 ± 2.00
24	46.47 ± 3.23
25	64.67 ± 3.80
26	57.67 ± 3.16
27	46.00 ± 2.81



(a)



(b)



(c)

Tabla 4.11: Ángulo de contacto para todas las formulaciones planteadas en el diseño experimental mostrado en la Tabla 4.2

Figura 4.16: Gráficos de medias para el ángulo de contacto respecto a los factores del diseño experimental (a); Relación fibroína/PVA, (b); Proporción fibroína:glicerol, (c); Proporción PVA:Glutaraldehído



Figura 4.17: Fotografías de las mediciones de ángulo de contacto para todas las formulaciones planteadas en el diseño experimental mostrado en la Tabla 4.2

De acuerdo con el análisis de varianza mostrado en la Tabla 4.10, el ángulo de contacto de las formulaciones depende de los tres factores estudiados en el diseño experimental ($P= 0.0000$), por lo tanto, cada uno de ellos tiene un efecto en esta variable de respuesta. En la Figura 4.16a se puede observar que para la relación fibroína/PVA, el ángulo de contacto tiene tendencia a disminuir a medida que aumenta la cantidad de fibroína en las formulaciones, el mismo comportamiento se presenta para la proporción fibroína:glicerol (Figura 4.16b).

En la siguiente sección, correspondiente al análisis por microscopía electrónica de barrido, se mostrará que las formulaciones con la proporción fibroína:glicerol más pequeña (3:0.5), tienden a producir materiales más heterogéneos y rugosos, y por lo tanto, presentarán un ángulo de contacto mayor como consecuencia de dicha rugosidad, ya que el esparcimiento del agua sobre la superficie de estos materiales se verá afectado como consecuencia de estas irregularidades topográficas, haciendo que estas superficies sean más hidrofóbicas [130, 131], por otra parte, en el caso de un aumento en la cantidad de fibroína, los resultados sugieren nuevamente que el aumento de las interacciones de hidrógeno tiene un impacto directo en las propiedades superficiales del material, en este caso, el glicerol permite que hayan interacciones entre las cadenas de PVA y las cadenas de fibroína, permitiéndoles tener configuraciones estructurales extendidas como se ha encontrado en otros estudios [201], y como consecuencia, estas cadenas tendrán más grupos hidrofílicos expuestos en la superficie, por lo tanto, el ángulo de contacto de estas muestras será menor.

Finalmente, como se observa en la figura 4.16c, la dependencia del ángulo de contacto respecto a la proporción PVA:glutaraldehído no es del todo clara, lo anterior puede indicar que en las proporciones estudiadas en el diseño experimental los grados de entrecruzamiento pueden ser similares, y por lo tanto, a pesar de que este factor afecta la variable de respuesta, su contribución a la hidrofiliidad de los materiales es prácticamente nula, y por lo tanto, el ángulo de contacto se verá mayoritariamente afectado por aumentos sucesivos en la cantidad de fibroína o de glicerol que se adicione al material, de este modo, para verificar este comportamiento, a continuación se analizarán los resultados de los perfiles de degradación de acuerdo con el diseño experimental planteado en la Tabla 4.4.

4.3.3.2. Microscopía electrónica de barrido

Como se observó en la Sección 4.3.1, la adición de glicerol induce interacciones intermoleculares entre cadenas de fibroína y PVA ya que la presencia de esta sustancia promueve la formación de enlaces de hidrógeno entre estas cadenas poliméricas como se modeló en la Figura 4.2, además de esto, se planteó que el incremento de estas interacciones podría afectar la homogeneidad del material final, por lo tanto, con el fin de verificar este comportamiento cuando se incrementa la proporción fibroína:glicerol, se observaron por microscopía electrónica de barrido las muestras resultantes del diseño experimental planteado en la Tabla 4.3, para ello, se tomó como blanco la base de la formulación sin glicerol, así, todas las muestras de este diseño experimental y el blanco fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido y luego comparadas. Las muestras analizadas se enumeraron igual que en la Tabla 4.2 con el fin

de facilitar la lectura de los resultados y mantener homogeneidad en la nomenclatura.

En la Figura 4.18 se muestran las micrografías para la muestra que se usó como blanco, en ésta se observa como la ausencia del glicerol resulta en un sistema con dos fases identificables y con una estructura topográfica irregular, este resultado confirma que en una mezcla fibroína/PVA, ambas sustancias tienden a separarse por acción de las fuerzas intermoleculares entre cadenas homónimas.

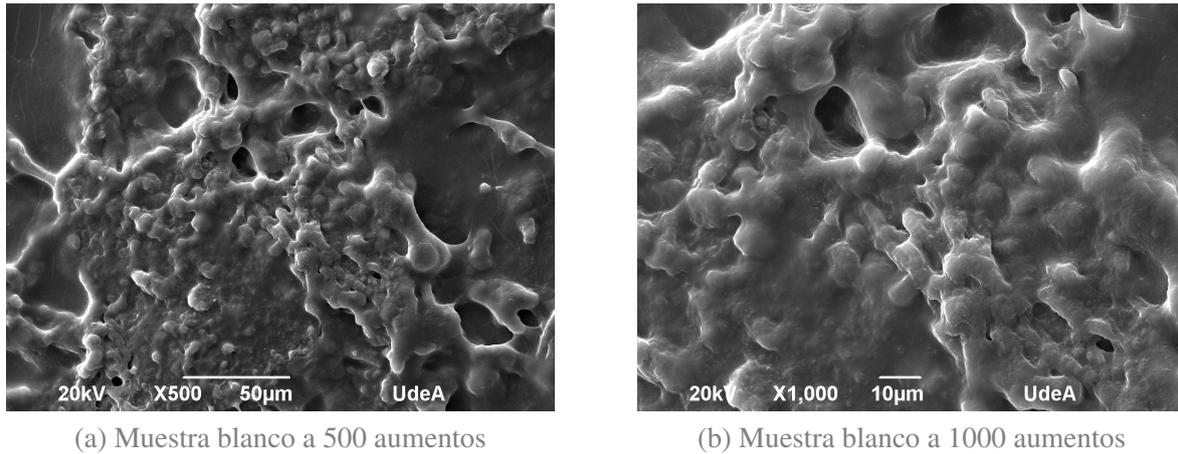
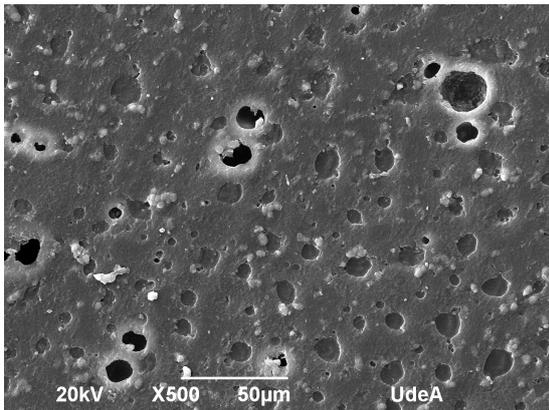
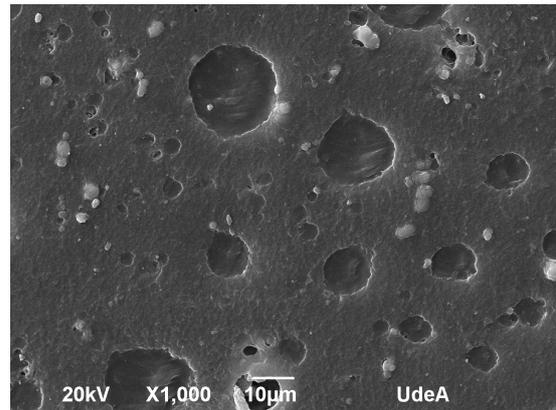


Figura 4.18: Micrografías SEM para la muestra blanco a 500 aumentos (a) y 1000 aumentos (b).

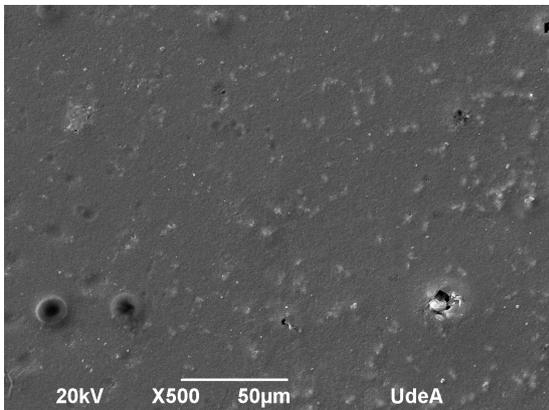
Por otra parte, en la Figura 4.19 se muestran las micrografías para las formulaciones con relación fibroína/PVA 60/40 (%), en ésta se observa que la muestra con la menor proporción fibroína:glicerol, equivalente a 3:0.5 (g:g) (Figuras 4.19a y 4.19b), tiende a colapsar y a separarse, aunque en fases más difíciles de identificar respecto al blanco, este comportamiento cambia cuando se aumenta la proporción fibroína:glicerol a 3:1 (g:g) (Figuras 4.19c y 4.19d) y 3:2 (g:g) (Figuras 4.19e y 4.19f) respectivamente, teniendo estas últimas una homogeneidad más notoria comparada con las otras dos proporciones fibroína:glicerol, del mismo modo, un comportamiento similar se observa para las muestras con relaciones fibroína/PVA 70/30 (%) y 80/20 (%) respectivamente como se muestra en las Figuras 4.20 y 4.21, donde las muestras con proporciones de fibroína:glicerol equivalente a 3:0.5 (g:g) (Figuras 4.20a, 4.20b, 4.21a y 4.21b) muestran una leve separación de fases y la misma tendencia al colapso del material que se observó para las muestras con relación fibroína/PVA 60/40 (%), sin embargo, cuando las proporciones fibroína:glicerol aumentan a 3:1 (g:g) y 3:2 (g:g) para todas las relaciones fibroína/PVA, se observa un notable aumento en la homogeneidad de la muestra, por lo tanto, estos resultados permiten concluir que un aumento en las interacciones de hidrógeno entre las cadenas de fibroína y PVA, consecuencia de la adición de glicerol a las formulaciones, lleva a materiales superficialmente más homogéneos, lo que ayuda a explicar la disminución en el ángulo de contacto respecto al aumento en la proporción fibroína:glicerol que se mostró en la sección anterior, ya que se espera que el aumento en la homogeneidad del material genere superficies más hidrofílicas.



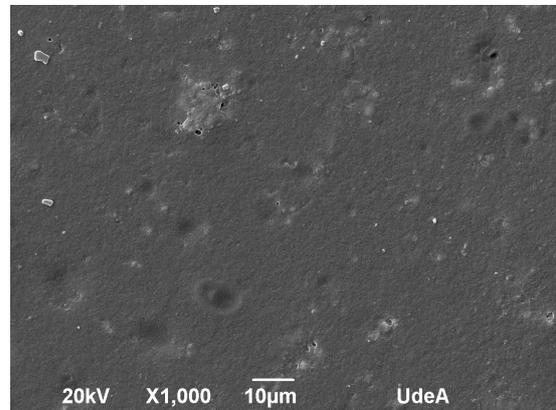
(a) Muestra 1 a 500 aumentos



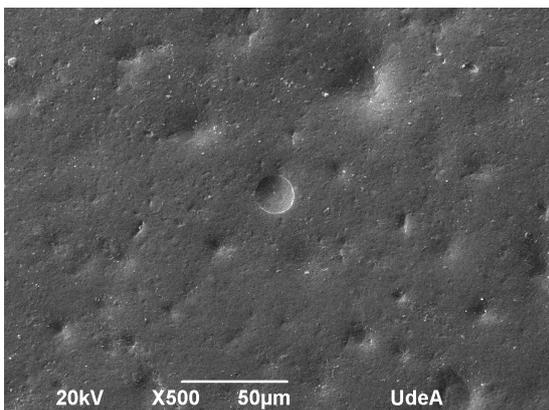
(b) Muestra 1 a 1000 aumentos



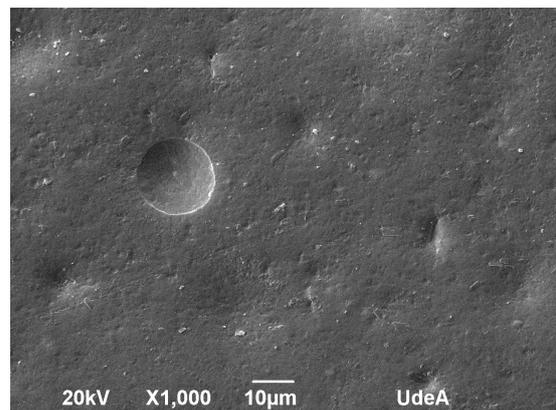
(c) Muestra 2 a 500 aumentos



(d) Muestra 2 a 1000 aumentos

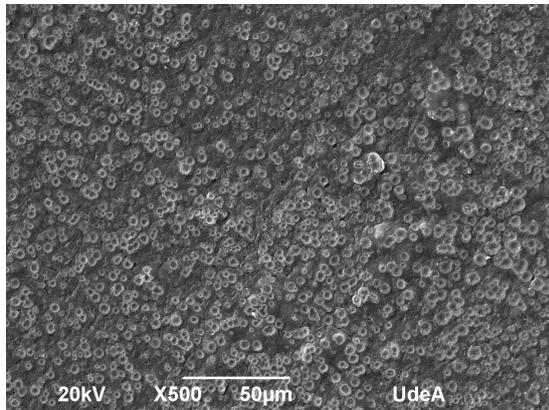


(e) Muestra 3 a 500 aumentos

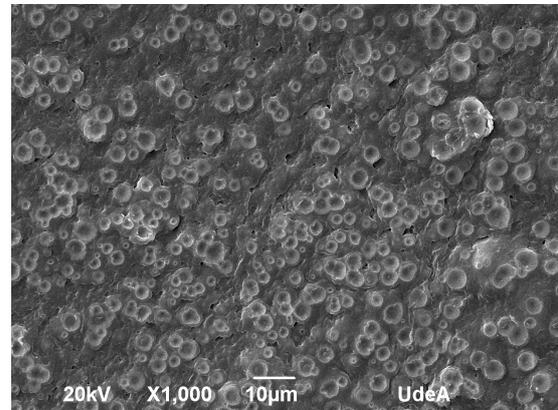


(f) Muestra 3 a 1000 aumentos

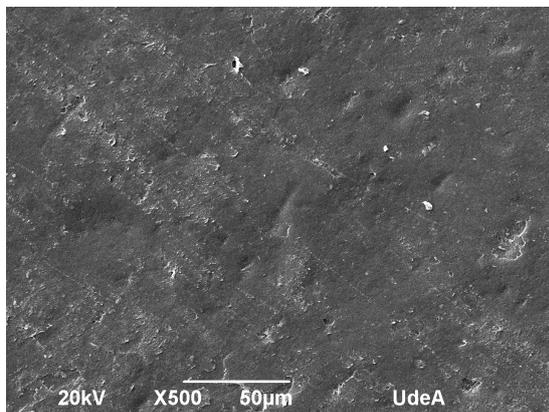
Figura 4.19: Micrografías SEM para las muestras 1, 2 y 3 a 500 y 1000 aumentos.



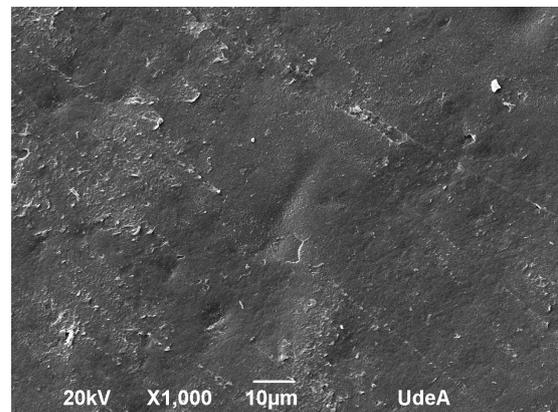
(a) Muestra 10 a 500 aumentos



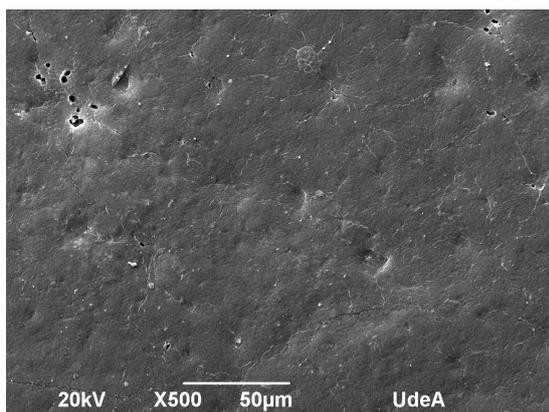
(b) Muestra 10 a 1000 aumentos



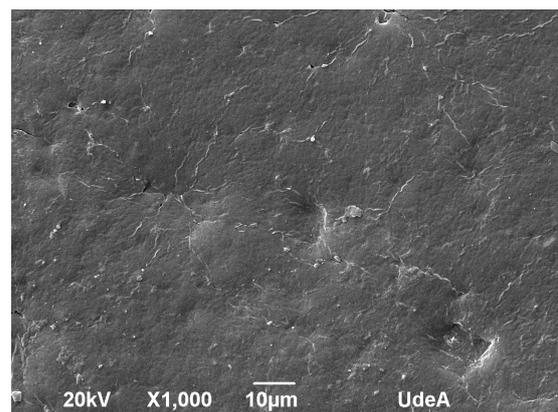
(c) Muestra 11 a 500 aumentos



(d) Muestra 11 a 1000 aumentos

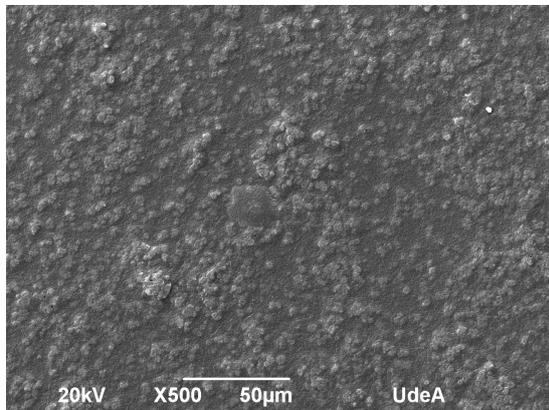


(e) Muestra 12 a 500 aumentos

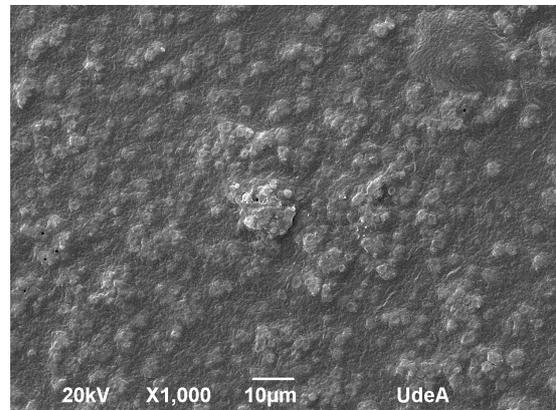


(f) Muestra 12 a 1000 aumentos

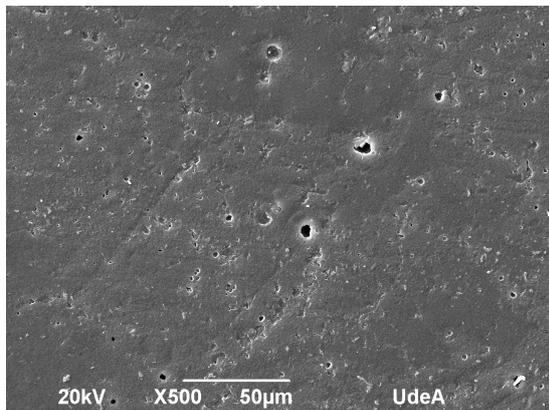
Figura 4.20: Micrografías SEM para las muestras 10, 11 y 12 a 500 y 1000 aumentos.



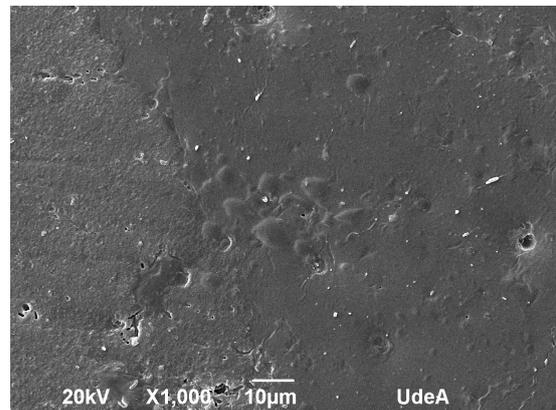
(a) Muestra 19 a 500 aumentos



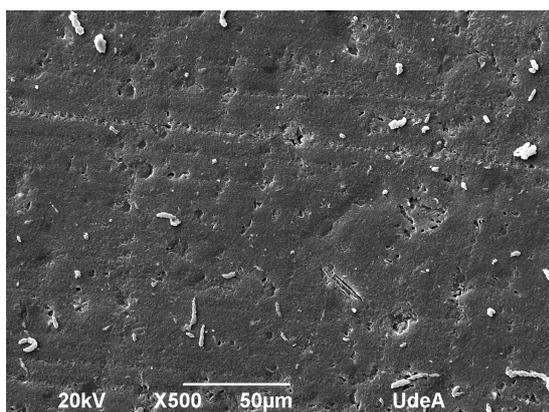
(b) Muestra 19 a 1000 aumentos



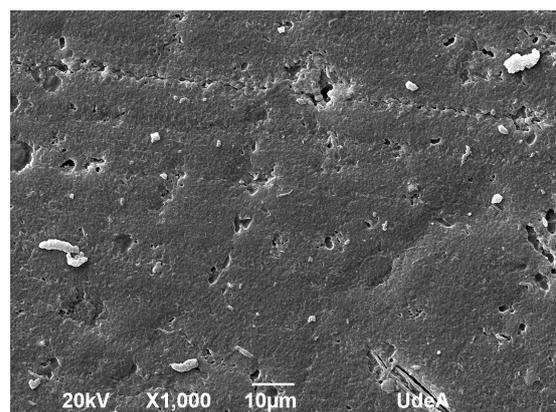
(c) Muestra 20 a 500 aumentos



(d) Muestra 20 a 1000 aumentos



(e) Muestra 21 a 500 aumentos



(f) Muestra 21 a 1000 aumentos

Figura 4.21: Micrografías SEM para las muestras 19, 20 y 21 a 500 y 1000 aumentos.

4.3.4. Perfiles de degradación

En la Sección 4.3.3.1 se encontró que la variabilidad del ángulo de contacto respecto a la proporción PVA:glutaraldehído no era del todo clara, y se planteó que el comportamiento mostrado en la Figura 4.16c posiblemente se debía a que los grados de entrecruzamiento logrados en el diseño experimental planteado para esta variable eran similares para todas las proporciones PVA:glutaraldehído, de este modo, para verificar dicha hipótesis, y basado en que varios estudios han encontrado que los tiempos de degradación de un material dan idea del grado de entrecruzamiento del mismo [85, 105, 183], se planteó el diseño experimental mostrado en la Tabla 4.4, en el que se dejó fijo el valor de la proporción fibroína:glicerol en 3:2 (g:g), y se variaron la relación fibroína/PVA y la proporción fibroína:glutaraldehído, de este modo, en la Tabla 4.12 se muestra el análisis de varianza y las validaciones de dicho análisis estadístico, los perfiles de degradación de todas las muestras estudiadas se muestran en la Figura 4.22, finalmente, la variación de medias del porcentaje de pérdida respecto a ambos factores de estudio para todo el diseño experimental se muestra en la Figura 4.23.

Degradación	Suma de cuadrados	Df	Media cuadrática	F	Valor P
Efectos Principales					
A:PVA:Glutaraldehído	18.4658	2	9.2329	1.5200	0.2238
B:Fibroína/PVA	623.237	2	311.6180	51.4400	0.0000
Interacciones					
AB	56.342	4	14.0855	2.3300	0.0630
RESIDUAL	508.854	84	6.0578		
TOTAL (Corregido)	25039.3	107			
Supuestos ANOVA	Prueba estadística				
Normalidad de residuos	Kolmogorov-Smirnov				0.3293
Varianza de poblaciones	Levene				0.3860
Independencia de residuos	Durbin-Watson				1.9606

Tabla 4.12: Tabla ANOVA para los perfiles de degradación según el diseño experimental planteado en la Tabla 4.4

De acuerdo con los resultados mostrados en las Figuras 4.22 y 4.23, todas las muestras analizadas en este diseño experimental tienen una pérdida inicial de masa cercana al 35 % en las primeras 24 horas, y luego de esto, ésta se mantiene constante durante todo el tiempo de estudio, además, según el análisis de varianza mostrado en la Tabla 4.12, el porcentaje de pérdida de las muestras se ve afectado solo por la relación fibroína/PVA ($P=0.0000$), estos resultados sugieren nuevamente que en los niveles seleccionados para las formulaciones estudiadas, la cantidad de glutaraldehído utilizado para todas ellas logra grados de entrecruzamientos similares como se muestra en la Figura 4.23b, donde se observa que el porcentaje de pérdida del material es prácticamente el mismo para todas las cantidades de glutaraldehído utilizadas, y por lo tanto, esto ayudaría a explicar el comportamiento encontrado respecto a este factor en la Sección

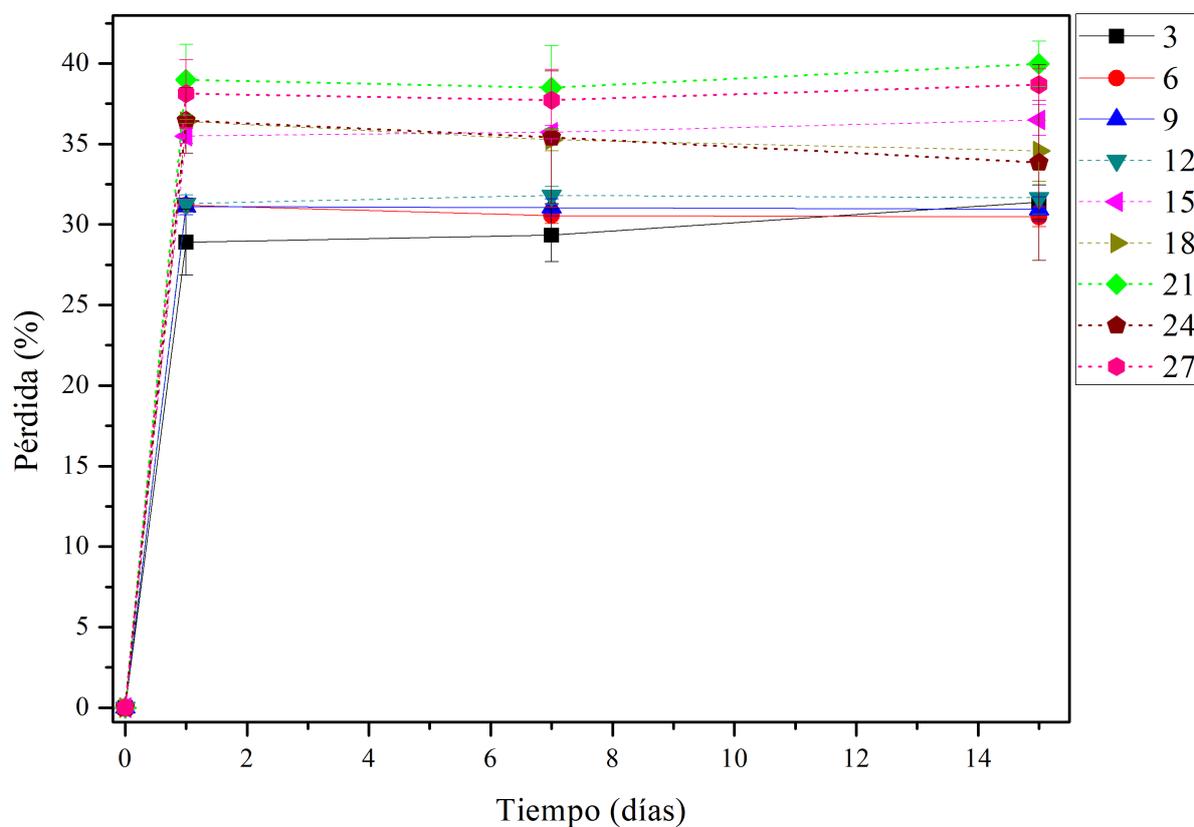


Figura 4.22: Perfiles de degradación para todas las muestras planteadas en el diseño experimental mostrado en la Tabla 4.4

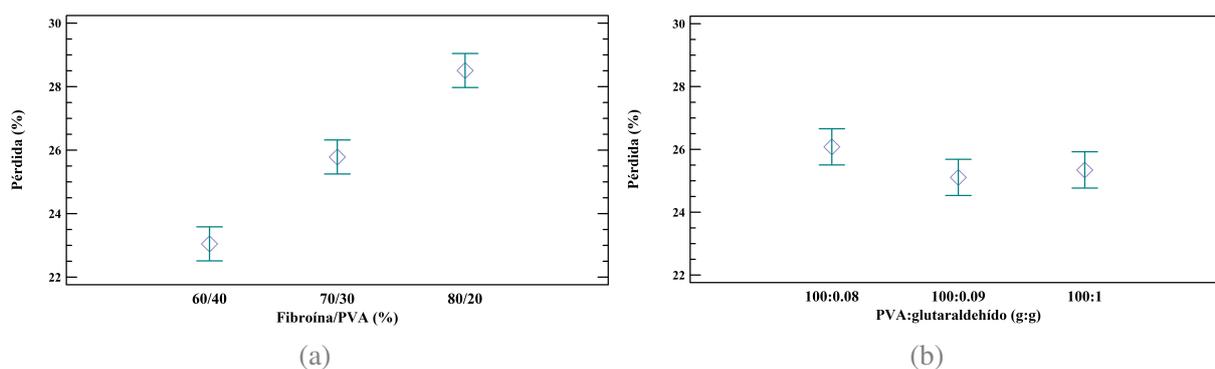


Figura 4.23: Gráfico de medias para el porcentaje de degradación respecto a la relación fibroína/PVA (a) y la proporción PVA:glutaraldehído (b)

4.3.3.1. Por otra parte, cuando se analiza la variación de las medias del porcentaje de pérdida respecto a la relación fibroína/PVA, se observa que a medida que aumenta la cantidad de fibroína, y disminuye la de PVA, el material tiende a tener un porcentaje de pérdida más alto, lo anterior, sumado a los resultados mostrados en el análisis de varianza, demuestra que el

grado de entrecruzamiento del PVA en las formulaciones es bastante similar, lo que da como resultado que la degradación del material no dependa de la proporción PVA:glutaraldehído, sin embargo, cuando hay un aumento en la cantidad del PVA entrecruzado, el material final será más estable a la degradación, de este modo, probablemente la pérdida de masa de los materiales esté relacionada a la cantidad de fibroína ya que se ha encontrado que cuando ésta tiene altos contenidos de láminas β , producto de la solubilización en sistemas ternarios $\text{CaCl}_2:\text{H}_2\text{O}:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, tiende a degradarse más que otras formas de esta proteína [202], por lo que es natural pensar que las muestras con mayor contenido de proteína sea menos estable a la degradación, efecto al cual se suma la degradación natural del PVA sin entrecruzar como han encontrado algunos autores [67, 82, 104, 105, 168], estos resultados explican a su vez la disminución en los ángulos de contacto para las muestras con mayor porcentaje de fibroína, ya que estas muestras tendrán más probabilidades de sufrir degradación oxidativa en medio acuoso, y promoverá la formación de grupos polares en la superficie [131], de este modo, se concluye que las muestras con mayor contenido de PVA entrecruzado, y menos cantidad de fibroína, serán más estables a la degradación, además, en las proporciones trabajadas tanto en el presente diseño experimental, como en el diseño principal (Tabla 4.2) la proporción PVA:glutaraldehído inducirá grados de entrecruzamiento similares para los materiales formulados.

4.3.5. Potenciales aplicaciones de los materiales formulados

Durante las secciones anteriores, se ha hecho un análisis de las propiedades mecánicas, superficiales y de estabilidad a la degradación de las formulaciones planteadas en el diseño experimental mostrado en la Tabla 4.2, en las que se ha encontrado que éstas barren, sobre todo, un amplio espectro de propiedades mecánicas, que a su vez, le pueden brindar una amplia gama de posibilidades al momento de fabricar un conducto vascular artificial [30, 203], y para este propósito, el resumen dichas propiedades se muestran en la Figura 4.24, además de esto, dichos valores se compararán con los mostrados en la Tabla 4.13, en la cual se muestran las caracterizaciones hechas por diferentes autores de algunos tejidos nativos e injertos vasculares artificiales de diferentes materiales, además de lo anterior, en las Figuras 2.6 y 2.7 se muestran los esfuerzos de presión a los que están sometidos los diferentes tipos de conductos vasculares en el cuerpo humano, y el tamaño promedio de los mismos, en éstas se observa que el mínimo y el máximo de esfuerzos de presión a los que están sometidos dichos conductos son de 0.011 MPa y 0.016 MPa respectivamente [25].

Es importante notar que, al igual que varios autores, los materiales formulados en este proyecto presentan un grado de rigidez significativamente mayor a la reportada para los conductos nativos, sin embargo, es de notar también que las mediciones hechas no simulan el comportamiento del cuerpo humano, razón por la cual, se deja como perspectiva el estudio del comportamiento mecánico en algún medio fisiológico simulado como PBS, o luego de incubar el material en dicho medio, ya que se sabe que dichos tratamientos pueden influir significativamente en las propiedades mecánicas medidas [208].

Si se comparan los resultados obtenidos para las propiedades mecánicas de los materiales

Conducto Vascular o injerto artificial	Módulo elástico (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Elongación en la ruptura (%)	Referencia
Arteria coronaria *	1.42	0.027	20.0	C. Van Andel. et. Al [32], Hao-Yang Mi. et. al, [33]
Arteria mamaria interna	1.18	0.1	35.1	Hao-Yang Mi. et. al. [33]
Aorta (L-T)**	0.250 - 0.0567	~ 1.0	~ 100 - 200	Frederick H. et. Al [27]
Carótida (L-T)**	0.188 - 0.0823	~ 1.0	~ 100 - 90	Frederick H. et. Al [27]
Vena Cava (L-T)**	0.319 - 0.191	~ 3.0	~ 100 - 60	Frederick H. et. Al [27]
Arteria carótida ***	0.15 ± 0.04, 0.89 ± 0.27, 0.75 ± 0.29	N/A	N/A	T. Khamdaeng et. al.[34]
Injerto vascular artificial Gore-Tex®	31.61 ± 4.76	14.03 ± 0.72	27.8	Cho Hay Mun et. al. [204]
Scaffold electro hilado de PLLA****, PLLA(APM)/PLLA(BPM), PLLA/PCL***** (5%), PLLA/PCL(10%)	170 ± 7.6, 180 ± 10.1, 68 ± 8.7, 33 ± 7.0	3.7 ± 0.2, 3.8 ± 0.3, 1.8 ± 0.1, 1.0 ± 0.1	40, 10, > 75, >75	Jeffrey J. D. Henry et. al. [205]
Scaffold electro hilado de Ácido poliglicólico, Arteria nativa*	11.8 ± 2.7, 45.1 ± 16.8	1.40 ± 0.25, 6.58 ± 0.97	N/A	Shannon L. M. Dahl et. al. [206]
Injerto vascular artificial Dacron (Poliester)®, colágeno en arteria nativa*	800-900, 1000	N/A	N/A	Charanpreet Singh et. al. [207]

Tabla 4.13: Valores de referencia de algunos conductos vasculares medidos por varios autores. *: Muestras tomadas de pacientes muertos, **: Direcciones longitudinal y transversal del conducto medido respectivamente, ***: Valores correspondientes a las capas del conducto, elastina, elastina-colágeno y fibras de colágeno respectivamente, medidas *in-vivo* utilizando el modelo de resortes paralelos con datos de correlación cruzada 1D en la radiofrecuencia de ultrasonido, ****: Poli - L - Lactida, donde APM y BPM son alto y bajo peso molecular respectivamente. *****: Policaprolactama.

formulados y los reportados en la Tabla 4.13 se puede observar algunos detalles interesantes que podrían dar pistas de las potenciales aplicaciones de estos materiales en términos de la fabricación de injertos vasculares artificiales. Primero, se puede observar que los materiales con una proporción fibroína:glicerol de 3:2 (g:g) son los menos rígidos, con una media de 57.51 ± 11.10 MPa para las formulaciones con relación fibroína/PVA de 60/40 (%), de 66.11 ± 9.36 MPa para las formulaciones con relación fibroína/PVA de 70/30 (%), y de $28. \pm 8.64$ MPa para las formulaciones con relación fibroína/PVA de 80/20 (%), con base en esto, de destaca que los módulos elásticos para las formulaciones con relación fibroína/PVA de 60/40 (%), y proporción fibroína:glicerol 3:2 (g:g) son bastante similares al de una arteria nativa según el reporte de Shannon L. M. Dahl et. al. [206] (45.1 ± 16.8 MPa), por lo que todos los materiales con esta proporción fibroína:glicerol podrían ser utilizados para fabricar arterias artificiales desde el punto de vista de su rigidez. Se resalta también que las otras proporciones fibroína:glicerol resultan menos rígidas que los materiales fabricados por Jeffrey J. D. Henry et. al. [205], los cuales reportan un módulo elástico que varía entre 68 y 180 MPa, razón por lo cual, dispositivos similares pueden ser fabricados por electrohilado y posteriormente caracterizar el efecto de este proceso en las propiedades mecánicas de los materiales.

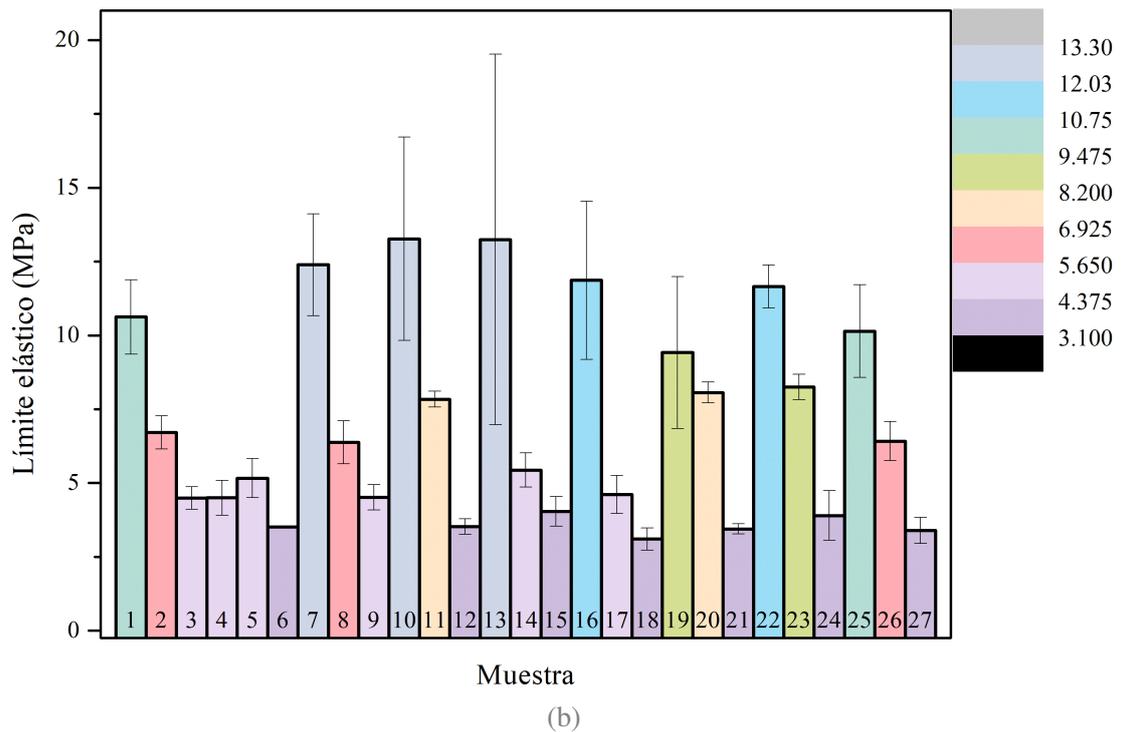
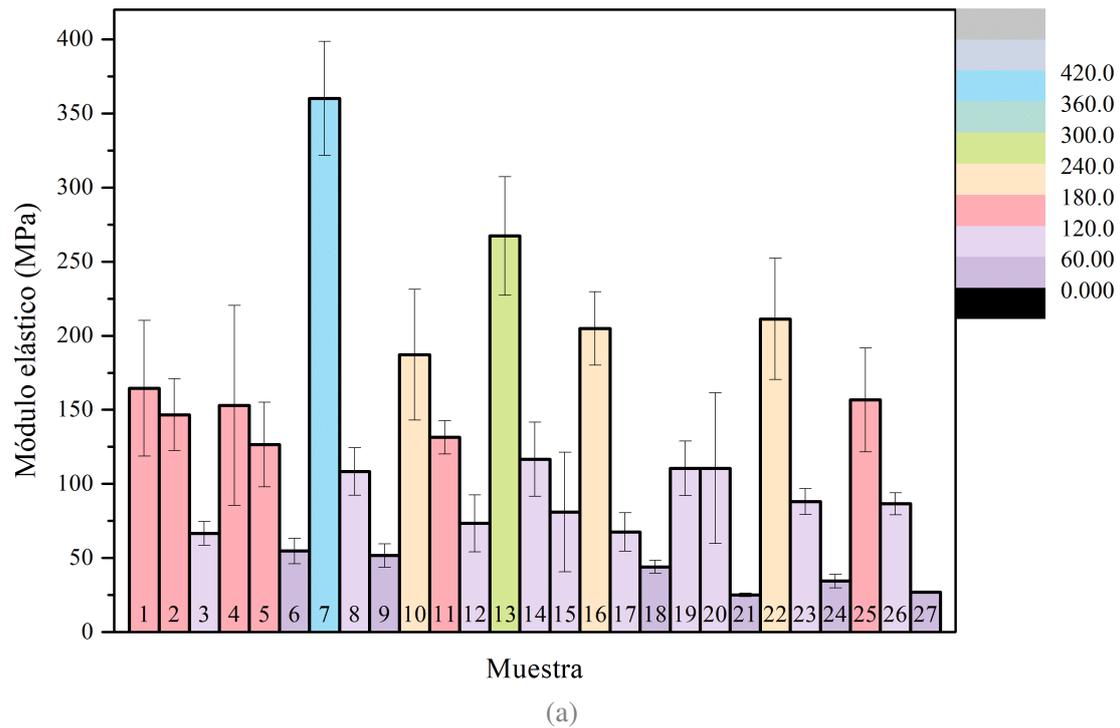


Figura 4.24: Gráficos de barras para todas las propiedades mecánicas medidas en el diseño experimental mostrado en la Tabla 4.2 (Primera parte)

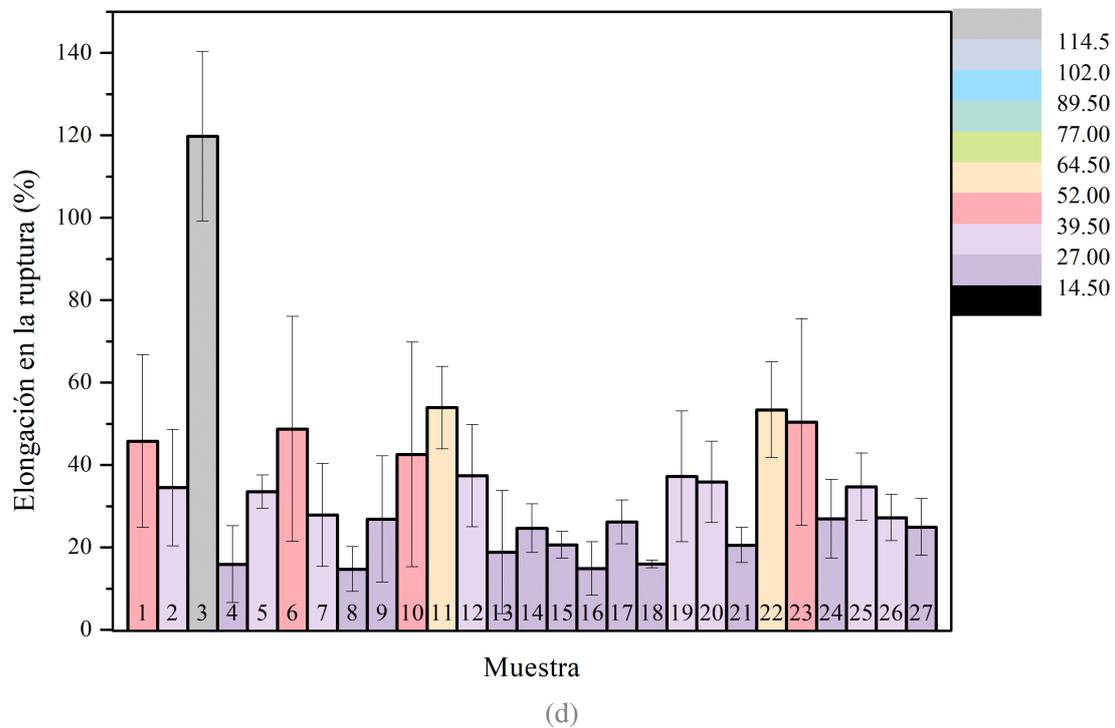
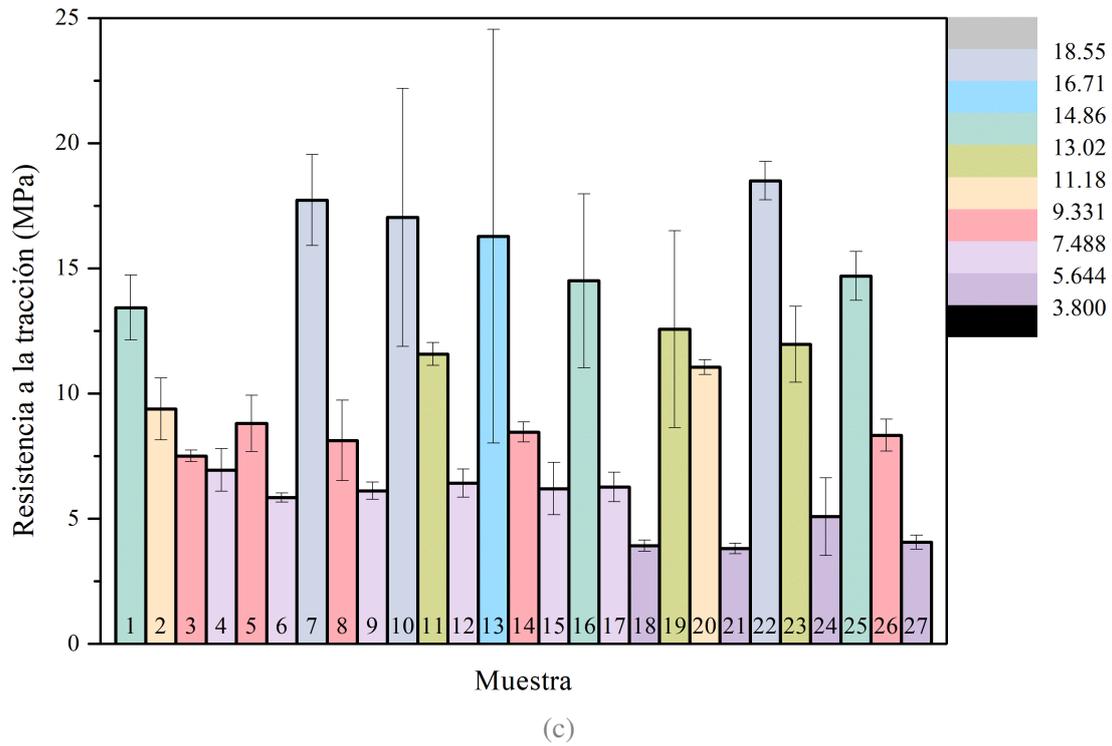


Figura 4.24: Gráficos de barras para todas las propiedades mecánicas medidas en el diseño experimental mostrado en la Tabla 4.2 (Parte final)

Desde el punto de vista de la resistencia a la tracción, se puede observar que los materiales formulados pueden resistir los esfuerzos a los que están sometidos los conductos vasculares nativos, teniendo por ejemplo la arteria coronaria una resistencia a la tracción de 0.027 MPa [32, 33], la aorta, la carótida y la vena cava, de aproximadamente 1.0 MPa para las dos primeras, y cercanas a 3.0 MPa para la tercera [27], por lo que en general esta resistencia no representaría una limitación para la fabricación de cualquier conducto vascular, ya que dichos esfuerzos son, en general, menores a los obtenidos en los materiales formulados (9.8 MPa de media sobre todo el diseño experimental).

Desde el punto de vista de la elongación en la ruptura, se destaca que la mayoría de conductos nativos reportados presentan elongaciones superiores al 100 %, siendo en este caso la muestra 3 de la Tabla 4.2 la mejor candidata para la fabricación de conductos vasculares artificiales, se destaca además, que este valor es más alto que los de todos los conductos artificiales reportados en la Tabla 4.13.

Finalmente, dado que existen diferencias significativas entre las mediciones de tejidos vivos o muertos, y para tener una idea más aproximada de las propiedades de un conducto vascular nativo, Gerhardt Konig et. al, [209], reportaron algunos valores de referencia para un grupo de estudio que consistió en pacientes masculinos y femeninos entre 26 y 89 años que fueron sometidos a reemplazo de una vena safena o arteria mamaria utilizando injertos autólogos, en su estudio, los autores encontraron que la vena safena puede soportar esfuerzos de presión de 0.2131 ± 0.1169 MPa y la arteria mamaria interna 0.4261 ± 0.1685 MPa, de este modo, si se comparan estos valores con los obtenidos en el presente proyecto, se puede concluir que todos ellos están en la capacidad de resistir los esfuerzos de presión a las que están sometidos la vena safena y las arterias mamarias internas, por lo que, en general, cualquiera de estas formulaciones podría ser utilidad para la fabricación de estos conductos vasculares, sin embargo, dado que los autores no reportan valores para el módulo elástico, ni la capacidad de elongación de estos conductos, se deben tener más datos para garantizar que el material se escoja correctamente.

En conclusión, como se observó a lo largo del capítulo, los materiales formulados brindan un abanico de posibilidades amplio para la fabricación de implantes vasculares artificiales desde el punto de vista mecánico y superficial, de este modo, el último paso a seguir para formular un material potencialmente útil para la fabricación de implantes vasculares artificiales, consiste en la inmovilización de heparina sobre dicho material, lo que le daría a éste la capacidad de estar en contacto con la sangre sin activar la cascada de coagulación. En el siguiente capítulo, se mostrará la descripción completa del proceso de biofuncionalización, para ello, se han escogido del compilado de formulaciones la muestra 3 ya que, basado en los reportes actuales del mercado [210], las venas safenas y las arterias torácicas son los dos tipos de conductos vasculares más reemplazados actualmente, y como se vio a lo largo del capítulo, las propiedades mecánicas de la muestra seleccionada se ajustan bastante bien, además, es la muestra que menos se degrada, y sus propiedades superficiales son optimas para proyectarse como material candidato a la fabricación de injertos vasculares artificiales.

4.4. Conclusiones

Las formulaciones planteadas al rededor del capítulo mostraron una amplia variedad de propiedades mecánicas y superficiales que le pueden dar a dichos materiales una variedad grande de aplicaciones para la fabricación de conductos vasculares artificiales, de este modo, el resumen general de las propiedades caracterizadas en este capítulo se pueden resumir como sigue:

- Las propiedades mecánicas de todos los materiales formulados en el diseño experimental 4.1 dependen en gran medida de la interacción intermolecular por puentes de hidrógeno entre cadenas de fibroína y de PVA, los cuales son inducidos a través del glicerol, de este modo, aumentos sucesivos en la concentración de glicerol en las formulaciones disminuyen el módulo elástico de los materiales, el mismo comportamiento ocurre con el límite elástico y con la resistencia a la tracción.
- El porcentaje de deformación de los materiales formulados dependió principalmente de de la relación fibroína/PVA y la proporción PVA:glutaraldehído, mostrando este resultado que las muestras con un grado de entrecruzamiento menor tienen mayor capacidad de deformación debido a su menor rigidez y estructura tridimensional menos compacta.
- Las propiedades superficiales muestran que el ángulo de contacto depende de los tres factores trabajados en el diseño experimental, sin embargo, la dependencia respecto a la cantidad de glutaraldehído no es clara, por su parte, cuando la relación fibroína/PVA es 80/20 se obtienen muestras más hidrofílicas, el mismo comportamiento ocurre cuando aumenta la proporción de glicerol en las formulaciones, indicando que promover mayor interacción por puentes de hidrógeno aumenta a su vez la hidrofiliidad de las películas finales.
- Las micrografías SEM muestran que a medida que se aumenta el glicerol en las formulaciones, se obtienen películas más homogéneas, lo que demuestra que el aumento de puentes de hidrógeno entre las cadenas de fibroína y PVA lleva a sistemas mejor distribuidos moléculamente, estos resultados también evidencian que a medida que aumenta el glicerol en las formulaciones, aumente los grupos hidrofílicos superficiales, lo que da como resultado ángulos de contacto más bajos.
- El análisis por espectroscopía infrarroja muestra que la adición de glicerol en las formulaciones induce a la formación de enlaces de hidrógeno, lo que demuestra las explicaciones planteadas en los numerales anteriores. La intensidad de las bandas en la zona de los grupos **-OH** y **-C=O** fueron la clave para determinar el mecanismo de aumento de interacciones en el material formulado.
- Los perfiles de degradación muestran que la estabilidad de los materiales formulados a degradarse en un medio de PBS depende exclusivamente de la relación fibroína/PVA, y no del grado de entrecruzamiento de PVA, de este modo, se concluye que el porcentaje

de pérdida de los materiales corresponden a las cadenas de fibroína que se van liberando de la estructura del material.

- La muestra 3, la cual posee la mayor capacidad de elongación previo a su ruptura, se escogió como la muestra a biofuncionalizar, las propiedades mecánicas ajustan bien a las de un conducto vascular nativo, no presenta separación de fases, y su ángulo de contacto es propicio para la fabricación de materiales destinados al contacto con sangre, por lo tanto, en el próximo capítulo se explicará todo el procedimiento que se siguió para biofuncionalizar esta muestra.

Capítulo 5

Biofuncionalización de Superficies a Base de Fibroína

5.1. Introducción

En los capítulos anteriores se hizo la descripción y el análisis del proceso de extracción de fibroína del capullo de gusano de seda *Bombyx Mori*, además de la metodología que se siguió para fabricar un material a base de esta proteína y de polivinil alcohol (PVA), el cual se utilizó con el fin de mejorar las propiedades mecánicas del material final, por lo tanto, el último paso a seguir en el desarrollo del material deseado, consiste en garantizar que éste tenga la capacidad de estar en contacto con la sangre sin desencadenar la cascada de coagulación, la cual se activa de forma natural en la sangre al estar en contacto con cualquier cuerpo extraño [211, 212], y para ello, una de las alternativas más populares consiste en la inmovilización de heparina sobre la superficie del material, para lo cual algunos investigadores han trabajado en técnicas de inmovilización basadas en la formación de complejos antitrombina-heparina [15, 213–215], modificación superficial de los materiales con plasma y posterior inmovilización de la heparina a través de los grupos funcionales formados en la superficie [16, 111, 216], y biofuncionalización por aprovechamiento interacciones electrostáticas [217–219], siendo todas estas metodologías exitosas al evaluar la actividad antitrombogénica de los materiales desarrollados, sin embargo, los estudios mencionados previamente limitan la biofuncionalización a la superficie del material trabajado, es decir, una vez fabricado el material, la inmovilización del mismo se hace solo sobre su superficie con alguna de las técnicas mencionadas, por lo que no se tiene en consideración la degradación del material en algún medio específico, y por lo tanto, aplicar dichos modelos de biofuncionalización resulta contraproducente en los materiales formulados en este proyecto debido a que estos pierden aproximadamente el 35 % de su masa en 24 horas cuando se ponen en contacto con solución amortiguadora de fosfato (PBS), y por lo tanto, existe la posibilidad de que la heparina inmovilizada superficialmente se pierda en tan solo el primer día de tener contacto con algún medio fisiológico, por esta razón, la propuesta planteada en este proyecto

tiene una aproximación diferente, la cual consiste en biofuncionalizar la fibroína mientras está en solución, y luego utilizarla para preparar las películas finales según los protocolos descritos en capítulos anteriores, de este modo, sabiendo que la fibroína biofuncionalizada y el PVA podrán formar una mezcla homogénea como ya se demostró, se puede garantizar que a medida que el material se va degradando, éste seguirá teniendo proteína biofuncionalizada con heparina, y por lo tanto, seguirá teniendo actividad antitrombogénica.

En este capítulo se describirán las dos metodologías de biofuncionalización de fibroína en solución que se utilizaron, la primera por acople de carbodiimida [107, 113, 114, 220], y la segunda por aprovechamiento de interacciones electrostáticas [217–219], para ello, se escogió la muestra 3 de las formulaciones planteadas en el Capítulo 4 debido a que ésta garantiza homogeneidad en su estructura macroscópica, es decir, no presenta separación de fases, tiende a degradarse menos que las demás formulaciones, su mojabilidad cumple con los requisitos para materiales que tendrán contacto con la sangre, y las propiedades mecánicas se ajustan bien a las de algunos conductos vasculares nativos, incluyendo su gran capacidad de elongación antes de la ruptura, de este modo, el objetivo principal de este estudio consistió en determinar el éxito de la biofuncionalización del material, para lo cual se midió la capacidad antitrombogénica de este poniéndolo en contacto directo con sangre según la metodología que se describirá en las siguientes secciones, finalmente, se mostrará el efecto de la biofuncionalización en las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y morfológicas del material con el fin de observar como se incorporó la heparina al material.

5.2. Metodología

5.2.1. Biofuncionalización de fibroína con heparina y fabricación de películas

5.2.1.1. Biofuncionalización de fibroína por acople de carbodiimida

Las carbodiimidias son una clase de compuestos orgánicos que se caracterizan por la secuencia estructural $R_1-N=C=N-R_2$ y se consideran formalmente diimidias de dióxido de carbono [107]. En el caso específico de la fibroína, se puede realizar un acople de carbodiimida aprovechando los residuos de aminoácidos reactivos de la fibroína como ácido aspártico (0.5 %), ácido glutámico (0.6 %), lisina (0.2 %), serina (12.1 %) y treonina (0.9 %) y los ácidos dicarboxílicos de la heparina a través de un enlace amida [19, 86, 221], por lo tanto, al biofuncionalizar por este método se genera un anclaje por enlace covalente entre la fibroína y la heparina.

El procedimiento experimental que se siguió para realizar la biofuncionalización por acople de carbodiimida se muestra en el esquema de la Figura 5.1, primero, se diluyó la heparina (5000 U.I/ml, Blau Farmacéutica Colombia S.A.S) en solución amortiguadora

de ácido 2-etanosulfónico (MES) a pH= 6.0, luego, la heparina se activó haciéndola reaccionar con N-hidroxisuccinimida (NHS, peso molecular 115.09g/mol, Sigma-Aldrich) durante 10 minutos, una vez activa la heparina, ésta se hizo reaccionar con hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, peso molecular 190.70g/mol, Sigma-Aldrich) y fibroína en solución a pH= 6.0 durante 6 horas a temperatura ambiente, una vez finalizada la reacción, la fibroína biofuncionalizada fue puesta en diálisis contra una solución de Na_2HPO_4 0.1 M a pH= 6.0 durante 2 horas para eliminar la heparina que no reaccionó, posteriormente fue puesta 3 veces en diálisis contra una solución de NaCl 2M a pH= 6.0 durante 24 horas para remover el Na_2HPO_4 , finalmente, puesta 3 veces en diálisis contra agua destilada durante 24 horas para eliminar el NaCl. Una vez terminados todos los procesos de diálisis, se calculó la concentración final de la fibroína biofuncionalizada por gravimetría y se preparo la muestra 3 según el protocolo de la Figura 4.1 mostrado en el Capítulo 4. La reacción de acople se muestra en la Figura 5.2, para dicha reacción, los grupos R de la cadena de fibroína dependen del aminoácido reactivo, por ejemplo, para la lisina, $\text{R}=(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$.

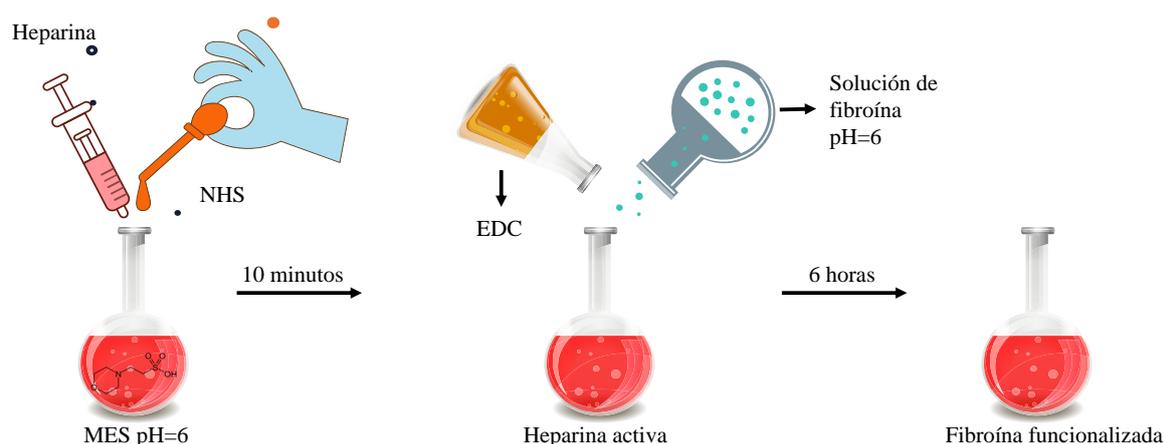


Figura 5.1: Esquema experimental de la biofuncionalización por acople de carbodiimida (Ilustración propia)

5.2.1.2. Biofuncionalización de fibroína por aprovechamiento de interacciones electrostáticas

La biofuncionalización por aprovechamiento de interacciones electrostáticas se basa en la diferencia de cargas de las moléculas presentes en solución, de este modo, se ha encontrado que a valores de pH cercanos a 6.0, la fibroína adquiere carga parcialmente positiva debido a que se garantiza la protonación de algunos grupos aminos terminales presentes en la estructura de la misma, está lejos de su punto isoelectrico (4.2) [222], lo que evita su coagulación, y su cadena adquiere una configuración extendida, lo que permite aprovechar al máximo la disponibilidad de

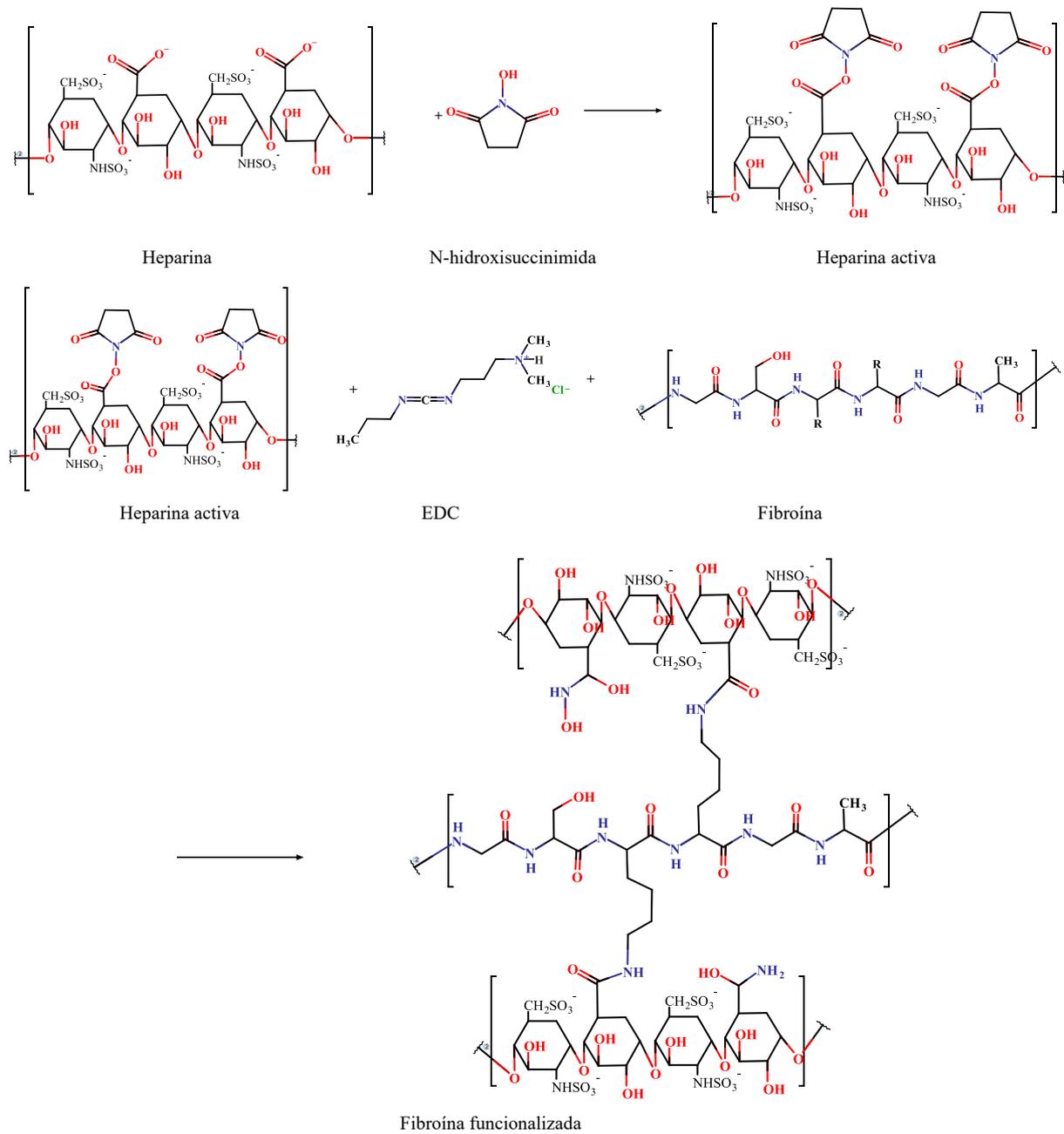


Figura 5.2: Reacción de acople de carbodiimida entre la fibroína y la heparina (Ilustración propia)

grupos aminos terminales [95, 223, 224]. Por su parte, a este pH los grupos ácidos carboxílicos en la heparina permanecerán protonados, por lo tanto, la carga negativa de esta molécula estará principalmente presente en los grupos sulfatados como se muestra en el esquema de la la Figura 5.3 [115].

Para realizar la biofuncionalización por este método, se mezclaron las soluciones de fibroína y heparina a pH 6.0 durante 6 horas con el fin de mantener las condiciones similares a la biofuncionalización por acople de carbodiimida, luego de esto, se calculó la concentración de la solución de fibroína por gravimetría y se preparó la muestra 3 según el protocolo de la Figura 4.1 del Capítulo 4.

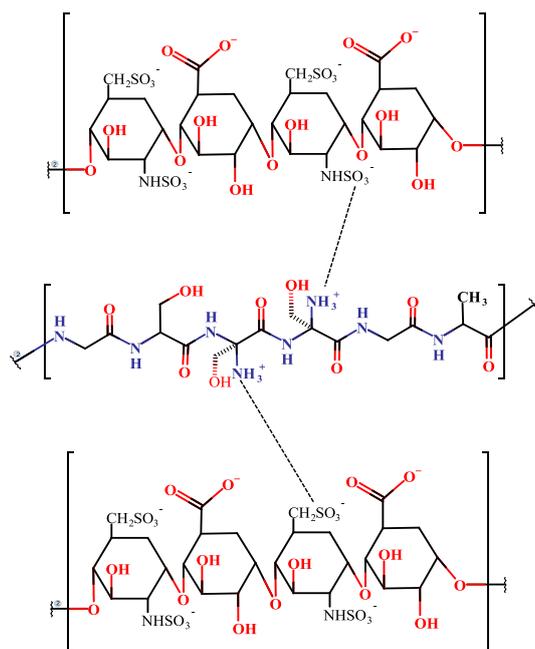


Figura 5.3: Esquema del modelo de interacción electrostática entre fibroína y heparina (Ilustración propia)

5.2.2. Evaluación y caracterización de los materiales biofuncionalizados

5.2.2.1. Evaluación de antitrombogenicidad de los materiales biofuncionalizados

Declaración ética: El protocolo que se presentará a continuación fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Antioquia, y la autorización para proceder con el mismo fue registrada en el acta 20-107-890 del año 2020, la cual se deja como evidencia en el Apéndice A. Para este protocolo participaron tres (3) voluntarios, los cuales donaron en su totalidad 30 ml de sangre. Como compromiso ante el Comité de Bioética de la Universidad de Antioquia, la identidad de los tres voluntarios se mantendrá en el anonimato, por lo tanto, se les asignaron los códigos aleatorios G²MD001, G²MD002 y G²MD003. Todos los consentimientos informados fueron firmados por los voluntarios, el investigador principal del proyecto, la tutora del proyecto, un testigo, y el medico asesor José Santiago Camacho Quintero, quien realizó las extracciones de sangre y verificó que se cumplieran todos los protocolos realizados durante el experimento. Para el protocolo que se presentará, se obtuvo aval para el total de sangre mencionado previamente, por lo tanto, para realizar la prueba de bioactividad a 15 días, solo se utilizó la sangre de un voluntario según la metodología que se explicará a continuación.

El éxito de la biofuncionalización depende principalmente de la respuesta del material al contacto con la sangre, de este modo, con el fin de llevar a cabo esta evaluación, se realizó la prueba de recalcificación en dispositivos médicos para contacto con sangre [225–227] a la muestra de control, y a los materiales biofuncionalizados. La nomenclatura de las muestras evaluadas se resumen en el siguiente listado:

- **Muestra 3:** Muestra 3 sin biofuncionalizar (control).
- **Muestra 3 EDC/NHS:** Muestra 3 biofuncionalizada utilizando acople de carbodiimida.
- **Muestra 3 Electrostático:** Muestra 3 biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas.

Para la prueba en cuestión, se siguió el esquema mostrado en la Figura 5.4, primero se extrajo sangre de los voluntarios según el protocolo de extracción a través de un catéter venoso [228], y fue depositada en tubos especiales con citrato de sodio para desactivar la cascada de coagulación, posterior a esto, en un tubo que contenía un fragmento de aproximadamente 1.0 cm² del material a evaluar se depositaron 400 μ l de la sangre extraída, luego a este sistema se le agregaron 40 μ l de solución de CaCl₂ 0.1 M para reactivar la cascada de coagulación en la sangre, finalmente, se retiró el material evaluado cada 10 minutos durante 60 minutos y se midió la masa total de coágulos adheridos a la superficie con una balanza analítica en los tiempos mencionados. Como tiempo infinito, las muestras se dejaron en contacto con la sangre durante 6 horas y se midió la masa de coágulos adheridos en las muestras luego de este tiempo. Todas las mediciones anteriores se realizaron por triplicado para cada material con la

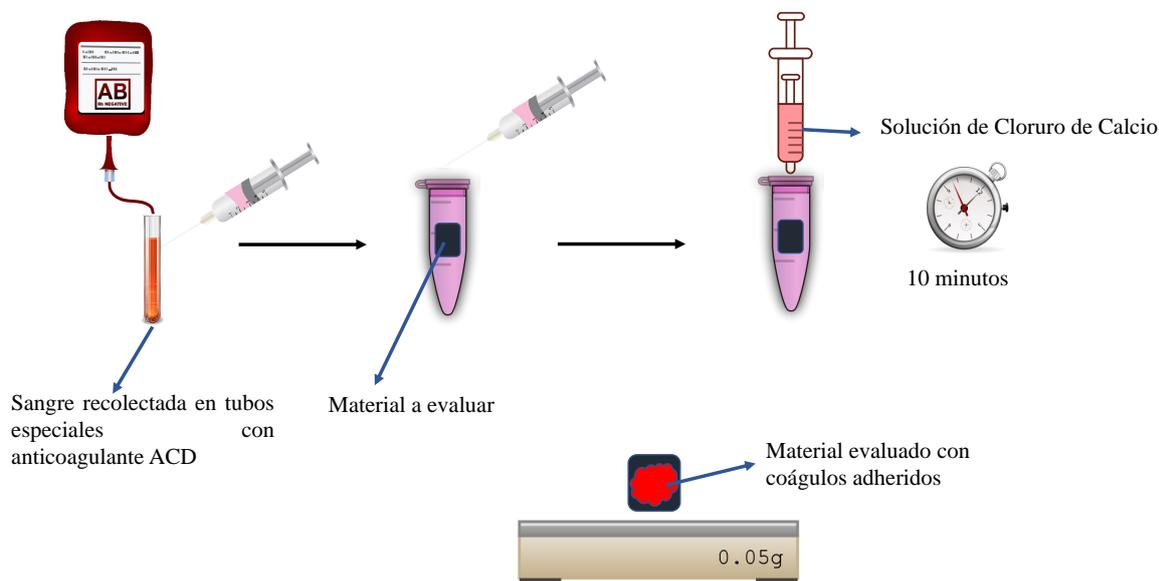


Figura 5.4: Esquema experimental para la prueba de recalcificación en dispositivos médicos para contacto con sangre (Ilustración propia)

sangre de cada voluntario, teniendo así un total de 9 replicas por material. El resultado final se reportó como el promedio de masa de los coágulos adheridos a la superficie con su desviación estándar. Finalmente, para verificar la estabilidad de la bioactividad de la heparina inmovilizada, se siguió el protocolo propuesto por algunos autores [52, 229, 230], primero, fragmentos de aproximadamente 1.0 cm^2 de las muestras fueron puestos en incubación durante 15 días en una solución amortiguadora de fosfato (PBS) a $\text{pH}=7.0$, una vez pasado el tiempo de incubación, las muestras se retiraron y se realizó la prueba de recalcificación de sangre a la muestra 3 sin biofuncionalizar para usarla como control, y biofuncionalizada por ambos métodos.

Una vez evaluado el éxito de la biofuncionalización, se plantearán algunos mecanismos de incorporación de la heparina en el material, para este propósito, se soportarán dichos planteamientos con los resultados obtenidos por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, análisis termogravimétrico y microscopía electrónica de barrido, además de esto, se estudió el efecto de la biofuncionalización en las propiedades superficiales y mecánicas como se describirá a continuación.

5.2.2.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El cambio de la conformación estructural de la fibroína en los materiales se siguió respecto a los métodos de biofuncionalización, para este propósito, se analizaron la muestra 3 de control, las muestras biofuncionalizadas por ambos métodos, y la heparina utilizada para la

biofuncionalización en un equipo **SHIMATZU IR-TRACER 100**, y se barrió el rango espectral entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} durante 24 ciclos.

5.2.2.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Las diferentes zonas de descomposición de los materiales de control y biofuncionalizados respecto a la temperatura, así como los residuos luego de finalizado el análisis, pueden dar información de la forma en que la heparina se incorporó en los materiales biofuncionalizados, para este propósito, se realizó un análisis termogravimétrico a la muestra 3 de control, las muestras biofuncionalizadas por ambos métodos y la heparina utilizada en la biofuncionalización, la caracterización en cuestión se hizo con un equipo **TGA Q500** de **TA Instruments** en atmósfera de nitrógeno a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. El barrido completo se realizó en el rango de temperatura entre 25°C y 900°C .

5.2.2.4. Microscopía electrónica de barrido

Con el fin de evaluar el efecto de la biofuncionalización sobre la estructura superficial del material, las muestras 3 de control y biofuncionalizadas por ambos métodos fueron observadas en un equipo de microscopía electrónica de barrido **SEM JEOL JSM-6490LV** y se tomaron 2 micrografías de cada muestra a 500X y 1000X respectivamente.

5.2.2.5. Ángulo de contacto

Normalmente, la inmovilización de heparina lleva a materiales más hidrofílicos [52], de este modo, con el fin de estudiar el efecto de la biofuncionalización en la hidrofiliidad del material, las muestras 3 de control y biofuncionalizadas por ambos métodos fueron analizadas en un goniómetro **DataPhysics OCA 15EC**, utilizando gotas de $1\mu\text{l}$ de volumen y se determinó el ángulo de contacto de cada una de ellas con agua. Todas las muestras se midieron por triplicado y su resultado se expresó como el promedio de los mismos con su desviación estándar.

5.2.2.6. Propiedades mecánicas

Con el fin de estudiar el efecto de la biofuncionalización en las propiedades mecánicas del material, se prepararon la muestra 3 de control y biofuncionalizada por ambos métodos, y en promedio, se obtuvieron películas con un espesor de $380\ \mu\text{m}$, de este modo, para la evaluación de la resistencia mecánica, las películas de las muestras de control y las muestras biofuncionalizadas fueron analizadas según la norma ASTM D-638 [178] en una máquina universal de ensayos **Shimadzu UH-X**, de estas pruebas se calcularon para cada película la

resistencia a la tracción, porcentaje de elongación en la ruptura, módulo elástico y el límite elástico.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Evaluación de antitrombogenicidad de los materiales biofuncionalizados

La cascada de coagulación consiste en un complejo mecanismo que se activa en la sangre mediante la vía extrínseca y la vía intrínseca como se explicó en la Sección 2.3.1, específicamente, la vía intrínseca se activa cuando la sangre entra en contacto con algún cuerpo extraño [25], siendo ésta la principal limitación de los dispositivos médicos destinados al contacto con la sangre, y motivo por el cual estos deben estar en capacidad de tener dicho contacto sin activar la cascada de coagulación, es decir, tener capacidad antitrombogenicidad [52, 231, 232].

Basado en lo anterior, la evaluación de la capacidad antitrombogenicidad de los materiales biofuncionalizados se hizo por medio de la prueba de recalcificación de sangre mostrada en la Figura 5.4, la cual consiste en la interrupción del mecanismo de coagulación de las muestras de sangre extraídas y su posterior reactivación mediante la adición de Ca^{2+} (factor IV de la cascada de coagulación [37, 38]) una vez están en contacto con el material a evaluar, para ello, dicha prueba se realizó a tiempo cero y a 15 días como se describió previamente en la Sección 5.2.2.1 utilizando la muestra 3 sin biofuncionalizar para ser usada como control, y biofuncionalizada por ambos métodos.

En la Figura 5.5 se presenta la fotografía de todas las muestras analizadas a tiempo cero luego de tener contacto con la sangre durante 6 horas, además de esto, en la Figura 5.7 se muestran los resultados cuantitativos de la masa total de coágulos adheridos a la superficie del material en función del tiempo.

De acuerdo con la evidencia fotográfica mostrada en la Figura 5.5, se observa que las muestras biofuncionalizadas por ambos métodos permanecen relativamente libres de coágulos luego de haber tenido contacto con la sangre recalcificada durante las 6 horas de análisis, por el contrario, las muestras de control tienen casi toda la superficie cubierta por coágulos, lo que muestra el éxito de la biofuncionalización del material, y por lo tanto, este podrá tener contacto con la sangre y garantizar que los coágulos formados no se adhieran a su superficie gracias a la acción de la heparina inmovilizada. En el caso de la muestra 3 de control, cuando la sangre entra en contacto con ésta, la respuesta inmunológica activará la cascada de coagulación a través de la vía intrínseca [25, 118], lo que estimulará la producción de fibrina, y formará el coágulo que se adherirá a la superficie del material sin biofuncionalizar [24, 233], por otra parte, el mecanismo de interacción de la sangre con los materiales biofuncionalizados es completamente diferente,

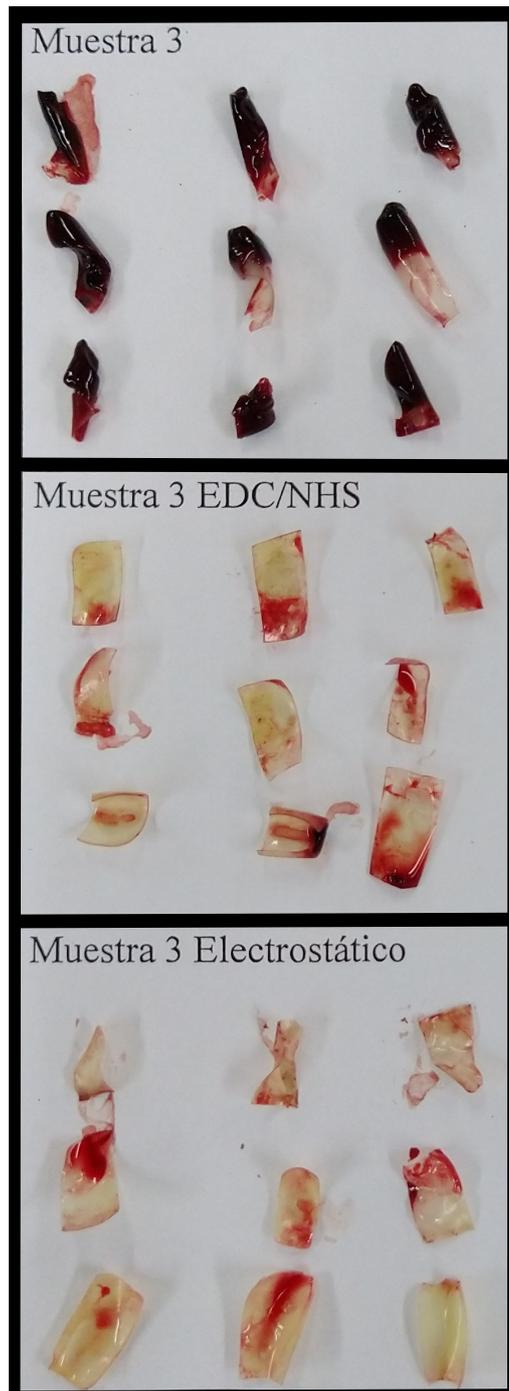


Figura 5.5: Fotografía de la muestra 3 sin biofuncionalizar, biofuncionalizada por acople de carbodiimida (EDC/NHS), y biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas luego de tener contacto con sangre recalcificada durante 6 horas.

ya que cuando los coágulos de la sangre recalcificada entran en contacto con la superficie de estos, la heparina disponible en la superficie formará un complejo con la antitrombina III (AT-III) [25], y como resultado, la heparina catalizará su acción y evitará la agregación

plaquetaria en la superficie del material como se muestra en el esquema modelo de la Figura 5.6.

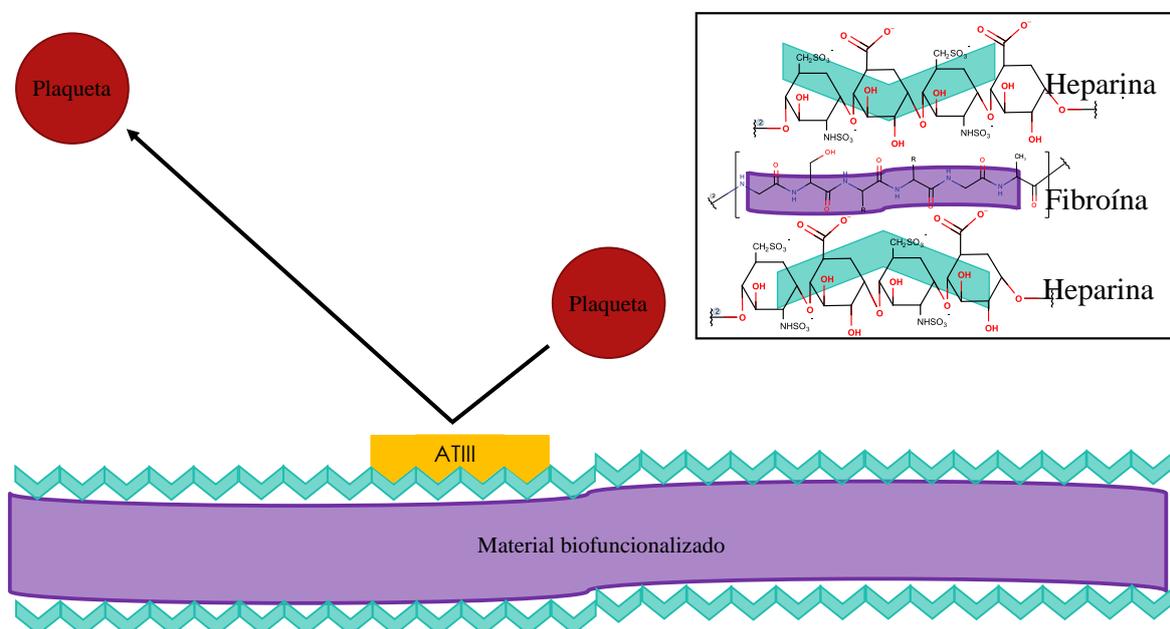


Figura 5.6: Modelo esquemático de la interacción de la sangre con el material biofuncionalizado, donde se muestra la formación del complejo AT-III-Heparina y su acción de bloqueo frente a la adhesión de coágulos (Ilustración propia).

En la Figura 5.7 se muestran los resultados cuantitativos de la masa de coágulos adheridos a la superficie de los diferentes materiales evaluados a tiempo cero, en ésta se observa que las muestras de control adquieren un máximo de masa de coágulos adheridos de 0.28 g en los primeros 10 minutos, para finalmente estabilizarse luego de 6 horas en 0.14 g, lo que se explica debido a que estas muestras de control, al ser materiales extraños y sin biofuncionalizar, permiten que los coágulos formados por recalcificación se adhieran a su superficie hasta alcanzar una masa crítica que se da cuando dicha superficie está saturada de coágulos, luego estos se desprenderán hasta estabilizarse en la capacidad máxima que cada superficie pueda tener [25, 41]. Por otra parte, las muestras biofuncionalizadas por ambos métodos muestran una eficacia notable, alcanzando un máximo de masa de 0.024 g y 0.022 g para la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida y aprovechamiento de interacciones electrostáticas respectivamente, destacando que estos valores permanecieron prácticamente iguales durante todo el tiempo de análisis.

La Figura 5.8 muestra los resultados de la prueba de recalcificación de sangre realizada a la muestra 3 luego de estar 15 días de incubación en solución de PBS como se describió previamente, en ésta se observa que luego de pasado este tiempo, las muestras biofuncionalizadas por ambos métodos continúan teniendo actividad antitrombogénica comparadas con la muestra de control (■), sin embargo, las muestras biofuncionalizadas

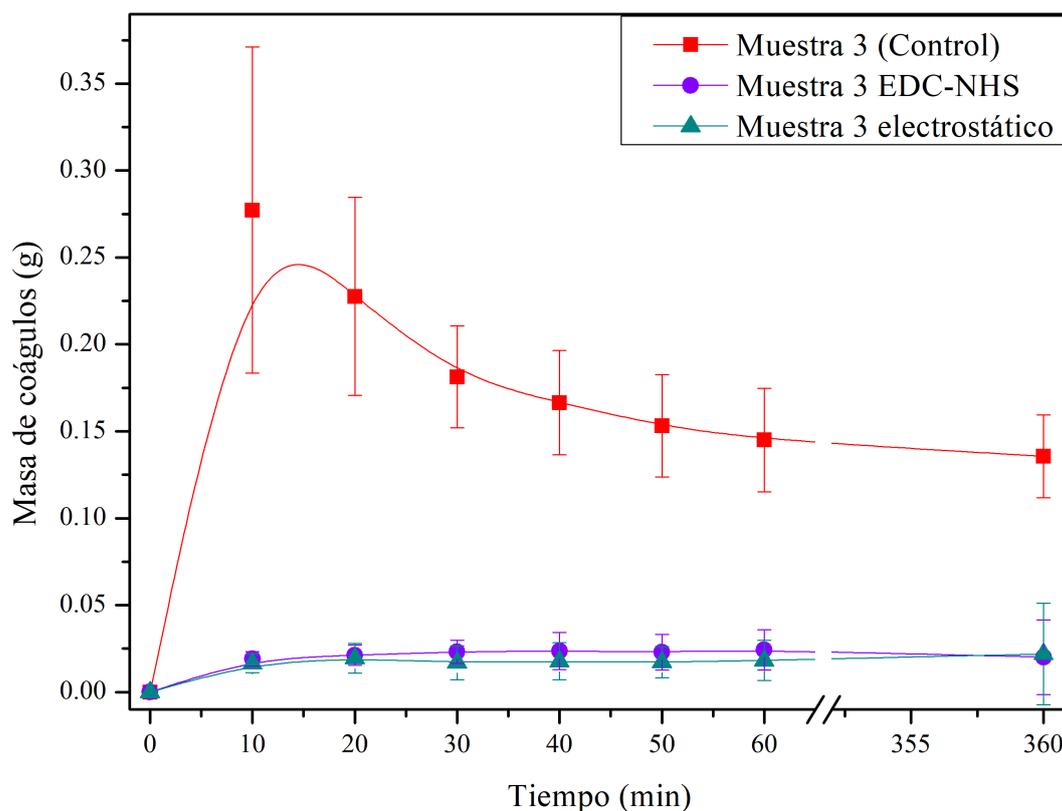


Figura 5.7: Cuantificación de masa de coágulos a tiempo cero para la muestra 3 de control (■), biofuncionalizada por acople de carbodiimida (●) y por aprovechamiento de interacciones electrostáticas (▲).

por aprovechamiento de interacciones electrostáticas (▲) presentan una mayor adherencia de coágulos sobre su superficie, lo que indica que luego del proceso de incubación en PBS, la heparina presente en la superficie del material migra hacia la solución, por lo tanto, perderá actividad rápidamente comparado con la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida (●) como muestran los resultados cuantitativos, donde se observa que estas últimas tienen una actividad antitrombogénica significativamente mayor.

Los resultados anteriores se observan mejor en la Figura 5.9, donde se evidencia que la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida presenta una adhesión de coágulos aproximadamente 32 % superior luego de 15 días de incubación en PBS, sin embargo, la muestra biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas permite una adhesión de coágulos aproximadamente 429 % superior luego de pasar por el mismo tratamiento, es decir, luego de 15 días de incubación, las muestras biofuncionalizadas por acople de carbodiimida tendrán aproximadamente 13 veces más actividad antitrombogénica si se compara con las muestras biofuncionalizadas por aprovechamiento de interacciones electrostáticas, lo que resulta natural si se piensa que bajo la primera metodología la heparina se ancla a la fibroína a través de enlaces covalentes, por lo que cualquier pérdida de actividad estará relacionada a la degradación del material, pero en el caso de la biofuncionalización por

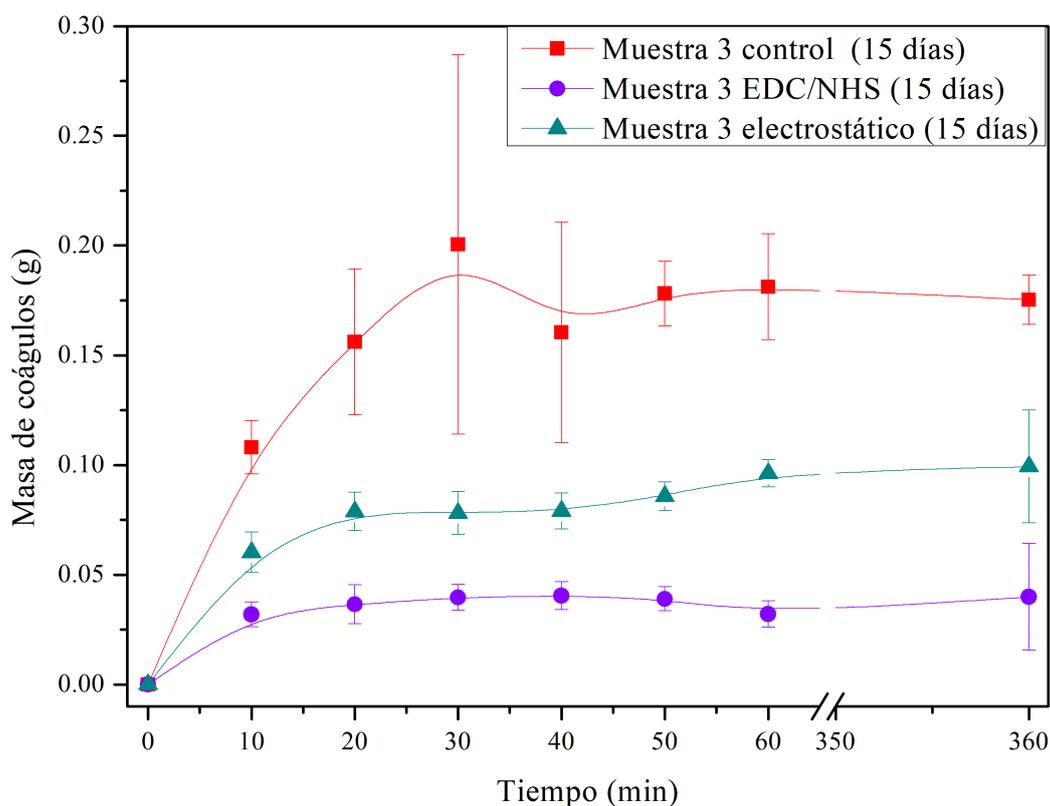


Figura 5.8: Cuantificación de masa de coágulos a 15 días de incubación en PBS para la muestra 3 de control (■), biofuncionalizada por acople de carbodiimida (●) y por aprovechamiento de interacciones electrostáticas (▲).

aprovechamiento de interacciones electrostáticas, la pérdida de actividad se dará tanto por lo degradación del material, como por la migración de la heparina hacia el seno de la solución de PBS [52, 217], lo que muestra el gran potencial que tienen los materiales biofuncionalizados por acople de carbodiimida.

En conclusión, los resultados de la prueba de recalcificación de sangre confirman que biofuncionalizar la fibroína antes de preparar el material permite que la actividad antitrombogénica del mismo se mantenga a medida que este se degrada en solución de PBS como se planteó en el Capítulo 4, además, al garantizar que la fibroína biofuncionalizada y el PVA permanecen homogéneamente distribuidos sobre todo el material, se puede afirmar que este mantendrá actividad antitrombogénica a medida que se va degradando, ya que siempre habrá fibroína biofuncionalizada disponible para mantener la actividad antitrombogénica estable, de este modo, se confirma el éxito del proceso de biofuncionalización, y se concluye que el mejor método es la biofuncionalización por acople de carbodiimida, por lo tanto, es el método que se recomienda para trabajos futuros derivados de el presente proyecto.

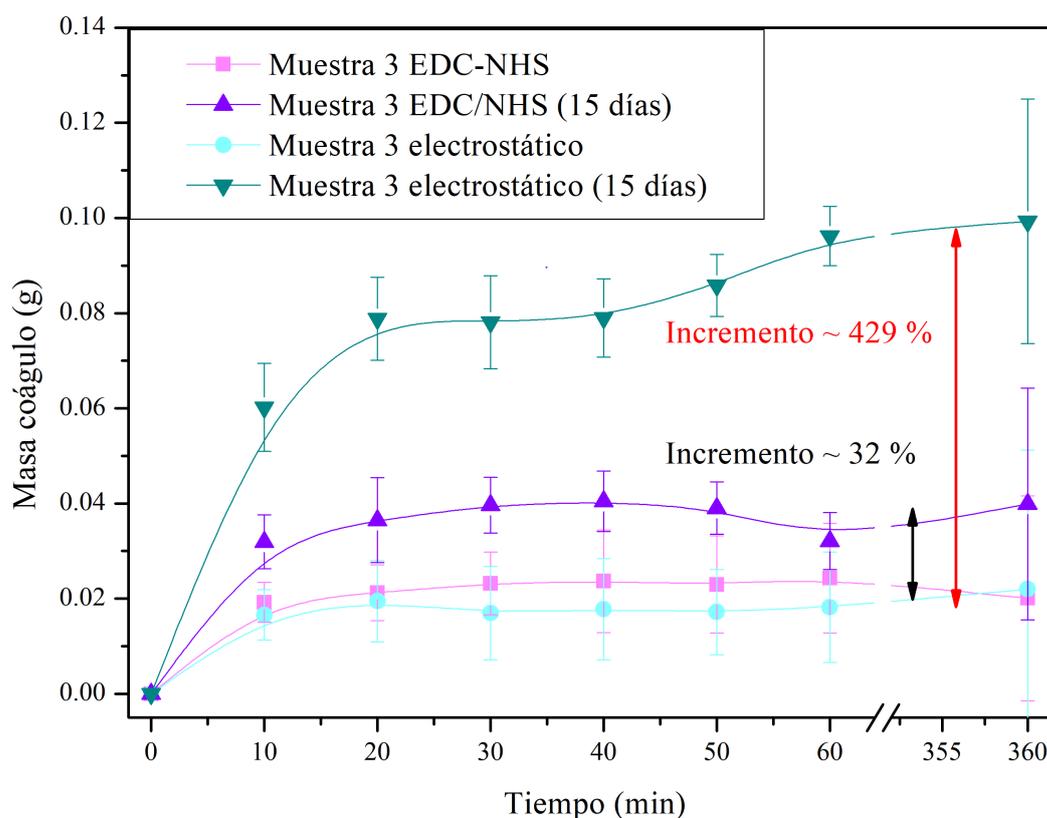


Figura 5.9: Comparación de la masa de coágulos adheridos a la superficie de los materiales biofuncionalizados donde se reconoce: muestra 3 biofuncionalizada por acople de carbodiimida a tiempo cero (■) y luego de 15 días de incubación en PBS (▲). Muestra 3 biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas a tiempo cero (●), y luego de 15 días de incubación en PBS (▼).

5.3.2. Análisis espectroscópico

La biofuncionalización del material fue un proceso en el cual se inmovilizó heparina sobre la fibroína mediante dos técnicas: acople de carbodiimida y aprovechamiento de interacciones electrostáticas, de este modo, en el caso del acople de carbodiimida, las aminas terminales ($-\text{NH}_2$) reaccionaron con los ácidos carboxílicos ($-\text{COOH}$) de la heparina según el esquema de la Figura 5.2 formando puentes diimida entre ambas sustancias, por lo tanto, el seguimiento de las bandas de amida I y II de la estructura de la fibroína serán claves para confirmar el éxito de la formación de dicho enlace. Por otra parte, en el caso de la biofuncionalización por aprovechamiento de interacciones electrostáticas se espera una formación adicional de enlaces de hidrógeno en el material, lo que normalmente también afecta las bandas de amida I y II de la estructura de la fibroína debido al cambio conformacional de *random coil* a láminas- β .

Los espectros infrarrojo de la muestra 3 de control, biofuncionalizada por acople de carbodiimida, biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas y de la heparina se encuentran en la Figura 5.10, en ésta se señalan algunas de las zonas de

interés que brindan información acerca de la incorporación de la heparina en los materiales biofuncionalizados, resaltadas en verde claro, rojo claro, y amarillo claro. Algunas de las bandas de interés se resumen en la Tabla 5.1.

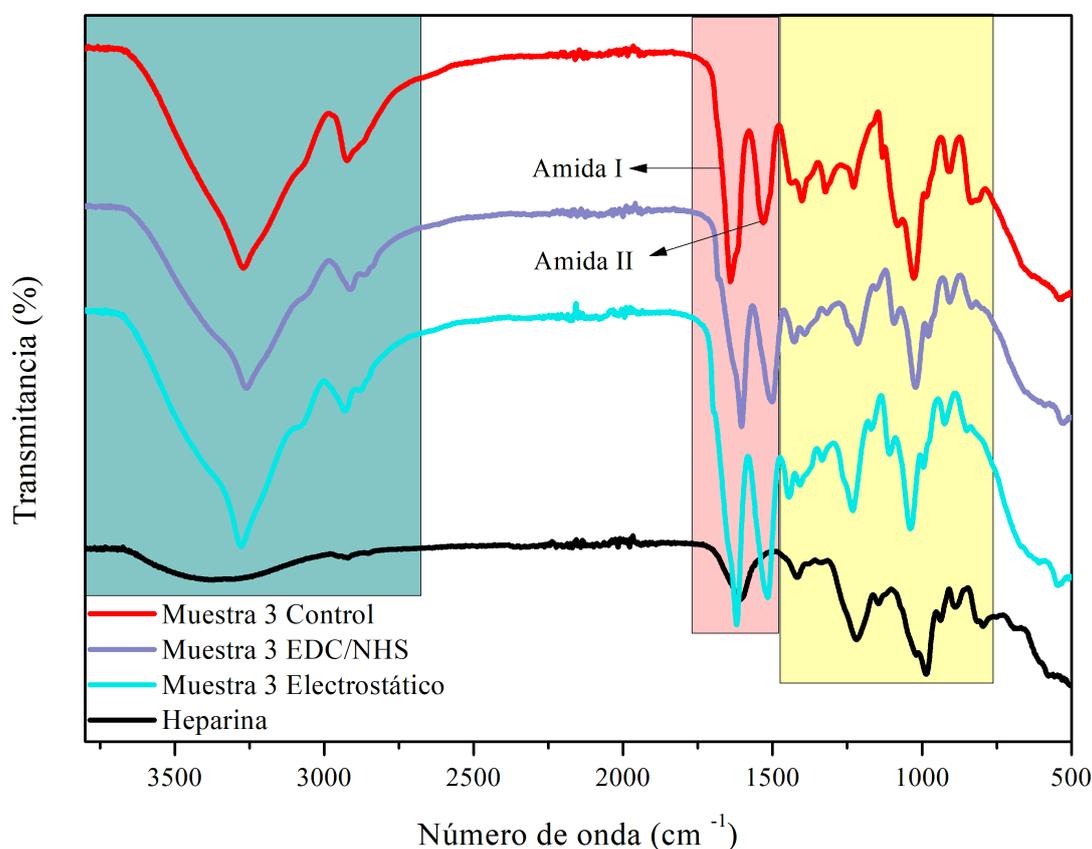


Figura 5.10: Espectros infrarrojo de: Heparina (—), Muestra 3 de control (—), Muestra 3 biofuncionalizada por acople de carbodiimida (—) y Muestra 3 biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas (—)

Muestra	Bandas (cm ⁻¹)		Otras bandas (cm ⁻¹)			
	Amida I	Amida II	S=O	C-O-S		
3 Control	1641	1534				
3 EDC/NHS	1603	1501	1212	1092	1022	
3 Electrostático	1620	1515	1232	1110	1041	
Heparina			1224	1017	984	804

Tabla 5.1: Números de onda para algunas de las bandas de interés de la muestra 3 de control, biofuncionalizada por acople de carbodiimida, por aprovechamiento de interacciones electrostáticas y heparina

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 5.10, la muestra de control (—) presenta la banda de tensión de grupos -O-H en 3273 cm^{-1} , la cual se desplaza a 3259 cm^{-1} para la

muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida (—), y a 3280 cm^{-1} para la muestra biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas (—), estos resultados sugieren que la asociación de puentes de hidrógeno entre los diferentes componentes del material cambia cuando este se biofuncionaliza [187], siendo el tipo de asociación diferente entre ambas muestras biofuncionalizadas.

A pesar de lo anterior, la evidencia más importante para observar el efecto de la heparina en el material se encuentra en las zonas resaltadas en rojo claro y amarillo claro, primero, las bandas de amida I y II de la muestra de control aparecen a 1641 cm^{-1} y 1534 cm^{-1} respectivamente, y se desplazan a 1603 cm^{-1} y 1501 cm^{-1} para la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida, y a 1620 cm^{-1} y 1515 cm^{-1} para la muestra biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas, estos resultados se explican dado que, cuando la heparina se integra al material, tanto a través del enlace diimida como por interacciones electrostáticas, la forma en que se producen los enlaces de hidrógeno también cambia, haciendo que la cantidad de láminas- β de la fibroína aumente, y finalmente se vea reflejado en el desplazamiento de las bandas de amida I y amida II de la fibroína a números de onda menores [234], por lo tanto, estos desplazamientos granizan que la incorporación de la heparina en el material fue exitosa.

Finalmente, en la zona amarillo claro, se distinguen varios cambios entre la muestra de control y las muestras biofuncionalizadas asociados a la extensión de grupos -S=O presentes en la estructura molecular de la heparina, y que aparecen en 1224 cm^{-1} , 1017 cm^{-1} y 984 cm^{-1} en el espectro correspondiente a este polisacárido, de estas señales, la primera banda en la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida se desplaza hasta 1212 cm^{-1} , y hasta 1232 cm^{-1} para la muestra biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas, lo que sugiere que los grupos -S=O de la heparina están interactuando a través de enlaces de hidrógeno con los polímeros en el material [234, 235], estos resultados se reafirman con las otras dos bandas características de la heparina, que se desplazan hasta 1092 cm^{-1} y 1022 cm^{-1} para la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida, y hasta 1110 cm^{-1} y 1041 cm^{-1} para la muestra biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas, estos resultados confirman que la heparina se incorpora de forma exitosa en el material, y por lo tanto, estos resultados, junto a los resultados de bioactividad a 15 días, muestran que dicha incorporación es más estable en la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida, sugiriendo que el enlazamiento covalente entre la fibroína y la heparina fue exitoso.

5.3.3. Análisis termogravimétrico

Los termogramas de la heparina, la muestra 3 de control, biofuncionalizada por acople de carbodiimida, y biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas se muestran en la Figura 5.11, además de esto, con el fin de facilitar la lectura de los datos, cada uno de estos termogramas, junto con la derivada del peso, se muestran en la Figura 5.12.

De acuerdo con los resultados mostrados en las Figuras 5.11 y 5.12, la heparina (—) se

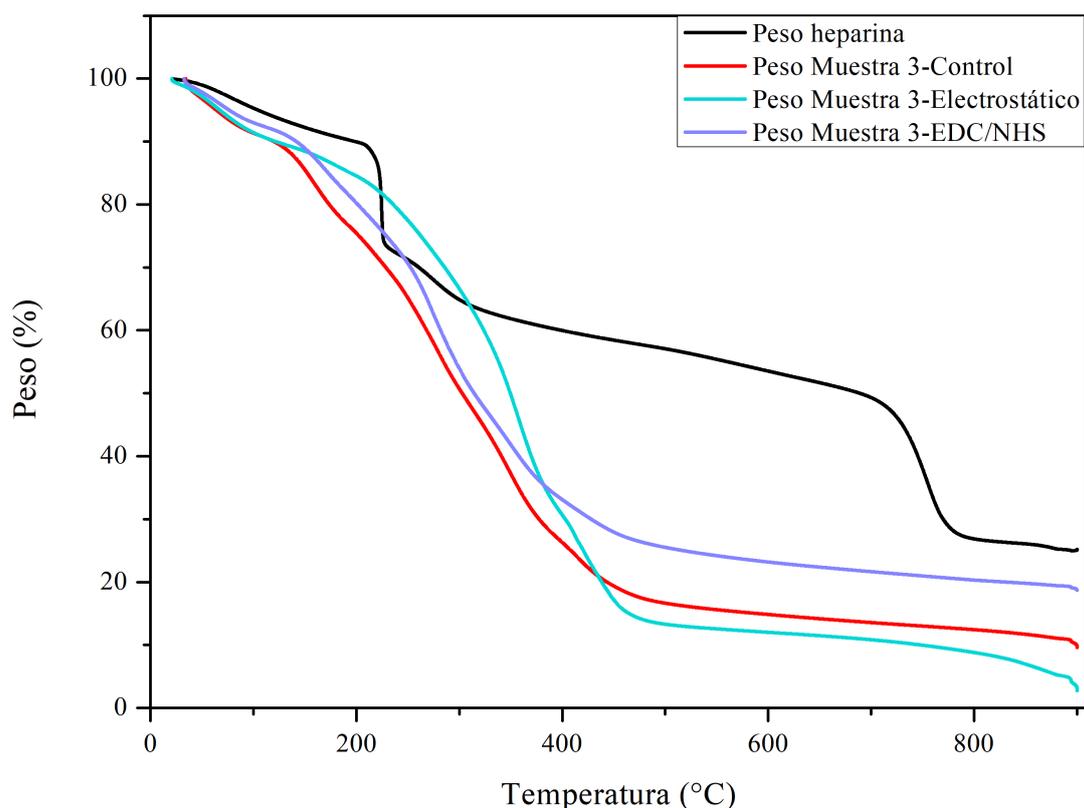


Figura 5.11: Termogramas para: Heparina (—), Muestra 3 de control (—), Muestra 3 biofuncionalizada por acople de carbodiimida (—) y Muestra 3 biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas (—)

descompone en 4 pasos, el primero ocurre en el rango desde 69.25°C hasta 199.34°C, en el cual se presenta una pérdida de masa de 9.6 %, la cual corresponde a la humedad de la muestra, posterior a esto, se da una pérdida brusca de masa que se da en el rango desde 224.37 °C hasta 241.4 °C, la cual es atribuida al proceso de degradación de este polisacárido [236], proceso que continua hasta dejar un residuo del 25 % aproximadamente a 754.56 °C debido a las sales generadas por los grupos sulfatados presentes en la heparina como se ha reportado previamente[234].

Por otra parte, en el termograma de la muestra 3 de control (—) se observa que la descomposición de esta muestra se da en 5 pasos, de los cuales, el primero se da en el rango que va desde 61.94 °C hasta 105.31 °C, y corresponde a la pérdida de humedad de esta muestra, posterior a esto, se da una segunda pérdida de masa del 14.31 % en el rango que va desde 159.4 °C hasta 190.79 °C, la cual es atribuida a la descomposición de las cadenas más pequeñas de PVA según se ha encontrado previamente para sistemas basados en PVA plastificado con glicerol [237], una vez superada esta etapa, se da una tercera pérdida de masa de 29.2 % en el rango que va desde 280.21 °C hasta 312.38 °C, el cual es atribuido a la degradación de la fibroína en aminoácidos y una descomposición parcial del PVA, procesos que comienzan a temperaturas similares [22], y que se puede extender hasta temperaturas cercanas a 370 °C en el caso de la

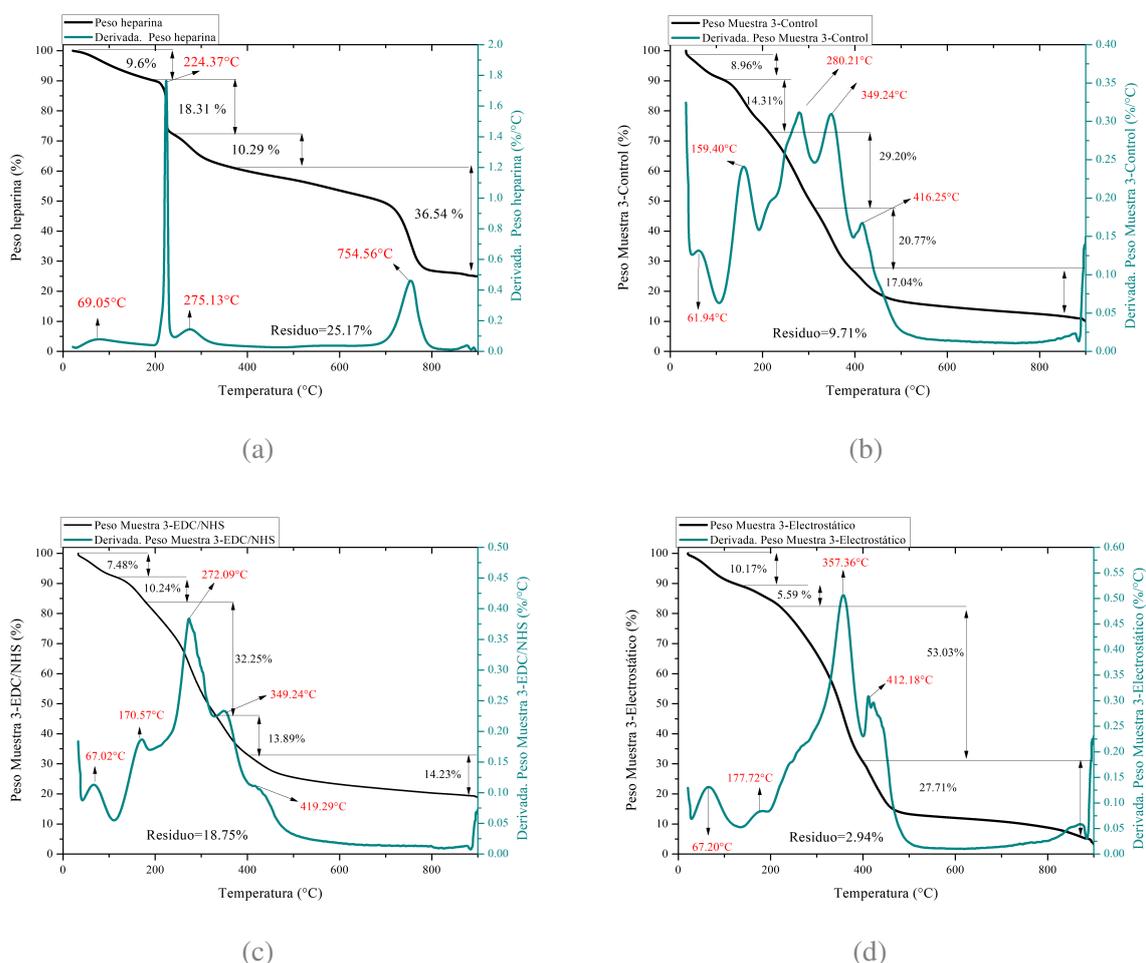


Figura 5.12: Termogramas y derivadas de heparina (a), muestra 3 de control (b), muestra 3 biofuncionalizada por acople de carbodiimida (c), y muestra 3 biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas (d).

degradación de la fibroína en aminoácidos [234], por lo tanto, dicha degradación ocurre en la cuarta etapa, la cual abarca el rango de temperaturas que va desde 349.24 °C hasta 396.35 °C y se traduce en una pérdida del 29.20 % de la masa del material, finalmente, la última etapa de descomposición ocurre en el rango de temperatura que va desde 416.25 °C hasta 509.29 °C, la cual, teniendo en cuenta que a esta temperatura la fibroína se ha degradado completamente [22], es atribuida a la descomposición final del PVA en el material, el cual deja un residuo de 9.71 % luego del análisis.

Respecto a las muestras biofuncionalizadas, destaca el comportamiento de la muestra biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas (—), la cual se descompone en 4 etapas, siendo la primera aquella que ocurre en el rango de temperaturas que va desde 67.2 °C hasta 132.87 °C, y que se debe a la pérdida de humedad de la muestra, seguida de una pérdida de 5.59 % en masa y que se da en el rango de temperaturas que va desde 177.72

°C hasta 190.75 °C, la cual, comparada con la muestra de control representa aproximadamente 3 veces menos pérdida de masa, además de comenzar a una temperatura más alta, lo cual probablemente se deba a una mayor estabilidad térmica de las cadenas más pequeñas de PVA producto de la interacción con la heparina, lo cual tiene sentido si se observa que la siguiente etapa abarca todo el rango que va desde 357.36 °C hasta 400.64 °C, y en el cual se pierde el 53.03 % de la masa del material, y que reúne las dos pérdidas de masa que se observan para la muestra de control en este rango en una sola pérdida, la cual corresponde tanto a pérdidas de masa por degradación de PVA, como fibroína y la heparina que está depositada en la superficie de la fibroína por interacciones electrostáticas, finalmente, en la etapa 4 de descomposición, la cual abarca el rango de temperatura que va desde 412.18 °C hasta 639.62 °C, el material pierde el 27.71 % de su masa dejando un residuo de apenas 2.94 %, este resultado, como se verá en la sección de microscopía electrónica de barrido, está relacionado con una leve separación de fases que se da entre el PVA y la fibroína, lo que explicaría que las últimas etapas de degradación estén relacionadas solo con la degradación del PVA.

Finalmente, el termograma de la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida muestra un comportamiento similar a la muestra de control, donde se identifican 5 etapas de descomposición en rangos de temperatura similares, de los cuales, la primera etapa de degradación, correspondiente a la pérdida de humedad, se da en el rango que va desde 67.02 °C hasta 109.56 °C, posterior a esto, en la segunda etapa de degradación, que va desde 170.57 °C hasta 187.87 °C, presenta una pérdida de 10.24 % de la masa del material, esta etapa, comparada con la muestra de control, resulta interesante ya que representa una pérdida menor, lo que podría indicar que la heparina incorporada en el material le brinda estabilidad térmica a este material, lo que resulta lógico si se piensa que en la siguiente etapa, la cual se da en el rango desde 272.09 °C hasta 323.86 °C, y en la que ya se ha degradado parte de la heparina, la muestra presenta su mayor pérdida de masa, correspondiente al 35.25 %. La cuarta etapa de degradación, la cual se da en el rango que va desde 349.24 °C hasta 399.24 °C, es prácticamente igual a la muestra de control, correspondiente a la degradación final de los aminoácidos de la fibroína, representa una pérdida del 13.89 %, finalmente, la última etapa de degradación se da en el rango que va desde 419 °C hasta 875 °C, posterior a la cual queda un residuo del 18.75 % el cual es resultado de los residuos de heparina producto de las sales de grupos sulfatados en la estructura de este polisacárido como se ha encontrado en estudios anteriores [234], y lo que indica que para esta muestra, la incorporación de la heparina fue mejor que en la muestra biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas.

5.3.4. Efecto de la biofuncionalización en las propiedades superficiales

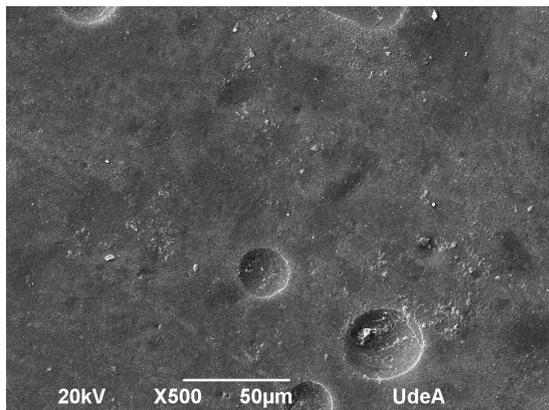
5.3.4.1. Microscopía electrónica de barrido

En la Sección 4.3.3 se observó que la homogeneidad del material formulado mejora significativamente cuando se utiliza la mayor proporción fibroína:glicerol (3:2) del diseño experimental planteado en la Tabla 4.2, lo anterior debido a que en dichas proporciones se puede

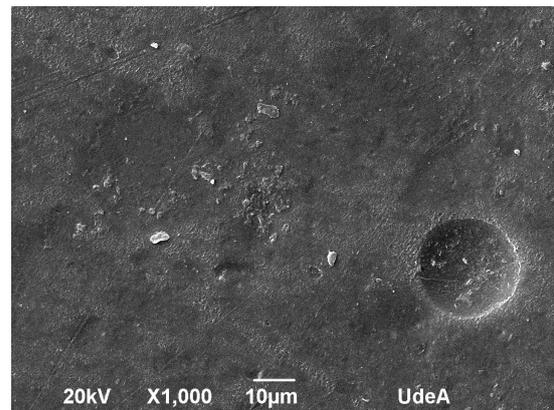
garantizar un aumento significativo en las interacciones de hidrógeno entre los componentes del material, y por lo tanto, la fibroína y el PVA podrán estar homogéneamente distribuidos gracias a la acción del glicerol. Basado en lo anterior, se debe garantizar que este comportamiento no se vea significativamente afectado cuando se biofuncionaliza la fibroína en solución y luego se prepara el material con ésta ya que es fundamental que el material sea homogéneo y no presente separación de fases con el fin de que éste tenga actividad antitrombogénica a lo largo de toda su superficie.

Las micrografías SEM para la muestra de control 3, y las muestras biofuncionalizadas por ambos métodos se encuentran registradas en la Figura 5.13, en ésta se observa que la muestra de control (Figuras 5.13a y 5.13b) presenta una superficie homogénea y no se evidencia una separación de fases entre la fibroína y el PVA como ya se había encontrado previamente, sin embargo, algunos defectos superficiales se notan como producto del proceso de evaporación de solvente en la preparación de la película. En las Figuras 5.13c y 5.13d se muestran los resultados del material biofuncionalizado por acople de carbodiimida, en éstas se observa que el comportamiento anterior se conserva cuando se prepara la película con fibroína biofuncionalizada por esta metodología, además de notarse también los mismos defectos superficiales normales del proceso de preparación de películas por evaporación de solvente, estos resultados resultan interesantes ya que muestran como la inmovilización de heparina sobre la fibroína a través de acople de carbodiimida no perjudica la estructura macroscópica del material final, y dado que no se observan sus fases separadas, se puede garantizar que la fibroína biofuncionalizada estará homogéneamente distribuida sobre el material, por lo tanto, éste tendrá actividad antitrombogénica a lo largo de toda su superficie. Finalmente, cuando se observa la muestra biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas (Figuras 5.13e y 5.13f) se pueden notar algunos defectos superficiales que son diferentes a los observados en las otras dos muestras, además de algunos pequeños agregados y huecos en algunas zonas de la superficie, lo que se explica debido a que los enlaces de hidrógeno son especialmente sensibles a la presencia de iones provenientes de sales [238, 239], de este modo, teniendo que cuenta que las interacciones electrostáticas de este material se darán entre la sal de heparina y la fibroína, es probable que se den algunas condiciones suficientes para que se formen coacervados de fibroína en el material como lo han reportado algunos autores previamente [240, 241], lo que explicaría las zonas con pequeños agregados o huecos que se observan en las Figuras 5.13e y 5.13f, y por lo tanto, es un resultado a tener en cuenta al momento de elegir el método de biofuncionalización, ya que estos resultados pueden sugerir que el material solo tenga actividad antitrombogénica en las zonas donde se concentran los agregados de fibroína biofuncionalizada, pero no en el resto de su superficie.

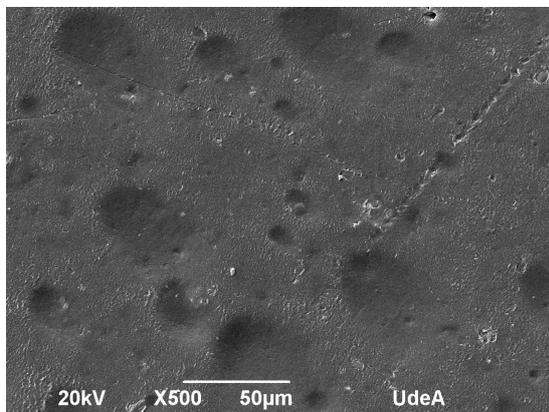
Basado en los resultados anteriores, se concluye que la biofuncionalización de fibroína por acople de carbodiimida resulta en un material más homogéneo comparado con el material obtenido cuando se biofuncionaliza por aprovechamiento de interacciones electrostáticas, dado que este último puede afectar directamente la forma en que se dan las interacciones de hidrógeno entre los diferentes componentes del material, promoviendo la formación de coacervados de fibroína y posibles zonas donde no haya actividad antitrombogénica.



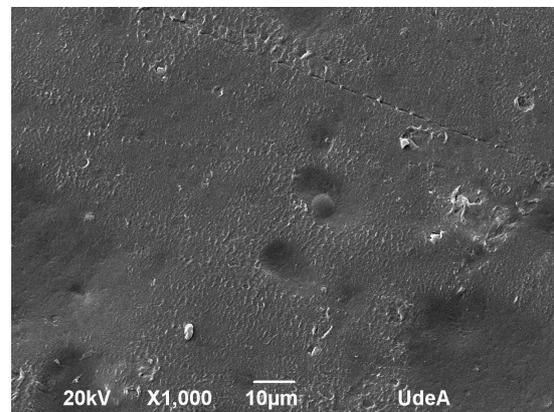
(a) Muestra 3 (control) a 500 aumentos



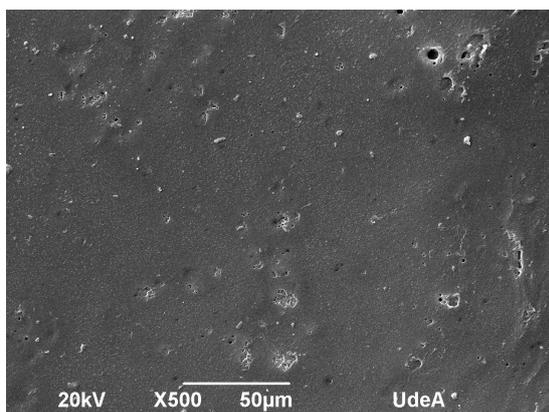
(b) Muestra 3 (control) a 1000 aumentos



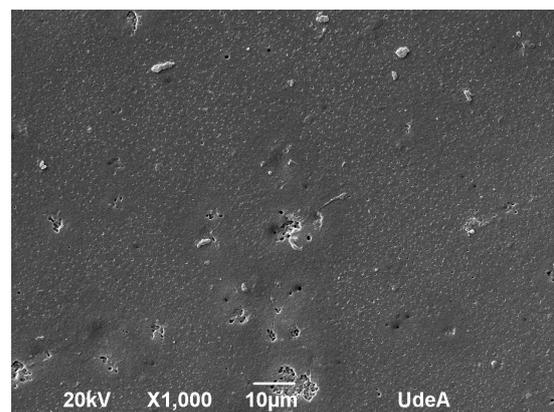
(c) Muestra 3 (EDC/NHS) a 500 aumentos



(d) Muestra 3 (EDC/NHS) a 1000 aumentos



(e) Muestra 3 (electrotático) a 500 aumentos



(f) Muestra 3 (electrotático) a 1000 aumentos

Figura 5.13: Micrografías SEM para las muestra 3 de control, bofuncionalizada por acople de carbodiimida y por aprovechamiento de interacciones electrostáticas a 500 y 1000 aumentos.

5.3.4.2. Ángulo de contacto

La mojabilidad de los materiales destinados a la fabricación de conductos vasculares es una propiedad que contribuye a su biocompatibilidad, específicamente, las plaquetas en la

sangre tienden a comportarse diferente cuando están en contacto con superficies hidrofílicas o hidrofóbicas, activándose menos en superficies hidrofílicas [242], sin embargo, la relación entre los dominios hidrofílicos e hidrofóbicos del material deben garantizar que pueden evitar la adsorción de proteínas, razón por la cual, superficies con ángulos de contacto bajos, y alto grado de mojabilidad no necesariamente son más biocompatibles [129].

Los resultados de las mediciones de ángulo de contacto para todas las muestras se encuentran registrados en la Tabla 5.2, y las fotografías de dichas mediciones se encuentran en la Figura 5.14, además de esto, en la Figura 5.15 se comparan los resultados de ángulo de contacto de la muestra de control y las muestras biofuncionalizadas por ambos métodos.

Según estos resultados, hay un descenso en el ángulo de contacto desde 63.5° para la muestra de control hasta 50.0° para la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida, y hasta 37.1° para la muestra biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas, por lo tanto, ambos métodos de biofuncionalización resultan en superficies más hidrofílicas, lo cual es consecuencia de un aumento en la disponibilidad de grupos polares provenientes de la heparina tales como ácidos carboxílicos (-COOH) en la superficie [111], además, en el caso de la muestra biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas, se cree que la disminución en el ángulo de contacto se relacione a la alta densidad de carga superficial, lo que hará que esta muestra sea más hidrofílica que la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida como se ha encontrado previamente [234, 241, 243]. Estos resultados resultan interesantes, ya que el rango de hidrofílicidad que ofrecen se adecua bastante bien para aplicaciones relacionadas a los materiales destinados a contacto con sangre, las cuales requieren que el material en cuestión tenga preferiblemente un ángulo de contacto en el rango $\theta = 48^\circ - 65^\circ$, el cual garantiza un balance apropiado entre la hidrofílicidad e hidrofobicidad del material [200], permitiendo mejor adhesión de células endoteliales, evita la adsorción de las proteínas presentes en la sangre y disminuye su coagulación [49, 129, 201], por lo tanto, en términos de la hidrofílicidad, resulta más adecuado usar el acople de carbodiimida como técnica de biofuncionalización, ya que se ajusta mejor a este rango.

En conclusión, la inmovilización de heparina sobre la fibroína, y posterior fabricación del material biofuncionalizado produce una superficie más hidrofílica por el aumento de grupos polares en ésta, a pesar de esto, la muestra biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas tiene un ángulo de contacto muy bajo, razón por la cual se recomienda el uso de la biofuncionalización por acople de carbodiimida, ya que el ángulo de contacto está en el rango requerido para materiales destinados al contacto con sangre.

Muestra	Ángulo de contacto ($^\circ$)
3 (Control)	63.5 ± 2.8
3 (EDC/NHS)	50.0 ± 3.7
3 (Electrostático)	37.1 ± 7.1

Tabla 5.2: Ángulo de contacto para la muestra de control y biofuncionalizada por acople de carbodiimida y aprovechamiento de interacciones electrostáticas

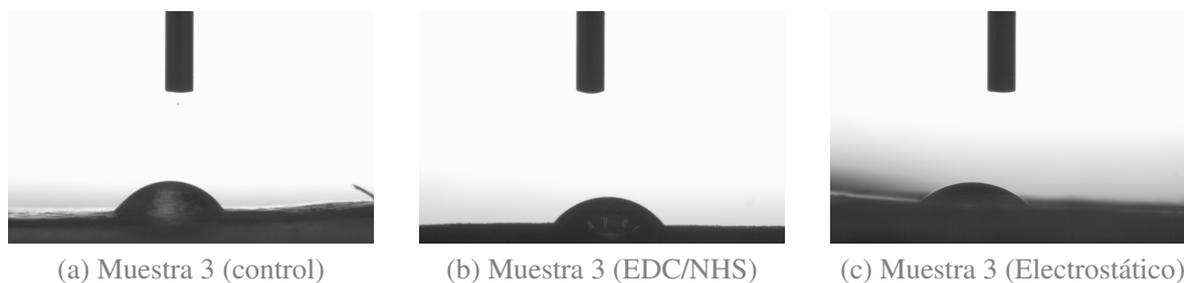


Figura 5.14: Fotografías de las mediciones de ángulo de contacto para la muestra de control y biofuncionalizada por acople de carbodiimida y aprovechamiento de interacciones electrostáticas

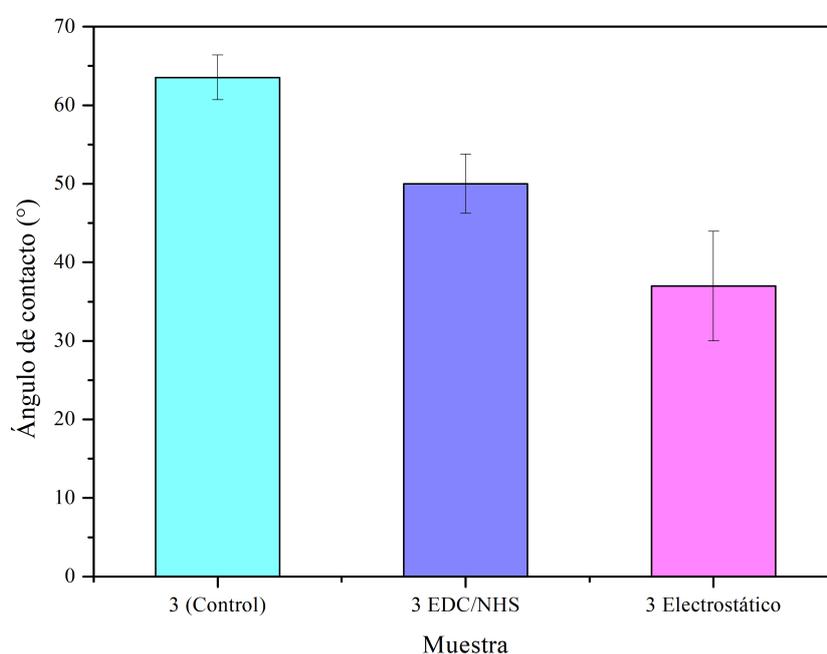


Figura 5.15: Comparación de los ángulos de contacto para la muestra 3 de control, biofuncionalizada por acople de carbodiimida (EDC/NHS) y por aprovechamiento de interacciones electrostáticas.

5.3.5. Efecto de la biofuncionalización en las propiedades mecánicas

En el Capítulo 4 se encontró que la mayoría de los materiales formulados tenían potencial para ser usados en la fabricación de diferentes tipos de conductos vasculares dependiendo de las propiedades mecánicas requeridas por el conducto a fabricar, específicamente, de las diferentes formulaciones mostradas en la Tabla 4.2 se escogió la muestra 3 para ser biofuncionalizada debido al balance entre su homogeneidad estructural, propiedades mecánicas, hidrofiliidad y resistencia a la degradación, basado en lo anterior, la muestra 3 fue preparada nuevamente para ser usada como blanco, y se prepararon muestras de este mismo material biofuncionalizado por ambas metodologías con el objetivo de estudiar el efecto de la biofuncionalización en las propiedades mecánicas del material.

Los resultados de las caracterizaciones mecánicas de las muestras analizadas se encuentran registrados en la Tabla 5.3, además, las curvas esfuerzo vs deformación que dan cuenta de dichos resultados se encuentran registradas en la Figura 5.3, en la que se muestra la curva promedio de las tres replicas realizadas a cada muestra, finalmente, el gráfico de barras comparativo para cada una de las propiedades mecánicas respecto al control y cada uno de los métodos de funcionalización se muestra en la Figura 5.17.

Muestra	Resistencia a la tracción (MPa)	Elongación en la ruptura (%)	Módulo elástico (MPa)	Límite elástico (MPa)
3 (control)	7.01 ± 0.33	93.11 ± 16.10	0.74 ± 0.14	4.75 ± 0.24
3 - EDC/NHS	6.64 ± 0.34	105.85 ± 13.63	0.44 ± 0.04	5.34 ± 0.21
3 - Electrostático	7.12 ± 0.41	102.45 ± 18.35	0.60 ± 0.04	4.94 ± 0.12

Tabla 5.3: Valores promedio de la resistencia a la tracción, elongación en la ruptura, módulo elástico y límite elástico para la muestra 3 de control, biofuncionalizada por acople de carbodiimida y biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas.

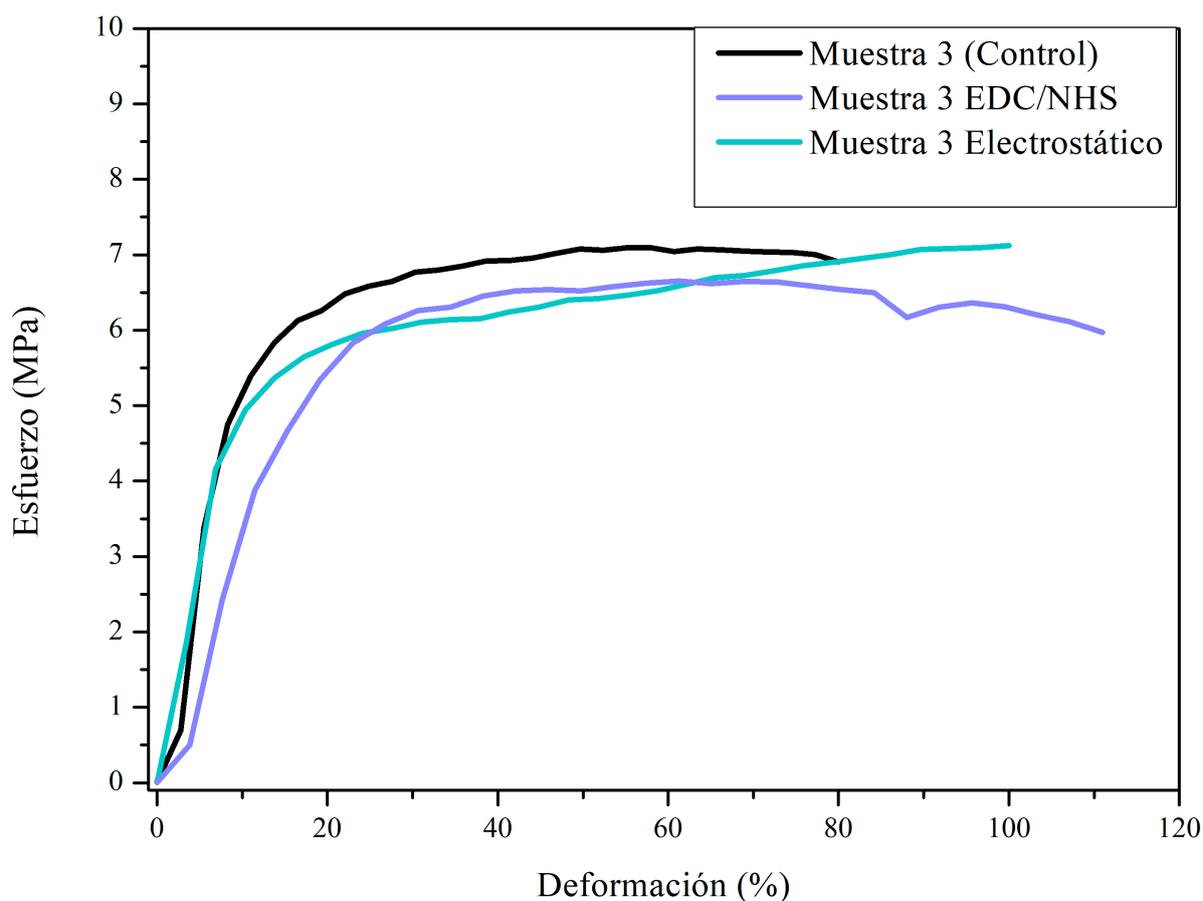


Figura 5.16: Curvas esfuerzo vs deformación para la muestra 3 de control (—), funcionalizada por acople de carbodiimida (—) y por aprovechamiento de interacciones electrostáticas (—).

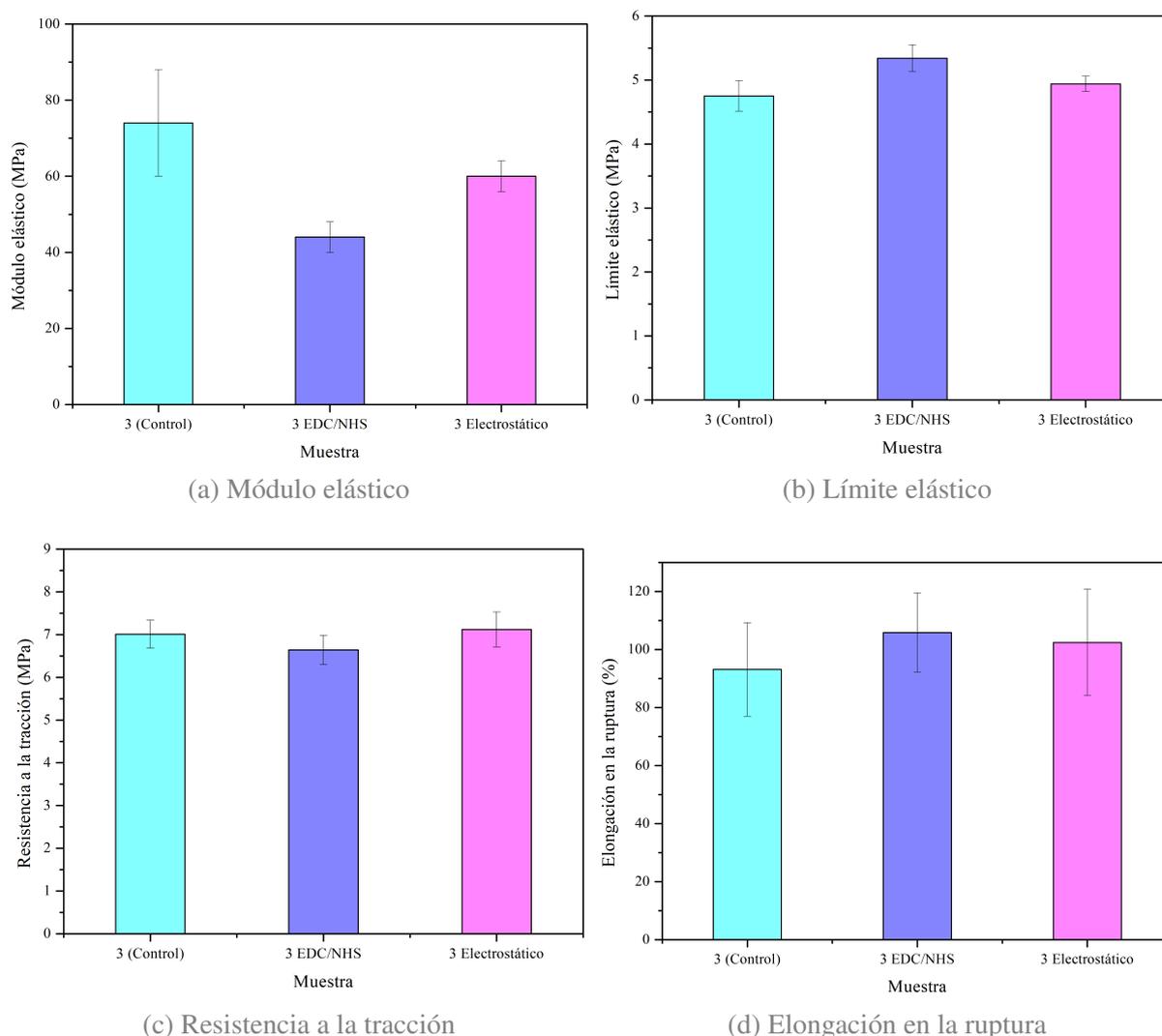


Figura 5.17: Gráfico de barras donde se compara el efecto de la biofuncionalización en las propiedades mecánicas donde se reconoce: (a); Módulo elástico, (b); Límite elástico, (c); Resistencia a la tracción, (d); Elongación en la ruptura.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 5.3 y en las Figuras 5.16 y 5.17, a excepción del módulo elástico, no se encuentra una diferencia estadística significativa en las demás propiedades mecánicas del material cuando se prepara con la fibroína biofuncionalizada por ambos métodos, estos resultados son similares a los encontrados por diferentes autores cuando se inmoviliza heparina sobre diferentes materiales [162, 224, 244], sin embargo, en el caso específico de la biofuncionalización de fibroína con heparina, una consideración importante a tener en cuenta, es que la estructura molecular de la heparina, podrá interactuar a través de puentes de hidrógeno con los demás componentes del material [241], de este modo, dado que la heparina se inmoviliza sobre la fibroína en solución previo a la preparación del material final, es probable que la cantidad de enlaces de hidrógeno que se formen no sea muy alta comparada

con el material sin biofuncionalizar, y por lo tanto, estas interacciones no se vean reflejadas en las propiedades mecánicas del material biofuncionalizado, por otra parte, en el caso del módulo elástico, cuando la heparina se inmoviliza por un enlace covalente a la fibroína, esta última utiliza las aminas terminales de su estructura para formar dichos enlaces, y por lo tanto, la cantidad de puentes de hidrógeno que se formarán serán lo suficientemente menores como para afectar la rigidez del material, por lo tanto, a pesar de que la inmovilización de heparina no afecta drásticamente las demás propiedades mecánicas, su principal efecto se verá reflejado en módulo elástico del material final solo cuando se biofuncionaliza por acople de carbodiimida, teniendo como consecuencia que el material resultó menos rígido, por lo tanto, puede ser potencialmente útil en la fabricación de dispositivos para contacto con la sangre como injertos vasculares, ya que sigue estando dentro del rango necesario como se explico en la Sección 4.3.5.

Basado en los resultados anteriores, se concluye que los métodos de biofuncionalización no influyen significativamente en las propiedades mecánicas del material final exceptuando el módulo elástico para la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida, a pesar de lo anterior, dicha muestra sigue siendo la más apropiada, y por lo tanto la sugerida para tener en cuenta como candidato en la fabricación de injertos vasculares artificiales.

5.4. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos luego de biofuncionalizar la muestra 3 del compilado mostrado en la Tabla 4.2, se plantean las siguientes conclusiones:

- El proceso de biofuncionalización fue exitoso tanto cuando se hace por acople de carbodiimida como por aprovechamiento de interacciones electrostáticas, sin embargo, la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida presento mayor estabilidad en el tiempo, lo que demuestra que dicha técnica resulta mejor a la hora de obtener el material con capacidad antitrombogénica.
- Los resultados del análisis espectroscópico muestran que la heparina se incorporó en el material de manera exitosa utilizando ambas metodologías, y estos resultados, junto a la prueba de estabilidad a 15 días sugieren que la incorporación de la heparina cuando se hace a través de acople de carbodiimida es más estable, por lo tanto, se cree que el enlazamiento covalente entre la fibroína y la heparina fue exitoso.
- Los análisis termogravimétricos muestran que la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida deja un residuo superior a la muestra de control, lo que se asocia a las sales de sulfato que deja la heparina luego de su proceso de degradación.
- Según los resultados de ángulo de contacto, las muestras biofuncionalizadas son más hidrofílicas, lo que se debe a la presencia de heparina superficial en el material.

- Los análisis de microscopía electrónica de barrido muestran que las superficies siguen siendo homogéneas luego de la biofuncionalización por acople de carbodiimida, sin embargo, este comportamiento cambia cuando se hace la biofuncionalización por aprovechamiento de interacciones electrostáticas, ya que se ven algunos poros y agregados de fibroína producto de los coacervados formados por las sales presentes en el material.
- En términos generales, la biofuncionalización no afectó las propiedades mecánicas, sin embargo, la muestra biofuncionalizada por acople de carbodiimida resultó ser menos rígida, lo que finalmente favorece el material con miras a utilizarse en la fabricación de injertos vasculares artificiales.

Capítulo 6

Conclusiones y perspectivas

6.1. Conclusiones

A lo largo de este documento, se mostró el protocolo que se siguió para optimizar la extracción de fibroína desde el capullo del gusano de seda *Bobyx Mori*, el procedimiento y diseño experimental que se siguió para formular en total 27 materiales a partir de esta proteína, y el esquema de reacción para biofuncionalizar uno de estos materiales utilizando heparina como sustancia funcionalizante con el fin de obtener un material cuya superficie sea apta para el contacto con la sangre, y por lo tanto, útil para la fabricación de injertos vasculares artificiales, de este modo, de acuerdo con los objetivos planteados para este proyecto en la Sección 1.2 se dan las siguientes conclusiones:

- El proceso de extracción de fibroína a partir del capullo de gusano de seda *Bobyx Mori* se logró optimizar de forma exitosa a través del estudio estadístico planteado, lográndose extraer en promedio 76.88 % de fibroína de estos capullos con las condiciones optimas mostradas en la Tabla 3.4, además , las caracterizaciones por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier mostraron que la configuración de esta proteína extraída tenía tanto láminas $-\beta$ como estructuras del tipo *random coil*, siendo estas configuraciones estructurales normales para la fibroína en su forma de seda.
- Se formularon en total 27 materiales a base de fibroína, y se encontró que sus propiedades morfológicas, mecánicas y superficiales dependen fuertemente de las interacciones por enlaces de hidrógeno que se dan entre los componentes principales de las formulaciones (fibroína y PVA), las cuales se logran potenciar por adición de glicerol en dichas formulaciones, de este modo, se encontró que los materiales con proporción fibroína:glicerol de 3:2 (g:g) resultaron más homogéneos en su estructura macroscópica, y no presentaron fallas superficiales significativas ni separación de fases, además , fueron los más hidrofílicos, teniendo un ángulo de contacto de 61.03 ± 1.91 , lo que le permite tener la hidrofiliidad adecuada para materiales destinados al contacto con sangre. Para

todas las demás proporciones fibroína:glicerol se encontraron algunas fallas estructurales y tendencia al colapso del material final.

- Cada una de las propiedades mecánicas estudiadas en el diseño experimental de la Tabla 4.2 depende de forma diferente de los factores estudiados en el diseño experimental, sin embargo, se destaca que en la mayoría de los casos, estas propiedades no dependieron fuertemente de la proporción PVA:glutaraldehído, por lo que se pudo reducir al máximo el uso de este entrecruzante teniendo en cuenta que los perfiles de degradación no mostraron diferencias significativas, y por lo tanto, resulta natural pensar que los grados de entrecruzamiento del PVA en los materiales es similar.
- La biofuncionalización del material escogido (muestra 3) fue exitosa y cumplió su objetivo, es decir, darle actividad antitrombogénica al material, de este modo, según los resultados obtenidos, la biofuncionalización por acople de carbodiimida resultó ser mejor ya que logró mantener actividad de una forma bastante notable comparada con la biofuncionalización por aprovechamiento de interacciones electrostáticas, esto debido a que el primer método de biofuncionalización logra un anclaje entre la fibroína y la heparina a través de enlaces covalentes (puentes diimida) lo que hace que estos materiales solo tengan pérdidas de actividad relacionadas con la degradación del mismo, sin embargo para el segundo método de biofuncionalización, la pérdida de actividad fue grande debido a que las sales de heparina migran al seno de la solución de PBS, teniendo pérdidas de actividad tanto por degradación como por dicha migración.
- En términos generales, la biofuncionalización del material no afectó significativamente las propiedades mecánicas del material, sin embargo, la muestra funcionalizada por acople de carbodiimida resultó menos rígida comparada con la muestra de control y la muestra biofuncionalizada por aprovechamiento de interacciones electrostáticas, además de esto, se encontró que luego de biofuncionalizar, las muestras se vuelven más hidrofílicas, lo cual era un resultado esperado dado que las superficies presentan más grupos polares expuestos como se había reportado previamente en la literatura.
- Los análisis por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y termogravimétricos confirman el éxito de la biofuncionalización, sugiriendo que la formación de enlaces diimida fue exitosa en el caso de la biofuncionalización por acople de carbodiimida y que la interacción electrostática entre la heparina y el material fue alta para la biofuncionalización por aprovechamiento de interacciones electrostáticas.

Basado en lo anterior, se concluye que tanto el objetivo general del proyecto como los objetivos específicos se cumplieron con éxito, por lo tanto, el material formulado y biofuncionalizado fue evaluado exitosamente como potencialmente útil para la fabricación de injertos vasculares artificiales, de este modo, se deja como sugerencia continuar con el uso de la biofuncionalización por acople de carbodiimida, y además se sugiere que se siga haciendo dicha biofuncionalización a la fibroína en solución, de este modo, se garantiza que el material tendrá actividad antitrombogénica a medida que se va degradando en algún medio específico como el PBS, el cual simula bastante bien los fluidos fisiológicos.

6.2. Perspectivas

Este proyecto deja un precedente en la formulación de materiales avanzados para la fabricación de dispositivos médicos, específicamente, aquellos que están destinados a la fabricación de injertos vasculares artificiales, por lo tanto, las perspectivas de este proyecto estarán enfocadas en la fabricación de dichos dispositivos, para la cual, algunas ideas incluyen la adaptación del material biofuncionalizado a tecnologías de fabricación de superficies con topografías especiales como impresión 3D, o tecnología láser para la obtención de estructuras porosas, de este modo, la principal perspectiva de este proyecto es obtener dispositivos con propiedades estructurales que se ajusten a la necesidad de cada conducto vascular requerido.

Apéndice **A**

**Acta de aprobación para la prueba de
recalcificación de sangre**



**COMITÉ DE BIOÉTICA
SEDE INVESTIGACIÓN UNIVERSITARIA
CBE-SIU**

ACTA DE APROBACION: 20-107-890

Nombre completo del proyecto: *"Biofuncionalización de superficies a base de fibroína para su potencial uso en aplicaciones cardiovasculares"*.

Sometido por: Carlos Murillo.

Fecha en que fue aprobado por el comité: 04 de marzo de 2020

La SEDE DE INVESTIGACION UNIVERSITARIA constituyó mediante la Resolución 001 de Mayo 2 de 2005 de la Dirección Científica de la SIU el Comité de Bioética de investigación en Humanos CBE-SIU, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última actualización del año 2013; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991) y la Resolución 2378 de 2008 del Ministerio de la Protección Social de Colombia que adopta las Buenas Prácticas Clínicas para las instituciones que conducen investigación con medicamentos en seres humanos (cuando aplique).

El CBE SIU certifica que:

1. Se revisaron y aprobaron los siguientes documentos del proyecto:

- a. Protocolo de investigación (Explicación y ampliación si el estudio está enmarcado dentro de un macroproyecto).
- b. Formato(s) de consentimiento y/o asentimiento informado
- c. Hojas de vida de los investigadores
- d. Formato de recolección de datos
- e. Folleto del investigador
- f. Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)
- g. Informe de actividades-renovación de aval

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité de Bioética.

(El Comité de Bioética cuenta con seis (6) integrantes, para que haya quórum es necesario la presencia de al menos cuatro (4) de ellos, en la reunión del 04 de marzo participaron):



ALBERTO TOBÓN CASTAÑO- *PhD en Salud pública y metodología de investigación Biomédica*

DANIEL FLÓREZ MEDINA- *Magíster en bioética y derecho*

HILDA INÉS ESCOBAR MESA- *Paramédica*

JASMÍN VIVIANA CACANTE- *PhD en Bioética*

NATALIA PAOLA LONDOÑO ARANGO- *Especialización en responsabilidad civil y seguros*

3. **El Comité consideró que el presente estudio:** Es válido desde el punto vista ético. La investigación representa un riesgo mínimo para los sujetos que participan.
4. Conforme con la Resolución 8430 de 1993, el Comité tendrá acceso permanente a los datos del estudio, sin que esto vulnere la confidencialidad de la información de los participantes.
5. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
6. El Comité considera adecuada la forma de obtener el consentimiento informado de los participantes en el estudio.
7. El Comité informará inmediatamente a los entes reguladores, correspondientes según el caso
 - a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
8. El Comité informará inmediatamente a las directivas de la SIU, toda información que reciba acerca de:
 - a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación
 - b. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
 - c. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité.
9. El presente proyecto queda aprobado por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.
Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente a este comité, con todos los documentos que permitan su revisión actualizada: estos incluyen, informe de actividades relacionadas con la captación y seguimiento de los participantes, fecha de iniciación, modificaciones solicitadas y previamente aprobadas por este Comité. El informe debe constar con toda la información relativa a los participantes y al mecanismo de toma de consentimiento informado.
10. El Investigador principal deberá:

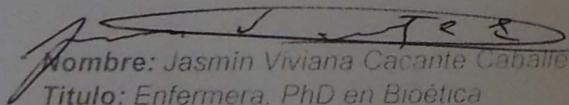


- a. Informar cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del CBE-SIU excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- b. Avisar cualquier situación imprevista que se considere implica riesgos para los sujetos, la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- c. Informar cualquier evento adverso serio de algún participante, comunicando la situación a la secretaria y a la presidencia del CBE-SIU, dentro de las primeras 24 horas de ocurrido el incidente, tal como lo dispone la resolución 2378 de 2008 y la resolución 2011020764 de 2011, ambas del Ministerio de la Protección Social.
- d. Poner en conocimiento del Comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones y las implicaciones que esto tiene para el cumplimiento de los objetivos del proyecto.

11. Observaciones

El Comité de Bioética consideró satisfactorias las respuestas a las observaciones planteadas al proyecto de la referencia.

Se solicita incluir en el Formato de Consentimiento Informado la información de los dos testigos y del Comité de Bioética en el numeral " 16. **¿A dónde puede comunicarse si tiene alguna duda?**" (Comité de Bioética de Investigación en Humanos de la Sede de Investigación Universitaria, teléfono 2196612 e-mail: cbioeticasiu@udea.edu.co)


Nombre: Jasmin Viviana Cacante Caballero
Título: Enfermera, PhD en Bioética
Cargo CBE-SIU: Presidenta

Proyectó: María Coral Correa
Administradora en Salud
Asistente CBE-SIU

Bibliografía

- [1] WHO. WHO methods and data sources for country-level causes of death. *Top 10 Causes Death*, (December), 2016.
- [2] G. E. Raskob, P. Angchaisuksiri, A. N. Blanco, H. Buller, A. Gallus, B. J. Hunt, E. M. Hylek, A. Kakkar, S. V. Konstantinides, M. McCumber, Y. Ozaki, A. Wendelboe, and J. I. Weitz. Thrombosis: A major contributor to global disease burden. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 34(11):2363–2371, 2014.
- [3] Erik J. Suuronen and Marc Ruel. *Biomaterials for cardiac regeneration*. 2015.
- [4] Fatima Zia, Khalid Mahmood Zia, Mohammad Zuber, Shazia Tabasum, and Saima Rehman. International Journal of Biological Macromolecules Heparin based polyurethanes : A state-of-the-art review. 84:101–111, 2016.
- [5] M. Fazley Elahi, Guoping Guan, and Lu Wang. Hemocompatibility of surface modified silk fibroin materials: A review. *Rev. Adv. Mater. Sci.*, 38(2):148–159, 2014.
- [6] Michael Lovett, Christopher Cannizzaro, Laurence Daheron, Brady Messmer, Gordana Vunjak-Novakovic, and David L. Kaplan. Silk fibroin microtubes for blood vessel engineering. *Biomaterials*, 28(35):5271–5279, 2007.
- [7] Antonella Motta, Devid Maniglio, Claudio Migliaresi, Hyeon Joo Kim, Xianyan Wan, Xiao Hu, and David L. Kaplan. Silk fibroin processing and thrombogenic responses. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 20(13):1875–1897, 2009.
- [8] Soichiro Enomoto, Makoto Sumi, Kan Kajimoto, Yasumoto Nakazawa, Rui Takahashi, Chiyuki Takabayashi, Tetsuo Asakura, and Masataka Sata. Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material. *J. Vasc. Surg.*, 51(1):155–164, 2010.
- [9] Xuefeng Qiu, Benjamin Li Ping Lee, Xinghai Ning, Niren Murthy, Nianguo Dong, and Song Li. End-point immobilization of heparin on plasma-treated surface of electrospun polycarbonate-urethane vascular graft. *Acta Biomater.*, 51:138–147, 2017.
- [10] Phuong Le Thi, Yunki Lee, Ho Joon Kwon, Kyung Min Park, Mi Hee Lee, Jong Chul Park, and Ki Dong Park. Tyrosinase-Mediated Surface Coimmobilization of Heparin and

- Silver Nanoparticles for Antithrombotic and Antimicrobial Activities. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9(24):20376–20384, 2017.
- [11] P. C. Begovac, R. C. Thomson, J. L. Fisher, A. Hughson, and A. Gällhagen. Improvements in GORE-TEX® vascular graft performance by Carmeda® BioActive Surface heparin immobilization. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 25(5):432–437, 2003.
- [12] M. J B Wissink, R. Beernink, J. S. Pieper, A. A. Poot, G. H M Engbers, T. Beugeling, W. G. Van Aken, and J. Feijen. Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation. *Biomaterials*, 22(2):151–163, 2001.
- [13] Maxwell T. Koobatian, Sindhu Row, Randall J. Smith, Carmon Koenigsnecht, Stelios T. Andreadis, and Daniel D. Swartz. Successful endothelialization and remodeling of a cell-free small-diameter arterial graft in a large animal model. *Biomaterials*, 76:344–358, 2016.
- [14] Yao Yao, Jianing Wang, Yun Cui, Rong Xu, Zhihong Wang, Ju Zhang, Kai Wang, Yuejie Li, Qiang Zhao, and Deling Kong. Effect of sustained heparin release from PCL/chitosan hybrid small-diameter vascular grafts on anti-thrombogenic property and endothelialization. *Acta Biomater.*, 10(6):2739–2749, 2014.
- [15] Kyla N. Sask, Leslie R. Berry, Anthony K C Chan, and John L. Brash. Modification of polyurethane surface with an antithrombin-heparin complex for blood contact: Influence of molecular weight of polyethylene oxide used as a linker/spacer. *Langmuir*, 28(4):2099–2106, 2012.
- [16] Xuefeng Qiu, Benjamin Li Ping Lee, Xinghai Ning, Niren Murthy, Nianguo Dong, and Song Li. End-point immobilization of heparin on plasma-treated surface of electrospun polycarbonate-urethane vascular graft. *Acta Biomater.*, 51:138–147, 2017.
- [17] Danyan Wang, Haifeng Liu, and Yubo Fan. Silk fibroin for vascular regeneration. *Microsc. Res. Tech.*, 80(3):280–290, 2017.
- [18] Terin Adalı and Murat Uncu. Silk fibroin as a non-thrombogenic biomaterial. *Int. J. Biol. Macromol.*, 90:11–19, 2016.
- [19] Amanda R. Murphy and David L. Kaplan. Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *J. Mater. Chem.*, 19(36):6443–6450, 2009.
- [20] Lixing Dai, Jun Li, and Eisuke Yamada. Effect of glycerin on structure transition of PVA/SF blends. *J. Appl. Polym. Sci.*, 86(9):2342–2347, 2002.
- [21] Hye Ryoung Park, Sung Hyo Chough, Yeon Hum Yun, and Soon Do Yoon. Properties of starch/PVA blend films containing citric acid as additive. *J. Polym. Environ.*, 13(4):375–382, 2005.
- [22] Masuhiro Tsukada, Gullano Freddi, and John S Crichton. Structure and Compatibility of Poly (vinyl Alcohol) -Silk Fibroin (PVA / SF) Blend Films. pages 243–248.

-
- [23] Jing Hua Li, Chuan Bao Cao, Xilan Ma, Yin Tang, and He Sun Zhu. The Antithrombogenicity of Silk Fibroin Films Blending with Citric Acid and PVA. *Key Eng. Mater.*, 288-289:417–420, 2009.
- [24] Kara Rogers. The Human Body: The Cardiovascular System. *Br. Educ. Publ.*, 2011.
- [25] J. Gordon Betts, Peter Desaix, Eddie Johnson, Jody E. Johnson, Oksana Korol, Dean Kruse, Brandon Poe, James A. Wise, Mark Womble, and Kelly A. Young. *Anatomy and Physiology*. 2017.
- [26] E. Filová, F. Straka, T. Miřejovský, J. Mašín, and Lucie Bačáková. Tissue-engineered heart valves. *Physiol. Res.*, 58(SUPPL.2):141–150, 2009.
- [27] Frederick H. Silver, Patrick B. Snowhill, and David J. Foran. Mechanical behavior of vessel wall: A comparative study of aorta, vena cava, and carotid artery. *Ann. Biomed. Eng.*, 31(7):793–803, 2003.
- [28] Y. C. Fung and Richard Skalak. *Biomechanics. Mechanical Properties of Living Tissues*, volume 49. 2009.
- [29] Ali P Ebrahimi. Mechanical properties of normal and diseased cerebrovascular system. *J. Vasc. Interv. Neurol.*, 2(2):155–62, 2009.
- [30] J.D. Humphrey and A. Baroutaji. *Blood Vessels, Mechanical and Physical Properties of*, volume 1. Elsevier Ltd., 2016.
- [31] A. Schiavone, C. Abunassar, S. Hossainy, and L. G. Zhao. Computational analysis of mechanical stress–strain interaction of a bioresorbable scaffold with blood vessel. *J. Biomech.*, 49(13):2677–2683, 2016.
- [32] Carolien J. Van Andel, Peter V. Pistecky, and Cornelius Borst. Mechanical properties of porcine and human arteries: Implications for coronary anastomotic connectors. *Ann. Thorac. Surg.*, 76(1):58–64, 2003.
- [33] Hao-yang Mi, Yongchao Jiang, Xin Jing, Eduardo Enriquez, Heng Li, Qian Li, and Lih-sheng Turng. Fabrication of triple-layered vascular grafts composed of silk fibers, polyacrylamide hydrogel, and polyurethane nanofibers with biomimetic mechanical properties. *Mater. Sci. Eng. C*, page #pagerange#, 2018.
- [34] Kevin Range and Darrin M. York Adam Moser. Arterial stiffness identification of the human carotid artery using the stress–strain relationship in vivo. *Ultrasonics*, 52(3):402–411, mar 2012.
- [35] Stephen H Caldwell and Arun J Sanyal. Coagulation and Hemostasis in Liver Disease: Controversies and Advances. 13(1), 2009.
- [36] Severian Dumitriu. *Polymers as Biomaterials 1*. 2002.

- [37] Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffmann, Frederick J. Schoen, and Jack E. Lemons. *Biomaterials Science*.
- [38] Bruce Furie. Pathogenesis of thrombosis. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2009:255–258, 2009.
- [39] Shannon M. Bates and Jeffrey I. Weitz. The status of new anticoagulants. *Br. J. Haematol.*, 134(1):3–19, 2006.
- [40] DANE. Estadísticas vitales año 2018. 2018:48, 2019.
- [41] Robert B. Taylor Alan K. David, Scott A. Fields, D. Melessa Phillips, Joseph E. Scherger. *Taylor's Cardiovascular Disease*, volume 1. 2005.
- [42] Erik J Suuronen and Marc Ruel. *Biomaterials for Cardiac Regeneration*.
- [43] Bonow Robert O. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. *JAMA*, 294(3):374, 2005.
- [44] John Harlan Mathew A. Vadas. *Advances in vascular biology*, volume 53. 2013.
- [45] Matthijs Oudkerk Edwin J.R. van Beek, Harry R. Büller. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Wiley-Blackwell*, 58(12):7250–7, dec 2014.
- [46] John L Francis. *Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis*, 1996.
- [47] Md Shahidul Islam. *Thrombosis and Embolism: from Research to Clinical Practice*, volume 1. 2017.
- [48] Dina S. Vara, Henryk J. Salacinski, Ruben Y. Kannan, Laurence Bordenave, George Hamilton, and Alexander M. Seifalian. Cardiovascular tissue engineering: State of the art. *Pathol. Biol.*, 53(10):599–612, 2005.
- [49] Erwin A. Vogler. Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials*, 33(5):1201–1237, 2012.
- [50] Anandi Krishnan, Paul Cha, Yi Hsiu Liu, David Allara, and Erwin A. Vogler. Interfacial energetics of blood plasma and serum adsorption to a hydrophobic self-assembled monolayer surface. *Biomaterials*, 27(17):3187–3194, 2006.
- [51] Karen S. Lavery, Candace Rhodes, Adam McGraw, and Michael J. Eppihimer. Anti-thrombotic technologies for medical devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 112:2–11, 2017.
- [52] Ryan A. Hoshi, Robert Van Lith, Michele C. Jen, Josephine B. Allen, Karen A. Lapidus, and Guillermo Ameer. The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts. *Biomaterials*, 34(1):30–41, 2013.
- [53] Bonow Robert O. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. *JAMA*, 294(3):374, 2005.

-
- [54] Arthur A Sasahara and Joseph Loscalzo. *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis* edited by. 2002.
- [55] Buddy D. Ratner and Allan S. Hoffman. *An Introduction to Materials in Medicine: Third Edition*. 2013.
- [56] P. Tranquilli Leali and A. Merolli. *Fundamentals of biomaterials*. 2009.
- [57] Xingdong Zhang David Williams. *Definitions of Biomaterials for the Twenty-First Century*. Elsevier, first edition, 2019.
- [58] Phillip A. Sharp and Robert Langer. Promoting convergence in biomedical science. *Science (80-.)*, 333(6042):527, 2011.
- [59] Juan Chen, Weimin Shi, Adam J. Norman, and Ponniah Ilavarasan. Electrical impact of high-speed bus crossing plane split. *IEEE Int. Symp. Electromagn. Compat.*, 2:861–865, 2002.
- [60] Henryk J. Salacinski, Sean Goldner, Alberto Giudiceandrea, George Hamilton, Alexander M. Seifalian, Alan Edwards, and Robert J. Carson. The mechanical behavior of vascular grafts: A review. *J. Biomater. Appl.*, 15(3):241–278, 2001.
- [61] Andrea S. Theus, Martin L. Tomov, Alex Cetnar, Bryanna Lima, Joy Nish, Kevin McCoy, Morteza Mahmoudi, and Vahid Serpooshan. Biomaterial approaches for cardiovascular tissue engineering. *Emergent Mater.*, 2(2):193–207, 2019.
- [62] S Ravi and El Chaikof. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen. Med.*, 5(1):1–21, 2010.
- [63] Brett C. Isenberg, Chrysanthi Williams, and Robert T. Tranquillo. Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. *Circ. Res.*, 98(1):25–35, 2006.
- [64] Dina S Vara, Henryk J Salacinski, Ruben Y Kannan, Laurence Bordenave, George Hamilton, and Alexander M Seifalian. Cardiovascular tissue engineering : state of the art Ingenierie tissulaire appliqué aux vaisseaux sanguins : état de l art. 53:599–612, 2005.
- [65] Anita C. Thomas, Gordon R. Campbell, and Julie H. Campbell. Advances in vascular tissue engineering. *Cardiovasc. Pathol.*, 12(5):271–276, 2003.
- [66] Jiaqing Zhang, Hexi Huang, Ruihong Ju, Kuntang Chen, Shaobin Li, Wujun Wang, and Yusheng Yan. In vivo biocompatibility and hemocompatibility of a polytetrafluoroethylene small diameter vascular graft modified with sulfonated silk fibroin. *Am. J. Surg.*, 213(1):87–93, 2017.
- [67] Mingzhong Li, Norihiko Minoura, Lixing Dai, and Linsen Zhang. Preparation of porous poly(vinyl alcohol)-silk fibroin (PVA/SF) blend membranes. *Macromol. Mater. Eng.*, 286(9):529–534, 2001.

- [68] By Nihal Engin Vrana and Garrett B McGuinness Professor Paul A Cahill. *Use of PVA Cryogelation for Tissue Engineering: Composites, Scaffold Formation and Cell Encapsulation*. 2009.
- [69] J.Y. Chang, D.Y. Godovsky, M.J. Han, C.M. Hassan, J. Kim, B. Lee, Y. Lee, N.A. Peppas, R.P. Quirk, and T. Yoo. *Biopolymers: PVA Hydrogels Anionic Polymerisation Nanocomposites*. 2000.
- [70] Kyla N. Sask, Leslie R. Berry, Anthony K C Chan, and John L. Brash. Polyurethane modified with an antithrombin-heparin complex via polyethylene oxide linker/spacers: Influence of PEO molecular weight and PEO-ATH bond on catalytic and direct anticoagulant functions. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 100 A(10):2821–2828, 2012.
- [71] Bingsong Qiu, Weizhong Mai, Rong Zeng, Mei Tu, Jianhao Zhao, and Zhengang Zha. Microwave-assisted immobilization of heparin onto polyurethane surface for improving blood compatibility. *J. Wuhan Univ. Technol. Mater. Sci. Ed.*, 29(5):1071–1077, 2014.
- [72] Mingqi Tan, Yakai Feng, Heyun Wang, Li Zhang, Musammir Khan, Jintang Guo, Qingliang Chen, and Jianshi Liu. Immobilized bioactive agents onto polyurethane surface with heparin and phosphorylcholine group. *Macromol. Res.*, 21(5):541–549, 2013.
- [73] Indu Bhushan, Alhumaidi Alabbas, Jyothi C. Sistla, Rashmi Saraswat, Umesh R. Desai, and Ram B. Gupta. Heparin depolymerization by immobilized heparinase: A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 99:721–730, 2017.
- [74] Alok Tiwari, Henryk Salacinski, Alexander M Seifalian, and George Hamilton. New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes. 10(3):191–197, 2002.
- [75] M. G. Jeschke, V. Hermanutz, S. E. Wolf, and G. B. Koveker. Polyurethane vascular prostheses decreases neointimal formation compared with expanded polytetrafluoroethylene. *J. Vasc. Surg.*, 29(1):168–176, 1999.
- [76] Michael Szycher and William A. McArthur. Surface Fissuring of Polyurethanes Following In Vivo Exposure. *Corros. Degrad. Implant Mater.*, pages 308–322, 1985.
- [77] Danyan Wang, Haifeng Liu, and Yubo Fan. Silk fibroin for vascular regeneration. *Microsc. Res. Tech.*, 80(3):280–290, 2017.
- [78] Terin Adalı and Murat Uncu. International Journal of Biological Macromolecules Silk fibroin as a non-thrombogenic biomaterial. *Int. J. Biol. Macromol.*, 90:11–19, 2016.
- [79] Xiaoqin Wang, Tuna Yucel, Qiang Lu, Xiao Hu, and David L. Kaplan. Silk nanospheres and microspheres from silk/pva blend films for drug delivery. *Biomaterials*, 31(6):1025–1035, 2010.

- [80] Tooru Kitagawa and Kazuyuki Yabuki. Physical properties of silk fibroin/chitosan blend films. *J. Appl. Polym. Sci.*, 80(7):928–934, 2001.
- [81] Lixing Dai, Jun Li, and Eisuke Yamada. Effect of glycerin on structure transition of PVA/SF blends. *J. Appl. Polym. Sci.*, 86(9):2342–2347, 2002.
- [82] Yen Bach Truong, Jonghyun Choi, James Mardel, Yuan Gao, Sabrina Maisch, Mustafa Musameh, and Ilias Louis Kyratzis. Functional Cross-Linked Electrospun Polyvinyl Alcohol Membranes and Their Potential Applications. *Macromol. Mater. Eng.*, 302(8):1–9, 2017.
- [83] M A Shakir, Mohd Firdaus Yhaya, and Mardiana Idayu Ahmad. The Effect of Crosslinking Fibers with Polyvinyl Alcohol Using Citric Acid. *Imp. J. Interdiscip. Res. (IJIR)*, 3(4):758–764, 2017.
- [84] Patricia Cazón, Gonzalo Velazquez, and Manuel Vázquez. Characterization of mechanical and barrier properties of bacterial cellulose, glycerol and polyvinyl alcohol (PVOH) composite films with eco-friendly UV-protective properties. *Food Hydrocoll.*, 99(May 2019):105323, 2020.
- [85] Rui Shi, Jingliang Bi, Zizheng Zhang, Aichen Zhu, Dafu Chen, Xinhua Zhou, Liquan Zhang, and Wei Tian. The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature. *Carbohydr. Polym.*, 74(4):763–770, 2008.
- [86] C Z Zhou, F Confalonieri, M Jacquet, R Perasso, Z G Li, and J Janin. Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins*, 44(2):119–122, 2001.
- [87] J R Shrimp Taura. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *926(2002):1057–1061*, 2003.
- [88] B. Zuo, L. Dai, and Z. Wu. Analysis of structure and properties of biodegradable regenerated silk fibroin fibers. *J. Mater. Sci.*, 41(11):3357–3361, 2006.
- [89] M.M.R. Khan and M. Tsukada. *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2014.
- [90] Peggy Cebe, Qiang Lu, Shenzhou Lu, Jonathan A. Kluge, Xiaoqin Wang, Xiao Hu, and David L. Kaplan. Water-insoluble silk films with silk I structure. *Acta Biomater.*, 6(4):1380–1387, 2009.
- [91] Motta Antonella, Fambri Luca, and Migliaresi Claudio. Regenerated silk fibroin films: Thermal and dynamic mechanical analysis. *Macromol. Chem. Phys.*, 203(10-11):1658–1665, 2002.
- [92] Norihiko Minoura, Masuhiro Tsukada, and Masanobu Nagura. Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial. *Biomaterials*, 11(6):430–434, 1990.

- [93] Dohiko Terada, Yoshiyuki Yokoyama, Shinya Hattori, Hisatoshi Kobayashi, and Yasushi Tamada. The outermost surface properties of silk fibroin films reflect ethanol-treatment conditions used in biomaterial preparation. *Mater. Sci. Eng. C*, 58:119–126, 2016.
- [94] Rajesh R. Naik, Lawrence F. Drummy, David M. Phillips, Morley O. Stone, and B. L. Farmer. Thermally Induced α -Helix to β -Sheet Transition in Regenerated Silk Fibers and Films. *Biomacromolecules*, 6(6):3328–3333, 2005.
- [95] Anže Lošdorfer Božič and Rudolf Podgornik. pH Dependence of Charge Multipole Moments in Proteins. *Biophys. J.*, 113(7):1454–1465, 2017.
- [96] Xiu Ying Liu, Chao Can Zhang, Wei Lin Xu, and Chen xi Ouyang. Controlled release of heparin from blended polyurethane and silk fibroin film. *Mater. Lett.*, 63(2):263–265, 2009.
- [97] F Philipp Seib, Manuela Herklotz, Kelly A Burke, Manfred F Maitz, Carsten Werner, and David L Kaplan. Multifunctional silk e heparin biomaterials for vascular tissue engineering applications. *Biomaterials*, 35(1):83–91, 2014.
- [98] Silva Patachia, Artur J.M. Valente, Adina Papancea Lobo, and Victor M. M. Lobo. *Poly (Vinyl Alcohol)[Pva]- Based Polymer Membranes*. 2009.
- [99] R. Saiah, P. A. Sreekumar, N. Leblanc, M. Castandet, and J. M. Saiter. Study of wheat-flour-based agropolymers: Influence of plasticizers on structure and aging behavior. *Cereal Chem.*, 84(3):276–281, 2007.
- [100] Muhammad Rizwan, Yuan Yao, Maud B. Gorbet, John W. Tse, Deirdre E.J. Anderson, Monica T. Hinds, and Evelyn K.F. Yim. One-Pot Covalent Grafting of Gelatin on Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel to Enhance Endothelialization and Hemocompatibility for Synthetic Vascular Graft Applications. *ACS Appl. Bio Mater.*, 3(1):693–703, 2020.
- [101] Yufen Wu, Chenglong Yu, Meiyi Xing, Lu Wang, and Guoping Guan. Surface modification of polyvinyl alcohol (PVA)/polyacrylamide (PAAm) hydrogels with polydopamine and REDV for improved applicability. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 108(1):117–127, 2020.
- [102] Mei Chen Lin, Ching Wen Lou, Jan Yi Lin, Ting An Lin, Yueh Sheng Chen, and Jia Horng Lin. Biodegradable Polyvinyl Alcohol Vascular Stents: Structural Model and Mechanical and Biological Property Evaluation. *Mater. Sci. Eng. C*, 91(April):404–413, 2018.
- [103] M. Atlan, T. Simon-Yarza, J. M. Ino, V. Hunsinger, L. Corté, P. Ou, R. Aid-Launais, M. Chaouat, and D. Letourneur. Design, characterization and in vivo performance of synthetic 2 mm-diameter vessel grafts made of PVA-gelatin blends. *Sci. Rep.*, 8(1):1–12, 2018.

-
- [104] Bert Gebben, Hans W.A. van den Berg, Dick Bargeman, and Cees A. Smolders. Intramolecular crosslinking of poly(vinyl alcohol). *Polymer (Guildf)*., 26(11):1737–1740, 1985.
- [105] Cristiano P. Borges Katia C. S. Figueiredo Tito L. M. Alves and Chemical. Poly(vinyl alcohol) films crosslinked by glutaraldehyde under mild conditions. *J. Appl. Polym. Sci.*, 111(6):3074–3080, jan 2009.
- [106] Saravanababu Murugesan, Jin Xie, and Robert J. Linhardt. Immobilization of Heparin: Approaches and Applications. *October*, 8(2):80–100, 2008.
- [107] Henri Ulrich. *Chemistry and Technology of Carbodiimides*. 2007.
- [108] End-point Immobilization and Plasma-treated Surface. End-Point Immobilization of Heparin on Plasma-Treated Surface of Electrospun Department of Bioengineering , University of California , Los Angeles (UCLA), Los Corresponding to :. *Acta Biomater.*, 2017.
- [109] Yabin Zhu, Changyou Gao, Tao He, and Jiacong Shen. Endothelium regeneration on luminal surface of polyurethane vascular scaffold modified with diamine and covalently grafted with gelatin. 25:423–430, 2004.
- [110] Giyoong Tae, Yang Jung Kim, Won Il Choi, Mihye Kim, Patrick S. Stayton, and Alan S. Hoffman. Formation of a novel heparin-based hydrogel in the presence of heparin-binding biomolecules. *Biomacromolecules*, 8(6):1979–1986, 2007.
- [111] Inn Kyu Kang, Oh Hyeong Kwon, Young Moo Lee, and Yong Kiel Sung. Preparation and surface characterization of functional group-grafted and heparin-immobilized polyurethanes by plasma glow discharge. *Biomaterials*, 17(8):841–847, 1996.
- [112] Charles D Ebert and Salt Lake City. Immobilized heparin: spacer arm effects on biological interactions. 1987.
- [113] H. Edward Conrad. *Heparin Binding Proteins*. 2001.
- [114] Charles A. Hales. Hari G. Garg, Robert j. Linhardt. *Chemistry And Biology of Heparin and Heparan Sulfate*. 2005.
- [115] Dallas L. Rabenstein. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat. Prod. Rep.*, 19(3):312–331, 2002.
- [116] Robert J. Linhardt. 2003 Claude S. Hudson award address in carbohydrate chemistry. Heparin: Structure and activity. *J. Med. Chem.*, 46(13):2551–2564, 2003.
- [117] J. Choay, M. Petitou, J. C. Lormeau, P. Sinaÿ, B. Casu, and G. Gatti. Structure-activity relationship in heparin: A synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116(2):492–499, 1983.

- [118] Jack E. Lemos Ratner, Buddy D. Allan S. Hoffman, Federick J. Schoen. *Biomaterial Science*.
- [119] Hari G. Garg, Robert J. Linhardt, and Charles A. Hales. Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate. *Chem. Biol. Heparin Heparan Sulfate*, 2005.
- [120] Douglas A. Skoog, Stanley R. Crouch, and F. James Holler. *Instrumental Analysis Principles*. 2006.
- [121] Janez Grum. *Book Review: Handbook of Polymer Testing Short-Term Mechanical Tests*, volume 27. 2006.
- [122] T. W. Huseby and S. Matsuoka. *Mechanical properties of solid and liquid polymers*, volume 1. 1967.
- [123] Second Edition. *An introduction to the mechanical properties of solid polymers*, volume 42. 2004.
- [124] Stuart L. Cooper and Jianjun Guan. *Advances in Polyurethane Biomaterials*. Number 108. 2016.
- [125] N. Burke, A. and Hasirci. *Biomaterials: From Molecules to Engineered Tissues*. 2004.
- [126] Kyla N. Sask, Leslie R. Berry, Anthony K C Chan, and John L. Brash. Modification of polyurethane surface with an antithrombin-heparin complex for blood contact: Influence of molecular weight of polyethylene oxide used as a linker/spacer, 2012.
- [127] Liang Jia, Chiara E. Ghezzi, and David L. Kaplan. Optimization of silk films as substrate for functional corneal epithelium growth. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 104(2):431–441, 2016.
- [128] Rolando A. Gittens, Lutz Scheideler, Frank Rupp, Sharon L. Hyzy, Jürgen Geis-Gerstorfer, Zvi Schwartz, and Barbara D. Boyan. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater.*, 10(7):2907–2918, 2014.
- [129] Kara L. Menzies and Lyndon Jones. The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. *Optom. Vis. Sci.*, 87(6):387–399, 2010.
- [130] Paul C Hiemenz. *Surface Tension and Contact Angle: Application to Pure Substances*. 1997.
- [131] D Munday. *Surfaces, Interfaces and Colloids — Principles and Applications, Second Edition* by D. Myers, Wiley-VCH, New York, 1999, xx+501 pp., ISBN 0-471-33060-4; £61.50., volume 51. 2000.
- [132] Ipek Y Enis, Hande Sezgin, and Telem G Sadikoglu. Full factorial experimental design for mechanical properties of electrospun vascular grafts. *J. Ind. Text.*, (65):152808371769061, 2017.

-
- [133] F. Vollrath, D. Porter, and C. Dicko. *The structure of silk*, volume 2. Woodhead Publishing Limited, 2009.
- [134] Leng Duei Koh, Yuan Cheng, Choon Peng Teng, Yin Win Khin, Xian Jun Loh, Si Yin Tee, Michelle Low, Enyi Ye, Hai Dong Yu, Yong Wei Zhang, and Ming Yong Han. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. *Prog. Polym. Sci.*, 46:86–110, 2015.
- [135] Robert O. Kuehl. *Diseño de experimentos Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*. 2000.
- [136] Mahesh Kumar Sah and Arvind Kumar. The extraction of fibroin protein from Bombyx mori silk cocoon: Optimization of process parameters. *Int. J. Bioinforma. Res.*, 2(2):975–3087, 2010.
- [137] Ja Wass. First Steps in Experimental Design—The Screening Experiment. *J. Valid. Technol.*, pages 49–57, 2010.
- [138] Kauko Leivisk. Introduction to Experiment Design Kauko Leiviskä University of Oulu Control Engineering Laboratory Table of Contents. 2013.
- [139] Yoko TAKASU, Hiromi YAMADA, and Kozo TSUBOUCHI. Isolation of Three Main Sericin Components from the Cocoon of the Silkworm, Bombyx mori. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(12):2715–2718, 2002.
- [140] E. V. Keogh and R. J. Walsh. © 1965 Nature Publishing Group. *Nat. Publ. Gr.*, 208(5007):239–241, 1965.
- [141] Regina Inês Kunz, Rose Meire Costa Brancalhão, Lucinéia De Fátima Chasko Ribeiro, and Maria Raquel Marçal Natali. Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications. *Biomed Res. Int.*, 2016, 2016.
- [142] Gene V. Glass, Percy D. Peckham, and James R. Sanders. Consequences of Failure to Meet Assumptions Underlying the Fixed Effects Analyses of Variance and Covariance. *Rev. Educ. Res.*, 42(3):237–288, 1972.
- [143] Seung Jin Lee, Lim Jeong, Byung-Moo Min, In-Sung Yeo, Ju-Eun Oh, Won Ho Park, and Taek Seung Lee. Collagen-Based Biomimetic Nanofibrous Scaffolds: Preparation and Characterization of Collagen/Silk Fibroin Bicomponent Nanofibrous Structures. *Biomacromolecules*, 9(4):1106–1116, 2008.
- [144] Edwin Kamalha, Yuansheng Zheng, and Yongchun Zeng. Analysis of the secondary crystalline structure of regenerated Bombyx mori fibroin. *Res. Rev. Biosci.*, 7(2):76–83, 2013.
- [145] Jagdeesh Bandekar. Vibrational analysis of peptides, polypeptides, and proteins: Characteristic amide bands of beta-turns. *76(2):774–777*, 1979.

- [146] Maxime Boulet-Audet, Thierry Lefèvre, Thierry Buffeteau, and Michel Pézolet. Attenuated total reflection infrared spectroscopy: An efficient technique to quantitatively determine the orientation and conformation of proteins in single silk fibers. *Appl. Spectrosc.*, 62(9):956–962, 2008.
- [147] Tatsuo Miyazawa. Perturbation treatment of the characteristic vibrations of polypeptide chains in various configurations. *J. Chem. Phys.*, 32(6):1647–1652, 1960.
- [148] Andreas Barth. The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 74(3-5):141–173, 2000.
- [149] Paola Taddei and Patrizia Monti. Vibrational infrared conformational studies of model peptides representing the semicrystalline domains of Bombyx mori silk fibroin. *Biopolymers*, 78(5):249–258, 2005.
- [150] WH Moore and S Krimm. Vibrational Analysis of Peptides, Polypeptides, and Proteins .2. Beta Poly(L Alanine) and Beta Poly(L Alanyl glycine). *Biopolymers*, 15:2465–2483, 1976.
- [151] Yu N. Chirgadze and N. A. Nevskaya. Infrared spectra and resonance interaction of amide I vibration of the parallel chain pleated sheet. *Biopolymers*, 15(4):627–636, 1976.
- [152] Y N Chirgadze, O V Fedorov, and N P Trushina. Estimation of amino acid side chain absorption in the IR spectra of protein solutions in heavy water. *Biopolymers*, 14:679, 1975.
- [153] M. Boulet-Audet, F. Vollrath, and C. Holland. Identification and classification of silks using infrared spectroscopy. *J. Exp. Biol.*, 218(19):3138–3149, 2015.
- [154] H. Y. Kweon, I. C. Um, and Y. H. Park. Thermal behavior of regenerated Antheraea pernyi silk fibroin film treated with aqueous methanol. *Polymer (Guildf)*., 41(20):7361–7367, 2000.
- [155] Joykrisna Saha, Ibrahim H Mondal, Rezaul Karim Sheikh, and Ahsan Habib. Journal of Textile Science & Engineering Extraction , Structural and Functional Properties of Silk Sericin Biopolymer from Bombyx mori Silk Cocoon Waste. 9(1):1–5, 2019.
- [156] Erik J. Suuronen and Marc Ruel. *Biomaterials for cardiac regeneration*. 2015.
- [157] Hai Yan Wang and Yu Qing Zhang. Effect of regeneration of liquid silk fibroin on its structure and characterization. *Soft Matter*, 9(1):138–145, 2013.
- [158] Maminirina Randrianandrasana, Wen Yen Wu, David A. Carney, Amy J. Wagoner Johnson, and May R. Berenbaum. Structural and mechanical properties of cocoons of Antherina suraka (Saturniidae, Lepidoptera), an endemic species used for silk production in Madagascar. *J. Insect Sci.*, 17(1), 2017.
- [159] Fujia Chen, David Porter, and Fritz Vollrath. Silk cocoon (Bombyx mori): Multi-layer structure and mechanical properties. *Acta Biomater.*, 8(7):2620–2627, 2012.

- [160] Peng Chao Guo, Qian Wang, Zhan Wang, Zhaoming Dong, Huawei He, and Ping Zhao. Biochemical characterization and functional analysis of invertase Bmsuc1 from silkworm, *Bombyx mori*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 107:2334–2341, 2018.
- [161] Juan Du, Tonghe Zhu, Haiyan Yu, Jingjing Zhu, Changbing Sun, Jincheng Wang, Sihao Chen, Jihu Wang, and Xuran Guo. Potential applications of three-dimensional structure of silk fibroin/poly(ester-urethane) urea nanofibrous scaffold in heart valve tissue engineering. *Appl. Surf. Sci.*, 447:269–278, 2018.
- [162] Zhending She, Weiqiang Liu, and Qingling Fenga. Silk fibroin/chitosan/heparin scaffold: Preparation, antithrombogenicity and culture with hepatocytes. *Polym. Int.*, 59(1):55–61, 2010.
- [163] Qiang Lu, Shenjia Zhang, Kun Hu, Qingling Feng, Chuanbao Cao, and Fuzhai Cui. Cytocompatibility and blood compatibility of multifunctional fibroin/collagen/heparin scaffolds. *Biomaterials*, 28(14):2306–2313, 2007.
- [164] Hao Yang Mi, Yongchao Jiang, Xin Jing, Eduardo Enriquez, Heng Li, Qian Li, and Lih Sheng Turng. Fabrication of triple-layered vascular grafts composed of silk fibers, polyacrylamide hydrogel, and polyurethane nanofibers with biomimetic mechanical properties. *Mater. Sci. Eng. C*, 98(April):241–249, 2019.
- [165] Jia-Horng Lin, Jin-Jia Hu, Cheng-Ying Tu, Mong-Chuan Lee, Po-Ching Lu, and Ching-Wen Lou. Porous Tubular PVA Hydrogels: Preparation and Assessment. *DEStech Trans. Eng. Technol. Res.*, (apetc), 2018.
- [166] Jianglin Wang, Wei Hu, Qun Liu, and Shengmin Zhang. Dual-functional composite with anticoagulant and antibacterial properties based on heparinized silk fibroin and chitosan. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 85(2):241–247, 2011.
- [167] Benjamin J. Allardyce, Rangam Rajkhowa, Rodney J. Dilley, Sharon L. Redmond, Marcus D. Atlas, and Xungai Wang. Glycerol-plasticised silk membranes made using formic acid are ductile, transparent and degradation-resistant. *Mater. Sci. Eng. C*, 80:165–173, 2017.
- [168] Choong Kyun Yeom and Kew Ho Lee. Pervaporation separation of water-acetic acid mixtures through poly(vinyl alcohol) membranes crosslinked with glutaraldehyde. *J. Memb. Sci.*, 109(2):257–265, 1996.
- [169] Lynn L.H. Huang Lee, David T. Cheung, and Marcel E. Nimni. Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. *J. Biomed. Mater. Res.*, 24(9):1185–1201, 1990.
- [170] Julie E. Gough, Colin A. Scotchford, and Sandra Downes. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. *J. Biomed. Mater. Res.*, 61(1):121–130, 2002.

- [171] M. Grimm, M. Grabenwoger, E. Eybl, A. Moritz, P. Bock, M. M. Muller, and E. Wolner. Improved biocompatibility of bioprosthetic heart valves by L glutamic acid treatment. *J. Card. Surg.*, 7(1):58–64, 1992.
- [172] Jui Yang Lai. Biocompatibility of genipin and glutaraldehyde cross linked chitosan materials in the anterior chamber of the eye. *Int. J. Mol. Sci.*, 13(9):10970–10985, 2012.
- [173] Isabelle Migneault, Catherine Dartiguenave, Michel J. Bertrand and Karen C. Waldron. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 4(37)::790–802, 2004.
- [174] Muralidhar Padala. Biomaterials for heart valve replacement: Conjectures and refutations. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 152(4):1175–1176, 2016.
- [175] Shigeyuki Ozaki, Paul Herijgers, and Willem Flameng. Influence of blood contact on the calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine aortic valves. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 9(4):245–252, 2003.
- [176] Juan Zhou, Bin Zhang, Lijun Shi, Jian Zhong, Jun Zhu, Juan Yan, Ping Wang, Chuanbao Cao, and Dannong He. Regenerated silk fibroin films with controllable nanostructure size and secondary structure for drug delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6(24):21813–21821, 2014.
- [177] Claudia Patricia Ossa Maritza Buitrago Vasquez. *Desarrollo de un material compuesto de fibroína y nanobarras de hidroxiapatita para su potencial aplicación como sustituto óseo*. PhD thesis, 2016.
- [178] ASTM (D638-02a). American Society for Testing and Materials. Standard test method for tensile properties of plastics (D 638 - 02a) - SCAN VERSION. *Astm*, 08:46–58, 2003.
- [179] Amanda R. Murphy and David L. Kaplan. Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *J. Mater. Chem.*, 19(36):6443–6450, 2009.
- [180] Meng Wan, Dong Ki Baek, Jin Ho Cho, Inn Kyu Kang, and Kyo Han Kim. In vitro blood compatibility of heparin-immobilized polyurethane containing ester groups in the side chain. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 15(10):1079–1087, 2004.
- [181] M Fazley Elahi, Guoping P Guan, Lu Wang, and Martin W King. Improved hemocompatibility of silk fibroin fabric using layer-by-layer polyelectrolyte deposition and heparin immobilization. *J. Appl. Polym. Sci.*, 131(18):n/a–n/a, 2014.
- [182] R. Deppisch, M. Storr, R. Buck, and H. Göhl. Blood material interactions at the surfaces of membranes in medical applications. *Sep. Purif. Technol.*, 14(1-3):241–254, 1998.
- [183] J. Park, D. L. Kaplan, V. Karageorgiou, P. Cebe, H.-J. Jin, U.-J. Kim, and R. Valluzzi. Water-Stable Silk Films with Reduced β -Sheet Content. *Adv. Funct. Mater.*, 15(8):1241–1247, 2005.

- [184] ASTM. F1634: In-Vitro Environmental Conditioning of Polymer Matrix Composite Materials and Implant Devices. *ASTM Stand.*, 15(Reapproved):5, 2000.
- [185] Jinlong Zhang, Ning Wang, Wenguang Liu, Xiaoli Zhao, and William Lu. Intermolecular hydrogen bonding strategy to fabricate mechanically strong hydrogels with high elasticity and fatigue resistance. *Soft Matter*, 9(27):6331–6337, 2013.
- [186] Yan Jie Wang, Chen Yu Li, Zhi Jian Wang, Yiping Zhao, Li Chen, Zi Liang Wu, and Qiang Zheng. Hydrogen bond-reinforced double-network hydrogels with ultrahigh elastic modulus and shape memory property. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, 56(19):1281–1286, 2018.
- [187] Luis Cesteros Iturbe. Aplicaciones de la FTIR al estudio de las interacciones polímero-polímero. *Rev. Iberoam. Polímeros*, 5(3):1, 2004.
- [188] A N Egorochkin and S E Skobeleva. Infrared Spectroscopy of the Hydrogen Bond as a Method for the Investigation of Intramolecular Interactions. *Russ. Chem. Rev.*, 48(12):1198–1211, 1979.
- [189] Erik T.J. Nibbering, Jens Dreyer, Oliver Kühn, Jens Bredenbeck, Peter Hamm, and Thomas Elsaesser. Vibrational dynamics of hydrogen bonds. *Springer Ser. Chem. Phys.*, 87:619–687, 2007.
- [190] Mel Gorman. The evidence from infrared spectroscopy for hydrogen bonding: A case history of the correlation and interpretation of data. *J. Chem. Educ.*, 34(6):304–306, 1957.
- [191] Bo Zhu, Jianchun Li, Yong He, Yasushi Osanai, Shuichi Matsumura, and Yoshio Inoue. Thermal and infrared spectroscopic studies on hydrogen-bonding interaction of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate)s with natural polyphenol catechin. *Green Chem.*, 5(5):580–586, 2003.
- [192] Yiyu Wang, Xinyu Wang, Jian Shi, Rong Zhu, Junhua Zhang, and Zongrui Zhang. Flexible silk fibroin films modified by genipin and glycerol. *RSC Adv.*, 5(123):101362–101369, 2015.
- [193] Xiaobo Hu, Mohammad Vatankhah-Varnoosfaderani, Jing Zhou, Qiaoxi Li, and Sergei S. Sheiko. Weak Hydrogen Bonding Enables Hard, Strong, Tough, and Elastic Hydrogels. *Adv. Mater.*, 27(43):6899–6905, 2015.
- [194] Milad Rouhi, Seyed Hadi Razavi, and Seyed Mohammad Mousavi. Optimization of crosslinked poly(vinyl alcohol) nanocomposite films for mechanical properties. *Mater. Sci. Eng. C*, 71:1052–1063, 2017.
- [195] M. Krumova, D. López, R. Benavente, C. Mijangos, and J. M. Pereña. Effect of crosslinking on the mechanical and thermal properties of poly(vinyl alcohol). *Polymer (Guildf.)*, 41(26):9265–9272, 2000.

- [196] Ainatul Mardhiah Mohd Amin, Suhaila Mohd Sauid, Mohibah Musa, and Ku Halim Ku Hamid. The effect of glycerol content on mechanical properties, surface morphology and water absorption of thermoplastic films from *tacca leontopetaloides* starch. *J. Teknol.*, 79(5-3):53–59, 2017.
- [197] Zhe Yang, Hongdan Peng, Weizhi Wang, and Tianxi Liu. Crystallization behavior of poly(ϵ -caprolactone)/layered double hydroxide nanocomposites. *J. Appl. Polym. Sci.*, 116(5):2658–2667, 2010.
- [198] Yang Liu, Wen-ze Qiu, Hao-cheng Yang, Yue-cheng Qian, Xiao-jun Huang, and Zhi-kang Xu. RSC Advances. *RSC Adv.*, 5:12922–12930, 2015.
- [199] N. Burke, A. and Hasirci. *Biomaterials: From Molecules to Engineered Tissues*. 2004.
- [200] Teruo Okano, Takao Aoyagi, Kazunori Kataoka, Kazuhiko Abe, Yasuhisa Sakurai, Masashi Shimada, and Isao Shinohara. Hydrophilic hydrophobic microdomain surfaces having an ability to suppress platelet aggregation and their in vitro antithrombogenicity. *J. Biomed. Mater. Res.*, 20(7):919–927, 1986.
- [201] Jeong Eun Song, Bo Ra Sim, Yoo Shin Jeon, Han Sol Kim, Eun Yeong Shin, Cristiano Carlomagno, and Gilson Khang. Characterization of surface modified glycerol/silk fibroin film for application to corneal endothelial cell regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 30(4):263–275, 2019.
- [202] Qiang Lu, Bing Zhang, Mingzhong Li, Baoqi Zuo, David L. Kaplan, Yongli Huang, and Hesun Zhu. Degradation mechanism and control of silk fibroin. *Biomacromolecules*, 12(4):1080–1086, 2011.
- [203] Paula Fomby, Andrew J Cherlin, Afra Hadjizadeh, Charles J Doillon, Viranuj Sueblinvong, Daniel J. Weiss, Jason H T Bates, Thomas Gilbert, W. Conrad Liles, Carolyn Lutzko, Jay Rajagopal, Darwin J. Prockop, Daniel Chambers, Adam Giangreco, Armand Keating, Darrell Kotton, Peter I. Lelkes, Darcy E. Wagner, and Darwin J. Prockop. Stem cells and cell therapies in lung biology and diseases: Conference report. *Ann. Am. Thorac. Soc.*, 12(3):181–204, 2010.
- [204] Cho Hay Mun, Youngmee Jung, Sang Heon Kim, Sun Hee Lee, Hee Chan Kim, Il Keun Kwon, and Soo Hyun Kim. Three-dimensional electrospun poly(Lactide-Co- ϵ -Caprolactone) for small-diameter vascular grafts. *Tissue Eng. - Part A*, 18(15-16):1608–1616, 2012.
- [205] Jeffrey J D Henry, Jian Yu, Aijun Wang, Randall Lee, Jun Fang, and Song Li. Engineering the mechanical and biological properties of nanofibrous vascular grafts for in situ vascular tissue engineering. *Biofabrication*, 9(3):035007, aug 2017.
- [206] Shannon L.M. Dahl, Caroline Rhim, Ying C. Song, and Laura E. Niklason. Mechanical properties and compositions of tissue engineered and native arteries. *Ann. Biomed. Eng.*, 35(3):348–355, 2007.

- [207] Charanpreet Singh, Cynthia Wong, and Xungai Wang. Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries. *J. Funct. Biomater.*, 6(3):500–525, 2015.
- [208] Jingyu Tang, Luhan Bao, Xue Li, Lin Chen, and Feng F. Hong. Potential of PVA-doped bacterial nano-cellulose tubular composites for artificial blood vessels. *J. Mater. Chem. B*, 3(43):8537–8547, 2015.
- [209] Gerhardt Konig, Todd N. McAllister, Nathalie Dusserre, Sergio A. Garrido, Corey Iyican, Alicia Marini, Alex Fiorillo, Hernan Avila, Wojciech Wystrychowski, Krzysztof Zagalski, Marcin Maruszewski, Alyce Linthurst Jones, Lech Cierpka, Luis M. de la Fuente, and Nicolas L’Heureux. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials*, 30(8):1542–1550, 2009.
- [210] Grand View Research. Coronary Artery Bypass Graft Market Size | CABG Industry Report, 2025. pages 1–6, 2020.
- [211] John P. Veinot. *Handbook of Pathology and Pathophysiology of Cardiovascular Disease*, volume 12. 2003.
- [212] Patrick Vermette, Hans J Griesser, Gaétan Laroche, and Robert Guidoin. *Tissue engineering intelligence unit 6*. 2001.
- [213] S. Haddad, N. Zanina, A. Othmane, and L. Mora. Polyurethane films modified by antithrombin-heparin complex to enhance endothelialization: An original impedimetric analysis. *Electrochim. Acta*, 56(21):7303–7311, 2011.
- [214] Ying Jun Du, Leslie R. Berry, and Anthony K.C. Chan. Chemical-physical characterization of polyurethane catheters modified with a novel antithrombin-heparin covalent complex. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 22(17):2277–2294, 2011.
- [215] P. Klement, Y. J. Du, L. Berry, M. Andrew, and A. K.C. Chan. Blood-compatible biomaterials by surface coating with a novel antithrombin-heparin covalent complex. *Biomaterials*, 23(2):527–535, 2002.
- [216] Bae J S, Seo E J, and Kang I K. Synthesis and characterization of heparinized polyurethanes using plasma glow discharge. *Materials (Basel)*, 20:529–537, 1990.
- [217] Meneme Gümüdereliolu and Sezin Aday. Heparin-functionalized chitosan scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydr. Res.*, 346(5):606–613, 2011.
- [218] Chong Cheng, Shudong Sun, and Changsheng Zhao. Progress in heparin and heparin-like/mimicking polymer-functionalized biomedical membranes. *J. Mater. Chem. B*, 2(44):7649–7672, 2014.
- [219] Phillip B. Messersmith Lee Haeshin, Shara M. Dellatore, William M. Miller. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. 426(2007), 2012.

- [220] Rachel Williams. *Surface modification of biomaterials methods, analysis and applications*. 2011.
- [221] Yu Qi, Hui Wang, Kai Wei, Ya Yang, Ru Yue Zheng, Ick Soo Kim, and Ke Qin Zhang. A review of structure construction of silk fibroin biomaterials from single structures to multi-level structures. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(3), 2017.
- [222] Valentina Catto, Silvia Farè, Irene Cattaneo, Marina Figliuzzi, Antonio Alessandrino, Giuliano Freddi, Andrea Remuzzi, and Maria Cristina Tanzi. Small diameter electrospun silk fibroin vascular grafts: Mechanical properties, in vitro biodegradability, and in vivo biocompatibility. *Mater. Sci. Eng. C*, 54:101–111, 2015.
- [223] Makoto Demura, Takashi Komura, and Tetsuo Asakura. Membrane potential of Bombyx mori silk fibroin membrane induced by an immobilized enzyme reaction. 26:167–175, 1991.
- [224] Xin Chen, Wenjun Li, Wei Zhong, Yuhua Lu, and Tongyin Yu. pH sensitivity and ion sensitivity of hydrogels based on complex forming chitosan/silk fibroin interpenetrating polymer network. *J. Appl. Polym. Sci.*, 65(11):2257–2262, sep 1997.
- [225] D. T. Hunter and J. L. Allensworth. Improved coagulation screening by an activated recalcification test. *J. Clin. Pathol.*, 20(3):244–248, 1967.
- [226] ISO. ISO 10993-4. Biological evaluation of medical devices — Part 4: Selection of tests for interactions with blood. 61010-1 © Iec2001, 2002:13, 2002.
- [227] MAry Bruce Litten. Girdhari L. Gulliani Bong H. Hyun. A Simple and Reliable Test to Monitor Heparin Therapy. *Am. J. Clin. Pathol.*, 65, 1975.
- [228] Marc Deschka. La extracción de sangre en la práctica. *Sarstedt*, page 100, 2011.
- [229] F Philipp Seib, Manuela Herklotz, Kelly A Burke, Manfred F Maitz, Carsten Werner, and David L Kaplan. Biomaterials Multifunctional silk e heparin biomaterials for vascular tissue engineering applications. *Biomaterials*, 35(1):83–91, 2014.
- [230] Norbert Weber, Hans P. Wendel, and Gerhard Ziemer. Hemocompatibility of heparin-coated surfaces and the role of selective plasma protein adsorption. *Biomaterials*, 23(2):429–439, 2002.
- [231] S. Braune, A. Lendlein, and F. Jung. *Developing standards and test protocols for testing the hemocompatibility of biomaterials*. Elsevier Ltd., 2018.
- [232] Brahatheeswaran Dhandayuthapani, Saino Hanna Varghese, Ravindran Girija Aswathy, Yasuhiko Yoshida, Toru Maekawa, and D. Sakthikumar. Evaluation of antithrombogenicity and hydrophilicity on Zein-SWCNT electrospun fibrous nanocomposite scaffolds. *Int. J. Biomater.*, 2012, 2012.
- [233] Robert B. Taylor. *Taylor's Cardiovascular Disease*, volume 1. 2005.

- [234] Marília Cestari, Vinícius Muller, Jean Henrique Da Silva Rodrigues, Celso V. Nakamura, Adley F. Rubira, and Edvani C. Muniz. Preparing silk fibroin nanofibers through electrospinning: Further heparin immobilization toward hemocompatibility improvement. *Biomacromolecules*, 15(5):1762–1767, 2014.
- [235] Shudong Wang, Youzhu Zhang, Hongwei Wang, and Zhihui Dong. Preparation, characterization and biocompatibility of electrospinning heparin-modified silk fibroin nanofibers. *Int. J. Biol. Macromol.*, 48(2):345–353, 2011.
- [236] Pedro V.A. Bueno, Paulo R. Souza, Heveline D.M. Follmann, Antonio G.B. Pereira, Alessandro F. Martins, Adley F. Rubira, and Edvani C. Muniz. N,N-Dimethyl chitosan/heparin polyelectrolyte complex vehicle for efficient heparin delivery. *Int. J. Biol. Macromol.*, 75:186–191, 2015.
- [237] Zhou Yong hong Jia Pu you Bo Cai ying Hu Li hong. Properties of Poly(vinyl alcohol) Plasticized by Glycerin. *J. For. Prod. Ind.*, 151, 2014.
- [238] Nathaniel V. Nucci and Jane M. Vanderkooi. Effects of salts of the Hofmeister series on the hydrogen bond network of water. *J. Mol. Liq.*, 143(2-3):160–170, 2008.
- [239] Hwankyung Lee. Effects of temperature, salt concentration, and the protonation state on the dynamics and hydrogen-bond interactions of polyelectrolyte multilayers on lipid membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18(9):6691–6700, 2016.
- [240] Özge Malay, Oguz Bayraktar, and Ayşegül Batigün. Complex coacervation of silk fibroin and hyaluronic acid. *Int. J. Biol. Macromol.*, 40(4):387–393, 2007.
- [241] Songmin Shang, Lei Zhu, and Jintu Fan. Intermolecular interactions between natural polysaccharides and silk fibroin protein. *Carbohydr. Polym.*, 93(2):561–573, 2013.
- [242] P. Yang, N. Huang, Y. X. Leng, Z. Q. Yao, H. F. Zhou, M. Maitz, Y. Leng, and P. K. Chu. Wettability and biocompatibility of nitrogen-doped hydrogenated amorphous carbon films: Effect of nitrogen. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, 242(1-2):22–25, 2006.
- [243] Na Meng, Xiaohong Chu, Man Qing Ge, Ming Zhang, Baohong Sun, Yu Tian Su, and Ning Lin Zhou. Preparation and characterization of Lecithin–heparin intercalated in montmorillonite nanocomposite. *Appl. Clay Sci.*, 162(December 2016):454–460, 2018.
- [244] Fatima Zia, Khalid Mahmood Zia, Mohammad Zuber, Saima Rehman, Shazia Tabasum, Salma Sultana, Khalid Mahmood, Mohammad Zuber, and Saima Rehman. Synthesis and characterization of chitosan/curcumin blends based polyurethanes. *Int. J. Biol. Macromol.*, 92:1074–1081, 2016.