



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**Polimerización de epicatequina:
evaluación de su aplicación en la
técnica de electrohilado**

TESIS

Que para obtener el título de

Ingeniera en Sistemas Biomédicos

P R E S E N T A

Edna Odette Melo Uscanga

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Alfredo Maciel Cerda



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2023

ÍNDICE

1	Lista de abreviaturas	3
2	Glosario	4
3	Resumen.....	5
4	Objetivos	5
4.1	Objetivo general.....	5
4.2	Objetivos particulares	5
5	Introducción	6
6	Antecedentes	8
6.1	Enfermedades cardiovasculares.....	8
6.2	Andamios.....	9
6.2.1	Técnicas de fabricación de andamios.....	9
6.3	Tipos de polímeros	17
6.3.1	Epicatequina.....	17
6.3.2	Policatequina.....	18
6.3.3	Poli(ϵ -caprolactona) (PCL).....	19
6.4	Lacasa	19
6.5	Métodos de caracterización del polímero	20
6.5.1	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	20
6.5.2	Espectroscopia ultravioleta-visible.....	21
6.5.3	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).....	21
6.5.4	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	23
6.5.5	Microscopía óptica	24
6.5.6	Caracterización de propiedades térmicas.....	24
6.5.7	Método 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) ABTS	26
6.5.8	Cuantificación de proteína	27
6.5.9	Actividad enzimática	27
6.6	Diseño de Experimentos	29
6.6.1	Diseños factoriales	31
7	Materiales	31
8	Metodología	32
8.1	Concentración de proteína.....	32
8.2	Actividad enzimática de la lacasa.....	32
8.3	Polimerización enzimática de epicatequina.....	33

9	Caracterización del polímero con base en epicatequina	33
9.1	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).....	33
9.1.1	Grado de conversión de epicatequina a poli(epicatequina)	33
9.2	Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)	33
9.2.1	Método 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) ABTS	34
9.3	Análisis Térmico Gravimétrico (TGA)	34
9.4	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	¡Error! Marcador no definido.
10	Electrohilado	35
10.1	Diseño de experimentos factorial fraccionado	35
10.2	Preparación de las fibras electrohiladas	36
10.3	Diseño de experimentos factorial	36
10.4	Preparación de las fibras electrohiladas	36
11	Resultados	37
11.1	Concentración de proteína.....	37
11.2	Actividad enzimática de la lacasa.....	37
11.3	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).....	38
11.3.1	Grado de conversión de epicatequina a poli(epicatequina)	40
11.4	Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)	41
11.4.1	Método 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) ABTS	42
11.5	Análisis Gravimétrico Térmico (TGA)	42
11.6	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	¡Error! Marcador no definido.
11.7	Fibras electrohiladas	43
12	Anexos	54
12.1	Anexo 1. Actividad enzimática de la lacasa.....	54
12.2	Anexo 2. Diagrama Lineaweaver-Burk.....	55
12.3	Anexo 3. Grado de conversión	57
12.4	Anexo 4. Curva de calibración.....	57
12.5	Anexo 5. Cálculo de actividad antioxidante	57
12.6	Anexo 6. Fibras electrohiladas: primer DoE.....	59
12.7	Anexo 7. Fibras electrohiladas: segundo DoE.....	61
13	Conclusiones.....	52
14	Referencias bibliográficas	64

1 LISTA DE ABREVIATURAS

EC	Epicatequina
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
DDS	Sistemas de administración de medicamentos
Ang II	Angiotensina II
XO	Xantina oxidasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
ECV	Enfermedad cardiovascular
MEC	Matriz extracelular
NaCl	Cloruro de sodio
scCO ₂	Dióxido de carbono supercrítico
T _g	Temperatura de transición vítrea
T _m	Temperatura de fusión
PVA	Poli (alcohol vinílico)
PVP	Poli (pirrolidona de vinilo)
SLS	Sinterizado selectivo por láser
EOR	Especies de oxígeno reactivo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
UV-Vis	Espectroscopia ultravioleta-visible
RMN	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
SEM	Microscopia electrónica de barrido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
TGA	Análisis Térmico Gravimétrico
DMA	Análisis mecánico dinámico
TMA	Análisis termomecánico
T _c	Temperatura de cristalización
T _d	Temperatura de degradación
DTG	Termogravimetría derivada
TAC	Capacidad antioxidante total
AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropano)
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
HPCL	Cromatografía líquida de alta eficacia
RPM	Revoluciones por minuto
DC	Grado de conversión
BSA	Albúmina de suero bovino
ATR-FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total
U	Unidades Internacionales
DoE	Diseño de experimentos
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos

GLOSARIO

Angiotensina: Es un polipéptido que se encuentra en la sangre y que causa vasoconstricción (disminución de la luz de las arteriolas), lo que provoca un aumento de la presión sanguínea. El control de la presión arterial se hace a través de una cascada de eventos bioquímicos: la formación de angiotensina I, que, a su vez desencadena la formación de angiotensina II (Ang II) y finalmente, producción de aldosterona. La sobre estimulación con angiotensina II está implicada en la inflamación, disfunción endotelial y cambios estructurales y mecánicos en las paredes de los vasos sanguíneos.

Trametes versicolor: Es una especie de hongos no comestibles que se desarrolla en bosques templados sobre madera muerta. Contienen alto contenido de flavonoles que les confiere potencial terapéutico y antioxidante.

2 RESUMEN

En el presente trabajo se sintetizó poli(epicatequina) por reacción enzimática con lacasa. El resultado de esta polimerización con base en epicatequina se caracterizó por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier en modalidad de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). El procedimiento experimental propuesto permitió la conversión de epicatequina a poli(epicatequina), lo cual se confirmó por la aparición de bandas características de la forma polimérica de los flavonoides en los espectros UV-Vis y ATR-FITR, la cual muestra propiedades antioxidantes mayores a la de la epicatequina, pero menor estabilidad térmica a altas temperaturas. Se planteó un diseño de experimentos factorial fraccionado 2^{5-2} para el electrohilado de fibras de poli(epicatequina) con poli(ϵ -caprolactona), utilizando 2,2,2-trifluoroetanol, diclorometano y N, N-dimetilformamida como disolventes. A partir de los resultados de este experimento, tomando en cuenta los parámetros que generaron las mejores fibras y lo reportado en la literatura, se realizó un nuevo diseño de experimentos. En ambas ocasiones se realizó un estudio cualitativo de los defectos de superficie de las fibras mediante microscopía óptica. Al analizar las micrografías obtenidas, se constató la viabilidad de parámetros como la tasa de flujo, proporciones entre polímeros y disolventes, diferencial de potencial y distancia aguja-colector que permiten la obtención de fibras lisas. En virtud de esto, se podría vislumbrar el electrohilado de fibras de poli(epicatequina) para aplicaciones cardiovasculares.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Síntesis de poli(epicatequina) de una reacción catalizada con lacasa y con el monómero de epicatequina, para posteriormente evaluar su viabilidad en la técnica de electrohilado.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Síntesis de poli(epicatequina) mediante reacción enzimática.
- Caracterización del polímero obtenido por las técnicas de FTIR, UV-Vis, DSC y TGA.
- Obtener las diferencias de actividad antioxidante entre la epicatequina y la poli(epicatequina) por el método ABTS.
- Realizar un diseño de experimentos factorial fraccionado 2^{5-2} para obtener las proporciones entre polímeros y solventes, velocidad de flujo, diferencial de potencial, distancia de la aguja al colector y el diámetro de aguja adecuados para la obtención de fibras mediante electrohilado.

4 INTRODUCCIÓN

Las civilizaciones antiguas utilizaban materiales naturales o sintéticos de origen no humano para la restauración dental, el trasplante de huesos de animales a humanos, el tratamiento de heridas y el control de infecciones quirúrgicas. A partir de los años setenta, se empezaron a diseñar y desarrollar biomateriales complejos como metales y cerámicos para aplicaciones ortopédicas y ortodóncicas, y polímeros para dispositivos médicos flexibles [1].

El término polímero procede de las palabras griegas *poli* y *meros*, que significan “muchas partes” [2]. Según la definición de la IUPAC, un polímero es una sustancia compuesta por moléculas caracterizadas por la repetición múltiple de una o más especies de átomos o grupos de átomos (unidades constitutivas repetitivas) unidas entre sí en cantidades suficientes para proporcionar un conjunto de propiedades que no varían notablemente con la adición de una o varias unidades constitutivas repetitivas [3].

Los polímeros utilizados como biomateriales pueden ser naturales, sintéticos o híbridos. Estos sistemas dominan el sector de dispositivos médicos avanzados, sistemas de administración de fármacos (DDS) y como herramientas clave para las novedosas tecnologías de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos blandos y duros [4], [5]

Gracias a los recientes conocimientos sobre los mecanismos implicados en enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, el cáncer, los accidentes cerebrovasculares y la diabetes, se están evaluando modos de tratamiento más eficaces [6]. Fármacos como los inhibidores de los canales de calcio, de la enzima convertidora de la angiotensina y de los receptores de la angiotensina II (Ang II) se han utilizado para el tratamiento de la isquemia miocárdica y han demostrado ser efectivos, pero su eficacia para la prevención a largo plazo del infarto de miocardio en pacientes de alto riesgo siempre ha sido limitada debido a sus reacciones adversas [7]. Recientemente, se ha prestado una atención creciente a la evaluación del potencial cardioprotector/cardiopreventivo de los productos naturales [8].

Los flavonoides son un grupo de sustancias naturales estructuralmente basadas en derivados de un propil-benceno sustituido por fenilo con un esqueleto C_{15} [9], [10].

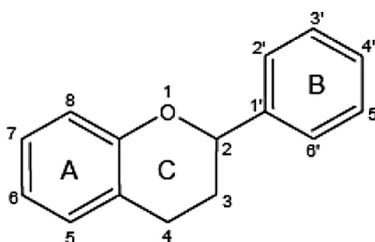


Ilustración 1 Las estructuras químicas de los flavonoides se basan en un esqueleto C_{15} con un anillo cromano (anillo A+C) que soporta el segundo anillo aromático (anillo B) [11].

La epicatequina (EC) pertenece a una subclase de flavonoides conocidos como monómeros de flavanol, y es un compuesto bioactivo de origen vegetal que se encuentra en el cacao, el té verde, el té negro, los cacahuetes, las uvas, las bayas, la manzana y el chocolate negro. La EC tiene una estructura química C6-C3-C6 formada por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por una cadena de tres carbonos, formando un heterociclo oxigenado (anillo C) [12], [13].

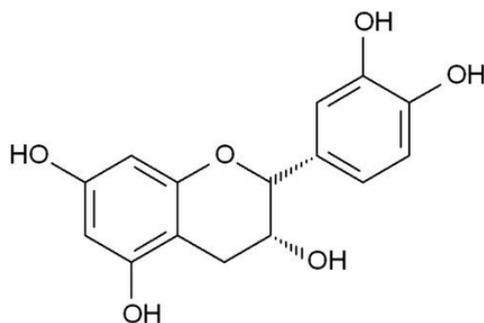


Ilustración 2 Estructura química de la epicatequina [14].

Debido a sus propiedades antioxidantes, antimutagénicas, anticancerígenas, antimicrobianas, antiinflamatorias, antibacterianas y antiproliferativas, las catequinas se han utilizado ampliamente en el tratamiento de numerosas enfermedades como el cáncer, la diabetes, la osteoartritis, los trastornos oculares y las enfermedades cardiovasculares [15]–[17].

Numerosos estudios revelan que la hipertensión y la incidencia de enfermedades cardiovasculares disminuyen en las personas que procuran dietas ricas en flavonoides [18].

Se han publicado estudios de tratamientos de epicatequina en ratas, los cuales demuestran reducción de estrés oxidativo de tejido cardíaco, inducción del crecimiento fisiológico del corazón, inhibición de lesión cardíaca inducida por isquemia miocárdica y protección preventiva de esta; igualmente previene la hipertrofia cardíaca y reduce el tamaño del infarto por lesión de isquemia-reperfusión. De igual manera, se ha reportado que confiere cardioprotección en el caso de lesiones por isquemia-reperfusión, inhibe el aumento anormal de cardiomiocitos inducido por Ang II, ejerce efectos protectores endógenos en la isquemia focal, reduce la disfunción endotelial y modifica la función vascular; dando como resultado un efecto antihipertensivo.

Sin embargo, las aplicaciones clínicas de los flavonoides se ven limitadas por su inestabilidad cuando se exponen a la luz, el calor y las condiciones básicas, su escasa biodisponibilidad, su rápido metabolismo y su escasa permeabilidad a las membranas [19]. La polimerización de flavonoides ha demostrado una mayor actividad antimicrobiana, una mejor estabilidad térmica, una mayor actividad antioxidante, incluida la capacidad de eliminación de superóxido, la inhibición de la enzima xantina oxidasa (XO) y la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), en comparación con el monómero de flavanol [16], [17], [19]–[22]. Los flavonoides poliméricos son polímeros del monómero flavan-3-ol funcionalizado con múltiples grupos aromáticos e hidroxílicos [23].

Existen varias técnicas de polimerización de flavonoides: polimerización enzimática, fotopolimerización, autocondensación de flavonoides y polimerización con un compuesto reticulante [20].

La polimerización enzimática es un método novedoso y eficaz para sintetizar diversos polímeros con estructuras controladas [24]. Dos grupos de enzimas, la lacasa y la peroxidasa, han sido analizados como catalizadores exitosos de la polimerización oxidativa de derivados fenólicos, como la catequina, la rutina, la quercetina, el galato de (-)-epigallocatequina y la esculina [20]–[22], [25].

Las lacasas son glicoproteínas obtenidas de diferentes fuentes como plantas, actinomicetos, hongos y bacterias. A menudo se presentan como isoenzimas que se oligomerizan para formar complejos multiméricos con la reducción del oxígeno molecular a agua [26], [27]. La lacasa facilita la o-hidroxilación de los polifenoles en o-difenoles y la oxidación de los o-difenoles en o-quinonas [28]. Este proceso de oxidación y acoplamiento sucesivos de oligómeros puede conducir a la formación de polímeros de alto peso molecular [25].

En los últimos años, la polimerización enzimática ha cobrado relevancia para la síntesis verde de polímeros, debido a su capacidad para ahorrar energía en los procesos de producción y reducir la formación de subproductos no deseados en condiciones poco agresivas, ya que la reacción es selectiva en gran medida. En general, una reacción catalizada por enzimas es mucho más rápida que una reacción convencional, ya que reduce la energía de activación [29], [30].

5 ANTECEDENTES

5.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) comprende un grupo de trastornos cardíacos y de los vasos sanguíneos que incluyen, entre otros, enfermedades coronarias, cerebrovasculares, de insuficiencia cardíaca, congénitas, reumáticas, arteriales periféricas, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar [31].

A pesar de que en las últimas décadas han existido notables avances en el tratamiento de las enfermedades de las arterias coronarias y del infarto agudo del miocardio aún siguen siendo la causa más común de insuficiencia cardíaca.

Los factores que contribuyen a la patogénesis del desarrollo de la insuficiencia cardíaca en el momento de la hospitalización del infarto de miocardio son: necrosis y aturdimiento miocárdico, así como complicaciones mecánicas debido a la ruptura del músculo papilar, comunicación interventricular y rotura de pared libre ventricular. A los 30 min de la isquemia, se presentan cambios estructurales de los cardiomiocitos y edema, después de 3 horas existe una muerte de los miocitos. La respuesta inflamatoria a la muerte de miocitos también contribuye al desarrollo de la insuficiencia cardíaca.

La insuficiencia cardíaca que se desarrolla después de la hospitalización por infarto de miocardio es consecuencia de la muerte de los cardiomiocitos y la formación de cicatrices, lo que desencadena la activación neurohumoral crónica (renina-angiotensina-aldosterona y regulación del sistema nervioso simpático) y el remodelado ventricular. El remodelado ventricular cambia la geometría ventricular y conduce a un adelgazamiento de la pared, insuficiencia mitral isquémica y una mayor pérdida de cardiomiocitos [32].

5.2 ANDAMIOS

Los andamios son estructuras porosas tridimensionales que regeneran tejidos blandos y duros y son responsables de generar señales para controlar y regular el comportamiento celular [33], [34]. Desempeñan un papel imperativo en la ingeniería de tejidos, ya que son fundamentales para el crecimiento y proliferación celular y la formación de nuevos tejidos; además, tales estructuras se adoptan en la administración de fármacos [33].

Los andamios nanofibrosos y nanocompuestos para ingeniería tisular son capaces de imitar la matriz extracelular (MEC) por su similitud con la MEC nativa y por permitir la integración de los andamios con las células circundantes y promover la regeneración tisular [35], [36].

La MEC es un complejo de proteínas, principalmente colágenas, que se expulsan fuera de la célula para ensamblarse formando una estructura tridimensional de fibras elásticas bien organizadas, asociadas a fibras reticulares y colágenas; dentro de un componente amorfo compuesto por proteoglicanos, glicosaminoglicanos y glicoproteínas multiadhesivas, que dan espacio y soporte a la célula para interactuar con el resto de componentes de la MEC. Su función es contrarrestar las fuerzas de compresión, absorbiendo grandes cantidades de agua y orientando las fibras de colágeno. Las fibras de colágeno interactúan con las fibras elásticas, compuestas principalmente por elastina y fibrilina, para evitar el desgarro de los tejidos por el estiramiento [37].

Idealmente, los andamios deben poseer propiedades específicas. En primer lugar, deben tener una estructura porosa y esponjosa para facilitar la adhesión y migración celular y estimular la angiogénesis y el intercambio metabólico.

En segundo lugar, el andamio debe tener cierta estabilidad de forma y propiedades mecánicas intrínsecas similares a las de los tejidos defectuosos. En tercer lugar, el andamio debe ser biocompatible con el organismo y biodegradable a una velocidad controlable en el cuerpo. En cuarto lugar, el andamio debe mostrar una inmunogenicidad baja o nula. Por último, el andamio debe ser capaz de incluir señales biológicas y/o físicas que afecten al fenotipo celular y promuevan la regeneración celular dirigida [38].

5.2.1 Técnicas de fabricación de andamios

Para andamios implantados, las técnicas suelen dividirse entre métodos convencionales y no convencionales [33].

5.2.1.1 Métodos convencionales de fabricación de andamios

5.2.1.1.1 Moldeo por disolvente

En el método de moldeo por solvente, el polímero se disuelve con un disolvente adecuado, y la mezcla se vierte en un molde con la forma deseada. Se pueden aplicar diferentes métodos de secado para eliminar el disolvente, incluido el secado al aire, el secado al vacío y el liofilizado. Durante la fase de disolución del polímero, es posible añadir partículas inorgánicas solubles en agua (p. ej., NaCl) o partículas orgánicas (p. ej., sacarosa) para obtener una estructura porosa después de liberar el porógeno. En este caso, el proceso se conoce como técnica de lixiviación de sal fundida solvente. El método de moldes por solvente se ha utilizado para crear andamios para reemplazos de tejidos blandos, materiales de envasado e ingeniería de tejidos óseos, cuando se combina con la técnica de lixiviación de sal [39].

5.2.1.1.2 Liofilización

La liofilización es una técnica convencional para la fabricación de andamios en 3D, que crea una geometría de andamio compleja al tiempo que logra una morfología de poros uniforme. Este método convierte las soluciones en sólidos a través de cuatro pasos: pretratamiento, congelación, secado primario y secado secundario. En la primera fase se aplican tratamientos para mejorar la estabilidad de los precursores durante el proceso, lo que hace que los precursores preparados estén listos para la fase de congelación. En este último, la disolución se enfría a una temperatura por debajo del punto triple del disolvente de modo que los cristales de disolvente se subliman y el polímero crea una red dispuesta dentro de los espacios intersticiales. La fase final de secado se divide en dos etapas en las que el disolvente congelado se elimina por sublimación y evaporación [40].

5.2.1.1.3 Procesamiento de fluidos supercríticos

La tecnología de dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) se basa en la exposición del polímero a CO₂ por encima de las condiciones supercríticas ($T_c = 31^\circ\text{C}$; $P_c = 73,8 \text{ bar}$) donde el CO₂ se disuelve en el polímero. En la etapa de presurización, el CO₂ plastifica el polímero disminuyendo la temperatura de transición vítrea (T_g) para polímeros amorfos, o la temperatura de fusión (T_m) para polímeros semicristalinos debido a su interacción con cadenas poliméricas. Esos polímeros plastificados experimentan una inestabilidad termodinámica sobre una despresurización rápida sobresaturando el CO₂ en la matriz polimérica. Como consecuencia, a través de un proceso de nucleación, se forman poros de tamaño micrométrico en el polímero. Más interesante aún, es posible controlar el tamaño y la distribución de los poros cambiando los parámetros como el tiempo de despresurización, la presión y la temperatura [41].

5.2.1.1.4 Electrohilado

Esta técnica consiste en aplicar un campo eléctrico alto para producir fibras de polímero ultrafinas con diámetros de micro a nanométricos. La actividad electrofísica compleja entre la disolución polimérica y la fuerza electrostática es el principal mecanismo detrás de esta técnica. En electrohilado se genera un campo eléctrico de alto voltaje entre la aguja de inyección y el colector utilizando una fuente de alimentación y electrodos.

Después de forzar gradualmente la salida de la disolución polimérica, se forma una gota en la punta de la aguja. Esta gota de polímero se alarga en una forma cónica, conocida como el cono de Taylor, y la carga superficial sobre la gota de polímero aumenta con el tiempo al aumentar el voltaje. Un chorro de polímero comienza a formarse inmediatamente después de superar la tensión superficial de la gota de polímero. Después de vaporizar el disolvente en el chorro del polímero, la tensión superficial en el chorro aumenta, lo que desestabiliza el chorro de polímero. El chorro de polímero se separa geoméricamente, inicialmente en dos chorros y, finalmente, en un gran número de chorros, para compensar la inestabilidad. La fuerza electrostática, que afecta a las gotas de polímero que se dividen constantemente, causa el patrón de nanofibra. Los componentes principales de un sistema de electrohilado son: una jeringa con aguja metálica, una bomba, una fuente de alimentación de alto voltaje y un colector conectado a tierra [42].

5.2.1.1.4.1 Efectos de los parámetros sobre el electrohilado

Hay varios factores que afectan el proceso de electrohilado. Estos factores se clasifican como parámetros de la disolución, del electrohilado y ambientales. Los parámetros de electrohilado incluyen el diferencial de potencial, la distancia entre la aguja y el colector, la tasa de flujo volumétrico y el diámetro de la aguja. Los parámetros de disolución incluyen el tipo de disolvente, la concentración de polímero, la viscosidad y la conductividad de la disolución. Los parámetros ambientales incluyen la humedad relativa y la temperatura. Todos estos parámetros afectan directamente a la generación de fibras electrohiladas lisas y sin cuentas [43].

5.2.1.1.4.1.1 Diferencial de potencial

El aumento del diferencial de potencial acelerará el chorro de electrohilado y esto puede resultar en un mayor volumen de disolución extraída de la punta de la aguja [44].

Los aumentos en el diámetro y la formación de cuentas o nanofibras perladas con un aumento en el diferencial de potencial aplicado se atribuyen a la disminución en el tamaño del cono de Taylor y al aumento en la velocidad de chorro para el mismo flujo volumétrico [43].

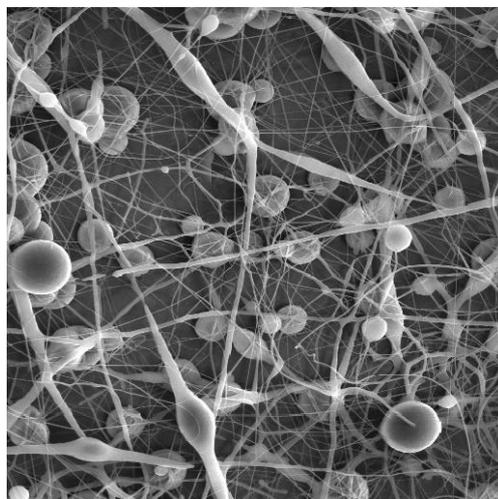


Ilustración 3 Ejemplo de fibras de PCL electrohiladas con perlas en la estructura [45].

5.2.1.1.4.1.2 *Distancia entre la aguja y el colector*

La distancia entre la punta de la aguja y el colector tiene un efecto en la trayectoria del chorro y el tiempo de viaje antes de depositarse sobre el colector. Si el diferencial de potencial se mantiene constante, la intensidad del campo eléctrico será inversamente proporcional a la distancia. En una configuración típica de electrohilado, esta distancia oscila entre 10 y 15 cm, lo que generalmente permite un tiempo de vuelo suficiente para que el disolvente se vaporice de tal manera que se deposite una fibra seca [44].

Numerosos grupos de investigación han estudiado el efecto de la distancia entre la punta de la aguja y el colector y concluyeron que las nanofibras defectuosas y de gran diámetro se forman cuando esta distancia se mantiene pequeña, mientras que el diámetro de la nanofibra disminuyó a medida que se aumentaba la distancia [43].

5.2.1.1.4.1.3 *Tasa de flujo volumétrico*

El flujo de la disolución polimérica a través de la punta de la aguja metálica determina la morfología de las nanofibras electrohiladas. Se podrían preparar nanofibras electrohiladas uniformes sin cuentas a través de una tasa crítica para una disolución polimérica. Este valor crítico varía con el sistema de polímero. Aumentar la tasa de flujo por encima del valor crítico podría llevar a la formación de cuentas.

Debido a que los aumentos y disminuciones en la tasa afectan la formación y el diámetro de la nanofibra, se prefiere una tasa mínima para mantener un equilibrio entre la disolución polimérica saliente y la sustitución de esa disolución por una nueva, durante la formación del chorro de solución del polímero [43].

5.2.1.1.4.1.4 *Diámetro de la aguja*

Teóricamente, el uso de agujas de diámetro pequeño resulta en la formación de una pequeña gota de la disolución del polímero con alta tensión superficial, en comparación con el diámetro de aguja grande. Por lo que se requiere un diferencial de potencial grande para superar la tensión superficial y formar un chorro de la solución del polímero. El diferencial de potencial más alto aumenta las fuerzas electrostáticas impuesta a la gota de polímero, que es responsable de estirar el chorro y lo hace más delgado, por lo que el chorro se hará más delgado y se recolectará una nanofibra de diámetro pequeño en el colector [46].

En un estudio realizado por Abunahel et al [46]. se investigó el efecto del diámetro de la aguja en la morfología de las nanofibras electrohiladas n-Bi₂O₃/epoxi-PVA utilizando tres tipos diferentes de diámetros de aguja. Concluyeron que cuando se usan diámetros de aguja pequeños con 0,21 mm de diámetro interior, las nanofibras resultaron más delgadas y lisas sin aglomeración o formación de cuentas, en comparación con el diámetro interior de la aguja grande 0,26 mm. La porosidad de las nanofibras aumenta con la disminución del diámetro interior de la aguja de 0,26 a 0,21 mm, además de que el diámetro de la fibra más pequeña resulta de un diámetro de la aguja más pequeño [46].

5.2.1.1.4.1.5 *Disolvente*

La elección un disolvente o de la mezcla de disolventes influye fuertemente en la viscosidad, la tensión superficial, la conductividad eléctrica, la constante dieléctrica y la

volatilidad de la disolución, y por lo tanto es de crucial importancia. El disolvente seleccionado no solo debe proporcionar conductividad eléctrica adecuada, viscosidad y tensión superficial, sino que también debe ser capaz de disolver/ dispersar el polímero y el componente funcional de interés en concentraciones adecuadas [47].

5.2.1.1.4.1.6 Concentración del polímero

La concentración del polímero determina la posibilidad de que una solución pueda ser hilada, es decir, si se forman fibras o no. La disolución debe tener una concentración de polímero lo suficientemente alta como para que se produzcan entrelazamientos de cadena; sin embargo, la disolución no puede ser demasiado diluida o concentrada. La concentración de polímero influye tanto en la viscosidad como en la tensión superficial de la disolución; ambos parámetros son muy importantes en el proceso de electrohilado. Si la disolución está demasiado diluida, la fibra de polímero se romperá en gotitas antes de llegar al colector, debido a los efectos de la tensión superficial. Sin embargo, si la disolución está demasiado concentrada, las fibras no se pueden formar debido a la alta viscosidad, lo que hace difícil controlar el flujo de la disolución a través del capilar. Por lo tanto, existe un rango óptimo de concentraciones de polímero en el que las fibras pueden ser electrohiladas cuando todos los demás parámetros se mantienen constantes [48].

Cuando solo se forman perlas, entonces uno se refiere a la electropulverización o perlas en electrohilado de fibras.

Existe una relación semi empírica a partir de la cual podemos decidir qué proceso se obtuvo, si electrohilado o electropulverización. Si el número de entrelazamientos de la disolución $(\eta_e)_{soln}$ tiene un valor inferior a 2, se forman cuentas. Entre 2 y 3.5 el chorro se forma en fibras con cuentas y cuando es más de 3.5 se logra fibras a través de electrohilado. El número de entrelazamientos de la disolución $(\eta_e)_{soln}$ se encuentra a partir de la masa molar del polímero en la disolución M_ω , masa molar del entrelazado del polímero M_e y fracción del volumen del polímero φ relacionados por la ecuación siguiente:

$$(\eta_e)_{soln} = \frac{\varphi M_\omega}{M_e} \quad (1)$$

Perlas, fibras con perlas y fibras puras se forman de acuerdo con la teoría de Shenoy [49] como se muestra en la Ilustración 4.

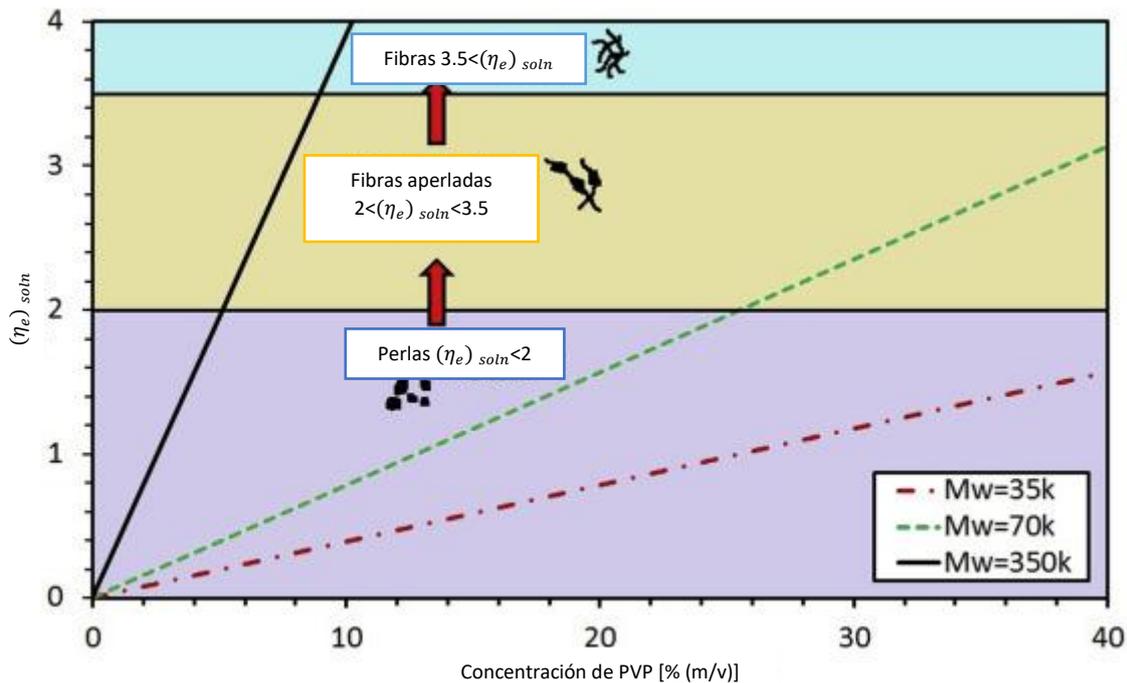


Ilustración 4 Diagrama que muestra el efecto de la concentración de PVP sobre el número de entrelazamientos de la disolución $(\eta_e)_{soln}$ y en la morfología de la formación de fibras electrohiladas. Adaptado de: [49]

5.2.1.1.4.1.7 Viscosidad

Una mayor viscosidad de la disolución inducirá un mayor diámetro de fibra. A medida que aumenta la viscosidad, las cargas que inician el hilado pueden ser insuficientes para estirar la disolución de polímero al diámetro de fibra deseado [44].

A medida que la viscosidad disminuye, la movilidad de las cadenas de polímero aumenta y se organiza en dirección alineada durante el electrohilado y forma fibras con diámetros pequeños que tienen un alto grado de orientación, cristalinidad y resistencia.

A muy baja viscosidad se obtienen perlas en lugar de fibras, y a muy alta viscosidad, es difícil hilar la disolución de polímero y se requiere una viscosidad óptima para formar fibras a través de la técnica de electrohilado [49].

5.2.1.1.4.1.8 Conductividad de la disolución

La repulsión de las cargas en la superficie del chorro de electrohilado hace que la disolución se estire y forme las nanofibras, y el estiramiento del chorro de electrohilado y la inestabilidad de deformación de la fibra son controlados principalmente por la fuerza de Coulomb entre las cargas y la fuerza debida al campo eléctrico externo. Ambas fuerzas surgen debido a la carga superficial en el chorro; por lo tanto, se puede variar cambiando la conductividad de la disolución. Se puede observar una caída significativa en el diámetro de las nanofibras electrohiladas al aumentar la conductividad eléctrica de la disolución, debido a que el chorro lleva más cargas. En general, se pueden obtener

nanofibras electrohiladas con el diámetro de fibra más pequeño a partir de la disolución de mayor conductividad [50].

En la literatura se ha informado que la formación de fibras perladas se puede evitar mediante la adición de una pequeña cantidad de sal a la disolución polimérica: El aumento de la carga llevada por el chorro de electrohilado provoca que el chorro se alargue por las fuerzas eléctricas y produzca fibras uniformes con un diámetro menor. También se ha reportado que con la adición de sal a la disolución de polímero se pueden observar fibras con cuentas ovaladas más pequeñas que parecen collares [50].

5.2.1.1.4.1.9 Humedad

La humedad afecta indirectamente la velocidad de evaporación, ya que puede influir en la eliminación de cargas de la superficie del chorro.

Aunque el aire es comúnmente considerado como un gas aislante, bajo potenciales eléctricos elevados se vuelve conductor, gracias a la formación de iones en el aire.

Como resultado, para cualquier tipo de solvente, el chorro de electrohilado se descarga parcialmente a través de la recombinación con el aire ionizado circundante. Con un aumento de la humedad, la ionización del aire aumenta debido a la mayor cantidad de moléculas de vapor de agua en el aire. Las moléculas de vapor de agua se pueden ionizar fácilmente gracias a su baja energía de ionización, en comparación con otras especies presentes en el aire, como el nitrógeno. Por lo tanto, a alta humedad, el chorro de electrohilado se descarga aún más. A medida que la densidad de carga en el chorro se reduce a alta humedad, la amplitud de los movimientos laterales inestables se reduce, lo que ralentiza la velocidad de evaporación del disolvente.

Además, la humedad hace que la evaporación del disolvente se retrase si el disolvente es agua o es hidrofílico. Por lo tanto, retrasa la solidificación de las fibras. Los polímeros higroscópicos también pueden absorber una pequeña cantidad de agua presente en el aire. Como resultado, se observa una tremenda reducción de la transición vítrea, debido a un efecto plastificante que podría favorecer el alargamiento del chorro durante más tiempo antes de la solidificación final. Por lo tanto, la alta humedad, que promueve la absorción de agua, pospone la solidificación y permite que los chorros de electrohilado se estiren más. Cuando se utiliza un polímero hidrofóbico, el vapor de agua actúa como un no solvente para el polímero. En consecuencia, el aumento de la humedad conduce a una mayor velocidad de solidificación de las fibras [51].

5.2.1.1.4.1.10 Temperatura

Las temperaturas más altas generarán dos efectos opuestos en el electrohilado: por un lado, proporciona más energía a las moléculas en disolución, aumentando así la conductividad eléctrica y reduciendo la viscosidad y la tensión superficial de la disolución. Esto facilita la formación de diámetros de fibra más finos y conduce a una mayor alineación de la cadena de polímeros (mejorando las propiedades mecánicas). Sin embargo, un aumento de la temperatura también proporciona energía adicional para acelerar la velocidad de evaporación del disolvente, reduciendo el tiempo disponible para el alargamiento de la fibra antes de la solidificación. El aumento de la temperatura ambiente de

aproximadamente 20°C a 40°C conduce a un diámetro de fibra reducido, lo que indica que el efecto previamente mencionado predomina en este rango de temperatura. Sin embargo, se encontró que el diámetro de la fibra aumenta a temperaturas superiores a 40°C, lo que indica que aquí la rápida evaporación del solvente ha superado el efecto sobre la tensión superficial y la viscosidad [47].

5.2.1.2 *Métodos no convencionales de fabricación de andamios*

5.2.1.2.1 Estereolitografía

Esta técnica, basada en la fotopolimerización capa por capa de resinas líquidas, permite modelos con alta precisión y redisolución espacial [52].

5.2.1.2.2 Impresión tridimensional (3D)

Generalmente, la impresión 3D es un proceso de fabricación capa por capa utilizando sustratos de materiales en polvo, líquidos o sólidos. Desde la parte inferior y hacia arriba, cada nueva capa formada se activa para adherirse a la capa anterior, aumentando gradualmente el tamaño de la estructura [53].

5.2.1.2.3 Sinterizado selectivo por láser (SLS)

La sinterización láser selectiva es una técnica de fabricación aditiva que utiliza un rayo láser de CO₂ para fusionar partículas y construir objetos tridimensionales capa por capa. Debido a sus características, tales como la posibilidad de reproducir formas 3D complejas sin la necesidad de un material de soporte adicional ni el uso de aglutinantes potencialmente tóxicos, la técnica ha ganado atención para la producción de andamios en el campo de la ingeniería de tejidos, cuyo objetivo es la restauración, mantenimiento o mejora de la función del tejido vivo.

Deben identificarse los parámetros de proceso SLS adecuados, como la potencia del láser, la velocidad de escaneo, el espaciado del escaneo, el espesor de la capa, el diámetro del haz láser y la temperatura de la base de la pieza (p. ej., la temperatura en la cámara de construcción). Los efectos de estos parámetros sobre el resultado de la sinterización son interdependientes, así como dependientes del material, por lo que es difícil definir las condiciones de sinterización ideales para una aplicación específica [54].

5.2.1.2.4 Fabricación por filamento fundido

En este método se implementa un cabezal de extrusión, mediante el cual los materiales se extruyen en ejes x e y. A medida que el cabezal de extrusión se mueve, las plataformas descienden en la dirección z. Esto resulta en la formación de cada nueva capa, cuyas partículas se adhieren a la capa anterior. Estas etapas deben continuar para la fabricación de andamios. Los beneficios de este enfoque son que no es necesario utilizar disolventes, la fabricación de andamios sin materiales atrapados, la formación de andamios con la resistencia adecuada, y el bajo costo. Sin embargo, tiene algunos inconvenientes, como la exigente fabricación de andamios que tienen tamaños de poros pequeños, precisión de procesos media y alto impacto térmico en los materiales [33].

5.3 TIPOS DE POLÍMEROS

Las catequinas, que consisten en pequeñas unidades de taninos, son los antioxidantes naturales presentes en una variedad de hierbas, té y verduras. Debido a sus propiedades de eliminación de radicales libres, tienen un papel preventivo contra diferentes enfermedades, incluyendo el cáncer y los trastornos inflamatorios y cardiovasculares. Recientemente, la lacasa se utilizó para oxidar una serie de catequinas, lo que resulta en numerosos productos con propiedades antioxidantes mejoradas [55].

5.3.1 Epicatequina

La (-)-epicatequina es un metabolito secundario prevalente en las plantas y uno de los polifenoles vegetales más abundantes en la dieta humana. Proviene principalmente de té, cacao, uvas, manzanas y extracto de acacia catechu. La epicatequina es bien conocida por su destacada actividad antioxidante. Los metabolitos de epicatequina en el cuerpo humano existen en el plasma y se acumulan en el cerebro, el hígado, el corazón, el intestino, los riñones y otros órganos. Como tal, la epicatequina puede desempeñar un papel beneficioso en varios tejidos y órganos del cuerpo humano.

La epicatequina se compone estructuralmente de dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico que contiene oxígeno. La presencia de múltiples grupos hidroxilos fenólicos contribuye a las potentes propiedades antioxidantes de la epicatequina, que puede eliminar directa o indirectamente las especies de oxígeno reactivo (EOR), a través de una reacción química entre el hidroxilo y las EOR o mediante la regulación de compuestos y enzimas que eliminan las EOR [56].

La capacidad de protección cardiovascular de los alimentos ricos en flavanol se atribuye en gran medida a la presencia de epicatequina. Los beneficios de la epicatequina incluyen la inhibición de la inflamación y el estrés oxidativo, la promoción de la vasodilatación y la reducción de la presión arterial y la modulación de los mecanismos de coagulación [31].

Se han desarrollado fibras mediante electrohilado coaxial compuestas de acetato de celulosa y poli(vinilpirrolidona) que contienen (-) epicatequina en el núcleo de la fibra; un material que posiblemente podría utilizarse como andamio para el crecimiento de células madre del mesénquima y su posterior diferenciación en células cardíacas, lo que se ve favorecido por la presencia de epicatequina [57].

Se ha utilizado la epicatequina como agente de recubrimiento para sintetizar nanopartículas de plata recubiertas de epicatequina; obteniendo un resultado favorable como quimiosensor para la detección de fármacos antimicrobianos en muestras biológicas (plasma y suero), medioambientales (agua) y en presencia de otros medicamentos antimicrobianos. En la actualidad, los quimiosensores basados en nanomateriales están recibiendo mucha atención para la detección de residuos químicos en el medio ambiente [58].

5.3.2 Policatequina

La catequina es un flavonoide que se encuentra abundantemente en la naturaleza. Las fresas, las uvas negras y, especialmente el té verde, contienen fenoles en las formas de catequina, epicatequina, epicatequina-3-galato, epigalocatequina y epigalocatequina-3-galato [59]. La catequina posee varias propiedades biológicas, como efectos antioxidantes, antivirales y antibacterianos [60].

Como flavonoides, la potente capacidad antioxidante de las catequinas podría jugar un papel importante en el daño oxidativo asociado a las enfermedades degenerativas crónicas, incluyendo trastornos neuróticos, inflamación, enfermedades cardiovasculares y cáncer [59].

Para ello, elimina los radicales de oxígeno e hidroxilo, inhibe la peroxidación de los lípidos y quelata los iones metálicos [60].

Las actividades antioxidantes y antimicrobianas de las catequinas se atribuyen a los grupos ortodihroxilo e hidroxilo del anillo β de las moléculas de catequina [61]. Estos antioxidantes naturales actúan como un agente antiradical para reducir las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los radicales libres que se sabe que causan daño al ADN, alterando la expresión génica y causando la muerte celular [59].

Si bien los antioxidantes de moléculas pequeñas constituyen una defensa suficiente contra muchos procesos oxidativos, tienen algunas desventajas, como la lixiviación, que reduce el rendimiento antioxidante. A esto se suman los pobres resultados de los estudios in vivo. El interés en el uso de polímeros antioxidantes se vio estimulado por el reconocimiento de que el aumento de la vida útil de los antioxidantes in vivo era importante para permitir que estos compuestos funcionaran eficazmente. Se puede plantear la hipótesis de que los antioxidantes poliméricos pueden ser una alternativa más eficaz y terapéutica a los antioxidantes de moléculas pequeñas. [25]

La polimerización enzimática es la polimerización de polifenoles más ampliamente descrita. Las formas poliméricas de flavonoides pueden obtenerse mediante polimerización enzimática utilizando dos grupos de enzimas: la lacasa y la peroxidasa. Es posible obtener poli(quercetina), poli(rutina) y poli(catequina) gracias a la polimerización enzimática catalizada con lacasa de diversos orígenes. Además, se conoce el uso de peroxidasa del rábano como catalizador para la polimerización enzimática de quercetina, rutina y catequina [62].

Por ejemplo, la policatequina obtenida por la polimerización oxidativa catalizada por lacasa exhibió una mayor actividad de eliminación de radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y actividad inhibidora de la xantina oxidasa que la de un monómero de catequina, lo que hace que la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos catalizada por enzimas sea un enfoque importante para producir nuevas sustancias con mayores propiedades antioxidantes. [63], [64]. También se ha fabricado policatequina condensada mediante acetaldehído [65].

Debido a sus propiedades antibacterianas y a través de la oxidación enzimática de catequina con lacasa, se ha aprovechado en el recubrimiento de catéteres para reducir la adhesión bacteriana e impedir la formación de biopelículas [66], [67].

Se ha reportado la síntesis de nanopartículas de policatequina mediante la técnica de microemulsión de agua en aceite, para su potencial aplicación como portador terapéutico en la terapia del cáncer, la terapia de quelación del hierro y el tratamiento de la diabetes tipo II [59]. Se han fabricado nanopartículas de oro recubiertas de policatequina que transportan amfenaco; un antiinflamatorio no esteroideo [68].

5.3.3 Poli(ϵ -caprolactona) (PCL)

La poli(ϵ -caprolactona) (PCL) pertenece a la familia de poliésteres alifáticos biodegradables que han adquirido un uso destacado como biomateriales en prótesis, suturas y sistemas de administración de fármacos [69]. Es un polímero semicristalino debido a su estructura regular; presenta una gran ductilidad, una buena estabilidad, una fuerte resistencia al impacto y la viscosidad de su estado fundido es relativamente grande. El PCL se ha utilizado como material de envasado biodegradable, ya que puede ser degradado por microorganismos [70], [71]. Los principales atractivos del PCL son su aprobación por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para su uso en humanos, su biodegradabilidad, su compatibilidad con una amplia gama de otros polímeros, su buena procesabilidad que permite la fabricación de variedad de estructuras y formas, su alta estabilidad térmica y su coste relativamente bajo. El uso de PCL para la fabricación de andamios está en auge en el sector de ingeniería de tejidos por sus excelentes características, como la biodegradabilidad, biocompatibilidad, leves reacciones indeseables del organismo huésped y estructuras porosas tridimensionales [72], [73].

5.4 LACASA

Las lacasas (EC 1.10.3.2 p-difenol oxidorreductasa, u oxidasas multicopper) son un grupo de enzimas oxidativas extendidas en plantas, bacterias, hongos y en el reino animal, que muestran una amplia especificidad de sustrato y trabajan sin la necesidad de cofactores. Estas enzimas oxidan sustratos aromáticos, principalmente fenólicos, pero también diaminas o bencenotioles, simplemente a través de la reducción del oxígeno molecular en el agua, que es el único subproducto. Esta reacción ocurre en presencia de cuatro iones de cobre involucrados en la transferencia de electrones del sustrato al oxígeno, que es el aceptor final de electrones. En las últimas dos décadas, se observó un aumento significativo en la explotación de estos biocatalizadores en la síntesis orgánica, así como en los procesos farmacéuticos, agroquímicos, de procesamiento de alimentos y textiles industriales; esto también está relacionado con el desarrollo de la química verde, basado en métodos sostenibles, ecológicos, rentables y posiblemente de alto rendimiento [74].

Las lacasas oxidan compuestos mediadores como el fenol, la anilina, el ácido 4 hidroxibenzoico y el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), que a su vez degradan tintes y una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos [75] como los p-difenoles, los o-difenoles, las arildiaminas, los aminofenoles, etc; con la reducción de

oxígeno molecular a agua. Además de las funciones mencionadas, las lacasas también catalizan reacciones de polimerización y despolimerización [76].

5.5 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO

5.5.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

FTIR son las siglas en inglés de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier: una técnica para la identificación y el análisis estructural de los compuestos químicos [77]. En esta espectroscopia, la radiación infrarroja pasa a través de una muestra. Parte de la radiación es absorbida y otra parte pasa a través de la muestra (transmitida) [78]. El espectro resultante representa la absorción y transmisión molecular, con picos de absorción que representan la excitación de los modos vibracionales de las moléculas de la muestra y, por tanto, están asociados a los distintos enlaces químicos y grupos funcionales presentes en las moléculas [77].

Dado que cada material tiene una composición única y, en consecuencia, una disposición diferente de los átomos, no hay dos compuestos que produzcan exactamente el mismo espectro infrarrojo. Por lo tanto, la espectroscopia IR puede dar lugar a una identificación positiva (análisis cualitativo) de cada tipo de material. Además, el tamaño de un pico en el espectro es una indicación directa de la cantidad de material presente [78].

Hay tres componentes básicos del espectrómetro en una transformación de Fourier: una fuente de radiación, un interferómetro y un detector.

El instrumento produce un haz de irradiación infrarroja, que se emite desde una fuente luminosa de cuerpo negro. A continuación, el haz pasa al interferómetro, donde tiene lugar la codificación espectral [79]. El interferómetro más utilizado es el interferómetro de Michelson, que consta de tres componentes activos: un espejo móvil, un espejo fijo y un divisor de haz [78].

La recombinación de haces con diferentes longitudes de trayectoria en el interferómetro crea una interferencia constructiva y destructiva denominada interferograma. Posteriormente, el haz entra en el compartimento de la muestra y ésta absorbe frecuencias específicas de energía, que son características únicas de la muestra a partir del interferograma. A continuación, el detector mide la señal del interferograma en energía frente al tiempo para todas las frecuencias simultáneamente.

Mientras tanto, se superpone un haz para proporcionar una referencia (fondo) para el funcionamiento del instrumento. Por último, el espectro deseable se obtiene después de que el interferograma reste automáticamente el espectro del fondo del espectro de la muestra mediante el software informático de transformada de Fourier [79].

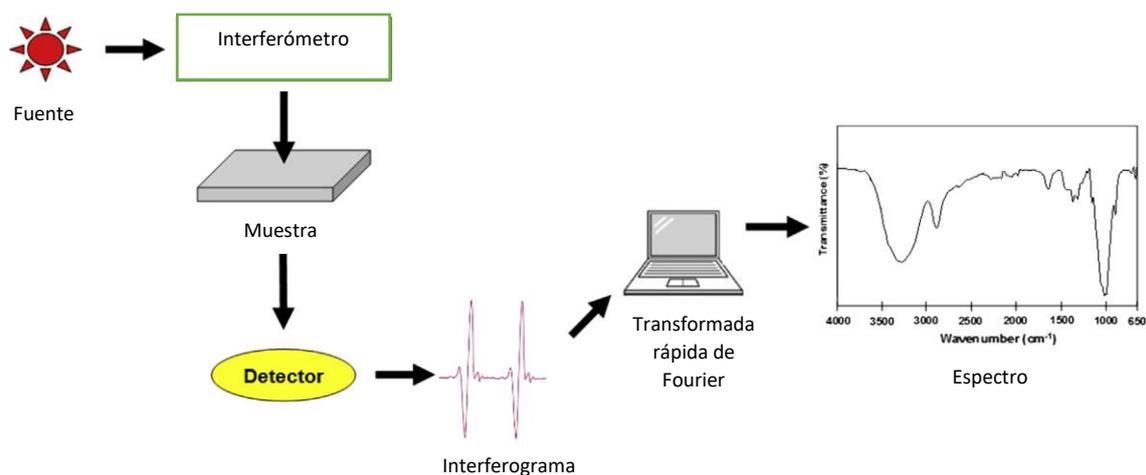


Ilustración 5 Componentes básicos del espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier. Adaptado de: [79].

5.5.2 Espectroscopia ultravioleta-visible

La espectroscopia UV-Vis es el estudio de cómo responde una muestra a la radiación electromagnética en el rango de 200-750 nm, es decir, el rango UV-Vis. Cuando un haz de luz atraviesa una sustancia o una disolución, parte de la luz puede ser absorbida y el resto transmitida a través de la muestra [80], [81]. El analito absorbe la luz de una longitud de onda específica (sólo UV y VIS) y se mide la cantidad de radiación absorbida por el analito. Al aumentar la concentración del analito, la absorción de la luz también aumenta linealmente, mientras que la transmisión de la luz disminuye exponencialmente. En la región UV-VIS, la absorción de la radiación depende de la configuración electrónica de las especies absorbentes, como átomos, moléculas, iones o complejos.

Un nivel de energía electrónica consta de varios niveles de energía vibracional, mientras que un nivel de energía vibracional único consta de varios niveles de energía rotacional. Cuando un fotón interactúa con una molécula, puede inducir una transición en los niveles de energía electrónica, si la energía proporcionada por el fotón coincide con la diferencia de energía en estos niveles. La cantidad de radiaciones absorbidas por el analito se mide y se traza frente a la longitud de onda de la radiación electromagnética para obtener el espectro. Así, un espectro UV-VIS típico es un gráfico de la longitud de onda o la frecuencia frente a la intensidad de la absorción [82].

Los espectrómetros UV-Vis constan de los mismos elementos comunes a la mayoría de los métodos espectroscópicos: un monocromador, normalmente con una rejilla de difracción para dispersar las diferentes longitudes de onda; un detector, como un fotomultiplicador, un dispositivo de carga acoplada o un detector de matriz de diodos; y un ordenador con software especializado. Los espectrómetros UV-Vis típicos utilizan una lámpara de deuterio para el UV que produce luz de 170 a 375 nm y una lámpara de filamento de tungsteno para el visible, que produce luz de 350 a 2500 nm [80].

5.5.3 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopia es la medición de la dependencia de la frecuencia de absorción o emisión de energía por parte de un sistema. La resonancia magnética nuclear se refiere a la

absorción y liberación de energía de radiofrecuencia por un núcleo en un campo magnético [83].

Los núcleos con un número par de protones y neutrones tienen un espín y un momento magnético nucleares nulos, mientras que los que tienen un número impar de protones o neutrones poseen un espín y un momento magnético no nulos. Entre los núcleos con un número impar de protones o neutrones, algunos núcleos, como el ^1H , el ^{31}P , el ^{13}C y el ^{15}N , tienen un número de espín de $\frac{1}{2}$, que es favorable para las aplicaciones prácticas de la resonancia magnética. Si el estado de espín de estos núcleos se mide individualmente en el campo magnético, se observan dos estados de espín que corresponden a los números cuánticos magnéticos de $\frac{1}{2}$ y $-\frac{1}{2}$. Uno de estos estados corresponde a la orientación de los núcleos paralelo al campo magnético, y el otro corresponde a su orientación antiparalela. Estos dos estados de espín tienen energías diferentes [84].

Supongamos ahora que irradiamos el protón con una radiación electromagnética de una frecuencia ν tal que los fotones o cuantos tienen una energía $h\nu$ exactamente igual a la separación de los dos niveles de energía. Entonces, si el protón se encuentra en el estado propio de menor energía, puede ser promovido exactamente al nivel superior. Si, por el contrario, se encuentra inicialmente en el estado superior, puede ser estimulado de forma resonante para que emita un fotón y caiga al estado inferior. Por tanto, tenemos un intercambio resonante de energía entre el protón y el campo electromagnético. Esto es la resonancia magnética nuclear [85].

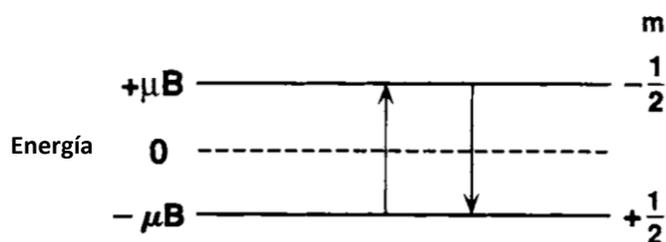


Ilustración 6 Valores propios de la energía de un núcleo de momento magnético μ en un campo magnético B [85].

Dado que la diferencia de energía entre los dos estados es proporcional a la intensidad del campo magnético, cuanto más fuerte sea el campo, mayor será la diferencia entre las dos poblaciones y más fuerte será la señal de resonancia magnética [83].

En los experimentos de espectroscopia de RMN, los núcleos magnéticos se colocan en un fuerte campo electromagnético B_0 y se excitan desde estados de espín de menor energía a estados de espín de mayor energía, mediante la absorción de radiación electromagnética generada por un segundo campo electromagnético B_1 . A continuación, estos núcleos excitados se relajan emitiendo radiación electromagnética de energía ligeramente inferior [85].

A medida que cada núcleo es perturbado de su estado de equilibrio original, ese núcleo mostrará una señal característica de decaimiento de vuelta al equilibrio. Esta

transferencia de energía se corresponde con una señal, la cual se detecta y se procesa para obtener la misma en forma de espectro de RMN del núcleo correspondiente [86].

La densidad de electrones alrededor de los núcleos de una molécula varía según los tipos de núcleos y enlaces que tenga, lo que hace que los campos magnéticos estáticos y opuestos sean diferentes. Este fenómeno se denomina "desplazamiento químico" y es el dato fundamental para caracterizar la estructura de la molécula o el polímero [87].

La radiación de radiofrecuencia emitida tiene cuatro parámetros que pueden analizarse para obtener información sobre la muestra: intensidad, frecuencia, vida media y fase [88]. Por tanto, los espectros de RMN pueden utilizarse para identificar compuestos desconocidos a partir de sus firmas de RMN características, para analizar mezclas de compuestos y para determinar las estructuras moleculares con detalle cuantitativo en 3D [85].

5.5.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) utiliza un haz de electrones finamente enfocado para producir una imagen de alta resolución de la superficie de una muestra [89].

SEM es, por tanto, una herramienta utilizada para la caracterización de materiales que proporciona información sobre la estructura superficial o casi superficial, la composición y los defectos de los materiales de naturaleza sólida [90].

Se puede considerar que el instrumento SEM consta de tres secciones principales: la columna de electrones, la cámara de muestras y los controles informáticos/electrónicos. La sección superior de la columna de electrones consiste en un cañón que genera un haz de electrones. Las lentes electromagnéticas situadas dentro de la columna enfocan el haz en una sonda de pequeño diámetro (unos pocos nanómetros). Las bobinas de escaneo de la columna rastrean la sonda sobre la superficie de la muestra presente en la cámara que se encuentra en el extremo de la columna. El cañón de electrones, la columna y la cámara de la muestra se mantienen en vacío para permitir la generación y el avance del haz de electrones. Los electrones del haz penetran unas pocas micras en la superficie de la muestra sólida, interactúan con sus átomos y generan una variedad de señales como electrones secundarios y retrodispersados y rayos X característicos que se recogen y procesan para obtener imágenes y la química de la superficie de la muestra [90].

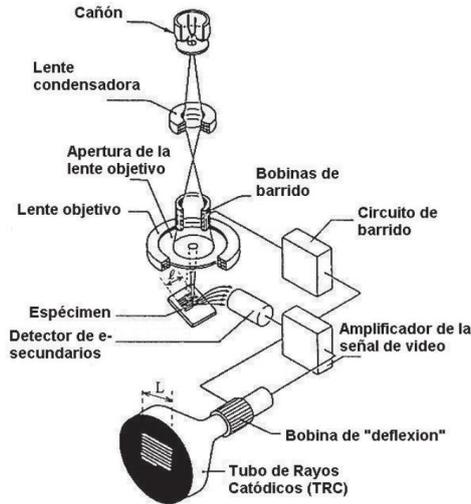


Ilustración 7 Esquema que muestra la construcción de los distintos componentes situados en la columna de electrones y la cámara de muestras del SEM [91].

5.5.5 Microscopía óptica

El microscopio óptico utiliza luz visible (400–700 nm) y un sistema de lentes para ampliar las imágenes de muestras micrométricas con una resolución adecuada [92], [93].

En el microscopio óptico, la luz de la lámpara del microscopio pasa a través del condensador y luego a través de la muestra o a su alrededor. La luz directa o no desviada es proyectada por el objetivo y repartida uniformemente por todo el plano de la imagen en el diafragma del ocular. La luz difractada por el espécimen se enfoca en varios lugares localizados en el mismo plano de la imagen, donde la luz difractada provoca interferencias destructivas y reduce la intensidad, dando lugar a zonas más o menos oscuras. Estos patrones de luz y oscuridad son lo que reconocemos como una imagen de la muestra. La lente del ocular aumenta aún más esta imagen, que finalmente se proyecta sobre la retina, el plano de la película de una cámara o la superficie de un chip de computadora sensible a la luz [94].

Esta técnica proporciona datos útiles sobre la superficie: se puede observar el tamaño y la forma de fibras o partículas, sin embargo, no es posible documentar estructuras finas y la composición química [95].

5.5.6 Caracterización de propiedades térmicas

5.5.6.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Las técnicas más empleadas para caracterizar las transiciones de fase son el análisis termogravimétrico (TGA), el análisis mecánico dinámico (DMA), el análisis termomecánico (TMA) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Entre estas técnicas, se prefiere el DSC porque permite detectar transiciones en un amplio rango de temperaturas (-90 a 550 °C) y facilita el análisis cuantitativo y cualitativo de las transiciones.

El método comprende el suministro de calor a un ritmo constante a la muestra y a un material de referencia. Se obtiene una diferencia del flujo de calor necesario para suministrar a la muestra y al material de referencia para mantener ambos a la misma temperatura. Esta diferencia de flujo de calor se traza contra la temperatura o el tiempo para obtener un termograma típico.

El termograma muestra cuatro transiciones identificadas de baja a alta temperatura como: temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de cristalización (T_c), temperatura de fusión (T_m) y temperatura de degradación (T_d). En general, las transiciones de primer orden se observan como picos bien definidos, mientras que las de segundo orden son variaciones en la curva de flujo de calor [96].

El DSC se utiliza para analizar los polímeros y comprobar su composición. Los puntos de fusión y las temperaturas de transición vítrea de la mayoría de los polímeros están disponibles en compilaciones estándar, y el método puede mostrar una posible degradación del polímero por la disminución del punto de fusión esperado, que depende de la masa molar del polímero, por lo que los polímeros de bajo peso molecular tendrán puntos de fusión más bajos que los esperados. Las impurezas en los polímeros pueden determinarse examinando los termogramas en busca de picos anómalos, y los plastificantes pueden detectarse en sus puntos de ebullición característicos [97].

5.5.6.2 *Análisis Gravimétrico Térmico (TGA)*

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica analítica cuantitativa que analiza la masa de una muestra, desde 1 mg hasta varios gramos, a medida que la temperatura de un horno se eleva hasta 1600°C bajo un flujo de gas estable o cambiante [98]. Se utiliza principalmente para comprender determinados fenómenos térmicos como la absorción, adsorción, desorción, vaporización, sublimación, descomposición, oxidación y reducción. Además, el TGA puede utilizarse para evaluar los productos volátiles o gaseosos que se pierden durante estas reacciones químicas en muestras como nanomateriales, polímeros, nanocompuestos poliméricos, fibras, pinturas, revestimientos y películas [99].

El instrumento consta de tres componentes diferentes para proporcionar la flexibilidad necesaria para obtener datos analíticos precisos: balanza (para medir el peso de la muestra), horno (que proporciona calentamiento lineal), programador de temperatura (para medir y controlar la temperatura) y registrador (para registrar la unidad de cambios de peso y temperatura). Cuando se producen variaciones de peso, la platina de la balanza tiende a desviarse de su posición normal [100].

Los resultados de la TGA se grafican como pérdida de masa en función de la temperatura o el tiempo. Otro tipo de representación de los resultados es la termogravimetría derivada (DTG), que es la primera derivada de la curva TGA y describe la tasa de cambio de masa. En un gráfico de TGA, una pendiente constante caracteriza los diferentes pasos de la descomposición térmica. Mientras que el gráfico DTG ayuda a detectar las transformaciones que se superponen o que están asociadas a una pérdida de masa deficiente. Los picos de DTG indican una transformación específica, y los valores mínimos coinciden con la tasa máxima de pérdida de masa de la etapa de descomposición relacionada [101].

Los termogramas genéricos tienen varias secciones:

- a) Por debajo de 150°C, se evapora el agua fisorbida, los compuestos volátiles de bajo peso molecular, los disolventes y los gases atrapados.

- b) Entre 150 °C y 250 °C, la pérdida de masa se debe al agua químicamente absorbida y a compuestos de bajo peso molecular, como aditivos y productos volátiles de descomposición.
- c) Por encima de 250°C, los compuestos empiezan a descomponerse y se obtiene la temperatura de inicio y la de fin. En los sistemas multicomponentes y en las reacciones con etapas intermedias pueden darse varias temperaturas de inicio y fin.
- d) El material restante por encima de la temperatura de desintegración incluye cenizas inorgánicas no volátiles y metales. En un entorno oxidante, los compuestos metálicos aumentan el estado de oxidación y ganan masa [98].

5.5.7 Método 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) ABTS

Se utilizan numerosos métodos para evaluar la actividad antioxidante de los compuestos naturales en los alimentos o en los sistemas biológicos. Dos radicales libres que se utilizan habitualmente para evaluar la actividad antioxidante in vitro son el 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) (ABTS) y el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) [102].

El catión radical de sal de diamonio del 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico) (ABTS•+), se utiliza con frecuencia para estimar la capacidad antioxidante total (TAC) de los productos naturales, incluidos los extractos crudos, los polifenoles, los ácidos fenólicos y los flavonoides, entre otros [103].

El ensayo ABTS mide la capacidad relativa de los antioxidantes para reducir el ABTS generado en la fase acuosa, en comparación con un estándar Trolox (análogo de la vitamina E soluble en agua)[102]. En general, las técnicas implican la generación de ABTS•+ mediante una reacción entre el ABTS y los iniciadores, como la metmioglobina/H₂O₂, la peroxidasa de rábano picante/H₂O₂, el peroxidisulfato de potasio, el dióxido de manganeso, el dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) u otros, y da lugar a la producción de un cromóforo ABTS•+ de color verde azulado, que posteriormente es inhibido por los antioxidantes [104].

El cambio de coloración debido a la reacción entre el radical ABTS y el antioxidante se mide a través de su espectro de absorción que posee una onda característica. El método suele expresarse como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC). El método es rápido y puede utilizarse en una amplia gama de valores de pH, tanto en sistemas acuosos como de disolventes orgánicos [102].

Con la mejora de la tecnología para la determinación del cromóforo azul ABTS•+ producido a través de la reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio, se estableció un método factible según una absorción máxima del ABTS•+ en las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm [103].

5.5.8 Cuantificación de proteína

5.5.8.1 Método Bradford

Durante los procedimientos de aislamiento de proteínas a partir de materiales vegetales, animales, insectos, levaduras o bacterias, es importante determinar la concentración de proteínas en cada paso del procedimiento de purificación. La medición de la concentración de proteínas es esencial para los ensayos de actividad enzimática y es importante en las mediciones clínicas. Los métodos de cuantificación de proteínas detectan aminoácidos concretos basándose en la absorbancia por estructuras de anillos aromáticos o en la interacción de colorantes o cobre con residuos de aminoácidos cargados o enlaces peptídicos [105].

El ensayo de Bradford se basa en la unión entre el colorante azul Coomassie G250 y la proteína. La forma catiónica del colorante, que predomina en la disolución ácida del reactivo del ensayo, tiene una λ máxima de 470 nm. En cambio, la forma aniónica del colorante, que se une a la proteína, tiene una λ máxima de 595 nm. Así, la cantidad de colorante unido a la proteína puede cuantificarse midiendo la absorbancia de la disolución a 595 nm [106].

El color azul producido en condiciones ácidas es el resultado de la reacción del colorante con la arginina y, en menor medida, con los residuos de lisina, histidina, tirosina, triptófano y fenilalanina de las proteínas. También se producen interacciones hidrofóbicas. Se pueden detectar de 0,2 a 20 μ g de proteína. [105].

A partir de este ensayo se puede trazar una curva de calibración donde se grafican las concentraciones conocidas de la proteína estándar contra la absorbancia. La concentración desconocida de proteína de la muestra de interés se determina con base en la ecuación lineal de la serie de estándares de proteína con concentración conocida [107].

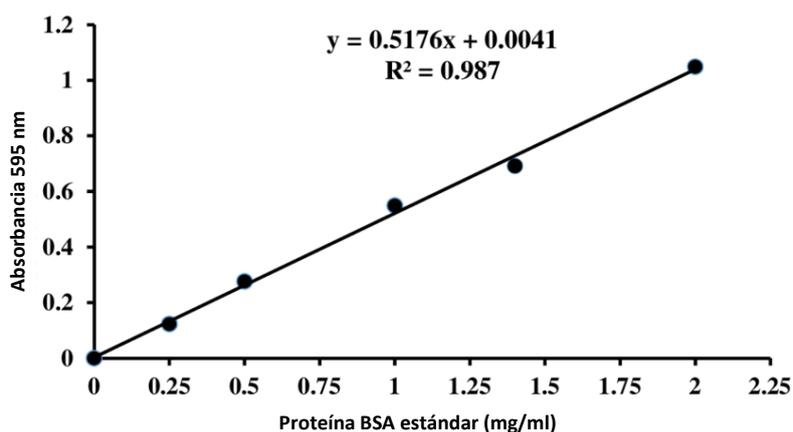


Ilustración 8 Ejemplo de curva estándar del ensayo Bradford de concentración de proteína estándar BSA frente a absorbancia.

5.5.9 Actividad enzimática

El objetivo de la medición de la actividad enzimática es determinar la cantidad de enzima presente en una condición estándar, de modo que la actividad pueda compararse entre una muestra y otra, y entre un laboratorio y otro. Las condiciones elegidas suelen ser un

pH óptimo, una concentración de sustrato capaz de saturar a la enzima y una temperatura adecuada.

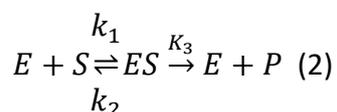
Para medir la actividad de una enzima hay que medir la cantidad de producto que se forma en un tiempo determinado o, en algunos casos, la cantidad de sustrato que se ha consumido, lo que debería ser lo mismo.

El ensayo puede seguirse mediante cambios en la absorbancia, la fluorescencia, la viscosidad, el pH o alguno de los otros parámetros físicos posibles. En muchos ejemplos de ensayos de hidrolasas, se utiliza un sustrato artificial que libera un producto coloreado o fluorescente [108].

5.5.9.1 Michaelis Menten

La ecuación de Michaelis-Menten es capaz de describir el cambio sufrido por la velocidad de una reacción catalizada por una enzima al variar la concentración del sustrato.

Michaelis y Menten consideraron el siguiente esquema de reacción:



en el que la enzima libre, E , se une reversiblemente a un sustrato, S , para formar un complejo enzima-sustrato intermedio, ES , que luego se descompone irreversiblemente para liberar la enzima y producir el producto, P . Las etiquetas de las reacciones k_1, k_2, k_3 son las constantes de velocidad de cada proceso. Michaelis y Menten derivaron de este esquema su fórmula de velocidad:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

en el que V_{max} es la velocidad máxima de la reacción, $V_{max} = k_3([E] + [ES])$, y $K_M = (k_3 + k_2)/k_1$ es la constante de Michaelis–Menten [109].

La constante K_M es equivalente a la concentración de sustrato a la que la enzima se satura y describe la afinidad de una enzima a un sustrato específico, gráficamente se encuentra en $1/2 V_{max}$ (Ver ilustración 8) [110], [111]. A bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de una reacción enzimática es de primer orden y directamente proporcional a la concentración de sustrato ($V_0 = k[S]$), mientras que, a altas concentraciones de sustrato, la velocidad se vuelve independiente de la concentración de sustrato, está representada por una cinética de orden cero ($V_0 = V_{max}$) y casi todas las moléculas de la enzima están unidas al sustrato. Para evitar el uso de este gráfico curvilíneo, Lineweaver y Burk introdujeron un análisis de la cinética enzimática mediante un gráfico recíproco doble de línea recta de $1/V_0$ frente a $1/[S]$ con una pendiente de K_M/V_{max} y una intercepción en la ordenada a $1/V_{max}$ [111].

Se parte de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (4)$$

Se calculan los recíprocos:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{max}[S]} \quad (5)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]} \quad (6)$$

Obtenemos la ecuación de Lineweaver-Burk, que corresponde a la gráfica doble recíproca de la ecuación de Michaelis-Menten (Ver Ilustración 8).

$$\frac{1}{V_0} = \left\{ \left[\frac{K_M}{V_{max}} \right] \left[\frac{1}{[S]} \right] \right\} + \frac{1}{V_{max}} \quad (7)$$

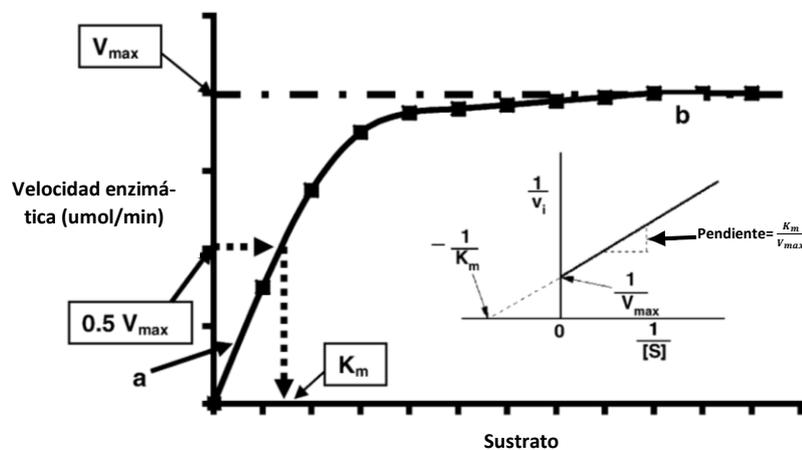


Ilustración 9 Una curva típica de Michaelis-Menten representando el cambio de velocidad de una reacción catalizada por una enzima con respecto a la concentración de sustrato. Adaptado de: [111].

5.6 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

El Diseño de Experimentos (DoE) fue desarrollado a principios de la década de 1920, por Sir Ronald Fisher en la Estación de Investigación Agrícola de Rothamsted, en Londres (Inglaterra). Sus experimentos iniciales tenían por objeto determinar el efecto de diversos fertilizantes en diferentes parcelas de tierra. El estado final del cultivo dependía no sólo del fertilizante, sino también de otra serie de factores (como el estado del suelo subyacente, el contenido de humedad del suelo, etc.) de cada una de las parcelas respectivas [112].

El DoE hace referencia al proceso de planificación, diseño y análisis del experimento para poder extraer conclusiones válidas y objetivas de forma eficaz y eficiente [112].

En el contexto del DoE en la fabricación, uno puede encontrarse con dos tipos de variables o factores del proceso: cualitativos y cuantitativos. En el caso de los factores cuantitativos, hay que decidir el rango de ajustes y cómo se van a medir y controlar durante el experimento. Los factores cualitativos son de naturaleza discreta. El tipo de materia

prima, el tipo de catalizador, el tipo de proveedor, etc. son ejemplos de factores cualitativos [112].

Un plan de diseño experimental eficaz debe incluir los siguientes elementos:

Definición de objetivos. En primer lugar, esta declaración debe responder a la pregunta de por qué se va a realizar el experimento. En segundo lugar, permite identificar si el experimento se realiza para clasificar las fuentes de variabilidad o si su propósito es estudiar las relaciones causa-efecto [113].

Identificación de las unidades experimentales. Esto es, declarar el elemento sobre el cual se cambiará algo [113].

Definir una variable dependiente significativa y medible. Identificar qué característica de las unidades experimentales pueden medirse y registrarse después de cada ejecución [113].

Enumeración de las variables independientes y ocultas. Verificar que las variables independientes elegidas para el estudio pueden controlarse durante un único experimento y variarse de un experimento a otro. Si hay interés en una variable, pero no puede controlarse ni variarse, no puede incluirse como factor. Las variables que afectan a la respuesta, pero que no se pueden controlar, son variables ocultas [113].

Realizar pruebas piloto. Esto para asegurarse de que pueden controlarse y modificarse los factores que se han seleccionado, que la respuesta puede medirse y que las mediciones repetidas de las mismas unidades experimentales o similares son coherentes [113].

Elección del diseño experimental. Debe adaptarse a los objetivos del experimento concreto. Esto incluirá una descripción de los niveles factoriales que se estudiarán [113].

Determinación del número de réplicas necesarias. Basándose en la varianza esperada del error experimental, el investigador debe determinar el número de réplicas que darán una alta probabilidad de detectar un efecto de importancia práctica [113].

Asignar aleatoriamente las condiciones experimentales a las unidades experimentales. En algunos diseños, los niveles de factor o la combinación de niveles de factor se asignan a las unidades experimentales de forma completamente aleatoria. En otros diseños, la aleatorización de los niveles de los factores se realiza por separado dentro de los grupos de unidades experimentales y puede hacerse de forma diferente para los distintos factores [113].

Realización del experimento. Durante la realización del experimento, es fundamental supervisar cuidadosamente el proceso para asegurarse de que todo se está haciendo según lo previsto. Los errores en el procedimiento experimental en esta fase suelen destruir la validez del experimento [114].

Análisis estadístico de los datos. Deben utilizarse métodos estadísticos para analizar los datos, de modo que los resultados y las conclusiones sean objetivos y no juiciosos.

Existen muchos programas informáticos excelentes diseñados para ayudar en el análisis de datos [114].

5.6.1 Diseños factoriales

Cuando se estudian múltiples factores, un enfoque clásico consiste en estudiar cada uno por separado manteniendo todas las demás constantes. Una estrategia mucho mejor para experimentar con múltiples factores es utilizar un diseño factorial. En un diseño factorial, las celdas constan de todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores en estudio. Los diseños factoriales acentúan los efectos de los factores y permiten estimar la interdependencia de los efectos (o interacciones)[113].

Generalmente, si hay k factores, cada uno en dos niveles, el diseño factorial requeriría 2^k ejecuciones. Evidentemente, a medida que aumenta el número de factores de interés, el número de ejecuciones necesarias aumenta rápidamente; por ejemplo, un experimento de 10 factores con todos los factores en dos niveles requeriría 1024 ejecuciones ($2^{10} = 1024$). Esto se convierte rápidamente en inviable desde el punto de vista del tiempo y los recursos. Un experimento factorial fraccionado es una variación del factorial básico en el que sólo se utiliza un subconjunto de las ejecuciones [114].

Un diseño factorial fraccional regular de dos niveles se denomina comúnmente diseño 2^{k-p} . Tiene k factores de dos niveles con 2^{k-p} ejecuciones, y está completamente determinado por p relaciones definitorias independientes. Cuando $p = 0$, se produce un diseño factorial completo 2^k . En contraste, 2^{k-1} requiere la mitad de los experimentos que un diseño factorial completo [115].

6 MATERIALES

Para la cuantificación de concentración de proteína se utilizó el reactivo proteínico azul brillante G 250 (Sigma-Aldrich, 0.35mg/ml), proteína standard de albúmina humana (Sigma-Aldrich, 0.3 mg/ml) y cloruro de sodio (NaCl, Sigma-Aldrich, 58.44 g/mol).

Para el ensayo de actividad enzimática se utilizó 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) ($C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$, Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$ HPCL), $M_w = 548.68$ g/mol).

Para la síntesis de poli(epicatequina) se adquirieron los siguientes materiales: (-)-Epicatequina ($C_{15}H_{14}O_6$, Sigma-Aldrich, $\geq 90\%$ HPCL, $M_w = 290.27$ g/mol), lacasa de trametes versicolor (Sigma-Aldrich, ≥ 0.5 U/mg), acetona (CH_3COCH_3 , Sigma-Aldrich, $\geq 99.5\%$), acetato de sodio (CH_3COONa , Sigma-Aldrich, $\geq 99.0\%$, $M_w = 82.03$ g/mol), ácido acético (CH_3CO_2H , Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$, $M_w = 60.05$ g/mol).

Se utilizaron reactivos mencionados anteriormente para la prueba de actividad enzimática: 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico), acetato de sodio, lacasa de trametes versicolor y agua destilada.

La extracción de las catequinas para el UV-Visible se realizó en alcohol etílico (C_2H_6O , Hycel, $M_w = 46.07$ g/mol).

Para la técnica de electrohilado se utilizó poli(ϵ -caprolactona) $((C_6H_{10}O_2)_n$, Sigma-Aldrich, $M_n = 70,000-90,000$), 2,2,2-Trifluoroetanol ($C_2H_3F_3O$, Sigma Aldrich, $M_w = 100.04$ g/mol), N,N-dimetilformamida (Sigma Aldrich, $\geq 99.8\%$, $M_w = 73.09$ g/mol), diclorometano (Sigma Aldrich, $\geq 99.8\%$, $M_w = 84.93$ g/mol).

7 METODOLOGÍA

7.1 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Primero se preparó una disolución de cloruro de sodio al 0.85% m/v.

Posterior a esto se elaboró la disolución de Brilliant blue G 250 utilizando como disolvente agua, en una relación 1:4 en volumen.

A tres tubos, etiquetado cada uno como blanco, standard e incógnita, respectivamente, se les agregaron 2.5 ml de disolución de Brilliant blue. Al primer tubo denominado como el blanco se le añadieron 50 μ L de la disolución de cloruro de sodio. Al tubo standard se le adicionaron 50 μ L de proteína standard, en este caso albúmina humana a una concentración de 0.3 mg/mL. Y finalmente, al tubo incógnita se le agregaron 50 μ L de disolución de lacasa, con una concentración de 0.5 mg/mL.

Los tubos se agitaron en un mezclador Vortex. Luego se traspasaron las disoluciones a celdas espectrofotométricas y se obtuvo la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm de las disoluciones standard e incógnita, utilizando como referencia la disolución de blanco mediante espectroscopia ultravioleta-visible. El procedimiento se realizó por triplicado.

7.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LACASA

La medición de actividad enzimática de la lacasa se basa en la oxidación del sustrato 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) (ABTS). La velocidad de oxidación del ABTS se determinó espectrofotométricamente a 420 nm durante 10 minutos.

La mezcla de reacción contenía 600 μ L de buffer de acetato de sodio (0,1 M, pH 5.0), 300 μ L de lacasa (0.5 mg/mL) y 1400 μ L de agua destilada. Se añadieron 300 μ L de disolución de ABTS a diferentes concentraciones (0.1943 mM-1.943 mM).

La mezcla se incubó durante 2 min y la absorbancia se midió inmediatamente en un espectrofotómetro a 420 nm en intervalos de 15 segundos. La actividad con cada concentración de sustrato se determinó dos veces.

Una unidad de actividad lacasa se definió como la actividad de una enzima que cataliza la conversión de 1 mol de ABTS por minuto [116].

Con base en el ensayo enzimático a concentraciones variables del sustrato ABTS, se realizó un diagrama de Lineweaver-Burk, del que se obtuvo la velocidad máxima de reacción, que se define como el punto donde la lacasa está saturada por el sustrato. A partir

del ajuste de curvas del gráfico de velocidad de reacción frente a las concentraciones de sustrato, se determinó el valor de la velocidad máxima de reacción [117], [118].

7.3 POLIMERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE EPICATEQUINA

El monómero de epicatequina se oxidó mediante la lacasa para producir poli(epicatequina). Para esto, la epicatequina (10mM) se disolvió en una mezcla de buffer de acetato de sodio (0.1 M, pH 5.0) y acetona (80:20, v/v) mediante agitación magnética.

Dos Unidades Internacionales [U] por mililitro de lacasa se agregaron a la disolución y la oxidación se llevó a cabo a 60 rpm, durante 24 horas [66], [119].

El precipitado se recuperó mediante centrifugación a 4500 rpm por 10 minutos; posteriormente se lavó 3 veces con agua destilada mediante centrifugación a 4500 rpm, durante 10 minutos. La poli(epicatequina) se secó a 35°C durante 72 horas en un horno de vacío [120].

8 CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO CON BASE EN EPICATEQUINA

8.1 ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER CON REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA (ATR-FTIR)

Para la obtención de los espectros FTIR fue utilizado un equipo Thermo Scientific, Nicolet 6700. Se colocó muestra suficiente de epicatequina y poli(epicatequina) en el portamuestras, las cuales se ajustaron con un tornillo y se analizaron en la región de 4000-500 cm^{-1} . Con esta caracterización se monitorearon los cambios en las señales espectrales, con la finalidad de comparar los grupos funcionales del monómero y su forma polimérica.

8.1.1 Grado de conversión de epicatequina a poli(epicatequina)

Con base al ATR-FTIR se calculó el grado de conversión de epicatequina a poli(epicatequina). Este valor se obtiene de la relación entre la altura de una banda que cambió debido a la polimerización, y la altura de un pico que se mantiene similar en la epicatequina y la poli(epicatequina) al ser característico de los flavonoides; este último se utiliza como un valor de referencia del grado de conversión.

En Origin 2018, se normalizaron ambos gráficos en un valor de [0,1]; posteriormente se realizó una línea base en los gráficos de la epicatequina y la poli(epicatequina), trazada entre los nodos de cada pico, y se midió la altura desde esta línea hasta la cresta [121]. Este valor se obtuvo dos veces, de los espectros ATR-FTIR de dos polimerizaciones diferentes.

8.2 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV-Vis)

Para esta evaluación se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-2600.

Se pesaron 10 mg de epicatequina y 10 mg de poli(epicatequina), se aforaron a 10 ml de etanol y se agitaron con un agitador magnético. Se extrajo 1 µL de estas soluciones, se aforaron y agitaron nuevamente en 10 ml de etanol puro. La absorbancia obtenida se estudió por triplicado en el rango 250-600 nm, utilizando una celda de cuarzo de 1 cm.

8.2.1 Método 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) ABTS

El radical ABTS^{•+} se obtuvo mediante la agitación magnética de una solución de ABTS 7.0 mM en agua destilada con persulfato potásico (2.45 mM) en la oscuridad durante 15 horas antes de su uso. La absorbancia de la solución de ABTS^{•+} se ajustó con etanol para obtener una lectura en el espectrofotómetro de 0.70 a 753 nm a temperatura ambiente.

A continuación, la solución ABTS^{•+} (1.0 mL) se mezcló con 0.5 mL de etanol y 0.5 mL de epicatequina o poli(epicatequina) (2 mg/mL en agua destilada). La absorbancia se midió a 753 nm al cabo de 6 min. Se utilizó agua destilada como blanco.

El nivel de inhibición (%) de los radicales libres ABTS se calculó según la ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100 \quad (8)$$

donde A_0 es la absorbancia de la muestra de referencia sin antioxidantes, y A_1 es la absorbancia en presencia de epicatequina o poli(epicatequina) [120].

El nivel de inhibición (%) de la absorbancia se calculó utilizando la curva estándar preparada con Trolox (% de nivel de inhibición – concentración de Trolox en mM). El efecto de la epicatequina y la poli(epicatequina) en la eliminación de ABTS se denomina capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) (Ver anexos 4 y 5).

8.3 ANÁLISIS TÉRMICO GRAVIMÉTRICO (TGA)

Con este análisis térmico se determinó la pérdida de masa de las muestras hasta la descomposición del polímero, al someterlas a temperatura monitoreada y una atmósfera específica.

El instrumento mide la diferencia en flujo de calor entre la muestra colocada en el porta muestras, y una referencia. Los termogramas obtenidos se examinaron en el software TA Universal Analysis y los parámetros que se utilizaron se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1 Parámetros utilizados para caracterización TGA.

Muestra	Intervalo de temperatura	Velocidad de calentamiento	Gas
Epicatequina	35 – 800 °C	10°C/min	Nitrógeno
Poli(epicatequina)	35 – 800 °C	10°C/min	Nitrógeno

9 ELECTROHILADO

9.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS FACTORIAL FRACCIONADO

Se utilizó un modelo factorial fraccionado 2^{k-p} , este diseño tiene 2 niveles, un número de factores k igual a 5, y un valor de $p = 2$. Con estos parámetros, se obtuvieron 8 combinaciones; se realizaron los experimentos por triplicado, dando un total de 24 corridas.

Tabla 2 Factores con sus respectivos niveles.

Factores	Niveles	
Diferencial de potencial (kV)	15	25
Distancia de la aguja al colector (cm)	15	25
Diámetro de la aguja (G)	22	30
Concentración % (m/v)	7.5	9.33
Razón de flujo (mL/h)	0.40	0.60

Tabla 3 Diseño de experimentos factorial fraccionado.

No. Experimento	Diferencial de potencial (kV)	Distancia de la aguja al colector	Aguja	Concentración % (m/v)	Razón de flujo (mL/h)
1	15	25	22	9.33	0.6
2	25	25	22	7.5	0.4
3	15	15	22	7.5	0.6
4	25	15	30	9.33	0.6
5	25	25	30	7.5	0.6
6	15	15	30	7.5	0.4
7	25	15	22	9.33	0.4
8	15	25	30	9.33	0.4
9	15	25	22	9.33	0.6
10	25	25	22	7.5	0.4
11	15	15	22	7.5	0.6
12	25	15	30	9.33	0.6
13	25	25	30	7.5	0.6
14	15	15	30	7.5	0.4
15	25	15	22	9.33	0.4
16	15	25	30	9.33	0.4
17	15	25	22	9.33	0.6
18	25	25	22	7.5	0.4
19	15	15	22	7.5	0.6
20	25	15	30	9.33	0.6
21	25	25	30	7.5	0.6
22	15	15	30	7.5	0.4
23	25	15	22	9.33	0.4
24	15	25	30	9.33	0.4

9.2 PREPARACIÓN DE LAS FIBRAS ELECTROHILADAS

La disolución de PCL se preparó en 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) a una concentración del 13% m/v, agitando durante 6 horas. La solución de poli(epicatequina) se preparó disolviendo 40 mg de poli(epicatequina) en 2 mL de DCM y DMF en una proporción 60/40 (v/v). Esta última disolución, se añadió a la solución de PCL para obtener disoluciones finales de 7.5% y 9.33% (m/v). Se electrohiló 1 mL de polímero con las respectivas condiciones asignadas a cada una de las corridas.

9.3 DISEÑO DE EXPERIMENTOS FACTORIAL

Tabla 4 Factores y niveles del segundo DoE.

Factores	Niveles		
Concentración % (m/v)	10.8	9.33	13.8
Razón de flujo (mL/h)	0.2	0.3	0.4

Tabla 5 Diseño de experimentos factorial completo.

No. Experimento	Concentración % (m/v)	Razón de flujo (mL/h)
1	10.8	0.2
2	9.33	0.2
3	13.8	0.2
4	10.8	0.3
5	9.33	0.3
6	13.8	0.3
7	10.8	0.4
8	9.33	0.4
9	13.8	0.4

9.4 PREPARACIÓN DE LAS FIBRAS ELECTROHILADAS

La solución de PCL se preparó en DCM y DMF en una proporción 60/40 (v/v) a una concentración del 13% en peso, agitando durante 6 horas. La solución de poli(epicatequina) se preparó disolviendo 40 mg de poli(epicatequina) en 2 mL de DCM y DMF en una proporción 60/40 (v/v). Esta última disolución se agitó con la solución de PCL para obtener disoluciones finales de 9.33% y 10.8% (m/v); a la solución de 13% en peso de PCL, se le añadieron 40 mg de poli(epicatequina), obteniendo una concentración de 13.8% (m/v). Se electrohiló 1 mL de polímero con las respectivas condiciones asignadas a cada una de las corridas.

10 CARACTERIZACIÓN DE LAS FIBRAS ELECTROHILADAS

De las muestras electrohiladas se tomaron secciones rectangulares, las cuales fueron recubiertas con oro en un equipo JEOL JPC-1100. La superficie se observó en un

microscopio Leica, Stereoscan 440, operado a 20kV. Para analizar el diámetro de las fibras, se utilizaron 30 mediciones de dos muestras diferentes en el software ImageJ.

11 RESULTADOS

11.1 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{(A_{\text{incógnita}}) \cdot (\text{Concentración standard})}{A_{\text{standard}}} \quad (9)$$

Utilizando el promedio de 6 mediciones de absorbancia de la lacasa y de la proteína standard, y sabiendo por las especificaciones de fábrica que la concentración de la proteína standard es de 0.3 mg/mL, se sustituyeron los valores:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{(0.0571666) \cdot (0.3 \text{ mg/mL})}{0.351166} \quad (10)$$

Por lo tanto:

$$\text{Concentración} = 0,04883 \text{ mg/mL}$$

11.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LACASA

Se obtuvo la actividad enzimática de la lacasa, a partir del gráfico de los cambios de concentraciones de disoluciones de ABTS contra la velocidad de oxidación de ABTS mediado con lacasa (Anexo 1). De este se derivó la curva Lineaweaver-Burk (Anexo 2), computando una velocidad máxima de $8.8868E^{-06} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{min}} \right]$.

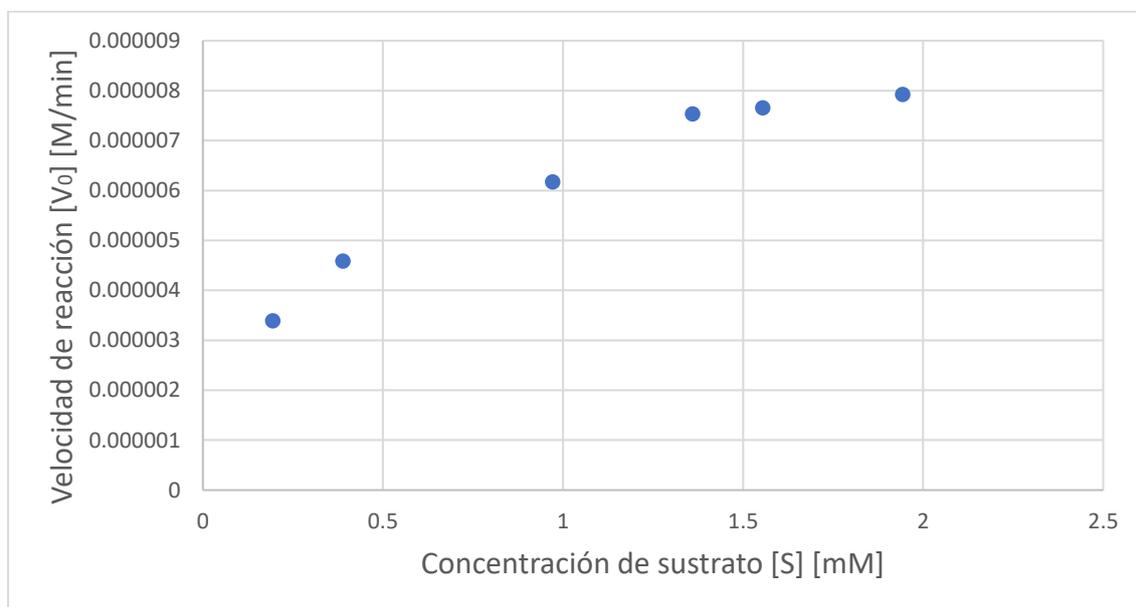


Ilustración 10 Gráfica de Michaelis-Menten.

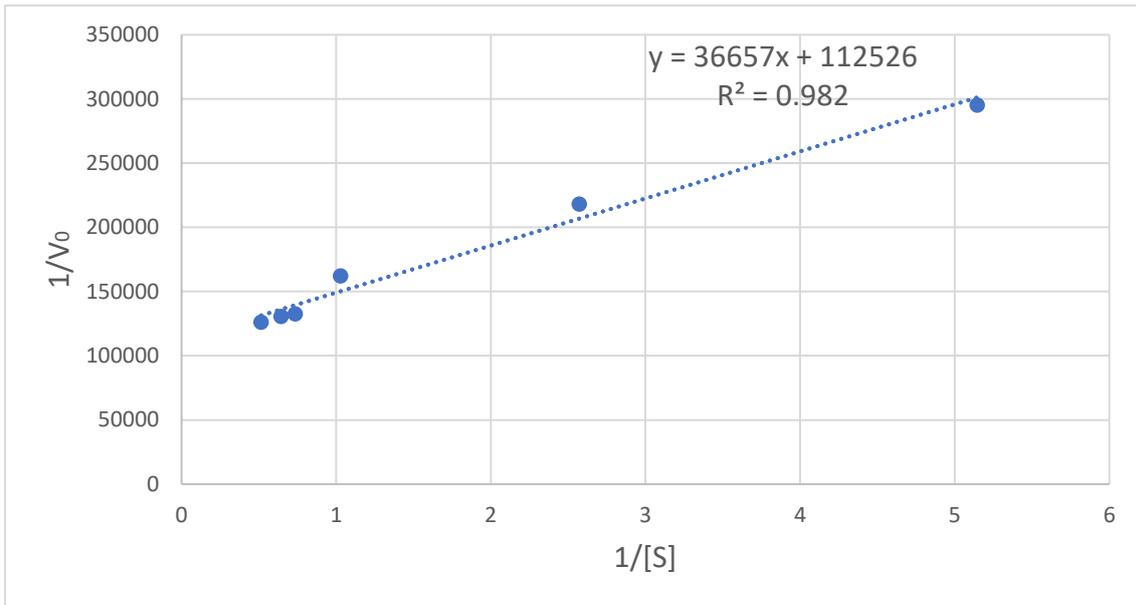


Ilustración 11 Grafica de Lineweaver-Burk.

11.3 ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER CON REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA (ATR-FTIR)

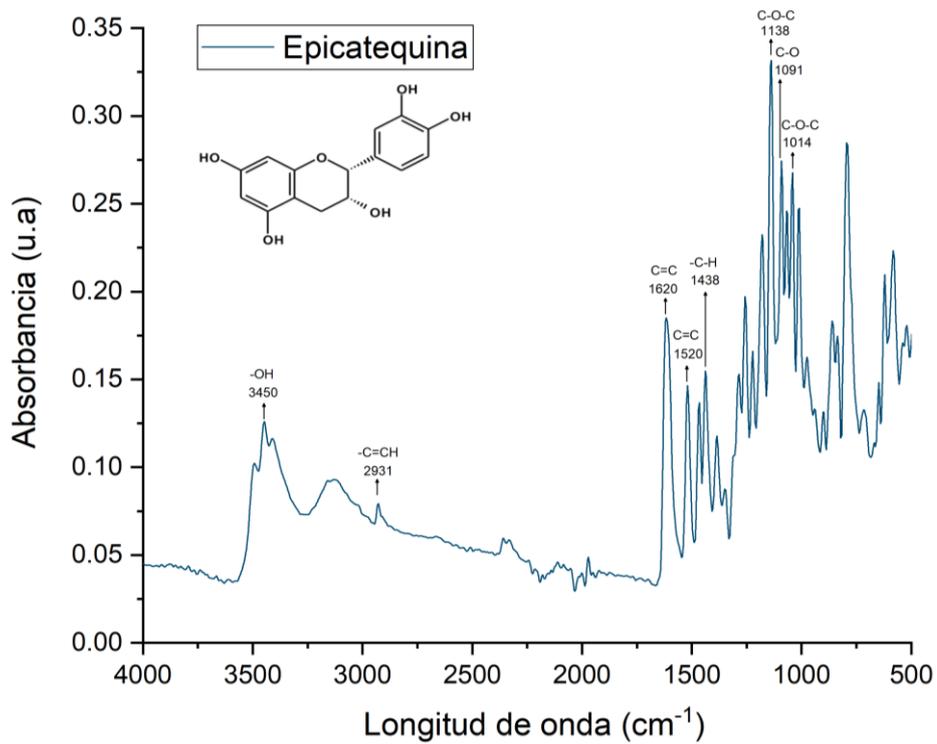


Ilustración 12 FTIR de la epicatequina.

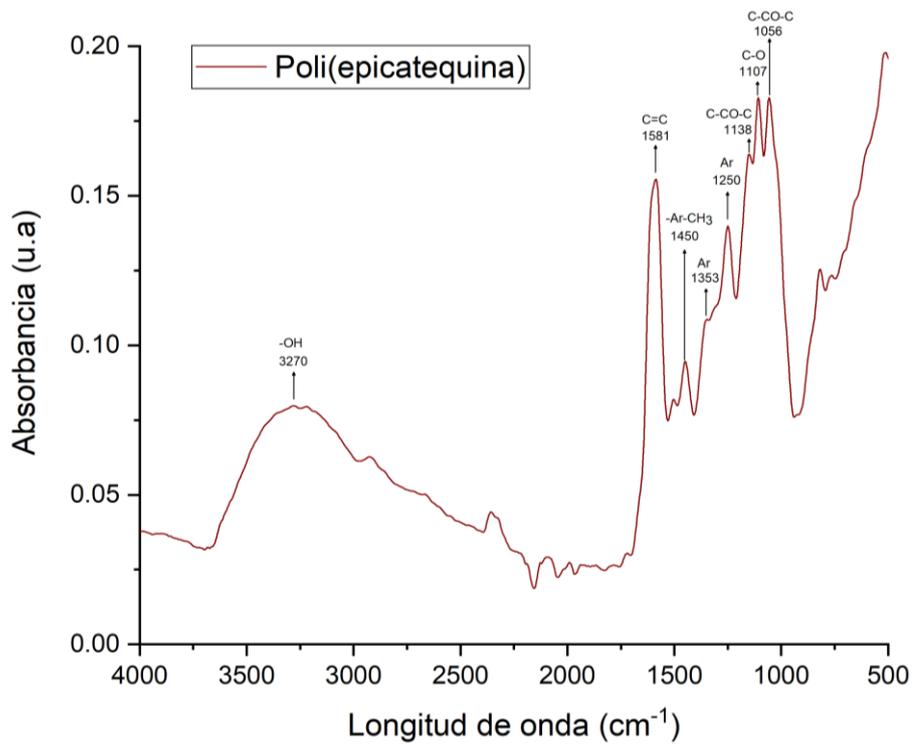


Ilustración 13 FTIR de la poli(epicatequina).

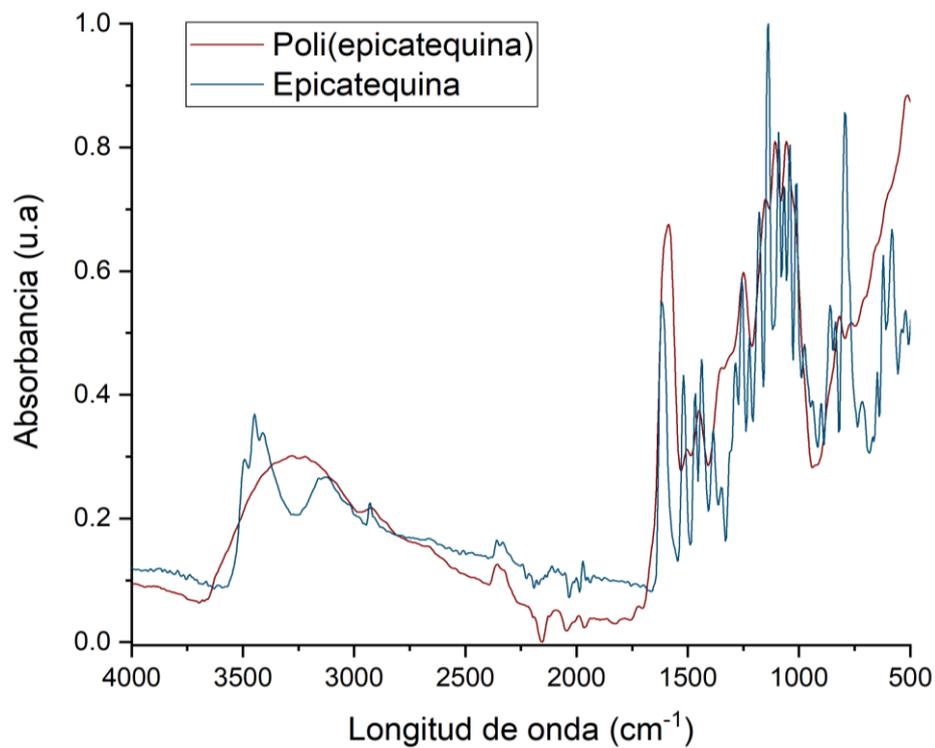


Ilustración 14 Poli(epicatequina) en contraste con su forma monomérica.

Se utilizó espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier para confirmar la polimerización de la epicatequina.

Se han reportado picos característicos en el espectro FTIR que corroboran la forma polimérica de los flavonoides catequina [17], [119], [120], rutina [122], [123] y naringenina

[124]; asimismo, de los polifenoles catecol, resorcinol e hidroquinona [125]: la banda entre 3900-3000 cm^{-1} corresponde a la formación de vibraciones del enlace OH, la vibración de estiramiento de grupos arilo lo indica el rango de 1370-1250 cm^{-1} , aproximadamente en 1061 denota presencia de C-CO-C en cetonas. También se señalan picos característicos de los grupos funcionales que se encuentran en la forma monomérica de los flavonoides: en 1600-1450 vibraciones C=C de los grupos aromáticos, en 2900-2930 Ar-CH₃ así como estiramientos del C-OH en 1165-1112.

En la Ilustración 12 se muestran las regiones espectrales características de la epicatequina, en la Ilustración 13 se observan los grupos funcionales obtenidos de la poli(epicatequina), y en la Ilustración 14 se superponen ambos espectros de absorción.

Para la epicatequina, se presentan las vibraciones de estiramiento de los grupos hidroxilos a 3450 cm^{-1} , el grupo -C=CH en 2931 cm^{-1} , las bandas en 1620 y 1520 cm^{-1} correspondientes a los grupos aromáticos, estiramientos olefínicos en 1438 cm^{-1} y el grupo éter en 1138, 1091 y 1014 cm^{-1} .

En contraste, las intensidades de las bandas de absorción entre 1.600 y 1.000 cm^{-1} de la poli(epicatequina) tendieron a debilitarse. De acuerdo a la explicación de Sun y colegas [125], este comportamiento se debe a que los polímeros tienen grupos más rígidos en comparación con los monómeros.

La banda ancha antes mencionada, característica de los polímeros, se observa en el rango de 3600-2500 cm^{-1} , confirmando los grupos funcionales hidroxilo de los compuestos fenólicos. La segunda banda notable es la que va de 1450 a 1353 cm^{-1} , correspondiente a vibraciones de estiramiento de grupos arilo. Asimismo, se anticipaban los picos de C-CO-C, en este caso presente en 1138 y 1056 cm^{-1} ; el cual se visualiza en el espectro del monómero, como una banda más pronunciada en 1138 cm^{-1} . Al obtener los picos que la literatura menciona como representativos de los polímeros a base de flavonoides, se podría confirmar que se logró una polimerización exitosa a poli(epicatequina).

11.3.1 Grado de conversión de epicatequina a poli(epicatequina)

El grado de conversión promedio de (-)-epicatequina a poli(epicatequina) fue del 79.75%, pudiendo indicar una buena eficiencia de la polimerización enzimática. Se ha llegado a obtener un 90% de conversión para el caso de poli(catequina) [120].

Al final de la reacción polimérica, la disolución adquirió un color marrón oscuro, que se le atribuye a la generación de estructuras conjugadas derivadas de la polimerización por oxidación, y el cuál ya se ha reportado como indicador de una reacción enzimática adecuada[125].

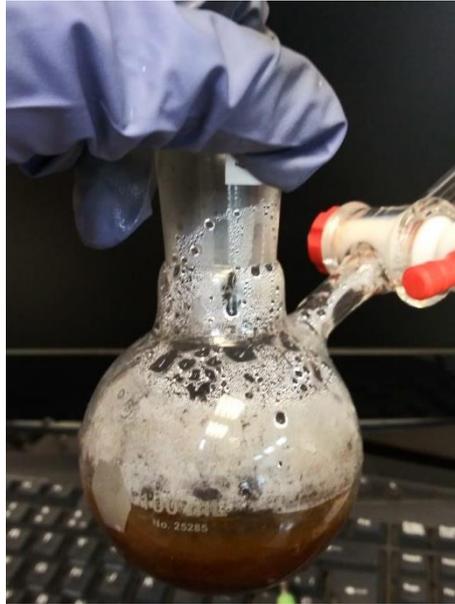


Ilustración 15 Resultado final de la reacción enzimática.

11.4 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV-Vis)

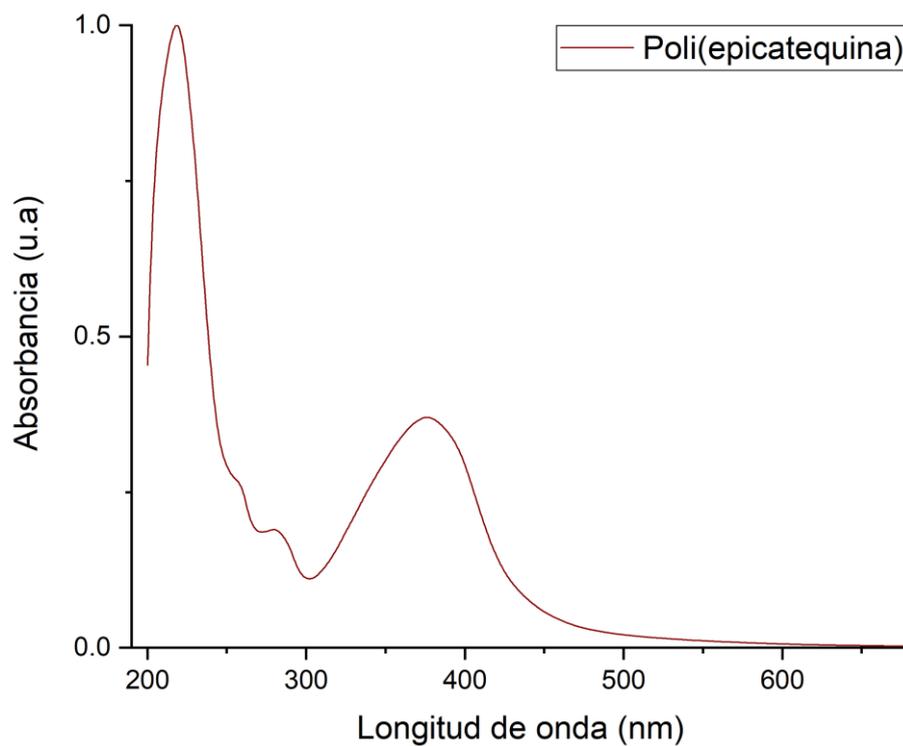


Ilustración 16 Espectro UV-visible de la poli(epicatequina).

De acuerdo con la literatura, el monómero de epicatequina exhibe una banda de absorción en 250-300 nm. La formación de una banda en 300-550 nm en el espectro de la epicatequina oxidada por lacasa, podría confirmar que se obtuvo su forma polimérica. Se ha documentado este pico amplio en reacciones de polimerización enzimática de epicatequina catalizadas por peroxidasa de rábano [126], [127]. Asimismo, este rango de

absorción ha surgido en poli(catequina) obtenida en una reacción polimérica mediada por lacasa [119], a través de oligomerización asistida por luz azul[17], y en poli(naringenina) sintetizada por reacción de reticulación[124].

Malgorzata Latos-Brozio et al [120] señalan que este pico es característico de la forma polimérica de los flavonoides; Ferdinando Francesco Bruno et al [127] indican que este es debido a que los componentes de la poli(epicatequina) tienen estructuras conjugadas, mientras que Malgorzata Latos-Brozio y Anna Masek interpretan el rango de 370-470 como indicador de catequina oligomérica [17], [124].

11.4.1 Método 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) ABTS

La forma polimérica de la epicatequina exhibió una actividad antioxidante 9.46% mayor a la del monómero (83.08%; TEAC 551 mmolT/100g). El valor de la actividad antioxidante de la poli(epicatequina) es bastante similar con el obtenido por Malgorzata Latos-Brozio y colegas para la poli(catequina)[120], sin embargo la epicatequina presenta un porcentaje de inhibición de radicales libres ABTS en cantidades similares a la del polímero (73.62%; TEAC 476.45 mmolT/100g).

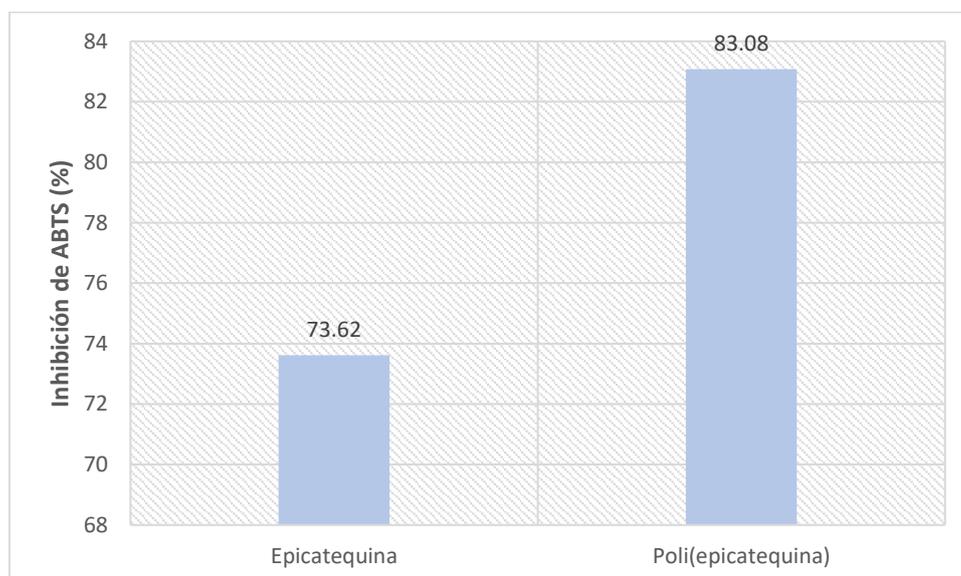


Ilustración 17 Actividad antioxidante de los flavonoides.

11.5 ANÁLISIS GRAVIMÉTRICO TÉRMICO (TGA)

El análisis de la pérdida de peso en función de la temperatura se realizó para epicatequina y poli(epicatequina).

El termograma TGA exhibe la pérdida de peso de epicatequina en dos intervalos entre los 200-320 °C, posterior a esto se degrada gradualmente; este comportamiento coincide con lo que se ha reportado en otras publicaciones [128]–[130].

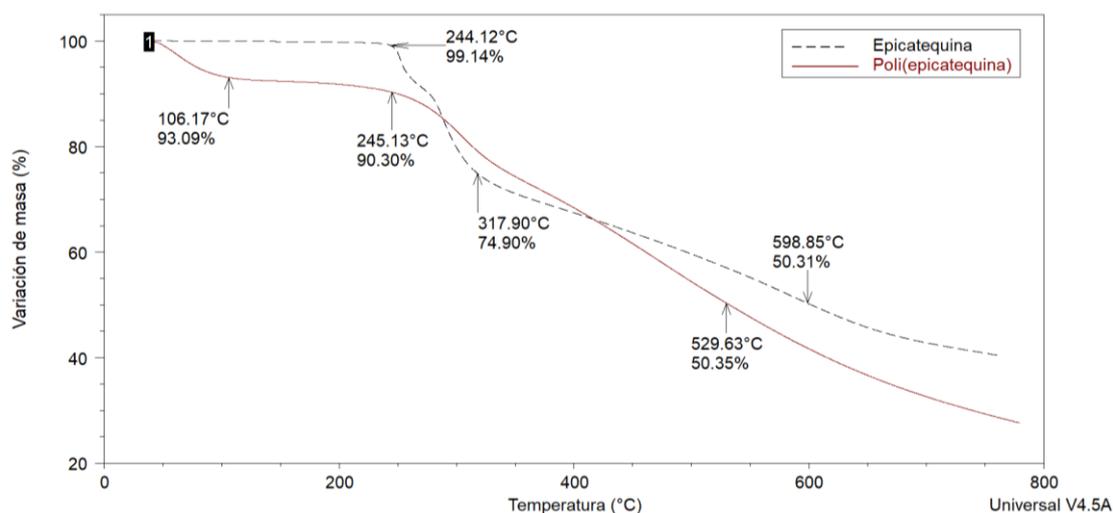


Ilustración 18 Curva TGA de la poli(epicatequina)

Para la poli(epicatequina), se observó una primera pérdida del 7% de masa a 106.17°C. A 245.13°C, se observa la segunda caída de masa con un valor del 9.7%, a partir de este momento, comienza la desintegración del polímero [98]. El polímero se desintegró a la mitad de su masa, a una temperatura de 529.63 °C.

La muestra de epicatequina, tiene un comportamiento térmico ligeramente mejor que la de su polímero; su desintegración comienza a los 317.90°C; la pérdida de la mitad de la masa se alcanza a los 598.85°C. De acuerdo con la literatura, la catequina y su forma polimérica alcanzan el 50% de degradación a los 613°C y 730°C, por lo que estos tienen menor estabilidad térmica que la que consiguieron a través de una reacción de enlace cruzado [120].

11.6 FIBRAS ELECTROHILADAS

11.6.1 Diseño de experimentos 1

Uno de los polímeros biodegradables más populares es la PCL, que posee la aprobación de la FDA para su uso en diversas aplicaciones biomédicas. Aunque la PCL tiene una baja tasa de degradación en solución acuosa y respuestas limitadas de adhesión y proliferación celular, también proporciona una alta rigidez a los andamios que genera [134], [135]. Por lo tanto, se propuso PCL y poli(epicatequina) con la proyección de manufacturar fibras con cualidades mecánicas y físicas mejoradas junto con una biocompatibilidad aceptable al incorporar ambos polímeros.

Los parámetros y solventes utilizados se escogieron con base en el estudio de Miranda Buendia (2022) et al.; en este, se prueba por primera vez el electrohilado exitoso de andamios de epicatequina/PCL en TFE [128]; en diversas publicaciones se ha utilizado TFE y la mezcla de DCM/DMF como solventes satisfactorios de PCL [136]–[140].

Las variables elegidas para ver su impacto en la formación de las fibras fueron: el flujo de alimentación, la diferencia de potencial, la distancia desde el inyector al colector, el diámetro de la aguja, la proporción de polímeros y solventes; al ser los parámetros que

influyen en la morfología, alineación y la aparición de defectos en las fibras electrohiladas.

La microscopía óptica se implementó como método de evaluación rápida para visualizar si las fibras obtenidas tenían las características adecuadas, así como para observar el efecto de los parámetros de electrohilado en la calidad de las fibras en formación.

Se ponderó la calidad de las fibras, con el siguiente criterio:

Tabla 6 Criterios de evaluación de calidad de las fibras.

Perlas		Salpicaduras			Calidad de fibras
Presencia de perlas	Sin perlas	Presencia excesiva	Presencia moderada	Sin salpicaduras	
✓	x	✓	✓	x	Rango 0-3

En donde se incrementa en 1 punto el valor de calidad de las fibras si:

- Tiene fibras mayormente ordenadas y alineadas.
- Las fibras se encuentran conectadas y sin grietas o rupturas entre ellas.
- Los parámetros son propicios para generar abundante cantidad de fibras.

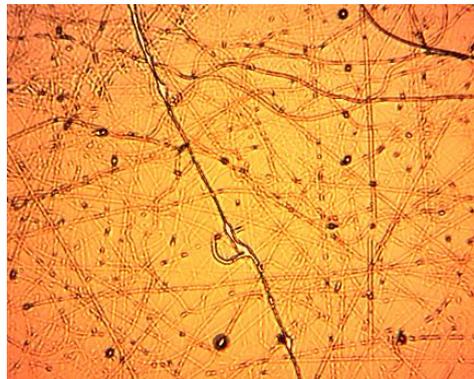


Ilustración 19 Muestra 1.

Por ejemplo, en la muestra 1:

- Se presentan fibras enredadas y otras onduladas (por lo que se asignó puntaje 0).
 - Hay fibras que se visualizan rotas (0 puntos sumados).
 - Se generan numerosas fibras (se añade un punto).
- Lo que genera una suma total de 1 en calidad de fibras.

Tabla 7 Evaluación de las fibras: primer DoE.

No. Experimento	Perlas	Salpicaduras	Calidad de fibras
1	✓	✓	1
2	✓	✓	0

3	x	x	3
4	✓	✓	3
5	✓	✓	2
6	✓	✓	1
7	✓	✓	0
8	✓	✓	1
9	✓	✓	2
10	✓	✓	3
11	✓	✓	3
12	✓	✓	0
13	✓	✓	0
14	✓	✓	2
15	✓	✓	0
16	✓	✓	3
17	✓	✓	0
18	✓	✓	1
19	✓	✓	1
20	✓	✓	1
21	✓	✓	2
22	✓	✓	1
23	✓	✓	0
24	✓	✓	2

Las imágenes de las fibras vistas al microscopio óptico se muestran en las ilustraciones 20 y 21. En la Ilustración 20, las primeras dos columnas de imágenes corresponden a fibras elaboradas con disoluciones al 7.5% en porcentaje masa-volumen entre polímeros y solventes. Las dos columnas restantes muestran los resultados al hilar con disoluciones el 9.33% (m/v). La fila superior de imágenes corresponde a muestras hiladas a 15 kV, mientras que la fila inferior corresponde a las fibras hiladas a 25 kV. En la Ilustración 21, se visualizan las mismas micrografías, pero posicionando en las columnas las muestras hiladas a velocidades de flujo de 0.4 y 0.6 mL/h; en la fila superior se posicionaron las muestras electrohiladas en un colector a 15 cm de la aguja, y en fila inferior las fabricadas a 25 cm de la aguja.

Se enmarcó en color verde las imágenes que mostraron mejores características, en rojo las fibras no adecuadas y en amarillo las de calidad media de acuerdo con la tabla 6. La numeración en el ángulo inferior derecho de las imágenes es el número de experimento;

se enmarcó en azul los números de muestra hilados con aguja 22 G y en rosado los hilados con aguja 30 G.

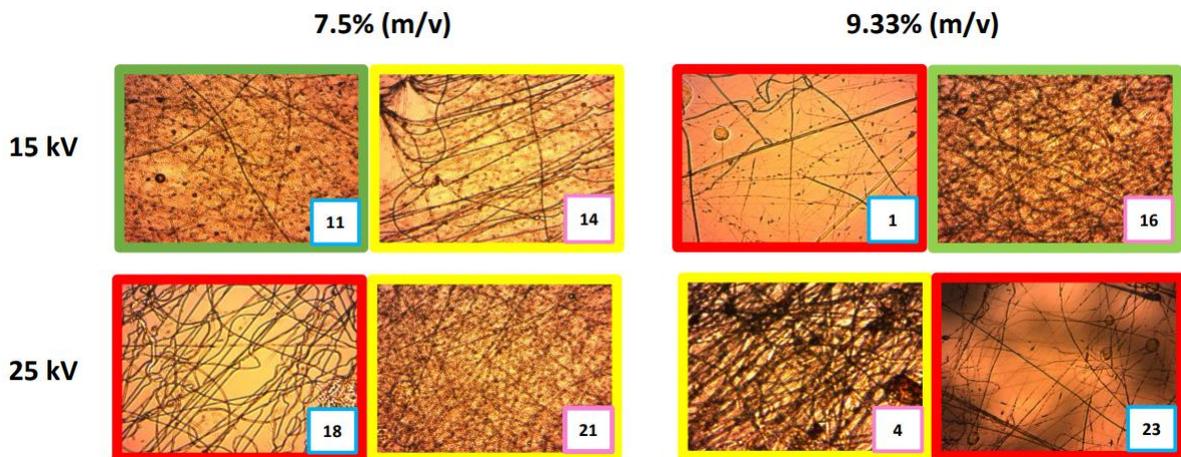


Ilustración 20 Diferencia de potencial vs proporción masa volumen de polímero respecto a los solventes.

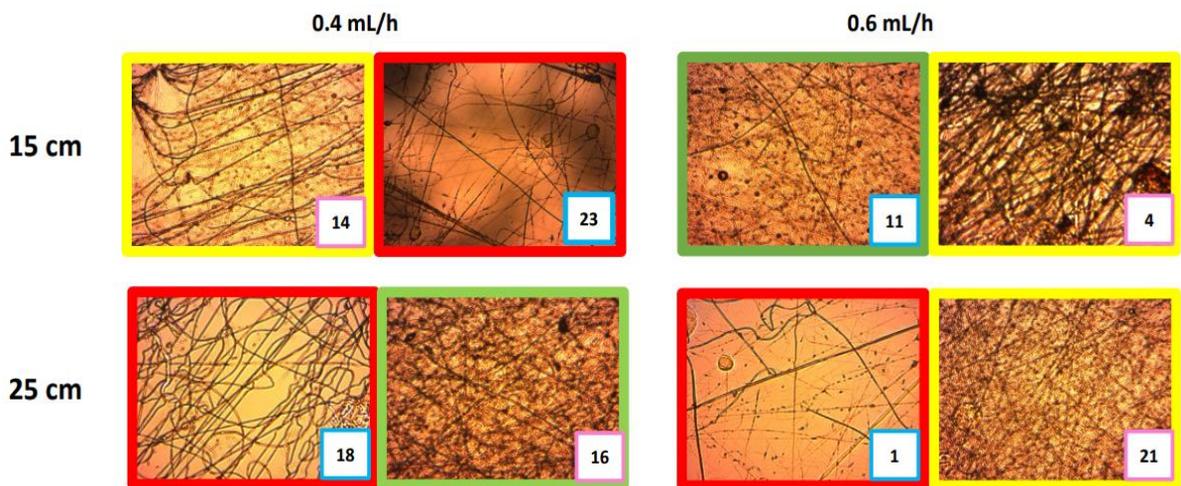


Ilustración 21 Distancia aguja-colector vs tasa de flujo.

Previo al proceso de electrohilado, se probó la solubilidad de PCL y de poli(epicatequina) en TFE y DCM/DMF, los cuales logran formar disoluciones homogéneas por separado. Sin embargo, cuando se mezclan, al poner en marcha esta técnica de formación de fibras la cual dura 100-150 minutos o más, dependiendo la tasa de flujo, obstrucciones de la aguja u otros inconvenientes, la solución se tornó opaca y gradualmente se precipitó la poli(epicatequina). Este inconveniente fue observado al electrohilar PCL/gelatina con TFE por Feng y colaboradores [141], quienes confirmaron una separación de fases mediante análisis de dispersión dinámica de luz y atribuyen esto a que el comportamiento individual de un polímero se ve afectado al interactuar con el otro; al agregar ácido acético a la solución, lograron una solución óptima con conductividad eléctrica y viscosidad ideales para electrohilar.

Como resultado, en la mayoría de los experimentos se obtuvieron fibras aperladas y con muchos defectos de salpicadura, lo cual coincide con lo documentado por Feng et al, sin

embargo, algunas condiciones permitieron la formación de fibras uniformes y sin defectos.

Las condiciones de 15 kV, 15 cm, aguja 22G, 7.5% (m/v), 0.6 mL/h resultaron las más adecuadas y consistentes, al haber cumplido el criterio de repetibilidad en dos corridas de las tres realizadas; en ambas muestras se presentan abundantes fibras colectadas y semi alineadas; sin embargo, en zonas más densas aparecen cuentas en una de las corridas (experimentos 3 y 11) (Ilustración 22).

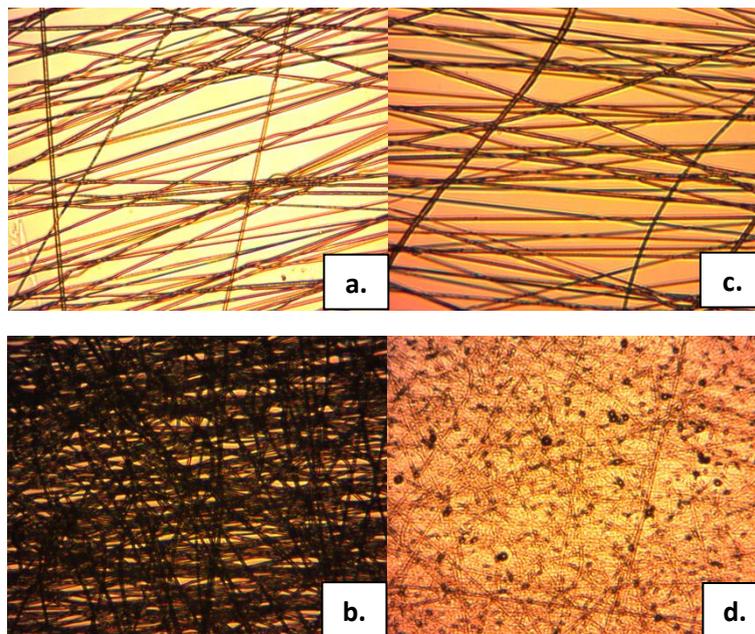
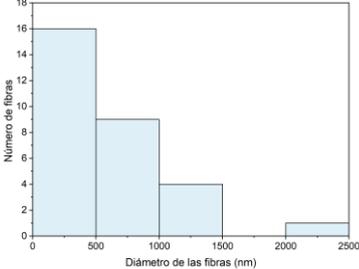
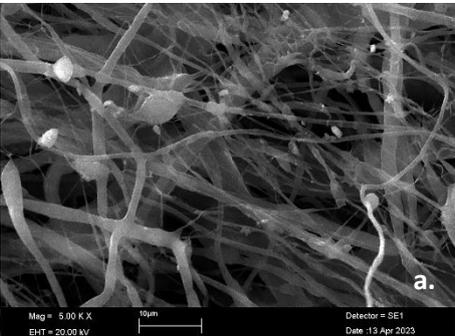
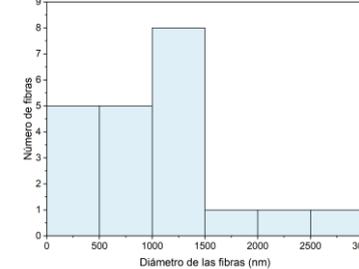
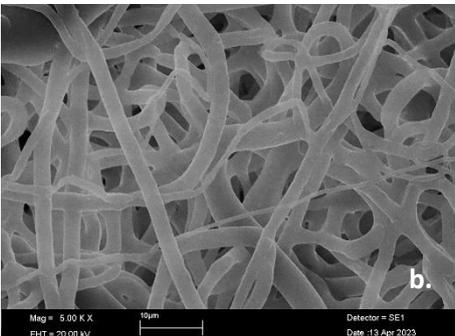
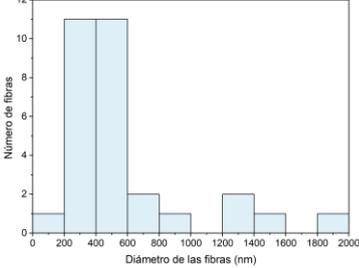
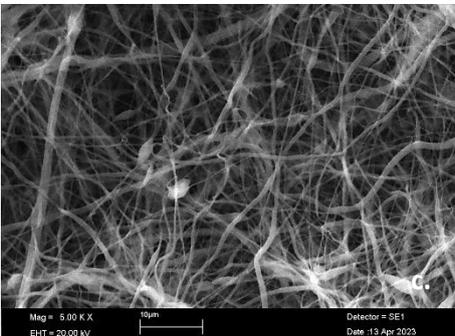
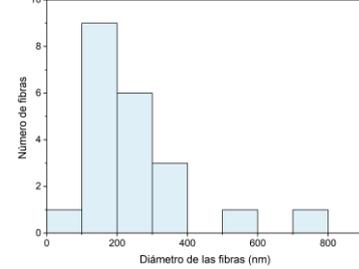
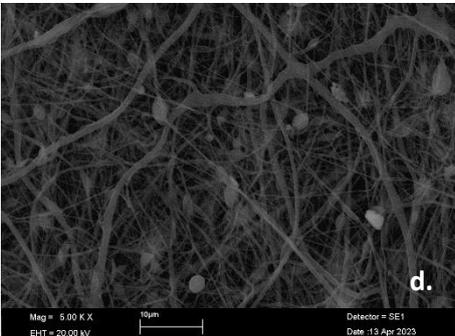


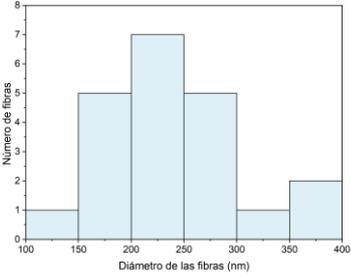
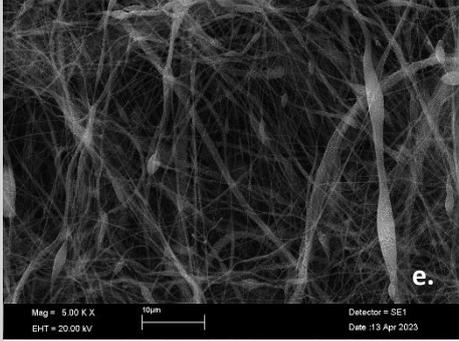
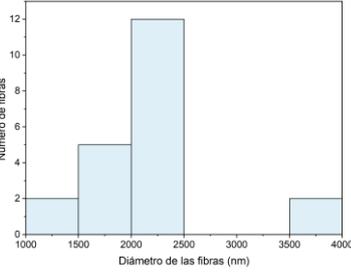
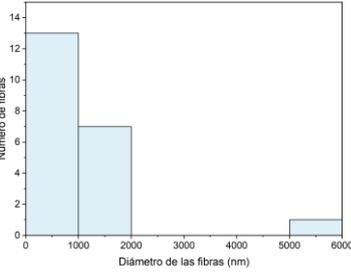
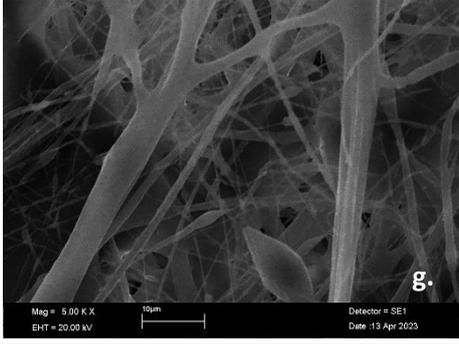
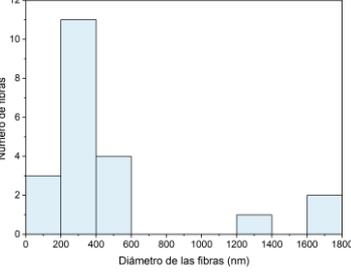
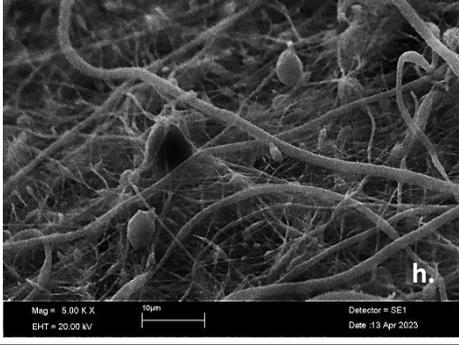
Ilustración 22 Micrografías de experimentos a) Muestra No. 3, donde se visualizan fibras más ordenadas y alineadas. b) Muestra No.3 en diferente zona, donde se conserva la forma alargada y alineada de fibras. c) Muestra No. 11, fibras ordenadas y alineadas. d) Muestra No. 11 en zona de abundantes fibras pero con numerosas cuentas.

Los factores de diferencial de potencial y distancia entre aguja y colector adecuados coinciden con los publicados por Castillo-Ortega [130], quien electrohiló fibras de epicatequina/PVP; de igual manera concuerda el diferencial de potencial manejado por Miranda-Buendía [128] al emplear epicatequina, PCL y TFE.

Las muestras de este primer DoE, fueron analizadas mediante SEM. Se seleccionó una muestra de las tres que se fabricaron para cada combinación de parámetros.

Tabla 8 SEM de las muestras seleccionadas.

Muestra	Parámetros	Diámetro promedio de las fibras (nm)	SEM (5000x)
1	15 kV, 25 cm, 0.6 mL/h, 22 G, 9.33% (m/v)	625.55 ± 460.10 	
4	25 kV, 15 cm, 0.6 mL/h, 30 G, 9.33% (m/v)	962.54 ± 607.16 	
11	15 kV, 15 cm, 0.6 mL/h, 22 G, 7.5% (m/v)	565.5 ± 402.35 	
14	15 kV, 15 cm, 0.4 mL/h, 30 G, 7.5% (m/v)	340.94 ± 247.24 	

16	15 kV, 25 cm, 0.4 mL/h, 30 G, 9.33% (m/v)	<p style="text-align: center;">260.91 ± 81.75</p> 	
18	25 kV, 25 cm, 0.4 mL/h, 22 G, 7.5% (m/v)	<p style="text-align: center;">1976.86 ± 673</p> 	
21	25 kV, 25 cm, 0.6 mL/h, 30 G, 7.5% (m/v)	<p style="text-align: center;">991.90 ± 1068.44</p> 	
23	25 kV, 15 cm, 0.4 mL/h, 22 G, 9.33% (m/v)	<p style="text-align: center;">482.27 ± 405</p> 	

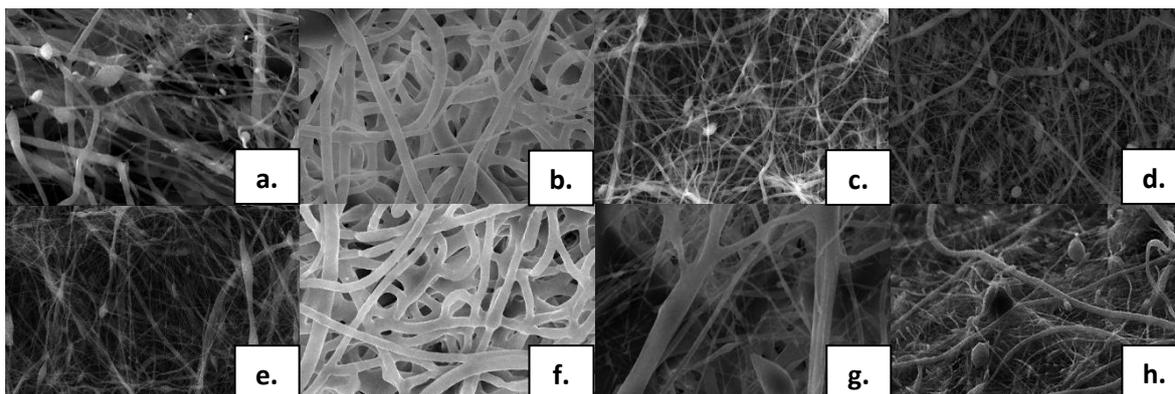


Ilustración 23 Muestras SEM de las fibras obtenidas para diferente combinación de parámetros generados por DoE.

Las fibras con menor diámetro fueron obtenidas a 15 kV, 25 cm, 0.4 mL/h, con una aguja 30 G y una relación del 9.33% (m/v) (Ilustración 23 e.); su histograma muestra una distribución simétrica y presentan mayor homogeneidad en cuanto al tamaño de la fibra, al ser las condiciones que generaron menor desviación estándar.

Las condiciones de 15 kV, 15 cm, 0.6 mL/h, aguja 22 G y 7.5% (m/v) fueron las que parecían fabricar las mejores fibras en el estudio con microscopía óptica; al observarlas mediante SEM, se observan menos defectos de fibras y diámetros pequeños, en relación con las otras muestras (Ilustración 23 c.).

Se ha reportado mayormente que diferenciales de potencial altos aumentan la fuerza de repulsión electrostática sobre la solución polimérica, facilitando el estiramiento de la fibra y conduciendo a diámetros más estrechos [142]. Sin embargo, algunos estudios han descrito el efecto contrario, argumentando que el aumento de la diferencia de potencial puede causar una disminución en el tiempo de viaje entre la boquilla y el colector, lo que reduce el efecto “latigazo”. Durante el proceso de latigazo, las fuerzas de carga internas y externas provocan el movimiento de oscilación del chorro de líquido en dirección al colector. Este movimiento permite que las cadenas poliméricas de la solución se estiren y se deslicen una sobre otra, lo que da lugar a la creación de fibras con diámetros pequeños [43]. En este caso, la diferencia de potencial más baja parece ser la óptima para generar nanofibrillas.

Las tres muestras con fibras más delgadas fueron generadas con la tasa de flujo de 0.4 mL/h (Ilustración 23 d., e., h.). Esta es una variable clave, ya que, si el caudal es insuficiente, la forma del cono de Taylor no se mantiene y no resiste la fuerza de Coulomb para producir un chorro estable. Por otro lado, a altas velocidades de flujo, se expulsa una mayor cantidad de solución, con un periodo de tiempo muy corto para evaporar el disolvente y estirar el chorro, aumentando el diámetro medio de las fibras; esto se puede corroborar en las muestras 4 y 21, hiladas a 0.6 mL/h (Ilustración 23 b., g.). Se prefieren tasas de flujo bajas que permitan la evaporación del disolvente y la diferenciación del chorro en fibras [143]–[145].

11.6.2 Diseño de experimentos 2

Al realizar un segundo diseño de experimentos, el diferencial de potencial y la distancia aguja-colector se operaron como variables constantes. Al sólo utilizar DCM/DMF como solventes, se indagaron las condiciones óptimas para electrohilarlos con PCL y se encontró que el porcentaje de polímero y la tasa de flujo son los que parecen tener mayor influencia en las características de las fibras [138], [140]. Asimismo, varios estudios convergen en velocidades de flujo más bajas en el rango de los 0.1-0.2 mL/h, proporciones de PCL arriba del 10%, y diferencia de potencial de 15 kV o menores [138]–[141], [146]; por lo que se utilizó una mayor proporción de PCL y tasas de flujo más lentas en la segunda fase de pruebas.

En el segundo DoE, la mayoría de las fibras obtenidas resultaron sin perlas y con pocas salpicaduras; algunas muestras presentan salpicaduras por errores operativos por el continuo detenimiento de la bomba.

Tabla 9 Evaluación de las fibras: segundo DoE.

No. Experimento	Perlas	Salpicaduras	Calidad
1	x	x	3
2	x	✓	2
3	x	✓	1
4	x	✓	2
5	x	✓	0
6	x	x	2
7	✓	✓	2
8	x	✓	2
9	✓	✓	1

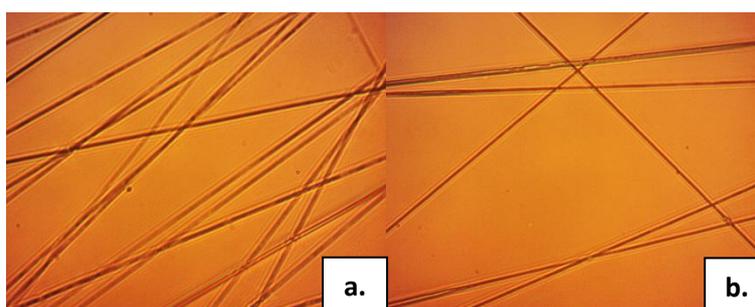


Ilustración 24 Micrografías de experimentos a. No. 4 b. No. 6.

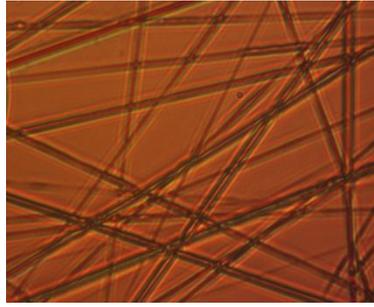


Ilustración 25 Micrografía experimento No. 1.

Las muestras con mayor dosis de poli(epicatequina) exhibieron fibras alineadas y sin perlas (13.8% (m/v), 0.2 y 0.3 mL/h) (Ilustración 24), sin embargo, se depositó un menor volumen de estas; por un lado, al ser las soluciones con mayor porcentaje de polímeros y a las posibles interacciones de enlaces de hidrógeno entre PCL y poli(epicatequina), la viscosidad es mayor y resultó en fibras bien formadas. En contraste, se ha reportado que al incrementar el contenido de catequina, se depositan menos fibras en el colector [147], [148]. Shao et al [149]. encontraron que, al agregar catequinas la conductividad eléctrica de la solución disminuye, debido a la propiedad que tienen los compuestos antioxidantes de formar enlaces con iones metálicos. Esto se podría traducir en insuficiente tensión superficial en la gota de polímero para formar el cono de Taylor y, a su vez, producir pocas o ninguna fibra. Las condiciones del experimento 1 (Ilustración 25) se encuentran entre las de mejor desempeño, al generar fibras lisas, sin perlas y sin defectos de salpicaduras (10.8% (m/v), 0.4 mL/h), esto podría deberse a que el porcentaje de PCL fue mayor y, por lo tanto, la viscosidad incrementó. Debido a que en todos los experimentos de ambos DoE se utilizó un colector plano, las fibras no se encuentran orientadas de manera paralela, esto se podría mejorar al utilizar un colector rotatorio [150]–[152].

12 CONCLUSIONES

Se obtuvo poli(epicatequina) por reacción enzimática con lacasa y con epicatequina como monómero y se confirmó la síntesis, al realizar espectroscopía UV-Vis se muestra un pico amplio en 300–550 nm en el espectro. Adición a esta caracterización para confirmar la síntesis de la poli (epicatequina) se realizó un estudio con ATR-FTIR y en el espectro se observó una banda ancha en el rango de 3600–2500 cm^{-1} correspondiente a los grupos funcionales hidroxilo, una segunda banda en 1450 a 1353 cm^{-1} , correspondiente a vibraciones de estiramiento de grupos arilos, y entre 1138 y 1056 cm^{-1} se visualizan los picos de C-CO-C. Se ha reportado que los picos anteriormente mencionados son representativos de la forma polimérica de los flavonoides. Además, las intensidades de las bandas de absorción ATR-FTIR entre 1.600 y 1.000 cm^{-1} de la poli(epicatequina) tendieron a debilitarse, posiblemente por la rigidez de los grupos funcionales del polímero. Estas diferencias respecto al espectro de la epicatequina, las cuales se mencionan en la literatura, son indicios de la obtención de poli(epicatequina).

El grado de conversión de epicatequina a poli(epicatequina) fue de 79.75%.

El comportamiento antioxidante de la poli(epicatequina) fue satisfactorio: mostró un 83.08% de inhibición de radicales de ABTS, 9.46% mayor al de la epicatequina. Sin embargo, sus propiedades térmicas no mejoraron; al someterlo a altas temperaturas con calorimetría TGA, alcanzó una pérdida de la mitad de su masa a los 529.63°C, mientras que la epicatequina logró la mitad de su desintegración a los 598.85°C.

Se logró electrohilar fibras de poli(epicatequina) con PCL, utilizando TFE, DCM y DMF como solventes; las mejores condiciones fueron una relación entre polímeros y solventes del 7.5%, una diferencia de potencial de 15 kV, 15 cm de distancia entre la aguja y el colector, una tasa de flujo de 0.6 mL/h y una aguja 22 G. Mediante SEM, se verificó la presencia de cuentas, pero en pequeñas cantidades en comparación con las otras muestras. Las fibras con diámetro más pequeño y mayor homogeneidad fueron obtenidas a 15 kV, 25 cm, 0.4 mL/h, con una aguja 30 G y 9.33% (m/v). Al haber obtenido defectos de superficie en la mayoría de las fibras, se realizó un segundo diseño de experimentos, en el que las fibras más lisas, sin cuentas o salpicaduras se lograron al 10.8% (m/v) y 0.2 mL/h; en esta segunda fase de experimentos se mantuvieron constantes los 15 kV, 15 cm y aguja 30 G.

13 ANEXOS

13.1 ANEXO 1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LACASA

A través de espectroscopía UV-Vis se midió absorbancia a través del tiempo de la oxidación de ABTS mediado con lacasa, permitiendo calcular la diferencia de absorbancias [Δ_A] que hubo en el tiempo inicial [A_0] y el tiempo final [A_f] del experimento, el cual duró 10 minutos.

Tabla 10 Parámetros utilizados para medición de actividad enzimática de la lacasa.

	0.194318 [mM]	0.388636 [mM]	0.97159 [mM]	1.3602 [mM]	1.55454 [mM]	1.94318 [mM]
A_0	0.1016	0.17235	0.2611	0.3930	0.40255	2.0788
A_f	1.32075	1.8225	2.4812	3.1048	3.15875	4.92995
Δ_A	1.21915	1.6501	2.2201	2.7118	2.7562	2.85115
ϵ [$M^{-1} cm^{-1}$]	36000	36000	36000	36000	36000	36000
b [cm]	1	1	1	1	1	1
t [min]	10	10	10	10	10	10
A	0.121915	0.16501	0.22201	0.27118	0.27562	0.285115
c [M/min]	3.3865E-06	4.58361E-06	6.167E-06	7.533E-06	7.656E-06	7.92E-06

Donde:

$$\Delta_A = A_f - A_0 \quad (11)$$

$$A = \frac{\Delta_A}{t} \quad (12)$$

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot b} \quad (13)$$

La expresión para obtener la concentración molar por minuto de las disoluciones deriva de la ley de Lambert Beer:

$$A = \epsilon bc \quad (14)$$

Donde:

A = Cambio de absorbancia por minuto

ϵ = Coeficiente de extinción molar (constante, 3600 L mol⁻¹ cm⁻¹ para ABTS)

b = Longitud de la cubeta por donde pasa el haz luminoso [1 cm]

c = Concentración de las soluciones [M/min]

Los cambios de concentraciones de las soluciones de ABTS se graficaron contra las velocidades de reacción, para obtener el diagrama de Michaelis-Menten.

Tabla 11 Concentraciones ABTS y velocidades de reacción.

S [mM]	V ₀ [M/min]
0.194318	3.3865E ⁻⁰⁶
0.388636	4.5836E ⁻⁰⁶
0.97159	6.1669E ⁻⁰⁶
1.3602	7.5328E ⁻⁰⁶
1.55454	7.6561E ⁻⁰⁶
1.94318	7.9199E ⁻⁰⁶

13.2 ANEXO 2. DIAGRAMA LINEAWEAVER-BURK

El diagrama Lineaweaver-Burk se obtiene de los recíprocos del cambio de concentración de sustrato y del cambio de concentración por minuto.

Tabla 12 Recíprocos del cambio de concentración de sustrato y del cambio de concentración por minuto.

1/[S]	1/V ₀
5.146203646	295287.7
2.573101823	218168.596
1.029240729	162154.858
0.735186002	132753.153
0.643277111	130614.614
0.514620365	126264.841

Una vez calculada la ecuación de la recta obtenida de la cinética enzimática:

$$y = 36657x + 112526 \quad (15)$$

La ecuación:

$$\frac{1}{v_1} = \left\{ \left[\frac{K_M}{V_{max}} \right] \left[\frac{1}{S} \right] \right\} + \frac{1}{V_{max}} \quad (16)$$

Se puede visualizar como la ecuación de una recta:

$$y = mx + b \quad (17)$$

Por lo que:

$$b = \frac{1}{V_{max}} \quad (18)$$

Se puede determinar V_{max} reordenando la expresión anterior:

$$V_{max} = \frac{1}{b} \quad (19)$$

$$V_{max} = \frac{1}{112526} \quad (20)$$

$$V_{max} = 8.8868E^{-06} \left[\frac{M}{min} \right] = 8.8868E^{-06} \left[\frac{mol}{L \cdot min} \right]$$

Este valor se interpreta como el número de moles de producto que se producirían cada minuto si la celda con la disolución de lacasa, ABTS, buffer acetato de sodio y agua destilada donde se llevó a cabo la reacción enzimática, tuviera un volumen de 1 L.

En el experimento llevado a práctica, la celda contenía 2600 μ L totales de disolución, compuesta de 300 μ L de lacasa, ABTS, buffer acetato de sodio y agua destilada.

Por lo tanto, para este volumen, la velocidad máxima se calcula:

$$8.8868E^{-06} \left[\frac{mol}{L \cdot min} \right] \cdot [0.0026 L] = 2.31E^{-08} \left[\frac{mol}{L \cdot min} \right] \quad (21)$$

La síntesis de poli(epicatequina) requería de 2U/ml de disolución total de acetona con buffer acetato de sodio.

La actividad enzimática se provee en Unidades Internacionales o en Unidades [U] [153], donde:

$$1U = 1 \frac{\mu M}{min} \quad (22)$$

Por lo que para determinar las 2U/ml necesarios para fabricar el polímero, se estandarizaron los $2.31E^{-08} \left[\frac{mol}{L \cdot min} \right]$ a Unidades Internacionales simplemente realizando una conversión de unidades y se calculó la actividad enzimática para 1 [L] de disolución de lacasa.

Sabiendo que 300 μ L de disolución de lacasa producen $2.31E^{-08} \left[\frac{mol}{L \cdot min} \right]$, el cálculo para 1 [L] se realiza:

$$2.31E^{-08} \left[\frac{mol}{L \cdot min} \right] \cdot \left[\frac{1 L}{300 E^{-06} L} \right] = 7.7019 E^{-05} \left[\frac{mol}{L \cdot min} \right] \quad (23)$$

La conversión de unidades se determinó de la siguiente manera:

$$7.7019 E^{-05} \left[\frac{mol}{L \cdot min} \right] = 77.01 \left[\frac{\mu mol}{L \cdot min} \right] = 77.01 [U] \text{ por litro de de enzima} \quad (24)$$

Una vez obtenida la actividad enzimática de la lacasa, se puede calcular cuántos mg de lacasa se necesitan en función de la cantidad de poli(epicatequina) que se quiera fabricar y, por lo tanto, del número de mililitros de solventes que se requieren para sintetizarla.

En este caso, se calculaba la lacasa necesaria, partiendo de que 1 [L] de lacasa posee una actividad enzimática de 77 [U]; para este procedimiento se requiere 2 [U] por mililitro; y la concentración de proteína que se obtuvo, fue 0.0488 mg de proteína por cada mililitro de disolución de enzima.

13.3 ANEXO 3. GRADO DE CONVERSIÓN

Como valor de referencia interna, se utilizó la banda del grupo aromático C=C, presente en todos los flavonoides; en este caso, tanto en la epicatequina, como en la poli(epicatequina).

Para calcular el grado de conversión, se tomaron dos de los picos característicos que resultan de polimerizar la epicatequina: el pico del grupo arilo y el del grupo éter [120].

$$DC (\%)_{Arilo} = \left(\frac{\frac{h_{1346} poli(epicatequina)}{h_{1612}}}{\frac{h_{1346} epicatequina}{h_{1612}}} - 1 \right) \times 100\% = \left(\frac{\frac{0.001}{0.0179}}{\frac{0.0020}{0.0107}} - 1 \right) \times 100\% \quad (25)$$

$$DC (\%)_{Arilo} = 71\%$$

$$DC (\%)_{Éter} = \left(\frac{\frac{h_{1138} poli(epicatequina)}{h_{1612}}}{\frac{h_{1138} epicatequina}{h_{1618}}} - 1 \right) \times 100\% = \left(\frac{\frac{0.0657}{0.4355}}{\frac{0.5593}{0.4265}} - 1 \right) \times 100\% \quad (26)$$

$$DC (\%)_{Éter} = 88.5\%$$

13.4 ANEXO 4. CURVA DE CALIBRACIÓN

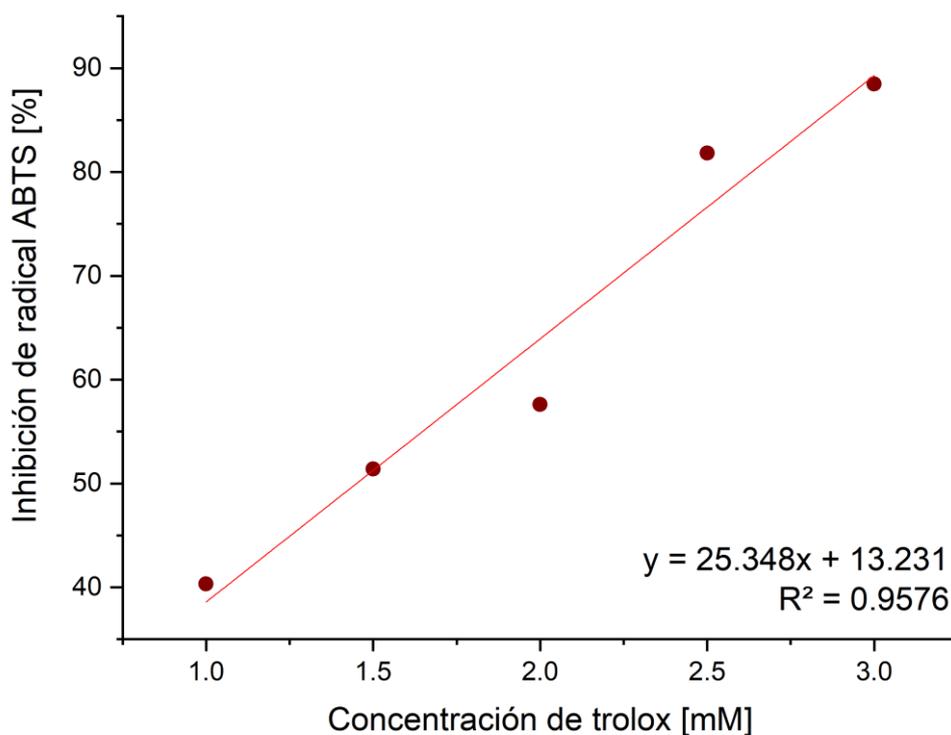


Ilustración 26 Curva de calibración.

13.5 ANEXO 5. CÁLCULO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Con base en la ecuación:

$$(\%) \text{ de Inhibición} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100 \quad (27)$$

Y utilizando las absorbancias de la celda control donde no se tenía flavonoide como A_0 , y tomando como A_1 el promedio de 2 medidas de absorbancia a los 6 minutos de reacción de epicatequina o poli(epicatequina) con el radical ABTS, se sustituyó:

$$(\%) \text{ de Inhibición}_{\text{poli(epicatequina)}} = \left(\frac{0.677 - 0.1145}{0.677} \right) \times 100 \quad (28)$$

$$(\%) \text{ de Inhibición}_{\text{poli(epicatequina)}} = 83.08\%$$

$$(\%) \text{ de Inhibición}_{\text{epicatequina}} = \left(\frac{0.677 - 0.18}{0.677} \right) \times 100 \quad (29)$$

$$(\%) \text{ de Inhibición}_{\text{epicatequina}} = 73.62\%$$

De la ecuación de la recta de Trolox se despeja x y se sustituye el valor del porcentaje de inhibición obtenido y se resuelve la ecuación.

$$y = 25.348x + 13.231 \quad (30)$$

$$x = \frac{y - 13.231}{25.348} \quad (31)$$

Para la poli(epicatequina):

$$x = \frac{83.08 - 13.231}{25.348} \quad (32)$$

$$x = 2.755 [mM] = 2,755 [\mu M]$$

Se despeja C_2 de la siguiente ecuación y se introducen los términos conocidos en la ecuación:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (33)$$

$$C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2} \quad (34)$$

Donde:

C_1 = Actividad antioxidante equivalente a Trolox en el volumen total de la celda

V_1 = Volumen total de la celda = 2 mL

V_2 = Volumen de la solución de poli(epicatequina) empleado en la celda = 0.5 mL

C_2 = Actividad antioxidante equivalente a Trolox en el volumen de solución de poli(epicatequina) empleado en la celda (0.5 mL)

$$C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2} \quad (35)$$

$$C_2 = \frac{(2,755 [\mu M])(2 [mL])}{(0.5 [mL])} \quad (36)$$

$$C_2 = 11,020 \mu M$$

$$C_2 = 1,102 \mu mol \text{ de trolox} / 100 \text{ mL de solución de poli(epicatequina)}$$

Para expresar el resultado por 100g de poli(epicatequina) se emplea la siguiente relación:

$$\frac{1,102\mu\text{mol de trolox}}{100\text{ mL de solución de poli(epicatequina)}} \times \frac{10\text{ mL de solución de poli(epicatequina)}}{0.02\text{ g de poli(epicatequina)}} \quad (37)$$

$$= 5,510\ \mu\text{mol equivalente a trolox/g de poli(epicatequina)}$$

$$= 551,000\ \mu\text{mol}/100\text{g} = 551\ \text{mmol}/100\text{g}$$

Para la epicatequina:

$$x = \frac{73.62 - 13.231}{25.348} \quad (38)$$

$$x = 2.3823\ [mM] = 2,382.30\ [\mu M]$$

$$C2 = \frac{(2,382.30[\mu M])(2\ [mL])}{(0.5\ [mL])} \quad (39)$$

$$C2 = 9,529.20\ \mu M$$

$$C2 = 952.92\ \mu\text{mol de trolox}/100\ \text{mL de solución de epicatequina}$$

Para expresar el resultado por 100g de epicatequina:

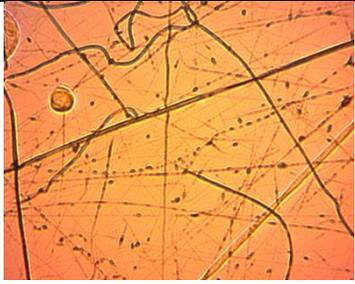
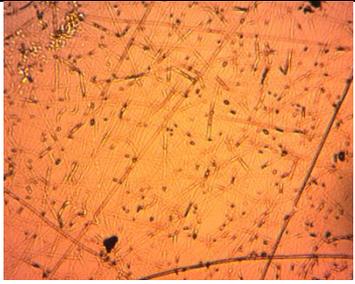
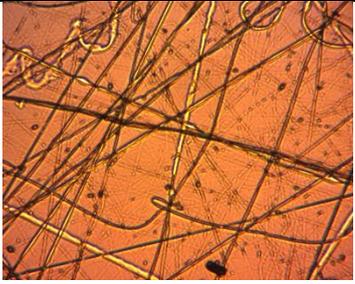
$$\frac{952.92\ \mu\text{mol de trolox}}{100\ \text{mL de solución de epicatequina}} \times \frac{10\ \text{mL de solución de epicatequina}}{0.02\ \text{g de epicatequina}} \quad (40)$$

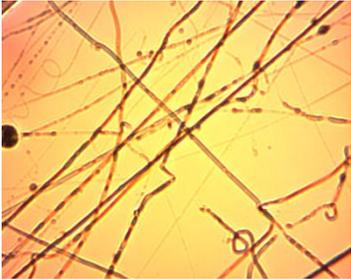
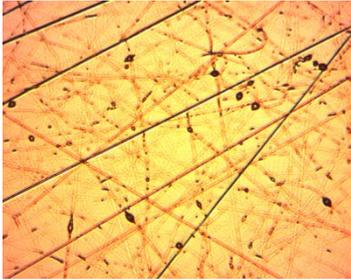
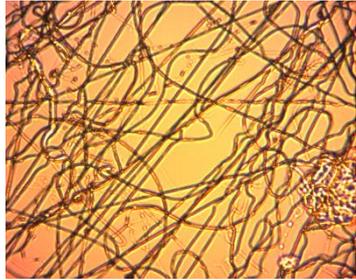
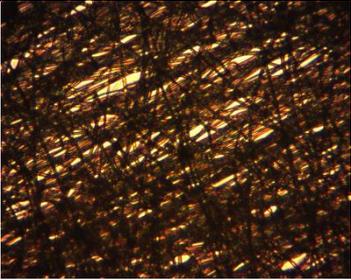
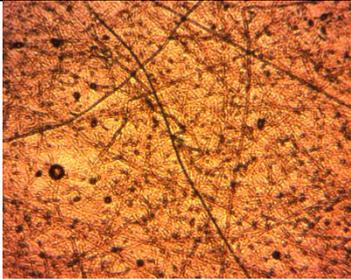
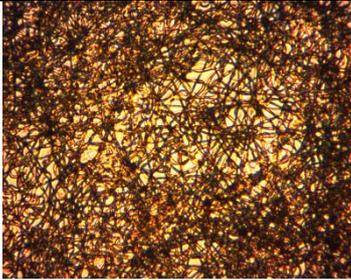
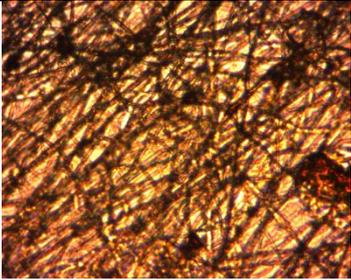
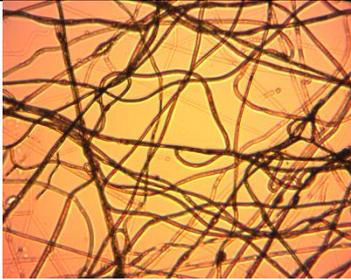
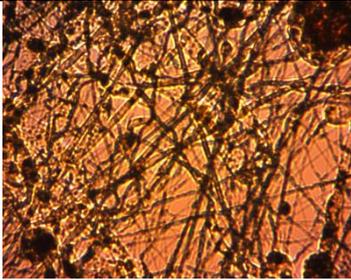
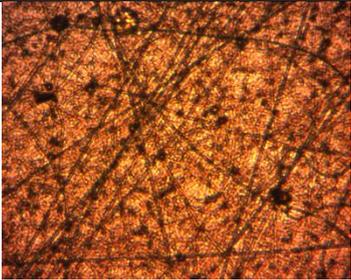
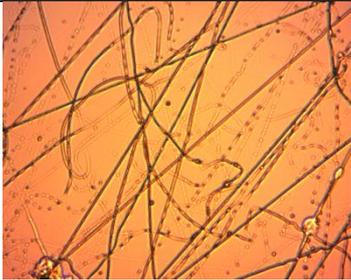
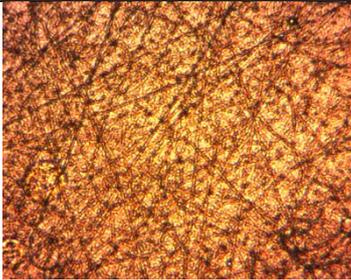
$$= 4,764.50\ \mu\text{mol equivalente a trolox/g de epicatequina}$$

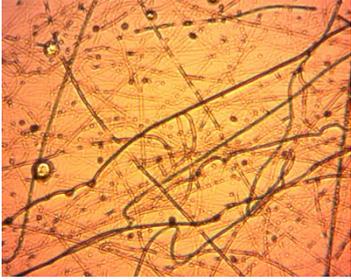
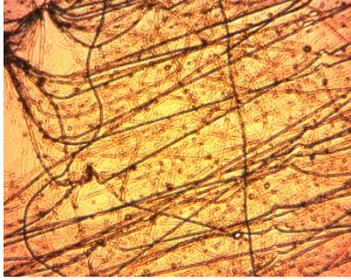
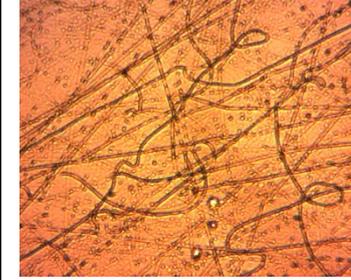
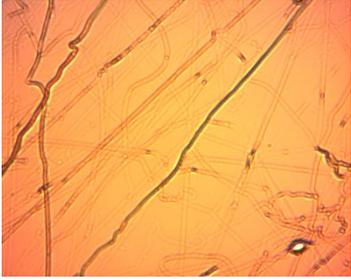
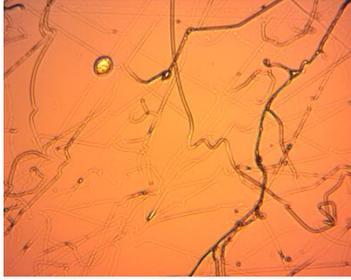
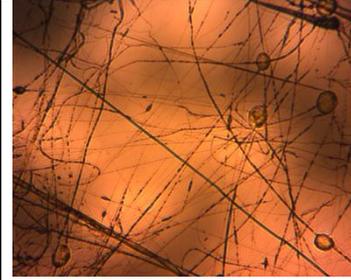
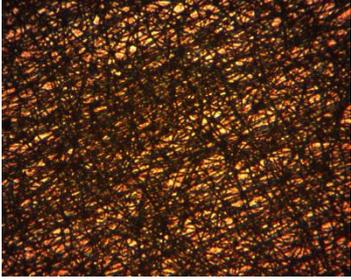
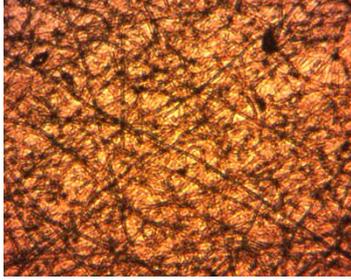
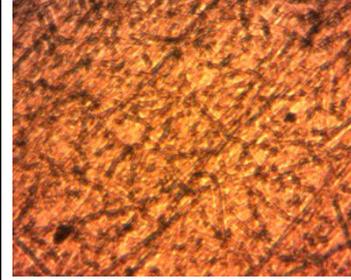
$$= 476,450\ \mu\text{mol}/100\text{g} = 476.45\ \text{mmol}/100\text{g}$$

13.6 ANEXO 6. FIBRAS ELECTROHILADAS: PRIMER DOE

Tabla 13 Micrografías del primer DoE.

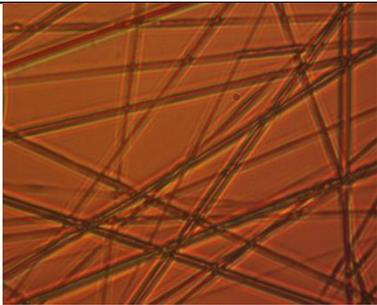
Corrida	1	9	17
Parámetros	15 kV, 25 cm, 0.6 mL/h, 22 G, 9.33% (m/v)		
			
Corrida	2	10	18
Parámetros	25 kV, 25 cm, 0.4 mL/h, 22 G, 7.5% (m/v)		

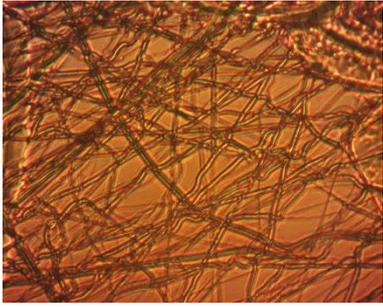
			
Corrida	3	11	19
Parámetros	15 kV, 15 cm, 0.6 mL/h, 22 G, 7.5% (m/v)		
			
Corrida	4	12	20
Parámetros	25 kV, 15 cm, 0.6 mL/h, 30 G, 9.33% (m/v)		
			
Corrida	5	13	21
Parámetros	25 kV, 25 cm, 0.6 mL/h, 30 G, 7.5% (m/v)		
			
Corrida	6	14	22
Parámetros	15 kV, 15 cm, 0.4 mL/h, 30 G, 7.5% (m/v)		

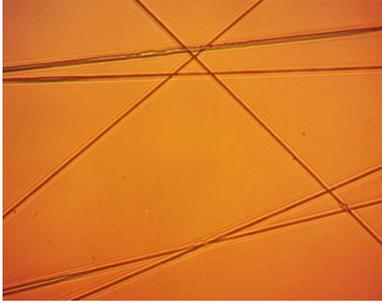
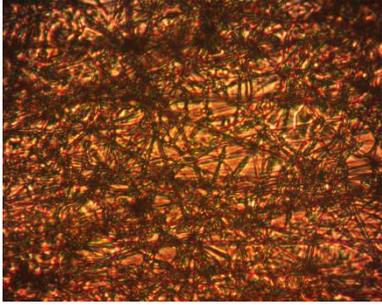
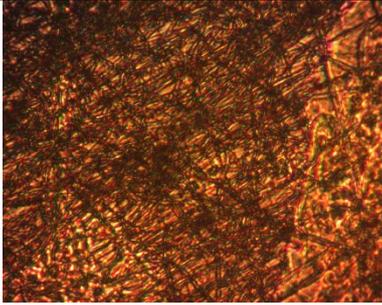
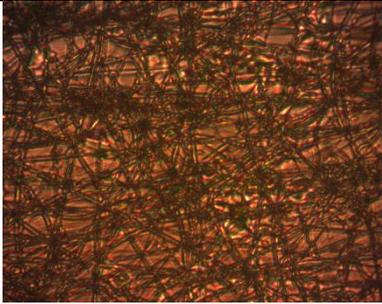
			
Corrida	7	15	23
Parámetros	25 kV, 15 cm, 0.4 mL/h, 22 G, 9.33% (m/v)		
			
Corrida	8	16	24
Parámetros	15 kV, 25 cm, 0.4 mL/h, 30 G, 9.33% (m/v)		
			

13.7 ANEXO 7. FIBRAS ELECTROHILADAS: SEGUNDO DOE

Tabla 14 Micrografías del segundo DoE

Corrida	1
Parámetros	10.8% (m/v), 0.2 mL/h
	
Corrida	2
Parámetros	9.33% (m/v), 0.2 mL/h

	
Corrida	3
Parámetros	13.8% (m/v), 0.2 mL/h
	
Corrida	4
Parámetros	10.8% (m/v), 0.3 mL/h
	
Corrida	5
Parámetros	9.33% (m/v), 0.3 mL/h
	
Corrida	6
Parámetros	13.8% (m/v), 0.3 mL/h

	
Corrida	7
Parámetros	10.8% (m/v), 0.4 mL/h
	
Corrida	8
Parámetros	9.33% (m/v), 0.4 mL/h
	
Corrida	9
Parámetros	13.8% (m/v), 0.4 mL/h
	

14 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] V. Grumezescu y A. Grumezescu, *Materials for Biomedical Engineering: Thermoset and Thermoplastic Polymers*. Elsevier, 2019.
- [2] P. C. Hiemenz y T. Lodge, *Polymer chemistry*, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- [3] U. W. Gedde y M. S. Hedenqvist, *Fundamental Polymer Science*. Springer Nature, 2019.
- [4] V. B. Damodaran, D. Bhatnagar, y N. S. Murthy, *Biomedical Polymers: Synthesis and Processing*. Springer, 2016.
- [5] I. R. Calori, G. Braga, P. da C. C. de Jesus, H. Bi, y A. C. Tedesco, «Polymer scaffolds as drug delivery systems», *Eur. Polym. J.*, vol. 129, p. 109621, abr. 2020, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109621.
- [6] J. Shay, H. A. Elbaz, I. Lee, S. P. Zielske, M. H. Malek, y M. Hüttemann, «Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration», *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2015, p. e181260, jun. 2015, doi: 10.1155/2015/181260.
- [7] Y. Chen *et al.*, «Anti-myocardial Ischemia Effect and Components of Litchi Pericarp Extracts», *Phytother. Res.*, vol. 31, n.º 9, pp. 1384-1391, 2017, doi: 10.1002/ptr.5865.
- [8] S. M. P. Ponnian, «Preventive effects of (-) epicatechin on tachycardia, cardiac hypertrophy, and nuclear factor- κ B inflammatory signaling pathway in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats», *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 924, p. 174909, jun. 2022, doi: 10.1016/j.ejphar.2022.174909.
- [9] A. N. Panche, A. D. Diwan, y S. R. Chandra, «Flavonoids: an overview», *J. Nutr. Sci.*, vol. 5, p. e47, ed 2016, doi: 10.1017/jns.2016.41.
- [10] K. Yonekura-Sakakibara, Y. Higashi, y R. Nakabayashi, «The Origin and Evolution of Plant Flavonoid Metabolism», *Front. Plant Sci.*, vol. 10, 2019, Accedido: 6 de febrero de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00943>
- [11] M. Corcoran, D. McKay, y J. Blumberg, «Flavonoid Basics: Chemistry, Sources, Mechanisms of Action, and Safety», *J. Nutr. Gerontol. Geriatr.*, vol. 31, pp. 176-89, jul. 2012, doi: 10.1080/21551197.2012.698219.
- [12] C. G. Fraga, P. I. Oteiza, y M. Galleano, «Plant bioactives and redox signaling: (-)-Epicatechin as a paradigm», *Mol. Aspects Med.*, vol. 61, pp. 31-40, jun. 2018, doi: 10.1016/j.mam.2018.01.007.
- [13] J. R. Dash, G. Pattnaik, G. Ghosh, G. Rath, y B. Kar, «Protective effect of epicatechin in diabetic-induced peripheral neuropathy: A review», *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2022, doi: 10.7324/JAPS.2023.130105-1.
- [14] F. Berli, «Respuesta de *Vitis vinifera* L. cv. Malbec a UV-B y ABA», 2011. doi: 10.13140/RG.2.2.20208.61449.
- [15] Y. Yang y X. Shen, «Preparation and Application of Molecularly Imprinted Polymers for Flavonoids: Review and Perspective», *Molecules*, vol. 27, n.º 21, Art. n.º 21, ene. 2022, doi: 10.3390/molecules27217355.
- [16] M. Kurisawa, J. E. Chung, Y. J. Kim, H. Uyama, y S. Kobayashi, «Amplification of Antioxidant Activity and Xanthine Oxidase Inhibition of Catechin by Enzymatic Polymerization», *Bio-macromolecules*, vol. 4, n.º 3, pp. 469-471, may 2003, doi: 10.1021/bm034012z.
- [17] M. Latos-Brozio y A. Masek, «Natural Polymeric Compound Based on High Thermal Stability Catechin from Green Tea», *Biomolecules*, vol. 10, n.º 8, p. 1191, ago. 2020, doi: 10.3390/biom10081191.
- [18] B. Piotrkowski, V. Calabró, M. Galleano, y C. G. Fraga, «(-)-Epicatechin prevents alterations in the metabolism of superoxide anion and nitric oxide in the hearts of I -NAME-treated rats», *Food Funct.*, vol. 6, n.º 1, pp. 154-160, 2015, doi: 10.1039/C4FO00554F.

- [19] S. Oliver, J. M. Hook, y C. Boyer, «Versatile oligomers and polymers from flavonoids – a new approach to synthesis», *Polym. Chem.*, vol. 8, n.º 15, pp. 2317-2326, 2017, doi: 10.1039/C7PY00325K.
- [20] M. Latos-Brozio, A. Masek, y M. Piotrowska, «Polymeric Forms of Plant Flavonoids Obtained by Enzymatic Reactions», *Molecules*, vol. 27, n.º 12, Art. n.º 12, ene. 2022, doi: 10.3390/molecules27123702.
- [21] H. Uyama, «Artificial Polymeric Flavonoids: Synthesis and Applications», *Macromol. Biosci.*, vol. 7, n.º 4, pp. 410-422, 2007, doi: 10.1002/mabi.200700005.
- [22] S. Oliver, O. Vittorio, G. Cirillo, y C. Boyer, «Enhancing the therapeutic effects of polyphenols with macromolecules», *Polym. Chem.*, vol. 7, n.º 8, pp. 1529-1544, 2016, doi: 10.1039/C5PY01912E.
- [23] J. H. Bridson, J. Kaur, Z. Zhang, L. Donaldson, y A. Fernyhough, «Polymeric flavonoids processed with co-polymers as UV and thermal stabilisers for polyethylene films», *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 122, pp. 18-24, dic. 2015, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.10.002.
- [24] R. Bai, Y. Yu, Q. Wang, J. Yuan, X. Fan, y J. Shen, «Laccase-catalyzed in-situ dyeing of wool fabric», *J. Text. Inst.*, vol. 107, n.º 8, pp. 995-1003, ago. 2016, doi: 10.1080/00405000.2015.1077039.
- [25] S. Nagarajan *et al.*, «Antioxidant Activity of Synthetic Polymers of Phenolic Compounds», *Polymers*, vol. 12, n.º 8, p. 1646, jul. 2020, doi: 10.3390/polym12081646.
- [26] J. Su, J. Fu, Q. Wang, C. Silva, y A. Cavaco-Paulo, «Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols», *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 38, n.º 2, pp. 294-307, feb. 2018, doi: 10.1080/07388551.2017.1354353.
- [27] D. Kumar, A. Kumar, S. Sondhi, P. Sharma, y N. Gupta, «An alkaline bacterial laccase for polymerization of natural precursors for hair dye synthesis», *3 Biotech*, vol. 8, n.º 3, p. 182, mar. 2018, doi: 10.1007/s13205-018-1181-7.
- [28] T. Qiang, L. Chen, Q. Zhang, y X. Liu, «A sustainable and cleaner speedy tanning system based on condensed tannins catalyzed by laccase», *J. Clean. Prod.*, vol. 197, pp. 1117-1123, oct. 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.06.257.
- [29] C. Maraveas, I. S. Bayer, y T. Bartzanas, «Recent Advances in Antioxidant Polymers: From Sustainable and Natural Monomers to Synthesis and Applications», *Polymers*, vol. 13, n.º 15, Art. n.º 15, ene. 2021, doi: 10.3390/polym13152465.
- [30] J. K. Fink, *The Chemistry of Bio-based Polymers*. John Wiley & Sons, 2020.
- [31] E. Cremonini *et al.*, «(-)-Epicatechin and the comorbidities of obesity», *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 690, p. 108505, sep. 2020, doi: 10.1016/j.abb.2020.108505.
- [32] D. Jenča *et al.*, «Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors», *ESC Heart Fail.*, vol. 8, n.º 1, pp. 222-237, feb. 2021, doi: 10.1002/ehf2.13144.
- [33] M. Roshandel y F. Dorkoosh, «Cardiac tissue engineering, biomaterial scaffolds, and their fabrication techniques», *Polym. Adv. Technol.*, vol. 32, n.º 6, pp. 2290-2305, 2021, doi: 10.1002/pat.5273.
- [34] K. Da Silva, P. Kumar, Y. E. Choonara, L. C. du Toit, y V. Pillay, «Three-dimensional printing of extracellular matrix (ECM)-mimicking scaffolds: A critical review of the current ECM materials», *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 108, n.º 12, pp. 2324-2350, 2020, doi: 10.1002/jbm.a.36981.
- [35] Z. Chen *et al.*, «Laminated electrospun nHA/PHB-composite scaffolds mimicking bone extracellular matrix for bone tissue engineering», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 72, pp. 341-351, mar. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2016.11.070.
- [36] D. Hao *et al.*, «Extracellular Matrix Mimicking Nanofibrous Scaffolds Modified With Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles for Improved Vascularization», *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, p. 633, jun. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00633.
- [37] G. R. Jiménez-Gastélum, E. M. Aguilar-Medina, E. Soto-Sainz, R. Ramos-Payán, y E. L. Silva-Benítez, «Antimicrobial Properties of Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering», *BioMed Res. Int.*, vol. 2019, p. e9641456, dic. 2019, doi: 10.1155/2019/9641456.

- [38] S. Yi, F. Ding, L. Gong, y X. Gu, «Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine», *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 12, n.º 3, pp. 233-246, 2017, doi: 10.2174/1574888X11666160905092513.
- [39] T. Montanheiro *et al.*, «Recent progress on polymer scaffolds production: Methods, main results, advantages and disadvantages», *EXPRESS Polym. Lett.*, vol. 16, pp. 197-219, dic. 2021, doi: 10.3144/expresspolymlett.2022.16.
- [40] E. Capuana, F. Lopresti, F. Carfi Pavia, V. Brucato, y V. La Carrubba, «Solution-Based Processing for Scaffold Fabrication in Tissue Engineering Applications: A Brief Review», *Polymers*, vol. 13, n.º 13, Art. n.º 13, ene. 2021, doi: 10.3390/polym13132041.
- [41] R. Sanz-Horta *et al.*, «Breath figures makes porous the “so-called” skin layer obtained in polymer foams prepared by supercritical CO₂ treatments», *J. Supercrit. Fluids*, vol. 167, p. 105051, ene. 2021, doi: 10.1016/j.supflu.2020.105051.
- [42] M. Rahmati *et al.*, «Electrospinning for tissue engineering applications», *Prog. Mater. Sci.*, vol. 117, p. 100721, abr. 2021, doi: 10.1016/j.pmatsci.2020.100721.
- [43] A. Haider, S. Haider, y I.-K. Kang, «A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology», *Arab. J. Chem.*, vol. 11, n.º 8, pp. 1165-1188, dic. 2018, doi: 10.1016/j.arabjc.2015.11.015.
- [44] Y.-Z. Long, X. Yan, X.-X. Wang, J. Zhang, y M. Yu, «Chapter 2 - Electrospinning: The Setup and Procedure», en *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*, B. Ding, X. Wang, y J. Yu, Eds., en Micro and Nano Technologies. William Andrew Publishing, 2019, pp. 21-52. doi: 10.1016/B978-0-323-51270-1.00002-9.
- [45] C. Hsu, «Electrospinning of Poly(ε-Caprolactone)», 2003. Accedido: 5 de abril de 2023. [En línea]. Disponible en: [https://www.semanticscholar.org/paper/Electrospinning-of-Poly\(%C2%A3%60-Caprolactone\)-Hsu/76958e3f031d1a70b8962b79429536153de75f39](https://www.semanticscholar.org/paper/Electrospinning-of-Poly(%C2%A3%60-Caprolactone)-Hsu/76958e3f031d1a70b8962b79429536153de75f39)
- [46] B. M. Abunahel, N. Z. N. Azman, y M. Jamil, «Effect of Needle Diameter on the Morphological Structure of Electrospun nBi₂O₃ / Epoxy-PVA Nanofiber», 2018. Accedido: 3 de febrero de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Effect-of-Needle-Diameter-on-the-Morphological-of-2-Abunahel-Azman/b77f78eb607673466272cd926bd4fdf92f31ffcf>
- [47] G. R. Williams, B. T. Raimi-Abraham, y C. J. Luo, *Nanofibres in Drug Delivery*. UCL Press, 2018.
- [48] T. J. Sill y H. A. von Recum, «Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering», *Biomaterials*, vol. 29, n.º 13, pp. 1989-2006, may 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.
- [49] H. M. Ibrahim y A. Klingner, «A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications», *Polym. Test.*, vol. 90, p. 106647, oct. 2020, doi: 10.1016/j.polymertesting.2020.106647.
- [50] C. J. Angamma y S. H. Jayaram, «Analysis of the Effects of Solution Conductivity on Electrospinning Process and Fiber Morphology», *IEEE Trans. Ind. Appl.*, vol. 47, n.º 3, pp. 1109-1117, may 2011, doi: 10.1109/TIA.2011.2127431.
- [51] D. Mailley, A. Hébraud, y G. Schlatter, «A Review on the Impact of Humidity during Electrospinning: From the Nanofiber Structure Engineering to the Applications», *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 306, n.º 7, p. 2100115, 2021, doi: 10.1002/mame.202100115.
- [52] A. Tikhonov *et al.*, «Stereolithographic fabrication of three-dimensional permeable scaffolds from CaP/PEGDA hydrogel biocomposites for use as bone grafts», *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 110, p. 103922, oct. 2020, doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.103922.
- [53] X. Yang, Y. Wang, Y. Zhou, J. Chen, y Q. Wan, «The Application of Polycaprolactone in Three-Dimensional Printing Scaffolds for Bone Tissue Engineering», *Polymers*, vol. 13, n.º 16, p. 2754, ago. 2021, doi: 10.3390/polym13162754.
- [54] M. Tortorici, C. Gayer, A. Torchio, S. Cho, J. H. Schleifenbaum, y A. Petersen, «Inner strut morphology is the key parameter in producing highly porous and mechanically stable

- poly(ϵ -caprolactone) scaffolds via selective laser sintering», *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, vol. 123, p. 111986, abr. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.111986.
- [55] M. K. A. Ansari, O. Lastochkina, A. A. Ansari, T. Fatma, y G. Owens, «Laccase - The Wonder Enzyme for a Variety of Industries», p. 15, 2021.
- [56] Z. Qu *et al.*, «Advances in physiological functions and mechanisms of (-)-epicatechin», *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 61, n.º 2, pp. 211-233, ene. 2021, doi: 10.1080/10408398.2020.1723057.
- [57] M. M. Castillo-Ortega *et al.*, «Preparation by coaxial electrospinning and characterization of membranes releasing (-) epicatechin as scaffold for tissue engineering», *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, vol. 46, pp. 184-189, ene. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2014.10.031.
- [58] F. Ikram, A. Qayoom, y M. R. Shah, «Synthesis of epicatechin coated silver nanoparticles for selective recognition of gentamicin», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 257, pp. 897-905, mar. 2018, doi: 10.1016/j.snb.2017.11.038.
- [59] S. S. Suner, M. Sahiner, S. Mohapatra, R. S. Ayyala, V. R. Bhethanabotla, y N. Sahiner, «Degradable poly(catechin) nanoparticles as a versatile therapeutic agent», *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 71, n.º 14, pp. 1104-1115, sep. 2022, doi: 10.1080/00914037.2021.1941957.
- [60] E. Sistanipour, A. Meshkini, y H. Oveisi, «Catechin-conjugated mesoporous hydroxyapatite nanoparticle: A novel nano-antioxidant with enhanced osteogenic property», *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 169, pp. 329-339, sep. 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.05.046.
- [61] M. Sabaghi, S. Z. Hoseyni, S. Tavasoli, M. R. Mozafari, y I. Katouzian, «Strategies of confining green tea catechin compounds in nano-biopolymeric matrices: A review», *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 204, p. 111781, ago. 2021, doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111781.
- [62] M. Latos-Brozio y A. Masek, «Structure-Activity Relationships Analysis of Monomeric and Polymeric Polyphenols (Quercetin, Rutin and Catechin) Obtained by Various Polymerization Methods», *Chem. Biodivers.*, vol. 16, n.º 12, p. e1900426, 2019, doi: 10.1002/cbdv.201900426.
- [63] E. Yüksel, A. Bilici, İ. H. Geçibesler, y İ. Kaya, «Synthesis and antioxidant activities of phenolic Schiff base monomers and polymers», *Can. J. Chem.*, vol. 98, n.º 3, pp. 151-157, mar. 2020, doi: 10.1139/cjc-2019-0307.
- [64] I. G. Munteanu y C. Apetrei, «Assessment of the Antioxidant Activity of Catechin in Nutraceuticals: Comparison between a Newly Developed Electrochemical Method and Spectrophotometric Methods», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, n.º 15, p. 8110, jul. 2022, doi: 10.3390/ijms23158110.
- [65] J. E. Chung, M. Kurisawa, Y.-J. Kim, H. Uyama, y S. Kobayashi, «Amplification of antioxidant activity of catechin by polycondensation with acetaldehyde», *Biomacromolecules*, vol. 5, n.º 1, pp. 113-118, feb. 2004, doi: 10.1021/bm0342436.
- [66] I. Gonçalves, T. Matamá, A. Cavaco-Paulo, y C. Silva, «Laccase coating of catheters with poly(catechin) for biofilm reduction», *Biocatal. Biotransformation*, vol. 32, n.º 1, pp. 2-12, ene. 2014, doi: 10.3109/10242422.2013.828711.
- [67] I. Gonçalves *et al.*, «Enzymatic synthesis of poly(catechin)-antibiotic conjugates: an antimicrobial approach for indwelling catheters», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, n.º 2, pp. 637-651, ene. 2015, doi: 10.1007/s00253-014-6128-2.
- [68] Y.-J. Li *et al.*, «Synergistically dual-functional nano eye-drops for simultaneous anti-inflammatory and anti-oxidative treatment of dry eye disease», *Nanoscale*, vol. 11, n.º 12, pp. 5580-5594, 2019, doi: 10.1039/C9NR00376B.
- [69] S. C. Woodward, P. S. Brewer, F. Moatamed, A. Schindler, y C. G. Pitt, «The intracellular degradation of poly(ϵ -caprolactone)», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 19, n.º 4, pp. 437-444, 1985, doi: 10.1002/jbm.820190408.
- [70] M. Abedalwafa, F. Wang, L. Wang, y C. Li, «Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review», *Rev. Adv. Mater. Sci.*, vol. 34, pp. 123-140, dic. 2012.

- [71] H. Lu, K. Zhang, J. Yi, y A. Wei, «Study on Mechanical Properties of Polycaprolactone Modified Cement-Based Material», *Int. J. Concr. Struct. Mater.*, vol. 16, n.º 1, p. 24, may 2022, doi: 10.1186/s40069-022-00516-w.
- [72] B. Azimi, P. Nourpanah, M. Rabiee, y S. Arbab, «Poly (ϵ -caprolactone) Fiber: An Overview», *J. Eng. Fibers Fabr.*, vol. 9, n.º 3, p. 155892501400900320, sep. 2014, doi: 10.1177/155892501400900309.
- [73] A. Cipitria, A. Skelton, T. R. Dargaville, P. D. Dalton, y D. W. Hutmacher, «Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review», *J. Mater. Chem.*, vol. 21, n.º 26, pp. 9419-9453, 2011, doi: 10.1039/C0JM04502K.
- [74] N. Cardullo, V. Muccilli, y C. Tringali, «Laccase-mediated synthesis of bioactive natural products and their analogues», *RSC Chem. Biol.*, vol. 3, n.º 6, pp. 614-647, jun. 2022, doi: 10.1039/D1CB00259G.
- [75] M. Irshad, M. Asgher, M. A. Sheikh, y H. Nawaz, «PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACCASE PRODUCED BY Schyzophyllum commune IBL-06 IN SOLID STATE CULTURE OF BANANA STALKS», p. 13, 2011.
- [76] S. H. Khatami, O. Vakili, A. Movahedpour, Z. Ghesmati, H. Ghasemi, y M. Taheri-Anganeh, «Laccase: Various types and applications», *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. n/a, n.º n/a, doi: 10.1002/bab.2313.
- [77] A. A. Ismail, F. R. van de Voort, y J. Sedman, «Chapter 4 Fourier transform infrared spectroscopy: Principles and applications», en *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, J. R. J. Paré y J. M. R. Bélanger, Eds., en *Instrumental Methods in Food Analysis*, vol. 18. Elsevier, 1997, pp. 93-139. doi: 10.1016/S0167-9244(97)80013-3.
- [78] A. Dutta, «Chapter 4 - Fourier Transform Infrared Spectroscopy», en *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, S. Thomas, R. Thomas, A. K. Zachariah, y R. K. Mishra, Eds., en *Micro and Nano Technologies*. Elsevier, 2017, pp. 73-93. doi: 10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2.
- [79] M. A. Mohamed, J. Jaafar, A. F. Ismail, M. H. D. Othman, y M. A. Rahman, «Chapter 1 - Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy», en *Membrane Characterization*, N. Hilal, A. F. Ismail, T. Matsuura, y D. Oatley-Radcliffe, Eds., Elsevier, 2017, pp. 3-29. doi: 10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2.
- [80] R. Wolstenholme, «Ultraviolet–Visible and Fluorescence Spectroscopy», en *Analytical Techniques in Forensic Science*, John Wiley & Sons, Ltd, 2021, pp. 115-143. doi: 10.1002/9781119373421.ch6.
- [81] S. Upstone, «Ultraviolet/Visible Light Absorption Spectrophotometry in Clinical Chemistry Update based on the original article by Stephen L. Upstone, Encyclopedia of Analytical Chemistry , © 2000, John Wiley & Sons, Ltd.», 2013. doi: 10.1002/9780470027318.a0547.pub2.
- [82] M. S. H. Akash y K. Rehman, «Ultraviolet-Visible (UV-VIS) Spectroscopy», en *Essentials of Pharmaceutical Analysis*, M. S. H. Akash y K. Rehman, Eds., Singapore: Springer Nature, 2020, pp. 29-56. doi: 10.1007/978-981-15-1547-7_3.
- [83] I. C. P. Smith y D. E. Blandford, «Nuclear magnetic resonance spectroscopy», *Anal. Chem.*, vol. 67, n.º 12, pp. 509-518, jun. 1995, doi: 10.1021/ac00108a037.
- [84] V. Mlynárik, «Introduction to nuclear magnetic resonance», *Anal. Biochem.*, vol. 529, pp. 4-9, jul. 2017, doi: 10.1016/j.ab.2016.05.006.
- [85] E. R. Andrew, «1 - Introduction to Nuclear Magnetic Resonance», en *NMR in Physiology and Biomedicine*, R. J. Gillies, Ed., San Diego: Academic Press, 1994, pp. 1-23. doi: 10.1016/B978-0-12-283980-1.50006-5.
- [86] M. K. Singh y A. Singh, «Chapter 14 - Nuclear magnetic resonance spectroscopy», en *Characterization of Polymers and Fibres*, M. K. Singh y A. Singh, Eds., en *The Textile Institute Book Series*. Woodhead Publishing, 2022, pp. 321-339. doi: 10.1016/B978-0-12-823986-5.00011-7.

- [87] N. M. Stark, D. J. Yelle, y U. P. Agarwal, «4 - Techniques for Characterizing Lignin», en *Lignin in Polymer Composites*, O. Faruk y M. Sain, Eds., William Andrew Publishing, 2016, pp. 49-66. doi: 10.1016/B978-0-323-35565-0.00004-7.
- [88] J. H. F. Bothwell y J. L. Griffin, «An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy», *Biol. Rev.*, vol. 86, n.º 2, pp. 493-510, 2011, doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00157.x.
- [89] D. Bazin *et al.*, «Scanning electron microscopy—a powerful imaging technique for the clinician», *Comptes Rendus Chim.*, vol. 25, n.º S1, pp. 37-60, 2022, doi: 10.5802/crchim.101.
- [90] A. Ul-Hamid, *A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy*. Cham: Springer International Publishing, 2018. doi: 10.1007/978-3-319-98482-7.
- [91] G. G. Mancera y M. E. N. Amaya, *Principios de microscopía electrónica de barrido y microanálisis por rayos X característicos*. UNAM, Facultad de Química, 2006.
- [92] T. Roodbar Shojaei, S. Soltani, y M. Derakhshani, «Chapter 6 - Synthesis, properties, and biomedical applications of inorganic bionanomaterials», en *Fundamentals of Bionanomaterials*, A. Barhoum, J. Jeevanandam, y M. K. Danquah, Eds., en *Micro and Nano Technologies*. Elsevier, 2022, pp. 139-174. doi: 10.1016/B978-0-12-824147-9.00006-6.
- [93] A. Di Gianfrancesco, «8 - Technologies for chemical analyses, microstructural and inspection investigations», en *Materials for Ultra-Supercritical and Advanced Ultra-Supercritical Power Plants*, A. Di Gianfrancesco, Ed., Woodhead Publishing, 2017, pp. 197-245. doi: 10.1016/B978-0-08-100552-1.00008-7.
- [94] M. Davidson y M. Abramowitz, «Optical Microscopy», 2002. doi: 10.1002/0471443395.img074.
- [95] «Surface Treatment of Materials for Adhesive Bonding - 2nd Edition». <https://www.elsevier.com/books/surface-treatment-of-materials-for-adhesive-bonding/ebnesajjad/978-0-323-26435-8> (accedido 22 de marzo de 2023).
- [96] C. Leyva-Porras *et al.*, «Application of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) in Food and Drug Industries», *Polymers*, vol. 12, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2020, doi: 10.3390/polym12010005.
- [97] M. S. H. Akash y K. Rehman, «Differential Scanning Calorimetry», *Essent. Pharm. Anal.*, pp. 199-206, 2020, doi: 10.1007/978-981-15-1547-7_17.
- [98] N. Saadatkah *et al.*, «Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA», *Can. J. Chem. Eng.*, vol. 98, n.º 1, pp. 34-43, 2020, doi: 10.1002/cjce.23673.
- [99] S. Loganathan, R. B. Valapa, R. K. Mishra, G. Pugazhenti, y S. Thomas, «Chapter 4 - Thermogravimetric Analysis for Characterization of Nanomaterials», en *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*, S. Thomas, R. Thomas, A. K. Zachariah, y R. K. Mishra, Eds., en *Micro and Nano Technologies*. Elsevier, 2017, pp. 67-108. doi: 10.1016/B978-0-323-46139-9.00004-9.
- [100] H. M. Ng, N. M. Saidi, F. S. Omar, K. Ramesh, S. Ramesh, y S. Bashir, «Thermogravimetric Analysis of Polymers», en *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Ltd, 2018, pp. 1-29. doi: 10.1002/0471440264.pst667.
- [101] C. De Blasio, «Thermogravimetric Analysis (TGA)», en *Fundamentals of Biofuels Engineering and Technology*, C. De Blasio, Ed., en *Green Energy and Technology*. Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 91-102. doi: 10.1007/978-3-030-11599-9_7.
- [102] C. V. Ratnavathi y V. V. Komala, «Chapter 1 - Sorghum Grain Quality», en *Sorghum Biochemistry*, C. V. Ratnavathi, J. V. Patil, y U. D. Chavan, Eds., San Diego: Academic Press, 2016, pp. 1-61. doi: 10.1016/B978-0-12-803157-5.00001-0.
- [103] J.-W. Dong, L. Cai, Y. Xing, J. Yu, y Z.-T. Ding, «Re-evaluation of ABTS*+ Assay for Total Antioxidant Capacity of Natural Products», *Nat. Prod. Commun.*, vol. 10, n.º 12, pp. 2169-2172, dic. 2015.
- [104] I. R. Ilyasov, V. L. Beloborodov, y I. A. Selivanova, «Three ABTS*+ radical cation-based approaches for the evaluation of antioxidant activity: fast- and slow-reacting antioxidant

- behavior», *Chem. Pap.*, vol. 72, n.º 8, pp. 1917-1925, ago. 2018, doi: 10.1007/s11696-018-0415-9.
- [105] J. P. D. Goldring, «Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis», en *Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols*, B. T. Kurien y R. H. Scofield, Eds., en *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer, 2019, pp. 31-39. doi: 10.1007/978-1-4939-8793-1_3.
- [106] J. M. Walker, Ed., *Basic protein and peptide protocols*. en *Methods in molecular biology*, no. v. 32. Totowa, N.J: Humana Press, 1994.
- [107] O. Ernst y T. Zor, «Linearization of the Bradford Protein Assay», *J. Vis. Exp. JoVE*, n.º 38, p. 1918, abr. 2010, doi: 10.3791/1918.
- [108] R. K. Scopes, «Enzyme Activity and Assays», en *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, Ed., 1.^a ed. Wiley, 2002. doi: 10.1038/npg.els.0000712.
- [109] J. Gunawardena, «Time-scale separation--Michaelis and Menten's old idea, still bearing fruit», *FEBS J.*, vol. 281, n.º 2, pp. 473-488, ene. 2014, doi: 10.1111/febs.12532.
- [110] A. Kroll, M. K. M. Engqvist, D. Heckmann, y M. J. Lercher, «Deep learning allows genome-scale prediction of Michaelis constants from structural features», *PLoS Biol.*, vol. 19, n.º 10, p. e3001402, oct. 2021, doi: 10.1371/journal.pbio.3001402.
- [111] C. G. Whiteley y D.-J. Lee, «Enzyme technology and biological remediation», *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 38, n.º 3, pp. 291-316, feb. 2006, doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.010.
- [112] J. Antony, *Design of Experiments for Engineers and Scientists*. Elsevier, 2014.
- [113] J. Lawson, *Design and Analysis of Experiments with R*. CRC Press, 2014.
- [114] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments, 8th Edition*. John Wiley & Sons, Incorporated, 2012.
- [115] W. Ke, C. Ren, y H. Lu, «SELECTION OF BLOCKED TWO-LEVEL FRACTIONAL FACTORIAL DESIGNS FOR AGRICULTURAL EXPERIMENTS», *Conf. Appl. Stat. Agric.*, abr. 2007, doi: 10.4148/2475-7772.1109.
- [116] M. M. Atalla, H. K. Zeinab, R. H. Eman, A. Y. Amani, y A. A. E. A. Abeer, «Characterization and kinetic properties of the purified Trematosphaeria mangrovei laccase enzyme», *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 20, n.º 4, pp. 373-381, oct. 2013, doi: 10.1016/j.sjbs.2013.04.001.
- [117] A. Arsenault, H. Cabana, y J. P. Jones, «Laccase-Based CLEAs: Chitosan as a Novel Cross-Linking Agent», *Enzyme Res.*, vol. 2011, p. e376015, jul. 2011, doi: 10.4061/2011/376015.
- [118] Z. Ding *et al.*, «Production and characterization of thermostable laccase from the mushroom, Ganoderma lucidum, using submerged fermentation», *Afr. J. Microbiol. Res.*, vol. 6, n.º 6, pp. 1147-1157, feb. 2012, doi: 10.5897/AJMR11.1257.
- [119] M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, y S. Kobayashi, «Laccase-catalyzed Synthesis and Antioxidant Property of Poly(catechin)», *Macromol. Biosci.*, vol. 3, n.º 12, pp. 758-764, 2003, doi: 10.1002/mabi.200300038.
- [120] M. Latos-Brozio, A. Masek, y M. Piotrowska, «Thermally Stable and Antimicrobial Active Poly(Catechin) Obtained by Reaction with a Cross-Linking Agent», *Biomolecules*, vol. 11, n.º 1, p. 50, dic. 2020, doi: 10.3390/biom11010050.
- [121] F. M. Collares, F. F. Portella, V. C. B. Leitune, y S. M. W. Samuel, «Discrepancies in degree of conversion measurements by FTIR», *Braz. Oral Res.*, vol. 27, n.º 6, pp. 453-454, 2013, doi: 10.1590/S1806-83242013000600002.
- [122] T. Pivec *et al.*, «Chemical Structure–Antioxidant Activity Relationship of Water–Based Enzymatic Polymerized Rutin and Its Wound Healing Potential», *Polymers*, vol. 11, n.º 10, p. 1566, sep. 2019, doi: 10.3390/polym11101566.
- [123] M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, y S. Kobayashi, «Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin)», *Biomacromolecules*, vol. 4, n.º 5, pp. 1394-1399, 2003, doi: 10.1021/bm034136b.
- [124] M. Latos-Brozio, A. Masek, y M. Piotrowska, «Novel Polymeric Biomaterial Based on Naringenin», *Materials*, vol. 14, n.º 9, Art. n.º 9, ene. 2021, doi: 10.3390/ma14092142.

- [125] X. Sun *et al.*, «Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenolic Compounds», *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 171, n.º 7, pp. 1673-1680, dic. 2013, doi: 10.1007/s12010-013-0463-0.
- [126] S. Nagarajan *et al.*, «Biocatalytically Oligomerized Epicatechin with Potent and Specific Anti-proliferative Activity for Human Breast Cancer Cells», *Molecules*, vol. 13, n.º 11, pp. 2704-2716, nov. 2008, doi: 10.3390/molecules13112704.
- [127] F. F. Bruno, L. A. Samuelson, S. Nagarajan, R. Nagarajan, y J. Kumar, «Biocatalysis for Material Science and Drug Discoveries», *MRS Online Proc. Libr.*, vol. 1065, n.º 1, p. 106, jun. 2008, doi: 10.1557/PROC-1065-QQ01-06.
- [128] E. Miranda-Buendia *et al.*, «Activity patterns of cardiomyocytes in electrospun scaffolds of poly (ϵ -caprolactone), collagen, and epicatechin», *Mater. Today Commun.*, vol. 31, p. 103405, jun. 2022, doi: 10.1016/j.mtcomm.2022.103405.
- [129] I. Y. López-Peña *et al.*, «Study of the release kinetics of (-) epicatechin: Effect of its location within the fiber or sphere», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 136, n.º 10, p. 47166, 2019, doi: 10.1002/app.47166.
- [130] M. M. Castillo-Ortega *et al.*, «Preparation by coaxial electrospinning and characterization of membranes releasing (-) epicatechin as scaffold for tissue engineering», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 46, pp. 184-189, ene. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2014.10.031.
- [131] A. Guadalupe Perez-Ruiz, A. Ganem, I. María Olivares-Corichi, y J. Rubén García-Sánchez, «Lecithin–chitosan–TPGS nanoparticles as nanocarriers of (-) epicatechin enhanced its anticancer activity in breast cancer cells», *RSC Adv.*, vol. 8, n.º 61, pp. 34773-34782, 2018, doi: 10.1039/C8RA06327C.
- [132] A. Semalty, Y. Tanwar, D. Rawat, y M. s. M. Rawat, «Phosphatidylcholine complex in improving oral drug delivery of epicatechin: preparation and characterization», *J. Drug Discov. Dev.*, vol. 1, pp. 46-55, jun. 2014.
- [133] C. M. Álvarez, L. Restrepo-Urbe, J. A. López, O. A. Estrada, y M. del P. Noriega, «Improvement of stability and release of (-) epicatechin by hot melt extrusion», *J. Polym. Eng.*, vol. 40, n.º 1, pp. 75-85, ene. 2020, doi: 10.1515/polyeng-2019-0140.
- [134] L. Liverani *et al.*, «Incorporation of bioactive glass nanoparticles in electrospun PCL/chitosan fibers by using benign solvents», *Bioact. Mater.*, vol. 3, n.º 1, pp. 55-63, mar. 2018, doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.05.003.
- [135] «Fabrication of hybrid scaffolds obtained from combinations of PCL with gelatin or collagen via electrospinning for skeletal muscle tissue engineering - Perez-Puyana - 2021 - Journal of Biomedical Materials Research Part A - Wiley Online Library». <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.37156> (accedido 20 de marzo de 2023).
- [136] D. Han y A. J. Steckl, «Triaxial Electrospun Nanofiber Membranes for Controlled Dual Release of Functional Molecules», *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, n.º 16, pp. 8241-8245, ago. 2013, doi: 10.1021/am402376c.
- [137] Y. Zhang, H. Ouyang, C. T. Lim, S. Ramakrishna, y Z.-M. Huang, «Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds», *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 72B, n.º 1, pp. 156-165, 2005, doi: 10.1002/jbm.b.30128.
- [138] N. Kulpreechanan, T. Bunaprasert, y R. Rangkupan, «Electrospinning of Polycaprolactone in Dichloromethane/Dimethylformamide Solvent System», *Adv. Mater. Res.*, vol. 849, pp. 337-342, 2014, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.849.337.
- [139] M. Khan, A. M. Md Abdullah, R. Mia, A. Xu, y M. Rashid, «Effect of Different Solvent Systems on Fiber Morphology and Property of Electrospun PCL Nano Fibers», *Tekst. Ve Mühendis.*, vol. 28, pp. 61-76, jun. 2021, doi: 10.7216/1300759920212812201.
- [140] H. H. Kim, M. J. Kim, S. J. Ryu, C. S. Ki, y Y. H. Park, «Effect of fiber diameter on surface morphology, mechanical property, and cell behavior of electrospun poly(ϵ -caprolactone) mat», *Fibers Polym.*, vol. 17, n.º 7, pp. 1033-1042, jul. 2016, doi: 10.1007/s12221-016-6350-x.

- [141] B. Feng, H. Tu, H. Yuan, H. Peng, y Y. Zhang, «Acetic-Acid-Mediated Miscibility toward Electrospinning Homogeneous Composite Nanofibers of GT/PCL», *Biomacromolecules*, vol. 13, n.º 12, pp. 3917-3925, dic. 2012, doi: 10.1021/bm3009389.
- [142] G. Salimbeigi, R. N. Oliveira, y G. B. McGuinness, «Electrospun poly(e-caprolactone)/propolis fiber morphology: A process optimisation study», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 139, n.º 19, p. 52131, 2022, doi: 10.1002/app.52131.
- [143] H.-W. Chen y M.-F. Lin, «Characterization, Biocompatibility, and Optimization of Electrospun SF/PCL/CS Composite Nanofibers», *Polymers*, vol. 12, n.º 7, jul. 2020, doi: 10.3390/polym12071439.
- [144] «The Effect of Flow Rate on Morphology and Deposition Area of Electrospun Nylon 6 Nanofiber - Shamim Zargham, Saeed Bazgir, Amir Tavakoli, Abo Saied Rashidi, Rogheih Damerchely, 2012». <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/155892501200700414> (accedido 19 de abril de 2023).
- [145] «[PDF] PLA/PCL electrospun membranes of tailored fibres diameter as drug delivery systems | Semantic Scholar». <https://www.semanticscholar.org/paper/PLA-PCL-electrospun-membranes-of-tailored-fibres-as-Herrero-Herrero-G%C3%B3mez-Tejedor/8365ca3c8d8adac4a5ed118e19524fb8b7fff1a7> (accedido 19 de abril de 2023).
- [146] D. Sharma y B. K. Satapathy, «Optimization and physical performance evaluation of electrospun nanofibrous mats of PLA, PCL and their blends», *J. Ind. Text.*, vol. 51, n.º 4_suppl, pp. 6640S-6665S, jun. 2022, doi: 10.1177/1528083720944502.
- [147] J. Kang, L. Chen, S. Okubayashi, y S. Sukigara, «Preparation of electrospun polycaprolactone nanofibers with water-soluble eggshell membrane and catechin», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 124, n.º S1, pp. E83-E90, jun. 2012, doi: 10.1002/app.35538.
- [148] P. Pusporini, D. Edikresnha, I. Sriyanti, T. Suciati, M. M. Munir, y K. Khairurrijal, «Electrospun polyvinylpyrrolidone (PVP)/green tea extract composite nanofiber mats and their antioxidant activities», *Mater. Res. Express*, vol. 5, n.º 5, p. 054001, may 2018, doi: 10.1088/2053-1591/aac1e6.
- [149] S. Z. Hoseyni, S. M. Jafari, H. Shahiri Tabarestani, M. Ghorbani, E. Assadpour, y M. Sabaghi, «Production and characterization of catechin-loaded electrospun nanofibers from Azivash gum- polyvinyl alcohol», *Carbohydr. Polym.*, vol. 235, p. 115979, may 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.115979.
- [150] Q. Pham Le, M. V. Uspenskaya, R. O. Olekhovich, y M. A. Baranov, «The Mechanical Properties of PVC Nanofiber Mats Obtained by Electrospinning», *Fibers*, vol. 9, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2021, doi: 10.3390/fib9010002.
- [151] M. Sattary, M. Rafienia, M. T. Khorasani, y H. Salehi, «The effect of collector type on the physical, chemical, and biological properties of polycaprolactone/gelatin/nano-hydroxyapatite electrospun scaffold», *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 107, n.º 4, pp. 933-950, may 2019, doi: 10.1002/jbm.b.34188.
- [152] «A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications | SpringerLink». <https://link.springer.com/article/10.1007/s42452-019-1288-4> (accedido 21 de marzo de 2023).
- [153] A. S. Bommarius y B. R. Riebel-Bommarius, *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, 2007.