

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS
NANOESTRUCTURADAS DE POLICAPROLACTONA,
NANOHIPOXIAPATITA Y *Humulus lupulus* L,
CON POTENCIAL APLICACIÓN
EN REGENERACIÓN ÓSEA.

POR

JAIME ANTONIO VILLANUEVA LUMBRERAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Diciembre, 2019

**FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS
NANOESTRUCTURADAS DE POLICAPROLACTONA,
NANOHIPOXIPATITA Y *Humulus lupulus* L,
CON POTENCIAL APLICACIÓN
EN REGENERACIÓN ÓSEA.**

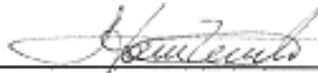
Comité de Tesis



Dra. Aída Rodríguez García
Presidente



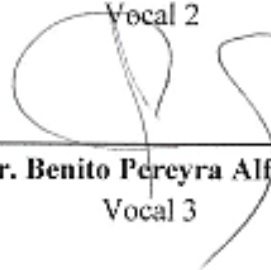
Dr. Hamlet Avilés Arnaut
Secretario



Dra. Susana De la Torre Zavala
Vocal 1



Dr. Luis J. Galán Wong
Vocal 2



Dr. Benito Pereyra Alferez
Vocal 3

**FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS
NANOESTRUCTURADAS DE POLICAPROLACTONA,
NANOHIPOXIAPATITA Y *Humulus lupulus* L,
CON POTENCIAL APLICACIÓN
EN REGENERACIÓN ÓSEA.**

Dirección de tesis



Dra. Aída Rodríguez García
Director



Dr. Ciro A. Rodríguez González
Director Externo

AGRADECIMIENTOS

Principalmente, agradezco a la Dra. Aída Rodríguez García, quien fue la persona que desde el 2013 me dio un lugar en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, siempre me apoyó, me impulsó y me protegió durante mi estancia en el Instituto, siempre buscando los recursos necesarios y haciendo más de lo posible por este proyecto. No hay palabras suficientes para demostrar la gratitud que tengo hacia ella. Gracias por todo. Gracias siempre.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo con la beca No. 706724 para la realización de este proyecto y la estancia en el extranjero.

Al Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, maestros y personal no docente, por haber dispuesto sus instalaciones, apoyo y enseñanzas para que este proyecto se llevara a cabo.

Gracias al Dr. Ciro A. Rodríguez González y al Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey por el acceso a las instalaciones del Centro de Innovación y Transferencia de Tecnología para el Desarrollo Estratégico de Productos (CIDEP), PIIT. Un agradecimiento especial para Javier Vázquez, Vívian Cepeda y Raquel Tejeda, por su disposición y ayuda para este proyecto.

A la Dra. María Rosa Aguilar de Armas y al Dr. Julio San Román, por haberme aceptado y acompañado en mi estancia de investigación en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España. Agradezco también a todo el equipo de España: Luis García, Luis Rojo, Rosa Ana, Eva, Gloria, Daniel, Miguel y especialmente a Raquel Palao Suay. Y a mis mexicanos que compartieron un tiempo en mi estancia: Marina, Javier y Héctor.

Gracias a todos los compañeros y amigos con los que compartí el aula, los seminarios, las tareas, los desvelos y demás, fueron parte importante en este proceso.

Agradezco de todo corazón a todas las personas que se cruzaron en este camino.

DEDICATORIA

A mis padres, quienes siempre me impulsaron a que siguiera estudiando.

Va para mi familia.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Pérdida ósea.....	3
2.2 Regeneración ósea.....	4
2.3 Andamios (scaffolds).....	5
2.4 Biomateriales para elaboración de andamios.....	7
2.5 Policaprolactona (PCL).....	9
2.6 Hidroxiapatita (HAP).....	10
2.7 Técnicas para elaboración de andamios.....	12
2.8 Electrohilado (Electrospinning).....	14
2.9 Humulus lupulus L.	15
3. Justificación.....	17
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivos.....	19
5.1 Objetivo general.....	19
5.2 Objetivos específicos.....	19
6. Material y método.....	20
6.1 Extracto de <i>Humulus lupulus</i> L.....	20
6.2 Solución polimérica y electrohilado	20
6.3 Microscopia electrónica de barrido	20
6.4 Análisis termogravimétrico	21
6.5 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	21
6.6 Prueba de degradación	21
6.7 Pruebas de tensión	22
6.8 Ensayo de citotoxicidad	22
6.9 Pruebas antibacterianas	22
6.10 Análisis estadístico	22
7. Resultados y discusión	23
7.1 Electrohilado	23

7.2 Microscopía electrónica de barrido.....	24
7.3 Análisis termogravimétrico (TGA).....	28
7.4 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	30
7.5 Prueba de degradación	32
7.6 Pruebas de tensión	33
7.7 Pruebas de citotoxicidad	36
7.8 Pruebas antibacterianas	38
8. Conclusión	42
9. Perspectivas	43
10. Bibliografía	44
11. Resumen biográfico	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de las combinaciones de PCL, NHAP y extracto de lúpulo de las membranas de nanofibras obtenidas. Se resaltan las seleccionadas para su posterior análisis.	24
Tabla 2. Diámetros de las nanofibras obtenidas con los distintos parámetros de electrohilado.....	25
Tabla 3. Datos estadísticos de las membranas analizadas del ensayo de MEB	27
Tabla 4. Se muestran las temperaturas “Onset” y la cantidad de residuo al final del análisis termogravimétrico.....	29
Tabla 5. Pérdida de peso con desviación estándar y valor obtenido de <i>p</i>	33
Tabla 6. Módulo de Young de las muestras utilizadas para los análisis de tensión	35
Tabla 7. Se muestra la media de la fuerza de las muestras analizadas y el valor obtenido de <i>p</i>	36
Tabla 8. Porcentaje de viabilidad de fibroblastos con las distintas membranas elaboradas.	37
Tabla 9. Actividad antibacteriana del control positivo y de la membrana con extracto de lúpulo.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de electrohilado en disposición horizontal	23
Figura 2. Membrana de PCL y NHAP	23
Figura 3. Nanofibras de PCL 9%, a 1000x de magnificación	25
Figura 4. Fibras de PCL 9% y NHAP 3%, a 2000x	26
Figura 5. Nanofibras de PCL 9%, NHAP 3% y extracto 3%, a 2000x	27
Figura 6. Curva termogravimétrica de la PCL.....	28
Figura 7. Curva termogravimétrica de la PCL con NHAP.....	29
Figura 8. Curva termogravimétrica de la PCL, NHAP y extracto	29
Figura 9. Espectro infrarrojo con los grupos característicos de la PCL	31
Figura 10. Espectro infrarrojo con los grupos característicos de la PCL y la NHAP	31
Figura 11. Espectro infrarrojo de nanofibras con PCL, NHAP y extracto.....	32
Figura 12. Prueba de degradación de la membrana de PCL.....	33
Figura 13. Módulo de Young de la membrana de PCL	34
Figura 14. Módulo de Young de la membrana de PCL y NHAP	34
Figura 15. Membrana de PCL y NHAP en el ensayo de tensión	35
Figura 16. Módulo de Young de la membrana de PCL, NHAP y extracto de lúpulo...	36
Figura 17. Imagen del ensayo de citotoxicidad	37
Figura 18. Fibroblastos observados bajo microscopio óptico a 40x	37

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

PCL: policaprolactona

NHAP: nanohidroxiapatita

EX: extracto de lúpulo

nm: nanómetros

MPa: megapascal

mm: milímetros

mg: miligramos

h: hora

°C: grados centígrados

ml: mililitros

cm: centímetros

MN: peso molecular

Min: minuto

kV: kilovatio

UV: ultravioleta

CO₂: dióxido de carbono

SFB: suero fetal bovino

DMSO: dimetil sulfóxido

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

DMEM: Dulbecco modified Eagles minimal essential medium (por sus siglas en inglés)

SPSS: statistical Package for the Social Sciences

RESUMEN

La regeneración ósea se encarga de estudiar y ofrecer soluciones para reestablecer tejidos óseos dañados o faltantes, la cual cobra importancia debido a la falta de tratamientos efectivos para esta finalidad. La investigación y el uso de los biomateriales va en aumento y de la mano con los estudios en donde se utilizan compuestos naturales que tengan alguna actividad biológica. En esta investigación se utilizó Policaprolactona, Nanohidroxiapatita y *Humulus lupulus*, para realizar membranas poliméricas con potencial en regeneración ósea. Los resultados más relevantes de esta investigación fueron los cambios en las propiedades físicas y químicas de las membranas fabricadas.

El análisis de microscopia electrónica de barrido nos muestra el cambio en el diámetro de las nanofibras elaboradas con PCL, a las electrohiladas además con NHAP y extracto de lúpulo, de 549 nm a 1,102 nm de diámetro; además, en las imágenes obtenidas por microscopia se aprecia que el extracto de lúpulo influye directamente en la morfología de las nanofibras. En el ensayo de tensión también hubo influencia del lúpulo sobre las nanofibras, donde las membranas fabricadas solo con PCL, presentaron una fuerza (MPa) promedio de $1.74 \pm .63$, y las fabricadas con PCL, NHAP y extracto de lúpulo presentaron un esfuerzo de $1.07 \pm .35$. Los ensayos de citotoxicidad confirman que la PCL, la NHAP y el extracto de lúpulo no son tóxicos.

La presente investigación aportó nueva información acerca de la interacción de los compuestos naturales con biomateriales sintéticos. Hacen falta más investigaciones dentro de este campo para seguir desarrollando nuevas mezclas de materiales que sean de utilidad para la biomedicina.

SUMMARY

Bone regeneration is responsible for studying and offering solutions to restore damaged or missing bone tissues, which becomes important due to the lack of effective treatments for this purpose. The research and use of biomaterials is increasing and hand in hand with studies where natural compounds that have some biological activity are used. In this research, Polycaprolactone, Nanohydroxyapatite and *Humulus lupulus* were used to make polymeric membranes with potential for bone regeneration. The most relevant results of this work were the changes in the physical and chemical properties of the manufactured membranes.

The scanning electron microscopy analysis shows the change in the diameter of the nanofibers made with PCL, to the electro-spun in addition to NHAP and hop extract, from 549 nm to 1,102 nm in diameter; In addition, in the images obtained by microscopy, it can be seen that the hop extract directly influences the morphology of the nanofibers. In the stress test, there was also influence of hops on nanofibers, where membranes made only with PCL, had an average force (MPa) of $1.74 \pm .63$, and those made with PCL, NHAP and hop extract presented an effort of $1.07 \pm .35$. Cytotoxicity assays confirm that PCL, NHAP and hop extract are not cytotoxic against human fibroblasts.

The present research provided new information about the interaction of natural compounds with synthetic biomaterials. More research is needed within this field to continue developing new mixtures of materials that are useful for biomedicine.

1. INTRODUCCIÓN

En el campo de la medicina regenerativa, que es la que se encarga de estudiar y ofrecer soluciones para reestablecer tejidos dañados o faltantes, se encuentra la regeneración ósea, la cual es importante después de una fractura, pérdida de hueso o extracción dental, en donde queda una insuficiencia ósea para reestablecer el tejido perdido o faltante. El hueso es el único tejido del organismo capaz de regenerarse, permitiendo la restitución del mismo en el lugar donde ha sido afectado.

Dentro de la regeneración ósea se encuentran tratamientos para regenerar el hueso maxilar o mandibular, el cual cobra importancia ya que los tratamientos actuales para regeneración ósea maxilar no son lo suficientemente eficientes para la restitución del mismo en el lugar en donde el hueso se ha visto afectado por distintas causas. Actualmente, al sufrir pérdida ósea maxilar se utilizan implantes dentales para sustituir el hueso dental perdido; sin embargo, los utilizados hoy en día no estimulan la regeneración de hueso y pueden traer consigo posibles infecciones bacterianas.

Es por estos padecimientos y a la ineficiencia de los tratamientos actuales para regeneración ósea que el uso y las investigaciones en el campo de los biomateriales para regeneración de tejidos es una tendencia que va al alza debido al gran potencial terapéutico que se ha encontrado en ellos. Un biomaterial se puede definir como cualquier sustancia o combinación de sustancias que no se consideran fármacos o drogas, que se utilizan para el tratamiento de forma indefinida, como parte o en su totalidad de sistemas de gestión, mejora o reemplazo tejidos, órganos o funciones del cuerpo que están en contacto con los fluidos y tejidos biológicos.

Tal es el caso de la hidroxiapatita nanoparticulada (NHAP), mineral encontrado de manera natural en huesos y dientes que es utilizado hoy en día para fabricar andamios o “scaffolds” que sirven como matrices para la regeneración tisular. Otro material empelado para el mismo fin es la policaprolactona (PCL), la cual se ha empleado para elaborar soportes terapéuticos y matrices con el propósito de sembrar células madre en ellas para su diferenciación y aplicación en la regeneración de tejidos *in vivo*.

Estos materiales son biocompatibles y no presentan toxicidad, por lo que su uso en humanos es frecuente en la actualidad.

Dentro del proceso de la regeneración de un tejido está presente la posibilidad de infección bacteriana, por lo que es importante prever esta posible complicación administrando un compuesto antibiótico para combatir la infección.

En la medicina tradicional, el mundo vegetal ha constituido una importante fuente para la búsqueda de nuevos productos de interés en el ámbito terapéutico. En la actualidad, la búsqueda por compuestos bioactivos ha ganado terreno en explorar nuevas alternativas para la obtención de metabolitos procedentes de fuentes naturales que actúen en contra de enfermedades en el humano o que tengan propiedades farmacológicas de interés, como actividad antimicrobiana, antiviral y antineoplásica.

En el presente estudio se utilizará el extracto de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) incorporado a una membrana polimérica de PCL y NHAP para evaluar la actividad antibacteriana contra los patógenos orales *Streptococcus mutans* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Pérdida ósea

Dentro de las causas de la pérdida ósea dental se pueden enlistar distintos factores determinantes, combinados con múltiples causas, que pueden resultar en la pérdida ósea gradual o directamente en un evento traumático. Entre las causas más frecuentes de pérdida ósea se encuentra la enfermedad periodontal, la cual es el padecimiento número uno en causas de pérdida de piezas dentales.

Recientemente, los datos epidemiológicos demuestran una creciente tendencia a la pérdida de dientes debido a enfermedad periodontal. Actualmente, es la enfermedad número uno que causa la pérdida de dientes en adultos, y además causa degeneración de los tejidos óseos circundantes. En México se ha presentado algún estadio de enfermedad periodontal en hasta 70% de la población, siendo la prevalencia en adultos mayores de 65 años. Los tratamientos periodontales van desde los \$10,000 hasta los \$30,000 pesos por persona.

La periodontitis ocurre cuando la inflamación o la infección de las encías (gingivitis) se deja que avance sin tratamiento. La infección e inflamación se diseminan desde la encía (gingiva) hasta el ligamento periodontal y al hueso circundante, que sirven de soporte a los dientes. La pérdida de soporte hace que los dientes se aflojen y finalmente se caigan.

La placa y el sarro se acumulan en la base de los dientes. La inflamación a raíz de esta acumulación hace que entre la encía y los dientes se formen bolsas que se llenan de sarro y de placa. La inflamación del tejido blando atrapa la placa en la bolsa. La inflamación continua lleva al daño de los tejidos y el hueso alrededor del diente. Debido a que la periodontitis es una enfermedad infecciosa donde participan múltiples bacterias, es muy común el desarrollo de abscesos dentales. Esto también causa un incremento en la tasa de la destrucción ósea (Kawar et al. 2011).

La periimplantitis es la infección de los tejidos blandos y óseos circundantes al área en donde se ha colocado un implante dental. Al igual que en la periodontitis, las bacterias secretan toxinas que en combinación con las defensas naturales del cuerpo contra la infección empiezan a destruir el hueso y el tejido conjuntivo, provocando que se degrade el hueso en el área donde se ha realizado el implante, imposibilitando una nueva cirugía que lo reemplace.

2.2 Regeneración ósea

El hueso es un tejido dinámico en constante formación y reabsorción, que permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo fosfocálcico. Este fenómeno equilibrado denominado proceso de remodelado permite la renovación de un 25% de tejido óseo al año. El balance entre la reabsorción y la formación ósea está influido por una serie de factores interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales (Fernández et al. 2005).

El hueso es un tejido conectivo especializado, y los osteoblastos son las células principalmente responsables de su formación. Se encuentran en las superficies óseas, donde se depositan activamente a la matriz ósea orgánica y controlan su mineralización. La diferenciación de los osteoblastos a partir de células osteoprogenitoras depende de la liberación o de la presencia de factores que inducen o promueven el crecimiento óseo, dentro de los cuales están las proteínas y factores de crecimiento óseo, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento similar a la insulina y factor de crecimiento de fibroblastos.

La regeneración se puede dividir en tres fases principales: inflamación, reparación y remodelación. Este proceso se inicia a las pocas horas hasta varios días después de la lesión ósea y dura alrededor de 4-8 semanas, mientras que la mineralización del callo, formado de la deposición de células osteoblásticas en el lugar de la lesión, y la formación de tejido óseo no organizado puede tomar un adicional de 2-

4 meses. Esta progresión de acontecimientos de curación establece una base para la formulación de los principios de la regeneración ósea guiada y la osteogénesis por distracción.

La ingeniería de tejidos Regenerativa (RTE) puede definirse como un proceso de combinación de las células vivas con andamios biocompatibles para generar un sustituto biológico capaz de sostenerse por sí mismo y de su integración con tejido nativo funcional (Miura et al. 2003).

Una nueva alternativa para los procedimientos de regeneración ósea es utilizar el enfoque de ingeniería de tejidos que se aplica a construcciones de andamios sintéticos para la formación de tejido *in situ*. Los andamios sintéticos ideales deben cumplir los siguientes criterios: propiedades biocompatibles y osteoinductivas para estimular el crecimiento de los huesos, soporte mecánico temporal en las áreas de defectos, tasa de degradación adecuada para que coincida con el crecimiento óseo, y la estructura porosa para permitir la penetración celular y el crecimiento óseo. En los humanos el periodo de formación de hueso nuevo va de 3 a 6 meses en condiciones normales.

2.3 Andamios (scaffolds)

Un andamio (scaffold) es un soporte o armazón 3D que sirve como una matriz para la proliferación y migración celular por un periodo finito de tiempo. Los andamios pueden ser fabricados en formas y materiales predeterminados, y pueden ser provistos de factores de crecimiento para ayudar en el crecimiento celular (Demarco et al. 2011). La función del andamio es dirigir el crecimiento celular, ya sea de los tejidos adyacentes o de las células sembradas en él. Para ello, el material debe proveer una adecuada adhesión celular, y en ciertos casos debe favorecer la migración celular

La organización de la estructura 3D de la región afectada debe ser estudiada para que sea posible elaborar andamios apropiados al tamaño del defecto existente. Una vez que el andamio se implanta en el tejido vivo, debe ser avalada la interacción de los

materiales con la región dañada (Ribeiro 2012).

En la medicina regenerativa, un andamio debe mantener su estructura en la etapa inicial después de la implantación y proveer una matriz ideal para la estimulación celular (Pan y Ding 2012).

Se han utilizado polímeros naturales y sintéticos para la elaboración de andamios, siendo los polímeros naturales los que brindan una mayor biocompatibilidad. Los polímeros sintéticos tienen la característica de poder ser manipulados fácilmente en sus propiedades físico-químicas, como absorción, microestructura y propiedades mecánicas.

La porosidad es una característica importante que deben tener los andamios ya que en los poros es donde van incorporados los factores que van a potenciar o a estimular la regeneración celular. Generalmente los factores que se utilizan son moléculas bioactivas como proteínas, factores de diferenciación y de crecimiento, células madre y compuestos como hidroxiapatita, colágeno, etc. El comportamiento celular y la formación de tejido nuevo va a depender del tamaño y cantidad de poros presentes en el andamio y que contengan un factor de crecimiento celular. (Demarco et al. 2011).

Demarco et al. 2011, reportan la diferenciación de células madre embrionarias a osteoblastos en un modelo *in vitro*, utilizando andamios de PLA (ácido poliláctico) como matriz incorporados con células madre de pulpa dental.

En los modelos *in vivo* se han utilizado andamios para la regeneración ósea. Lee et al. 2010, realizaron la regeneración ósea de una articulación de conejo empelando un andamio de PLA; el andamio previamente había sido sembrado con células óseas para su posterior implantación y regeneración del hueso del conejo.

Los andamios pueden ser elaborados con distintos materiales. Modulevsky et al. 2014, elaboraron un andamio con celulosa para el crecimiento de células musculares en

un modelo *in vitro*, demostrando la amplia variedad de materiales con los que se pueden elaborar andamios.

2.4 Biomateriales para elaboración de andamios

La primera aplicación de biomateriales en medicina no se produce hasta 1860 con la introducción de las técnicas quirúrgicas asépticas. A principios de 1900 se aplican las primeras placas óseas hechas de metal con la finalidad de separar roturas o fracturas. Durante los siguientes años las aleaciones metálicas constituyen la única forma de biomateriales en uso. Sus aplicaciones se extienden desde reparaciones óseas hasta sistemas de liberación de medicamentos. No es hasta la Segunda Guerra Mundial que se produce un rápido avance en la ciencia de los polímeros, principalmente enfocado a las aplicaciones médicas. El poli metilmetacrilato (PMMA) fue uno de los primeros polímeros utilizados como material biomédico, aplicándose como material para reparar la córnea humana (Robinson et al. 2001).

Los biomateriales utilizados para andamios e interacción directa con tejido biológico deben cumplir con propiedades biológicas, físicas, químicas y mecánicas aptas para procesos de locomoción y adhesión celular, con baja o nula toxicidad, promoción celular, estabilidad a la degradación y un adecuado comportamiento térmico (Soria y González 2009)

Para la elaboración de andamios se utilizan materiales naturales y/o sintéticos, dependiendo de las condiciones de la aplicación en donde se va a utilizar. Dentro de los materiales naturales más utilizados se encuentran:

Colágeno, el cual es una de las proteínas más abundantes en la naturaleza y es el responsable de mantener la integridad estructural de los tejidos. Ha sido utilizado en el diseño de sustitutos de piel y en la creación de redes capilares subdérmicas. Su uso se ha extendido a la producción de otros tejidos, como vasos sanguíneos, ligamentos y bronquios. Además, el colágeno es utilizado para reparar daños o traumas químico-

mecánicas de piel o mucosas y en general, favorece la regeneración íntegra de la piel en heridas profundas, permitiendo el restablecimiento en cortos periodos de tiempo (Colorado et al. 2013).

La fibroína es una seda cada vez más estudiada en aplicaciones biomédicas, dada su biocompatibilidad, lenta biodegradabilidad y propiedades mecánicas que combinan peso ligero, alta resistencia y notable dureza y elasticidad. La seda fibroína en varios formatos (películas, fibras, redes, mallas, membranas, hilos, y esponjas) se utiliza para apoyar la adhesión de las células madre, la proliferación y diferenciación in vitro y para promover la reparación de una amplia gama de tejidos in vivo como cartílagos artificiales, fragmentos de tejido óseo, vasos sanguíneos, tejido epitelial y tejido nervioso óseos (Kon'kov et al. 2010).

El polímero quitosano, también llamado “chitosán” o “quitosán” es un material bioadhesivo, biocompatible y biodegradable, ampliamente utilizado en el campo de la biomedicina. Sus propiedades le permiten aplicaciones en encapsulación de células, transporte de principios activos a través de las superficies epiteliales, cultivo celular, reparación de cartílago y reconstrucción de huesos (Boucard et al. 2007). En mezcla con algodón, se ha encontrado como acelerador de cicatrización de las heridas, es presentado como un material ideal para la ingeniería de tejidos, de fácil manejo, transferencia y aplicación. Sin embargo, su baja porosidad se opone a cualquier migración de las células vivas a lo largo de su estructura (Mizuno et al. 2003).

Un beneficio de los biomateriales sintéticos es que reducen al mínimo la capacidad de contaminación, además de presentar características modificables para programar la liberación de principios activos. El mayor beneficio de los biomateriales sintéticos es que pueden ser diseñados para satisfacer necesidades específicas. Dentro de los materiales sintéticos, los más utilizados a nivel biomédico son los polímeros tales como:

Los Poliuretanos (PU), han sido ampliamente utilizados en varios productos por

la diversidad de sus tecnologías de procesamiento y de sus propiedades (Jiménez 2015)

El ácido poli-L-láctico (PLLA), el ácido láctico-co-glicólico (PLGA) y el ácido glicólico (PGA) son un tipo de polímeros biocompatibles de degradación por hidrólisis y aprobados por la FDA (Food and Drugs Administration) para determinadas aplicaciones médicas (Jiménez 2015).

La policaprolactona (PCL) es un poliéster biodegradable usado comúnmente para la fabricación de andamios, el cual puede ser utilizado en una amplia gama de aplicaciones médicas. Es un biomaterial biocompatible y biodegradable, ha sido utilizado como material de soporte o matriz para la fabricación de andamios con elementos bioactivos (Hajjali et al. 2018). Es un biomaterial ampliamente utilizado en aplicaciones para la regeneración tisular gracias a su facilidad de manipulación, capacidad de mezclarse con otros biomateriales y a la variedad de distintas técnicas de elaboración de andamios en que puede ser aplicado (Janmohammadi y Nourbakhsh 2019).

2.5 Policaprolactona (PCL)

La Policaprolactona (PCL) se obtiene de la polimerización de la caprolactona. Es un poliéster alifático con punto de fusión de 60°C, biodegradable y reabsorbible en el cuerpo humano. Se ha utilizado en soluciones con otros polímeros y biomateriales como la hidroxiapatita. Su alta capacidad de manipulación y la amplia variedad de aplicaciones en que puede ser utilizada hace que cobre relevancia en el campo de la investigación con biomateriales (Mohamed y Yusoh 2015).

Como biopolímero, la policaprolactona se ha posicionado como un material con alto potencial comercial para aplicaciones biomédicas debido a su tasa de degradación, la cual puede ocurrir en unos cuantos años después de cumplir su función (Murray et al. 2015).

La degradación de la policaprolactona se lleva a cabo por hidrólisis en los enlaces éster de las cadenas del polímero, y puede tomar más tiempo del que se requiere para alguna aplicación en específico. La velocidad de degradación depende del peso molecular de la policaprolactona, la cual puede ir desde 30,000 hasta 90,000 g/mol, también depende de la cristalinidad, entre mayor sea, menor solubilidad, y viceversa (Temtem et al. 2008). Es por esto que se han realizado experimentos y mezclas con otros polímeros y sustancias para disminuir el tiempo de degradación y ampliar la gama de aplicaciones de la policaprolactona (Taghizadeh y Favis 2013).

La accesibilidad de costos y la facilidad de manipulación de los tiempos de degradación de la policaprolactona la hacen atractiva para aplicaciones de liberación de fármacos, y es una de las aplicaciones en donde ya se están utilizando matrices de PCL junto con compuestos activos (Armentano et al. 2010). Otras aplicaciones de la policaprolactona son la fabricación de suturas, recoberturas de heridas y andamios para regeneración ósea dental (Sowmya et al. 2013), también se ha utilizado con extractos naturales para aplicaciones en regeneración de tejidos (Jin et al. 2013).

En electrohilado, la policaprolactona se ha utilizado en la fabricación de andamios junto con otros materiales, como la hidroxiapatita, para la manufactura de membranas poliméricas que sean biofuncionales para aplicaciones de regeneración ósea guiada de maxilares. Sunandhakumari et al. 2018, fabricaron una membrana de PCL, hidroxiapatita y cristal bioactivo para la aplicación clínica en hueso maxilar. Se obtuvo que la membrana no presentó toxicidad, presentó características físicas y químicas acorde a las propiedades de los materiales y se tomó como un prototipo para una membrana final con aplicación en regeneración ósea guiada de hueso maxilar. En otro estudio, Han et al. 2015, fabricaron una membrana de PCL, hidroxiapatita y colágeno para la regeneración de cartílago de conejo, la cual presentó buena citocompatibilidad y permitió la proliferación de osteoblastos de conejo en un modelo *in vitro*.

2.6 Hidroxiapatita (HAP)

A partir de la década de los 70s, se comenzó a estudiar el uso y aplicaciones de la hidroxiapatita como un material osteoconductor, o sea que induce a la formación de hueso nuevo. En la actualidad se utiliza HAP obtenida de hueso bovino, autólogo o hidroxiapatita sintética (Hernández et al. 1998).

La hidroxiapatita (HAP) es un material de la familia de los fosfatos cálcicos, utilizada en cirugías ortopédicas, dentales y maxilofaciales como sustituto de hueso o como ayuda a la regeneración del mismo después de una intervención quirúrgica (Balamurugan et al. 2008).

En distintas investigaciones de ingeniería de tejidos se ha utilizado la hidroxiapatita como componente de los andamios elaborados para los estudios de regeneración tisular. Es utilizada debido a que es un componente natural de los huesos y dientes y ha sido combinada con compuestos como alginatos, quitina, pululano, quitosan, ácidos poliláctico y poliglicólico (Ito et al. 2005).

La bio-compatibilidad que presenta la HAP le permite ser un material de frecuente uso dentro de las distintas formas en las que se puede utilizar, como gránulos, andamios y bloques, los cuales son utilizados de manera clínica y experimental. Este material permite realizar matrices porosas, las cuales permiten la migración celular, paso de nutrientes y vascularización de los tejidos en formación (Hong et al. 2011).

Ribeiro 2012, elaboró una matriz utilizando hidroxiapatita, fosfato tricálcico y sacarosa como agente porogénico, para su aplicación en ingeniería tisular utilizando células óseas.

La nano-hidroxiapatita (nHAP) tiene la característica de integrarse y restaurar la superficie ósea de mejor manera que la hidroxiapatita convencional, por lo que resulta mejor opción para aplicarse en tratamientos de regeneración ósea. (Balamurugan et al. 2008). Fricain et al. 2013, realizaron un estudio de regeneración femoral utilizando andamios incorporados con nHAP. Los resultados arrojaron que las muestras tratadas

con matrices incorporadas con nHAP presentan diferencia significativa en cuanto a la densidad y al contenido mineral en comparación con las que no fueron tratadas.

La hidroxiapatita nano-particulada es una cerámica que se ha utilizado en andamios para aplicaciones biomédicas. Es un material biocompatible que permite la osteoconducción y osteogénesis en el tejido óseo (Luong et al. 2008). La hidroxiapatita nano-particulada se incorpora a polímeros biodegradables para formar andamios nanocompuestos con distintas propiedades fisicoquímicas para incorporarse en procesos de regeneración ósea (Luong et al. 2008). Se ha aplicado en tratamientos para regeneración ósea con biomateriales como quitina, colágeno, ácido poliláctico, policaprolactona, poliuretano, entre otros (Venkatesan y Kim 2014).

2.7 Técnicas para la elaboración de andamios

Las técnicas usadas en la manufactura de andamios (scaffolds) son dependientes de las propiedades del material y del tipo de aplicación final. Los andamios pueden ser fabricados mediante polímeros, metales, cerámicos o materiales compuestos. Es importante saber las propiedades del tejido que se vaya a reemplazar, ya que dependiendo de sus propiedades será el tipo de material a usar para la fabricación del andamio (Hernández 2006).

Las matrices poliméricas nanoporosas o nanofibrosas pueden ser fabricadas a través de casting, separación de fases, saturación con gas, disolución y colada con liberación de partículas, laminación de membranas, liofilización, impresión en 3D, unión de fibras y electrospinning. Cada técnica de elaboración le confiere al andamio características estructurales diferentes, por lo que es muy importante elegir la técnica correcta según la aplicación final del andamio.

Casting es una técnica sencilla que consiste en disolver el polímero en un solvente orgánico. La solución polimérica es colocada en un molde hasta alcanzar consistencia de gel. Seguidamente el gel es procesado mediante diferentes

concentraciones de acetona, etanol y agua para así obtener una estructura microporosa (Coombes y Heckman 1992).

La separación de fases es un proceso en el cual el polímero se disuelve en un solvente como el dioxano a una temperatura baja. La separación líquido-líquido y luego sólido-líquido es inducida al bajar la temperatura de la solución. Subsecuentemente se elimina el solvente solidificado por medio de la sublimación del mismo dejando así el andamio polimérico. La concentración del polímero y la estrategia de enfriamiento juegan un papel fundamental en la morfología final de los poros (Nam y Park 1999). La liofilización es similar a la separación de fases, consiste en liofilizar soluciones congeladas del polímero con ácido acético glacial o benceno. La morfología de los andamios depende notablemente del polímero y del solvente.

Saturación con gas. Consiste en someter a los polímeros, previamente prensados, los cuales son expuestos a altas presiones con CO₂. Al reducir la presión, se crea una inestabilidad en el polímero, lo cual genera una nucleación y permite que el CO₂ atrapado en el polímero salga y forme los macroporos. La ventaja de este método es que no se utilizan solventes orgánicos, pero la mayor desventaja es que la superficie es poco porosa y algunos poros quedan atrapados en el interior (Mooney et al. 1996).

Disolución y colada con liberación de partículas. En este método, se incorpora a la solución polimérica una proporción determinada de partículas minerales u orgánicas. La mezcla es luego colada en un molde donde el solvente se evapora o puede ser procesada por secado en frío. Una vez evaporado el solvente, las partículas son disueltas en agua dejando a su paso los diferentes poros. Con esta técnica se pueden conseguir porcentajes de porosidad bastante elevados. El tamaño de los poros dependerá de las partículas utilizadas (Wake et al. 1996).

La técnica de laminación de membranas consiste en la utilización de diferentes films porosos generalmente obtenidos a partir de la técnica de disolución y colada con liberación de partículas, y colocados uno sobre otro unidos con la ayuda de la

impregnación con cloroformo en la superficie, para obtener estructuras tridimensionales de forma compleja (Mikos et al. 1993).

La impresión 3D es un proceso que permite crear objetos tridimensionales sólidos a partir de un modelo digital utilizando procesos aditivos con aporte de material de modo que el objeto va creándose mediante capas sucesivas de dicho material (Arráez, et al. 2014). Es un conjunto de tecnologías para la reproducción física capa a capa de prototipos y piezas personalizadas mediante software especializado. La técnica de impresión tridimensional puede ser empleada para la fabricación de andamios de biomateriales usados en la ingeniería de tejidos (Rios et al. 2013).

Unión de fibras. Consiste en la elaboración de redes interconectadas mediante la unión de fibras. Para esto se utilizan dos polímeros diferentes como el PLA y el PGA. Las fibras del PGA son alineadas con la forma final de la estructura deseada, y son embebidas en una solución de PLA/cloruro de metileno. Después de la evaporación del solvente, los polímeros son calentados por encima de su temperatura de fusión. Finalmente, el PLA es disuelto en cloruro de metileno, dejando las fibras de PGA unidas de forma tal que forman una estructura porosa (Mikos et al. 1993).

2.8 Electrohilado (Electrospinning)

El electrohilado (e-spinning) es una técnica altamente versátil con la que se pueden procesar mezclas de polímeros y realizar fibras de distintos diámetros, desde micrómetros hasta nanómetros. Esta técnica es aplicable a prácticamente cualquier polímero o mezcla de polímeros de los cuales se deseen obtener fibras para su caracterización o para la elaboración de productos derivados del polímero con el cual se elaboran las fibras. Además de polímeros, también se pueden electro hilar mezclas que contengan enzimas, bacterias, metabolitos secundarios, entre otros compuestos capaces de incorporarse a los polímeros (Greiner y Wendorff 2007).

El fundamento del electrohilado se basa en la atracción de polímeros desde un

contenedor o inyector conectado a una terminal de carga positiva, hasta un colector metálico conectado a una terminal de carga negativa. Ambas terminales son alimentadas por voltaje, provocando la atracción de las mismas y atrayendo al polímero hacia la superficie colectora. En la actualidad, se han desarrollado distintas variantes del electrohilado, como el roto electrohilado o las técnicas de hilado al vacío o con condiciones de humedad controlada (Greiner y Wendorff 2007).

Los primeros dispositivos para distribuir líquidos a través de cargas eléctricas fueron patentados por Cooley y Morton, en 1902 y 1903. Fue hasta 1934 cuando Anton Formhals describió la técnica del electrohilado con plásticos y sentó las bases del electrohilado moderno. En 1970 se patentó el uso del electrohilado para la producción de fibras menores a una micra.

Las nanofibras creadas por electrohilado son fuente de estudio para la regeneración de tejidos como piel, hueso, cartílago, pulmón, vasos sanguíneos y tejido cardíaco. Uno de los objetivos en el uso de las nanofibras es crear matrices que permitan el anclaje, migración y proliferación de células para reproducir el tejido a ser reemplazado o regenerado (Greiner y Wendorff 2007).

Li y Tuan 2009, elaboraron un andamio de nanofibras de PLLA a través del método de electrohilado. Utilizaron condrocitos en un modelo in vitro para evaluar la proliferación celular y su potencial aplicación en ingeniería de tejidos.

Actualmente, esta es la única técnica que es aplicada para la elaboración de fibras de manera continua a escalas nanométricas.

2.9 *Humulus lupulus* L.

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es una planta perteneciente a la familia Cannabaceae, nativa de Europa, Asia occidental y Norteamérica. Una de las principales aplicaciones del lúpulo, y el más conocido, es como ingrediente que le da el sabor

amargo a la cerveza. Esta planta tiene propiedades sedantes, y se utiliza para calmar los trastornos nerviosos como la ansiedad, insomnio, dolor de cabeza producida por tensión, espasmos nerviosos, rigidez muscular, estrés y anomalías que corresponden a motivos psicológicos. Además, se utiliza para tratar alteraciones estomacales generadas por motivos psicológicos, como la indigestión o la acidez estomacal. Favorece la secreción de jugos gástricos y se ha empleado como aperitivo. En los hombres, esta planta actúa como anafrodisíaco, ya que aumenta la cantidad de estrógenos; por otra parte, favorece la producción de esta hormona en las mujeres. El fruto se utiliza para tratar úlceras, quemaduras e inflamaciones externas.

El lúpulo también se ha utilizado en investigaciones para evaluar sus propiedades antimicrobianas. Bhattachayra et al. 2003, reportan actividad del extracto contra estreptococos orales, en especial *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* y *S. salivarius*, con una concentración mínima inhibitoria de entre 2 a 50 µg/ml, dependiendo del microorganismo. En el mismo estudio, se comparó al lúpulo en contra de compuestos como el timol, nerol, aceites esenciales de canela y clavo, eucaliptol y mentol, siendo el lúpulo el que mostró mejores resultados antimicrobianos.

Rozalski et al. 2013, reportan la capacidad antiadherente y la capacidad antibiofilm del lúpulo en contra de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, ambas gram positivas. Este estudio tiene especial relevancia debido a que *Streptococcus mutans*, patógeno oral, también es una bacteria gram positiva, por lo que no se descarta que el lúpulo presente el mismo efecto antiadherente y antibiofilm al exhibido en el citado estudio.

Tharakan y Lakshmi, en 2013, reportan la actividad antimicrobiana del lúpulo en contra de patógenos orales como *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*. Además, también reportan que los polifenoles contenidos en los extractos del lúpulo tienen propiedades que los hacen ideales para realizar experimentos en otros patógenos orales como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, uno de los principales patógenos de la enfermedad periodontal.

Algunos compuestos del extracto de *Humulus lupulus*, como el Xanthohumol, han sido utilizados como antibacterianos, antiinflamatorios y antisépticos (Bocquet et al. 2018). Además, compuestos del lúpulo han sido empleados para la elaboración de mallas de electrohilado para evaluar sus propiedades físicas y químicas (Qiao et al. 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

Los avances y el desarrollo experimentado en los últimos años en el campo de la nanotecnología ha permitido un notable crecimiento tecnológico en otras áreas de la ciencia que evolucionan paralelamente estableciendo relaciones sinérgicas. Tal es el caso de la ingeniería de tejidos. Uno de estos avances es la técnica de electrohilado, la cual permite la generación de andamios y membranas nanoestructurados para su aplicación en diversos campos de la medicina.

La utilización de estas técnicas es de vital importancia para el desarrollo de nuevos tratamientos y para aplicaciones en donde el cuerpo no es capaz de regenerar por sí mismo los tejidos dañados. Los tratamientos actuales para la regeneración ósea no son lo suficientemente efectivos para recuperar el hueso después de una lesión. Es por esto que la investigación a partir de nanotecnología y el diseño y uso de biomateriales con propiedades físico-químicas con capacidad de ser procesados a escala micro y nano ha ido en aumento.

La combinación de polímeros de distintas naturalezas, con biocerámicas como la hidroxiapatita resulta en una bioactividad mejorada, con una mayor adhesión y proliferación celular. Por otro lado, la incorporación de compuestos naturales con propiedades antimicrobianas, le otorgan a las membranas la capacidad de enfrentar posibles riesgos de infección, especialmente cuando están expuestas a un tejido infectado o a un área de acceso a bacterias.

En este trabajo se propone el uso de policaprolactona con nanohidroxiapatita, incorporándole extracto de *Humulus lupulus*, aprovechando sus propiedades para la fabricación de membranas nanoestructuradas para su aplicación en regeneración ósea.

4. HIPÓTESIS

Es posible desarrollar membranas de nanofibras incorporando policaprolactona, nanohidroxiapatita y extracto de *Humulus lupulus* utilizando la técnica de electrohilado, para su potencial uso en regeneración de tejidos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Fabricar y caracterizar membranas nanoestructuradas a través del proceso de electrohilado, que presenten actividad antibacteriana y no citotóxica.

5.2 Objetivos específicos

- a) Estandarizar los parámetros de electrohilado.
- b) Elaborar membranas de nanofibras de policaprolactona, nanohidroxiapatita y extracto de lúpulo.
- c) Evaluar la actividad antibacteriana y citotóxica de las membranas obtenidas.
- d) Determinar las características físico-químicas y mecánicas de las membranas obtenidas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Extracto de *Humulus lupulus* L.

El extracto metanólico de flor de *H. lupulus* L. fue donado por el Dr. Luis Damas, de Cervecería Heineken, México. Se conservó a temperatura ambiente en obscuridad hasta su uso.

6.2 Solución polimérica y electrohilado

Se utilizó policaprolactona (PCL, MN= 80,000) y nanohidroxiapatita (NHAP, <200 nm de tamaño de partícula), ambos de Sigma-Aldrich Co., USA.

Se utilizó acetona (Jalmek, SC, México) para preparar las soluciones para electrohilado. Se utilizaron 3 ml de acetona para cada solución, la PCL se utilizó al 9%, mientras que los porcentajes de NHAP y el extracto de lúpulo variaron entre 1, 3 y 5% con el fin de optimizar las mezclas para su posterior análisis. Cada solución se preparó durante 3h a 40°C y con agitación constante de 800 RPM.

Cada solución obtenida de la mezcla de PCL, NHAP y lúpulo se transfirió a una jeringa (BD Plastipak™, USA) dotada de un inyector metálico de punta roma y se inyectó con una bomba (Harvard Apparatus 11 Plus) a un caudal de inyección de 0.4 ml/h, con un voltaje de 25 kV (Gamma High Voltage Research, Inc., EE. UU.) y las fibras se depositaron en un colector de aluminio a 15 cm de distancia.

6.3 Microscopia electrónica de barrido

Para el análisis morfológico de las membranas electrohiladas se procedió a revestir en oro muestras de 5x3 mm de las membranas seleccionadas para el análisis, para esto se utilizó un metalizador Polaron SC7640, Thermo VG Scientific. Una vez concluido este proceso se analizaron las membranas en un microscopio electrónico de barrido Philips XL30 SEM TMP. Las imágenes se analizaron con el software del microscopio para obtener diámetros e imágenes de las nanofibras.

6.4 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico de membranas electrohiladas se llevó a cabo con muestras de 13 mg de las membranas seleccionadas para analizar, se realizó en un horno termogravimétrico TA Q500, en condiciones desde temperatura ambiente hasta 600 °C, 10 °C/ min en atmósfera de N₂. El análisis de las curvas de degradación se llevó a cabo en el software TA Universal Analyzer.

6.5 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Los análisis de FTIR se llevaron a cabo para verificar la presencia los compuestos en las membranas poliméricas, se utilizaron muestras redondas de 5mm de diámetro de membranas de PCL, Nhap y extracto de lúpulo. Los análisis se llevaron a cabo en un Espectrofotómetro FT-IR Spectrum UATR Two, Perkin Elmer, en un rango de 4000 a 400 cm⁻¹. El análisis de los espectros de las membranas se llevó a cabo en el software Origin.

6.6 Prueba de degradación

Los ensayos de degradación fueron realizados de acuerdo con BS EN ISO 10993-13:2010. Se colocaron muestras de 10 mg de fibras electrohiladas, por triplicado, en viales plásticos (Corning®) con 5 ml de PBS a 37°C, con agitación constante durante 8 semanas. Antes de cada lectura de peso, las muestras se lavaron previamente con agua destilada para eliminar los restos salinos y se desecaron por 24 h a 40°C.

El porcentaje de pérdida de peso se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = [P_i - P_f] / P_i \times 100$$

Donde P_i es el peso inicial de la muestra, P_f es el peso de la muestra después del tiempo correspondiente.

6.7 Pruebas de tensión

Los ensayos de tensión se realizaron a temperatura ambiente, en un dispositivo Instron 3365 (Instron, USA) con una celda de carga de 5 N a una velocidad de cruceta o de deformación de 2mm/min. Las probetas de membranas se utilizaron con una medida de 20 x 30 mm, por triplicado. El análisis de las curvas de deformación y del Módulo de Young se llevó a cabo en el software del equipo.

6.8 Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo con la línea celular CCL-116 (fibroblastos humanos) por el método de contacto directo, por triplicado. Las células (1×10^4) fueron sembradas en microplacas de 96 pozos (Corning®) y se incubaron por 24 h a 37°C y atmósfera de CO₂, en medio DMEM con 10% de SFB. Después de 24h de siembra de las células. se colocó una muestra de cada membrana seleccionada de 1 cm de diámetro, por triplicado y un control de fibroblastos sin nanofibras. Después de 24h de incubación, se retiraron las nanofibras de los pocillos, se agregaron 10 µL de MTT y dejó en ensayo en incubación durante 4 h. Después de la incubación de las células con MTT, se retiró el medio con el reactivo y se añadieron 100 µl de DMSO. La microplaca se leyó con un espectrofotómetro de placa Biotek Synergy 2 a 570 nm.

6.9 Pruebas antibacterianas

El ensayo antibacteriano se llevó a cabo por el método de Kirby-Bauer, con discos de 7 mm de nanofibras con lúpulo para probar su actividad antibacteriana contra los patógenos orales *Streptococcus mutans* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Se utilizó medio de Infusión Cerebro Corazón para el ensayo. Los discos de nanofibras fueron esterilizados mediante radiación UV. Se utilizó clorhexidina como control positivo.

6.10 Análisis estadístico

Se analizaron los resultados de los experimentos pertinentes con el programa estadístico SPSS versión 25.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Electrohilado

Las condiciones de electrohilado en donde se obtuvieron membranas de nanofibras óptimas para el estudio fueron en 25 kV, .4 ml de volumen de inyección y colector a 15 cm de distancia del inyector de solución. En la **Figura 1** se aprecia el acomodo del electrohilado horizontal. En la **Figura 2** se aprecia una membrana electrohilada de PCL y NHAP.

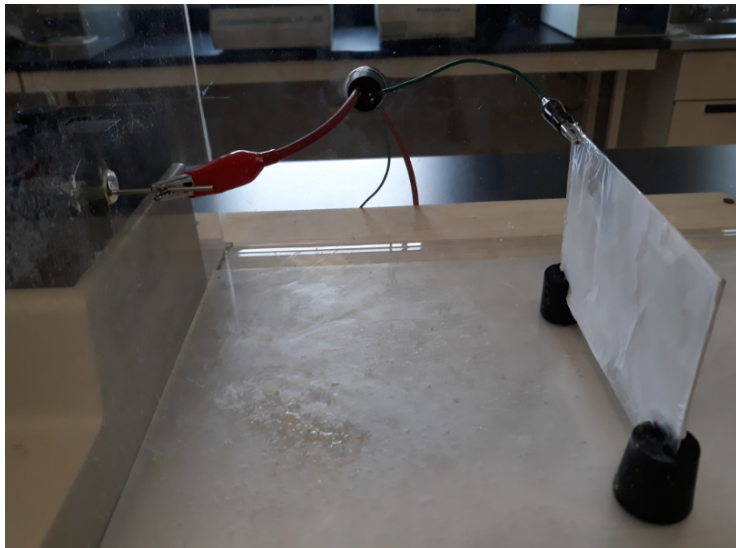


Figura 1. Sistema de electrohilado en disposición horizontal.

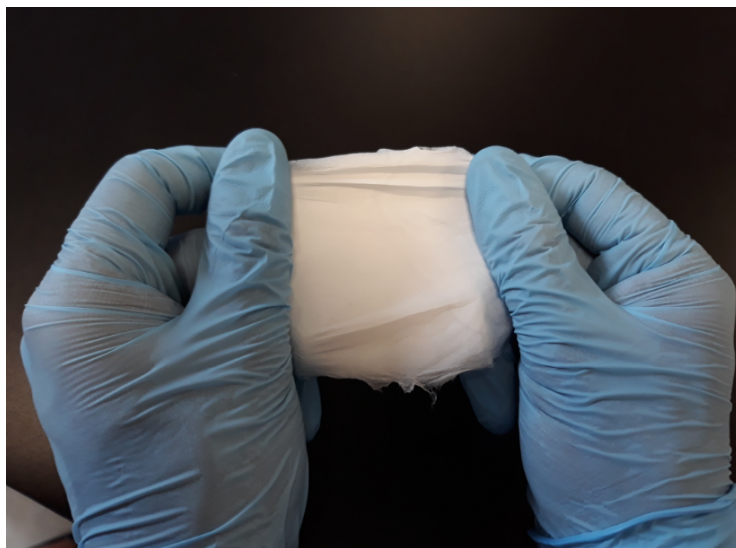


Figura 2. Membrana de PCL y NHAP.

Con las variables que se tenían de PCL, NHAP y lúpulo, se obtuvieron 13 combinaciones de soluciones poliméricas (**Tabla 1**), de las cuales solo 3 fueron seleccionadas para llevar a cabo los experimentos de caracterización. Las membranas seleccionadas fueron las elaboradas con PCL 9%, NHAP 3% y extracto de lúpulo 3%. Esto debido principalmente a la reproducibilidad de las nanofibras con los parámetros seleccionados de voltaje, distancia del colector y velocidad de inyección de las soluciones poliméricas. Además, los análisis de MEB nos muestran que con esta combinación obtenemos fibras con formas homogéneas a comparación que con el resto de las combinaciones elaboradas.

Tabla 1. Parámetros de las combinaciones de PCL, NHAP y extracto de lúpulo de las membranas de nanofibras obtenidas. Se resaltan las seleccionadas para su posterior análisis.

Parámetros de soluciones poliméricas
PCL 9%
PCL 9% - NHAP 1%
PCL 9% - NHAP 1% - EX 1%
PCL 9% - NHAP 1% - EX 3%
PCL 9% - NHAP 1% - EX 5%
PCL 9% - NHAP 3%
PCL 9% - NHAP 3% - EX 1%
PCL 9% - NHAP 3% - EX 3%
PCL 9% - NHAP 3% - EX 5%
PCL 9% - NHAP 5%
PCL 9% - NHAP 5% - EX 1%
PCL 9% - NHAP 5% - EX 3%
PCL 9% - NHAP 5% - EX 5%

7.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Con el análisis de las membranas a través de microscopia electrónica de barrido se obtuvieron los promedios de los diámetros de las 13 combinaciones obtenidas, sin embargo, como se mencionó en el apartado anterior, solo tres combinaciones de nanofibras fueron seleccionadas para los posteriores análisis. En la **Tabla 2** se muestran los parámetros y los diámetros (en nanómetros) obtenidos a través del software del microscopio electrónico.

Tabla 2. Diámetros de las nanofibras obtenidas con los distintos parámetros de electrohilado.

Parámetro de soluciones poliméricas	Diámetro (nm)
PCL 9%	549
PCL 9% - NHAP 1%	634
PCL 9% - NHAP 1% - EX 1%	565
PCL 9% - NHAP 1% - EX 3%	860
PCL 9% - NHAP 1% - EX 5%	721
PCL 9% - NHAP 3%	681
PCL 9% - NHAP 3% - EX 1%	582
PCL 9% - NHAP 3% - EX 3%	1,102
PCL 9% - NHAP 3% - EX 5%	953
PCL 9% - NHAP 5%	777
PCL 9% - NHAP 5% - EX 1%	705
PCL 9% - NHAP 5% - EX 5%	832

De acuerdo a lo observado con el microscopio electrónico de barrido, se encontró que el diámetro de las fibras varía de acuerdo con la cantidad de extracto y NHAP encontradas en la solución polimérica. En un estudio previo (Chong et al. 2015) se demuestra que el promedio de diámetro de las fibras de PCL sin NHAP es de 478.55 nm, y con NHAP es de 521.1 nm. En esta investigación, el promedio de fibras de PCL sin NHAP y extracto es de 504 nm. En la **Figura 3** se aprecia una imagen de nanofibras de PCL 9% a 1000x.

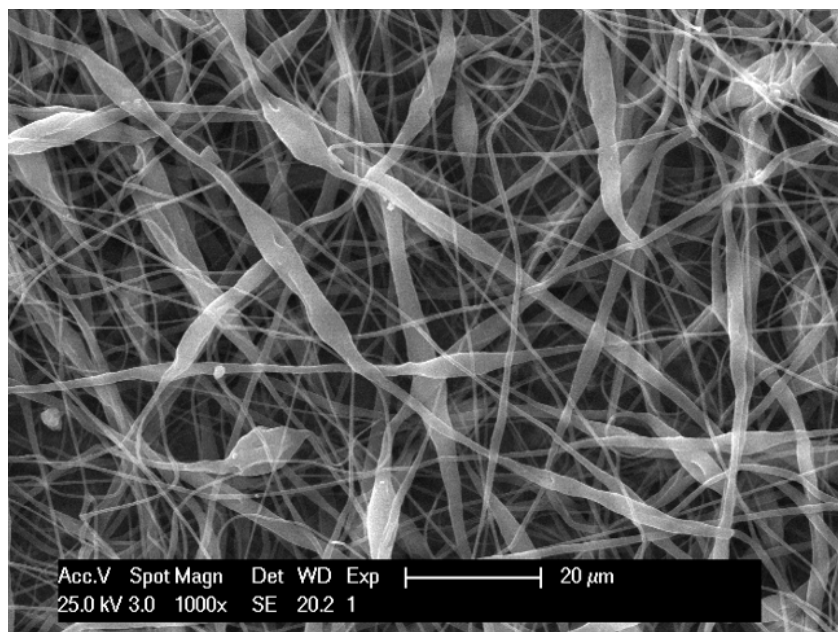


Figura 3. Nanofibras de PCL 9%, a 1000x de magnificación.

La relación entre el diámetro y los porcentajes de los componentes muestra que la presencia de extracto y NHAP aumenta el diámetro de las fibras. Los cambios morfológicos debido a la integración del extracto concuerdan con una investigación (Costa et al. 2013) en donde se observaron cambios en el diámetro de las nanofibras al agregar dos extractos vegetales a la mezcla polimérica. Esto nos da indicios de que el extracto, además de agente biológico, altera físicamente la morfología de las nanofibras, lo que resulta atractivo desde el punto de vista de aditivo para polímeros. La **Figura 4** muestra nanofibras de PCL 9% y NHAP 3%, con sus medidas de diámetro a 2000x.

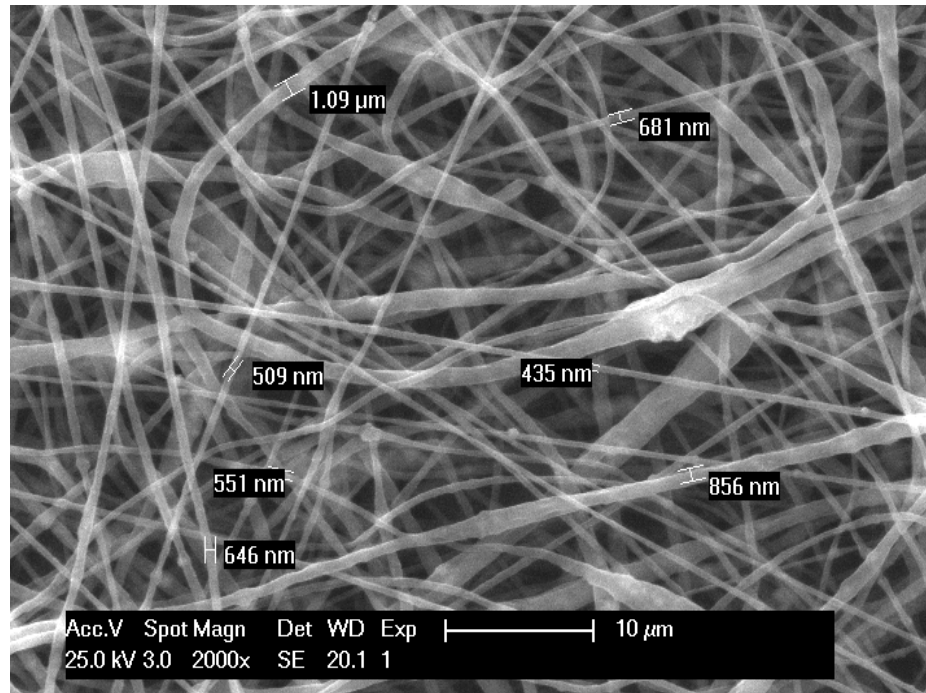


Figura 4. Fibras de PCL 9% y NHAP 3%, a 2000x.

El diámetro y forma de las fibras también es afectado por voltaje, velocidad de flujo, solvente, distancia del colector y viscosidad de la solución polimérica (Sánchez et al. 2013), la cual se ve incrementada por la NHAP y el extracto de lúpulo. La **Figura 5** muestra nanofibras de PCL 9%, NHAP 3% y extracto 3%, a 2000x, en donde las nanofibras presentan un diámetro mayor al presentado solo con PCL y NHAP.

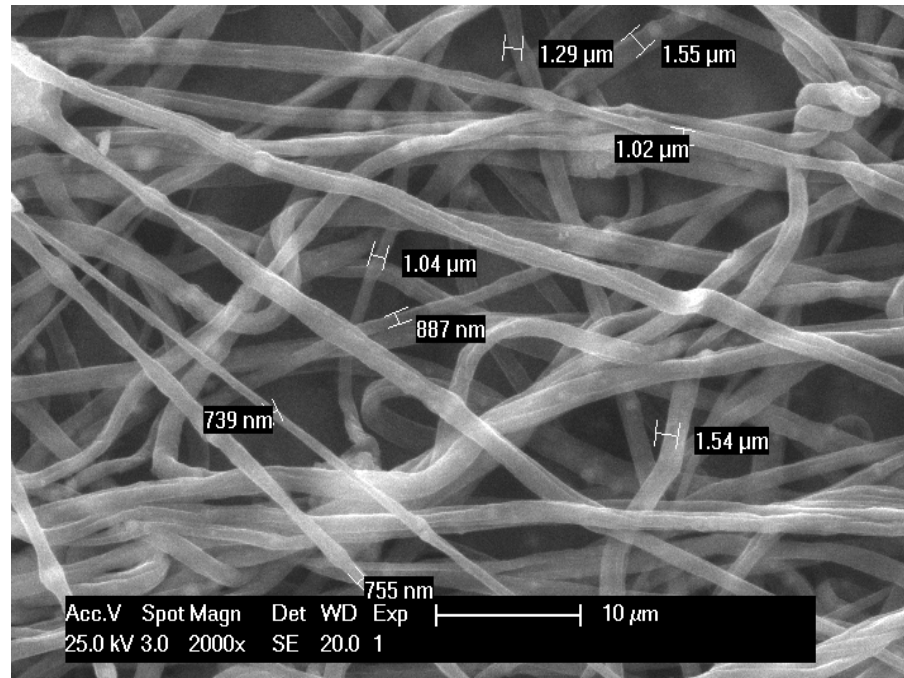


Figura 5. Nanofibras de PCL 9%, NHAP 3% y extracto 3%, a 2000x.

Los análisis estadísticos se realizaron con 95% de intervalo de confianza. El análisis estadístico realizado a las muestras de SEM seleccionadas nos muestra el promedio de las fibras y la desviación estándar. La prueba de Tukey nos confirma que hay diferencia significativa entre algunas muestras analizadas. La **Tabla 3** muestra los datos obtenidos el análisis estadístico del ensayo de MEB.

Tabla 3. Datos estadísticos de las membranas analizadas del ensayo de MEB.

Muestra	Diámetro de fibra (nm ± Desv. Est)	Valor de <i>p</i>
PCL 9%	549 ± 60	.7
PCL 9% - NHAP 3%	681 ± 112	.99
PCL 9% - NHAP 3% - EX 3%	1,102 ± 162	.012

$p < .05$ considerada estadísticamente significativa en comparación entre los grupos.

7.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico de PCL muestra una curva de degradación de un solo paso y una temperatura máxima de degradación de 410°C, lo cual coincide con estudios previos de degradación de PCL mediante TGA y muestran la despolimerización en un solo paso debido a que se rompe la estabilidad térmica de la PCL (Su et al. 2008; Cerkes et al. 2017). Los cambios en la temperatura máxima de degradación se atribuyen al peso molecular de la PCL (Persenaire et al. 2001; Liu et al. 2011). En la **Figura 6** se muestra la curva de degradación de la PCL.

La NHAP muestra estabilidad térmica a las condiciones del análisis de TGA realizado en este estudio, lo cual concuerda con estudios previos en donde se menciona que la HAP tiene temperaturas de degradación que van de 1000 a 1500°C (Pataquiva et al. 2013; Londoño et al. 2014). La **Figura 7** y **Figura 8** muestran las curvas del análisis termogravimétrico de las membranas con NHAP y extracto de lúpulo.

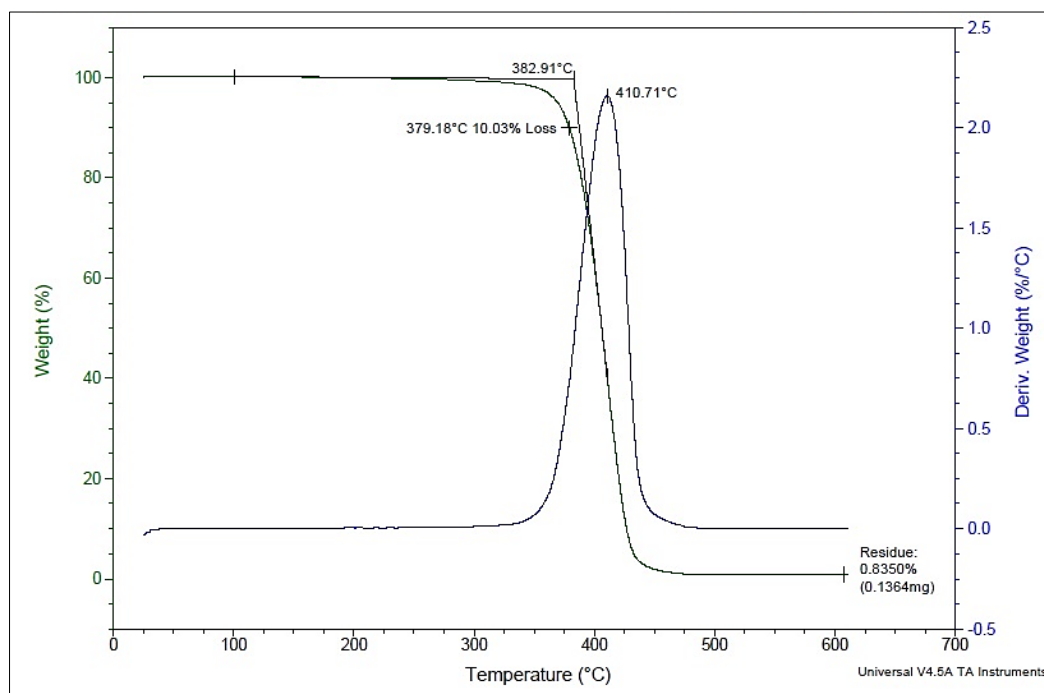


Figura 6. Curva termogravimétrica de la PCL. Se señala la temperatura de 10% de pérdida de peso y la zona de mayor degradación. La curva derivada muestra la temperatura de mayor degradación.

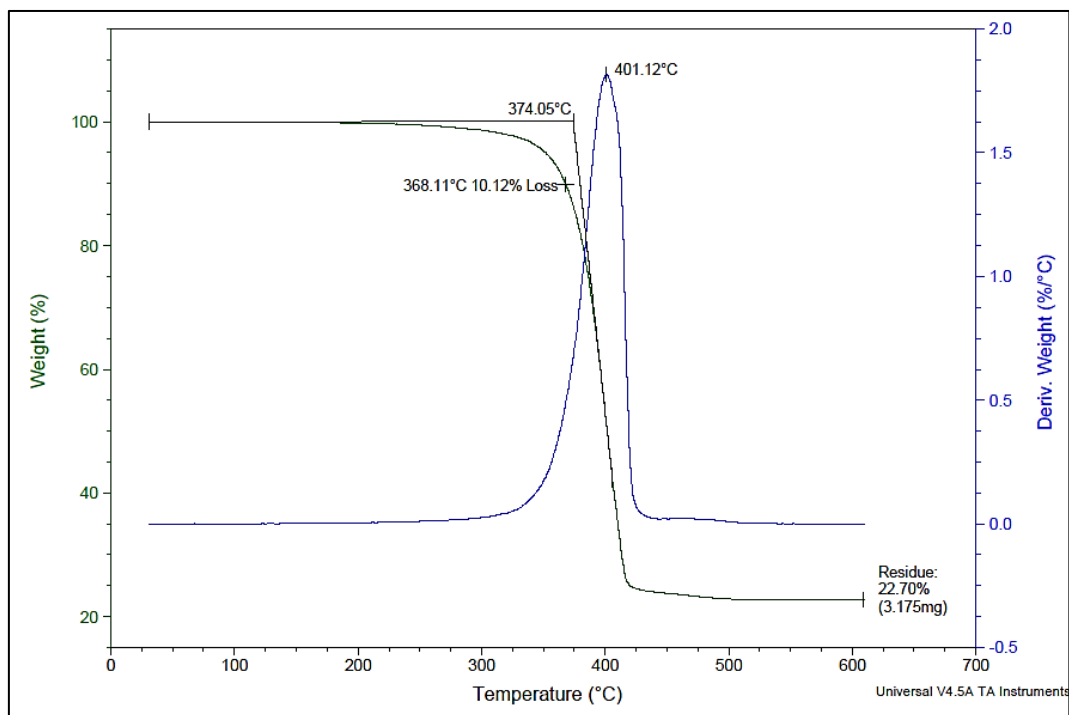


Figura 7. Curva termogravimétrica de la PCL con NHAP. Se señala el punto de 10% de pérdida de peso y la zona de mayor degradación. La curva derivada muestra la temperatura de mayor degradación.

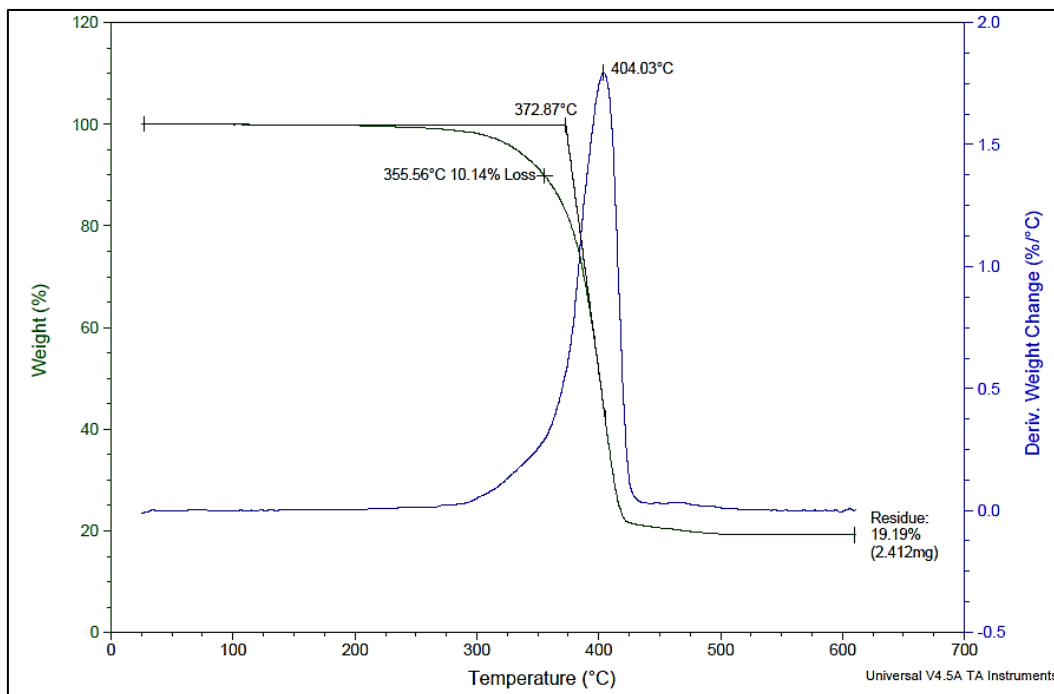


Figura 8. Curva termogravimétrica de la PCL, NHAP y extracto. Se señala el punto de 10% de pérdida de peso y la zona de mayor degradación. La curva derivada muestra la temperatura de mayor degradación.

Los análisis termogravimétricos de las muestras con extracto y NHAP presentan cambios en sus temperaturas máximas de pérdida de peso (Temp. “Onset”) y en la cantidad de residuo obtenido al final del análisis. En el caso del extracto de lúpulo, al ser materia orgánica, se disminuye la temperatura pérdida de peso. Las nanofibras fabricadas con NHAP son las que presentan mayor residuo después del análisis. La PCL en este estudio presenta un residuo de menos del 1%, lo cual concuerda con investigaciones previas (Su et al. 2008; Mohamed et al. 2008). La **Tabla 4** muestra los residuos y las temperaturas en donde ocurrió la mayor pérdida de peso.

Tabla 4. Se muestran las temperaturas “Onset” y la cantidad de residuo al final del análisis termogravimétrico.

Muestra	Temp. Onset (°C)	Residuo (mg)
PCL 9%	382	0.1364
PCL 9% - NHAP 3%	374	3.175
PCL 9% - NHAP 3% - EX 3%	372	2.412

7.4 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis infrarrojo muestra los grupos funcionales -CH, C=O y C-O-C, característicos de la PCL (Rezaei, y Mohammadi 2013) a 2943 cm^{-1} , 1723 cm^{-1} y 1240 cm^{-1} , respectivamente; los grupos PO_4 a 1021 cm^{-1} y 564 cm^{-1} son característicos de la NHAP (Rodríguez et al. 2013). En el análisis de muestras con extracto no aparecen bandas que pudieran sugerir la presencia de lúpulo en las nanofibras. En algunos espectrofotómetros los límites de detección están en cantidades mayores a la que se utilizó para el lúpulo en este estudio, lo que sugiere que la cantidad de extracto está por debajo de los límites de detección del modelo de espectrofotómetro utilizado en esta investigación. En las **Figuras 9, 10 y 11**, se muestran los espectros de la PCL, NHAP y extracto de lúpulo

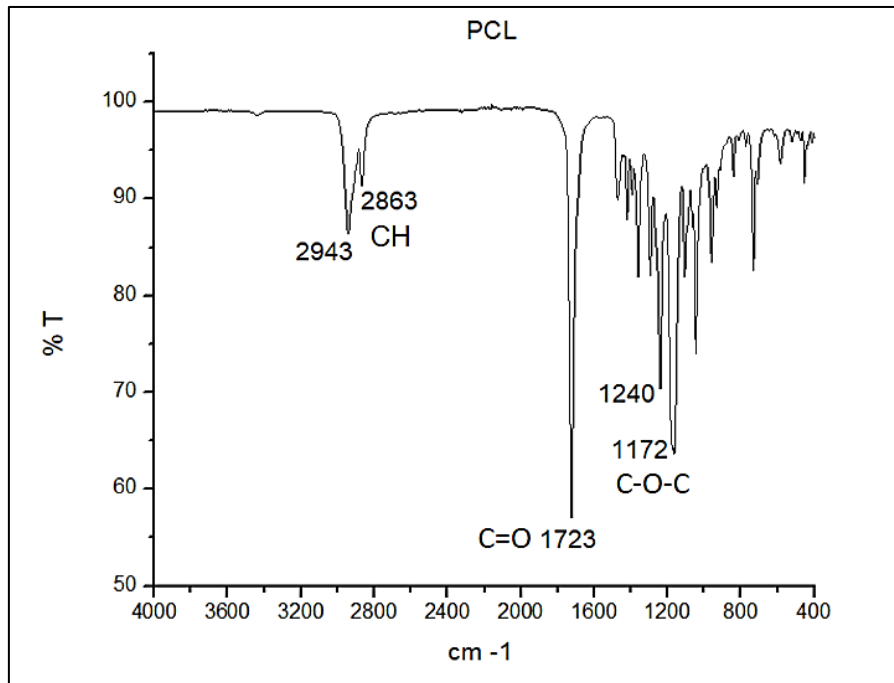


Figura 9. Espectro infrarrojo con los grupos característicos de la PCL.

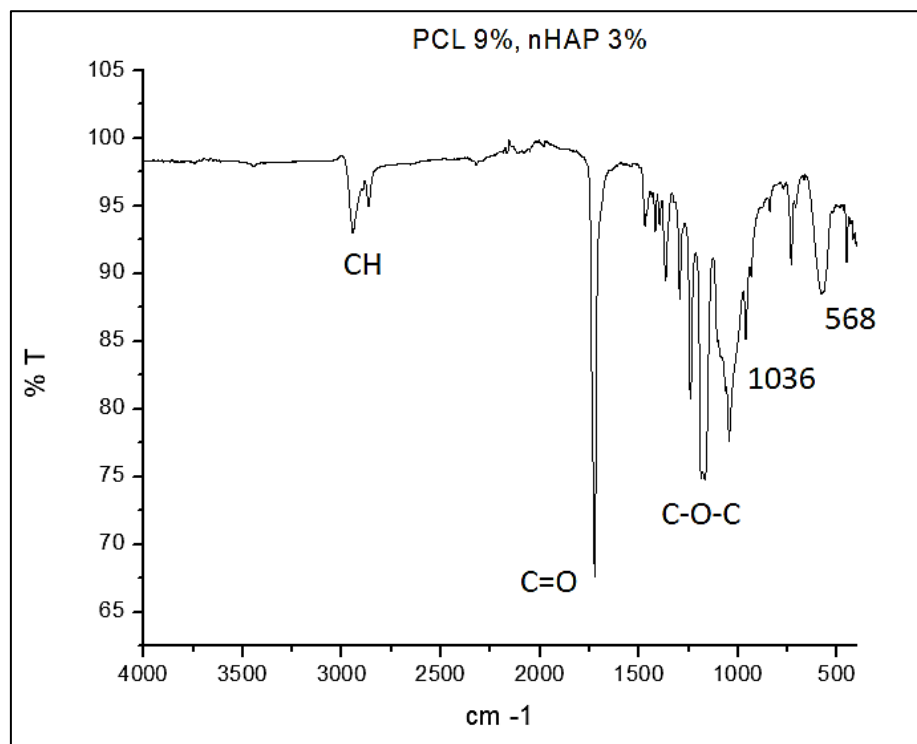


Figura 10. Espectro infrarrojo con los grupos característicos de la PCL y la NHAP.

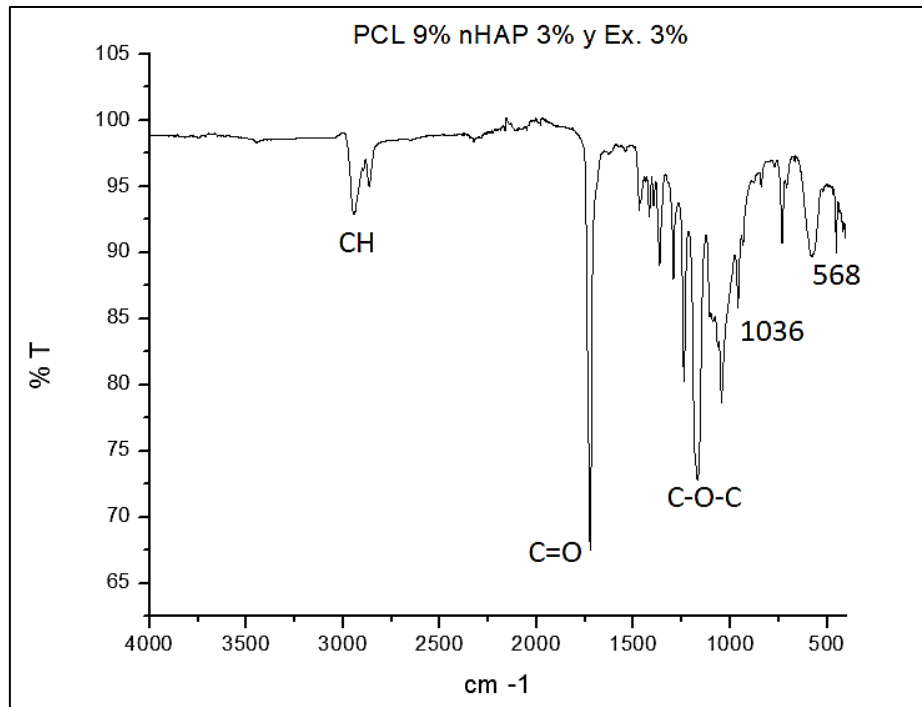


Figura 11. Espectro infrarrojo de nanofibras con PCL, NHAP y extracto.

7.5 Prueba de degradación

Los estudios de degradación en las fibras que solo contienen PCL muestran una degradación del 0% en 8 semanas. Esta tasa de degradación concuerda con un estudio previo (Sunandhakumari et al. 2018) de caracterización de PCL en donde influyen el peso molecular ($MN= 80,000$), la cristalinidad, pH y temperatura.

Las fibras con PCL, NHAP y lúpulo presentaron una degradación del 1% y del 2% respectivamente en 8 semanas. En la **Figura 12** se presentan las diferencias morfológicas en la degradación de las membranas de PCL y las elaboradas con PCL, NHAP y extracto. La incorporación de la NHAP y de lúpulo provoca que aumenten las regiones amorfas de la PCL y haya una mayor hidrólisis de los enlaces éster de las nanofibras (Augustine et al. 2014) en comparación a las elaboradas solo con PCL.

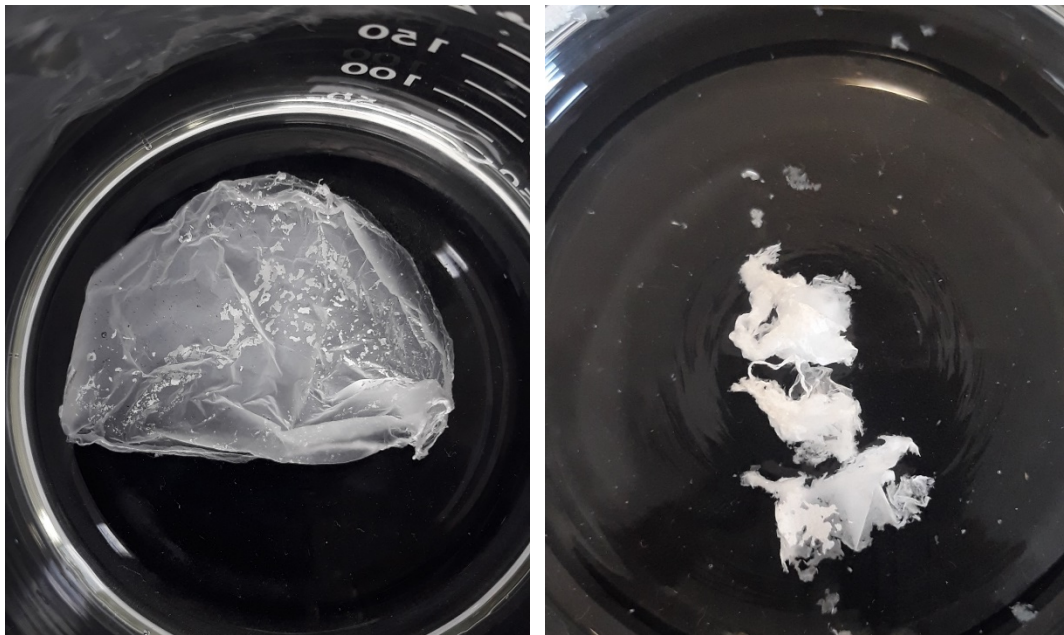


Figura 12. A la izquierda se aprecia la membrana elaborada sólo con PCL, se aprecia prácticamente completa sin partes desprendidas; a la derecha se aprecia la membrana elaborada con PCL, NHAP y lúpulo, donde se aprecia la membrana como tres partes.

El análisis ANOVA realizado nos demuestra que no hay diferencia significativa en la degradación de las muestras analizadas. La diferencia de peso se tomó desde el inicio del ensayo hasta después de las 8 semanas. En la **Tabla 5** se muestra la pérdida de peso y el valor obtenido de p .

Tabla 5. Pérdida de peso con desviación estándar y valor obtenido de p .

Muestra	Pérdida de peso (Media \pm Desv. Est)	Valor de p
PCL 9%	.1 \pm 0.0	.235
PCL 9% - NHAP 3%	.46 \pm .23	
PCL 9% - NHAP 3% - EX 3%	.23 \pm .05	

$p < .05$ considerada estadísticamente significativa en comparación entre los grupos.

7.6 Pruebas de tensión

En las pruebas de tensión los resultados suelen expresarse como un módulo de

Young, que es donde se muestra el porcentaje de elongación al fallo y la fuerza, en MPa, utilizada para llegar al límite de tensión. En la **Figura 13** se muestra el módulo de Young de la membrana de PCL. La **Figura 14** muestra el módulo de la membrana con PCL y NHAP. En una investigación previa (Croisier et al. 2012) se muestra el módulo de Young con valores mayores a los encontrados en esta investigación. Estas variaciones dependen de los parámetros de electrohilado, diámetro y orientación de las fibras y peso molecular y concentración del polímero (Tan et al. 2005). En la **Tabla 6** se muestra el módulo de Young de los triplicados de las muestras utilizadas para el ensayo.

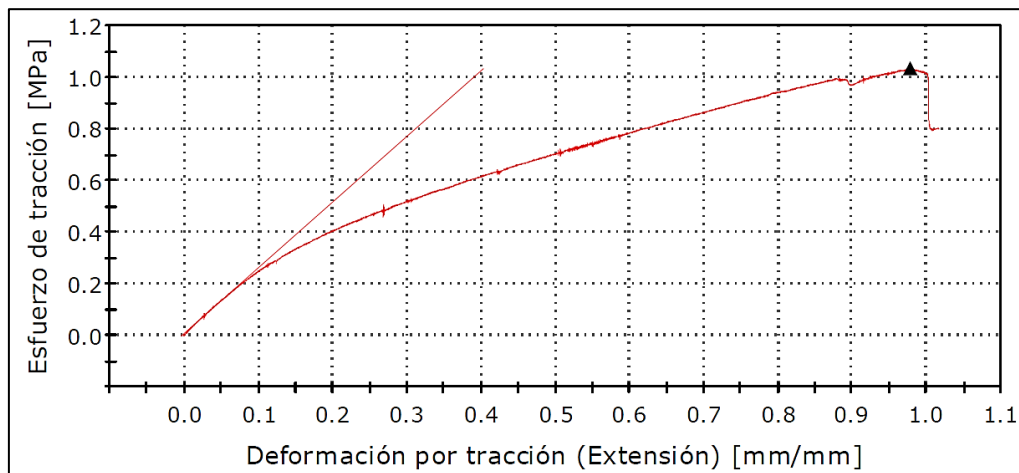


Figura 13. Módulo de Young de la membrana de PCL.

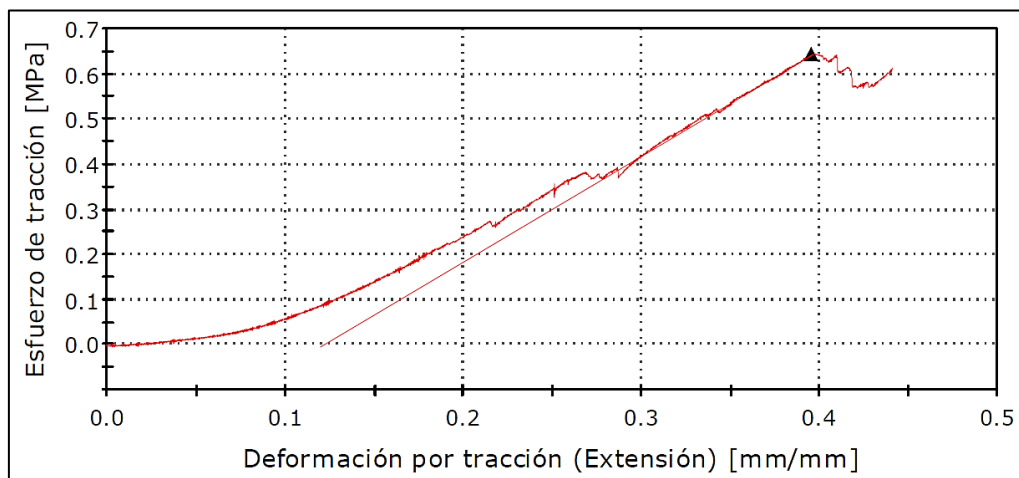


Figura 14. Módulo de Young de la membrana de PCL y NHAP.

Tabla 6. Módulo de Young de las muestras utilizadas para los análisis de tensión.

Módulo de Young		
Muestra	Fuerza (MPa ± Desv. Est.)	Tensión al fallo (% ± Desv. Est.)
PCL 9%	1.74 ± .63	3.8 ± .66
PCL 9% - NHAP 3%	1.39 ± .69	2.2 ± .81
PCL 9% - NHAP 3% - EX 3%	1.07 ± .35	5.4 ± 1.9

Las fibras realizadas con PCL y NHAP concuerdan con investigaciones previas (Wong et al. 2008; Hassan y Sultana 2017) en donde al incrementar la cantidad de nanohidroxiapatita, disminuye el porcentaje de deformación por tracción de las fibras. La **Figura 15** muestra una membrana de PCL y NHAP durante el ensayo de tensión en la máquina Instron.

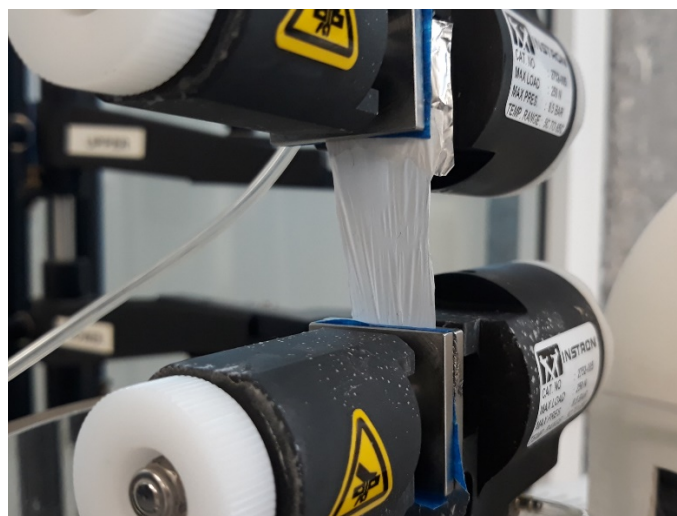


Figura 15. Membrana de PCL y NHAP en el ensayo de tensión.

En las fibras con extracto, investigaciones previas (Hosseinkazemi et al. 2015; Charernsriwilaiwat et al. 2013) han demostrado la disminución del módulo de Young y de la variación del porcentaje de deformación por tracción dependiendo del compuesto natural que se haya incorporado a las fibras, comparado con las fibras sin extracto. La **Figura 16** muestra el módulo de Young de la membrana de PCL, NHAP y extracto de lúpulo. El aumento o disminución de estos parámetros puede atribuirse a la interacción química del compuesto natural con el polímero (Sridhar et al. 2015).

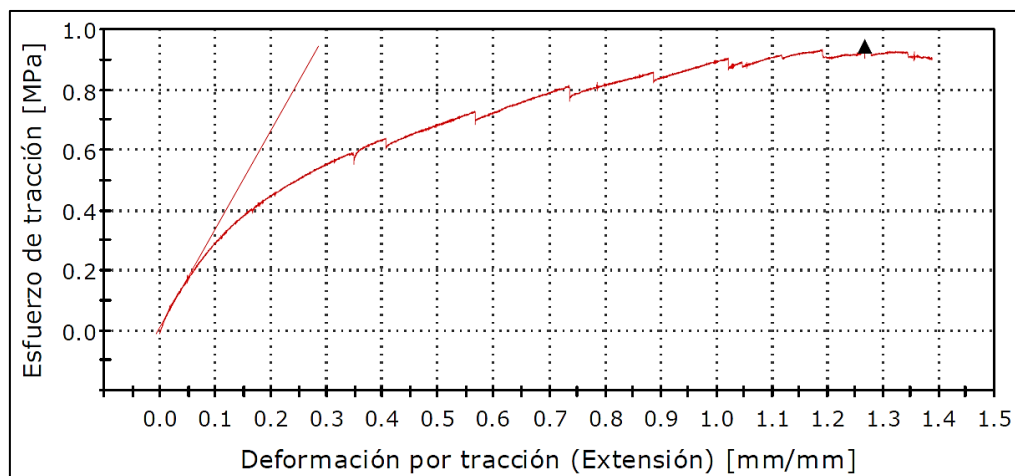


Figura 16. Módulo de Young de la membrana de PCL, NHAP y extracto de lúpulo.

El análisis ANOVA realizado nos demuestra que no hay diferencia significativa en las pruebas de tensión de las muestras analizadas. La **Tabla 7** muestra los promedios de fuerza y la desviación estándar, además del valor de p obtenido.

Tabla 7. Se muestra la media de la fuerza de las muestras analizadas y el valor obtenido de p .

Muestra	Fuerza (MPa \pm Desv. Est.)	Valor de p
PCL 9%	1.74 \pm .63	.058
PCL 9% - NHAP 3%	1.39 \pm .69	
PCL 9% - NHAP 3% - EX 3%	1.07 \pm .35	

$p < .05$ considerada estadísticamente significativa en comparación entre los grupos.

7.7 Pruebas de citotoxicidad

Uno de los requerimientos de los biomateriales es la no-citotoxicidad del polímero y de los productos de degradación (Joseph 2013). Los ensayos de citotoxicidad muestran un porcentaje de viabilidad igual al control del estudio (**Figura 17**). En la **Figura 18** se aprecian los fibroblastos observados bajo microscopio óptico a 40x. Esto confirma investigaciones previas con nanofibras de PCL y nHAP, en donde se demuestra que son materiales no citotóxicos y biocompatibles (Lim et al. 2015; Safaeijavan et al. 2014). Las fibras que contienen lúpulo tampoco presentaron citotoxicidad, lo que confirma lo realizado en una investigación previa sobre la citotoxicidad de *H. lupulus* con

fibroblastos. (Phillips et al. 2017). En la **Tabla 8** se muestra el porcentaje de viabilidad de los fibroblastos.

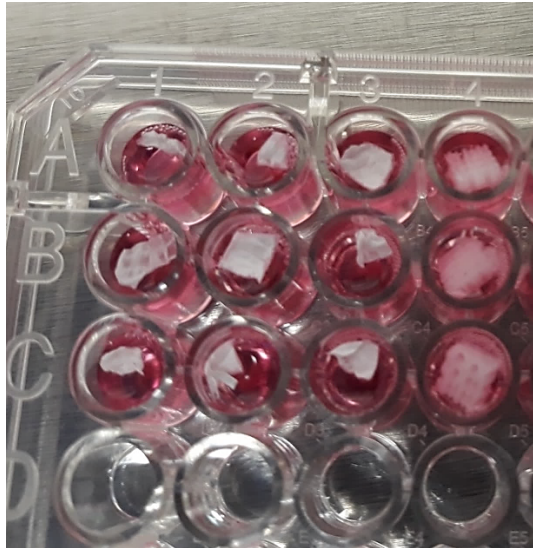


Figura 17. Imagen de un ensayo de toxicidad por contacto directo llevado a cabo con fibroblastos.

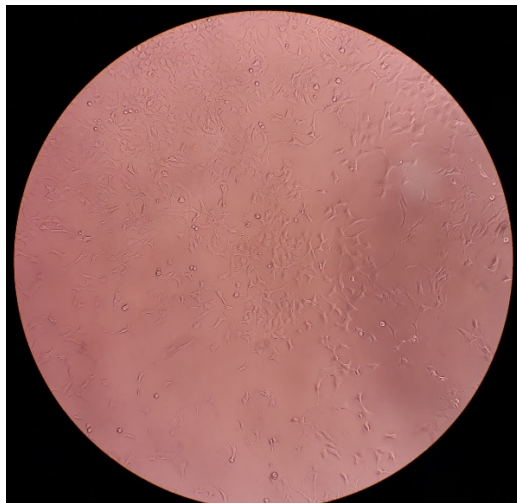


Figura 18. Fibroblastos observados bajo microscopio óptico a 40x.

Tabla 8. Porcentaje de viabilidad de fibroblastos con las distintas membranas elaboradas.

Material	Viabilidad (%)
Control (medio de cultivo)	100
PCL 9%	100
PCL 9% - NHAP 3%	85
PCL 9% - NHAP 3% - EX 3%	80

7.8 Pruebas antibacterianas

El ensayo de actividad antimicrobiana contra *S. mutans* y *A. actinomycetemcomitans* resultó negativo, sin inhibición de bacterias. Esto se puede deber a la baja cantidad de extracto de *H. lupulus* contenida en las fibras, ya que un estudio previo contra patógenos orales (Bhattacharya et al. 2003) muestra efecto antimicrobiano con mayor cantidad de extracto a la utilizada en este estudio. Otra causa puede ser que la degradación de los compuestos del lúpulo por la irradiación UV y la oxidación haya afectado sus propiedades antimicrobianas (Krofta et al. 2012, 2013). La **Tabla 9** muestra los resultados del ensayo.

Tabla 9. Actividad antibacteriana del control positivo y de la membrana con extracto de lúpulo.

Muestra	Microorganismo	
	<i>S. mutans</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
Clorhexidina	+	+
PCL 9% - NHAP 3% - EX 3%	-	-

+ = actividad antibacteriana positiva mayor a 7 mm de halo de inhibición.

- = actividad antibacteriana negativa, menor o igual a 7 mm de halo de inhibición

8. CONCLUSIÓN

La presente investigación aportó un avance en la investigación de materiales sintéticos en mezcla con compuestos naturales. En estudios previos, las investigaciones con polímeros y extractos de plantas se hacían de manera que los compuestos fueran aislados o puros, mientras que en la presente investigación se realizó incorporando el extracto natural completo o crudo, es decir, sin fraccionar, a la solución polimérica utilizada. Lo obtenido nos demuestra que se pueden modificar las propiedades del material, como la fuerza de tensión, en donde se confiere mayor elasticidad a las membranas al incorporar el extracto de lúpulo.

Las membranas de PCL, NHAP y *Humulus lupulus* muestran diferencias en cuanto a propiedades físico químicas, lo que nos indica que se pueden modificar las propiedades de los andamios añadiendo un compuesto adicional, en este caso el extracto. Además, la incorporación del extracto y la elaboración de fibras abre la ventana de posibilidades a la fabricación de andamios con compuestos naturales sin encapsular.

En concreto, la investigación realizada nos revela que, con compuestos naturales, además de buscar una determinada actividad, se pueden modificar otras propiedades físicas y químicas de los materiales sintéticos.

9. PERSPECTIVAS

Esta investigación deja en claro que los estudios con biomateriales deben de continuar con el objetivo de encontrar nuevas alternativas a las ya existentes; o bien, mejorar y modificar andamios previamente elaborados con estas técnicas.

Además, la aportación más relevante de este trabajo fue la incorporación de un extracto vegetal a la mezcla de los biomateriales utilizados. Esta es la primera vez que se reporta el uso de compuestos vegetales en membranas nanoestructuradas para regeneración ósea. Estos resultados son muy prometedores para continuar las investigaciones con el uso de compuestos naturales incorporados a andamios o sistemas de liberación para su aplicación en biomedicina. Por otro lado, el uso de extractos crudos permite que se conserven propiedades debido a la sinergia que se da entre cada molécula, y que pudiera perderse si se incorpora sólo un compuesto aislado.

Otra propuesta es que se continúe haciendo investigación en el aspecto de combinación de polímeros y otras moléculas funcionales, lo cual podría mejorar las propiedades físico-químicas y mecánicas de los andamios y tener nuevas opciones de tratamiento para la regeneración de tejidos.

Es recomendable que se continúen las investigaciones con biomateriales y compuestos naturales con miras a contribuir al conocimiento existente y a encontrar nuevas alternativas para la regeneración tisular.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Balamurugan, A., Rebelo, A. H. S., Lemos, A. F., Rocha, J. H. G., Ventura, J. M. G., & Ferreira, J. M. F. (2008). Suitability evaluation of sol-gel derived Si-substituted hydroxyapatite for dental and maxillofacial applications through in vitro osteoblasts response. *Dental materials*, 24(10), 1374-1380.
2. Bhattacharya, S., Virani, S., Zavro, M., & Haas, G. J. (2003). Inhibition of *Streptococcus mutans* and Other Oral streptococci by hop (*Humulus lupulus* L.) constituents. *Economic Botany*, 57(1), 118-125.
3. Boucard, N., Viton, C., Agay, D., Mari, E., Roger, T., Chancerelle, Y., & Domard, A. (2007). The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*, 28(24), 3478-3488.
4. Buckwalter, J. A., & Hunziker, E. B. (1996). Healing of bones, cartilages, tendons, and ligaments: a new era. *The Lancet*, 348, S18.
5. Colorado, A. C., Agudelo, C. A., Moncada, A., & Elena, M. (2013). Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: revisión. *Revista Ingeniería Biomédica*, 7(14), 11-23.
6. Coombes, A. G. A., & Heckman, J. D. (1992). Gel casting of resorbable polymers: 1. Processing and applications. *Biomaterials*, 13(4), 217-224.
7. Demarco, F. F., Conde, M. C. M., Cavalcanti, B. N., Casagrande, L., Sakai, V. T., & Nör, J. E. (2011). Dental pulp tissue engineering. *Brazilian Dental Journal*, 22(1), 3-13.
8. Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., & Hatton, P. V. (2014). An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, 15(3), 3640-3659.
9. Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2007). Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(30), 5670-5703.
10. Hong, M. H., Son, J. S., Kim, K. M., Han, M., Oh, D. S., & Lee, Y. K. (2011). Drug-loaded porous spherical hydroxyapatite granules for bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(2), 349-355.

11. Ito, Y., Hasuda, H., Kamitakahara, M., Ohtsuki, C., Tanihara, M., Kang, I. K., & Kwon, O. H. (2005). A composite of hydroxyapatite with electrospun biodegradable nanofibers as a tissue engineering material. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(1), 43-49.
12. Jimenez Ortegon, N. T. (2015) Comportamiento in vitro de células stem mesénquimales de origen dental humano en matrices extracelulares tridimensionales de ácido poliláctico/poliglicólico con y sin hidroxiapatita. (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá).
13. Kon'kov, A. S., Pustovalova, O. L., & Agapov, I. I. (2010). Biocompatible materials from regenerated silk for tissue engineering and medicinal therapy. *Applied biochemistry and microbiology*, 46(8), 739-744.
14. Lee, C. H., Cook, J. L., Mendelson, A., Moioli, E. K., Yao, H., & Mao, J. J. (2010). Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study. *The Lancet*, 376(9739), 440-448.
15. Li, W. J., & Tuan, R. S. (2009). Fabrication and application of nanofibrous scaffolds in tissue engineering. *Current Protocols in Cell Biology*, 25-2.
16. Mikos, A. G., Bao, Y., Cima, L. G., Ingber, D. E., Vacanti, J. P., & Langer, R. (1993). Preparation of poly (glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *Journal of biomedical materials research*, 27(2), 183-189.
17. Mikos, A. G., Sarakinos, G., Leite, S. M., Vacanti, J. P., & Langer, R. (1993). Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials*, 14(5), 323-330.
18. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 5807-5812.
19. Mizuno, K., Yamamura, K., Yano, K., Osada, T., Saeki, S., Takimoto, N., & Nimura, Y. (2003). Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice. *Journal of biomedical materials research Part A*, 64(1), 177-181.
20. Modulevsky, D. J., Lefebvre, C., Haase, K., Al-Rekabi, Z., & Pelling, A. E. (2014). Apple derived cellulose scaffolds for 3D mammalian cell culture. *PloS one*, 9(5),

e97835.

21. Mooney, D. J., Baldwin, D. F., Suh, N. P., Vacanti, J. P., & Langer, R. (1996). Novel approach to fabricate porous sponges of poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*, 17(14), 1417-1422.
22. Nam, Y. S., & Park, T. G. (1999). Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method. *Biomaterials*, 20(19), 1783-1790.
23. Ong, G. (2011). Periodontal disease and tooth loss. *International Dental Journal*. 48(3), 233-238.
24. Pan, Z., & Ding, J. (2012). Poly (lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface focus*, 2(3), 366-377.
25. Ribeiro Rodrigues, L. (2012). Scaffolds baseados em nanopartículas de fosfatos de cálcio para engenharia tecidual óssea. (Doctoral dissertation. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. Sede Brasil).
26. Rozalski, M., Micota, B., Sadowska, B., Stochmal, A., Jedrejek, D., Wieckowska-Szakiel, M., & Rozalska, B. (2013). Antiadherent and antibiofilm activity of *Humulus lupulus* L. derived products: new pharmacological properties. *BioMed research international*.
27. Soria, J. M., González, J. B., Andrades, J. A., Arce, J. R., Pradas, M. M., & Verdugo, J. M. G. (2009). Uso de biomateriales en medicina regenerativa, aspectos básicos y aplicaciones en el Sistema Nervioso. *Trauma*, 20(1), 15-22.
28. Tharakan S. & Lakshmi T. (2013) *Humulus lupulus* in Management of Oro dental Pathogens –An Update. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(9), 187-189.
29. Wake, M. C., Gupta, P. K., & Mikos, A. G. (1996). Fabrication of pliable biodegradable polymer foams to engineer soft tissues. *Cell transplantation*, 5(4), 465-473.
30. Williams, D. F. (Ed.). (1987). *Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials*, Chester, England, March 3-5, 1986 (Vol. 4). Elsevier Science Limited.
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Hilbert, J. L., Rambaud, C., & Rivière, C. (2018). *Humulus*

- lupulus L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochemistry reviews*, 17(5), 1047-1090.
31. Luong, N. D., Moon, I. S., Lee, D. S., Lee, Y. K., & Nam, J. D. (2008). Surface modification of poly (l-lactide) electrospun fibers with nanocrystal hydroxyapatite for engineered scaffold applications. *Materials Science and Engineering: C*, 28(8), 1242-1249.
 32. Mohamed, R. M., & Yusoh, K. (2016). A review on the recent research of polycaprolactone (PCL). In *Advanced Materials Research* (Vol. 1134, pp. 249-255). Trans Tech Publications.
 33. Venkatesan, J., & Kim, S. K. (2014). Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering—a review. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(10), 3124-3140.
 34. Murray, E., Thompson, B. C., Sayyar, S., & Wallace, G. G. (2015). Enzymatic degradation of graphene/polycaprolactone materials for tissue engineering. *Polymer degradation and stability*, 111, 71-77.
 35. Temtem, M., Casimiro, T., Mano, J. F., & Aguiar-Ricardo, A. (2008). Preparation of membranes with polysulfone/polycaprolactone blends using a high pressure cell specially designed for a CO₂-assisted phase inversion. *The Journal of Supercritical Fluids*, 43(3), 542-548.
 36. Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., & Kenny, J. M. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. *Polymer degradation and stability*, 95(11), 2126-2146.
 37. Sowmya, S., Bumgardener, J. D., Chennazhi, K. P., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2013). Role of nanostructured biopolymers and bioceramics in enamel, dentin and periodontal tissue regeneration. *Progress in Polymer Science*, 38(10-11), 1748-1772.
 38. Jin, G., Prabhakaran, M. P., Kai, D., Annamalai, S. K., Arunachalam, K. D., & Ramakrishna, S. (2013). Tissue engineered plant extracts as nanofibrous wound dressing. *Biomaterials*, 34(3), 724-734.
 39. Sunandhakumari, V., Vidhyadharan, A., Alim, A., Kumar, D., Ravindran, J., Krishna, A., & Prasad, M. (2018). Fabrication and In Vitro Characterization of

- Bioactive Glass/Nano Hydroxyapatite Reinforced Electrospun Poly (ϵ -Caprolactone) Composite Membranes for Guided Tissue Regeneration. *Bioengineering*, 5(3), 54.
40. Han, F., Zhang, P., Sun, Y., Lin, C., Zhao, P., & Chen, J. (2015). Hydroxyapatite-doped polycaprolactone nanofiber membrane improves tendon–bone interface healing for anterior cruciate ligament reconstruction. *International journal of nanomedicine*, 10, 7333.
 41. Qiao, T., Jiang, S., Song, P., Song, X., Liu, Q., Wang, L., & Chen, X. (2016). Effect of blending HA-g-PLLA on xanthohumol-loaded PLGA fiber membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 221-227.
 42. Chong, L. H., Hassan, M. I., & Sultana, N. (2015, May). Electrospun polycaprolactone (PCL) and PCL/nano-hydroxyapatite (PCL/nHA)-based nanofibers for bone tissue engineering application. In *Control Conference (ASCC), 2015 10th Asian* (pp. 1-4). IEEE.
 43. Costa, L. M. M., de Olyveira, G. M., Cherian, B. M., Leão, A. L., de Souza, S. F., & Ferreira, M. (2013). Bionanocomposites from electrospun PVA/pineapple nanofibers/*Stryphnodendron adstringens* bark extract for medical applications. *Industrial Crops and Products*, 41, 198-202.
 44. Sánchez, L. M. D., Rodríguez, L., & López, M. (2013). Electrospinning: La era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 14(1), 10-27.
 45. Su, T. T., Jiang, H., & Gong, H. (2008). Thermal stabilities and the thermal degradation kinetics of poly (ϵ -caprolactone). *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 47(4), 398-403.
 46. Cerkez, I., Sezer, A., & Bhullar, S. K. (2017). Fabrication and characterization of electrospun poly (ϵ -caprolactone) fibrous membrane with antibacterial functionality. *Royal Society open science*, 4(2), 160911.
 47. Persenaire, O., Alexandre, M., Degée, P., & Dubois, P. (2001). Mechanisms and kinetics of thermal degradation of poly (ϵ -caprolactone). *Biomacromolecules*, 2(1), 288-294.
 48. Liu, J. Y., Reni, L., Wei, Q., Wu, J. L., Liu, S., Wang, Y. J., & Li, Y. (2011). Fabrication and characterization of polycaprolactone/calcium sulfate whisker composites. *Express polymer letters*, 5(8).

49. Pataquiva-Mateus, A. Y., Ferraz, M. P., & Monteiro, F. J. (2013). Nanoparticles of hydroxyapatite: preparation, characterization and cellular approach—an overview. *Revista Mutis*, 3(2), 43-57.
50. Mohamed, A., Finkenstadt, V. L., Gordon, S. H., Biresaw, G., Palmquist, D. E., & Rayas-Duarte, P. (2008). Thermal properties of PCL/gluten bioblends characterized by TGA, DSC, SEM, and infrared-PAS. *Journal of applied polymer science*, 110(5), 3256-3266.
51. Rezaei, A., & Mohammadi, M. R. (2013). In vitro study of hydroxyapatite/polycaprolactone (HA/PCL) nanocomposite synthesized by an in situ sol-gel process. *Materials Science and Engineering: C*, 33(1), 390-396.
52. Rodriguez, G., Dias, J., d'Ávila, M. A., & Bártolo, P. (2013). Influence of hydroxyapatite on extruded 3D scaffolds. *Procedia Engineering*, 59, 263-269.
53. Sunandhakumari, V., Vidhyadharan, A., Alim, A., Kumar, D., Ravindran, J., Krishna, A., & Prasad, M. (2018). Fabrication and In Vitro Characterization of Bioactive Glass/Nano Hydroxyapatite Reinforced Electrospun Poly (ϵ -Caprolactone) Composite Membranes for Guided Tissue Regeneration. *Bioengineering*, 5(3), 54.
54. Augustine, R., Dominic, E. A., Reju, I., Kaimal, B., Kalarikkal, N., & Thomas, S. (2014). Electrospun polycaprolactone membranes incorporated with ZnO nanoparticles as skin substitutes with enhanced fibroblast proliferation and wound healing. *Rsc Advances*, 4(47), 24777-24785.
55. Croisier, F., Duwez, A. S., Jérôme, C., Léonard, A. F., Van Der Werf, K. O., Dijkstra, P. J., & Bennink, M. L. (2012). Mechanical testing of electrospun PCL fibers. *Acta biomaterialia*, 8(1), 218-224.
56. Tan, E. P. S., Ng, S. Y., & Lim, C. T. (2005). Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber. *Biomaterials*, 26(13), 1453-1456.
57. Wong, S. C., Baji, A., & Leng, S. (2008). Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly (ϵ -caprolactone). *Polymer*, 49(21), 4713-4722.
58. Hassan, M. I., & Sultana, N. (2017). Characterization, drug loading and antibacterial activity of nanohydroxyapatite/polycaprolactone (nHA/PCL) electrospun membrane. *3 Biotech*, 7(4), 249.
59. Hosseinkazemi, H., Biazar, E., Bonakdar, S., Ebadi, M. T., Shokrgozar, M. A., &

- Rabiee, M. (2015). Modification of PCL electrospun nanofibrous mat with *Calendula officinalis* extract for improved interaction with cells. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 64(9), 459-464.
60. Charernsriwilaiwat, N., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Sukma, M., & Opanasopit, P. (2013). Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with *Garcinia mangostana* extracts. *International journal of pharmaceutics*, 452(1-2), 333-343.
61. Sridhar, R., Lakshminarayanan, R., Madhaiyan, K., Barathi, V. A., Lim, K. H. C., & Ramakrishna, S. (2015). Electrospayed nanoparticles and electrospun nanofibers based on natural materials: applications in tissue regeneration, drug delivery and pharmaceuticals. *Chemical Society Reviews*, 44(3), 790-814.
62. Joseph, D. 2013. Evaluating the Potential of Electrospun Membranes for Tissue Specific Signal Delivery in Cartilage and Bone Tissue Engineering. Master's Thesis, Sree Chitra Tirunal Institute for Medical Sciences Technology, Kerala, India.
63. Lim, M. M., Sun, T., & Sultana, N. (2015). In Vitro biological evaluation of electrospun polycaprolactone/gelatine nanofibrous scaffold for tissue engineering. *Journal of Nanomaterials*, 16(1), 416.
64. Safaeijavan, R., Soleimani, M., Divsalar, A., Eidi, A., & Ardeshtyrlajimi, A. (2014). Biological behavior study of gelatin coated PCL nanofiberous electrospun scaffolds using fibroblasts. *Journal of Paramedical Sciences*, 5(1).
65. Philips, N., Samuel, P., Lozano, T., Gvaladze, A., Guzman, B., Siomyk, H., & Haas, G. (2017). Effects of *Humulus lupulus* extract or its Components on Viability, Lipid Peroxidation, and expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Melanoma Cells and Fibroblasts. *Madr. J. Clin. Res*, 1, 15-19.
66. Krofta, K., Vrabcová, S., Mikyška, A., Jurková, M., Čajka, T., & Hajslová, J. (2012, September). Stability of hop beta acids and their decomposition products during natural ageing. In III International Humulus Symposium 1010 (pp. 221-230).
67. Krofta, K., Vrabcova, S., Mikyska, A., & Jurkova, M. (2013). The effect of hop beta acids oxidation products on beer bitterness. *Kvasny Prumysl (Czech Republic)*.

11. RESUMEN BIOGRÁFICO

Jaime Antonio Villanueva Lumbreras

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis: FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS NANOESTRUCTURADAS DE POLICAPROLACTONA, NANOHIPOXIAPATITA Y *Humulus lupulus*, CON POTENCIAL APLICACIÓN EN REGENERACIÓN ÓSEA.

Campo de Estudio: Biotecnología

Datos personales: originario de Monterrey, Nuevo León. Nacido el 6 de marzo de 1992, hijo de Jaime Villanueva y Mercedes Lumbreras.

Educación: egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: Biólogo, en 2013, con mención honorífica en tesis de licenciatura.

Experiencia profesional: asesor de investigación en proyectos de laboratorio con biomateriales, toxicidad en células y regeneración de tejidos. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. 2017- 2019. **Colaborador en investigación** como técnico en el área de cultivo celular para pruebas citotóxicas con biomateriales para regeneración de tejidos. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey. México. 2017. **Asesor académico** para alumnos aspirantes a nivel medio superior en la Universidad Autónoma de Nuevo León, 2013.

Congresos: Internacional. XXVI Congreso Italo-latinoamericano de Etnomedicina y IX Congreso Colombiano de Cromatografía, Cartagena de Indias, Colombia. 2017.

Nacional. VIII Congreso Nacional de Ciencia e Ingeniería en Materiales, Cuernavaca, Mor. México. 2017

Estancia de investigación: En el Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid, España. 2018.