

Resumen

La conservación de microorganismos viables tiene interés en diversos sectores industriales. Así, por ejemplo en la industria alimentaria, la panificación, vinicultura y cervecera entre otros requieren procesos de fermentación que son iniciados con *starters* o microorganismos colonizadores requeridos para la generación de biomasa. En la industria biomédica se requiere la conservación de microorganismos tipo o de referencia.

En este proyecto se estudió el encapsulamiento de microorganismos de interés biomédico y alimentario en micro/nanofibras coaxiales basadas en los polímeros biodegradables poliláctida (PLA) y polietilenglicol (PEG). El encapsulamiento de microorganismos en una matriz polimérica tiene aplicaciones prácticas como facilitar su conservación, almacenamiento y transporte, además es un sistema de liberación controlada.

Las fibras fueron preparadas por electrohilado (*electrospinning*) coaxial, lo cual permite compartimentalizar las fibras en un dominio de cubierta (*shell*) y otro nuclear o central (*core*). El PLA es un polímero hidrofóbico mientras que el PEG es hidrofílico, por tal motivo, se ha seleccionado el PEG como polímero para conformar el core de la fibra y en este dominio se encapsularan los microorganismos, y el PLA conformará la cubierta de la fibra. Así, las fibras coaxiales fueron preparadas bajo diferentes condiciones experimentales establecidas en un diseño experimental (DOE).

Las micro/nanofibras obtenidas fueron caracterizadas por diversas metodologías para establecer su estructura coaxial. Luego, las fibras fueron analizadas mediante técnicas microscópicas (óptica, SEM) para determinar su morfología y sus diámetros. Finalmente se prepararon fibras coaxiales como medio de encapsulamiento de la bacteria *Escherichia coli* usada como modelo para estudiar la viabilidad de la bacteria durante diferentes tiempos de conservación al interior de las fibras, y la posible acción protectora de la cubierta de la fibra cuando las bacterias encapsuladas fueron sometidas a la actividad antibacteriana de la luz ultravioleta.

Sumario

RESUMEN	2
SUMARIO	4
1. GLOSARIO	7
2. PREFACIO	8
2.1. Origen del proyecto	8
2.2. Motivación	9
2.3. Requerimientos previos	9
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo general del proyecto	11
3.2. Objetivos específicos del proyecto	11
4. INTRODUCCIÓN	13
4.1. Polímeros	13
4.1.1. Historia	13
4.1.2. Clasificación	14
4.1.3. Aplicaciones	16
4.2. Polímeros biodegradables	17
4.2.1. Generalidades	17
4.2.2. Proceso de degradación	18
4.2.3. Clasificación	20
4.2.4. Acido poliláctico (PLA)	21
4.2.5. Polietilenglicol (PEG)	24
4.2.6. Aplicaciones biomédicas de los polímeros biodegradables	25
4.3. Electrospinning (electrohilado)	27
4.3.1. Generalidades	27
4.3.2. Parámetros de la técnica de electrospinning	29
4.3.3. Aplicaciones de la técnica	32
4.4. Electrospinning coaxial	34
4.4.1. Generalidades	34
4.4.2. Parámetros de la técnica	35
4.4.3. Aplicaciones biomédicas	35
4.5. Antecedentes	37
4.5.1. Artículos referidos a la obtención de fibras mediante la mezcla de polímeros	37
4.5.2. Artículos referidos a la obtención de fibras coaxiales	38

4.5.3.	Artículos referidos a la liberación de fármacos en fibras coaxiales.....	39
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
5.1.	Reactivos.....	40
5.2.	Material de laboratorio	40
5.3.	Preparación de la disolución polimérica de PLA y PEG	41
5.4.	Electrospinning coaxial	41
5.5.	Morfología y diámetro de las fibras	42
5.5.1.	Microscopía óptica (OM)	42
5.5.2.	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	43
5.6.	Ángulos de contacto	45
5.7.	Pérdida de masa.....	46
5.8.	Espectrómetro IR	46
5.9.	Ensayos biológicos	47
5.9.1.	Carga de las fibras con bacterias	47
5.9.2.	Viabilidad de las bacterias	48
5.9.3.	Exposición UV	49
5.9.4.	Estabilidad en el tiempo	49
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
6.1.	Optimización de las condiciones operacionales de electrospinning coaxial	50
6.1.1.	Organización y preparación de las disoluciones electrohilables de PLA y PEG	50
6.1.2.	Análisis mediante microscopía óptica (OM)	54
6.2.	Selección de fibras coaxiales	61
6.2.1.	Ángulos de contacto.....	61
6.2.2.	Pérdida de masa	64
6.2.3.	Ángulos de contacto y pérdida de masa	67
6.2.4.	Análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	69
6.2.5.	Diámetros de las fibras.....	75
6.2.6.	Características de las fibras coaxiales seleccionadas.....	81
6.3.	Fibras cargadas con bacterias.....	84
6.3.1.	Ángulos de contacto.....	84
6.3.2.	Pérdida de masa	85
6.3.1.	Análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	85
6.3.2.	Diámetros de las fibras.....	87
6.3.3.	Análisis de fibras mediante FTIR.....	88
6.4.	Ensayos biológicos	92
6.4.1.	Viabilidad de las bacterias cargadas	92

6.4.2. Efecto de la luz UV	92
6.4.3. Efecto del tiempo de almacenamiento	93
6.4.4. 94	
7. IMPACTO AMBIENTAL	96
8. EVALUACIÓN ECONÓMICA	98
CONCLUSIONES	101
AGRADECIMIENTOS	103
BIBLIOGRAFIA	105

1. Glosario

BHI: Medio de cultivo infusión de cerebro-corazón (*infusion brain-heart medium*)

DOE: Diseño Experimental

DCM: Diclorometano

DMF: Dimetilformamida

FTIR: Espectroscopia de Infrarrojo de Transformada de Fourier

IR: Espectroscopia de Infrarrojo

OM: Microscopia Óptica

PEG: Polietilenglicol

PFC: Proyecto Final de Carrera

PLA: Ácido poliláctico

PM: Peso molecular

SEM: Microscopia Electrónica de Barrido

UCR: Unidad constitucional repetitiva

Δm : Pérdida de masa

ρ : Densidad

\varnothing : Diámetro

2. Prefacio

2.1. Origen del proyecto

El Grupo de Investigación “Polímeros Sintéticos: Estructura y Propiedades. Polímeros Biodegradables, PSEP” del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Politècnica de Catalunya (UPC) tiene una importante trayectoria en la conformación de polímeros biodegradables mediante la técnica del electrohilado o *electrospinning*.

Esta técnica mimetiza la conformación de tejidos y órganos en el cuerpo humano; por ejemplo, la matriz extracelular está estructurada tridimensionalmente por una red de microfibras y nanofibra, de manera similar el tejido óseo está estructurado jerárquicamente en redes nanofibrosas. En este sentido, es importante el estudio de técnicas y biopolímeros que puedan llegar a producir tejidos nanofibrosos similares a los tejidos y matrices biológicas. Así, la técnica de electrospinning constituye un verdadero avance en la ingeniería de tejidos. Adicionalmente, si se considera el carácter temporal de los polímeros biodegradables junto a su plasticidad conformacional estaríamos indicando el camino hacia una revolución en cuanto a la regeneración de tejidos y órganos.

Así, en los últimos años, diversos PFC realizados en el PSEP han consistido en la preparación de matrices de microfibras y/o nanofibras como plataformas para el cultivo de células (*scaffolds*), y sistemas liberadores de drogas, para ello se han preparado fibras uniaxiales de un polímero o mezclas de dos polímeros con diferentes características hidrofóbicas. También, se ha estudiado el uso de las microfibras y nanofibras como material de refuerzo para films de polímeros con reducidas propiedades mecánicas. Recientemente, en el PSEP se han preparado fibras coaxiales como sistemas liberadores de drogas.

En la actualidad, se ha iniciado la exploración de aplicaciones innovadoras para la técnica de electrospinning. Una de estas aplicaciones consiste en utilizar estas matrices como plataformas para encapsular sistemas biológicos viables con la finalidad de conservar, transportar y liberar de manera controlada estos sistemas biológicos. Los sistemas biológicos que están siendo encapsulados son los más “simples”, tal como virus y bacterias. Sin embargo, los resultados obtenidos por ahora demuestran una gran pérdida en la viabilidad de los sistemas biológicos encapsulados. Esta situación se debe en gran medida al efecto tóxico de los solventes orgánicos usados como disolventes de los polímeros, y posiblemente al efecto del campo eléctrico sobre las biomacromoléculas de los sistemas biológicos.

En tal sentido, el actual PFC tiene como interés estudiar la posible aplicación del sistema de electrospinning coaxial como técnica de encapsulamiento de sistemas biológicos. El hecho

de poder manejar de manera diferencial el dominio de cubierta y el core en las fibras coaxiales ofrece la posibilidad de mejorar la viabilidad del sistema biológico en un entorno de solvente y polímero más biocompatible. Así, en este trabajo, se ha propuesto preparar fibras coaxiales con un core basado en polietilenglicol (PEG) debido a su solubilidad en agua, lo cual constituye un medio que permite la viabilidad de bacterias y virus.

2.2. Motivación

La principal motivación para realizar este PFC es un interés propio por abordar un trabajo experimental que me permite poner en práctica muchos de los conocimientos adquiridos a lo largo de mi carrera. Además, este PFC me ha permitido adquirir experiencia en el trabajo experimental en un laboratorio de biopolímeros.

Adicionalmente, otro motivo por el cual he realizado este PFC fue debido al hecho que la transformación de los polímeros biodegradables mediante el electrohilado es una aplicación directa y actual que existe en el ámbito de la biomedicina. Así, pensar que este PFC pueda contribuir relativamente de manera inmediata en el desarrollo de nuevas líneas de estudio para el desarrollo biotecnológico de la biomedicina y alimentación.

2.3. Requerimientos previos

Inicialmente, con el objetivo de establecer los antecedentes y las mejores metodologías para alcanzar los objetivos propuestos se realizó una búsqueda e investigación bibliográfica.

Este PFC se ha desarrollado en un laboratorio de investigación, lo cual ha requerido un aprendizaje del funcionamiento general del laboratorio: almacenaje de productos químicos, limpieza y cuidado de los materiales, compra de material fungible, reserva de materiales y equipos, manejo de los residuos generados, etc. Para los reactivos requeridos en el PFC se realizó la búsqueda de sus fichas técnicas de seguridad para garantizar un uso correcto y seguro.

Para el desarrollo del PFC se han utilizado un gran número de técnicas, que han requerido un adiestramiento y/o aprendizaje previo.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general del proyecto

El objetivo general propuesto fue estudiar bajo un diseño experimental la obtención de fibras coaxiales estructuradas con un núcleo (*core*) de polietilenglicol (PEG) y una cubierta (*shell*) de ácido poliláctico (PLA). La preparación de estas fibras servirá para cargar sistemas biológicos en el núcleo de la fibra. Este procedimiento permitirá mejorar la viabilidad de los sistemas biológicos desde que el PEG es un polímero soluble en agua.

3.2. Objetivos específicos del proyecto

- 1) Determinar los parámetros operacionales óptimos para el electrohilado coaxial de PEG/PLA (*core/shell*). Bajo un diseño experimental de tipo factorial $3 \times 2^{2^2}$, donde fueron considerados los valores extremos de NaCl, peso molecular PEG, y concentración de PLA en la preparación de las disoluciones para el electrohilado.
- 2) Seleccionar mediante microscopía óptica las diferentes matrices de fibras coaxiales para su posterior caracterización según:
 - a) Se estudiarán los ángulos de contacto de las superficies de las matrices como una aproximación para determinar la correcta disposición del PEG en el núcleo de las fibras. Por ejemplo, una fibra con un bajo ángulo de contacto podría estar indicando la distribución superficial del PEG.
 - b) Se evaluará la pérdida de peso de las matrices después de ser incubadas en agua. La disminución del peso de una matriz indicaría la disolución del PEG.
 - c) Se analizarán las fibras seleccionadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para establecer su morfología y diámetro de la fibra. La observación microscópica será realizada antes y después de incubar las matrices en agua, para determinar posibles cambios morfológicos producidos por la disolución del PEG.
- 3) Encapsular o cargar la bacteria *Escherichia coli* (usada como prototipo de sistema biológico) en las fibras coaxiales PEG/PLA (*core/cubierta*) bien estructuradas. Posteriormente, serán caracterizadas de acuerdo a los siguientes puntos:
 - a) Determinar la pérdida de masa incubando las matrices en agua, para establecer la disposición del PEG y composición de la fibra.
 - b) Caracterizar la morfología y diámetro de las fibras mediante el análisis de imágenes obtenidas por SEM.
 - c) La composición cualitativa de las fibras será analizada por espectroscopia de radiación infrarroja (FTIR).

- d) Evaluar la carga bacteriana. Para ello, el número de bacterias será determinado en disolución del PEG y en fibras destruidas por ultrasonido.
- e) Determinar la estabilidad de la carga bacteriana. Para ello, se analizará la viabilidad bacteriana en función del tiempo de almacenamiento de las matrices de fibras.
- f) Estudiar el efecto protector de la cubierta de la fibra coaxial. Para ello, se determinará la viabilidad bacteriana en fibras coaxiales cargadas con *E. coli* y expuestas a radiación ultravioleta.

4. Introducción

4.1. Polímeros

En términos generales, un polímero es una macromolécula formada por unidades constitucionales que se repiten (UCR) a lo largo de la cadena polimérica de una manera más o menos ordenada. La unión entre sí de estas pequeñas moléculas o UCR constituye el proceso químico conocido como polimerización. A estas pequeñas moléculas también se las denomina monómeros. Para que una molécula pueda generar un polímero, es necesario que su funcionalidad sea igual o superior a dos, es decir que tenga dos o más grupos funcionales que puedan reaccionar^[1].

4.1.1. Historia

Desde la antigüedad los seres humanos han utilizado polímeros de origen natural para satisfacer algunas de sus necesidades. En 1839, Charles Goodyear descubre la vulcanización, mediante la combinación de caucho natural con azufre y calentándolo a 270 grados Fahrenheit. En ese mismo siglo hubo otros descubrimientos importantes como el de la nitrocelulosa en 1846 por Christian Schönbein y el descubrimiento de la dinamita por Alfred Nobel en 1875.

En el siglo XX, Leo Baekeland descubre en 1907 una resina termoestable preparada por reacción entre el fenol y formaldehído a la que denominó bakelita. El concepto de polímero, tal y como lo conocemos en la actualidad se debe a Staudinger, cuando en 1920 introdujo por primera vez la idea de una cadena macromolecular constituida por enlaces covalentes. En 1938, gracias a Wallace Hume Carothers se obtiene la primera fibra sintética, una poliamida sintética denominada Nylon. En 1955 gracias a los trabajos combinados de Karl Ziegler y Giulio Natta se obtuvo un polipropileno cristalino y surgió el concepto de estereorregularidad que les valió la concesión del premio Nobel en 1955. Posteriormente las brillantes investigaciones de otro destacado científico, Paul J. Flory, también le hicieron acreedor del premio Nobel en 1974.

A partir de entonces el desarrollo de nuevas tecnologías, materiales y aplicaciones de los polímeros ha sido explosivo. En el mundo contemporáneo, los polímeros sintéticos han copado todos los ámbitos del desarrollo y la elaboración de productos manufacturados, sustituyendo materiales usados tradicionalmente, tales como la madera, metales y materiales cerámicos. Así, por ejemplo estos materiales encuentran aplicación en campos tan diversos como la medicina (donde se emplean como prótesis, válvulas cardíacas entre otras muchas aplicaciones), ingeniería (partes de vehículos y de computadores, tableros, y cientos de aplicaciones mas), agricultura, etc.

4.1.2. Clasificación

4.1.2.1. Según el origen

- Polímeros Naturales: Son los que se pueden presentar en la naturaleza (reino vegetal y animal), por ejemplo: la celulosa, el caucho natural, las resinas, etc..
- Polímeros Sintéticos: Son los que se obtienen por vía puramente sintética a partir de sustancias de bajo peso molecular. Ej: el Nylon.
- Polímeros semisintéticos: Son los obtenidos por la transformación química de los polímeros naturales, sin que se destruya de modo apreciable su naturaleza macromolecular. Ej: la seda artificial obtenida a partir de la celulosa.

4.1.2.2. Según sus propiedades físicas

- Termoestables: Son polímeros que no se pueden fundir a través de un proceso de calentamiento simple, puesto que su masa es tan dura que necesita temperaturas muy elevadas para sufrir algún tipo de destrucción.
- Elastómeros: Son polímeros que aunque pueden ser deformados, una vez que desaparece el agente que causó la pérdida de su forma pueden retornar a ella.
- Termoplásticos: Este es un tipo de polímeros que tienen facilidad para ser fundidos, y por lo tanto pueden ser moldeados. Si tienen una estructura regular y organizada, pertenecen a la subdivisión de los cristalinos, pero si su estructura es desorganizada e irregular, se consideran amorfos.

4.1.2.3. Según la estructura molecular

- Polímeros lineales: La molécula está constituida por una cadena de la que sólo cuelgan los grupos laterales, los cuales ya estaban presentes en el monómero.
- Polímeros ramificados: Existen cadenas más o menos largas, en mayor o menor frecuencia, que emergen de manera aleatoria de la cadena principal. La constitución química de la rama es idéntica a la de la cadena principal.
- Polímeros peine: Constituyen un caso intermedio entre polímeros lineales y ramificados. Contienen ramas de similar longitud, dispuestas con alta frecuencia y regularidad a lo largo de la cadena principal. Por lo general cuelga una rama de cada UCR. La constitución química de la rama es por lo general diferente a la de la cadena principal. En los polímeros estrella, las diferentes ramas irradian desde un origen común.
- Polímeros entrecruzados: Son polímeros ramificados en los que las ramas entrelazan las cadenas unas con otras, de manera que todo el conjunto puede concebirse como una sola macromolécula de tamaño limitado. Los polímeros escalera son unos polímeros entrecruzados constituidos por una sucesión regular

de ciclos. Los polímeros semiescalera son un caso particular en el que las unidades cíclicas alternan con segmentos lineales.

4.1.2.4. Según la composición química de la cadena principal

- Polímeros homocadena: Son aquellos en los que la cadena principal no contiene heteroátomos. Dentro de este grupo de polímeros, se distinguen cinco familias principales: las Poliolefinas, los Poliostirénicos, los insaturados (polienos), los polivinilos y los poliacrílicos.
- Polímeros heterocadena: En esta clase de polímeros (que contienen heteroátomos en la cadena principal) hay tantas familias como funciones químicas, distinguiéndose en cada caso los tipos A·B y A-A·B-B según que las funciones complementarias de los monómeros estén sobre la misma molécula o no.

4.1.2.5. Según las reacciones de formación

- Polímeros de adición: Son polímeros cuyas macromoléculas se han formado por unión de moléculas monómeras no saturadas. Ej: el polietileno.
- Polímeros de condensación: Son polímeros cuyo enlace entre las macromoléculas son multifuncionales, con separación de algún producto de bajo peso molecular. Ej: Nylon, las proteínas.
- Polímeros poliaductos: Son aquellos cuyo enlace entre las macromoléculas son multifuncionales, sin separación de moléculas sencillas. Ej: poliuretanos y resinas.

4.1.2.6. Según su uso

- Plásticos “commodities”: Son plásticos de uso cotidiano, que se caracterizan por ser económicos y de consumo masivo.
- Plásticos “specialities”: Son plásticos destinados a aplicaciones más específicas y con un valor añadido considerable.

A continuación, en la Fig. 4.4.1 se presenta un esquema de la clasificación de los polímeros.

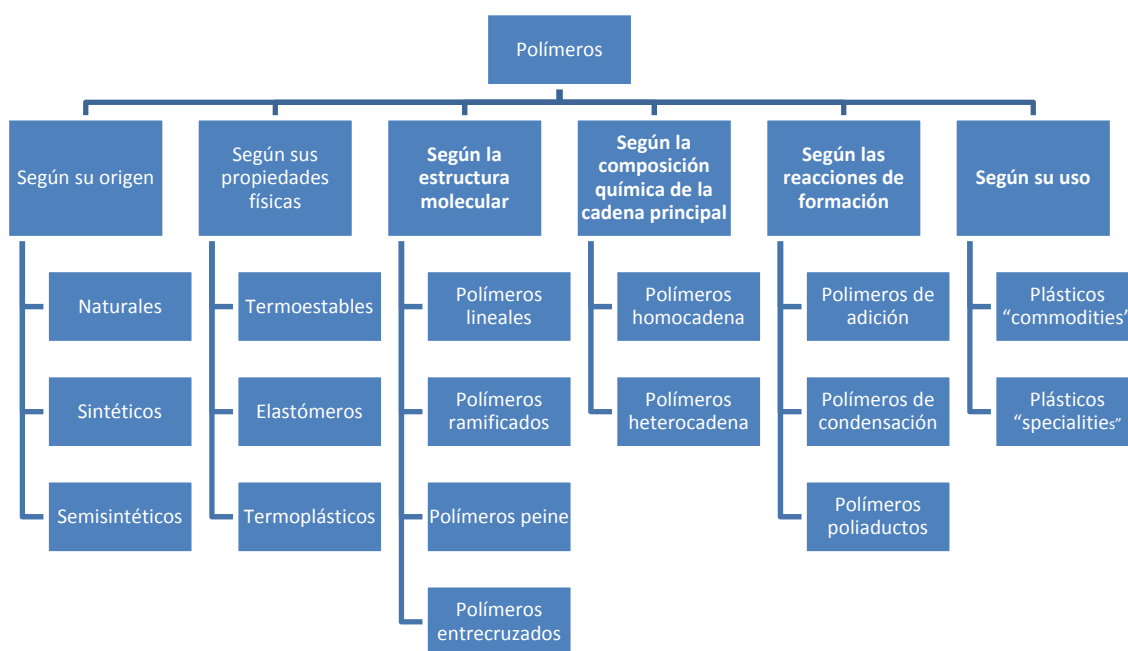


Fig. 4.4.1 Esquema de la clasificación de los polímeros

4.1.3. Aplicaciones

A pesar de que los distintos polímeros presentan grandes diferencias en su composición y estructura, hay una serie de propiedades comunes en todos ellos y que los distinguen de otros materiales como por ejemplo el aluminio o el acero.

El rango de densidades de los polímeros es relativamente bajo en comparación a otros materiales como el aluminio o el acero. El hecho de que los polímeros tengan una densidad tan baja permite que sean materiales fáciles de manejar y supone gran ventaja en el diseño de piezas en las que el peso es una limitación, con ello que se utilice en diferentes industrias.

Por otra parte, el valor de la conductividad térmica de los polímeros es sumamente pequeña. Esto hace que se puedan utilizar como aislantes térmicos.

Igualmente la gran mayoría de polímeros conducen muy mal la corriente eléctrica en comparación con otros materiales como el acero o el aluminio. Por ello presentan resistencias muy elevadas, y por tanto, baja conductividad eléctrica. Gracias a su elevada resistencia eléctrica los polímeros se utilizan frecuentemente como aislantes eléctricos de aparatos y conducciones que funcionan con corriente o la transportan.

En cuanto a las propiedades ópticas, los polímeros que no contienen aditivos son por lo general traslúcidos, aunque esta propiedad está fuertemente influenciada por la cristalinidad del material. Los polímeros amorfos son transparentes, mientras que los cristalinos son opacos. Las zonas cristalinas dispersan la luz, evitando así su libre transmisión, dando lugar a translucidez u opacidad excepto cuando se orientan o se tratan secciones muy finas. Por lo contrario, en los polímeros amorfos el empaquetamiento al azar de las moléculas no causa una difracción de la luz importante, permitiendo una transparencia muy buena y una transmitancia a la luz que puede ser superior al 90. Termoplásticos amorfos como el PC, PMMA y PVC presentan transparencia que no difieren mucho de la del propio vidrio. La transparencia de los polímeros se puede perder, al menos parcialmente, por exposición a la intemperie o a cambios bruscos de temperatura^[6].

Por tanto la gran variedad de polímeros y de combinación entre ellos, hace que dispongan de propiedades favorables para el uso que se les quiera dar. Por ello se pueden emplear en infinitésimas cosas como por ejemplo: tuberías, fibras textiles, aislamiento eléctrico, revestimientos, envases, utensilios caseros, aparatos quirúrgicos, medicina etc.

4.2. Polímeros biodegradables

4.2.1. Generalidades

La introducción de nuevos materiales biodegradables ha sido el reto de la ciencia de los materiales en los últimos 20 años, ya que los residuos poliméricos sintéticos han aumentado considerablemente. Muchos esfuerzos tecnológicos han sido dirigidos principalmente a solventar problemas en el área de la salud, medicina y medio ambiente. Si bien los polímeros naturales están generalmente más asociados al término de biodegradabilidad, la gama de polímeros sintéticos que cumplen este concepto se ha incrementado notablemente en los últimos años, debido a la mejora de sus propiedades, que los han hecho más susceptibles de seguir los mecanismos de degradación que les afectan en el medio ambiente una vez que se han convertido en residuos.^[4]

El término de biodegradabilidad fue definido de forma general por Chandra y Rustgi^[5] como un proceso por el cual bacterias, hongos, levaduras y sus enzimas consumen una sustancia polimérica como una fuente de alimento de manera que su forma original se ve alterada. Es un proceso relativamente rápido bajo las condiciones apropiadas de humedad, pH, temperatura y oxígeno disponible. El principal requisito de los polímeros biodegradables es que contengan grupos lábiles en sus cadenas que puedan romperse fácilmente por acción de un agente externo de naturaleza física o química. Estos grupos deben contener enlaces hidrolíticamente inestables, como por ejemplo los que se hallan presentes en: éster, anhídrido, amida, etc.

La biodegradación depende de las propiedades mecánicas del polímero y de la velocidad de degradación^[7].

Las propiedades mecánicas que influyen en la degradación son:

- El tipo de naturaleza del monómero.
- El iniciador de la reacción de polimerización.
- Los aditivos presentes en el polímero.
- Las condiciones de procesado.

La velocidad de degradación depende de tres factores:

- Condiciones del medio: temperatura, humedad y pH.
- Características del polímero: presencia de enlaces químicos susceptibles a la hidrólisis, la hidrofiliidad, la estereoquímica, el peso molecular, la cristalinidad, la superficie específica, la Tg y la Tf.
- Tipo de microorganismos: cantidad, variedad, fuente y actividad.

4.2.2. Proceso de degradación

4.2.2.1. Fotodegradación

La fotodegradación incluye los cambios físicos y químicos que se producen en el polímero debido a la irradiación del material con luz ultravioleta o visible. Este proceso se basa en la aportación de energía de la luz ultravioleta procedente de la luz solar. Esta energía es mayor que la energía de unión entre los enlaces C-C y C-H, por ese motivo, rompen las cadenas moleculares reduciendo así su peso molecular y sus propiedades mecánicas.

Existen dos maneras de obtener polímeros fotodegradables:

- Introduciendo en el polímero grupos funcionales sensibles a la radiación ultravioleta, como los grupos carbonilo, mediante la modificación del polímero y copolimerización con monómeros portadores del grupo carbonilo, tales como cetonas vinílicas.
- Introduciendo aditivos fotosensibles, catalizadores y peroxidantes que aceleren el proceso de degradación.

4.2.2.2. Degradación térmica

En el procesado de polímeros interviene de forma muy directa el calor, y por este motivo la degradación térmica es de gran importancia. El proceso está acompañado por la ruptura hemolítica de los enlaces covalentes de la cadena o de los grupos laterales como

consecuencia del aumento de la temperatura. Dependiendo de la reactividad de cada radical se producirán unas reacciones u otras.

Tanto si hablamos de fotodegradación como de degradación térmica, los mecanismos fundamentales de degradación de los polímeros están basados en los mismos principios. La única excepción es que la fotodegradación tiene lugar a una velocidad más rápida que la degradación térmica.

4.2.2.3. Degradación hidrolítica

La degradación hidrolítica de un polímero se produce como consecuencia del contacto del material con un medio acuoso. La penetración del agua dentro de la matriz provoca el inflamamiento, ruptura de puentes de hidrógeno intermoleculares, hidratación de las moléculas y finalmente la hidrólisis de los enlaces inestables. La rotura de los grupos funcionales por hidrólisis, puede suceder tanto en los grupos situados en la cadena principal como en los sustituyentes laterales.

El concepto de degradación de un polímero se asocia con el decrecimiento del peso molecular, por este motivo, es necesario que la cadena principal se rompa en diferentes puntos. Por tanto, la degradación implica la hidrólisis de los grupos funcionales que estén situados en la cadena principal.

4.2.2.4. Biodegradación

El término biodegradación hace referencia a la transformación y deterioro que se produce en el polímero debido a la acción natural de microorganismos (bacterias, hongos, algas), para obtener progresivamente una estructura más simple. La biodegradación puede ser parcial o total.

- La biodegradación parcial consiste en la alteración en la estructura química del material y la pérdida de propiedades específicas.
- La biodegradación total consiste en la degradación absoluta por la acción de microorganismos. Esta puede ser aeróbica o anaeróbica. Bajo las condiciones aeróbicas produce dióxido de carbono, agua, sales minerales y biomasa. En cambio, bajo las condiciones anaeróbicas produce metano, agua, sales minerales y biomasa.

A continuación, en la Fig. 4.2 se presenta un esquema del proceso de degradación de los polímeros biodegradables.

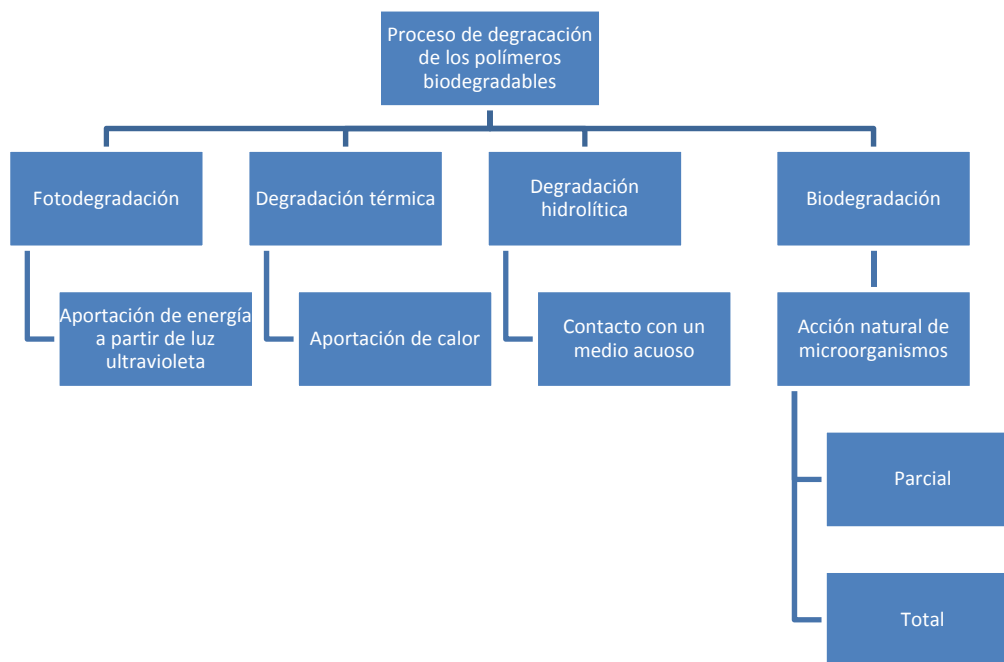


Fig. 4.2 Esquema del proceso de degradación de los polímeros biodegradables

4.2.3. Clasificación

Según su procedencia los polímeros biodegradables se pueden clasificar en naturales o sintéticos.

- Los polímeros naturales provienen de recursos naturales, desde el punto de vista químico, incluyen cuatro subgrupos: polisacáridos, proteínas, lípidos y poliésteres. En los polisacáridos tenemos los homopolisacáridos (almidón, celulosa, y quitina) y los heteropolisacáridos (gomas naturales). En los poliésteres tenemos los producidos por microorganismos o plantas (PHA, PHB) y los sintetizados a partir de monómeros biológicos (PLA).
- Los polímeros sintéticos se obtienen a partir de materias primas procedentes de la petroquímica o derivados de recursos biológicos. Dentro de esta familia son considerados biodegradables aquellos polímeros que exhiben degradación promovida por microorganismos junto con agentes químicos o que exhiben degradación mecánica.

A continuación, en la Fig. 4.3 se presenta un esquema de los diversos polímeros biodegradables.

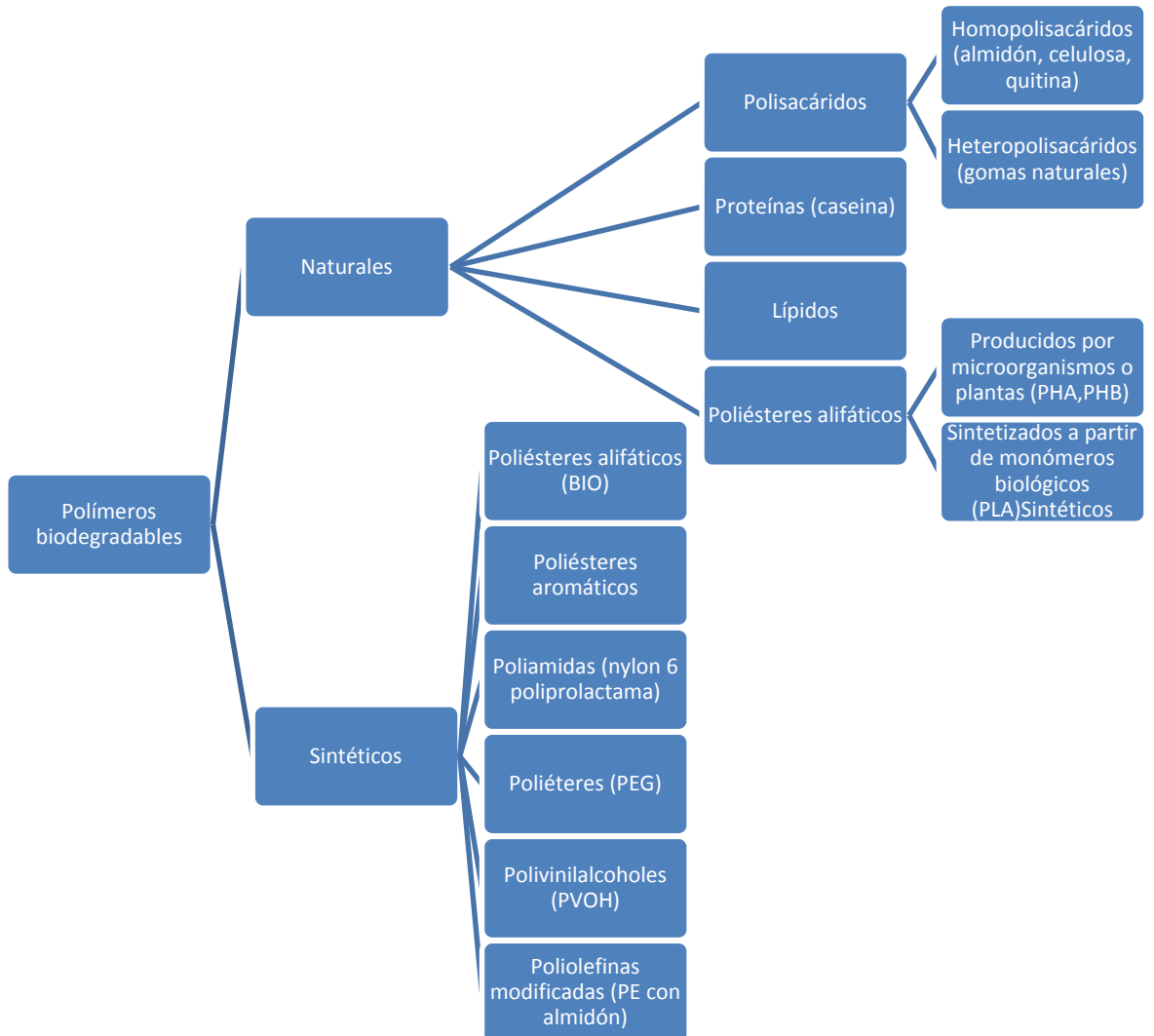


Fig. 4.3 Esquema de los diversos polímeros biodegradables

4.2.4. Acido poliláctico (PLA)

El Ácido Poliláctico (PLA) es un polímero de la familia de los poliésteres preparado a partir del ácido láctico, cuya estructura principal consta de un grupo carboxilo y de un radical metilo que está unido al metilo de la cadena del polímero ^[9]. A continuación, en la Fig. 4.4 se presenta la unidad repetitiva del ácido poliláctico.

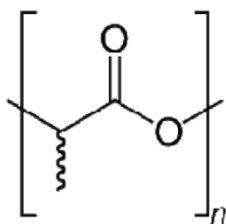


Fig. 4.4 Unidad repetitiva del ácido poliláctico

El PLA puede ser clasificado como biopolímero de origen natural porque su monómero (ácido láctico) todavía se obtiene mayoritariamente por fermentación de los recursos renovables, materiales con almidón y azúcares. Aunque también podría situarse en la categoría de los poliésteres sintéticos porque puede ser sintetizado a partir de fuentes petrolíferas ^[10].

El ácido poliláctico pertenece al grupo de los Poli(hidroxiácidos), que son poliésteres alifáticos sintetizados mediante polimerización por apertura de anillo o lactonas y lactidas. Concretamente pertenecen al grupo de los poli(α -hidroxiácidos) que se diferencian de los (β -hidroxiácidos) al contener el grupo -OH en posición α respecto al grupo -COOH. Éstos son polímeros semicristalinos con puntos de fusión relativamente altos.

El PLA se puede preparar tanto por condensación/esterificación directa del ácido láctico, como por polimerización por apertura de anillo de la lactida. La policondensación directa del hidroxiácido produce material de bajo peso molecular. En cambio si se obtiene por apertura de anillo de su dímero cíclico, la lactida, el material obtenido es de elevado peso molecular y con un punto de fusión algo superior a 170°C, tal y como se observa en la Fig. 4.5

Para usos biomédicos, el PLA es preparado por este último procedimiento, si bien el proceso completo implica una polimerización térmica del hidroxiácido hasta un PLA de bajo peso molecular que es despolimerizado y ciclado posteriormente. El material final es obtenido a partir de la lactida así preparada.

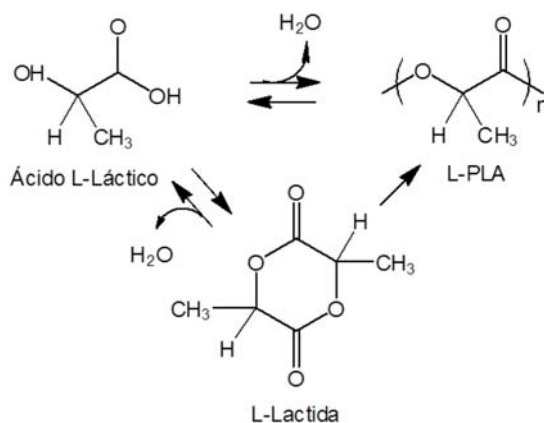


Fig. 4.5 Obtención de la polilactida

La unidad repetitiva del PLA consta del grupo éster y de un grupo $-\text{CH}(\text{CH}_3)$, tal y como se observa en la Fig. 4.6. Desde el punto de vista de su estructura química, el carbono alfa de la unidad repetitiva es un carbono quiral y en consecuencia puede presentar dos configuraciones distintas.

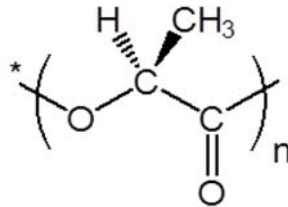


Fig. 4.6 Unidad repetitiva de la polilactida

La lactida es el dímero cíclico del ácido láctico, que existe en forma de dos isómeros ópticos, el D y el L, como se muestra en la Fig. 4.7. El monómero cíclico tiene dos carbonos asimétricos por lo que es factible preparar polímeros con diferentes tacticidades. La L-lactida es el dímero obtenido a partir del estereoisómero natural, mientras la D,L-lactida está formada por los dos estereoisómeros. El homopolímero derivado del monómero natural, L-láctico (L-PLA), es un polímero semicristalino (grado de cristalinidad del 37), debido principalmente a su estereoregularidad. Tiene alta resistencia a la tensión y baja elongación, y consecuentemente tiene un módulo de Young elevado, lo que hace al polímero muy adecuado para aplicaciones que tienen que soportar una carga, como son las suturas y fijaciones ortopédicas ^[12,13]. Térmicamente, se caracteriza por tener un punto de ebullición elevado (175-178°C) y una temperatura de transición vítrea comprendida entre 60 y 65°C.

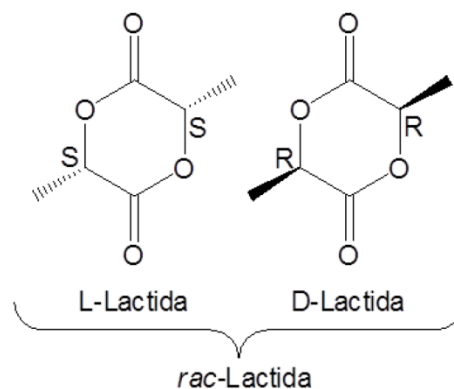


Fig. 4.7 Enantiómeros del ácido láctico: D-láctico y L-láctico

El poli (D,L-láctico) (DLPLA) es un polímero amorfo, ya que está formado por los dos isómeros del ácido láctico con una distribución aleatoria, hecho que impide que la estructura sea cristalina. Consecuentemente, este polímero tiene una resistencia a la tensión más baja, alta elongación, y una elevada velocidad de degradación que hace que sea un material muy

atractivo para los sistemas de liberación de fármacos. También se preparan copolímeros de L-PLA y D,L-PLA para disminuir la cristalinidad del polímero quiral y controlar el proceso de degradación^[12,13].

Actualmente se utiliza en suturas, tornillos, cirugía maxilofacial, liberación de fármacos, stents (mallas) para cirugía cardiovascular y clavos para la unión de ligamentos, fijación de fracturas y reparación de meniscos. Una de las aplicaciones más recientes del PLA se encuentra en el campo de la Ingeniería de Tejidos, donde se pretende regenerar tejidos a partir de células del mismo paciente cuyo crecimiento es guiado in-situ mediante andamios (scaffolds) reabsorbibles^[14].

4.2.5. Polietilenglicol (PEG)

El polietilenglicol o glicol de polietileno (PEG) es un poliéter con muchas aplicaciones desde la industria manufacturera hasta la industria de la medicina

El PEG está compuesto por unidades repetitivas de óxido de etileno. Cada UCR de óxido de etileno tiene un peso molecular de 44 Da (g/mol), así pues en función de las UCR que compongan el PEG será de bajo o alto peso molecular. Debido a ello, los PEG pueden ser líquidos o sólidos de bajo punto de fusión, en función de sus pesos moleculares.

El polietilenglicol se produce por la interacción de óxido de etileno con agua, etilenglicol u oligómeros de etilenglicol, tal y como se muestra en la Fig. 4.8. La reacción es catalizada por catalizadores ácidos o básicos. El etilenglicol y sus oligómeros son preferibles como material de partida en lugar de agua, debido a que permiten la creación de polímeros con una baja polidispersidad^[15,16] (distribución de peso molecular estrecha). Longitud de la cadena de polímero depende de la relación de los reactivos.

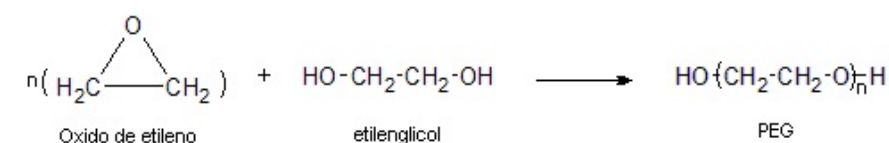


Fig. 4.8 Síntesis del polietilenglicol

Dependiendo del tipo de catalizador, el mecanismo de polimerización puede ser catiónico o aniónico. El mecanismo aniónico es preferible, ya que permite obtener un PEG con baja polidispersidad. La polimerización de óxido de etileno es un proceso exotérmico. El sobrecalentamiento o contaminantes de óxido de etileno con catalizadores tales como óxidos metálicos o álcalis o de metal puede conducir a la polimerización fuera de control, que puede terminar en una explosión después de unas pocas horas^[18].

El óxido de polietileno o polietilenglicol de alto peso molecular, se sintetiza por polimerización en suspensión. Es necesario sujetar la cadena de polímero en crecimiento en solución en el curso del proceso de policondensación. La reacción es catalizada por compuestos órgano-metálicos de magnesio, aluminio o calcio. Para evitar la coagulación de las cadenas de polímero en solución, se utilizan aditivos quelantes tales como dimetilglioxima^[18].

Se utilizan catalizadores alcalinos, tales como hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), o carbonato de sodio (Na₂CO₃), para preparar polietilenglicol de bajo peso molecular.

El polietilenglicol es soluble en agua, por lo que la mayoría de sus aplicaciones se dan en disoluciones acuosas, posee baja inflamabilidad y baja presión de vapor. En comparación con otros disolventes alternativos, el PEG es biodegradable, biocompatible y no tóxico; y puede ser recuperado y reciclado de la disolución por extracción o destilación directa. Además es soluble en solventes orgánicos como el benceno, cloroformo, dimetilformamida, diclorometano.

El PEG se utiliza en numerosas aplicaciones, tales como agentes tensoactivos, en los alimentos, en cosmética, en farmacia, en la biomedicina, como agentes dispersantes, como disolventes, en ungüentos, en bases de supositorios, como excipientes en tabletas y como laxantes. Actualmente, es el polímero más utilizado en las ciencias biomédicas ya que debido a su hidrofiliidad, disminución de la interacción con los componentes sanguíneos y su alta compatibilidad permite la administración de múltiples fármacos^[17].

4.2.6. Aplicaciones biomédicas de los polímeros biodegradables

Para que un material pueda ser utilizado en una aplicación biomédica es necesario que sea compatible con el cuerpo humano, es decir, no debe ser mutagénico, cancerígeno, antigénico y tóxico; y a su vez sea capaz de degradarse pasado un cierto tiempo. Deben ser materiales que al esterilizarse no sufran alteraciones significativas y que muestren buenas propiedades de conformación para su producción a nivel industrial.

Algunas de las aplicaciones más habituales son las suturas quirúrgicas, barreras temporales, dispositivos de liberación controlada(fármacos) y andamios temporales (temporary scaffolds).

4.2.6.1. Saturas quirúrgicas

El campo de la biomedicina una de las aplicaciones con mayor éxito en son los materiales para las suturas. El motivo principal es su capacidad de biodegradación y de ser bioabsorbido por el cuerpo humano. El interés en desarrollar dichos materiales radica en el

de disminuir el potencial de infección post-operatorio. Este tipo de implantes permiten realizar distintas funciones como por ejemplo, suplantar la función de un órgano lesionado mientras éste se recupera, momento a partir del cual la sutura debe desaparecer y a su vez mantener los tejidos y órganos unidos durante los días posteriores a la operación.

De forma genérica se define una sutura quirúrgica como un filamento estéril utilizado para cerrar heridas, mantener unidos varios tejidos cuando se realizan implantes protésicos o ligar vasos sanguíneos. Para la producción de suturas los materiales que se utilizan son productos naturales, fibras sintéticas comunes y algunas fibras de polímeros sintetizadas específicamente para esta aplicación.

4.2.6.2. Barreras temporales

Las barreras temporales se usan como prevención a la adhesión tras el acto quirúrgico [19]. Son importantes porque si la adhesión, no natural, no se impide, pueden provocar complicaciones.

En general este tipo de dispositivos adquieren la forma de un film de espesor reducido o malla y se dispone entre los tejidos adyacentes en el momento de la intervención quirúrgica [19,20]. Su función consiste en mantener separado el tejido dañado durante el proceso de curación. Por ello, estos materiales deben caracterizarse por ser lo suficientemente flexibles y resistentes como para mantener recubierto el tejido blando y dañado. Además de tener la capacidad de biodegradarse una vez el tejido se ha regenerado.

4.2.6.3. Andamios temporales (Temporary scaffolds)

Otra aplicación de los polímeros es su uso como dispositivos de sujeción llamados andamios temporales. Su función es actuar como soporte artificial sobre un tejido que ha sido debilitado ya sea por enfermedad, lesión o cirugía; hasta que éste recupere su forma y resistencia características.

A continuación se detallan algunos ejemplos del uso de andamios temporales con polímeros biodegradables:

Uno de los campos donde se utiliza los andamios temporales es en odontología, ya que utilizan partículas poliméricas porosas como relleno del hueco originado tras la extracción dental, para acelerar el proceso de cicatrización del hueso de la mandíbula [21]. Otro campo donde se utiliza los andamios temporales son los dispositivos ortopédicos de fijación en zonas donde las propiedades mecánicas requeridas son pequeñas.

En la actualidad el término de biodegradable scaffold se asocia específicamente a materiales de estructura tridimensional y porosa, que sirven de soporte para el crecimiento

celular in vitro, con el fin de construir un sustituto biológico para un órgano o tejido que ha perdido su función ^[19,20,22]. Esta aplicación, es la base de la ingeniería de tejidos, y es uno de los campos de la investigación biomédica más interesantes ^[21,22].

4.3. Electrospinning (electrohilado)

4.3.1. Generalidades

El Electrospinning o Electrohilado es una técnica que utiliza fuerzas eléctricas para producir fibras, de una forma relativamente simple y poco costosa, con diámetros que varían desde unos pocos nanómetros hasta algunos micrómetros ^[23-24].

Esta técnica se conoce desde hace más de 60 años en la industria textil y se utilizaba para la fabricación de telas no tejidas de fibra. En los últimos años ha habido un creciente interés por esta tecnología, que permite producir fibras a micro y nano escala con multitud de aplicaciones, desde la cosmética, ensayos ópticos, textiles, hasta la investigación médica, entre otras.

La técnica consiste en aplicar un campo electrostático elevado entre una solución polimérica y una superficie colectora. El polo positivo está unido a un sistema de inyección, en este caso una aguja, y el negativo a una placa metálica o colector (el cual se encuentra a potencial cero) donde se recogen las fibras formando un tejido o matriz porosa (llamada electrospun o matt), con textura, color y densidad características ^[25].

La técnica puede ser desarrollada de forma horizontal o vertical según se desee, el principal inconveniente al trabajar en posición vertical es la posible salida de gotas de solución desde el capilar hacia el plato colector las cuales pueden caer sobre las fibras depositadas haciendo defectuosa la superficie de las mismas e interrumpiendo el proceso. En nuestro proyecto utilizaremos la técnica en forma horizontal.

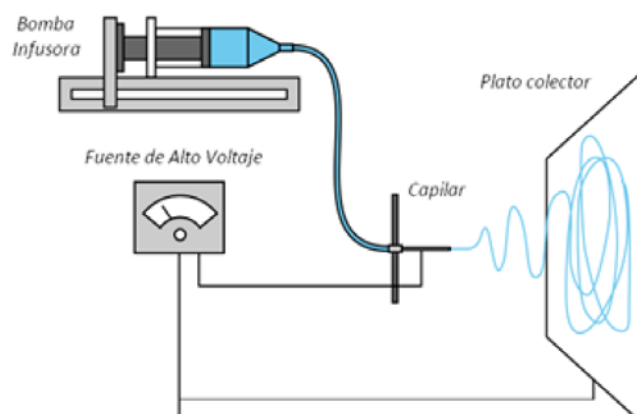


Fig. 4.9 Diagrama de un equipo de electrospinning en posición horizontal

En la Fig. 4.9 se muestra un esquema típico de un equipo de electrospinning en posición horizontal. En la parte superior se inyecta la disolución de polímero en una jeringa de inyección, a una presión y flujo controlado por la bomba de infusión o perfusión. A esta jeringa se le aplica un alto potencial eléctrico que suele oscilar entre los 0-30kV, y se genera un campo eléctrico en la región comprendida entre el extremo de la jeringa (aguja metálica) y el colector. Debido a este campo y al fenómeno de polarización y carga, la solución se deposita en la placa.

Como consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico, se forma un menisco electrificado en forma de cono, conocido como el Cono de Taylor. Este cono se forma debido al fenómeno de polarización y carga; que se produce por la inducción de cargas en el fluido mediante la distancia de separación entre los dos electrodos, rompiéndose la tensión superficial a través del campo electrostático y descomponiéndose esta tensión en una tangencial y otra normal. A medida que el cono se acelera, su diámetro es menor y las componentes tangencial y normal se equiparan hasta llegar a ser iguales. En este momento, el cono se solidifica creando las fibras y depositándose sobre la placa colectora ^[26], esto se aprecia en la Fig. 4.10.

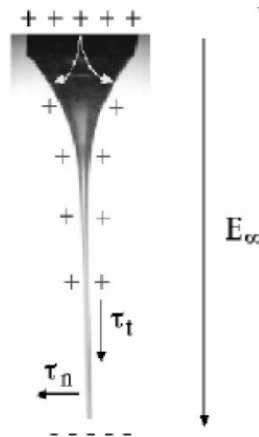


Fig. 4.10 Formación del Cono de Taylor durante el proceso de electrospinning. τ_n y τ_t componente normal y tangencial respectivamente del campo electrostático (E_{∞}).

Durante la creación del cono, el solvente se evapora gradualmente originando un spray de gotas cargadas eléctricamente. Cuando el componente tangencial y el normal no alcanzan a ser iguales ocurre el fenómeno de electrospray, en el cual en lugar de obtenerse microfibras se obtienen gotas de polímero. Se debe remarcar que la conductividad eléctrica del líquido es uno de los parámetros que condiciona la formación de las fibras, concretamente determina el diámetro del haz, el tamaño y la uniformidad de las gotas ^[26].

4.3.2. Parámetros de la técnica de electrospinning

La morfología de las fibras obtenidas por electrospinning, depende de varios factores que se pueden clasificar en tres grupos: Las propiedades de la solución polimérica, los parámetros del proceso y el entorno del electrospinning.

4.3.2.1. Propiedades de la solución polimérica

4.3.2.1.1 Concentración de la solución

Es uno de los parámetros determinantes del tamaño y la morfología de las fibras. La concentración de polímero en la solución influye tanto la viscosidad como la tensión superficial de esta, la viscosidad de una solución de polímero está relacionada con el enredo de las cadenas poliméricas, si las cadenas son menos enredadas, la solución tendrá una viscosidad baja y viceversa. El diámetro de las fibras tiende a aumentar con la viscosidad ^[31]. Si la solución está muy diluida las fibras de polímero se rompen en gotas antes de llegar al plato colector debido al efecto de la tensión superficial, de igual forma si la solución está muy concentrada entonces las fibras no se podrán formar debido a la alta viscosidad, lo que dificulta el paso de la solución a través del capilar ^[32, 33].

4.3.2.1.2 Tensión superficial

Doshi y Reneker concluyeron que reduciendo la tensión superficial de una solución de polímero podrían obtenerse fibras sin presencia de beads ^[34]. La tensión superficial intenta reducir el área superficial por unidad de masa, cambiando los chorros (jets) por esferas, al aplicar el alto voltaje se busca aumentar la superficie oponiéndose a la formación de beads y favoreciendo la formación de chorros más delgados, en este caso es la fuerza viscoelástica la que se resiste a cambios rápidos en la forma. El coeficiente de tensión superficial depende del polímero y el disolvente, adicionar disolventes como el etanol a una solución con baja tensión superficial, podría contribuir a la obtención de fibras lisas ^[35].

4.3.2.1.3 Conductividad de la solución

Soluciones con alta conductividad tendrán mayor capacidad de transportar las cargas de la solución que aquellas con baja conductividad. La adición de sales a la solución incrementa la conductividad y por consiguiente la fuerza eléctrica para el estiramiento del chorro, lo que promueve una reducción en el diámetro de las fibras ^[36]. Se ha encontrado que con el aumento de la conductividad eléctrica de la solución hay una disminución significativa en el diámetro de las fibras mientras que cuando la conductividad es baja se observa un alargamiento insuficiente del chorro lo que impide la producción de fibras uniformes ^[37].

4.3.2.1.4 Efecto dieléctrico del disolvente

Básicamente el disolvente cumple dos roles importantes dentro del proceso de electrospinning: en primer lugar disolver las moléculas de polímero para formar el chorro con carga eléctrica y en segundo lugar llevar las moléculas de polímero disueltas hasta el colector ^[38], es por ello que las propiedades del disolvente cumplen un rol fundamental dentro del proceso, la constante dieléctrica por ejemplo tiene gran influencia en el proceso de electrospinning, generalmente una solución con buenas propiedades dieléctricas reduce la formación de beads y el diámetro de las fibras resultantes ^[33].

4.3.2.2. Parámetros del proceso

4.3.2.2.1 Voltaje

El voltaje es uno de los parámetros más importantes dentro del proceso de electrospinning, algunos autores afirman que aplicar voltajes altos hace que más fluido se transporte en el chorro lo que resulta en fibras con mayores diámetros, otros afirman que un incremento en la aplicación del voltaje decrece el diámetro de las nanofibras ^[39] y aumenta la probabilidad de obtener fibras con defectos (beads) ^[33, 40], lo cierto es que en la mayoría de los casos un voltaje alto permite un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerza de coulomb en el chorro y un fuerte campo eléctrico, todos estos factores promueven una reducción en el diámetro de las fibras ^[41]. La influencia del voltaje depende además de las propiedades viscoelásticas del material base, por ello es importante analizar el comportamiento para cada polímero con su respectivo disolvente.

4.3.2.2.2 Flujo de salida

Un flujo de salida menor podría ser benéfico ya que el disolvente tendría más tiempo para evaporarse evitando la formación de defectos en las fibras ^[43]. Cuando el flujo de salida se incrementa ocurre un incremento en el diámetro de las fibras y posiblemente en el tamaño de los defectos ^[44, 42]. Un mínimo valor de volumen de solución a la salida del capilar debería ser mantenido para obtener un cono de Taylor estable, el flujo de salida determina la cantidad de solución disponible para el proceso de electrospinning.

4.3.2.2.3 Distancia entre la punta de la aguja y el plato colector

Dependiendo de las propiedades de la solución el efecto de la variación de la distancia puede o no, tener efecto en la morfología de las fibras. Al trabajar con distancias muy grandes las fibras electrohiladas podrían romperse debido a su propio peso, especialmente si las fibras son de diámetro pequeño ^[45]. Una mínima distancia es requerida para dar a las fibras el tiempo suficiente para que el disolvente se evapore

antes de alcanzar el plato colector, con distancias muy grandes o demasiado pequeñas se ha observado la aparición de beads ^[46] o fibras húmedas que promueven la obtención de fibras aplanadas o con forma de cintas. La mayoría de los autores coinciden en que con mayores distancias la solución tendrá mayor tiempo de vuelo lo que promoverá un mayor estiramiento de las fibras antes de depositarse en el plato colector ^[47].

4.3.2.3. Entorno del electrospinning

4.3.2.3.1 Parámetros ambientales

Casper et al. evaluó la influencia de la humedad en las fibras obtenidas por medio de la técnica de electrospinning y demostraron la aparición de pequeños poros circulares en la superficie de las fibras debido al aumento en la humedad ^[48]. El agua condensada en la superficie de las fibras, al trabajar con alta humedad, puede tener influencia en la morfología de las fibras especialmente cuando se trabaja con disolventes volátiles ^[49]. Los poros pueden promover una transferencia de proteínas y una migración celular mucho más ágil y fácil en ingeniería de tejidos. La humedad en el ambiente podría determinar la velocidad de evaporación del disolvente en la solución, a humedad relativa baja un disolvente volátil podría evaporarse muy rápido. Por su parte la temperatura puede incrementar la tasa de evaporación y puede ocasionar una reducción en la viscosidad de la solución ^[40]. Dependiendo de los parámetros y algunas características del ambiente las fibras pueden tener diversas formas y tamaños. A continuación, en la Fig. 4.11 se presenta un esquema de los parámetros que influyen en la técnica de electrospinning.

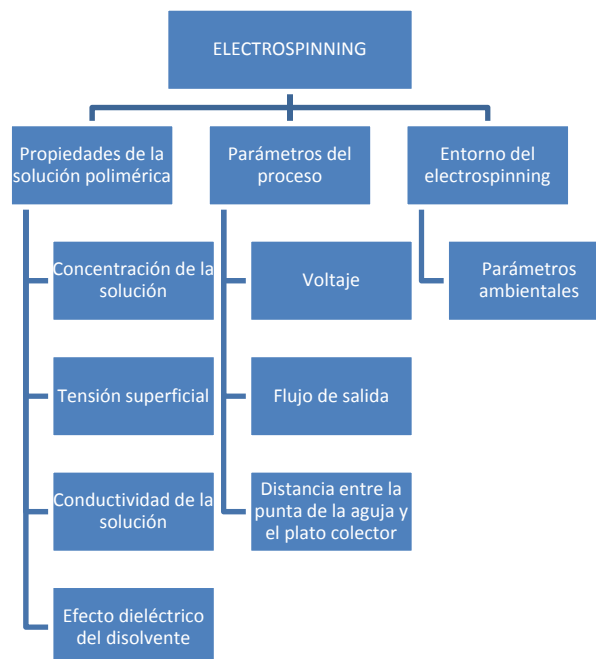


Fig. 4.11 Esquema de los parámetros que influyen en la técnica de electrospinning

4.3.3. Aplicaciones de la técnica

Actualmente, existen numerosas aplicaciones de las fibras de electrospinning en diversos campos científicos.

4.3.3.1. Composites

Una aplicación importante de las fibras obtenidas mediante electrospinning es su uso como refuerzos con el objetivo de mejorar las prestaciones mecánicas, de tal modo que los materiales permitan ser sometidos a mayor carga, tensión o deformación mecánica y reducir el peso substituyendo un material determinado por composites ^[50].

Hasta el momento, los esfuerzos en el campo de los composites con fibras para electrospinning se han dirigido a desarrollar las propiedades físicas (ópticas y eléctricas) y químicas, y a mantener las prestaciones mecánicas en niveles correctos ^[50].

4.3.3.2. Filtración

Es un proceso muy común en muchos sectores industriales y normalmente se utilizan materiales fibrosos para optimizar su uso. La finura de las fibras juega un papel importante en la eficiencia de la filtración. Las películas producidas a partir de fibras preparadas por electrospinning pueden ser una solución en los casos en que hay que separar micropartículas. De esta forma, se mejoraría la filtración atrapando las partículas más pequeñas en los filtros constituidos por nanofibras ^[50].

4.3.3.3. Tecnología textil

Los tejidos de nanofibras son capaces de neutralizar agentes químicos sin dejar de ser permeables al aire y al vapor debido a su gran superficie. El electrospinning produce capas de nanofibras que presentan una alta porosidad, pero tamaños de poros muy pequeños. Por esto, este tipo de tejidos serían buenos candidatos en vestimentas protectoras ^[50].

4.3.3.4. Cosméticos

Otra de las posibles aplicaciones de las fibras de electrospinning es en el campo de la cosmética. En este amplio campo se está investigando en máscaras adaptables a la piel. Se ha estudiado la elasticidad y facilidad de deformación de algunas fibras, gracias a estas características la aplicación de máscaras sobre la piel podría ser posible. Una segunda aplicación serían los apósitos para retirar o aplicar el maquillaje ya que, debido a la porosidad de la fibra, se pueden retener los pigmentos.

4.3.3.5. Aplicaciones ópticas y eléctricas

La tecnología es otro de los campos en los que la técnica de electrospinning se abre camino. Actualmente se está intentado producir pequeños dispositivos electrónicos y baterías de alto rendimiento (con electrodos porosos) a partir de nanofibras que provienen de polímeros conductores. El principio de estas baterías es que la velocidad de reacción electroquímica es función de la superficie del electrodo. Este tipo de membranas también pueden ser útiles para aplicaciones en las que sea necesaria la disipación electrostática, la protección de la corrosión, el aislamiento electromagnético, etc ^[51,52].

A continuación, en la Fig. 4.12 se presenta un esquema de las aplicaciones de la técnica de electrospinning.

4.3.3.6. Aplicaciones biomédicas

La mayoría de tejidos y órganos del cuerpo humano están estructurados en redes nanofibrosas, por ejemplo los huesos, el colágeno, los cartílagos o la piel. Por ese motivo es tan importante esta técnica en el campo de la biomedicina. A continuación se muestran diferentes aplicaciones biomédicas:

- **Prótesis médicas:** En diferentes estudios, se ha utilizado las fibras obtenidas a partir de electrospinning para la fabricación de un gran número de prótesis de tejido blando. En EEUU hay varias patentes para aplicaciones como venas, vascular, mama, ect.
Además, las fibras para electrospinning se pueden usar como films que recubran las prótesis de tejido rígido que actúan como interfaz para evitar o prevenir que la prótesis falle ^[54,55,67].
- **Soportes para el crecimiento del tejido humano:** A partir de esta técnica y de los biomateriales, se diseñan refuerzos óptimos que son capaces de imitar las estructuras y funciones biológicas de la matriz. A lo largo de los últimos años se ha dedicado una mayor investigación para generar refuerzos a partir de polímeros sintéticos biocompatibles y/o biodegradables ^[68].
- **Protección de heridas:** las heridas o quemaduras en la piel se pueden tratar con capas poliméricas de nanofibras. El recubrimiento de las heridas con capas se podría aplicar directamente creando un campo eléctrico local. De esta manera se impulsa el crecimiento de la piel y se evita la formación de cicatrices. Una de las limitaciones de este método recae en que, como es lógico, el hueso y la piel no pueden ser tratados con el mismo tipo de fibra, ya que según su procedencia polimérica, en unos casos será efectiva y en otros no. La investigación en este campo evoluciona con rapidez y se espera que pronto forme parte de una nueva técnica médica consolidada ^[57,58].

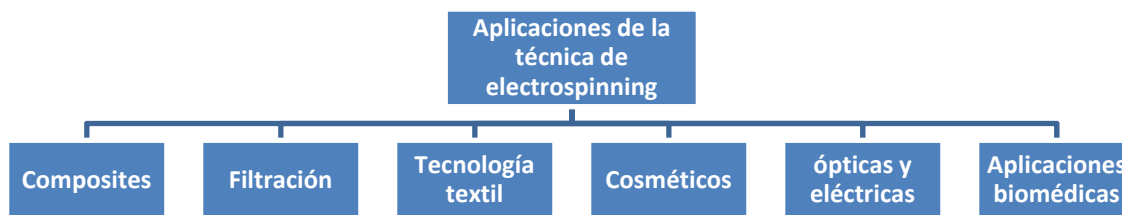


Fig. 4.12 Esquema de las aplicaciones de la técnica de electrospinning

4.4. Electrospinning coaxial

4.4.1. Generalidades

Electrospinning coaxial es una modificación o una ampliación de la técnica convencional [26] que ha permitido electrohilar simultáneamente diferentes polímeros dentro de una estructura formada por un núcleo (core) y una corteza (Shell) de nanofibras [27, 29].

A diferencia de la aguja empleada en el electrospinning convencional, la boquilla coaxial consta de dos agujas concéntricas. Esta es alimentada simultáneamente por las dos soluciones poliméricas, una de las cuales formará el núcleo de la fibra y la otra la cubierta.

Al igual que el electrospinning convencional el proceso de electrohilado se inicia cuando se ve salir la primera gota compuesta de las fases poliméricas de la aguja coaxial. Seguidamente, tras la aplicación de una tensión suficiente, entre la aguja y el colector, se forma el cono de Taylor; en esta ocasión es un cono compuesto por las dos soluciones. El chorro de líquido expulsado sufre el mismo proceso que en el electrospinning convencional y la membrana fibrosa que resulta en este caso es un material compuesto bicomponente [29,30], esto se aprecia en la Fig. 4.13. La mayor ventaja de trabajar con electrospinning coaxial es que la solución que forma el núcleo no necesariamente debe tener las propiedades dieléctricas para someterse al proceso, la solución que actúa como corteza puede servir como vehículo de esa solución principal permitiendo encapsular fármacos de diferente naturaleza y con diversas características.

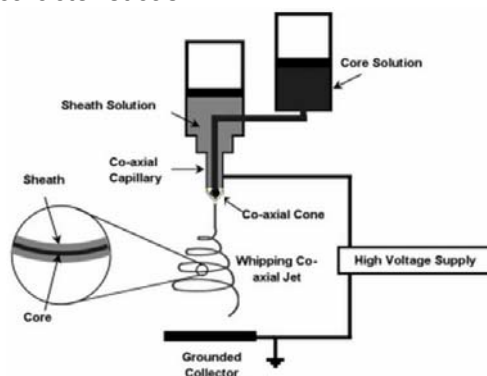


Fig. 4.13 Diagrama de un equipo de electrospinning coaxial

4.4.2. Parámetros de la técnica

La morfología de las fibras obtenidas por electrospinning coaxial igual que la convencional, depende de los mismos factores, pero con alguna diferencia. Por ello, estos se clasifican en los tres mismos grupos: Las propiedades de la solución polimérica, los parámetros del proceso y el entorno del electrospinning.

4.4.2.1. Propiedades de la solución polimérica

4.4.2.1.1 Concentración de la solución

El hecho de tener dos disoluciones de polímero con concentraciones diferentes y por lo tanto con viscosidad diferente, hace que la viscosidad que en principio servía para el electrospinning convencional por separados ya no sirva y por lo tanto, se tenga que modificar la concentración de las disoluciones a menos concentración por la suma de viscosidad de las dos disoluciones de polímero. Además, para obtener fibras coaxiales optimas, la viscosidad de la disolución de la cubierta ha de ser mayor que la viscosidad disolución del núcleo para que la primera arrastre la segunda.

4.4.2.1.2 Conductividad de la solución

Una conductividad relativa excesiva de la disolución del núcleo respecto a la disolución de la cubierta puede generar que las fuerzas viscosas que deben dominar la estructura coaxial puedan verse superadas por las fuerzas que ejercen las cargas de la disolución del núcleo. Este fenómeno producirá fibras coaxiales intermitentes.

4.4.2.2. Parámetros del proceso

4.4.2.2.1 Flujo de salida

La relación entre flujos también ejerce un papel importante en la formación de fibras coaxiales. Para obtener fibras coaxiales de calidad el flujo de salida de la cubierta ha de ser diferente que el flujo de salida del núcleo, en concreto el de la cubierta tiene que ser mayor que el del núcleo para que así el de la cubierta arrastre al núcleo por fuerzas viscosas.

4.4.3. Aplicaciones biomédicas

Las aplicaciones mayoritarias del electrospinning coaxial, se encuentra dentro del campo de la biomedicina ^[53], sobretodo en el ámbito de la administración de fármacos, como factor más importante de esta técnica^[54-59].

La entrega de fármacos a los pacientes de una manera fisiológicamente aceptable ha sido siempre una preocupación importante ^[56]. Debido a que los perfiles de liberación deben obedecer el ritmo biológico para que esta administración sea conveniente, eficaz y segura ^[59].

Actualmente, la administración de fármacos se realiza conjuntamente con otras sustancias como los polímeros que mejoran el mecanismo de liberación. La liberación de fármacos puede darse de dos maneras:

- Liberación controlada: elimina o reduce los efectos secundarios liberando una concentración del fármaco que sea adecuada para el organismo. Para que tenga lugar depende de que las interacciones fármaco-polímero lleven a una cinética de orden cero en la que no se produzcan cambios en la concentración del fármaco en el organismo ^[56].
- Liberación dirigida: el fármaco es llevado y liberado en el lugar requerido, de tal manera que se mantiene inactivo en cualquier otro lugar del organismo ^[60].

La administración de medicamentos a partir de las fibras generadas en el electrospinning se basa en el principio de que la velocidad de disolución del fármaco aumenta con el aumento de la superficie del medicamento y de la estructura polimérica que lo soporta. También se ha de tener en cuenta que la interacción existente entre el fármaco y el polímero determina el comportamiento de la liberación, ya que, el complejo de fibras resultantes está estrechamente ligado a la solubilidad y la compatibilidad del fármaco en la solución de la mezcla, así como a las condiciones del electrospinning. Si para la obtención de nano/microfibras cargadas con medicamentos se ha adoptado la vía simple, es decir se ha mezclado el medicamento en la solución polimérica antes de ser electrohilado, existen tres modos de interacción entre los fármacos y las fibras generadas:

- I. Las drogas se unen a la superficie de las fibras como pequeñas partículas.
- II. El fármaco y el polímero son electrohilados y por lo tanto la matriz resultante está formada por dos tipos de nano/microfibras entrelazadas.
- III. Una mezcla de medicamento y polímero se integran en un tipo de nano/microfibras compuestas adoptando diferentes morfologías; la droga encapsulada dentro de la fibra, o las fibras de fármaco y polímero se enredan de manera uniforme a nivel molecular debido a la buena compatibilidad de ambos ^[56].

Se ha demostrado a lo largo de varios estudios que las interacciones droga-polímero de tipo I. y II. dan lugar a una liberación prácticamente total del fármaco debido a la apertura longitudinal de la fibra. Mientras que para las interacciones de tipo c) esta apertura no tiene lugar ^[56,61].

Actualmente, para conseguir una liberación controlada evitando la liberación por apertura longitudinal se utilizan fibras producidas a partir del electrospinning coaxial. Estas fibras coaxiales están compuestas por un núcleo y una cubierta, de tal manera que permiten un encapsulamiento del fármaco casi perfecto, ya que este se dispone en el núcleo y se encuentra protegido por una cubierta polimérica. Para este caso el perfil de liberación se puede controlar mediante la regulación del tamaño de partícula^[62].

Por último, el electrospinning coaxial también permite la creación de un sistema de liberación bifásica, en el cual existe una liberación de fármaco inmediata, debido a que este se encuentre en la cubierta de la fibra combinado con un polímero hidrofílico, seguida de una liberación sostenida si en el núcleo se encuentra un fármaco combinado con un polímero hidrofóbico^[59]

4.5. Antecedentes

La técnica electrospinning es un método eficaz para elaborar micro o nanofibras para aplicaciones muy específicas empleadas en los campos de la ingeniería de tejidos, de la liberación controlada de fármacos, etc. Esta técnica permite la utilización de distintos polímeros tanto sintéticos como naturales, los cuales tienen propiedades específicas.

A partir la técnica de electrospinning coaxial se pueden obtener fibras bicomponentes, lo cual permite compartimentalizar las fibras en un dominio de cubierta (shell) y otro central (core), es por ese motivo, que los polímeros utilizados aportan a la fibras unas propiedades específicas que no se pueden obtener mediante la técnica convencional.

Utilizando la técnica del electrospinning coaxial se puede obtener una liberación controlada del fármaco según su disposición en la fibra coaxial e incluso un perfil de liberación que presente etapas bien diferenciadas. Para exponer el estado del arte con estos materiales, se resumen ocho artículos que pueden dar al lector una visión general de los trabajos en los que se desarrollan fibras coaxiales obtenidas mediante la técnica del electrospinning.

4.5.1. Artículos referidos a la obtención de fibras mediante la mezcla de polímeros

- I. Z.Y.Qian y colaboradores^[63], publicaron en 2012 un trabajo en el que se describe el comportamiento de matrices de microfibras obtenidas mediante electrospinning a partir de disoluciones de PLA y PEG en cloroformo. El contenido de PEG en estas matrices alcanzó un 30 en peso. Se comprobó que la adición de PEG mejoró el proceso de electrohilado, originando fibras más continuas. La biocompatibilidad in-

vitro se estudió con células NIH3T3, evaluando la adhesión y proliferación de éstas sobre las matrices de PLA/PEG para todas las composiciones preparadas.

- II. b) En un siguiente artículo Z.Y.Qian y colaboradores ^[64], en 2011, ampliaron su estudio sobre el comportamiento de las matrices de PLA/PEG. Mediante la técnica de electrospinning, prepararon matrices a partir de mezclas PLA/PEG 95:5, y sembraron células madre mesenquimales (MSC). La biocompatibilidad in-vivo de las matrices se comprobó mediante su implantación en músculos del muslo de ratas. La conclusión importante del trabajo es que estas matrices presentan un buen comportamiento para su empleo en ingeniería de tejidos óseos.

4.5.2. Artículos referidos a la obtención de fibras coaxiales

- I. Z. Sun y colaboradores ^[29], en 2003, realizaron diferentes estudios concernientes al potencial del electrospinning coaxial para producir fibras con un núcleo y una cubierta de distinta constitución. En el primero, obtuvo fibras coaxiales utilizando disoluciones al 2 en peso de óxido de polietileno (PEO) pero conteniendo bromofenol al 2 en la disolución utilizada para obtener el core y al 0.2 en la utilizada para el shell. En el segundo trabajo, obtuvo fibras coaxiales formadas por dos polímeros distintos. En concreto PEO en el shell y polisulfona (PSU) en el core. En un último trabajo, obtuvo fibras coaxiales constituidas por PEO en el shell y poli(dodeciltiofeno) (PDT) en el core, polímero que no puede hilarse por sí solo mediante electrospinning.
- II. X. Jing y colaboradores ^[65], elaboraron en 2006 nanofibras coaxiales mediante electrospinning de una emulsión constituida por una fase acuosa, conteniendo PEG, y una fase orgánica, formada por un copolímero dibloque (PLA-b-PEG) disuelto en cloroformo. Las fibras preparadas resultaron con una distribución no homogénea al disponerse el PEG en la parte central y el PEG-PLA en la capa externa. Para diferenciar claramente las dos fases se añadió fluoresceína a la disolución acuosa, pudiendo incluso determinar el grosor del núcleo resultante en la microfibra.
- III. En un siguiente artículo, en 2008, X. Jing y colaboradores ^[66], describieron la preparación y propiedades de fibras coaxiales cargadas con clorhidrato de doxorubicina (DOX), un agente anticancerígeno. La estrategia utilizada en este trabajo consistió en electrohilar una emulsión obtenida a partir de una solución acuosa de DOX y otra del copolímero dibloque (PLA-b-PEG) disuelto en cloroformo. La nanofibra coaxial fabricada, resultó formada por un eje central conteniendo agregados de DOX dispersos en (PLA-b-PEG) y una capa externa de (PLA-b-PEG) prácticamente carente del agente anticancerígeno. Esta distribución es importante

ya que permite un cierto control en la liberación del fármaco al tener que efectuarse a través de la capa externa de polímero.

4.5.3. Artículos referidos a la liberación de fármacos en fibras coaxiales

- I. T. T. T. Nguyen y colaboradores ^[62], fabricaron y caracterizaron, en 2012, nanofibras porosas compuestas de un núcleo y una cubierta diferenciadas con aplicación en el diseño de parches para la curación de heridas y con una actividad a largo plazo. Las nanofibras estuvieron estructuradas con un núcleo de ácido salicílico (SA) y poli(etilenglicol) (PEG) y una cubierta de poli(ácido láctico) (PLA). Los resultados obtenidos indicaron que las fibras obtenidas a un flujo más bajo mostraban una liberación sostenida de SA durante un tiempo prolongado al ser su superficie más porosa, mientras que la liberación era muy reducida cuando la cubierta presentaba una baja porosidad. Los autores utilizaron también modelos de difusión para determinar la cinética de liberación.
- II. Chi Wang y colaboradores ^[67], realizaron en 2010 un estudio de liberación sostenida de fármacos comparando el comportamiento de fibras coaxiales formadas por poli(ácido DL-láctico) (PDLLA) y poli(-3-hidroxibutirato) (PHB) y fibras formadas por un único componente (PDLLA o PHB). En concreto las fibras coaxiales electrohiladas presentaron un núcleo compuesto por PDLLA y una cubierta compuesta por PHB y viceversa. La droga utilizada en el estudio fue dimetiloxalilglicina (DMOG) que en el caso de las fibras coaxiales se incorporó únicamente en la solución empleada para producir el núcleo de la fibra. El resultado de la liberación fue interesante puesto que mostró una liberación instantánea en las fibras de un único componente al experimentar estas una apertura longitudinal, mientras que se observó una cinética de liberación en dos etapas con las fibras coaxiales (una liberación rápida inicial y una liberación controlada posterior).
- III. D.G. Yu y colaboradores ^[59], fabricaron en 2013 nanofibras coaxiales de polivinilpirrolidona (shell) y acetato de celulosa (core) cargadas con un 1 de ketoprofeno (KTP), una molécula con actividad antiinflamatoria. Los estudios se efectuaron posicionando la droga tanto en el core como en el shell de la nanofibra. En los ensayos de liberación in-vitro se demostró que las nanofibras coaxiales pueden proporcionar una liberación en dos etapas (rápida y sostenida). De esta forma, el estudio muestra que el electrohilado coaxial es un método sencillo y útil para el diseño y la fabricación sistemática de nuevos biomateriales con características estructurales que permiten una liberación de fármaco que puede en cierta medida programarse.

5. Materiales y métodos

En este apartado, se han presentado tanto los materiales y reactivos utilizados, como los métodos y equipos que se han llevado a cabo para la caracterización de las matrices poliméricas.

5.1. Reactivos

Para la realización de los diferentes ensayos de laboratorio se han utilizado los siguientes productos químicos:

- Acetona, Panreac
- Agua destilada
- Agua desionizada Helix
- Agua desionizada Millipore
- Cloroformo
- Cloruro de sodio
- PEG 1000 kDa
- PEG 35000 kDa
- PLA

5.2. Material de laboratorio

Para la realización de los diferentes ensayos de laboratorio se han utilizado los siguientes materiales:

- Botellas de cristal de cristal 1L
- Espátula
- Jeringas de plástico de 5mL y 10ML
- Pipetas Pasteur
- Pera de goma
- Viales 20mL
- Agitador
- Balanza analítica
- Pinzas de precisión
- Porta y cubreobjetos para microscopía óptica
- Vasos de precipitado
- Parafilm
- Ependors
- Bandeja de pesada
- Tijeras

En cuanto a equipos de protección personal, se han empleado:

- Bata de laboratorio
- Guantes de nitrilo
- Gafas homologadas

5.3. Preparación de la disolución polimérica de PLA y PEG

Para poder obtener fibras coaxiales a partir de la técnica de electrospinning coaxial es necesario previamente transformar los polímeros PLA y PEG en estado sólido en disoluciones poliméricas. Para ello se ha utilizado el siguiente procedimiento:

1. Calcular y preparar la composición de los diferentes solventes que se va a utilizar en los ensayos.
 - CHCl_3 :Acetona (2V:1V)
 - NaCl (0,5M)
 - Agua desionizada Millipore 100
2. Calcular la masa de solvente y de polímero (PLA y PEG) para realizar la disolución polimérica.
3. Con ayuda de la bandeja de pesada y espátula, pesar la cantidad ya calculada de polímero para realizar la mezcla polimérica.
4. Introducir el polímero ya pesado en un vial. Con ayuda de la pipeta pasteur pesar la masa de solvente ya calculada.
5. Cerrar el vial y dejarlo 24 horas en el agitador.

5.4. Electrospinning coaxial

El equipo coaxial que se ha utilizado para la realización de fibras coaxiales está compuesto de los siguientes elementos, tal y como podemos ver en la Fig. 5.1:

- 2 bombas de desplazamiento
- 1 jeringa de plástico de 5mL
- 1 jeringa de plástico de 10 mL
- Aparato bifásico de electrospinning (Coax_3LKIT)
- Fuente de alimentación de alto voltaje
- Superficie colectora
- 2 gomas



Fig. 5.1 Esquema del equipo de electrospinning coaxial

A parte del equipo de electrospinning coaxial se han usado guantes, papel de aluminio cubreobjetos y portaobjetos. Con el fin de establecer las condiciones óptimas se ha utilizado el microscopio óptico para analizar las fibras in-situ.

El procedimiento que se ha llevado a cabo para la realización de electrospinning coaxial es el siguiente:

1. Cargar las jeringas con sus correspondientes soluciones poliméricas.
2. Colocar las jeringas en sus bombas y unirlas al aparato bifásico de electrospinning mediante gomas.
3. Cubrir la superficie colectora con papel de aluminio.
4. Conectar la fuente de alimentación a la jeringa y a la superficie colectora.
5. Poner un cubreobjetos sobre el colector para analizar en el microscopio óptico si las fibras obtenidas son válidas.
6. Encender las bombas y definir el tipo de jeringa, volumen de solución y flujo al cual se realizará el experimento.
7. Al ver caer la primera gota de solución polimérica encender la fuente de alimentación y regular el voltaje al que se quiere trabajar.
8. Observar que se forma el cono de Taylor en la punta de la aguja, y recoger muestra en el cubreobjetos.
9. Con la ayuda de un portaobjetos analizar el cubre en el MO y si las fibras son correctas, recoger todo el volumen de solución sobre el papel de aluminio.

5.5. Morfología y diámetro de las fibras

La caracterización de las matrices se ha llevado a cabo mediante microscopía. Para la optimización de las variables de electrohilado, se han realizado observaciones con la ayuda del microscopio óptico (OM). Sin embargo, la porosidad de las matrices obtenidas así como la morfología de las fibras se ha analizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

5.5.1. Microscopia óptica (OM)

El microscopio óptico, que se ha utilizado para evaluar la apariencia de las fibras recogidas en el portaobjetos es el microscopio óptico (MO) *Zeiss Axioskop 40* y se han tomado micrografías con la cámara digital *Zeiss Axios Cam MRC5* (Fig. 5.2).



Fig. 5.2 Equipo de microscopía óptica

El microscopio óptico se sirve de la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto. Está compuesto por dos sistemas de lentes convexas, tres objetivos de 5,20 y 40 aumentos y el ocular. Los objetivos y el ocular están montados en extremos opuestos del tubo cerrado^[68].

Mirando a través del ocular se puede ver una imagen virtual aumentada de la imagen real. De esta manera, se hace una observación rápida de la muestra recogida en el cubreobjetos. Las imágenes obtenidas a partir del microscopio óptico son útiles para hacer una primera valoración. Estas no sirven para calcular el diámetro, aunque tampoco sirven para observar la morfología de las fibras, que se analizaran mediante la microscopía electrónica de barrido.

5.5.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM), utilizado para analizar la morfología de la superficie de la fibra a mayor aumento que el MO, ha sido el *Focus Ion Beam Zeiss Neon40* (Fig. 5.3).

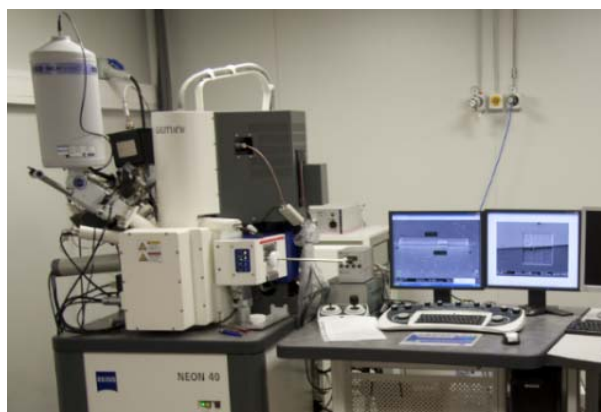


Fig. 5.3 Equipo de microscopía electrónica de barrido (SEM)

La técnica del SEM se basa en la reproducción de una imagen mediante el uso de electrones. La cámara donde se introduce la muestra trabaja al vacío. En la parte superior de la cámara está situado el cañón de electrones el cual produce el haz de electrones, que posteriormente generará la imagen, el haz viaja verticalmente a través del microscopio a un voltaje de aceleración de 5 kV. La muestra es enfocada gracias a una serie de lentes electromagnéticas situadas en la columna. Los electrones de alta intensidad inciden sobre la muestra y los electrones dispersados de alta intensidad son captados por detectores que los convierten en una señal digital captada por una pantalla ^[69].

Para que la técnica del SEM se pueda aplicar sobre el material es necesario que la muestra sea conductora. En el caso de que no sea conductora se le debe hacer un tratamiento previo, que consiste en recubrir la muestra con una capa delgada de material conductor (oro o carbono). Este recubrimiento se ha realizado con el dispositivo *Mitec K950 SputterCoater*, el cual crea un recubrimiento por pulverización catódica utilizando un campo eléctrico y gas argón, trabajando en condiciones de vacío.

El procedimiento que se ha llevado a cabo para analizar una muestra en el SEM es:

1. La muestra a analizar se coloca sobre el cubreobjetos y el portaobjetos del SEM.
2. Recubrir con carbón la muestra mediante el dispositivo Mitec K950 SputterCoater. Solo si no es conductora.
3. Introducir la muestra conductora en la precámara del SEM con la ayuda de un brazo metálico.
4. Cerrar la precámara y aplicarle el vacío.
5. Abrir la compuerta de la precámara y depositar, con la ayuda del brazo, el portaobjetos con las muestras en la plataforma de la cámara.
6. Extraer el brazo, cerrar la compuerta. El interior de la cámara del SEM se puede observar a través del ordenador ya que se reproduce la imagen. Elegir la muestra a analizar con la ayuda del programa informático.
7. Tomar fotografías con el programa *Smart Tiff de Carl Zeiss SMT Ltd*.

Las fotos obtenidas mediante el SEM son aptas para analizar la morfología de la fibra y para tomar muestras de diámetros y realizar así su distribución. Las medidas de diámetro se realizan con el mismo programa informático y mediante el *Origin Pro 8.0* el procesamiento de los datos.

5.6. Ángulos de contacto

El equipo que se ha utilizado para medir los ángulos de contacto es el *DataPhysics OCA 15plus* (Fig. 5.4) y el *software es el SCA20*. Este sirve para comprobar si la superficie de la muestra es hidrofílica o hidrofóbica.

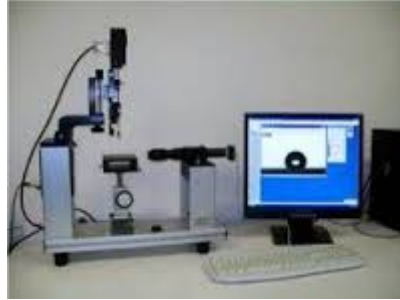


Fig. 5.4 Equipo de ángulos de contacto

El análisis de ángulos de contacto es una técnica superficial y para su medición se emplea el análisis de la forma de la gota aceptando que la gota es una forma simétrica respecto a un eje vertical y teniendo en cuenta que las únicas fuerzas que afectan a la forma de la gota son la tensión superficial y la gravedad. Los ángulos se miden ajustando una expresión matemática a la forma de la gota, calculando el ángulo entre la recta tangente de la gota y la base de referencia ^[70].

El procedimiento que se ha utilizado para medir los ángulos de contacto ha sido el siguiente:

1. Cargar la jeringa de vidrio con el solvente, en este caso agua.
2. Colocar la jeringa en el equipo.
3. Introducir en el programa los datos relativos al fluido utilizado, al volumen de la gota y a la manera de dispensarla.
4. Colocar la muestra sobre una superficie metálica y fijarla para que quede plana, colocar la superficie en la base del equipo.
5. Con la ayuda de la cámara observar por la pantalla la muestra y la jeringa. Dispensar una gota. Las primeras gotas limpiarlas.
6. Observando por la pantalla subir la superficie metálica hasta que se toque con la gota y después separarla de manera que la gota quede sostenida encima de la muestra.
7. Con la ayuda del programa aplicar la línea base y medir el ángulo.

5.7. Pérdida de masa

A partir de la pérdida de masa después de ser removidas con agua se ha pretendido analizar si las fibras coaxiales electrospineadas son óptimas. Para ello se ha llevado a cabo el siguiente procedimiento:

1. Poner la matriz seca en ependors y pesarla.
2. Lavar la matriz con agua desionizada helix y dejarla en remojo 24horas.
3. Lavar 2 veces con agua helix para asegurar que está bien lavada.
4. Quitar el agua de los ependors y secar en la estufa a 37°C 24 horas.
5. Sacar la matriz de la estufa y pesarla.
6. Dejarla nuevamente en la estufa 24 horas.
7. Volver a pesar la matriz para comprobar que está completamente seca.
8. Comparar la pérdida de masa experimental con la teórica.

5.8. Espectrómetro IR

Para realizar un espectrómetro IR, el equipo que se ha utilizado ha sido el *FTIR 4100* Jasco con los accesorios *Specacmodel MKII Golden Gate Heated Single Reflection Diamond ATR* y con *ZnS lenses + High Stability Temperature Controller (West 6100+)* (Fig. 5.5). Este permite realizar un estudio cualitativo para determinar los grupos funcionales que constituyen la muestra, tanto sólida como líquida.



Fig. 5.5 FTIR 4100 Jasco

La técnica del IR se basa en la absorción de radiación infrarroja a una determinada longitud de onda a partir de la excitación de los modos de vibración y subestados de rotación de las moléculas que provocan un cambio en su momento dipolar. Es posible asignar absorciones a grupos funcionales específicos y obtener un espectro de IR diferente para cada molécula [69].

El procedimiento que se ha llevado a cabo para la realizar el espectro de las diferentes muestras ha sido el siguiente:

1. Encender el ordenador y poner en marcha el espectrofotómetro siguiendo las instrucciones del aparato.
2. Abrir el ATR como se indica las instrucciones y limpiar con etanol el soporte de diamante y el cristal de zafiro
3. Hacer una línea base (background).
4. Poner la muestra entre el soporte y el cristal y cerrar el ATR. Tomar la medida del espectro utilizando el programa informático Spectra-measurement. Guardar el espectro.
5. Repetir el procedimiento a partir del punto 5, para cada muestra.
6. Cerrar el equipo siguiendo las instrucciones.

5.9. Ensayos biológicos

Para determinar si las fibras coaxiales con estos materiales biodegradables son óptimas y para verificar que se pueden cargar con drogas y bacterias se han llevado a cabo diferentes ensayos biológicos.

5.9.1. Carga de las fibras con bacterias

Para evaluar la actividad bacteriana en las fibras obtenidas mediante electrospinning coaxial, las disoluciones poliméricas han sido cargadas con la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*).

Los pasos que se han seguido para cargar las fibras con bacterias han sido los mismos ya explicados en la preparación de la disolución polimérica de PLA y PEG (apartado 5.3). La diferencia es que después de dejar las disoluciones poliméricas agitando durante 24 horas, se ha cargado la disolución de PEG con la cantidad de bacterias calculadas.

Para determinar el número de bacterias que se deberían obtener en una matriz se ha llevado a cabo los siguientes pasos:

1. Agitar en el vortex el tubo con la disolución de las bacterias *E. coli*
2. Diluir la disolución de bacterias con agua pura y ponerlas en placas de poliestireno de 24 pocillos (Fig. 5.6).
3. Se pone en un lector Elisa, para realizar la lectura de absorbancia a 395nm como medida para determinar la cantidad de bacterias.
4. Partiendo de la base que $10.D=10^8$ bacterias/mL, mediante la absorbancia se calcula cuantas bacterias hay en 1mL.

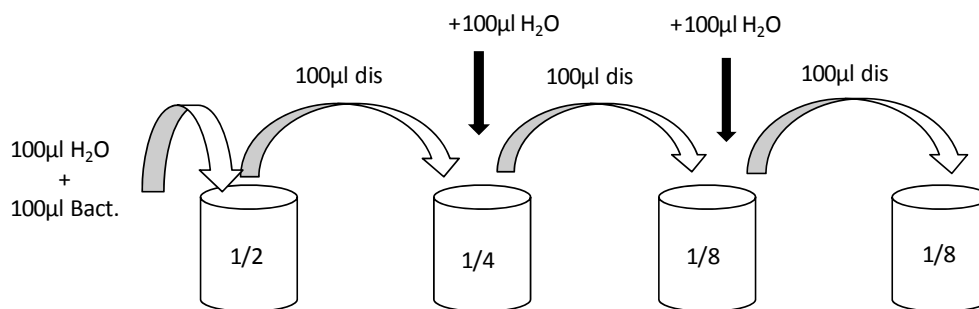


Fig. 5.6 Preparación de muestra para determinar la absorbancia

La lectura se ha realizado en el equipo lector de microplacas *EZ-READ 400 ELISA* (Fig. 5.7)

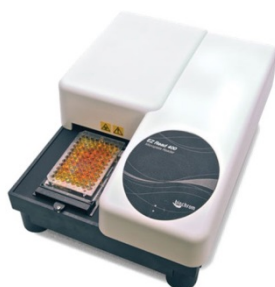


Fig. 5.7 Equipo ELISA lector de microplacas.

5.9.2. Viabilidad de las bacterias

Para estudiar la viabilidad de las bacterias se ha seguido los siguientes pasos:

1. Pesar aproximadamente 10-20mg de matriz y ponerla en un tubo de 15 mL. Hacer 6 réplicas.
2. Añadir 5mL de medio cultivo BHI a cada tubo.
3. De las 6 réplicas, sonicar 3 y las otras 3 no. Sonicar en 5 ciclos a 45% de potencia durante 10 segundos por cada ciclo. (Fig. 5.8)
4. Preparar una muestra de control positivo (5mL medio cultivo + 20µL bacterias) y una muestra de control negativo (5mL medio cultivo).
5. Incubar los cultivos a 37°C y agitar a 100 rpm durante 24 h.
6. Pipetear 200µL de los cultivos y colocarlo en una placa ELISA de poliestireno.

7. Realizar una lectura de absorbancia a 595nm como medida para determinar el crecimiento bacteriano.



Fig. 5.8 Equipo de ultrasonido para disgregar las matrices de fibras coaxiales cargadas con bacterias

5.9.3. Exposición UV

Para determinar el crecimiento bacteriano con respecto a la exposición UV se ha seguido el siguiente procedimiento:

1. Pesar entre 10-20 mg de matriz y ponerla en un tubo de 15 mL. 5 réplicas.
2. Exponer las matrices a rayos UV durante 30, 60, 90 min y 24 h. Una de las réplicas no fue irradiada y sirvió como muestra control.
3. A cada tubo se añadió 5 mL de medio BHI. Un control positivo fue preparado sembrando 20 μ L de bacterias en 5 mL de medio.
4. Los tubos fueron incubados en condiciones de cultivo, a 37 °C en agitación de 100 rpm durante 24 h.
5. Luego, la absorbancia fue leída a 595 nm para calcular el crecimiento bacteriano.

5.9.4. Estabilidad en el tiempo

Para determinar la estabilidad de las bacterias en el tiempo se ha llevado a cabo el mismo procedimiento que en el apartado de viabilidad de las bacterias (5.9.2) exceptuando el punto 3, en el que se sónica. Así, la viabilidad de las bacterias cargadas en las fibras coaxiales fue determinada el día de fabricación de las matrices y después de 30 y 45 días.

El crecimiento bacteriano se ha determinado tal y como se describe en los diferentes ensayos de crecimiento bacteriano. Todos los experimentos se han realizado por triplicado, expresando todos los resultados como la media \pm la desviación estándar. Se ha utilizado la *t*-Student para el análisis estadístico con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

6. Resultados y discusión

6.1. Optimización de las condiciones operacionales de electrospinning coaxial

6.1.1. Organización y preparación de las disoluciones electrohilables de PLA y PEG

Para obtener micro/nanofibras coaxiales sin defectos a partir de los polímeros de PEG y PLA se evaluaron diferentes parámetros operacionales idóneos tales como el disolvente y la concentración de los polímeros, ya que estos afectan directamente a la viscosidad final de la disolución. Por ello, se ha utilizado un diseño experimental factorial de 3×2^2 que corresponde a un total de 24 experimentos.

Con el fin de encontrar las condiciones óptimas se ha utilizado diferentes concentraciones en peso de PLA y diferentes concentraciones de PEG con diferente peso molecular. Además de dos solventes para el PEG y uno para el PLA.

El PLA que se ha usado para la fabricación de las fibras coaxiales corresponde a un PLA de grado comercial (Natureworks®) con un contenido de 98 wt-% del isómero L-láctico (PLA 4032D). De acuerdo a las características del fabricante, el PLA 4032D tiene una apariencia translúcida, una densidad de 1.24 g/cc. Sus propiedades calorimétricas y mecánicas corresponden a una temperatura de transición vítrea (T_g) de 70 °C, una temperatura de fusión (T_m) de 160 °C, un módulo de tensión (E) de 3440-3784 MPa y una fuerza de tensión (σ) de 103,2-144,5 MPa, y una elongación bajo tensión (γ) de 100-180%. Su peso molecular en número (M_n) y en peso (M_w) fue determinado por cromatografía de gel permeación (GPC) con valores de 84,200 g/mol y 179,400 g/mol y un índice de polidispersidad de 2.13. Asimismo, se han utilizado dos PEG comerciales (Sigma-Aldrich) de diferente peso molecular, uno de bajo y otro de alto peso molecular (10 y 35 KDa, respectivamente). Por lo que corresponde a los disolventes utilizados, el PLA es un polímero hidrofóbico, al contrario que el PEG que es un polímero hidrofílico. Por ello, se ha llevado a cabo la búsqueda del disolvente o disolventes más idóneos para la obtención de fibras sin defectos, teniendo en cuenta además la función de dichas fibras. Con estas premisas, se han realizado diferentes ensayos de solubilidad. En la Tabla 6.1 se muestran los resultados de las pruebas cualitativas de solubilidad para el PLA y el PEG.

Tabla 6.1 Pruebas de solubilidad para la selección de disolventes de PLA y PEG. Los resultados son mostrados de forma cualitativa.

Solvente	PLA	PEG
Agua	Insoluble	Soluble
CHCl ₃	Soluble	Soluble
CH ₂ Cl ₂	Soluble	Soluble
DMF	Soluble	Soluble
Etanol	Insoluble	Soluble con calor
Acetona	Insoluble	Soluble

Como se puede observar en la Tabla 6.1, hay más de un solvente capaz de disolver ambos polímeros. Los primeros ensayos se han realizado con solventes clorados (CHCl₃ y CH₂Cl₂), que han resultado ser muy volátiles, lo que ha resultado ser un problema a la hora de llevar a cabo la técnica de electrospinning coaxial. Por tanto, se ha procedido a experimentar con la mezcla de diclorometano y dimetilformanida, DCM/DMF(70:30 wt-%). En los siguientes ensayos se ha utilizado esta mezcla de disolventes para disolver el PLA y el PEG, tanto de alto peso molecular como de bajo peso molecular. Se ha observado que en el caso de utilizarlo para el PEG de 35 KDa sí que se han conseguido fibras. Sin embargo, utilizando el PEG de 10 KDa no se obtuvieron fibras.

Puesto que con el disolvente DCM/DMF (70:30 p/p) no se conseguieron fibras, se utilizó una mezcla de cloroformo y etanol (3v:1v). En este caso, se obtuvieron fibras tanto para el PEG de 35 KDa como el PEG de 10KDa. El problema de este solvente es que en muchas ocasiones, la evaporación del disolvente es rápida y queda polímero solidificado en la punta de la aguja. Por lo tanto, se ha utilizado otro solvente con características similares y con una proporción de cloroformo inferior. En este caso ha sido la mezcla de CHCl₃:Acetona (2V:1V). Con este disolvente se consiguió mejorar el problema de solidificación de la gota en la aguja y **se pudo electrohilar** tanto el PEG de alto peso molecular como el PEG de bajo peso molecular. En la tabla Tabla 6.2 se puede apreciar el resumen de los disolventes usados y con cuáles de ellos se obtuvieron fibras.

Además, para los primeros ensayos con CHCl₃, CH₂Cl₂ y DCM/DMF (70:30) se ha utilizado el mismo flujo, tanto para el PLA como para el PEG. Sin embargo, para los otros disolventes se ha tenido que variar el flujo de PLA con respecto al de PEG. Por ello, se ha utilizado dos bombas de inyección en vez de una.

Tabla 6.2 Solventes de los polímeros PLA y PEG para producir fibras por electrospinning coaxial

Polimero (Shell)	Polímero (Core)	Solvente (Shell)	Solvente (Core)	Electrospinning coaxial
PLA	PEG 10000	CHCl ₃	Agua	No
PLA	PEG 10000	DCM/DMF (70:30)	DCM/DMF (70:30)	No
PLA	PEG 10000	CHCl ₃ :Etanol (3:1)	Agua	Si
PLA	PEG 10000	CHCl ₃ :Acetona (2:1)	Agua	si
PLA	PEG 10000	CHCl ₃ :Acetona (2:1)	NaCl(0,5M)	si
PLA	PEG 35000	CHCl ₃	Agua	No
PLA	PEG 35000	DCM/DMF (70:30)	DCM/DMF (70:30)	Si
PLA	PEG 35000	CHCl ₃ :Etanol (3:1)	Agua	Si
PLA	PEG 35000	CHCl ₃ :Acetona (2:1)	Agua	si
PLA	PEG 35000	CHCl ₃ :Acetona (2:1)	NaCl(0,5M)	si

Por lo tanto, para determinar los solventes a utilizar, se han tenido en cuenta los siguientes aspectos:

- Disolución completa del polímero en el solvente
- Comportamiento de la disolución del polímero durante el proceso de electrohilado. Por ejemplo, formación del cono de Taylor, comportamiento del jet, etc.
- Obtención de fibras a partir de electrospinnig coaxial.
- Impacto del solvente del polímero del núcleo en la fibra coaxial sobre la viabilidad bacteriana u otro sistema biológico.

Se ha utilizado una mezcla de CHCl₃ y acetona (2:1) para disolver el PLA y agua para disolver el PEG. El NaCl se ha utilizado para aumentar la conductividad de la disolución del PEG, puesto que la adición de sales a la solución incrementa la conductividad y por consiguiente la fuerza iónica para mejorar el transporte del jet de polímero, lo que promueve una reducción en el diámetro de las fibras^[36], siendo esto un criterio que permite la optimización de las condiciones del electrohilado.

Una vez elegido el solvente que se va a utilizar a lo largo de los ensayos, hay que tener en cuenta otro parámetro importante de la disolución, tal como la concentración de polímero que se va utilizar, puesto que es uno de los parámetros determinantes del tamaño y la morfología de las fibras. La concentración de polímero en la disolución influye tanto la viscosidad como la tensión superficial de esta, y la viscosidad de una solución de polímero está relacionada con la distribución de las cadenas poliméricas. Por consiguiente, se ha

variado la concentración de los diferentes polímeros con el fin de encontrar los parámetros idóneos para la obtención de fibras coaxiales. De esta manera se han elegido las siguientes concentraciones de polímero comprendidas en un rango de 2,5-7,5 % en peso de PLA disuelto en la mezcla cloroformo-acetona (2:1, v:v) y de 200-400 mg/mL de PEG de alto y bajo peso molecular disuelto en agua ultrapura o una disolución 0,5 M de cloruro de sodio.

A continuación, en la Tabla 6.3 se presenta el diseño experimental factorial $3 \times 2^{2^2}$ de este estudio para realizar los diferentes experimentos, donde se ha definido las siguientes variables:

- PEG de bajo y alto peso molecular (10 y 35 KDa, respectivamente).
- Concentración en peso de PLA (2,5; 5 y 7,5% en peso).
- Concentración del PEG (200 y 400 mg/mL) en agua o NaCl 0,5 M
- CHCl_3 :Acetona (2v:1v) como solvente del PLA.
- Agua y NaCl como solvente del PEG.

En cada experimento se ha variado los parámetros operacionales del proceso con el fin de encontrar las condiciones óptimas para el electrohilado. Estos parámetros son el voltaje, el flujo de salida y la distancia entre la punta de la aguja y el colector. Los parámetros operacionales del proceso de electrohilado fueron variando en los siguientes rangos:

- Voltaje entre 20 y 30 KV.
- Distancia de la punta de la aguja y el colector entre 12 y 18 cm.
- Flujo de PLA entre 1 y 15 mL/h.
- Flujo de PEG entre 0,6 y 2,4 mL/h.

Tabla 6.3 Diseño factorial $3 \times 2^{2^2}$ de los diferentes experimentos

Experimento	PLA (%Wt)	PEG (kDa)	PEG (mg/ml)	Solvente PEG	Solvente PLA
1	2,5	35	200	NaCl (0,5M)	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
2	5,0	35	200	NaCl (0,5M)	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
3	7,5	35	200	NaCl (0,5M)	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
4	2,5	35	400	NaCl (0,5M)	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
5	5,0	35	400	NaCl (0,5M)	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
6	7,5	35	400	NaCl (0,5M)	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
7	2,5	10	200	NaCl (0,5M)	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
8	5,0	10	200	NaCl (0,5M)	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
9	7,5	10	200	NaCl (0,5M)	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
10	2,5	10	400	NaCl (0,5M)	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
11	5,0	10	400	NaCl (0,5M)	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
12	7,5	10	400	NaCl (0,5M)	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
13	2,5	35	200	H ₂ O	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
14	5	35	200	H ₂ O	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
15	7,5	35	200	H ₂ O	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
16	2,5	35	400	H ₂ O	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
17	5,0	35	400	H ₂ O	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
18	7,5	35	400	H ₂ O	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
19	2,5	10	200	H ₂ O	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
20	5,0	10	200	H ₂ O	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
21	7,5	10	200	H ₂ O	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
22	2,5	10	400	H ₂ O	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
23	5,0	10	400	H ₂ O	CHCl ₃ :Acetona(2:1)
24	7,5	10	400	H ₂ O	CHCl ₃ :Acetona(2:1)

6.1.2. Análisis mediante microscopía óptica (OM)

En todos los experimentos se ha trabajado con las disoluciones PLA para la cubierta y PEG para el núcleo de la fibra. Con el fin de obtener fibras coaxiales, estas disoluciones se han sometido a electrospinnig coaxial, y en todos los casos se han ensayado con diferentes

condiciones operacionales del proceso, para obtener fibras de calidad. Esto se refiere a la obtención de fibras sin defectos como son los beads o gotas de polímero sin estirar a lo largo de las fibras, ausencia de partículas esféricas del polímero, y fibras homogéneas en cuanto a su diámetro.

Antes de recoger gran cantidad de fibras de manera continua para formar una matriz, es imprescindible hacer un primer examen de las fibras. Para ello, se ha recogido una pequeña cantidad de polímero electrohilado mediante un cubreobjetos, y se ha hecho un análisis cualitativo mediante el microscopio óptico, con el fin de evaluar la presencia o ausencia de defectos en las fibras.

A la hora de aceptar las fibras como buenas y por lo tanto sus condiciones de electrohilado, se han considerado los siguientes aspectos teniendo como constantes la distancia aguja-colector y el voltaje usado para generar el campo eléctrico.

- Las disoluciones de polímeros no gotean a la hora de electrohilar. Esto indicaría que la concentración de polímero es adecuada para el electrohilado.
- La disolución de polímero no se solidifica en la aguja. Lo cual indicaría que el solvente en lo referente a su volatilidad es adecuado para el proceso.
- El cono de Taylor se forma correctamente y es regular. Imprescindible para considerar que el proceso de electrohilado es adecuado.
- Se crean fibras con un diámetro relativamente homogéneo y sin defectos. Lo cual indica que las condiciones del proceso pueden ser consideradas como óptimas.

A continuación, en la figura Fig. 6.1 se muestran cuatro imágenes, obtenidas por microscopía óptica, con la que se ha ilustrado los posibles defectos a lo largo de los 24 experimentos y por lo cual se han descartado esas condiciones.

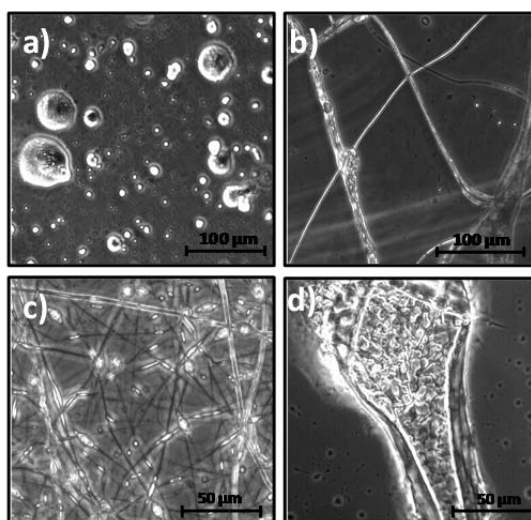


Fig. 6.1 Defectos observados mediante microscopía óptica

En la Fig 6.1a se muestra el resultado de varios experimentos en el que se ha obtenido solo gotas, esto es debido al aplicar flujos muy altos y tensiones demasiado bajas, que hacen que la gota no se acabe de estirar para formar fibras. En cambio en la Fig 6.1b, se ve como se ha obtenido algunas fibras de diferente tamaño y no homogéneas, esto es debido a que el cono de Taylor no ha sido uniforme durante el proceso de electrohilado y haya creado subconos. En la Fig 6.1c, se puede observar un mayor número de fibras de diámetro más regular, pero con muchos beads, que se evidencian como puntos muy birrefringentes. Claramente, a mayor aumento se puede observar que el bead (Fig 6.1d) corresponde a la acumulación de polímero, posiblemente se origina por la combinación de las condiciones del flujo y del campo eléctrico, como por ejemplo si el flujo es muy grande y el voltaje bajo.

A continuación en la Tabla 6.4 se muestran los experimentos de electrospinning coaxial que a priori se han dado como buenos después de evaluar las fibras usando microscopía óptica.

Tabla 6.4 Experimentos que han superado la evaluación por microscopía óptica (primera criba).

Experimentos	PLA (%Wt)	PEG (kDa)	[PEG] (mg/ml)	Solvente del PEG
6	7,50%	35	400	NaCl (0,5M)
8	5,00%	10	200	NaCl (0,5M)
9	7,50%	10	200	NaCl (0,5M)
11	5,00%	10	400	NaCl (0,5M)
14	5,00%	35	200	H ₂ O
15	7,50%	35	200	H ₂ O
17	5,00%	35	400	H ₂ O
18	7,50%	35	400	H ₂ O
20	5,00%	10	200	H ₂ O
21	7,50%	10	200	H ₂ O
23	5,00%	10	400	H ₂ O
24	7,50%	10	400	H ₂ O

En la Fig. 6.2 se expresa en tanto por ciento los experimentos que han pasado la primera criba de evaluación de las fibras coaxiales in-situ mediante el uso de microscopía óptica.

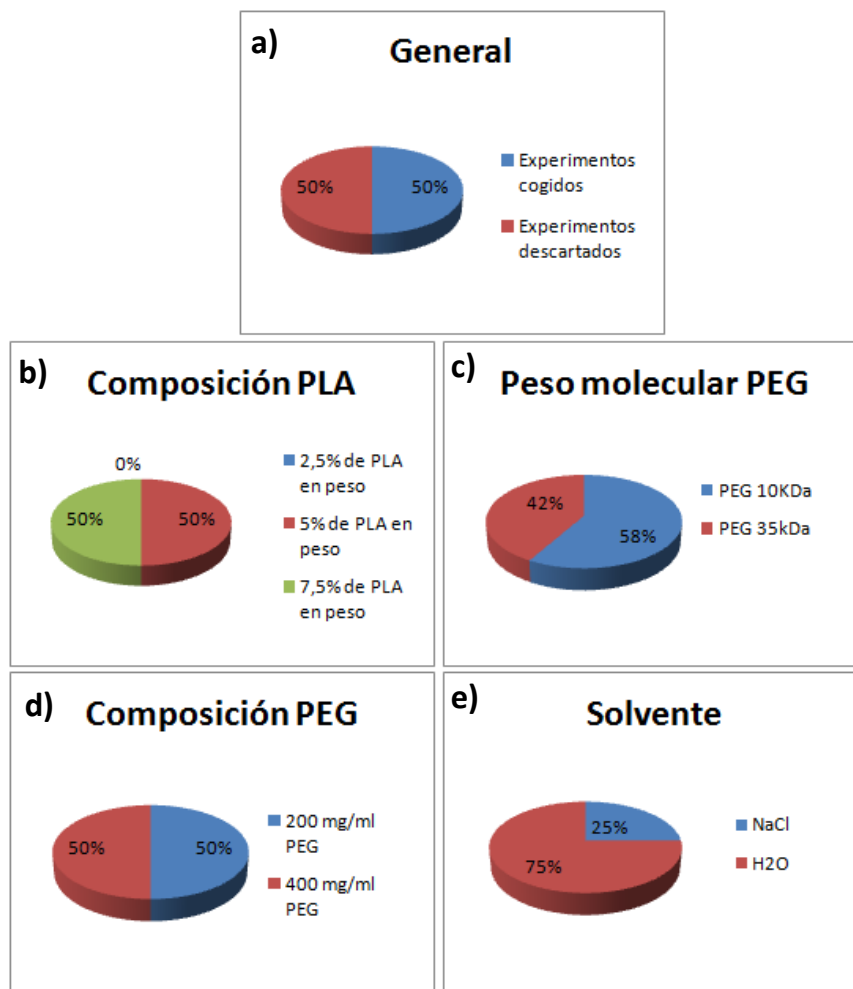


Fig. 6.2 Experimentos validos con referencia a los diferentes parámetros que intervienen en las propiedades de la solución polimérica.

Se ha tenido en cuenta los puntos mencionados anteriormente para considerar como buenas o malas las fibras y se ha hecho un análisis estadístico con referencia a los diferentes parámetros que intervienen en las propiedades de la solución polimérica.

En la Fig 6.2a se muestra que del total de los 24 experimentos resultantes del diseño experimental, sólo el 50% de ellos fueron adecuados para generar fibras, mientras que el restante 50% de experimentos fue descartado después de evaluar las fibras obtenidas por microscopía óptica. Este hecho destaca la importancia del análisis de las fibras in-situ tan pronto como fueron generadas. Con referencia a la composición de PLA se puede observar en la Fig. 6.2b, que los experimentos que contienen disoluciones de polímeros con una concentración de PLA del 2,5 % en peso fueron todos rechazados a causa de que esta disolución de PLA fue muy diluida y por ello las fibras de polímero se rompen antes de llegar a la superficie colectora debido al efecto de la tensión superficial, y pueden generar

una apariencia de fibra discontinua, y en otros casos el proceso se convierte en un electrospray generando gotas de polímeros. También se puede observar en la Fig 6.2b que de los experimentos aceptados, un 50% de los casos donde se obtuvieron fibras fueron preparados con concentración de 5% de PLA y el restante 50% de los casos con el 7,5% de PLA. Con respecto al peso molecular de PEG donde se puede ver en la Fig. 6.2c que el 58% de las fibras fueron obtenidas con el PEG de bajo molecular y el 42% con el PEG de alto peso molecular. En la Fig. 6.2d se observó que de los experimentos aceptados el 50% fueron preparados con una composición de PEG de 200 mg/mL y el otro 50% con una composición de PEG de 400 mg/mL. Por último, en la Fig. 6.2c, se muestran los experimentos que han sido aceptados con respecto al tipo de disolvente que se ha utilizado para preparar la disolución de PEG, se observa que de los experimentos aceptados, un 75% pertenecen a los que se ha utilizado agua y el otro 25% a los que se ha utilizado cloruro de sodio, por tanto, se podría indicar que las disoluciones de PEG que contienen NaCl tienen más dificultades para ser electrohiladas en comparación a las preparadas solo con agua. Se ha observado que la presencia de NaCl impide en ocasiones que las fibras generadas se depositen en el colector, y ocurre un apilamiento de pequeñas fibrillas sobre el colector y pueden llegar a crecer hacia la aguja como se muestra en el esquema de la Fig 6.3.

En resumen, luego de la evaluación por microscopía óptica de las fibras PLA/PEG preparadas usando electrospinning coaxial se puede indicar:

- La concentración del polímero que constituye la cubierta de la fibra coaxial (en este caso PLA) es importante para obtener una correcta morfología de fibra.
- La concentración y peso molecular del polímero que constituye el núcleo de la fibra coaxial (en este caso PEG) es más permisible puesto que su ubicación en el centro de la fibra puede enmascarar defectos que no son evidentes por la microscopía óptica. Sin embargo, hay situaciones en las cuales el polímero del núcleo de la fibra influye, tal como sucede en algunos casos cuando el PEG recibe un suplemento de carga como NaCl añadido.
- Finalmente, es claro que la evaluación mediante microscopía óptica es una herramienta muy valiosa en la preparación de fibras por electrospinning.

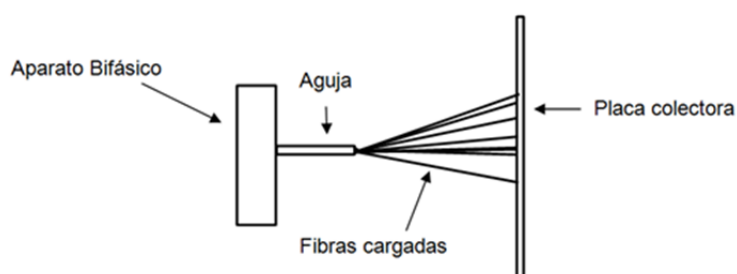


Fig. 6.3 Representación de electrospinning coaxial con cloruro de sodio

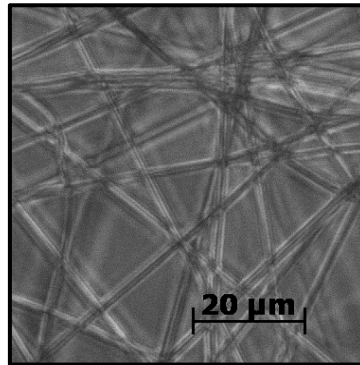


Fig. 6.4 Posible fibra coaxial sin defectos apreciada con el MO

En la Fig. 6.4, a modo de ejemplo, se muestra una imagen obtenida por microscopía óptica de una posible fibra coaxial. En esta figura se aprecia el conjunto de fibras de manera regular. Como bien se ha mencionado previamente, el microscopio óptico es usado para establecer la morfología global de la fibra, y en ningún caso, fue utilizado para determinar si la fibra obtenida corresponde a una fibra coaxial.

Por otro lado, en cada experimento se fue variando el flujo de las dos disoluciones de polímeros, el voltaje y la distancia entre la aguja y la placa colectora. En la siguiente Tabla 6.5, se muestran diferentes condiciones de los parámetros de distancia aguja-colector, voltaje y flujos de las disoluciones de PLA y PEG. Como se observa en la columna de muestras, el número entero representa el experimento del diseño experimental (ver Tabla 6.3), y el decimal representa las condiciones en las cuales pueden generar fibras. Puede observarse que algunos experimentos son más permisibles en las condiciones para obtener fibras, por ejemplo, el experimento 6 muestra al menos 4 diferentes condiciones de los parámetros operacionales para obtener fibras; por lo contrario, en el experimento 20 ó 23 solo se pudo establecer una condición para estos parámetros operacionales.

A manera de resumen, en la Tabla 6.5 se aprecia los siguientes aspectos:

- La distancia entre placa colectora y aguja en la mayoría de los casos es de 15 cm
- El voltaje que se ha usado ha sido mayoritariamente de 25-30 KV.
- Las relaciones entre flujo de PLA y flujo de PEG (PLA/PEG) en general corresponde al doble de PLA con respecto al PEG. Así, los valores para esta relación fueron de 2,1; 4,2; 8,3 y 16,7.

Tabla 6.5 Nomenclatura y parámetros del proceso que han pasado la primera criba

Muestra	Distancia	KV	Flujo PLA (ml/h)	Flujo PEG (ml/h)	$r_{PLA/PEG}$
6,1	15	30	10	1,2	8,3
6,2	15	25	10	1,2	8,3
6,5	15	30	10	2,4	4,2
6,8	17	30	5	1,2	4,2
8,1	15	20	10	1,2	8,3
8,2	15	25	10	1,2	8,3
9,3	15	30	10	1,2	8,3
9,9	15	25	5	0,6	8,3
11,2	15	30	10	1,2	8,3
11,7	15	25	10	0,6	16,7
11,8	15	30	10	0,6	16,7
14,3	15	25	10	2,4	4,2
14,4	18	25	10	2,4	4,2
14,6	15	25	5	0,6	8,3
14,7	15	25	5	1,2	4,2
14,8	15	25	5	2,4	2,1
15,1	15	25	10	0,6	16,7
17,3	15	25	10	1,2	8,3
17,4	15	25	10	2,4	4,2
17,7	15	25	5	1,2	4,2
17,8	15	25	5	2,4	2,1
18,2	15	25	10	1,2	8,3
18,3	15	25	10	2,4	4,2
18,7	15	25	5	2,4	2,1
20,8	15	25	5	2,4	2,1
21,1	15	25	10	2,4	4,2
21,3	15	25	10	1,2	8,3
21,5	15	25	5	2,4	2,1
23,10	15	30	5	2,4	2,1
24,2	15	25	10	1,2	8,3
24,6	15	25	5	2,4	2,1

6.2. Selección de fibras coaxiales

Después de haber hecho una primera criba con ayuda de la microscopía óptica, se ha llevado a cabo la caracterización de las diferentes matrices de fibras coaxiales a partir de diversas técnicas de análisis para detectar las mejores condiciones.

6.2.1. Ángulos de contacto

El análisis de los ángulos de contacto permite determinar la hidrofobicidad de la superficie de las matrices de fibras. Para realizar el ensayo se han medido los ángulos de contacto entre una gota de agua y la superficie de las diferentes matrices de fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo). Para cada muestra se han realizado 10 medidas del ángulo de contacto. Todas las muestras de las fibras coaxiales PLA/PEG fueron estudiadas en dos condiciones: 1) el ángulo de contacto fue estudiado en las matrices de fibras intactas tal cual fueron fabricadas; 2) el ángulo de contacto fue estudiado en las matrices de fibras después de la inmersión de la matriz en agua con la finalidad de redissolver el PEG. En la Fig. 6.5 se muestra la representación de los valores promedio \pm la desviación estándar para cada muestra de fibra obtenida antes y después de la inmersión en agua. Se ha utilizado la *t*-Student pareado para el análisis estadístico con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$) para comparar las condiciones antes y después de la inmersión en agua..

La medida del ángulo de contacto después de la redisolución del PEG en agua podría permitir determinar si en la superficie de las fibras se encuentra PLA, PEG o una mezcla de PLA y PEG. De tal forma, que si en la superficie de la fibra se encuentra PLA conformando la cubierta de la fibra se podrá realizar la medida de los ángulos; si por lo contrario se encuentra el PEG, no se podrá realizar la medida del ángulo de contacto debido al carácter hidrofílico, y por ello, la gota de agua mojaría la superficie de la matriz. En el caso de que la cubierta de la fibra estuviera conformada por una mezcla de PLA y PEG se podría medir los ángulos de contacto, pero el valor del ángulo de contacto sería inferior que si solo hubiese PLA. Por lo tanto, esta técnica podría permitir estudiar la distribución del PLA y del PEG en la fibra coaxial conformada.

En la Fig 6.5 se muestran dos gráficos que corresponden a la concentración del 5% y 7,5% en peso de PLA como supuesto constituyente de la cubierta. En general, se pueden distinguir 3 situaciones diferentes según la comparación de las medidas de los ángulos de contacto antes y después de la inmersión de la matriz en agua:

- Antes y después de la inmersión en agua, las matrices tienen similar valor para el ángulo de contacto. Esto podría ser supuesto como el caso ideal puesto que

significa que antes y después de la inmersión en agua se encuentra PLA en la superficie de las fibras. También puede indicarse que antes y después de la inmersión en agua la matriz mantiene intacta su característica de superficie, la cual correspondería a la presencia exclusiva de PLA. Este caso es lo observado en la mayoría de las muestras.

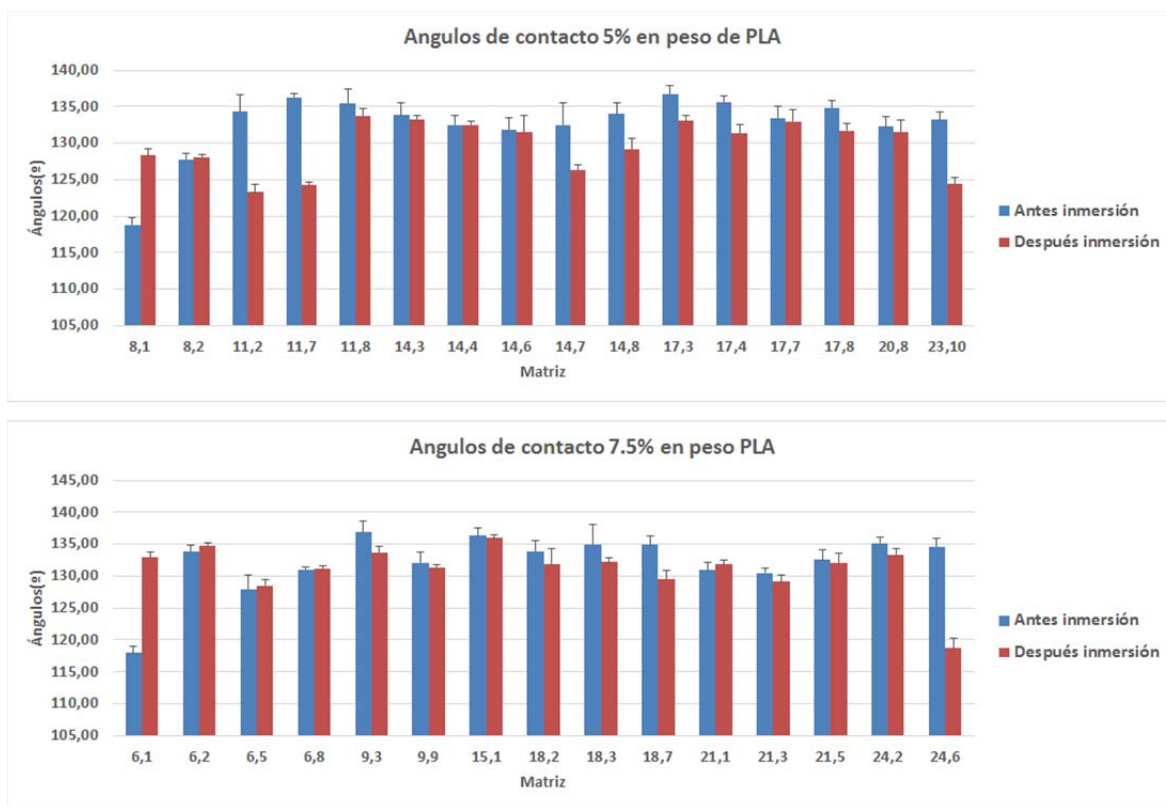


Fig. 6.5 Matrices según sus ángulos de contacto

- El ángulo de contacto de las matrices antes de la inmersión en agua fue menor que los ángulos medidos después de la inmersión en agua. Una explicación para este fenómeno podría ser que antes de la inmersión, en la superficie de la matriz hubiese PEG y que después de la inmersión en agua se haya perdido el PEG y solo quedase PLA. En este caso, se habla de una pequeña fracción de PEG puesto que los ángulos de contacto son medibles con valores superiores a 120 grados. Como ejemplos de este caso se pueden observar las matrices de PLA/PEG 8,1 y 6,1 para las concentraciones de PLA 5% y 7,5% respectivamente.
- Finalmente, una tercera situación puede ser observada y corresponde con un alto valor para el ángulo de contacto en las matrices antes de ser inmersas en agua en comparación al valor significativamente reducido después de la inmersión en agua. Esta situación podría ser explicada porque ocurre un cambio en la

morfología de las fibras, estos cambios pueden considerarse desde la forma de la fibra, por ejemplo el cambio de una fibra tubular a una fibra en forma de cinta o plana, cambio que puede ocurrir al redisolver el PEG del núcleo de la fibra. La misma situación podría ocurrir si la fibra no tuviera una cubierta totalmente cerrada (p.e. a manera de vaina) y ella queda abierta al redisolver el PEG en agua. Por otro lado, estas variaciones también podrían ser explicadas por cambios en la rugosidad de las fibras. Como ejemplo de esta tercera situación se pueden observar los cambios que ocurren en los valores de los ángulos de contacto en las muestras PLA/PEG 11,2; 11,7; y 23,10 preparadas con 5% de PLA en la cubierta, y PLA/PEG 24,6 preparada con 7,5%.

A continuación en la Tabla 6.6 se muestra el promedio y su desviación estándar de los ángulos de contacto para las matrices de fibras coaxiales PLA/PEG fabricadas con el 5% y el 7,5% en peso de PLA en la cubierta.

Tabla 6.6 Promedio y desviación estándar de los ángulos de contacto para las matrices de fibras coaxiales PLA/PEG antes y después de la inmersión en agua

5% wt PLA		7,5%wt PLA	
Antes	Después	Antes	Después
132,48 ± 4,25	129,62 ± 3,45	132,24 ± 4,62	131,13 ± 3,99

En la Tabla 6.6 se puede apreciar que apenas existen diferencias entre el antes y después de la inmersión en agua tanto para las matrices de fibras coaxiales preparadas con cubiertas del 5% como del 7,5% en peso de PLA. En general se puede indicar que el ángulo de contacto para las matrices de estas fibras coaxiales podría corresponder a un valor promedio alrededor de 132 grados concluyéndose que las fibras de estas matrices tienen superficialmente propiedades hidrofóbicas que corresponden al PLA de acuerdo a su diseño coaxial.

En la Fig. 6.6, a modo de ejemplo, se muestra el contacto de la gota de agua con la superficie para una matriz de fibras coaxiales antes y después de su inmersión en agua, Fig 6.6a y 6.6b respectivamente. Claramente, en ambos casos se observa que el ángulo de contacto para esta superficie correspondería a valores mayores a 90°, lo cual indicaría que en ambos casos las superficies son hidrofóbicas. .

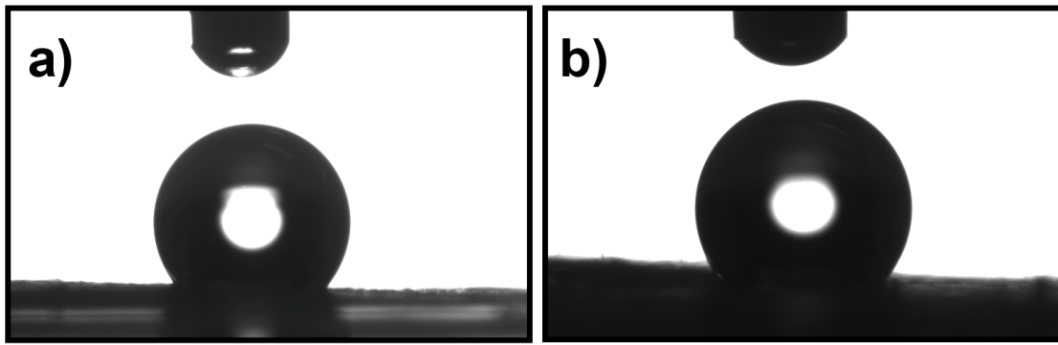


Fig. 6.6 Imágenes de la gota de agua en contacto con la superficies de una matriz de fibras coaxiales PLA/PEG antes (a) y después (b) de inmersión en agua

6.2.2. Pérdida de masa

Puesto que el PLA y el PEG son polímeros con diferente solubilidad en agua, se ha procedido a estudiar el efecto de la redisolución del PEG mediante la inmersión en agua de las fibras de PLA/PEG (cubierta/núcleo). El PEG es un polímero soluble en agua, mientras que el PLA es totalmente insoluble por su carácter hidrofóbico. Con este estudio se trata de caracterizar las mejores condiciones experimentales y del proceso de electrohilado para conformar las fibras coaxiales PLA/PEG. Para ello, se ha estudiado la pérdida en peso del PEG en la matriz después de su redisolución en agua.

Tal y como se ha explicado en el apartado 5.7, se realizaron dos medidas del peso para las matrices de fibras coaxiales PLA/PEG, una antes y otra después de redissolver el PEG por inmersión de la matriz en agua y posterior secado. La diferencia entre ambas medidas de peso para la misma matriz sería usada como un indicador de la cantidad de PEG que pierde la matriz por redisolución en agua y ello se calcula con la siguiente ecuación:

$$\Delta m_{PEG} = \Delta m_{Experimental} = m_{Antes\ de\ remover} - m_{Después\ de\ remover} \quad (\text{Ec. 6.1})$$

Una vez obtenida la pérdida de masa de PEG se calcula el total de masa teórico que debería tener una matriz con la siguiente ecuación:

$$\Delta m_{Teórico} = m_{PEGTeórico} = m_{matriz} \cdot \chi_{PEG} \quad (\text{Ec. 6.2})$$

Dónde la fracción del PEG es:

$$\chi_{PEG} = \frac{m_{PEGTeórica}}{m_{PEGTeórica} + m_{PLATEórica} + m_{NaClTeórica}} \quad (\text{Ec. 6.3})$$

Donde la masa teórica de PEG, PLA y NaCl son:

$$m_{PEG} = t \cdot flujo_{PEG} \cdot \rho_{disolución\ de\ polimero} ; m_{PLA} = t \cdot flujo_{PLA} \cdot \frac{\%PLA}{1-\%PLA} \cdot \rho_{CHCl_3:Acetona} \text{ Y}$$

$$m_{NaCl} = \frac{t \cdot flujo_{PEG} \cdot M_{NaCl} \cdot PM}{1000} \quad (\text{Ec. 6.4})$$

Donde las unidades son las siguientes:

$$m = g; \quad flujo = \frac{ml}{h}; \quad \rho = \frac{g}{ml}; \quad t = h; \quad PM = \frac{g}{mol}; \quad M = \frac{mol}{l}$$

Una vez calculada la masa total de PEG que hay en la matriz de fibras coaxiales, se compara la pérdida de masa experimental con la pérdida de masa teórica si se redisolviere con agua y se perdiese toda la masa de PEG.

$$\Delta m_{Teórico} = \Delta m_{Experimental} \quad (\text{Ec. 6.5})$$

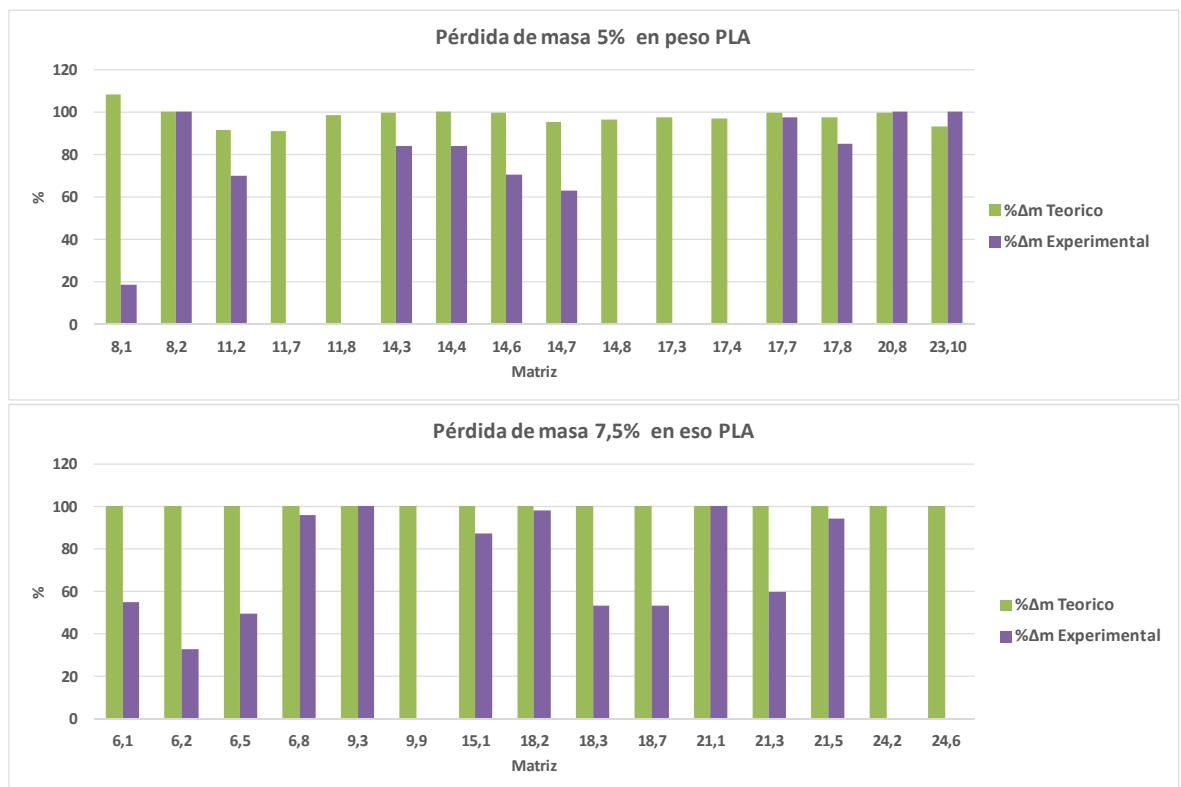


Fig. 6.7 Matrices de fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo) según su pérdida de masa al redisolver el PEG por inmersión en agua

Los resultados de la pérdida de masa antes y después de redissolver el PEG por inmersión de la matriz en agua son mostrados en la Fig 6.7, tanto para las matrices preparadas con PLA al 5% y 7,5% en peso para la cubierta de las fibras coaxiales. Se han hecho diferentes estudios con otros biopolímeros con propiedades parecidas al PLA y PEG, donde se ha observado el efecto que puede llegar a tener el agua sobre estas fibras coaxiales. A continuación, se expone los posibles casos que pueden ocurrir cuando el PEG contenido en la fibra es redissuelto en agua:

- Las fibras sufren una apertura longitudinal debido a la presión hidrostática que se ejerce desde el núcleo de la fibra.
- Las fibras sufren un aplastamiento de ellas debido a que el núcleo de la fibra queda vacío, la morfología es de una cinta.
- Las fibras sufren algún pequeño cambio en cuestión de morfología pero manteniendo la forma tubular de la fibra. La cubierta de la fibra es impermeable al agua y el núcleo de la fibra no puede ser redissuelto.

De manera similar a lo descrito en el apartado anterior (ver 6.2.1 Ángulos de contacto), en la Fig. 6.7, se grafica la pérdida de masa teórica y experimental al redissolver el PEG cuando la matriz es inmersa en agua. Los resultados se muestran agrupados de acuerdo a la concentración de PLA en la cubierta de las fibras. En resumen, en la Fig 6.7 se puede describir tres posibles casos o situaciones:

- La pérdida de masa teórica es igual a la pérdida de masa experimental. Esto podría ser interpretado bajo dos motivos. Por un lado, las fibras coaxiales podría presentar pequeñas fisuras (p.e. que la cubierta no quede totalmente cerrada) y cuando la fibra queda inmersa en el agua, el agua entra dentro de la fibra de tal manera que redissuelve el PEG (hidrofílico) y la presión hidrostática que origina esta redisolución podría hinchar y en caso extremo reventar la fibra. Por otro lado, podría ocurrir una situación totalmente diferente, si el PEG en lugar de encontrarse en el núcleo de la fibra se encontrará en la cubierta, en este caso el agua redissolvería el PEG cuando la matriz queda inmersa en el agua, y ello provocaría una pérdida de toda la masa de PEG, y la morfología de la fibra seguiría siendo tubular.
- La pérdida de masa experimental del PEG es parcial respecto a la pérdida de su masa teórica. Este fenómeno puede ocurrir por dos motivos. Por un lado, en la cubierta exista una mezcla de PLA y PEG, de tal manera que cuando el agua entra en contacto con la superficie, esta pierde su fracción de PEG. Además, la morfología de las fibras podría ser muy variable. Otra posibilidad, es que aunque el PEG se distribuya en el centro de la fibra, su contacto con el agua sea parcial

debido a su limitada accesibilidad debido al carácter hidrofóbico de la cubierta de PLA.

- No ocurre pérdida de masa cuando la fibra es expuesta al agua. Este hecho se podría explicar mediante la hipótesis que el PEG se encuentra correctamente distribuido en el núcleo de las fibras coaxiales y este compartimiento es totalmente inaccesible al agua debido la característica impermeable del PLA. Esta situación debe contrastarse porque no ocurre ningún cambio en la morfología de las fibras antes y después de su inmersión en agua..

Así, si se comparan los dos gráficos de la Fig 6.7, se puede observar que tanto para las fibras con cubierta de PLA del 5% en peso como para la de 7,5% ocurren las tres situaciones anteriormente descritas: pérdida de masa completa de PEG, pérdida de masa parcial de PEG y sin pérdida de masa de PEG.

6.2.3. Ángulos de contacto y pérdida de masa

Tal y como se ha comentado anteriormente, el estudio de los ángulos de contacto en las superficies de las matrices de fibras coaxiales puede ayudar a inferir la distribución del PEG en el núcleo y el PLA en la cubierta de la fibra coaxial. Además, la pérdida de masa tras ser incubada en agua es un indicador de la accesibilidad del solvente para la redisolución del PEG, y por lo tanto permite deducir su distribución en la fibra coaxial. Por ese motivo, se ha realizado un análisis comparativo de los ángulos de contacto y la pérdida de masa dependiendo de la matriz. Los resultados de este análisis permitirán seleccionar las mejores matrices coaxiales para una caracterización más exhaustiva por microscopía electrónica de barrido (SEM). A continuación, en la Fig. 6.8 se representa con un gráfico de barras esta comparación:

Observando la Fig. 6.8, se pueden apreciar diferentes casos comunes, tanto para 5% como para 7,5% en peso de PLA:

- Los ángulos de contacto antes y después de la inmersión en agua son parecidos o iguales, y la pérdida de masa teórica es igual a la pérdida de masa experimental (caso 1). Esto se puede apreciar en las siguientes matrices: 8,2; 6,8; 9,3; 17,7; 18,2; 20,8; 21,1 y 21,5 (ver Tabla 6.5, para las condiciones específicas de los experimentos).
- Los ángulos de contacto antes y después de la inmersión en agua son parecidos o iguales, y la pérdida de masa experimental es parcial en comparación a la pérdida de masa teórica (caso 2). Esto se puede apreciar en las siguientes matrices: 6,2; 6,5; 14,3; 14,4; 14,6; 14,7; 15,1; 17,8; 18,3; 18,7 y 21,3.
- Los ángulos contacto antes y después de la inmersión en agua son parecidos o iguales, y la pérdida de masa experimental es completamente diferentes a la

pérdida de masa teórica (caso 3). Esto se puede apreciar en las siguientes matrices: 11,8 14,8; 17,3; 17,4; 23,10; 9,9 y 24,2.

- Los ángulos de contacto después de la inmersión es mayor que antes, y la pérdida de masa experimental es parcial en comparación a la pérdida de masa teórica (caso 4). Esto se puede apreciar en las siguientes matrices: 6,1 y 8,1.
- Los ángulos de contacto antes de la inmersión en agua son más grandes que después, y la pérdida de masa experimental es parcial en comparación a la pérdida de masa teórica (caso 5). Esto se puede apreciar en las siguientes matrices: 11,2.
- Los ángulos de contacto antes de la inmersión en agua son superiores que después, y la pérdida de masa experimental es totalmente diferente a la pérdida de masa teórica (caso 6). Esto se puede apreciar en las siguientes matrices: 11,7 y 24,6.

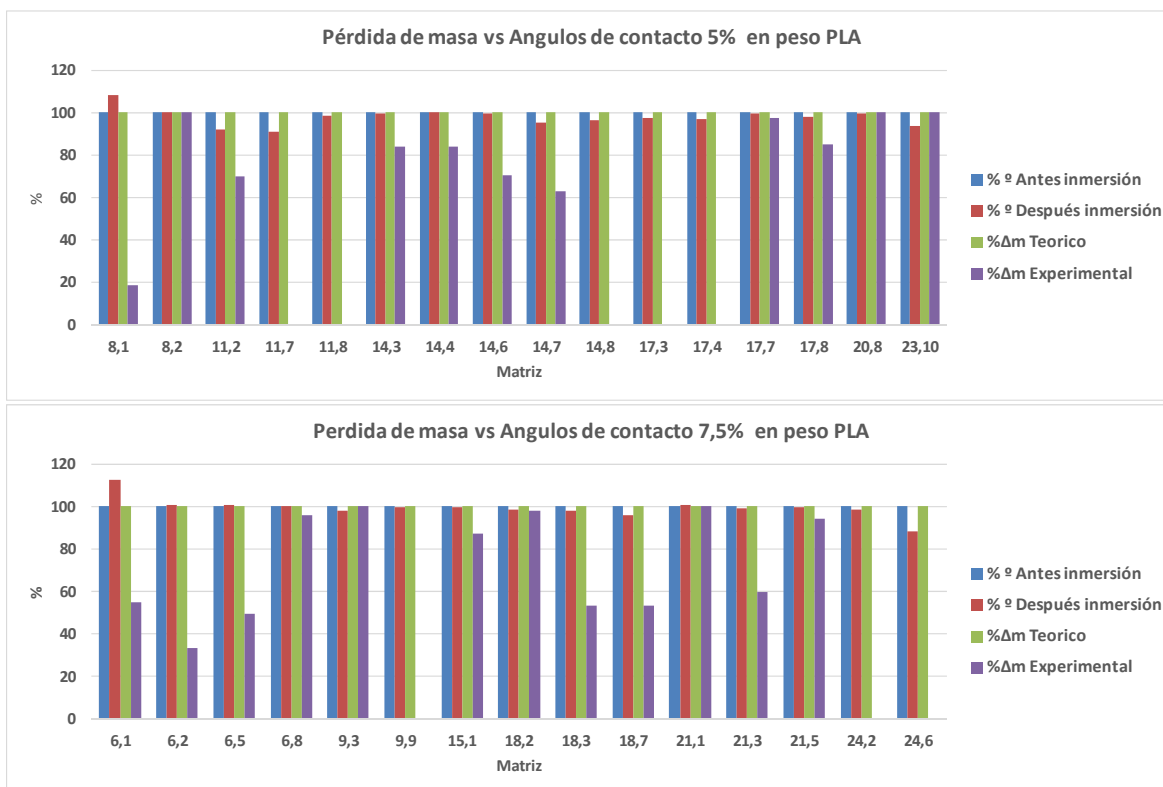


Fig. 6.8 Comparación ángulos de contacto con pérdida de masa de las diferentes matrices

Ante todo remarcar, que todas las matrices graficadas en principio son fibras coaxiales de peor o mejor calidad pero el objetivo de este trabajo es encontrar las condiciones que hagan que estas fibras sean muy homogéneas y sin defectos, por ese motivo, a la hora de seleccionar las diferentes matrices que se van a analizar mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido, se ha seguido el criterio de que los ángulos de contacto antes y después de la inmersión sean lo mismo, ya que así se esperaría que el PLA se encuentre distribuido en la cubierta y el PEG en el núcleo de la fibra coaxial. Respecto a la pérdida de masa, se han seleccionado las matrices que no muestran pérdida de masa, ya que eso significaría que el núcleo de la fibra estaría protegido por la cubierta hidrofóbica de PLA e impediría la redisolución del PEG, manteniendo la morfología de la fibra coaxial. Las matrices que cumplen estas dos premisas son las siguientes (caso 3): 9,9; 11,8; 14,8; 17,3; 17,4; y 24,2. Por otro lado, también se ha elegido otras matrices para que sean analizadas mediante SEM, teniendo en cuenta los otros casos ya expuestos. Las matrices que se han analizado mediante SEM y que no seguían las premisas deseadas, pero que se ha considerado interesantes para contrastar algunas suposiciones anteriormente expuestas han sido las siguientes: 6,1; 6,2; 6,8; 8,1; 8,2; 11,2; 11,7; 14,4; 17,7; 21,3 y 24,6.

6.2.4. Análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Después de haber seleccionado las matrices de fibras coaxiales, estas se han analizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), para estudiar su morfología, es decir, para observar en detalle la superficie de dichas fibras, y así determinar diferentes características como la rugosidad, grietas, etc. Las imágenes de SEM fueron obtenidas de muestras, antes y después de incubar las matrices en agua, para determinar posibles cambios morfológicos por la disolución del PEG.

En el apartado anterior (6.2.3), con ayuda del gráfico que compara los ángulos de contacto con la pérdida de masa, se han distinguido 6 casos. Todas las matrices de fibras coaxiales que pertenecen al caso que cumple las dos hipótesis: igual valores de ángulos de contacto antes y después de la inmersión en agua, y pérdida de masa experimental totalmente diferente a la masa teórica, fueron analizadas mediante el SEM. También se han analizado los otros 5 casos, pero solo algunas muestras representativas de cada caso.

A continuación, se representan las imágenes del SEM teniendo en cuenta los 6 casos. Las matrices antes de la inmersión mantienen su nomenclatura, y las que son después de la inmersión en agua se marcan con una w (*water*). En la Fig. 6.9, se representa las imágenes de SEM de las matrices seleccionadas del caso 1 del apartado 6.2.3.

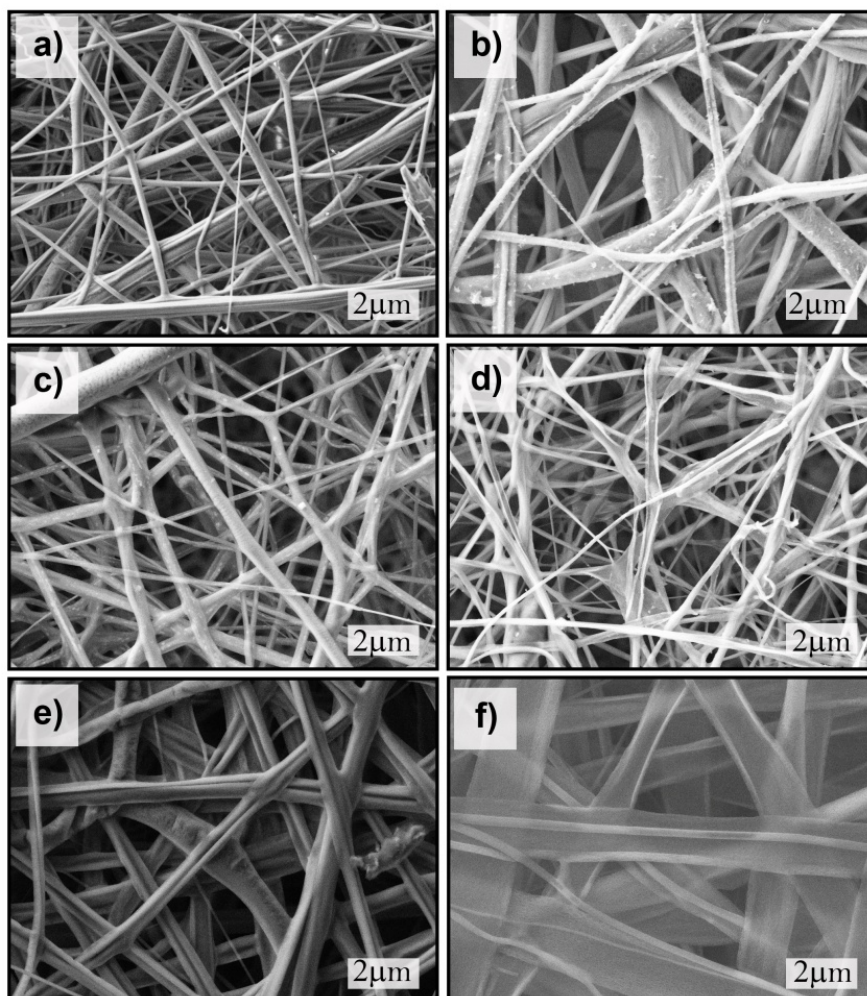


Fig. 6.9 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): 6,8 (a), 6,8w (b), 8,2 (c), 8,2w (d), 17,7 (e), 17,7w (f)

En estas imágenes se puede observar como la morfología de las fibras antes y después de ser sumergidas en agua cambian. En general, se puede apreciar que en todas las imágenes, las fibras después de ser sumergidas han sufrido una apertura longitudinal, probablemente debido a la presión hidrostática que debe soportar la fibra durante el proceso de resolubilización del PEG. Por lo tanto, es coherente el hecho de que la pérdida de masa experimental sea igual a la pérdida de masa teórica. Las matrices más representativas en las cuales se puede apreciar esto son la 17,7 (Fig 6.9e) y la 17,7w (Fig 6.9f).

En la Fig. 6.10, se representa las micrografías del SEM de las matrices seleccionadas del caso 2 del apartado 6.2.3

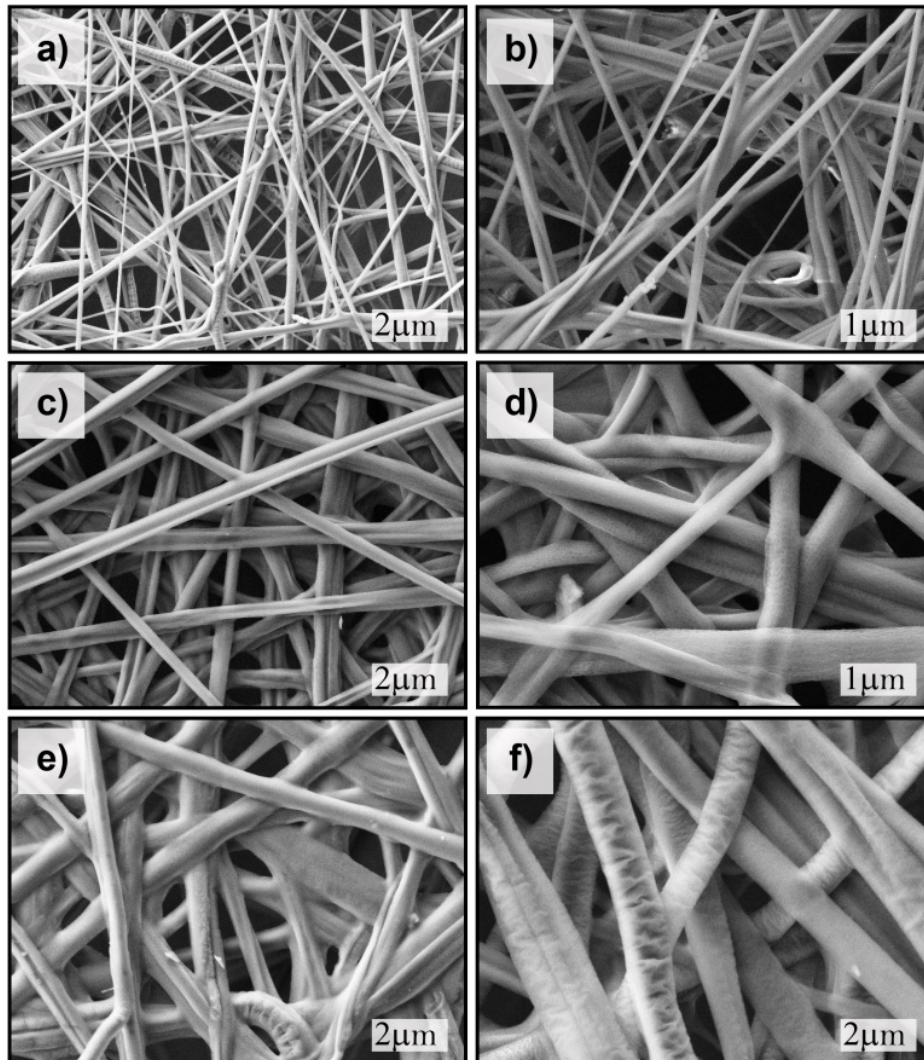


Fig. 6.10 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): 6,2 (a), 6,2w (b), 14,4 (c), 14,4w (d), 21,3 (e), 21,3w (f)

En general, se observa que después de la inmersión en agua y comparándolas con las imágenes antes de la inmersión, la morfología de las fibras ha cambiado muy poco, manteniendo su forma tubular. En la matriz 14,4w (Fig 6.10d) se puede apreciar que casi es idéntica a la matriz 14,4 (Fig 6.10c). Así, las condiciones de electrohilado de estas matrices podrían ser consideradas como condiciones óptimas. Sin embargo, se requiere mayor caracterización como sería el análisis de la distribución de sus diámetros.

En la Fig. 6.11, se muestran las imágenes SEM de las matrices seleccionadas como caso 3 del apartado 6.2.3

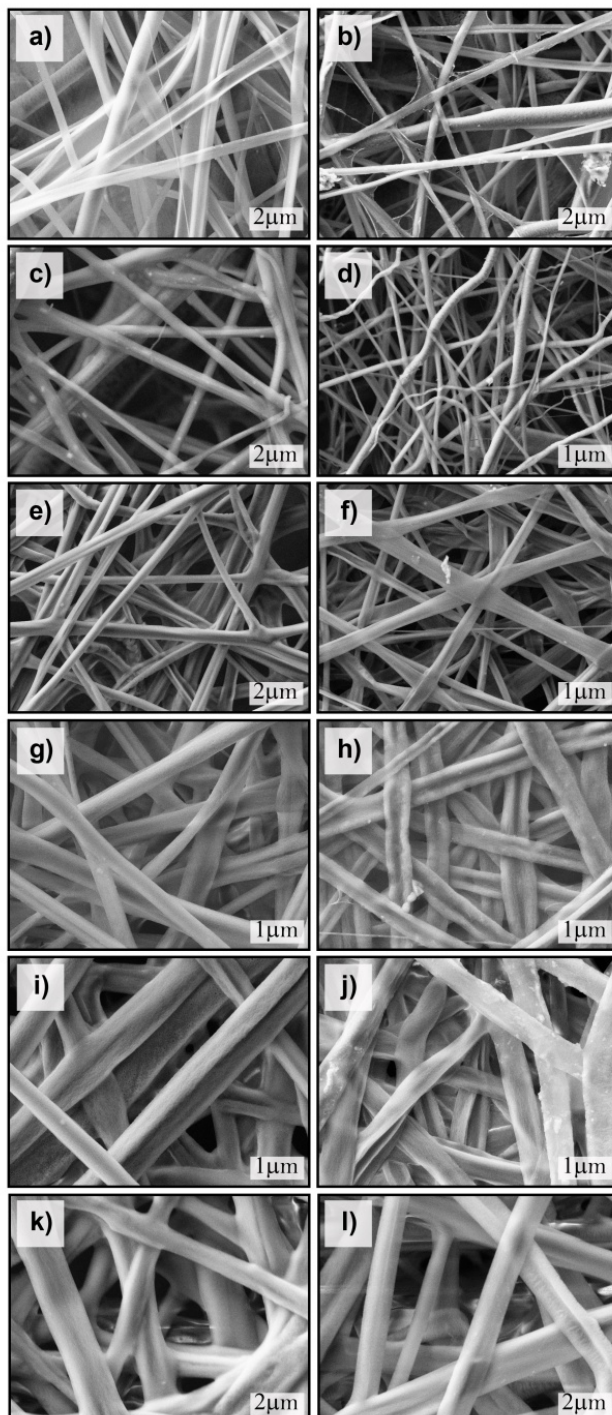


Fig. 6.11 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): 9,9 (a), 9,9w (b), 11,8 (c), 11,8w (d), 14,8 (e), 14,8w (f), 17,3 (g), 17,3w (h), 17,4 (i), 17,4w (j), 24,2 (k), 24,2w (l)

En general, en estas imágenes se puede observar como la morfología de las fibras, después de ser inmersas en agua, no sufren cambios morfológicos significativos. Las fibras mantienen su forma tubular antes y después de la incubación en agua. Esto podría explicar porque no se observa pérdida de masa, y que los diámetros antes y después de la incubación sean parecidos (estos resultados se presentan en las siguientes secciones). Por otro lado, de manera particular se puede observar en la imagen de la Fig 6.11h que las fibras muestran una morfología aplanada. En la Fig 6.11j, a pesar de que las fibras mantienen su forma tubular antes y después de la incubación en agua, se puede observar cambios en su superficie debido a la acumulación de material granular. Teniendo en cuenta las imágenes de antes y después de la incubación en agua, se pueden distinguir las matrices 14,8, 17,3 y la 24,2 como las más regulares y sin morfológicamente sin defectos.

En la Fig. 6.12, se muestran las imágenes de SEM de las matrices seleccionadas del caso 4 (ver apartado 6.2.3).

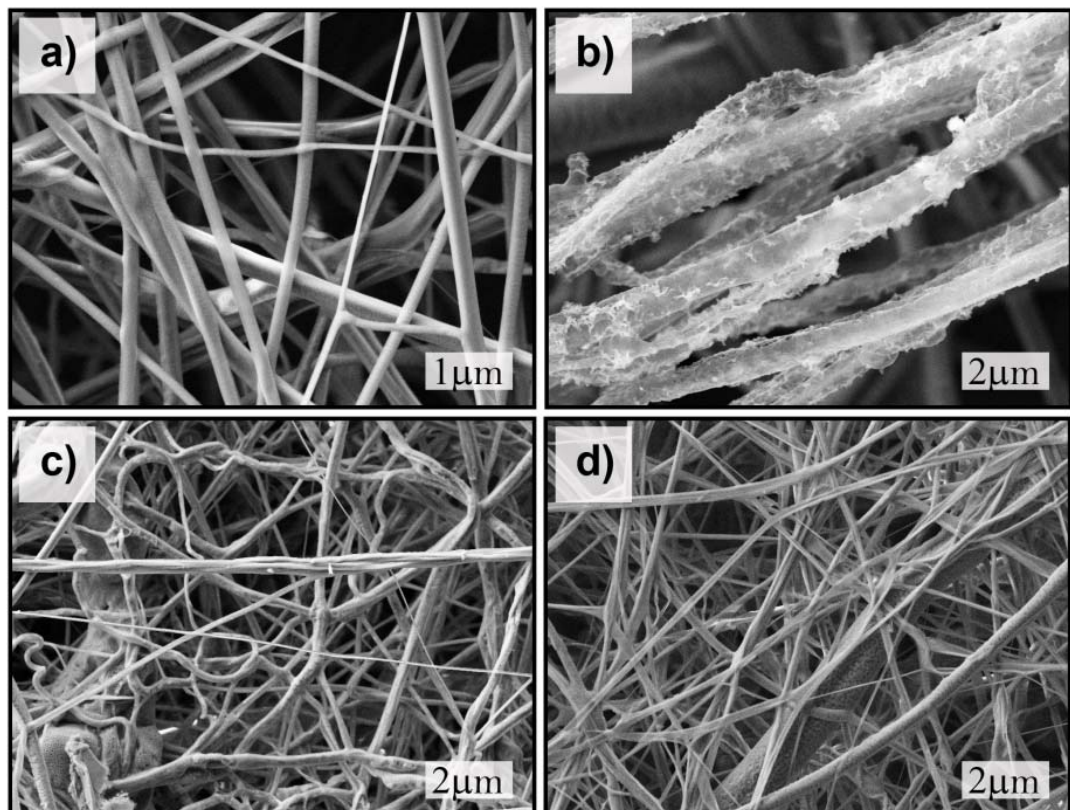


Fig. 6.12 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): 6,1 (a), 6,1w (b), 8,1 (c), 8,1w (d)

Claramente, se puede observar que la morfología de las fibras cambia después de ser incubadas en agua, también se observa que no son morfológicamente uniformes. La Fig 6.12b muestra de manera evidente una mayor rugosidad que la imagen de la Fig 6.12a. Este cambio de rugosidad es un factor que afecta al valor de su ángulo de contacto.

En la Fig. 6.13, se representa las micrografías del SEM de las matrices seleccionadas del caso 5 (ver apartado 6.2.3). En la imagen de la Fig 6.13b se puede apreciar como la fibras se han abierto de manera longitudinal por la presión hidrostática, y por ese motivo existe una pérdida de masa. También se aprecia que hay algunas fibras que no están abiertas, que mantienen una forma tubular, por lo que la pérdida de masa no es total si no parcial.

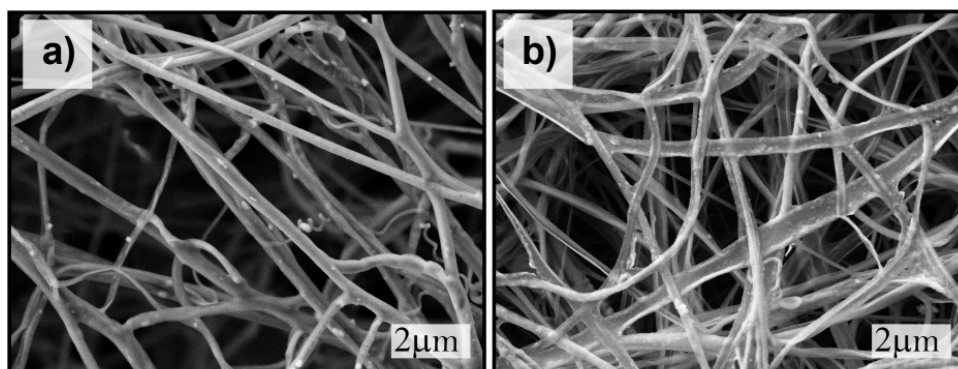


Fig. 6.13 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): 11,2(a), 11,2w (b)

En la Fig. 6.14, se representa las micrografías del SEM de las matrices seleccionadas del caso 6 (ver apartado 6.2.3).

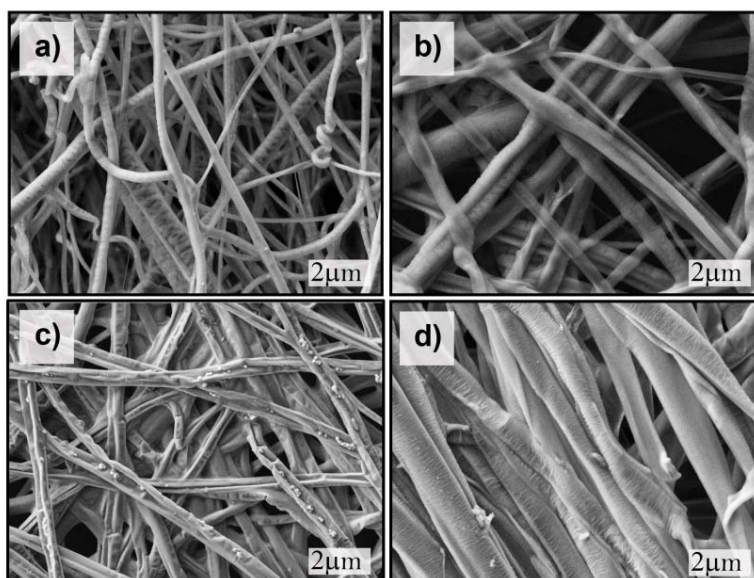


Fig. 6.14 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): 11,7 (a), 11,7w (b), 24,6 (c), 24,6w (d)

En este último caso (Fig 6.14), antes de la incubación en agua, el ángulo de contacto con la superficie es mayor que el valor obtenido para después de la incubación en agua. Este hecho se puede confirmar observando la imágenes de las Fig 6.14c y d, donde se puede apreciar que la imagen Fig 6.14c tiene diferentes rugosidades en la superficie, y en cambio la imagen Fig 6.14d carece de ellas después de la incubación en agua; además, se puede observar que las fibras muestran una morfología plana lo cual podría indicar que han perdido el PEG desde el núcleo de la fibra.

6.2.5. Diámetros de las fibras

Las imágenes de las fibras obtenidas mediante la técnica de SEM también fueron utilizadas con fines cuantitativos para realizar el análisis de la distribución de diámetros de las fibras coaxiales PLA/PEG. El diámetro medio de las fibras es una medida que da información sobre la homogeneidad de las fibras en la matriz. Para ello, se han medido los diámetros de un número significativo de fibras para cada mezcla. Para realizar este estudio estadístico de la distribución de diámetros se realizaron entre 75-100 medidas por cada muestra, evitando medir repetidamente la misma fibra y midiendo los diámetros de fibras en diferentes zonas de la matriz. El programa que se ha utilizado para medir el diámetro de las fibras fue el *Smart Tiff* de libre distribución (*Carl Zeiss Smart Tiff*). Los valores medidos fueron tratados mediante el programa *Origin* (*Origin Pro v8. Microcal*) que permite analizar la distribución de diámetros y realizar las representaciones gráficas de estas distribuciones.

En la Tabla 6.7, se muestran los valores promedio y su desviación estándar, tanto para las matrices antes y después de la inmersión en agua. En la Tabla 6.7 se puede apreciar que los diámetros de las fibras varían entre 995-2390 nm. Se puede observar que las matrices con un diámetro inferior corresponden a las matrices que se han electrohilado con cloruro de sodio añadido a la disolución del PEG (matrices: 6,1; 6,2; 6,8; 8,1; 8,2; 9,9; 11,2; 11,7; 11,8). Las matrices que tiene una desviación estándar pequeña para el valor promedio del diámetro de fibra pueden ser destacadas como matrices con gran uniformidad, es decir que las fibras son regulares, estas matrices fueron la 6,1; 11,2; 11,8; 14,4; 14,8; 17,3; 17,4; 17,7 y 24,2. En las matrices 14,4; 17,3; 17,4 y 24,2 se ha determinado que antes y después de la inmersión en agua, las fibras tienen un diámetro promedio parecido y la desviación estándar es pequeña. Por lo tanto, estos resultados indicarían que estas matrices podrían ser las fibras coaxiales PLA/PEG idóneas.

A continuación se mostraran los resultados gráficos para la distribución de tamaño de diámetros para las fibras de las matrices clasificadas por casos específicos (ver apartado 6.2.3 y 6.2.4).

Tabla 6.7 Distribución de diámetros de las diferentes fibras

Matriz	∅ Antes inmersión (nm)	∅ Después inmersión w (nm)
6,1	955 ± 246	793 ± 218
6,2	998 ± 350	822 ± 401
6,8	1116 ± 489	1194 ± 631
8,1	1023 ± 525	940 ± 593
8,2	806 ± 301	746 ± 195
9,9	891 ± 385	905 ± 287
11,2	884 ± 203	-
11,7	881 ± 899	657 ± 293
11,8	638 ± 232	544 ± 188
14,4	1178 ± 223	1202 ± 220
14,8	1072 ± 206	1374 ± 328
17,3	1076 ± 273	1052 ± 196
17,4	1392 ± 235	1350 ± 296
17,7	1400 ± 297	1631 ± 367
21,1	1502 ± 321	1301 ± 278
24,2	1548 ± 201	1600 ± 173
24,6	2390 ± 403	2155 ± 514

En la Fig. 6.15, se muestra los histogramas para las matrices seleccionadas como caso 1 (ver apartado 6.2.3).

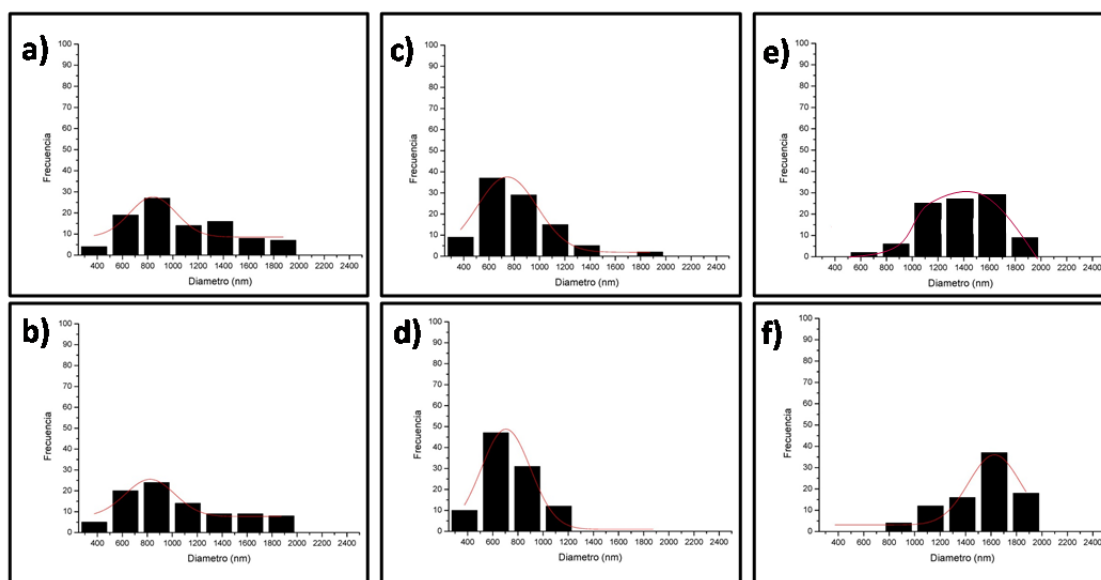


Fig. 6.15 Distribución de los diámetros de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): 6,8 (a), 6,8w (b), 8,2 (c), 8,2w (d), 17,7 (e), 17,7w (f)

Una clara distribución unimodal puede ser representada para la muestra 8,2 (Fig 6.15c y d). En el caso de los histogramas para la muestra 6,8 (Fig 6.15a y b) se observa que las fibras son poblaciones heterogéneas por sus tamaños de diámetros más variados. Esto mismo sucede la muestra 17,7 en los histogramas de la Fig 6.15e y f, pero la distribución es más amplia para las fibras de mayor diámetro, también se puede destacar que la heterogeneidad de las fibras se reduce mostrándose como una población más homogénea después de la redisolución del PEG.

En la Fig. 6.16, se muestra los histogramas las matrices seleccionadas del caso 2 (ver apartado 6.2.3).

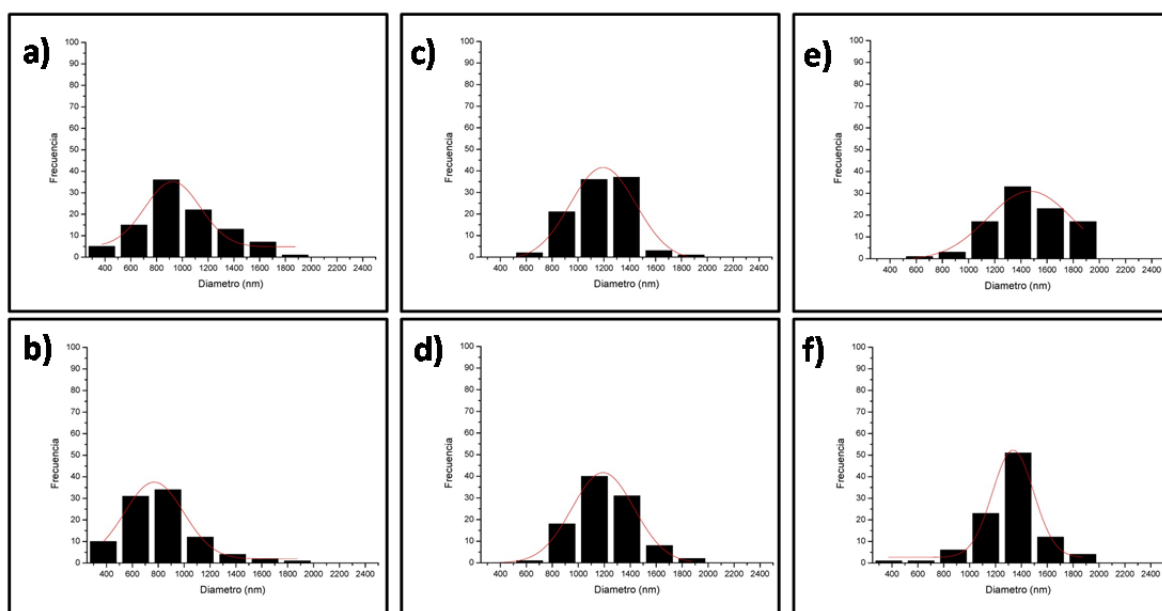


Fig. 6.16 Distribución de los diámetros de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): 6,2 (a), 6,2w (b), 14,4 (c), 14,4w (d), 21,1 (e), 21,1w (f)

En general, los gráficos de la Fig 6.16 muestran distribuciones unimodales, eso significa que las fibras tienen forma uniforme. Para la muestra 6,2 (Fig 6.16a y b) se observa que el diámetro promedio de la fibra disminuye cuando se redisuelve el PEG por inmersión de la matriz en agua, ello coincide con algún cambio en su morfología. Algo similar sucede para la muestra 21,1 pero los diámetros fueron mayores (Fig 6.16e y f). Por lo contrario, la Fig 6.16c y d para la muestra 14,4 mantienen una distribución unimodal y además su valor promedio de diámetro coinciden en las matrices antes y después de la inmersión en agua. Este hecho es un indicativo de que las fibras obtenidas de esta matriz fueron electrohiladas bajo condiciones operacionales óptimas.

En la Fig. 6.17, se muestra los histogramas las matrices seleccionadas del caso 3 (ver apartado 6.2.3).

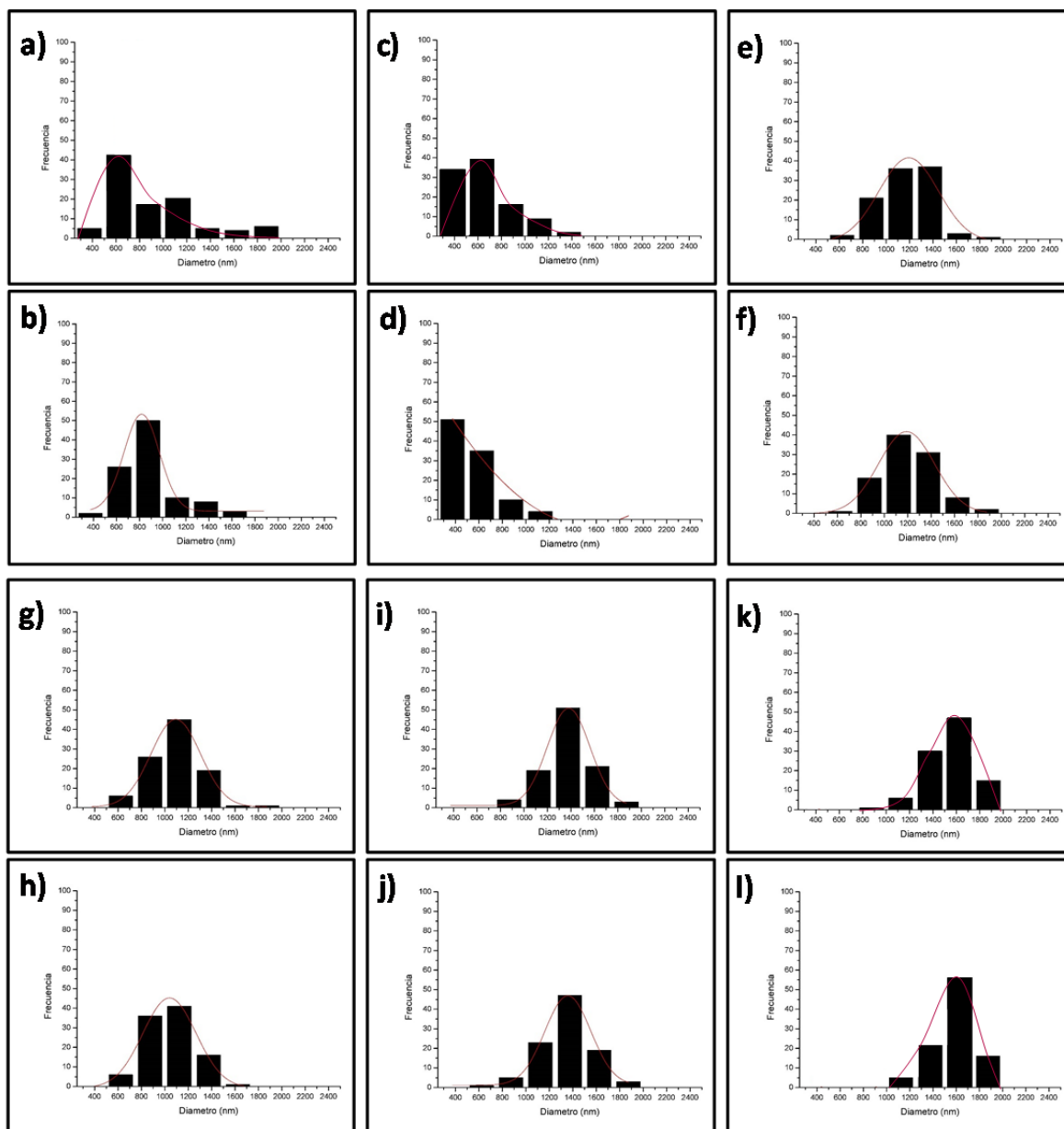


Fig. 6.17 Distribución de los diámetros de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): 9,9 (a), 9,9w (b), 11,8 (c), 11,8w (d), 14,8 (e), 14,8w (f), 17,3 (g), 17,3w (h), 17,4 (i), 17,4w (j), 24.2 (k), 24,2w (l)

En la Fig. 6.17, tanto las matrices antes y después de ser incubadas en agua mantienen la distribución de los diámetros. Esto significa que el agua no ha ejercido cambios sobre ellas posiblemente porque el PEG no fue redisolto en las fibras, y así su morfología es similar antes y después de la inmersión en agua (ver imágenes SEM de la Fig 6.11). Las muestras 9,9 y 11,8 muestran gran heterogeneidad y con clara asimetría en su distribución (Fig 6.17a y b, y Fig 6.17c y d). Estas matrices corresponden a las muestras que se han electrohilado añadiendo cloruro de sodio en la disolución del PEG. Por lo tanto, se podría sugerir que la adición de NaCl al PEG para incrementar la fuerza iónica de la disolución de PEG no es aconsejable para el sistema coaxial tal como se ha realizado en este estudio. En las muestras 17,3; 17,4 y 24,2 se puede observar distribuciones unimodales, y además, antes y después de la incubación en agua mantienen el promedio de sus diámetros. Por tanto, se podría indicar que estas matrices fueron electrohiladas bajo condiciones operacionales óptimas.

En la Fig. 6.18, se muestran los histogramas las matrices seleccionadas del caso 4 del apartado 6.2.3.

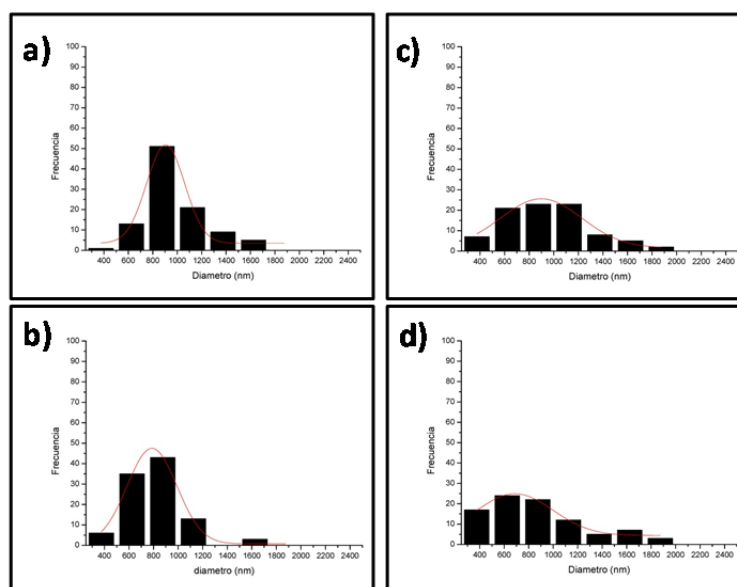


Fig. 6.18 Distribución de los diámetros de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): 6,1 (a), 6,1w (b), 8,1 (c), 8,1w (d)

En la muestra 6,1 las fibras de una distribución homogénea cambia a una mayor heterogeneidad cuando se redisuelve el PEG afectando la morfología de la fibra. Mientras que la muestra 8,1 mantiene una población heterogénea, tanto antes y después de la inmersión en agua.

En la Fig. 6.19, se muestra el histograma de las matriz seleccionada del caso 5 del apartado 6.2.3.

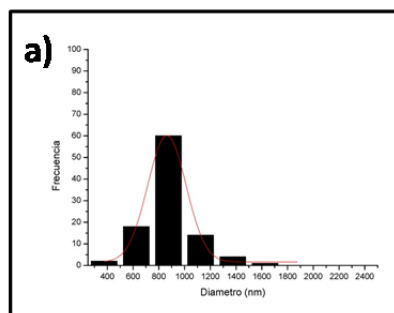


Fig. 6.19 Distribución de los diámetros de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): 11,2(a)

En esta figura solo se puede apreciar un histograma, puesto que las fibras después de ser incubadas en agua han sufrido una apertura longitudinal, y por ese motivo no se han podido medir los diámetros.

En la Fig. 6.20, se muestran los histogramas de las matrices seleccionadas del caso 6 del apartado 6.2.3.

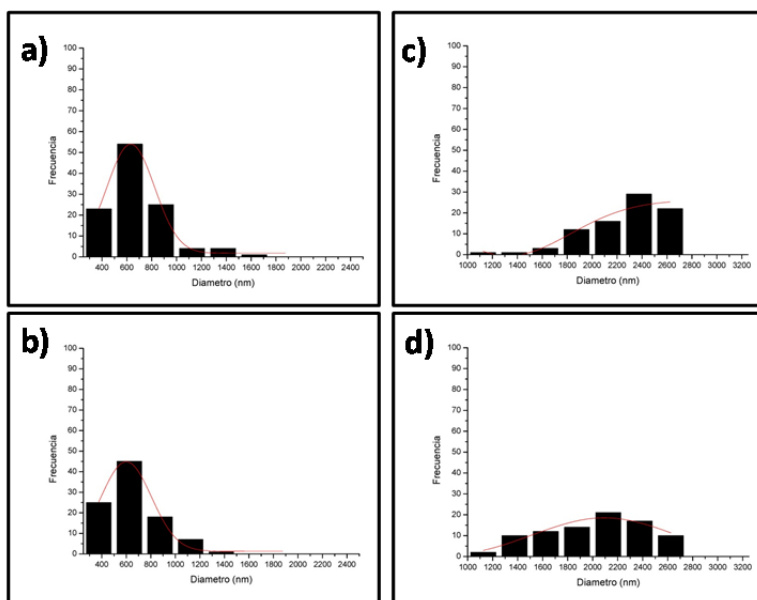


Fig. 6.20 Distribución de los diámetros de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): 11,7 (a), 11,7w (b), 24,6 (c), 24,6w (d)

Claramente se observa que la muestra 11,7 tienen distribuciones similares de diámetros antes y después de la inmersión en agua (Fig 6.20a y b); sin embargo, los diámetros para estas fibras tienen pequeños valores que la aproximan a las nanofibras. Por otro lado, la muestra 24,6 tiene valores de microfibras pero su distribución es muy heterogénea (Fig 6.20c y d).

6.2.6. Características de las fibras coaxiales seleccionadas

El objetivo principal de este trabajo fue obtener fibras coaxiales estructuradas con un núcleo (core) de polietilenglicol y una cubierta (shell) de ácido poliláctico, para ello se ha buscado las condiciones idóneas, variando los parámetros operacionales para el electrohilado coaxial. Para fabricar las fibras coaxiales más idóneas, se ha realizado un diseño experimental de tipo factorial $3 \times 2^{2^2}$, donde se ha variado el solvente del PEG (agua o NaCl), el peso molecular del PEG (10KDa o 35KDa), la concentración del PEG (200mg/ml o 400mg/ml) y la concentración en peso del PLA (2,5%, 5% o 7,5%). Durante el electrohilado de las diferentes muestras diseñadas se ha evaluado in-situ mediante microscopía óptica las fibras obtenidas. Posteriormente, se ha procedido a la selección de las matrices que tienen las mejores características de fibras coaxiales considerando los siguientes aspectos:

- Tener los ángulos de contacto superiores a 120° antes y después de la inmersión en agua, o tener ángulos de contacto igual o similares antes y después de la inmersión en agua.
- Determinar que la pérdida de masa experimental sea diferente a la pérdida de masa teórica.
- Observar mediante imágenes SEM que las fibras de las matrices mantienen una morfología similar antes y después de la redisolución del PEG en agua (morfología tubular o plana por vaciado de su contenido).
- Analizar la distribución de diámetros de las fibras coaxiales antes y después de la redisolución del PEG en agua para comprobar que la distribución sea unimodal, homogénea, y con valores lo más similar posible.

Una vez planteados estos aspectos, se ha llegado a la conclusión que las matrices que mejor se adaptan a estas características son las matrices de fibras coaxiales PLA/PEG 14,4; 17,3 y 24,2. Por tanto, sus parámetros operacionales son los óptimos para el electrohilado coaxial de fibras con cubierta de PLA y núcleo de PEG.

En la Tabla Tabla 6.8, se muestran los ángulos de contacto y el valor promedio de los diámetros de las fibras coaxiales para las tres matrices seleccionadas.

Tabla 6.8 Ángulos de contacto y diámetros de las fibras coaxiales seleccionadas

Matriz	ÁNGULOS DE CONTACTO		DIÁMETROS DE LAS FIBRAS	
	Antes inmersión (°)	Después inmersión w (°)	Antes inmersión (nm)	Después inmersión w (nm)
14,4	132,51 ± 1,60	132,47 ± 1,54	1178 ± 223	1202 ± 220
17,3	136,67 ± 0,89	133,06 ± 2,04	1076 ± 273	1052 ± 196
24,2	135,19 ± 4,64	133,37 ± 1,03	1548 ± 201	1600 ± 173

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se muestran las imágenes SEM para observar los detalles morfológicos de las fibras coaxiales antes y después de su inmersión en agua.

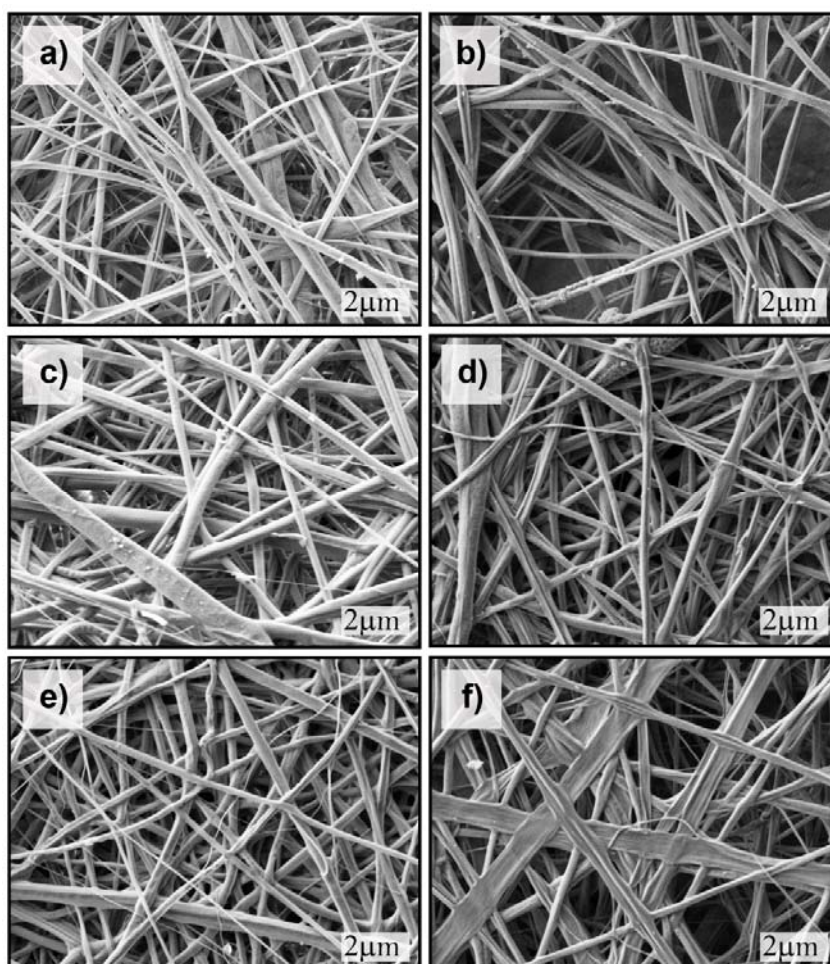


Fig. 6.21 Imágenes de SEM de las fibras coaxiales PLA/PEG antes y después de su inmersión en agua (w): 14,4 (a), 14,4w (b), 17,3 (c), 17,3w (d), 24,2 (e), 24,2w (f)

En la Fig. 6.22, se muestran los gráficos de la distribución de diámetros de las fibras coaxiales en las tres matrices.

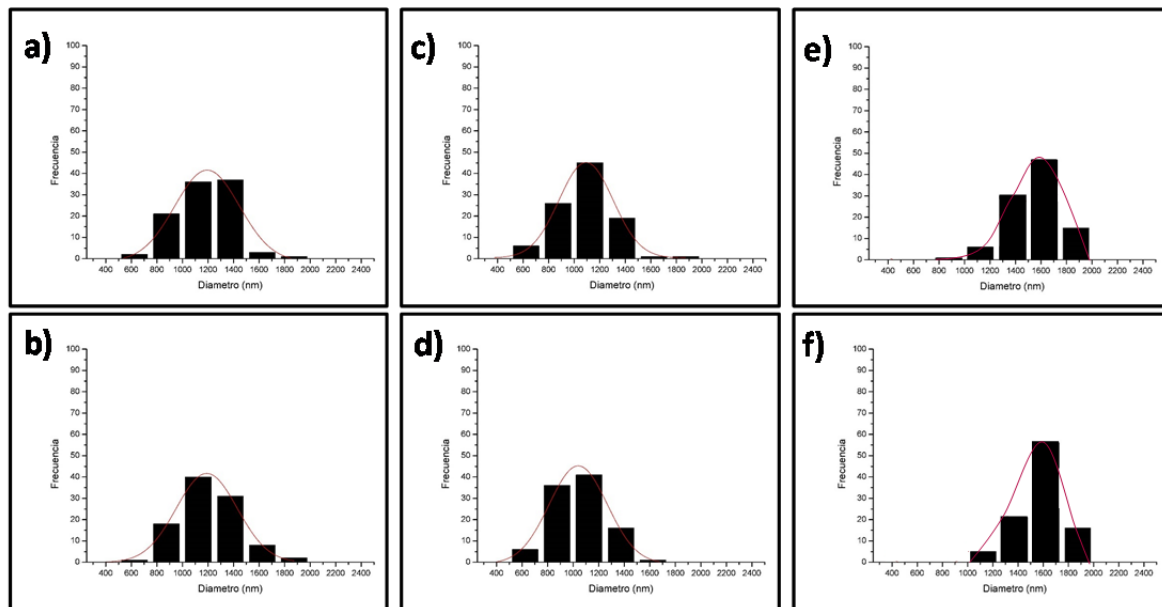


Fig. 6.22 Distribución de los diámetros de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): 14,4 (a), 14,4w (b), 17,3 (c), 17,3w (d), 24,2 (e), 24,2w (f)

Por último, en la Tabla 6.9 se muestran los parámetros operacionales óptimos del proceso de electrohilado para obtener las tres matrices seleccionadas.

Tabla 6.9 Parámetros idóneos de las matrices seleccionadas

Matriz	PLA (%wt)	PEG (kDa)	PEG (mg/ml)	KV	Flujo PLA* (ml/h)	Flujo PEG* (ml/h)	Distancia (cm)
14,4	5,00%	35	200	25	10	2,4	18
17,3	5,00%	35	400	25	10	1,2	15
24,2	7,50%	10	400	25	10	1,2	15

*Agua como solvente del PEG, y la mezcla CHCl₃:Acetona(2:1, v/v) como solvente del PLA

6.3. Fibras cargadas con bacterias

Una vez determinada las mejores matrices de fibras coaxiales, y por lo tanto los parámetros operacionales idóneos para el electrohilado coaxial, las matrices seleccionadas se cargarán con la bacteria *Escherichia coli*, para usarlas como un prototipo de sistema biológico. Después de haber cargado estas matrices con la bacteria *E.coli* se procedió a la caracterización de dichas matrices.

Para este caso, el electrohilado coaxial fue realizado utilizando como colector un rodillo giratorio con la finalidad de facilitar la acumulación de las fibras para generar la matriz. Las matrices cargadas con bacterias se respetarán con la letra E; por ejemplo E14,4 significa una matriz de fibra coaxial PLA/PEG cargada con *E.coli* en las condiciones operacionales del experimento 14,4.

6.3.1. Ángulos de contacto

La medida de ángulos de contacto para las matrices de las fibras cargadas con la bacteria *E.coli*, se ha realizado igual que en el apartado 6.2.1. En la tabla Tabla 6.10, se hace una comparativa con la medida de los ángulos de contacto antes y después de la inmersión en agua con estas matrices cargadas de bacterias.

Tabla 6.10 Ángulos de contacto de las matrices cargadas con la bacteria *Escherichia coli*

ÁNGULOS DE CONTACTO		
Matriz	Antes inmersión (°)	Después inmersión w (°)
E14,4	131,51 ± 2,60	129,47 ± 2,84
E17,3	132,67 ± 1,69	131,06 ± 2,34
E24,2	133,19 ± 3,64	133,37 ± 3,03

Se puede apreciar que las tres matrices cargadas con la bacteria tienen un ángulo de contacto parecido entre ellas, y que además, el promedio de ángulos de contacto antes y después de la inmersión en agua son similares. También se puede observar que los ángulos de contacto de estas matrices están en los intervalos entre 129 y 134 grados. Este hecho verifica que las matrices antes y después de la inmersión en agua contiene PLA en la cubierta y que por tanto, el PEG se encuentra en el núcleo de la fibra.

6.3.2. Pérdida de masa

A diferencia que en el apartado 6.2.2, las matrices en vez de dejarlas 24 horas incubando en agua se han dejado 48 horas. Además, se ha realizado tres replicas para cada matriz en vez de una, como en el apartado 6.2.2.

Teniendo en cuenta la Ec. 6.6, se ha hecho una comparativa de la pérdida de masa teórica con la pérdida de masa experimental.

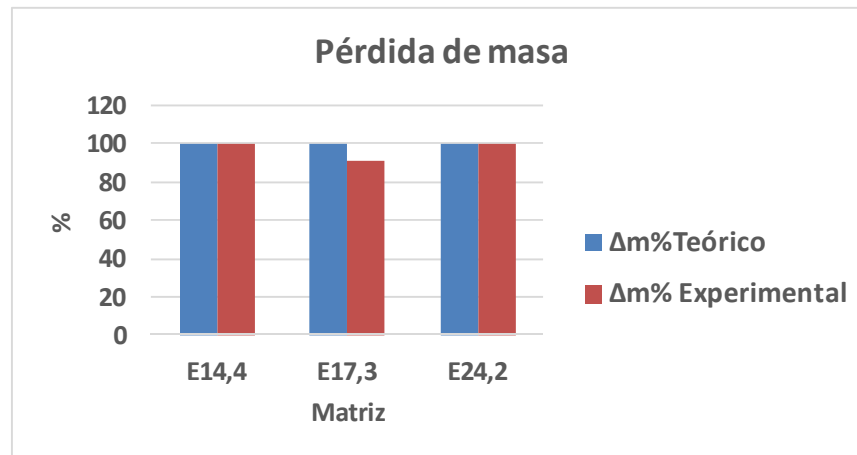


Fig. 6.23 Pérdida de masa de las matrices cargadas con la bacteria *Escherichia coli*

En general, se observa que para todos los tipos de fibras cargadas con la bacteria *E. coli*, la comparación entre la pérdida de masa experimental es igual la pérdida de masa teórica, a excepción de la matriz E17,3, donde se aprecia que el PEG se ha disuelto alrededor de un 90%. Estos resultados son diferentes a los obtenidos cuando estas matrices no tenían carga de la bacteria. Estos resultados demuestran que la carga de bacterias en el PEG puede influir en la redisolución del PEG cuando la matriz es inmersa en agua. Esto puede ser debido a pequeños cambios de viscosidad de la gota en el cono de Taylor durante el electrohilado.

6.3.1. Análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se procede a examinar de nuevo las fibras mediante el SEM para evaluar el efecto que podría tener la pérdida de PEG en las fibras cargadas con bacterias. En la Fig. 6.24, se muestran las imágenes SEM de estas fibras.

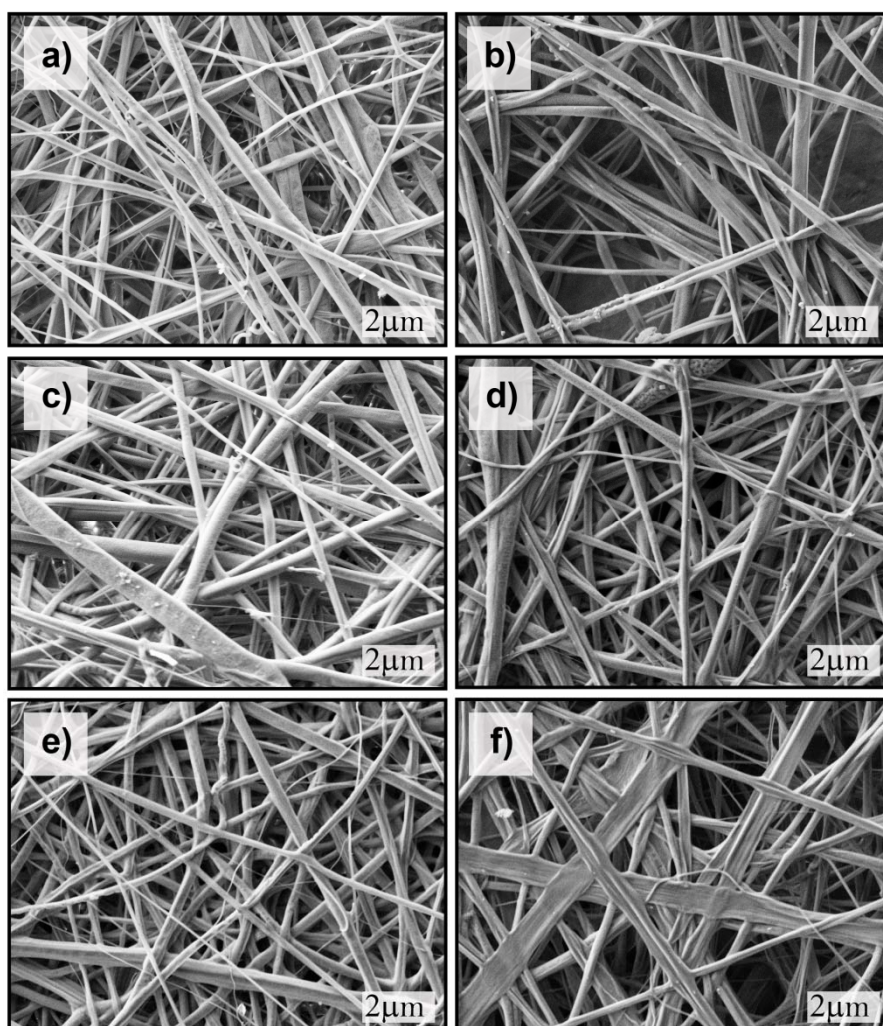


Fig. 6.24 Imágenes SEM de las fibras coaxiales PLA/PEG cargadas con *E.coli* en el núcleo de la fibra: E14,4 (a), E14,4w (b), E17,3 (c), E17,3w (d), E 24,2 (e), E 24,2w (f)

En la Fig 6.24 se observa que las imágenes antes de la incubación en agua, (a), (c) y (e), no tienen la misma forma comparadas con las imágenes del SEM de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Este hecho puede ocurrir por dos motivos. En primero lugar, las fibras se recogieron en un rodillo en vez de una placa colectora, lo que puede intervenir en la morfología de las fibras. Por otro lado, el hecho de ponerle bacterias puede cambiar su morfología, puesto que la densidad del conjunto no es la misma que sin bacterias. En cuanto a las morfologías después de la incubación en agua, se puede observar que cada matriz después de ser incubada sigue un patrón diferente. Las fibras de la muestra E14,4w (Fig 6.24b) se aplastan y algunas se abren longitudinalmente. En cuanto a la muestra E17,3w (Fig 6.24d) se mantienen con una morfología muy similar a la matriz

inicial seca. Por último, la muestra E24,2w (Fi 6.24f) las fibras han sufrido una apertura longitudinal y un aplastamiento importante de ellas.

6.3.2. Diámetros de las fibras

Del mismo modo que anteriormente se ha explicado, las fibras cargadas antes y después de la inmersión de las matrices en agua para remover el componente de PEG, fueron observadas por SEM para obtener imágenes para realizar la medida de los diámetros de las fibras. En la Fig. 6.25 se muestran la distribución de los diámetros de las fibras antes y después de redissolver el PEG.

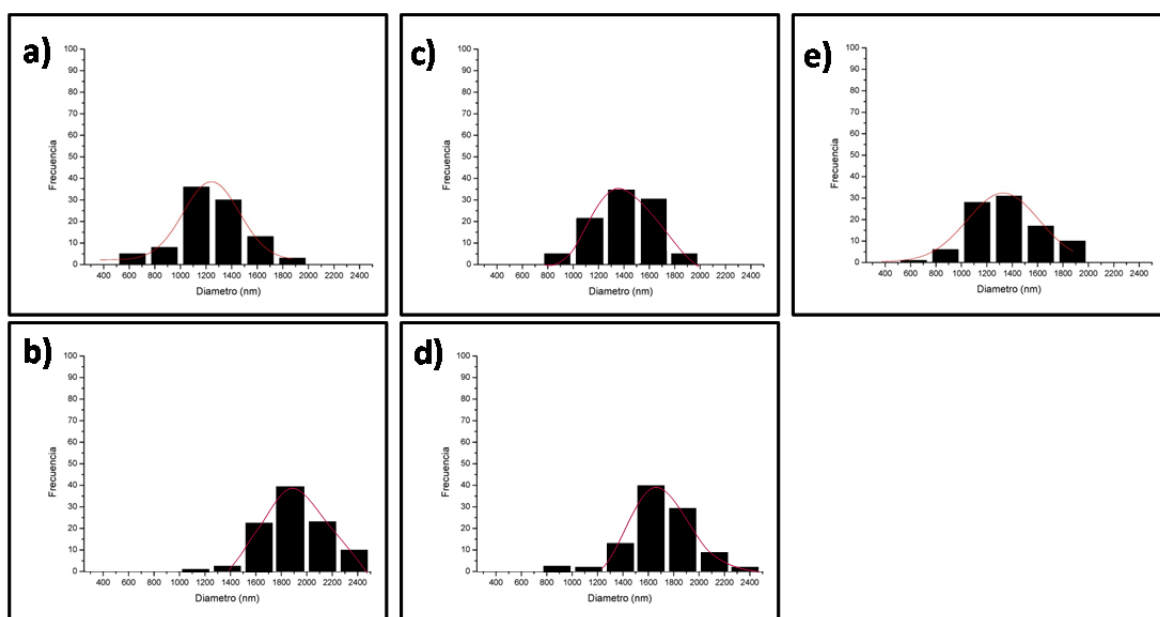


Fig. 6.25 Distribución de los diámetros de las fibras coaxiales PLA/PEG (cubierta/núcleo): E14,4 (a), E14,4w (b), E17,3 (c), E17,3w (d), E24,2 (e), E24,2w (f)

En general, se puede apreciar que la distribución de los diámetros se mantiene unimodal. Por otro lado, en las muestras E14,4 y E17,3 se observa que el diámetro de las fibras después de ser sumergidas en agua aumenta. No se ha podido medir el diámetro de las fibras de la muestra E24,2 después de la inmersión en agua debido a su morfología de fibras abiertas.

6.3.3. Análisis de fibras mediante FTIR

Para verificar la composición de PLA y PEG de las matrices de fibras coaxiales cargadas con bacterias, se ha procedido a hacer un análisis FTIR de las diferentes matrices. Este análisis se ha realizado de las matrices cargadas con bacterias, de estas mismas pero incubadas en agua y por último de las matrices expuestas a rayos UV.

En la Fig. 6.26, se representa la comparativa de los espectros del PLA y del PEG.

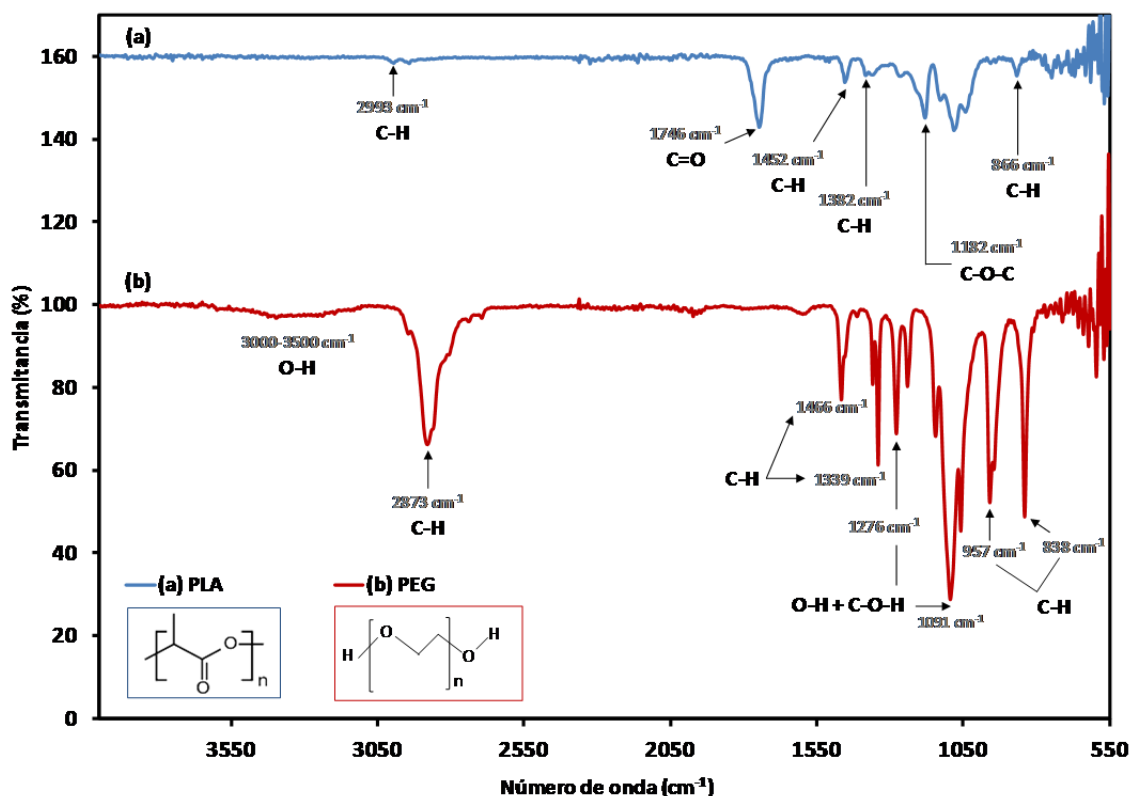


Fig. 6.26 FTIR del PLA y PEG comercial: PLA (a) y PEG (b)

Por un lado, el espectro del PLA (Fig 6.26a) contiene bandas de absorción características entre 2800-3000, 1300-1500 y 866 cm^{-1} , que pueden ser asignadas a los grupos metileno (estiramiento y vibraciones de deformación, respectivamente). Además, presenta una banda fuerte y aguda a 1746 cm^{-1} debido al grupo C=O. Finalmente, la banda a 1182 cm^{-1} se puede atribuir al grupo C-O-C.

Por otro lado, el espectro del PEG (Fig 6.26b) presenta una banda ancha no muy pronunciada entre 3000 y 3500 cm^{-1} , que corresponde al grupo hidroxilo. Además, contiene bandas de metileno a 2873, 1466, 1339, 957 y 838 cm^{-1} (de estiramiento y deformación). Finalmente, la banda intensa a 1091 cm^{-1} corresponde al grupo éter.

Una vez se han descrito las bandas del PLA y del PEG, se ha procedido a analizar mediante FTIR cada matriz, para determinar su composición cualitativa. Mediante este análisis se podrán observar los posibles cambios de la matriz al incubarla en agua y al exponerla a radiación UV (las matrices tratadas con UV se denotan con las letras UV al final; p.e., E14,4 UV, E17,3 UV y E24,2 UV).

Por un lado, en la Fig. 6.27 se han analizado los espectros de la matriz E14,4 y se han comparado con el espectro FTIR del PLA y del PEG.

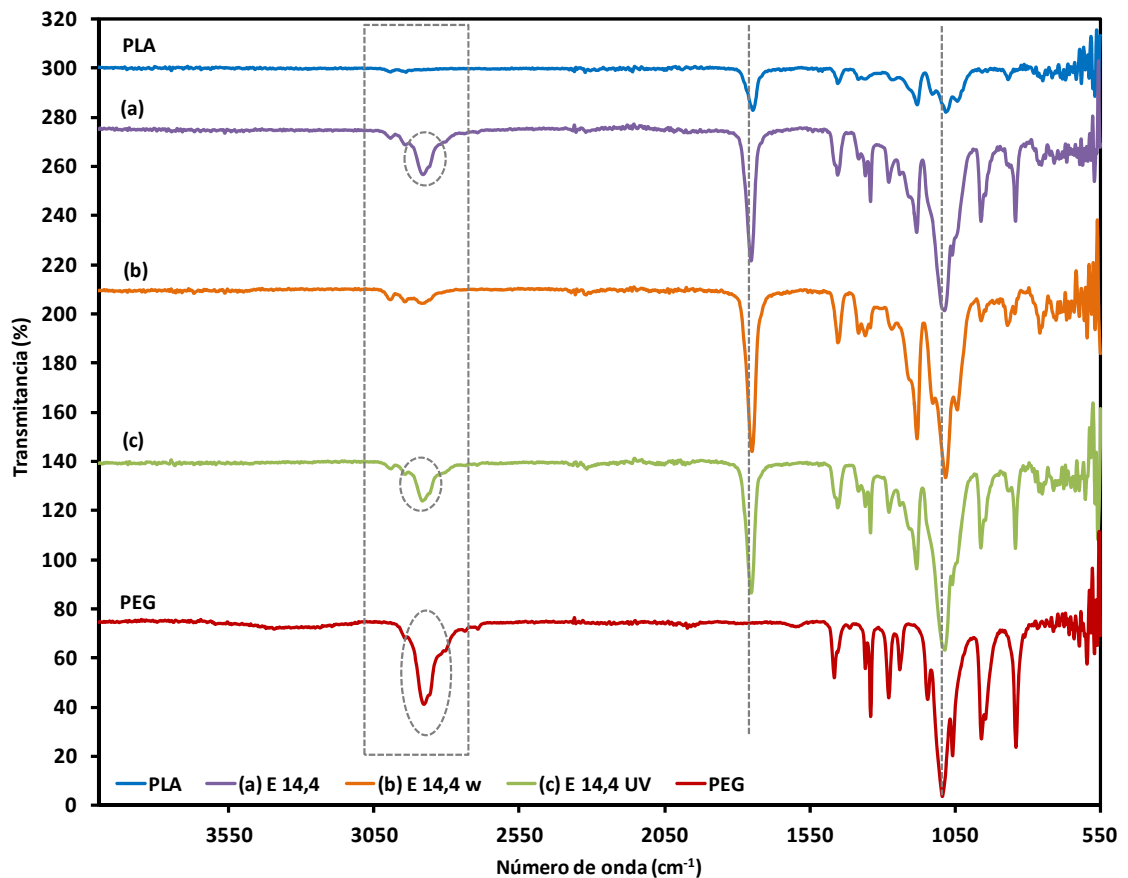


Fig. 6.27 Espectros FTIR de las matrices cargadas con bacterias: E14,4 (a), E14,4w (b), E14,4UV(c)

El espectro de la matriz E14,4 (Fig 6.27a) contiene las bandas características del PLA y del PEG. Por lo tanto, se puede afirmar que la matriz cargada con bacterias contiene PLA y PEG en sus matrices. Sin embargo, no se puede afirmar donde se encuentra el PEG y el PLA.

En espectro de la matriz E14,4 w (Fig 6.27b) se aprecia una cierta evolución, a tener solo las bandas características del PLA. Se observa como se ha perdido la banda del metileno

(2873, 1466, 1339, 957 y 838 cm^{-1}) además de la banda intensa (1091 cm^{-1}) que corresponde al grupo éter. Teniendo en cuenta lo descrito, se puede afirmar que durante la inmersión en agua se ha redissuelto el PEG. En cuanto a la matriz E14,4 UV (Fig 6.27c), de igual modo de que la matriz E14,4(a), se aprecia que su espectro contiene las bandas características del PLA y del PEG. Por lo tanto, se puede afirmar que esta matriz no ha perdido sus características químicas por acción de los rayos UV.

A continuación, en la Fig. 6.28 se muestran los espectros para la matriz E17,7. Como se puede observar, este caso es muy similar al anterior. Las matrices E17,7 (a) y E17,7UV (c) presentan tanto las bandas del PLA como del PEG, mientras que la matriz E17,7 w (b) presentan solo las del PLA.

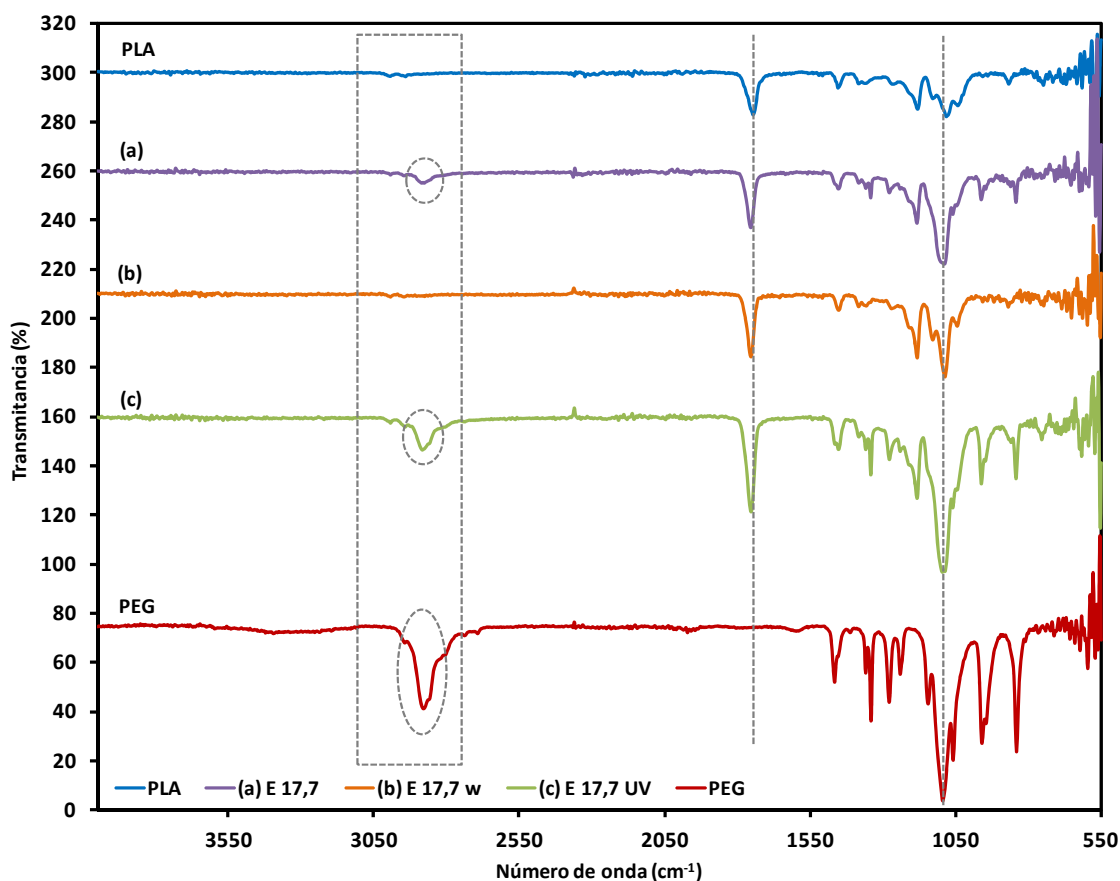


Fig. 6.28 Espectros FTIR de las matrices cargadas con bacterias: E17,7 (a), E17,7w (b), E17,7UV (c)

Finalmente, en la Fig 6.29a se muestran los espectros para la matriz E24,4. Se puede observar que se repite el mismo comportamiento que se ha observado para las otras dos matrices.

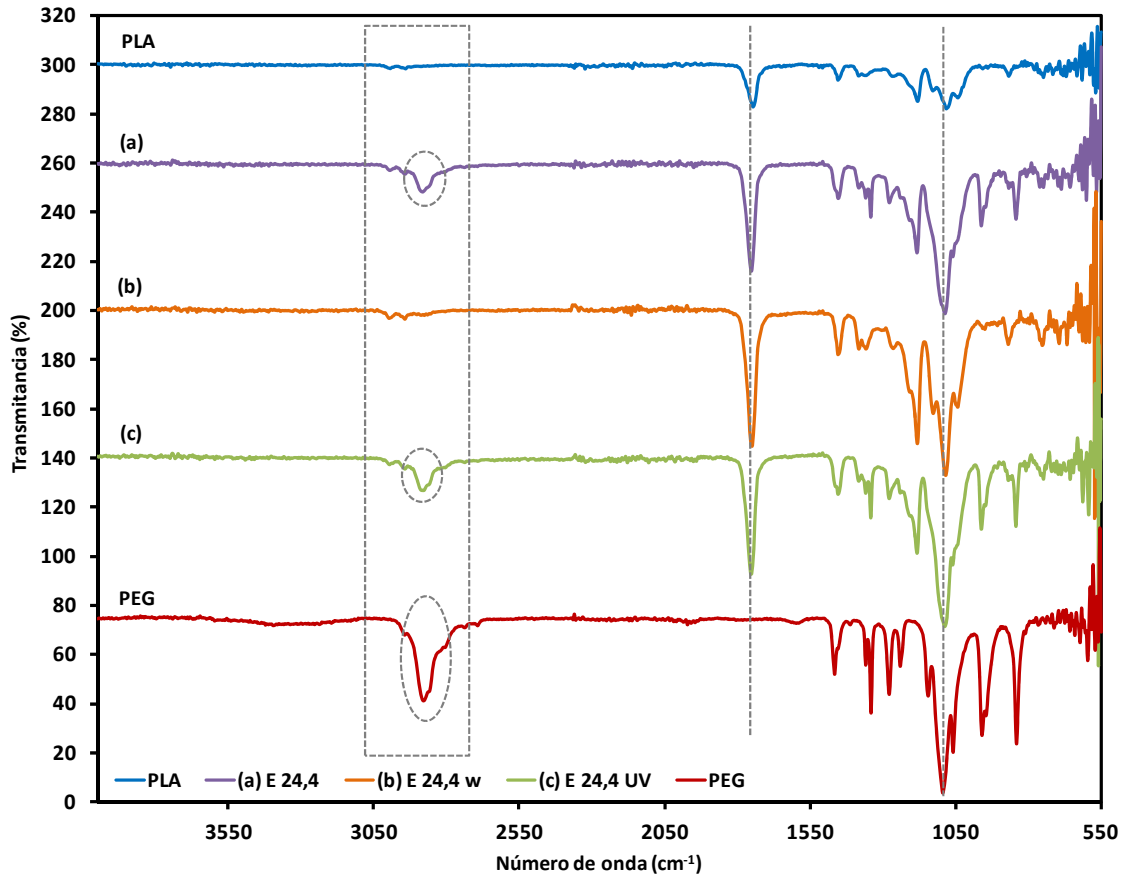


Fig. 6.29 Espectros FTIR de las matrices cargadas con bacterias: E24,4 (a), E24,4w (b), E24,4UV(c)

Adicionalmente, se realizaron los FTIR de las muestras de fibras coaxiales cargadas con *E.coli* con la finalidad de observar la banda de las amidas que corresponde a las proteínas de la bacteria. Sin embargo el límite de detección del equipo de FTIR no ha permitido hacer la detección de estas señales. A parte de ello, se puede observar para las tres muestras dos puntos:

- El PEG es redissuelto después de sumergir las matrices en agua.
- La radiación UV no afecta la composición química de las matrices de fibras coaxiales cargadas con *E.coli*.

6.4. Ensayos biológicos

6.4.1. Viabilidad de las bacterias cargadas

En la Fig 6.30 se muestran los resultados de la viabilidad de las bacterias recuperadas desde la matriz. Para esto, se ensayaron dos condiciones para la recuperación de las bacterias a partir de las fibras cargadas. Las matrices de fibras coaxiales fueron pesadas y resuspendidas en el medio de cultivo BHI, y adicionalmente a un grupo de ellas se las trató aplicándoles ultrasonidos para asegurar la destrucción de las fibras. Luego los cultivos fueron mantenidos a 37 °C durante 24 h en agitación. El crecimiento de las bacterias fue cuantificado por la medida de la absorbancia. Los resultados muestran que el número de bacterias recuperadas fue similar con ambos procedimientos, es decir por simple redisolución del PEG en el medio de cultivo y adicionalmente aplicando ultrasonidos.

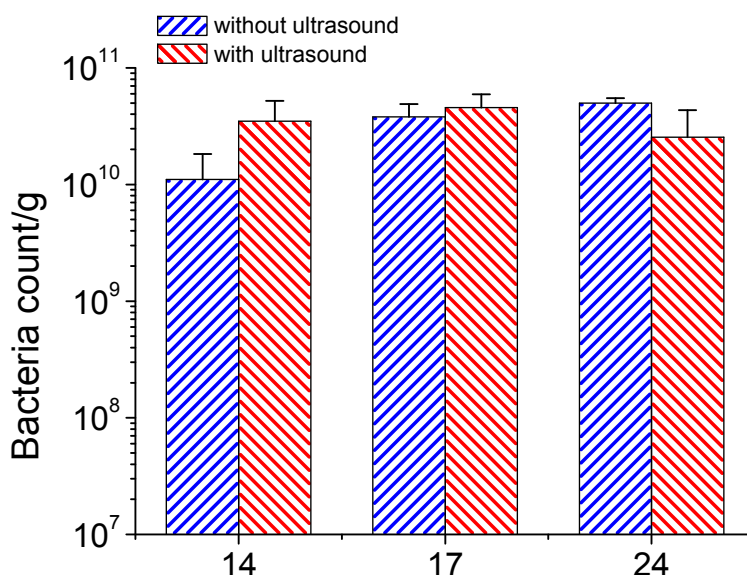


Fig. 6.30 Número de bacterias recuperadas desde las matrices de fibras coaxiales de PLA/PEG. Las matrices ensayadas corresponden a las fibras E14,4, E17,3 y E24,2

6.4.2. Efecto de la luz UV

Las matrices cargadas con bacterias fueron expuestas durante diferentes períodos de tiempo a radiación ultravioleta (UV) de longitud de onda de 254 nm. Esta radiación tiene actividad bactericida y los períodos de exposición fueron cortos en el rango de 30-90 min o prolongado durante 24 horas. El objetivo de este ensayo fue determinar si las bacterias cargadas en el núcleo de las fibras coaxiales quedan protegidas de los efectos adversos

físicos como puede ser la exposición a luz UV. Dicha protección debería esta conferida por la cubierta de PLA en la fibra coaxial. En la Fig 6.31 se muestran los resultados de estos ensayos, Las matrices secas fueron expuestas a la radiación durante el tiempo indicado y luego se añade el medio de cultivo para redissolver el PEG y se mantiene durante 24 horas en condiciones de crecimiento bacteriano para cuantificar las bacterias recuperadas. Los resultados claramente indican que las tres matrices cargadas con *E.coli* (matriz E14,4; E17,3 y E24,2) ofrecen la misma protección a las bacterias frente a la radiación de la luz UV. Los niveles de crecimiento fueron similares tanto para la exposición a la radiación a tiempos cortos y prolongados. Esto estaría de acuerdo con los espectros FTIR analizados (ver sección 6.3.3) donde se observa que la exposición de la luz UV no afecta a los principales grupos funcionales del PLA/PEG en las fibras coaxiales. Finalmente, esto demuestra que la fibra coaxial no solo permite la carga de bacterias en su núcleo sino que también confiere protección a las bacterias cargadas.

6.4.3. Efecto del tiempo de almacenamiento

Para estudiar la viabilidad de las bacterias cargadas en las fibras coaxiales PLA/PEG a lo largo, las matrices fueron conservadas de manera seca y fueron evaluadas a los 15, 30 y 45 días de conservación. Los resultados de este ensayo se muestran en la Fig 6.32 y se puede observar que al menos durante los primeros 45 días de almacenamiento de las matrices de fibras coaxiales, el número de bacterias recuperadas fue similar en todos los casos. Sin embargo, una ligera disminución no significativa fue observada en el tiempo. Por esta razón, podría ser aconsejable que este experimento de estabilidad de la carga bacteriana en el núcleo de la fibra coaxial sea prolongado a mayor tiempo de conservación de las matrices.

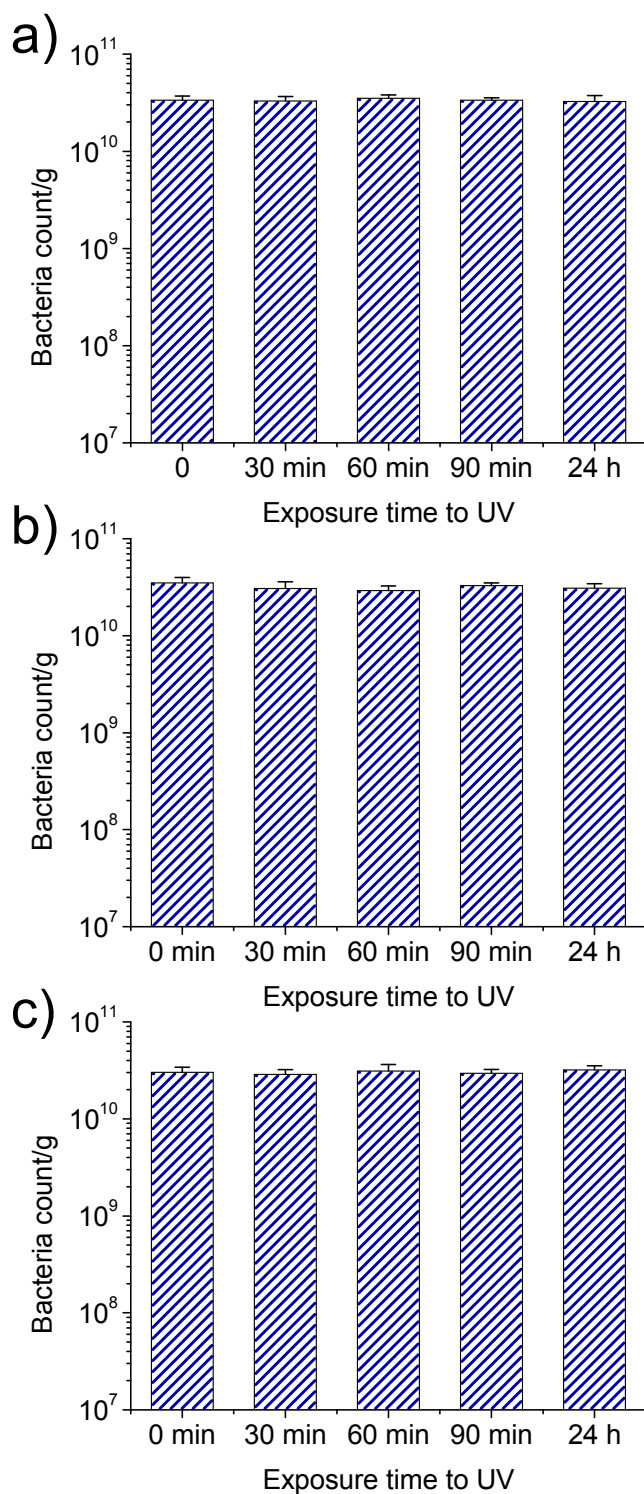


Fig. 6.31 Número de bacterias recuperadas desde las matrices de fibras coaxiales de PLA/PEG expuestas a radiación ultravioleta. Las matrices ensayadas corresponden a las fibras E14,4 (a), E17,3 (b), y E24,2 (c).

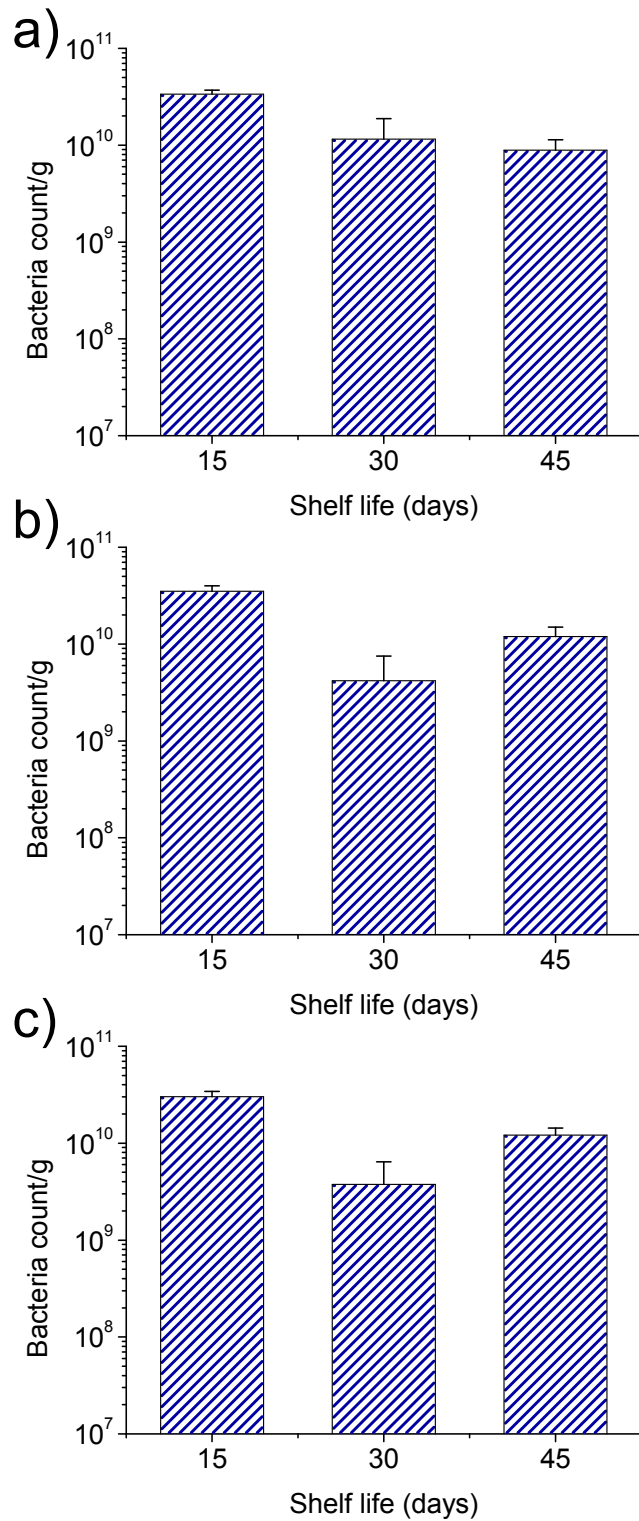


Fig. 6.32 Número de bacterias recuperadas desde las matrices de fibras coaxiales de PLA/PEG conservadas durante diferentes tiempos. Las matrices ensayadas corresponden a las fibras E14,4 (a), E17,3 (b), y E24,2 (c).

7. Impacto ambiental

Los objetivos de este apartado son los de identificar qué tipo de efectos puede tener el desarrollo de este proyecto para la salud y el medio ambiente. Para ello, se han considerado los distintos productos químicos que se emplean en la parte experimental del proyecto con la idea de evaluar qué efectos adversos pueden tener.

Las fichas de seguridad recogen la información necesaria sobre éstos productos, mayormente en forma de códigos que informan al usuario sobre el tipo de peligro al que pueden estar sometidos tras una manipulación incorrecta.

También se ha tenido en cuenta el sistema de recogida de éstos productos una vez utilizados para poder llevar a cabo una gestión correcta de los mismos, así como el ciclo de vida de los polímeros que se han utilizado.

Para la elaboración de este estudio, se ha trabajado con reactivos que pueden ser potencialmente peligrosos (mayormente disolventes) y que deben manipularse con especial cuidado. Para ello se ha utilizado el reglamento (CE) nº 1272/2008 y las directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE, de este modo se han conocido los riesgos de la salud y medioambientales que conllevan. En las Tabla 7.1 y Tabla 7.2 se muestran la clase de sustancias peligrosas, sus indicaciones, pictogramas y sus Hazard Statement.

Tabla 7.1 Clase, indicaciones y pictogramas de las sustancias químicas utilizadas en el PFC.




Substancia química	Clase de peligro	Pictogramas
Acetona	H225, H319, H336,EUH066	
Cloroformo	H302+H332, H315, H319, H336, H351,H361d, H373	
Etanol	H225	

Tabla 7.2 Significado de los Hazard Statements referentes a las sustancias utilizadas.

Statements	Clase de peligro
EUH066	La exposición repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel.
H225	Líquidos inflamables.
H302	Nocivo en caso de ingestión
H315	Provoca irritación cutánea
H319	Irritación ocular grave.
H332	Nocivo en caso de inhalación
H335	Puede irritar las vías respiratorias
H336	Puede provocar somnolencia o vértigo.
H341	Se sospecha que provoca defectos genéticos
H351	Se sospecha que provoca cáncer
H361d	Se sospecha que daña al feto
H373	Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas

A lo largo de éste proyecto se ha trabajado con polímeros biodegradables, por lo que el ciclo de vida de éste tipo de materiales no va a tener consecuencias graves para el medio ambiente. Según indica la *Directiva 67/548/CEE*, se trata de sustancias no nocivas para el medio ambiente.

La empresa ECOCAT, en colaboración con el Centro de Sostenibilidad Territorial, se encarga de la gestión de los residuos que se generan en el laboratorio de la ETSEIB. Existen unos contenedores específicos donde deben depositarse estas sustancias una vez utilizadas en el laboratorio para poder proceder a su tratamiento y evitar la contaminación del medio ambiente. Se trata de envases fabricados en polietileno de alta densidad, y en el caso de este proyecto, se destina uno para sustancias halogenadas, otro para no halogenadas y otro para residuos biológicos peligrosos.

8. Evaluación económica

La evaluación económica es muy importante y necesaria para poder tomar decisiones respecto la viabilidad del proyecto.

Para evaluar el coste global de la realización del proyecto, lo dividiremos en cuatro partes diferenciadas:

1. Coste de disolventes y productos químicos, necesarios para la elaboración de las fibras, los medios de liberación (tampón), para la extracción de PEG de las fibras, y el estudio bacteriano. Los precios de estos disolventes, así como de los productos químicos requeridos, se han obtenido de los catálogos de las empresas suministradoras, tales como *Aldrich*, *Fluka*, etc. Estos costes se recogen en la tabla Tabla 8.1

Tabla 8.1 Coste disolvente y productos químicos (PQ)

Coste de disolventes y PQ		
Disolvetes	Cantidad	Total €
Agua	1l	2,23
Acetona	1l	9,41
Cloroformo	1l	80,7
Productos químicos (PQ)	Cantidad	
PEG 10000	1Kg	29,8
PEG 35000	1Kg	45,4
PLA	1Kg	75
NaCl	5g	0,69
Subtotal PQ		243,23
Otros (+10%)		24,323
TOTAL		267,55

El coste total de los disolvente y productos químico es de 267,55 €.

2. El coste personal para la elaboración del proyecto teniendo en cuenta las horas dedicadas a cada parte del proyecto se expresa en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2 Coste personal

Coste personal			
Actividad	Cantidad	Precio (€/h)	Total (€)
Estudio previo y documentación	125	10	1250
Experimentación	775	15	11625
Análisis de resultados	250	20	5000
TOTAL			17875

El coste personal total del proyecto es de 17875 €.

- Coste de equipos, teniendo en cuenta su amortización, el número de usuarios que comparte el aparato, un interés anual del 4% y la duración del PFC (10 meses).

Tabla 8.3 Coste de equipos

Coste de equipos				
Aparato	Precio (€)	Amortización (años)	Usuarios	Total (€)
Electrospinning	3000	5	7	71,51
Aguja coaxial	3245	5	1	541,48
MO	10000	10	7	119,31
Cámara digital MO	5400	5	7	128,73
SEM	210000	20	10	878,68
Equipo FITR	24725	10	12	172,08
Lector ELISA	3440	5	10	57,4
Sonicador	2500	5	5	65,32
Total				2034,51

El coste de equipos total es de 2034,51 €.

- Otros costes como los suministros de luz, agua y climatización calculados como un 10% del presupuesto de actividad (Tabla 8.4). Otros costes como posibles imprevistos y el coste operacional del laboratorio (overhead) considerados como un 3% y un 21% del presupuesto total respectivamente. Todos estos costes adicionales se muestran en la Tabla 8.5, conjuntamente con el presupuesto final del proyecto.

Tabla 8.4 Presupuesto de actividad

Presupuesto de actividad	
	Total (€)
Coste de disolventes y PQ	267,53
Coste de personal	17875
Coste de equipos	2034,51
TOTAL	20177,04

El total del presupuesto de actividad es de 20177,04 €.

Tabla 8.5 Presupuesto del proyecto

Presupuesto del proyecto	
	Total (€)
Presupuesto actividad	20177,04
Suministros (10% PA)	2017,70
Subtotal PFC	22194,74
Imprevistos (3% subtotal PFC)	665,84
Coste operacional (21% subtotal PFC)	4660,90
TOTAL	27521,48

Finalmente, el presupuesto total de este proyecto asciende a 27521,48 €.

Conclusiones

El objetivo principal de este trabajo es obtener fibras coaxiales estructuradas con un núcleo (core) de polietilenglicol y una cubierta (shell) de ácido poliláctico, para ello se han establecido las condiciones óptimas, variando los parámetros operacionales para el electrohilado coaxial. Los experimentos para obtener las fibras coaxiales fueron realizados bajo un diseño experimental de tipo factorial $3 \times 2^{2^2}$, donde se ha variado el solvente del PEG (agua o NaCl), el peso molecular del PEG (10KDa o 35KDa), la concentración del PEG (200mg/ml o 400mg/ml) y la concentración en peso del PLA (2,5%, 5% o 7,5%). Las fibras obtenidas fueron seleccionadas inicialmente por su morfología observada por microscopía óptica, luego el análisis de los ángulos de contacto de la superficie de las matrices de fibras y la pérdida de peso después de redissolver el PEG en agua fueron los criterios iniciales para seleccionar las fibras coaxiales para su posterior estudio por microscopía SEM para establecer detalles morfológicos y distribución homogénea en el diámetro de las fibras. Una vez establecidos los experimentos con parámetros operacionales óptimos para producir fibras coaxiales PLA/PEG, bajo estas condiciones se prepararon fibras coaxiales con el núcleo de PEG cargado con la bacteria *Escherichia coli* como modelo de sistema biológico. Finalmente, en las fibras cargadas se ha determinado la viabilidad de las bacterias recuperadas y las ventajas que ofrece esta forma de encapsulamiento de bacterias en cuanto a la protección frente a agentes físicos como la luz UV y la conservación de las fibras en el tiempo.

Las conclusiones extraídas tras la realización del proyecto se exponen a continuación:

1. Se ha conseguido optimizar la técnica de electrospinning para obtener fibras coaxiales a partir de disoluciones poliméricas de PLA y PEG distribuidos en la cubierta y núcleo de las fibras, respectivamente.
2. Se ha observado que los diferentes parámetros que intervienen en las propiedades de la solución polimérica influyen en la preparación de las fibras coaxiales:
 - a. Las disoluciones con concentración baja de PLA no permiten obtener fibras coaxiales.
 - b. Se obtienen fibras coaxiales con PEG de alto y bajo peso molecular. Pero, se han de establecer los parámetros operacionales adecuados para cada caso.
 - c. Se obtiene fibras coaxiales con alta y baja concentración de PEG.
 - d. La carga de la disolución del núcleo de la fibra coaxial tiene influencia en la preparación final de la fibra coaxial. Esto se ha demostrado añadiendo NaCl a la disolución de PEG.

- e. Finalmente en el sistema PLA/PEG, el mejor sistema de solventes fue cloroformo: acetona (2v:1v) para el PLA, y PEG en agua.
3. La caracterización superficial de las matrices de fibras mediante la medida de los ángulos de contacto permite determinar la hidrofobicidad de la superficie de las matrices de fibras. A partir de esta técnica, se ha demostrado que el PLA se encuentra en la cubierta y el PEG en el núcleo de la fibra.
 4. Se ha obtenido fibras coaxiales que no disminuyen de peso después de incubar la matriz con agua para redissolver el PEG, demostrando que la cubierta de PLA es un aislante para poner en contacto el núcleo de PEG con su solvente. Adicionalmente, las imágenes del SEM, han demostrado que las matrices después de ser incubadas en agua no sufren grandes cambios morfológicos, en algunas condiciones la fibra coaxial mantiene su forma tubular, en otras puede cambiar a una morfología plana debido al vaciado de su contenido.
 5. Se han obtenido fibras coaxiales de PLA/PEG con una distribución homogénea de su diámetro de fibras. Estas matrices corresponden a fibras coaxiales en la escala de microfibras.
 6. Finalmente, las fibras coaxiales PLA/PEG pueden ser cargadas en su núcleo de PEG con sistemas biológicos, tal como se ha realizado con la bacteria *E.coli*. La fibra coaxial obtenida podría conferir a la bacteria una fácil recuperación por redisolución del PEG, protección a agentes físicos como la radiación UV (protección basada en la cubierta de PLA), y conservación viable por tiempo prolongado (p.e., 30 y 45 días).

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mis tutores el Dr. Luís Javier del Valle y el Dr. Jordi Puiggali, todos los conocimientos que me han transmitido, su paciencia, su motivación y el buen rollo. Sin ellos la realización de este proyecto no habría sido posible.

También quisiera agradecer a todo el equipo del Laboratorio de Ingeniería Química (pabellón G) por la ayuda prestada.

Por otro lado, agradecer a mis compañeros de trabajo por el apoyo ofrecido durante estos meses. También agradecer a todos mis amigos.

Especialmente quisiera darle las gracias a mi novia Alba, por estar a mi lado en todo momento, por la ayuda y por los ánimos ofrecidos a lo largo del proyecto.

Por último, a las personas más importantes del mundo, mi familia. Gracias a mis abuelos por las bendiciones, cariños, alegrías que me han ofrecido a lo largo de la vida y por todos esos platos tan exquisitos que me han dado fuerzas para continuar adelante. A mi madre y a mi padre por todos los esfuerzos que han realizado para que pueda ser una persona de provecho y poder llegar a decir soy ingeniero químico, además de todas las alegrías compartidas con ellos y la actitud tan positiva que me han brindado siempre. A mi hermana por todo lo que ha hecho desde pequeña, por cuidarme, mimarme, prepararme para la vida, por ser tal y como es, por ser un ejemplo a seguir como persona y por ser mi sister, una campeona. También darle gracias a toda la familia en Colombia, a mis abuelos, tíos y primos, porque para ir a un lugar no puedes olvidar de dónde vienes. Gracias por todo, este proyecto os lo dedico a todos vosotros.

Bibliografía

- [1] PUIGGALÍ J. Estructura y propiedades de los polímeros. CPDA, ETSEIB: 2009.
- [2] LÓPEZ CARRASQUERO F, fundamentos de polímeros. VI escuela venezolana para la enseñanza de la química, Edición 2004, p. 4-6
- [3] JORDI PUIGGALÍ BELLALTA, Apuntes de “estructura y propiedades de los polímeros”, “física de polímeros”. p. 15-16
- [4] DAVID ARADILLA ZAPATA, RAMÓN OLIVER PUJOL, FRANCESC ESTRANY CODA, Polímeros biodegradables: una alternativa de futuro a la sostenibilidad del medio ambiente, marzo 2012.
- [5] CHANDRA R., RUSTGI R. Biodegradable Polymers. Progress in Polymer Science. 1998, Vol. 23, p.1273-1335
- [6] M.BELTRAN y A.MARCILLA, Tecnología de polímeros. Tema 1. Estructura y propiedades de los polímeros.
- [7] ARADILLA ZAPATA D., OLIVER PUJOL R., ESTRANY CODA F., Polímeros biodegradables: una alternativa de futuro a la sostenibilidad del medio ambiente. Técnica Industrial. 2012, Vol. 297, p. 76-80
- [8] JUAN NICOLÁS BORBÓN PIRA, Apuntes de “Polímeros degradables, Universidad Cooperativa de Colombia, Especialización en docencia universitaria
- [9] SÁEZ MORALES, ARIEL EDUARDO, Modificación de las propiedades del ácido Poliláctico (PLA), abril 2013, p. 13-17
- [10] CALMON-DECRIAUD A., BELLON-MAUREL V., IVESTRE F. Standard Methods for Testing Aerobic Biodegradation of Polymeric, Review and Perspectives. Advances. Polymer Science. 1998, Vol. 135, p. 29-32
- [11] REN, J. Biodegradable Poly(Lactic Acid). Synthesis, modification, processing and applications. Shanghai, Springer 2010.

- [12] LANGFORD J. I, WILSON A. J. C. Scherrer after sixty years: A survey and some new results in the determination of crystallite size. *Journal of Applied Crystallography*. 1978, Vol.11 (2), p. 102-113
- [13] CHO T-Y., STROBL G., Temperature dependent variations in the lamellar structure of poly(L-lactide). *Polymer*. 2006, Vol. 47 (4), p. 1036-1043
- [14] SILL T.J., VON RECUM H.A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, Mayo 2008, 29 (13), p. 1989-2006
- [15] PIELICHOWSKI K., FLEJTUJCH K. Differential Scanning Calorimetry Studies on Poly(ethylene Glycol) with Different Molecular Weights for Thermal Energy Storage Materials. *Polymers for Advanced Technologies*. 2002, Vol. 13, p. 690-696
- [16] PTITSYNA N.V., OVSYANNIKOVA S.V., GEL'FER TS.M., KAZANSKII K.S. Synthesis of Polyethylene glycols of molecular weight above 10000 by anionic polymerization. *Polymer Science U.S.S.R.* 1980, Vol. 22 n°11, p. 2779-2786
- [17] KNOP K., HOOGENBOOM R., FISCHER D., SCHUBERT S.U. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potencial Alternatives. *Angewandte Chemie*. 2010, Vol. 49, p. 6288-6308
- [18] RODRIGUEZ, M. Polietilenglicol(PEG), tecnologia de los plasticos, junio 2013
- [19] KHON J., LANGER R., *Biomaterials Science*. New York (B. Ratner et al), Vol. 64, 1996.
- [20] HAYASHI T., *Prog. Polym Sci.* 19, 1994, p. 663.
- [21] TIPTON A.J., MIDDLETON J.C., *Biomaterials*. 21, 2000 p. 23-35.
- [22] KHON J., PACHENCE J.M., *Principles of tissue engineering*. New York, Academic Press : (R. Lanza et al), 1997. p. 273.
- [23] BOGNITZKI M., CZADO W., FRESE T., SCHAPER A., HELLWIG M., STEINHART M. Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Advanced Materials*, 2001, Vol. 13, p. 70-72
- [24] BHARDWAJ N., KUNDU C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 2010, Vol. 28, p. 325-347
- [25] WANG ZG., WAN L.S., LIU Z., Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers. *Journal of molecular catalysis b-enzymatic*. Vol. 56, 2009, p. 189-195.

- [26] ROYO RAMOS M, Matrices de copoliésteres derivados de los ácidos azelaico y pimélico, junio 2011
- [27] Li D, Xia Y "Direct Fabrication of Composite and Ceramic Hollow Nanofibers by Electrospinning," *Nano Lett.*, 4, 933 (2004)
- [28] Zhang YZ, Venugopal J, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S "Characterization of the Surface Biocompatibility of the Electrospun PCI–Collagen Nanofibers Using Fibroblasts," *Biomacromolecules*, 6, 2583 (2005)
- [29] SUN Z., ZUSSMAN E., YARIN L.A., WENDORFF H.J., GREINER A. Compound Core-Shell Polymer Nanofibers by Co-Electrospinning. *Advanced Materials*. 2003, Vol.15 n°22, p. 1929-1932
- [30] HAN D., STECKL A.J., Superhydrophobic and Oleophobic Fibers by Coaxial Electrospinning. *Langmuir*. 2009, Vol. 25 n°16, p. 9454-9462
- [31] Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, Lim TC, Ma Z "An Introduction to Electrospinning and Nanofibers", National University of Singapore, (2005)
- [32] Sill TJ, Von Recum HA "Electrospinning: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering," *Biomaterials*, 29, 1989 (2008)
- [33] Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan NC "The Effect of Processing Variables on the Morphology of Electrospun Nanofibers and Textiles", *Polymer*, 42, 261 (2001)
- [34] Doshi J, Reneker DH "Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers", *J. Electrostatics*, 35, 151 (1995)
- [35] Fong H, Chung I, Reneker DH "Beaded Nanofibers Formed During Electrospinning", *Polymer*, 40, 4585 (1999)
- [36] Barakat NAM, Kanjwal MA, Sheikh FA, Kim HY "Spider–Net within the N6, Pva and Pu Electrospun Nanofiber Mats Using Salt Addition: Novel Strategy in the Electrospinning Process", *Polymer*, 50, 4389 (2009)
- [37] Bhardwaj N, Kundu SC "Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique," *Biotechnol. Adv*, 28, 325 (2010)
- [38] Ohkawa K, Kim H, Lee K, Yamamoto H "Electrospun Non–Woven Fabrics of Poly(ϵ –Caprolactone) and Their Biodegradation by Pure Cultures of Soil Filamentous Fungi," *Macromolecular Symposia*, 216, 301 (2004)

- [39] Sencadas V, Correia DM, Areias A, Botelho G, Fonseca AM, Neves IC, Gomez Ribelles JL, Lanceros Mendez S "Determination of the Parameters Affecting Electrospun Chitosan Fiber Size Distribution and Morphology," *Carbohydr. Polym*, 87, 1295 (2012)
- [40] Demir MM, Yilgor I, Yilgor E, Erman B "Electrospinning of Polyurethane Fibers," *Polymer*, 43, 3303 (2002)
- [41] Lee JS, Choi KH, Ghim HD, Kim SS, Chun DH, Kim HY, Lyoo WS "Role of Molecular Weight of Atactic Poly(Vinyl Alcohol) (Pva) in the Structure and Properties of Pva Nanofabric Prepared by Electrospinning", *J. Appl. Polym. Sci*, 93, 1638 (2004)
- [42] Ribeiro C, Sencadas V, Gómez Ribelles JL, Lanceros-Méndez S "Influence of Processing Conditions on Polymorphism and Nanofiber Morphology of Electroactive Poly(Vinylidene Fluoride) Electrospun Membranes.," *Soft Materials*, 8, 274 (2010)
- [43] Yuan X, Zhang Y, Dong C, Sheng J "Morphology of Ultrafine Polysulfone Fibers Prepared by Electrospinning", *Polym. Int*, 53, 1704 (2004)
- [44] Zong X, Kim K, Fang D, Ran S, Hsiao BS, Chu B "Structure and Process Relationship of Electrospun Bioabsorbable Nanofiber Membranes," *Polymer*, 43 4403 (2002)
- [45] Li D, Wang Y, Xia Y "Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays.," *Nano Lett.*, 3, 1167 (2003)
- [46] Ki CS, Baek DH, Gang KD, Lee KH, Um IC, Park YH "Characterization of Gelatin Nanofiber Prepared from Gelatin-Formic Acid Solution," *Polymer*, 46, 5094 (2005)
- [47] Kang H, Zhu Y, Jing Y, Yang X, Li C "Fabrication and Electrochemical Property of Ag-Doped Sio2 Nanostructured Ribbons," *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 356, 120 (2010)
- [48] Casper CL, Stephens JS, Tassi NG, Chase BD, Rabolt JF "Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process," *Macromolecules*, 37, 573 (2004)
- [49] Bognitzki M, Czado W, Frese T, Schaper A, Hellwig M, Steinhart M, Greiner A, Wendorff JH "Nanostructured Fibers Via Electrospinning," *Adv. Mater*, 13, 70 (2001)
- [50] BURGER C., HSIAO B.S., CHU B. Nanofibrous materials and their applications. *Annual Review Materials Research*. 2006, Vol. 36, p. 333-368
- [51] FRENOT A., CHRONAKIS I.S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2003, Vol. 8, p. 64-65

- [52] BHARDWAJ N., KUNDU C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 2010, Vol. 28, p. 325-347
- [53] AGARWAL S., WENDORFF H.J., GREINER A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*. 2008, Vol.49, p. 5603-5621
- [54] BUCHKO C.J., CHEN L.C., SHEN Y., MARTIN D.C. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*. 1999, Vol. 40, p. 7397-7407
- [55] BUCHKO C.J., KOZLOFF K.M., MARTIN D.C. Surface characterization of porous, biocompatible protein polymer thin films. *Biomaterials*. 2001, Vol. 22, p. 1289-1300
- [56] ZANG Y., LIM C.T., RAMAKRISHNA S., HUANG Z.M. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *Materials in Medicine*. 2005, Vol. 16, p. 933-946
- [57] AGRAWAL C.M., RAY R.B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001, Vol.55 n°2, p.141- 150
- [58] BUSCHLE-DILLER G., COOPER J., XIE Z., WU Y., WALDRUP J., REN X. Release of antibiotics from electrospun bicomponent fibers. *Cellulose*. 2007, Vol.14 n°16, p. 553-562
- [59] YU D.G., WANG X., LI X.Y., CHIAN W., LI Y., LIAO Y.Z., Electrospun biphasic drug release polyvinylpyrrolidone/ethyl cellulose core/sheath nanofibers. *Acta Biomaterialia*. 2013, Vol. 9, p. 5665-5672
- [60] USERO R., SUÁREZ N. Electrospinning de poliésteramidas biodegradables. PFC, Ingeniería Técnica Química, EUETIB, UPC. Julio 2009, p. 21-22
- [61] HUANG Z.-M., HE C.-L., YANG A., ZHANG Y., HAN X.-J., YIN J., WU Q. Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning. *Wiley Periodicals, Inc.* 2005, p. 169-179
- [62] NGUYEN T. T. T., GHOSH C., HWANG S.-G., CHANUNPANICH N., PARK J.S. Porous core/sheath composite nanofibers fabricated by coaxial electrospinning as a potencial mat for drug release system. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, Vol. 439, p. 296-306
- [63] WANG B.-Y., FU S.-Z., NI P.-Y., PENG J.-R., ZHENG L., LUO F., LIU H., QIAN Z.Ý. *Electrospun polylactide/poly(ethylene glycol) hybrid fibrous scaffolds for tissue engineering*. *Society For Biomaterials*. 2011, p. 441-449

- [64] NI P.Y., FU S.Z., FAN M., GUO G., SHI S., PENG J.R., LUO F., QIAN Z.Y. *Preparation of poly(ethylene glycol)/polylactide hybrid fibrous scaffolds for bone tissue engineering*. International Journal of Nanomedicine. 2011, Vol. 6, p. 3065-3075
- [65] XU X., ZHUANG X., CHEN X., WANG X., YANG L., JING X. *Preparation of Core-Sheath Composite Nanofibers by Emulsion Electrospinning*. Macromolecular Rapid Commun. 2006, Vol. 27, p. 1637-1642
- [66] XU X., CHEN X., MA P., WANG X., JING X. *The release behavior of doxorubicin hydrochloride from medicated fibers prepared by emulsion-electrospinning*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2008, Vol. 70, p. 165-170
- [67] WANG C., YAN K.-W., LIN Y.-D., HSIEH H. C. P. *Biodegradable Core/Shell Fibers by Coaxial Electrospinning: Processing, Fiber Characterization, and Its Application in Sustained Drug Release*. Macromolecules. 2010, Vol. 43, p. 6389-6397
- [68] WAKANA S., NAGAI T., SAKATA Y. *Wide bandwidth scanning Kerr microscope based on optical sampling technique using externally triggerable pulse laser diode*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 2001, Vol. 235, p. 213-217
- [69] TECHNICAL STAFF OF MATERIALS EVALUATION AND ENGINEERING. *Handbook Of Analytical Methods For Materials*. United States: 2010, p. 37-40
- [66] WOODWARD R. *Contact angle measurements using the drop shape method*. Porstmouth: physics department of oregon's college of engineer. 1999.
- [67] BUCHKO C. J. [et al.]. *Mechanical properties of biocompatible protein polymer thin films*. Journal of Materials Research. 2000, Vol. 15 (1), p. 231-242
- [68] LIAO T., ADANUR S. *Computerized failure analysis of nonwoven fabrics based on fiber failure criterion*. Textile Research Journal. 1999, Vol. 69 (7), p. 489-496.
- [69] KACURÁKOVÁ M., WILSON H.R. *Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates*. Carbohydrate Polymers. 2001, Vol. 44, p. 291-303