



Universidad de Valladolid



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Mecánica

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**DESARROLLO DE UN EQUIPO  
DE ELECTROSPINNING PARA  
OBTENCIÓN DE NANOFIBRAS  
ALINEADAS DE  
RECOMBINÁMEROS TIPO  
ELASTINA**

Autor:

Calzón Gutiérrez, Adrián

Tutores:

Dr. Rodríguez Cabello, Jose Carlos  
(Física de la Materia Condensada, Cristalografía y Mineralogía)

Dr. González de Torre, Israel  
(Química Analítica)

Junio de 2016



Quiero expresar mi agradecimiento al profesor Rodríguez Cabello y a los compañeros del grupo BioForge por haberme ofrecido la posibilidad de realizar este trabajo en sus instalaciones y por la oportunidad única de entrar en contacto con un ambiente tan enriquecedor para cualquier estudiante.



## Resumen y palabras clave

La ingeniería de tejidos se presenta como una de las áreas de la biotecnología con mayores desafíos para la técnica científica actual y futura. En este enclave se sitúan el tipo de biopolímeros, transicionables en hidrogeles, conocidos como recombinameros tipo elastina (Elastin-Like-RecoMbinamers), que reúnen una serie de características que les permiten mimetizar el comportamiento de esta sustancia presente en numerosos tejidos del cuerpo humano. Sus propiedades también, les confieren la posibilidad de recrear biocompatiblemente la matriz extracelular entre otras diversas posibilidades dentro de este ámbito.

La disposición de estos materiales en nanofibras alineadas, ofrece más posibilidades al material, incrementa su similitud con los tejidos biológicos y favorece la proliferación celular a través de ellos.

En el presente trabajo, se describen los procedimientos experimentales llevados a cabo para desarrollar un equipo de electrospinning o electrohilado para la obtención de nanofibras uniaxialmente dispuestas de polímeros transicionables en hidrogeles tipo elastina, con una breve exposición de los resultados obtenidos.

**Palabras Clave:** Recombinémeros ELRM, Electrospinning, Nanofibras, Elastina, Ingeniería de Tejidos.



## Abstract

Tissue engineering shows itself as one of the most fascinating disciplines where nanobiotechnology is taking part. The current challenges to be overcome in this area, could very likely suppose a cornerstone for the bioscience of the next decades. Inside this settlement, a family of biopolymers with high recombinant capacities, called Elastin Like Recombinamers (ELRMs) appear as a magnificent income for novel studies and projects due to possibilities and characteristics they have in many forms and mainly as hydrogel structures. One of the greatest hallmarks of this materials, is the chance to mimick biostructures that containe natural elastine, like so many tissues in bioorganisms, and also the chances to produce arrays of polymers that could recreate Extra Cellular Matrix.

The present work describes the proceses of experimental modification of an ordinary electrospinning equipment in order to have a device that offers the chance of creating arrays of polymers with significant level of alignment between the fibers that form them. As a culmination, a brief detail of results obtained is showed up.

**Keywords:** Elastin-Like recombinamers (ELRMs), Electrospinning, Fiber Alignment, Elastin, Tissue Engineering.





# Índice

<b>1. Objetivo.</b>	<b>15</b>
<b>2. Biomateriales y definiciones.</b>	<b>16</b>
2.1. Introducción . . . . .	16
2.2. Matriz extracelular . . . . .	17
2.2.1. Andamiajes para matriz extracelular (scaffolds) . . . . .	17
2.3. Recombinámeros tipo Elastina (ELRMs), definición y características. . . . .	19
2.3.1. Aplicaciones biomédicas y biotecnológicas de los ELRMs	20
2.3.2. Hidrogeles . . . . .	21
2.4. Química Click [3]. . . . .	22
2.4.1. Biopolímero HRGD6 . . . . .	23
2.4.2. Biopolímero VKVx24 . . . . .	24
2.4.3. Disolvente . . . . .	25
<b>3. Técnica de Electrospinning o Electrohilado.</b>	<b>25</b>
3.1. Historia del Electrospinning . . . . .	25
3.2. Descripción del proceso . . . . .	27
3.3. Parámetros influyentes en el proceso . . . . .	30
3.4. Electrospinning de Fibras Alineadas . . . . .	37
3.5. Electrospinning Coaxial . . . . .	40
<b>4. Instrumental y Métodos.</b>	<b>42</b>
4.1. Instrumental utilizado . . . . .	42
4.1.1. Bomba de Flujo con regulación de caudal. . . . .	42
4.1.2. Fuente de tensión de alto voltaje . . . . .	43
4.1.3. Jeringuillas . . . . .	43
4.1.4. Tubos capilares portaflujo . . . . .	44
4.1.5. Aguja Simple . . . . .	44
4.1.6. Aguja Coaxial . . . . .	44
4.1.7. Motor Eléctrico . . . . .	45
4.1.8. Higrómetro digital . . . . .	46
4.1.9. Microscopio óptico . . . . .	46
4.2. Metodología . . . . .	47
<b>5. Procedimiento experimental.</b>	<b>48</b>
5.1. Estado Inicial . . . . .	49
5.1.1. Electrodo Puntual . . . . .	49
5.1.2. Resultados para Electrodo Puntual. . . . .	51
5.1.3. Problemáticas observadas para finalidad de alineamiento	52
5.2. Planteamiento Doble Electrodo-Gap . . . . .	54
5.2.1. Variación del tamaño del colector . . . . .	56
5.2.2. Resultados y problemáticas encontradas. . . . .	57
5.3. Planteamiento Colector Rotatorio . . . . .	58
5.3.1. Tubo metálico simple . . . . .	59

5.3.2. Parrilla rotatoria . . . . .	61
5.3.3. Presentación de las muestras . . . . .	63
5.3.4. Test de agua . . . . .	64
5.4. Optimización de resultados. . . . .	65
<b>6. Resultados y discusión.</b>	<b>66</b>
6.1. Defectología y repetibilidad . . . . .	66
6.2. Eliminación de gotas de disolvente. . . . .	67
6.3. Eliminación de Grumos . . . . .	68
6.4. Mejora del alineamiento . . . . .	69
6.5. Eliminación de Perlas . . . . .	70
6.6. Disminución de la densidad . . . . .	72
<b>7. Conclusiones.</b>	<b>73</b>
<b>Referencias</b>	<b>74</b>

## Índice de figuras

1.	Esquema de la matriz extracelular [3]. . . . .	18
2.	Transición térmica de los polímeros tipo elastina: a bajas temperaturas estructura tipo c latrat o de las moléculas del agua alrededor de restos apolares, y a temperaturas elevadas, repliegue en horquilla $\beta$ [25] . . . . .	21
3.	Trifluoroetanol ( $CF_3H_2OH$ ), disolvente utilizado para las disoluciones de polímeros. . . . .	25
4.	Publicaciones anuales sobre electrospinning [1] . . . . .	27
5.	Disposición de un sistema de electrospinning y configuraciones habituales [43] . . . . .	28
6.	a. Formación de Cono de Taylor en la punta de la aguja b. Variaciones del Cono de Taylor con potencial aplicado [55] . . . . .	29
7.	Diferentes fotografías de muestras de fibras proucidad con electrohilado: a. Fibras con grumos, b. Fibras de pequeño diámetro, c. Fibras en un menor orden de magnitud. [45] . . . . .	30
8.	Inestabilidad del chorro eyectado en un proceso de electrospinning [21] . . . . .	37
9.	Colección de fibras alineadas mediante tubo rotatorio [51]. . . . .	38
10.	a. Disposición de electrodos paralelos. b. Distribucion de campo eléctrico [51]. . . . .	39
11.	Disposición «rotating mandrel and wire» [51]. . . . .	39
12.	Disco colector para fbras alineadas y líneas de campo electrostático [51]. . . . .	40
13.	Modificaciones sobre el colector tipo tubo rotatorio[51]. . . . .	41
14.	Electrospinning Coaxial [43] . . . . .	41
15.	Puesto de trabajo para realización de ensayos. . . . .	42
16.	a. Frontal de fuente de tensión de alto voltaje. b. Trasera de la fuente de tensión. c. Bomba de Flujo [3] . . . . .	43
17.	a. Jeringuilla utilizada. b. Tubos capilares [3]. . . . .	44
18.	a. Aguja para electrospinning coaxial [3]. b. Aguja utilizada para ensayo simple. . . . .	45
19.	a y b. Agitador eléctrico utilizado como motor. c. Higrómetro digital. . . . .	46
20.	Microscopio óptico Nikon eclipse 80 i utilizado en las observaciones. . . . .	47
21.	a. Colector tipo electrodo puntual b. Detalle del vidrio colector adherido al electrodo [3] c. Urna de metacrilato. . . . .	50
22.	a y b. Imagenes al microscopio óptico de fibras con bajos defectos, obtenidas mediante electrospinning de electrodo puntual. c. Células adheridas a las fibras a las que se ha aplicado tinción.[12] . . . . .	52
23.	a. Tubos capilares multietapa PTFE del estado inicial. b. Tubos plásticos monoetapa solubles al disolvente 2,2,2 TFE. c. Solución adoptada, material plástico no soluble (Argon Comp PR Line10 in CLR) . . . . .	53

24.	a. Disposición de los elementos del equipo de electrospinning al comienzo [45] b. Configuración después de las modificaciones. . . . .	54
26.	a. Tornillo en u, utilizado para colocar un doble electrodo. b. Vista frontal de las placas paralelas. . . . .	55
25.	aa. Esquema de la configuración. ab. Imágen al microscopio de las fibras obtenidas en el estudio de Dan Li et al. ac. Variación para colectar en dos direcciones perpendiculares [40]. b. Campo eléctrico creado, sección 2.2.1. c. Imagenes al microscopio de resultados de Li et al [40] . . . . .	55
27.	a. Nuevo electrodo de 21 mm de separación. b. Montaje con placas de aluminio. . . . .	56
28.	Fotografías al microscopio de fragmentos de fibras depositadas en el hueco entre electrodos. . . . .	58
29.	Lámina de plástico entre las dos placas colectoras. . . . .	58
30.	a. Colector con tubo rotatorio simple. b. Parrilla rotatoria utilizada cómo segundo. c. Parrilla rotatoria con eje. . . . .	59
31.	a. Tubo metálico simple. b. Parrilla unida a eje para conectar al agitador y escobilla par conexión a tierra. c. Ensayo estático con parrilla desnuda. . . . .	60
32.	a. Muestras de electrospray. b. Esquema de electrospray [23] . . . . .	61
33.	a. Fibras depositadas en la superficie de la parrilla. . . . .	63
34.	a. Muestras para colección de fibras. De izq, a dch., recubrimientos lateral y frontal. b. Material colocado sobre la parrilla . . . . .	64
35.	Punto de partida para optimización de resultados. . . . .	67
36.	Ensayos para eliminacion de gotas grandes de disolvente. . . . .	68
37.	Resultado de ensayos para eliminación de grumos. . . . .	69
38.	Resultado de ensayos para mejora del alineamiento. . . . .	70
39.	Resultado de ensayos para eliminación de Perlas. . . . .	71
40.	Ensayos para mejora de la densidad. . . . .	72

## Índice de cuadros

1.	Propiedades de algunos disolventes comunes en electrohilado.[43]	33
2.	Tipos de Fibras en base a parámetros involucrados. [43]	36
3.	Datos de las agujas coaxiales disponibles [3]	45
4.	Secuencia para realización de un ensayo de electrospinning.	48
5.	Rango de valores óptimos para ensayos de electrospinning horizontal (histórico BioForge) [45].	50
6.	Valores de los parámetros para los primeros ensayos.	56
7.	Ensayos realizados con colector tubo metálico.	60
8.	Ensayos realizados con parrilla estática sin recubrimiento.	63
9.	Parámetros de ensayos para materiales de recubrimiento.	64
10.	Parámetros del punto de partida para optimización de resultados.	67
11.	Parámetros de ensayos para eliminación de gotas de disolvente.	68
12.	Parámetros de ensayos para eliminación de grumos.	69
13.	Parámetros de ensayos para mejora del alineamiento.	70
14.	Parámetros de ensayos para eliminación de perlas.	71
15.	Parámetros utilizados para ensayos de mejora de densidad.	72



# 1. Objetivo.

El presente Trabajo de Fin de Grado recoge las tareas experimentales, para el desarrollo de un equipo de electrohilado, llevadas a cabo en el Grupo de Materiales Avanzados y Nanobiotecnología de la Universidad de Valladolid, BioForge, cuyos proyectos de investigación están relacionados con el diseño, la bioproducción y la aplicación de polímeros recombinantes o recombinámeros tipo elastina (ELRMs) como materiales altamente biocompatibles de aplicación en áreas como Biomedicina, Medicina Regenerativa o Nanotecnología.

Además de las propiedades inherentes a los polímeros ELRMs, la disposición de estos materiales en fibras, en la micro y nanoescala, aporta a los mismos una serie de propiedades que los hacen muy adecuados para algunas aplicaciones dentro de las áreas mencionadas [25, 31]. Existe interés en obtener entramados de fibras, ya que pueden aplicarse en el campo de la ingeniería de tejidos: como sistema para bioactivar superficies; para biocompatibilizar distintos biomateriales o como sistema de encapsulación de diferentes fármacos.

La producción de nanofibras de diferentes biomateriales ha sido objeto de diferentes trabajos desarrollados en BioForge previamente [44, 3, 45, 12] por lo general, en estos estudios se ha perseguido la formación de fibras con distribución aleatoria, sin ningún patrón de alineamiento para un tipo de aplicaciones concretas.

El objetivo del trabajo se centra en el desarrollo experimental de un equipo de electrospinning o electrohilado para obtención de fibras con alineamiento y optimización de las propiedades de las muestras (véase 3 en la página 25) . Para ello, se han introducido una serie de modificaciones a los métodos que se venían aplicando al equipo de electrospinning en el laboratorio de BioForge. El cultivo de células permite evaluar la citocompatibilidad de la red de fibras poliméricas producida, así como el comportamiento y la capacidad de respuesta simulando las condiciones de la matriz extracelular. Estas superficies recubiertas de nanofibras poseen potenciales aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos.

Se persigue la realización de electrohilado mediante la inyección con agujas coaxiales de dos componentes reactivos entre sí, en dos disoluciones de recombinámeros tipo elastina modificados químicamente: HRGD6-N3 y VKVx24-ciclooctino.(ver 2). De esta forma una vez entren en contacto, se entrecruzarán mediante una reacción «click chemistry» (ver 2.4), formando estructuras estables. Un valor añadido a los biomateriales dispuestos en esta forma, es que las condiciones de reacción son totalmente biocompatibles y no conllevan ningún tipo de purificación para su posterior aplicación en ingeniería de tejidos o en otras aplicaciones médicas.

Los aspectos a desarrollar durante el trabajo experimental han sido:

- Aprendizaje del manejo de la técnica de electrohilado y estudio de las variables que afectan al proceso.
- Desarrollo de un sistema colector para fibras con alineamiento uniaxial.
- Optimización de los parámetros para la producción de fibras, a partir de una disolución de los recombinámeros.
- Obtención y estudio de las características de las nanofibras obtenidas click con la técnica de electrohilado con aguja coaxial.

## 2. Biomateriales y definiciones.

### 2.1. Introducción

Las posibilidades de la técnica actual hacen que hoy en día la medicina pueda confiar en una gran variedad de materiales compatibles con las funciones biológicas con las aptitudes de las estructuras originales, con bajas tasas de rechazo y considerable fiabilidad en el intento de imitar la estructura, propiedades y funciones de los tejidos naturales. Existe un buen número de posibilidades, al poder tratarse de materiales metálicos, poliméricos, cerámicos o materiales compuestos. Los biomateriales no son exclusivamente los dispositivos destinados a ser implantados en el cuerpo humano sino también los que están en contacto con las mucosas o la sangre incluyendo los sistemas que permiten la liberación controlada de fármacos..

Este trabajo versa sobre biomateriales de tipo polimérico, de los que hablaremos más adelante, que son los más amplia y exitosamente utilizados en estas disciplinas, dadas las enormes posibilidades que presentan, tanto en variedad de compuestos como en la posibilidad de fabricarlos de muy distintas formas con características bien determinadas, así como por su facilidad de conformarlos en fibras, tejidos, películas o bloques. Pueden ser tanto naturales como sintéticos y, en cualquier caso, se pueden encontrar formulaciones bioestables, con carácter permanente y particularmente útiles para sustituir de forma parcial o total tejidos u órganos lesionados, destruidos, o biodegradables, con carácter temporal y con una funcionalidad adecuada durante un tiempo limitado, el necesario mientras el problema subsista.

El grado de biocompatibilidad de un material es función de su forma, estructura, composición química y de sus propiedades físicas, químicas, mecánicas y eléctricas. Además, el grado de biocompatibilidad depende de la localización en el organismo y del tipo de aplicación. Otro requisito muy importante de un biomaterial es su fiabilidad, es decir, la capacidad de mantener sus prestaciones



exactamente durante el tiempo necesario, ya sea en un implante provisional o definitivo.

## 2.2. Matriz extracelular

La matriz extracelular (ECM), figura 1, es una estructura compleja que rodea y soporta las células que se encuentran dentro de los tejidos de los mamíferos. Está constituida por una complicada trama de macromoléculas que forman parte de una gran cantidad de funciones celulares, y que influyen en la supervivencia, el desarrollo, la forma, polaridad, y el comportamiento de las células que soporta. Los tejidos naturales están compuestos por las células y la matriz extracelular que las propias células construyen. Son sistemas altamente complejos con una organización extraordinaria que determina sus propiedades.

Cada tejido contiene una serie de características físicas y químicas que le permite cumplir con la función de mantener el órgano u organismo del que forma parte. Está formada por una serie de moléculas secretadas por las células y se encuentra presente en todos los tejidos y órganos. La ECM no solo constituye el micro-ambiente que rodea a la célula, también sirve de soporte físico y proporciona la mayoría de las propiedades mecánicas a los tejidos actuando como un andamio donde las células pueden crecer y desarrollarse modificando incluso la estructura física y química de la propia matriz extracelular [25].

Aunque se ha producido un rápido progreso en la caracterización de muchos de los componentes principales de la ECM, todavía no se conoce exactamente toda su composición. Los dos componentes principales que forman parte de las macromoléculas, son proteínas y polisacáridos secretados por las células en un lugar determinado y organizadas en forma de malla en estrecha asociación con la superficie de la célula que las produce.

### 2.2.1. Andamiajes para matriz extracelular (scaffolds)

En los últimos años, producir fibras de polímeros orgánicos de dimensiones variables entre decenas de nanómetros, a micrómetros, ha ganado un gran interés en muchos grupos de investigación, la principal característica de interés de una nanofibra es su continuidad y elevada dimensión longitudinal, lo que le aporta una gran superficie útil. Cuando se trata de materiales poliméricos aparecen muchas aplicaciones industriales por su estabilidad y fácil reproducción del mecanismo de crecimiento de la fibra, desde andamiaje («scaffolds»<sup>1</sup>) para tejidos y otras aplicaciones biomédicas [54], hasta aplicaciones en materiales compuestos o nanoelectrónica.

---

<sup>1</sup>Ensamblajes de fibras que sirven como soporte para crecimiento celular [53].

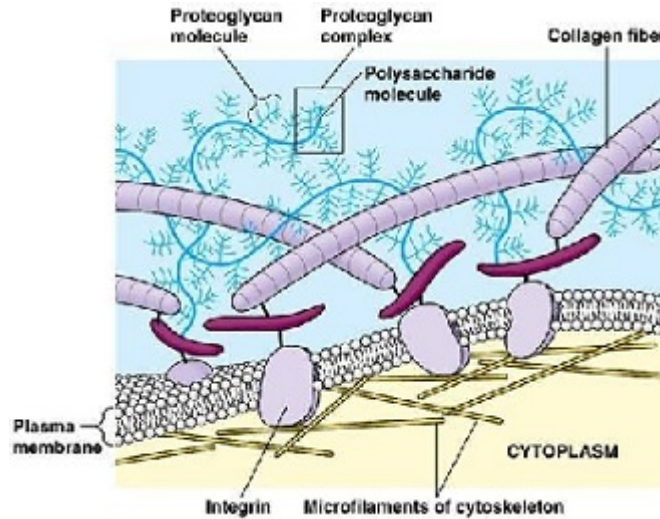


Figura 1: Esquema de la matriz extracelular [3].

Uno de los puntos clave en la regeneración de órganos (o para la regeneración de parte de un tejido dañado) es el de desarrollar estructuras 3D que sustituyan parte del órgano, total o parcialmente, o actúen como vehículo para transportar células y moléculas a lugares concretos del organismo. Estos soportes se construyen con materiales distintos en función de la estructura del órgano o tejido donde se vayan a implantar, se hace necesario controlar la orientación espacial de las nanoestructuras unidimensionales.

Las fibras obtenidas por electrospinning son colectadas normalmente en direcciones aleatorias, sin forma de tejido, lo que generalmente les confiere malas propiedades mecánicas, no obstante no deja de ser una estructura con aplicaciones en ingeniería de tejidos, algunas estructuras como la de los huesos, tienen estas características. La producción de entramados de fibras cuya disposición tenga un patrón de alineamiento, aporta importantes propiedades a los biomateriales en campos como la ingeniería de tejidos, donde las bioestructuras con matriz extracelular presentes de forma natural, tienen de forma inherente estos patrones anisotrópicos, como son los tejidos nerviosos, cardíacos, tendones, vasos sanguíneos, musculares o cartilagosos. Por tanto, una correcta arquitectura de los tejidos biopoliméricos es necesaria para imitar correctamente las propiedades de la matriz extracelular.

De entre las posibles técnicas para producir «scaffolds», como por ejemplo separación de fase o autoensamblado [54]; la técnica de electrospinning se presenta como una de las que más se ha desarrollado y evolucionado en los últimos tiempos, debido a que por las características del proceso, sobre todo por la utilización de un campo electrostático, se consiguen fibras de mayores longitudes, respecto a las otras metodologías. Por otro lado, el área superficial de una nanofibra, que ya de por sí es muy grande en relación a su longitud, puede incrementarse de forma notable cuando la estructura de la misma se hace porosa, este incremento en el área de superficie es de mucha utilidad para mu-

chas aplicaciones, como pueden ser: catalisis, filtración, absorción, células de combustible, células solares, baterías e ingeniería de tejidos. La producción de nanofibras por electrospinning les da una mejor estructura porosa a las mismas.

El electrospinning, se presenta como una técnica muy prometedora para producción de scaffolds, que puede conducir a una mejora en el objetivo de conseguir un mejor entorno biomimético para el desarrollo de tejidos, mejorando la penetración interna de las células en estos tejidos de fibras, las propiedades biomecánicas, o la toxicidad celular de los disolventes orgánicos utilizados [51].

### **2.3. Recombinámeros tipo Elastina (ELRMs), definición y características.**

La elastina natural consiste en una proteína estructural elástica e insoluble del tejido conjuntivo. Es uno de los componentes de la matriz extracelular de muchos tejidos y en general en las zonas donde se requiere elasticidad y resiliencia tales como arterias, ligamentos, tendones, pulmones, piel o cartílago elástico. La elastina posee varias características extraordinarias, como la habilidad de sufrir una gran deformación sin romperse y la recuperación posterior de la disposición original cuando el esfuerzo ha terminado, además de una gran resistencia a la fatiga. El origen de esa habilidad reside en su estructura, formada por secuencias recurrentes como las VPG, VPGVG, VPGG, VGVAPG, GVGVP, IPGVG [18-20]; siendo V=Valina, P=Prolina, G=Glicina, A=Alanina e I=Isoleucina [25].

Los recombinameros tipo elastina [31], constituyen una nueva clase de biomateriales con una extraordinaria biocompatibilidad y una interesante bioactividad. Todos ellos están basados en la recurrencia de los motivos que son considerados “bloques de construcción” de la elastina natural [22]. El polipéptido VPGVG está a la cabeza de este grupo, y el sistema modelo de sus características. Gracias a las técnicas de la ingeniería genética, se pueden diseñar polímeros tipo elastina bien definidos con una múltiple biofuncionalidad controlada. Los polímeros tipo elastina son de naturaleza proteica, es decir, son materiales péptidos no naturales, contruidos a partir de combinaciones de los veinte aminoácidos naturales. Su estructura es compleja y tiene funcionalidades específicas para el autoensamblaje a nanoescala, que permiten la obtención de nanotopologías de interés tanto en 2D (nanoporos, etc.) como en 3D (nanoesferas, nanotubos, etc.).

El desarrollo de tecnologías de ADN recombinante molecular ha permitido el diseño y la manufactura de materiales explotando las habilidades de las proteínas naturales [22, 30]. Así, se hace posible el control total de la secuencia de los polímeros permitiendo diseñar de forma muy precisa las funcionalidades finales del biomaterial. Estos polímeros sintetizados mediante técnicas de ingeniería genética son denominados entonces como recombinámeros tipo elastina,

ELRMs, reemplazando la nomenclatura convencional de ELPs .

Los ELRMs funcionales muestran la denominada Temperatura de Transición Inversa (TTI). Esto es un comportamiento de transición de fase, en medio acuoso, en función de la temperatura, (Figura 2). Por debajo de la TTI, las cadenas poliméricas se encuentran en estado de desorden conformacional, en el que la cadena está extendida con disposición al azar. El polímero es soluble y da lugar a disoluciones transparentes debido a la hidratación hidrófoba. Al aumentar la temperatura de la disolución por encima de la TTI, el polímero sufre un cambio de estado, se pliega y ensambla adoptando una disposición ordenada, regular y no aleatoria conocida como espiral  $\beta$ , figura 2. En este estado, el polímero comenzará a formar agregados, que precipitarán de la disolución y causarán un abrupto aumento de la turbidez del sistema [25]. La temperatura de transición de este tipo de polímeros, suele ser cercana a la temperatura ambiente o fisiológica, y vendrá determinada en función de multitud de parámetros físicos y químicos. Los parámetros químicos que pueden modificar el valor de la temperatura de transición se pueden clasificar en:

- Extrínsecos:

- Concentración de polímero en disolución.
- Cambios en la composición aminoacídica del poli (VPGVG).
- Cambios en el grado de ionización de cadenas laterales.
- Cambios en el pH.
- Longitud de la cadena.

- Intrínsecos:

- Los efectos de sales en disolución.
- Los efectos de solutos de tipo orgánico, incluidos detergentes iónicos o neutros.
- Los efectos de la presión.

Los ELRMs son capaces de alcanzar estructuras más ordenadas cuando aumenta la temperatura, pues en la mayoría de las proteínas, un aumento de la temperatura provoca un despliegue y desnaturalización.

### **2.3.1. Aplicaciones biomédicas y biotecnológicas de los ELRMs**

Los ELRMs están adquiriendo una importancia creciente como biomateriales utilizados para ingeniería de tejidos. Son unos candidatos excelentes para usar en medicina regenerativa y presentan gran versatilidad dado que se pueden modificar sus propiedades y bioactividad mediante el diseño adecuado y “a la carta” de su secuencia de aminoácidos.

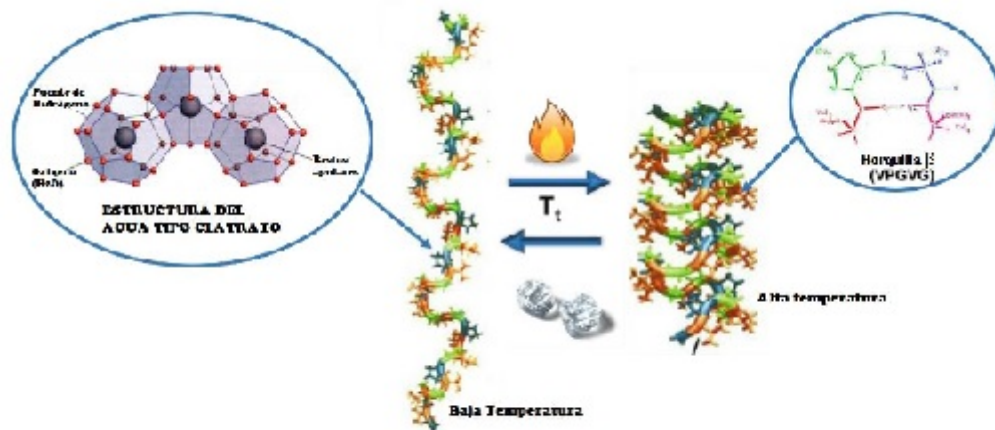


Figura 2: Transición térmica de los polímeros tipo elastina: a bajas temperaturas estructura tipo clatrato de las moléculas del agua alrededor de restos apolares, y a temperaturas elevadas, repliegue en horquilla  $\beta$  [25]

Las aplicaciones de los ELRMs abarcan el campo de la Biomedicina y la Biotecnología:

- Ingeniería de tejidos
- Funcionalización de superficies
- Fibras
- Liberación de fármacos
- ELRMs que responden a estímulos luminosos

Además, el aumento de la disponibilidad de formas recombinantes de la elastina, ha permitido la formación de una amplia gama de construcciones tales como agregados, películas, fibras, micelas, nanopartículas, e hidrogel, ya sean solos o como sistemas híbridos, en una amplia gama de tamaños y morfologías.

### 2.3.2. Hidrogel

El término de hidrogel se utiliza para describir las estructuras de redes poliméricas entrecruzadas, obtenidos a partir de polímeros naturales y/o sintéticos, capaces de absorber y retener grandes cantidades de agua. La estructura de hidrogel es creada por los grupos o dominios presentes en una red polimérica que son hidratados en medio acuoso. Los ELRMs son un tipo de biomateriales transicionables en hidrogel. Últimamente se han desarrollado un gran número de hidrogel que difieren en estructura, composición y propiedades con aplicaciones médicas como lentes de contacto, biosensores, revestimiento para implantes artificiales y dispositivos de administración de fármacos.

La gelificación es el mecanismo de formación de las redes en lo referente a la formación de enlaces entre las cadenas macromoleculares, por lo que se conduce a la progresiva ramificación de los polímeros, dependiendo de la estructura

y conformación del material de partida. El proceso de entrecruzamiento tiene como resultado un aumento del tamaño del polímero ramificado, que conlleva una disminución de la solubilidad. Esta forma del polímero se denomina “gel” o “red” y se compone de polímeros ramificados de menor grosor. La transición entre ambos estados se denomina transición de gelificación, conociéndose el punto crítico en el que aparece el gel por primera vez como “punto de gel” [45].

La gelificación puede tener lugar ya sea por conexión física o por enlace químico. Los geles físicos se subdividen en geles fuertes y débiles, donde los primeros son aquellos con fuertes enlaces físicos entre las cadenas poliméricas, siendo permanentes en un conjunto de condiciones experimentales. Algunos ejemplos son los nódulos vídriosos, microcristales laminares o hélices dobles y triples. Sin embargo los geles físicos débiles se caracterizan por formar enlaces reversibles formados a partir de asociaciones temporales entre las cadenas, algunos de los ejemplos son enlaces de hidrógeno, asociaciones iónicas e hidrofóbicas, micelas de copolímeros, etc [25]. En cuanto a la gelificación química se distinguen los procesos de condensación, adición y entrecruzamiento en general. Este tipo de gelificación conlleva enlaces químicos covalentes fuertes y estables entre las cadenas. Se alcanza un estado de equilibrio del hinchamiento que depende del parámetro de interacción polímero-agua y la densidad de entrecruzamiento.

La capacidad de retención de agua y la permeabilidad son los rasgos característicos más importantes de un hidrogel. Los grupos hidrófilos polares son los primeros en hidratarse en el contacto con el agua, exponiendo a los grupos hidrófobos a interactuar también con las moléculas de agua. Adicionalmente se absorbe agua debido a la fuerza osmótica impulsora de las cadenas de la red hacia dilución infinita, se alcanza entonces un equilibrio de hinchamiento. Dependiendo de la naturaleza y composición del hidrogel, si el entrecruzamiento es degradable, se puede producir la desintegración y/o disolución del hidrogel. Los hidrogeles biodegradables, que contienen enlaces lábiles, son importantes en aplicaciones de ingeniería de tejidos, cicatrización de heridas y administración de fármacos. Esos enlaces pueden romperse en condiciones fisiológicas, ya sea enzimáticamente o químicamente, casi siempre por hidrólisis.

La biocompatibilidad con el sistema inmune es la tercera propiedad más característica requerida en un hidrogel. Generalmente, poseen una buena biocompatibilidad debido a que su superficie hidrófila tiene una energía interfacial baja cuando está en contacto con los fluidos corporales, lo que resulta en una baja tendencia de proteínas y células a adherirse a estas superficies. Además, la naturaleza suave y elástica de los hidrogeles minimiza la irritación al tejido circundante.

## 2.4. Química Click [3].

Cómo se indicó en la introducción, uno de los objetivos del trabajo es llegar a realizar electrospinning de tipo coaxial 3.5, con dos disoluciones de distintos

polímeros en disolvente orgánico, para producir fibras de reacción tipo click. En las secciones siguientes: 2.4.1 y 2.4.2, se da una descripción de los polímeros con los que se pretende llevar a cabo una reacción de este tipo.

Química “click” es un término introducido por K. B. Sharpless en 2001 para definir una nueva metodología sintética que utiliza exclusivamente las transformaciones químicas más prácticas y fiables. Dentro de esta metodología se encuentran un grupo de reacciones que cumplen una serie de características [38]:

- Son fáciles de llevar a cabo desde el punto de vista experimental y mediante el uso de reactivos fácilmente disponibles.
- Se realizan en condiciones suaves de reacción (temperatura ambiente y disolución acuosa)
- Toleran una amplia variedad de grupos funcionales y condiciones de reacción en diversos tipos de interfases como sólidos/líquidos, líquidos/líquidos, o incluso sólidos/sólidos.
- Son altamente selectivas y regioespecíficas.
- Generan sólo residuos que pueden ser eliminados sin necesidad de una purificación cromatográfica.
- Poseen altos rendimientos: Dan lugar a la formación del producto de reacción de forma cuantitativa.

Los recombinámeros ELRMs utilizados en este proyecto, son diseñados y bio-producidos en el laboratorio de materiales avanzados y nanobiotecnología BioForge de la Universidad de Valladolid mediante técnicas de ingeniería genética [25], y son totalmente biocompatibles y biodegradables.

#### **2.4.1. Biopolímero HRGD6**

El primer recombinámero para reacción click es el biopolímero HRGD6 incluye un dominio de adhesión celular universal con el que obtener unos hidrogeles bioactivos a partir de su entrecruzamiento. El biopolímero HRGD6 [15] es un material biosintético que puede imitar el comportamiento de la matriz extracelular natural. La supervivencia celular, extensión, migración y proliferación, precisan de un soporte mecánicamente aceptable así como de dominios específicos de adhesión celular. Sus propiedades biofísicas pueden influir en distintas funciones celulares como la adhesión, diferenciación y migración [3]

El polímero se enriquece con secuencias cortas que codifican péptidos de adhesión celular: RGD (Arginina-glicina-ácido aspártico). Se trata de una secuencia de reconocimiento celular, presente por ejemplo en la fibronectina, que es reconocida por las integrinas, y que promueve la fijación de las células. La secuencia aminoacídica del monómero, repetida 6 veces en el polímero, es la siguiente:

[(VPGIG)<sub>2</sub> VPGKG(VPGIG)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>AVTGRGDSPASS[(VPGIG)<sub>2</sub>VPGKG(VPGIG)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>

Este monómero contiene tres dominios funcionales diferentes, de cara a conseguir una adecuada respuesta tanto a nivel mecánico como bioactivo:

- Primer bloque, (VPGIG): Dominio que proporciona una biocompatibilidad excepcional, y el deseado comportamiento mecánico.
- Segundo bloque (VPGKG): Dominio que permite la modificación química post-traducciona del biopolímero, gracias al grupo amino libre de la lisina introducida.
- Tercer bloque (AVTGRGDSPASS): tercer y último bloque, que integra en su composición un dominio que conferirá la funcionalidad específica de adhesión celular, mediada por integrinas, a la matriz polimérica que genere el biopolímero.

Una caracterización preliminar mediante diferentes técnicas [3] ha permitido obtener los siguientes parámetros:

- Temperatura de transición inversa (TTI): 35.8<sup>o</sup>C
- pH: 7.01

#### 2.4.2. Biopolímero VKVx24

El segundo recombinámero para reacción click es un polímero tipo elastina estructural que no posee ninguna secuencia bioactiva y su monómero tiene la siguiente secuencia aminoacídica que se repite 24 veces:

VGVP GVGVP GKGVP GVGVP GVGVP GVGVP G

El dominio que proporciona una biocompatibilidad excepcional, y el deseado comportamiento mecánico, en este biopolímero, es el VPGVG. El segundo bloque VPGKG como ya se ha mencionado, es el dominio que va a permitir la modificación química post-traducciona del biopolímero, gracias al grupo amino libre de la lisina introducida[3]. Una caracterización preliminar mediante diferentes técnicas [3] ha permitido obtener los siguientes parámetros:

- - Temperatura de transición inversa (TTI): 54.3<sup>o</sup>C
- - pH: 8
- - Peso molecular aparente: 60463Da
- - Punto isoeléctrico (teórico): 11.04
- - Rendimiento de la producción: 240 mg/L.



### 2.4.3. Disolvente

El disolvente orgánico que se ha utilizado para disolver los polímeros, ha sido el 2,2,2 Trifluoroetanol 99,8 % extra-puro (TFE), del fabricante Acros Organics; figura 3. La razón para utilizar este tipo de disolvente cómo se explica en la sección 3.3 es su menor valor de tensión superficial frente a otros disolventes como el agua, cuadro 1. Este hecho favorece la viabilidad del proceso de electrospinning, como se explicará más adelante. Además, el agua por sus características, disuelve las fibras orgánicas de gel.

Por otro lado, el TFE presenta cierta toxicidad según el protocolo GHS P statement [9], revisar catálogo del fabricante para medidas en casos de toxicidad ante:

- Irritación de piel.
- Peligrosidad ocular.
- Ingesta.
- Inhalación.
- Sospechoso de dañar la fertilidad.
- Inflamable como líquido y como vapor.

Por todo ello, y sus extracciones se realizan siempre bajo un campana de extracción química y con la utilización de guantes protectores.



Figura 3: Trifluoroetanol ( $CF_3H_2OH$ ), disolvente utilizado para las disoluciones de polímeros.

## 3. Técnica de Electrospinning o Electrohilado.

### 3.1. Historia del Electrospinning

La técnica de electrospinning o electrohilado, permite crear fibras de polímeros, en escala micro y nanométrica, para una gran variedad de aplicaciones

biomédicas, esta técnica aporta a las fibras desarrolladas diversas características como amplia superficie por unidad de área, porosidad y buenas propiedades mecánicas, siendo atractiva a nivel biotecnológico. La técnica es versátil y de fácil implantación lo que permite procesar una gran variedad de polímeros, integrando en los últimos años otras clases de materiales. En el electrospinning un campo eléctrico es aplicado a una disolución de polímero con cierta viscosidad, que fluye por un tubo capilar, induciendo una gran densidad de carga a la superficie líquida, lo que provoca una fuerza de repulsión opuesta a la tensión superficial de la disolución.

Se trata de una técnica antigua, siendo contemplada por primera vez por Rayleigh [7] en 1897 y por Zeleny [29], en 1914 y patentada por autores como Cooley, Morton y Formhals [4, 20]. Precisamente, éste último en 1934 logró describir de forma explícita el proceso, trabajó en su primera patente con acetato de celulosa, para producir hilos textiles. Para su segundo desarrollo ensambló un nuevo sistema con un mayor control de la distancia entre el capilar y el colector, con el cual redujo de forma considerable los inconvenientes observados en sus primeras investigaciones..

Hasta 1993 esta técnica es conocida como «electrostatic spinning» , durante este tiempo, son muy pocas las publicaciones sobre esta técnica, aparecen algunas para la producción de fibras de pequeños diámetros [47]. El electrospinning puede considerarse como una variante de la técnica de « spray electrostático» [5]. Ambas técnicas requieren la aplicación de un campo eléctrico de alto voltaje para provocar la formación de un chorro cargado electricamente («liquid jet»).

A principios de los 90, varios grupos de investigación, especialmente el Grupo de Reneker en la Universidad de Akron, reavivan el interés en esta técnica, mediante el uso de la misma para la producción de fibras de pequeños diámetros de una gran variedad de polímeros orgánicos. A partir de aquí, el término electrospinning, empieza a ser comúnmente encontrado en la literatura. Aparecen numerosos artículos de investigación en los que se nombra o aplica esta técnica.

La Figura 4 recoge ese crecimiento exponencial en el número de publicaciones durante el período que estamos tratando, ya que solo desde hace pocos años debido a la demanda de materiales con dimensiones en escala nanométrica, la técnica de electrospinning se ha convertido en un proceso más atractivo gracias a la habilidad de transformar un amplio rango de materiales en forma de nanofibras a bajo costo y con relativa simplicidad [6].

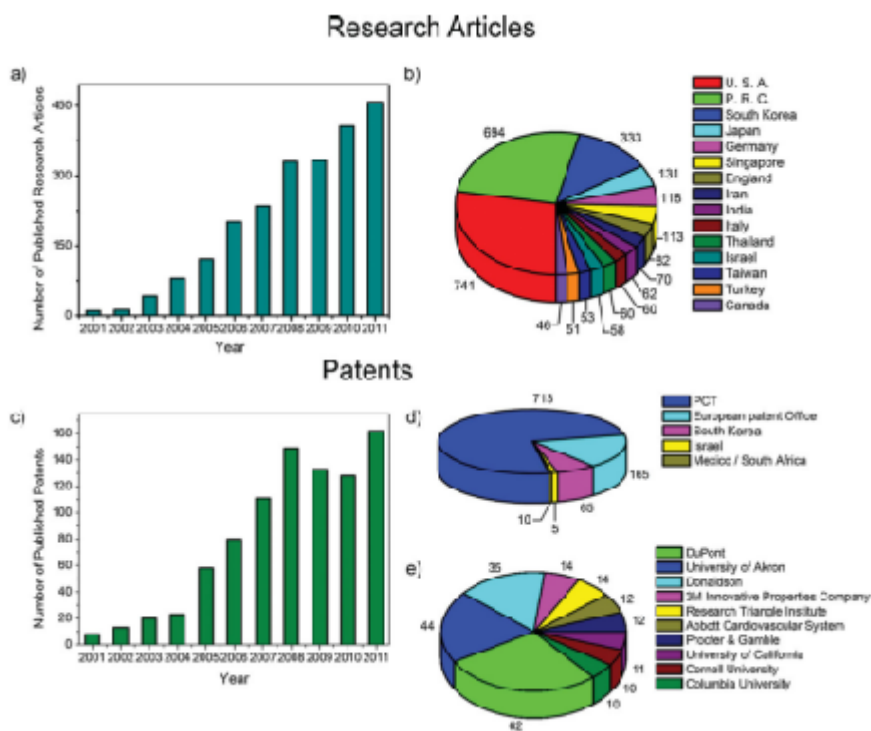


Figura 4: Publicaciones anuales sobre electrospinning [1]

### 3.2. Descripción del proceso

El proceso de electrospinning permite obtener fibras por medio de estiramiento axial de una solución viscoelástica [?], estas fibras poseen diámetros que van de las sub micras a los nanómetros rangos en los que es posible encontrar características únicas, entre las que se encuentra: un área superficial muy grande en relación al volumen [52] (en el caso de las nanofibras, esta relación puede ser un aproximado de 103 veces más que una microfibras), flexibilidad en la superficie, alta porosidad, poros interconectados [26] y un rendimiento mecánico superior comparado con otras formas ya conocidas del material, estas características hacen de las nanofibras, óptimos candidatos para una variedad de aplicaciones, entre ellas: ingeniería de tejidos, textiles, elementos para cubrir heridas, medios de filtración, membranas especiales y diversas aplicaciones medicas tales como reemplazo de huesos, implantes dentales, sistemas de liberación de farmacos, injertos vasculares, vasos sanguíneos artificiales entre otros.

La técnica consiste en aplicar suficientes fuerzas eléctricas que superen las fuerzas de la tensión superficial en la solución de polímero cargado, de esta forma a un voltaje determinado (umbral), finos chorros de solución son expulsados desde el capilar hasta el plato colector. Posteriormente el chorro se mueve en la dirección del campo eléctrico, elongándose de acuerdo a las fuerzas externas e internas y experimentando inestabilidad en algunas ocasiones [?]. El disolvente se evapora y los segmentos de fibras son depositados al azar en un sustrato colector. Normalmente, el electrohilado es llevado a cabo a tempe-

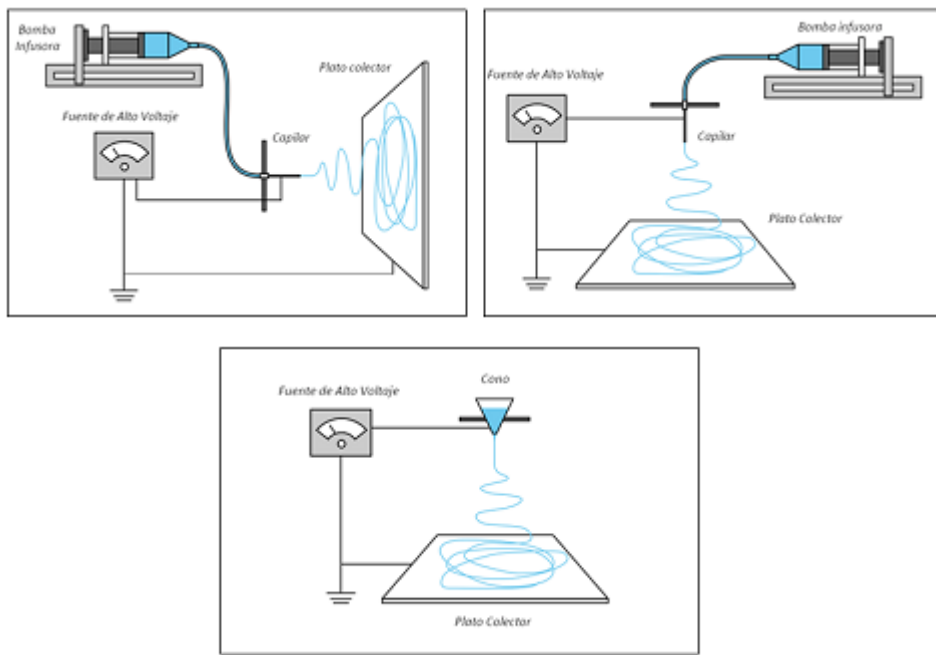


Figura 5: Disposición de un sistema de electrospinning y configuraciones habituales [43]

ratura ambiente, bajo condiciones atmosféricas. La disposición característica del aparato en conjunto se muestra en la figura 5 .

Para generar este proceso de electrohilado se requiere un voltaje de corriente directa en un rango de varias decenas de kV, basándose en el principio de que las fuerzas eléctricas repulsivas aplicadas superan a las fuerzas más débiles de tensión superficial en el líquido polimérico cargado [10]. Actualmente existen dos configuraciones de electrohilado estándar, posición vertical y horizontal. En el montaje en horizontal, a priori, se evita la contaminación de la muestra por el goteo de la disolución sin electrohilar, mientras que en el montaje vertical, la gravedad a su vez es una fuerza que ayuda al campo eléctrico en el avance de la disolución. La expansión de esta tecnología ha llevado a diferentes grupos de investigación a desarrollar sistemas capaces de fabricar nanofibras con estructuras cada vez más complejas de formas más eficientes y controladas [36].

El sistema de electrohilado consta de tres componentes principales:

- Fuente de alimentación de alta tensión
- Colector (vidrio,placa de metal, aluminio, ITO, etc.)
- Jeringa con su aguja y tubos capilares correspondientes. Lo habitual es que sean accionados por una bomba de flujo programable que permita mantener un caudal constante.

Se utiliza la fuente de alto voltaje para cargar con una cierta polaridad la

disolución polimérica, la cual es posteriormente acelerada hacia el colector de polaridad opuesta y que se encuentra conectado a tierra.

Los polímeros son disueltos en un solvente volátil, que ha de evaporarse durante el proceso, formando la disolución polimérica que fluye por el tubo capilar. En el proceso, la salida de la disolución depende de su tensión superficial en el final del tubo capilar. Por tanto, se somete a un campo eléctrico que induce una carga eléctrica en la superficie del líquido. Cuando el campo eléctrico aplicado alcanza un valor crítico, las fuerzas eléctricas de repulsión superan a las fuerzas de tensión superficial del líquido [42].

Existe un concepto asociado al electrospinning, el «cono de Taylor», es una forma estable de la suspensión de la disolución polimérica en la punta de la aguja. Esta surge como resultado del equilibrio entre las fuerzas eléctricas aplicadas y la tensión superficial en los casos de líquidos no viscosos, newtonianos y viscoelásticos [23]. Entonces, el cuerpo líquido adquiere una forma cónica (figura 6 a), que se refiere como cono de Taylor. El cono cambia de forma a medida que se modifica el potencial, partiendo de una gota con bajos potenciales hasta la forma cónica bien definida en los potenciales mayores [55] (Figura 6).

Finalmente, un hilo cargado de la disolución, es expulsado por la punta del cono de Taylor como una rápida sacudida inestable que ocurre entre la punta del capilar y el colector, lo que permite la evaporación del disolvente, obteniendo únicamente una fibra de polímero. Es por ello que el proceso de electrohilado ofrece una técnica simplificada para la formación de fibras.

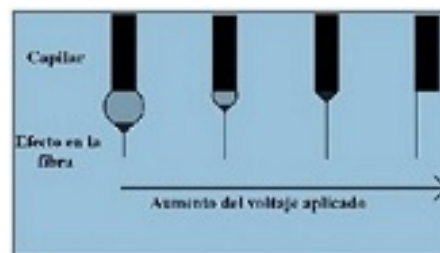


Figura 6: a. Formación de Cono de Taylor en la punta de la aguja b. Variaciones del Cono de Taylor con potencial aplicado [55]

La técnica de electrospinning, puede ser desarrollada de forma horizontal o vertical según se desee, figura 5 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. Para impulsar la solución a través del capilar puede utilizarse una bomba de infusión; si se trabaja de forma horizontal con cono como capilar, la salida de la solución puede estar determinada por la fuerza de gravedad ligada a la viscosidad de la solución.

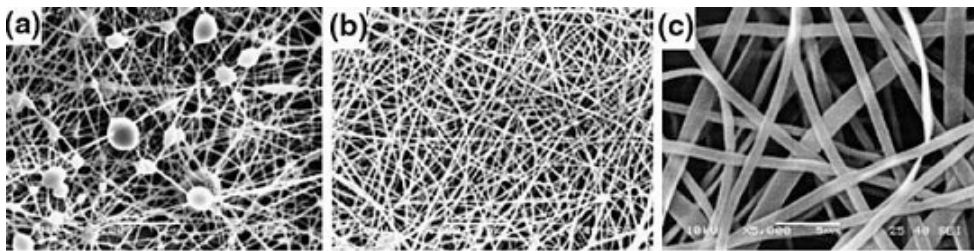


Figura 7: Diferentes fotografías de muestras de fibras producidas con electrohilado: a. Fibras con grumos, b. Fibras de pequeño diámetro, c. Fibras en un menor orden de magnitud. [45]

### 3.3. Parámetros influyentes en el proceso

Durante el desarrollo del proceso de electrospinning, existen una serie de variables operativas que influyen en las características de los elementos obtenidos, ya sea porque están ligadas a las características del material base o porque su desempeño está relacionado con otros parámetros dentro del proceso. Puesto que se trata de un proceso en el que pretendemos obtener unas características morfológicas en una escala inferior a lo observable durante la realización de un experimento de electrospinning, es difícil clarificar la influencia e interrelación de todas las variables entre sí y con el resultado final observable en el microscopio, ya que al mismo tiempo, las variables también están ligadas entre sí para el inicio del proceso, el polímero debe estar diluido en el o los disolventes que permitan una dilución y distribución homogénea del mismo, si el polímero no se encuentra correctamente disuelto, puede producirse obstrucción del capilar de la aguja durante el proceso, a la vez, al mismo tiempo se promueve la obtención de fibras homogéneas.

Por regla general, los polímeros son dieléctricos, en presencia de un campo eléctrico pueden considerarse como un arreglo de dipolos eléctricos microscópicos compuestos por cargas positivas y negativas cuyos centros no coinciden perfectamente [2], se mantienen en su lugar por acción de las fuerzas atómicas y moleculares, y solo pueden cambiar su posición ligeramente en respuesta a fuertes campos eléctricos externos, lo que explica por qué ocurre el estiramiento de la solución en el proceso. Son llamadas cargas ligadas en contraposición a cargas libres que determinan la conductividad [18]. Con el fin de mejorar las propiedades dieléctricas de la solución, se utilizan disolventes con altas constantes dieléctricas, esto favorece la formación de fibras con menos estructuras defectuosas [39] (un tipo de estructuras defectuosas conocidas como grumos o beads, decrecen la superficie por unidad de área del proceso, figura 7).

En lo que sería un experimento de electrospinning básico, tras preparar la diso-

lución y disponerla en una jeringa unida al capilar y aguja se inicia la aplicación de alto voltaje, con el potencial eléctrico, las cargas se acumulan promoviendo la formación de una gota en la punta del capilar, a medida que la intensidad del campo eléctrico se incrementa, la gota se alarga para crear el cono de Taylor (ver3.2) . La fuerza del campo eléctrico supera las fuerzas de cohesión de la solución, en la mayoría de los casos dominada por la tensión superficial, es así como un chorro de solución de polímero inicia un viaje desde la punta del capilar hasta el plato colector; en su viaje, el chorro de solución polimérica es alargado debido a las interacciones electrostáticas entre las cargas cercanas al mismo chorro, mientras tanto, el disolvente se evapora, finalmente, las fibras se solidifican a su llegada al plato colector.

Podemos clasificar los parámetros que intervienen en el proceso, en base a 3 criterios: características de la disolución, características del proceso y condiciones ambientales.

### **Parámetros de la disolución.**

Existen diversos parámetros que están íntimamente relacionados con las propiedades y características de las fibras obtenidas por medio de electrospinning por lo que su control durante la ejecución del proceso es indispensable. Desempeñan un papel importante en la formación y la estructura de las fibras, en el cuadro 2, se resume la influencia de los parámetros en las características de las fibras obtenidas. Si bien un número de relaciones generales entre los parámetros de proceso y morfología de las fibras se pueden argumentar, es importante darse cuenta de que la relación exacta será diferente para cada polímero y disolvente utilizado en el sistema. Dependiendo de una serie de variables de la solución se obtendrán diferentes resultados. Por lo tanto, es difícil dar relaciones cuantitativas que se puedan aplicar en una amplia gama de polímeros y sistemas de disolventes. Aclarado esto, hay tendencias generales que son útiles para determinar las condiciones óptimas para un determinado sistema:

- **Concentración de la disolución polimérica:** 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 la fibras tiende a aumentar con la viscosidad. 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.
- **Viscosidad:** la viscosidad de la disolución es un aspecto clave en la de-

terminación de la morfología de la fibra. Se ha demostrado que fibras finas y continuas no pueden ser obtenidas con baja viscosidad debido a que la tensión superficial es el factor dominante y conlleva la formación de cuentas, mientras que niveles muy elevados de viscosidad hacen muy difícil la eyección de fibras por la aguja. Un aumento de la viscosidad de la disolución origina un mayor y más uniforme diámetro de fibra. Por tanto, se requiere una viscosidad adecuada para el proceso de electrohilado que generalmente puede ser modificada ajustando la concentración polimérica. Es importante remarcar que viscosidad, concentración y peso molecular están directamente relacionados los unos con los otros a lo largo del proceso .

- **Tensión superficial:** Doshi y Reneker [17] concluyeron que reduciendo la tensión superficial de una solución de polímero podrían obtenerse fibras sin presencia de grumos. La tensión superficial intenta reducir el área superficial por unidad de masa, cambiando los chorros (jets) por esferas (figura 6), al aplicar el alto voltaje se busca aumentar la superficie oponiéndose a la formación de grumos o beads [19] 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, la utilización de disolventes de menor tensión superficial, supone una mejora en la fluidez del proceso.

En este trabajo se utilizará como disolvente, 2,2,2 trifluoroetanol (TFE), ver 2.4.3, debido a su baja tensión superficial (26.4 mN/m). En anteriores trabajos se pensó en utilizar agua milliQ como disolvente, pero en las primeras pruebas realizadas se descartó debido a su elevada tensión superficial (72.8 mN/m) y a la humedad de las condiciones de trabajo.

- **Conductividad de la disolución:** 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 [33]. 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.
- **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, 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 [37], las constantes dieléctricas de los disolventes más utilizados en electrospinning se encuentran en el cuadro 1.

Disolvente	Cte. Dieléctrica	Pto. de Ebullición ( $^{\circ}$ C)	Tensión Superficial (mN/m)	Dens.(g/ml)
Trifluoroetanol	27	78	21.1	1.393
Cloroformo	4.8	61.6	26.5	1.498
Acetona	20.7	56.1	25.2	0.786
Etanol	24.55	78.3	21.9	0.789
Dimetilformamida	38.3	153	37.1	0.994
Agua	79	100	72.8	1
Metanol	33	645	22.3	0.791
Ac. Acético	26.9	118.1	26.9	1.049

Cuadro 1: Propiedades de algunos disolventes comunes en electrohilado.[43]

### Parámetros del proceso.

- **Voltaje:** Solamente aplicando un voltaje superior a un umbral es posible que las fibras salgan eyectadas del cono de Taylor. Entonces, bajos voltajes implican que una gota está suspendida en la punta de la aguja y se produce un goteo constante de cuentas y gotitas que pueden acabar en el colector por efecto del campo eléctrico. 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 [27], otros afirman que un incremento en la aplicación del voltaje decrece el diámetro de las nanofibras [49] y aumenta la probabilidad de obtener fibras con defectos (beads), lo que si es seguro, es que en la mayoría de los casos un voltaje alto permite un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerzas electrostáticas de tipo Coulomb en el chorro y un fuerte campo eléctrico, todos estos factores promueven una reducción en el diámetro de las fibras. 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.
- **Flujo de salida:** Los estudios realizados acerca de la relación entre la velocidad de flujo de alimentación y la morfología y tamaño de las fibras, generalmente, se encontraron con que utilizando flujos bajos se obtenían fibras con diámetros menores, por lo que se considera lo recomendado.

Asimismo, cuando la velocidad de flujo es demasiado alta, se obtiene como resultado fibras de diámetro muy grueso y un aumento considerable de los defectos, debido a que no puede evaporarse el disolvente antes de llegar al colector [46]. 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.

- **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 distancia muy grandes las fibras electrohiladas podrían romperse debido a su propio peso, especialmente si las fibras son de diámetro pequeño. 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 grumos o beads [35] 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 [32].

### **Parámetros ambientales.**

El último tipo de parámetros que tienen influencia en el proceso los parámetros ambientales que son fundamentalmente humedad relativa y la temperatura ambiente. Se han realizado estudios para investigar el efecto de la temperatura en fibras de poliamida 6 variando de 25 a 60 °C y se encontró que con el aumento de la temperatura se producen fibras de menores diámetros. Mit-Uppatham y colaboradores atribuyeron esta reducción en el diámetro a la disminución de la viscosidad de las soluciones poliméricas a altas temperaturas ya que existe una relación inversa entre viscosidad y temperatura [24].

Se ha estudiado además la variación de la humedad durante el electrohilado de poliestireno y se ha demostrado que al aumentar la humedad ambiental se presenta una aparición de pequeños poros circulares en la superficie de las fibras. También se ha encontrado que en ambientes casi secos o de muy poca humedad, un solvente volátil se evapora más rápidamente. A veces la velocidad de evaporación es demasiado rápida, comparada con la eliminación del disolvente en la punta de la aguja, que se crea una deficiencia en el proceso de electrohilado al taparse la aguja después de pocos minutos de haber empezado el proceso [48]. Aunque otros investigadores, también han sugerido que ambientes muy húmedos pueden ayudar a la descarga de las fibras [42, 11]. Por lo anteriormente explicado, los parámetros ambientales también afectan al proceso de electrohilado y es necesario tenerlos en cuenta.

En este apartado se han explicado las múltiples variables que presenta la técnica de electrohilado así como el efecto que tienen sobre las fibras. En consecuencia para abordar el presente proyecto se desarrolló un estudio previo sobre las variables que se podían controlar consiguiendo un dominio de la técnica y el conocimiento de la influencia de las variables en el proceso. Muchas de estas variables están relacionadas entre sí por lo que averiguar la correlación no resulta sencillo, la puesta a punto del sistema y su optimización supuso un trabajo de experimentación y desarrollo.

La aparición de pequeños poros circulares en la superficie de las fibras debido al aumento en la humedad, fue demostrada por Casper et al [8]. Los poros pueden promover una transferencia de proteínas y una migración celular mucho más ágil y fácil en ingeniería de tejidos [41]. 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 el nivel de evaporación de la disolución y puede ocasionar una reducción en la viscosidad de la solución [16]. Dependiendo de los parámetros y algunas características del ambiente las fibras pueden tener diversas formas y tamaños, algunos casos, se recogen en el cuadro 2 .

Tipo de Fibra	Parámetros Involucrados	Aplicaciones
Aplanadas	Fibras con poros. Se atribuyen a la formación de una capa de polímero en la superficie de la fibra, debido a la desigual evaporación del disolvente, la presión atmosférica tiende a colapsar la forma redonda de la fibra. Puede estar relacionada con el tipo de disolvente y la adición de sales a la disolución. Cantidad de sales, Repulsión de Coulomb entre los jets = fibras con este tipo de forma.	Sistemas biosensores, debido a la capacidad de transferir electrones y su actividad electroquímica
Cintas	Se forman en las mismas condiciones a las fibras con formas aplanadas	Sistemas biosensores, debido a la capacidad de transferir electrones y su actividad electroquímica
Helicoidales	Ocurre por la deformación del jet debido al impacto con el plato colector. Concentración de la solución promueve este comportamiento. El ángulo de incidencia del jet influye en la obtención de este tipo de fibras.	Nano y microsistemas electromecánicos y electromagnéticos, componentes ópticos avanzados, sistema de liberación de fármacos.
Ramificadas	Se relacionan con la aparición de pequeños jets en la superficie del primer jet. La inestabilidad entre las fuerzas eléctricas y la tensión superficial generan inestabilidad del jet	En el caso de la liberación de fármacos, este comportamiento puede promover la acumulación de medicamento en algunas regiones de la muestra.
Huecas	Es posible obtener este tipo de fibras por medio de electrospinning coaxial o por procesos químicos en las fibras electrohiladas.	Nano dispositivos electrónicos y optoelectrónicos, conversión de energía, liberación del fármaco, protección ambiental, sensores entre otros
Fibras con beads	Los principales parámetros asociados con la formación de beads en el proceso son la tensión superficial y las propiedades viscoelásticas de la solución. Flujo de salida, distancia entre el capilar y el plato colector, voltaje, peso molecular, viscosidad de la solución, pueden promover la formación de este tipo de defectos	Son defectos indeseados dentro del proceso de electrospinning ya que disminuyen la superficie por unidad de área, afectando la homogeneidad de las fibras.
Fibras con poros	Humedad relativa y presión de vapor del disolvente contribuye a la aparición de poros en la superficie de las fibras	Ingeniería de tejidos, catálisis, sensores

Cuadro 2: Tipos de Fibras en base a parámetros involucrados. [43]

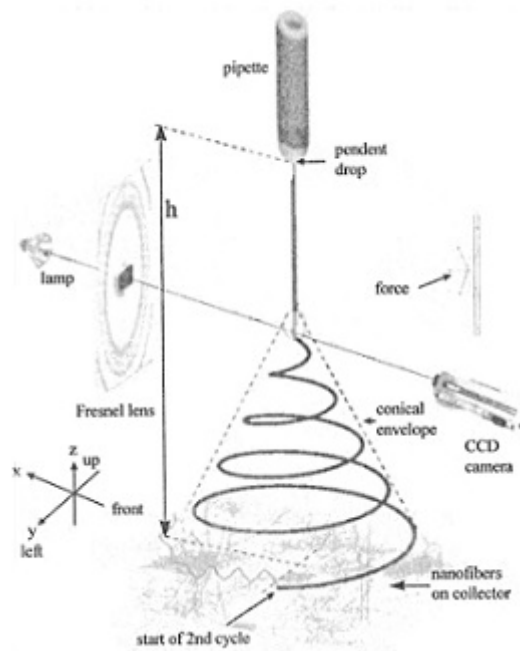


Figura 8: Inestabilidad del chorro eyectado en un proceso de electrospinning [21]

### 3.4. Electrospinning de Fibras Alineadas

Desarrollar un colector para electrospinning que permita depositar fibras alineadas lo más paralelamente unas a otras, como en la figura 25 en la página 55, a diferencia de una disposición aleatoria, figura 7 en la página 30, es el mayor objetivo del trabajo. Para ello es preciso introducir modificaciones en el set up del equipo de electrospinning. Al describir el proceso vimos que la eyección de las fibras hacia el colector, era una consecuencia de la interacción entre la fuerza electrostática sobre la disolución y la tensión superficial inherente a la misma. Sin entrar en consideraciones del modelo matemático [14], por la naturaleza del proceso, la eyección de un chorro de disolución, tiene una dinámica inestable, tal como puede apreciarse en la figura 8, cuya trayectoria espiral puede aproximarse por un modelo cónico [14]. Conviene explicar la existencia de este hecho, ya que supone una dificultad añadida a la finalidad de obtener fibras alineadas sobre un colector, a partir del «jet» o chorro en electrospinning.

Se expone a continuación, una breve introducción a los métodos experimentales, que hasta el momento han tenido mayor repercusión, en la finalidad de obtención de fibras alineadas.<sup>2</sup>

<sup>2</sup>En el trabajo de W.E. Teo y S. Ramakrishna en [51], se ha realizado una excelente labor de exposición de los diferentes métodos que aparecen en la bibliografía sobre electrospinning.

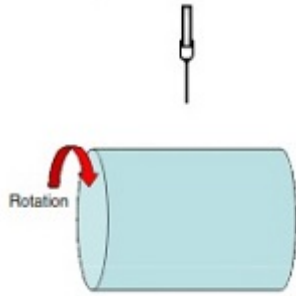


Figura 9: Colección de fibras alineadas mediante tubo rotatorio [51].

### **Tubo rotatorio (figura 9):**

El uso de un tubo rotatorio como colector permite la obtención de fibras alineadas. El nivel de alineamiento que se puede conseguir depende de la velocidad de giro en relación a la velocidad de flujo de salida por el capilar, han de sincronizarse bien ambas velocidades para evitar que las fibras se rompan al depositarse en el colector. Esta configuración es bastante simple y es una forma sencilla de obtener alineamiento, cuanto mayor sea la velocidad de giro, mejor será el alineamiento logrado, ya que a bajas velocidades, las fibras tienden a depositarse de forma desordenada [51]. Cuando mayor es el radio del tubo, más complicado es optimizar el proceso.

### **Electrodos paralelos (figura 10):**

Este método consiste en la disposición de dos electrodos longitudinalmente paralelos, conectados a tierra. Las líneas de campo electrostático de este modo, se disponen como se muestra en la figura 10 b, las fibras cargadas con polaridad opuesta a los electrodos, al llegar al hueco entre ambos, no tienen una dirección preferencial para disponerse, ya que la distribución de campo ejerce igual fuerza de un lado a otro en la dirección perpendicular a los electrodos. Por tanto, las fibras en esta zona quedan dispuestas según esa dirección perpendicular. Por otro lado, las fibras depositadas mantienen la carga y por ello repelen a fibras nuevas que llegan al colector, este hecho, hace que este método presente el inconveniente de no poderse conseguir entramados de fibras de gran espesor.

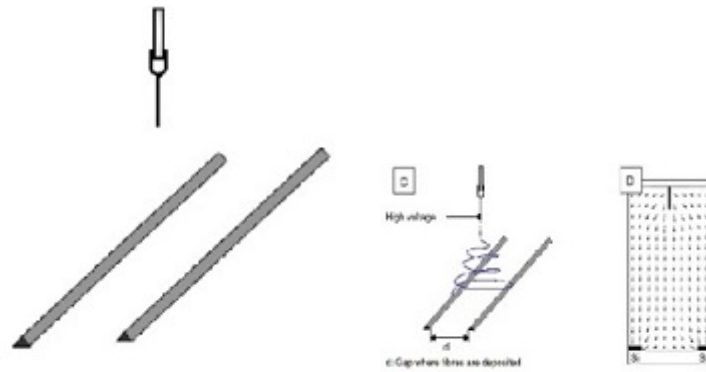


Figura 10: a. Disposición de electrodos paralelos. b. Distribucion de campo eléctrico [51].

### Rotating Mandrel and Wire (figura 11):

Este método es una variación del método tubo rotatorio. La diferencia radica en disponer una jaula de cable metálico conductor como cara lateral del cilindro. De una manera similar al método con doble electrodo, el espacio entre dos segmentos de cable consecutivos no tiene una dirección no preferente de alineamiento para una fibra que allí vaya a depositarse y por ello, se colocará perpendicular a los mismos. Al extenderse este hecho a toda la cara lateral, tenemos una superficie extensa de alineamiento de fibras. También existe la posibilidad de colocar cable metálico paralelo al plano de la base del cilindro, de este modo las fibras tienden a aglomerarse sobre el cable, quedando alineadas en esta dirección, aunque no es extensible a toda la cara lateral del cilindro.

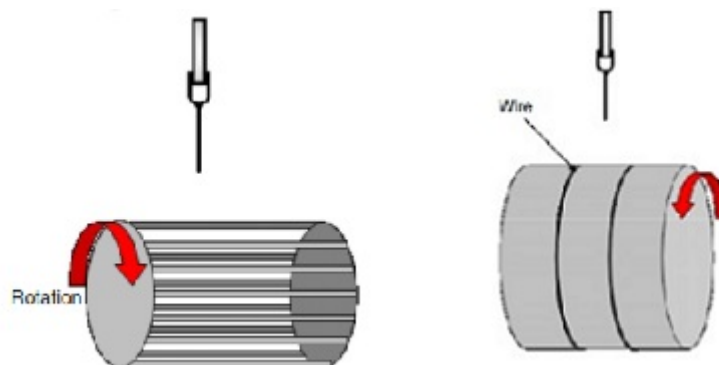


Figura 11: Disposición «rotating mandrel and wire» [51].

### Disco colector (figura 12):

Este método es una pequeña variante de la disposición de tubo rotatorio, utilizando en su lugar un disco plano con borde afilado conectado a tierra.

Con esta geometría, lo que se consigue es que en el extremo afilado, convergen las líneas de campo eléctrico, dando lugar a que en este punto se depositen gran cantidad de fibras que formaran entramados de fibras en forma de hilo o cuerdas. La desventaja de este método, es que no pueden lograrse tejidos de mayores dimensiones transversales, aunque si puede conseguirse un buen espesor de fibras.

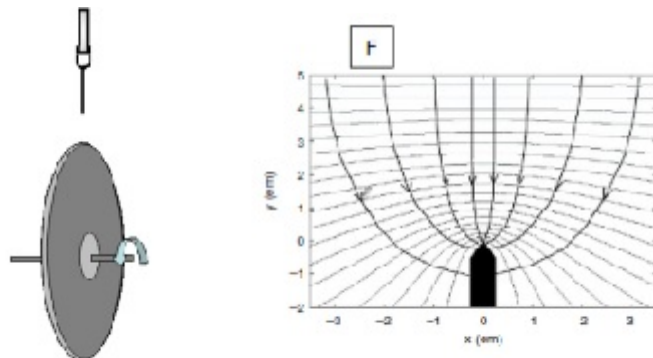


Figura 12: Disco colector para fibras alineadas y líneas de campo electrostático [51].

### Mejoras para «Rotating Mandrel» (figura 13):

En la literatura, pueden encontrarse numerosos artículos sobre la base del método del tubo rotatorio, a los que se han añadido una serie de modificaciones par lograr en general, un mejor alineamiento o una mayor uniformidad del flujo hacia el colector para solventar el problema de la inestabilidad del jet comentada en la sección 3.4. Aquí se recogen algunos muy habituales, como la colocación de electrodos afilados en diferentes partes alrededor del tubo rotatorio, para dirigir el campo electrostático hacia estas zonas y que las fibras se depositen alineadas hacia esa dirección, o la introducción de un electrodo metálico en el interior del tubo para concentrar el campo en esta zona y dirigir hacia ella las fibras.

## 3.5. Electrospinning Coaxial

Se trata de una variación de la técnica convencional de electrospinning, que permite electrohilar simultáneamente diferentes polímeros dentro de una estructura formada por un núcleo y una corteza de nanofibras [50] lo que lo ha convertido en una de las mejores opciones para la obtención de nanofibras con elementos de diferente naturaleza. Se basa en una boquilla pequeña dentro de otra más grande, en nuestro caso, utilizamos una aguja coaxial como la de la figura 14. Esta configuración permite que diferentes fármacos y proteínas pueden ser incorporadas en el núcleo protegidas por la cubierta que puede ser



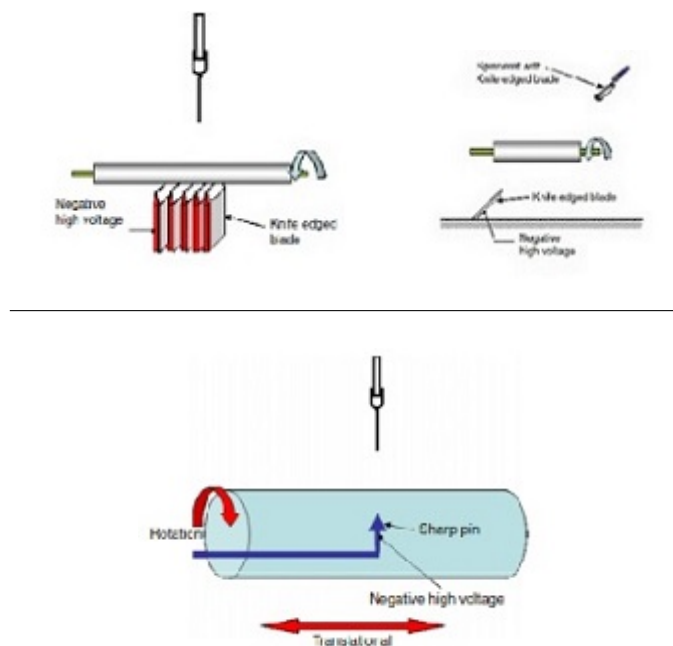


Figura 13: Modificaciones sobre el colector tipo tubo rotatorio[51].

de un polímero más estable mecánicamente o en su defecto menos degradable. Este tipo de estructura añade una capa adicional sobre la velocidad de liberación del fármaco lo que permite un mayor control y la obtención de un perfil de liberación sostenido, 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 [50].

Cómo se ha comentado en los apartados anteriores, se pretende llevar a cabo electrospinning de un cruzamiento de dos biopolímeros (HRGD6-N3 y VKVx24-Ciclooctino), disueltos en Trifluoroetanol (TFE), mediante una reacción química tipo click click (ver sección 2.4 en la página 22), que se llevará a cabo mediante la técnica coaxial.

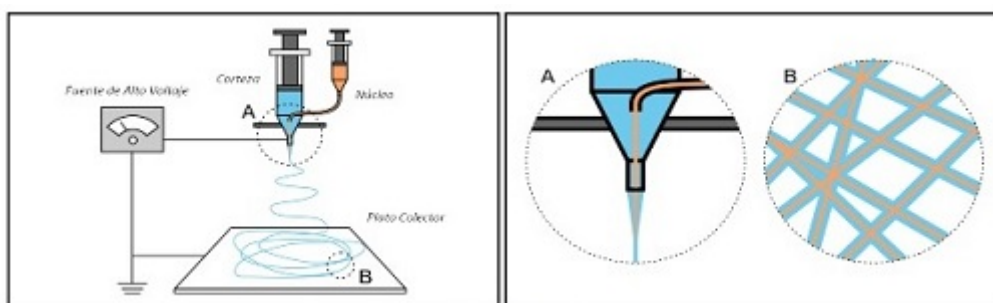


Figura 14: Electrospinning Coaxial [43]



Figura 15: Puesto de trabajo para realización de ensayos.

## 4. Instrumental y Métodos.

Se da detalle a continuación del material utilizado como equipo de electrospinning en el laboratorio BioForge con el que se han llevado a cabo los experimentos.

### 4.1. Instrumental utilizado

Todos los ensayos y pruebas han sido realizados sobre una mesa de laboratorio con el equipamiento habitual, a temperatura y humedad ambiente. El instrumental y lugar de trabajo, fueron sufriendo modificaciones con el desarrollo de los experimentos, que se han ido documentando en secciones próximas, el lugar de trabajo en un aspecto general, es el que puede verse en la figura 15.

#### 4.1.1. Bomba de Flujo con regulación de caudal.

Bomba reguladora de caudal programable, modelo:

-PHD 2000 Programmable Harvard Apparatus, figura 16  
(InstechlabsPennsylvania, Estados unidos.).

#### 4.1.2. Fuente de tensión de alto voltaje

Modelo comercial:

- FC Series 120 Watt, 1 to 60 kv, 1.75" H x 19" W x 20.25" D, 12 lbs  
(Glassman High Voltage Inc), figura 16.

El protocolo de uso este dispositivo es elemental y basta con seguir unas sencillas pautas para su correcto funcionamiento:

- Antes de comenzar a usar la fuente comprobar que todos los cables están bien conectados.

- Para la puesta en marcha pulsar POWER (botón amarillo), con lo que el aparato ya esta encendido. Después pulsando el botón verde, activamos el paso de corriente por el circuito y mediante el mando giratorio se podrá modificar la diferencia de potencial.

Se establece una diferencia de potencial conectando uno de los cables de la fuente a la aguja por donde sale la disolución y un cable de conexión a tierra al colector dónde se recogen las fibras.



Figura 16: a. Frontal de fuente de tensión de alto voltaje. b. Trasera de la fuente de tensión. c. Bomba de Flujo [3]

#### 4.1.3. Jeringuillas

- BD 1 mL Syringe (figura 17)



Figura 17: a. Jeringuilla utilizada. b. Tubos capilares [3].

#### 4.1.4. Tubos capilares portaflujo

Tubos monoetapa, sin elementos adyacentes que conectan directamente la jeringuilla con la aguja:

Argon Comp PR Line10 in CLR (figura 17)

#### 4.1.5. Aguja Simple

Esta aguja va insertada en el interior de la aguja coaxial, para diferenciar el flujo primario del secundario. También es la aguja que se ha utilizado en la realización de experimentos simples con el recombinámero VKVx24, en los que no se ha realizado reacción click (ver 2.4), en los que por tanto sólo había un único material y una única disolución. La aguja es del tipo Vita 18 G, su geometría es similar a la de la aguja coaxial y puede verse en la figura 18 b.

#### 4.1.6. Aguja Coaxial

El laboratorio está equipado con dos agujas coaxiales de diámetros diferentes (Coaxial Needle p/n 100-10), ver Figura 18 a. Estas agujas se constituyen por dos entradas fijas, colocadas de forma perpendicular entre sí. Los fluidos que se viertan por ambos circuitos podrán entrar en contacto únicamente al final del conducto, es decir, en la punta de la aguja, lo que evita la formación de obstrucciones por la reacción de ambas disoluciones en el interior de los conductos.

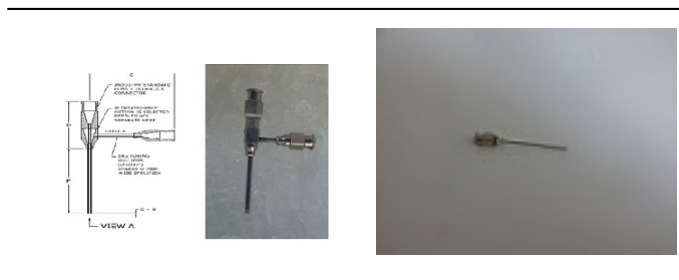


Figura 18: a. Aguja para electrospinning coaxial [3]. b. Aguja utilizada para ensayo simple.

El cuadro 3 recoge las dimensiones de los dos tipos de agujas coaxiales disponibles.

		Diametro Interior (mm)	Diametro Exterior (mm)	C (mm)	E (mm)	F (mm)
Coaxial 1	14G	1.60	2.11	0	25	25
	18G	1.19	1.65			
Coaxial 2	16G	0.84	1.24	0	25	25
	20G	0.584	0.889			

Cuadro 3: Datos de las agujas coaxiales disponibles [3]

#### 4.1.7. Motor Eléctrico

Como generador del movimiento del colector rotatorio se ha utilizado un agitador eléctrico de laboratorio con velocidad máxima de 2000 rpm, modelo:

IKA eurostar 20 digital (figura 19)

El agarre del elemento rotatorio en este agitador, se realiza mediante un cabezal de tres garras, similar al que puede haber en cualquier taladro eléctrico de uso doméstico. Por otro lado, la máxima velocidad de giro que puede suministrar es de 2000 rpm. Se utilizó una caja de poliexpan recortada con la forma del agitador para sostener al mismo en su funcionamiento y absorber vibraciones, figur 19 b.

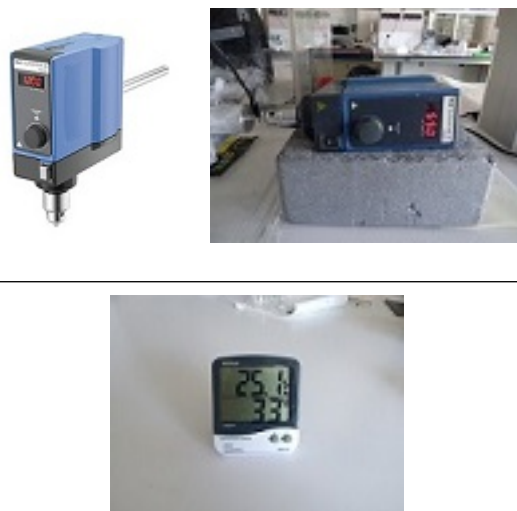


Figura 19: a y b. Agitador eléctrico utilizado como motor. c. Higrómetro digital.

#### 4.1.8. Higrómetro digital

Como se mencionó en la sección 2, en ciertas partes del desarrollo experimental fue preciso controlar los parámetros humedad relativa y temperatura referidos al ambiente, dada su influencia en las características de la fibra. Para ello, se ha utilizado un higrómetro digital, (figura 19):

Sper Scientific 800016

#### 4.1.9. Microscopio óptico




Para las observaciones de las muestras obtenidas de los experimentos, así como la toma de las fotografías que en este trabajo se incluyen, se ha dispuesto de un *microscopio óptico Nikon eclipse 80 i*, figura 4.1.9. El modelo 80 i dispone de un sistema iluminación con lámparas alógenas de 12V-100W y tecnología que mejora la iluminación de imágenes digitales. Así mismo también incorpora sistemas para la eliminación de ruido lumínico externo de las imágenes, mejorando claridad y contraste de las mismas. Las aplicaciones de este microscopio van desde estudios clínicos o educacionales a histología, microbiología, genética o citología.



Figura 20: Microscopio óptico Nikon eclipse 80 i utilizado en las observaciones.

## 4.2. Metodología

En la los estudios experimentales sobre electrospinning [45, 12, 3], se observa que de los elementos que componen el instrumental necesario para realizar los mismos, hay algunos elementos que siempre están presentes: jeringa, aguja, bomba de flujo y fuente de alto voltaje, además, hay pocas diferencias de unos a otros. Cómo se ha visto en la sección 3.4, las variaciones entre unos equipos y otros están principalmente en los colectores y lo que va asociado a ellos. Se hará una breve descripción de la metodología común a todo ensayo de electrospinning, reservando para la sección 5 los métodos asociados a modificar el colector para diferentes finalidades. Los procedimientos comunes a cada ensayo de electrospinning, se han reflejado en el cuadro 4, indicando que partes del equipo involucran.

AJUSTE DE VARIABLES	
Determinar Concentración de la Muestra	
Extracción de Polímero	
Extracción del disolvente	
Preparación de la disolución	
Carga de la jeringuilla y ajuste de tubo capilar	
Programación Caudal y colocación de jeringuilla	
Determinación distancia aguja-colector	
Selección de Voltaje	

Cuadro 4: Secuencia para realización de un ensayo de electrospinning.

## 5. Procedimiento experimental.

En esta sección se detallarán los procedimientos experimentales seguidos para implementar el sistema de producción de fibras alineadas. Se partió del estado en que se encontraba el equipo de electrospinning de BioForge en anteriores estudios y se fueron introduciendo modificaciones puntuales para mejorar algunos aspectos del proceso o para facilitar la finalidad de alineamiento, por ello, el punto de partida experimental será la metodología y «setup» utilizados en los estudios anteriores en nuestro lugar de trabajo en el laboratorio de BioForge para producción de scaffolds de fibras de biomateriales, con disposición aleatoria, si bien, será una referencia, puesto que la modificación de elementos del proceso puede conllevar variaciones en las variables y que los valores óptimos sean diferentes.



Durante más de dos meses de pruebas y experimentación, se fueron introduciendo modificaciones, desde el plantamiento inicial, que resultaron en los experimentos que se detallan en los apartados siguientes de esta sección. Las modificaciones introducidas, pueden dividirse en 3 fases, según el tipo de colector que se trataba de implementar en el sistema: Electrodo Puntual, que es el estado inicial; Doble electrodo y Colector Rotatorio. Partimos.

Desde el estado inicial, una vez revisado el estado del arte, las estrategias primeras, se centraron en implementar un método sencillo, con colector tipo «doble electrodo con gap». Puesto que no fue satisfactorio el resultado, por razones que se darán en la subsección 5.2 se pasó a desarrollar un colector de tipo rotatorio, que era la idea inicial del trabajo, esta parte se describe en la tercera parte de esta sección.

## 5.1. Estado Inicial

En la introducción al trabajo, se comentó que en el grupo BioForge se veían realizando experimentos sobre electrospinning o que había sido incluido como parte de los procesos en otro tipo de estudios. Si bien, se habían realizado ensayos satisfactorios en la obtención de fibras con alineamiento mediante otros métodos, este trabajo, supone un intento de obtener las mismas mediante la utilización de técnicas que implicaran el uso de colectores rotatorios. Se ha visto en la literatura, que el uso de un colector rotatorio es una de las formas más extendidas para esta finalidad dada la sencillez de implantación del equipo [51].

El setup del equipo de electrospinning en el comienzo del trabajo se encontraba configurado según las necesidades para los últimos trabajos sobre electrospinning realizados en BioForge [45, 3]. Este buscaba la obtención de muestras de fibras no alineadas, y utilizaba un colector tipo, que llamaremos «electrodo puntual».

La principal característica distintiva se encuentra en el colector. Se trata de un electrodo consistente en un tornillo incrustado en una pieza de poliexpan (figura 21). El campo eléctrico generado entre la aguja y este tipo de electrodo una vez conectado a tierra, puede aproximarse al de una carga puntual, por lo que una vez puesta en marcha la fuente de alimentación y determinado el voltaje, se convierte en un sumidero de cargas y por tanto las fibras eyectadas que se encuentran cargadas con polaridad opuesta son atraídas hacia este punto de forma uniforme.

### 5.1.1. Electrodo Puntual

A la llegada al laboratorio de BioForge, no había estudios en marcha sobre electrospinning, y el equipo se encontraba configurado en base a las necesidades de los últimos estudios allí realizados. En ellos, interesaba la recolección

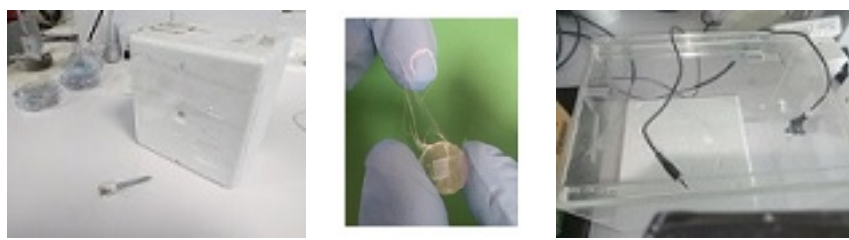


Figura 21: a. Colector tipo electrodo puntual b. Detalle del vidrio colector adherido al electrodo [3] c. Urna de metacrilato.

de fibras de manera aleatoria en cristales de vidrio de 12 mm de diámetro, que se colocaban adheridos como colector a un tornillo de cabeza plana de las dimensiones del cristal, conectado al cable de tierra de la fuente de alimentación. Insertado en una pieza de poliexpan para aislar el campo eléctrico generado por el resto del tornillo como electrodo conectado a tierra, se colocaba en el interior de una caja de metacrilato (figura 21 c) cuya función principal era aislar las condiciones de humedad y temperatura en el experimento, del ambiente del laboratorio.

La finalidad principal que se había perseguido en los últimos estudios era la de optimizar las variables del proceso para tener muestras sin defectos y así poder realizar cultivos de células sobre ellas, para evaluar la proliferación de las mismas sobre estas estructuras. En la figura 21 a se puede ver en detalle el colector.

Tras probarse en anteriores trabajos de electrospinning en BioForge el ensayo en vertical, se desechó esta posibilidad ya que hubo problemas de excesivo goteo por gravedad de disolución, lo cual se tradujo en problemas de desperdicio de material e imperfecciones en las muestras. Por tanto la configuración en horizontal ha sido la utilizada en el resto de ensayo.

También en el histórico de estudios anteriores en BioForge, se había establecido un rango de valores [45] para las variables involucradas en el proceso, en torno a los cuales, podía estar la solución óptima para las condiciones habituales de trabajo, siendo estas variaciones causa del tipo de colector utilizado, disolvente, variables ambientales o el tipo de polímero, estos rangos de valores se dan en el cuadro 5.

Concentración (mg/ml)	Caudal (µl/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Posición
75-125	1-7	17-30	8-19	10-240	22-25	27-33	Horizontal

Cuadro 5: Rango de valores óptimos para ensayos de electrospinning horizontal (histórico BioForge) [45].

### 5.1.2. Resultados para Electrodo Puntual.

Los valores para cada variable, que daban los mejores resultados, se optimizan según un proceso<sup>3</sup> consistente en realización de ensayos bajo la modificación de una única variable. Se describe a continuación las condiciones de un ensayo con la configuración de electrodo puntual y los biomateriales indicados, con el ajuste de variables. De este tipo de ensayos, realizados por D. Moretón previamente en BioForge, para su correspondiente trabajo de fin de grado sobre electrospinning [12]. De aquí se partió para el desarrollo del presente trabajo experimental :

Se pesaron 45 mg de los polímeros HRGD6-N3 y VKVx24 por separado. Se añadieron a cada polímero 0,6ml de 2,2,2 trifluoretanol (Acrós, Geel, Bélgica) para disolverlos que se disolvieran y obtener se obtuviera finalmente una concentración de 75mg/mL. Con las jeringas unidas a unos capilares de PTFE (VWR, Barcelona, España. ref.19-0041-01) mediante conectores, se cargaron en cada uno manualmente 0,575 ml de disolución polimérica, las integramos se integraron en nuestra bomba de flujo PHD 200 (Instechlabs, Pennsylvania, Estados unidos) y se conectaron los conductos debidamente a la aguja coaxial formada por una aguja interior de calibre 16G y una aguja exterior de calibre 20G.

La obtención de las nanofibras “click” se llevó a cabo mediante electrospinning horizontal, utilizando colectores circulares de vidrio (Menzler Glasser, Braunschweig, Alemania ref. 18CB00180RA1) a 90 mm de la salida de la aguja coaxial, adheridos al electrodo puntual. Con los conductos debidamente conectados a la aguja coaxial y la bomba de flujo con un caudal de 0,1 ml/min, hasta aparición de disolución en la punta de la aguja. Entonces se detuvo bomba de flujo y se retiró la gota formada en el extremo de la aguja. Se seleccionó el caudal 0,005ml/min y se encendió la fuente de alimentación FC Series 120 Watt Regulated High Voltage DC Power Supplies (Glassman High Voltage, Nueva York, Estados unidos) en la cual previamente habíamos se había seleccionado como voltaje 20kV. Tras 15 segundos se apagaron ambas máquinas y se retiramos el colector. Durante estas experiencias se trabajó con unas condiciones ambientales de entre 23 y 25°C de temperatura y una humedad de entre el 30 % y el 35 %.

Las muestras obtenidas fueron observadas a través del microscopio óptico donde se observaron estructuras con una escasa cantidad de perlas (tipo de defecto, ver sección 6.1) tal y como se puede apreciar en las figura 22.

---

<sup>3</sup>No se describirá este proceso aquí, ya que de forma similar hubo que llevar a cabo una optimización en nuestro trabajo. Esta se detallará en el apartado 5.4 de esta sección. Ya que aquí se describe la configuración por la cuál se decidió optar finalmente.

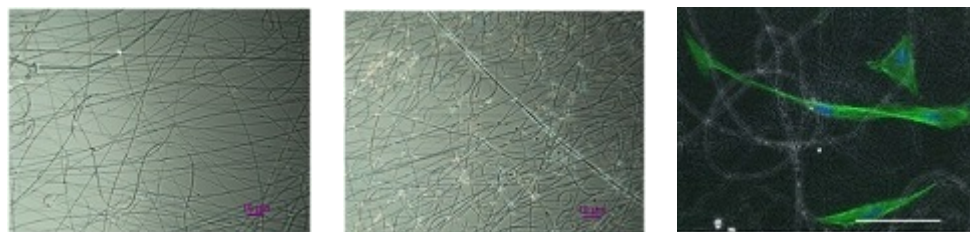


Figura 22: a y b. Imágenes al microscopio óptico de fibras con bajos defectos, obtenidas mediante electrospinning de electrodo puntual. c. Células adheridas a las fibras a las que se ha aplicado tinción.[12]

Tras el test de estabilidad(ver 5.3.4), consistente en sumergir las muestras en agua miliQ, ya que esta actúa como disolvente de fibras de cada polímero por separado, pero no de las fibras click. Se confirmó que se trataban de fibras entrecruzadas (click) ya que de no ser así estas se habrían disuelto. Después de llevar a cabo el cultivo de células [12] se pudo comprobar que los fibroblastos que quedaban adheridos a las fibras debido a las secuencias RGD de estas últimas. También quedó demostrado que las células adheridas encontraban un medio apto para su crecimiento y proliferación [12].

### 5.1.3. Problemáticas observadas para finalidad de alineamiento

Para comenzar los estudios de alineamiento de fibras, se comenzó por recrear los ensayos anteriores para empezar a manejar el equipo de electrospinning. Se lograron reproducir ensayos de recolección de fibras con condiciones similares a las del apartado anterior, no obstante, se observaron algunas problemáticas que podían suponer problemas durante la realización de los futuros experimentos. El principal problema que se observaba era la repetibilidad de los mismos. Dada la baja temperatura ( $37^{\circ}\text{C}$ ) de transición (TTI) de la reacción click entre los dos polímeros ensayados, era bastante sencillo que se produjeran obstrucciones por gelificación de la disolución en los conductos de PTFE (VWR, Barcelona, España. ref.19-0041-01), a, que se utilizaban, así como en las uniones entre estos que eran de material plástico y removibles, en cada ensayo se roscaban al tubo de Teflón PTFE, figura 23. Debido a esto, con la repetición de ensayos, las uniones roscadas se desgastaban, generándose puntos por donde se producían fugas de disolución. Los procesos de limpieza de gel y recarga, llevaban excesivo tiempo, por lo que en muchas ocasiones se aminoraba el número de ensayos realizables al día. Por estas razones, a fin de mejorar la repetibilidad y el tiempo de preparación de ensayo, se optó por cambiar a otro tipo de tubos capilares.

En el laboratorio, existían otros dos tipos de tubos capilares, que se encontraban allí como repuestos para otros ensayos realizados anteriormente a lo aquí descrito [3]. Se observó que a diferencia de los utilizados hasta ese momento, eran tubos monoetapa, es decir, la unión entre la jeringa y la aguja era una sola pieza de cable, por tanto, al implantarlos, se acababa con el problema de las fugas. Se probaron los dos tipos de tubos, resultando, que los primeros (Prolonsend), figura 23 b, se deshacían al contacto con el disolvente utilizado, se desestimó el uso de estos; pues si podían ser válidos para ensayos con otro tipo de disolventes, pero no para el TFE. Finalmente se optó por utilizar en cada ensayo los tubos no solubles, figura 23 c. Con esta modificación, fue posible realizar ensayos con un muy inferior tiempo de preparación, ya que la limpieza y colocación de los tubos era mucho más rápida, aunque siguiesen produciéndose gelificaciones en el interior. También se eliminaron las fugas, evitando parones durante los ensayos y desperdicios.



Figura 23: a. Tubos capilares multietapa PTFE del estado inicial. b. Tubos plásticos monoetapa solubles al disolvente 2,2,2 TFE. c. Solución adoptada, material plástico no soluble (Argon Comp PR Line10 in CLR)

Puesto que como se verá más adelante, eran muchas las ideas y modificaciones las que se tenía previsto probar, la tasa diaria de ensayos, se vislumbraba que iba a ser alta. Debido a esto se vio la necesidad de modificar, además de los tubos, la ergonomía del equipo y el puesto de trabajo que encontramos a la llegada al laboratorio, figura 24. El siguiente punto problemático que se observó para poder realizar ensayos. Se introdujo una segunda modificación. Se ordenaron los elementos de electrospinning de tal manera que el equipo pudiera ser más versátil en caso de necesitarse introducir un motor para un elemento rotatorio y que la accesibilidad a la urna de metacrilato fuera mejor, desde el punto de vista de que habría que tener continuo acceso al interior. En la figura



Figura 24: a. Disposición de los elementos del equipo de electrospinning al comienzo [45] b. Configuración después de las modificaciones.

## 5.2. Planteamiento Doble Electrodo-Gap

Como se ha mencionado anteriormente, paralelamente a la puesta en marcha de los experimentos y la introducción de modificaciones, se realizó una revisión preliminar del estado del arte en los estudios de los últimos años sobre electrospinning para obtener fibras con alineamiento. Si bien, la idea inicial del trabajo era la obtención de las mismas mediante algún tipo de colector que implicase rotación, siendo un método versátil, cómo se vió en la sección 3.4, y que era ampliamente empleado en muchas publicaciones recientes. Entre la bibliografía, se observó que no eran pocos los estudios que trabajaban a partir de la idea original de Dan Li et al (2004) [40].

Esta metodología, que implicaba gran sencillez, consistía en coleccionar fibras alineadas, a partir de dos electrodos de silicio longitudinalmente paralelos figura , conectados a tierra. En la sección 2.2.1, se dió una breve explicación del método.



Figura 26: a. Tornillo en u, utilizado para colocar un doble electrodo. b. Vista frontal de las placas paralelas.

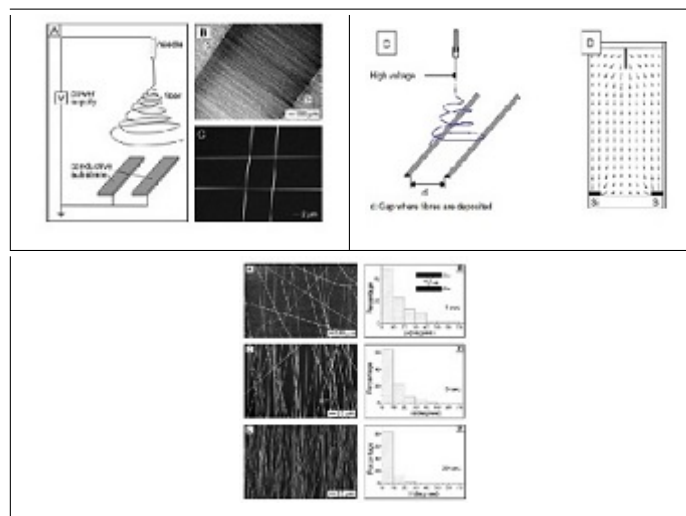


Figura 25: aa. Esquema de la configuración. ab. Imágen al microscopio de las fibras obtenidas en el estudio de Dan Li et al. ac. Variación para coleccionar en dos direcciones perpendiculares [40]. b. Campo eléctrico creado, sección 2.2.1. c. Imágenes al microscopio de resultados de Li et al [40]

Debido a la sencillez de implantación de este método, decidió probarse previamente a formas más complicadas. La idea inicial para llevarlo a cabo fue el uso de un tornillo doblado en U, con una distancia de separación entre puntas de 55 mm, que actuaría como electrodo conectado al cable de tierra de la fuente de alimentación mediante una pinza, de forma similar al uso del tornillo de cabeza plana como electrodo puntual, también insertado en un trozo de porexpán, para reducir el campo eléctrico actuante, a la zona donde se situaban las placas. Sobre cada punta del tornillo, se colocarían placas finas de metal paralelas entre sí (figura ). La unión entre tornillo y placas, se haría mediante tuercas. Se recubrió con celo las zonas traseras del tornillo para tratar de aislar el campo eléctrico en la zona frontal del electrodo.

Con este colector se realizaron un total de 3 pruebas, sin reacción click, para una sola disolución de VKVx24 no modificado con ciclooctino en TFE, con los parámetros indicados en el cuadro 6. En la primera de ellas, se colocó el electrodo desnudo, a fin de ver similitudes con el ensayo básico de electrodo puntual<sup>4</sup>. Para otras pruebas, a fin de evaluar si se depositaban fibras entre

<sup>4</sup>De ahora en adelante, se tendrá en cuenta la configuración de electrodo puntual como

ambos extremos, se colocó un vidrio rectangular entre ambas placas. No se tomaron medidas de humedad ambiental o tiempo de exposición.

Ensayo	Concentración (mg/ml)	Caudal (μl/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Polímero
1	75	5	18	9	-	24	-	VKVx24 <sup>5</sup>
2	75	5	20	9	-	24	-	VKVx24
3	75	5	22	9	-	24	-	VKVx24

Cuadro 6: Valores de los parámetros para los primeros ensayos.

### 5.2.1. Variación del tamaño del colector

Los resultados obtenidos de los ensayos reflejados en el apartado anterior no revelaron existencia de fibras sobre los colectores de vidrio que fueron observados al microscopi. Se observó abundante spray, una especie de polvo con gran densidad de gotas de disolvente.

Se revisó bibliografía de electrospinning[13, 40]que emplease este método , y se vió que la distancia entre electrodos para que hubiera un correcto depósito de fibras entre ambas placas, debía de ser mucho menor, en el orden de 4 a 20 mm [13].

También se comprobó que el tamaño del electrodo era demasiado grande y que era una causa que contribuía a la formación de electospray [40]. Por las anteriores razones, se decidió cambiar el tamaño del electrodo, manteniendo la idea de un tornillo en U, adquirido en material de ferretería, Este nuevo tornillo, tenía una distancia entre puntas de 21 mm de diámetro, figura 27 a. Sobre él se acoplaron mediante tuercas, de igual modo al caso anterior, dos placas de dimensiones menores, figura 27 b.



Figura 27: a. Nuevo electrodo de 21 mm de separación. b. Montaje con placas de aluminio.

referencia básica para el resto de ensayos.



### 5.2.2. Resultados y problemáticas encontradas.

Los ensayos realizados con esta modificación fueron bajo los mismos parámetros que se habían aplicado en el caso del electrodo grande de la sección anterior, a su vez, los parámetros de distancia, caudal y concentración, eran los mismos del electrodo puntual, por considerarse de partida estos como óptimos, aunque no se realizara reacción click en estas pruebas y se utilizará aguja simple 4.1.5.

Se realizó un barrido de voltaje de 20kV a 30 kV en variaciones de 2kV por ensayo, los tiempo de exposición fueron altos, del orden de un minuto, pues quería observarse bien el comportamiento del chorro eyectado más que obtener unos resultados óptimos.

Los resultados fueron dispares, se observó un spray sobre las placas para los voltajes de 20 a 22 kV, lo que podía indicar que el chorro no era estable y que por tanto, el campo eléctrico creado por estas placas no estaba igualmente dirigido que el creado por el electrodo puntual.

Para los voltajes superiores(24-30 kV), se observaron fibras a simple vista entre aguja y colector. Tras el tiempo de exposición, las placas y el hueco quedaron ampliamente cubiertas de fibras de aspecto blanquecino.

La zona dónde se esperaba encontrar fibras con alineamiento, el hueco entre las dos placas, presentaba tras los ensayos 24-30 kV una zona de aspecto uniforme en las que a simple vista se observaba la disposición de fibras perpendicularmente a ambas placas en el hueco, como puede verse en la figura 27 b.

Observar al microscopio este tejido de fibras se hizo muy complicado, ya que el más mínimo movimiento de las placas al retirar las tuercas provocaba la rotura o desplazamiento de las fibras situadas en el hueco entre ellas. No obstante pudieron realizarse algunas observaciones sobre algunos fragmentos que quedaron depositados en los bordes de las placas de aluminio o retiradas del material fibroso con trozos de vidrio. No obstante estos fragmentos de fibras al retirarlos o al romperse se desplazaron o deformaron, no siendo posible observarlos como quedaron depositadas en el ensayo, no obstante puede observarse cierta alineación, figura 28 a.

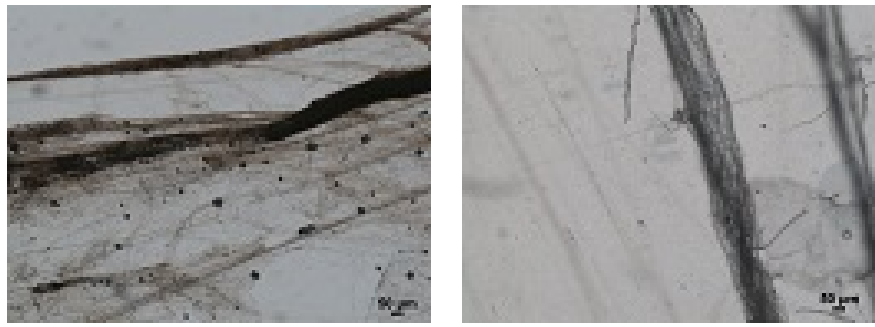


Figura 28: Fotografías al microscopio de fragmentos de fibras depositadas en el hueco entre electrodos.

Se había conseguido la formación de fibras sobre este tipo de colector, ahora lo importante era poder observarlas al microscopio para comparar con los resultados obtenidos con la bibliografía revisada. Para ello, se hacía necesario disponer las fibras en algún elemento que permitiera la depositación sobre ellas, sin modificar el resultado una vez las fibras quedaban en el hueco entre ambas placas. Se decidió colocar algún tipo de material removible en la zona que comprendía el hueco, con la finalidad de poder retirar las fibras colectadas en el hueco sin que estas se movieran o rompieran al hacerlo. Por ello, se utilizaron dos placas más para situar un trozo de plástico entre ellas.



Figura 29: Lámina de plástico entre las dos placas colectoras.

Se realizaron 2 ensayos con las mismas condiciones que en el caso previo. y u voltaje de 24 kV. La solución anterior, no dio el resultado esperado, las fibras quedaban adheridas unicamente a la parte metálica, si bien el objetivo del plástico era que las mismas se depositasen sobre este al retirarlo, siguió sin ser posible evitar la rotura o deformación de las mismas. Por esta razón, se abandonó el intento de implementar este tipo de colector.

### 5.3. Planteamiento Colector Rotatorio

El uso de colector más simple como el doble electrodo, se mostró cómo una alternativa no viable para las condiciones en que fue implantado. Se optó

entonces por implantar el tipo de colector que teníamos como idea principal del trabajo: la solución que implica el uso de un elemento rotatorio. En la sección 3.4, se describieron varios tipos de colectores rotatorios que se habían desarrollado en diferentes estudios de los últimos años para la obtención de fibras alineadas. Como elemento generador del movimiento, se disponía en el laboratorio de BioForge de un agitador químico, ver sección 4.1.7. Esto implicaba añadir un nuevo parámetro a los que ya se manejaban, la velocidad de rotación del elemento colector, que ha de ir, principalmente en consonancia con el parámetro velocidad de flujo, y en menor medida con el campo eléctrico generado, pues la conjunción de estos, influye en el alineamiento logrado, la longitud de la fibra y la morfología, pudiendo ocasionar rotura de las fibras una velocidad de rotación no conforme a la de salida por el capilar [51]

Primeramente se probó una forma sencilla, el uso de un tubo metálico.



---

Figura 30: a. Colector con tubo rotatorio simple. b. Parrilla rotatoria utilizada como segundo. c. Parrilla rotatoria con eje.

### 5.3.1. Tubo metálico simple

Se utilizó un tubo metálico de 33 mm de diámetro y 40 cm de longitud encontrado entre el material auxiliar del laboratorio, se recubrió con cartón los extremos del mismo y se apoyo en un extremo de la urna de metacrilato y se conectó al agitador por medio de un adaptador. La conexión a tierra, se realizó por medio de un alambre metálico, enrollado al tubo y que giraba no solidariamente, realizando un efecto escobilla<sup>6</sup>, figura 31, para tratar de dirigir mejor las fibras en la dirección del capilar y que se depositaran en la zona central del tubo, donde se había colocado un trozo de papel de aluminio adherido al tubo metálico, y que no se desplazasen oblicuamente hacia otros puntos del tubo, en los ensayos, se colocó el electrodo puntual con el aislamiento de porexpán, por detrás del tubo, en su zona central.

---

<sup>6</sup>Forma de poner dos elementos en contacto superficial para transmitir la corriente eléctrica



Figura 31: a. Tubo metálico simple. b. Parrilla unida a eje para conectar al agitador y escobilla par conexión a tierra. c. Ensayo estático con parrilla desnuda.

	Concentración (mg/ml)	Caudal ( $\mu$ l/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Colector	Complemento	rpm
1	75	5	24	9	Tubo metálico	-	550
2	75	5	24	9	Tubo metálico	-	800
3	75	5	24	9	Tubo metálico	Electrodo puntual	1150
4	75	5	22	9	Tubo metálico	Electrodo puntual	550
5	75	5	22	9	Tubo metálico	Electrodo puntual	800
6	75	5	22	9	Tubo metálico	Electrodo puntual	1150

Cuadro 7: Ensayos realizados con colector tubo metálico.

En la figura 7, se recogen los 6 experimentos realizados con este colector, se mantuvieron constantes los valores de caudal, concentración y distancia colector-aguja, que se habían venido utilizando tanto en electrodo puntual como en doble electrodo, se probó con el electrodo puntual tras dos ensayos sin él y se variaron valores de velocidad angular y voltaje. A la conclusión de estos experimentos empleando el tubo metálico, no se había logrado depositar fibras sobre los colectores de papel de aluminio que se situaron en cada ensayo adheridos al tubo. En todos los casos, se obtuvo sobre los mismos electro spray (sección 3), figura 32, se ve cómo las fibras se rompen y aparecen fragmentos de gel, con numerosas gotas de disolvente no evaporado.

Se establecieron varias hipótesis a las cuales se asocian estos resultados:

- Colector demasiado grande. El tubo metálico probado podría, por sus dimensiones generar un campo eléctrico muy extenso.
- Distancia insuficiente entre colector y aguja dadas las dimensiones de este.

- Voltaje elevado. Se trabajo con voltaje siempre por encima de 20 kV, cuando podría haber sido recomendable bajarlo por el tamaño de colector.

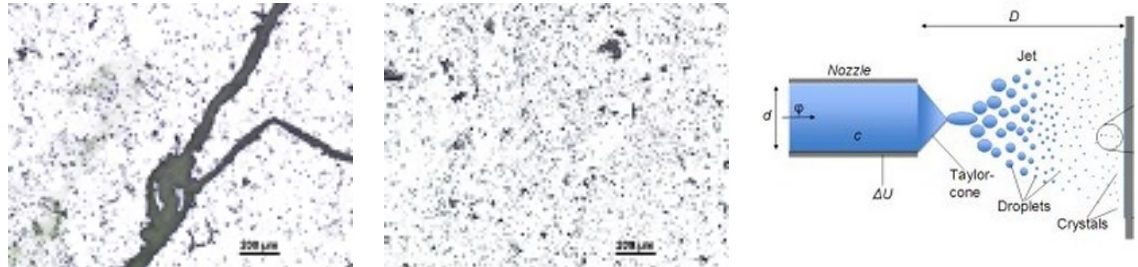


Figura 32: a. Muestras de electrospay. b. Esquema de electrospay [23]

No poder esclarecer una causa singular de estos resultados y la no obtención de fibras en ninguno de los intentos realizados, llevó a pensar en cambiar el tipo de estrategia de colector rotatorio, con unas menores dimensiones, que permitiera tener un mejor control de las variables algo que se detalla en la siguiente sección. También, empezó a tenerse en consideración las variables ambientales, de humedad y temperatura, haciendo uso del higrómetro, sección 4.1.8.

### 5.3.2. Parrilla rotatoria

Se pensó en utilizar algún tipo de tubo más pequeño o con algún elemento añadido, del estilo a cómo se muestra en la sección 2.2.1. De experimentos previos, sabíamos que en un hueco entre dos electrodos las fibras se alinean perpendicularmente a los elementos paralelos, también sabemos, de la sección 3.4, que el uso de un tubo colector rotatorio permitía obtener fibras (aunque aún no se hubieron logrado de esta manera), y que además una evolución de este consiste en el uso de un cable metálico repartido en la cara lateral de un cilindro rotatorio, también había dado resultados satisfactorios en [34]. Por todo ello, se pensó en utilizar como cabezal para el colector, algún tipo de elemento rotatorio, que pudiera aunar las posibilidades de un colector tipo cable y tubo, y las del electrodo simple con el gap.

Entre el material desechado de un equipo informático, se encontro una parrilla de aletas para disipación de calor del microprocesador, figura 30, que cumplía una serie de características que la hacían muy apata para ser utilizada como cabezal del colector rotatorio y poner en práctica las anteriores ideas:

- Numerosos espaciados metálicos paralelos, lo cual era una garantía para que perpendicularmente a estos colector fibras alineadas en cada uno de los intersticios.

- Se la podía hacer rotar sin demasiado desequilibrio, dado que era un elemento simétrico, aunque su peso era algo elevado para la forma en que iba a sujetarse al motor. Por ello, se le practicó un taladro en el centro para quitarle peso.
- Las dimensiones del elemento eran suficiente grandes como para poder obtener entramados de fibras de una longitud elevada.

Para comprobar la veracidad de los anteriores supuestos, primeramente se hicieron algunos ensayos de electrospinning sobre la parrilla en estático, sin ningún tipo de recubrimiento, de tal manera que se comprobaría si la fibra se depositaba sobre el metal desnudo de la parrilla. Se situó la parrilla en el interior de la urna de metacrilato y se utilizaron los parámetros de la figura 33, en diferentes ensayos. La parrilla es directamente conectada al cable de tierra de la fuente de alimentación, figura 30.

El resultado, con los parámetros de ensayos recogidos en la figura 8 fueron parrillas altamente recubiertas de fibras de polímero, que mantenían en todos los intersticios alineación perpendicular a los mismos. En la cara lateral, el grado de alineamiento se mostraba mejor incluso que en la superficie cilíndrica situada frontalmente a la aguja, figura 31 b. Se incrementó la distancia de ensayo en 3 cm y se probaron cambios en el potencial y caudal para evitar la formación de electrospray como en el tubo simple.

Una vez observada la recolección de fibras con alineamiento sobre la parrilla en estático, se adherió a la parrilla mediante pegamento de contacto, una pieza metálica de revolución con un esbelto eje que sería el medio para darle el movimiento de rotación a la misma. Se tenían dos piezas prácticamente iguales, la diferencia radicaba en la parte esbelta del eje. Primero se utilizó la menos esbelta, pero tras varios ensayos, el eje de esta comenzó a flexionar, siendo este hecho cada vez más notable, figura 33 c. Este hecho, inducía vibraciones notables al motor durante los ensayos, lo que provocaba desplazamientos de la caja-bastidor donde este apoyaba, lo que movía la posición de la parrilla, impidiendo el alineamiento, en un momento dado, girar a más de 900 revoluciones no era factible y coincidiendo con una mayor flexión del eje esbelta tras un ensayo, se optó por despegar este último y pegar la otra pieza similiar, pero con un eje más robusto.

Este nuevo eje, figura 33 c, no daba problemas de vibraciones, incluso permitía revoluciones cercanas a los 2000 rpm (valor máximo del agitador), y soportaba el peso sin flexionar, por lo que es el eje que fue utilizado para conectar al agitador en el resto de experimentos de optimización. La unión de este eje con el agitador, se hacía por su extremo, donde el eje se hacía más fino y podía ser agarrado por las garras. Todo el conjunto metálico: parrilla y eje, fueron conectados a tierra por medio de un hilo metálico enrollado alrededor del eje de forma uniforme, figura 33 c, y que no giraba solidariamente al mismo, sino permitiendo el deslizamiento relativo, este tipo de conexión, se conoce como

de escobilla.

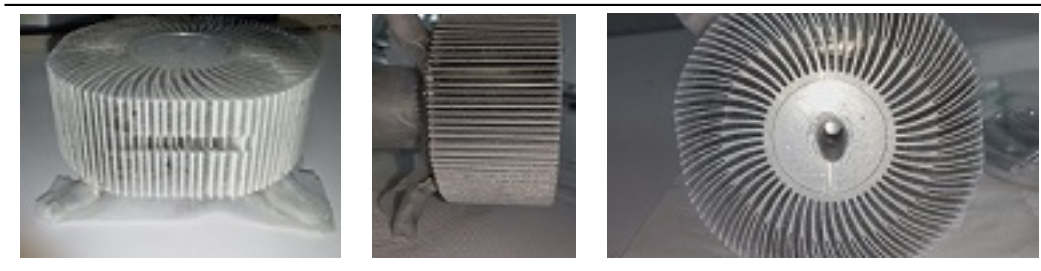


Figura 33: a. Fibras depositadas en la superficie de la parrilla.

	Concentración (mg/ml)	Caudal ( $\mu$ l/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Humedad (%)	Posición
1	75	5	20	12	24.3	33	Parrilla estática
2	75	4	22	12	24.3	33	Parrilla estática
3	75	4	24	12	24.1	32	Parrilla estática

Cuadro 8: Ensayos realizados con parrilla estática sin recubrimiento.

### 5.3.3. Presentación de las muestras

Al utilizar un colector con esta geometría, se presentaba nuevamente la problemática de hacer que las fibras se depositasen en un sustento que permitiera recoger muestras con similares características para la observación al microscopio, y que no modificase la forma en que estas se alineaban en los intersticios de la parrilla.. Además la unica posibilidad era la de recubrir la parrilla, sin que se aislase o se magnificase el campo eléctrico, con la esperanza de que las fibras se depositasen sobre la parrilla recubierta de igual manera a como lo hacían sobre la parrilla desnuda. Para ello se probó con papel de aluminio, al que se le dio la forma de la cara lateral de la parrilla y de la superficie frontal cilíndrica. Ambos adheridos por cinta adhesiva a la parrilla, de tal manera que para retirar una muestra, los fragmentos de papel de aluminio se agarrasen por las zonas dónde estaba adherido el celo, para no dañar el material recogido en la muestra. El papel de aluminio tiene la ventaja de adaptarse completamente a la forma de los intersticios de la parrilla, y de no generar aislamiento del campo. Los fragmentos de papel de aluminio para la cara lateral, se cortaron en tiras de 22 cm de longitud y 4cm de ancho, para dar homogeneidad a las muestras, estas tiras se adaptaban a la cara frontal. Para la cara lateral, las muestras siempre presentaban el diámetro de la parrilla al adherirse perfectamente a esta y seccionarse por sus bordes.

Se probaron estos recubrimientos de papel de aluminio en diferentes ensayos, como resultado, para cada ensayo, se obtenían dos muestras de papel de aluminio recubierto de fibras de polímero, una circular, donde la alineación era en esa dirección, y otro trozo rectangular que recubría la superficie cilíndrica y dónde las fibras se situaban paralelas a la mayor longitud, figura 34,

dependiendo de las condiciones del ensayo, con mayor o menos grado de alineamiento. Las condiciones probadas para tratar de depositar fibras sobre el papel de aluminio fueron las mismas que cuando se ensayó la parrilla desnuda en estático sin recubrimiento.

También se probó otro material como recubrimiento para recoger las muestras: lámina de plástico tipo PET, con recubrimiento de óxido de indio dopado con estaño con resistividad de 45 Ohmios/m, denominado comercialmente «ITO coated PET» (Sigma-Aldrich). Se trata de un material conductor de la corriente y que por tanto no genera el efecto aislante que podría atribuirse al plástico. La desventaja que presentaba al compararlo con el aluminio, era su rigidez, que impedía un mejor moldeado de la forma de la parrilla, ya que la causa principal de alineamiento de las fibras era la presencia de intersticios, con el ITO, al no adaptarse a los mismos, el alineamiento y distribución de fibras era peor, aunque sí que había una correcta deposición de las mismas.

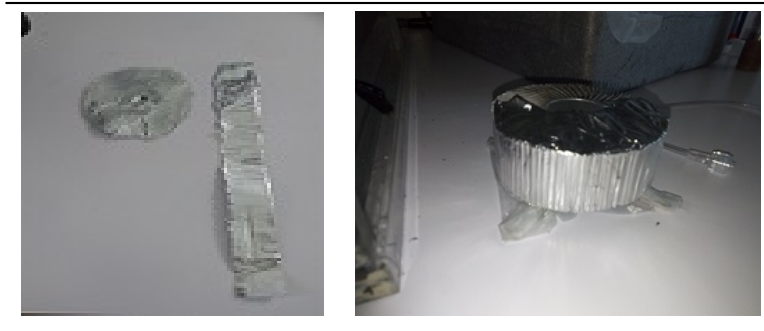


Figura 34: a. Muestras para colección de fibras. De izq. a dch., recubrimientos lateral y frontal. b. Material colocado sobre la parrilla

	Concentración (mg/ml)	Caudal ( $\mu$ l/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Humedad (%)	Posición Parrilla	Material Colector
1	75	5	20	12	24.2	33	estática	Aluminio
2	75	4	22	12	24.5	33	estática	Aluminio
3	75	4	24	12	24.3	32	estática	ITO PET
4	75	5	20	12	24.1	32	rotatoria	Aluminio
5	75	4	22	12	24.1	32	rotatoria	Aluminio
6	75	4	24	12	24.3	32	rotatoria	ITO PET

Cuadro 9: Parámetros de ensayos para materiales de recubrimiento.

#### 5.3.4. Test de agua

Es una prueba simple que consiste únicamente en sumergir en agua MilliQ fría durante varias horas la superficie con las nanofibras sintetizadas por electrohilado. Estas fibras han sido irradiadas mediante luz UV, con lo que debido al carácter fotosensible del polímero modificado, se han entrecruzado



alcanzando un estado de gel. El gel entrecruzado es insoluble en agua fría, por lo que el objetivo de esta prueba es comprobar si se han entrecruzado totalmente las fibras. Entonces, en el caso de que el polímero se haya entrecruzado correctamente, las fibras no se disolverán en agua fría y al secarlas mediante una estufa a 37°C seguirán estando recubiertas. Sin embargo, si no ha habido gelificación, las fibras del polímero se disolverán de nuevo en el agua fría, quedando la superficie del colector limpia de fibras.

#### 5.4. Optimización de resultados.

En la sección anterior, habíamos concluido en que el cabezal sería una parrilla de aletas desipación de calor, para conectar esta al motor-agitador eléctrico se utilizó un eje robusto de sección variable, de dimensiones similares en diámetro a la parrilla, que permitía la rotación a altas velocidades ( $\pm 2000\text{rpm}$ ) con baja vibración, pasaron a realizarse ensayos siempre con velocidad angular variable.

Se había optado por el aluminio adherido a la parrilla para coleccionar las muestras. Se habían obtenido fibras con alineamiento en los ensayos realizados con estas condiciones en estático y rotatorio. Se trató de comprobar si las fibras obtenidas en ensayos con la parrilla coleccionadora en movimiento daban unos mejores resultados en la orientación de las fibras obtenidas. Sobre las fibras preliminares, se observaban defectos:

- Grandes gotas de disolvente sin evaporar.
- Lo que se conoce como perlas, gotas de disolvente más pequeñas, con polímero hecho gel.
- Las fibras contenían demasiados grumos, figura 32 b..
- El grado de alineamiento de las fibras variaba de unas muestras a otras.

Un proceso de optimización de la calidad de las fibras, se hacía necesario, de similar manera a los seguidos en otros trabajos con electrospinning en este laboratorio [3, 45, 12] Todo ello asegurando un buen grado de alineamiento sobre las estructuras a optimizar.

Logrados estos objetivos anteriores, se habría completado el objetivo del trabajo, que recordamos era diseñar un sistema para coleccionar fibras alineadas y producir muestras repetibles y con parámetros optimizados.

En la sección 6 se recoge una cronología del proceso de optimización y sus resultados con las imágenes al microscopio.

## 6. Resultados y discusión.

### 6.1. Defectología y repetibilidad

La dificultad para obtener muestras sin apenas defectos, fue problemática con las nuevas soluciones probadas. Recordando lo tipos de defectos que suelen observarse, de los que se habló en la sección 3.3, los defectos más comunes que se pueden observar en muestras de electrospinning son:

- **Gotas de disolvente sin evaporar:** Cuando las fibras son eyectadas, evaporan el disolvente en la distancia entre el capilar y el colector.
- **Fibras con grumos:** En lugar de ser una fibra continua y de sección constante, se producen discontinuidades grumosas en las fibras obtenidas. Fueron eliminadas por completo con un aumento de concentración, pasando al rango 100-120 mg/ml.
- **Perlas:** Son fragmentos de fibra que se rompen y que no evaporan correctamente el disolvente.

En los ensayos de optimización quedó más o menos patente que eliminar por completo todos los defectos, especialmente las perlas, no era sencillo, no obstante fueron muy buenos los resultados finales comparados con los defectos obtenidos en las fibras al comienzo de esta fase de optimización. También la alineación de las fibras no era exactamente igual de unas pruebas a otras en todos los casos, la viscosidad o las vibraciones de el motor, cambiaban la forma en que la fibra eyectada se depositaba en el chorro. Se vió que la humedad ambiental influía en gran manera en el ratio de evaporación de disolvente, es decir cuándo por ejemplo trabajamos a humedad ambiental del 29 %, se observaron muchos menos defectos asociados a la evaporación del disolvente, bajo el resto de parámetros iguales, que al trabajar a 33 % de humedad.

Se observó que la repetibilidad del proceso de electrospinning bajo las condiciones de trabajo, era baja, es decir conseguir muestras muy similares de unos ensayos a otros requería un control muy alto de las condiciones de funcionamiento y parámetros, ya que un *ligero desvío de condiciones óptimas podía modificar notablemente el resultado*

En las primeras muestras obtenidas sobre el papel de aluminio fijado sobre la superficie externa de la parrilla, como cabezal del elemento rotatorio, se observaba presencia de defectos:

- Grandes gotas de disolvente sin evaporar.
- Fibras grumosas [19].

- La alineación de las fibras no era totalmente paralela a la dirección de eyección en la zona frontal de la parrilla, no así en la cara lateral, donde las fibras se colectaban en dirección radial.
- Fragmentos de fibras rotas envueltas en disolvente, llamados perlas.

Las imágenes al microscopio de los resultados obtenidos en esta primera fase, se muestran en la figura 35. Los parámetros utilizados se dan en el cuadro 10 y son los parámetros de partida que se utilizaron durante las comprobaciones de la fase experimental y las variaciones ambientales.

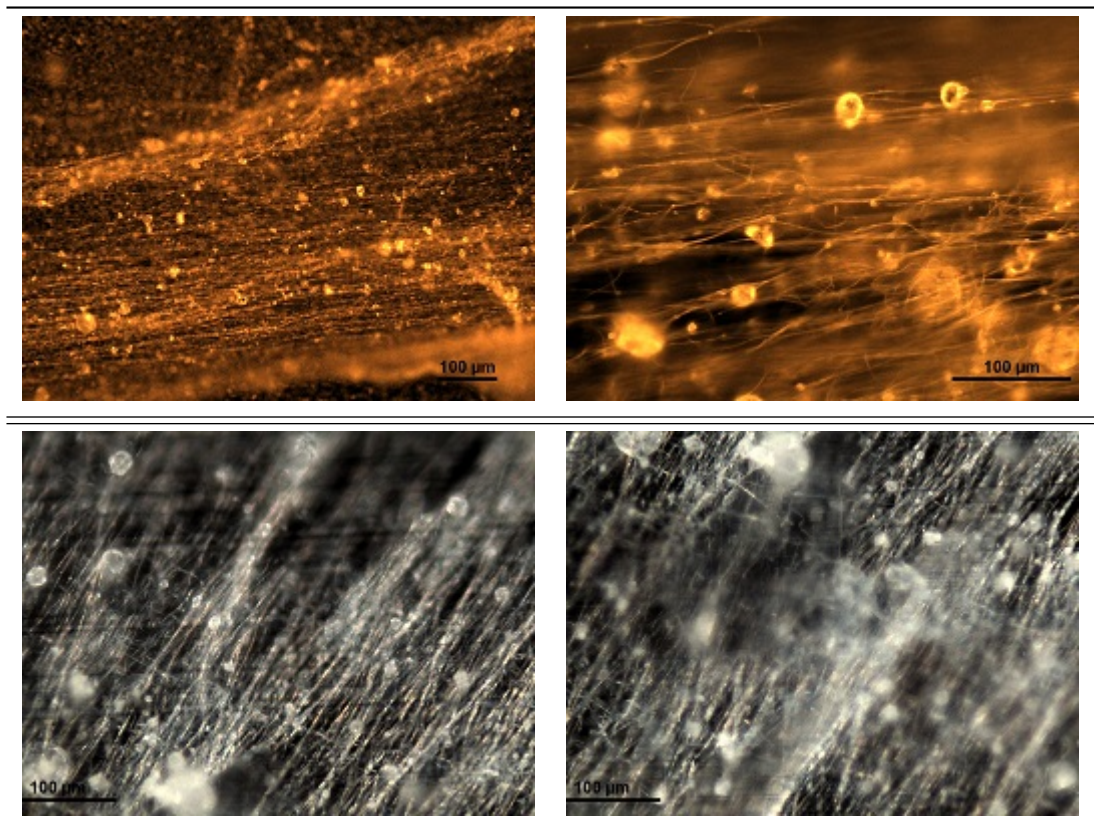


Figura 35: Punto de partida para optimización de resultados.

Concentración (mg/ml)	Caudal (μl/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Posición
75	5	22-26	9-13	> 40	24-25	33-35	900-1200

Cuadro 10: Parámetros del punto de partida para optimización de resultados.

## 6.2. Eliminación de gotas de disolvente.

Cómo defecto más grave, las gotas de disolvente eran el primer aspecto a eliminar de las muestras. Otros trabajos como [43, 17]y[3] sugerían que las

principales razones para la formación de gotas en las muestras estaban en las razones para una mala evaporación del disolvente. Los parámetros que tenían influencia en ello eran el voltaje en relación al caudal, la distancia y la humedad ambiental. Un ajuste grueso fue una bajada de voltaje a 18 kV frente a los 20 utilizados anteriormente como valor más bajo y una disminución del caudal inferior a 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . se probaron nuevas distancias entre aguja y colector. Los mejores resultados logrados bajo estas condiciones, se recogen en la figura 36. Se observa cómo sigue habiendo perlas pero el disolvente se ha eliminado.

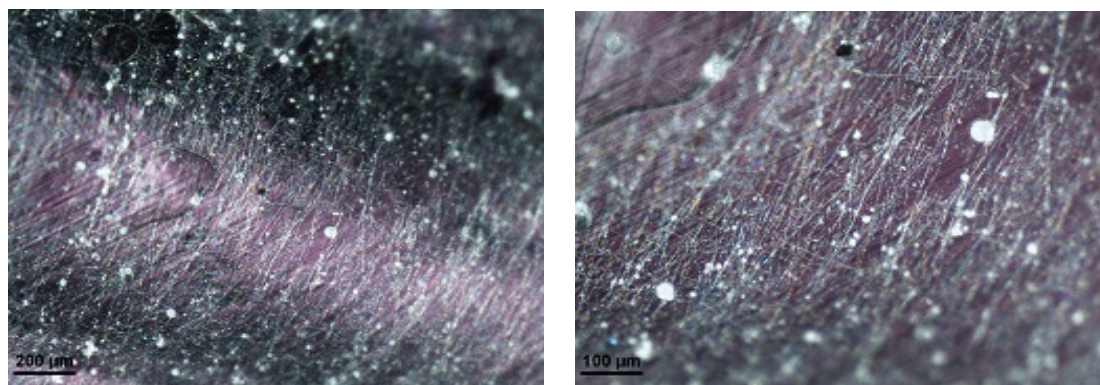


Figura 36: Ensayos para eliminación de gotas grandes de disolvente.

Concentración (mg/ml)	Caudal ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Tiempo (s)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Humedad (%)	rpm
100-125	3.5	18-20	9-13	>40	22-25	33-35	900-1200

Cuadro 11: Parámetros de ensayos para eliminación de gotas de disolvente.

### 6.3. Eliminación de Grumos

En el estudio de Fong, Chun y Reneker [19], se recogieron algunas pruebas para eliminar grumos de fibras de polímeros obtenidas por electrospinning, resultando algunas medidas que mejoran los resultados.

- Incremento de la concentración disminuye el nivel de grumos.
- Presencia de sales en la disolución disminuye el nivel de grumos.
- Incremento del voltaje aumenta el nivel de grumos si la distancia aguja colector es insuficiente, agravado si la tensión superficial es baja.

Por ello, se aumentó el voltaje en el rango 100-125 mg/ml, aunque siempre que fue posible, se trabajó a 125 mg/ml, ya que mejor era la disminución de fibras, cuanto mayor era esta concentración. Se ensayó en el rango 18-20 kV de

nuevo, observándose buenos resultados a aproximadamente a 19 kV para una distancia de 9cm, figura 37.

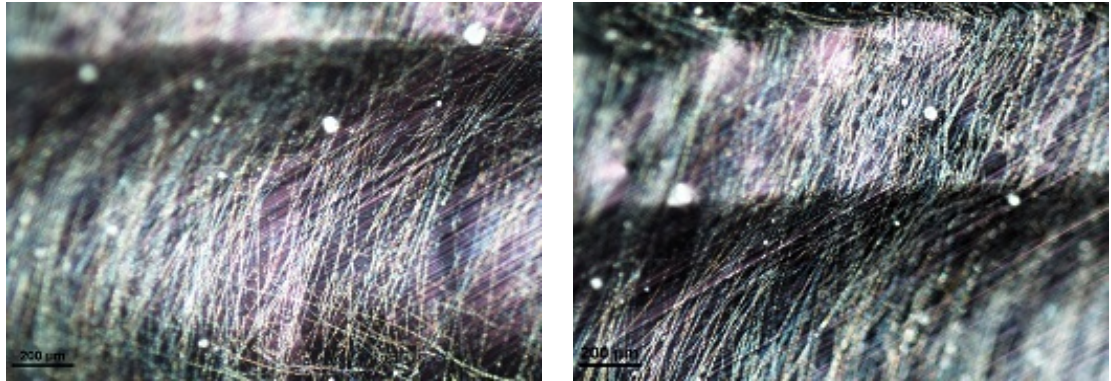


Figura 37: Resultado de ensayos para eliminación de grumos.

Concentración (mg/ml)	Caudal ( $\mu$ l/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Tiempo (s)	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Humedad (%)	rpm
100-125	3.5	18-20	9-13	>40	22-25	31-35	1100-1800

Cuadro 12: Parámetros de ensayos para eliminación de grumos.

#### 6.4. Mejora del alineamiento

Se presentaban problemas de ligeros desvíos de la dirección en que la fibra se depositaba en la cara frontal en relación a la dirección paralela a la aguja y capilar, que era la dirección deseada para el alineamiento. Algunos estudios [51, 28], aseguraban que en métodos de colector rotatorio, una mayor velocidad de rotación en el rango 1000- 000 rpm y que no rompiese la fibra al ser esta depositada aseguraban un mejor alineamiento. Se pensó en probar en aumentar la velocidad de rotación del cabezal rotatorio, se probó en el rango 1800-2000 rpm, que era el máximo que daba el agitador eléctrico.

Aumentar las rpm, significaba también un aumento en las vibraciones durante el tiempo del ensayo, por ello, se mejoraron las condiciones del bastidor de poliexpan utilizado para dar soporte al motor, se fijó con cinta y se le dio forma a la salida del cabezas. De este modo, se ganó estabilidad, la horizontalidad del cabezal también mejoró, con respecto al chorro eyecctado, todo esto mejoró el alineamiento de las fibras, figura 37.





Figura 38: Resultado de ensayos para mejora del alineamiento.

Concentración (mg/ml)	Caudal ( $\mu$ l/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Tiempo (s)	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Humedad (%)	rpm
125	3.5	18-20	9-13	>40	22-25	31-35	1800-2000

Cuadro 13: Parámetros de ensayos para mejora del alineamiento.

## 6.5. Eliminación de Perlas

En trabajos anteriores en BioForge [3, 45, 12], se sugería que el goteo que se produce en el capilar cuando no hay una salida de flujo no uniforme provocaba excesos de flujo para un voltaje ajustado a un caudal concreto, por lo que no se eyectan chorros con mucho disolvente, lo cuál provocaba formación de gotas y perlas. Recordamos que con modificaciones previas, se habían eliminado las gotas de disolvente. Para tratar de eliminar perlas, se realizó un ensayo de barrido de voltaje para ver en que valores de voltaje el chorro se hacía estable y se observaban menos inestabilidades en la punta del capilar. Aproximadamente a 20 kV se apreciaba un flujo estable, manteniendo los parámetros de las pruebas previas. También se señalaba en estos trabajos anteriores que el

aumento del caudal permitía tener un caudal más continuo ante posibles irregularidades, lo que favorecía la uniformidad del chorro, así como eliminar los goteos que se generan en la punta al cargar la jeringa, antes de encender la fuente de alimentación. Por ello, se elevó el caudal de prueba a 4  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Estas pruebas con los parámetros del cuadro 14, mejoraron los resultados por lo general. No obstante, un cambio muy notable en el nivel de perlas sobre las muestras, se observó en un día en que la humedad ambiental del laboratorio, era del 29%, uno de los valores más bajos que se habían registrado en el histórico de ensayos. Se relacionó entonces de forma predominante a la humedad ambiental con existencia de perlas y gotas de disolvente. Cuanto menor era esta, mejor se favorecía la ausencia de estos defectos en las fibras, figura 39

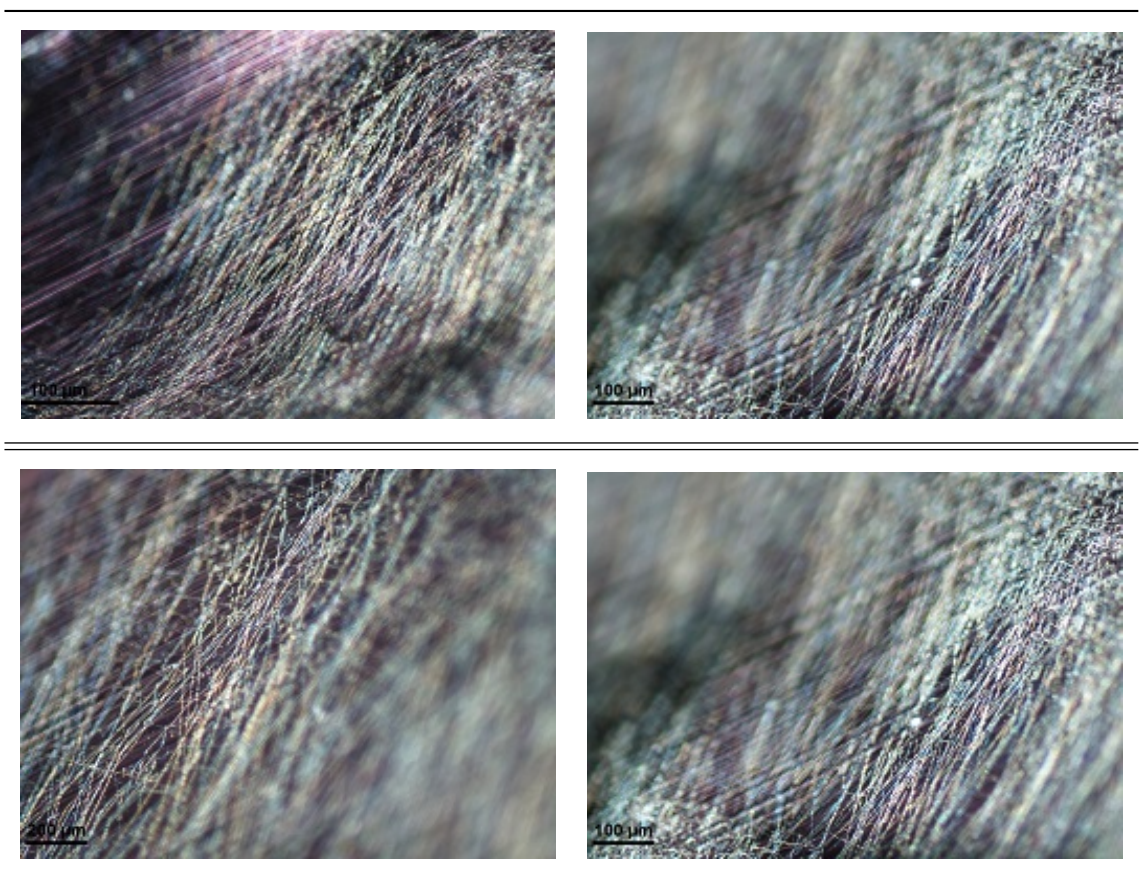


Figura 39: Resultado de ensayos para eliminación de Perlas.

Concentración (mg/ml)	Caudal ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Tiempo (s)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Humedad (%)	rpm
125	4	20	9	>40	22-25	29	1800-2000

Cuadro 14: Parámetros de ensayos para eliminación de perlas.



## 6.6. Disminución de la densidad

Una baja densidad de fibras puede ser más interesante para la proliferación celular que la densidad que teníamos en la muestra anterior que impide un correcto crecimiento. Si mantenemos las condiciones y modificamos el tiempo de exposición, bajando este a unos 10 segundos, bajo las condiciones de los ensayos previos, recogidos en el cuadro 15. El resultado se observa en la figura 40.

Durante esta prueba se observó que rápidamente el colector se llenaba de fibras y que con 15 segundos ya se observaba un recubrimiento muy denso, se pensó que el tiempo para el recubrimiento disminuía exponencialmente con el tiempo de exposición. Donde ya se observa una buena cantidad de fibras con los primeros segundos de exposición.

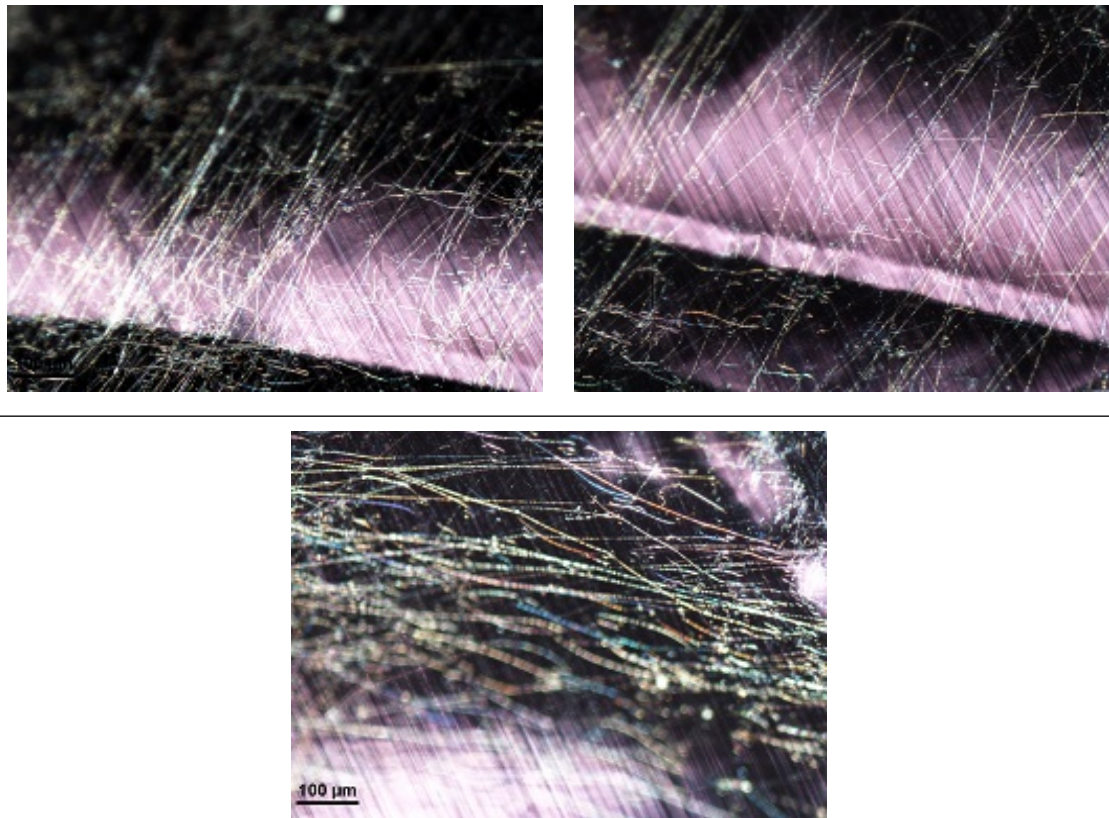


Figura 40: Ensayos para mejora de la densidad.

Concentración (mg/ml)	Caudal (µl/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	Humedad (%)	rpm
125	4	20	9	10	22-25	29	1800-2000

Cuadro 15: Parámetros utilizados para ensayos de mejora de densidad.



## 7. Conclusiones.

Durante el trabajo experimental, se llevaron a cabo un buen número de experimentos que permitieron llegar a los resultados que se mostraron en la sección anterior. A grandes rasgos, se lograron los siguientes objetivos:

- Mejora de la ergonomía y repetibilidad de un equipo de electrospinning.
- Implementación de un colector rotatorio para fibras alineadas.
- Disponer material sobrecolector adecuadamente para obtener muestras repetibles y manejables.
- Optimización de los resultados, eliminación defectos de las fibras que inicialmente se obtenían una vez implementado el método experimental.

Se comentó en varias ocasiones que uno de los objetivos era la producción de fibras con entrecruzamiento click entre los recombinámeros HRGD6-N3 y VKVx24-ciclooctino, mediante electrospinning de aguja coaxial. Sin embargo, debido a una parte experimental que fue más larga de lo esperado, quedó menos tiempo de laboratorio para la optimización de las fibras monocomponente producidas por electrospinning de aguja simple del recombinámero VKVx24 no ciclooctino, que era el paso previo a realizar ensayos con aguja coaxial y reacción click para obtener fibras entrecruzadas.

Se logró un buen resultado de optimización sin embargo no hubo tiempo de probar el coaxial click. De continuarse con este trabajo en el futuro, este podía ser un próximo paso, así como comprobar sus características citocompatibles con cultivos celulares sobre las fibras obtenidas.

## Referencias

- [1] Persano A. Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering*, 298:504–520, 2013.
- [2] Dekker AJ. *Electrical Engineering Materials Inc.* Prentice Hall, 1959.
- [3] Sardina D Alonso A. Electrohilado coaxial de nanofibras biocomponentes como sistema de bioactivación, biocompatibilización de biomateriales y encapsulación de fármacos. Master's thesis, Escuela de Ingenierías Industriales, Universidad de Valladolid, 2014.
- [4] F. Anton, US Patent 0330200 (1934).
- [5] A.G. Bailey. *Electrostatic Spraying for Liquids*. Wiley, 1988, New York.
- [6] Craighead HG Bellan LM. Applications of controlled electrospinning systems. *Polymer Advanced Technology*, 22:304, 2011.
- [7] Kundu SC Bharwaj N. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3):324–347, 2010.
- [8] Tassi NG Casper CL, Stephens JS. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules*, 37:573, 2004.
- [9] Sigma Aldrich: Aldrich ChemFiles, editor. *The Global Harmonized System (GHS). Codes and Pictograms*.
- [10] Dzenis Y Chew S, Wen Y. The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine. *Current pharmaceutical design*, 12(36):4751, 2006.
- [11] Ramakrishna S Chong EJ, Phan TT. Evaluation of electrospun pcl gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Mater*, 3:321–30, 2007.
- [12] Moreton Manso D. Electrohilado de recombinameros tipo elastina para la producción de nanofibras biocompatibles de reacción click con funcionalización de adhesión celular. Master's thesis, Escuela de Ingenierías Industriales. Universidad de Valladolid, 2016.
- [13] Yang D. Aligned electrospun nanofibers induced by magnetic field. *Wiley Interdisciplinary Reviews*, 2010.
- [14] Alexander L Darrell H, Reneker A. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of Applied Physics*, 87:4531, 2000.
- [15] Miguel Rivero de P; Rebollar Gonzalez EM. Diseño de experimentos para la optimización del medio de cultivo utilizado en un proceso biotecnológico de obtención de polímeros proteicos con potenciales aplicaciones médicas. Master's thesis, Universidad de Valladolid, 2008.
- [16] Yilgor E Demir MM, Yilgor I. Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer*, 43:3303, 2002.

- [17] Reneker DH Doshi J. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J. Electrostatics*, 35:151, 1995.
- [18] Adler RH Fano MR, Chun LJ. *Electromagnetic Fields, Energy, and Forces*. John Wiler & Sons, 1987.
- [19] Reneker DH Fong H, Chun I. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *polymer*, 40(16):4585–4592, 1999.
- [20] A. Formhals, US Patent 1 975 504 (1934).
- [21] Chronakis IS Frenot A. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Colloid and Interface Science Communications*, 8:64–75, 2003.
- [22] Pinedo G. *Development of nanostructures and highly functional systems with complex molecular architecture based on elastin like recombinamers*. PhD thesis, Facultad de Ciencias, Universidad de Valladolid, 2013.
- [23] Taylor G. Electrically driven jets. *Proc R Soc London, Ser A*, pages 313–453, 1969.
- [24] Fu GD. Hollow polymeric nanostructures synthesis, morphology and function. *Polymer Science*, 36:127, 2011.
- [25] Israel Gonzalez de Torre. *Biofunctional hydrogels based on elastin like recombinamers as extracellular matrix analogues*. PhD thesis, Universidad de Valladolid, 2015.
- [26] Jiang H. A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *J. Controlled Release*, 108:237, 2005.
- [27] Ramakrishna S Huang ZM, Kotaki M. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composite Science Technology*, 63:2223, 2003.
- [28] Chronakis IS. Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process, a review. *Journal of Materials Processing Technology*, 167(2):283–293, 2005.
- [29] Zeleny J. The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces. *Physical Review*, 3(2):69, 1914.
- [30] Rodriguez Cabello JC. Genetic engineering of protein based polymers: The example of elastin like polymers, in ordered polymeric nanostructures at surfaces. *Springer Berlind Heidelberg*, pages 119–167, 2006.
- [31] Rodriguez Cabello JC. Recombinamers as advanced materials for post oil age. *Polymer Journal*, 50:5159–5169, 2009.
- [32] Zhu Y Kang H. Fabrication and electrochemical property of ag doped sio2 nanostructured ribbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 356:120, 2010.
- [33] Kim HY Kanjwal MA, Sheikh FA. Spidernet within the n6 pva and pu electrospun nanofiber mats using salt addition: Novel strategy in the electrospinning process. *Polymer*, 50:4389, 2009.

- [34] Ramsier RD Katta P, Alessandro M. Continuous electrospinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector. *Nano Letters*, 4(11):2215–2218, 2004.
- [35] Baek DH Ki CS. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin formic acid solution. *Polymer*, 46:5094, 2005.
- [36] Matsuda T Kidoaki S, Kwon IK. Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials*, 26(1):37–46, 2005.
- [37] Beck T Kleinmeyer J, Harris D. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 42:261, 2001.
- [38] Sharpless KB Kolb HC, Finn MG. *Angewandte Chemie International Edition in English 2001*, volume 40. 2004.
- [39] Khil MS Lee KH, Kim HY. Characterization of nanostructured polycaprolactone nonwoven mats via electrospinning. *Polymer*, 44:1287, 2003.
- [40] Xia Y Li D, Wang Y. Electrospinning of nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer by layer stacked films. *Advanced Materials*, 4:361–367, 2004.
- [41] Tuan R Li W, Caterson E and Ko F. Electrospun nanofibrous structure a novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed Mater. Res*, 60:613, 2002.
- [42] Chu B Liang D, Hsiao BS. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 59(14):1392–1412, 2007.
- [43] Duque LM. Electrospinning: la era de las nanofibras. *Revista Ibero-Americana de Polimeros*, 14, 2013.
- [44] Rodriguez Cabello JC Machado A. Electrospun silk-elastin-like fiber mats for tissue engineering applications. *Biomedical Materials*, 8:065009, 2013.
- [45] Jesus Munoz Noriega. Electrohilado de nanofibras fotosensibles a partir de polimeros tipo elastina. Tfg, Escuela de Ingeniería Industriales. Universidad de Valladolid, Junio 2015.
- [46] Mikos AG Pham QP, Sharma U. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Engineering*, 12:1197–1211, 2006.
- [47] Baumgarten PK. Electrostatic spinning. *Interface Science*, 19:933, 1971.
- [48] Baumgarten PK. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *J Colloid Interface Sci*, 36:71, 1971.
- [49] Correia DM Sencadas V. Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology. *Carbohydrate Polymers*, 87:1295, 2012.
- [50] Yarin AL Sun Z, Zussman E. Compound core shell polymer nanofibers by co electrospinning. *Advanced Materials*, 15:1929, 2003.

- [51] Ramakrishna S Teo WE. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, 17:89–106, 2006.
- [52] Wang M Tong HW, Zhang X. A new nanofiber fabrication technique based on coaxial electrospinning. *Mater. Lett.*, 66:257, 2012.
- [53] Cato T Wan Ji. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60(4):613–621, 2002.
- [54] Li B Wang X, Ding B. Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering. *Materials Today*, 16, 2013.
- [55] Reneker DH Yarin AL, Koombhongse S. Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics*, 90(9):4836–4846, 2001.