



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Universitat Politècnica de València

Tesis Doctoral

Programa en Tecnologías para la Salud y el Bienestar

**DESARROLLO DE ANDAMIAJES CON
POROSIDAD ESTRATIFICADA BASADOS
EN POLIÉSTERES COMO SOPORTES EN
CO-CULTIVO CELULAR INDIRECTO**

Maria Herrero Herrero

Valencia, 11 de octubre de 2022

Directores:

José Antonio Gómez Tejedor

José Carlos Rodríguez Hernández

Ana Vallés Lluch

La ciencia no solo es una
disciplina de razón, sino
también de romance y pasión.

Stephen Hawking

Agradecimientos

Otra etapa que se cierra.

Ojalá pudiera decirle a aquella niña que soñaba con ser científica, que hoy estamos más cerca de aquel sueño y que todo el esfuerzo ha merecido la pena. Un sueño guiado por la curiosidad de conocer el mundo, de entenderlo, de hacerlo mejor... y es aquí donde quiero agradecer inmensamente a mi profesora de preescolar, Charo, que siempre nos motivó a cuestionarnos las cosas.

Ha sido un camino largo hasta llegar aquí, pero he podido rodearme de personas maravillosas que siempre me animaron a continuar este viaje que empezó hace ya 8 años, cuando la Dra. Ana Vallés me abrió las puertas del CBIT para realizar mi TFG. Ella fue quien me descubrió este fascinante mundo de la investigación, y desde el primer momento se convirtió en un gran ejemplo a seguir, por todos sus conocimientos y por toda la dedicación y entrega a un trabajo tan duro como este.

Agradezco también a mis otros directores de tesis, el Dr. José Antonio Gómez, que me ha enseñado todas las bondades del *electrospinning*, y el Dr. José Carlos Rodríguez, que tantas veces me ha ayudado y con el que he podido aprender sobre AFM compartiendo largas tardes en microscopía. Gracias!

También quería agradecer en estas líneas a José Luís, técnico del Servicio de Microscopía de la UPV, por las tardes de viernes en el microscopio en las que igual hablábamos de astronomía que de cambiar el mundo. Y agradecer también al resto de técnicos que tanto me han ayudado a lo largo de todos estos años (Chimo, Alicia, Merche y Manolo).

A mis compañeros del CBIT, especialmente a mis compañeros de despacho (Sergio, Guillermo, Rubén y Raquel), con los que he compartido inquietudes pero también alegrías, y de los que he podido aprender mucho.

A mis amigos y a mis compañeros de la banda y de alemán, que me han hecho desconectar cuando más lo he necesitado.

A los que estuvieron y a los que ahora están. Gracias! Especialmente a ti, Jorge, que has conseguido llenar de luz tantos días oscuros. Sin saberlo, llegaste en el momento que más te necesitaba y has hecho que esto, hoy, sea una realidad.

A mi tío Enrique, que siempre ha estado a nuestro lado.

A mis padres les agradezco todo el esfuerzo que siempre han puesto en darnos una educación a mi hermana y a mí. El saber entenderme, cuando ni yo me entendía. El ayudarme a

levantarme tras cada caída. El quererme incondicionalmente... ¡Os quiero mucho y os estaré eternamente agradecida!

A mi hermana, mi teta, la que siempre ha confiado en mí y sin la que yo no sería nada. He tenido la inmensa suerte de haber llegado a esta vida con la mejor compañera de viaje... podemos estar horas y horas sin parar de reír y esa es la mejor medicina cuando tu mundo se pone "patas arriba". ¡Gracias por ser como eres y por hacerme ver la vida con humor!

Y, desde luego, estos agradecimientos no podía cerrarlos sin acordarme de ellos: mis yayos. Cada uno de ellos se encargó de dejarme un valioso aprendizaje a lo largo de los años que pude disfrutar de ellos, y cada uno tiene en mi corazón un rinconcito que nunca desaparecerá ¡Os querré SIEMPRE!

Índice de contenidos

Resumen 11

Resum 13

Summary 15

Glosario 17

Introducción General 21

Andamiajes para el cultivo 3D 23

Sistemas de porosidad estratificada 27

Materiales biocompatibles 31

Los poliésteres en biomedicina 33

Aplicaciones de los soportes poliméricos para el cultivo *in vitro* 35

Objetivos 37

CAPÍTULO I. DESARROLLO DE MEMBRANAS ELECTROHILADAS BASADAS EN ÁCIDO POLILÁCTICO Y POLICAPROLACTONA CON PROPIEDADES ESPECÍFICAS.

Introducción 41

Principio de funcionamiento de la técnica de electrohilado 42

Parámetros de la disolución 45

Parámetros del proceso 51

Parámetros ambientales 54

Materiales y métodos 56

Estudios previos 56

Preparación de las membranas electrohiladas 57

Caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido 58

Caracterización de las disoluciones poliméricas 59

Densidad 59

Tensión superficial 60

Viscosidad 62

Conductividad eléctrica 62

Determinación de las propiedades fisicoquímicas de las membranas 62

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) 62

Calorimetría diferencial de barrido 63

Estudio mecánico de las membranas 65

Determinación del módulo de Young (E) 65

Resultados y discusión 67

- Optimización de los parámetros para la obtención de membranas de PLGA y PCLGA con un diámetro de fibra de 1,8 μm 67
- Caracterización de las disoluciones poliméricas: densidad, tensión superficial, viscosidad y conductividad 73
- Caracterización fisicoquímica de las membranas 75
- Caracterización mecánica de las membranas 80

Conclusiones 82

CAPÍTULO II. OBTENCIÓN DE ESTRUCTURAS DE POROSIDAD ESTRATIFICADA A PARTIR DE SOPORTES POROSOS (*SCAFFOLDS*)

Introducción 87

- Evaporación del disolvente (*solvent-casting*) 87
- Evaporación del disolvente con lixiviación de partículas (*solvent-casting particle-leaching*) 87
- Separación de fases (*phase separation*) 87
- Espumado con gas (*gas foaming*) 88
- Liofilización (*freeze drying*) 88
- Electrohilado (*electrospinning*) 89
- Moldeado por fusión (*melt moulding*) 89
- Extrusión (*extrusion*) 89
- Sinterización selectiva por láser, SLS (*selective laser sintering*) 90
- Estereolitografía (*stereolithography*) 90
- Fabricación por corte y laminado 90
- Moldeado por deposición de material fundido (*fused deposition modeling*) 90

Materiales y métodos 91

- Preparación de los *scaffolds* 91
 - Empleo de plantilla porogénica 91
 - Empleo de la técnica de evaporación del disolvente con lixiviación de partículas (SCPL) 92
 - Empleo de la técnica de moldeado por fusión 93
- Caracterización de los *scaffolds* 93
 - Morfología mediante microscopía diferencial de barrido 93
 - Análisis elemental EDS de los *scaffolds* 94
 - Hinchado en agua 94
 - Porosidad 95
- Integración de las membranas electrohiladas sobre el *scaffold* 98

Resultados y discusión 99

- Optimización del proceso de fabricación de *scaffolds* porosos 99
 - Empleo de plantilla porogénica 99
 - Empleo de la técnica de evaporación del disolvente con lixiviación de partículas 99
 - Empleo de la técnica de moldeado por fusión 101
- Caracterización de los *scaffolds* 103
 - Análisis elemental EDS 103

Hinchado 106

Porosidad 107

Obtención del sistema 3D de porosidad estratificada 107

Conclusiones 109

CAPÍTULO III. DEGRADACIÓN DE LOS MATERIALES Y LIBERACIÓN DE UN FÁRMACO MODELO A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS

Introducción 113

Curcumina: un fármaco de gran interés 115

Fabricación de sistemas de liberación mediante electrohilado 117

Electrohilado en disolución 117

Electrohilado coaxial 118

Electrohilado en emulsión 118

Mecanismos de degradación 120

Materiales y métodos 121

Degradación de los materiales 121

Determinación cuantitativa del porcentaje de masa degradada 122

Análisis morfológico mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo 123

Análisis mecánico 124

Calorimetría diferencial de barrido (DSC) 124

Cromatografía por permeación de gel (GPC) 124

Obtención de un sistema polímero-fármaco para la liberación controlada 126

Electrohilado en disolución 126

Electrohilado coaxial 126

Estudio de liberación de curcumina 127

Determinación de la cantidad de curcumina liberada 127

Efectividad de la encapsulación 128

Resultados y discusión 128

Degradación de los materiales 128

Efecto de la degradación en las propiedades fisicoquímicas 142

Efecto de la degradación en las propiedades mecánicas 146

Liberación de curcumina a través de las membranas 148

Efectividad de la encapsulación 149

Conclusiones 151

CAPÍTULO IV. ESTUDIO DE ADHESIÓN DE PROTEÍNAS EN DIFERENTES POLÍMEROS EMPLEADOS

Introducción 155

Fibronectina 156

Recubrimiento por centrifugación (*spin-coating*) 157

Microscopía de fuerza atómica 159

Modo de contacto (o estático) 160

Modos dinámicos 160

Materiales y métodos 161

- Obtención de soportes planos mediante *spin-coating* 161
- Microscopía de fuerza atómica (AFM) 162
- Determinación cualitativa de la adhesión de proteína 163
 - Estudio en seco 163
 - Estudio en inmersión 164
- Determinación cuantitativa de la adhesión de proteína 164
- Estudio fisicoquímico de los materiales 165
 - Determinación de la tensión superficial 165

Resultados y discusión 166

- Obtención de soportes planos mediante *spin-coating* 166
- Determinación cualitativa de la adhesión de proteína 170
- Determinación cuantitativa de la adhesión de proteína 175
- Estudio fisicoquímico de los materiales 176

Conclusiones 176

CAPÍTULO V. APROXIMACIÓN AL CO-CULTIVO CELULAR INDIRECTO DE LA ESTRUCTURA 3D. VIABILIDAD CELULAR DE LA LÍNEA L-929**Introducción 181**

- Los fibroblastos 183
- Técnicas de esterilización y desinfección de materiales 184
- Los medios de cultivo 187

Materiales y métodos 189

- Preparación de los materiales para el cultivo celular 189
- Cultivo celular 190
 - Descongelación de las células 190
 - Expansión de la línea celular 191
 - Siembra 191
- Estudio de la viabilidad celular 192
- Estudio de imagen de la adhesión celular 192

Resultados y discusión 193

- Viabilidad celular 193

Conclusiones 197

Conclusiones Generales 199**Contribuciones 201****Bibliografía 203**

Resumen

El desarrollo de la sociedad ha estado siempre ligado a los avances científicos y tecnológicos. Sin embargo, algunos de estos avances han supuesto la aparición de nuevos problemas, sobre todo de tipo ético, dando lugar a nuevos movimientos asociativos contrarios a ellos. Un ejemplo de ello es el uso de la experimentación animal, fundamentalmente en el campo de la medicina, y más concretamente en el ensayo de fármacos y dispositivos implantables en contacto con medios biológicos.

En este sentido, desde el ámbito de los biomateriales y la ingeniería tisular se trabaja para buscar alternativas a la experimentación animal. Una de estas alternativas es el desarrollo de modelos *in vitro* a partir de soportes poliméricos para el crecimiento celular *in vitro*. Estas estructuras, además, podrían emplearse no sólo en ensayos de fármacos o investigación *in vitro* para reducir el uso de animales en experimentación, sino también para regeneración tisular, simulando desde tejidos simples en los que se tienen un único tipo celular, a tejidos más complejos a partir del co-cultivo celular.

Así pues, en esta tesis se ha desarrollado un sistema tridimensional con estructura porosa estratificada que permite tanto el co-cultivo celular indirecto, como la realización de ensayos de liberación de fármacos. Para ello, se ha obtenido soportes porosos (*scaffolds*) por medio de la técnica de *solvent-casting particle-leaching* empleando como porógeno sal, cuyo tamaño de poro permite albergar células en su interior, sobre los que se han dispuesto, formando una estructura tipo sándwich, membranas electrohiladas. Estas membranas forman una estructura de fibras entrecruzadas, dejando entre ellas espacios de tamaño muy inferior al tamaño celular, de modo que permiten el paso de nutrientes y moléculas a través de ellas, pero actúan de barrera para las células impidiendo su migración a otras zonas del sistema tridimensional. Este tipo de estructuras permiten simular, por ejemplo, la arquitectura tubular renal, con la zona porosa intersticial central y las dos capas epitelial y endotelial externas, que estarían en contacto con la orina y la sangre, respectivamente.

Para obtener estas estructuras, se ha optado por emplear polímeros de la familia de los poliésteres, en particular ácido poliláctico y poli(ϵ -caprolactona), así como su mezcla y copolímeros con ácido poliglicólico. Estas combinaciones permiten ajustar la hidrofiliidad, y por tanto la biodegradabilidad, la cinética de liberación de fármacos y el comportamiento biológico, según interese. Además, el uso de la técnica de *electrospinning* para el desarrollo de las membranas, permite obtener diferentes diámetros de fibra a partir de la modificación de los principales parámetros del electrohilado, permitiendo también regular las propiedades de estos materiales.

Finalmente, para estudiar la liberación de fármacos desde el sistema anterior, las membranas electrohiladas se han cargado con curcumina mediante dos métodos diferentes: a través del método de electrohilado en disolución y con *electrospinning* coaxial, para obtener así diferentes perfiles de liberación.

Resum

El desenvolupament de la societat ha estat sempre lligat als avanços científics i tecnològics. Malauradament, alguns d'aquests avanços han suposat l'aparició de nous problemes, sobretot de tipus ètic, donant lloc a nous moviments associatius contraris a ells. Un exemple d'això és l'ús de l'experimentació animal, fonamentalment al camp de la medicina, i més concretament en el testatge de fàrmacs i dispositius implantables en contacte amb medis biològics.

En aquest sentit, des de l'àmbit dels biomaterials i l'enginyeria tissular es treballa per a buscar alternatives a l'experimentació animal. Una d'aquestes alternatives és el desenvolupament de models *in vitro* a partir de suports polimèrics per al creixement cel·lular *in vitro*. Aquestes estructures, a més a més, podrien emprar-se no sols en testatge de fàrmacs o investigació *in vitro* per a reduir l'ús d'animals en experimentació, sinó també per a regeneració tissular, simulant des de teixits simples en què es té un únic tipus cel·lular, a teixits més complexos a partir del co-cultiu cel·lular.

Així doncs, en aquesta tesi s'ha desenvolupat un sistema tridimensional amb estructura porosa estratificada que permet tant el co-cultiu cel·lular indirecte, com la realització d'assajos d'alliberació de fàrmacs. Per a això, s'ha obtingut suports porosos (*scaffolds*) mitjançant la tècnica *solvent-casting particle-leaching* emprant com a porògen sal, amb una grandària de porus que permet albergar cèl·lules en el seu interior, sobre els que s'han disposat, formant una estructura tipus sandvitx, membranes electrofilades. Aquestes membranes formen una estructura de fibres entrecreuades, deixant entre elles espais de grandària molt inferior a la grandària cel·lular, de mode que permeten el pas de nutrients i molècules a través d'elles, però actuen de barrera per a les cèl·lules impedit la seua migració a altres zones del sistema tridimensional. Aquest tipus d'estructures permeten simular, per exemple, l'arquitectura tubular renal, amb la zona porosa intersticial central i les dues capes epitelial i endotelial externes, que estarien en contacte amb l'orina i la sang, respectivament.

Per a obtindre aquestes estructures, s'ha optat per emprar polímers de la família dels polièsters, en particular àcid polilàctic i poli(ϵ -caprolactona), així com la seua mescla i

copolímers amb àcid poliglicòlic. Aquestes combinacions permeten ajustar la hidrofilitat, i per tant la biodegradabilitat, la cinètica d'alliberació de fàrmacs i el comportament biològic, segons interesse. A més, l'ús de la tècnica d'*electrospinning* per al desenvolupament de les membranes, permet obtindre diferents diàmetres de fibra a partir de la modificació dels principals paràmetres de l'electrofilat, permetent també regular les propietats d'aquests materials.

Finalment, per a estudiar l'alliberació de fàrmacs des del sistema anterior, les membranes electrofilades s'han carregat amb curcumina mitjançant dos mètodes diferents: a través del mètode d'emulsió i amb *electrospinning* coaxial, per a obtindre així diferents perfils d'alliberació.

Summary

The development of society has always been linked to scientific and technological advances. However, some of these advances have led to the appearance of new problems, especially of an ethical nature, giving rise to new associative movements opposed to them. An example of this is the use of animal experimentation, mainly in the field of medicine, and more specifically in the testing of drugs and implantable devices in contact with biological media.

In this sense, the field of biomaterials and tissue engineering is working to find alternatives to animal experimentation. One of these alternatives is the development of *in vitro* models based on polymer supports for *in vitro* cell growth. These structures, moreover, could be used not only in drug testing or *in vitro* research to reduce the use of animals in experimentation, but also for tissue regeneration, simulating from simple tissues in which there is a single cell type, to more complex tissues from cell co-culture.

Thus, in this thesis, a three-dimensional system with a stratified porous structure have been developed to allow both indirect cell co-culture and drug release assays. For this purpose, porous supports (scaffolds) have been obtained by means of the solvent-casting particle-leaching technique using salt as porogen, whose pore size allows cells to be housed in its interior, on which electrospun membranes have been arranged, forming a sandwich structure. These membranes form a structure of cross-linked fibers, leaving spaces between them that are much smaller than the cell size, so that they allow the passage of nutrients and molecules through them, but act as a barrier to the cells, preventing their migration to other areas of the three-dimensional system. This type of structure allows us to simulate, for example, the renal tubular architecture, with the central interstitial porous zone and the two outer epithelial and endothelial layers, which would be in contact with urine and blood, respectively.

To obtain these structures, we have chosen to use polymers of the polyester family, in particular polylactic acid and poly(ϵ -caprolactone), as well as their blend and copolymers with polyglycolic acid. These combinations allow adjustment of hydrophilicity, and thus

biodegradability, drug release kinetics and biological behavior, as desired. In addition, the use of the electrospinning technique for the development of membranes allows to obtain different fiber diameters by modifying the main electrospinning parameters, allowing also to regulate the properties of these materials.

Finally, to study drug release from the previous system, the electrospun membranes have been loaded with curcumin by two different methods: through the emulsion method and with coaxial electrospinning, in order to obtain different release profiles.

Glosario

ρ	densidad (kg/m ³)
E	módulo elástico o módulo de Young
ϵ	deformación
F	carga
g	aceleración de la gravedad. 9,81 m/s ²
G'	módulo de almacenamiento
G''	módulo de pérdidas
L	longitud
Δl	alargamiento
η'	viscosidad dinámica
η''	viscosidad de almacenamiento
r	radio
σ	tensión
T	temperatura
T _f	temperatura de fusión
T _g	temperatura de transición vítrea
V	volumen
ω	velocidad angular
M _w	peso molecular (g/mol)
%H	porcentaje de hinchado
2D	estructura bidimensional
3D	estructura tridimensional
AAVS	<i>American Anti-Vivisection Society</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
AFM	microscopía de fuerza atómica
Al	aluminio
Al ₂ O ₃	alúmina
BCA	ácido bicinconínico
BME	medio basal de Eagle
BUAV	<i>British Union Against Anti-Vivisection Society</i>
CAD	diseño asistido por ordenador

Cl	cloro
clor	cloroformo
CO ₂	dióxido de carbono
Cu	cobre
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro
DCM	diclorometano
DPBS	tampón fosfato salino de Dulbecco
DMEM	medio MEM modificado por Dulbecco
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DSC	calorimetría diferencial de barrido
ECM	matriz extracelular
EDS	espectroscopía de Rayos-X por dispersión en energía
EtOH	etanol
FBS	suero fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe	hierro
FESEM	microscopio electrónico de barrido de emisión de campo
FN	fibronectina
FTIR	espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GPC	cromatografía por permeación de gel
HCl	ácido clorhídrico
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HR	humedad relativa (%)
IMDM	modificación de Iscove del medio DMEM
K ₂ SO ₄	sulfato potásico
MEM	medio mínimo esencial de Eagle
met	metanol
NaCl	cloruro sódico; sal
NaOH	hidróxido de sodio
NEAVS	<i>New England Anti-Vivisection Society</i>
O.C.T.	compuesto para corte de tejidos congelados (<i>embedding medium for frozen tissue specimens to ensure Optimal Cutting Temperature</i>)
PAA	ácido peracético
PAN	poliacrilonitrilo
PBS	tampón fosfato salino
PCL	poli(ε-caprolactona)

PCLGA	copolímero poli(ϵ -caprolactona-co-ácido glicólico); P(CL-co-GA)
PDLA	ácido poli(D-láctico), isómero D(+)
PEO	óxido de polietileno
PGA	ácido poliglicólico
PIM	polímero de microporosidad intrínseca
PLA	ácido poliláctico
PLAPCL	mezcla 50:50 en masa de PLA y PCL
PLGA	copolímero ácido poli(láctico-co-glicólico); P(LA-co-GA)
PLLA	ácido poli(L-láctico), isómero L(-)
Pt	platino
PVA	alcohol polivinílico
PVDF	fluoruro de polivinilideno
PVP	Polivinil pirrolidona
SCPL	evaporación del disolvente con lixiviación de partículas
SEM	microscopía electrónica de barrido
SPM	microscopio de barrido por sonda
TEAB	bromuro de tetraetilamonio
TeCa	1,1,2,2-tetracloroetano
TMA	análisis termomecánico
THF	tetrahidrofurano
UPV	Universitat Politècnica de València
UV	ultravioleta
Zn	zinc
ZrO ₂	zirconia

Introducción General

El desarrollo de las sociedades ha estado siempre ligado a los avances científicos y tecnológicos, dando lugar a lo largo de la historia a diferentes debates éticos y políticos. Uno de los debates más antiguos es el de la experimentación con animales.

El uso de animales como objeto de investigación aparece esporádicamente en los textos más antiguos relacionados con la medicina. Aunque los primeros textos hipocráticos apenas tienen referencias, ya Aristóteles (384-322 a.C.) realizó un gran número de disecciones para observar las estructuras internas e intuir la función de los órganos. Probablemente, él solo empleara animales muertos; sin embargo, los médicos alejandrinos, entre los que destacan Herófilo (330-260 a.C.) y Erasístrato (304-245 a.C.), practicaban habitualmente la disección “en vivo” o vivisección. [1]

Unos siglos después, con las obras de Galeno (130-210 d.C.), surgieron los primeros debates en torno a este tema, ya que había escuelas médicas que negaban el interés de estas prácticas al realizarse con animales muertos o sometidos a condiciones extremas que podrían invalidar los resultados (Figura 1).



Figura 1. Representación de Galeno durante una disección de un cerdo. Opera Omnia (Roma, 1596-1597).
Fuente: Sabers en acció

Estos debates fueron más allá de la practicidad a raíz de los argumentos basados en las creencias religiosas, como las tradiciones judaica y cristiana que consideraban que los seres

humanos eran seres superiores a los animales y estos estaban a su servicio, y las corrientes filosóficas, que afirmaban que únicamente los seres humanos tenían la capacidad de sentir.

Fue a partir del s. XVIII, con filósofos como David Hume (1711-1776 d.C.) y Jeremy Bentham (1748-1832 d.C.), cuando se empezó a considerar que los animales eran capaces de sentir igual que los seres humanos. Desde este planteamiento, la filosofía moral y la ética práctica no pueden soslayar el tema del sufrimiento de los animales y el tratamiento que nuestra sociedad tiene con ellos.

Así pues, en el s. XIX, se comienzan a crear diferentes sociedades para la lucha contra la experimentación animal, como la American Anti-Vivisection Society (AAVS) en 1883, la New England Anti-Vivisection Society (NEAVS) en 1895 y la British Union Against Vivisection (BUAV) en 1898. [2]

A raíz del debate público, en el s. XX los científicos comenzaron a hacer una reflexión ética sobre la experimentación con animales. De este modo, el zoólogo William Russell y el microbiólogo Rex Burch publicaron en 1959 *The Principles of Humane Experimental Technique*, en el que proponen y desarrollan el principio de “las Tres R de la experimentación con animales”: Reemplazo, Reducción y Refinamiento.

Según este principio, la primera opción que debe plantearse un científico es el reemplazo; es decir, el empleo de alternativas al uso de animales. Actualmente estas alternativas son: [3]

1. Evitar experimentos innecesarios *in vivo* e *in vitro*: protocolos normalizados, disponibilidad de estudios previos...
2. Empleo de modelos computacionales (*in silico*).
3. Uso de organismos inferiores: bacterias, hongos, protozoos, plantas...
4. Empleo de embriones en etapas iniciales.
5. Estudios *in vitro* con órganos, cultivos y sistemas acelulares.

En caso de no ser posible la sustitución, se debe reducir al máximo los animales empleados seleccionando, además, las especies más adecuadas, y refinar las técnicas para reducir el estrés y el dolor causado a los animales. En la actualidad, todo ello se regula por los comités éticos que analizan los aspectos éticos de los diferentes proyectos antes de su puesta en marcha. [4]

En relación con estas cuestiones, la Ingeniería Tisular ha desarrollado un papel fundamental en la creación de modelos *in vitro* para el reemplazo de animales. Estos modelos van desde

cultivos en 2D hasta cultivos en 3D, como esferoides, organoides, y sistemas microfisiológicos (conocidos comúnmente como *organs-on-chips*). [5] En la actualidad, los modelos 3D son los más empleados, ya que reproducen la anatomía y fisiología de los tejidos, permitiendo que las células se comporten de la manera en que lo harían en sus órganos o tejidos de origen. Además, se garantizan las interacciones célula-célula, por lo que existen diferencias en metabolismo, diferenciación, expresión de genes y proteínas, proliferación, viabilidad y respuesta a diferentes estímulos, respecto de los cultivos en 2D. [6]

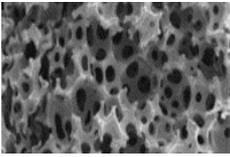
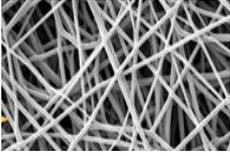
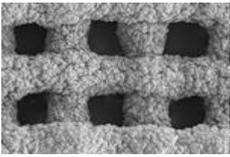
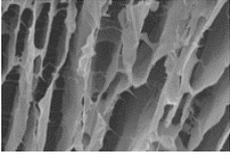
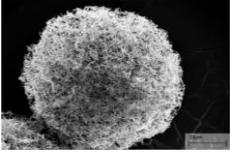
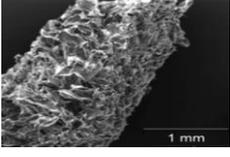
Este nuevo enfoque requiere experiencia multidisciplinar, ya que las células cultivadas en 3D necesitan andamiajes (*scaffolds*) que las soporten y permitan su organización y proliferación. Estas estructuras deben tener una geometría ordenada; además, las propiedades del material y sus características (porosidad, distribución de los poros y área superficial) desempeñan un papel fundamental en la adhesión y proliferación celular. [6]

Por todo ello, se han desarrollado diferentes tipos de andamiajes empleando materiales biocompatibles que, además, pueden recubrirse con moléculas bioactivas como la fibronectina para favorecer el crecimiento y diferenciación celular.

Andamiajes para el cultivo 3D

Existen diferentes andamiajes que pueden ser empleados en cultivo celular 3D *in vitro*. Cada una de estas estructuras presenta una serie de ventajas y desventajas (Tabla 1), de modo que, en función de la aplicación requerida, se empleará un tipo u otro.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de diferentes andamiajes. Traducida y modificada de [7]

Estructura	Ventajas	Desventajas
Andamiajes porosos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevada porosidad y estructura interconectada ▪ Fabricación sencilla 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Uso de disolventes tóxicos ▪ Dificultad para obtener una siembra homogénea ▪ Pérdida de las propiedades mecánicas con la porosidad ▪ Poco control sobre el espesor
Andamiajes fibrosos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ratio área superficial/volumen elevado ▪ La distancia entre fibras genera poros de tamaño adecuado para el intercambio de nutrientes 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dificultad para controlar la porosidad y el tamaño de los poros ▪ La porosidad generada no permite el paso de las células, limitando la integración celular en 3D
Andamiajes a medida (técnicas CAD) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevado control sobre la morfología ▪ Fácilmente reproducible 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Solo pueden emplearse determinados materiales poliméricos
Hidrogeles 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Flexibilidad similar a la de los tejidos ▪ Viscoelasticidad 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevado coste ▪ No son adherentes ▪ Los hidrogeles de polímeros naturales, como colágeno, gelatina, alginato y agarosa, pueden provocar respuesta inflamatoria
Microesferas 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevada área superficial ▪ Pueden emplearse para cultivos 3D en suspensión dentro de un biorreactor 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ No se conoce la toxicidad asociada a las microesferas
Andamiajes nativos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Simulan el microambiente natural de las células en términos de composición, señales bioactivas y propiedades mecánicas 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La distribución de las células no es uniforme

Para obtener estos tipos de estructuras, existen diferentes técnicas:

- Andamiajes porosos:
 - i. Evaporación del disolvente-lixiviado de partículas (*solvent casting-particle leaching*)
 - ii. Evaporación del disolvente (*solvent casting*)
 - iii. Espumado de gas (*gas foaming*)
 - iv. Moldeo por fusión (*melt molding*)
 - v. Separación de fases (*phase separation*)

- Andamiajes fibrosos:
 - i. Mallado de fibras (*fiber mesh*)
 - ii. Unión de fibras (*fiber bonding*)
 - iii. Electrohilado (*electrospinning*)
 - iv. Autoensamblaje (*self-assembly*)

- Andamiajes a medida (técnicas CAD):
 - i. Estereolitografía (*stereo-lithography*)
 - ii. Impresión 3D (*3D printing*)
 - iii. Sinterización selectiva por láser (*selective laser sintering*)
 - iv. Modelado por deposición fundida (*fused deposition modelling*)
 - v. Laminado de membranas (*membrane lamination*)

- Hidrogeles:
 - i. Evaporación del disolvente-lixiviado de partículas (*solvent casting-particle leaching*)
 - ii. Espumado de gas (*gas foaming*)
 - iii. Liofilización (*lyophilization* o *freeze-drying*)
 - iv. Métodos de entrecruzamiento (*crosslinking methods*)
 - v. Microfluídica (*microfluidics*)

- Microesferas:
 - i. Evaporación del disolvente (*solvent casting*)
 - ii. Emulsión (*emulsification*)
 - iii. Agregación de partículas (*particle aggregation*)
 - iv. Liofilización (*lyophilization*)
 - v. Coacervación por separación de fases (*coacervation by phase separation*)
- Andamiajes nativos:
 - i. Descelularización (*decellularization*)

Estas técnicas pueden combinarse para dar lugar a estructuras de porosidad más compleja, como por ejemplo estructuras estratificadas, que permitan el co-cultivo celular, lo cual consiste en cultivar células de diferentes tipos en un único cultivo, permitiendo mayor mimetización de los tejidos, ya que normalmente están compuestos por un conjunto de células de varios tipos.

El co-cultivo celular puede realizarse de forma directa o indirecta:

Co-cultivo directo

En este tipo de co-cultivo los diferentes tipos celulares están en contacto directo, por lo que también puede realizarse en 2D. La interacción celular tiene lugar por medio de señales paracrinas a partir de factores solubles, así como la comunicación célula-matriz extracelular y la adhesión célula-célula, si existe un contacto íntimo entre las células (Figura 2). [8], [9]

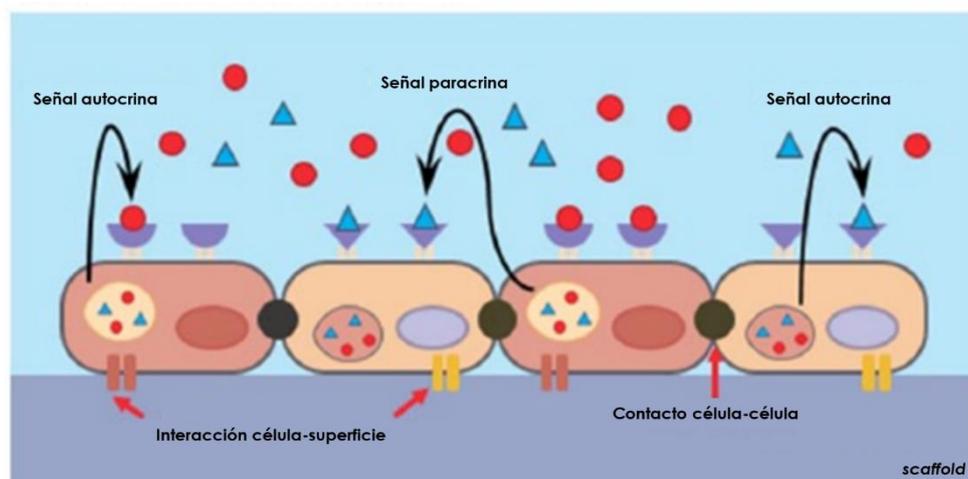


Figura 2. Representación de un co-cultivo celular directo. Traducida de [9]

Co-cultivo indirecto

A diferencia del co-cultivo directo, en el co-cultivo indirecto las células están separadas físicamente, por lo que se emplean diferentes materiales para mantenerlas separadas. En este tipo de co-cultivo es común emplear estructuras de porosidad estratificada; así pues, la zona con un tamaño de poros menor impide el paso de las células hacia la zona de poros de mayor tamaño en la que está cultivado el otro tipo celular.

Para conseguir esta porosidad estratificada es común, como ya se ha comentado, combinar diferentes técnicas de obtención de andamiajes; por ejemplo, Kook *et. al* (2017) co-cultivaron células de disco intervertebral y células madre mesenquimales en un *scaffold* 3D formado por un hidrogel de alginato y una membrana electrohilada.

Finalmente, la interacción celular en el co-cultivo indirecto se produce únicamente por medio de señales paracrinas a partir de factores solubles capaces de atravesar la membrana permeable que separa los dos cultivos (Figura 3).

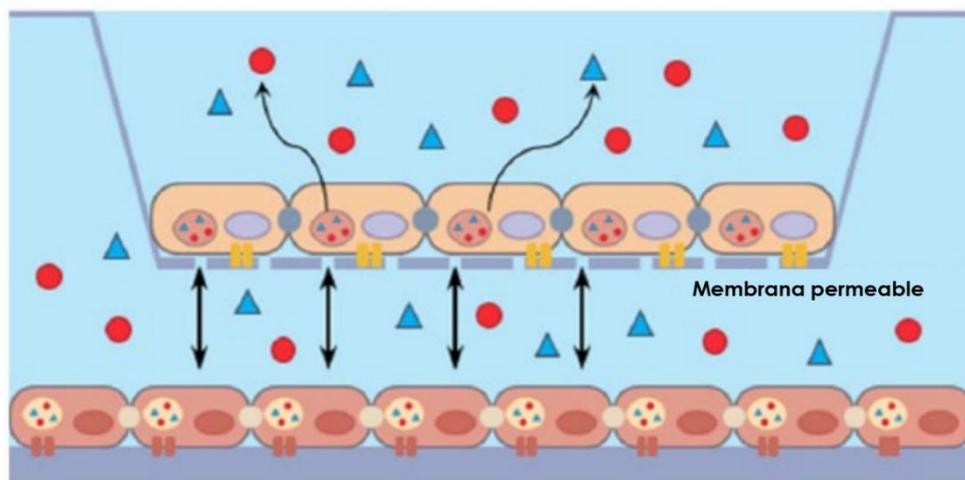


Figura 3. Representación de un co-cultivo celular indirecto. Traducida de [9]

Sistemas de porosidad estratificada

Los sistemas de porosidad estratificada han sido ampliamente desarrollados en los últimos años en el área de la Ingeniería Tisular, ya que permiten el co-cultivo celular indirecto y pueden ser empleados para mimetizar tejidos formados por estructuras complejas multicapa, como la piel o el cartílago. [10] En el sistema musculoesquelético existen numerosos ejemplos de este tipo de estructuras, debido a que el hueso suele presentar inserciones directas de

tejidos blandos, dando lugar a una transición continua de diferentes tejidos, como puede verse en la Figura 4, donde se muestra la estructura de unión osteocondral entre hueso y cartílago articular:

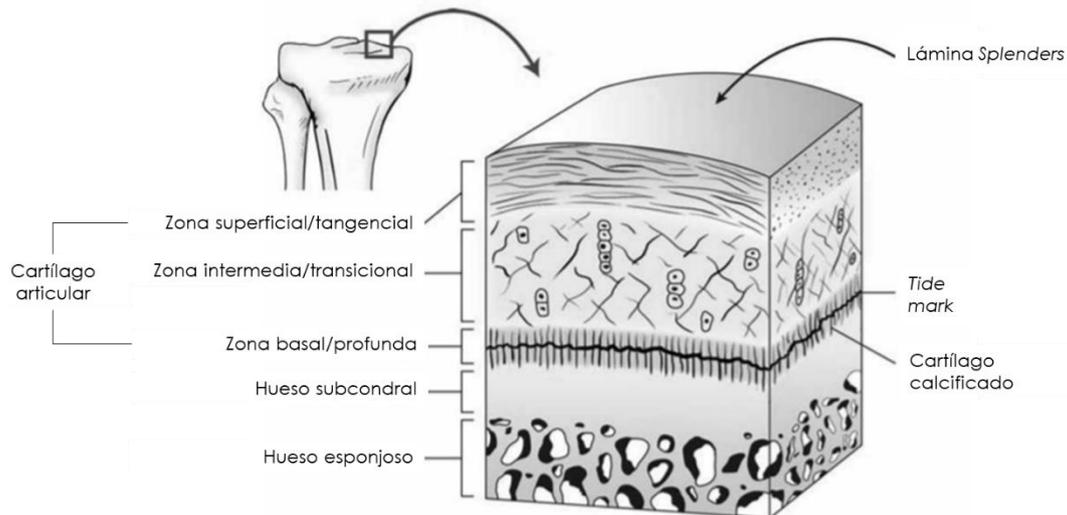


Figura 4. Estructura de la unión osteocondral, en la que se ve una transición continua de diferentes tejidos. Traducida de [11]

Así pues, como se ha comentado, se realizan aproximaciones a este tipo de estructuras por medio de la combinación de las técnicas anteriores. Por ejemplo: Salerno *et al.* (2012) combinaron las técnicas de lixiviación de partículas (NaCl) y espumado con gas (CO₂); Chen *et al.* (2006) emplearon las técnicas de lixiviación de partículas (NaCl) y liofilización; y Bi *et al.* (2011) combinaron evaporación del disolvente con liofilización. [12]–[14]

Sin embargo, aunque se puede obtener diferentes estructuras mediante la combinación de estas técnicas, actualmente está cobrando importancia el uso de la técnica de *electrospinning* para la fabricación de sistemas de porosidad estratificada ya que es una técnica versátil y con numerosas ventajas, que puede emplearse sola. [10]

Para conseguir un sistema de porosidad estratificada mediante la técnica del *electrospinning* es suficiente con hacer una deposición capa-a-capla con diferentes tamaños de fibra, que da lugar a diferentes porosidades. Además, pueden emplearse también materiales diferentes en cada capa, cada uno de ellos con unas propiedades determinadas. [10]

Por ejemplo, Lee *et al.* (2017) fabricaron un sistema de porosidad estratificada con tres capas mediante la técnica de *electrospinning*, combinando dos materiales (proteína de maíz y polivinil

pirrolidona) y tamaños de fibra diferente (1004 ± 234 nm en el exterior, y 774 ± 120 nm en el interior, ver Figura 5).

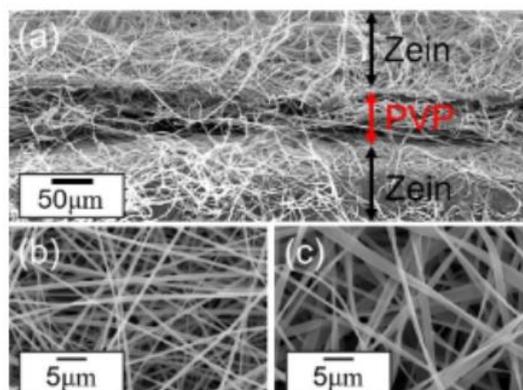


Figura 5. Imágenes SEM de un sistema de porosidad estratificada obtenida a partir de la deposición capa-a-capla de diferentes tamaños de fibra, empleando diferentes materiales: Proteína de maíz (Zein) y polivinil pirrolidona (PVP). Extraída de [15]

Esta técnica, además, permite mimetizar tejidos altamente anisótropos, como el menisco o el anillo fibroso, sobreponiendo membranas de fibras alineadas con diferente ángulo de orientación, como hicieron Fisher *et. al* (2015). [16]

Finalmente, la versatilidad del *electrospinning* hace que pueda combinarse con otras técnicas ya sea uniendo los diferentes andamiajes elaborados de forma separada, como electrohilando directamente sobre él. [10]

Liverani *et. al* (2012) fabricaron un sistema de porosidad estratificada uniendo un *scaffold* de vidrio bioactivo obtenido por evaporación del disolvente y una membrana electrohilada de quitosano. Para ello, impregnaron la base del *scaffold* de una disolución polimérica de quitosano, eliminaron el exceso y todavía húmedo colocaron la membrana de quitosano encima.

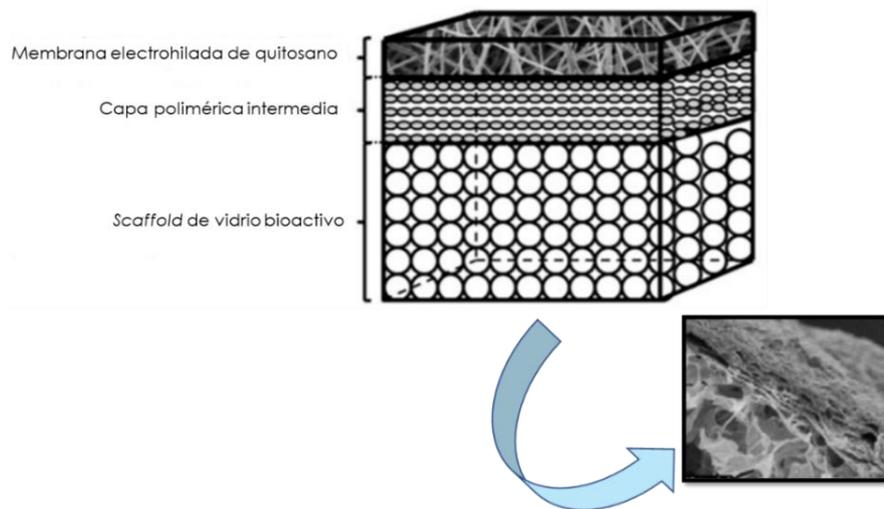


Figura 6. Representación esquemática e imagen SEM de un sistema de porosidad estratificada obtenido por la unión de un *scaffold* de vidrio bioactivo fabricado por evaporación del disolvente y una membrana de quitosano fabricada por *electrospinning*. Modificada de [17]

Huang *et al.* (2020), sin embargo, fabricaron un sistema de porosidad estratificada electrohilando sobre un andamiaje obtenido por impresión 3D:

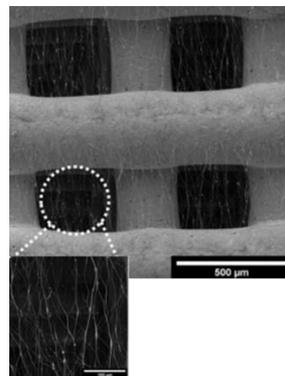


Figura 7. Sistema de porosidad estratificada obtenido al electrohilado sobre un *scaffold* fabricado mediante impresión 3D. Modificada de [18]

En caso de que el *scaffold* vaya a estar en contacto con material biológico, como células, e incluso dentro del propio organismo, si se diseña para regeneración tisular o como implante, debe ser biocompatible.

Materiales biocompatibles

La biocompatibilidad es una característica que deben poseer los biomateriales que quedó definida por David Williams como: “la capacidad de servir de sustrato para las células favoreciendo la actividad celular, incluso la señalización molecular y mecánica, sin provocar ninguna respuesta local o sistémica indeseable en el eventual huésped.” [19]

Entre los materiales biocompatibles encontramos metales, cerámicas y polímeros.

Materiales metálicos

Los metales son materiales inorgánicos formados por elementos metálicos. En caso de estar constituidos por un único elemento se habla de metales puros, mientras que si se componen de diferentes elementos metálicos se tienen las aleaciones. Algunos ejemplos son el acero inoxidable o el titanio.

Son materiales capaces de soportar cargas elevadas y que ofrecen propiedades mecánicas próximas a las del tejido óseo. Su elevado módulo y límite elástico, su ductilidad y su resistencia a la fractura los convierte en los materiales de elección en aquellas situaciones donde los requerimientos mecánicos prevalecen frente a los demás; por ejemplo, como implantes que deben soportar cargas cíclicas. [20]

Algunos ejemplos de uso son prótesis ortopédicas (de cadera o rodilla, fundamentalmente) e implantes dentales. También pueden emplearse como ayuda en la consolidación de fracturas en forma de placas, tornillos y clavos, como *stents* vasculares, guías para catéteres o implantes cocleares. [21], [22]

Materiales cerámicos

Se trata de materiales inorgánicos, típicamente cristalinos, formados por la unión de compuestos metálicos y no metálicos como, por ejemplo, la alúmina (Al_2O_3) o la zirconia (ZrO_2). Presentan altas temperaturas de fusión, baja conductividad eléctrica y calorífica y son duros y frágiles, con baja resistencia a la tracción. [23]

Pueden dividirse en dos categorías: cerámicas estructurales y cerámicas funcionales. Las primeras sustituyen a los materiales que forman parte de estructuras sometidas a esfuerzos de compresión, fatiga, térmicos, etc.; mientras que las cerámicas funcionales son aquellas que además de las propiedades anteriores presentan otras, como las dieléctricas, semiconductoras y piezoeléctricas.

Además, las cerámicas biocompatibles o biocerámicas pueden clasificarse también en función de su interacción con el tejido vivo en: bioinertes, si no interaccionan con los sistemas biológicos; bioactivos, que pueden interactuar superficialmente con tejidos próximos; y biodegradables, si pueden ser reabsorbidos. [24]

A pesar de su buena biocompatibilidad, tiene la limitación de su alta fragilidad frente a impactos, por lo que su empleo se limita a aquellas situaciones en que la carga aplicada sea predominantemente de compresión o bien como recubrimientos. Algunos ejemplos de uso son prótesis óseas o válvulas del corazón. [21]

Materiales poliméricos

Los polímeros son macromoléculas formadas por la repetición de una o varias unidades denominadas monómeros. Aquellos formados por una única unidad de repetición son los homopolímeros; mientras que los que presentan varias unidades de repetición se denominan copolímeros. [25]

Presentan propiedades cercanas a los tejidos vivos, por lo que son los biomateriales más usados en implantes e Ingeniería Tisular. [21]

Dentro de los materiales poliméricos encontramos tanto materiales naturales como sintéticos, cada uno de ellos con una serie de ventajas y desventajas, que deberán considerarse en función de su aplicación.

Materiales poliméricos naturales

Los polímeros naturales son aquellos que se extraen a partir de una fuente presente en la naturaleza.

Dentro de este grupo, los más ampliamente utilizados en Ingeniería Tisular son el colágeno, el quitosano y el ácido hialurónico. La principal ventaja que presentan es que muchos de ellos se encuentran en la matriz extracelular (ECM), por lo que presentan una elevada biocompatibilidad. Sin embargo, presentan bajas propiedades mecánicas y, debido a su compleja estructura, son difíciles de manipular. [26]

Materiales poliméricos sintéticos

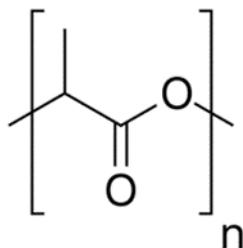
Los polímeros sintéticos se obtienen por medio de reacciones químicas a partir del monómero o monómeros que lo constituyen.

Entre los polímeros sintéticos destacan, en el campo de la biomedicina, los poliésteres, concretamente los poliésteres alifáticos lineales. Estos se emplean en numerosas aplicaciones debido a sus propiedades físicas y mecánicas, y su facilidad para ser modificados, lo que permite ajustar sus propiedades a las aplicaciones deseadas, por ejemplo, a partir de un cambio en su cristalinidad. Además, pueden ser procesados por medio de diversas técnicas, dando lugar a diferentes estructuras. [27], [28]

Los poliésteres en biomedicina

Los poliésteres que tienen mayor interés en biomedicina son el ácido poliláctico (PLA), la policaprolactona (PCL) y el ácido poliglicólico (PGA), todos ellos aprobados por la *Food and Drug Administration (FDA)*. [29], [30]

Ácido poliláctico



El ácido poliláctico (PLA) es un poliéster alifático termoplástico que forma parte de los α -hidroxiácidos (figura 8). Su precursor es el ácido láctico, una molécula quiral que presenta dos isómeros ópticos, el D(-) láctico y el L(+) láctico. A diferencia del isómero D(-), la configuración L(+) es metabolizada por el organismo humano. [31]

Figura 8. Estructura molecular PLA.

Sus propiedades dependen de la composición del polímero, de su peso molecular y de su cristalinidad, que puede ajustarse desde un valor de 0% hasta 40% en forma de homopolímeros lineales o ramificados, y como copolímeros al azar o en bloque. Un 100% de L-PLA resulta en un material con alto punto de fusión y elevada cristalinidad. Si se emplea una mezcla D y L, se obtiene un polímero amorfo con una temperatura de transición vítrea de 60 °C.

Respecto a su degradación, ésta es más lenta si la cristalinidad es elevada, si el contenido del L-PLA es alto o si el peso molecular también es elevado, pudiendo variar entre unos pocos meses hasta casi 2 años.

Finalmente, sus principales aplicaciones en este campo son: *scaffolds* para regeneración tisular, tornillos bioabsorbibles, *stents*, hilos de sutura y parches dérmicos, entre otras. [29]

Policaprolactona

La policaprolactona (PCL) es un polímero semicristalino, que puede alcanzar una cristalinidad de hasta el 69%, con un punto de transición vítrea de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un punto de fusión entre 59 y $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ (figura 9). [32]

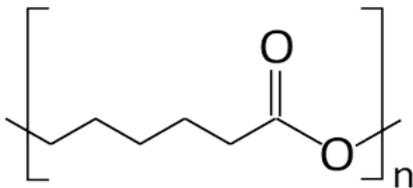


Figura 9. Estructura molecular PCL.

Al igual que el PLA, sus propiedades físicas, térmicas y mecánicas dependen de su cristalinidad, así como de su peso molecular. Además, tiene la propiedad característica de ser miscible con diferentes polímeros. [33]

Presenta una degradación lenta, comparado con el PLA, que puede ser modificada variando la cristalinidad y el peso molecular.

Así pues, se emplea en numerosas aplicaciones, como hilos de sutura, tornillos, *scaffolds* para regeneración tisular y sistemas de liberación de fármacos. [34]

Ácido poliglicólico

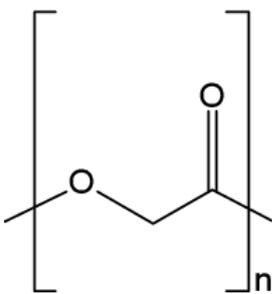


Figura 10. Estructura molecular PGA.

Al igual que el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico (PGA) forma parte del grupo de los α -hidroxiácidos (figura 10).

Se trata de un polímero altamente cristalino (45-55%), con un elevado punto de fusión (220 - $225\text{ }^{\circ}\text{C}$) y una temperatura de transición vítrea en torno a 35 - $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, que presenta unas elevadas propiedades mecánicas comparado con el PLA. Además, también se degrada más rápidamente que el PLA.

Sin embargo, debido a su elevada cristalinidad, es insoluble en muchos disolventes, excepto en disolventes altamente fluorados, como el hexafluoroisopropanol (HFIP). [30]

Algunas de las aplicaciones en las que se emplea el PGA son hilos de sutura, sistemas de liberación controlada de fármacos, *scaffolds* para regeneración tisular e implantes reforzados para el tratamiento de fracturas. [35]

Estos polímeros pueden combinarse entre sí formando mezclas o copolímeros, que permiten obtener materiales con propiedades intermedias.

Aplicaciones de los soportes poliméricos para el cultivo *in vitro*

Estos sistemas 3D, que permiten minimizar el empleo de animales de experimentación, presentan numerosas aplicaciones en biomedicina [36]:

Diagnóstico del cáncer

El empleo de soportes poliméricos cultivados permite mejorar el diagnóstico del cáncer, ya que como concluyó Dermer (1994), el mal diagnóstico y el mal enfoque terapéutico del cáncer se atribuyen a los modelos de cáncer *in vitro*, que utilizan condiciones de cultivo en monocapa que no son adecuadas para representar la enfermedad. [37] Estas condiciones de cultivo en monocapa en 2D en placas Petri de subpoblaciones aisladas no reflejan la compleja naturaleza de la masa tumoral y, por tanto, sus respuestas a las sustancias químicas de prueba suelen conducir a conclusiones erróneas.

Sensores celulares

Las células presentan múltiples receptores en su superficie, lo que da lugar a un procesamiento complejo de información que les permite responder e identificar algunas entidades con una elevada precisión. Este hecho dio origen al desarrollo de sensores celulares con el fin de detectar analitos químicos y biológicos e incluso patógenos, siendo de utilidad en el diagnóstico clínico, el control de los alimentos y la detección de agentes de guerra biológica.

Cribado de alto rendimiento

En el descubrimiento de fármacos es esencial el cribado de alto rendimiento, que consiste en determinar la posible actividad terapéutica de un gran número de compuestos químicamente diversos en un único ensayo. Tradicionalmente estos experimentos se realizaban con células cultivadas en 2D; sin embargo, como se ha comentado anteriormente, estos no son cultivos representativos de entornos celulares reales y dan lugar a falsos negativos, por lo que es esencial el uso de entornos 3D. [38]

Industria biotecnológica

Estos sistemas pueden utilizarse como microportadores (*microcarriers*) en el procesamiento previo de vacunas y otros productos biotecnológicos en los que el rendimiento está directamente relacionado con la masa celular.

Reemplazos bioquímicos

Este tipo de materiales también pueden emplearse en terapia de sustitución hormonal o enzimática, suplementando o reemplazando un conjunto específico de células. Por ejemplo, las células productoras de insulina pueden implantarse en el páncreas directamente, o a través de un implante subcutáneo que actúe de reservorio natural para la liberación controlada de insulina.

Ingeniería Tisular

La regeneración y producción de tejido funcionalmente viable es el objetivo final de la Ingeniería Tisular. El biomaterial empleado debe definir y mantener el espacio 3D para acomodar el tejido en crecimiento, además de ayudarlo a restablecer el entorno fisiológico *in vivo*.

Liberación controlada de fármacos

Un *scaffold* 3D biodegradable adecuadamente diseñado también puede ser empleado como vehículo de administración de fármacos. Los componentes del *scaffold* pueden ser elegidos de tal manera que puedan fusionarse con la matriz extracelular del sitio seleccionado mientras liberan lentamente el fármaco.

Con todo ello, en esta tesis doctoral se pretende desarrollar un material tridimensional, con porosidad estratificada, a partir de diferentes poliésteres que permita el co-cultivo celular indirecto. De este modo, se realiza una aproximación a la obtención de un material que mimetice la membrana de filtración del riñón para su uso en el testeo de fármacos, permitiendo la reducción de animales en experimentación.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el desarrollo de un sistema polimérico basado en membranas electrohiladas como modelo *in vitro* de tejidos compartimentados, de aplicación en testeo de fármacos y co-cultivos celulares organizados.

Para ello, se plantean diversos objetivos específicos:

1. Desarrollar membranas electrohiladas a partir de diferentes poliésteres (homo- y co- polímeros) que permitan la liberación de un fármaco, así como el cultivo celular sobre su superficie.
2. Desarrollar andamiajes porosos a partir de diferentes poliésteres que puedan albergar células en su interior.
3. Desarrollar un sistema tridimensional de porosidad estratificada, con una estructura tipo sándwich, a partir de los materiales anteriores.
4. Analizar el comportamiento *in vitro* acelular de los poliésteres planteados.
5. Estudiar la viabilidad de los materiales para las aplicaciones planteadas; por un lado, la liberación de un fármaco a través de las membranas electrohiladas y, por otro lado, el co-cultivo indirecto de células en el material.

A continuación se muestra una figura en la que se resume de forma esquemática el objetivo de esta tesis doctoral.

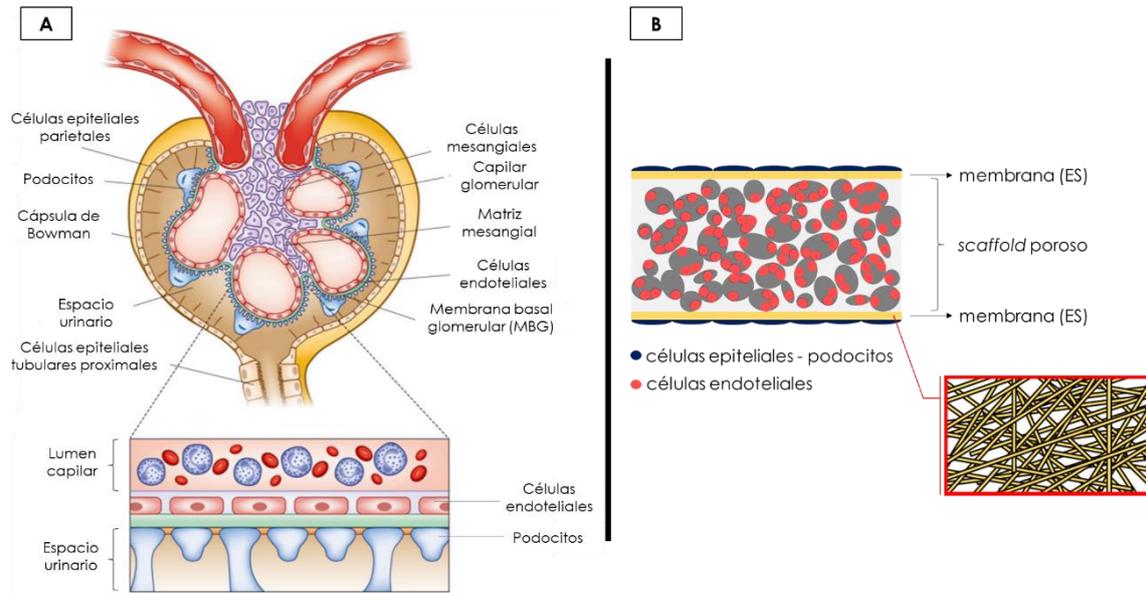


Figura 11. (A) Fisiología de la membrana de filtración glomerular. Modificada de [39] y (B) esquema del sistema 3D propuesto.

CAPÍTULO I

DESARROLLO DE MEMBRANAS ELECTROHILADAS BASADAS EN ÁCIDO POLILÁCTICO Y POLICAPROLACTONA CON PROPIEDADES ESPECÍFICAS

En este primer capítulo se realiza el estudio de los principales parámetros del electrohilado para obtener membranas poliméricas de 1,8 μm de los copolímeros empleados (poli láctico-co-glicólico y poli caprolactona-co-glicólico). Se analizan posteriormente las propiedades físicoquímicas y mecánicas de todas las membranas.

Introducción

La técnica del electrohilado, más comúnmente conocida como *electrospinning*, surge del desarrollo de la idea de aplicar una diferencia de potencial para la formación de gotas (*electrospraying*), de la que ya se hablaba hace más de cien años. [40] De hecho, en el año 1600, cuando William Gilbert investigaba las atracciones eléctricas entre los cuerpos, observó cómo al acercar una barra de ámbar cargada electrostáticamente se deformaba una gota de agua, formando un cono. [41] Este fenómeno es en el que se basan ambas técnicas. [42] Sin embargo, no fue hasta la década de 1930 cuando se describió el proceso de *electrospinning*, por parte de Formhals, quien describió un equipo con el que se podían producir fibras poliméricas aplicando las bases del *electrospraying* con la principal diferencia de que la disolución polimérica estaba más concentrada en el proceso de *electrospinning*. [43]–[46]

A pesar de este avance, la técnica siguió sin despertar el suficiente interés científico para su desarrollo, un hecho que cambió a partir de la década de 1990 gracias a las publicaciones del grupo de Reneker. [40], [47] Es a partir de ese momento cuando surge el interés por esta técnica, mostrando un desarrollo exponencial a lo largo de los últimos años. Esto puede verse en la Figura 12, en la que se muestra el número de publicaciones científicas relacionadas con esta técnica en los últimos 40 años. Cabe destacar que los datos anteriores al año 2000 son difíciles de verificar, ya que el término *electrospinning* fue acuñado por J. Doshi y D.H. Reneker en 1995.

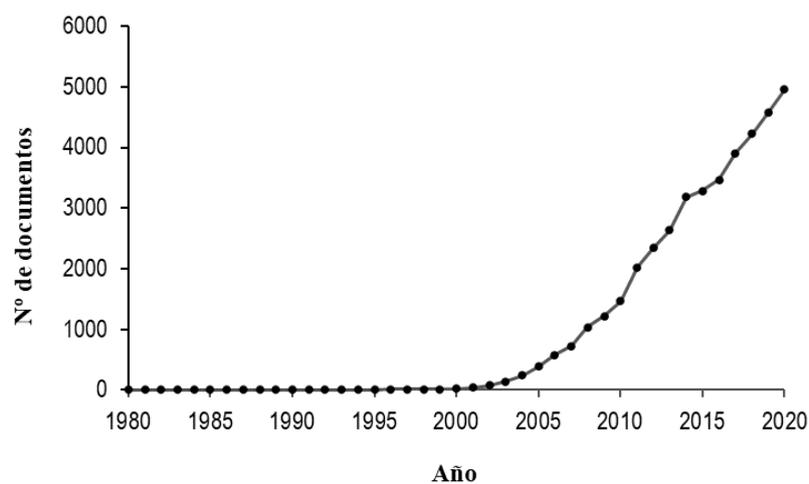


Figura 12. Evolución del número de publicaciones sobre *electrospinning* a lo largo de los últimos 40 años.
Fuente: <https://www.scopus.com>

Principio de funcionamiento de la técnica de electrohilado

Como ya se ha comentado, Formhals se considera el padre de esta tecnología. Sin embargo, el principio de funcionamiento del *electrospinning* surge del trabajo desarrollado por Zeleny, quien diseñó un aparato (Figura 13) con un capilar para el estudio de las descargas eléctricas de líquidos. [48], [49]

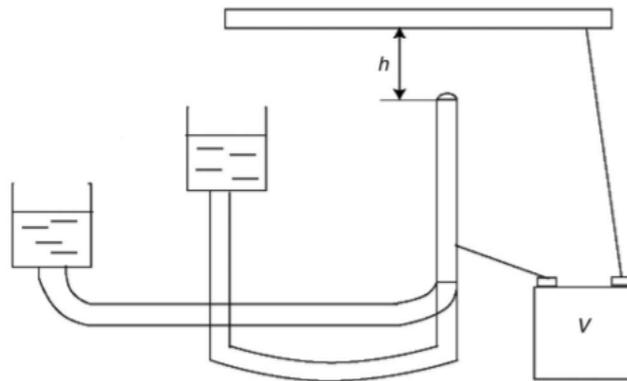


Figura 13. Aparato de Zeleny con capilar. Modificada de [42]

Este aparato, de hecho, es similar a muchos de los equipos básicos empleados hoy en día por numerosos investigadores, los cuales constan de una bomba a la que está conectada una jeringa con una aguja, un colector, y una fuente de alto voltaje conectada a ambos para generar una diferencia de potencial entre ellos. La siguiente figura muestra un esquema de estos equipos:

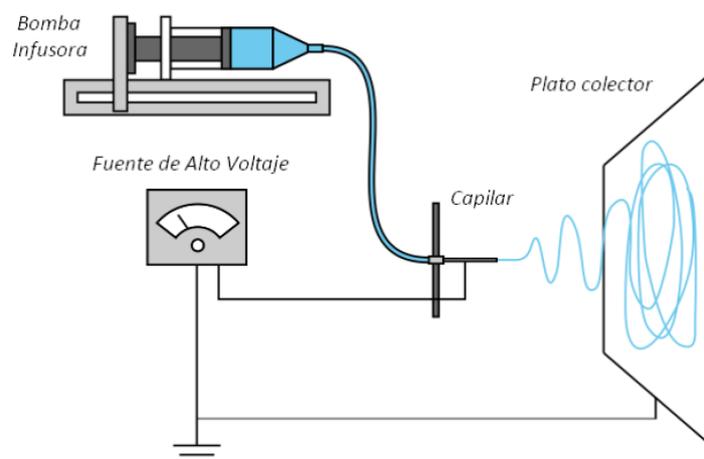


Figura 14. Esquema de un montaje convencional de *electrospinning*. Extraída de [50]

El principio de funcionamiento se basa, como hemos visto, en un fenómeno electrohidrodinámico, por el cual una gota de líquido se carga eléctricamente generando un chorro (o *jet*) que se elonga creando fibras.

El proceso se puede dividir en cuatro etapas: [51]

(i) Carga de la gota y formación del cono de Taylor.

La disolución polimérica se eyecta constantemente a través de una aguja de punta roma, gracias a una bomba, lo que da lugar a la formación de una gota en la punta de la aguja debido a la tensión superficial de la disolución. Al aplicar una diferencia de potencial entre la aguja y el colector, las cargas de la disolución se separan y las del mismo signo que la polaridad de la aguja migran a la superficie de la gota.

Mientras que la tensión superficial favorece una forma esférica para minimizar la energía libre superficial, la repulsión electrostática deforma la gota para disminuir el área superficial y así reducir la repulsión. De este modo, cuando se alcanza un determinado voltaje, la fuerza electrostática que actúa sobre la gota supera la fuerza generada por la tensión superficial, dando lugar a una deformación de la gota en forma cónica (**cono de Taylor**). [52], [53]

(ii) Alargamiento del chorro.

En esta etapa el chorro se extiende en la dirección del campo eléctrico, hacia el colector, sufriendo además una aceleración. En un primer momento, en la conocida región de campo cercano, el chorro se elonga en línea recta una cierta distancia. Es importante que la disolución presente unas propiedades viscoelásticas tales que eviten la **inestabilidad de Rayleigh**, que provocaría la rotura del chorro en gotas (*electrospraying*).

(iii) Estrechamiento del chorro.

Durante la aceleración del chorro en el tramo recto inicial, la tensión superficial y la viscoelasticidad de la disolución polimérica actúan en contra de su avance, de modo que la aceleración se va atenuando gradualmente. Además, el diámetro del chorro se va reduciendo con la distancia. Ambas condiciones favorecen la perturbación del chorro en esta región de campo lejano.

Las inestabilidades que pueden producirse en esta región son tres: *i*) la inestabilidad de Rayleigh, que puede evitarse con un campo eléctrico intenso; *ii*) la **inestabilidad de flexión** (o de látigo), provocada por el alargamiento del chorro como resultado de las fuerzas eléctricas y que se caracteriza por la formación de una especie de bobinas, producidas por la fuerza repulsiva de las cargas eléctricas en el chorro, que giran a un radio creciente. Esta flexión produce un movimiento oscilante del chorro a altas frecuencias que es crítica para reducir el diámetro del chorro de micrómetros a nanómetros; y *iii*) una última inestabilidad que se da al tener campos eléctricos muy intensos.

La formación de estas inestabilidades depende de las interacciones entre las cargas del chorro y el campo eléctrico externo, y pueden controlarse a través de las propiedades fisicoquímicas de la disolución y los parámetros del *electrospinning*.

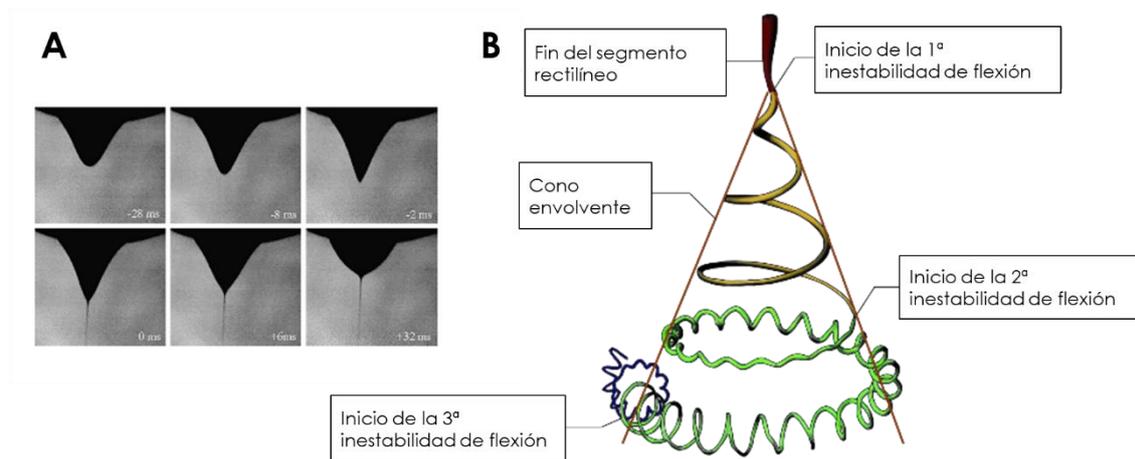


Figura 15. (A) Evolución de una gota de fluido en el proceso de electrohilado; (B) Diagrama que muestra el camino de un chorro electrohilado. Modificada de [54]

(iv) Solidificación del chorro.

Durante el proceso de elongación, el chorro se solidifica formando fibras, debido a la evaporación del disolvente. Tras la solidificación, las cargas pueden seguir estando atrapadas en la superficie de las fibras secas, pero todas las inestabilidades cesan.

Finalmente, las fibras alcanzan el colector y se depositan en él, disipándose las cargas de las fibras a través de éste, ya que está conectado a tierra. Sin embargo, debido a la baja conductividad de la mayoría de los materiales electrohilados, puede quedar en la superficie de las fibras una cierta cantidad de carga residual. Como resultado de ello,

el grosor de membrana que puede obtenerse suele estar restringido por un límite superior de aproximadamente 0,5-1 mm.

La principal problemática que presenta el empleo de esta técnica es el elevado número de parámetros de los que depende, los cuales no sólo están relacionados con la disolución polimérica (peso molecular del polímero, concentración, disolvente o disolventes empleados, ratio de disolventes) que, además, influyen en la densidad, la tensión superficial, la viscosidad y la conductividad, sino que también están relacionados con el proceso de electrohilado (flujo de eyección, voltaje, distancia entre la aguja y el colector, y diámetro de la aguja) y con las condiciones ambientales (humedad relativa, temperatura).

Cada uno de estos parámetros influye de una manera u otra en la formación de las fibras y, consecuentemente, en su diámetro y la presencia o no de defectos. De entre los defectos más comunes se encuentran las gotas y las cintas (Figura 16).

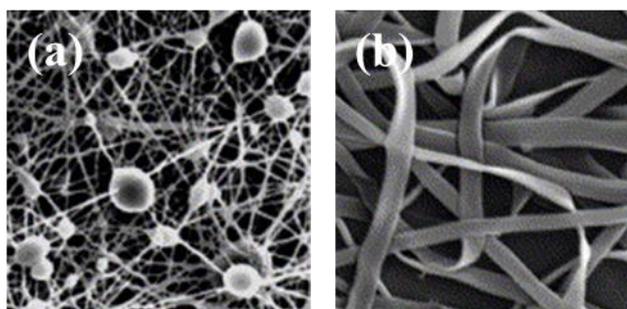


Figura 16. Imágenes SEM de los defectos de (a) gotas y (b) cintas. Modificada de [55]

Dada la importancia de cada uno de estos parámetros, a continuación se va a explicar brevemente cómo afecta cada uno de ellos en la morfología de las fibras. Cabe destacar, sin embargo, que alguno de estos parámetros puede desempeñar un efecto contrario al pasar un valor crítico, el cual vendrá determinado por propiedades intrínsecas a la disolución polimérica.

Parámetros de la disolución

Peso molecular del polímero

La capacidad de un polímero para ser electrohilado depende de los entrelazamientos en la cadena polimérica, siendo difícilmente electrohilables aquellos polímeros que presentan cadenas cortas, sin entrelazamientos entre ellas. [56] Esto es debido a que la presencia de

entrelazamientos favorece la inestabilidad de flexión que provoca un movimiento en forma de látigo entre la aguja y el colector, dando lugar a un estiramiento del chorro y, como consecuencia, a la formación de fibras. [57] De acuerdo con ello, conforme aumenta el peso molecular se obtienen membranas con fibras más homogéneas y sin defectos, ya que a medida que aumenta el peso molecular, aumenta también la densidad de entrelazamientos en las cadenas poliméricas. [58]

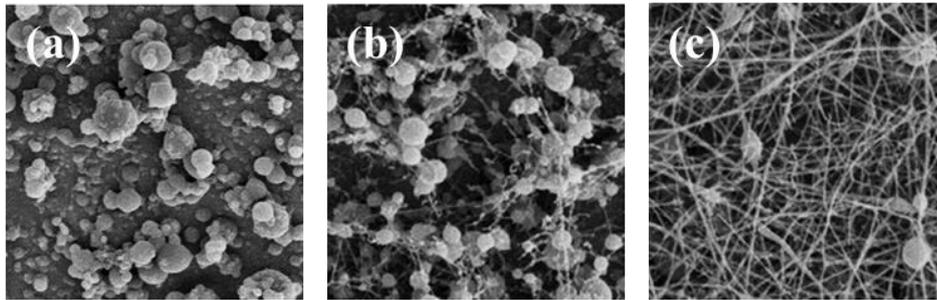


Figura 17. Efecto del peso molecular del polímero. Nylon-6 al 10% w/v en ácido fórmico con (a) $M_w=30.000$ g/mol, (b) $M_w=50.000$ g/mol y (c) $M_w=63.000$ g/mol. Modificada de [58]

Concentración del polímero

Para que se produzca la formación de fibras homogéneas existe una ventana de concentración, característica de cada polímero. Esto se debe a que la concentración afecta a la tensión superficial y a la viscosidad, de modo que conforme aumenta la concentración aumenta la viscosidad, pero disminuye la tensión superficial. [59]

Por tanto, se diferencian cuatro concentraciones críticas: [60]

- (i) A muy bajas concentraciones, únicamente se forman gotas (*electrospraying*) debido a la inestabilidad de Rayleigh, ya que la viscosidad es baja pero la tensión superficial es elevada.
- (ii) Por encima de cierta concentración, empiezan a formarse fibras, pero se mantienen los defectos de gota.
- (iii) Cuando nos encontramos en la ventana electrohilable, en que la relación tensión superficial-viscosidad es adecuada, únicamente tenemos fibras cuyo diámetro va aumentando con la concentración.

(iv) Superada cierta concentración, la viscosidad es muy elevada y genera dificultad en el proceso de electrohilado, de modo que empiezan a producirse microcintas en forma de hélice.

En la siguiente figura, puede verse cómo se produce el paso de gotas a fibras al incrementarse la concentración.

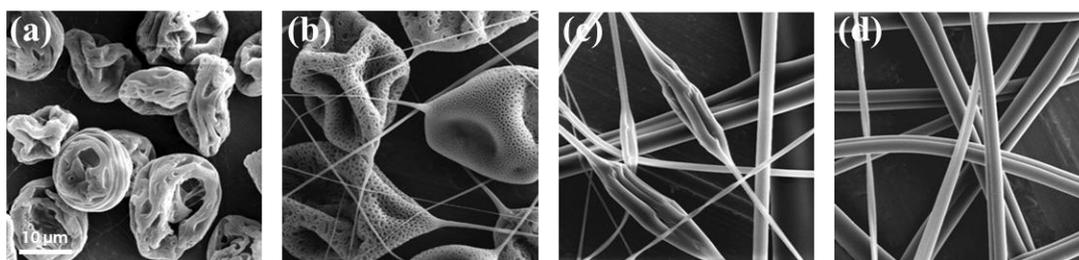


Figura 18. Efecto de la concentración. Poliestireno en tetrahidrofurano al (a) 5,1% *w/v*, (b) 13,9% *w/v*, (c) 18,9% *w/v* y (d) 21,2% *w/v*. Modificada de [61]

Disolvente y ratio de los disolventes en sistemas binarios

La elección del disolvente es otro factor clave en la obtención de fibras, principalmente debido a su conductividad, y no tanto a la viscosidad de las disoluciones resultantes, como demostraron Uyar & Besenbacher (2008). [62] En la Figura 19, se puede ver cómo influye en la morfología el empleo de diferentes disolventes para el poliestireno (DMF, cloroformo y THF), siendo más elevadas las viscosidades de las disoluciones en cloroformo y THF. Sin embargo, la única disolución que tiene conductividad es aquella en la que se empleó DMF y coincide con la disolución en la que se producen fibras sin defectos.

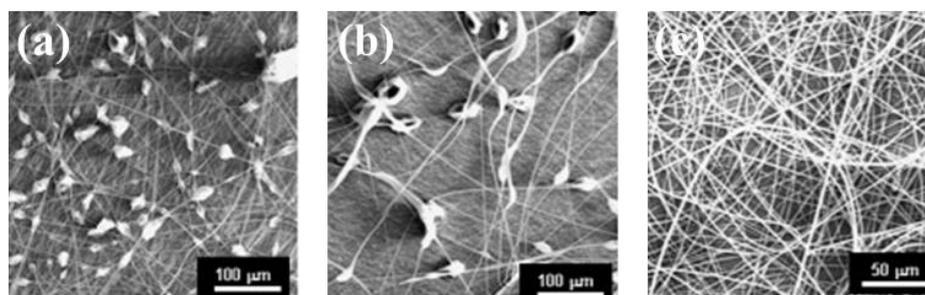


Figura 19. Efecto del disolvente empleado. Poliestireno al 20% *w/v* en (a) THF, (b) cloroformo y (c) DMF. Flujo = 1 ml/h, voltaje = 15 kV y distancia aguja-colector = 10 cm. Modificada de [62]

Además, también son fundamentales el momento dipolar y el punto de ebullición de los disolventes. Un elevado momento dipolar, así como una elevada constante dieléctrica,

favorecen el electrohilado al proporcionar una mayor susceptibilidad eléctrica a la disolución cuando es sometida a un campo eléctrico. De hecho, Wannatong *et al.* (2004) indicaron que el tetracloruro de carbono, que no es polar, nunca ha sido considerado como un disolvente adecuado para el *electrospinning*. [63] En cuanto al punto de ebullición, es importante que no sea demasiado bajo para evitar la rápida evaporación del disolvente, lo que podría provocar la solidificación del polímero en la punta de la aguja. [64]

Finalmente, cabe destacar que es común el empleo de dos disolventes (sistema binario) para obtener los beneficios de ambos.

Viscosidad

La viscosidad está directamente relacionada con la concentración. Su efecto sobre el diámetro de la fibra, al igual que el de la concentración, es conocido y aceptado por la comunidad científica ya que existen numerosos estudios que lo reportan.

A bajas viscosidades, se obtienen gotas debido a que no es posible formar un cono de Taylor estable. A partir de un determinado valor de viscosidad, característico de cada polímero, es posible comenzar a obtener fibras, aunque éstas todavía presentan defectos de gotas, cada vez menores. Conforme aumenta la viscosidad, se alcanza un determinado valor a partir del cual se tienen fibras únicamente. Munir *et al.* (2009) determinaron que estas transiciones de gotas a fibras con gotas, y de fibras con gotas a fibras, se encontraban a 0,04 y 0,16 Pa·s para la polivinil pirrolidona, valores que descienden hasta 0,01 y 0,03 Pa·s para los poliésteres. [65]

Una vez que se entra en la región electrohilable, se tiene inicialmente diámetros de fibra pequeños debido a la mayor movilidad de las cadenas de polímero, y las mayores inestabilidades durante el proceso, lo que da lugar a un mayor estiramiento del chorro de polímero. Al aumentar la viscosidad, generalmente por un incremento en la concentración, una mayor cantidad de polímero estabiliza el chorro debido a las restricciones de movimiento, limitando así la capacidad de estiramiento de éste. [66]

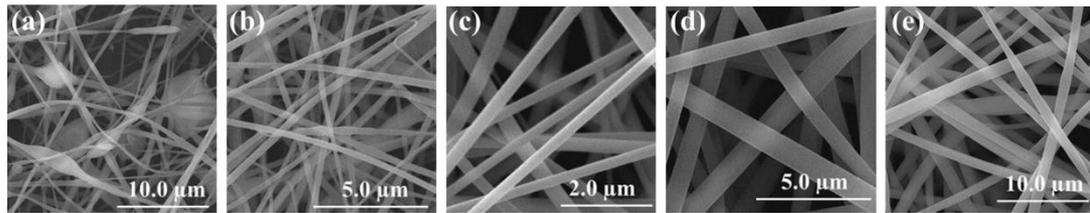


Figura 20. Efecto de la viscosidad. Nanofibras de sílica con viscosidad (a) 65 mPa·s, (b) 102 mPa·s, (c) 145 mPa·s, (d) 398 mPa·s y (e) 981 mPa·s. Modificada de [67]

Conductividad eléctrica

Como ya se ha comentado, la conductividad eléctrica juega un papel fundamental en el proceso de *electrospinning*. De hecho, Jarusuwannapoom *et al.* (2005) demostraron que es imposible formar fibras si la disolución tiene una conductividad nula. [64] Esto se debe a que está relacionada con la cantidad de cargas libres presentes en la disolución y, en consecuencia, determina la elongación del chorro, ya que cuantas más cargas libres (mayor conductividad), la repulsión será mayor y el chorro se estirará más. [68] Por tanto, al aumentar la conductividad de la disolución, disminuye el diámetro de las fibras, como puede verse en la Figura 21.

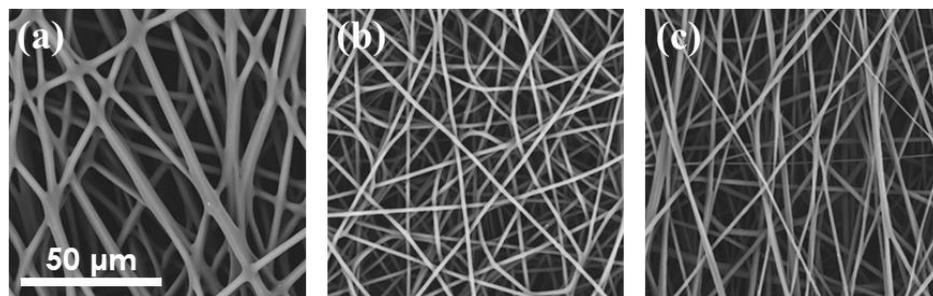


Figura 21. Efecto de la conductividad en el diámetro de fibra. Poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) con óxido de polietileno (70:30 %w/w) en (a) cloroformo: $\sigma = 0,18 \pm 0,01 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$, (b) DCM: $\sigma = 2,21 \pm 0,01 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ y (c) DCM/EtOH: $\sigma = 4,99 \pm 0,01 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$. Modificada de [69]

Por otro lado, aumentando la conductividad, por ejemplo, añadiendo sales o polielectrolitos, es posible eliminar los defectos de gotas:

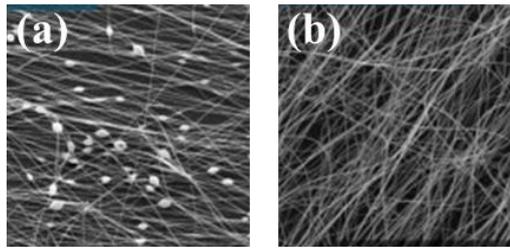


Figura 22. Efecto del empleo de sales en la eliminación de defectos de tipo gota, para un polímero de microporosidad intrínseca (PIM). (a) 15% *w/v* PIM en TeCa, (b) 15% *w/v* PIM en TeCa + 5% *w/w* TEAB. Modificada de [70]

Sin embargo, si la conductividad es demasiado elevada, es muy difícil o imposible electrohilar las fibras, incluso con voltajes elevados.

Tensión superficial

Teniendo en cuenta que la formación de fibras durante el proceso de *electrospinning* se consigue cuando la fuerza eléctrica consigue vencer la tensión superficial de la disolución polimérica, es fácil comprender que el valor de ésta será crucial para el desarrollo de las fibras. [71]

Cuando la tensión superficial es elevada, la disolución ejerce resistencia a ser eyectada, por lo que se forman defectos de gota, mientras que conforme disminuye la tensión superficial, desaparecen las gotas y el diámetro de fibra aumenta. [72] Esto puede verse en la Figura 23. Sin embargo, una baja tensión superficial puede dar lugar también a la formación de gotas, ya que el disolvente no tendría tiempo suficiente de evaporarse. [73]

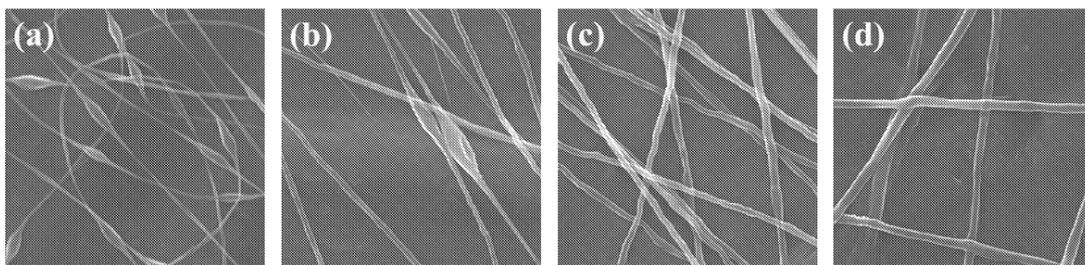


Figura 23. Efecto de la tensión superficial en la morfología de las fibras. Óxido de polietileno (PEO) al 3% *w/w* en agua:etanol a diferentes ratios con tensión superficial de (a) 75,8 mN/m (100:0), (b) 59,3 mN/m (80:20), (c) 54,7 mN/m (70:30) y (d) 50,5 mN/m (60:40). Modificada de [72]

Parámetros del proceso

Flujo

Para formar un cono de Taylor estable se requiere un volumen mínimo de disolución en la punta de la aguja. [74] Por tanto, se requiere un flujo mínimo para obtener fibras, ya que por debajo de este flujo mínimo el campo eléctrico genera inestabilidades de Rayleigh sobre la disolución y, en consecuencia, se forman gotas.

A partir de este flujo mínimo, conforme aumenta éste también aumenta el tamaño de la fibra (Figura 24) debido a que hay un mayor volumen de disolución y la velocidad a la que se desplaza el chorro es mayor. Sin embargo, por encima de un valor máximo de flujo se vuelven a obtener fibras con defectos de gotas, incluso fibras fusionadas, debido a que hay una mayor cantidad de disolvente, que tiene poco tiempo para evaporarse. [75]

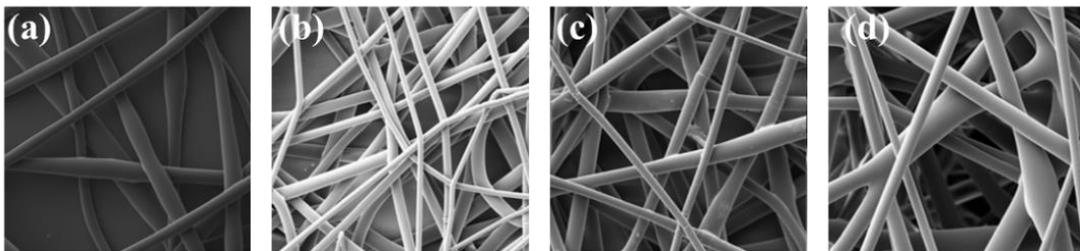


Figura 24. Efecto del flujo en el diámetro de las fibras. Acetato de polivinilo en cloroformo a 380 mg/ml, manteniendo el voltaje a 21 kV y la distancia a 20 cm, con (a) 2 ml/h, (b) 3 ml/h, (c) 4 ml/h y (d) 5 ml/h. Modificada de [75]

Voltaje

El voltaje es un parámetro fundamental en el proceso de *electrospinning*, pues determina la fuerza electrostática que se genera y que debe ser superior a la tensión superficial para que se produzca el chorro. De este modo, existe un voltaje mínimo por debajo del cual no es posible obtener fibras. [76]

A partir de ese voltaje mínimo, podemos encontrar dos comportamientos diferentes: Somsap *et al.* (2018) en su estudio observaron una reducción del diámetro de la fibra al aumentar el voltaje, mientras que en el experimento de Liu *et al.* (2011) el diámetro de fibra aumentaba. [77], [78] Este doble comportamiento se debe a que cuando el voltaje es bajo, un incremento en él supone un mayor estrechamiento de la fibra al haber una mayor fuerza electrostática; sin embargo, cuando el voltaje es muy elevado, el cono de Taylor es más inestable y la

disolución tiene menos tiempo para evaporarse, dando lugar a fibras de mayor diámetro y defectos de gotas. [79]

La siguiente figura muestra este doble comportamiento de las fibras en función del voltaje:

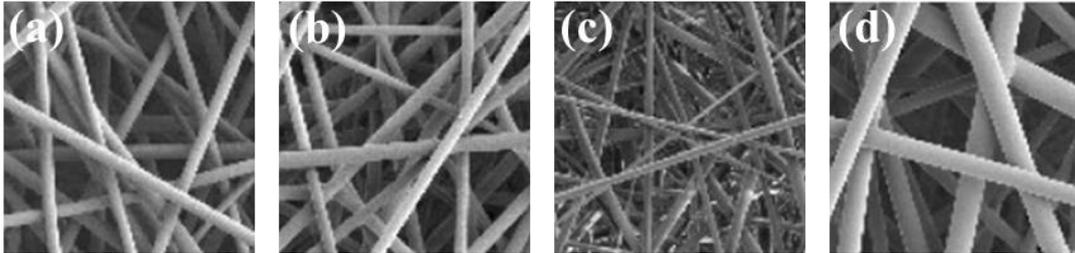


Figura 25. Efecto del voltaje en el diámetro de las fibras. Acetato de polivinilo al 15% *w/v*, distancia aguja-colector = 10 cm y flujo 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, con (a) 10 kV, (b) 12,5 kV, (c) 15 kV y (d) 17,5 kV. Modificada de [79]

Distancia aguja-colector

Lee *et al.* (2004) pudieron observar en su estudio que el efecto de la distancia aguja-colector presenta también un doble comportamiento. Conforme aumenta la distancia entre la aguja y el colector, disminuye el diámetro de fibra, hasta alcanzar un determinado valor en el cual se produce un punto de inflexión y el diámetro de fibra empieza a aumentar con la distancia. [80]

Este comportamiento, que se puede ver en la Figura 26, se debe a que la distancia aguja-colector está relacionada con la evaporación del disolvente, pero también con el tiempo de elongación del chorro. [81], [82] De este modo, podemos encontrarnos con tres regiones diferentes:

- (i) Por debajo de una distancia crítica, se producen defectos de gota debido a que el disolvente no tiene tiempo suficiente para evaporarse.
- (ii) A partir de dicha distancia, conforme aumenta la distancia aguja-colector, el mayor tiempo de elongación del chorro permite que las fibras se estiren más y, por tanto, presenten un diámetro menor.
- (iii) Una vez que se ha superado el punto de inflexión, el diámetro de las fibras comienza a aumentar debido a que se reduce el campo eléctrico (voltaje dividido por distancia).

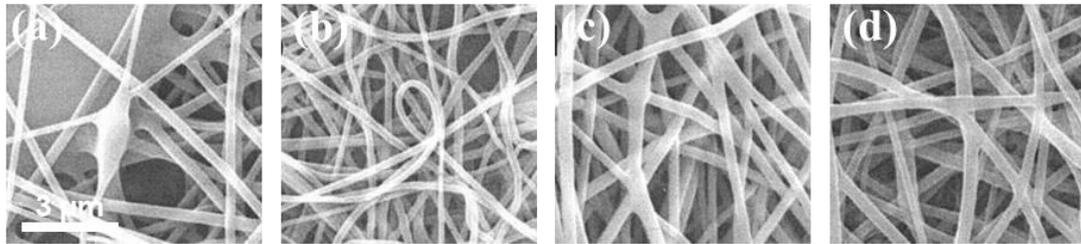


Figura 26. Efecto de la distancia aguja-colector. Alcohol de polivinilo al 7% *w/v* en agua, variando la distancia aguja-colector: (a) 5 cm, (b) 7 cm, (c) 13 cm y (d) 15 cm. Modificada de [80]

Diámetro de la aguja

De acuerdo con Kuchi *et al.* (2018), que analizaron la morfología de nanofibras de TiO_2 obtenidas con agujas de diferente diámetro interno, el diámetro de fibra es directamente proporcional al diámetro de la aguja. Esto se debe a que, con una aguja de menor diámetro, el radio de la gota disminuye y, por tanto, su tensión superficial aumenta. Como consecuencia de ello, la resistencia que opone la gota durante la etapa de alargamiento del chorro es mayor y se moverá más lentamente, lo que favorece un mayor estrechamiento en la siguiente etapa. [83]

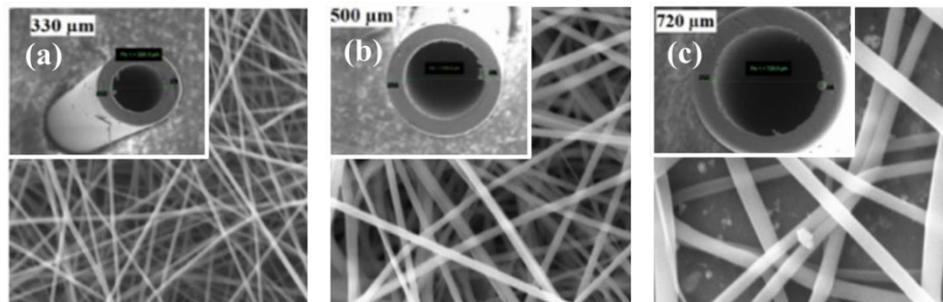


Figura 27. Diámetro de fibra en función del diámetro interno de la aguja: (a) 330 μm , (b) 500 μm y (c) 720 μm . Modificada de [83]

Parámetros ambientales

Humedad relativa

La humedad relativa (HR) afecta a la morfología de las fibras de dos maneras. En primer lugar, influye sobre el diámetro de éstas; sin embargo, parece que existe un efecto contrario en función de la hidrofobicidad del polímero.

Levitt *et al.* (2018) analizaron la influencia de la humedad relativa en membranas de poliacrilonitrilo (PAN) y observaron que conforme aumentaba la humedad, aumentaba el diámetro de las fibras. [84]

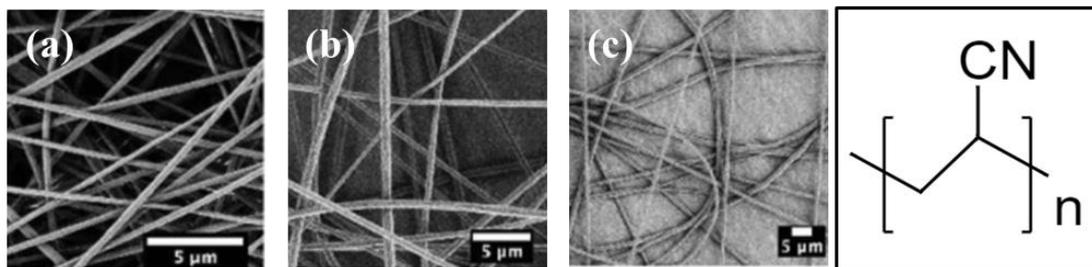


Figura 28. Variación del diámetro de fibra de PAN en función de la humedad relativa. (a) 23% HR, (b) 33% HR y (c) 43% HR. Modificada de [84]

Por el contrario, Pelipenko *et al.* (2013) encontraron que para el alcohol polivinílico (PVA) conforme aumenta la humedad relativa, disminuye el diámetro de las fibras. [85]

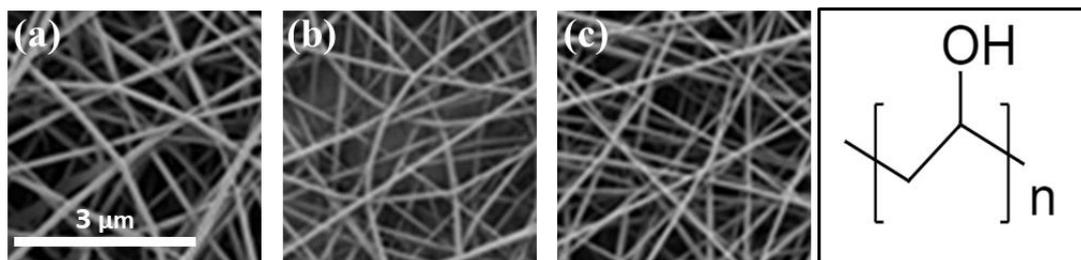


Figura 29. Variación del diámetro de fibra de PVA en función de la humedad relativa. (a) 10% HR, (b) 30% HR y (c) 60% HR. Modificada de [85]

Esta diferencia en el comportamiento de los polímeros puede deberse a que, por un lado, en los polímeros hidrófilos (como el PVA), el agua actuaría como disolvente y, además, habría cierta absorción de agua por parte del polímero. Este hecho daría lugar a una solidificación del chorro más lenta y, por tanto, la etapa de estrechamiento duraría más, reduciéndose el diámetro de fibra. [85] Por el contrario, en el caso de polímeros hidrófobos (como el PAN),

el agua no actúa como disolvente, de modo que la evaporación de éste es más rápida que en el caso anterior, y la etapa de estrechamiento del chorro es más corta. [84], [86]

Por último, la humedad relativa puede dar lugar a la formación de poros en la fibra que, además, podrán encontrarse tanto en el interior como en el exterior de la fibra, en función del disolvente empleado, como indican Fashandi & Karimi (2012). [86]

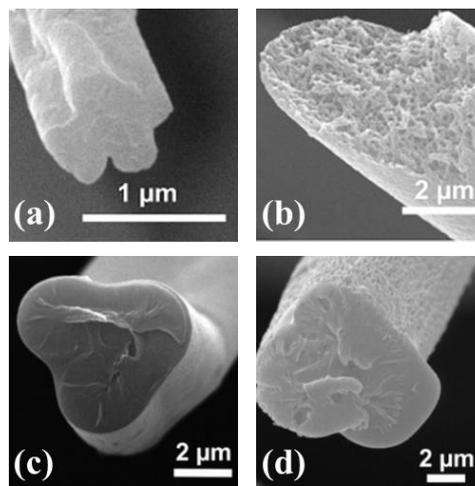


Figura 30. Formación de poros en función de la humedad relativa y del tipo de disolvente. (a) DMF - 20% HR, (b) DMF - 60% HR, (c) THF - 20% HR y (d) THF - 60% HR. Modificada de [86]

Cuando se emplea un disolvente no volátil (como DMF), se producen poros internos debido a una inestabilidad termodinámica de la disolución polimérica al penetrar agua en fase gaseosa, lo que se conoce como separación de fases inducida por el vapor, mientras que al emplearse un disolvente volátil (como el THF), la porosidad aparece en la superficie como resultado de la condensación del agua debido al enfriamiento por evaporación de la superficie del chorro.[86]

Temperatura

Huang *et al.* (2008) observaron que, para el fluoruro de polivinilideno (PVDF), un aumento de la temperatura de trabajo reducía el diámetro de las fibras, debido a que contribuía a una menor tensión superficial. [87] Sin embargo, un estudio de Yang *et al.* (2017), determinó que esta tendencia no se mantenía constante y, a partir de un determinado valor, el diámetro aumentaba, como puede verse en la Figura 31. [88]

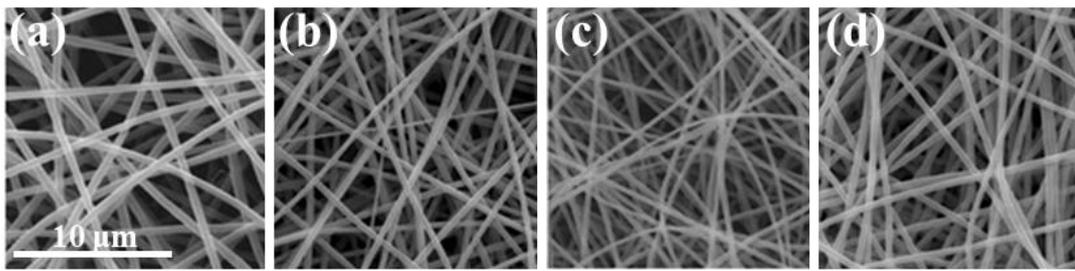


Figura 31. Efecto de la temperatura en el diámetro de fibra. (a) 20 °C, (b) 30 °C, (c) 40 °C y (d) 50 °C. Modificada de [88]

Este cambio de tendencia, que dependerá principalmente del disolvente empleado, se debe a que el efecto de la temperatura no sólo contribuye a una reducción de la tensión superficial, sino que también acelera el proceso de evaporación del disolvente. [88]

Materiales y métodos

Estudios previos

En estudios realizados previamente, se obtuvo membranas de PLA, PCL y PLAPCL con dos diámetros de fibra diferentes (0,8 y 1,8 μm) cuyo comportamiento en cultivo celular fue analizado para encontrar diferencias entre estos tamaños. Como resultado, se concluyó que las membranas de 1,8 μm favorecían el cultivo de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo y permitían su diferenciación en condrocitos, sin necesidad de un medio condrogénico específico. [89] Por tanto, se seleccionó el diámetro de fibra de 1,8 μm para el desarrollo de esta tesis doctoral.

Dado que se va a trabajar tanto con los homopolímeros PLA y PCL y su mezcla (PLAPCL), como con los copolímeros de ácido láctico y caprolactona con ácido glicólico (P(LA-co-GA) y P(CL-co-GA), en adelante PLGA y PCLGA, en la Tabla 2 se detallan los parámetros ya obtenidos para el desarrollo de membranas electrohiladas de PLA, PCL y PLAPCL con un diámetro de fibra de 1,8 μm .

Cabe destacar que en el desarrollo de esta tesis doctoral también se optimizaron los parámetros de disolución de las membranas de PLAPCL para evitar el empleo del sistema de disolventes DCM/DMF, ya que se observaron problemas debido a las diferencias en el punto de ebullición de ambos disolventes (T de ebullición DCM: 39,6 °C; T de ebullición DMF: 153 °C). El sistema de disolventes empleados fue, al igual que en los homopolímeros,

cloroformo/metanol (clor/met; T de ebullició cloroformo: 61,2 °C; T de ebullició metanol: 64,7 °C).

Tabla 2. Parámetros de la disolución y del proceso de *electrospinning* para la obtención de membranas con un diámetro de fibra de 1,8 μm , para los homopolímeros PLA, PCL y su mezcla PLAPCL.

	PLA	PCL	PLAPCL
parámetros de la disolución			
<i>Concentración (% w/v)</i>	15	15	10
<i>Ratio disolventes clor:met (v/v)</i>	2:1	2:1	4:1
parámetros del proceso			
<i>Flujo (ml/h)</i>	2	2	2
<i>Voltaje (kV)</i>	20	25	20
<i>Distancia aguja-colector (cm)</i>	13	13	15

Preparación de las membranas electrohiladas

Para la obtención de membranas electrohiladas, fue necesario preparar previamente las disoluciones poliméricas. Para ello, el PLGA (50:50 Mw 38.000-54.000 g/mol, terminación ácido y éster; *Sigma Aldrich*) y PCLGA (caprolactona:glucólico 45:55, viscosidad 1,5 dl/g; *Sigma Aldrich*) se disolvieron en cloroformo (estabilizado con etanol; *Scharlab*) y 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP; $\geq 99,9\%$; *Sigma Aldrich*) a diferentes concentraciones, en un rango de 10 a 25% *w/v*. Las disoluciones se mantuvieron en agitación magnética 48 horas y, posteriormente, se introdujeron en una jeringa de 10 ml de capacidad para ser electrohiladas. A la jeringa se le acopló una aguja de 24G (diámetro interno = 0,31 mm), y se puso en una bomba eyectora RS-232, modelo NE 1000 (*New Era Pump Systems, Inc.*) que se ajustó para trasegar un caudal de 2 ml/h. Opuesto a la aguja se posicionó un colector previamente recubierto de papel de aluminio, para facilitar la extracción de la membrana. La distancia entre la aguja y el colector se varió de 13 a 20 cm. Finalmente, tanto la aguja como el colector se conectaron a una fuente generadora de alta tensión OL400W-503 (*HiTek Power*), variando el voltaje de trabajo entre 13 y 20 kV.

Todo ello se llevó a cabo en el interior de una cabina diseñada para trabajar en unas condiciones de humedad controlada, para reducir su efecto sobre la morfología de la membrana. De este modo, un flujo de aire comprimido seco circulaba continuamente por el interior de la cabina, manteniéndose la humedad relativa por debajo del 20%. Además, el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente (entre 20 y 22 °C).

En la Figura 32 se muestra una imagen del montaje de *electrospinning*.

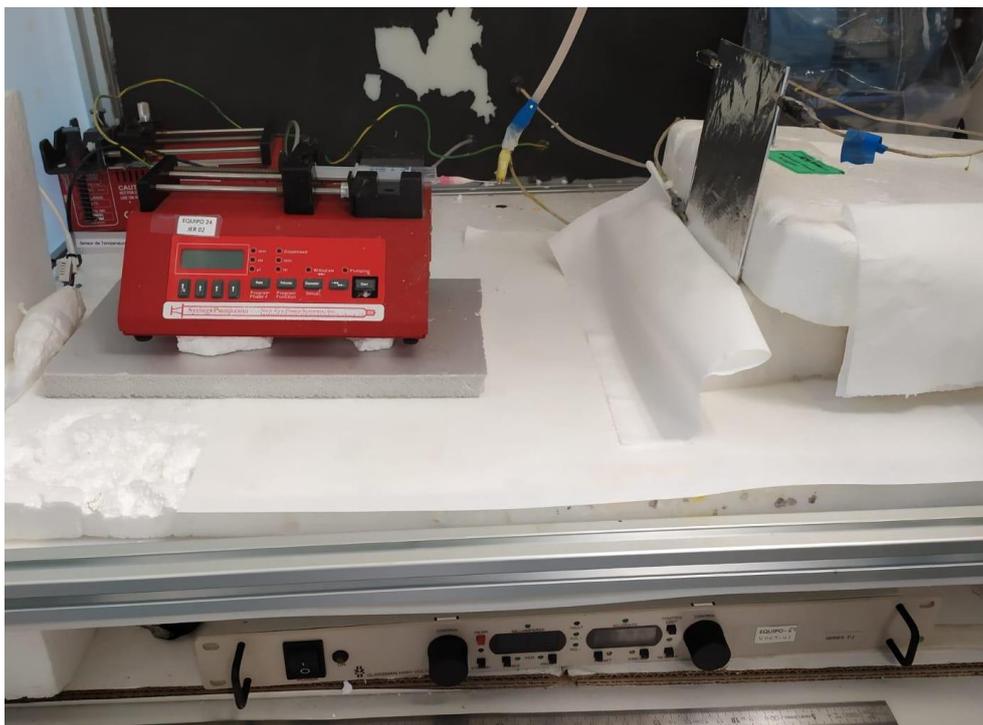


Figura 32. Montaje del electrospinning.

Finalmente, las membranas obtenidas, de $10 \times 15 \text{ cm}^2$, se mantuvieron *overnight* en una campana de extracción para asegurar la completa evaporación del disolvente. Trascurrido este tiempo, se separaron las membranas del papel de aluminio y se mantuvieron en la nevera ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) hasta su caracterización, para evitar su degradación por efecto de la temperatura.

Caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido

Con el fin de detectar cualquier defecto en las membranas (por ejemplo, gotas), así como estudiar los diámetros de fibra, se tomaron imágenes en el microscopio electrónico de barrido (SEM, JEOL modelo JSM6300) del Servicio de Microscopía de la Universitat Politècnica de València.

Dado que el SEM trabaja haciendo incidir sobre la muestra un haz de electrones, éstas deben cumplir una serie de requisitos: (i) deben estar completamente secas, y (ii) deben ser conductoras. Por tanto, todas las muestras se mantuvieron a vacío las 24 h previas y se recubrieron con oro mediante deposición por bombardeo iónico en fase gaseosa. Este

recubrimiento fue realizado por el Servicio de Microscopía. Los parámetros del microscopio con los que se trabajó fueron un voltaje de 15 kV y una distancia de trabajo de 12 mm.

Una vez obtenidas las imágenes, las muestras que presentaban defectos fueron descartadas y el resto se analizó con el programa *ImageJ v.1.50* para obtener la distribución de los diámetros de fibra. Para que los resultados fueran representativos, se tomaron dos imágenes a $\times 1000$ aumentos, sobre las que se midió un total de 50 fibras en cada una de ellas. Además, la distribución de los diámetros de fibras se representó con un histograma realizado mediante el *software Statgraphics XVII (Data Analysis Solutions)*.

Caracterización de las disoluciones poliméricas

Una vez obtenidos los parámetros del *electrospinning* para la obtención de membranas electrohiladas de PLGA y PCLGA, se caracterizaron las disoluciones poliméricas para poder hacer un estudio en el que relacionar sus propiedades con los parámetros del *electrospinning*.

Para tal fin, se determinó la densidad, la tensión superficial, la viscosidad y la conductividad eléctrica de cada una de las disoluciones.

Densidad:

La densidad se obtuvo empleando un picnómetro de 10 ml, que previamente fue calibrado con agua destilada, cuya densidad (kg/m^3) en función de la temperatura viene definida por la siguiente ecuación (Jones & Harris, 1992):

$$\rho_{H_2O} \left(\frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right) = 999,85308 + 6,32693 \cdot 10^{-2} \cdot T - 8,523829 \cdot 10^{-3} \cdot T^2 + 6,943248 \cdot 10^{-5} \cdot T^3 - 3,821216 \cdot 10^{-7} \cdot T^4 \quad (1)$$

siendo T la temperatura en grados centígrados ($^{\circ}\text{C}$).

Para el calibrado del picnómetro, se pesó en una balanza XS105 DualRange (*Mettler Toledo*) el picnómetro vacío (m_p) y el picnómetro lleno de agua destilada (m_{H_2O}), de modo que el volumen del picnómetro (V_p) pudo determinarse como:

$$V_p = \frac{m_{H_2O} - m_p}{\rho_{H_2O} (26^{\circ}\text{C})} \quad (2)$$

Una vez conocido el volumen exacto del picnómetro, se pesó el picnómetro lleno con cada una de las disoluciones polimérica (m_{dis}), siendo la densidad de cada una de las disoluciones poliméricas:

$$\rho_{dis} = \frac{m_{dis} - m_p}{V_p} \quad (3)$$

Para cada disolución se hizo tres medidas.

Tensión superficial:

Tal y como ocurrió con las disoluciones poliméricas de los homopolímeros estudiadas previamente, debido a la viscosidad de las disoluciones y la rápida evaporación de los disolventes, fue necesario emplear la ley de Tate modificada para la obtención de la tensión superficial.[90], [91]

La ley de Tate se basa en el equilibrio entre el peso de la gota, que hace que la gota caiga por un capilar, y la fuerza debida a la tensión superficial, que hace que la gota quede suspendida en la punta del capilar, tal y como se muestra en la Figura 33.

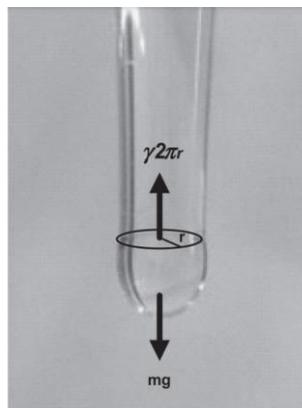


Figura 33. Gota formada en la punta de un capilar, sobre la que se representan las fuerzas que actúan en ella de acuerdo con la ley de Tate. Extraída de [91]

Según esta ley, justo antes de que la gota caiga por el capilar, en condiciones de equilibrio, el peso de la gota colgante es igual a la componente vertical de la fuerza ejercida por la tensión superficial, que es proporcional al perímetro mojado de la frontera entre el líquido y el capilar:

$$m \cdot g = \gamma \cdot 2 \cdot \pi \cdot r \quad (4)$$

donde m es la masa de la gota que cae, g es la aceleración de la gravedad, γ es la tensión superficial de la interfase gota-aire, y $2\pi r$ es el perímetro mojado. Según las características del líquido, r será el radio interno o externo del capilar. Además, debe garantizarse que la caída de la gota haya sido lo suficientemente lenta como para minimizar los efectos hidrodinámicos, que conducen a gotas irregulares. Para evitar estos efectos, se necesitan tiempo de formación superiores a 30 s.

Riba & Esteban (2014) señalan, sin embargo, que con esta ley se obtienen valores inferiores a los reales. Esto se debe a que la ley de Tate supone una caída ideal, en la que toda la gota colgante se libera desde el extremo del capilar, obteniéndose una gota que cae con la misma masa que la gota colgante original formada cuando se ha alcanzado el máximo tamaño estable. En la realidad, se ha comprobado que dependiendo de factores que incluyen las características del líquido analizado o la geometría del capilar, entre otros, hasta un 40% del volumen de la gota puede quedar en el capilar y no caer. Por ello se modifica esta ley con un factor corrector F , descrito por Earnshaw *et al.* (1996). [92]

$$m \cdot g = F \cdot \gamma \cdot 2 \cdot \pi \cdot r \quad (5)$$

Este factor de corrección F relaciona el cociente entre el volumen de la gota real y el volumen de la gota ideal para el radio adimensional del capilar $r/V^{1/3}$, y según la aproximación matemática de Lee-Chan-Pogaku, queda como:

$$\begin{aligned}
 F\left(\frac{r}{V^{1/3}}\right) = & 1 - 0,9121 \cdot \left(\frac{r}{V^{1/3}}\right) - 2,109 \cdot \left(\frac{r}{V^{1/3}}\right)^2 + 13,38 \cdot \left(\frac{r}{V^{1/3}}\right)^3 \\
 & - 27,29 \cdot \left(\frac{r}{V^{1/3}}\right)^4 + 27,53 \cdot \left(\frac{r}{V^{1/3}}\right)^5 - 13,58 \cdot \left(\frac{r}{V^{1/3}}\right)^6 \\
 & + 2,593 \cdot \left(\frac{r}{V^{1/3}}\right)^7
 \end{aligned} \quad (6)$$

Así pues, combinando las ecuaciones (5) y (6) podemos obtener la tensión superficial γ de la disolución polimérica. Para ello, fue necesario pesar en un recipiente sellado para minimizar la evaporación del disolvente, al que se hizo un agujero, 5 gotas de la disolución polimérica, que se dejaron caer por gravedad. La balanza empleada fue una balanza de precisión AX205 (*Mettler Toledo*).

Viscosidad:

La viscosidad dinámica de las disoluciones se obtuvo con un reómetro Discovery HR-2 hybrid (*TA Instruments*) a partir de un ensayo oscilatorio a una frecuencia de 100 Hz y una velocidad angular de 100 rad/s. Se realizaron tres réplicas para cada una de las disoluciones, empleando cada vez un volumen de 500 μl .

Con los datos obtenidos en el ensayo se pudo obtener la viscosidad dinámica (η') y la viscosidad de almacenamiento (η''), como:

$$\eta' = \frac{G''}{\omega} \quad \eta'' = \frac{G'}{\omega} \quad (7)$$

donde G'' es el módulo de pérdidas, G' es el módulo de almacenamiento y ω la velocidad angular.

Conductividad eléctrica:

La medida de conductividad de las disoluciones se realizó con un conductímetro EC-Meter Basic 30+ (*Crison Instruments*), previamente calibrado con tres disoluciones patrón de conductividades conocidas. Cada disolución se midió 3 veces.

Determinación de las propiedades fisicoquímicas de las membranas

Una vez obtenidas las membranas electrohiladas de los copolímeros, y caracterizadas las disoluciones poliméricas que dieron lugar a ellas, se caracterizó fisicoquímicamente todas las membranas.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica de **espectroscopía vibracional**, por lo que permite obtener la siguiente información: (i) al tratarse de un **espectrofotómetro**, mide la absorbancia (cantidad de luz absorbida por la muestra) o la transmitancia (cantidad de luz que pasa a través de la muestra). Aunque ambos parámetros están relacionados entre sí, únicamente la absorbancia es proporcional a la concentración, y con su medida podemos hacer análisis cuantitativo.[93] (ii) Dado que la radiación infrarroja al interactuar con la materia provoca la **vibración** de los átomos a determinadas longitudes de onda, podemos identificar la muestra determinando los modos vibracionales, que son característicos de los diferentes enlaces y grupos funcionales. [94]

Así pues, con esta técnica de caracterización de los materiales es posible determinar los grupos funcionales presentes en las muestras, lo que permite conocer la adecuada formación de mezclas, así como la presencia de restos de disolvente en las membranas.

Las muestras fueron analizadas en un equipo FTIR ALPHA (*Bruker*), en un rango de longitud de onda desde 4000 hasta 400 cm^{-1} . Antes de realizar las medidas se obtuvo el espectro del aire, empleando las mismas condiciones instrumentales, como calibración del equipo. Los espectros se adquirieron en función de la transmitancia, realizando una medida para cada tipo de material (membranas y films).

Calorimetría diferencial de barrido

Unos de los parámetros característicos de cada uno de los polímeros es su temperatura de fusión (T_f) y su temperatura de transición vítrea (T_g). Únicamente aquellos polímeros que sean semicristalinos presentarán ambas temperaturas, los polímeros amorfos sólo tienen una temperatura de transición vítrea.

Mediante la calorimetría diferencial de barrido (DSC) es posible determinar ambas temperaturas de los polímeros, de modo que se puede observar si el proceso de fabricación ha modificado la estructura polimérica de los materiales, ya que ambas temperaturas son conocidas y están tabuladas. Además, en el caso de la mezcla permite cuantificar la cantidad de cada uno de los polímeros que la componen.

Esta técnica consiste en cuantificar la cantidad de calor que es absorbida o liberada por una sustancia cuando ésta se mantiene a temperatura constante durante un tiempo, o cuando es calentada o enfriada a una velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas. (Suriñach *et al.*, 1992) Para ello, se estudia la diferencia entre la velocidad de flujo de calor entre un crisol que contiene la muestra y uno de referencia vacío, cuando se someten al mismo programa de temperatura en una atmósfera especificada. (norma **UNE-EN ISO 11357-1:2017**)

Existen dos tipos de DSC: DSC de flujo térmico y DSC de compensación de potencia. En este caso, se empleó un DSC de **flujo térmico** en el que la muestra y la referencia están sometidas al mismo programa de temperatura controlada por una única fuente de calor. Una diferencia de temperatura (ΔT) sucede entre la posición de la muestra y la posición de la referencia, debido a la diferencia en la capacidad calorífica de ambas. De esta diferencia de temperatura, se deriva la diferencia en las velocidades del flujo de calor entre ambas

posiciones y, normalmente, se registra la temperatura en función de la temperatura de referencia o del tiempo.

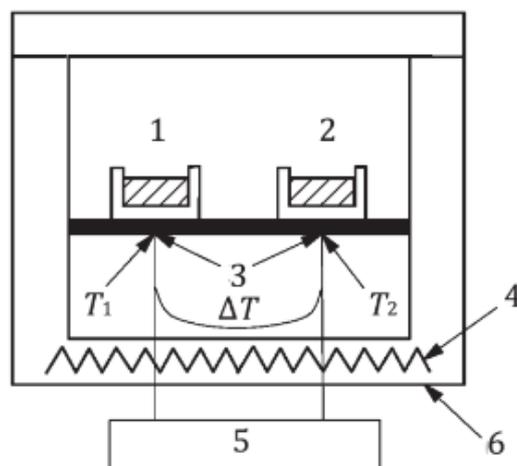


Figura 34. Esquema de un DSC de flujo térmico. (1) posición de la muestra, (2) posición de la referencia, (3) termopares, (4) calentador individual, (5) circuito de medición para $T_{muestra} = T_1$, $T_{referencia} = T_2$ y diferencia de temperaturas ΔT , y (6) estufa circundante. Extraída de [95]

Para llevar a cabo el ensayo se realizó, atendiendo a la norma citada, un calibrado previo con Indio (*on-set* en 156,60 °C) y, a continuación, se obtuvo la línea de base instrumental empleando crisoles vacíos tanto en la posición de la muestra como en la de la referencia. Por último, se realizó las medidas introduciendo en la posición de la muestra un crisol con una determinada masa (menor de 10 mg) de polímero.

Es importante tener en cuenta que la carga de las cápsulas se debe realizar a temperatura ambiente, o ligeramente por encima (50 °C) para prevenir la condensación de la humedad en los crisoles.

Todas las muestras, así como las líneas base, fueron sometidas al mismo programa de temperatura, por lo que se consultaron previamente la T_f y T_g de cada uno de los homopolímeros:

Tabla 3. Temperatura de transición vítrea (T_g) y de fusión (T_f) de los diferentes homopolímeros. [96]

	T_g (°C)	T_f (°C)
PLA	53 a 64	145 a 186
PCL	-72	58
PGA	45	222

De este modo, y teniendo en cuenta que las mezclas y copolímeros tienen temperaturas intermedias de T_g y T_f respecto de los homopolímeros que los componen, se realizaron los siguientes barridos:

- (1) 1 min a -80 °C
- (2) -80 a 200 °C, 20 °C/min
- (3) 1 min a 200 °C
- (4) 200 a -80 °C, 20 °C/min
- (5) 1 min -80 °C
- (6) -80 a 200 °C, 20 °C/min

Lo barridos del 1 al 5 son para borrar la memoria térmica del material, siendo el barrido empleado para los estudios el número 6.

A partir de los termogramas obtenidos se calculó la cristalinidad de los polímeros, a partir de la siguiente ecuación:

$$X (\%) = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^\infty \cdot w} \cdot 100 \quad (8)$$

Siendo ΔH_f la entalpía de fusión del polímero, ΔH_f^∞ la entalpía de fusión del polímero si este fuera 100% cristalino (93 J/g para el PLA y 139,5 J/g para la PCL), y w la fracción másica del PLA y la PCL (0,5 en el caso de la mezcla PLAPCL y 1 para el material puro).

Estudio mecánico de las membranas

Para los ensayos mecánicos fue necesario obtener, además, los materiales en bloque (o *films*). La técnica empleada para ello fue el *solvent-casting*, que consiste en verter la disolución polimérica en una placa Petri y dejarla 24 h en una campana de extracción para que el disolvente se evapore.

Tanto los *films* como las membranas se sometieron a un ensayo de tracción para determinar el módulo elástico.

Determinación del módulo de Young (E)

Para determinar el módulo de elasticidad (o módulo de Young, E) de cada material se empleó un dilatómetro TMA/SS6000 (*Seiko*) acoplado a una plataforma antivibratoria MOD-1 M plus (*Halcyonics*), teniendo en cuenta la norma **UNE-EN ISO 527-1:2020**.

En primer lugar, se preparó una probeta de cada una de las muestras con las siguientes dimensiones:

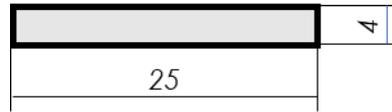


Figura 35. Dimensiones de las probetas del ensayo mecánico TMA. Unidades: mm

A continuación, se midió el espesor de cada muestra con un medidor de espesores MiniTest 3100 (*ElektroPhysik*), para determinar el área transversal (A_t) de la probeta, que será un parámetro necesario para determinar la tensión aplicada. Finalmente, la probeta se colocó entre las mordazas y se puso en el vástago adecuado para el ensayo de tracción (como se ve en la Figura 36).



Figura 36. Posición de la probeta en el dilatómetro para medir el módulo elástico a tracción.

Una vez colocada la muestra, se midió la longitud inicial (L_0) con el *software* del equipo, y se configuró el ensayo para realizar una rampa de tensión de 0 a 5884 mN (valor máximo que alcanza el equipo), a una velocidad de 100 mN/min. El ensayo se realizó a temperatura ambiente.

Los datos que se obtienen del equipo son alargamiento (Δl) y carga (F). Así pues, para calcular el módulo de Young, se calculó la deformación (ε) y la tensión (σ) como:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{L_0} \quad (9)$$

$$\sigma = \frac{F}{A_t} \quad (10)$$

Con ello, el módulo de Young, que se define como la pendiente de la curva σ - ε en el régimen de comportamiento elástico, es decir, cuando la relación entre la tensión y la deformación es lineal, se determinó con la fórmula siguiente:

$$\sigma = E\varepsilon \quad (11)$$

Resultados y discusión

Optimización de los parámetros de electrospinning para la obtención de membranas de PLGA y PCLGA con un diámetro de fibra de 1,8 μ m

Para la optimización de los parámetros del *electrospinning*, se tuvo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio previo. De acuerdo con ello, para un mayor efecto en la morfología y, en particular, en el diámetro de las fibras, se deben modificar los parámetros de la disolución, concretamente la concentración de polímero y el disolvente empleado. Además, de los parámetros del proceso, el voltaje desempeña también un papel fundamental. Finalmente, para pequeños ajustes en el diámetro, se debe modificar el flujo y/o la distancia aguja-colector. [90]

Por todo ello, se inició el estudio de optimización seleccionando unos parámetros de partida definidos a partir de los resultados de las investigaciones de Bini *et al.* (2006) y Mehrasa *et al.* (2016). [97], [98] Estos parámetros se detallan a continuación:

Tabla 4. Parámetros de partida para la obtención de membranas de PLGA y PCLGA de 1,8 μ m.

PLGA y PCLGA	
parámetros de la disolución	
<i>Concentración (% w/v)</i>	10
<i>Disolvente</i>	HFIP
parámetros del proceso	
<i>Flujo (ml/h)</i>	2
<i>Voltaje (kV)</i>	17
<i>Distancia aguja-colector (cm)</i>	13

Con estos parámetros se obtuvo membranas que se observaron al SEM para estudiar su morfología. Los resultados de este estudio morfológico se muestran en la Figura 37.

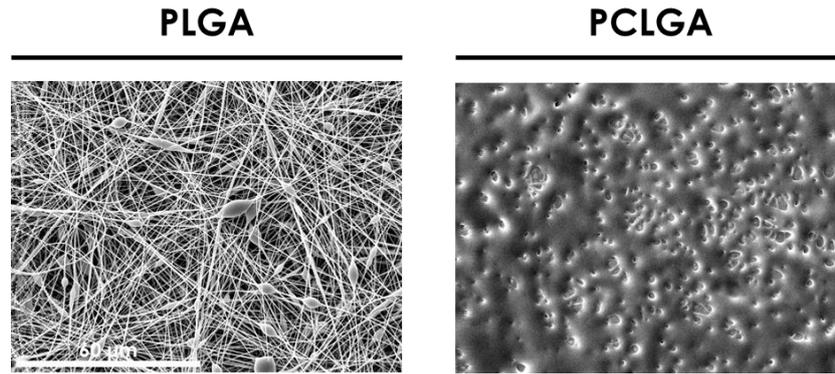


Figura 37. Imágenes SEM de las membranas de PLGA y PCLGA obtenidas con los parámetros de partida.
Barra de escala: 60 μm

Como puede observarse, únicamente se electrohiló el PLGA, aunque la membrana presentaba defectos de gota. En el caso del PCLGA no se obtuvo fibras, probablemente porque el disolvente no se evaporó durante el proceso.

Dado que los resultados mostraron un comportamiento diferente de ambos polímeros en el proceso, la optimización se planteó de modo diferente para cada uno de ellos:

- (i) para el PLGA, al obtenerse fibras finas con defectos de gota, se incrementó la concentración de polímero al 25% *w/v*. Como se ha visto en la introducción, un aumento de la concentración elimina defectos de gota, a la vez que aumenta el diámetro de las fibras. [99], [100]
- (ii) para el PCLGA, se planteó el uso de cloroformo como disolvente, debido a su polaridad y a su menor constante dieléctrica. [101], [102] Además, se estudió también el efecto de la concentración del polímero aumentándola al 18 y 20% *w/v*, ya que, al haber menos cantidad de disolvente, éste puede evaporarse más fácilmente.

En este primer momento, se mantuvieron constantes los parámetros del proceso para evaluar únicamente el efecto de los parámetros de la disolución, obteniéndose las membranas que se muestran en la Figura 38.

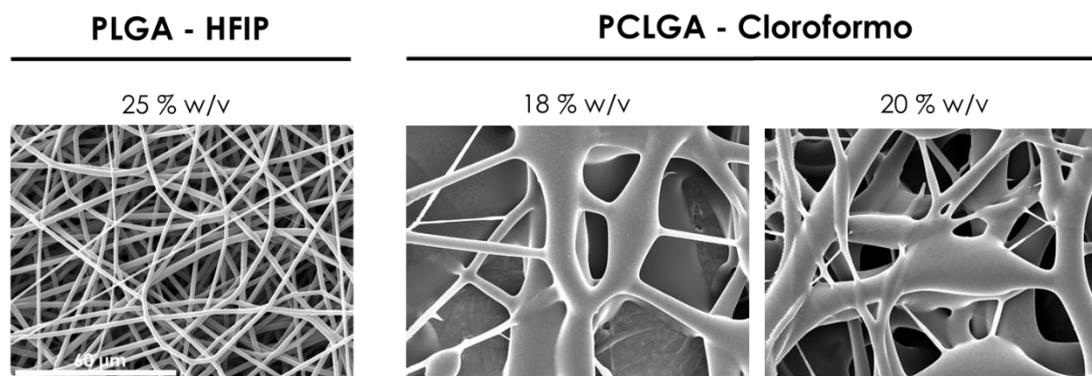


Figura 38. Imágenes SEM del PLGA al 25% *w/v* en HFIP y del PCLGA al 18 y 20% *w/v* en cloroformo, a 2 ml/h, 17 kV y 13 cm. Barra de escala: 60 μm

La Figura 38 muestra cómo un incremento en la concentración de PLGA permitió obtener membranas electrohiladas sin defectos de fibra y, además, con un diámetro de fibra mayor. Al presentar una adecuada morfología, se determinó el diámetro de las fibras, que resultó en $1,62 \pm 0,27 \mu\text{m}$ de media. Por tanto, para el **PLGA** se establecieron los parámetros de la disolución en **25% w/v en HFIP**.

En el caso del PCLGA, el uso de cloroformo mejoró el electrohilado de este copolímero al observarse una morfología en la que se empezaban a definir fibras; sin embargo, éstas no se formaron adecuadamente. En la bibliografía se ha descrito que para obtener fibras finas y uniformes se pueden añadir sales a la disolución polimérica para aumentar su conductividad. [62], [103] Por ello, se planteó añadir piridina (anhidra, 99,8%; *Sigma Aldrich*) al 5 y al 10% *v/v* de concentración a la disolución de 20% *w/v* en cloroformo, manteniendo los parámetros del electrohilado.

Se seleccionó la piridina al haber estudios que demuestran que ésta se evapora durante el proceso del *electrospinning*, por lo que no se requieren lavados posteriores de las membranas. Además, se seleccionaron concentraciones superiores al 5% *v/v* ya que por debajo de esta concentración no se tiene un efecto significativo sobre la conductividad. [104]

Con todo ello, las membranas de PCLGA observadas al SEM son las siguientes:

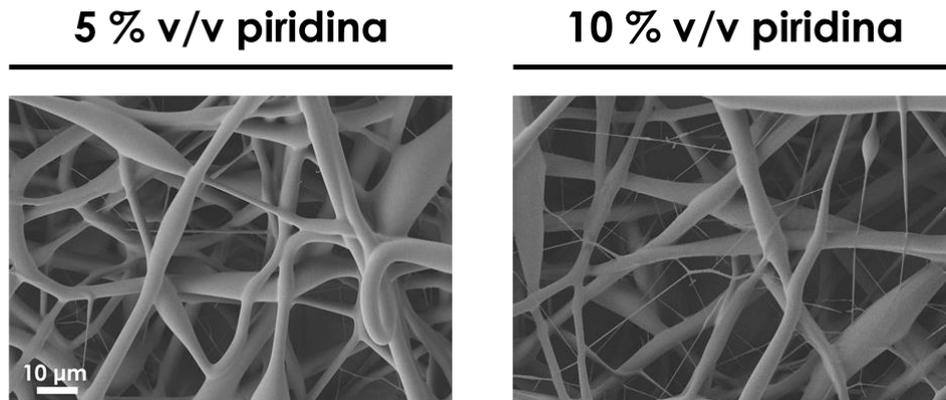


Figura 39. Imágenes SEM del PCLGA al 20% *w/v* en cloroformo con 5 y 10% *v/v* de piridina, a 2 ml/h, 15 kV y 20 cm. Barra de escala: 10 μm .

Las imágenes SEM muestran que la adición de piridina en la disolución polimérica permitió obtener membranas con fibras más definidas, aunque el diámetro de éstas es elevado y todavía no se muestra una morfología homogénea. De este modo se plantearon dos acciones paralelas para obtener una mayor homogeneidad y un menor diámetro de fibra: (i) por un lado, se redujo la concentración del copolímero a un 17% *w/v*; (ii) por otro lado, se planteó el uso de un sistema binario de disolventes con la piridina, **cloroformo:piridina (80:20 *v/v*)** para aumentar el efecto de la piridina en el proceso.

Estas muestras se observaron al microscopio óptico, observándose una morfología adecuada, por lo que se establecieron estos parámetros para el PCLGA. De este modo, una vez seleccionados los parámetros de la disolución para ambos copolímeros, se pasaron a optimizar los parámetros del proceso.

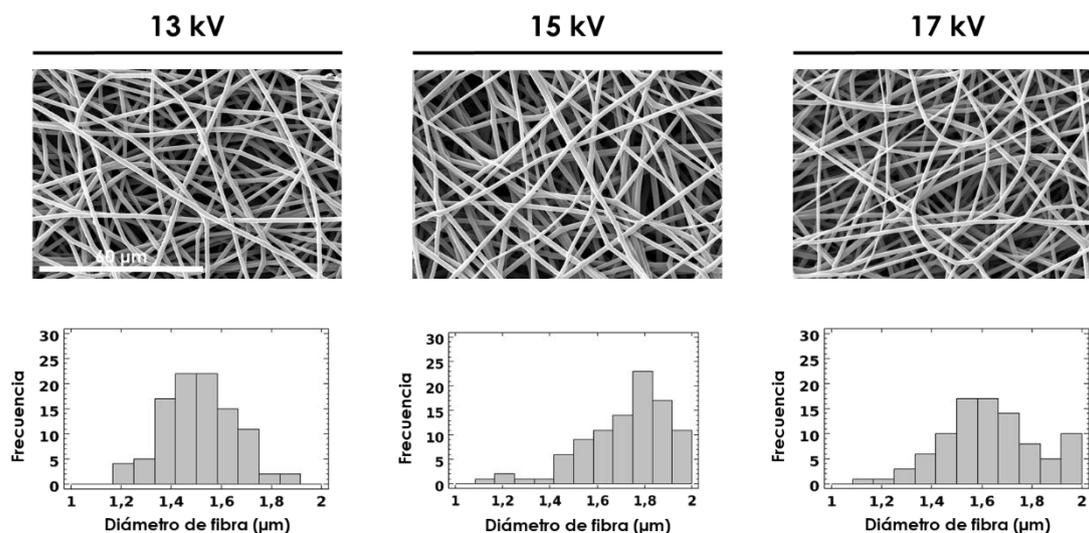


Figura 40. Imágenes SEM e histogramas del diámetro de fibra del PLGA al 25% *w/v* en HFIP a 13, 15 y 17 kV, con 2 ml/h y 13 cm. Barra de escala: 60 µm. Los diámetros se han obtenido realizando medidas del diámetro de 50 fibras diferentes en dos imágenes SEM con el *software* ImageJ.

Para el PLGA se estudió el efecto del voltaje, a 2 ml/h y 13 cm. La Figura 40 muestra cómo el diámetro de fibra aumenta con el voltaje, hasta que se alcanza un valor máximo para un voltaje intermedio alrededor de 15 kV:

Tabla 5. Media y desviación estándar de los diámetros de fibras del PLGA obtenidos a diferentes voltajes.

	<i>media</i> (µm)	<i>desviación estándar</i> (µm)
13 kV	1,51	0,14
15 kV	1,76	0,20
17 kV	1,62	0,26

Este efecto del voltaje sobre el diámetro de las fibras se ha observado previamente para otros polímeros de diferente naturaleza. [105], [106] Además, conforme aumenta el voltaje también aumenta la heterogeneidad en el diámetro de las fibras. Estos resultados mostraron significancia estadística y concuerdan con los resultados de [107]. Por todo ello, para el PLGA se establecieron los parámetros del proceso en **2 ml/h, 15 kV y 13 cm**.

El efecto del voltaje en las membranas de PCLGA se estudió aumentando además la distancia aguja-colector de 13 a 20 cm, para contribuir a una mayor reducción del diámetro de las fibras al permitir una mayor elongación de éstas.

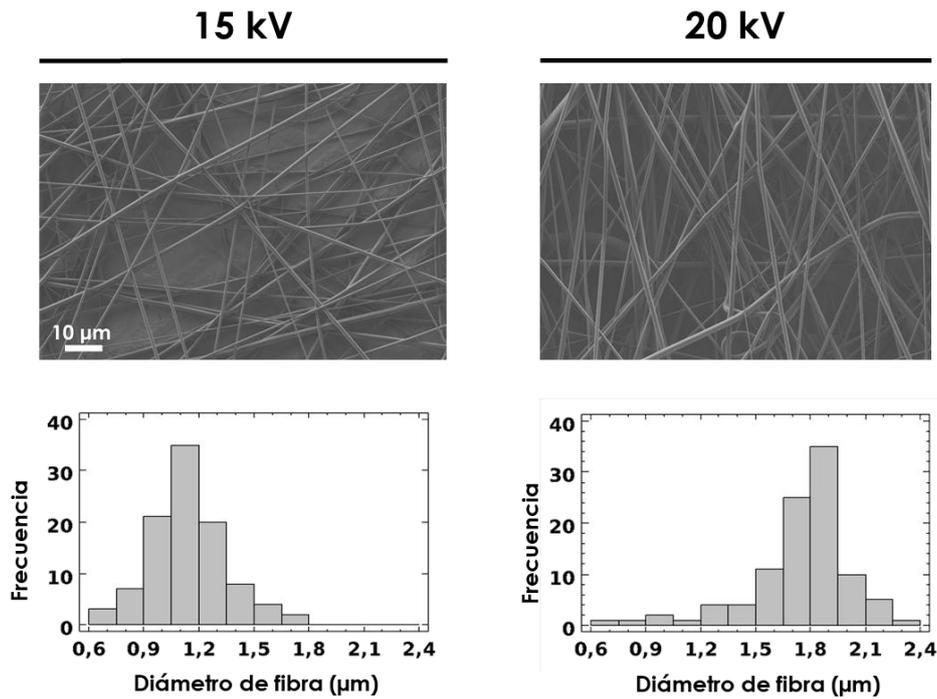


Figura 41. Imágenes SEM e histogramas del diámetro de fibra del PCLGA al 17% *w/v* en cloroformo:piridina (80:20 *v/v*) a 15 y 20 kV, con 2 ml/h y 20 cm. Barra de escala: 10 μm. Los diámetros se han obtenido realizando medidas del diámetro de 50 fibras diferentes en dos imágenes SEM con el *software* ImageJ.

En el caso del PCLGA, al aumentar el voltaje aumenta también el diámetro de fibra:

Tabla 6. Media y desviación estándar de los diámetros de fibras del PCLGA obtenidos a diferentes voltajes.

	<i>media (μm)</i>	<i>desviación estándar (μm)</i>
15 kV	1,15	0,21
20 kV	1,74	0,28

De modo que, de acuerdo con estos resultados, se establecieron los parámetros del proceso en **2 ml/h, 20 kV y 20 cm**.

Así pues, la Tabla 7 muestra los parámetros optimizados para ambos copolímeros con el fin de obtener membranas electrohiladas con un diámetro de fibra de aproximadamente 1,8 μm.

Tabla 7. Parámetros de la disolución y del proceso de los copolímeros PLGA y PCLGA, para obtener membranas electrohiladas de 1,8 μm .

	PLGA	PCLGA
<i>Diámetro de fibra (μm)</i>	1,76 \pm 0,20	1,74 \pm 0,28
parámetros de la disolución		
<i>Concentración (% w/v)</i>	25	17
<i>Disolvente/s</i>	HFIP	Cloroformo:piridina
<i>Ratio disolventes (% v/v)</i>		80:20
parámetros del proceso		
<i>Flujo (ml/h)</i>	2	2
<i>Voltaje (kV)</i>	15	20
<i>Distancia aguja-colector (cm)</i>	13	20

Caracterización de las disoluciones poliméricas: densidad, tensión superficial, viscosidad y conductividad

Las disoluciones poliméricas de la Tabla 7 se caracterizaron en términos de densidad, tensión superficial, viscosidad y conductividad.

Las densidades fueron (1,258 \pm 0,010) g/ml para el PLGA y (1,018 \pm 0,006) g/ml para el PCLGA, con diferencias estadísticamente significativas. Esta diferencia puede ser atribuida, en primer lugar, a la elevada concentración de PLGA en la disolución y, en segundo lugar, a que el HFIP presenta una mayor densidad que el cloroformo y la piridina.

Su efecto sobre el diámetro de las fibras ha sido estudiado pocas veces, ya que tiene un efecto moderado. Sin embargo, en el modelo teórico presentado por Thompson *et al.* (2007), así como Wannatong *et al.* (2004), se encontró que un incremento en la densidad reduce ligeramente el diámetro de las fibras. [63], [108] Este hecho puede explicar la necesidad de un voltaje y una distancia aguja-colector mayor para el PCLGA.

Respecto a las tensiones superficiales, se determinó en (158,2 \pm 0,5) mN/m para el PLGA y (136,8 \pm 0,9) mN/m para el PCLGA, siendo las diferencias estadísticamente significativas. La mayor tensión superficial del PLGA supone una mayor oposición de la disolución a ser eyectada. [99] Por esa razón, el disolvente puede evaporarse más rápidamente y, en consecuencia, la distancia aguja-colector puede reducirse de 20 cm para el PCLGA a 13 cm para el PLGA.

En cuanto a los resultados del ensayo oscilatorio de viscosidad, la Tabla 8 muestra los valores del módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdidas (G''), $\tan \delta$, la viscosidad dinámica (η') y la viscosidad de almacenamiento (η''):

Tabla 8. Módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdidas (G''), $\tan \delta$, viscosidad dinámica (η') y viscosidad de almacenamiento (η'') del PLGA y PCLGA, medidos a 100 rad/s.

	PLGA	PCLGA
G' (Pa)	901,5 ± 1,6	1180,0 ± 90,4
G'' (Pa)	259,5 ± 6,5	232,5 ± 25,8
$\tan \delta$	0,288 ± 0,008	0,197 ± 0,020
η' (Pa·s)	2,595 ± 0,065	2,324 ± 0,258
η'' (Pa·s)	9,015 ± 0,016	11,798 ± 0,904

El módulo de almacenamiento (G') representa la energía almacenada en la estructura elástica de las muestras, mientras que el módulo de pérdidas (G'') representa la parte viscosa de la energía disipada. [109] Además, la elasticidad está relacionada con el módulo de almacenamiento, mientras que la plasticidad se relaciona con el módulo de pérdidas, siendo la plasticidad la que contribuye a la formación de las nanofibras. La elasticidad es crítica en el momento de la formación del chorro y su elongación, ya que previene la rotura de éste. De modo que un mayor G' da lugar a una estructura sin defectos de gotas. [110]

En este caso, las disoluciones de ambos copolímeros presentan un módulo de almacenamiento mayor que el módulo de pérdidas, siendo además mayor para el PCLGA. Sin embargo, la viscosidad dinámica del PLGA es mayor que la del PCLGA, aunque no hay una significancia estadística. A pesar de ello, existen estudios que reportan una reducción de la viscosidad dinámica al añadir piridina. [111] Finalmente, una mayor viscosidad dinámica permite obtener una homogeneidad mayor de las fibras, como puede verse en la Tabla 7 para el PLGA.

En cuanto a la conductividad, el PLGA presentó un valor de (0,98 ± 0,01) S/cm, mientras que el del PCLGA fue (0,31 ± 0,01) S/cm (diferencia estadísticamente significativa). La baja conductividad del PCLGA justifica la necesidad de emplear un mayor voltaje para electrohilarla. Esto se debe a que una mayor conductividad da lugar a una mayor acumulación de cargas en la disolución. [112]

Todos estos resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Tabla resumen de las características de las disoluciones poliméricas de los copolímeros PLGA y PCLGA.

	PLGA	PCLGA
<i>Densidad (g/ml)</i>	1,258 ± 0,010	1,018 ± 0,006
<i>Tensión superficial (mN/m)</i>	158,2 ± 0,5	136,8 ± 0,9
<i>Viscosidad dinámica (Pa·s)</i>	2,595 ± 0,065	2,320 ± 0,260
<i>Conductividad (S/cm)</i>	0,98 ± 0,01	0,31 ± 0,01

Caracterización físicoquímica de las membranas

Tras la optimización de los parámetros del *electrospinning* para obtener membranas de 1,8 μm (ES-1,8) de PLGA y PCLGA, se pasan a caracterizar las membranas de estos materiales junto con los homopolímeros PLA, PCL y su mezcla PLAPCL.

Además, en este primer capítulo también se incluyen los resultados correspondientes a las membranas electrohiladas de 0,8 μm (ES-0,8) de los homopolímeros, para estudiar el efecto del diámetro.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

A continuación se muestran los espectros FTIR para cada morfología (films, membranas de 1,8 μm y membranas de 0,8 μm).

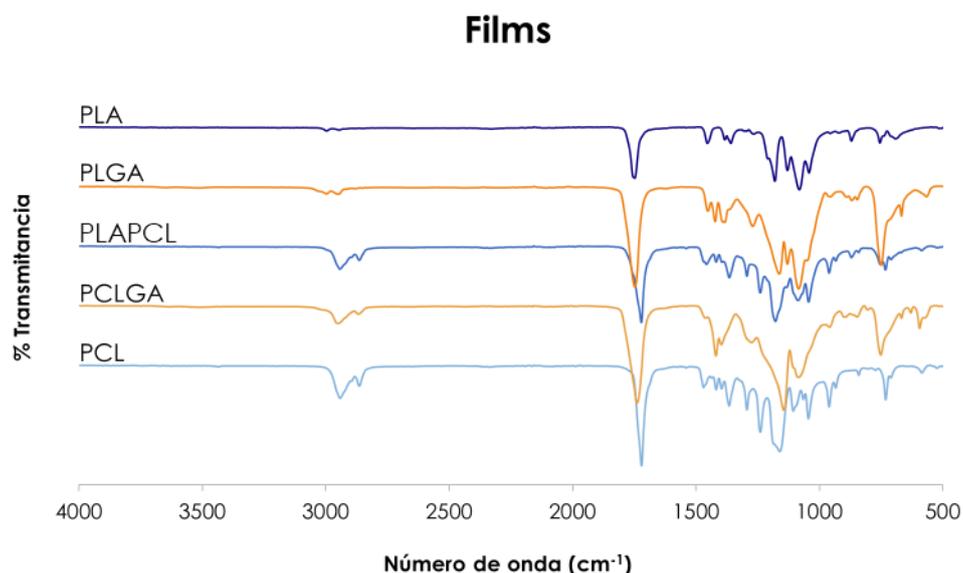


Figura 42. Espectros de FTIR de los films de PLA, PCL, PLAPCL, PLGA y PCLGA.

Membranas 1,8 μm

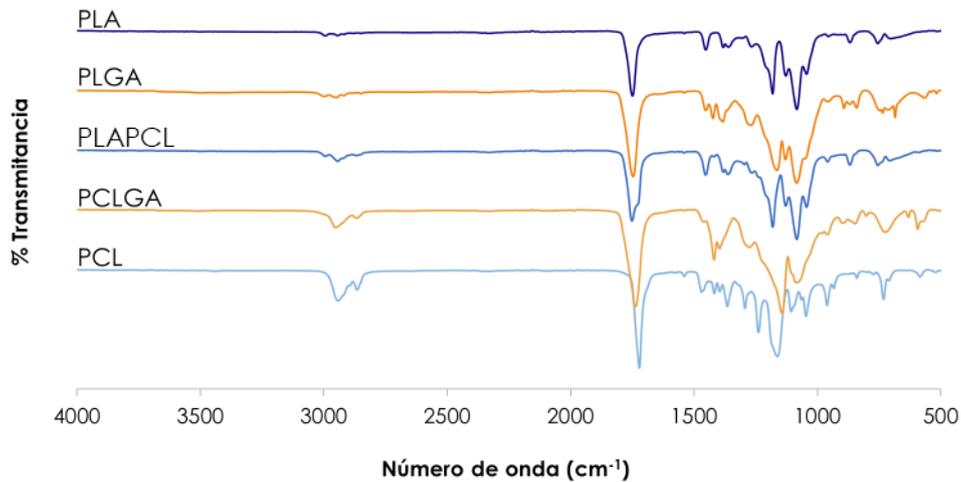


Figura 43. Espectros de FTIR de las membranas electrohiladas de 1,8 μm de PLA, PCL, PLAPCL, PLGA y PCLGA.

Membranas 0,8 μm

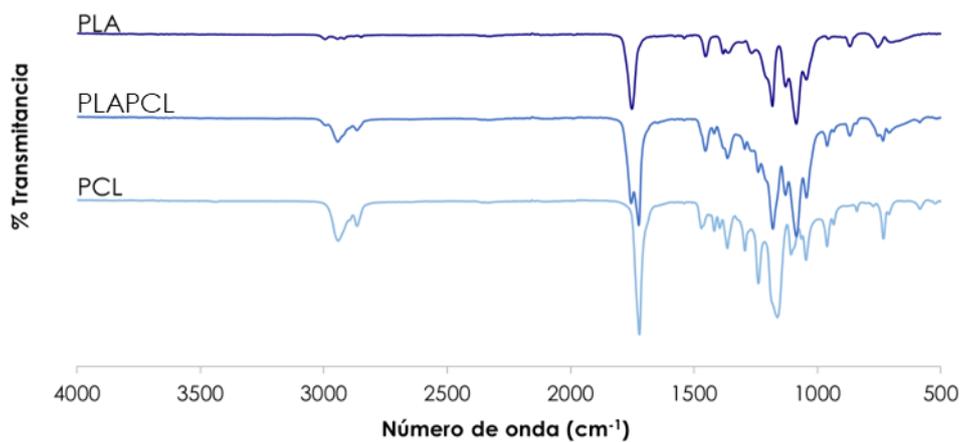


Figura 44. Espectros de FTIR de las membranas electrohiladas de 0,8 μm de PLA, PCL y PLAPCL.

De acuerdo con Coates (2004), se analizaron los espectros anteriores: [113]

- (i) En todos los materiales (films, ES-1,8 y ES-0,8) se observa que cuando se tiene PCL, ya sea en la mezcla como en copolímero, aparecen dos picos en la banda 2935-2915/2865-2845 cm^{-1} correspondiente a los grupos metileno ($-\text{CH}_2-$). Estos picos no se observan para el PLA, que carece de grupos metileno, ni para el PLGA con muy pocos grupos en su cadena.

Además, esta banda nos permite determinar también que la mezcla se ha formado adecuadamente, ya que la intensidad de los picos en el PLAPCL es intermedia.

(ii) En la banda de $1750\text{-}1725\text{ cm}^{-1}$, relacionada con el grupo éster, todos los polímeros presentan un pico en todos los materiales. Este pico, al hacer la deconvolución, se muestra doble para el PLAPCL ya que hay una desviación entre el PLA y la PCL, por lo que esta banda también confirma la adecuada formación de la mezcla.

(iii) Los grupos fundamentales de los disolventes aparecen en las bandas de $1150\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ para el HFIP (alargamientos C-F) y de $800\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ para el cloroformo (alargamientos C-Cl). En cuanto al PLGA, que se disolvió en HFIP, no se observan picos que puedan asociarse al alargamiento C-F, por lo que se descarta la presencia de este disolvente. Para el resto de los polímeros, algunos muestran un pico en la banda $800\text{-}700\text{ cm}^{-1}$; sin embargo, este pico también se observa para el PLGA. Además, Marques & Alberto (2013) demostraron que cuando varios átomos de cloro están unidos por el mismo carbono, como en el caso del cloroformo, los picos son muy intensos y se encuentran en el límite superior del rango. [114] Por tanto, no existe presencia de cloroformo. Finalmente, este pico es posible asociarlo a la cadena de hidrocarburos.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

De igual modo, a continuación se presentan los resultados del DSC para todos los materiales (films, membranas de $1,8\text{ }\mu\text{m}$ y membranas de $0,8\text{ }\mu\text{m}$).

Todos los resultados se muestran en función del flujo de calor normalizado; es decir, teniendo en cuenta la masa de la muestra.

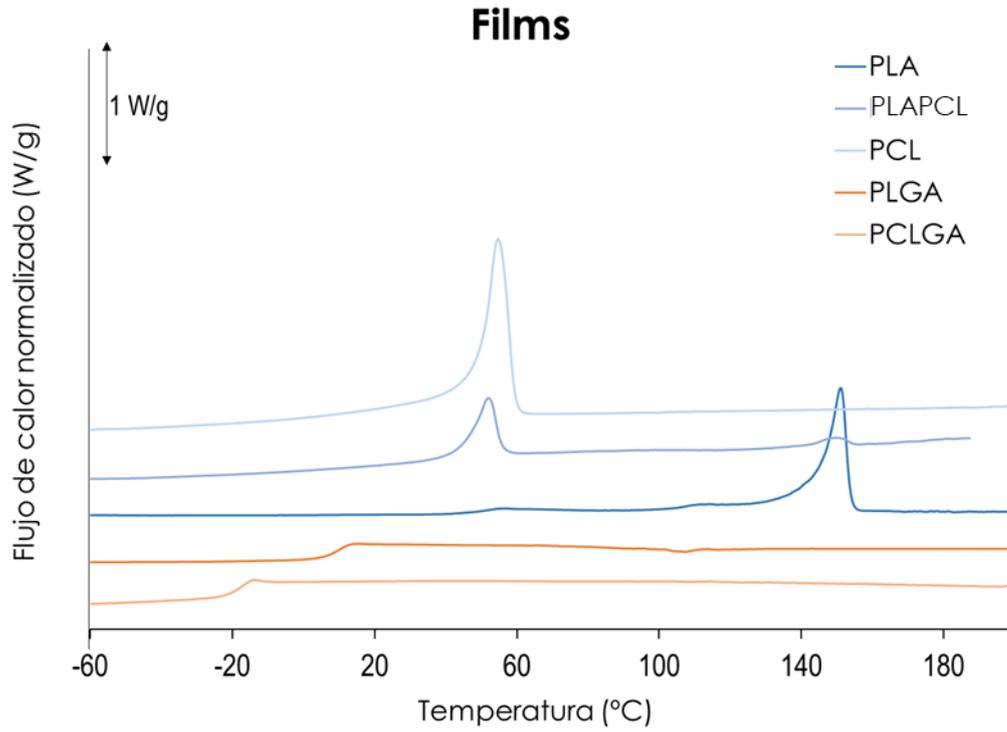


Figura 45. Termogramas obtenidos en el DSC para los films de PLA, PCL y PLAPCL.

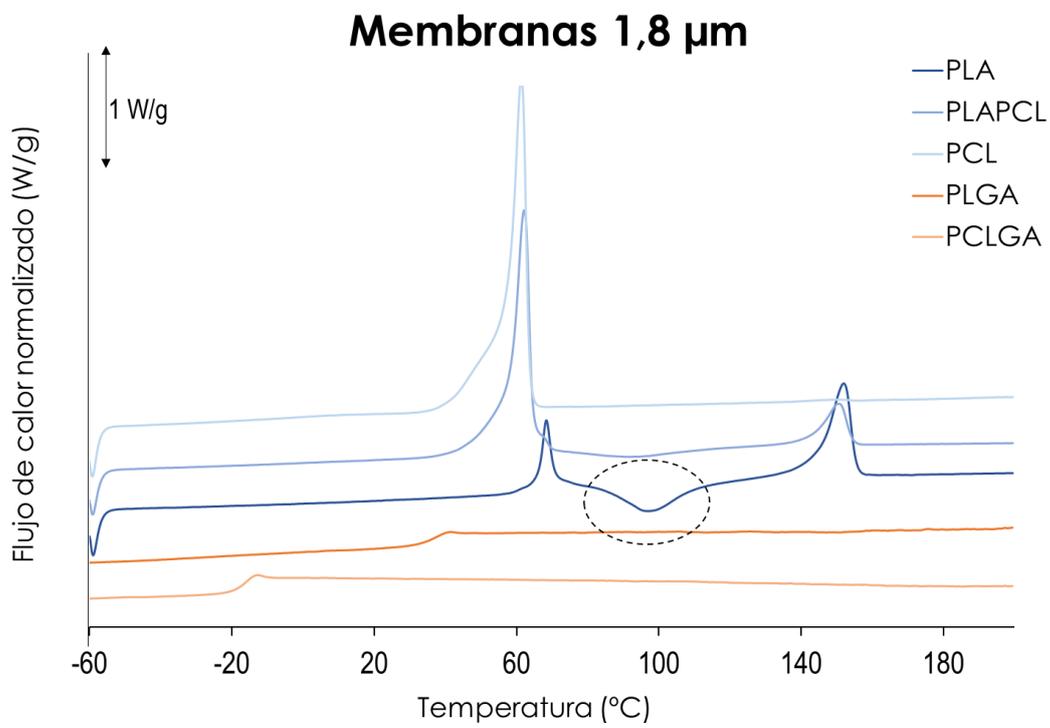


Figura 46. Termogramas obtenidos en el DSC para las membranas de 1,8 µm de PLA, PCL y PLAPCL.

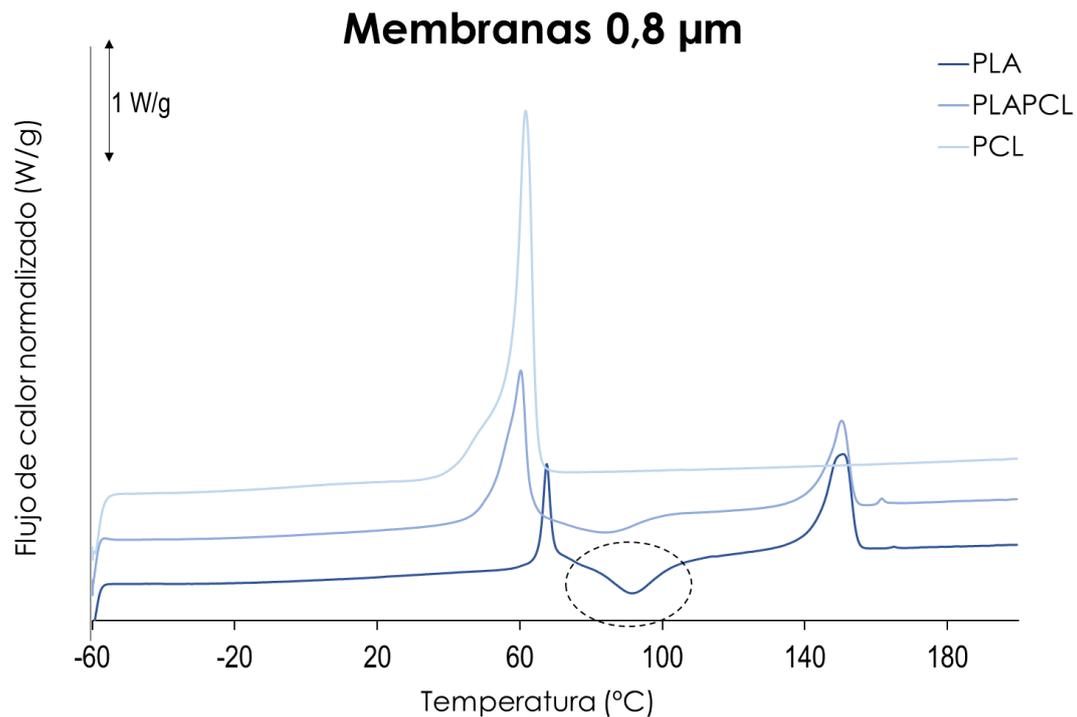


Figura 47. Termogramas obtenidos en el DSC para las membranas de 0,8 μm de PLA, PCL y PLAPCL.

De los resultados anteriores podemos concluir, en primer lugar, que los homopolímeros son semicristalinos, observándose para el PLA tanto el punto de transición vítrea ($a \sim 65^{\circ}\text{C}$) como el de fusión ($a \sim 150^{\circ}\text{C}$), correspondientes a los valores bibliográficos mostrados en la Tabla 3. Para la PCL se tiene un punto de fusión a $\sim 60^{\circ}\text{C}$, mientras que la mezcla PLAPCL muestra un comportamiento intermedio entre los homopolímeros que la componen. Los copolímeros, sin embargo, muestran un comportamiento diferente, al ser amorfos.

Cabe destacar que en todos los materiales obtenidos a partir del PLA se observa un pico de cristalización entre 90 y 100 $^{\circ}\text{C}$, debido probablemente a la orientación de las cadenas. [74]

En términos de cristalinidad, las membranas de PCL presentan mayor cristalinidad (53,0% las membranas ES-0,8 y 54,6% las ES-1,8) que las de PLA (14,2% para ES-0,8 y 17,8% para ES-1,8). En el caso de la mezcla PLAPCL, la cristalinidad de las membranas ES-0,8 pasa a ser del 28,3% para las cadenas de PLA y del 46,8% para las de PCL, con una media del 37,6%, y en las membranas ES-1,8 se tiene una cristalinidad del 20,5% para el PLA y del 73,2% para la PCL, con una media del 46,9%. Estos valores están entre los obtenidos para los homopolímeros.

Finalmente, se demuestra que el proceso de electrohilado aumenta la cristalinidad de los homopolímeros, lo que está en concordancia con los resultados observados por otros autores. [115]

Caracterización mecánica de las membranas

Módulo elástico o de Young (E)

En las Figura 48-Figura 50 se muestran los diagramas tensión-deformación de los diferentes polímeros, tanto membranas (ES-1,8 y ES-0,8) como films.

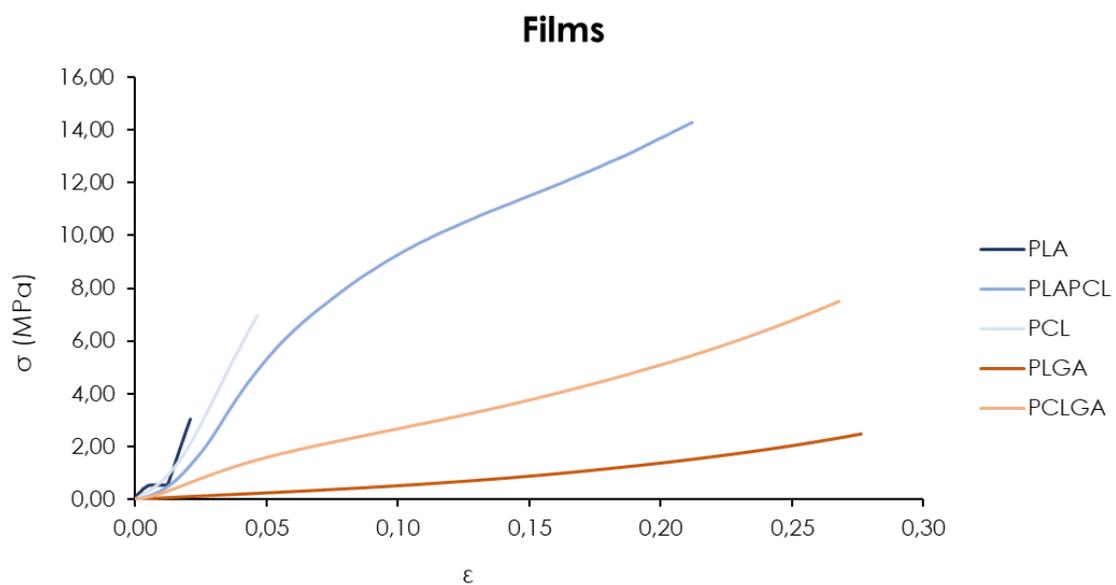


Figura 48. Diagrama tensión-deformación de los films de PLA, PLAPCL, PCL, PLGA y PCLGA.

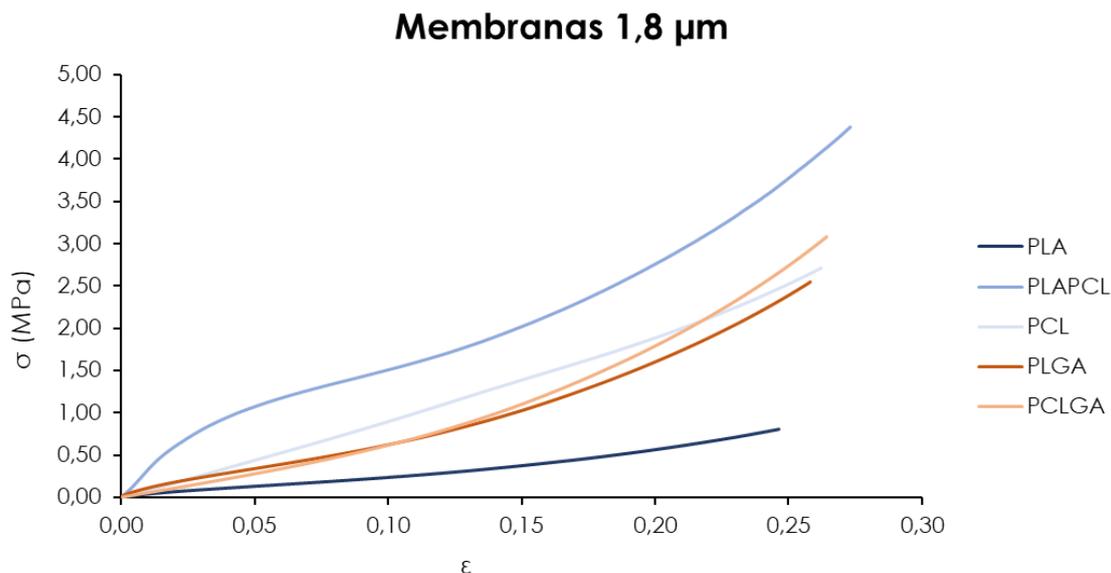


Figura 49. Diagrama tensión-deformación de las membranas ES-1,8 de PLA, PLAPCL, PCL, PLGA y PCLGA.

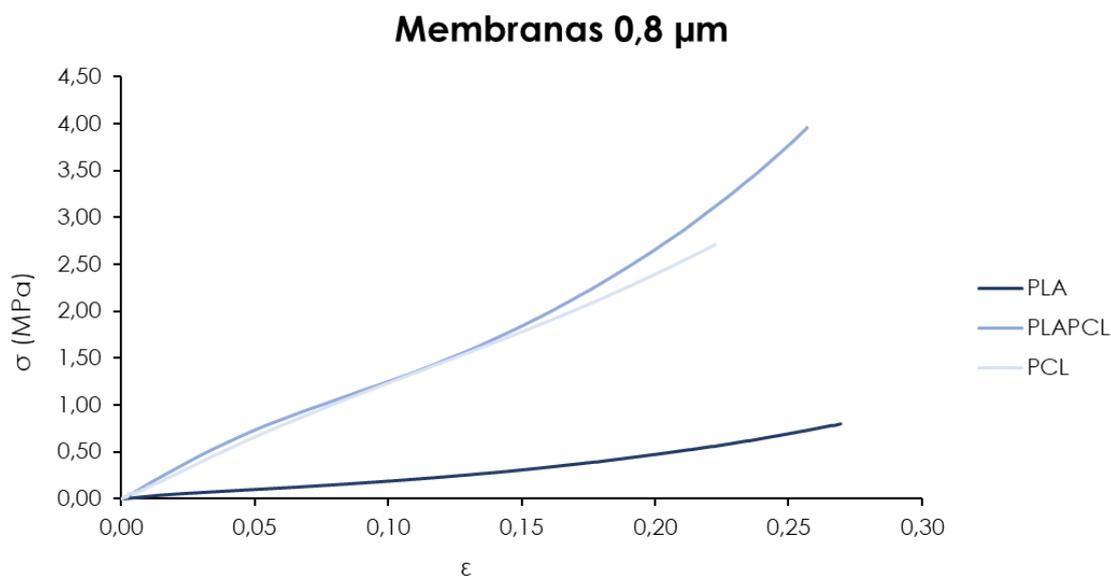


Figura 50. Diagrama tensión-deformación de las membranas ES-0,8 de PLA, PLAPCL, PCL, PLGA y PCLGA.

En los diagramas tensión-deformación anteriores se puede observar el comportamiento elástico de los diferentes materiales.

Por otro lado, en el rango de 0-0,3 MPa se ha calculado el módulo elástico de cada uno de los polímeros, en sus diferentes conformaciones. Estos resultados se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 10. Valores del módulo elástico E (MPa) de los diferentes polímeros (PLA, PLAPCL, PCL, PLGA y PCLGA) en su conformación de film, y membranas ES-1,8 y ES-0,8.

Módulo elástico E (MPa) en el rango 0-0,3 MPa			
	Films	ES-1,8	ES-0,8
<i>PLA</i>	131,39	2,24	1,90
<i>PLAPCL</i>	32,88	32,71	16,23
<i>PCL</i>	64,98	12,71	8,72
<i>PLGA</i>	4,86	6,69	
<i>PCLGA</i>	25,25	5,56	

De acuerdo con los resultados anteriores se tiene, por un lado, que los films presentan un mayor módulo elástico que las membranas debido a la porosidad de las membranas y, por otro lado, que la cristalinidad, en los polímeros semicristalinos, aumenta con el diámetro de fibra, por lo que el módulo elástico de las membranas ES-1,8 es mayor que el de las membranas ES-0,8.

Conclusiones

Conociendo la influencia de los parámetros del *electrospinning*, fue posible obtener membranas electrohiladas con un tamaño de fibra de 1,8 μm de diámetro de PLGA y PCLGA. Es importante destacar que el electrohilado de PCLGA se llevó a cabo empleando un copolímero con un **ratio molar de 45:55 (CL:GA)**, lo que permite obtener propiedades intermedias entre la PCL y el PGA.

Mientras que el PLGA se electrohiló empleando HFIP como disolvente, el sistema PCLGA/HFIP no se puede electrohilar, por lo que fue necesario emplear cloroformo como disolvente, así como adicionar una sal (en este caso piridina) para aumentar la conductividad.

Además, la caracterización de las disoluciones permitió establecer una serie de relaciones entre los parámetros de la disolución y los parámetros del proceso para obtener diámetros de fibra específicos. Estas relaciones son:

- (i) Una mayor tensión superficial, obtenida en la disolución de PLGA, permite reducir la distancia entre la aguja y el colector.
- (ii) Una baja conductividad, como en el caso del PCLGA, requiere del empleo de mayores voltajes.

Por otro lado, la caracterización fisicoquímica de las membranas ha permitido determinar que se consiguió una mezcla de los homopolímeros PLAPCL homogénea. Además, todos los materiales (films, membranas ES-1,8 y membranas ES-0,8) están libres de disolventes ya que no se observan picos característicos en los espectros FTIR.

Finalmente, los ensayos mecánicos muestran que la porosidad de las membranas disminuye en general el módulo elástico, pero en los materiales que pueden cristalizar, la fase cristalina aumenta dicho módulo en las membranas con fibras de mayor diámetro.

Debido a las dificultades que muestra el copolímero PCLGA para ser electrohilado, y la elevada influencia de los parámetros ambientales en el proceso, se decidió descartar este polímero para los posteriores estudios, ya que no se considera viable para su escalado a la hora de obtener el dispositivo planteado para el testeo de fármacos.

CAPÍTULO II

OBTENCIÓN DE ESTRUCTURAS DE POROSIDAD ESTRATIFICADA A PARTIR DE SOPORTES POROSOS (*SCAFFOLDS*)

En este capítulo se estudian diferentes técnicas para la obtención de soportes porosos (scaffolds), sobre los que irán acopladas las membranas electrohiladas. Estos materiales se analizan y caracterizan morfológica y fisicoquímicamente.

Además, se lleva a cabo la integración de las membranas sobre el soporte, observando la estructura en el microscopio.

Introducción

Los andamiajes poliméricos, más comúnmente conocidos como *scaffolds*, son ampliamente utilizados en el campo de la Ingeniería Tisular para el desarrollo de tejidos, soportes implantables para la regeneración, y para sistemas de liberación controlada. Su principal ventaja frente a otras estructuras es que permiten el cultivo celular en 3D.

Como se ha visto en la **Introducción General**, existen diferentes técnicas de fabricación de *scaffolds*. [116] A continuación, veremos en qué consisten algunas de las técnicas más utilizadas.

El uso de cada una de ellas vendrá condicionado por las propiedades que deseemos, especialmente las propiedades mecánicas, así como la aplicación para la que vaya a destinarse.

Evaporación del disolvente (solvent casting)

Es una de las técnicas más sencillas, que consiste en disolver el polímero y dejar evaporar el disolvente. Puede llevarse a cabo de dos formas, sumergiendo un molde en la disolución polimérica durante un tiempo determinado, o vertiendo la disolución en el molde y dejar que el disolvente se evapore.

A pesar de ser una técnica sencilla, únicamente pueden obtenerse formas sencillas y la interconectividad de los poros es muy baja.

Evaporación del disolvente con lixiviación de partículas (solvent-casting particle-leaching)

Esta técnica es la más empleada en la fabricación de *scaffolds*. Consiste en dispersar un porógeno en la disolución polimérica, generalmente sal, con un tamaño determinado, y dejar que el disolvente se evapore. Una vez el disolvente se ha evaporado, se hacen lavados con agua para eliminar el porógeno, quedando una estructura de elevada porosidad (90-95%).

Separación de fases (phase separation)

También conocida como separación de fases inducida térmicamente, se basa en cambiar el equilibrio termodinámico del sistema para provocar la separación de fases, esto es, la reducción de la solubilidad de uno de los componentes por enfriamiento, lo que provoca la formación de cristales en la mezcla polimérica que, al ser eliminados, crean poros en el material. Se trata, pues, de una separación de fases líquido/sólido. [117]

También suele emplearse la separación de fases líquido/líquido haciendo uso de la temperatura supercrítica de la disolución para generar poros abiertos interconectados después de eliminar el disolvente.

Espumado con gas (gas foaming)

Se trata de una técnica en la que se tiene el polímero comprimido (este puede ser o no calentado, si es necesario) y se somete a dióxido de carbono (CO_2) gaseoso a elevada presión, lo que da lugar a una inestabilidad del CO_2 que produce la nucleación y formación de poros en la estructura. [118] La ventaja de esta técnica sobre las anteriores es que no requiere emplear disolventes, por lo que se evita que puedan quedar residuos que afecten a la viabilidad del *scaffold*.

Para favorecer la formación de una estructura de porosidad abierta en la que haya interconectividad, se pueden agregar porógenos.

Liofilización (Freeze drying)

La liofilización o *freeze drying* es una técnica de obtención de *scaffolds* con una porosidad controlable y un diámetro de poro medio, que se basa en el proceso de sublimación. El polímero se disuelve en un disolvente y se congela con nitrógeno líquido para introducirlo en la liofilizadora, en la que por medio de un alto vacío se consigue pasar directamente del estado sólido al estado vapor, eliminándose el disolvente que da lugar a los poros.

Para entender mejor el proceso se tiene la Figura 51:

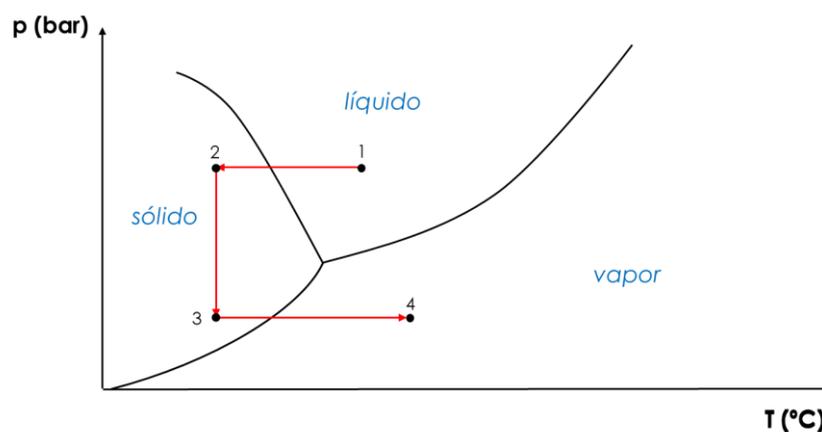


Figura 51. Etapas del proceso de liofilización.

Como se observa en la figura anterior, al congelar la disolución (1) y aplicar un alto vacío (2) se consigue poner la mezcla por debajo del punto triple, lo que permite que al volver a aumentar la temperatura (3) se pase directamente del estado sólido a vapor, dejando los huecos que albergaba el disolvente.

Electrohilado (electrospinning)

Como se ha visto en el capítulo anterior, esta técnica da lugar a un material fibroso al someter la disolución polimérica a un gradiente de tensión. El resultado está condicionado por variables intrínsecas a la disolución, al procesado y a las condiciones ambientales.

Esta técnica permite obtener fibras con diámetros del orden de decenas de nanómetros a micrómetros, dando lugar a una elevada área superficial y porosidad, con poros interconectados, siendo la superficie flexible y teniendo un rendimiento mecánico superior.

Moldeado por fusión (melt moulding)

Se usa comúnmente en la preparación de soportes porosos metálicos y cerámicos, aunque puede emplearse también con polímeros. Consiste en disponer en un molde el polímero y el porógeno y calentarlo por encima de la temperatura de transición vítrea del polímero, a una presión elevada. A continuación, se deja enfriar y se elimina el porógeno.

Aunque permite un buen control de la forma y tamaño de los poros, y evita el uso de disolventes orgánicos, presenta diferentes desventajas: por un lado, se crea una capa no porosa en la superficie y, por otro lado, debido al procedimiento el porógeno puede quedar fuertemente atrapado en la red polimérica y ser difícil extraerlo. [119]

Extrusión (extrusion)

Aunque la extrusión es un método de procesamiento bien documentado para polímeros industriales con diversas aplicaciones, este método es relativamente nuevo para la fabricación de *scaffolds* biocompatibles y porosos. Uno de los primeros trabajos reportados usando esta técnica aplicada a la Ingeniería Tisular fue el de Widmer *et. al* (1998), quienes utilizaron PLGA y PLLA para formar *scaffolds* tubulares para la regeneración del nervio periférico. [120]

El método consiste en introducir en la extrusora el polímero y partículas de porógeno, a continuación se aplica calor y presión al material compuesto polímero/porógeno y se fuerza a pasar por una boquilla que le da la forma deseada. Finalmente, el material se deja enfriar y se hacen lavados para eliminar el porógeno.

Sinterización selectiva por láser, SLS (selective laser sintering)

Es una técnica que se engloba dentro de las técnicas de prototipado rápido, un conjunto de tecnologías de fabricación asistida por ordenador. Ésta consiste en extender una capa de polvo de polímero sobre una plataforma de construcción, e ir fundiéndola por acción de un láser de CO₂. Al enfriarse, las partículas de polímero pasan al estado vítreo y quedan fusionadas con las partículas circundantes.

Estereolitografía (stereolithography)

Se trata de otra técnica incluida dentro de las de prototipado rápido que consiste en controlar el movimiento de un láser ultravioleta con un ordenador para fotopolimerizar una resina en estado líquido. Tanto la dimensión del láser como la resolución del movimiento en la dirección z determinan la estructura global de los andamios fabricados. [121]

La principal limitación de esta técnica es el limitado número de resinas disponibles en el mercado.

Fabricación por corte y laminado

Se basa en la superposición de láminas previamente cortadas por un láser. El material, que presenta un recubrimiento adhesivo, se lamina y corta con un láser. A continuación, se prensa con un rodillo caliente quedando adherido a la lámina precedente. [118]

En este caso, la temperatura es un factor crítico y debe mantenerse constante a lo largo de todo el proceso, por lo que la maquinaria debe disponer de un circuito cerrado que asegure este condicionante.

Esta técnica puede emplearse con poliésteres y poliamidas; sin embargo, aunque presenta una elevada precisión, pueden producirse deformaciones en las láminas, que dificultan el control del procesado.

Moldeo por deposición de material fundido (fused deposition modeling)

Esta última técnica, que también se trata de una técnica de prototipado rápido, consiste en hacer pasar un filamento termoplástico por un pequeño extrusor a una determinada temperatura e ir depositando el polímero semifundido en una plataforma, en un proceso capa por capa. [122]

El *scaffold* se obtiene como una pieza tridimensional basada en la deposición precisa de capas finas de polímero extruido.

Teniendo en cuenta todas las ventajas y desventajas que ofrecen las técnicas anteriores se propone estudiar diferentes técnicas para la obtención de *scaffolds* de PLA, PCL y PLAPCL, que permitan obtener posteriormente una estructura de porosidad estratificada apta para cultivo celular indirecto.

Materiales y métodos

Preparación de los scaffolds

Se estudiaron tres técnicas diferentes para la obtención de los *scaffolds*: el empleo de una plantilla porogénica, evaporación del disolvente con lixiviación de partículas y moldeado por fusión.

El porógeno que se empleó en las dos primeras técnicas fue sal de un tamaño entre 212 y 250 μm . Para ello, se tamizó la sal (NaCl) en una tamizadora electromagnética (FT 200M; *Filtra Vibración, S.L.*). La tamizadora consiste en una torre de tamices, ordenados en orden decreciente de tamaño de luz de malla, dispuestos sobre una plataforma vibratoria.

La sal se dispuso en el tamiz superior de una serie de tres tamices de 250, 212 y 125 μm de luz de malla, que se mantuvo en vibración durante 10 minutos. Trascurrido este tiempo se separó la fracción de sal entre 212 y 250 μm y se guardó en botes de plástico en el interior de recipientes herméticos con sílica gel (Sílica gel, granulada, desecante, 2-5 mm; *Sigma Aldrich*) para absorber la humedad.

Las disoluciones empleadas en las dos primeras técnicas fueron disoluciones de los homopolímeros (PLA, PCL, PLAPCL) al 10% m/v en cloroformo que se mantuvo toda la noche en agitación magnética para asegurar la homogeneización de la disolución.

Empleo de plantilla porogénica

Como se ha visto en la introducción, esta técnica consiste en preparar una plantilla (negativo) que será la estructura porosa que quedará al final. Esta plantilla se elaboró con sal por medio de la técnica de fusión por efecto de la humedad. Para ello, se fabricó un molde de teflón¹ específico (Figura 52-A) en cuyos canales se puso 0,5 g de sal. A continuación, se insertaron varillas de vidrio en los canales y sobre ellas se dispuso una placa metálica con dos pesas de

¹ Agradecimientos a Ricardo Pérez Feito, Técnico Superior de Laboratorio del Departamento de Termodinámica Aplicada de la UPV, que fabricó el molde de teflón.

600 g cada una, para compactar la sal (Figura 52-B). El peso total que se aplicó (pesas + placa metálica) fue de 1.400 g.

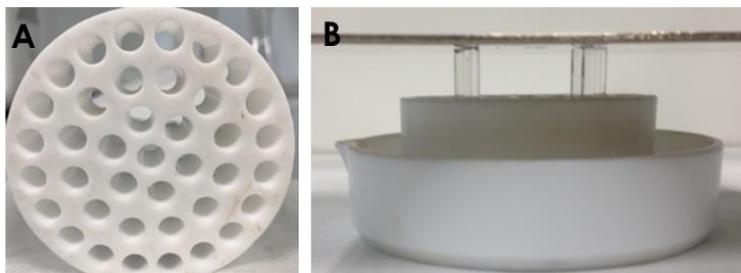


Figura 52. Imágenes de (A) molde de teflón y (B) montaje para la obtención de plantillas porogénicas de sal.

A continuación, se mantuvo la presión a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se dejó 4 horas en un recipiente hermético en el que se creó previamente una atmósfera húmeda, manteniendo el peso indicado anteriormente. Para obtener una atmósfera húmeda, se colocó el recipiente hermético en una estufa a 37 °C (*Selecta*) y en su interior se puso un vaso de precipitados con una disolución saturada de sulfato potásico (K_2SO_4 ; *Scharlau*). Trascorridas 24 horas, se puede asegurar que se ha alcanzado el equilibrio y la atmósfera creada en el interior del recipiente es de un 97% de humedad relativa.

Finalmente, se quitó el peso y se dejaron las plantillas 24 horas en la atmósfera húmeda y otras 24 horas en una estufa a 130 °C. Las plantillas de sal se conservaron en una bolsa zip hasta su uso.

Una vez se tienen las plantillas de sal, se depositaron de nuevo en el molde para cubrir con las disoluciones poliméricas, y se dejó 1 hora en un desecador a vacío con extracción continua para favorecer la penetración de la disolución polimérica en los poros de la plantilla y después se dejó 24 horas en una campana de extracción para asegurar la evaporación del disolvente.

Empleo de la técnica de evaporación del disolvente con lixiviación de partículas (SCPL)

Esta técnica, en inglés *solvent-casting particle-leaching* (SCPL), consiste en mezclar la disolución polimérica con el porógeno (la sal, en este caso) y dejar que se evapore el disolvente.

De este modo, se dispuso sobre una placa Petri de teflón la cantidad de sal adecuada para obtener *scaffolds* de 0,3 mm de espesor, con un ratio de sal de 1/3 y 1/6 $m_{\text{polímero}}/m_{\text{porógeno}}$ y, a continuación, se vertió la disolución polimérica. Con una varilla de vidrio se homogeneizó la mezcla y se dejó 48 horas en una campana de extracción, para asegurar la completa evaporación del disolvente.

Es importante verter la disolución sin extracción porque el disolvente se evapora rápidamente y no se obtendría una adecuada homogeneización del porógeno en la disolución polimérica.

Empleo de la técnica de moldeado por fusión

Se realizó un estudio preliminar con PCL empleando la técnica de moldeado por fusión. En este caso se emplearon microesferas de un tamaño inferior a 500 μm de Polivinil alcohol (PVA)² como porógeno, que se mezclaron con un ratio $1/3 m_{\text{polímero}}/m_{\text{porógeno}}$ con PCL previamente molido.

La mezcla se dispuso en el centro de un molde de silicona circular, compuesto por dos tapas y un aro entre ambas. El molde se colocó entre dos placas metálicas y se introdujo en una prensa durante 3 minutos a 110 °C. Trascurrido este tiempo, se dejó enfriar las placas y se extrajo el *scaffold*.

El último paso una vez se tuvo todos los materiales, fue disponerlos en recipientes con agua destilada y mantenerlos en vaivén hasta eliminar el porógeno (sal y PVA, respectivamente), haciendo cambios de agua cada 24 horas. Para asegurar que la sal se eliminase por completo, se midió cada vez la conductividad con un conductímetro (Crison EC-Meter Basic 30+; HACH LANGE). En el momento en que la conductividad del agua no aumenta, se tendrá el *scaffold* polimérico preparado.

Por último, se secaron los materiales cuidadosamente con papel, se dejaron unas primeras 24 horas en una campana extractora y otras 48 horas más en un desecador a vacío. Después de esto se mantuvo los *scaffolds* en bolsas zip en nevera, hasta su uso.

Caracterización de los scaffolds

Morfología mediante microscopía diferencial de barrido

Las muestras fueron observadas en un microscopio diferencial de barrido (SEM JEOL JSM-6300) para determinar su morfología a nivel microscópico, analizando la porosidad e interconectividad de los poros.

² Agradecimientos a la Dr. Carmen Antolinos Turpín, que elaboró las microesferas de PVA.

Para ello, se sacaron las muestras de la nevera y se dejaron 24 horas en un desecador a vacío para asegurar que estuvieran completamente secas y evitar interferencias con el microscopio. A continuación, se llevaron al Servicio de Microscopía de la UPV, donde se prepararon las muestras para su observación. En primer lugar, se colocó en cada porta muestras tres fragmentos de la muestra para observar la base, la capa superior y el interior, haciendo una fractura transversal con nitrógeno líquido. En segundo lugar, se realizó el recubrimiento con oro de las muestras.

Las condiciones del microscopio se establecieron en 20 kV y 13 cm.

Una vez obtenidas las imágenes, se determinó la técnica más adecuada para la obtención de un *scaffold* con una elevada porosidad e interconectividad de los poros, y se realizaron los ensayos siguientes a los materiales seleccionados.

Análisis elemental EDS de los *scaffolds*

Para comprobar que no quedó sal retenida en el interior del *scaffold* se analizaron las muestras mediante espectroscopía de rayos X por dispersión en energía (EDS), que permite determinar la composición de la muestra a partir de la detección de la energía dispersada de los Rayos X emitidos por la superficie sobre la que incide el haz de electrones, que es característica de cada elemento químico.

Esta técnica se realizó empleando el detector de energía dispersiva de Rayos X (*Oxford Instruments*) del microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM; *ZEISS modelo ULTRA 55*) del Servicio de Microscopía de la UPV.

Para ello, se realizaron fracturas de las muestras con nitrógeno líquido para observar el interior de las muestras, y se recubrieron con platino (Pt).

Los datos obtenidos fueron tratados para obtener los espectros y determinar la composición de las diferentes muestras.

Hinchado en agua

Se estudió el hinchado de las muestras para ver cómo afectaba el lavado de los materiales, y también estudiar su comportamiento en presencia de un medio acuoso, ya que los materiales estarán en contacto con el medio de cultivo.

Para ello, se troquelaron, con un troquel de 0,8 mm, tres muestras de cada uno de los polímeros y se pesaron en una balanza XS105DU (*Mettler-Toledo Inc.*), siendo su masa inicial

m_0 . A continuación, se introdujeron en una placa multipocillo con 1 ml de agua destilada cada una y tras 48 horas, para asegurar el equilibrio, se volvieron a pesar las muestras (m_f), después de eliminar el exceso de agua suavemente.

Con estas medidas se calculó el porcentaje de hinchado, mediante la ecuación (12):

$$\%H = \frac{m_f - m_0}{m_0} \cdot 100 (\%) \quad (12)$$

Porosidad

Para determinar la porosidad de los *scaffolds* se empleó una balanza hidrostática cuyo principio de funcionamiento es el Principio de Arquímedes, según el cual “Un cuerpo total o parcialmente sumergido en un fluido en reposo, recibe un empuje de abajo hacia arriba igual al peso del volumen del fluido que desaloja”.

Así pues, se debe tener en cuenta el balance de fuerzas que aparecen al colocar una muestra en una balanza hidrostática. Como se puede ver en la Figura 53, se tiene la fuerza peso (P) debida a la acción gravitatoria que ejerce la Tierra sobre los cuerpos, que tiene el mismo sentido que la gravedad. De acuerdo con la Tercera Ley de Newton, aparece una fuerza de igual módulo y dirección que el peso, pero sentido contrario, perpendicular a la superficie del cuerpo, que se conoce como fuerza normal (N) y que es la que ejerce la superficie sobre la que está apoyado el cuerpo. Y, finalmente, por el Principio de Arquímedes, se tiene una fuerza de sentido igual al de la fuerza normal que se denomina empuje (E) y que es la fuerza ejercida por el fluido sobre el cuerpo.

Así pues, se debe tener en cuenta el balance de fuerzas que aparecen al colocar una muestra en una balanza hidrostática. Como se puede ver en la Figura 53, se tiene la fuerza peso (P) debida a la acción gravitatoria que ejerce la Tierra sobre los cuerpos, que tiene el mismo sentido que la gravedad y por el Principio de Arquímedes, se tiene una fuerza de sentido opuesto que se denomina empuje (E) y que es la fuerza ejercida por el fluido sobre el cuerpo.



Figura 53. Esquema de las fuerzas que aparecen al sumergir un cuerpo en un fluido.

La balanza hidrostática mide la diferencia entre el peso de la muestra y la fuerza de empuje:

$$P = N + E \quad (13)$$

Dado que las muestras presentan poros microscópicos, se debe definir, en primer lugar, el concepto de volumen aparente (V_{ap}). Este se define como la suma del volumen del polímero (V), sin considerar los poros, y el volumen de los poros (V_p); es decir:

$$V_{ap} = V + V_p \quad (14)$$

donde el volumen de los poros se puede calcular a partir de la diferencia de peso de la muestra pesada al aire (m_m) y la muestra pesada al aire una vez que se ha inyectado el etanol para rellenar los poros (m_i). De esta forma, el volumen de los poros viene dado por la siguiente expresión:

$$V_p = \frac{m_i - m_m}{\rho_{etOH}} \quad (15)$$

Por otro lado, el volumen del polímero se obtiene de forma sencilla como:

$$V = \frac{m_m}{\rho_m} \quad (16)$$

Aplicando el Principio de Arquímedes a la muestra inyectada con el fluido en el que se sumerge:

$$E = m_{etOH} \cdot g = V_{ap} \cdot \rho_{etOH} \cdot g \quad (17)$$

Además, según la expresión (13):

$$E = P - N \quad (18)$$

donde P es el peso de la muestra que se sumerge y es igual al peso de la muestra una vez se ha inyectado en ella el fluido,

$$P = m_i \cdot g \quad (19)$$

y N la fuerza normal que experimenta el cuerpo sumergido, cuyo módulo es igual al peso de la muestra al sumergirla en el fluido, después de haber inyectado el líquido en los poros (m_{is}),

$$N = m_{is} \cdot g \quad (20)$$

Sustituyendo los términos (19) y (20) en la ecuación (18), tenemos que el empuje es igual a:

$$E = (m_i - m_{is}) \cdot g \quad (21)$$

Por lo que, igualando la expresión (18) y (21) se tiene que:

$$V_{ap} = \frac{m_i - m_{is}}{\rho_{etOH}} \quad (22)$$

Ahora bien, la porosidad (π) se define como la fracción volúmica de poros y se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\pi = \frac{V_p}{V_{ap}} \quad (23)$$

Por tanto, si sustituimos las expresiones (15) y (22) en (13), se puede calcular la porosidad de los *scaffolds* a partir de la masa de las muestras pesadas al aire (m_m), después de inyectarles etanol (m_i) y tras sumergirlo en etanol (m_{is}):

$$\pi = \frac{m_i - m_m}{m_i - m_{is}} \quad (24)$$

El equipo empleado fue una balanza de precisión Mettler AX205 (*Mettler-Toledo Inc.*) con el accesorio Mettler ME 33360, empleando como fluido etanol (*Sigma Aldrich*) para evitar interacciones con la cadena polimérica que den lugar al hinchado del material.

Finalmente, para la inyección del etanol en los poros se introdujo las muestras en viales con 3 ml de etanol, y se mantuvo a vacío durante 30 minutos en un desecador (*Selecta*).

Integración de las membranas electrohiladas sobre el scaffold

Para obtener una primera aproximación a la estructura 3D con porosidad estratificada, se probó dos métodos diferentes para el PLA:

i) electrohilado directo: se realizó un breve tratamiento (1 minuto) de plasma en una cámara de plasma (*Plasma-Electronic Piccolo*) al *scaffold* y se puso sobre un colector específico. A continuación, se cubrió con una placa de metacrilato que presentaba un orificio central, para asegurar la conducción de las fibras al *scaffold*.

El tratamiento de la muestra con plasma da lugar a la formación de radicales libres en la superficie del polímero, por lo que cabe esperar que las fibras electrohiladas se adhieran al sustrato gracias a la presencia de dichos radicales libres.

ii) fusión parcial: dado que el PLA tiene un punto de fusión de 120 °C y la PCL de 60 °C, se realizó la integración de las membranas electrohiladas sobre el *scaffold* siguiendo el protocolo de Hakimi *et. al* (2015), sobre el que se realizaron algunas modificaciones. Para ello, se dispuso las membranas tal como se muestra en la Figura 54; las membranas de PLA en ambas caras del *scaffold* e intercaladas dos membranas electrohiladas de PCL, sin emplear HFIP ya que disuelve ambos polímeros fácilmente. [123]

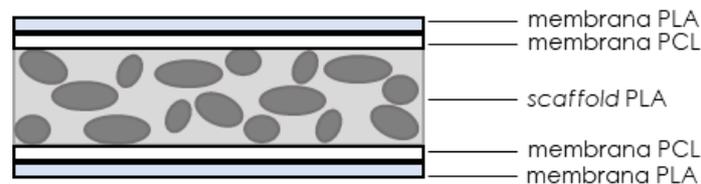


Figura 54. Esquema de la disposición del *scaffold* y las membranas para obtener la estructura 3D de porosidad estratificada.

Una vez que se tuvo todo ello, se colocó entre dos placas de Teflón y se introdujo en la estufa a 80 °C durante 10 minutos.

Resultados y discusión

Optimización del proceso de fabricación de los scaffolds porosos

Cada una de las técnicas empleadas dieron lugar a resultados diferentes, que se analizan en este apartado:

Empleo de plantilla porogénica

Debido a la viscosidad de la disolución, así como a la facilidad con la que se evapora el disolvente, el empleo de una plantilla porogénica para la obtención de los *scaffolds* no fue viable, ya que la disolución no pudo permear a través de los poros de la plantilla y quedó sobre ella.

Por tanto, los materiales obtenidos por este método se desecharon.

Con los otros dos métodos, sin embargo, sí fue posible obtener *scaffolds* (Figura 55), que fueron analizados tras los lavados en el SEM.

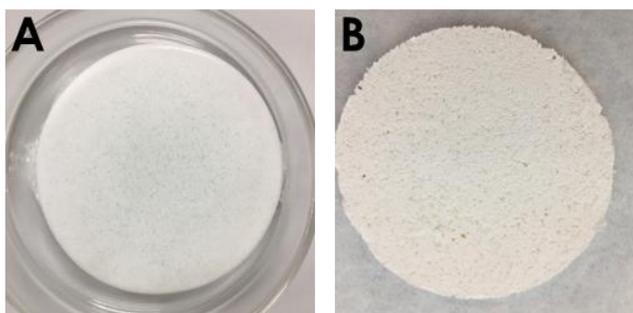


Figura 55. Aspecto macroscópico de los *scaffolds* de PCL obtenidos por la técnica de (A) evaporación del disolvente con lixiviación de partículas, y (B) moldeado por fusión.

Empleo de la técnica de evaporación del disolvente con lixiviación de partículas

La técnica de evaporación del disolvente con lixiviación de partículas se empleó utilizando dos ratios polímero/porógeno diferentes: 1/3 y 1/6.

En la Figura 56 se observa la morfología de los *scaffolds* obtenidos con un ratio 1/3:

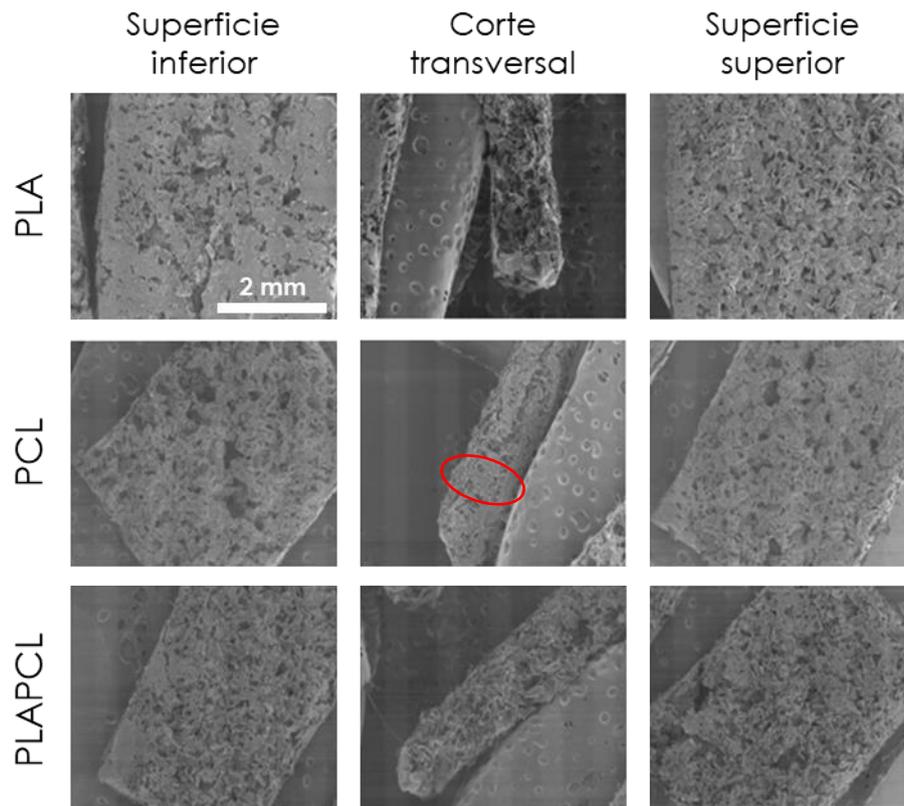


Figura 56. Imágenes SEM de ambas superficies y corte transversal de los *scaffolds* de PLA, PCL y PLAPCL obtenidos por la técnica de evaporación del disolvente con lixiviación de partículas, con un ratio polímero/porógeno 1/3. Barra de escala: 2 mm

Como se puede observar, la porosidad y la interconexión entre los poros es baja, especialmente para el caso de la PCL, cuyo corte transversal muestra amplias zonas prácticamente libres de poros (zona marcada).

Esto es debido a que el ratio polímero/porógeno es bajo.

Si aumentamos el ratio a 1/6:

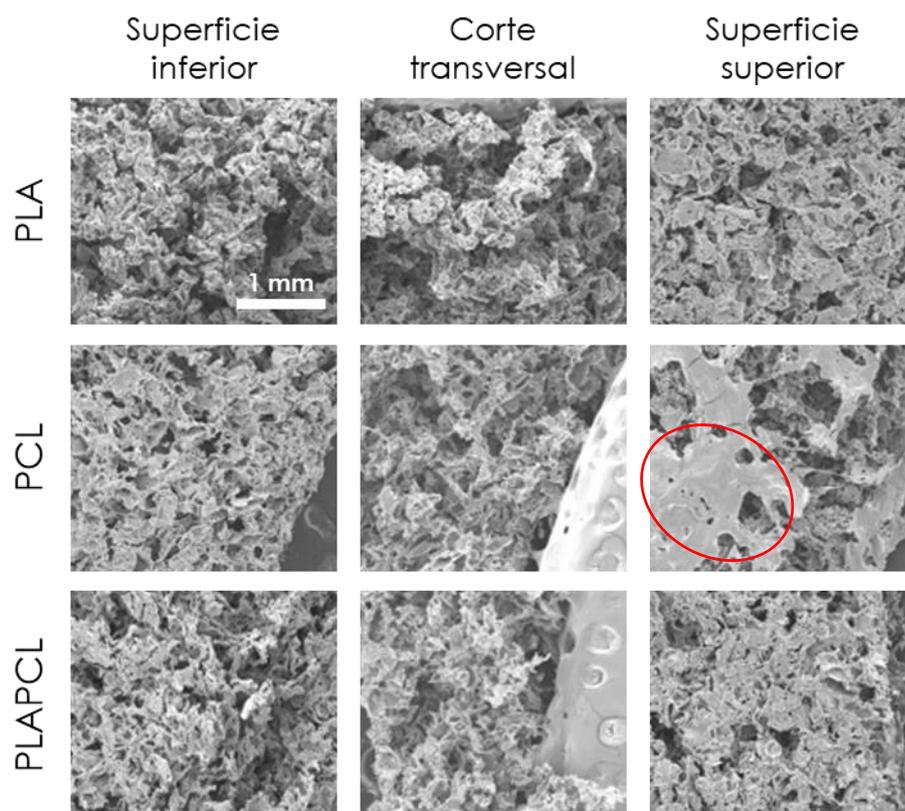


Figura 57. Imágenes SEM de ambas superficies y corte transversal de los *scaffolds* de PLA, PCL y PLAPCL obtenidos por la técnica de evaporación del disolvente con lixiviación de partículas, con un ratio polímero/porógeno 1/6. Barra de escala: 1 mm

Las imágenes del SEM muestran una elevada porosidad e interconexión de los poros, excepto en el caso de la cara superior de los *scaffolds* de PCL, en los que se tiene una amplia zona libre de poros (marcada en rojo). Esto puede ser debido a una mala homogeneización de la mezcla de la disolución polimérica con la sal, por lo que este será un parámetro para tener en cuenta durante el procesado.

Finalmente, se comprueba que un aumento en el ratio polímero/porógeno proporciona una mayor porosidad e interconectividad, lo que permitirá una mejor difusión de los nutrientes a través del *scaffold*.

Empleo de la técnica de moldeado por fusión

La Figura 58 muestra la morfología microscópica de los *scaffolds* de PCL obtenidos por esta técnica, empleando un ratio polímero/porógeno 1/3:

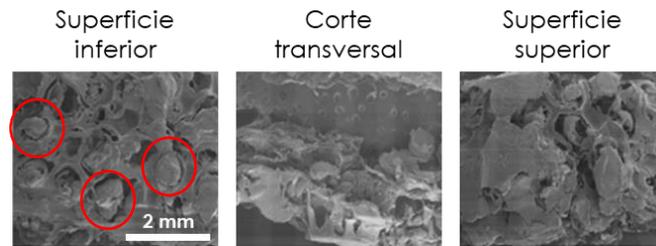


Figura 58. Imágenes SEM de ambas superficies y corte transversal de los *scaffolds* de PCL obtenidos por la técnica de moldeado por fusión, con un ratio polímero/porógeno 1/3. Barra de escala: 2 mm

Las imágenes SEM muestran, en primer lugar, la presencia de porógeno que no ha sido eliminado con los lavados (marcados en rojo) y, en segundo lugar, una porosidad muy reducida, con poros no interconectados.

Por un lado, la presencia de porógeno residual en el *scaffold* es difícil de controlar ya que no existe una forma sencilla de cuantificar el PVA presente en las muestras, como ocurre en el caso de la sal, que puede determinarse con el conductímetro. Podría realizarse con técnicas como el DSC, pero se trata de una técnica destructiva y, por tanto, no es factible su uso. Así pues, este hecho supone un problema a la hora de optimizar el procesado.

Por otro lado, la baja porosidad puede aumentarse incrementado el ratio polímero/porógeno a 1/6, lo que permitiría también obtener una mayor interconectividad de los poros. Por ello, en la Figura 59 se muestran las imágenes del SEM para un ratio 1/6.

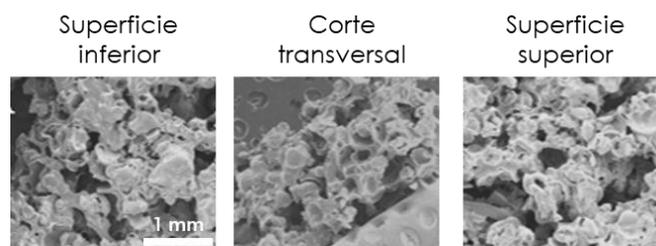


Figura 59. Imágenes SEM de ambas superficies y corte transversal de los *scaffolds* de PCL obtenidos por la técnica de moldeado por fusión, con un ratio polímero/porógeno 1/6. Barra de escala: 1 mm

Como puede verse en la Figura 59, al aumentar el ratio polímero/porógeno, aumenta la porosidad e interconectividad de los poros. Sin embargo, a diferencia de los *scaffolds* obtenidos por la técnica SCPL, estos presentan una estructura más cerrada, con menor porosidad e interconectividad.

Por tanto, la técnica seleccionada para la fabricación de los *scaffolds* es la SCPL, ya que da lugar a estructuras de elevada porosidad e interconectividad; además, como se ha comentado anteriormente, el ratio polímero/porógeno que se empleará será 1/6.

Así pues, estos materiales serán los que se caracterizarán a continuación.

Caracterización de los scaffolds

Una vez establecido el método de obtención de los *scaffolds*, se preparó los materiales para ser caracterizados.

Análisis elemental EDS de los scaffolds

En primer lugar, en la Figura 60, se muestra más en detalle la estructura microscópica de los diferentes *scaffolds*:

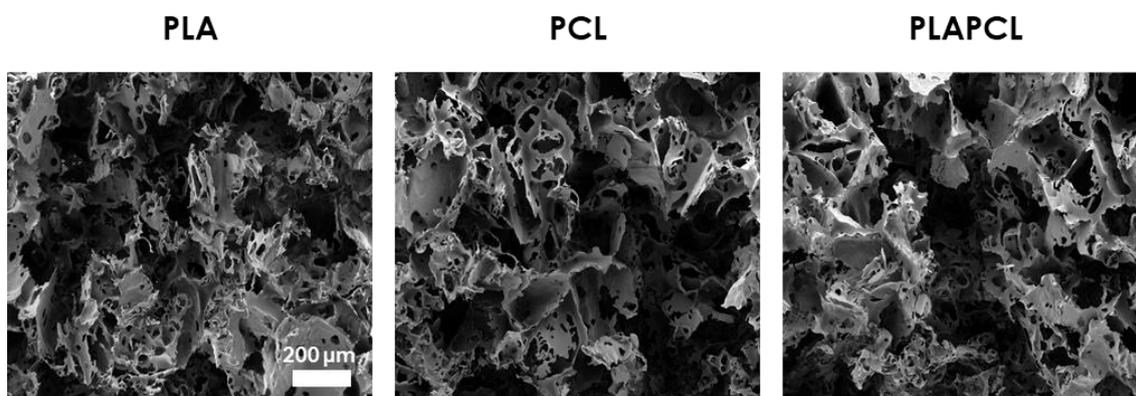


Figura 60. Imágenes SEM en las que se observa la estructura microscópica en detalle del interior de los *scaffolds*. Barra de escala: 200 µm

Tal como se ha visto en el apartado anterior, los *scaffolds* presentan una elevada porosidad e interconectividad de los poros. Además, se observan poros de menor tamaño, que bloquearían el paso de las células y las mantendrían en el interior de la estructura, para un diseño de co-cultivo indirecto.

Empleando el *software* del equipo se realizó un estudio elemental tanto de las superficies inferior y superior, como del interior del *scaffold* para estudiar la presencia de sal (porógeno) residual en los materiales. Esto se debe a que, aunque los valores de conductividad y salinidad medidos con el conductímetro durante los lavados fueran iguales a los del agua destilada, las muestras pueden contener trazas si ésta ha podido quedar atrapada en la estructura.

Cabe recordar que, dado que se realizó el recubrimiento con platino (Pt), este elemento aparecerá en los resultados obtenidos.

En la Figura 61 se presenta el estudio EDS de los *scaffolds* de PLA:

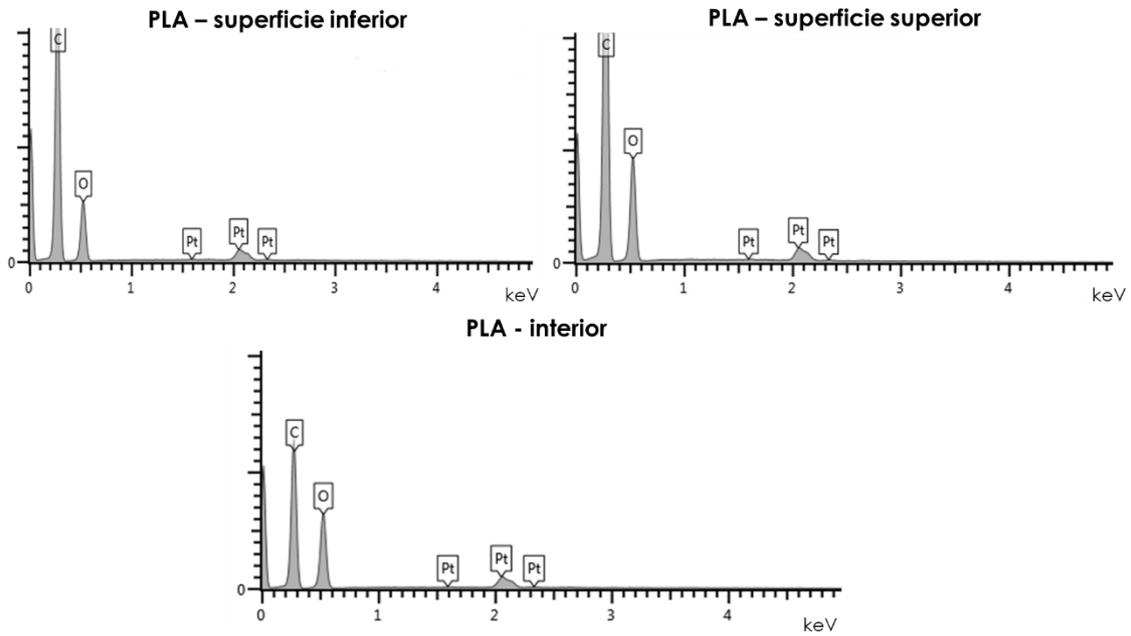


Figura 61. Análisis elemental EDS de las superficies inferior y superior, y el interior del *scaffold* de PLA.

En ella podemos ver que no hay trazas de porógeno en ninguna zona de las analizadas. Sin embargo, para la PCL sí se detectó la presencia de Cl, como puede verse en la Figura 62:

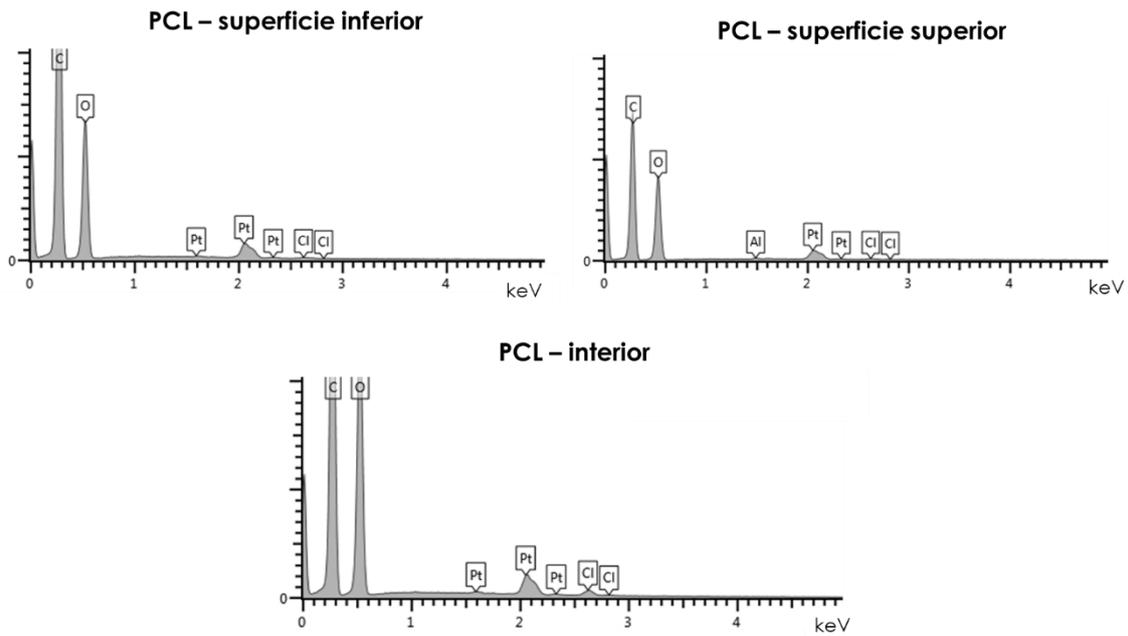


Figura 62. Anàlisi elemental EDS de las superficies inferior y superior, y el interior del *scaffold* de PCL.

Esto puede ser debido a que la PCL hincha menos, por lo que el agua tiene mayor dificultad para introducirse en la estructura. Por otro lado, este hecho también puede deberse a que la porosidad de la muestra es menor, aunque se descarta esta hipótesis en el caso de estudio, ya que las imágenes morfológicas (Figura 60) muestran homogeneidad en las diferentes muestras en cuanto a porosidad e interconectividad.

Por otro lado, se observa en la superficie superior trazas de Al, que se corresponderían al portamuestras empleado.

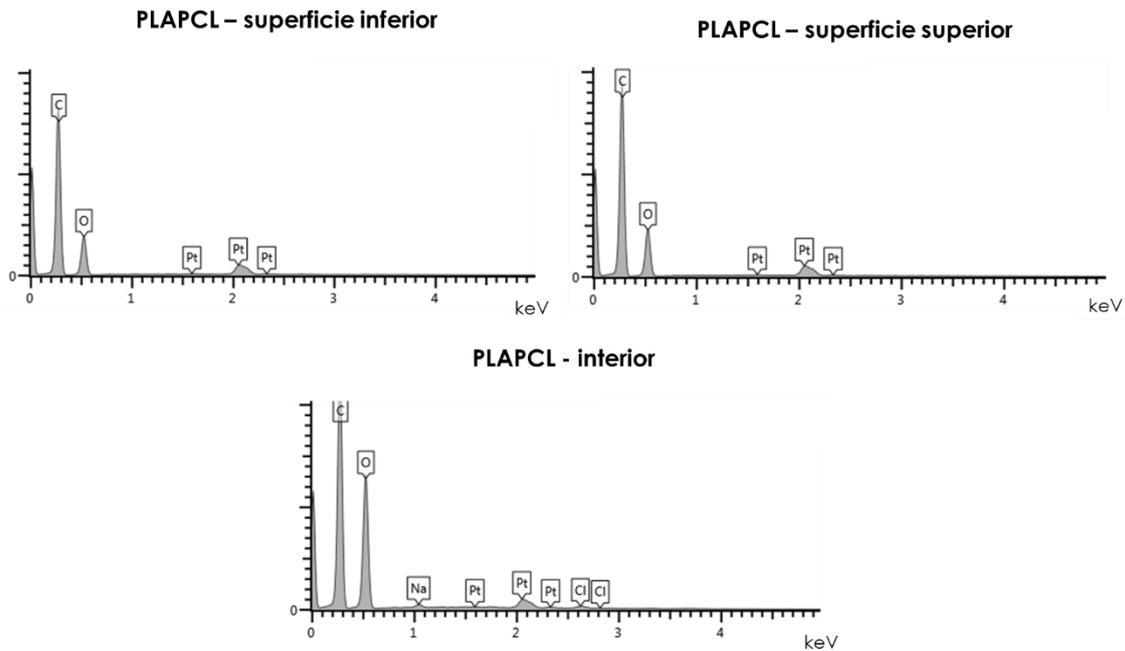


Figura 63. Anàlisi elemental EDS de les superfícies inferior i superior, i el interior del *scaffold* de PLAPCL.

En el caso de la mezcla PLAPCL, aparecen trazas tanto de sodio (Na) como de cloro (Cl), pero únicamente en el interior del *scaffold*. Al igual que ocurre con la PCL, la mezcla también hincha menos que el PLA, por lo que un menor hinchado supondría una mayor dificultad para eliminar el porógeno a través de los lavados.

Por tanto, se estableció realizar tres lavados más a los *scaffolds*, todos ellos manuales; es decir, empleando una jeringa para hacer vacío e introducir en el interior de la estructura el disolvente. Se realizó un primer lavado con etanol 70%, un segundo lavado con una mezcla 50:50 de etanol 70% y agua miliQ, y finalizar con agua miliQ. Con ello aseguramos el lavado completo de los materiales.

Hinchado

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de restos de porógeno tras los lavados iniciales en los *scaffolds* de PCL y PLAPCL puede deberse a un menor hinchado de estos, lo que dificultaría el proceso.

Para comprobar esto se determinó el hinchado de las muestras que, además, nos permite conocer cómo se comportarán los materiales una vez estén en contacto con un medio acuoso, como el medio de cultivo.

En la tabla siguiente se tiene el hinchado de los materiales tras haber estado en agua destilada 48h:

Tabla 11. Hinchado (%) de los *scaffolds* tras 48h en agua destilada.

	<i>Hinchado (%)</i>
PLA	39,6 ± 2,3
PLAPCL	31,2 ± 1,1
PCL	18,1 ± 3,9

Con los resultados anteriores, podemos concluir que los *scaffolds* de PCL hinchan menos (un 45% menos que los de PLA) que el resto, lo que permite concluir que el porógeno residual tras los primeros lavados sea debido a ello.

Además, dado que todos los polímeros hinchan poco, se espera que en los cultivos celulares las células puedan quedar albergadas en el interior de los poros del *scaffold*, permitiendo el co-cultivo indirecto que se requiere para el objetivo final de la estructura.

Porosidad

En cuanto a la porosidad de los *scaffolds*, los resultados se presentan en la Tabla 12:

Tabla 12. Porosidad (%) de los *scaffolds*.

	<i>Porosidad (%)</i>
PLA	98,5 ± 0,2
PLAPCL	98,0 ± 0,2
PCL	98,2 ± 0,1

La porosidad conseguida a través de la técnica SCPL para todos los polímeros es superior al 98 %, lo cual permite obtener estructuras porosas viables para la difusión de los nutrientes, así como para la colonización celular.

Obtención de un sistema 3D de porosidad estratificada

La primera aproximación al sistema 3D que se llevó a cabo consistió en el electrohilado directo sobre el *scaffold* tras un tratamiento con plasma. Para poder ver el efecto de dicho tratamiento en el proceso, se realizó también el electrohilado sobre el *scaffold* sin tratar, mostrándose los resultados en la Figura 64:

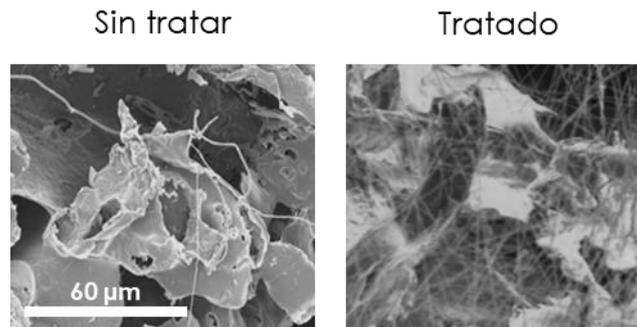


Figura 64. Imágenes FESEM del *scaffold* de PLA sin tratar (izquierda) y tratado con plasma (derecha) sobre el que se ha llevado a cabo un electrohilado directo de PLA. Barra de escala: 60 μm

Como se puede observar, el tratamiento con plasma favorece el electrohilado sobre la superficie del *scaffold*, debido a que el plasma permite modificar las cargas superficiales. En el proceso de electrohilado tiene mucha relevancia este fenómeno, ya que las cargas residuales de las fibras repelen a aquellas similares del chorro. Como resultado de ello, con el electrohilado únicamente se pueden conseguir espesores de membrana de entre 0,5 y 1 mm, por lo que el electrohilado directo sobre el *scaffold*, de mayor espesor (3 mm), es complejo. [124], [125]

Dadas las dificultades que presenta esta técnica, se realizó la unión física de ambos materiales mediante la fusión parcial, el resultado de la estructura obtenida se muestra en la Figura 65:



Figura 65. Aspecto de la estructura 3D de porosidad estratificada obtenida a partir de la técnica de fusión parcial.

En la Figura 65 se distinguen las partes que componen la estructura, además de las interfaces que quedan tras la fusión de las membranas de PCL, que unen las membranas de PLA con el *scaffold*.

Finalmente, se observó en el FESEM la morfología a nivel microscópico (Figura 66) para su estudio.

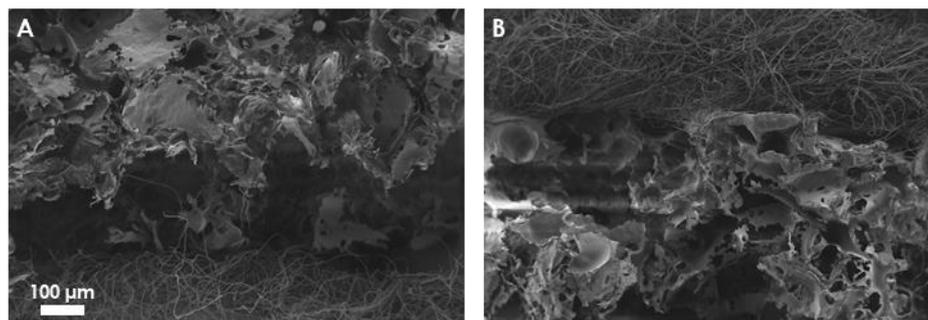


Figura 66. Imágenes FESEM de la estructura 3D de porosidad estratificada de la parte inferior (A) y superior (B), obtenida por la técnica de fusión parcial. Barra de escala: 100 µm

Las imágenes de FESEM muestran la correcta unión de las membranas al *scaffold*, sin una interfaz de PCL observable, lo que asegura la difusión de los nutrientes y los factores paracrinos de las células a través de la estructura.

Con estos resultados, se alcanza el objetivo principal de esta tesis doctoral, la obtención de una estructura de porosidad estratificada que permita el co-cultivo celular indirecto, permitiendo el cultivo de un tipo celular en el interior del *scaffold*, y el de otro tipo celular sobre las membranas.

Con este objetivo alcanzado, a continuación se estudiará la liberación de un fármaco modelo desde las membranas, para determinar si el material es viable para el uso planteado en testeo de fármacos (**Capítulo III**). Además, se estudiará la interacción de los materiales con una proteína de adhesión celular, como es la fibronectina (**Capítulo IV**), así como la viabilidad celular y citotoxicidad de los materiales (**Capítulo V**).

Conclusiones

En primer lugar, se ha obtenido *scaffolds* de PLA, PCL y PLAPCL mediante la técnica de evaporación del disolvente con lixiviación de partículas (SCPL), empleando como porógeno sal, con una porosidad elevada (por encima del 98%) y elevada interconectividad de los poros, tal y como se observó en las imágenes del FESEM.

Con relación al proceso de lavado del porógeno, se observó, gracias al análisis EDS, que los *scaffolds* de PCL y PLAPCL contenían trazas del mismo, lo que se pudo relacionar con el hinchado que sufren los materiales. La PLA hincha más que la PCL y el PLAPCL, por lo que el agua tiene mayor facilidad para penetrar en la estructura y eliminar el porógeno. Por ello,

se planteó la realización de 3 lavados mecánicos manuales empleando una jeringa y aplicando vacío, para asegurar la completa eliminación de la sal.

Finalmente, se ha logrado obtener la estructura 3D de porosidad estratificada uniendo mediante fusión parcial las membranas con el *scaffold*, para ello fue necesario emplear una membrana “de sacrificio” de PCL que se situó entre las membranas de PLA y el *scaffold* de PLA, para que al someterla a temperatura se fundiera y actuara de pegamento entre los dos materiales. Al observar la estructura al microscopio se pudo ver que la interfaz de PCL no era apreciable, por lo que la difusión de los nutrientes y los factores paracrinicos de las células a través del sistema es viable.

CAPÍTULO III

DEGRADACIÓN DE LOS MATERIALES Y LIBERACIÓN DE UN FÁRMACO MODELO A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS

Este tercer capítulo se centra en el estudio de liberación de la curcumina, un fármaco modelo ampliamente utilizado en biomedicina. Dado que la liberación del fármaco está relacionada con la degradación del polímero, también se incluye un estudio de degradación de los materiales.

Además, el estudio de degradación nos permite conocer la durabilidad del dispositivo, y seleccionar el material óptimo para la aplicación requerida.

Introducción

El desarrollo de nuevos fármacos es caro y requiere mucho tiempo, por lo que las nuevas tendencias están enfocadas en mejorar la relación seguridad/eficacia de fármacos ya existentes. Para ello, se plantean diferentes alternativas, como la personalización del tratamiento, la regulación de la dosis, o la administración controlada, entre otros. [126]

La administración controlada de fármacos, concretamente, tiene gran interés debido a las ventajas que presenta frente a la administración de fármacos convencional [127]:

- i. Disminuye la frecuencia de administración del medicamento, mejorando el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.
- ii. Reduce los efectos secundarios relacionados con dosis elevadas.
- iii. Disminuye la fluctuación de los niveles plasmáticos.
- iv. Tiene un efecto terapéutico más uniforme.

Todas estas ventajas se pueden entender analizando los perfiles de liberación (Figura 67). La concentración del fármaco en el organismo debe ser superior a una dosis mínima efectiva, por debajo de la cual el fármaco no tiene efecto alguno en el organismo, e inferior a la dosis mínima tóxica, ya que valores superiores dan lugar a efectos secundarios importantes. En el caso de la liberación tradicional, la concentración del fármaco alcanza valores inicialmente altos, próximos a la dosis tóxica, para luego descender rápidamente acercándose a niveles ineficaces; por lo que, en estos casos, se administran dosis sucesivas del fármaco para mantenerse más o menos en un nivel óptimo de eficacia. Sin embargo, en los sistemas de liberación controlada, es posible mantener una concentración adecuada de fármaco, estable, sin necesidad de dosis repetidas. [128]

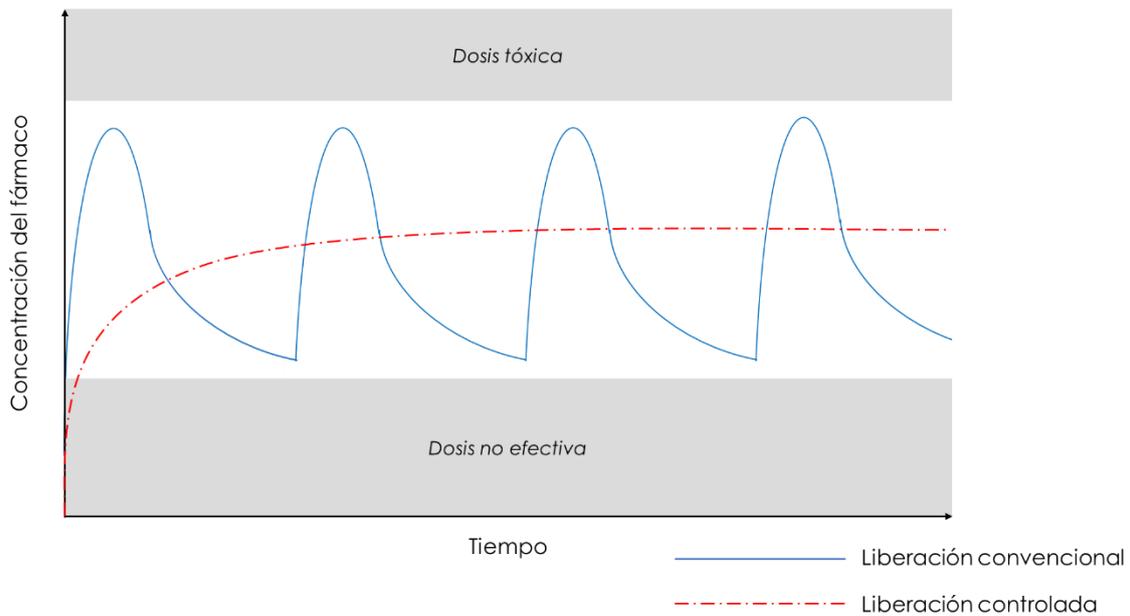


Figura 67. Comparativa del perfil de liberación en los sistemas convencionales y los de liberación controlada.

Por tanto, a la hora de diseñar un sistema de liberación controlada, deberá tenerse en cuenta los mecanismos de liberación implicados, para regular adecuadamente el perfil de liberación. Estos mecanismos, por los que un principio activo se libera desde un sistema, son tres: difusión, degradación e hinchado. [129]

Difusión

Este mecanismo tiene lugar cuando el fármaco u otro agente activo pasa a través del polímero que forma el dispositivo de liberación controlada; es decir, cuando pasa de la matriz polimérica al entorno externo. A medida que se produce la liberación su tasa suele disminuir, ya que el agente activo tiene una distancia progresivamente mayor para viajar y, por lo tanto, requiere de un mayor tiempo de difusión.

Es fundamental en estos sistemas que las combinaciones de las matrices poliméricas y los agentes bioactivos elegidos permitan la difusión a través de los poros o de la estructura macromolecular del polímero al introducir el sistema de liberación en el entorno biológico, sin inducir ningún cambio en el propio polímero.

Degradación

Los polímeros biodegradables se degradan dentro del organismo como resultado de los procesos biológicos naturales, lo que evita que sea necesario extraer el sistema una vez que se ha completado la liberación del agente activo, como ocurre en otros casos. La mayoría de

los polímeros biodegradables están diseñados para degradarse como resultado de la hidrólisis de las cadenas poliméricas en compuestos biológicamente aceptables y progresivamente más pequeños. A medida que las cadenas poliméricas se van degradando, el fármaco puede ser liberado, de modo que esta liberación viene regulada por la degradación de la matriz polimérica.

En el caso de algunos polímeros degradables, la degradación se produce sólo en la superficie del polímero, lo que da lugar a una tasa de liberación que es proporcional a la superficie del sistema.

Hinchado

En estos casos el sistema está inicialmente seco y, cuando se coloca en el cuerpo, el polímero es capaz de absorber agua u otros fluidos corporales, hinchándose. Al hincharse, aumenta el contenido de disolvente acuoso en la formulación, así como el tamaño de la malla polimérica, lo que permite que el fármaco se difunda a través de la red hinchada hacia el entorno externo.

Finalmente, para el diseño de un sistema de liberación controlada, se requiere conocer las características del fármaco, así como las técnicas más adecuadas para su encapsulación, de acuerdo con su aplicación.

Curcumina: un fármaco de gran interés

La curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)1,6-hepta-dien-3,5-diona; Figura 68) es un polifenol con tautomería ceto-enólica obtenido de la planta cúrcuma (*Curcuma longa*) altamente bioactivo. Se trata de un compuesto lipófilo que es capaz de atravesar la membrana plasmática de la célula con gran facilidad; sin embargo, debido a su naturaleza no es soluble en disolventes polares y presenta una baja tasa de biodisponibilidad para la célula, por su rápida metabolización y eliminación. [130]

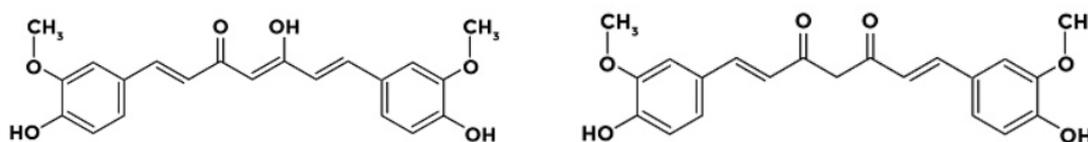


Figura 68. Estructura molecular de los dos tautómeros de la curcumina.

Presenta gran interés en medicina debido a sus múltiples propiedades, que lo hacen un fármaco empleado en numerosas aplicaciones, como puede verse en la Figura 69.

Presenta un comportamiento anticancerígeno, al inducir la apoptosis de las células cancerígenas, tiene actividad inmunosupresora, antiinflamatoria y antioxidante; además, inhibe la formación de la placa β -amiloide responsable de la enfermedad de Alzheimer, y es un inhibidor no tóxico de la bomba Ca-adenosina trifosfato, lo que permite corregir los defectos de la fibrosis cística. [131]–[136]

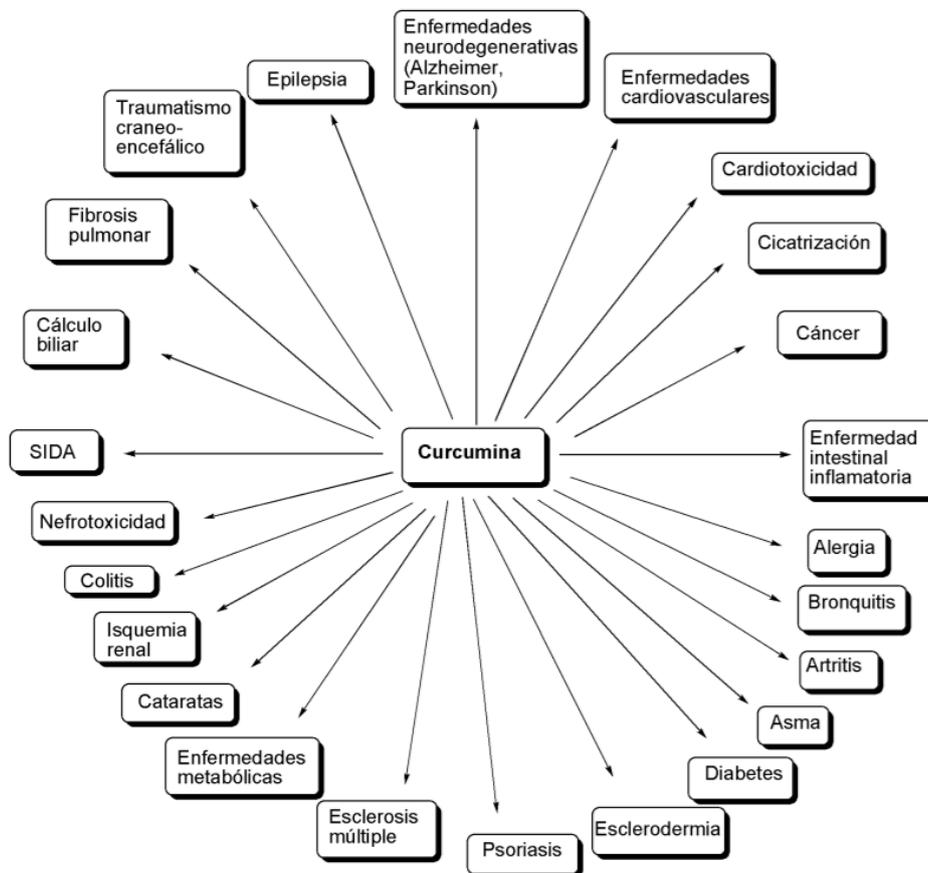


Figura 69. Aplicaciones en las que la curcumina presenta una elevada actividad biológica. Extraída de [137]

Al tratarse de un fármaco altamente inestable, se ha propuesto diferentes sistemas de liberación que eviten su rápida degradación en contacto con el medio fisiológico, siendo el que presenta mayor interés su encapsulación en micro y nanofibras por medio de la técnica de electrohilado. [138] Algunas de las características de los sistemas de liberación preparados por electrohilado son: alta carga de fármaco (60%) y eficiencia de encapsulación (hasta 100%), posibilidad de utilizar diferentes polímeros permitiendo el diseño de sistemas

adaptados a la compatibilidad fisicoquímica, mayor disponibilidad del fármaco, capacidad para modular la liberación, y simplicidad y rentabilidad del proceso. [139]–[143]

Fabricación de sistemas de liberación mediante electrohilado

Las técnicas avanzadas de electrohilado tienen gran interés debido a la posibilidad de preparar materiales compuestos o cargados con un fármaco. En el caso de los sistemas de liberación, existen diferentes técnicas para encapsular el fármaco en las fibras, como el electrohilado en mezcla, electrohilado coaxial y electrohilado en emulsión. [144]

Electrohilado en disolución

Esta técnica, también llamada como electrohilado en mezcla, consiste en mezclar el fármaco directamente con la disolución polimérica, previamente al proceso de electrohilado. El fármaco se disuelve o se dispersa en la matriz polimérica, permitiendo obtener un perfil de liberación prolongado, controlado por la difusión/desorción del fármaco y la degradación del polímero.

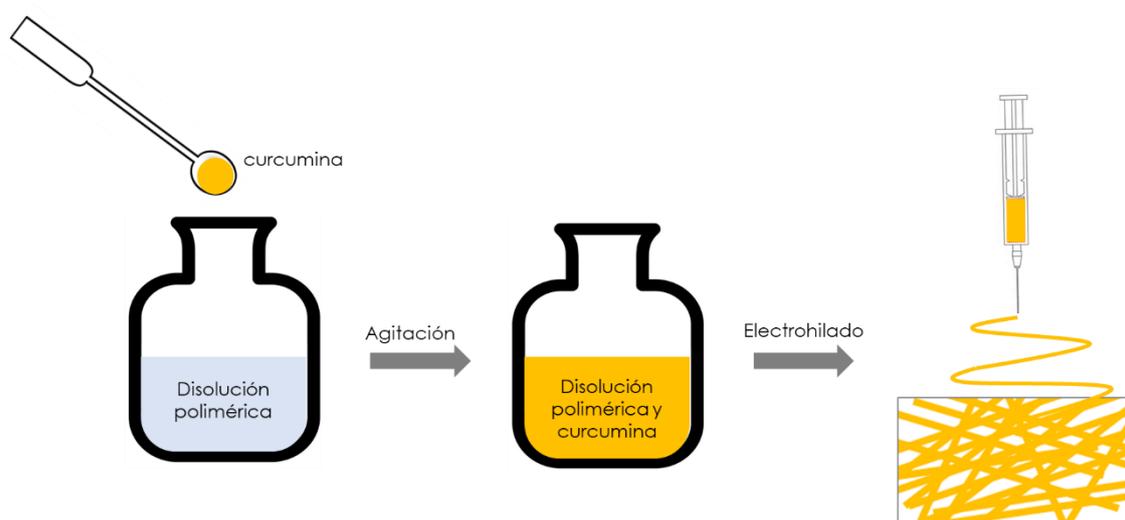


Figura 70. Esquema del proceso de electrohilado en mezcla empleando la curcumina como fármaco.

Mediante esta técnica se ha hecho diferentes estudios encapsulando antibióticos, antiinflamatorios y fármacos citostáticos, así como péptidos antimicrobiales y proteínas; siendo especialmente útil cuando la molécula es pequeña.

Electrohilado coaxial

El electrohilado coaxial consiste en electrohilar simultáneamente dos disoluciones a través de una aguja doble coaxial, dando lugar a un sistema núcleo/revestimiento (más conocido por su nombre en inglés, *core/shell*). La disolución polimérica se inyecta por la aguja exterior para formar el revestimiento, y la disolución del fármaco por la aguja interior, de modo que quede en el núcleo de la fibra.

En este caso la liberación del fármaco es más prolongada que mediante el electrohilado en mezcla, porque el principal mecanismo de liberación es la difusión, ya que todo el fármaco se encuentra en el núcleo de la fibra.

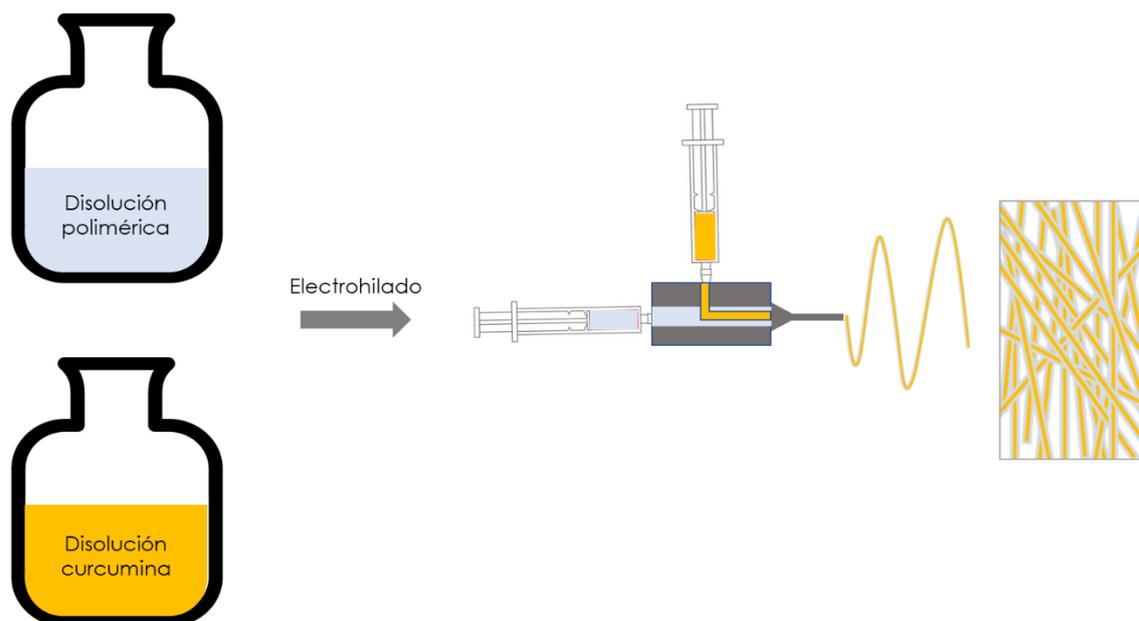


Figura 71. Esquema del proceso de electrohilado coaxial empleando la curcumina como fármaco (*core*).

Los fármacos que se han encapsulado por *electrospinning* coaxial son muy diversos, desde antiinflamatorios y analgésicos, hasta fármacos antimicrobianos, anticancerígenos o proteínas.

Electrohilado en emulsión

Esta técnica combina las dos anteriores, creando una estructura *core/shell* a partir del electrohilado de una emulsión estable mediante una aguja simple. Por tanto, el mecanismo de liberación predominante será también la difusión y, en menor medida, la degradación del polímero.

La emulsión está formada por dos (o más) fases inmiscibles, estabilizadas generalmente con tensioactivos, de forma que durante el proceso de electrohilado, la fase continua se convierte en la envoltura y la fase de gotas forma el núcleo de las fibras. Estas emulsiones pueden ser de tipo agua-en-aceite (fase continua lipofílica y fase gotas hidrofílica), que permite encapsular moléculas polares e hidrofílicas, como proteínas; y de tipo aceite-en-agua (fase continua hidrofílica y fase gotas lipofílica).

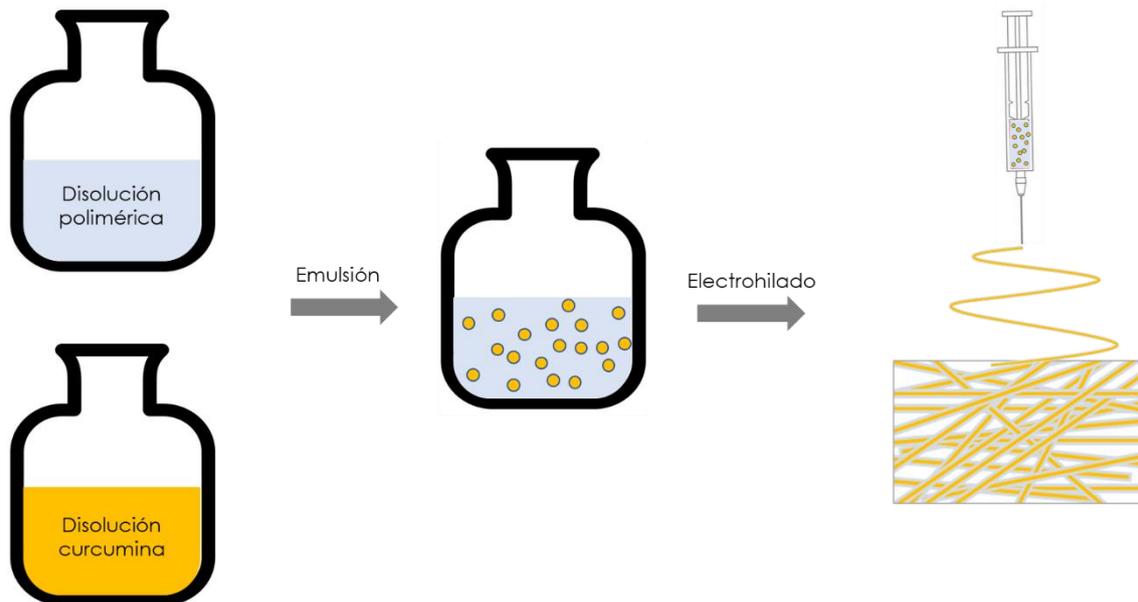


Figura 72. Esquema del proceso de electrohilado en emulsión empleando la curcumina como fármaco (*core*).

La principal problemática en este tipo de configuración es la complejidad en la optimización de los protocolos, ya que aparecen nuevas variables en el diseño que deben controlarse. De hecho, si la viscosidad de la fase de gotas es mayor que la de la fase continua, se forma un núcleo continuo a lo largo del eje de la fibra; sin embargo, si es mayor la viscosidad de la fase continua, el núcleo queda formado por gotas y la envoltura presenta una morfología discontinua.

Como se ha podido observar, en todas estas técnicas de encapsulación los mecanismos implicados en la liberación son fundamentalmente la difusión del fármaco y la degradación del sistema. Así pues, los materiales más adecuados para un mejor ajuste de los perfiles de liberación son polímeros biodegradables, como el PLA, la PCL y el PGA. De hecho, en el mercado ya existen formulaciones en forma de implantes y micropartículas de PLA y PLGA como sistemas de liberación controlada: Atridox® para periodontitis (implante *in situ* de PLA

con Hiclato de doxiciclina), Lupron Depot® para cáncer de próstata y endometriosis (micropartículas de PLA con Acetato de leuprolide), Ozurdex® para edema macular (implante intravítreo de PLGA con Dexametasona) o Risperdal® para esquizofrenia (micropartículas de PLGA con Risperidona). [145]

Así pues, es importante conocer no sólo los tiempos de degradación de los diferentes polímeros, para ajustarlos a los tiempos de aplicación, y cómo afecta a las propiedades mecánicas (en caso de implantes funcionales), sino también los mecanismos de degradación que afectan a cada uno de ellos.

Mecanismos de degradación

Los mecanismos básicos de degradación de cualquier polímero son los siguientes [146]:

- Fotodegradación: se produce cuando el polímero es irradiado con luz ultravioleta o visible.
- Degradación mecánica: causada debido a los esfuerzos a los que se encuentra sometido el material.
- Degradación térmica: se refiere a casos en los que el polímero, a elevadas temperaturas, sufre cambios químicos sin la contribución de ningún otro factor que no sea la energía térmica. Generalmente, es difícil distinguir entre la degradación térmica y la termoquímica, por lo que en los últimos años se ha estado investigando sobre polímeros termoestables, en los cuales no hay pérdida de propiedades con la temperatura.
- Degradación química: es inducida por el contacto del polímero con productos químicos reactivos. Uno de los tipos de degradación química más frecuentes es la degradación hidrolítica, producida por el contacto del material con un medio acuoso, en la que la penetración del agua dentro de la matriz polimérica produce el hinchamiento, escisión de los puentes de hidrógeno intermoleculares, hidratación de las moléculas y, finalmente, la hidrólisis de los enlaces inestables. Además, también tiene lugar este tipo de degradación en medios básicos o ácidos.
- Degradación mediante microorganismos o enzimática: los microorganismos producen gran variedad de enzimas que son capaces de reaccionar con los polímeros, degradándolos.

Entre todos estos mecanismos, los que están implicados en la degradación de los biomateriales empleados en biomedicina son la degradación mecánica, la degradación

química y la degradación enzimática. Y, concretamente en el caso de estudio de esta Tesis Doctoral, la degradación química, que puede producirse en bloque o en superficie, en función del pH. Como se observa en la Figura 73, la degradación en bloque afecta a toda la matriz polimérica, observándose una caída inmediata del peso molecular, mientras que la pérdida de masa está más retardada; sin embargo, la degradación superficial ocurre a nivel de la superficie, lo que se traduce en una pérdida de masa significativa. [147]

Degradación en bloque:



Degradación superficial:



Figura 73. Esquema de los procesos de degradación química en bloque y superficial. Modificada de [147]

Por todo ello, en este capítulo se pretende estudiar la liberación de la curcumina a través de dos sistemas de encapsulamiento (electrohilado en disolución y coaxial), desarrollados a partir de PLA, PCL, PLAPCL y PLGA; así como su relación con la degradación de dichos polímeros.

Materiales y métodos

Degradación de los materiales

El estudio de degradación se llevó a cabo tanto con las membranas poliméricas (PLA, PCL, PLAPCL y PLGA), como con los *scaffolds* (PLA, PCL y PLAPCL). Además, también se trabajó con films obtenidos por la técnica *solvent-casting* (PLA, PCL, PLAPCL y PLGA), como se ha explicado en el **Capítulo I**, que sirvieron de control.

Por un lado, se troqueló 144 muestras de cada uno de los materiales anteriores, con un diámetro de 8 mm. Se tomó tres placas multipocillos P-48 para cada una de las tres réplicas, y en cada uno de los pocillos se puso una muestra de material. Se estudió el efecto de cuatro medios de degradación diferentes: PBS, medio ácido (ácido clorhídrico - HCl 0,001 N),

medio básico (hidróxido de sodio - NaOH 0,01 N) y agua pura ultrafiltrada (agua miliQ). Los tiempos de degradación estudiados fueron 1, 2, 5, 8, 12, 16, 22, 29, 40, 54, 71, 90 días.

Por otro lado, se recortó 16 muestras de las membranas y films con las medidas adecuadas (Véase **Capítulo I**) para el ensayo mecánico de tracción con el TMA, que se dejaron en viales con los medios de degradación anteriores para ser analizadas los días 5, 29, 54 y 90.

Todas las muestras, así como los recipientes en los que se preparó los diferentes medios, se mantuvieron en una estufa a 37 °C durante todo el ensayo.

Durante el ensayo de degradación se hizo cambios de medio cada 10 días, para evitar tanto la contaminación de éste por los residuos de la degradación, como que la muestra quedara sin medio debido a la evaporación.

Determinación cuantitativa del porcentaje de masa degradada

Todas las muestras, a excepción de las que fueron preparadas para el ensayo mecánico, se pesaron antes de iniciar el ensayo de degradación. Esta masa se denomina m_0 y es la masa inicial de la muestra.

Para cada uno de los tiempos de degradación, se extrajo las muestras de las placas y se colocaron en papel especial de biología molecular para secarlas. A continuación, se puso discos de papel de filtro troquelados a 9 mm en una placa multipocillo P-48, y se colocó las muestras secas. El papel de filtro permite, por un lado, favorecer el secado de las muestras y, por otro lado, evitar que una vez secas queden pegadas a la superficie del pocillo. Finalmente, se dejaron 24 horas en el desecador a vacío para asegurar el completo secado de las muestras.

Trascurrido ese tiempo, las muestras se pesaron (m_f , masa final) y se introdujeron en eppendorfs para conservarse en una bolsa zip en el congelador a -20 °C, hasta realizar los siguientes ensayos.

Conocidas la masa final e inicial de cada una de las muestras, se calculó el porcentaje de masa degradada mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ degradación} = \frac{m_0 - m_f}{m_0} \cdot 100 \quad (25)$$

Los siguientes ensayos se realizaron únicamente para los tiempos de degradación de **5, 29, 54 y 90 días**.

Anàlisis morfològic mediante microscòpia electrònica de barrido de emisi3n de camp

Para comprobar el efecto que había tenido la degradación sobre la morfología de los materiales y cómo se había producido ésta, se observaron las muestras en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM; de sus siglas en inglés *Field Emission Scanning Electron Microscope*). El equipo empleado fue un FESEM Ultra55 de la marca ZEISS disponible en el Servicio de Microscopía de la UPV:



Figura 74. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) empleado en la caracterización morfológica de los materiales degradados. Fuente: Servicio de Microscopía de la UPV

Para ello, se dejaron previamente las muestras durante 1 h en el desecador a vacío, para asegurar su secado completo. A continuación, se dispuso las membranas y los films en los portamuestras, sobre doble cinta de carbono y se recubrieron con oro por parte del Servicio de Microscopía de la UPV.

En cuanto a los *scaffolds*, como interesa observar no sólo la superficie, sino también su estructura interna, se fragmentaron con ayuda de dos pinzas después de haber sido sumergidos brevemente en nitrógeno líquido. A continuación, se dispusieron en los portamuestras, sobre doble cinta de carbono y se recubrieron con platino por parte del Servicio de Microscopía de la UPV.

Las condiciones de trabajo del microscopio fueron: 2 kV y 5,5 mm.

Análisis mecánico

La influencia de la degradación en el comportamiento mecánico de los materiales se cuantificó a través de las medidas del módulo de elasticidad de cada material, empleando el dilatómetro TMA/SS6000 (*Seiko*) acoplado a una plataforma antivibratoria MOD-1 M plus (*Halcyonics*), siguiendo la norma **UNE-EN ISO 527-1:2020**.

Para ello se midió, en primer lugar, las dimensiones de las probetas. Con ayuda de un pie de rey se determinó el ancho, y con el medidor de espesores MiniTest 3100 (*ElektroPhysik*) se determinó el espesor de cada muestra.

Del mismo modo que se llevó a cabo este ensayo en el **Capítulo I** (con membranas y films), se aplicó una rampa de tensión de 0 a 5884 mN, a una velocidad de 100 mN/min, para el caso de las membranas y los films, y una rampa de compresión de 0 a -5884 mN, a una velocidad de 100 mN/min, para los *scaffolds*.

El ensayo se realizó, además, a temperatura ambiente.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para poder determinar cómo varía la cristalinidad y las propiedades térmicas de los materiales durante el proceso de degradación, se llevó a cabo un ensayo de calorimetría diferencial de barrido.

A fin de poder comparar los resultados con las muestras sin degradar, las condiciones del ensayo fueron las mismas que las establecidas en el **Capítulo I**, en el que se realizó dos barridos de -80 a 200 °C, el primero de ellos para eliminar la memoria térmica del material.

Cromatografía por permeación de gel (GPC)

Durante el proceso de degradación, las cadenas poliméricas van escindiéndose y, consecuentemente, su peso molecular disminuye. Así pues, estudiar esta variación en el peso molecular permite estudiar más ampliamente la degradación de los materiales.

Mediante la técnica de cromatografía de exclusión por tamaño, más conocida como cromatografía por permeación de gel (GPC, del inglés *gel permeation chromatography*), es posible estudiar el peso molecular y distribución de los polímeros. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es sólida y se encuentra en una columna, mientras que la fase móvil es líquida.

El relleno de la columna se comporta como un filtro, distinguiendo tres tipos de moléculas:

- i) moléculas permeables: pequeñas moléculas que entran en el relleno poroso y quedan retenidas en él.
- ii) moléculas fraccionables: moléculas intermedias que entran de manera parcial en el relleno poroso.
- iii) moléculas excluidas: moléculas de medida superior al poro del relleno que no entran en él y pasan rápidamente.

Así pues, en los cromatogramas los picos iniciales se corresponderán con moléculas de mayor tamaño, y las moléculas más pequeñas darán lugar a los picos finales. Este tamaño está relacionado con el peso molecular, por lo que el tiempo de elución de un determinado pico proporciona una idea aproximada de su peso molecular, aunque debe tenerse en cuenta otros factores, como la forma o linealidad de la molécula. De este modo, para cuantificar el peso molecular será necesario emplear curvas de calibrado.

Sin embargo, dado que no disponemos de las constantes de Mark-Houwink-Sakurada de nuestros sistemas estudiados, el análisis se hará cualitativamente, estudiando los cromatogramas y viendo la evolución del tiempo de elución con el tiempo de degradación de los materiales.

Para llevar a cabo este estudio cualitativo, se disolvió 3 mg de cada muestra en tetrahidrofurano (THF; grado HPLC, $\geq 99,9\%$; *Sigma Aldrich*) y se dejó 24 h en vaivén para asegurar la completa disolución. Transcurrido este tiempo se filtraron las muestras en viales específicos para el GPC, que se introdujeron en el equipo. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

Volumen de inyección: 50 μ l

Flujo de THF: 1 ml/min

T^a : 30 °C

Obtención de un sistema polímero-fármaco para la liberación controlada

El principio activo que se empleó para el estudio de liberación fue la curcumina, que se introdujo en las membranas electrohiladas empleando dos métodos diferentes; por un lado, el electrohilado en disolución, y por otro lado, el electrohilado coaxial.

Electrohilado en disolución

Como se ha comentado en la introducción, este método consiste en introducir el principio activo directamente en la disolución polimérica y electrohilar.

Así pues, se prepararon las disoluciones poliméricas con un 10% m/m_{polímero} de curcumina. Para ello, se añadió la masa correspondiente de cada polímero y de curcumina en diferentes viales y, posteriormente, se añadió el disolvente, o disolventes, necesarios.

Las disoluciones se dejaron en agitación durante toda la noche y, posteriormente, se electrohilaron, empleando las condiciones del proceso que fueron optimizadas en el electrohilado de los polímeros (**Capítulo I**). Una vez, obtenidas las membranas cargadas con curcumina, se dejaron en un campana de extracción 24h para asegurar la completa evaporación del disolvente y, a continuación, se prepararon para su análisis morfológico en el SEM.

Con ello se pretendía obtener membranas cuyas fibras tuvieran el mismo diámetro que las de los polímeros, por lo que tras la observación al microscopio, se optimizaron las condiciones del proceso, cuando fue necesario, hasta obtener un diámetro de fibra de 1,8 μm .

Electrohilado coaxial

De forma previa al proceso de electrohilado coaxial, se testaron diferentes disolventes para comprobar cuál de ellos favorecía la disolución de la curcumina a la concentración correspondiente para cada uno de los polímeros manteniendo una concentración final del 10% m/m_{polímero}. Los disolventes empleados fueron: metanol, cloroformo, etanol y acetona.

Una vez seleccionado el disolvente, se preparó la disolución de curcumina para cada uno de los polímeros, y las disoluciones poliméricas (a las concentraciones seleccionadas para la obtención de membranas con un diámetro de fibra de 1,8 μm , **Capítulo I**). Se cargó una jeringa con cada una de las disoluciones, y se acoplaron a la aguja coaxial (BI-COAX-2DISP, *Linari Nanotech*). A continuación, se accionó cada una de las bombas impulsoras hasta

observar la salida del chorro de la disolución correspondiente, y se pararon para iniciar el proceso accionando la impulsión de la disolución polimérica; de este modo, una vez comenzó a eyectarse, se encendió la fuente de alto voltaje y, finalmente se accionó la bomba de impulsión de la disolución de curcumina. Así, se aseguró que el polímero quedaba formando la envoltura de las fibras, y la curcumina el núcleo.

Las condiciones del proceso de electrohilado fueron las obtenidas en la optimización de las membranas poliméricas (**Capítulo I**), aplicando el mismo flujo para la disolución polimérica y la de curcumina. Asimismo, una vez obtenidas las membranas, se dejaron 24h en una vitrina de extracción para asegurar la completa evaporación del disolvente, y se prepararon para su estudio morfológico en el FESEM, con las condiciones de trabajo de 2 kV y 5,5 mm.

Las imágenes obtenidas se analizaron empleando el programa *ImageJ* para medir los diámetros de las fibras y así optimizar las condiciones del proceso de electrohilado para obtener fibras de 1,8 μm .

Estudio de liberación de curcumina

Una vez que se tuvo los parámetros del electrohilado para ambas configuraciones, se tomó 20 mg de cada membrana (PLA, PCL, PLAPCL y PLGA) obtenidas por electrohilado en disolución y coaxial, y se dispuso cada muestra en un vial de 10 ml con 2 ml de PBS, preparado siguiendo el protocolo de AAT Bioquest, con un 0,5% de Tween 80 (*Sigma Aldrich*), dada la baja solubilidad de la curcumina en el agua.[148] Esto mismo se hizo también con las membranas electrohiladas sin curcumina (blancos). Durante el ensayo se mantuvo los viales en un baño a 37 °C con vaivén, y la disolución de PBS:Tween80 se mantuvo en la estufa a 37 °C para su posterior uso. Los días 1, 2, 4, 7, 11, 18 y 28 se extrajo 1 ml de sobrenadante, que se guardó en el congelador a -20 °C hasta su cuantificación, y se repuso con la disolución de PBS:Tween80 atemperada.

Determinación de la cantidad de curcumina liberada

Una vez finalizado el ensayo de liberación, se descongelaron las muestras de sobrenadante tomadas y se puso 100 μl de cada una en una placa multipocillos P-96. A continuación, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis (*Victor*) a una longitud de onda $\lambda = 429 \text{ nm}$, correspondiente a la curcumina. Y, a partir de una recta de calibrado, se estableció la cantidad de curcumina liberada para cada tiempo, siendo el porcentaje acumulado de curcumina liberada para los determinados tiempos:

$$\% \text{Acumulado de Cur} - \text{liberada} = \frac{\text{Cantidad de Cur} - \text{liberada}}{\text{Cantidad de Cur} - \text{inicial}} \cdot 100 \quad (26)$$

Efectividad de la encapsulación

Por último, se obtuvo también la eficacia de encapsulación de la curcumina en los diferentes sistemas, para cada polímero, como el ratio entre la cantidad de curcumina presente realmente en las membranas, determinada tras analizar la muestra final después de disolver el polímero, y la cantidad de curcumina teórica:

$$\text{Eficacia encapsulación (\%)} = \frac{\text{Cantidad Cur} - \text{real}}{\text{Cantidad Cur} - \text{teórica}} \cdot 100 \quad (27)$$

Este parámetro nos permitirá establecer, además, el método más efectivo para encapsular moléculas en las membranas poliméricas.

Resultados y discusión

Degradación de los materiales

En primer lugar, se muestran los resultados del estudio morfológico de la degradación de los materiales.

A consecuencia de la rápida degradación y la fragilidad que adquieren las membranas y los films de PLGA, únicamente se pudo analizar las muestras a los 5 días de degradación. Estos resultados se muestran en la Figura 75 y Figura 76.

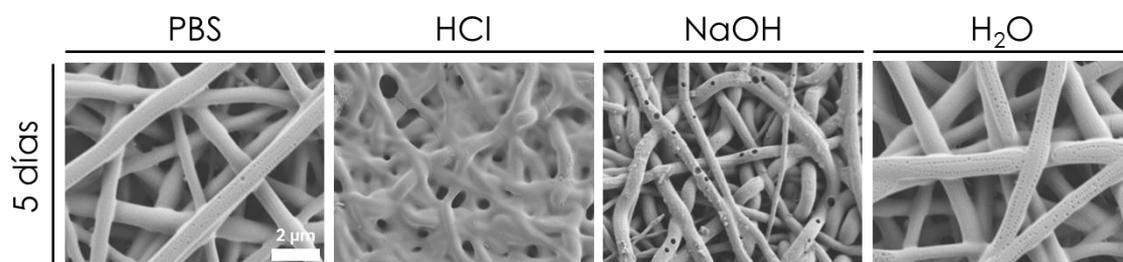


Figura 75. Estudio morfológico de las membranas ES-1,8 de PLGA después de la degradación en diferentes medios (PBS, HCl, NaOH y H₂O) tras 5 días de ensayo. Barra de escala: 2 μm

Como se puede observar en la Figura 75, a los 5 días de ensayo ya se aprecia una clara degradación en todos los medios, principalmente en medio ácido y básico. Tanto en PBS

como en H₂O se empiezan a observar poros en las fibras, que empiezan a fusionarse; mientras que en medio ácido (HCl) las fibras están casi fusionada por completo. En el caso de la degradación en medio básico (NaOH) a los 5 días de ensayo se ven grandes poros en la superficie de las fibras. Esto se corresponde con los resultados de Park *et. al* (2005), que observaron cómo el tratamiento con NaOH de *scaffolds* de PLGA daba lugar a poros debidos a la erosión superficial que producía. [149]

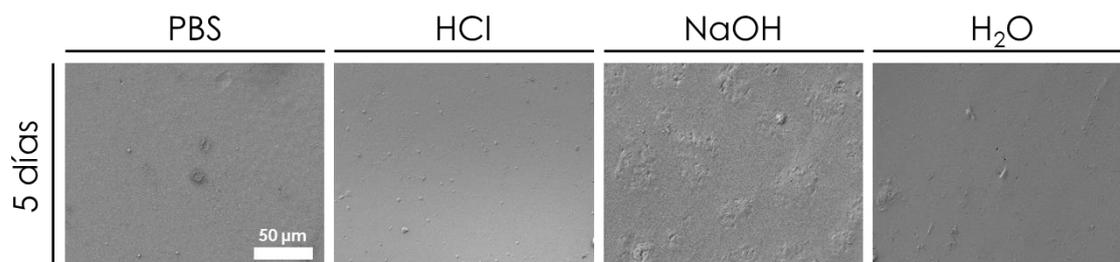


Figura 76. Estudio morfológico de los films de PLGA después de la degradación en diferentes medios (PBS, HCl, NaOH y H₂O) tras 5 días de ensayo. Barra de escala: 50 μm

En el caso de los films, sin embargo, no se aprecia la degradación a nivel morfológico en ningún medio. Sin embargo, las muestras a los 5 días ya presentaban cierta fragilidad, principalmente en medio ácido y básico.

A los 29 días, tanto los films como las membranas pierden su forma (Figura 77) y adquieren una consistencia similar a la cera, que pasa a endurecerse al sacarlo del medio de degradación.

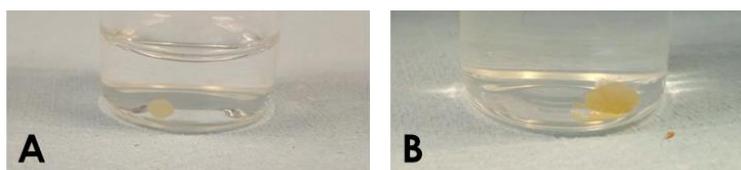


Figura 77. Aspecto de (A) la membrana y (B) el film de PLGA en el medio de degradación ácido (HCl 0,001N) tras 29 días de ensayo.

A nivel microscópico, se estudió una pequeña muestra de la membrana ES-1,8 de PLGA tras 29 días de ensayo en medio básico (NaOH 0,01N), tras endurecerse al sacarla del medio de degradación:

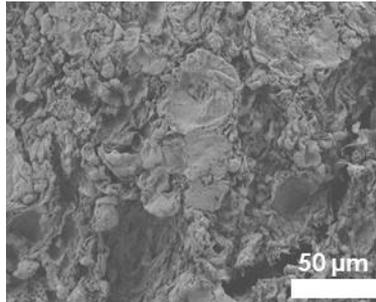


Figura 78. Estudio morfológico de la membrana ES-1,8 de PLGA después de la degradación en NaOH 0,01N tras 29 días de ensayo. Barra de escala: 50 μm

En ella se puede ver que las fibras han desaparecido por completo, presentando una rápida degradación.

Dado que los homopolímeros se degradan más lentamente, se ha podido llevar a cabo el estudio morfológico mediante el FESEM de las membranas ES-1,8 de PLA, PCL y PLAPCL (Figura 79 - Figura 81), films de PLA, PCL y PLAPCL (Figura 82 - Figura 84) y *scaffolds* de PLA, PCL y PLAPCL (Figura 85 - Figura 87).

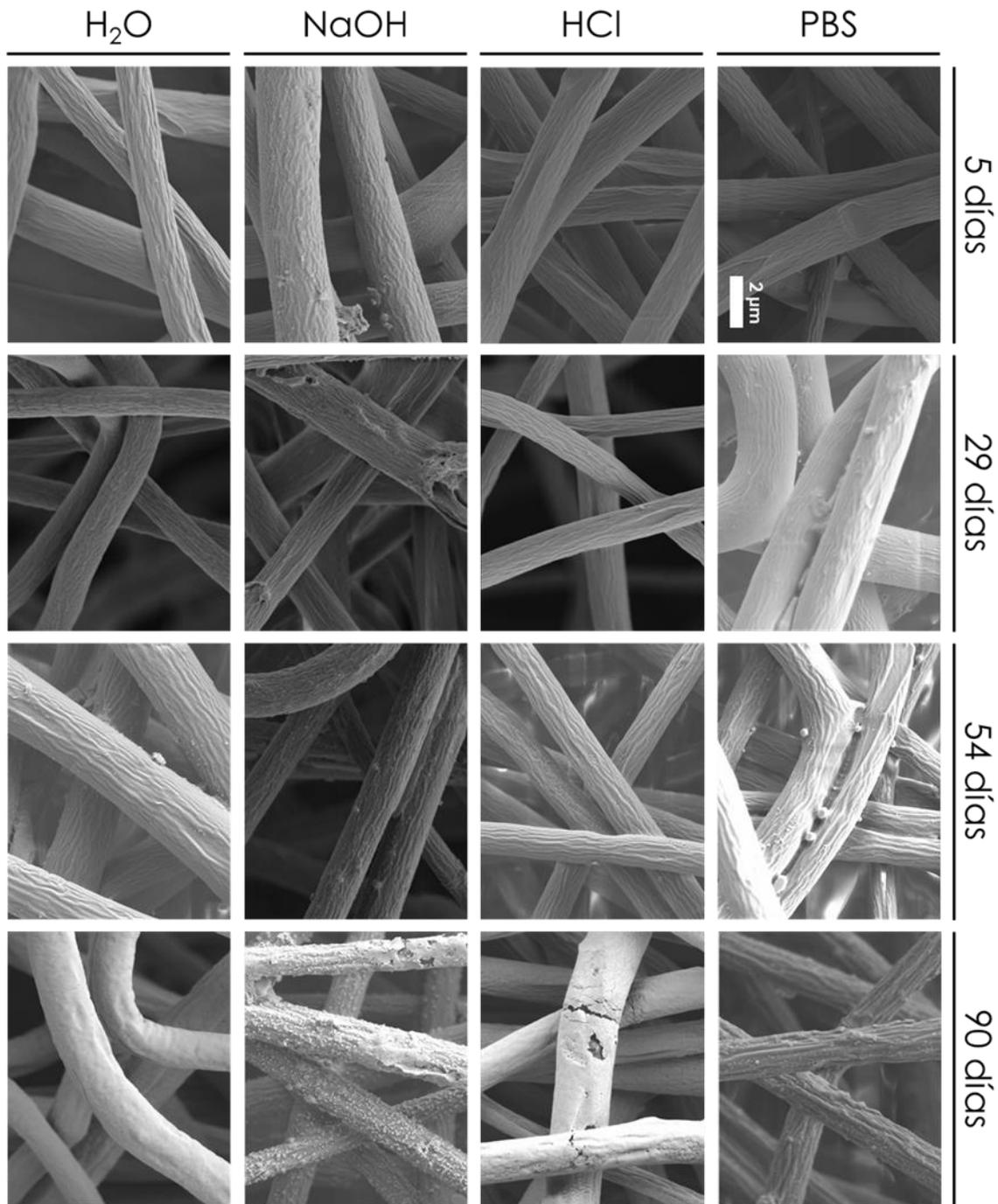


Figura 79. Estudio morfológico de las membranas ES-1,8 de PLA después de la degradación en diferentes medios (PBS, HCl, NaOH y H₂O) tras 5, 29, 54 y 90 días de ensayo. Barra de escala: 2 μm

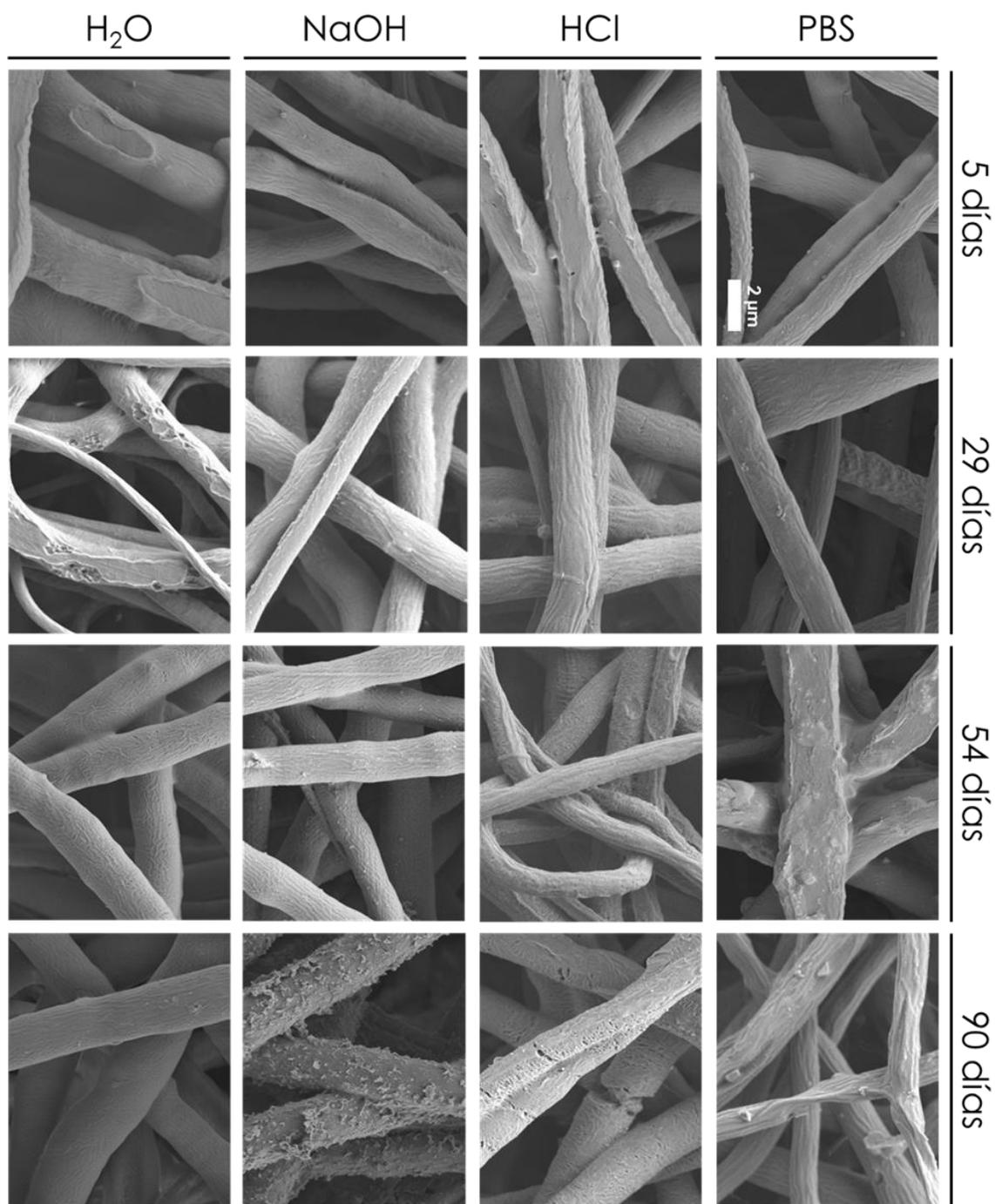


Figura 80. Estudio morfológico de las membranas ES-1,8 de PCL después de la degradación en diferentes medios (PBS, HCl, NaOH y H₂O) tras 5, 29, 54 y 90 días de ensayo. Barra de escala: 2 μm

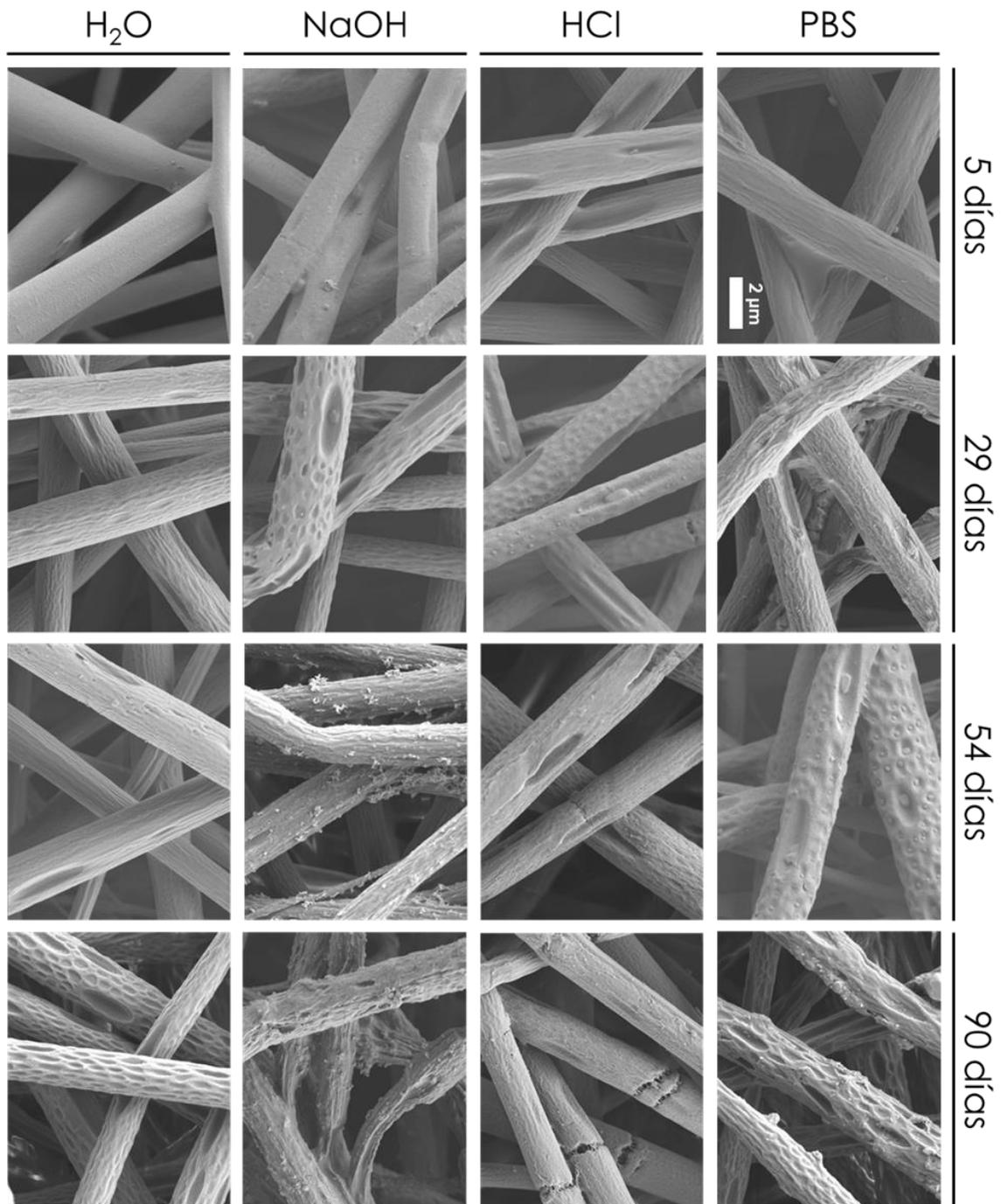


Figura 81. Estudio morfológico de las membranas ES-1,8 de PLAPCL después de la degradación en diferentes medios (PBS, HCl, NaOH y H₂O) tras 5, 29, 54 y 90 días de ensayo. Barra de escala: 2 μm

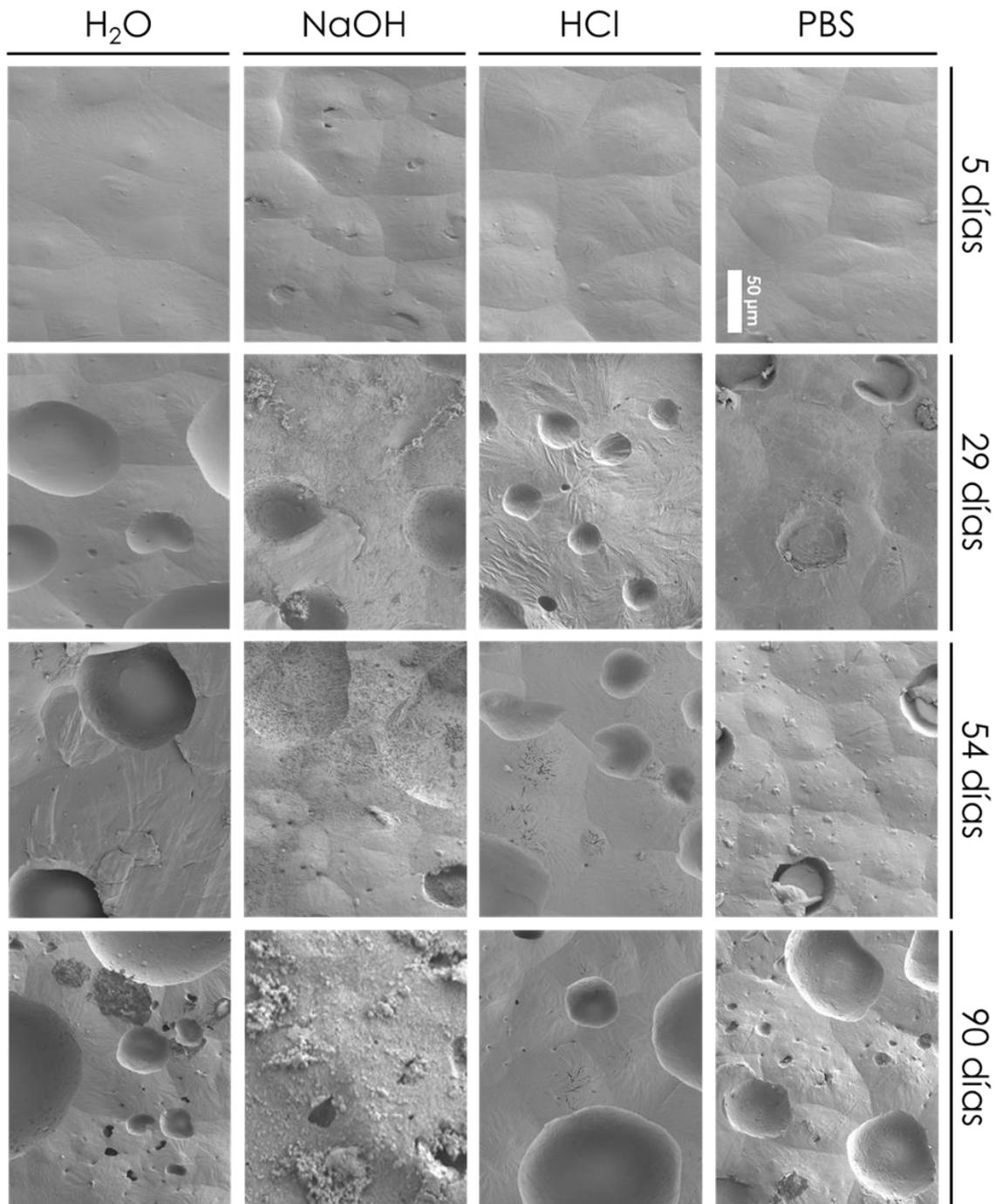


Figura 82. Estudio morfológico de los films de PLA después de la degradación en diferentes medios (PBS, HCl, NaOH y H₂O) tras 5, 29, 54 y 90 días de ensayo. Barra de escala: 50 μm

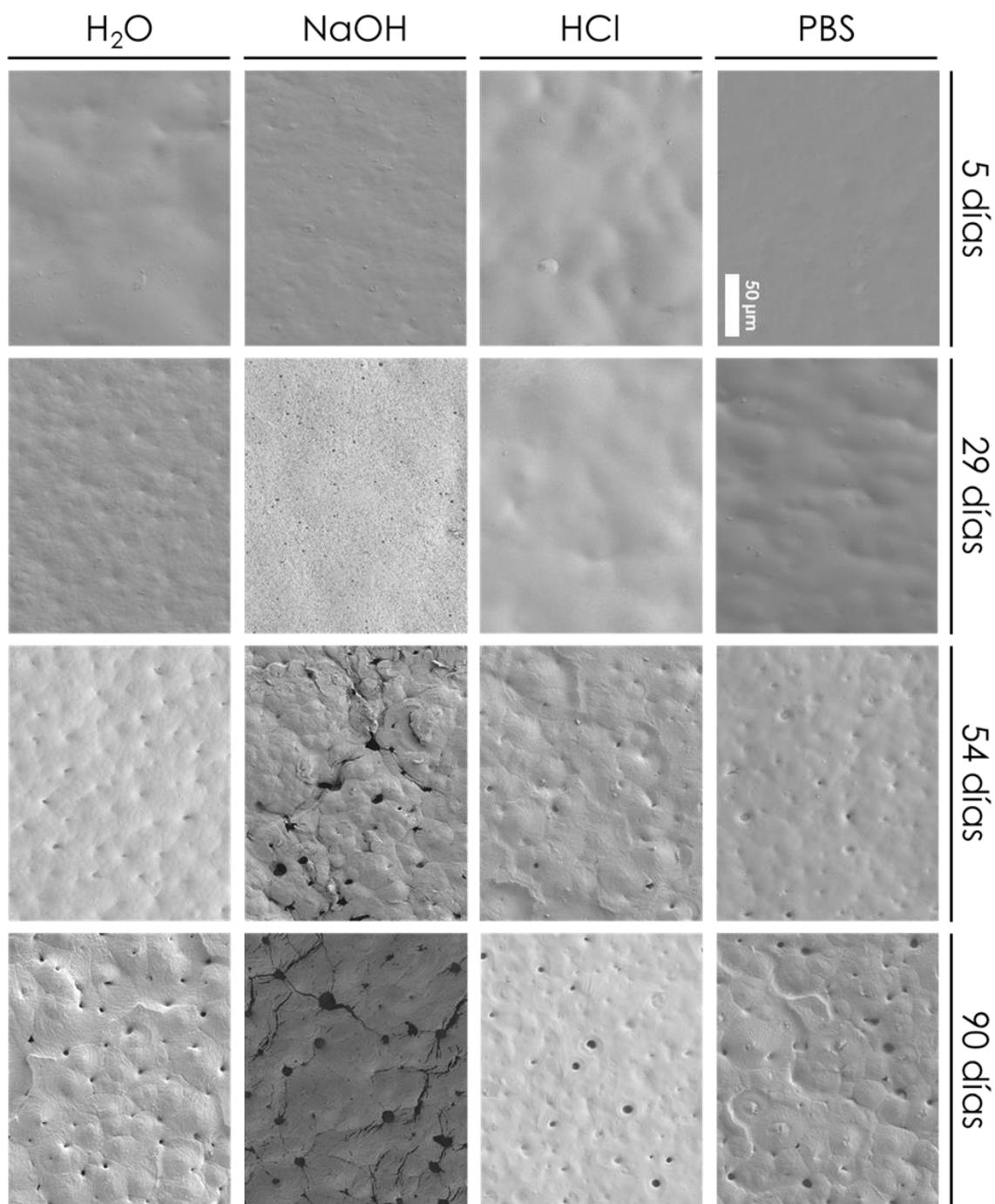


Figura 83. Estudio morfológico de los films de PCL después de la degradación en diferentes medios (PBS, HCl, NaOH y H₂O) tras 5, 29, 54 y 90 días de ensayo. Barra de escala: 50 μm

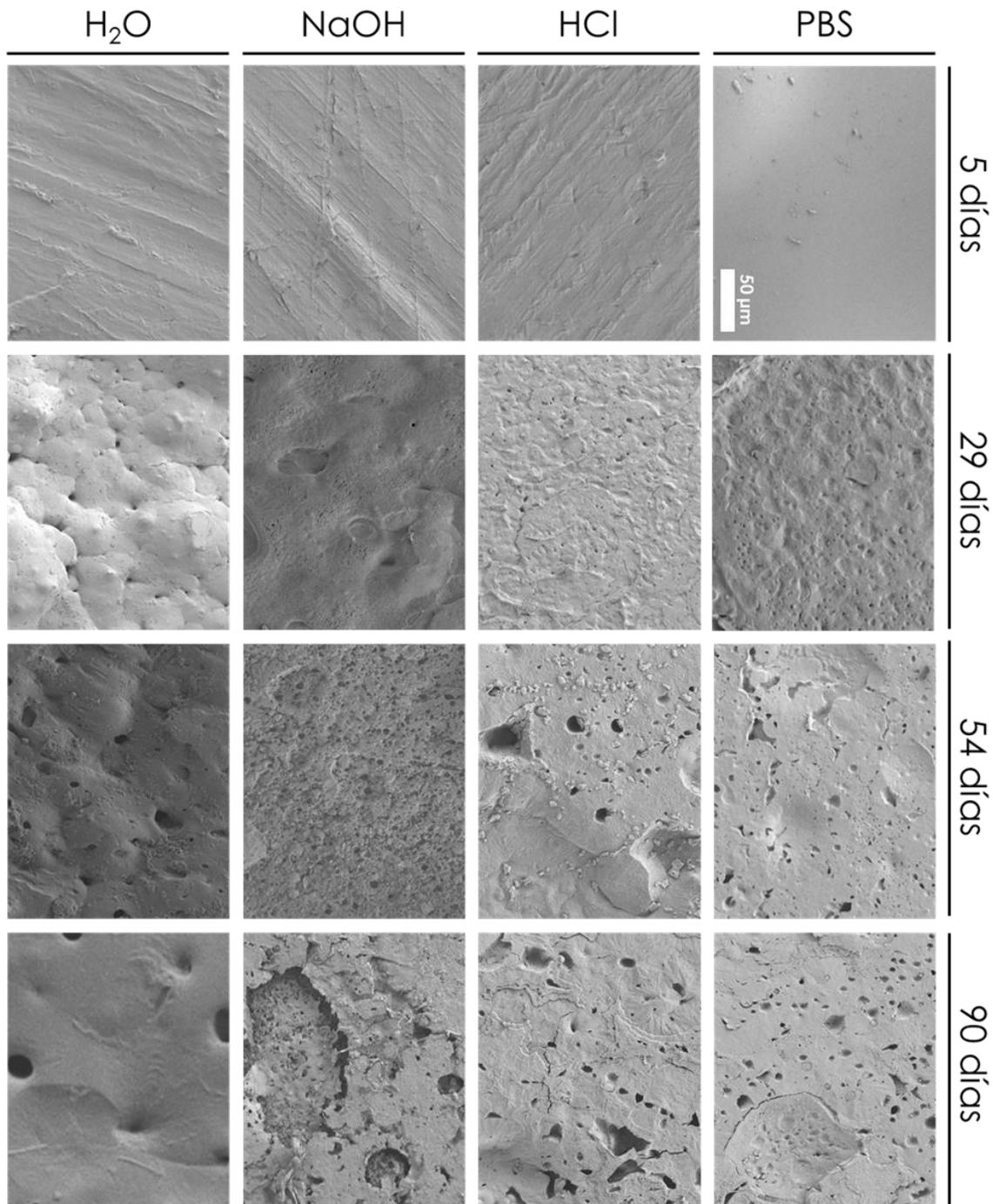


Figura 84. Estudio morfológico de los films de PLAPCL después de la degradación en diferentes medios (PBS, HCl, NaOH y H₂O) tras 5, 29, 54 y 90 días de ensayo. Barra de escala: 50 μm

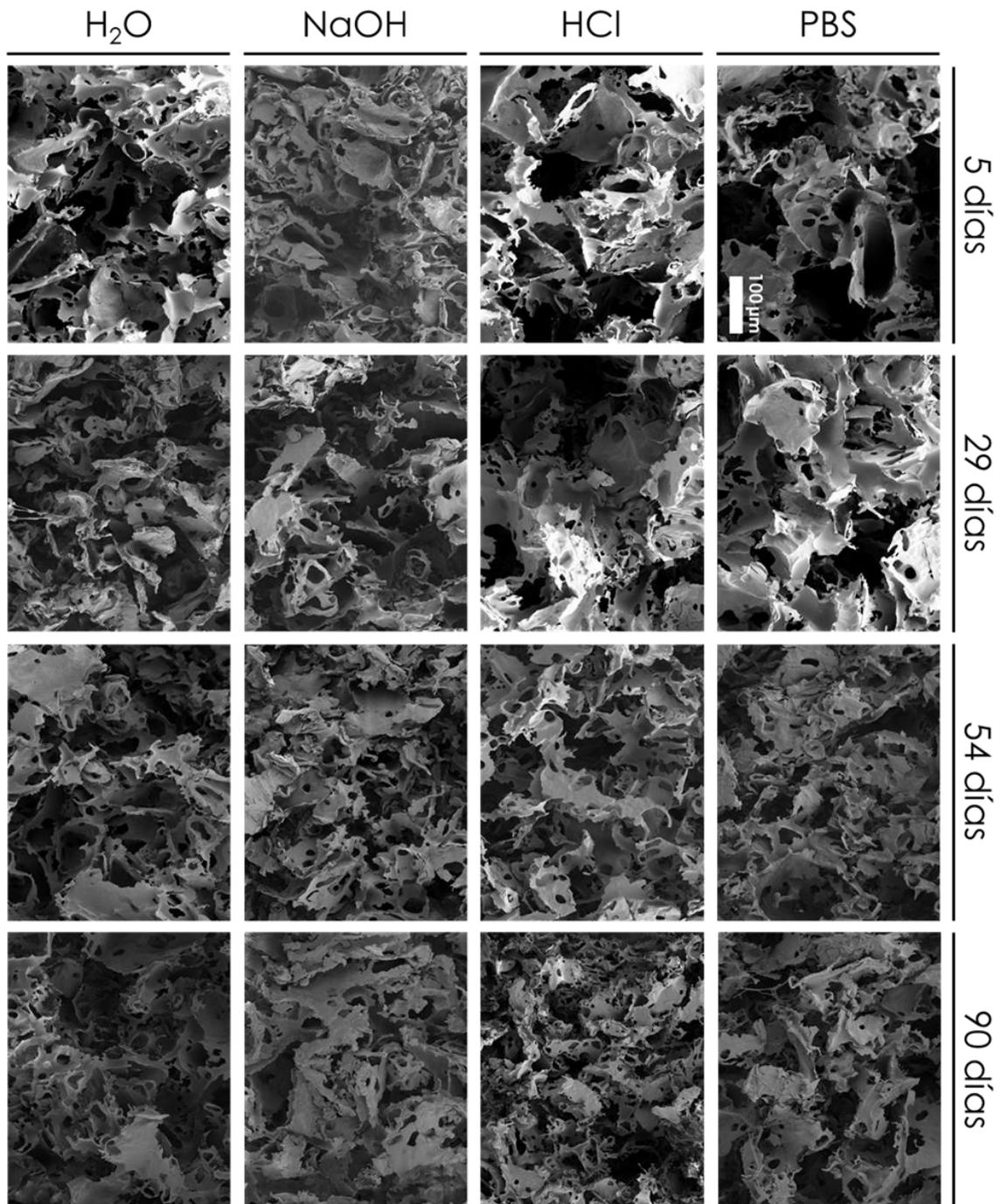


Figura 85. Estudio morfológico de los *scaffolds* de PLA después de la degradación en diferentes medios (PBS, HCl, NaOH y H₂O) tras 5, 29, 54 y 90 días de ensayo. Barra de escala: 100 μ m

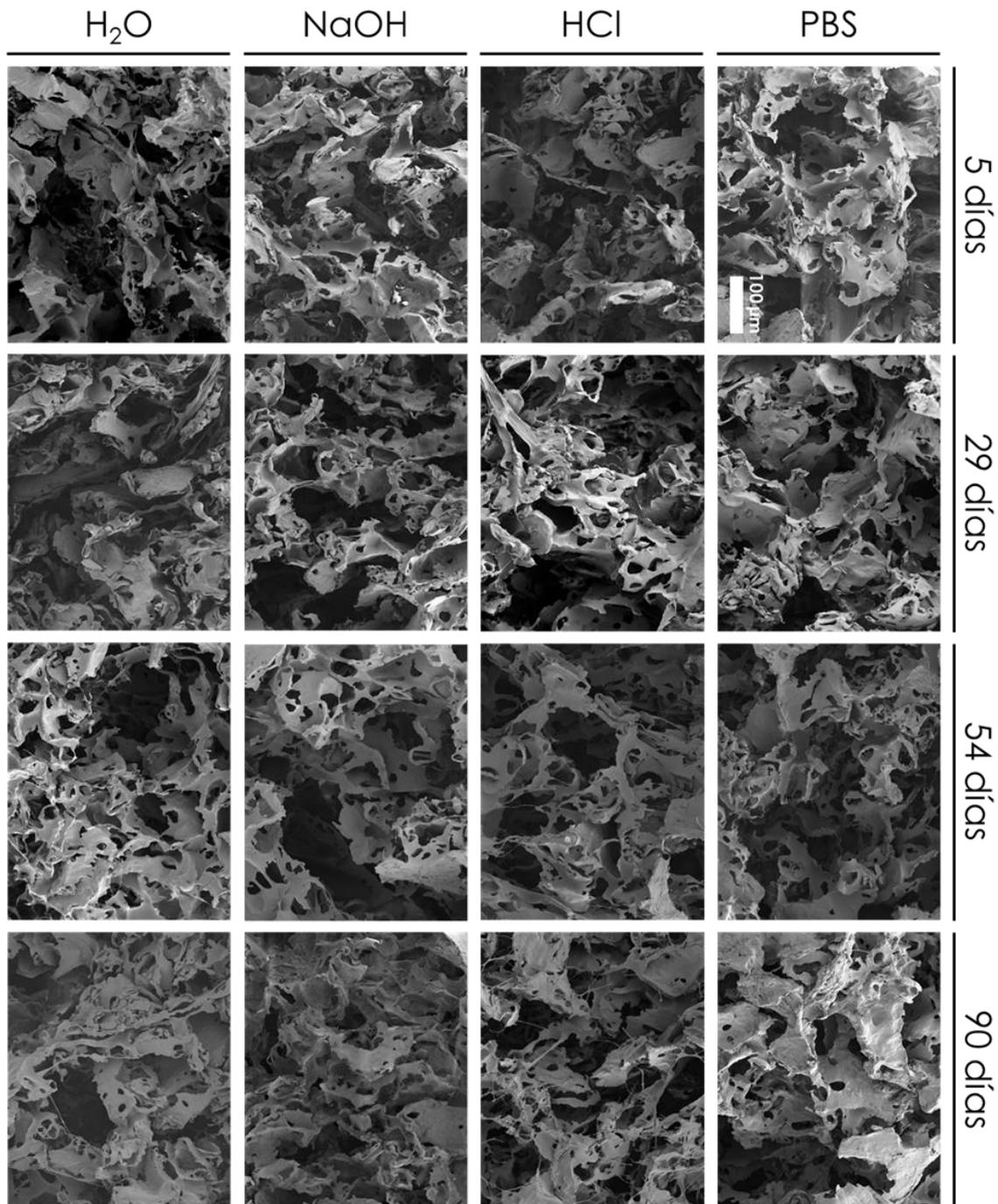


Figura 86. Estudio morfológico de los *scaffolds* de PCL después de la degradación en diferentes medios (PBS, HCl, NaOH y H₂O) tras 5, 29, 54 y 90 días de ensayo. Barra de escala: 100 µm

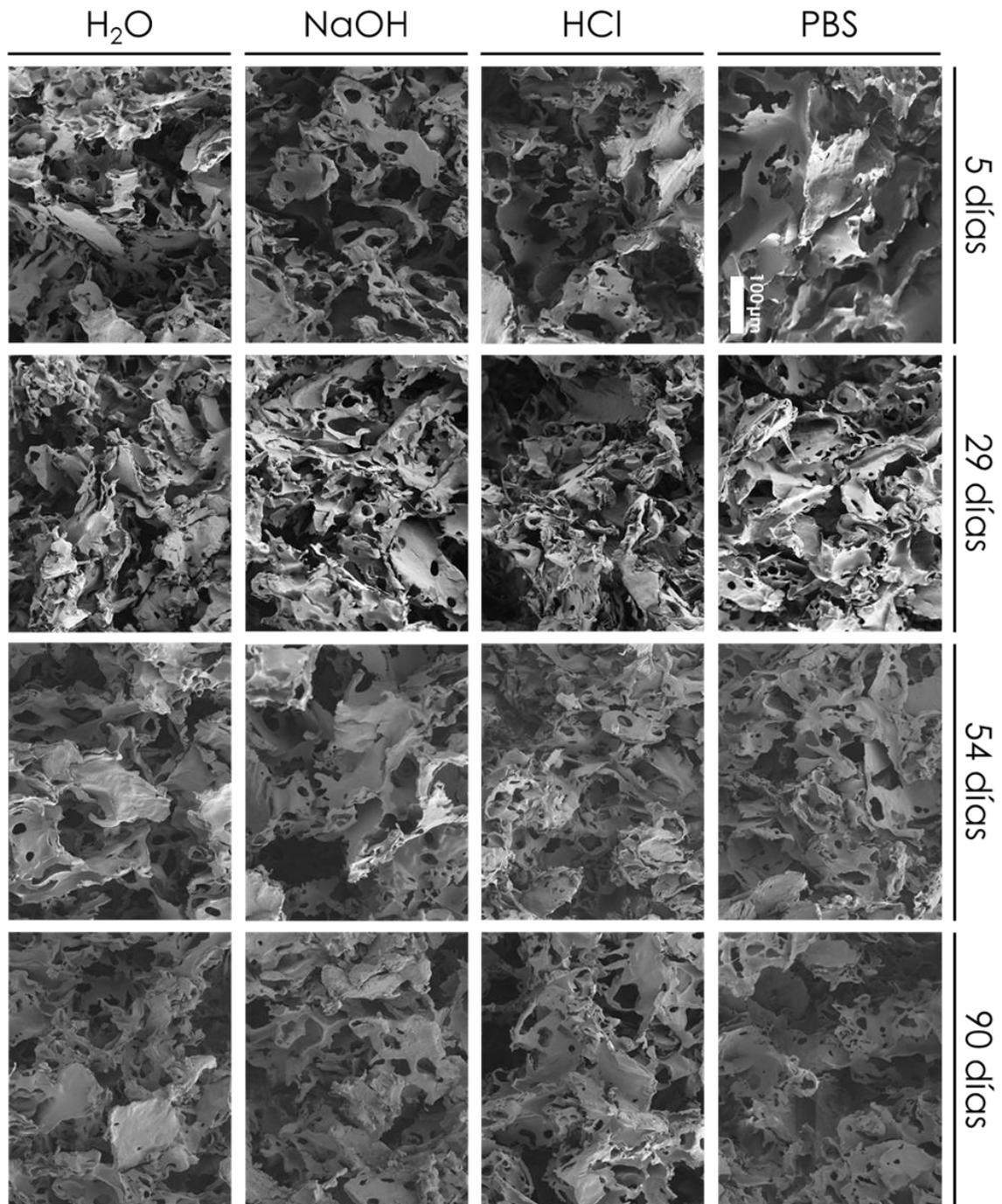


Figura 87. Estudio morfológico de los *scaffolds* de PLAPCL después de la degradación en diferentes medios (PBS, HCl, NaOH y H₂O) tras 5, 29, 54 y 90 días de ensayo. Barra de escala: 100 µm

Para un mejor análisis de estos resultados, se presenta a continuación las gráficas del porcentaje de pérdida de masa (%) respecto del tiempo (Figura 88 - Figura 90) de las membranas, los films y los *scaffolds*, para cada uno de los materiales, en los diferentes medios de degradación (PBS, HCl 0,001 N, NaOH 0,01 N y H₂O).

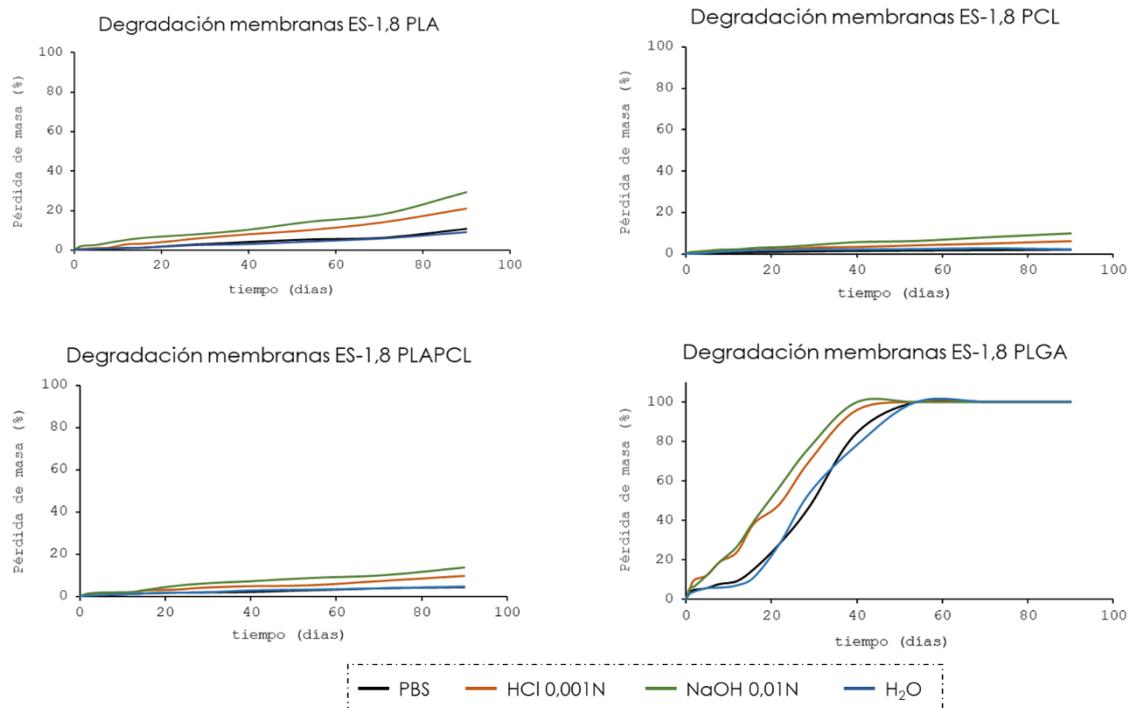


Figura 88. Pérdida de masa (%) de las membranas ES-1,8 de PLA, PCL, PLAPCL y PLGA en diferentes medios (PBS, HCl 0,001 N, NaOH 0,01 N y H₂O).

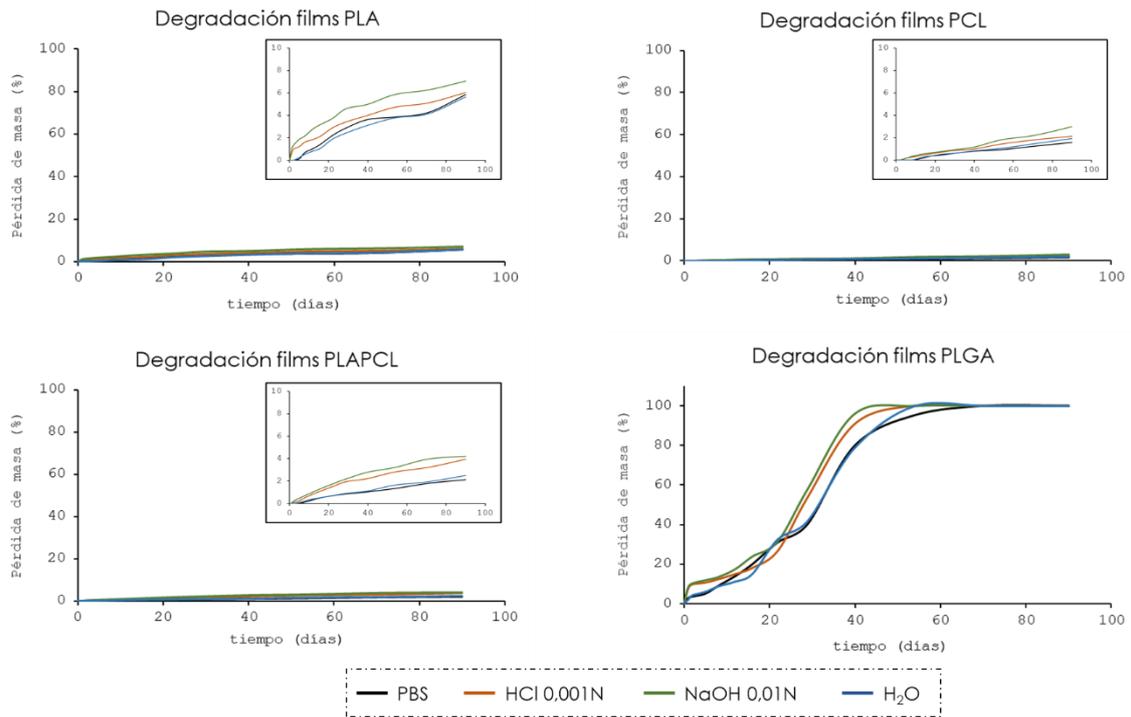


Figura 89. Pérdida de masa (%) de los films de PLA, PCL, PLAPCL y PLGA en diferentes medios (PBS, HCl 0,001 N, NaOH 0,01 N y H₂O). Para los homopolímeros se ha hecho una ampliación.

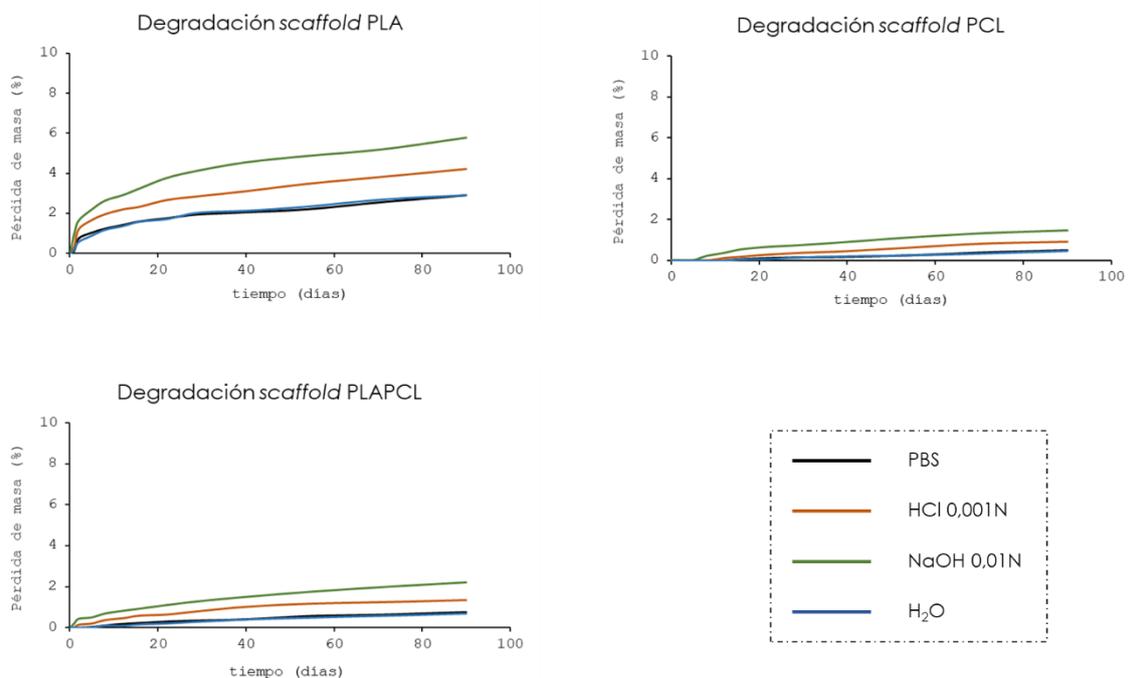


Figura 90. Pérdida de masa (%) de los *scaffolds* de PLA, PCL y PLAPCL en diferentes medios (PBS, HCl 0,001 N, NaOH 0,01 N y H₂O).

Las imágenes de FESEM muestran evidencias del proceso de degradación de forma acusada a partir de los 54 días de ensayo. Además, se observa un comportamiento diferente al resto en el caso de la degradación en medio básico, adquiriendo la superficie de los materiales una elevada rugosidad. Esto se debe a que el NaOH provoca la hidrólisis de los poliésteres. [149]

Este comportamiento diferenciado también se observa en las gráficas, en las que se tiene una mayor degradación de los materiales en medio básico. Además, en medio ácido también se acelera la degradación, aunque es más lenta que en NaOH 0,01 N. Estos resultados están en concordancia con los presentados por Jung *et. al* (2006), según los cuales la degradación de la PLA y la PCL es más rápida en medio básico que en medio ácido.[150] Ambos medios catalizan el proceso de degradación, observando una menor degradación en medio acuoso, tanto en PBS como en H₂O.

Efecto de la degradación en las propiedades fisicoquímicas

Para estudiar el efecto de la degradación en las propiedades fisicoquímicas se estudió, por un lado, la cristalinidad de las muestras, y, por otro lado, su peso molecular.

Respecto a la cristalinidad, esta se midió por medio del DSC, siendo los resultados los que se muestran en las tablas siguientes:

Tabla 13. Cristalinidad (%) de las membranas ES-1,8 de PLA, PLAPCL, PCL y PLGA tras 5, 29, 54 y 90 días de degradación en diferentes medios.

Membranas ES-1,8					
tiempos ensayo		T5	T29	T54	T90
PLA	PBS	18,1	18,9	21,5	25,6
	HCl	19,2	21,7	28,9	32,4
	NaOH	17,0	19,4	29,1	35,6
	H ₂ O	17,6	18,4	22,0	24,9
PLAPCL	PBS	46,5	47,2	49,1	49,9
	HCl	47,3	48,8	52,1	56,0
	NaOH	48,1	50,3	53,9	56,1
	H ₂ O	46,6	47,3	47,6	48,5
PCL	PBS	53,8	54,2	54,9	56,5
	HCl	55,5	58,4	69,1	72,2
	NaOH	56,1	60,8	70,3	72,1
	H ₂ O	54,0	54,3	55,1	55,9
PLGA	PBS	3,1			
	HCl	5,4	*debido a su rápida degradación, no se tuvo muestra suficiente para realizar este ensayo a estos tiempos		
	NaOH	6,2			
	H ₂ O	2,9			

Tabla 14. Cristalinidad (%) de los films de PLA, PLAPCL, PCL y PLGA tras 5, 29, 54 y 90 días de degradación en diferentes medios.

		Films			
tiempos ensayo		T5	T29	T54	T90
PLA	PBS	14,8	15,4	16,1	16,9
	HCl	16,2	17,1	19,1	20,4
	NaOH	16,3	17,4	20,0	21,5
	H ₂ O	13,9	15,7	16,7	17,0
PLAPCL	PBS	40,5	40,9	42,6	43,8
	HCl	42,8	44,9	45,8	47,1
	NaOH	43,3	44,8	46,3	49,5
	H ₂ O	40,7	41,9	43,2	44,4
PCL	PBS	49,8	52,4	54,3	56,9
	HCl	53,5	55,0	57,2	60,1
	NaOH	54,9	57,2	59,4	62,8
	H ₂ O	50,1	52,0	54,4	56,3
PLGA	PBS	1,8			
	HCl	3,9			
	NaOH	4,6			
	H ₂ O	1,7			

**debido a su rápida degradación, no se tuvo muestra suficiente para realizar este ensayo a estos tiempos*

Tabla 15. Cristalinidad (%) de los *scaffolds* de PLA, PLAPCL y PCL tras 5, 29, 54 y 90 días de degradación en diferentes medios.

		Scaffolds			
tiempos ensayo		T5	T29	T54	T90
PLA	PBS	13,0	14,2	14,8	15,1
	HCl	15,2	16,3	17,2	18,4
	NaOH	15,8	16,9	18,0	19,7
	H ₂ O	13,4	13,9	14,6	15,5
PLAPCL	PBS	38,9	39,4	40,5	41,1
	HCl	42,1	43,1	45,8	46,7
	NaOH	42,8	44,2	45,5	46,6
	H ₂ O	39,4	40,1	40,9	41,4
PCL	PBS	46,5	47,0	47,7	48,1
	HCl	48,9	49,5	50,9	52,4
	NaOH	48,3	50,1	51,3	53,2
	H ₂ O	45,9	46,2	47,0	47,9

Como se puede ver en los resultados anteriores, la cristalinidad aumenta con el tiempo de degradación, debido a que la degradación de los polímeros tiene lugar inicialmente en la fase

amorfa de los polímeros semicristalinos. En el caso del PLGA, la degradación induce inicialmente la cristalización en el tiempo estudiado.

En cuanto al peso molecular, se realizó un estudio cualitativo empleando el GPC, debido a que no era posible obtener con el equipo disponible los parámetros de Mark-Houwink-Sakurada. Por ello, se indican en las tablas siguientes, los tiempos de elución de cada muestra, siendo estos inversamente proporcionales al peso molecular.

Tabla 16. Tiempos de elución (min) de las membranas ES-1,8 del PLA, PCL, PLAPCL y PLGA tras 5, 29, 54 y 90 días de degradación en diferentes medios.

Membranas ES-1,8					
tiempos ensayo		T5	T29	T54	T90
PLA	<i>PBS</i>	26,07	26,21	26,28	26,33
	<i>HCl</i>	26,17	27,05	27,82	28,97
blanco 26,22	<i>NaOH</i>	27,02	28,62	29,12	29,98
	<i>H₂O</i>	26,12	26,17	26,53	27,13
PLAPCL	<i>PBS</i>	26,13	26,47	26,85	26,88
	<i>HCl</i>	26,13	26,52	27,25	27,38
blanco 26,23	<i>NaOH</i>	27,18	28,53	28,78	29,47
	<i>H₂O</i>	26,68	26,70	27,28	27,28
PCL	<i>PBS</i>	26,23	26,45	26,53	26,65
	<i>HCl</i>	26,40	26,53	26,62	26,78
blanco 26,07	<i>NaOH</i>	26,47	26,57	26,70	26,88
	<i>H₂O</i>	26,25	26,48	26,52	26,72
PLGA	<i>PBS</i>	28,85			
	<i>HCl</i>	29,43			
blanco 28,48	<i>NaOH</i>	29,67			
	<i>H₂O</i>	28,97			

**debido a su rápida degradación, no se tuvo muestra suficiente para realizar este ensayo a estos tiempos*

Tabla 17. Tiempos de elución (min) de los films del PLA, PCL, PLAPCL y PLGA tras 5, 29, 54 y 90 días de degradación en diferentes medios.

Films					
tiempos ensayo		T5	T29	T54	T90
PLA	PBS	26,22	26,30	26,35	26,47
	HCl	26,47	26,93	27,52	28,28
blanco 26,22	NaOH	26,72	27,17	28,05	28,82
	H ₂ O	26,25	26,25	26,47	26,57
PLAPCL	PBS	26,30	26,42	26,67	26,88
	HCl	26,68	26,93	27,18	27,22
blanco 26,23	NaOH	27,32	28,00	28,65	29,03
	H ₂ O	26,27	26,38	26,67	27,37
PCL	PBS	26,17	26,23	26,42	26,50
	HCl	26,30	26,48	26,58	26,82
blanco 26,07	NaOH	26,33	26,52	26,67	26,87
	H ₂ O	26,07	26,17	26,25	26,47
PLGA	PBS	29,02			
	HCl	29,65			
blanco 28,48	NaOH	29,70			
	H ₂ O	29,13			

*debido a su rápida degradación, no se tuvo muestra suficiente para realizar este ensayo a estos tiempos

Tabla 18. Tiempos de elución (min) de los *scaffolds* del PLA, PCL y PLAPCL tras 5, 29, 54 y 90 días de degradación en diferentes medios.

Scaffolds					
tiempos ensayo		T5	T29	T54	T90
PLA	PBS	26,38	26,45	26,47	26,58
	HCl	26,42	26,63	26,77	26,83
blanco 26,22	NaOH	26,45	26,77	26,82	27,10
	H ₂ O	26,28	26,38	26,42	26,63
PLAPCL	PBS	26,25	26,32	26,37	26,42
	HCl	26,28	26,33	26,43	26,58
blanco 26,23	NaOH	26,32	26,45	26,62	26,83
	H ₂ O	26,23	26,28	26,33	26,43
PCL	PBS	26,15	26,20	26,23	26,30
	HCl	26,10	26,25	26,38	26,48
blanco 26,07	NaOH	26,23	26,32	26,48	26,48
	H ₂ O	26,13	26,17	26,25	26,33

Como se observa en los resultados anteriores, conforme se incrementa el tiempo de degradación, el tiempo de elución de las disoluciones analizadas en el GPC aumenta; por

tanto, la degradación produce una pérdida de peso molecular en los materiales. Esta pérdida es mayor en medio básico, así como para el PLA.

Los resultados de este ensayo concuerdan con la pérdida de masa observada en las muestras, siendo mayor para las membranas, luego films y finalmente *scaffolds*, en los que no se observa diferencias notables en los tiempos de elución, ni en medio ácido ni básico que actúan de catalizadores del proceso.

Efecto de la degradación en las propiedades mecánicas

A continuación se presentan los resultados del módulo elástico (E) a tracción para films y membranas ES-1,8 de PLA, PLAPCL, PCL y PLGA, así como el módulo elástico (E) a compresión para *scaffolds* de PLA, PLAPCL y PCL, tras 5, 29, 54 y 90 días de degradación de los materiales en diferentes medios.

Tabla 19. Módulo elástico (E) a tracción en MPa de las membranas ES-1,8 de PLA, PLAPCL, PCL y PLGA tras 5, 29, 54 y 90 días de degradación.

Membranas ES-1,8					
tiempos ensayo		T5	T29	T54	T90
PLA	<i>PBS</i>	4,15	9,11	12,57	23,92
	<i>HCl</i>	7,82	13,24	19,95	31,09
	<i>NaOH</i>	18,56	26,31	28,56	53,84
	<i>H₂O</i>	5,23	8,48	17,32	19,46
PLAPCL	<i>PBS</i>	27,04	50,91	64,81	118,27
	<i>HCl</i>	44,23	61,00	94,33	198,04
	<i>NaOH</i>	37,94	58,05	128,75	312,95
	<i>H₂O</i>	35,81	48,15	69,66	119,46
PCL	<i>PBS</i>	18,15	25,31	29,63	38,55
	<i>HCl</i>	26,04	32,88	40,23	53,90
	<i>NaOH</i>	26,91	34,01	30,78	68,29
	<i>H₂O</i>	17,56	24,78	27,06	34,34
PLGA	<i>PBS</i>	68,14			
	<i>HCl</i>	195,96	*debido a su rápida degradación, no se tuvo muestra suficiente para realizar este ensayo a estos tiempos		
	<i>NaOH</i>	248,89			
	<i>H₂O</i>	75,30			

Tabla 20. Módulo elástico (E) a tracción en MPa de los films de PLA, PLAPCL, PCL y PLGA tras 5, 29, 54 y 90 días de degradación.

Films					
tiempos ensayo		T5	T29	T54	T90
PLA	PBS	151,30	585,84	752,43	1.100,21
	HCl	197,31	659,02	950,58	1.499,11
	NaOH	202,86	620,48	1.202,97	1.954,86
	H ₂ O	129,48	321,15	682,42	1.242,55
PLAPCL	PBS	30,24	63,15	299,03	457,10
	HCl	49,33	181,23	304,12	588,77
	NaOH	64,48	175,75	319,48	627,30
	H ₂ O	43,20	102,47	294,87	356,35
PCL	PBS	81,26	134,95	187,22	290,70
	HCl	98,28	254,13	281,13	539,49
	NaOH	95,91	299,26	272,43	592,55
	H ₂ O	90,52	158,32	236,03	298,65
PLGA	PBS	42,39			
	HCl	288,46	<i>*debido a su rápida degradación, no se tuvo muestra suficiente para realizar este ensayo a estos tiempos</i>		
	NaOH	352,72			
	H ₂ O	48,15			

Tabla 21. Módulo elástico (E) a compresión en MPa de los *scaffolds* de PLA, PLAPCL y PCL tras 5, 29, 54 y 90 días de degradación.

Scaffolds					
tiempos ensayo		T5	T29	T54	T90
PLA	PBS	0,93	1,08	1,10	1,46
	HCl	1,11	1,09	1,19	1,71
	NaOH	1,02	1,18	1,50	1,50
	H ₂ O	0,90	1,03	1,12	1,10
PLAPCL	PBS	0,80	0,96	1,28	1,31
	HCl	1,08	1,02	1,47	1,52
	NaOH	1,00	1,09	1,51	1,55
	H ₂ O	0,79	0,92	1,19	1,29
PCL	PBS	0,65	0,70	0,73	0,79
	HCl	0,67	0,77	0,90	1,09
	NaOH	0,72	0,86	0,93	1,15
	H ₂ O	0,65	0,68	0,67	0,84

Los resultados anteriores muestran un aumento en general del módulo elástico con el tiempo de degradación. Esto se debe a que, como se ha visto, la degradación produce un aumento de la cristalinidad de las muestras, lo que se traduce en un mayor módulo elástico.

En el caso de los *scaffolds* el módulo elástico (E) a compresión se mantiene prácticamente constante con el tiempo de degradación

Liberación de curcumina a través de las membranas

En la Figura 91 se han representado las curvas del % de curcumina liberado al medio (PBS + Tween80) durante los 30 días de ensayo para las membranas obtenidas mediante electrohilado en disolución y electrohilado coaxial.

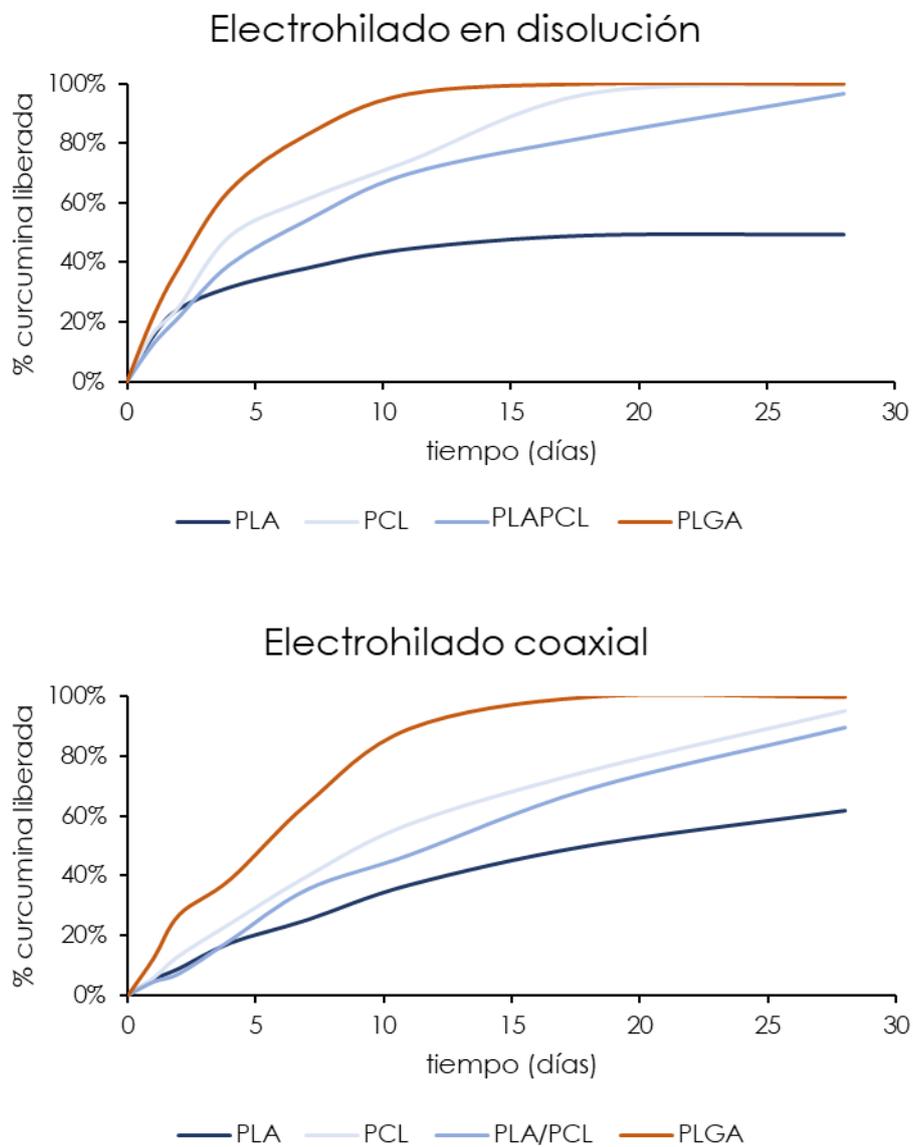


Figura 91. Curvas de liberación de curcumina en PBS+Tween80 durante 30 días a 37 °C de las membranas de PLA, PCL, PLAPCL y PLGA obtenidas mediante electrohilado en disolución (arriba) y electrohilado coaxial (abajo).

Como puede observarse, tanto para el electrohilado en disolución y el coaxial se tiene una liberación más rápida para el PLGA, que llega a liberar el 100% de la curcumina antes de los 15 días de ensayo. A continuación, la PCL permite una liberación más rápida que el PLA y la mezcla (PLAPCL).

Por otro lado, la velocidad del proceso también es mayor en el caso de las membranas obtenidas por electrohilado en disolución que con el coaxial. Esto es debido, seguramente, a la estructura obtenida. En el caso del electrohilado en disolución, la curcumina queda atrapada en toda la red polimérica, y se mantiene también en la superficie de la membrana; sin embargo, en el electrohilado coaxial se obtiene una membrana formada por fibras de tipo *core-shell* en cuyo interior se encuentra la curcumina, con una envoltura polimérica alrededor. Por tanto, la liberación se producirá más lentamente en el electrohilado coaxial, ya que dependerá del proceso de degradación del polímero, que permitirá a la curcumina traspasar la envoltura polimérica para salir al exterior. (véase Figura 92)

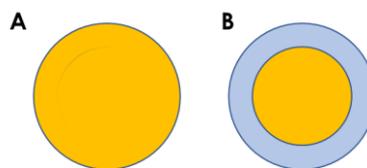


Figura 92. Esquema de la distribución de la curcumina en las fibras obtenidas por (A) electrohilado en disolución y (B) electrohilado coaxial.

Cruzando estos resultados con los de degradación, observamos que existe una desviación en los resultados esperados para la PLA y la mezcla, ya que éstos se degradan más rápidamente que la PCL. Este hecho puede ser debido a que la curcumina crea uniones con el PLA que dificultan su liberación al medio. Este hecho explicaría, además, que únicamente para este polímero se tenga una mayor degradación en el caso del electrohilado coaxial, que da lugar a una liberación continuada de la molécula, no siendo así para el electrohilado en disolución, en el que se observa que la liberación se detiene una vez alcanzado el 40%.

Efectividad de la encapsulación

La cuantificación de curcumina liberada se ha llevado a cabo teniendo en cuenta el porcentaje de curcumina real de las membranas; es decir, la efectividad de la encapsulación. Esta efectividad, en porcentaje, se muestra en el gráfico siguiente:

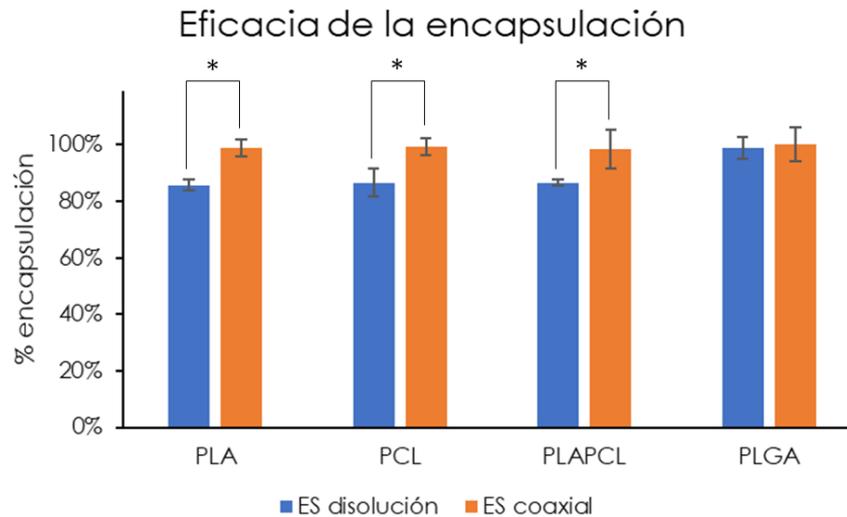


Figura 93. Efectividad de la encapsulación de la curcumina en las membranas obtenidas por electrohilado en disolución y electrohilado coaxial. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como * p-valor < 0.05.

Como puede observarse en el gráfico, la efectividad de encapsulación de la curcumina en las membranas obtenidas por electrohilado coaxial es mayor (~100%) para todos los polímeros; sin embargo, en aquellas membranas obtenidas por electrohilado en disolución la efectividad de encapsulación únicamente es prácticamente del 100% (98,9%) para el PLGA, siendo del ~ 85% para los homopolímeros.

Esto puede ser debido a que para el electrohilado coaxial se emplean dos disoluciones diferentes, la disolución de curcumina y la polimérica, por lo que se busca disolventes adecuados para la curcumina. Sin embargo, en el electrohilado en disolución, se añade directamente la curcumina a la disolución polimérica, por lo que esta debe ser compatible con el disolvente o los disolventes empleados en ella. Así pues, se observa que el HFIP, empleado en la disolución polimérica del PLGA, es adecuado para obtener una disolución homogénea con la curcumina; mientras que el sistema de disolventes cloroformo/metanol dificulta la disolución de la curcumina.

Por todo ello, cuando se requiera introducir una molécula a una membrana electrohilada será importante estudiar adecuadamente los disolventes compatibles tanto con los polímeros empleados como con la molécula seleccionada.

Conclusiones

La liberación de curcumina desde las membranas varía en función del procesado de las muestras, siendo mayor la velocidad del proceso en las membranas obtenidas por electrohilado en disolución que con el coaxial, debido a la influencia de la degradación. Además, con el PLGA se consigue una completa liberación antes de los 15 días de ensayo.

El estudio de degradación apoya los resultados anteriores para el PLGA, que se degrada rápidamente; sin embargo, para la PLA y la mezcla PLAPCL se observa una desviación respecto de la PCL debido probablemente a uniones formadas entre la curcumina y el PLA, que dificultan su liberación. De hecho, en las membranas de PLA obtenidas por electrohilado en disolución se tiene un valor límite en la liberación para este polímero del 40%.

Por otro lado, el proceso de degradación está catalizado por el medio ácido y, principalmente, por el medio básico, que provoca la hidrólisis de los poliésteres. Además, el PLA degrada más rápidamente que la PCL.

Analizando la propiedades fisicoquímicas, se tiene que para todas las muestras, el proceso de degradación incrementa la cristalinidad, ya que en los polímeros semicristalinos se degrada primero la fase amorfa. En el caso del PLGA se induce la cristalización, y el polímero pasa a ser muy frágil. Esto da lugar a un aumento del módulo elástico con el tiempo de degradación.

Finalmente, en los *scaffolds* no se observa, en los tiempos de estudio, diferencias significativas en sus propiedades tras la degradación.

CAPÍTULO IV

ESTUDIO DE ADHESIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS DIFERENTES POLÍMEROS EMPLEADOS

Dada la influencia que tienen las proteínas en la interacción soporte-célula, en este capítulo se ha realizado un estudio de adhesión de una proteína, la fibronectina.

Para estudiar únicamente la influencia de la química del polímero, se ha desarrollado films poliméricos planos mediante la técnica de spin-coating.

Se ha realizado tanto estudios cualitativos (microscopía) como cuantitativos.

Introducción

La historia de los cultivos celulares comenzó hace más de 100 años, cuando en 1885 Wilhelm Roux cultivó células de embrión de pollo en solución salina durante algunos días. Sin embargo, fue a principios del siglo XX cuando la necesidad de entender los eventos fisiológicos normales y de estudiar el comportamiento de las células animales sin la influencia sistémica, aceleró el desarrollo y comprensión de los cultivos celulares *in vitro*. [151]

Hoy en día, se sabe que existen diferentes factores que afectan a la viabilidad del cultivo celular y que cada tipo celular tiene requerimientos específicos de acuerdo con sus características fisiológicas; sin embargo, existen condiciones fisicoquímicas que todas las células necesitan, como la temperatura, el porcentaje de oxígeno y otros gases, así como los nutrientes necesarios para el metabolismo y crecimiento celular. [152]

La mayoría de las células, a excepción de las hematopoyéticas y las tumorales, son células dependientes de anclaje; es decir, necesitan una superficie o soporte para su proliferación. [153] Para favorecer este anclaje, adicionalmente al medio de cultivo, que contiene los nutrientes, como aminoácidos, vitaminas y sales, se adiciona suero (generalmente, suero fetal bovino o suero humano) para aportar las proteínas necesarias, como la fibronectina, que desempeña un papel fundamental en la adhesión celular. [152]

Todas estas necesidades específicas están relacionadas con las funciones de la matriz extracelular (ECM), una red tridimensional que rodea las células y presenta numerosas funciones vitales: permite la adhesión celular, mantiene la integridad y aporta propiedades mecánicas a los tejidos, mantiene e influye en la forma celular, permite la comunicación célula-célula, modula la diferenciación y la fisiología celular, e interviene en los procesos de multiplicación y señalización. Para ello, la ECM está constituida por diferentes moléculas, fundamentalmente proteínas y carbohidratos: proteoglicanos, fibronectina, laminina, integrinas, hemidesmosomas, elastina, entactina, fibrilinas, receptores de membrana, factores de crecimiento, colágeno tipos I, III, IV y VII, glucosaminoglicanos y metaloproteinasas. [154]

Dentro de las proteínas se encuentran aquellas con función estructural y las que tienen una función especializada, como la fibronectina, de gran interés biológico.

Fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína adhesiva que constituye uno de los principales componentes de la matriz extracelular. Ha sido ampliamente estudiada por su capacidad de interactuar con diversas células y macromoléculas, influyendo en el comportamiento celular y en diferentes procesos, como la proliferación, la migración y la adhesión celular. [155], [156]

Se trata de una proteína con un peso molecular de 440 kDa, compuesta por dos subunidades. En el organismo se puede encontrar en forma soluble o insoluble. La forma soluble, que se distribuye de manera dimérica en la sangre y otros fluidos, se dispone globularmente; mientras que la forma insoluble, que es la que encontramos en la ECM de diferentes tejidos, adquiere una conformación extendida. [157]

Este cambio conformacional que sufre la fibronectina también depende de las características de la superficie del sustrato al que se adsorba. De hecho, varios estudios concluyen que la fibronectina se adsorbe con una conformación diferente en función de la hidrofobicidad del sustrato. En superficies hidrofílicas adquiere la conformación extendida, mientras que en superficies hidrofóbicas mantiene la estructura globular compacta. [158], [159]

En cuanto a la adhesión de las células dependientes de anclaje al soporte, éstas se adhieren, se expanden y proliferan de forma óptima en superficies hidrófilas. Sin embargo, se ha demostrado que en presencia de fibronectina, la adhesión celular es la misma en superficies hidrófilas e hidrófobas. Por ello, muchos biomateriales poliméricos de uso clínico, de carácter hidrófobo especialmente, se preadsorben con fibronectina. [160]

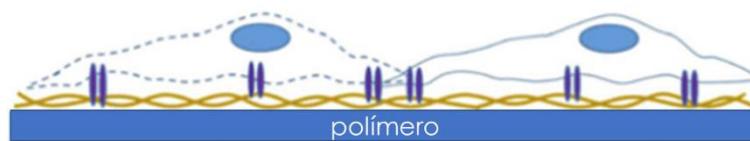


Figura 94. Esquema de adsorción celular mediada por el recubrimiento de fibronectina sobre la superficie de un polímero. Modificada de [161]

Este proceso de adsorción proteína-material es un proceso fisicoquímico complejo que depende en gran medida de las características superficiales del sustrato (energía superficial, grupos funcionales presentes en la superficie, propiedades electroquímicas, cargas superficiales, etc.), así como de su morfología. [162] Por tanto, para estudiar el efecto del polímero en la adhesión de fibronectina se requiere de films con muy baja rugosidad.

Recubrimiento por centrifugación (*Spin-coating*)

Existen diversas técnicas para la obtención de films poliméricos (*dip-coating*, *spray-coating*, deposición por láser pulsado, etc.); sin embargo, la técnica más empleada en la actualidad para la obtención de films planos es el recubrimiento por centrifugación (*spin-coating*), ya que se consiguen películas bien definidas con una distribución lateral y vertical homogéneas del polímero. [163] Además, permite elaborar films con espesores del orden de micrómetros e incluso nanómetros. [164]

El equipo en el que se lleva a cabo esta técnica, denominado *spin-coater*, consta de un disco giratorio conectado a una bomba de vacío para mantener durante el giro el sustrato. El proceso consta de tres pasos [165]:

(i) En primer lugar, se deposita la disolución en el sustrato. Esto puede hacerse en modo estático, en el que el disco giratorio está parado, o dinámico, habiendo rotación del disco.

La principal desventaja del modo estático es que comienza a evaporarse lentamente el disolvente cuando se deposita la disolución sobre el sustrato, lo que puede dar lugar a defectos en la muestra, en función de la disolución empleada.

(ii) En segundo lugar se realiza la rotación a alta velocidad. En esta etapa las fuerzas adhesivas presentes en la interfaz líquido/sustrato y las fuerzas centrífugas generadas por el giro del disco a una determinada velocidad angular, dan lugar a un flujo radial de la disolución que, junto con el proceso de evaporación del disolvente, forma una película de material uniforme en la superficie del sustrato. [163]

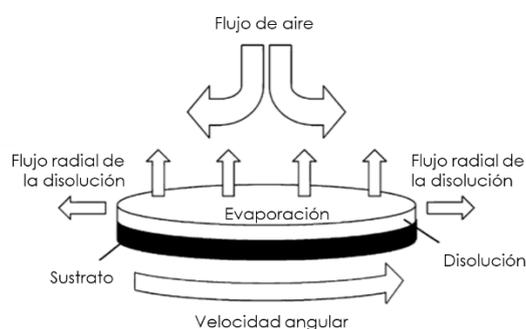


Figura 95. Etapa de giro a alta velocidad en el proceso de *spin-coating*, en la que se observa el flujo radial al que queda sometida la disolución. Traducida de [166]

(iii) Finalmente, se produce una etapa de secado para asegurar que no queda disolvente en la muestra.

Como ocurre con la técnica de electrohilado, existen numerosos parámetros –de la disolución, del proceso y del ambiente– que afectan al espesor del film obtenido. Dentro de los parámetros de la disolución se encuentra la concentración del polímero (o, en consecuencia, la viscosidad de la disolución) y el disolvente empleado; en los parámetros del proceso se tiene la velocidad angular y el tiempo de procesado y, en modo estático, el tiempo de inicio de la rotación y la aceleración angular. Finalmente, entre los parámetros ambientales tenemos la presión, la temperatura y la humedad relativa. [164]

Es importante conocer cómo afectan los diferentes parámetros a la morfología del film para evitar los defectos más importantes que pueden aparecer, entre ellos [167]:

(i) Film muy delgado: se obtiene con elevadas velocidades de giro y tiempos de procesado largos, así como una viscosidad muy baja de la disolución. Para evitar este defecto se puede reducir la velocidad de giro, así como el tiempo de procesado, y aumentar la concentración de la disolución para incrementar su viscosidad. También influye en el espesor el volumen de disolución depositada en el sustrato, cuanto menor sea ésta, menor será el espesor.

(ii) Film muy grueso: se obtiene al trabajar con bajas velocidades de giro, tiempos de procesado cortos o concentraciones elevadas de la disolución. Para evitarlo se debería aumentar tanto la velocidad de giro, como el tiempo de procesado, o reducir la concentración de la disolución. Tal y como se ha comentado anteriormente, un volumen de disolución elevado da lugar a mayores espesores de film.

(iii) Presencia de burbujas: este defecto puede deberse a varias causas, por un lado la presencia de burbujas en la disolución, por otro lado, una rápida evaporación del disolvente y, finalmente, una concentración elevada de polímero que bloquea la evaporación del disolvente. Será necesario asegurar que no hay burbujas de aire en la disolución, seleccionar disolventes que tarden más en evaporarse, o bien reducir la concentración de polímero.

(iv) Presencia de espirales: este defecto aparece cuando el tiempo de giro es muy corto o la disolución no se deposita en el centro del sustrato; por tanto, para evitarlo se deberá aumentar el tiempo de procesado y habrá que cerciorarse de que la disolución se deposita correctamente.

(v) Presencia de un círculo en el centro: cuando el disolvente es poco volátil, el polímero puede cristalizar en el centro, ya que en los bordes del sustrato la fuerza centrífuga es máxima y el disolvente se puede evaporar más rápidamente para formar una zona amorfa.

(vi) Áreas sin cubrir: se debe principalmente a que el volumen de disolución depositado en el sustrato es pequeño, por lo que habría que aumentarlo.

Aparte de los defectos mencionados anteriormente, si no se controlan las condiciones ambientales, trabajando, por ejemplo, en una atmósfera inerte controlada, podemos obtener una baja reproducibilidad del proceso.

Por último, para la caracterización morfológica de estos materiales se requiere de microscopios de una elevada resolución, como los microscopios de barrido por sonda (SPM; de sus siglas en inglés, *scanning probe microscopes*), entre los que se encuentra el microscopio de fuerza atómica.

Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM) comenzó a desarrollarse en 1986, cuando Gerd Binnig y Calvin Quate, de la Universidad de Standford, y Christoph Gerber, de IBM, diseñaron el primer microscopio de fuerza atómica. [168] Este microscopio permite obtener información de la nanoestructura de los materiales, así como de algunas de sus propiedades (fundamentalmente, propiedades mecánicas), a partir de la interacción producida entre una punta y la superficie del material. [169]–[171] Estas interacciones pueden ser de dos tipos: atractivas, cuando aparecen fuerzas de Van der Waals y electrostáticas, principalmente; y repulsivas, al darse fuerzas de Pauli y también electrostáticas. [172]

Los componentes principales de un AFM son: [173]

(i) La sonda, compuesta por una micropalanca (cantiléver), en cuyo extremo en voladizo hay una punta, que es la encargada de interactuar con la muestra.

(ii) La fuente del rayo láser, que apunta hacia el extremo en voladizo de la micropalanca, donde se encuentra la punta.

(iii) El fotodiodo, que detecta el rayo láser una vez ha sido reflejado. Generalmente, consiste en un diodo de cuatro cuadrantes, para detectar los movimientos de flexión y torsión de la micropalanca.

Además, la muestra se coloca sobre un detector piezocerámico que puede moverse con presión en las coordenadas X, Y y Z.

En la Figura 96, podemos ver el esquema de un AFM:

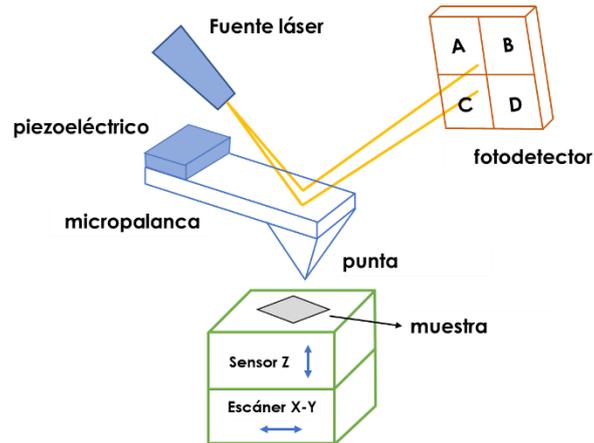


Figura 96. Esquema de un microscopio de fuerza atómica (AFM). Modificada de [173]

En función de las características físicas de la muestra y de las propiedades que se quieran medir, el AFM permite trabajar en diferentes modos; cada uno de ellos con sus propias ventajas y limitaciones. Estos modos se clasifican en dos grupos: los modos de contacto continuo (o estático) y los modos dinámicos. [173], [174]

Modo de contacto (o estático)

En el modo de contacto la sonda se encuentra en contacto con la muestra durante todo el barrido, de modo que su uso está reservado a cierto tipo de muestras que no sean susceptibles de ser destruidas por la punta, como metales, óxidos de metales, muestras inorgánicas rígidas, e incluso algunas muestras biológicas.

A pesar de ello, es útil porque permite realizar ensayos de espectroscopía de fuerzas y es ampliamente usado para el estudio de la conductividad eléctrica de muestras. [175], [176]

Modos dinámicos

Estos modos presentan la ventaja de reducir el desgaste de la punta y de la muestra, al no haber un contacto continuo entre ambos y, además, se obtiene información más amplia de la interacción, incluyendo la amplitud de la oscilación, la frecuencia y el cambio de fase; mientras que en los modos de contacto únicamente se obtiene información de la deflexión de la sonda.

Entre los modos dinámicos el más empleado es el modo de contacto intermitente, o *“tapping mode”*, en el que se hace vibrar la micropalanca con amplitudes en el rango nanométrico (entre 5 y 200 nm) y frecuencias de oscilación de kilohercios (entre 70 y 300 kHz).

Así pues, en este modo se controla únicamente la amplitud, que sufre cambios debido a la topografía de la muestra, haciendo que se mantenga en un valor preestablecido. De este modo, si la micropalanca se encuentra con un cambio en la topografía (ya sea un valle o una protuberancia), la amplitud de la punta cambiará, por lo que, para compensar esa pérdida o ganancia de amplitud, se moverá la muestra para intentar mantener la amplitud establecida. Además, el cociente entre la amplitud de la punta cuando toca el material y la amplitud de oscilación libre (es decir, antes de que se produzca el contacto), es un indicativo de la fuerza con la que la punta incide en la superficie.

Este modo permite, además, operar en vacío, en contacto con aire, lo que más adelante se ha denominado como estudio en seco, o en inmersión en un fluido, permitiendo hacer el estudio en unas condiciones más similares al entorno natural para el que se diseñan los materiales, o el ambiente fisiológico de las muestras biológicas. [177]

Finalmente, el surgimiento de esta técnica ha hecho posible obtener imágenes de moléculas de ADN, de anticuerpos, membranas proteínicas y de moléculas proteínicas individuales; así como la obtención de imágenes de polímeros. [173], [178], [179]

Por todo ello, en este capítulo se plantea caracterizar la adhesión de fibronectina en los diferentes polímeros (PLA, PCL, PLAPCL y PLGA), empleando microscopía atómica en modo de contacto intermitente.

Materiales y métodos

Obtención de soportes planos mediante spin-coating

Dado que se pretende estudiar únicamente la influencia del polímero en la adhesión de proteínas, se empleó la técnica de *spin-coating* para la obtención de films planos de cada uno de los polímeros.

Para ello, se prepararon disoluciones de PLA, PCL, PLAPCL y PLGA al 2% m/v en cloroformo. Estas disoluciones se dejaron en agitación durante la noche, para asegurar la completa disolución de los polímeros.

A continuación, se preparó los films en el *spin-coater* (CEE TM, Model 200). El equipo se conecta a una bomba de vacío, que mantiene el cubreobjetos de vidrio durante la rotación,

y, además, se inyecta continuamente nitrógeno para mantener una atmósfera inerte en el interior.

Los cubreobjetos de vidrio empleados fueron de 12 mm de diámetro (*Afora*). Sobre ellos, en modo estático primero y dinámico después, se vertió de 100 a 200 μl de la disolución polimérica y se hizo rotar en un rango de 1000 a 10000 rpm. En el modo estático, además, la aceleración se estudió de 1000 a 7500 rpm/s.

Una vez obtenidas las muestras, se realizó una inspección visual para determinar si la muestra era adecuada o presentaba algún defecto, como la obtención de una superficie de polímero no homogénea o la presencia de manchas blancas. Aquellas muestras que a simple vista parecían ser adecuadas, se inspeccionaron en el microscopio óptico (Nikon, Eclipse E600) para descartar posibles defectos microscópicos, como la presencia de burbujas.

A continuación, aquellas muestras que no presentaron defectos se dejaron 24h en un desecador termostático de vacío (Selecta, Vacio-Temp) para garantizar la evaporación completa del disolvente.

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El estudio morfológico de estas muestras se llevó a cabo en el microscopio de fuerza atómica (AFM; Bruker, Multimode 8) de los Servicios Centrales de Microscopía de la UPV, en el modo de funcionamiento *tapping*.

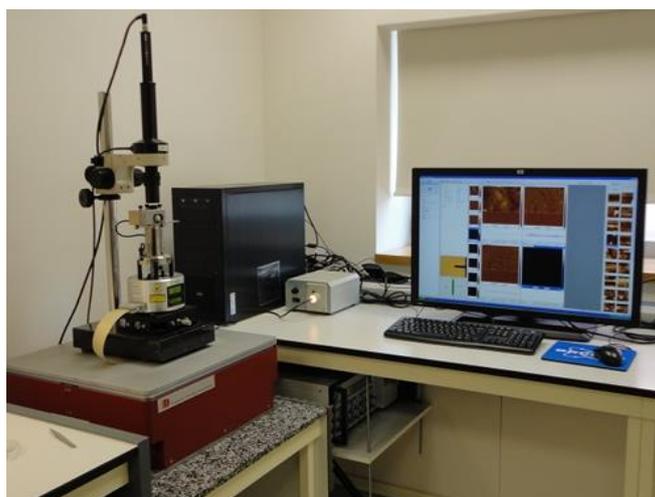


Figura 97. Microscopio de fuerza atómica (AFM) del Servicio de Microscopía de la UPV. Extraída de su página web.

Previamente, las muestras fueron lavadas con abundante agua destilada, para eliminar partículas que se hubieran podido depositar sobre la superficie y después, se secaron con Argón. A continuación, se colocaron en un portaobjetos metálico empleando cinta adhesiva de doble cara.

Para el manejo del microscopio, así como el postratamiento de las imágenes, se empleó el programa *NanoScope 8.15*, que permite, además, obtener datos de rugosidades.

Determinación cualitativa de la adhesión de proteína

Tras el estudio morfológico de los materiales, se estableció las condiciones de trabajo del *spin-coating* para cada uno de los polímeros, de forma que los films obtenidos de cada uno de ellos presenten la menor rugosidad posible. Estas muestras aparecen denominadas como “blanco”.

A continuación, se preparó 6 muestras de cada uno de los polímeros para la determinación cualitativa de fibronectina en el AFM. De las 6 muestras, 3 se destinaron al estudio en seco y otras 3 al estudio en inmersión. En ambos casos se analizó el comportamiento de la muestra en contacto con una disolución acuosa, por si se producían defectos en la morfología del film a causa de un posible hinchado; así como la adhesión de fibronectina para dos concentraciones diferentes (5 y 20 $\mu\text{g/ml}$).

De forma previa, se preparó una disolución de suero fetal bobino (PBS; Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, *Gibco*) y dos disoluciones de fibronectina, de concentraciones 5 $\mu\text{g/ml}$ (5FN) y al 20 $\mu\text{g/ml}$ (20FN) en agua miliQ.

Estudio en seco

Se colocaron las 3 muestras de cada polímero en una placa multipocillos P-24 y se añadió a la primera muestra 600 μl de PBS, a la segunda 600 μl de 5FN y a la última 600 μl de 20FN, de modo que quedasen cubiertas por la disolución. A continuación, se mantuvieron 24h en contacto con las disoluciones, antes de ser estudiadas en el AFM.

La preparación de las muestras para su observación en el microscopio fue la misma que la descrita para los blancos, teniendo especial cuidado con la limpieza de las muestras, para evitar la presencia de sales y proteína depositada en la superficie que no se hubiese adherido.

Se empleó, además, el modo *tapping*.

Estudio en inmersión

Al igual que en el caso anterior, se colocaron las 3 muestras de cada polímero en una placa multipocillos P-24. Dado que el estudio en inmersión es complejo y muy sensible a las impurezas que puedan quedar en la superficie, para analizar el efecto en la morfología por el contacto de una disolución acuosa, en lugar de PBS se empleó agua miliQ. De modo que a la primera muestra se le añadió 600 μl de agua miliQ, a la segunda 600 μl de 5FN y a la última 600 μl de 20FN.

Para su estudio en el AFM, las muestras únicamente se limpiaron con agua destilada y se colocaron directamente en el portaobjetos metálico, sobre la muestra se vertió 70 μl de agua ultrapura especial para AFM (*Sigma Aldrich*).

Se trabajó con diferentes modos para encontrar aquel que fuera óptimo para la obtención de imágenes que permitiesen la diferenciación de la proteína en la superficie del material.

Para facilitar la comprensión de las muestras estudiadas, se presenta en la Figura 98 un esquema:

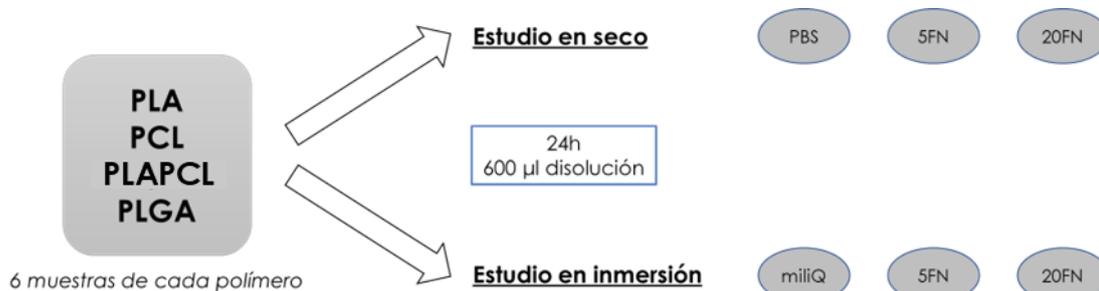


Figura 98. Muestras analizadas en el AFM para la determinación cualitativa de fibronectina.

Determinación cuantitativa de la adhesión de proteína

Mediante el microscopio de fuerza atómica, únicamente es posible determinar de forma cualitativa la presencia de fibronectina en el material. De modo que resulta interesante emplear otros métodos de análisis cuantitativos que respalden los resultados observados en el AFM.

Para ello, se empleó un microkit BCA (*Thermo Fisher*), que permite la cuantificación de proteínas a través de un espectrómetro UV. Se trata de un método altamente sensible que combina la reacción de las proteínas con Cu^{2+} en un medio alcalino (produciendo Cu^{+}) con un reactivo para la detección de Cu^{+} altamente selectivo y sensible denominado ácido

bicinconínico (BCA). Se basa, pues, en el principio de que las proteínas reducen los iones cúpricos a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas. Los iones cuprosos reaccionan con el BCA, de color verdoso, para formar un color morado debido a la quelación de dos moléculas de BCA con un ion de Cu. Este complejo presenta una absorbancia máxima a 562 nm.

Se realizaron 4 muestras de cada polímero para disponer de dos réplicas para cada concentración de fibronectina (5FN y 20FN). Las muestras se pusieron en una placa multipocillos P-24 con 600 µl de disolución de fibronectina, durante 24 h.

Trascurrido este tiempo, y dado que las muestras presentaban muy poco espesor para poder ser separadas del cubreobjetos de vidrio, se realizó el estudio con el microkit BCA, siguiendo las indicaciones del fabricante, tanto para las muestras como para el sobrenadante. Por lo que, previamente, se tomó el sobrenadante y se puso en tubos *eppendorf*.

Para la cuantificación de proteína, se realizó una curva patrón de acuerdo con las especificaciones del fabricante, y se midió la absorción de UV con un espectrómetro-UV (*Victor*) a 570 nm.

Estudio fisicoquímico de los materiales

Determinación de la tensión superficial

La tensión superficial nos permite conocer cómo va a comportarse un sólido en presencia de un fluido, ya sea líquido o gas. Para un sólido puede determinarse a partir de teorías, como la de Owens/Wendt, mediante el ángulo de contacto. [180]

El ángulo de contacto es el ángulo formado entre una gota de un líquido y la superficie del sólido. Para medirlo se empleó un equipo de medida de ángulo de contacto *Dataphysics OCA20*.

Se dejó caer una gota de 10 µl de diferentes líquidos – agua destilada, etilenglicol (extra puro, *Scharlabs*) y dietilenglicol (ReagentPlus®, *Sigma Aldrich*) – sobre la superficie polimérica, y tras 30 s para dejar que las tensiones se relajaran, se tomó una captura de la imagen de la gota en el sólido. A continuación, con el programa SCA20 se midió el ángulo de contacto izquierdo y derecho. Estas medidas se repitieron 5 veces.

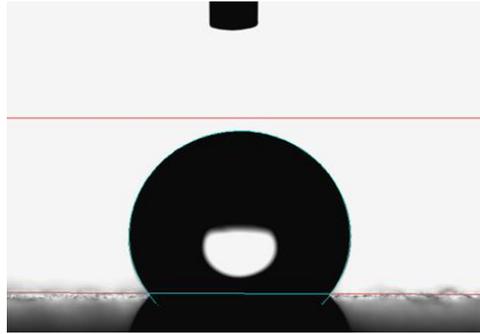


Figura 99. Ejemplo de medida de un ángulo de contacto con el programa SCA20. Extraído de DataPhysics Instruments GmbH

A partir de estas medidas se pudo determinar la tensión superficial representando una recta a partir de la teoría de Owens-Wendt:

$$\frac{\sigma_L(\cos \theta + 1)}{2(\sigma_L^D)^{\frac{1}{2}}} = (\sigma_S^P)^{\frac{1}{2}} \cdot \frac{(\sigma_L^P)^{\frac{1}{2}}}{(\sigma_L^D)^{\frac{1}{2}}} + (\sigma_S^D)^{\frac{1}{2}} \quad (28)$$

Siendo σ_L la tensión superficial del líquido, θ el ángulo de contacto, σ_S la tensión superficial del sólido, y los superíndices P y D indican que se trata de la parte polar (P) o dispersiva (D) de la tensión superficial.

De este modo, a partir de la pendiente y la ordenada en el origen, se puede obtener las componentes polar y dispersiva del sólido y así conocer la tensión superficial del material.

Resultados y discusión

Obtención de soportes planos mediante spin-coating

En primer lugar, se optimizó los parámetros del *spin-coating* para obtener films con una rugosidad mínima y así poder estudiar cómo influye únicamente la química del polímero en la interacción con la fibronectina, sin que haya efectos de la topografía.

Respecto de los parámetros de la disolución, se estableció una concentración del 2% m/v en cloroformo teniendo en cuenta los resultados de Sukanek (1985), Norrman *et. al* (2005) y Extrand (1994). [163], [181], [182]

En cuanto a los parámetros del proceso, que inicialmente se planteó en estático, se fijó la velocidad en 4000 rpm con una aceleración de 4000 rpm/s. El volumen de disolución fue de

200 μ l para asegurar un recubrimiento completo del portamuestras, dejando 30 s de tiempo inicial y 45 s de tiempo de procesado, permitiendo la completa evaporación del disolvente.

Estos parámetros se recogen en la Tabla 22:

Tabla 22. Resumen de los parámetros iniciales del *spin-coating* para la obtención de films planos.

Parámetros de la disolución	
<i>Disolvente</i>	Cloroformo
<i>Concentración</i>	2 % m/v
Parámetros del proceso	
<i>Modo</i>	Estático
<i>Velocidad</i>	4000 rpm
<i>Aceleración</i>	4000 rpm/s
<i>Tiempo de inicio</i>	30 s
<i>Tiempo de procesado</i>	45 s

Tras obtener las muestras, éstas se analizaron inicialmente de manera visual para detectar posibles defectos.

El primer defecto observado consistió en una mancha blanca en el centro de la muestra (Figura 100):

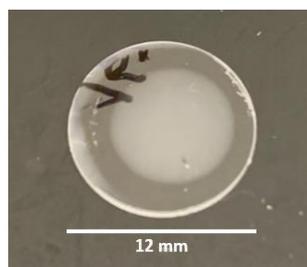


Figura 100. Defecto de mancha blanca en una muestra de PLA tras el proceso de *spin-coating*.

Este defecto que se muestra en la figura anterior puede ser debido a la presencia de burbujas. Se observa esta mancha, además, principalmente en el centro del portamuestras, por lo que el disolvente se evaporó de forma vertical, sin efecto de la fuerza centrífuga durante la rotación. Así pues, para evitar este defecto se eliminó el tiempo de inicio y se aumentó la velocidad hasta 10.000 rpm.

Con estos cambios se redujo el tamaño de la mancha blanca, disminuyendo la cantidad de burbujas, aunque no fue suficiente, seguramente debido a que el flujo de aire generado por

la velocidad angular acelera la evaporación del disolvente, tal y como demostraron Norrman *et. al* (2005). [163]

Otra causa probable de este defecto es una elevada concentración polimérica que dificulta la evaporación del disolvente. Por ello, se estudió la disminución de la concentración (0,5 – 1% m/v), en un rango de velocidades de 7.500 a 10.000 rpm, empleando volúmenes de 100 – 150 μ l. Sin embargo, con estos cambios el defecto disminuyó pero no se eliminó de forma completa.

Otro defecto que se observó fue una mala distribución del polímero, con marcas axiales, como se puede ver en la siguiente figura:

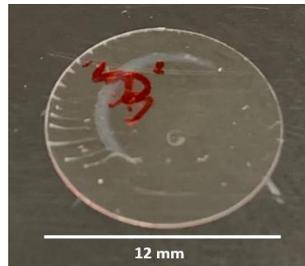


Figura 101. Defecto de mala distribución del polímero en una muestra de PLA tras el proceso de *spin-coating*.

El efecto observado en la Figura 101 puede deberse a diferentes motivos; uno de ellos puede ser una cantidad de polímero insuficiente para cubrir toda la superficie, lo cual está relacionado con la concentración y el volumen de disolución y otro, que la fuerza centrífuga no sea suficiente al principio del proceso, haciendo que el disolvente se evapore antes de que se alcance una velocidad que permita una adecuada distribución del polímero.

Para tratar de resolver este defecto, y corregir completamente el anterior, se pensó en modificar el modo de trabajo a dinámico, de forma que en el mismo momento en que se añade la disolución polimérica se tiene la velocidad máxima de giro, permitiendo que el polímero se distribuya rápida y homogéneamente antes de la evaporación completa del disolvente.

En la Figura 102 se puede ver la comparativa de una muestra obtenida en modo estático y otra en modo dinámico:

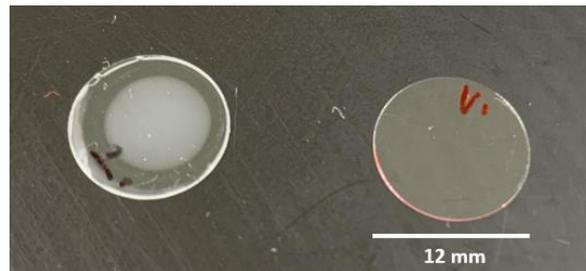


Figura 102. Comparativa visual de una muestra de PLA obtenida por *spin-coating* en modo estático (izquierda) y modo dinámico (derecha).

Tal y como se observa en la imagen, al emplear el modo dinámico se consigue obtener muestras sin defectos, de modo que una vez obtenidos los films planos de cada uno de los polímeros (Figura 103), se observaron en el microscopio óptico para detectar defectos visibles con él, ya que el AFM tiene precisión nanométrica y se requieren muestras sin defectos para evitar dañar la punta.

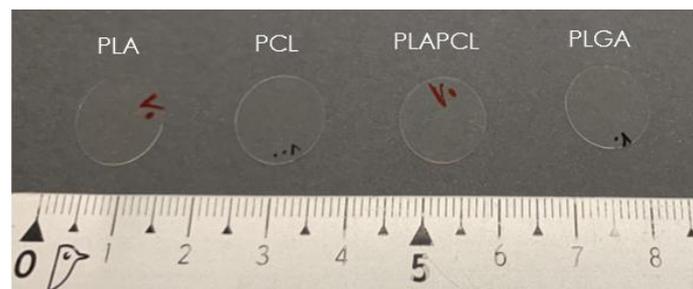


Figura 103. Aspecto visual de los films planos de PLA, PCL, PLAPCL y PLGA obtenidos mediante la técnica de *spin-coating*.

Una vez observadas las muestras en el microscopio óptico y descartadas aquellas en las que se podía observar defectos microscópicos, se estudió la topografía de las diferentes muestras en el AFM, seleccionando los parámetros óptimos de procesamiento de cada polímero. En la Figura 104 se pueden ver los resultados del AFM de las muestras (blancos), y en la Tabla 23 se recogen los parámetros del proceso tras la optimización:

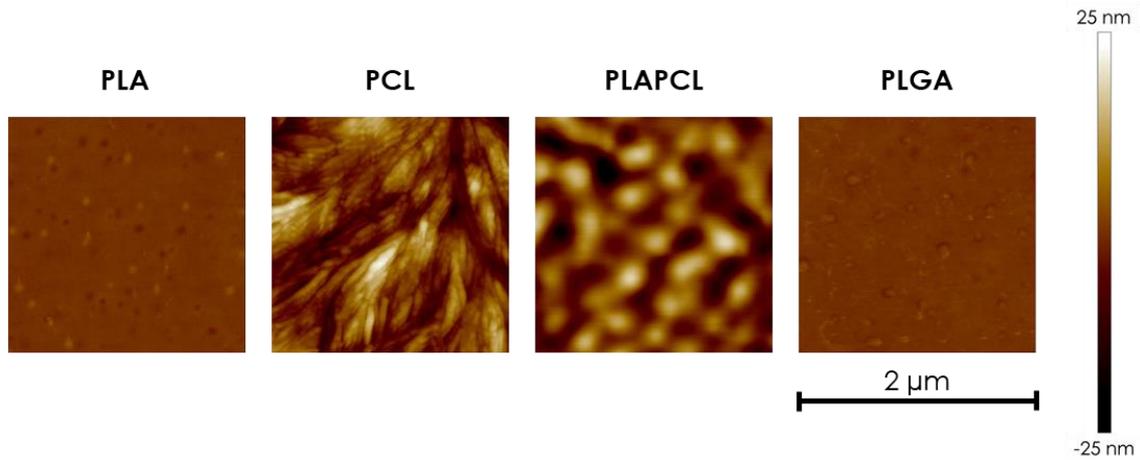


Figura 104. Imágenes de AFM de la topografía de los films de PLA, PCL, PLAPCL y PLGA obtenidos por la técnica de *spin-coating*. Las imágenes se corresponden con los resultados de amplitud en el modo *tapping*.

Los resultados muestran cómo las rugosidades del PLA y el PLGA son menores a las de la PCL y la mezcla (PLAPCL), debido seguramente a la cristalinidad de la policaprolactona. Esta fase cristalina se puede apreciar claramente en la imagen del homopolímero, en la que se pueden ver las lamelas que la forman.

Con ello, los parámetros del *spin-coating* son:

Tabla 23. Parámetros del *spin-coating* para los diferentes polímeros tras la optimización.

	PLA	PCL	PLAPCL	PLGA
Concentración (% <i>m/v</i>)	2	2	1	2
Disolvente	cloroformo			
Volumen (μ l)	200	200	200	150
Velocidad (<i>rpm</i>)	7500			
Modo de trabajo	dinámico			

Determinación cualitativa de la adhesión de proteína

Tras la optimización del proceso, en el que se obtuvo films planos de cada uno de los polímeros, se estudió de forma cualitativa empleando técnicas de imagen mediante el AFM la adhesión de la fibronectina en cada uno de los polímeros.

En primer lugar, se estudió el comportamiento de los materiales en seco tras haber estado 24 h en contacto con la disolución de proteína. Estos resultados se recogen en la Figura 105:

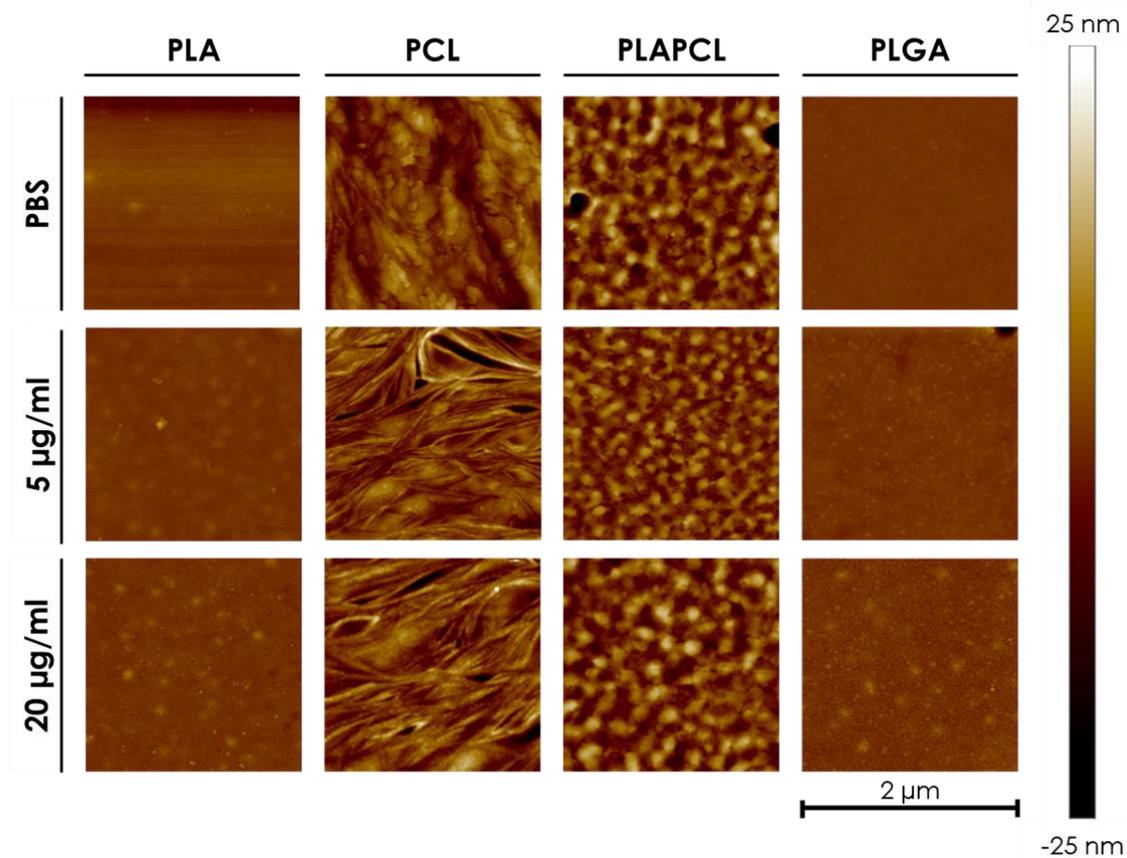


Figura 105. Estudio de la topografía de los films planos de PLA, PCL, PLAPCL y PLGA para la determinación cualitativa de fibronectina en seco mediante AFM.

En la Figura 105 se puede ver, en primer lugar, que el contacto con un medio acuoso durante 24 h no afecta a la morfología del material ya que las muestras que se mantuvieron en PBS presentan las mismas características visuales que los blancos de la Figura 104.

Por otro lado, para las muestras de PLA y PLGA, que presentaban menor rugosidad, se puede ver cómo la presencia de fibronectina da lugar a marcas globulares, habiendo más cantidad cuando la concentración de fibronectina es mayor. Estas marcas globulares se corresponden con la fibronectina, la cual presenta estructura globular. Además, se observa una mayor cantidad de estas marcas en el PLGA indicando mayor afinidad por la proteína y dando lugar a una mejor adhesión de ella.

Dado que las muestras de PCL y PLAPCL presentan una mayor rugosidad, en la Figura 106 y 107 se muestran los resultados a mayor aumento para poder detectar mejor la fibronectina:

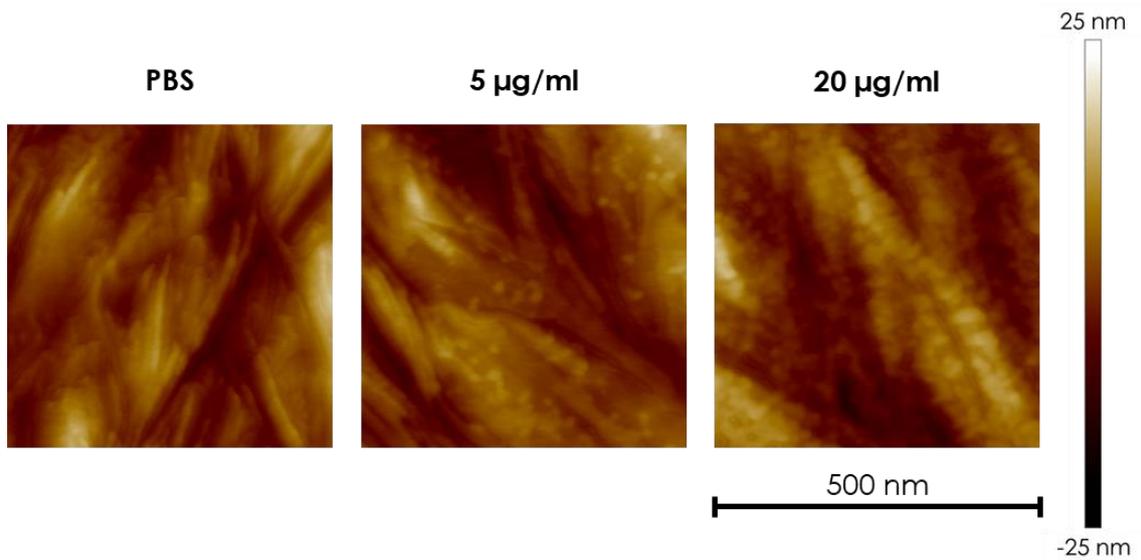


Figura 106. Estudio cualitativo mediante AFM de la adhesión de fibronectina en PCL a 500 nm.

Para la PCL, a mayor aumento se observa un cambio significativo en las imágenes de AFM al aumentar la concentración de fibronectina. En el caso de una menor concentración (5 µg/ml) se puede apreciar la conformación globular de la proteína; sin embargo, a la mayor concentración (20 µg/ml) no se distingue esta conformación debido, seguramente, a la saturación de la superficie.

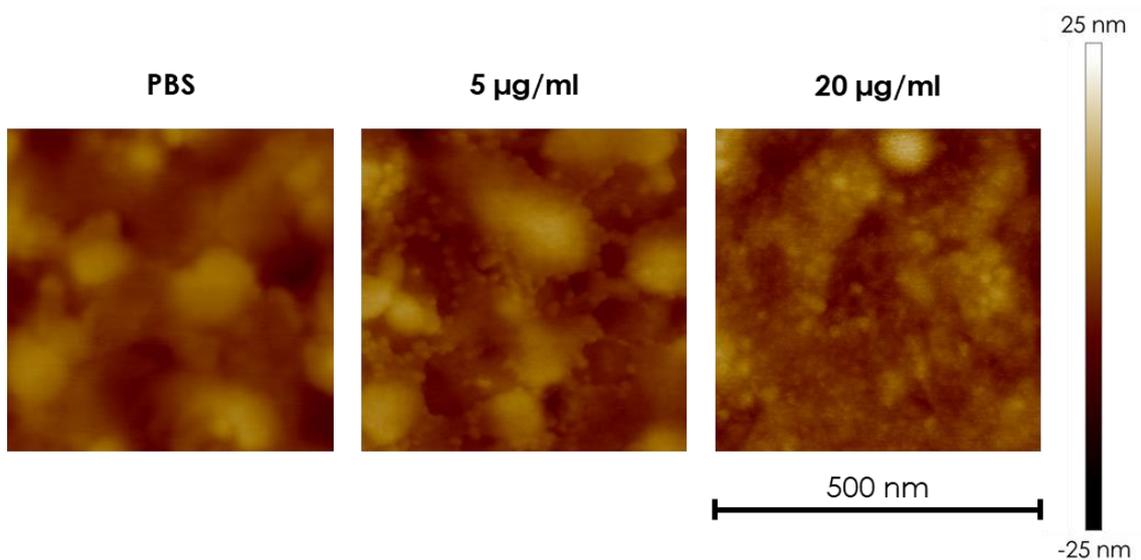


Figura 107. Estudio cualitativo mediante AFM de la adhesión de fibronectina en PLAPCL a 500 nm.

Para el caso de la PLAPCL (Figura 107), se observa también un aumento de marcas globulares correspondientes a la fibronectina, cuando se aumenta la concentración de ésta.

Por ello, puede decirse que la PLAPCL también es un material adecuado para la adhesión de fibronectina.

Para hacer una aproximación más real, se realizó el mismo estudio mediante AFM en inmersión. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 108:

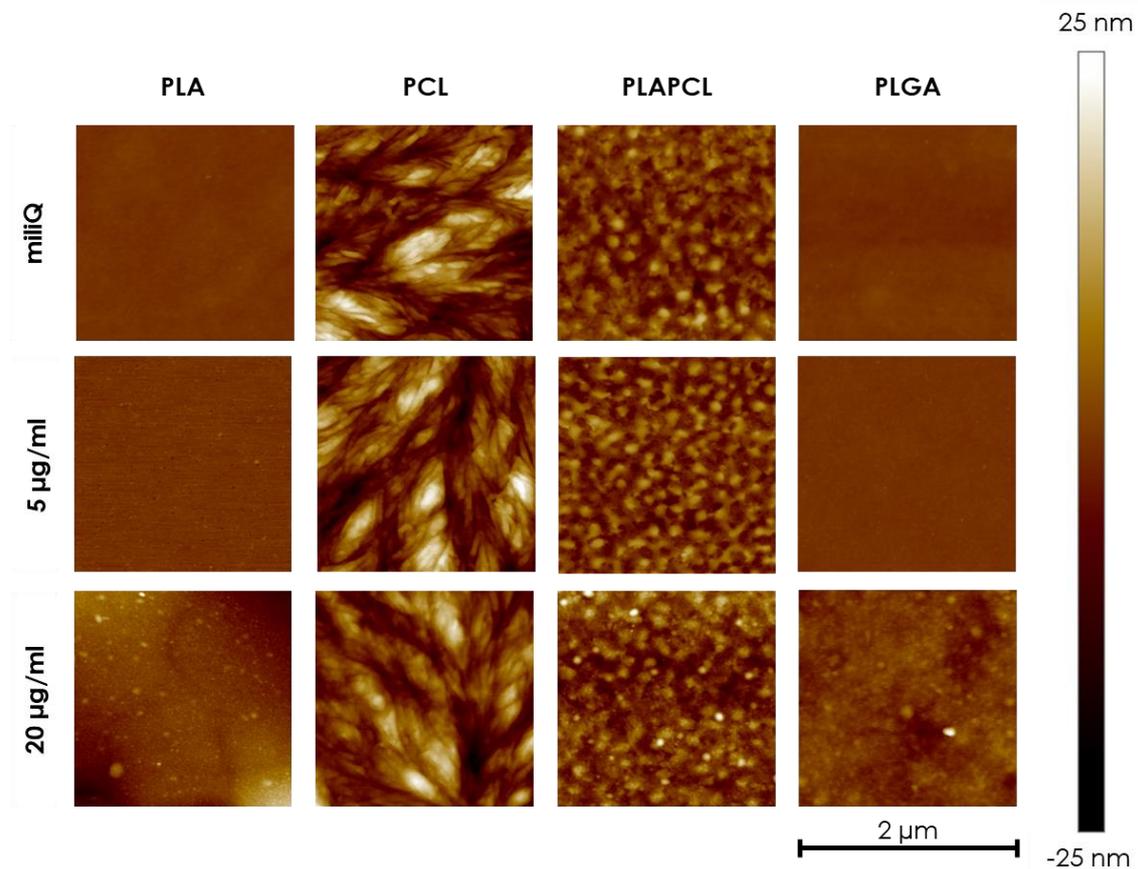


Figura 108. Estudio de la topografía de los films planos de PLA, PCL, PLAPCL y PLGA para la determinación cualitativa de fibronectina en inmersión mediante AFM.

Como se puede observar, en el estudio en inmersión se mantienen las estructuras observadas en las muestras en seco, con las lamelas de la PCL claramente diferenciadas, así como la mayor rugosidad de las muestras de PLAPCL, debido a la mezcla de los homopolímeros.

Por otro lado, el estudio en inmersión presenta algunas dificultades, ya que las imágenes obtenidas en el AFM son menos nítidas por las interferencias con el líquido. Este hecho puede apreciarse claramente en la siguiente figura, para la PCL:

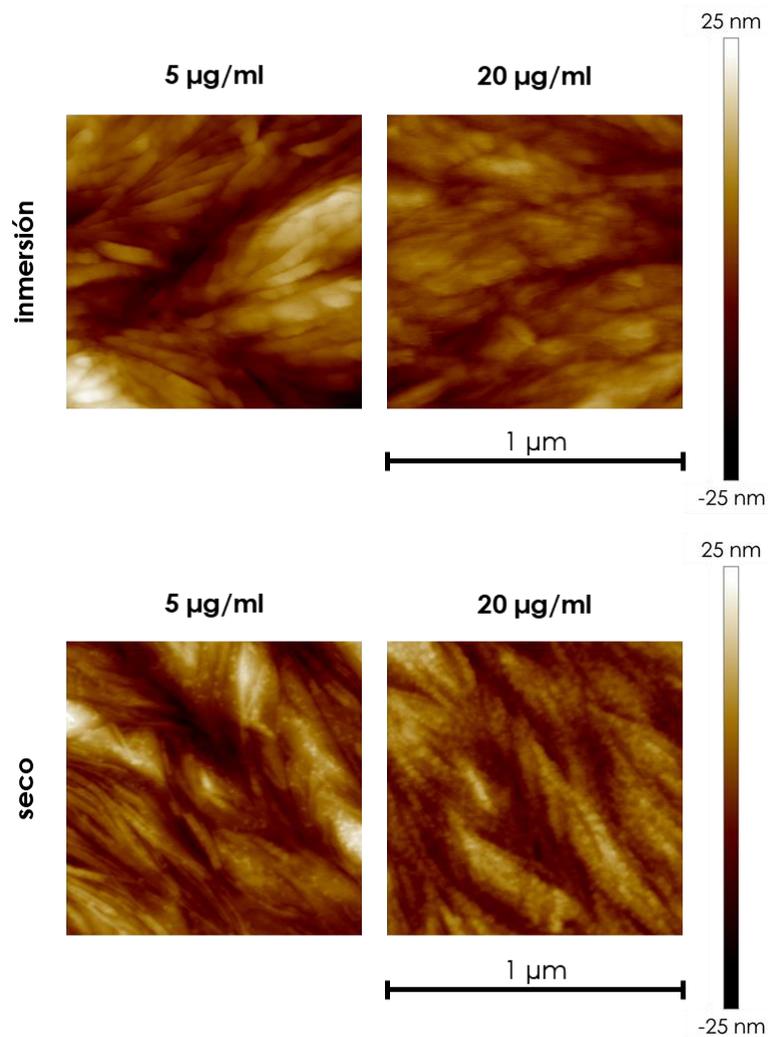


Figura 109. Comparativa del estudio de AFM en inmersión y en seco para la PCL.

En la imagen podemos ver la misma muestra durante el estudio en inmersión (arriba) y tras haber secado la muestra (abajo). En ella se puede apreciar claramente la falta de nitidez en las imágenes de AFM en inmersión, especialmente a mayores aumentos, lo que dificulta la determinación cualitativa de la proteína.

Por ello, conviene realizar siempre el estudio en inmersión, para ver cómo se comporta la muestra en el ambiente en el que se estudiará, empleando aumentos menores para una mayor nitidez de la imagen, acompañándolo del estudio en seco para un mejor estudio. Especialmente con polímeros en los que se tiene una elevada rugosidad, al ser mezclas o altamente cristalinos.

A pesar de esto, en el estudio en inmersión (Figura 108) se tiene el mismo comportamiento observado para las muestras en seco (Figura 105), con una mayor adhesión para la PLA y el

PLGA, siendo mejor la adhesión en el PLGA. Además, la adhesión es mayor, cuanto mayor es la concentración de proteína en la disolución.

Determinación cuantitativa de la adhesión de proteína

Los resultados anteriores se completaron con la cuantificación de proteína adsorbida en las diferentes superficies poliméricas mediante el test MicroBCA®:

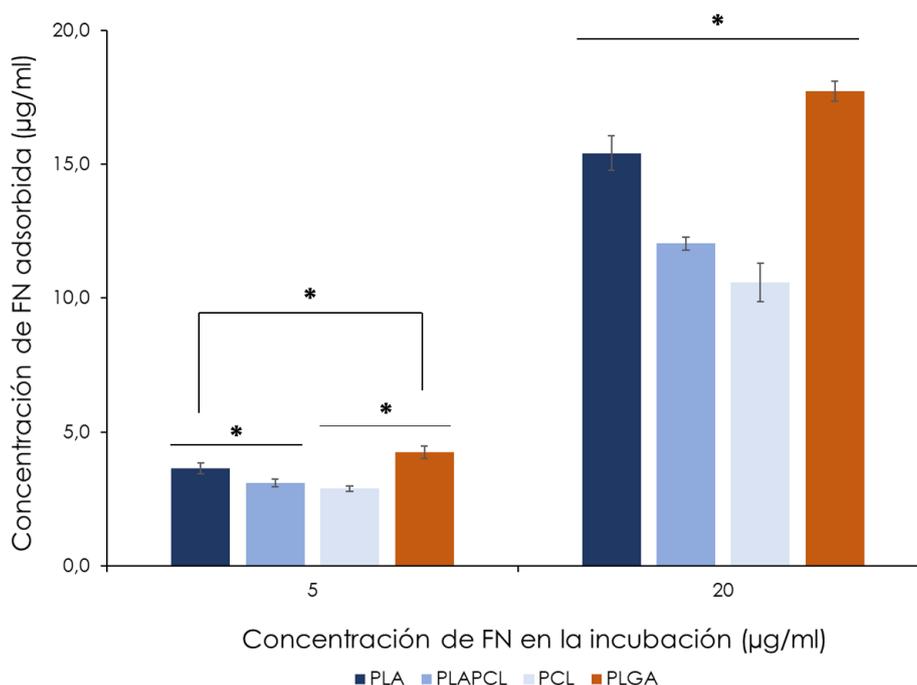


Figura 110. Concentración de fibronectina (FN) adsorbida en las diferentes superficies poliméricas, tras 24h de incubación en una disolución de 5 µg/ml y otra de 20 µg/ml. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como * p-valor < 0,05.

En el gráfico anterior se tiene que, como se había determinado de forma cualitativa con el AFM, el polímero que más fibronectina adsorbe en su superficie es el PLGA, seguido del PLA, la mezcla PLAPCL y finalmente la PCL.

Por otra parte, se tiene que se adsorbe un mayor porcentaje de fibronectina para el PLGA y el PLA cuanto más concentrada es la disolución en la que se incuban las muestras (88,6% adsorbida en el PLGA-20FN frente al 85,1% en el PLGA-5FN; 77,1% adsorbida en el PLA-20FN frente al 73,1% en el PLA-5FN). Sin embargo, este comportamiento no se observa para la PLAPCL y la PCL, probablemente debido a que en ambos casos el porcentaje adsorbido es bajo (~ 61% para la mezcla y ~ 55% para la PCL).

Para estudiar cómo puede influir las propiedades superficiales en ello, se realizó un estudio fisicoquímico para determinar la tensión superficial de los materiales.

Estudio fisicoquímico de los materiales

Se midió los ángulos de contacto de los diferentes materiales para determinar la tensión superficial de ellos (Tabla 24) y, de este modo, encontrar si existe una relación entre la tensión superficial y la adhesión de proteínas.

Tabla 24. Tensión superficial de los materiales obtenida a partir de la teoría de Owens-Wendt por medio de las medidas del ángulo de contacto.

	σ^P (mN/m)	σ^D (mN/m)	σ (mN/m)
PLA	20,4	26,6	47,0
PCL	13,3	27,9	41,2
PLAPCL	15,9	30,4	45,6
PLGA	14,9	32,7	47,6

Los resultados mostrados en la tabla anterior guardan relación con los resultados de proteína adherida en la superficie, siendo mayor la adhesión cuanto mayor es la tensión superficial del material.

Por otro lado, la tensión superficial está relacionada con la mojabilidad del polímero, siendo ésta inversamente proporcional; de modo que, como apuntaron Kooten *et. al* (2004), la adhesión de fibronectina es mayor cuando el sustrato tiene elevada mojabilidad. [183]

Conclusiones

A partir de los resultados anteriores podemos concluir, en primer lugar, que mediante la técnica de *spin-coating* pueden obtenerse films poliméricos de PLA, PCL, PLAPCL y PLGA planos que permiten hacer estudios de adhesión de proteína sin que en ellos tenga efecto la morfología del material, únicamente la química del polímero.

En segundo lugar, se ha comprobado que el AFM permite determinar de forma cualitativa la adhesión de fibronectina en la superficie de los polímeros, adquiriendo ésta una conformación globular. Además, es posible hacer el estudio tanto en seco como en inmersión, permitiendo un estudio más aproximado del comportamiento en el medio en el que se encontraría el material. Sin embargo, la interacción entre la punta y el líquido de

inmersión distorsiona las imágenes conforme se incrementan los aumentos, por lo que debe hacerse de forma complementaria siempre el estudio también en seco.

Tanto en el estudio en seco como en inmersión, se ha podido observar que la cantidad de proteína en la superficie de los materiales es mayor cuando los materiales se exponen a una disolución más concentrada (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Por otro lado, el estudio cualitativo mostró mejor adhesión de fibronectina en las muestras de PLGA. Estos hechos se pudieron comprobar mediante el estudio cuantitativo realizado con el kit MicroBCA®.

Por último, se determinó la tensión superficial de los materiales, observándose que cuanto mayor es la tensión superficial y, por consiguiente, mayor es la mojabilidad, mayor es también la adsorción de fibronectina en el material.

CAPÍTULO V

APROXIMACIÓN AL CO-CULTIVO CELULAR INDIRECTO DE LA ESTRUCTURA 3D. VIABILIDAD CELULAR DE LA LÍNEA L-929

El fin último de la estructura 3D de porosidad estratificada es permitir el co-cultivo celular para simular la membrana de filtración del tejido renal.

Por ello, en este último capítulo se ha llevado a cabo una primera aproximación empleando la línea celular L-929 para determinar, por un lado, si los materiales son adecuados para mantener las células en co-cultivo indirecto y, por otro lado, si son viables y no presentan citotoxicidad.

Introducción

El cultivo celular es fundamental en diversos ensayos en la investigación biomédica y preclínica. Esta técnica, que se encuentra en crecimiento debido al desarrollo de las terapias génicas, la genómica y la proteómica, puede emplearse para estudiar: (i) los efectos (citotoxicidad, genotoxicidad, mutagénesis y carcinogénesis) de sustancias químicas, (ii) los mecanismos de infección de virus y bacterias, al servir de hospederos, y (iii) las enfermedades y su desarrollo, que permiten la obtención de fármacos, vacunas y terapias celulares. Además, es un componente fundamental en la Ingeniería Tisular. [184]

Existen diferentes tipos de cultivos celulares:

- Cultivo de órganos: se coloca el órgano sobre una rejilla situada en la interfase líquido-gas de un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos. Permite mantener en parte la arquitectura característica del tejido *in vivo*, además de los tipos celulares diferenciados. Sin embargo, la proliferación es escasa y no se pueden propagar. Además, la cuantificación es difícil y la reproducibilidad es baja.
- Explantes primarios: se coloca un fragmento de tejido o de órgano en la interfase sólido-líquido de un soporte de vidrio o de plástico. Las células se adhieren a la superficie y las de la periferia del explante pueden migrar y proliferar por la superficie del soporte.
- Cultivo celular primario: es el más utilizado. Se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. En estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula y célula-ECM; sin embargo, presentan una elevada proliferación. Puede darse el cultivo en monocapa o en suspensión.
- Cultivos histotípicos y organotípicos: los histotípicos son cultivos de un solo tipo celular que consiguen alcanzar una elevada densidad celular, como ocurre en los tejidos; mientras que los organotípicos constan de varios tipos celulares que interactúan entre sí. El objetivo final de este tipo de cultivos es la creación *in vitro* de tejidos u órganos completamente funcionales que puedan ser utilizados en injertos o en trasplantes.

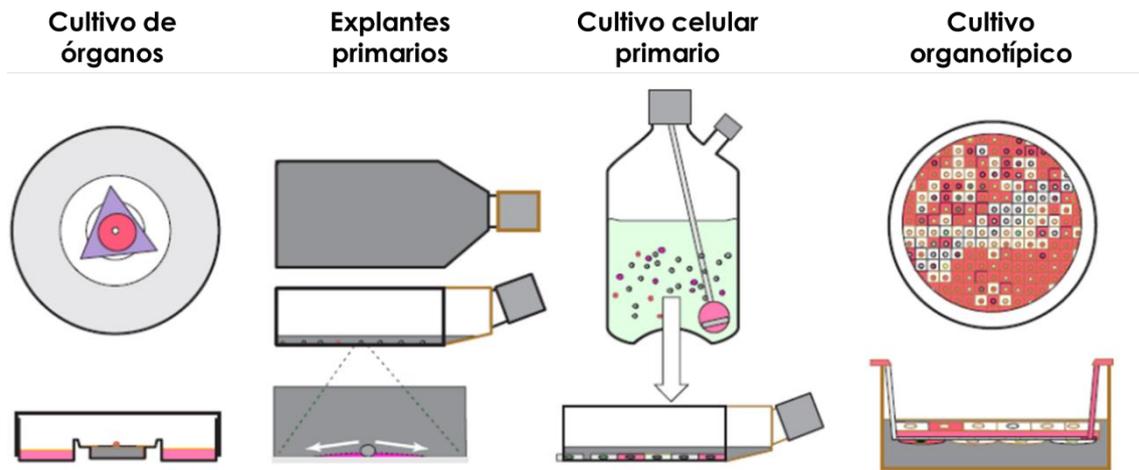


Figura 111. Tipos de cultivo celular. Modificado de [185]

Las características de cada uno de estos cultivos se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 25. Comparativa de los diferentes tipos de cultivo celular.

	Cultivo de órganos	Explantes primarios	Cultivo celular primario	Cultivo organotípico
<i>Origen</i>	órganos embrionarios, fragmentos de tejidos adultos	fragmentos de tejidos	tejido desagregado, cultivos primarios, líneas celulares propagadas	cultivos primarios o líneas celulares
<i>Dificultad</i>	elevada	moderada	baja	moderada
<i>Caracterización</i>	sencilla, por histología	citología y marcadores	bioquímica, molecular, inmunológica y citológica	histología, microscopía confocal o MRI
<i>Histología</i>	informativa	difícil	-	informativa
<i>Diferenciación</i>	posible	heterogénea	se pierde, pero se puede inducir	a veces se re-expresan
<i>Propagación</i>	no posible	posible	procedimientos estandarizados	solo después de la disociación
<i>Reproducibilidad</i>	muy baja	muy baja	elevada	elevada
<i>Cuantificación</i>	difícil	difícil	sencilla	puede requerir análisis por imagen

Dadas sus características, el tipo de cultivo celular más empleado hoy en día es el cultivo celular primario. Además, las líneas celulares más utilizadas son las de células madre

embrionarias (como la R1 o E14,1), las células epiteliales o semejantes (como la HeLa o la MDCK) y los fibroblastos (como la L929 o la 3T3).

Los fibroblastos

En la actualidad, los fibroblastos son las células más ampliamente utilizadas en investigación biomédica, fundamentalmente en regeneración de tejidos, empleándose en numerosos experimentos *in vitro*.

Se trata del tipo celular característico y más abundante del tejido conectivo, y su función principal es la síntesis y el mantenimiento de la matriz extracelular de dicho tejido.

Son células que presentan una forma y un tamaño variables dependiendo del órgano en el que se encuentren y su estado de actividad. En general, son células fusiformes o estrelladas con prolongaciones citoplasmáticas que pueden ser relativamente cortas y anchas, o bien largas, delgadas y muy ramificadas. En este último caso, los fibroblastos pueden estar en contacto unos con otros por uniones tiponexo o por contactos físicos simples. [186]

También interactúan con el resto de las células que hay en el tejido conectivo (neuronas, células musculares, células endoteliales, leucocitos, etc.) mediante contactos físicos directos, utilizando la ECM como intermediaria o mediante la secreción de sustancias.

Este tipo celular presenta numerosas funciones, siendo la más importante la síntesis y mantenimiento de todos los componentes de la ECM, tanto fibras de colágeno, como sustancias fundamentales (glucosaminoglucanos, proteoglicanos y glicoproteínas). Otras de las funciones que presenta son [187]:

- i. contribuye al mantenimiento de la homeostasis de la piel en adultos.
- ii. interviene en la organización estructural del tejido al que pertenecen, especialmente durante la embriogénesis, ya que exhiben contractilidad y motilidad.
- iii. interviene activamente en la cicatrización de heridas, gracias a su capacidad de sintetizar y fagocitar el colágeno y los componentes de la ECM, así como la producción de citoquinas con capacidad de promover la destrucción tisular y estimular la reabsorción ósea.
- iv. actúa en las primeras fases de la respuesta inmune.

Esta versatilidad hace que los fibroblastos sean una célula fácilmente manipulable en el laboratorio.

Sin embargo, para permitir la proliferación adecuada de las células se requiere que todo el material empleado, fundamentalmente los biomateriales que servirán de soporte, esté libre de microorganismos; así como aportar los nutrientes necesarios a través del medio de cultivo. Para ello, se deben esterilizar y/o desinfectar previamente a su uso en el cultivo celular y seleccionar el medio de cultivo adecuado.

Técnicas de esterilización y desinfección de materiales

De forma previa a desarrollar las diferentes técnicas que se emplean para la esterilización y desinfección de los materiales, se definen a continuación ambos términos [188]:

Esterilización: es el proceso mediante el cual se alcanza la muerte de todas las formas de vida microbianas, incluyendo bacterias y sus formas esporuladas altamente resistentes, hongos y sus esporas, y virus. Se entiende por muerte la pérdida irreversible de la capacidad reproductiva del microorganismo.

Desinfección: en este proceso se eliminan únicamente los agentes patógenos reconocidos, pero no necesariamente todas las formas de vida microbianas. Por tanto, es un término relativo, existiendo diversos niveles de desinfección.

En cuanto a las **técnicas de esterilización**, tenemos [189]–[191]:

Tratamientos físicos

- Por calor (húmedo o seco)

El tratamiento por calor es el más recomendado, y sólo cuando el material no pueda ser expuesto a elevada temperatura se usará otro método diferente.

i. Autoclave: la esterilización se lleva a cabo sometiendo el material a vapor de agua saturado, por lo que no debe sufrir hidrólisis. Generalmente, los ciclos de autoclave consisten en 121 °C durante 15-20 min o 132 °C durante 4 min, en esterilizador a vacío.

La ventaja de esta técnica es que no quedan residuos en el material; sin embargo, al requerirse el contacto directo con el agente esterilizante (vapor de agua saturado), el material debe cumplir una serie de requisitos.

- ii. Calor seco: consiste en introducir las muestras en un horno seco y aplicar un ciclo de temperatura. Típicamente se emplean 170 °C durante 60 min, 160 °C durante 120 min o 150 °C durante 150 min.

Ambos métodos no son indicados para los poliésteres, como la PCL y la PLA, debido a su temperatura de fusión.

- Por radiación (ionizante o no ionizante)

- i. Radiación gamma: es la radiación ionizante más empleada, con una elevada capacidad de penetración. La esterilización ocurre por la destrucción de los ácidos nucleicos, siendo la dosis estándar de 25 kGy en un rango de temperaturas de 30 a 40 °C.

La principal desventaja es que puede causar alteraciones en la estructura molecular del polímero debido a la rotura de cadenas, lo que daría lugar a un menor módulo elástico y una menor elongación.

- ii. Irradiación con haz de electrones: se trata también de radiación ionizante, aunque con menor penetración que la radiación gamma. La energía necesaria para la esterilización oscila entre 5 y 10 MeV y las dosis entre 10-60 kGy.

La tolerancia de los materiales a este tipo de radiación es mayor debido a que se pueden emplear dosis más elevada y, por tanto, se reducen los tiempos de exposición, reduciéndose los efectos oxidativos.

En fibras electrohiladas se ha observado que, aunque se mantiene la morfología y el diámetro de las fibras, el peso molecular decrece significativamente, así como la rugosidad de la superficie y el ángulo de contacto.

Tratamientos químicos

- i. Óxido de etileno: los parámetros típicos de este tratamiento son una concentración del gas de 450-1200 mg/l, un rango de temperatura de 37 a 63 °C, humedad relativa entre 40 y 80 %, y un tiempo de exposición de 1 a 6 h.

El óxido de etileno es un potente agente alquilante que desnaturaliza el ADN y las proteínas mediante la adición de grupos alquilo, interfiriendo en los procesos celulares normales. Aunque es un potente bactericida, esporicida y virucida, se trata

de un compuesto explosivo cuando se mezcla a ciertas concentraciones con el aire, y es inflamable y tóxico para los seres humanos. Además, puede quedar gas residual atrapado en el material, por lo que se necesita una desgasificación posterior.

En estudios con membranas de PLLA se ha observado la fusión de las fibras, y en membranas alineadas se desorientan las fibras. Por otro lado, *scaffolds* de PLGA sufrieron modificaciones en la morfología después de 4h de tratamiento con óxido de etileno a 37 °C, aunque no se alteró el peso molecular.

ii. Ácido peracético (PAA): mata las esporas bacterianas tras 15 s – 30 min de exposición a 500 – 10.000 ppm (0,05 – 1 %). Se trata de un fuerte oxidante que, mediante la transferencia de electrones oxida numerosos grupos químicos, incluidos los de las membranas celulares, iniciando la muerte celular.

La principal ventaja es que genera subproductos de baja toxicidad como agua, oxígeno y dióxido de carbono. Sin embargo, en membranas de PLGA se ha observado una reducción de al menos el 50 % del diámetro de fibras con 1000 ppm de PAA, y en membranas de PCL incluso a bajas concentraciones (100 ppm) se produjo fusión de las fibras.

iii. Plasma: se irradia peróxido de hidrógeno, que se transforma en radicales hidroxilo e hidroperoxilo, que atacan las estructuras de los microorganismos. El ciclo típico suele durar entre 28 y 75 min, en un proceso a temperatura inferior a 50 °C.

En membranas de PLLA se observó un incremento de la cristalinidad, sin verse afectada la morfología ni la composición química, mientras que en membranas de PCL aumentó el ángulo de contacto tras la esterilización.

iv. Ozono: el proceso aprobado por la FDA en 2003 consiste en un ciclo de 4,25 h a 30 – 35 °C.

En membranas de PLGA no se observó cambios en la morfología ni la composición química, así como tampoco se vieron alteradas las propiedades térmicas o la cristalinidad. Sin embargo, las propiedades mecánicas disminuyeron ligeramente tras 8 pulsos.

Por otro lado, son **técnicas de desinfección** las siguientes [189]–[191]:

Tratamientos físicos

- i. Radiación ultravioleta: el máximo efecto bactericida ocurre entre 240 y 280 nm, y depende del tiempo de exposición.

Tratamientos químicos

- i. Etanol: aunque no se considera un método de esterilización, sino de desinfección, muchos investigadores emplean esta técnica como una pre-esterilización antes de la siembra de células.

Produce la precipitación y desnaturalización de las proteínas, además de lesionar la membrana citoplasmática.

El etanol rectificado (95%) provoca una elevada deshidratación en los microorganismos, de manera que impide su penetración en los mismos. Por tanto, las concentraciones más efectivas son las que oscilan entre el 60 y 80 % en agua destilada, siendo la preparación más efectiva el 70 %. Concentraciones por debajo del 50 % no causan ningún efecto.

La técnica seleccionada debe mantener la estructura y las propiedades bioquímicas del material, garantizando así que los soportes cumplan las especificaciones para las que han sido desarrollados.

Otro factor importante a tener en cuenta cuando se realiza un cultivo celular es, como se ha comentado anteriormente, la elección del medio de cultivo.

Los medios de cultivo

Los medios de cultivo son soluciones compuestas por diferentes nutrientes que se requieren para una adecuada proliferación, morfología y fisiología de las células que se propagan en ellos. [192] Por tanto, los medios de cultivo deben seleccionarse en función de las células a cultivar.

El precursor de los medios de cultivo fue la solución salina balanceada desarrollada por Sidey Ringer en 1882, cuya composición precisa de sales permitió mantener el corazón de una rana

latiendo con una frecuencia normal por varias horas después de extraerlo del cuerpo del animal. [193]

Esta solución salina sólo permitía mantener vivas las células por un corto periodo de tiempo, por lo que el principal objetivo de muchos investigadores del s. XX fue encontrar un medio de cultivo que permitiera preservar las células con vida durante más tiempo, así como conseguir su proliferación.

De este modo, en 1907, Harrison empleó linfa, manteniendo vivas las células por varios días. Más tarde, en 1909, Burrows y Carrel sustituyeron la linfa por plasma y observaron que además de extender el período de cultivo, también se producía la proliferación de las células. Todo ello supuso el inicio del desarrollo de los medios de cultivo celular, que tuvo un gran avance gracias al grupo del Dr. Carrel y al matrimonio Lewis. Ellos formularon la solución Locke-Lewis, una mezcla de la solución salina Locke con aminoácidos, glucosa y otros nutrientes, y encontraron que, para obtener un crecimiento prolongado y una mayor multiplicación, era necesario agregar suplementos orgánicos. [194]

Con todo ello, en 1956, Harry Eagle realizó el primer estudio sistemático sobre los requerimientos nutricionales para el crecimiento de células de mamífero. Eagle trabajó con fibroblastos de ratón y células HeLa y vio que ambas líneas celulares podían ser propagadas en un medio basal que, aunque con mínimas diferencias entre ambas, consistía en una mezcla definida de aminoácidos, vitaminas, cofactores, carbohidratos y sales. Además, las mezclas debían ser suplementadas con una pequeña cantidad de proteínas séricas. Poco después, con base en sus resultados, Eagle desarrolló el Medio Esencial Mínimo (MEM). [195], [196]

Posteriormente, diversos grupos de investigación desarrollaron medios de cultivo con características particulares para tipos celulares específicos y modificaron los ya existentes para adaptarlos a las necesidades de sus estudios. Esto se realizó con el enriquecimiento de las soluciones con sustancias como la caseína, hemoglobina, insulina, tiroxina, glucosa, cisteína, hemina, peptona, plasma sanguíneo, glutatión, y vitaminas como la A, la B₁, la B₂ y el ácido ascórbico, entre otros. Un ejemplo muy conocido de esto es la mejora del MEM, convertido en DMEM por Renato Dulbecco, quien incrementó cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas. [197], [198]

Así pues, el auge de los cultivos celulares dio lugar al desarrollo de numerosos medios de cultivo, algunos de los más empleados hoy en día son:

- Medio Basal de Eagle (BME): aminoácidos esenciales.
- Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM): contiene más aminoácidos y en mayor concentración que el BME.
- RPMI 1640: medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas.
- Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM): contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el MEM.
- Modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM): es un medio muy completo que incluye en su formulación albúmina bovina, transferrina, etc.
- McCoy 5A: diseñado para el crecimiento de líneas celulares diploides.
- Medio L-15 de Leibovitz: utilizado para el cultivo de virus.
- Medio F-10 de Ham: para el crecimiento de líneas celulares humanas. Debe ser suplementado con proteínas y hormonas. Contiene Fe, Cu, Zn.
- Medio F-12 de Ham: útil para el crecimiento de líneas celulares con suplementos proteínicos.
- Medio 199: para el cultivo de células no diferenciadas y estudio de cromosomopatías.

Con todo ello, se realizó un cultivo celular de fibroblastos, seleccionando el método de esterilización/desinfección más adecuado para los materiales empleados (membranas electrohiladas y *scaffolds*), así como el medio de cultivo más favorable para el tipo celular seleccionado.

Materiales y métodos

Preparación de los materiales para el cultivo celular

Los ensayos de viabilidad celular fueron llevados a cabo en los diferentes materiales que componen la estructura final (membranas ES-1,8 y *scaffolds*) y la estructura 3D de porosidad estratificada que combina ambas, únicamente para el PLA. Se troqueló 3 muestras de cada

material, con un diámetro de 6 mm. Además, para las membranas se estudió también el efecto de la fibronectina (FN; de plasma humano, >95%, liofilizado; *Sigma-Aldrich*) a una concentración de 20 µg/ml, siendo también 3 el número de muestras de cada polímero.

Una vez troqueladas las muestras, se pusieron en una placa multipocillos p-48 y se cubrieron con etanol al 70 %, dejándolas 24h a temperatura ambiente. Los *scaffolds* se lavaron previamente de forma manual con etanol empleando una jeringa cargada con etanol al 70 %.

A continuación, se retiró el etanol y se dejaron secar las muestras en una campana de extracción. Una vez que las muestras estuvieron secas se dejaron 20 minutos con luz ultravioleta para asegurar la completa esterilización de los materiales.

Una vez se tuvo los materiales estériles, se preparó la disolución de fibronectina a una concentración de 20 µg/ml en DPBS (*Sigma Aldrich*).

Finalmente, se añadió 300 µl de fibronectina o DPBS, en función de la muestra, a todos los materiales, y se dejaron en una incubador a 37 °C durante 24h antes de la siembra.

Cultivo celular

La línea celular empleada para estos estudios fue la L-929 (fibroblastos de ratón).

De forma previa, se preparó medio de cultivo con la siguiente composición:

89 % medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, del inglés) con alto contenido en glucosa (*Biovest*).

10 % suero fetal bovino (FBS; *Sigma Aldrich*)

1 % penicilina/estreptomicina (*Gibco*)

Descongelación de las células

Las células se encontraban congeladas en un criovial en nitrógeno líquido a una concentración de 1×10^6 en 1,5 ml, que se atemperó a 37 °C hasta que se descongeló parcialmente.

Es importante evitar la descongelación total ya que la disolución celular tiene dimetilsulfóxido (DMSO; *Sigma Aldrich*) al 10 %v/v, que resulta citotóxico a temperatura ambiente.

A continuación, se añadió el 1,5 ml del criovial en 10 ml de medio previamente atemperado a 37 °C, y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Trascurrido este tiempo, se eliminó el sobrenadante y, posteriormente, se cultivó el poso de células en un flascón de 75 cm² con 10 ml de medio, y se introdujo en el incubador a 37°C y 5% de CO₂.

Expansión de la línea celular

Las células se dejaron expandir en el flascón, cambiando el medio cada 2 días; acondicionándolo previamente a 37 °C. Antes del cambio de medio se observaba al microscopio óptico para ver la cantidad de células, ya que se debía alcanzar un 80% de confluencia para realizar la siembra.

Siembra

Una vez se alcanzó el 80 % de confluencia, se procedió al conteo celular, para ajustar la densidad celular (4×10^4 células/cm²) y proceder a la siembra de los fibroblastos en los materiales. Para ello, se retiró el medio de cultivo del flascón y se añadió 2 ml de tripsina, que hace que las proteínas cadherinas – responsables de la unión célula-célula – y las proteínas integrinas – responsables de la unión célula-material – se vuelvan afuncionales, de modo que se consigue levantar las células del flascón. La tripsina se dejó actuar en el incubador a 37 °C durante 2 minutos. Trascurrido este tiempo, se añadió 10 ml de medio de cultivo para inactivar la actividad enzimática de la tripsina y se pasó a un tubo Falcon para centrifugarlo a 1000 rpm durante 5 minutos.

A continuación, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de medio de cultivo para recoger las células. Para facilitar el conteo, se realizó una dilución 1:2 y otra 1:10 y se tomaron 10 µl para poner en la cámara Neubauer.

Una vez determinada la cantidad de células, se preparó la disolución para tener la densidad celular deseada. Sobre las membranas se puso 40 µl de la disolución celular, y en los *scaffolds* se inyectó el volumen necesario con ayuda de una jeringa y una aguja de 26G. Por otro lado, para la siembra en la estructura 3D de porosidad estratificada, se puso 40 µl de la disolución celular en el fondo del pocillo, sobre ella se dispuso el material al que previamente se inyectó el volumen determinado en la parte del *scaffold*, y finalmente otros 40 µl sobre la membrana de la parte superior. Además, se sembró en pocillos vacíos para tener los controles positivo y negativo.

Para favorecer la adhesión celular sobre el material, se introdujo la placa con los materiales sembrados durante 2 h en el incubador y, a continuación, se añadió 200 μ l de medio de cultivo y se volvió a dejar en el incubador.

Estudio de la viabilidad celular

El estudio de viabilidad celular se realizó con el reactivo AlamarBlue® (*Thermo Fisher*), el cual permite cuantificar la actividad metabólica celular y, por consiguiente, determinar la concentración de células viables que hay en una muestra. Esto se consigue debido a que el AlamarBlue® tiene un compuesto redox, cuya forma oxidada es azul y no presenta fluorescencia, mientras que la forma reducida, que aparece debido al metabolismo celular, es de color rojo y presenta fluorescencia a 590 nm.

Dado que se trata de un compuesto estable y no citotóxico, permite el monitoreo continuo de los cultivos.

Con todo ello, se estudió la viabilidad celular en los días 1, 3, 5 y 7. Previamente, se añadió en los pocillos del control negativo DMSO ($\geq 99,9\%$; *Sigma Aldrich*), que es citotóxico, y se dejó actuar 15 minutos. Posteriormente, se preparó una disolución 1:9 de AlamarBlue® en medio de cultivo atemperado a 37 °C, se eliminó el medio de los pocillos de la placa de cultivo y se añadió 200 μ l a cada uno de ellos, incluyendo pocillos vacíos para el control neutro, dejándolo en el incubador durante 2 h. Transcurrido este tiempo, se tomó 100 μ l de cada uno de los pocillos y se puso en una placa multipocillos p-96 para su posterior lectura en el espectrofotómetro UV (*Victor*).

A continuación, se eliminó el contenido restante de AlamarBlue® de los pocillos y se añadió 200 μ l de medio de cultivo atemperado a 37 °C para mantener el cultivo, que se volvió a introducir en el incubador.

Por último, se llevó a cabo la lectura de la placa p-96 en el espectrofotómetro UV, haciendo dos medidas de absorbancia, una a 570 y otra a 600 nm, de las que se obtuvo la media.

Estudio de imagen de la adhesión celular

La adhesión celular se analizó también mediante técnica de imagen, empleando un microscopio de fluorescencia Eclipse 80i (*Nikon*). Para ello fue necesario preparar previamente las muestras una vez finalizado el ensayo de viabilidad celular.

En primer lugar, se retiró el medio de cultivo de la placa multipocillos y se lavaron los pocillos con DPBS. Posteriormente, se añadió paraformaldehído (*Panrea*) al 4 % v/v para fijar las células y se dejó actuar durante 20 minutos. A continuación, se lavó el formaldehído con una disolución de DPBS y azida sódica (*Sigma Aldrich*) al 0,05% m/v, y se retiró para cubrir los pocillos con una disolución de sacarosa (*Sigma Aldrich*) y agua miliQ al 30% m/v. Esta disolución se dejó actuar durante 2 horas.

Finalmente, se introdujo las muestras en O.C.T. (*Surgipath*), un compuesto que permite el corte de tejidos congelados, y se dejó 48 h en nevera y 24 h más en un congelador a -30 °C, siendo ésta la temperatura a la que se realizó los cortes de 15 µm en un criostato CM 1520 (*Leica*).

Una vez realizados los cortes, en una habitación oscura se cubrieron las muestras que iban a ser analizadas con faloidina 1:100 (Alexa Fluor™ 488; *Termo Fisher*) y se dejó actuar durante 15 minutos. Trascurrido este tiempo se realizó un lavado con DPBS y se añadió el medio de montaje Vectashield con 4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI; *Vector Laboratories*).

Resultados y discusión

Viabilidad celular

Los días 1, 3, 5 y 7 del cultivo celular se hicieron lecturas en el espectrofotómetro UV de la reducción del AlamarBlue® en cada material. Estos resultados se han representado en función del porcentaje respecto del control positivo, y se muestran a continuación:

Membranas ES-1,8 sin FN

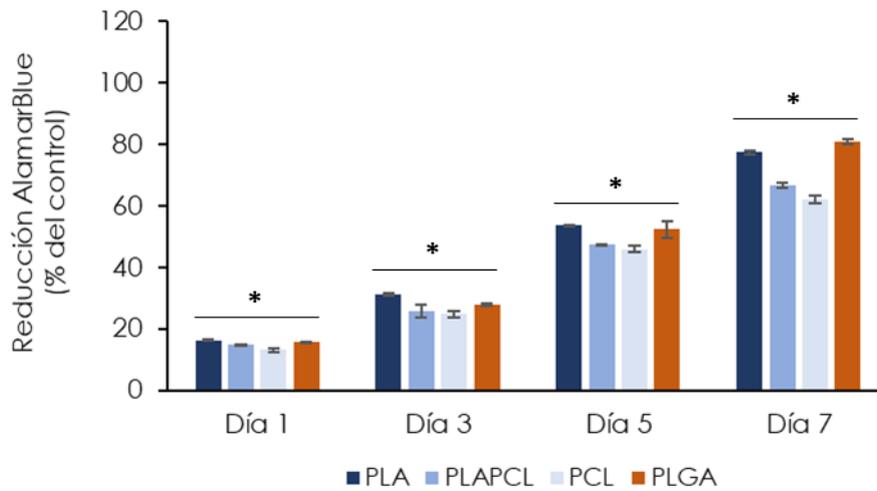


Figura 112. Porcentaje respecto del control positivo de la reducción del AlamarBlue® para las membranas ES-1,8 sin precondicionar con FN para el PLA, PLAPCL, PCL y PLGA. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como * p-valor < 0,05.

Membranas ES-1,8 con FN 20 µg/ml

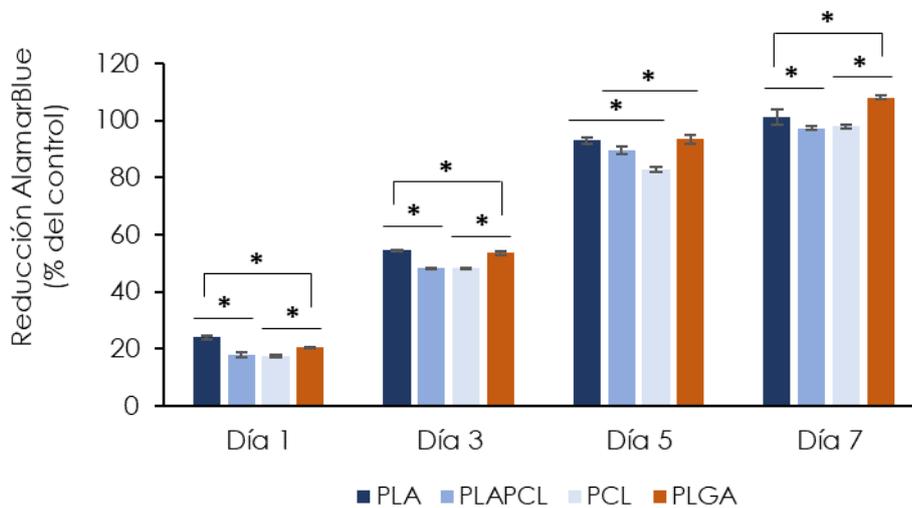


Figura 113. Porcentaje respecto del control positivo de la reducción del AlamarBlue® para las membranas ES-1,8 precondicionadas durante 24h con FN para el PLA, PLAPCL, PCL y PLGA. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como * p-valor < 0,05.

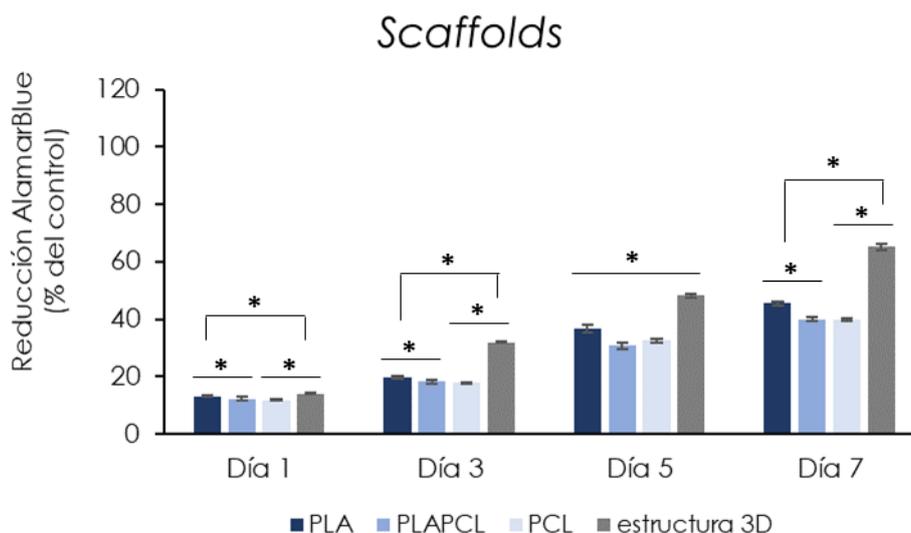


Figura 114. Porcentaje respecto del control positivo de la reducción del AlamarBlue® para los *scaffolds* de PLA, PLAPCL y PCL y la estructura 3D de PLA. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como * p-valor < 0,05.

Como puede verse en las figuras anteriores, todos los materiales permiten la proliferación celular de la línea L-929, siendo más favorables las membranas de PLA y PLGA que la PCL y PLAPCL, debido seguramente a la mayor hidrofiliidad que presentan los primeros. Estos resultados, además, están relacionados con la tensión superficial de cada uno de los poliésteres.

Por otro lado, la fibronectina permite una mayor proliferación celular en todos los materiales, destacando también el PLA y PLGA, ambos con una mayor adhesión de fibronectina (**Capítulo IV**).

En cuanto a los *scaffolds*, se observa un menor porcentaje de reducción, a excepción del sistema 3D tipo sándwich, ya que la cuantificación celular en las membranas es más sencilla al estar en contacto directo con el reactivo. En el caso de los *scaffolds* puede haber dificultad para penetrar en los poros y, además, el proceso de siembra es complejo.

Este estudio se completó con el análisis por microscopía de fluorescencia, en el que fue posible observar las membranas directamente, así como los cortes de los *scaffolds*.

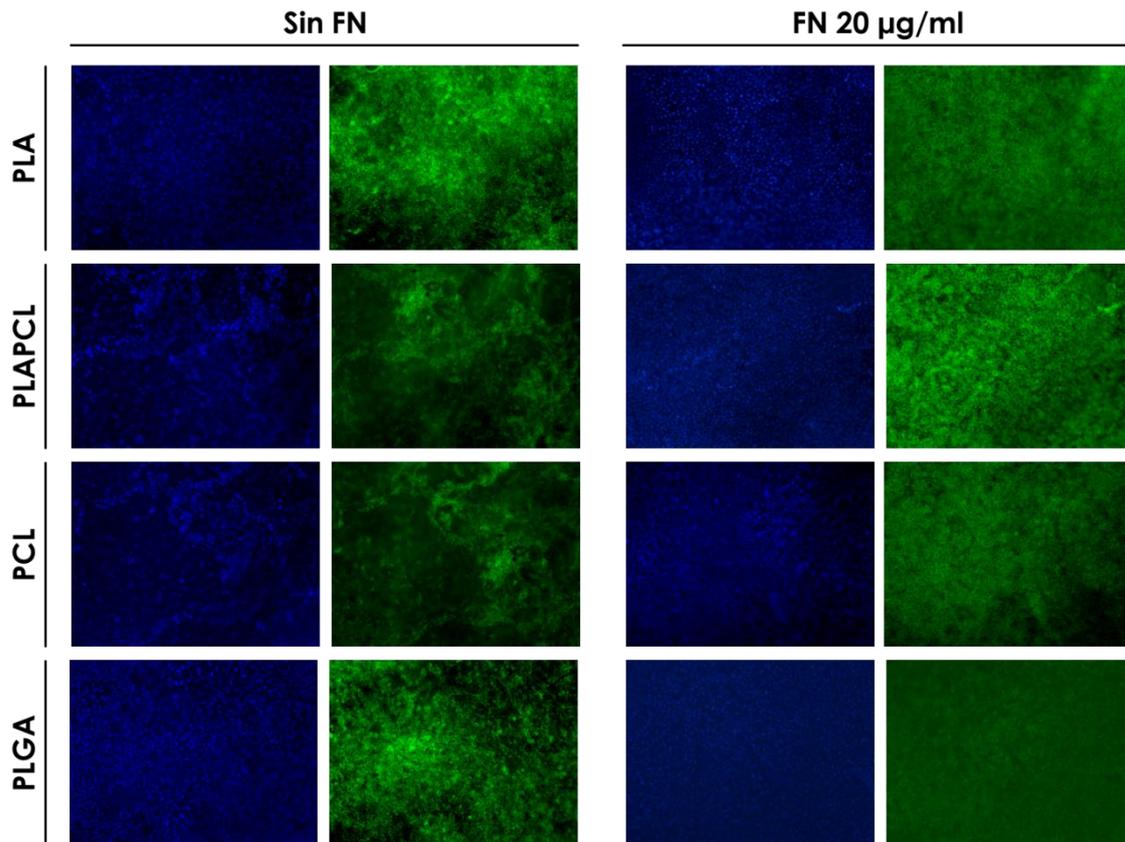


Figura 115. Imágenes de fluorescencia del núcleo (azul) y el citoesqueleto (verde) de los fibroblastos cultivados durante 7 días en las membranas ES-1,8 de PLA, PLAPCL, PCL y PLGA sin preconditionamiento con FN y con preconditionamiento a 20 $\mu\text{g/ml}$.

Como puede verse en la figura anterior, el preconditionamiento de las membranas con fibronectina a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ permite una mayor adhesión celular. Por otro lado, tal y como se determinó en estudios previos, la hidrofiliidad de las muestras parece favorecer la adhesión celular, dando lugar a un entorno celular tridimensional más favorable, teniendo todo ello relación con la tensión superficial de las membranas. [89]

Además, esta propiedad superficial también está relacionada con la adhesión de fibronectina, que se vio que era mayor para el PLA y el PLGA, por lo que también se observa mayor adhesión celular en estos materiales preconditionados.

Por último, los cortes de los *scaffolds* se observaron también en el microscopio de fluorescencia. En este caso se tomó imágenes de los núcleos de los fibroblastos para determinar si la estructura permite mantener en el interior las células, y así permitir el co-cultivo indirecto de dos tipos celulares diferentes.

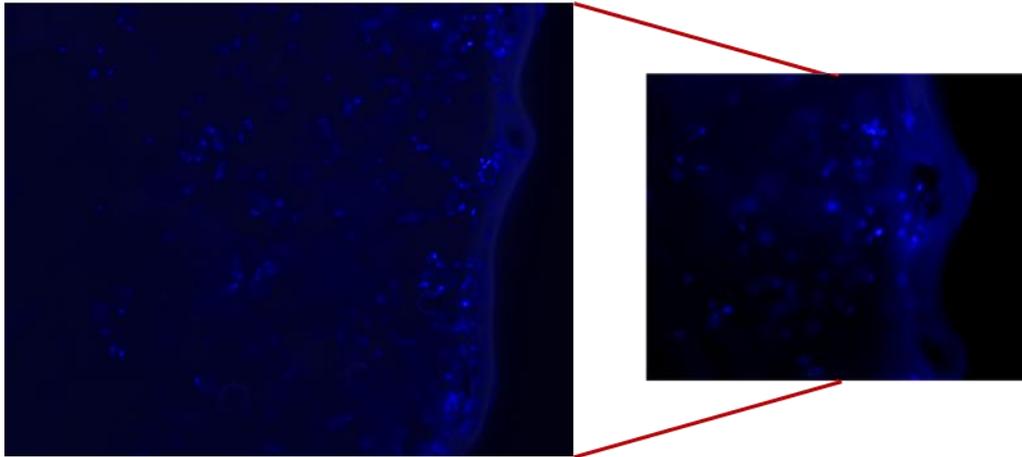


Figura 116. Imágenes de fluorescencia de los núcleos de fibroblastos en un *scaffold* de PLA. A la derecha se muestra la imagen ampliada.

En la Figura 116 se puede ver los núcleos de los fibroblastos cultivados en el interior del *scaffold* de PLA, en ella se observa que las células se mantienen en su interior, por lo que estas estructuras permiten el co-cultivo indirecto.

Por otro lado, se tiene una menor cantidad de células que para la membrana ES-1,8 de PLA, seguramente debido al proceso de siembra.

Como trabajo futuro se debería realizar un estudio de microscopía confocal con la estructura tridimensional, para determinar concretamente la adhesión celular en toda la estructura.

Conclusiones

De los resultados anteriores podemos concluir, en primer lugar, que todos los materiales empleados, tanto las membranas electrohiladas y *scaffolds*, como el sistema 3D de porosidad estratificada, son aptos para el cultivo celular, sin mostrar citotoxicidad durante los tiempos en los que se llevó a cabo el ensayo.

La proliferación celular de la línea L-929 es mayor en el PLA y PLGA, siendo estos los que mayor hidrofiliidad presentan, tanto en las membranas preacondicionadas como sin preacondicionar con fibronectina.

En el caso de las membranas preacondicionadas con fibronectina, se consigue una mayor proliferación celular, comprobándose el efecto que tiene esta proteína en el cultivo celular.

Por último, se ha visto que los *scaffolds* permiten albergar las células en su interior sin que estas puedan migrar y proliferar en el exterior de la estructura. Este hecho permite disponer de un sistema adecuado para el co-cultivo celular indirecto.

Conclusiones generales

Las conclusiones generales que se extraen de esta tesis doctoral son:

- Es posible obtener membranas electrohiladas de un tamaño de fibra determinado para diferentes poliésteres si se varían los principales parámetros del proceso, como son: la concentración polimérica, el disolvente, así como el voltaje o la distancia al colector, entre otros. Sin embargo, las propiedades de alguno de los polímeros, como el copolímero PCLGA, pueden dificultar el proceso, no siendo viable para su escalado si se requiere su uso en diferentes dispositivos.
- Con la técnica de evaporación del disolvente con lixiviación de partículas es posible obtener *scaffolds* con una elevada porosidad e interconectividad de los poros, lo que permite poder albergar células en su interior. Además, el tratamiento con plasma de estas estructuras permite electrohilar sobre ellas; sin embargo, este proceso requiere de poco espesor de la muestra, por lo que para obtener estructuras de porosidad estratificada es conveniente el uso de técnicas de fusión, en las que se emplea un polímero “de sacrificio” entre las membranas y el *scaffold*, que una vez fundido mantiene unidas ambas estructuras formando una estructura 3D tipo sándwich que puede emplearse en el co-cultivo celular indirecto.
- Las membranas electrohiladas pueden cargarse con fármacos o moléculas de interés de diferentes formas, como electrohilado coaxial o electrohilado en disolución. El uso de una u otra dependerá de las condiciones de la liberación que se busquen, ya que presentan diferentes perfiles al encontrarse la molécula dispuesta de forma diferente. Esto es así porque dependerá en mayor o menor medida de la degradación del polímero, que es mayor para el PLA y PLGA que para la PCL y PLAPCL. Además, también influye el medio, ya que un medio básico cataliza de forma considerable la degradación de los diferentes poliésteres.

- En función de las propiedades superficiales de los diferentes polímeros, se obtiene una mayor adhesión de proteína. En el caso de la fibronectina, ésta se adhiere en mayor proporción al PLA y PLGA, que presentan mayor hidrofiliidad, lo que favorecerá la proliferación celular en estos materiales cuando se precondicionen con ella.
- Todos los polímeros estudiados son viables para el cultivo celular de la línea L-929 de fibroblastos, observándose una mayor proliferación celular en las membranas precondicionadas con fibronectina, ya que es una molécula que favorece dicho mecanismo. Además, los *scaffolds* permiten que las células proliferen en su interior, evitando que estas migren al exterior, con lo que mediante la estructura 3D tipo sándwich se puede realizar un co-cultivo celular indirecto.

Con todo ello, todos los objetivos planteados al inicio han sido alcanzados.

Contribuciones

Publicaciones en congresos

Presentación póster: *PLA/PCL electrospun membranas of different fibres diameter as culture supports and delivery of albumin thereof.*

Autores: **Herrero-Herrero, Maria**; Vallés Lluch, Ana; Gómez-Tejedor, José-Antonio.

Nombre del congreso: European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2017 (Termis Eu 2017)

Presentación póster: *Characterization of electrospun membranes of P(LA-co-GA) and P(CL-co-GA).*

Autores: **Herrero-Herrero, Maria**; Herrero-Alarcón, Víctor; Vallés Lluch, Ana; Gómez-Tejedor, José-Antonio.

Nombre del congreso: 45th Annual European Society for Artificial Organs Congress (ESAO 2018)

Presentación póster: *Influence of fibre diameter and chemical composition of electrospun polyesters (PLA, PCL and their blend) intended as cell supports on the biological behaviour.*

Autores: Alberdi-Torres, S; **Herrero-Herrero, Maria**; Villar-Suárez, V; Vilariño, Guillermo; Gómez-Tejedor, José-Antonio; Vallés Lluch, Ana.

Nombre del congreso: 45th Annual European Society for Artificial Organs Congress (ESAO 2018)

Presentación póster: *Assessment of the parameters influencing the fibre characteristics of electrospun P(LA-co-GA) and P(CL-co-GA) membranes.*

Autores: **Herrero-Herrero, Maria**; Gómez-Tejedor, José-Antonio; Vallés Lluch, Ana.

Nombre del congreso: 29th European Conference on Biomaterials (ESB 2018)

Presentación póster: *Role of the main electrospinning parameters on electrospun membranes based on aliphatic co-polyesters as drug delivery systems.*

Autores: **Herrero-Herrero, Maria**; Martín-Cabezuelo, Rubén; Gómez-Tejedor, José-Antonio; Vallés Lluch, Ana.

Nombre del congreso: 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB 2019)

Publicaciones en revistas

Título: *PLA/PCL electrospun membranes of tailored fibres diameter as drug delivery systems.*

Autores: **Herrero-Herrero, Maria**; Gómez-Tejedor, José-Antonio; Vallés Lluch, Ana.

Año: 2018

Revista: Polymer Journal (99) 445-455

doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.12.045

Título: *Influence of chemistry and fiber diameter of electrospun PLA, PCL and their blend membranes, intended as cell supports, on their biological behavior.*

Autores: **Herrero-Herrero, Maria**; Sara, Alberdi-Torres; María Luísa, González-Fernández; Vilariño, Guillermo; Rodríguez-Hernández, Jose-Carlos; Vallés Lluch, Ana; Villar-Suárez, V.

Año: 2021

Revista: Polymer Testing (13)107364

doi: 10.1016/j.polymertesting.2021.107364

Título: *Role of electrospinning parameters on poly(lactic-co-glycolic acid) and poly(caprolactone-co-glycolic acid) membranes.*

Autores: **Herrero-Herrero, Maria**; Gómez-Tejedor, José-Antonio; Vallés Lluch, Ana.

Año: 2021

Revista: Polymers (13)695-706

doi: 10.3390/polym13050695

Bibliografía

- [1] J. . Bertomeu-Sánchez, “L’experimentació animal: un debat de llarga duració,” *Saber en acció*, 2021. .
- [2] F. Leyton, “Problemas bioéticos de la experimentación con animales no humanos.” pp. 1–15, 2010, [Online]. Available: <http://www.derechoanimal.info/images/pdf/FABIOLA-LEYTON-experimentacion-con-animales.pdf>.
- [3] G. Repetto, Álvarez Herrera, and A. del Peso, “Estrategias de identificación de planteamientos alternativos a la experimentación animal,” *Rev. Toxicol.*, vol. 31, no. 2, pp. 108–114, 2015.
- [4] R. A. Bustos and F. Valenzuela, “Evolución de aspectos bioéticos de la experimentación en animales: el origen del concepto ‘Cruelty free,’” *Rev. Chil. Dermatología*, vol. 33, no. 2, pp. 48–51, 2018, doi: 10.31879/rcderm.v33i2.136.
- [5] C. D. Edington *et al.*, “Interconnected Microphysiological Systems for Quantitative Biology and Pharmacology Studies,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–18, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-22749-0.
- [6] S. Calvo, “Cultivo de células en 3D. La nueva dimensión de los cultivos celulares,” *Cuad. del Tomas*, vol. 111, no. 2013, pp. 923–925, 2013, [Online]. Available: [file:///C:/Users/HP/Downloads/Dialnet-CultivoDeCelulasEn3D-4462495\(1\).pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/Dialnet-CultivoDeCelulasEn3D-4462495(1).pdf).
- [7] A. Dhaliwal, “3D Cell Culture: A Review,” *Mater. Methods*, pp. 1–22, 2015, [Online]. Available: <http://www.labome.com/method/3D-Cell-Culture-A-Review.html>.
- [8] N. K. Paschos, W. E. Brown, R. Eswaramoorthy, J. C. Hu, and K. A. Athanasiou, “Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 9, no. 5, pp. 488–503, 2015, doi: 10.1002/term.1870.

- [9] Y. M. Kook, Y. Jeong, K. Lee, and W. G. Koh, “Design of biomimetic cellular scaffolds for co-culture system and their application,” *J. Tissue Eng.*, vol. 8, 2017, doi: 10.1177/2041731417724640.
- [10] L. Liverani and A. R. Boccaccini, *Multilayered scaffolds for interface tissue engineering applications*. Elsevier Ltd, 2018.
- [11] R. Scaffaro, F. Lopresti, A. Maio, F. Sutura, and L. Botta, “Development of polymeric functionally graded scaffolds: A brief review,” *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.*, vol. 15, no. 2, pp. e107–e121, 2017, doi: 10.5301/jabfm.5000332.
- [12] A. Salerno, S. Iannace, and P. A. Netti, “Graded biomimetic osteochondral scaffold prepared via CO₂ foaming and micronized NaCl leaching,” *Mater. Lett.*, vol. 82, pp. 137–140, 2012, doi: 10.1016/j.matlet.2012.05.072.
- [13] G. Chen, T. Sato, J. Tanaka, and T. Tateishi, “Preparation of a biphasic scaffold for osteochondral tissue engineering,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 26, no. 1, pp. 118–123, 2006, doi: 10.1016/j.msec.2005.07.024.
- [14] L. Bi *et al.*, “Fabrication and characterization of a biphasic scaffold for osteochondral tissue engineering,” *Mater. Lett.*, vol. 65, no. 13, pp. 2079–2082, 2011, doi: 10.1016/j.matlet.2011.04.013.
- [15] H. Lee *et al.*, “Electrospun tri-layered zein/PVP-GO/zein nanofiber mats for providing biphasic drug release profiles,” *Int. J. Pharm.*, vol. 531, no. 1, pp. 101–107, 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.081.
- [16] M. B. Fisher, E. A. Henning, N. Söegaard, M. Bostrom, J. L. Esterhai, and R. L. Mauck, “Engineering meniscus structure and function via multi-layered mesenchymal stem cell-seeded nanofibrous scaffolds,” *J. Biomech.*, vol. 48, no. 8, pp. 1412–1419, 2015, doi: 10.1016/j.jbiomech.2015.02.036.
- [17] L. Liverani, J. A. Roether, P. Noeaid, M. Trombetta, D. W. Schubert, and A. R. Boccaccini, “Simple fabrication technique for multilayered stratified composite scaffolds suitable for interface tissue engineering,” *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 557, pp. 54–58, 2012, doi: 10.1016/j.msea.2012.05.104.
- [18] B. Huang *et al.*, “Engineered dual-scale poly (ϵ -caprolactone) scaffolds using 3D printing and rotational electrospinning for bone tissue regeneration,” *Addit. Manuf.*,

- vol. 36, no. February, p. 101452, 2020, doi: 10.1016/j.addma.2020.101452.
- [19] M. S. Shoichet, “Polymer scaffolds for biomaterials applications,” *Macromolecules*, vol. 43, no. 2, pp. 581–591, 2010, doi: 10.1021/ma901530r.
- [20] J. L. González-Carrasco, “Metals as bone repair materials,” in *Bone Repair Biomaterials*, 2009, pp. 154–193.
- [21] C. . Pérez Martínez, M. A. . Corella Madueño, T. del Castillo Castro, D. . Cenizales Rodríguez, and G. Palacios Careaga, “Biomateriales para aplicaciones biomédicas,” in *VII Congreso Estatal de Ciencias Exactas y Naturales y Enseñanza de las Ciencias*, 2019, vol. 1, pp. 47–59, [Online]. Available: http://www.congresociencias.uson.mx/MEMORIAS_CECEN_2019c.pdf#page=55.
- [22] J. . Wong, J. . Bronzino, and D. . Peterson, *Biomaterials. Principles and practices*, 1st Editio. CRC Press, 2013.
- [23] M. Vallet-Regí and A. J. Salinas, *Ceramics as bone repair materials*. Woodhead Publishing Limited, 2009.
- [24] A. M. Alfredo, “Los materiales y su biocompatibilidad: Hidroxiapatita,” *Mater. Av.*, vol. 3, pp. 44–48, 2005.
- [25] M. Flores-Reyes, M. S. Camarillo-Romero, J. Flores-Estrada, and M. V. Flores-Merino, “Sustitutos de piel poliméricos para el tratamiento de úlcera en pie diabético,” *Med. e Investig.*, vol. 3, no. 1, pp. 74–78, 2015, doi: 10.1016/j.mei.2015.02.006.
- [26] A. Vats, N. S. Tolley, J. M. Polak, and J. E. Gough, “Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: A review of clinical applications,” *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.*, vol. 28, no. 3, pp. 165–172, 2003, doi: 10.1046/j.1365-2273.2003.00686.x.
- [27] I. Manavitehrani, A. Fathi, H. Badr, S. Daly, A. N. Shirazi, and F. Dehghani, “Biomedical applications of biodegradable polyesters,” *Polymers (Basel)*, vol. 8, no. 1, 2016, doi: 10.3390/polym8010020.
- [28] K. Lee, K. U. K. R. O. Yoon, S. I. H. L. Woo, and I. S. Choi, “Surface Modification of Poly (glycolic acid) (PGA) for Biomedical Applications,” vol. 92, no. 5, pp. 933–937, 2003.

- [29] B. Tyler, D. Gullotti, A. Mangraviti, T. Utsuki, and H. Brem, "Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 107, pp. 163–175, 2016, doi: 10.1016/j.addr.2016.06.018.
- [30] K. Budak, O. Sogut, and U. Aydemir Sezer, "A review on synthesis and biomedical applications of polyglycolic acid," *J. Polym. Res.*, vol. 27, no. 8, 2020, doi: 10.1007/s10965-020-02187-1.
- [31] L. Serna C., A. Rodríguez de S., and F. Albán A., "Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones," *Ing. y Compet.*, vol. 5, no. 1, p. 16, 2011, doi: 10.25100/iyc.v5i1.2301.
- [32] P. Martínez and P. Marín, "Diseño y estudio de una máquina de electrospinning," 2009.
- [33] M. Labet and W. Thielemans, "Synthesis of polycaprolactone: A review," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 12, pp. 3484–3504, 2009, doi: 10.1039/b820162p.
- [34] T. Chen, T. Cai, Q. Jin, and J. Ji, "Design and fabrication of functional polycaprolactone," *E-Polymers*, vol. 15, no. 1, pp. 3–13, 2015, doi: 10.1515/epoly-2014-0158.
- [35] V. Sanko, I. Sahin, U. Aydemir Sezer, and S. Sezer, "A versatile method for the synthesis of poly(glycolic acid): high solubility and tunable molecular weights," *Polym. J.*, vol. 51, no. 7, pp. 637–647, 2019, doi: 10.1038/s41428-019-0182-7.
- [36] R. C. Dutta and A. K. Dutta, "Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 4, pp. 334–339, 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.02.002.
- [37] G. B. Dermer, "Another anniversary for the war on cancer," *Bio/Technology*, vol. 12, no. 3, p. 320, 1994, doi: 10.1038/nbt0394-320.
- [38] A. Ivascu and M. Kubbies, "Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis," *J. Biomol. Screen.*, vol. 11, no. 8, pp. 922–932, 2006, doi: 10.1177/1087057106292763.
- [39] A. Richard Kitching and H. L. Hutton, "The players: Cells involved in glomerular disease," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 11, no. 9, pp. 1664–1674, 2016, doi: 10.2215/CJN.13791215.

- [40] L. Wang and A. J. Ryan, "Introduction to electrospinning," *Electrospinning Tissue Regen.*, pp. 3–33, 2011, doi: 10.1533/9780857092915.1.3.
- [41] W. Gilbert, *De magnetis magneticisque corporibus, et de magno magnetis tellure (On the loadstone and magnetick bodies, and on the great magnet the Earth. A new physiology, demonstrated by many arguments and experiments)*. London, UK: D. Price, 1600.
- [42] D. Lukáš *et al.*, "Physical principles of electrospinning (electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century)," *Text. Prog.*, vol. 41, no. 2, pp. 59–140, 2009, doi: 10.1080/00405160902904641.
- [43] J. Anu Bhushani and C. Anandharamakrishnan, "Electrospinning and electrospaying techniques: Potential food based applications," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 38, no. 1, pp. 21–33, 2014, doi: 10.1016/j.tifs.2014.03.004.
- [44] M. Rahmati *et al.*, "Electrospinning for tissue engineering applications," *Prog. Mater. Sci.*, no. October 2016, p. 100721, 2020, doi: 10.1016/j.pmatsci.2020.100721.
- [45] A. Formhals, "Production of artificial fibers from fiber forming liquids," 2323025 A, 1943.
- [46] A. Formhals, "Method and apparatus for production of artificial fibers," 2158416 A, 1939.
- [47] J. Doshi and D. H. Reneker, "Electrospinning process and applications of electrospun fibers," *J. Electrostat.*, vol. 35, no. 2–3, pp. 151–160, 1995, doi: [https://doi.org/10.1016/0304-3886\(95\)00041-8](https://doi.org/10.1016/0304-3886(95)00041-8).
- [48] J. Zeleny, "Instability of electrified liquid surfaces," *Phys. Rev.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–6, 1917, doi: <https://doi.org/10.1103/PhysRev.10.1>.
- [49] J. Zeleny, "Electrical discharges from pointed conductors," *Phys. Rev.*, vol. 16, no. 2, pp. 102–125, 1920, doi: <https://doi.org/10.1103/PhysRev.16.102>.
- [50] L. M. Duque Sánchez, L. Rodríguez, and M. López, "Electrospinning: La era de las nanofibras," *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 14, no. 1, pp. 10–27, 2013.
- [51] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, and Y. Xia, "Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications," *Chem. Rev.*, vol. 119, no. 8, pp. 5298–5415, 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00593.

- [52] G. . Taylor, “Desintegration of water drops in an electric field,” *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.*, vol. 280, no. 1382, pp. 383–397, 1964, doi: <https://doi.org/10.1098/rspa.1964.0151>.
- [53] G. . Taylor, “Electrically driven jets,” *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 313, no. 1515, pp. 453–475, 1969, doi: <https://doi.org/10.1098/rspa.1969.0205>.
- [54] G. Yang, X. Li, Y. He, J. Ma, G. Ni, and S. Zhou, “From nano to micro to macro: Electrospun hierarchically structured polymeric fibers for biomedical applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 81, pp. 80–113, 2018, doi: [10.1016/j.progpolymsci.2017.12.003](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.12.003).
- [55] J. Tao and S. Shivkumar, “Molecular weight dependent structural regimes during the electrospinning of PVA,” *Mater. Lett.*, vol. 61, no. 11–12, pp. 2325–2328, 2007, doi: [10.1016/j.matlet.2006.09.004](https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.09.004).
- [56] H. Nie, A. He, J. Zheng, S. Xu, J. Li, and C. C. Han, “Effects of chain conformation and entanglement on the electrospinning of pure alginate,” *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 5, pp. 1362–1365, 2008, doi: [10.1021/bm701349j](https://doi.org/10.1021/bm701349j).
- [57] M. G. McKee, C. L. Elkins, and T. E. Long, “Influence of self-complementary hydrogen bonding on solution rheology/electrospinning relationships,” *Polymer (Guildf)*, vol. 45, no. 26, pp. 8705–8715, 2004, doi: [10.1016/j.polymer.2004.10.049](https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.10.049).
- [58] S. S. Ojha, M. Afshari, R. Kotek, and R. E. Gorga, “Morphology of electrospun Nylon-6 nanofibers as a function of molecular weight and processing parameters,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 108, pp. 308–319, 2008, doi: [10.1002/app](https://doi.org/10.1002/app).
- [59] J. M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, and N. C. Beck Tan, “The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles,” *Polymer (Guildf)*, vol. 42, pp. 261–272, 2001.
- [60] Z. Li and C. Wang, *One-Dimensional nanostructures. Electrospinning technique and unique nanofibers*. SpringerBriefs in Materials, 2013.
- [61] G. Eda and S. Shivkumar, “Bead-to-fiber transition in electrospun polystyrene,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 106, pp. 475–487, 2007, doi: [10.1002/app](https://doi.org/10.1002/app).
- [62] T. Uyar and F. Besenbacher, “Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity,” *Polymer (Guildf)*, vol. 49, no. 24, pp. 5336–5343, Nov. 2008, doi: [10.1016/j.polymer.2008.09.025](https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.09.025).

- [63] L. Wannatong, A. Sirivat, and P. Supaphol, “Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene,” *Polym. Int.*, vol. 53, no. 11, pp. 1851–1859, Nov. 2004, doi: 10.1002/pi.1599.
- [64] T. Jarusuwannapoom *et al.*, “Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers,” *Eur. Polym. J.*, vol. 41, no. 3, pp. 409–421, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2004.10.010.
- [65] M. M. Munir, A. B. Suryamas, F. Iskandar, and K. Okuyama, “Scaling law on particle-to-fiber formation during electrospinning,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 50, no. 20, pp. 4935–4943, 2009, doi: 10.1016/j.polymer.2009.08.011.
- [66] P. Heikkilä and A. Harlin, “Parameter study of electrospinning of polyamide-6,” *Eur. Polym. J.*, vol. 44, no. 10, pp. 3067–3079, 2008, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2008.06.032.
- [67] J. Geltmeyer, L. Van Der Schueren, F. Goethals, K. De Buysser, and K. De Clerck, “Optimum sol viscosity for stable electrospinning of silica nanofibres,” *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 67, no. 1, pp. 188–195, 2013, doi: 10.1007/s10971-013-3066-x.
- [68] C. J. Angamma and S. H. Jayaram, “Fundamentals of electrospinning and processing technologies,” *Part. Sci. Technol.*, vol. 34, no. 1, pp. 72–82, 2016, doi: 10.1080/02726351.2015.1043678.
- [69] Y. Xu, L. Zou, H. Lu, and T. Kang, “Effect of different solvent systems on PHBV/PEO electrospun fibers,” *RSC Adv.*, vol. 7, no. 7, pp. 4000–4010, 2017, doi: 10.1039/c6ra26783a.
- [70] F. Topuz, B. Satilmis, and T. Uyar, “Electrospinning of uniform nanofibers of Polymers of Intrinsic Microporosity (PIM-1): The influence of solution conductivity and relative humidity,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 178, no. June, p. 121610, 2019, doi: 10.1016/j.polymer.2019.121610.
- [71] T. Lin, *Nanofibers. Production, properties and functional applications*. Rijeka, Croatia: InTech, 2011.
- [72] H. Fong, I. Chun, and D. H. Reneker, “Beaded nanofibers formed during electrospinning,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 40, no. 16, pp. 4585–4592, 1999, doi:

- 10.1016/S0032-3861(99)00068-3.
- [73] A. K. Haghi and M. Akbari, "Trends in electrospinning of natural nanofibers," *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.*, vol. 204, no. 6, pp. 1830–1834, 2007, doi: 10.1002/pssa.200675301.
- [74] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, and B. Chu, "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes," *Polymer (Guildf)*, vol. 43, no. 16, pp. 4403–4412, 2002, doi: 10.1016/S0032-3861(02)00275-6.
- [75] G. Acik, C. E. Cansoy, and M. Kamaci, "Effect of flow rate on wetting and optical properties of electrospun poly(vinyl acetate) micro-fibers," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 297, no. 1, pp. 77–83, 2019, doi: 10.1007/s00396-018-4443-3.
- [76] A. S. Motamedi, H. Mirzadeh, F. Hajiesmaeilbaigi, S. Bagheri-Khoulenjani, and M. Shokrgozar, "Effect of electrospinning parameters on morphological properties of PVDF nanofibrous scaffolds," *Prog. Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 113–123, 2017, doi: 10.1007/s40204-017-0071-0.
- [77] J. Somsap, K. Kanjanapongkul, and R. Tepsorn, "Effect of parameters on the morphology and fibre diameters of edible electrospun chitosan-cellulose acetate-gelatin hybrid nanofibres," *MATEC Web Conf.*, vol. 192, 2018.
- [78] Y. Liu, L. Dong, J. Fan, R. Wang, and J. Y. Yu, "Effect of applied voltage on diameter and morphology of ultrafine fibers in bubble electrospinning," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 120, pp. 592–598, 2011, doi: 10.1002/app.
- [79] J. Y. Park, I. H. Lee, and G. N. Bea, "Optimization of the electrospinning conditions for preparation of nanofibers from polyvinylacetate (PVAc) in ethanol solvent," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 14, no. 6, pp. 707–713, 2008, doi: 10.1016/j.jiec.2008.03.006.
- [80] J. S. Lee *et al.*, "Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 93, no. 4, pp. 1638–1646, 2004, doi: 10.1002/app.20602.
- [81] A. H. Hekmati, A. Rashidi, R. Ghazisaefi, and J. Y. Dreon, "Effect of needle length, electrospinning distance, and solution concentration on morphological properties of polyamide-6 electrospun nanowebs," *Text. Res. J.*, vol. 83, no. 14, pp.

- 1452–1466, 2013, doi: 10.1177/0040517512471746.
- [82] R. Scarlet, L. R. Manea, I. Sandu, B. Cramariuc, and A. V. Sandu, “The Influence of the Needle - Collector Distance Upon the Characteristics of the Polyetherimide Nanofibres Obtained by Electrospinning,” *Rev. Chim.*, vol. 63, no. 8, pp. 777–782, 2012.
- [83] C. Kuchi, G. S. Harish, and P. S. Reddy, “Effect of polymer concentration, needle diameter and annealing temperature on TiO₂-PVP composite nanofibers synthesized by electrospinning technique,” *Ceram. Int.*, vol. 44, no. 5, pp. 5266–5272, 2018, doi: 10.1016/j.ceramint.2017.12.138.
- [84] A. S. Levitt, R. Vallett, G. Dion, and C. L. Schauer, “Effect of electrospinning processing variables on polyacrylonitrile nanoyarns,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 135, no. 25, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1002/app.46404.
- [85] J. Pelipenko, J. Kristl, B. Janković, S. Baumgartner, and P. Kocbek, “The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers,” *Int. J. Pharm.*, vol. 456, no. 1, pp. 125–134, 2013, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.078.
- [86] H. Fashandi and M. Karimi, “Pore formation in polystyrene fiber by superimposing temperature and relative humidity of electrospinning atmosphere,” *Polymer (Guildf)*, vol. 53, no. 25, pp. 5832–5849, 2012, doi: 10.1016/j.polymer.2012.10.003.
- [87] F. Huang, Q. Wei, J. Wang, Y. Cai, and Y. Huang, “Effect of temperature on structure, morphology and crystallinity of PVDF nanofibers via electrospinning,” *E-Polymers*, no. 152, pp. 1–8, 2008, doi: 10.1515/epoly.2008.8.1.1758.
- [88] G. Z. Yang, H. P. Li, J. H. Yang, J. Wan, and D. G. Yu, “Influence of Working Temperature on The Formation of Electrospun Polymer Nanofibers,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 12, no. 1, 2017, doi: 10.1186/s11671-016-1824-8.
- [89] M. Herrero-Herrero *et al.*, “Influence of chemistry and fiber diameter of electrospun PLA, PCL and their blend membranes, intended as cell supports, on their biological behavior,” *Polym. Test.*, vol. 103, no. September, 2021, doi: 10.1016/j.polymertesting.2021.107364.
- [90] M. Herrero-Herrero, J. A. Gómez-Tejedor, and A. Vallés-Lluch, “PLA/PCL

- electrospun membranes of tailored fibres diameter as drug delivery systems,” *Eur. Polym. J.*, vol. 99, no. January, pp. 445–455, 2018, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.12.045.
- [91] J.-R. Riba and B. Esteban, “A simple laboratory experiment to measure the surface tension of a liquid in contact with air,” *Eur. J. Phys.*, vol. 35, no. 5, p. 055003, 2014, doi: 10.1088/0143-0807/35/5/055003.
- [92] J. C. Earnshaw, E. G. Johnson, B. J. Carroll, and P. J. Doyle, “The drop volume method for interfacial tension determination: an error analysis,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 177, no. 1, pp. 150–155, 1996, doi: 10.1006/jcis.1996.0015.
- [93] R. D. García, “Instrumentos que revolucionaron la química: la historia del espectrofotómetro,” *Av. en Química*, vol. 13, no. 3, pp. 79–82, 2018, [Online]. Available: www.saber.ula.ve/avancesenquimicaAvancesenQuímica,13.
- [94] A. Subramanian and L. Rodriguez-Saona, *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*, 1st ed. Elsevier Inc., 2009.
- [95] AENOR, “UNE-EN ISO 11357-1: Plásticos, Calorimetría diferencial de barrido (DSC) Parte 1 : Principios generales,” 2017.
- [96] J. E. Mark, *Polymar Data Handbook*. Oxford Univeristy Press, 1999.
- [97] T. B. Bini, S. Gao, S. Wang, and S. Ramakrishna, “Poly(l-lactide-co-glycolide) biodegradable microfibers and electrospun nanofibers for nerve tissue engineering: An in vitro study,” *J. Mater. Sci.*, vol. 41, no. 19, pp. 6453–6459, 2006, doi: 10.1007/s10853-006-0714-3.
- [98] M. Mehrasa *et al.*, “Incorporation of mesoporous silica nanoparticles into random electrospun PLGA and PLGA/gelatin nanofibrous scaffolds enhances mechanical and cell proliferation properties,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 66, pp. 25–32, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.04.031.
- [99] N. Amariei, L. R. Manea, A. P. Berteau, A. Berteau, and A. Popa, “The Influence of Polymer Solution on the Properties of Electrospun 3D Nanostructures,” *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 209, no. 1, 2017, doi: 10.1088/1757-899X/209/1/012092.
- [100] Y. Liu, J. H. He, J. Y. Yu, and H. M. Zeng, “Controlling numbers and sizes of beads in electrospun nanofibers,” *Polym. Int.*, vol. 57, no. 4, pp. 632–636, 2008, doi:

- 10.1002/pi.2387.
- [101] C. J. Luo, E. Stride, and M. Edirisinghe, “Mapping the influence of solubility and dielectric constant on electrospinning polycaprolactone solutions,” *Macromolecules*, vol. 45, no. 11, pp. 4669–4680, 2012, doi: 10.1021/ma300656u.
- [102] Y. You, B. M. Min, S. J. Lee, T. S. Lee, and W. H. Park, “In vitro degradation behavior of electrospun polyglycolide, polylactide, and poly(lactide-co-glycolide),” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 95, no. 2, pp. 193–200, 2005, doi: 10.1002/app.21116.
- [103] C. Zhang, X. Yuan, L. Wu, Y. Han, and J. Sheng, “Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats,” *Eur. Polym. J.*, vol. 41, no. 3, pp. 423–432, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2004.10.027.
- [104] A. K. Moghe, R. Hufenus, S. M. Hudson, and B. S. Gupta, “Effect of the addition of a fugitive salt on electrospinnability of poly(ϵ -caprolactone),” *Polymer (Guildf)*, vol. 50, no. 14, pp. 3311–3318, 2009, doi: 10.1016/j.polymer.2009.04.063.
- [105] I. H. L. Pereira *et al.*, “Elaboration and characterization of coaxial electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibers for biomedical applications,” *Adv. Polym. Technol.*, vol. 33, no. S1, pp. 1–10, 2014, doi: 10.1002/adv.21475.
- [106] A. D. Petelska, K. Kazimierska-Drobny, K. Janicka, T. Majewski, and W. Urbaniak, “Understanding the unique role of phospholipids in the lubrication of natural joints: An interfacial tension study,” *Coatings*, vol. 9, no. 4, 2019, doi: 10.3390/coatings9040216.
- [107] A. Sohrabi, P. M. Shaibani, and T. Thundat, “The effect of applied electric field on the diameter and size distribution of electrospun Nylon6 nanofibers,” *Scanning*, vol. 35, no. 3, pp. 183–188, 2013, doi: 10.1002/sca.21044.
- [108] C. J. Thompson, G. G. Chase, A. L. Yarin, and D. H. Reneker, “Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model,” *Polymer (Guildf)*, vol. 48, no. 23, pp. 6913–6922, 2007, doi: 10.1016/j.polymer.2007.09.017.
- [109] A. Franck, “Viscoelasticity and dynamic mechanical testing. AN004,” New Castle, DE, USA, 1993.
- [110] J. Mirtič, H. Balažic, Š. Zupančič, and J. Kristl, “Effect of solution composition variables on electrospun alginate nanofibers: Response surface analysis,” *Polymers*

- (*Basel*), vol. 11, no. 4, 2019, doi: 10.3390/polym11040692.
- [111] A. A. Lach, H. L. Morris, J. A. Martins, E. T. Stace, A. J. Carr, and P. A. Mouthuy, “Pyridine as an additive to improve the deposition of continuous electrospun filaments,” *PLoS One*, vol. 14, no. 4, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0214419.
- [112] G. R. Williams, B. T. Raimi-Abraham, and C. J. Luo, *Nanofibres in drug delivery*. London, UK: UCL Press, 2018.
- [113] J. Coates, “Encyclopedia of Analytical Chemistry -Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach,” *Encycl. Anal. Chem.*, pp. 1–23, 2004, [Online]. Available: <http://www3.uma.pt/jrodrigues/disciplinas/QINO-II/Teorica/IR.pdf>.
- [114] D. R. Marques and L. Alberto, “Analysis of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)/ Poly (Isoprene) Polymeric Blend for Application as Biomaterial,” vol. 23, pp. 579–584, 2013.
- [115] M. Spasova, O. Stoilova, N. Manolova, I. Rashkov, and G. Altankov, “Preparation of PLLA/PEG nanofibers by electrospinning and potential applications,” *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 22, no. 1, pp. 62–76, 2007, doi: 10.1177/0883911506073570.
- [116] P. Deb, A. B. Deoghare, A. Borah, E. Barua, and S. Das Lala, “Scaffold Development Using Biomaterials: A Review,” *Mater. Today Proc.*, vol. 5, no. 5, pp. 12909–12919, 2018, doi: 10.1016/j.matpr.2018.02.276.
- [117] P. A. Villegas, “Para qué sirven las matrices 3D o Scaffolds,” in *Técnicas celulares y moleculares. II Simposio*, 2012, pp. 93–116.
- [118] M. A. Sabino, M. Loaiza, J. Dernowsek, R. Rezende, and J. V. L. Da Silva, “Técnicas para la fabricación de andamios poliméricos con aplicaciones en ingeniería de tejidos,” *Rev. Latinoam. Metal. y Mater.*, vol. 37, no. 2, pp. 120–146, 2017.
- [119] H. Janik and M. Marzec, “A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 48, pp. 586–591, 2015, doi: 10.1016/j.msec.2014.12.037.
- [120] M. S. Widmer *et al.*, “Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration,” *Biomaterials*, vol. 19, no. 21, pp. 1945–55, 1998.
- [121] F. P. W. Melchels, J. Feijen, and D. W. Grijpma, “A review on stereolithography and

- its applications in biomedical engineering,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 24, pp. 6121–6130, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.050.
- [122] I. Zein, D. W. Hutmacher, K. C. Tan, and S. H. Teoh, “Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 4, pp. 1169–1185, 2002, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00232-0.
- [123] O. Hakimi, P. A. Mouthuy, N. Zargar, E. Lostis, M. Morrey, and A. Carr, “A layered electrospun and woven surgical scaffold to enhance endogenous tendon repair,” *Acta Biomater.*, vol. 26, pp. 124–135, 2015, doi: 10.1016/j.actbio.2015.08.007.
- [124] T. Han, D. H. Reneker, and A. L. Yarin, “Pendulum-like motion of straight electrified jets,” *Polymer (Guildf)*, vol. 49, pp. 2160–2169, 2008.
- [125] Y. Filatov, A. Budyka, and V. Kirichenko, “Chapter 1,” in *Electrospinning of micro- and nanofibers: fundamentals in separation and filtration processes*, Begelhouse, 2007.
- [126] G. Tiwari *et al.*, “Drug delivery systems: An updated review,” *Int. J. Pharm. Investig.*, vol. 2, no. 1, p. 2, 2012, doi: 10.4103/2230-973x.96920.
- [127] J. Doménech and E. Escribano, “Preparados orales de cesión modificada: cinética,” in *Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen II*, J. Doménech, J. Martínez, and J. . Plà, Eds. Madrid: Síntesis, 1998, pp. 317–347.
- [128] A. Arredondo Peñaranda and M. E. Londoño López, “Hidrogeles: Potenciales Biomateriales Para La Liberación Controlada De Medicamentos,” *Rev. Ing. Biomédica*, vol. 3, no. 5, pp. 83–94, 2009, doi: 10.24050/19099762.n5.2009.70.
- [129] K. J. Gandhi, S. V. Deshmane, and K. R. Biyani, “Polymers in pharmaceutical drug delivery system: A review,” *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 14, no. 2, pp. 57–66, 2012.
- [130] J. Gómez Pinto, “Nanopartículas de curcumina: Estrategias y aplicaciones,” *MoleQla Rev. Ciencias la Univ. Pablo Olavide*, vol. 23, pp. 11–14, 2016, [Online]. Available: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5680540>.
- [131] S. Shishodia, M. . Chaturvedi, and B. . Aggarwal, “Role of curcumin in cancer therapy,” *Curr. Probl. Cancer*, vol. 4, no. 31, pp. 243–305, 2008.
- [132] A. . Begum *et al.*, “Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer’s Disease,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 1, no.

- 326, pp. 196–208, 2008.
- [133] X. Gao *et al.*, “Immunomodulatory activity of curcumin: Suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production in vitro,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 68, no. 1, pp. 51–61, 2004, doi: 10.1016/j.bcp.2004.03.015.
- [134] Ž. Jakopin, “Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) inhibitors: A rational approach toward inhibition of NOD signaling pathway,” *J. Med. Chem.*, vol. 57, no. 16, pp. 6897–6918, 2014, doi: 10.1021/jm401841p.
- [135] K. S. Bhullar, A. Jha, D. Youssef, and H. P. V. Rupasinghe, “Curcumin and its carbocyclic analogs: Structure-activity in relation to antioxidant and selected biological properties,” *Molecules*, vol. 18, no. 5, pp. 5389–5404, 2013, doi: 10.3390/molecules18055389.
- [136] M. E. Egan *et al.*, “Curcumin, a Major Constituent of Turmeric, Corrects Cystic Fibrosis Defects,” *Science (80-.)*, vol. 304, no. 5670, pp. 600–602, 2004, doi: 10.1126/science.1093941.
- [137] J. González-Albadalejo, D. Sanz, R. M. Claramunt, J. L. Lavandera, I. Alkorta, and J. Elguero, “Curcumina y curcuminoides: Química, estudios estructurales y propiedades biológicas,” *An. la Real Acad. Nac. Farm.*, vol. 81, no. 4, pp. 278–310, 2015.
- [138] J. G. León *et al.*, “Caracterización Y Estudio De Liberación De Curcumina Cargada En Microfibras De Acido Polilactico,” *Rev. la Fac. Ciencias*, vol. 9, no. 1, pp. 125–141, 2020, doi: 10.15446/rev.fac.cienc.v9n1.81966.
- [139] A. K. Blakney, E. A. Krogstad, Y. H. Jiang, and K. A. Woodrow, “Delivery of multipurpose prevention drug combinations from electrospun nanofibers using composite microarchitectures,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 2967–2978, 2014, doi: 10.2147/IJN.S61664.
- [140] A. K. Blakney, C. Ball, E. A. Krogstad, and K. A. Woodrow, “Electrospun fibers for vaginal anti-HIV drug delivery,” *Antiviral Res.*, vol. 100, no. SUPPL., pp. S9–S16, 2013, doi: 10.1016/j.antiviral.2013.09.022.
- [141] P. Anand, A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman, and B. B. Aggarwal,

- “Bioavailability of curcumin: Problems and promises,” *Mol. Pharm.*, vol. 4, no. 6, pp. 807–818, 2007, doi: 10.1021/mp700113r.
- [142] R. C. Owens and A. F. Shorr, “Rational dosing of antimicrobial agents: Pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies,” *Am. J. Heal. Pharm.*, vol. 66, no. 12 SUPPL. 4, pp. 23–30, 2009, doi: 10.2146/090087d.
- [143] S. F. Chou, D. Carson, and K. A. Woodrow, “Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers,” *J. Control. Release*, vol. 220, pp. 584–591, 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.09.008.
- [144] M. Buzgo, A. Mickova, M. Rampichova, and M. Doupnik, *Blend electrospinning, coaxial electrospinning, and emulsion electrospinning techniques*. Elsevier Ltd, 2018.
- [145] J. Tsung and D. J. Burgess, “Biodegradable polymers in drug delivery systems,” in *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery. Advances in delivey science and technology*, J. Sipemann, R. Siegel, and M. Rathbone, Eds. Boston: Springer, 2012, pp. 107–123.
- [146] D. Aradilla Zapata, R. Oliver Pujol, and F. Estrany Coda, “Biodegradable polymers: an alternative of future to the sustainability of the environment,” *Técnica Ind.*, vol. 297, pp. 76–80, 2012, [Online]. Available: <http://www.tecnicaindustrial.es/TIAdmin/Numeros/82/889/a889.pdf>.
- [147] C. S. Ha and J. A. Gardella, “Surface chemistry of biodegradable polymers for drug delivery systems,” *Chem. Rev.*, vol. 105, no. 11, pp. 4205–4232, 2005, doi: 10.1021/cr040419y.
- [148] A. Shababdoust, M. Zandi, M. Ehsani, P. Shokrollahi, and R. Foudazi, “Controlled curcumin release from nanofibers based on amphiphilic-block segmented polyurethanes,” *Int. J. Pharm.*, vol. 575, no. July 2019, p. 118947, 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118947.
- [149] G. E. Park, M. A. Pattison, K. Park, and T. J. Webster, “Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 16, pp. 3075–3082, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.08.005.
- [150] J. H. Jung, M. Ree, and H. Kim, “Acid- and base-catalyzed hydrolyses of aliphatic polycarbonates and polyesters,” *Catal. Today*, vol. 115, no. 1–4, pp. 283–287, 2006,

- doi: 10.1016/j.cattod.2006.02.060.
- [151] M. E. Castaño, “Cultivos celulares.pdf.” p. 18, 2012, [Online]. Available: <http://200.24.23.197/index.php/biogenesis/article/viewFile/158/158>.
- [152] U. N. A. y a D. UNAD, “Capítulo 2. Ciclo y cultivos celulares,” in *fundamentos de citogenética humana y animal*, .
- [153] O. W. Merten, “Advances in cell culture: Anchorage dependence,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 370, no. 1661, 2015, doi: 10.1098/rstb.2014.0040.
- [154] J. Sebastian Saavedra Torres, L. Fernanda Zúñiga Cerón, J. Alfonso Vásquez-López, C. Alberto Navia Amézquita, L. Patricia Mosquera Sánchez, and S. Isabel Freyre Bernal, “La matriz extracelular: un ecosistema influyente en la forma y comportamiento de las células,” vol. 7, no. 1, pp. 12–35, 2015.
- [155] S. Lucena, C. L. Arocha Piñango, and B. Guerrero, “Fibronectina. Estructura y funciones asociadas a la hemostasia. Revisión,” *Invest. Clin.*, vol. 48, no. 2, pp. 249–262, 2007.
- [156] A. J. Zollinger and M. L. Smith, “Fibronectin, the extracellular glue,” *Matrix Biol.*, vol. 60–61, pp. 27–37, 2017, doi: 10.1016/j.matbio.2016.07.011.
- [157] D. F. Mosher, “Physiology of fibronectin,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 35, pp. 561–575, 1984.
- [158] F. Grinnell and M. K. Feld, “Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium,” *J. Biol. Chem.*, vol. 257, no. 9, pp. 4888–4893, 1982.
- [159] L. Renner, T. Pompe, K. Salchert, and C. Werner, “Fibronectin displacement at polymer surfaces,” *Langmuir*, vol. 21, no. 10, pp. 4571–4577, 2005.
- [160] A. L. Koenig, V. Gambillara, and D. W. Grainger, “Correlating fibronectin adsorption with endothelial cell adhesion and signaling on polymer substrates,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 64, no. 1, pp. 20–37, 2003, doi: 10.1002/jbm.a.10316.
- [161] E. Grigoriou, M. Cantini, M. J. Dalby, A. Petersen, and M. Salmeron-Sanchez, “Cell migration on material-driven fibronectin microenvironments,” *Biomater. Sci.*, vol. 5,

- no. 7, pp. 1326–1333, 2017, doi: 10.1039/c7bm00333a.
- [162] J. Carlos *et al.*, “Conformación de proteínas sobre materiales soporte para terapias regenerativas,” pp. 9–10, 2008.
- [163] K. Norrman, A. Ghanbari-Siahkali, and N. B. Larsen, “Studies of spin-coated polymer films,” *Annu. Reports Prog. Chem. - Sect. C*, vol. 101, pp. 174–201, 2005, doi: 10.1039/b408857n.
- [164] N. Sahu, B. Parija, and S. Panigrahi, “Fundamental understanding and modeling of spin coating process: A review,” *Indian J. Phys.*, vol. 83, no. 4, pp. 493–502, 2009, doi: 10.1007/s12648-009-0009-z.
- [165] M. D. Tyona, “A theoretical study on spin coating technique,” *Adv. Mater. Res.*, vol. 2, no. 4, pp. 195–208, 2014.
- [166] G. C. Sarti and Æ. À, *Encyclopedia of Membranes*. 2016.
- [167] U. of Louisville, S. E. Spincoating, and B. Science, “Spin coating theory,” 2013.
- [168] G. Binning and C. F. Quate, “Atomic Force Microscope,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, no. 9, pp. 930–933, 1986, doi: 10.1201/9781420075250.
- [169] B. Cappella, *Mechanical Properties of Polymers Measured through AFM Force-Distance Curves*. 2016.
- [170] A. Giannetti, J. Revilloud, and C. Verdier, “Mechanical properties of 3D tumor spheroids measured by AFM,” *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.*, vol. 23, no. sup1, pp. S125–S127, 2020, doi: 10.1080/10255842.2020.1816297.
- [171] Y. Abidine, V. M. Laurent, R. Michel, A. Duperray, and C. Verdier, “Local mechanical properties of bladder cancer cells measured by AFM as a signature of metastatic potential,” *Eur. Phys. J. Plus*, vol. 130, no. 10, 2015, doi: 10.1140/epjp/i2015-15202-6.
- [172] A. Liebig, P. Hapala, A. J. Weymouth, and F. J. Giessibl, “Quantifying the evolution of atomic interaction of a complex surface with a functionalized atomic force microscopy tip,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-71077-9.
- [173] E. A. López and S. D. Solares, “El microscopio de fuerza atómica: métodos y

- aplicaciones,” *Rev. la Univ. del Val. Guatemala*, no. September, pp. 14–28, 2014.
- [174] M. C. R. Gonzáles and J. Castellon-Urbe, “Microscopio de Fuerza Atómica,” *Eninvié*, p. 6, 2005.
- [175] D. Xu, G. D. Watt, J. N. Harb, and R. C. Davis, “Electrical conductivity of femtin proteins by conductive AFM,” *Nanomater. Lett.*, vol. 5, pp. 571–577, 2005.
- [176] A. Alexeev, J. Loos, and M. Koetse, “Nanoscale electrical characterization of semiconductive polymer blends by c-AFM Ultramicroscopy,” *Ultramicroscopy*, vol. 106, pp. 191–199, 2006.
- [177] J. Ubbink and P. Schär-Zammaretti, “Probing bacterial interactions: Integrated approaches combining atomic force microscopy, electron microscopy and biophysical techniques,” *Micron*, vol. 36, no. 4, pp. 293–320, 2005, doi: 10.1016/j.micron.2004.11.005.
- [178] P. Parot *et al.*, “Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine,” *J. Mol. Recognit.*, vol. 20, pp. 418–431, 2007.
- [179] R. García, R. Magerle, and R. Pérez, “Nonscale compositional mapping with gent forces,” *Nat. Matter*, vol. 6, pp. 405–411, 2007.
- [180] T. Sengupta and J. H. Han, “Surface chemistry of foo, packaging, and biopolymer materials,” in *Innovations in Food Packaging*, 2014, pp. 51–87.
- [181] P. C. Sukanek, “Spin coating,” *J. Imaging Technol.*, vol. 11, no. 4, pp. 184–190, 1985.
- [182] C. W. Extrand, “Spin coating of very thin polymer films,” *Polym. Eng. Sci.*, vol. 34, no. 5, pp. 390–394, 1994.
- [183] T. G. van Kooten, H. T. Spijker, and H. J. Busscher, “Plasma-treated polystyrene surfaces: model surfaces for studying cell-biomaterial interactions,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 10, pp. 1735–1747, 2004.
- [184] J. Morales, A. Ulloa, S. Castro, C. Centeno, and L. A. Calvo, “Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos : Aplicaciones en Biomedicina Cell Culture and Tissue Engineering : Biomedical Applications,” vol. 32, pp. 56–65, 2019.
- [185] U. del P. Vasco, “Introducción Al Cultivo Celular,” 2015.
- [186] M. Megías, P. Molist, and M. A. Pombal, “Atlas de histología vegetal y animal. Tipos

- celulares,” <http://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/listado.php>, 2019. .
- [187] A. P. Acosta Gómez, “El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto,” *Univ. Odontológica*, vol. 25, pp. 26–33, 2006.
- [188] M. J. Miller, “A comprehensive review of the revised European Pharmacopoeia Chapter 5.1.6 (part two),” *Eur. Pharm. Rev.*, vol. 22, no. 6, pp. 27–30, 2017.
- [189] K. Pérez Moreno and A. Espitia Posada, “Selección de un agente entrecruzante que mejore la adhesividad en medio húmedo y simplifique el proceso de esterilización de un adhesivo óseo,” Colombia, 2015.
- [190] C. F. Rediguieri, R. C. Sassonia, K. Dua, I. S. Kikuchi, and T. de Jesus Andreoli Pinto, “Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering,” *Eur. Polym. J.*, vol. 82, pp. 181–195, 2016, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2016.07.016.
- [191] Z. Dai, J. Ronholm, Y. Tian, B. Sethi, and X. Cao, “Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications,” *J. Tissue Eng.*, vol. 7, 2016, doi: 10.1177/2041731416648810.
- [192] G. . Espinosa-Ayala, C. Rivas-Morales, K. Arévalo-Niño, D. . Oranday-Cárdenas, J. Castro-Garza, and P. Carranza-Rosales, “Diseño de un medio de cultivo para células de mamífero utilizando fuentes alternativas de nitrógeno y vitaminas,” *Rev. Mex. Ing. química*, vol. 6, no. 3, pp. 243–249, 2007.
- [193] D. Delgadillo, “Cultivos celulares: reducción histórica en el uso de animales de laboratorio,” *Rev. Fesabanccal*, vol. 7, no. 1, pp. 17–24, 2021.
- [194] G. W. Corner, *Warren Harmon Lewis 1870-1964. A bibliographical memoir*. National Academy of Sciences, 1967.
- [195] H. Eagle, “Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture,” *Science (80-.)*, vol. 122, no. 3168, pp. 501–504, 1955.
- [196] H. Eagle, “Amino acid metabolism in mammalian cell cultures,” *Science (80-.)*, vol. 122, pp. 432–437, 1959.
- [197] R. Dulbecco and G. Freeman, “Plaque production by the polyoma virus,” *Virology*, vol. 8, no. 3, pp. 396–397, 1959.

- [198] T. Yao and Y. Asayama, “Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues,” *Reprod. Med. Biol.*, vol. 16, no. 2, pp. 99–117, 2017.