



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

DISEÑO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE MICROESFERAS DE COPOLÍMEROS BASADOS EN EL ACRILATO DE ETILO POR ELECTROSPRAY

AUTORA: ANA BELÉN RAMOS MULERO

TUTOR: JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

COTUTOR: JOSÉ ANTONIO GÓMEZ TEJEDOR

Curso Académico: 2015-16

Agradecimientos

“Quiero agradecer, en esta ocasión, todo el apoyo y el cariño prestado de mi familia, mi pareja y mis amigos. Sin ellos, esto no hubiera sido posible. Del mismo modo, no puedo olvidar a mis compañeras, que en estos cuatro años han sido mi segunda familia y uno de mis principales pilares. Gracias a todos los grandes docentes por los que hoy estoy aquí y, por supuesto, gracias a mis tutores por haberme brindado esta gran oportunidad y por haberme prestado tanta ayuda y por aportarme tantos conocimientos de la maravillosa ciencia de los polímeros”.

Índice

1. OBJETIVOS DEL TRABAJO.	13
2. INTRODUCCIÓN AL PROBLEMA.	15
2.1. Antecedentes.	15
2.2. Motivación.	16
2.3. Justificación del TFG.	17
3. INTRODUCCIÓN. ESTADO DEL ARTE.	19
3.1. Microesferas. Aplicaciones y métodos.	19
3.2. Acrilatos y materiales utilizados en electrohilado y electroespray.	22
3.3. Electroespray en distintos materiales.	23
3.4. Diseño Ortogonal de Taguchi.	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	27
4.1. Preparación de P(EA-EMA-AA).	27
4.2. Disoluciones.	28
4.3. Métodos empleados.	28
4.4. SEGURIDAD.	29
5. RESULTADOS.	31
5.1. Puesta a punto del dispositivo.	31
5.2. Ensayos previos para el Diseño Ortogonal de Taguchi.	37
5.3. Diseño experimental.	46
6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	51
7. NORMATIVA.	63
7.1. Reactivos químicos y equipos de protección individual.	63
7.2. Gestión de residuos.	63
8. PRESUPUESTO.	65
9. CONCLUSIONES.	69
10. BIBLIOGRAFÍA.	71
11. ANEXOS.	75
ANEXO I. SEGURIDAD ELÉCTRICA DEL EQUIPO DE ELECTROESPRAY.	75

Resumen

El proyecto consiste en la optimización de los parámetros del proceso de producción por electroespray para obtener partículas de copolímeros de acrilato de etilo, metacrilato de etilo y ácido acrílico con forma esférica y diámetros comprendidos entre 1 y 10 micras. La aplicación en la que están pensadas estas partículas es la fabricación de microgeles para cultivos celulares. Se emplearán herramientas de diseño de experiencias para optimizar la distribución de tamaños de partícula, tomando como parámetros de diseño la concentración de la disolución de partida, la relación entre los disolventes utilizados, el campo eléctrico aplicado, la velocidad de flujo y la distancia entre la aguja y el colector. Se caracterizará la morfología de las partículas por microscopía electrónica.

Palabras clave: electroespray, acrilato de etilo, microesferas, microgel

Resum

El projecte consisteix en l'optimització dels paràmetres del procés de producció per electroespray per a obtindre partícules de copolímers d'acrilat d'etil, metacrilat d'etil i àcid acrílic amb forma esfèrica i diàmetres compresos entre 1 i 10 microns. L'aplicació en què estan pensades estes partícules és la fabricació de microgels per a cultius cel·lulars. S'empraran ferramentes de disseny d'experiències per a optimitzar la distribució de grandàries de partícula, prenent com a paràmetres de disseny la concentració de la dissolució de partida, la relació entre els dissolvents utilitzats, el camp elèctric aplicat, la velocitat de flux i la distància entre l'agulla i el col·lector. Es caracteritzarà la morfologia de les partícules per microscòpia electrònica.

Paraules clau: electroespray, acrilat d'etil, microesferes, microgel

Abstract

The project consist in the optimization of the parameters of the production process by electrospray to obtain particles of copolymers of ethyl acrylate, ethyl methacrylate and acrylic acid with spherical shape and diameters between 1 and 10 microns. The application in which these particles are intended is the manufacture of microgels for cell cultures. Design of experiences tools will be employed to optimize the distribution of particle sizes, using as design parameters the concentration of the starting solution, the ratio of the solvents used, the applied electric field, the flow rate and the distance between the needle and the collector. The particle morphology will be characterized by electron microscopy.

Keywords: electrospray, ethyl acrylate, microspheres, microgel

1. OBJETIVOS DEL TRABAJO.

Este Trabajo Final de Grado (TFG) formará parte de un proyecto de investigación realizado en conjunto por el *Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (Universitat Politècnica de València)* y el *Hospital “La Fe” (Valencia)*.

El principal objetivo de este TFG es diseñar el proceso de obtención de microesferas de copolímeros basados en acrilato de etilo mediante electroespray, combinando los parámetros que influyen en el proceso para obtener la morfología final deseada de las partículas. Estos parámetros son la distancia entre la aguja y el colector, la velocidad de flujo, el campo eléctrico aplicado, la concentración de la disolución y los disolventes empleados.

En segundo lugar, se pretende optimizar los parámetros influyentes en dicho proceso mediante técnicas de diseño de experiencias para obtener partículas esféricas del tamaño deseado. En este caso, se utilizará el método de *Diseño Ortogonal de Taguchi*.

2. INTRODUCCIÓN AL PROBLEMA.

2.1. Antecedentes.

El grupo de investigación del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la UPV colabora con el IIS La Fe en el proyecto: *“Desarrollo de entornos tridimensionales biomiméticos para el cultivo de células de mieloma”*, financiado dentro del programa “Ayudas para el desarrollo de proyectos de innovación coordinados entre investigadores de la Universitat Politècnica de València e investigadores del Hospital Universitari i Politècnic/ Instituto de Investigación Sanitaria La Fe”. En el desarrollo de este proyecto se han preparado microesferas de los materiales objetivo de este TFG por técnicas de emulsión. En este trabajo pretendemos disminuir en tamaño de las partículas obtenidas para que sean del orden de los tamaños moleculares, empleando para ello la técnica de electroespray. Mediante esa técnica se han preparado con anterioridad en el CBIT microesferas de otros polímeros que se han ensayado en cultivos de células mesenquimales de médula ósea (Correia et al., 2014; Gómez Ribelles et al., 2016).

2.2. Motivación.

He escogido este Trabajo Final de Grado por mi interés hacia el amplio campo que abarca la ciencia de los polímeros. Con el transcurso de los años en los que he estado estudiando el *Grado en Ingeniería Química*, he ido adquiriendo los conocimientos básicos que han determinado mi interés por los polímeros.

Durante el segundo curso, realicé la asignatura de *Química Orgánica*, la cual despertó mi curiosidad. En este último curso, he tenido la oportunidad de realizar dos asignaturas que han determinado mis propósitos futuros: *Ingeniería de Polímeros y Biopolímeros* y *Laboratorio Integrado de Polímeros y Biomateriales*. Con ellas, he adquirido los conceptos básicos de los polímeros así como su aplicabilidad en el ámbito de la medicina y la industria, con lo que he aprendido que los polímeros son sustancias muy importantes en nuestra vida cotidiana, debido a la gran diversidad de usos que tienen. Por otra parte, he encontrado la motivación necesaria para querer seguir perfeccionando mis conocimientos sobre la ciencia de los polímeros.

Además, puedo decir que, desde un principio, mi principal fin ha sido realizar un trabajo final de grado que aportase algún beneficio a la sociedad. En este caso, el TFG forma parte de un proyecto de investigación cuyo primordial objetivo es avanzar en las investigaciones del cáncer que es, por desgracia, una enfermedad cada vez más frecuente. Mi principal motivación es que este proyecto tenga éxito y poder ayudar a todas aquellas personas que sufren esta grave enfermedad.

Por estas razones, he puesto todo el empeño en adquirir los conocimientos necesarios y obtener resultados eficientes para que mi trabajo pueda servir de ayuda a este proyecto de investigación en un futuro próximo.

2.3. Justificación del TFG.

Este Trabajo Final de Grado forma parte de un proyecto de investigación conjunta realizado por el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tissular (Universidad Politécnica de Valencia) y el Hospital “La Fe” (Valencia).

El análisis de ciertas células cancerosas suele presentar complicaciones debido a su dificultad de proliferación *in vitro*, como ocurre con las células plasmáticas malignas. Esto pone de manifiesto la necesidad de crear un microambiente adecuado para que se produzca la proliferación *in vitro* de este tipo de células. De esta manera, se podría estudiar *in vitro* el efecto de los fármacos disponibles sobre las células del propio paciente, y poder predecir así la eficacia que presentará el tratamiento que se pretende aplicar, empleando el más favorable y reduciendo los efectos secundarios adversos.

Este proyecto de investigación se centra en el mieloma múltiple, que es el cáncer de sangre más frecuente. Se trata de un trastorno neoplásico que se caracteriza por la proliferación anormal de células plasmáticas en la médula ósea, produciendo dolor de huesos y fracturas y, en algunos casos, otros síntomas en múltiples órganos (Kyle et al., 2003).

El objetivo de este trabajo es producir microesferas, formadas por un copolímero basado en el acrilato de etilo. Las microesferas que se van a producir pueden ser funcionalizadas, y formarán parte de un entorno tridimensional de cultivo de células tumorales, que pretende asemejarse lo máximo posible al entorno real para facilitar la proliferación celular de las células plasmáticas malignas, y así poder llevar a cabo la práctica de la medicina personalizada.

Las partículas se producirán mediante la técnica de electroespray (Guarino, Altobelli, Cirillo, Cummaro, & Ambrosio, 2015), y deberán tener forma esférica y diámetros comprendidos entre 1 y 10 micras, ya que el tamaño ha de ser aproximado o menor que el de las células plasmáticas cancerígenas, para que estas así se adapten sin problema al medio y proliferen.

Una vez que se hayan establecido las condiciones para producir microesferas del tamaño adecuado, se procederá a determinar los parámetros óptimos del proceso de obtención de dichas partículas utilizando el método de *Diseño Ortogonal de Taguchi* (Silva et al., 2014), una herramienta de diseño de experiencias para optimizar la distribución de tamaños de partícula, tomando como parámetros de diseño la concentración de la disolución de partida y el disolvente utilizado, el campo eléctrico aplicado, la velocidad de flujo y la distancia entre la aguja y el colector (Guarino et al., 2015).

Durante todo el proceso, se caracterizará la morfología de las partículas que se han ido obteniendo mediante microscopía óptica y electrónica.

3. INTRODUCCIÓN. ESTADO DEL ARTE.

3.1. Microesferas. Aplicaciones y métodos.

Las microesferas proporcionan una amplia gama de aplicaciones en diversos campos. Se pueden producir de diversos materiales como polímeros, cerámicas o metales, e incluso se han fabricado microesferas compuestas con núcleo orgánico y cubierta polimérica y viceversa (Ma, Gu, Ma, & Ma, 2002).

Si nos referimos a micropartículas poliméricas, muchas de sus aplicaciones se sitúan en la ingeniería biomédica para sistemas de administración controlada de fármacos y, cada vez más, como soportes para la expansión y diferenciación celular. Se ha visto que los soportes tridimensionales formados por micropartículas poliméricas promueven una mayor proliferación celular que los andamiajes tradicionales (Correia et al., 2014). Por ejemplo, se han producido microesferas de gelatina, de un diámetro alrededor de 10 micras, que formaron parte de un soporte tridimensional para el cultivo de condrocitos (García Cruz, Sardinha, Escobar Ivirico, Mano, & Gómez Ribelles, 2013).

Se han utilizado diversas técnicas para la producción de microesferas de materiales poliméricos. Entre las más populares podemos encontrar las siguientes: emulsión y electroespray (Bock, Woodruff, Hutmacher, & Dargaville, 2011).

En cuanto a la emulsión, se trata de una dispersión de dos o más líquidos parcial o totalmente inmiscibles (Aranberri, Binks, Clint, & Fletcher, 2006). Una disolución de un polímero o un monómero se emulsiona formando microgotas en un medio en el que es insoluble. Posteriormente se aíslan las microesferas obtenidas tras la eliminación de los disolventes (Bock et al., 2011). Este método presenta dos alternativas:

- Una primera opción es polimerizar el copolímero in situ mediante emulsión. De este modo, se obtendrían directamente microesferas. Sin embargo, este proceso presenta como desventaja la presencia de residuos tóxicos de monómeros, lo cual no se puede permitir ya que la aplicación de las microesferas tiene carácter biológico.
- La segunda alternativa sería también emulsión, pero en este caso se utilizaría directamente el copolímero, polimerizado previamente. La diferencia de este método respecto al anterior es que, en este caso, no se obtienen residuos de monómeros.

La técnica de electroespray consiste en la formación de partículas a partir de una disolución de polímero, que se hace pasar a través de una jeringuilla a cuya aguja se conecta un electrodo con un alto voltaje. El líquido se dispersa en gotas debido a la fuerza del campo eléctrico (Jaworek & Sobczyk, 2008). En la Figura 1 se observa un esquema del montaje convencional. El dispositivo consta de una jeringuilla con una aguja de un diámetro determinado a la que se conecta el electrodo positivo, y un colector al que se conecta el electrodo negativo, creando de este modo una diferencia de potencial entre el colector y la aguja. En el caso de la *Figura 1*, se utiliza una placa colectora vertical a la que se ha conectado uno de los electrodos.

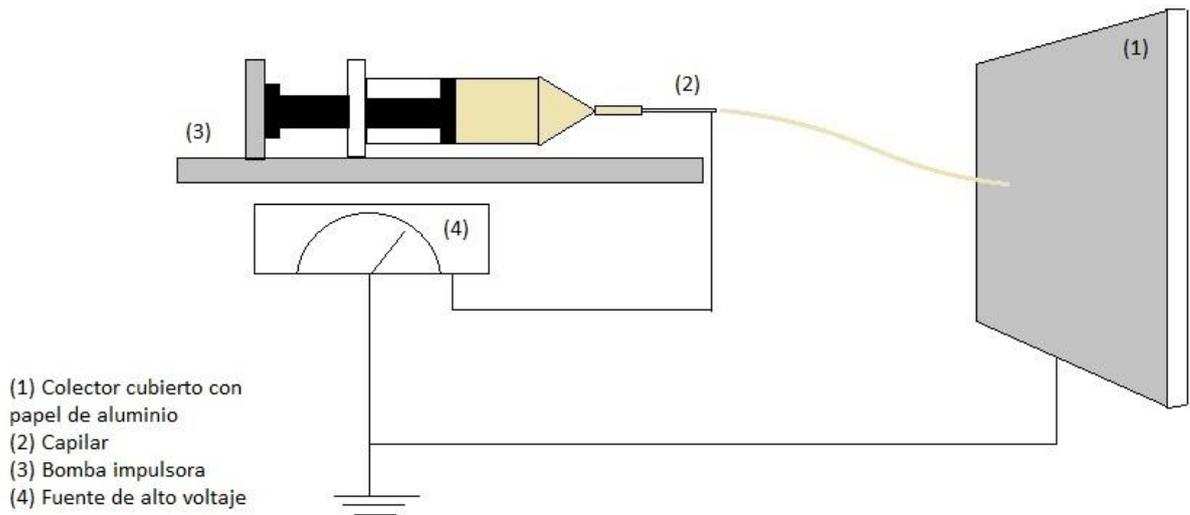


Figura 1. Esquema del montaje de electroespray con placa metálica como colector.

Durante el trayecto de la disolución desde la aguja al colector, el disolvente se evapora, siempre y cuando los parámetros de diseño sean los adecuados. De este modo, se obtienen partículas secas y puras, sin necesidad de lavados posteriores u otros tratamientos. Entre los parámetros que hay que controlar para una correcta evaporación del disolvente encontramos la velocidad de flujo, que no puede ser demasiado elevada para que el disolvente tenga tiempo suficiente para evaporarse. Por otro lado, también es importante controlar la distancia entre la aguja y el colector, por la misma razón que antes. Si esta distancia es muy pequeña, el disolvente no se evaporará en su totalidad y esto provocaría morfologías inadecuadas de las partículas, aglomeraciones de estas o tamaños superiores, etc. (Guarino et al., 2015).

Conforme aumenta el potencial aplicado, las fuerzas electrostáticas producen una modificación de la forma esférica de la gota en la punta del capilar, produciendo una forma cónica denominada como cono de Taylor (Taylor, 1964). Cuando el potencial aplicado alcanza un valor tal que supera la tensión superficial del líquido, la superficie del líquido se hace inestable y desde la punta del cono de Taylor, el líquido sale en forma de chorro, y esto permite que el proceso de electroespray tenga lugar, ya que a partir de ese chorro se formarán las gotas que posteriormente darán lugar a las partículas (Deitzel et al., 1999).

Hay que encontrar las condiciones del proceso adecuadas para obtener un cono de Taylor estable. La formación del chorro del cono así como el proceso de electroespray en general, son difíciles de controlar debido a los numerosos factores de los que dependen, como los parámetros del proceso (velocidad de flujo, campo eléctrico, diámetro de la aguja, distancia entre la aguja y el colector) y los propios de la disolución (viscosidad, conductividad, tensión superficial) (Yu, Ahn, & Lee, 2016). En la siguiente figura se observa la formación del cono de Taylor y el chorro en una disolución en electroespray.

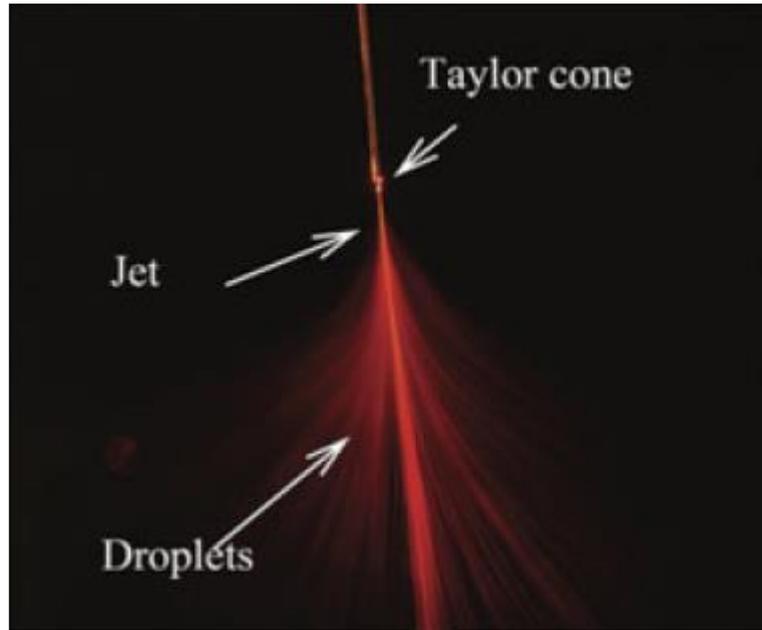


Figura 2. Esquema electroespray con formación del cono de Taylor (Xie & Wang, 2007).

Rayleigh predijo un límite, el límite de Rayleigh (L_R), para determinar la ruptura de la gotita, expresado en la ecuación (1). Este límite depende de q la carga eléctrica de la superficie de la gota, ϵ la permitividad del medio, γ la tensión superficial de líquido y R el radio de la gota. La carga máxima de la superficie de la gota viene dada por la ecuación (2), donde ϵ_0 es la permitividad del vacío (Bock et al., 2011; Rayleigh, 1882; Zeleny, 1914).

$$L_R = q64\pi^2\epsilon\gamma R^3 \quad (1)$$

$$q = 8\pi\sqrt{\epsilon_0\gamma R^3} \quad (2)$$

Es esencial hacer referencia al modo en que los entrelazamientos de cadenas influyen sobre la morfología final de las partículas. Los entrelazamientos son uniones físicas entre cadenas de polímeros producidas por solapamientos. El número de entrelazamientos aumenta con el peso molecular del polímero. Los entrelazamientos se comportan de manera similar a entrecruzamientos químicos, aunque las cadenas se pueden desplazar unas a otras afectando al comportamiento viscoelástico (Shenoy, Bates, Frisch, & Wnek, 2005).

La concentración de la disolución de polímero influye en el régimen de entrelazamientos que establece la formación de partículas o fibras. La concentración crítica de solapamiento de cadenas, C_{ov} , indica el punto en que la concentración de la disolución es igual a la concentración dentro del radio de giro de cada cadena individual y, de acuerdo con la ecuación (3), es inversamente proporcional a la viscosidad intrínseca, η . Cuando la concentración no supera este valor, no hay cadenas entrelazadas, lo que se conoce como

régimen diluido. El régimen semi-diluido se da cuando la concentración es superior a C_{ov} , donde las cadenas se solapan pero solo se observa algún entrelazamiento. La técnica de electroespray normalmente se lleva a cabo en un régimen semi-diluido donde se pueden producir partículas sólidas y densas (Bock, Dargaville, & Woodruff, 2012).

$$C_{ov} \propto \frac{1}{\eta} \quad (3)$$

La técnica de electrohilado es un método similar al electroespray, que produce fibras en lugar de microesferas. Se basa en los mismos principios que el electroespray, pero en este caso a partir del cono de Taylor se forma un chorro de disolución que se estira formando fibras en lugar de gotitas como ocurría con el electroespray. Anteriormente se ha definido la concentración crítica de solapamiento de cadenas, con la que se puede establecer el proceso que va a tener lugar, es decir, electrohilado o electroespray. Si el objetivo es producir fibras, la relación C/C_{ov} tiene que superarse, siendo C la concentración de polímero, mientras que para que se produzca electroespray, se requiere una baja densidad de entrelazamientos de cadenas (Bock et al., 2011).

Es preferente optar por electroespray en lugar de emulsión para cumplir nuestro objetivo, que es la producción de microesferas con el tamaño adecuado. Una de las razones para la elección del electroespray como método, es la pureza de las microesferas finales. En cuanto a la emulsión, en los dos casos que se han mencionado, se requiere una posterior eliminación del disolvente y limpieza para obtener las microesferas libres del medio en el que se han suspendido, a diferencia del electroespray, donde las partículas se obtienen puras, ya que el disolvente se evapora en el trayecto entre la aguja y la placa colectora.

Con el método de emulsión se pueden obtener nanopartículas, pero al tener un tamaño tan pequeño, los lavados y la purificación de las micropartículas obtenidas es difícil de realizar y, además, se puede perder material durante este procedimiento.

Por tanto, mientras que con emulsión el rendimiento del proceso resulta bajo, con electroespray se puede alcanzar el objetivo que buscamos, producir microesferas del tamaño adecuado con un mayor rendimiento.

3.2. Acrilatos y materiales utilizados en electrohilado y electroespray.

En primer lugar, es fundamental señalar que los poliacrilatos son muy usados en aplicaciones médicas, por ejemplo en hidrogeles o lentes de contacto (Cortés, Díaz, & Perilla, 2008), así como para encapsular moléculas terapéuticas (Gómez-Gaete, 2014). Su uso se debe a que son bioestables y no biodegradables.

En el trabajo de Pérez Olmedilla et al. (2006) se emplearon copolímeros formados por acrilato de etilo y metracrilato de hidroxietilo como sustrato para la adhesión celular y proliferación de condrocitos humanos cultivados in vitro.

Por otra parte, los poliacrilatos han sido empleados numerosas ocasiones para la producción de sistemas tridimensionales o andamiajes. Un ejemplo de soportes formados

por poliacrilatos, es el estudio realizado por Campillo-Fernandez et al. (2009), donde se han desarrollado soportes de copolímero de acrilato de etilo y acrilato de hidroxietilo para analizar la respuesta de células endoteliales y fibroblastos cultivados en dichos soportes. El andamiaje resultante se obtuvo al polimerizar in situ los monómeros de acrilato de etilo y dimetacrilato de etilenglicol.

Generalmente, se han producido membranas electrohiladas utilizando copolímeros de poliacrilatos en combinación con otros materiales como, por ejemplo, poli (metracrilato de metilo-co-acrilato de butilo) disuelto en dimetilformamida, empleado para producir nanofibras de un diámetro de 390 ± 30 nm (Avci & Sarac, 2013), Nylon 6 (disuelto en ácido fórmico) mezclado con poli (etileno-n-butyl acrilato-anhídrido maleico) (disuelto en xileno), ambos en disolución con 2- propanol, para sintetizar también nanofibras, esta vez de un diámetro entre 109 y 1200 nm (Biber, Gündüz, Mavis, & Colak, 2010).

Además, se ha estudiado también la influencia de parámetros en las características de membranas de fibras de poli (metacrilato de etilo), utilizando disoluciones de este material en dimetilformamida y diclorometano, donde las fibras obtenidas tienen un diámetro de entre 1.2 y 6 micras (Gómez Tejedor, Overberghe, Rico, & Gómez Ribelles, 2011).

Como hemos visto, la mayoría de trabajos en los que se utilizan poliacrilatos se han realizado empleando electrohilado, ya que la técnica producción de nanopartículas mediante electroespray todavía no está muy estudiada en el campo de la ingeniería tisular, a diferencia de las nanofibras de electrohilado.

3.3. Electroespray en distintos materiales.

Algunos de los materiales que se han empleado hasta ahora para producir microesferas a partir de electroespray son poliésteres. Se han desarrollado técnicas para encapsular fármacos en microesferas de poliésteres biodegradables, incluso proteínas, que se libran conforme el polímero se degrada. Como ejemplo, se encuentra la policaprolactona (PCL), con la que se fabricaron microesferas de un diámetro entre 10 y 20 micras mediante electroespray, con disoluciones de este polímero en cloroformo (5-10% en peso), velocidades entre 0.2 y 0.5 mL/h y una distancia al colector de 15-25 cm (Hossain, Patel, & Ahmed, 2014).

Se ha utilizado fluoruro de polivinilideno disuelto en un codisolvente formado por dimetilformamida (DMF) y tetrahidrofurano (THF), para producir microesferas. En este caso, se observó que los diámetros se situaban en un rango de 0.81 ± 0.34 a 5.55 ± 2.34 μm con concentraciones entre 2 y 7%, mientras que concentraciones más altas promovían la formación de fibras (Correia et al., 2014).

Los materiales que se van a utilizar en este TFG para la síntesis del copolímero son acrilato de etilo (EA, *Figura 3*), metacrilato de etilo (EMA, *Figura 4*) y ácido acrílico (AA, *Figura 5*). A continuación, se va a razonar la elección de cada uno de ellos.

En el caso del PEA, este tiene una temperatura de transición vítrea de -24°C (Brandrup, Immergut, Abe, & Bloch, 1999). Esto implica que a temperatura ambiente se encuentra en estado gomoso, por lo que las micropartículas son muy adherentes y se

aglomeran con facilidad y esto no sería útil para la aplicación que queremos. Es por esto por lo que se introduce el EMA.

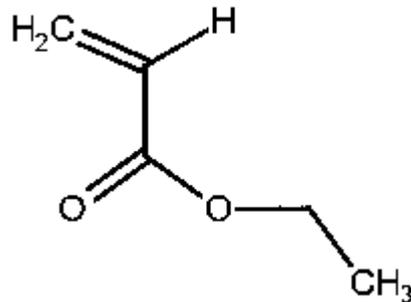


Figura 3. Estructura química del acrilato de etilo.

En cuanto al PEMA, se trata de un polímero muy usado en cultivos celulares (Alió del Barrio et al., 2015; Pérez Olmedilla et al., 2006). Este polímero tiene una temperatura de transición vítrea de 65°C (Brandrup et al., 1999).

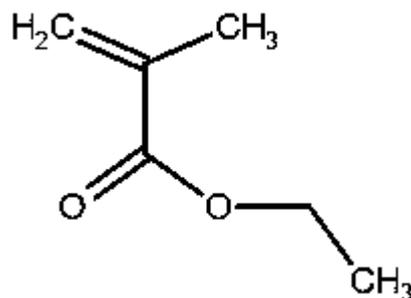


Figura 4. Estructura química del metacrilato de etilo.

En la *Figura 4* observamos el grupo metilo (-CH₃) extra enlazado al carbono alfa, que es la principal diferencia entre el EMA y el EA, que en su lugar tiene un átomo de hidrógeno (-H), como se puede apreciar en la *Figura 3*. Cuando se polimerizan estos monómeros, ambos grupos siguen siendo grupos laterales de la cadena principal. La mayor temperatura de transición vítrea se debe a este grupo metilo, ya que, en el caso de PEA, la ausencia de este hace que las barreras de energía que se oponen a la rotación en torno a los enlaces de la cadena principal sean menores dotando de flexibilidad a la cadena y facilitando los reordenamientos conformacionales y, por tanto, la temperatura de transición vítrea será menor. Por el contrario, el PEMA no tiene esa facilidad de movimiento, por lo que es más rígido, y su temperatura de transición vítrea es mayor. Con la combinación de EA y EMA en un copolímero al azar se busca obtener una temperatura de transición vítrea intermedia entre la de ambos polímeros, mejorando así su manipulación.

Por último, se ha añadido ácido acrílico al copolímero, ya que será el que proporcionará los grupos reactivos ácidos (-COOH) al polímero, los cuales se pueden activar para permitir la unión a este polímero de proteínas, mediante unión covalente. En la *Figura 5* se observa la estructura química de este compuesto.

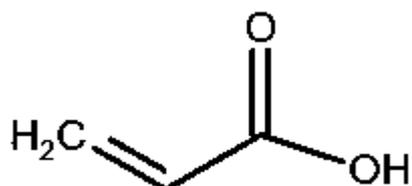


Figura 5. Estructura química del ácido acrílico.

En cuanto a los disolventes utilizados para preparar las disoluciones, se ha optado por distintas combinaciones de dimetilformamida (DMF) y diclorometano (DCM), que permiten obtener la conductividad eléctrica adecuada para el proceso de electrospray. Como hemos visto en el [apartado 3.2.](#), la dimetilformamida es frecuentemente usada para disolver copolímeros de acrilato. Más adelante, se verá con detalle qué proporciones se han utilizado de cada disolvente, y qué concentraciones de copolímero se han empleado. La intención de este TFG es obtener microesferas con diámetros de entre 1 y 10 μm , por lo que se estudiará la influencia del ácido acrílico en el tamaño de las microesferas obtenidas, haciendo pruebas con disoluciones de copolímero que no contiene ácido acrílico, así como otras disoluciones con un 5% de ácido acrílico.

3.4. Diseño Ortogonal de Taguchi.

El diseño ortogonal de Taguchi es una técnica de diseño de experiencias a partir de unos parámetros fijados. Para cada combinación de parámetros, se puede considerar un modelo de diseño. Así, el objetivo del diseño experimental es escoger los parámetros que más influyen en una determinada característica del producto final y determinar el conjunto de parámetros que optimizan el proceso (Brown, He, & Yeung, 2008).

Para reducir el número de pruebas de diseño factorial, se emplean matrices ortogonales para seleccionar un subconjunto de diseño factorial completo. Por lo tanto, el número de experimentos de diseño se puede reducir en gran medida, mientras que la información experimental clave se mantiene (Brown et al., 2008).

El diseño ortogonal de Taguchi se ha empleado en numerosas ocasiones en trabajos de electrohilado, para determinar qué parámetros son los más influyentes en el tamaño medio de la fibra y su homogeneidad de la fibra (Areias et al., 2012; Cui, Li, Zhou, & Weng, 2007; Silva et al., 2014). Según el número de parámetros a analizar, y el número de valores

que pueden adquirir estos parámetros, se ha de seleccionar la matriz ortogonal de Taguchi que define el número de experimentos a realizar, y los valores que han de adquirir los parámetros de dichos experimentos (Ross, 1996).

La *Tabla 1* representa la matriz de Taguchi, para un diseño mixto en el que uno de los parámetros tiene dos posibles valores (a y b), y el resto 3 valores (a, b y c). Esta matriz permite evaluar la influencia de hasta un total de 8 parámetros. En nuestro caso, vamos a analizar cinco parámetros, por lo que en esa tabla, debemos de quedarnos únicamente con las primeras 5 columnas correspondientes a esos 5 parámetros. En el [apartado 5.3.](#), se verán los parámetros que se elegirán y los distintos experimentos realizados. Con el diseño ortogonal de Taguchi, se quiere optimizar el proceso de producción de microesferas a partir de los parámetros más influyentes y obtener así las condiciones óptimas para conseguir el mejor resultado.

TABLA 1. Matriz genérica de 18 experiencias del Diseño Ortogonal de Taguchi.

Run	Columns							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	2	2	2	2	2
3	1	1	3	3	3	3	3	3
4	1	2	1	1	2	2	3	3
5	1	2	2	2	3	3	1	1
6	1	2	3	3	1	1	2	2
7	1	3	1	2	1	3	2	3
8	1	3	2	3	2	1	3	1
9	1	3	3	1	3	2	1	2
10	2	1	1	3	3	2	2	1
11	2	1	2	1	1	3	3	2
12	2	1	3	2	2	1	1	3
13	2	2	1	2	3	1	3	2
14	2	2	2	3	1	2	1	3
15	2	2	3	1	2	3	2	1
16	2	3	1	3	2	3	1	2
17	2	3	2	1	3	1	2	3
18	2	3	3	2	1	2	3	1

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Preparación de P(EA-EMA-AA).

La copolimerización se ha realizado en los laboratorios del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, con la ayuda de Carmen María Antolinos Turpín y María Noel Tamaño Machiavello, ambas pertenecientes al personal del centro.

Se han preparado dos copolímeros diferentes, cuya composición en peso se muestra entre paréntesis:

- EA:EMA:AA (50:50:0) (como control)
- EA:EMA:AA (47,5:47,5:5)

La síntesis se lleva a cabo utilizando benzoína (0.5%) como iniciador, y realizando la polimerización con acetona al 30% (en relación a la masa total) como diluyente, para que los polímeros obtenidos sean de bajo peso molecular.

Reactivos

En la siguiente tabla se reúnen los reactivos utilizados en la síntesis, así como los proveedores que los proporcionaron y el número CAS correspondiente:

TABLA 1. Identificación de reactivos utilizados en la síntesis del copolímero.

Reactivo	Proveedor	Número CAS
Benzoína	Scharlab	119-53-9
Acrilato de etilo (EA)	Sigma Aldrich	140-88-5
Metacrilato de etilo (EMA)	Sigma Aldrich	97-63-2
Ácido Acrílico (AA)	Sigma Aldrich	79-10-7
Acetona	Scharlab	67-64-1

Procedimiento

En todo momento se han seguido los protocolos del CBIT de prevención de riesgos en el laboratorio relativos a los procesos de síntesis de polímeros.

En primer lugar, se preparan las disoluciones de acrilato de etilo, metacrilato de etilo y ácido acrílico, con las proporciones correspondientes, en un 30% de acetona y un 0,5% de benzoína.

Para que tenga lugar la polimerización, hay que colocar las disoluciones en horno UV durante uno o dos días; se evapora la acetona durante 3-4 días; se introduce en el horno a 90 °C durante unas 24 horas para que se produzca la post- polimerización; se evapora el resto de monómeros durante uno o dos días; se llevan las muestras al desecador en vacío (60 °C) durante 3-4 días; se lava el polímero en acetona (11 g/100 ml) unas dos o tres veces; se lava en agua durante 24 horas y, por último, se seca en horno a 60 °C.

4.2. Disoluciones.

Se han preparado disoluciones de P(EA-EMA-AA) de diferentes concentraciones (en peso), utilizando como disolventes dimetilformamida (Nº CAS: 68-12-2) junto con diclorometano (Nº CAS: 75-09-2), ambos adquiridos de *Scharlab*, en distintas proporciones:

- Proporción de 20/80 (DMF/DCM): 4%, 6%, 12%, 14%, 15% y 20% de P(EA-EMA-AA).
- Proporción de 40/60 (DMF/DCM): 0.5%, 1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 15% y 20% de P(EA-EMA-AA).
- Proporción de 60/40 (DMF/DCM): 4% y 6% de P(EA-EMA-AA).

4.3. Métodos empleados.

El método que se ha utilizado para la producción de microesferas ha sido la técnica de electroespray con dos variantes, en cada una de las cuales se ha utilizado un colector diferente.

En ambos casos, el equipo ha sido montado por nuestros propios medios en el laboratorio del centro. La disolución de polímero se situó en una jeringa de plástico con una aguja de acero con un diámetro de 0,6 mm. El equipo también consta de una fuente de alimentación *PS/FC30P04* de *Glassman* para proporcionar el campo eléctrico y una bomba *Syringe-Pump NE-1000* para alimentar la disolución. Como colector se utilizó una placa metálica, que en el primer caso se recubrió con una capa de papel de aluminio (*Figura 1*), mientras que en el segundo caso se incluyó una placa Petri con agua destilada (*Figura 6*).

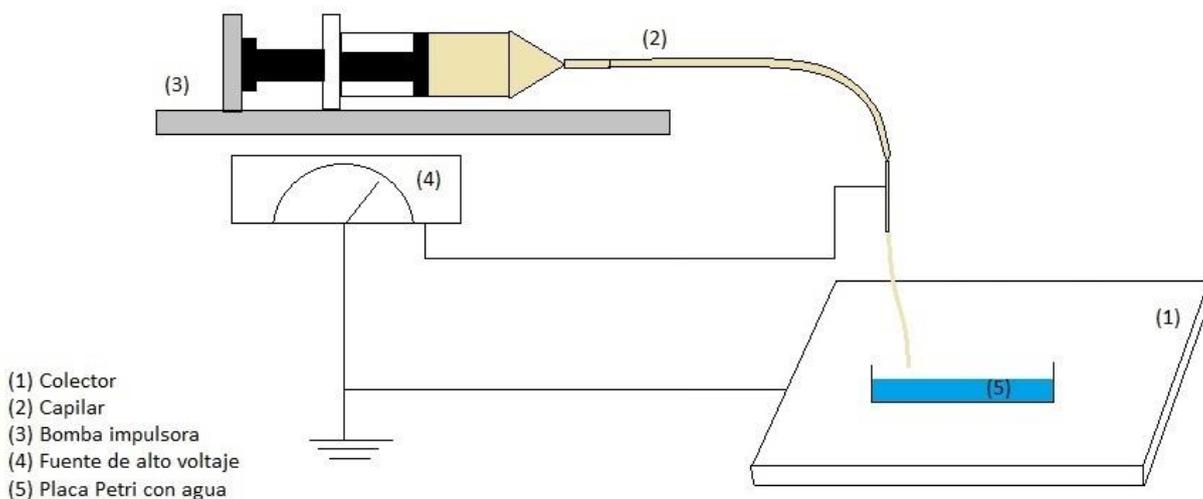


Figura 6. Esquema del montaje de electroespray con agua como colector.

Las microesferas fueron caracterizadas a partir de un microscopio óptico *NIKON* y un microscopio electrónico de barrido (SEM) *JEOL JSM 6300*, usando como parámetros 20 kV y 11 mm.

4.4. SEGURIDAD.

Las fichas de seguridad de cada reactivo involucrado en la síntesis del polímero, así como de los disolventes empleados en las disoluciones, se consultaron el 15 de mayo de 2016 en la página web de *Sigma Aldrich*, <https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>. A continuación se adjunta el enlace directo a cada una de las fichas de seguridad:

- Benzoína:
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=ES&language=es&productNumber=B8681&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3Dbenzoine%26interface%3DAI%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partialmax%26lang%3Des%26region%3DES%26focus%3Dproduct>
- Acetona:
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=ES&language=es&productNumber=650501&brand=SIAL&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3D67-64-1%26interface%3DCAS%2520No.%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partialmax%26lang%3Des%26region%3DES%26focus%3Dproduct>
- Acrilato de etilo:
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=ES&language=es&productNumber=E9706&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A>

- www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term%3D140-88-5%26interface%3DCAS%2520No.%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partialmax%26lang%3Des%26region%3DES%26focus%3Dproduct
- Metacrilato de etilo:
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=ES&language=es&productNumber=234893&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3D97-63-2%26interface%3DCAS%2520No.%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partialmax%26lang%3Des%26region%3DES%26focus%3Dproduct>
 - Ácido acrílico:
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=ES&language=es&productNumber=147230&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3D79-10-7%26interface%3DCAS%2520No.%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partialmax%26lang%3Des%26region%3DES%26focus%3Dproduct>
 - Dimetilformamida:
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language=&country=ES&brand=SIAL&productNumber=PHR1553&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3D68-12-2%26interface%3DCAS%2520No.%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partialmax%26lang%3Des%26region%3DES%26focus%3Dproduct>
 - Diclorometano:
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language=&country=ES&brand=SIAL&productNumber=439223&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3D75-09-2%26interface%3DCAS%2520No.%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partialmax%26lang%3Des%26region%3DES%26focus%3Dproduct>

En el [Anexo I](#), se hace referencia a la seguridad eléctrica del equipo utilizado en el proceso de electroespray.

5. RESULTADOS.

5.1. Puesta a punto del dispositivo.

En primer lugar, se empezó a realizar la técnica del electroespray utilizando un montaje similar al del esquema de la *Figura 1*. En la siguiente imagen se observa el montaje real en el laboratorio donde se ha trabajado.



Figura 7. Montaje de electroespray con placa colectora con papel de aluminio.

En un principio, se prepararon disoluciones de muy baja concentración de copolímero, partiendo de la base de que las microesferas se obtienen cuando la concentración de la disolución es lo suficientemente pequeña como para que dejen de producirse fibras (Guarino et al., 2015).

En los primeros experimentos, los parámetros del proceso se escogieron basándose en los que se utilizaron en el trabajo de Gómez Tejedor et al. (2011). Se comenzó con disoluciones de 1% y 2% de copolímero. En la siguiente tabla se reúnen las primeras experiencias realizadas:

TABLA 2. Experiencias realizadas con electroespray (1).

Concentración copolímero	Proporción disolventes (DMF/DCM)	Distancia al colector (cm)	Velocidad de flujo (ml/h)	Voltaje (kV)
1%	40/60	20	0,4	15
1%	40/60	20	0,4	20
1%	40/60	20	0,4	10
1%	40/60	15	0,4	10
1%	40/60	15	0,4	15
1%	40/60	15	0,4	20
2%	40/60	15	0,4	20
2%	40/60	15	0,4	15
2%	40/60	15	0,4	10
2%	40/60	20	0,4	10
2%	40/60	20	0,4	15
2%	40/60	20	0,4	20

Se observaron muestras de todos los experimentos en el microscopio óptico, y en todos los casos se observaban gotitas alargadas pero no microesferas. En base a esto, se decidió repetir algunos experimentos de la disolución de 1% de copolímero y preparar una disolución de 0,5% para repetir algunas condiciones. Se decidió aumentar la velocidad de flujo a 1 ml/h. Los experimentos fueron los indicados en la *Tabla 2*.

TABLA 3. Experiencias realizadas con electroespray (2).

Concentración copolímero	Proporción disolventes (DMF/DCM)	Distancia al colector (cm)	Velocidad de flujo (ml/h)	Voltaje (kV)
0,5%	40/60	15	1	15
1%	40/60	15	1	15

Se observaron los experimentos de la *Tabla 2* en el microscopio óptico, donde se apreciaban algunos puntos que podrían ser microesferas. Para asegurarse de ello, se seleccionaron tres muestras para ver en el microscopio electrónico de barrido (SEM). Las muestras escogidas y las condiciones con las que se realizaron se observan en la siguiente tabla.

TABLA 4. Muestras observadas en microscopio electrónico de barrido (SEM).

Concentración copolímero	Proporción disolventes (DMF/DCM)	Distancia al colector (cm)	Velocidad de flujo (ml/h)	Voltaje (kV)
0,5%	40/60	15	1	15
1%	40/60	15	1	15
2%	40/60	15	0,4	15

No se observó nada en el microscopio electrónico, por lo que se decidió cambiar de estrategia. En base al trabajo realizado por Gómez Tejedor et al. (2011), se decidió tomar algunos de los parámetros de dicho artículo y realizar pruebas con disoluciones de 4%, 6%, 8% y 10% de copolímero, con el fin de obtener fibras, para que, una vez obtenidas, se fuese disminuyendo la concentración de la disolución hasta obtener microesferas.

Las condiciones de los próximos experimentos que se llevaron a cabo, se aprecian en la *Tabla 5*.

TABLA 5. Experiencias realizadas con electroespray (3).

Concentración copolímero	Proporción disolventes (DMF/DCM)	Distancia al colector (cm)	Velocidad de flujo (ml/h)	Voltaje (kV)
4%	40/60	15	5	15
6%	40/60	15	5	15
8%	40/60	15	5	15
10%	40/60	15	5	15

En el experimento de la disolución del 4% de copolímero, se formaban gotas que no se secaban. Esto pudo ser debido a la alta velocidad, que no dejaba tiempo suficiente para que se evapore el disolvente, y debido a la baja concentración de la disolución, ya que durante el trayecto de la punta de la aguja al colector, viaja poco polímero y mucho disolvente, por lo que este último no llega a evaporarse antes de depositarse en el colector. En la *Figura 8* se aprecian las gotas que se formaron durante este experimento.



Figura 8. Gotas formadas durante el proceso de electroespray con disolución de 4% utilizando las condiciones de la Tabla 5.

Las muestras de la *Tabla 5* se observaron en el microscopio óptico. No se observó nada además de gotas, excepto en la muestra de 10% de copolímero, donde se observaba también alguna fibra entrecruzada. Se llevaron estas cuatro muestras al microscopio electrónico.

En la muestra de la disolución de 4% no se apreciaban esferas. Sin embargo, en las de disolución de 6%, 8% y 10% se observaba un fondo poroso con esferas aplastadas y además algunas fibras entre estas (*Figuras 9 y 10*).

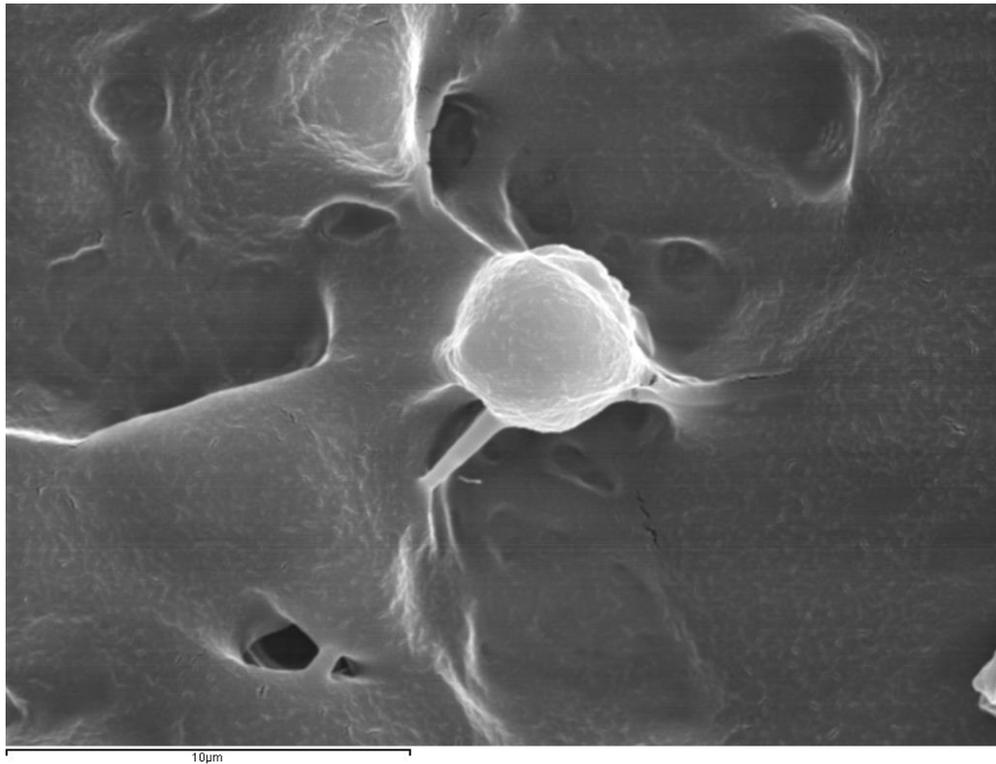


Figura 9. Disolución de 8% de copolímero con condiciones de la Tabla 5 observado en microscopio electrónico de barrido (SEM).

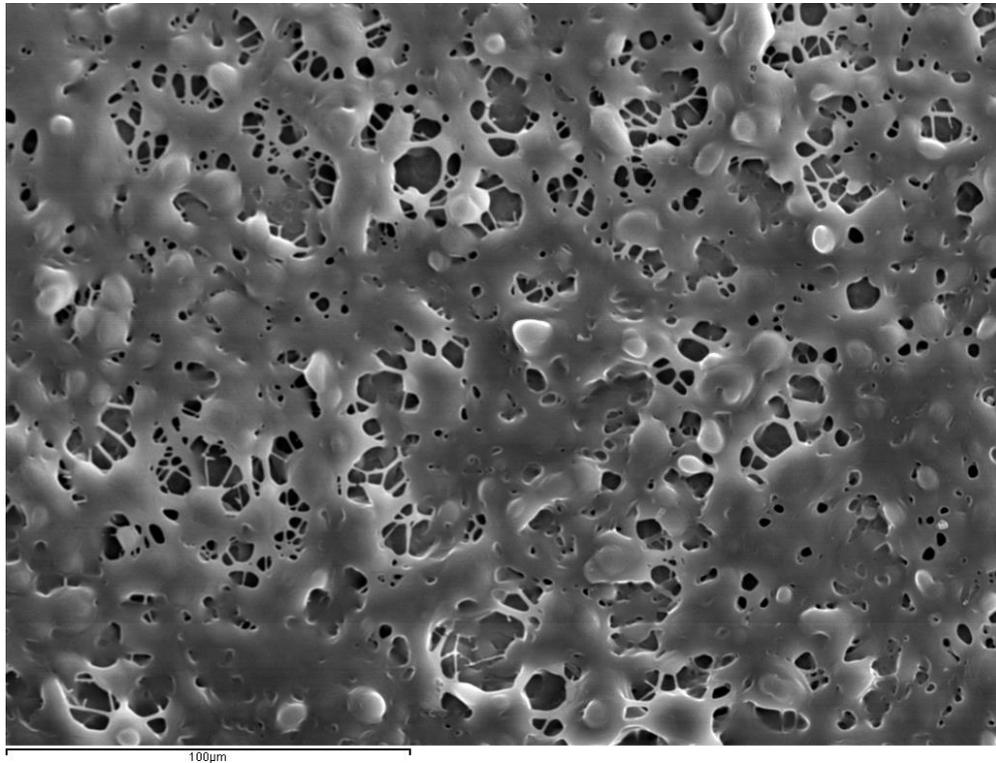


Figura 10. Disolución de 10% de copolímero con condiciones de la Tabla 5 observado en microscopio electrónico de barrido (SEM).

Al no obtener fibras, los siguientes experimentos se centraron en disoluciones más concentradas y, además, se probaron otras combinaciones de disolventes. Las condiciones empleadas fueron las de la *Tabla 5* de nuevo. En la siguiente tabla se observan los experimentos realizados.

TABLA 6. Experiencias realizadas con electroespray (3).

Concentración copolímero	Proporción disolventes (DMF/DCM)	Distancia al colector (cm)	Velocidad de flujo (ml/h)	Voltaje (kV)
15%	40/60	15	5	15
15%	20/80	15	5	15
20%	40/60	15	5	15
20%	20/80	15	5	15

En estos cuatro experimentos se observaron fibras en el microscopio óptico, por lo que estas condiciones se podrían tomar como punto de partida para pasar de electrohilado a electroespray. En la *Figura 11*, se observa una fotografía tomada en el microscopio del experimento realizado con las condiciones de la *Tabla 6* para la disolución de 20% de copolímero en 40/60 de DMF/DCM. Posteriormente, se experimentó con concentraciones de 12% y 14%, y estos experimentos se muestran en el [apartado 5.2](#).



Figura 11. Muestra de experimento de disolución de 20% (40/60 de DMF/DCM) observado en microscopio óptico.

En base a los resultados obtenidos con las diferentes pruebas, se llegó a la conclusión de que las esferas aglomeradas se podían deber a la alta velocidad y al papel de aluminio como colector, ya que al llegar podrían aplastarse. Por ello, se decidió utilizar un colector horizontal y sobre este una placa Petri con agua destilada, con la idea de que las esferas se mantengan en suspensión y no se lleguen a aglomerar.

5.2. Ensayos previos para el Diseño Ortogonal de Taguchi.

Se realizaron una serie de ensayos utilizando un colector horizontal con una placa Petri con agua destilada sobre este, para determinar las condiciones favorables para la obtención de microesferas. De este modo, se obtuvieron los parámetros que se utilizaron posteriormente para diseñar la matriz ortogonal de Taguchi. En la *Tabla 7* se reúnen todos los experimentos realizados con el montaje que se observa en la *Figura 12*.

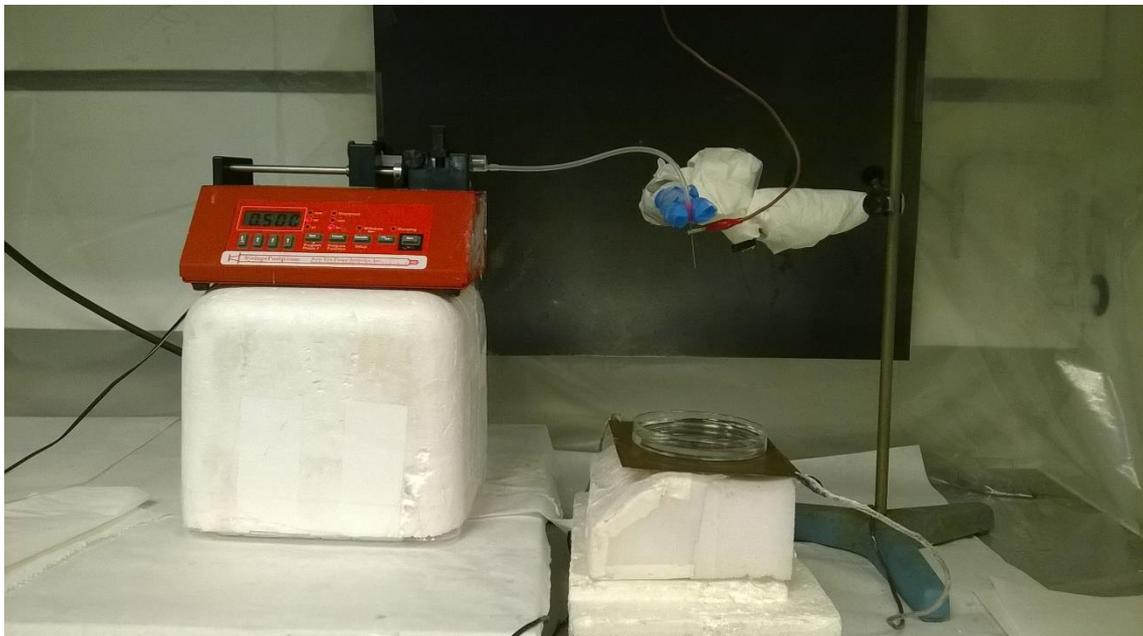


Figura 12. Montaje de electroespray utilizando placa Petri con agua destilada sobre colector horizontal.

TABLA 7. Experiencias realizadas con electroespray con colector horizontal y placa Petri con agua destilada (1).

Nº Experimento	Concentración copolímero	Proporción disolventes (DMF/DCM)	Distancia al colector (cm)	Velocidad de flujo (ml/h)	Voltaje (kV)
1	4%	40/60	20	0,5	20
2	6%	40/60	15	0,5	15
3	8%	40/60	15	0,5	15
4	10%	40/60	15	0,5	15
5	12%	40/60	15	0,5	15
6	12%	20/80	15	0,5	15
7	14%	40/60	15	0,5	15
8	14%	20/80	15	0,5	15

Respecto a las muestras de la *Tabla 7*, hay algunas en las que se formó un film (muestras nº 5, 6, 7 y 8) y otras en las que se quedó el material en suspensión (muestras nº 1, 2, 3 y 4). Estas últimas se mantuvieron en un decantador durante 48 horas (*Figura 13*), pero cuando se recogió lo decantado no se observó nada en el microscopio, por lo que este método para recuperar microesferas no fue útil.



Figura 13. Muestras en el decantador.

Se decidió probar con otras combinaciones de parámetros: velocidades de flujo de 2 y 8 ml/hr, distancias de 10 y 15 cm y voltajes de 5 y 10 kV. Los experimentos se reúnen en la *Tabla 8*.

En cuanto al experimento nº 10, es importante decir que no se formaba el spray al dispersar la disolución, sino que la disolución caía en forma de gotas, debido al bajo voltaje (5 kV). Por ello, se descartó este valor en el resto de experimentos.

TABLA 8. Experiencias realizadas con electroespray con colector horizontal y placa Petri con agua destilada (2).

Nº Experimento	Concentración copolímero	Proporción disolventes (DMF/DCM)	Distancia al colector (cm)	Velocidad de flujo (ml/h)	Voltaje (kV)
9	4%	40/60	15	2	10
10	4%	40/60	15	2	5
11	4%	40/60	10	2	10
12	4%	40/60	10	8	10
13	4%	40/60	15	8	10
14	6%	40/60	10	2	10
15	6%	40/60	15	2	10
16	6%	40/60	10	8	10
17	6%	40/60	15	8	10
18	8%	40/60	10	2	10
19	8%	40/60	15	2	10
20	8%	40/60	10	8	10
21	8%	40/60	15	8	10

Se observaron todas las muestras en el microscopio óptico. En el caso de las muestras nº 12, 13, 16 y 17, se observaron microesferas (*Figuras 14, 15, 16 y 17*). En el resto de muestras, en la mayoría se observaban fibras (como en los experimentos 5, 6 y 8) o fibras con esferas (*Figura 18*).

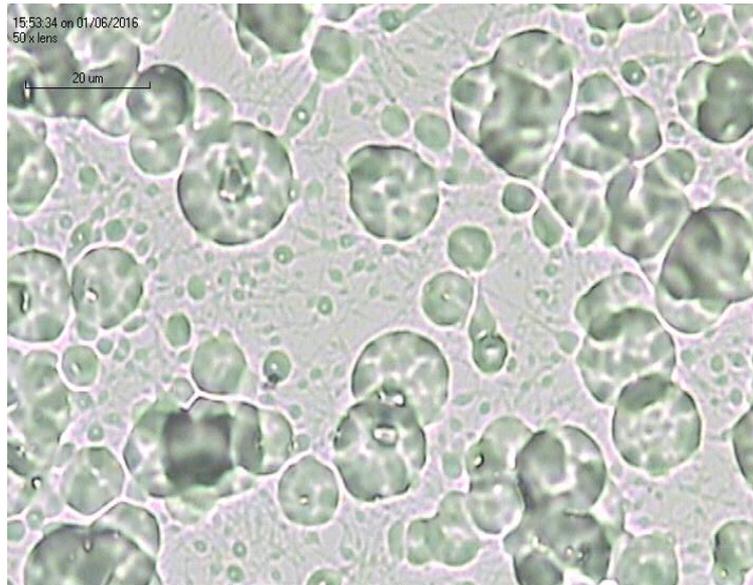


Figura 14. Muestra nº 12 observada en microscopio óptico.

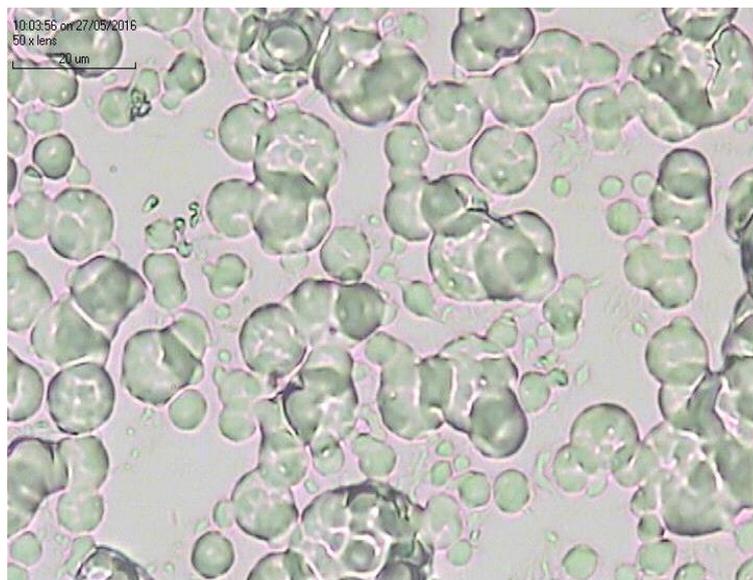


Figura 15. Muestra nº 13 observada en microscopio óptico.

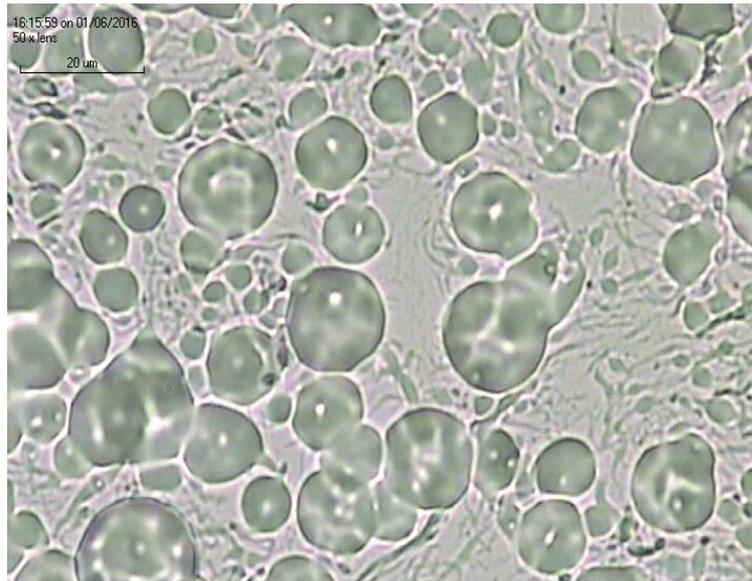


Figura 16. Muestra nº 16 observada en microscopio óptico.

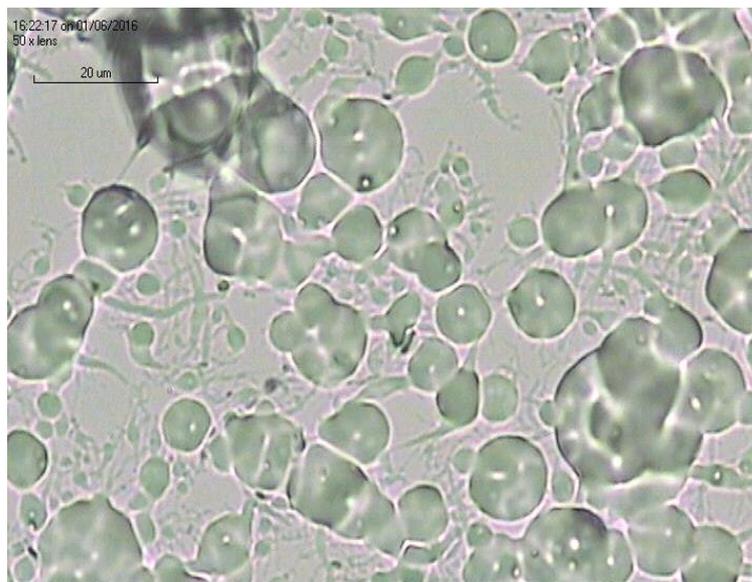


Figura 17. Muestra nº 17 observada en microscopio óptico.



Figura 18. Muestra nº 20 observada en microscopio óptico.

En la *Tabla 9*, se incluyen los resultados de las muestras nº 12, 13, 16 y 17 de los ensayos previos (*Tabla 8*). Estos valores se han obtenido mediante el programa *ImageJ*, como se explica más adelante. El diámetro medio se representa como \bar{x} y la desviación típica es σ .

TABLA 9. Diámetros medios y desviación típica de partículas obtenidas en experimentos de los ensayos previos.

Experimento	\bar{x} (μm)	σ (μm)
12	10,1	2,8
13	9,4	2,2
16	10,9	3,4
17	10,6	3,0

La viscosidad y la tensión superficial de las disoluciones son dos parámetros que influyen en el proceso de electroespray (Silva et al., 2014). Por ello, se han tomado medidas de ambos parámetros para tres disoluciones:

- Disolución de 4% de copolímero con 40/60 de DMF/DCM.
- Disolución de 6% de copolímero con 40/60 de DMF/DCM.
- Disolución de 8% de copolímero con 40/60 de DMF/DCM.

Se eligieron estas tres disoluciones puesto que en las dos primeras se obtuvieron esferas con las condiciones de la *Tabla 8* mientras que en la última no.

La viscosidad se midió mediante un reómetro *HR 2 (TA. Instruments)*, y las medidas se repitieron tres veces para cada disolución. Se calculó la media de cada disolución y los resultados obtenidos se adjuntan a continuación en el *Gráfico 1*.

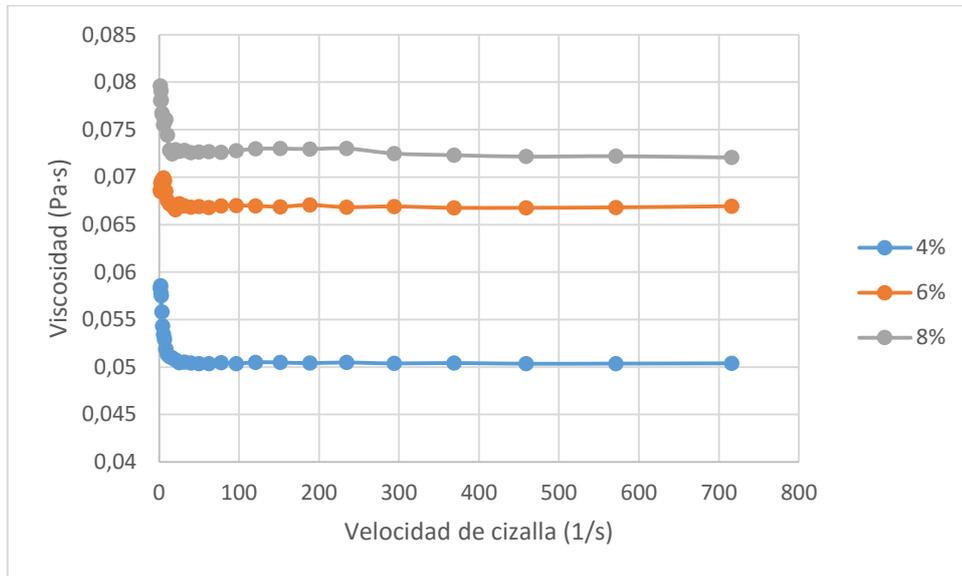


Gráfico 1. Viscosidad en disoluciones de 4%, 6% y 8% de copolímero con 40/60 de DMF/DCM.

En cuanto a la viscosidad, se observa que conforme aumenta la concentración, también lo hace la viscosidad. Con viscosidades menores, los entrelazamientos entre cadenas disminuyen, lo cual favorece la formación de microesferas, como afirman Bock et al. (2012).

La tensión superficial se ha medido empleado el método que se desarrolla en el trabajo de Lee, Ravindra, & Chan (2009). El método ha consistido en dejar caer 10 gotitas de una disolución determinada desde una jeringuilla con agujas de diferentes diámetros a un vial cuyo fondo estaba cubierto de la disolución en cuestión. Se han pesado las 10 gotas, y este procedimiento se ha repetido tres veces. Después se ha calculado el peso promedio por gota y la desviación estándar. Esto se ha hecho para varias agujas de diferente diámetro. Finalmente se ha representado los pesos medios de las gotitas frente a los diámetros de las agujas. Se ajusta la curva mediante regresión polinómica a la ecuación (4).

$$m = C_1(r^2) + C_2(r) \quad (4)$$

Según Lee et al. (2009), la tensión superficial se calcula en base a la ecuación (5), siendo C_2 el coeficiente obtenido mediante la curva de regresión polinómica.

$$\gamma = 171,2 \cdot C_2 \quad (5)$$

Para las disoluciones citadas previamente, se muestran los resultados a continuación:

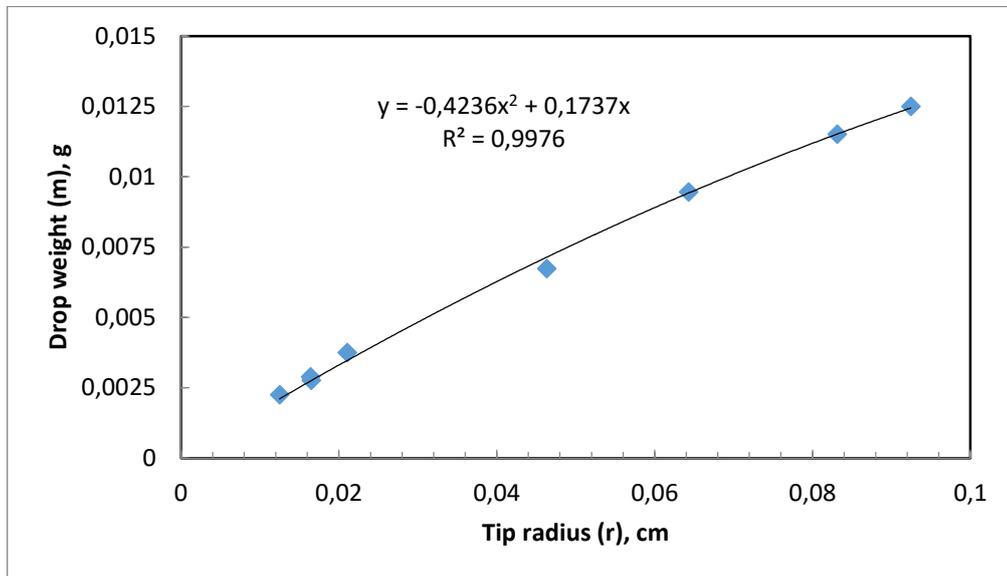


Gráfico 2. Método de tensión superficial en disolución de 4% de copolímero con 40/60 de DMF.

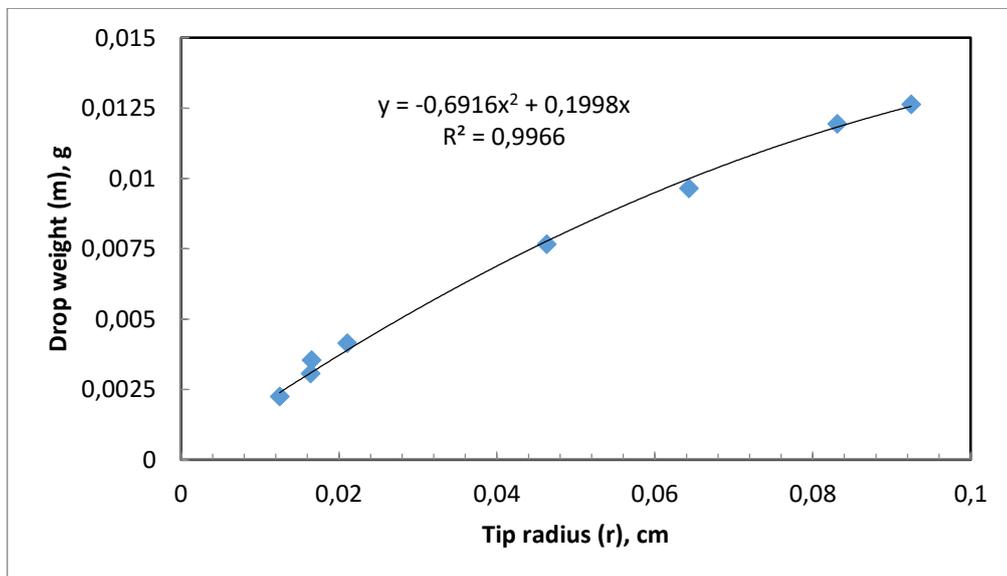


Gráfico 3. Método de tensión superficial en disolución de 6% de copolímero con 40/60 de DMF.

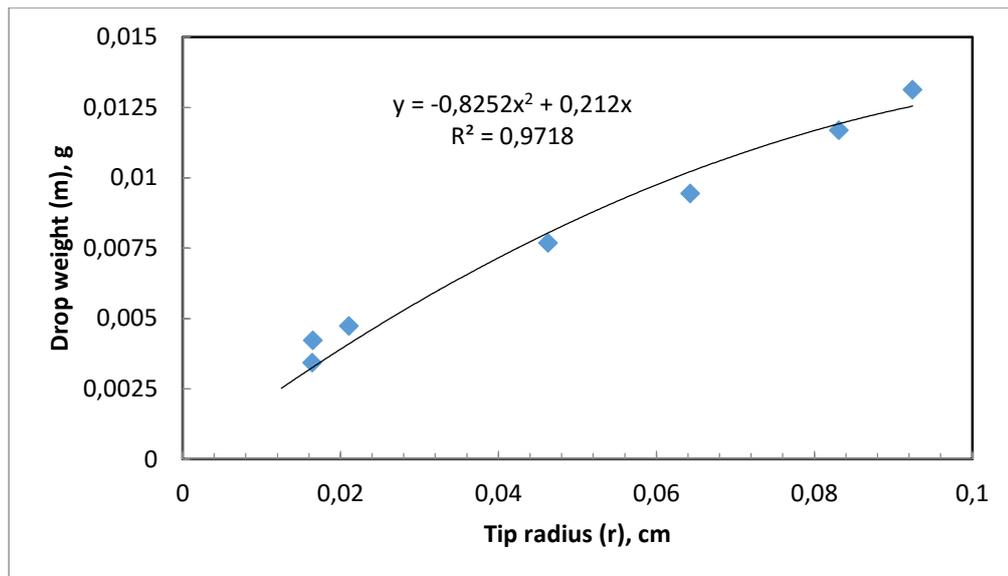


Gráfico 4. Método de tensión superficial en disolución de 8% de copolímero con 40/60 de DMF

Aplicando la ecuación (5) a cada gráfico, se han obtenido las tensiones superficiales cada disolución, que se reúnen en la *Tabla 10*.

TABLA 10. Tensión superficial obtenida para las disoluciones a las que se ha aplicado el método.

Concentración	γ (mN/m)
4%	29,7
6%	34,2
8%	36,3

En base a la *Tabla 10*, se puede afirmar que la tensión superficial aumenta ligeramente conforme se incrementa la concentración de polímero. Si la disolución está muy diluida, se forman gotas en lugar de fibras cuando el polímero llega al colector, debido a la menor tensión superficial (Duque Sánchez, Rodríguez, & López, 2014).

Como se observó en las muestras de estas tres disoluciones, con menor concentración de disolución se formaron microesferas, mientras que con la disolución más concentrada no. Aunque no hay grandes diferencias entre los valores de la viscosidad y la tensión superficial en dichas disoluciones, se ha comprobado su efecto sobre la morfología final de las esferas. Se ha podido observar que conforme estos parámetros disminuyen, se han obtenido microesferas de menor tamaño, es decir, con la disolución de 4% se obtuvieron esferas de menor diámetro medio que con la disolución de 6% (*Tabla 9*).

Tras realizar los ensayos previos, se concluyó que los parámetros más influyentes en la obtención de microesferas eran la concentración de la disolución, la proporción de

los disolventes empleados, la velocidad de flujo, la distancia entre el colector y la aguja y el campo eléctrico aplicado. Se seleccionó una serie de valores de cada uno de estos parámetros para llevar a cabo el *Diseño ortogonal de Taguchi*, y crear la matriz ortogonal de 18 experiencias. En el siguiente apartado se verá esto con detalle.

5.3. Diseño experimental.

Como se vio en la introducción, el *Diseño ortogonal de Taguchi* se basa en la elección de una serie de parámetros influyentes en el proceso que queremos optimizar. Dichos parámetros se variarán en varios valores, obteniendo así una serie de experimentos a realizar.

En nuestro caso, se ha comprobado que los cinco parámetros más influyentes en el proceso de obtención de microesferas son los siguientes: la concentración de la disolución, la proporción de los disolventes empleados, la velocidad de flujo, la distancia entre el colector y la aguja y el campo eléctrico aplicado. El primero de ellos se ha variado en dos valores, mientras que el resto se ha variado entre tres valores, obteniéndose así una matriz con dieciocho experimentos (*Tabla 1*).

Finalmente, se han escogido las disoluciones de concentraciones de 4% y 6% de copolímero; la proporción de disolventes (DMF/DCM) será de 20/80, 40/60 y 60/40; las velocidades de flujo que se emplearán son 2, 4 y 8 ml/h; se ha optado por distancias entre el colector y la aguja de 10, 15 y 20 cm; y, por último, el campo eléctrico tendrá los valores de 0,5, 1 y 1,5 kV/cm. El voltaje se ha calculado multiplicando la distancia y el campo eléctrico. En la *Tabla 10*, encontramos los 18 experimentos que se han llevado a cabo en el laboratorio.

La matriz de los 18 experimentos de Taguchi se ha realizado para los dos copolímeros que se sintetizaron en el laboratorio:

- EA:EMA:AA (50:50:0)
- EA:EMA:AA (47,5:47,5:5)

De este modo, se pretende comprobar la influencia del ácido acrílico en el proceso, ya que cuando el copolímero no tiene ácido acrílico, se trata de una sustancia hidrófoba, mientras que al incluir el ácido acrílico, se añaden grupos polares.

TABLA 10. Matriz de 18 experiencias realizadas en el laboratorio.

Exp. nº	Concentración copolímero	Proporción disolventes (DMF/DCM)	Velocidad de flujo (ml/h)	Distancia al colector (cm)	Campo eléctrico (kV/cm)	Voltaje (kV)
1	4	20/80	2	10	0,5	5
2	4	20/80	4	15	1	15
3	4	20/80	8	20	1,5	30
4	4	40/60	2	10	1	10
5	4	40/60	4	15	1,5	22,5
6	4	40/60	8	20	0,5	10
7	4	60/40	2	15	0,5	7,5
8	4	60/40	4	20	1	20
9	4	60/40	8	10	1,5	15
10	6	20/80	2	20	1,5	30
11	6	20/80	4	10	0,5	5
12	6	20/80	8	15	1	15
13	6	40/60	2	15	1,5	22,5
14	6	40/60	4	20	0,5	10
15	6	40/60	8	10	1	10
16	6	60/40	2	20	1	20
17	6	60/40	4	10	1,5	15
18	6	60/40	8	15	0,5	7,5

Para el copolímero de 5% de ácido acrílico, los ensayos de la *Tabla 10* se realizaron utilizando el montaje de la placa Petri con agua destilada (*Figura 11*), y para observarlos en el microscopio SEM, la muestra se recogió con papel de aluminio y se dejó secar. Debido a esto, en la mayoría de las muestras se aglomeraron las esferas, por lo que las fotografías tomadas en el microscopio SEM no se utilizaron para llevar a cabo la medida de los diámetros. En las siguientes figuras se observan algunos ejemplos de lo que se obtuvo.

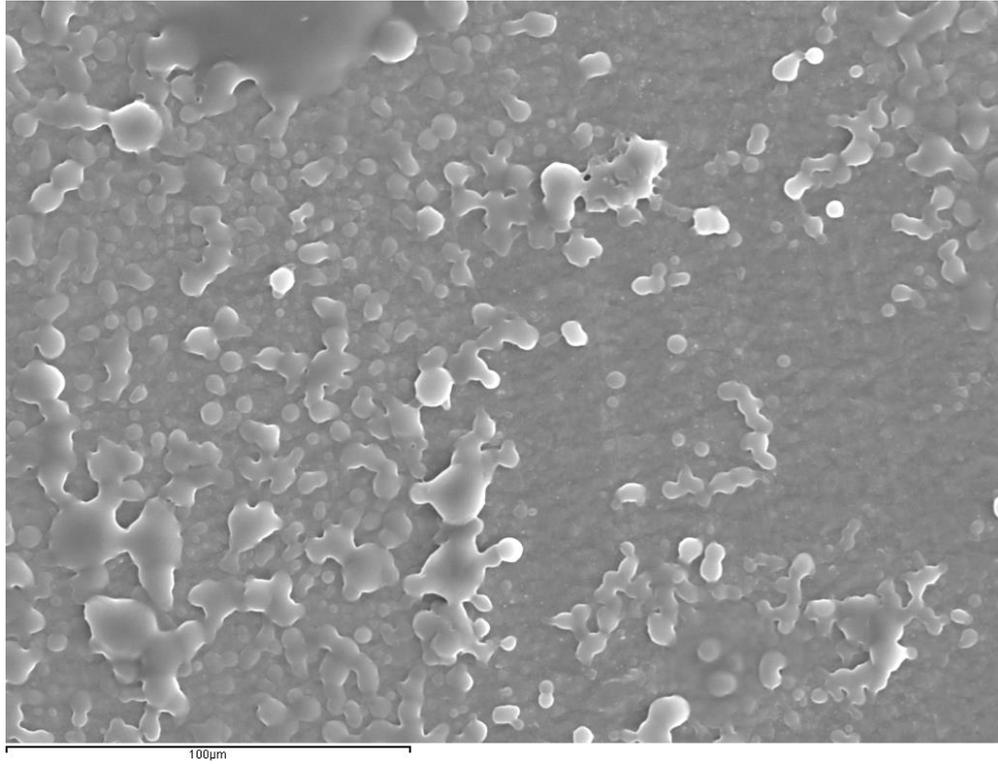


Figura 19. Experimento nº 7 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio electrónico de barrido (SEM).

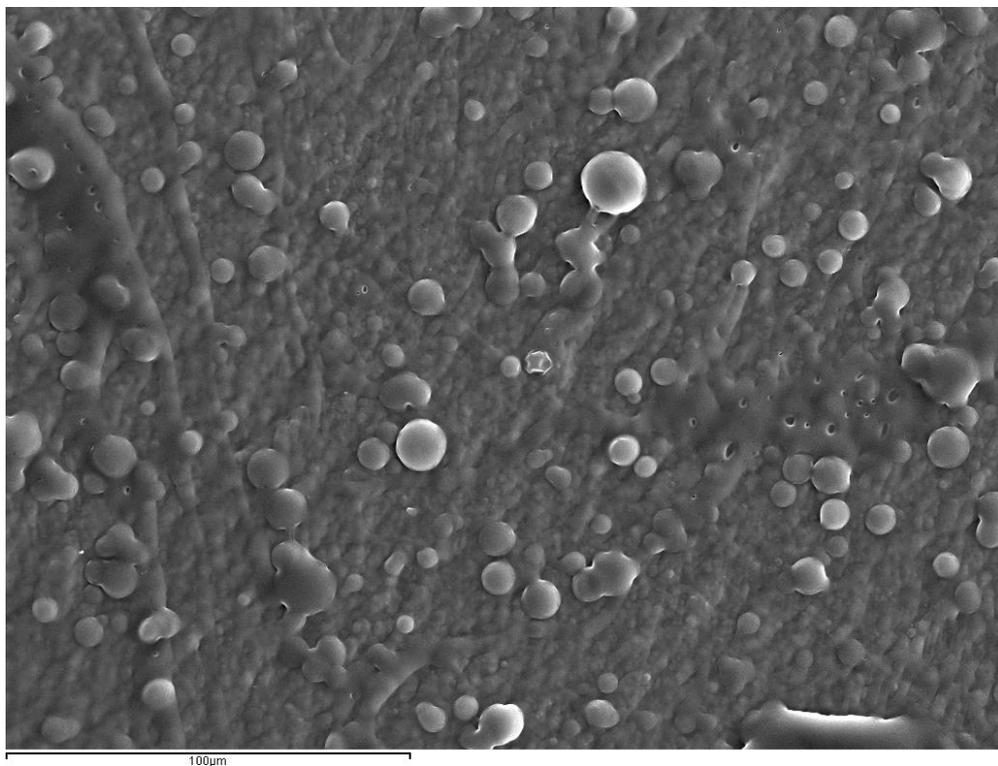


Figura 20. Experimento nº 18 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio electrónico de barrido (SEM).

Debido a la dificultad de recuperación de la muestra, se decidió realizar los experimentos de Taguchi con el copolímero de 0% de ácido acrílico utilizando un colector cubierto de papel de aluminio, como el de la *Figura 7*. Cuando estas muestras se observaron en el SEM, los resultados obtenidos fueron en su mayor parte aglomeraciones de esferas, reafirmando lo que se concluyó en el [apartado 5.1](#). El montaje de la *Figura 7* no es adecuado para nuestro material, ya que no se obtienen microesferas individuales, sino aglomeraciones. Las *Figuras 21* y *22* se corresponden con fotografías tomadas en el SEM de algunas de las muestras de estos experimentos.

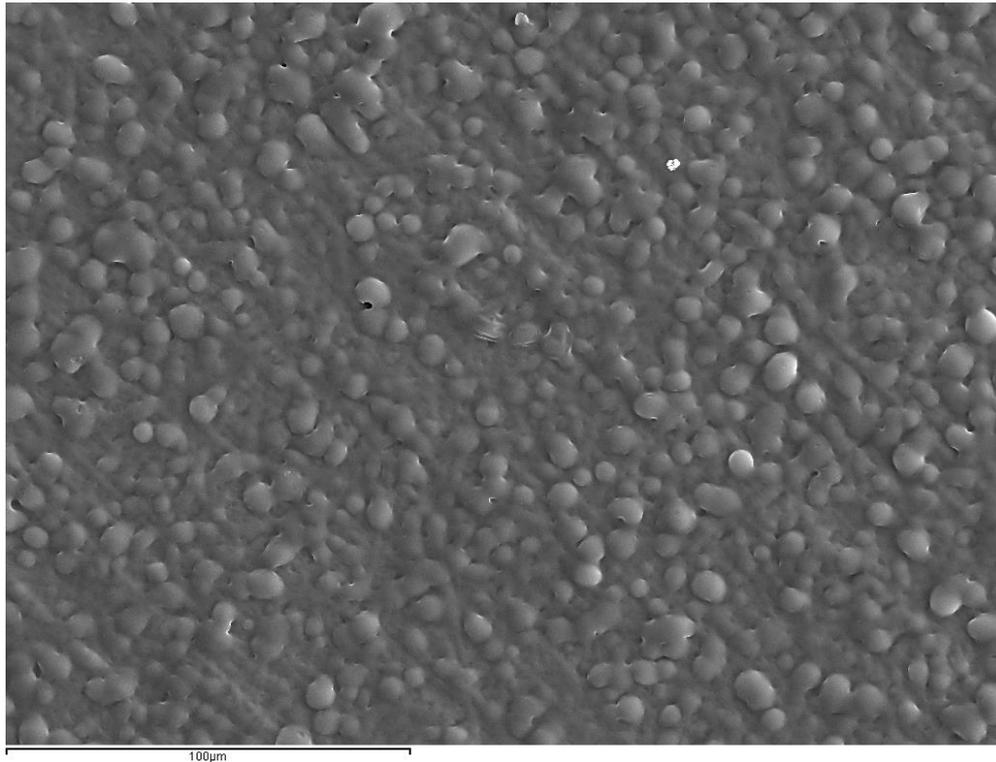


Figura 21. Experimento nº 4 de la Tabla 10 (0% ácido acrílico) observado en microscopio electrónico de barrido (SEM).

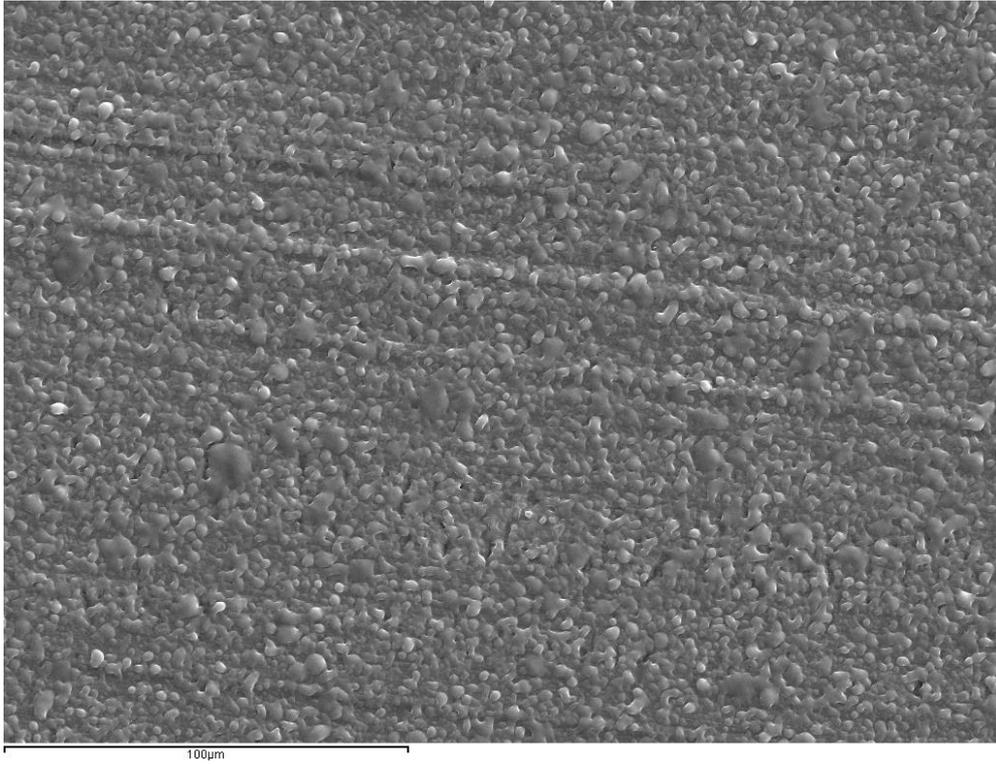


Figura 22. Experimento nº 9 de la Tabla 10 (0% ácido acrílico) observado en microscopio electrónico de barrido (SEM).

6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En el caso de los experimentos de Taguchi para el copolímero de 5% de ácido acrílico, no se obtuvieron esferas en todos los casos, por lo que, a continuación, se adjuntan distintas fotografías donde se observan los resultados.

En el caso del experimento nº 1 y el nº 15, no se dispone de fotografías ya que la disolución caía en gotas. Para el experimento nº 16 no se pudo recuperar la muestra, por lo que no se observó en el microscopio.

En el caso de los experimentos nº 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, se obtuvieron partículas. Todos ellos tienen en común que fueron realizados con disoluciones de una concentración de 4% de copolímero. Para el experimento nº 2, se observan bastantes esferas pero con un fondo de fibras (*Figura 23*).

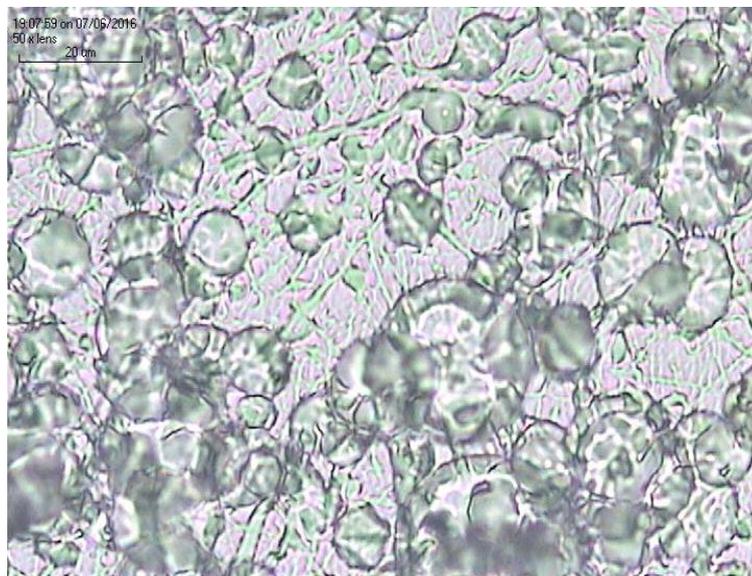


Figura 23. Experimento nº 2 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

En el caso del experimento nº 3, se observan manchas oscuras en la *Figura 24*. Esto es debido a que cada muestra se recogía en un portamuestras de vidrio, directamente desde la placa Petri, por lo que se pudo quedar agua acumulada en algunos trozos de la muestra (manchas oscuras). Se observan también esferas, y menos fibras que en el caso anterior.

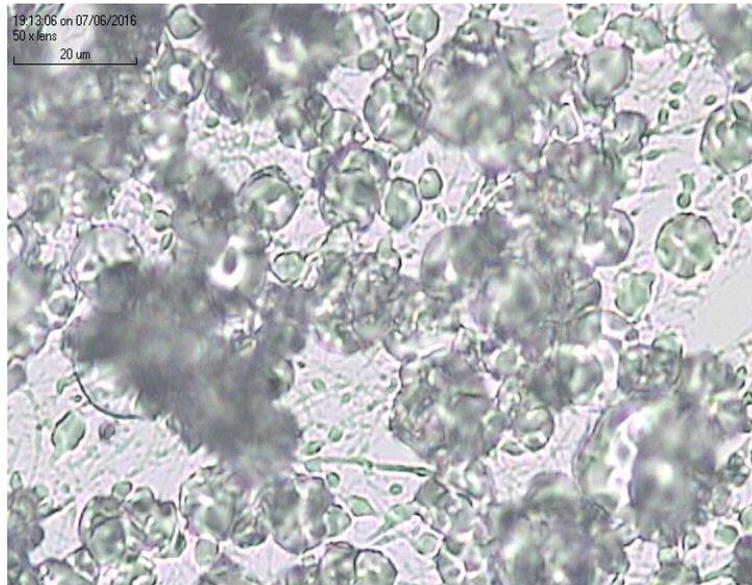


Figura 24. Experimento nº 3 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

En el experimento nº 4, no se aprecia la formación de fibras, a diferencia de los dos anteriores. Además, se observan esferas de un tamaño menor (*Figura 25*).

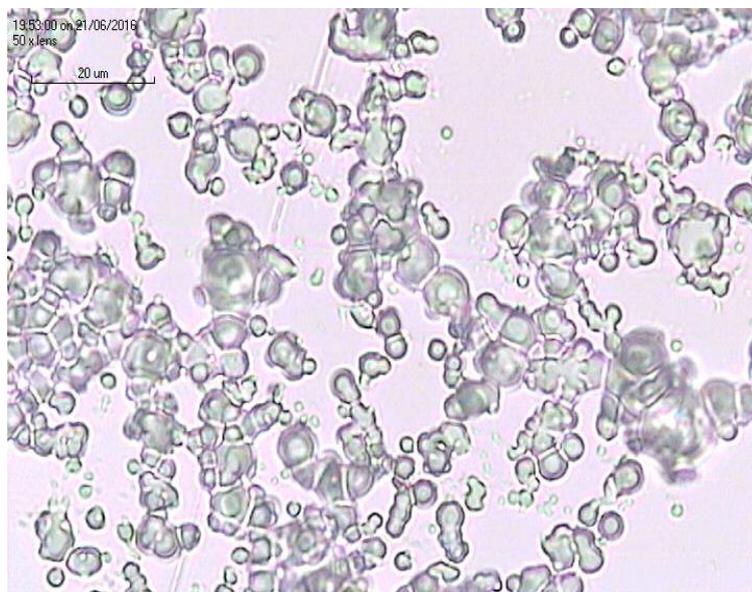


Figura 25. Experimento nº 4 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

Cuando se observó la muestra del experimento nº 5 en el microscopio óptico, no se distinguían bien los límites entre unas esferas y otras (*Figura 26*). Sin embargo, en el microscopio SEM se pudieron medir los diámetros, ya que se observaban esferas

individuales (*Figura 27*). En el SEM se observaba alguna fibra en el fondo con formación de gotas. Esto ocurre en la transición de electrohilado a electroespray (fibras a partículas).

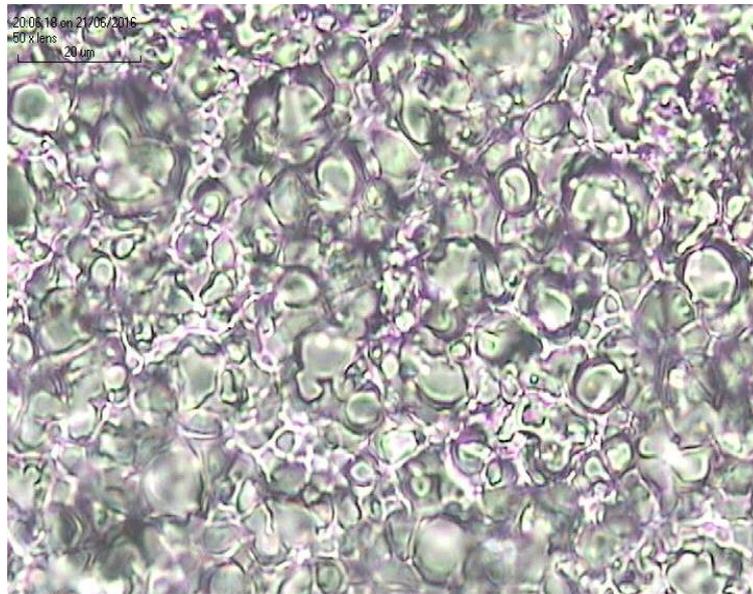


Figura 26. Experimento nº 5 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

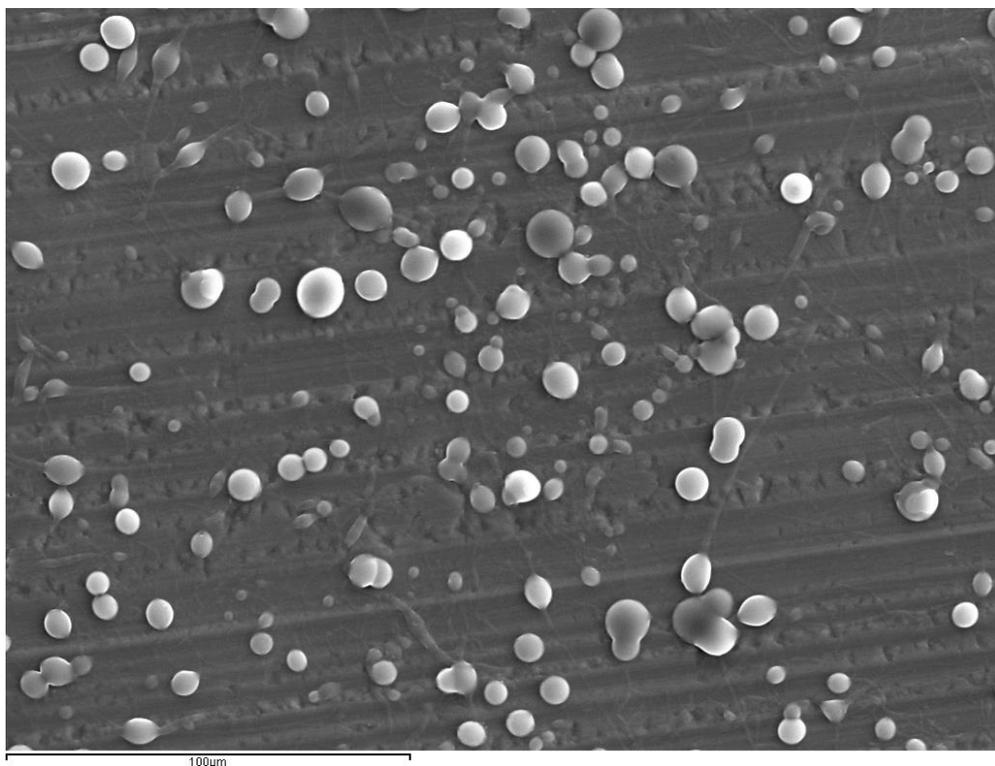


Figura 27. Experimento nº 5 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio electrónico de barrido (SEM).

En la *Figura 28*, se observa la muestra del experimento nº 6, donde no hay presencia de fibras.

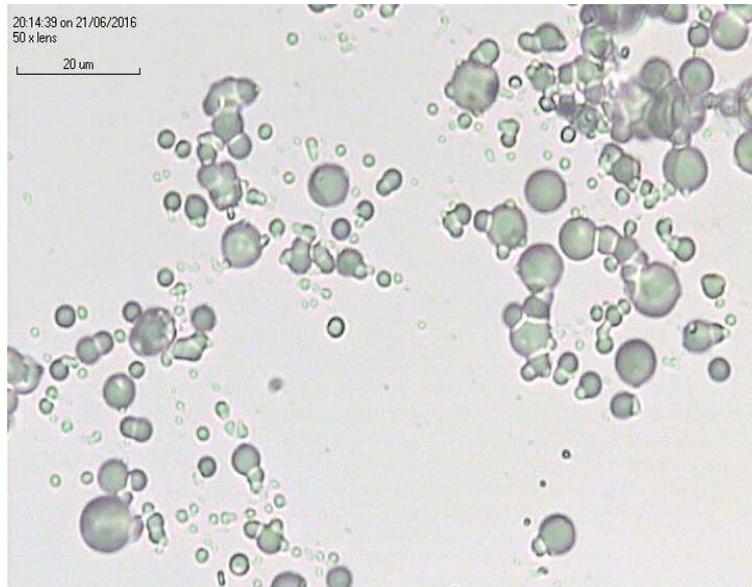


Figura 28. Experimento nº 6 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

En el experimento nº 7, se observan una considerable cantidad de esferas de tamaño pequeño, como se puede apreciar en la *Figura 29*. En este caso, tampoco hay fibras.

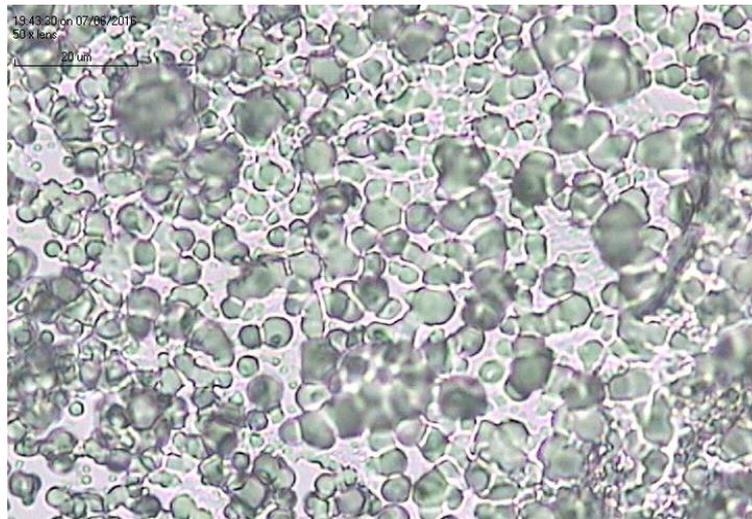


Figura 29. Experimento nº 7 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

En el experimento nº 8 se aprecian las esferas más pequeñas de todos los experimentos realizados con el método de Taguchi (*Figura 30*).

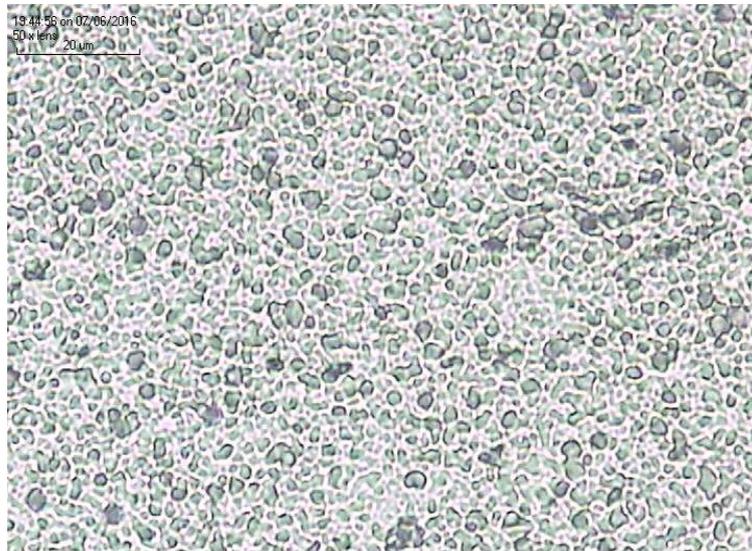


Figura 30. Experimento nº 8 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

En el experimento nº 9, se observa que los límites de las partículas no están bien definidos y se aproximan bastante (*Figura 31*).

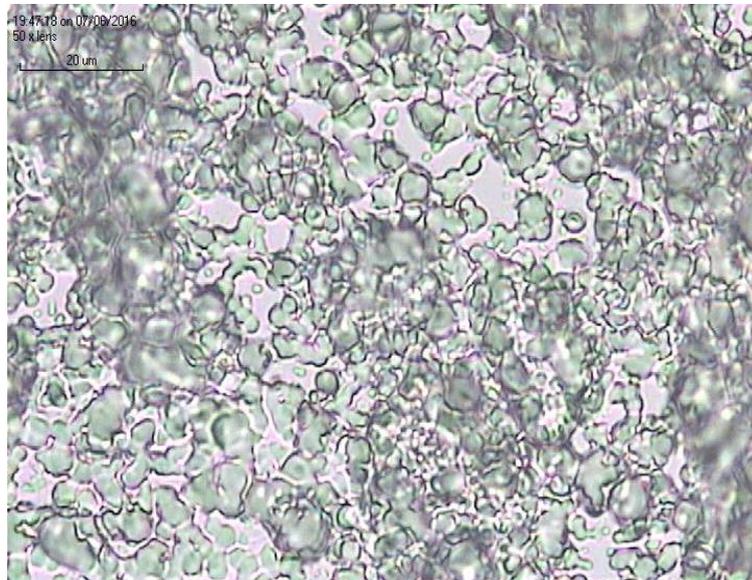


Figura 31. Experimento nº 9 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

En el caso de los experimentos nº 10 y 11, se observaban fibras con gotas, como se aprecia en las *Figuras 32 y 33*.

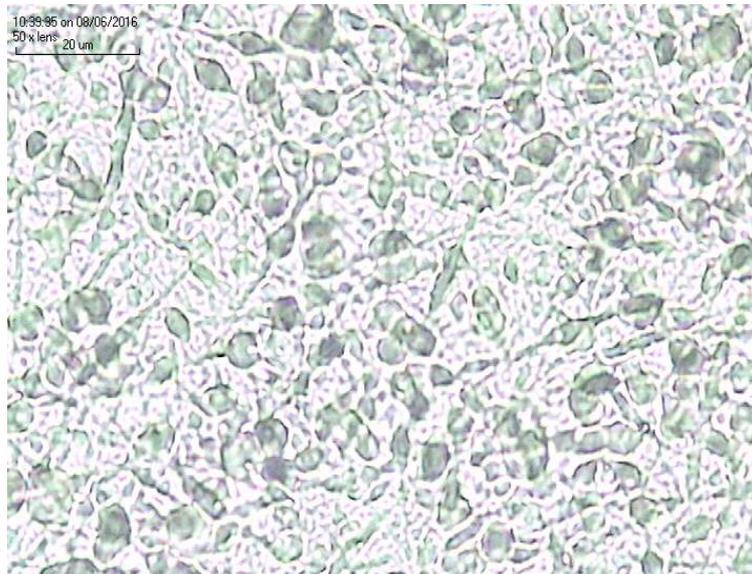


Figura 32. Experimento nº 10 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

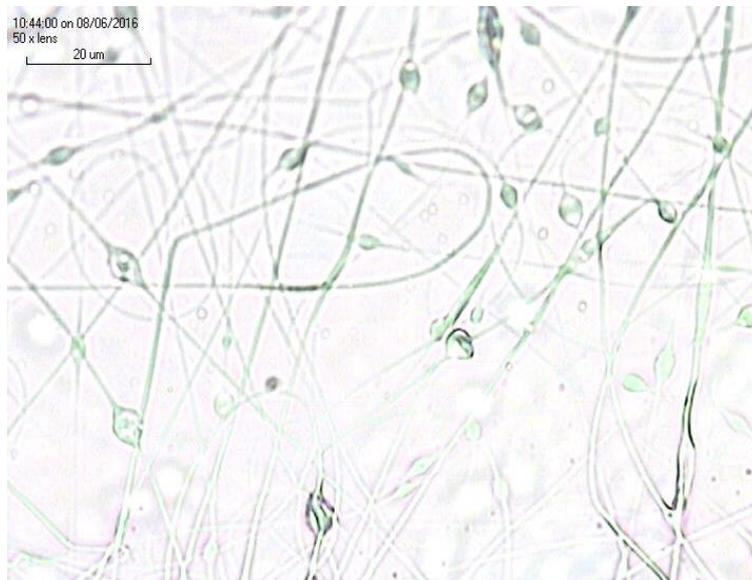


Figura 33. Experimento nº 11 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

En la muestra del experimento nº 12, sólo se observaban fibras (*Figura 34*).

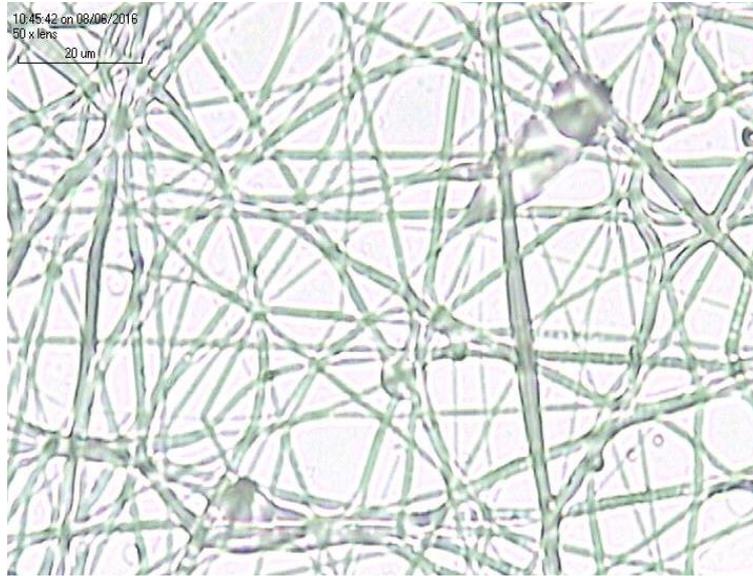


Figura 34. Experimento nº 12 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

Para el experimento nº 13 se observaron partículas en el microscopio óptico, aunque no del todo esféricas, como se puede apreciar en la *Figura 35*.

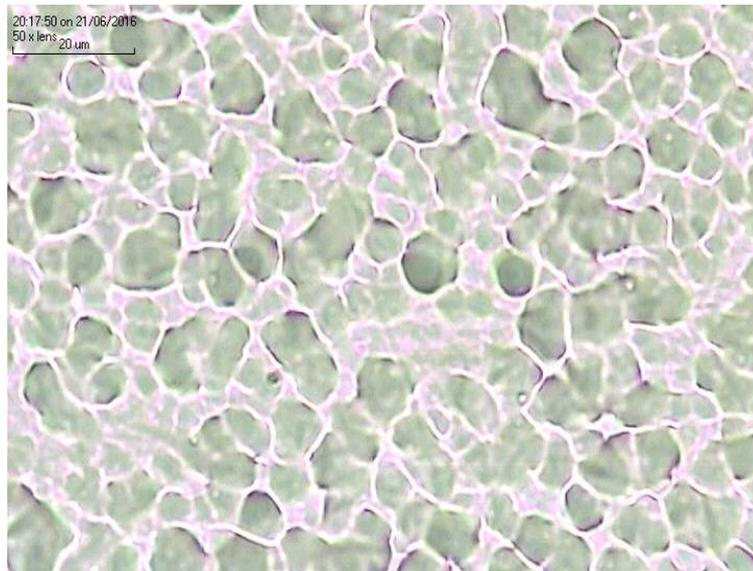


Figura 35. Experimento nº 13 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

En el experimento nº 14 se observa mayoritariamente fibras con gotas, como se aprecia en la *Figura 36*.



Figura 36. Experimento nº 14 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

En cuanto al experimento nº 17, ocurre lo mismo que para el experimento nº 8. Se observan muchas esferas y muy pequeñas (*Figura 37*).

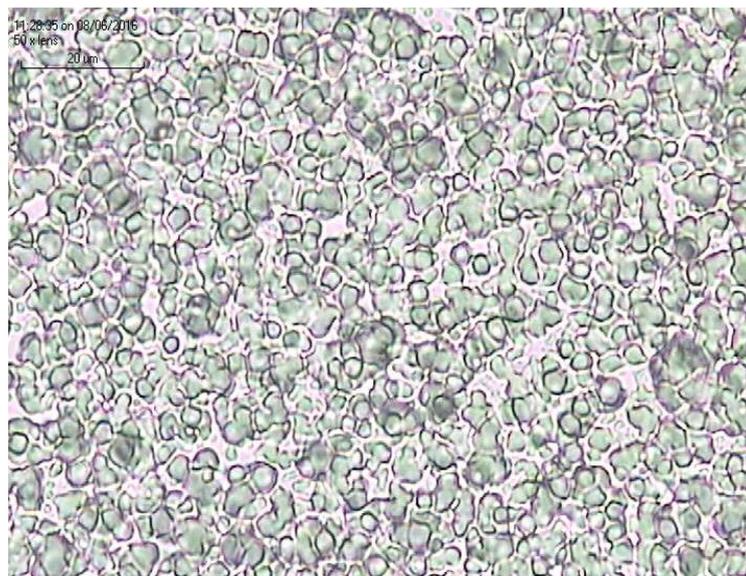


Figura 37. Experimento nº 17 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

Por último, en el experimento nº 18 también se han observado esferas de distintos tamaños, sin formación de fibras ni fibras con gotas.

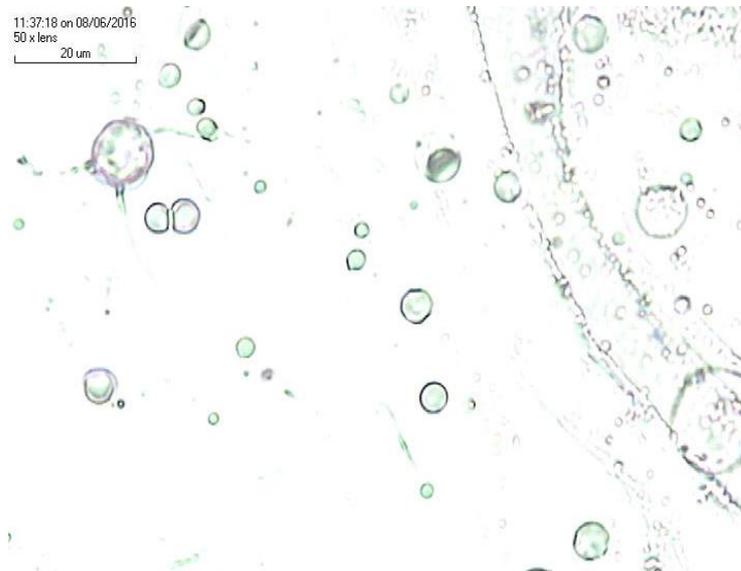


Figura 38. Experimento nº 18 de la Tabla 10 (5% ácido acrílico) observado en microscopio óptico.

Como se ha visto en el [apartado 5.3.](#), los resultados de los experimentos realizados con el copolímero de 0% de ácido acrílico no han podido ser analizados. Por tanto, se han medido los diámetros de las esferas en todas las muestras de copolímero de 5% de ácido acrílico que las produjeron, por medio del programa *ImageJ*. En la *Tabla 11* se incluyen los resultados de los experimentos del método de Taguchi con el copolímero de 5% de ácido acrílico que dieron lugar a esferas.

TABLA 11. Diámetros medios y desviación típica de partículas obtenidas en experimentos de Taguchi para el copolímero de 5% de ácido acrílico.

Exp. nº	\bar{x} (μm)	σ (μm)
2	11,4	2,7
3	9,1	2,8
4	3,9	1,2
5	6,6	2,8
6	4,1	1,6
7	3,9	1,1
8	1,9	0,5
9	3,5	1,2
13	6,3	1,6
17	2,7	0,7
18	4,2	1,9

A continuación, se va a realizar un análisis del Diseño Ortogonal de Taguchi, para determinar el efecto que cada variable tiene sobre la morfología de las partículas obtenidas. Cada parámetro tiene diferentes niveles (los valores en los que se varía). Se ha calculado el diámetro medio y la desviación estándar media para los niveles de cada parámetro. Hay que evaluar el efecto de los diferentes niveles de cada parámetro sobre el diámetro de las partículas, para lo cual se calcula el rango, la diferencia entre el valor máximo y el mínimo de cada nivel. Cuanto mayor es el rango, más importante es el parámetro. Los niveles se han escogido en función a la *Tabla 12*.

TABLA 12. Identificación de niveles para posterior análisis del método de Taguchi.

	Concentración copolímero	Proporción disolventes (DMF/DCM)	Velocidad de flujo (mL/h)	Distancia al colector (cm)	Campo eléctrico (kV/cm)
Nivel 1	4%	20/80	2	10	0,5
Nivel 2	6%	40/60	4	15	1
Nivel 3	-	60/40	8	20	1,5

En la *Tabla 13*, se presenta el desarrollo del análisis sobre los valores que se han obtenido experimentalmente.

TABLA 13. Análisis del método de Taguchi para los experimentos realizados con copolímero de 5% de ácido acrílico.

		Concentración copolímero	Proporción disolventes (DMF/DCM)	Velocidad de flujo	Distancia al colector	Campo eléctrico
Diámetro de partícula \bar{x} (μm)	Nivel 1	5,6	10,3	4,7	3,4	4,1
	Nivel 2	4,4	5,2	5,7	6,5	5,7
	Nivel 3	-	3,2	5,3	5,0	5,6
	Rango	1,2	7,1	1,0	3,1	1,6
	Importancia	4	1	5	2	3
Desviación típica σ (μm)	Nivel 1	1,7	2,8	1,3	1,0	1,5
	Nivel 2	1,4	1,8	1,7	2,0	1,5
	Nivel 3	-	1,1	1,9	1,6	1,8
	Rango	0,3	1,7	0,6	1,0	0,3
	Importancia	4	1	3	2	4
Mejor nivel		6%	60/40	2 mL/h	10 cm	0,5 kV/cm

A partir de estos resultados, se observa que la proporción de disolventes (DMF/DCM) y la distancia al colector tienen la mayor influencia tanto en el diámetro de las partículas como en la desviación típica. Con una proporción de disolventes del 60/40 de DMF/DCM, se obtienen las partículas más pequeñas. En cuanto al efecto de la distancia entre la aguja y el colector, con una distancia de 10 cm se han conseguido los menores diámetros. Con respecto a la concentración, también se ha visto que con un 6% se han obtenido partículas menores que con un 4%. Sin embargo, este parámetro, junto con el campo aplicado, es el que menos influye en la desviación típica. En cuanto a la velocidad de flujo, prácticamente no se muestra una influencia importante en el diámetro de partícula, mientras que por el contrario es de los factores más influyentes en la desviación típica. Por último, el efecto del campo eléctrico no ha estado claro, ya que el menor diámetro se obtiene con un campo eléctrico de 0,5 kV/cm, mientras que la menor desviación típica se obtiene con 1 kV/cm.

El mejor nivel se ha escogido en base a los diámetros medios más pequeños. Por lo tanto, se seleccionan como valores óptimos una concentración del 6%, 60/40 (DMF/DCM) como proporción de disolventes, una velocidad de flujo de 2 mL/h, una distancia entre la aguja y el colector de 10 cm y, por último, un campo eléctrico de 0,5 kV/cm.

7. NORMATIVA.

7.1. Reactivos químicos y equipos de protección individual

En cuanto a los reactivos químicos empleados, se han clasificado y etiquetado de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006.

Los equipos de protección para ojos utilizados son los testados y aprobados según la norma UNE-EN 166 (UE). Esta norma europea especifica los requisitos funcionales para diferentes tipos de protectores individuales de los ojos e incorpora consideraciones generales tales como:

- Designación;
- Clasificación;
- Requisitos básicos aplicables a todos los protectores de ojos;
- Diversos requisitos particulares y opcionales;
- Atribución de los requisitos, ensayos y aplicaciones;
- Marcado;
- Información para los usuarios.

Los guantes de protección seleccionados deben cumplir con las especificaciones de la Directiva de la UE 89/686/CEE, sobre aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros relativas a los equipos de protección individual.

Con respecto a la protección respiratoria, se deben usar equipos testados y aprobados bajo el Comité Europeo de Normalización, CEN (UE).

7.2. Gestión de residuos.

La gestión de residuos peligrosos se ha llevado a cabo siguiendo los protocolos del CBIT:

- Todo residuo generado en los laboratorios tiene su correspondiente contenedor.
- Antes de tirar un residuo hay que fijarse si hay un bidón ya etiquetado para el residuo.
- En caso de que no haya bidón, hay que etiquetarlo correctamente antes de tirar el residuo.
- Todos los bidones vacíos para residuos se encuentran en el almacén.
- Las etiquetas que identifican los residuos están clasificadas en grupos por la oficina del Área de Medio Ambiente (AMA).

Gestión de residuos sólidos

- Papel no contaminado: se tira en la papelera azul.
- Plástico no contaminado: en la papelera amarilla.

- Guantes no contaminados: en la papelera negra.
- El material de vidrio roto, contaminado o limpio, nunca se tira a la papelera negra normal, siempre al contenedor de residuos para vidrio (Grupo 19) que hay en Síntesis 1 y 2.
- Para tirar sólidos contaminados con monómeros hay que ponerlos en bolsas *Zip* bien cerradas, antes de tirarlos a los cubos de residuos de polimerización.
- Para el caso de otros sólidos contaminados con disolventes, primero hay que dejarlos un tiempo bajo la vitrina, hasta que se evapore el disolvente, y después se introducen en bolsas *Zip* bien cerradas antes de tirarlos.

Gestión de residuos líquidos

- Contenedores para líquidos:
 - o Disolventes no halogenados (acetona, etanol, tolueno, dimetilformamida, etc.).
 - o Disolventes halogenados (todos los que contienen flúor, cloro, bromo o yodo).
 - o Ácidos inorgánicos e inorgánicos.
 - o Soluciones de sales orgánicas e inorgánicas.
 - o Aceites, grasas e hidrocarburos.
 - o Residuos biológicos líquidos.
 - o Etc.

Todo residuo generado en los laboratorios tiene su correspondiente contenedor, no se tira nada por las pilas de lavado.

La normativa autonómica aplicable se cita a continuación:

- Ley 2/2006, de 5 de mayo, de prevención de la contaminación y calidad ambiental (DOGV nº 5256, de 11/05/06).
- Ley 10/2000, de 12 de diciembre de Residuos de la Comunidad Valenciana (DOGV nº 3898, de 15/12/00).
- ORDEN de 14 de julio de 1997, de la Conselleria de Medio Ambiente de la Comunidad Valenciana, por la que se desarrolla el Decreto 240/1994, de 22 de noviembre, del Gobierno Valenciano, por el que se aprueba el Reglamento Regulator de la Gestión de Residuos Sanitarios.
- Decreto 240/1994, de 22 de noviembre, del Gobierno Valenciano, por el que se aprueba el Reglamento Regulator de la Gestión de Residuos Sanitarios (DOGV nº 2401, de 5/12/94).
- Resolución de 24 de mayo de 2004, del Director General de Calidad Ambiental, por la que se regula el procedimiento para la comunicación telemática de las Notificaciones Previas a los Traslados (NPT) y Documentos de Control y Seguimiento (DCS) de residuos peligrosos por parte de los productores y gestores de residuos, y se aprueba la aplicación en virtud de la que se gestiona el procedimiento (DOGV nº 4772, de 10/06/04) (modificada por la Resolución de 18 de febrero de 2005, DOGV nº 4959, de 04/03/05).

8. PRESUPUESTO.

El presupuesto se calculará en función al coste de producción de 1 gramo de microesferas, utilizando los valores óptimos del proceso que se obtuvieron mediante el método de Taguchi, los cuales se indican al final del [apartado 6](#). El copolímero será el de composición 47.5:47.5:5 (EA:EMA:AA), ya que es con el que se analizó el método de Taguchi.

Coste de materiales

En primer lugar hay que obtener el coste de la polimerización. Para ello, se debe calcular la cantidad necesaria de cada sustancia química. En todos los casos, se supone que la densidad de los compuestos químicos es de 1g/ml, por lo que las masas calculadas coinciden con los volúmenes.

- Acetona (30%):

$$m_{acetona} = m_{final} \cdot 0,3 = 1g \cdot 0,3 = 0,3g$$

$$V_{acetona} = 0,3ml$$

- Benzoína (5%):

$$m_{benzoína} = (m_{final} - m_{acetona}) \cdot 0,005 = (1g - 0,3g) \cdot 0,005 = 0,0035g$$

- Acrilato de etilo (47,5 %):

$$m_{EA} = (m_{final} - m_{acetona} - m_{benzoína}) \cdot 0,475$$

$$m_{EA} = (1g - 0,3g - 0,0035g) \cdot 0,475 = 0,3308g$$

$$V_{EA} = 0,3308ml$$

- Metacrilato de etilo (47,5%):

$$m_{EMA} = (m_{final} - m_{acetona} - m_{benzoína}) \cdot 0,475$$

$$m_{EMA} = (1g - 0,3g - 0,0035g) \cdot 0,475 = 0,3308g$$

$$V_{EMA} = 0,3308ml$$

- Ácido Acrílico (5%):

$$m_{AA} = (m_{final} - m_{acetona} - m_{benzoína}) \cdot 0,05$$

$$m_{AA} = (1g - 0,3g - 0,0035g) \cdot 0,05 = 0,0348g$$

$$V_{AA} = 0,0348ml$$

Una vez calculado el precio de 1 gramo de copolímero, se tiene que obtener la cantidad de disolventes que se necesita para preparar una disolución del 4% de este material. Sabiendo que para preparar 10 ml de disolución se necesitan 0,4 gramos de copolímero, con 1 gramo podremos preparar 25 ml de disolución, de los cuales 24 ml serán de disolventes.

- Dimetilformamida:

$$V_{DMF} = 24ml \cdot 0,6 = 14,4ml$$

- Diclorometano:

$$V_{DCM} = 24ml \cdot 0,4 = 9,6ml$$

A continuación, se incluye una tabla con el presupuesto referido a los materiales. En este se ha tenido en cuenta el volumen total de las botellas de cada reactivo, y se ha calculado el precio proporcionalmente al volumen que hemos utilizado para producir 1 gramo de microesferas.

TABLA 14. Presupuesto referido a materiales empleados para producción de 1 gramo de microesferas.

Reactivo	Precio (€/L o €/kg)	Volumen requerido (mL o g)	Precio total (€)
Acetona	33,29	0,3000	0,0099
Benzoína	75,88	0,0035	0,0003
Acrilato de etilo	53,90	0,3308	0,0178
Metracrilato de etilo	57,90	0,3308	0,0192
Ácido acrílico	53,70	0,0348	0,0019
Dimetilformamida	70,75	14,4000	1,0188
Diclorometano	45,09	9,6000	0,4328
			1,50

Sesiones en microscopio electrónico de barrido

Se incluirá una estimación de las horas que serían necesarias para analizar la muestra en el Servicio de Microscopía de la Universitat Politècnica de València (UPV). El precio para usuarios de la UPV, como es nuestro caso, es de 13 €/h. Para analizar tan sólo una muestra de microesferas, sería suficiente utilizar una hora el equipo, por lo que en este caso se considera un gasto total de 13 €.

TABLA 15. Presupuesto referido a sesiones en microscopio electrónico.

Horas de reserva en SEM	Precio (€/h)	Precio total (€)
1	13	13

Horas de trabajo

En función de las condiciones del proceso de electroespray, se tendrá en cuenta el coste eléctrico, y el coste de amortización de los equipos. Si la velocidad de flujo es de 2ml/h, los 25 ml de disolución se habrán dispensado en 12,5 horas. También se incluye 1 hora empleada en el análisis de la muestra en el servicio de microscopía.

El sueldo de un trabajador que realiza una tesis doctoral se puede estimar en 2000 euros al mes. Considerando 37,5 horas de trabajo a la semana, el precio por hora sería de 13,33 €, por lo que el total sería de 179,96 €.

TABLA 16. Presupuesto referido a horas de trabajo de ingeniero químico.

Horas de trabajo	Precio (€/h)	Precio total (€)
13,5	13,33	179,96

Costes indirectos

Hay que incluir los costes indirectos en el presupuesto total. Con ellos, nos referimos a los gastos de luz, agua, teléfono, entre otros. Estos costes suponen un 25% de los costes directos.

TABLA 17. Presupuesto total sin costes indirectos para la producción de 1 gramo de microesferas.

Descripción	Precio (€)
Reactivos	1,51
Servicio de microscopía	13,00
Sueldo del trabajador	179,96
	194,47

Los costes indirectos suponen un valor de 48,62 €. Por lo tanto, el presupuesto total para producir 1 gramo de microesferas con las condiciones óptimas es de 243,09 €, teniendo en cuenta tanto costes directos como indirectos, como se aprecia en la tabla siguiente.

TABLA 18. Presupuesto total para la producción de 1 gramo de microesferas.

Descripción	Precio (€)
Costes directos	194,47
Costes indirectos	48,62
	243,09

9. CONCLUSIONES.

Como bien se ha dicho anteriormente, el objetivo de este trabajo es diseñar un proceso óptimo para la producción de microesferas mediante electroespray. La optimización se ha llevado a cabo a través del método de Taguchi. Para ello, se han realizado pruebas iniciales utilizando papel de aluminio como colector. Debido a las aglomeraciones de esferas que se observaron en el microscopio electrónico, se ha decidido realizar el proceso empleando agua como colector.

Los ensayos previos al Diseño Ortogonal de Taguchi se han realizado utilizando el nuevo montaje con el agua como colector. Se han obtenido esferas de unos diámetros medios de entre 9,4 y 10,9 micras. Se ha determinado la viscosidad y la tensión superficial para disoluciones de concentraciones de 4%, 6% y 8% de copolímero con proporción de disolventes de 40/60 de DMF/DCM en los tres casos. En base a los resultados obtenidos, se ha concluido que estos parámetros no tienen una importante influencia en el material empleado.

En cuanto al método de Taguchi, se han realizado 18 experimentos con los parámetros más influyentes y se ha concluido que el proceso óptimo se da con una concentración de disolución del 6%, proporción de disolventes de DMF/DCM del 60/40, una velocidad de flujo de 2 mL/h, distancia entre la aguja y el colector de 10 cm y campo eléctrico de 0.5 kV/cm.

En los experimentos realizados mediante el Diseño Ortogonal de Taguchi, se obtuvo un diámetro medio mínimo de microesferas de $1.9 \pm 0.5 \mu\text{m}$, con las condiciones del experimento nº 8 que se indican en la *Tabla 10*. Por tanto, con los parámetros óptimos se espera obtener esferas de un diámetro del mismo orden.

Por tanto, se puede decir que se ha cumplido el objetivo de este TFG, optimizando el proceso de producción de microesferas de copolímero basado en acrilato de etilo mediante electroespray, para obtener microesferas de un tamaño comprendido entre 1 y 10 micras.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Alió del Barrio, J. L., Chiesa, M., Gallego Ferrer, G., Garagorri, N., Briz, N., Fernandez-Delgado, J., ... De Miguel, M. P. (2015). Biointegration of corneal macroporous membranes based on poly(ethyl acrylate) copolymers in an experimental animal model. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 103(3), 1106–1118. <http://doi.org/10.1002/jbm.a.35249>
- Aranberri, I., Binks, B. P., Clint, J. H., & Fletcher, P. D. I. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3)(May 2016), 211–231.
- Areias, A. C., Gómez Tejedor, J. A., Sencadas, V., Alió, J., Gómez Ribelles, J. L., & Lanceros-Méndez, S. (2012). Assessment of parameters influencing fiber characteristics of chitosan nanofiber membrane to optimize fiber mat production. *Polymer Engineering and Science*, 52, 1293–1300. <http://doi.org/10.1002/pen>
- Avci, M. Z., & Sarac, A. S. (2013). Transparent poly(methyl methacrylate-co-butyl acrylate) nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(6), 4264–4272. <http://doi.org/10.1002/app.39705>
- Biber, E., Gündüz, G., Mavis, B., & Colak, U. (2010). Effects of electrospinning process parameters on nanofibers obtained from Nylon 6 and poly (ethylene-n-butyl acrylate-maleic anhydride) elastomer blends using Johnson SB statistical distribution function. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 99(2), 477–487. <http://doi.org/10.1007/s00339-010-5559-6>
- Bock, N., Dargaville, T. R., & Woodruff, M. A. (2012). Electrospinning of polymers with therapeutic molecules: State of the art. *Progress in Polymer Science*, 37(11), 1510–1551. <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.03.002>
- Bock, N., Woodruff, M. A., Hutmacher, D. W., & Dargaville, T. R. (2011). Electrospinning, a Reproducible Method for Production of Polymeric Microspheres for Biomedical Applications. *Polymers*, 3 (1), 131–149. <http://doi.org/10.3390/polym3010131>
- Brandrup, J., Immergut, E. H., Abe, A., & Bloch, D. R. (1999). *Polymer handbook (Vol. 89)*. New York: Wiley.
- Brown, M., He, F., & Yeung, L. F. (2008). Robust measurement selection for biochemical pathway experimental design. *International Journal of Bioinformatics Research and Applications*, 4(4), 400–416. <http://doi.org/10.1504/IJBRA.2008.021176>
- Campillo-Fernández, A. J., Unger, R. E., Peters, K., Halstenberg, S., Santos, M., Sánchez, M. S., ... Kirkpatrick, C. J. (2009). Analysis of the biological response of endothelial and fibroblast cells cultured on synthetic scaffolds with various hydrophilic/hydrophobic ratios: influence of fibronectin adsorption and conformation. *Tissue Engineering: Part A*, 15(6), 1331–1341.
- Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT). Documentación interna (2016)
- ChemAxon Ltd. (2016). <http://www.chemicalize.org/>
- Correia, D. M., Gonçalves, R., Ribeiro, C., Sencadas, V., Botelho, G., Gómez Ribelles, J. L., &

- Lanceros-Méndez, S. (2014). Electrospayed poly(vinylidene fluoride) microparticles for tissue engineering applications. *RSC Advances*, 4(62), 33013–33021. <http://doi.org/10.1039/C4RA04581E>
- Cortés, M. G. R., Díaz, B. M. V., & Perilla, J. E. (2008). Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. *Ingeniería E Investigación*, 28(1), 57–71.
- Cui, W., Li, X., Zhou, S., & Weng, J. (2007). Investigation on process parameters of electrospinning system through orthogonal experimental design. *Journal of Applied Polymer Science*, 103(7), 3105–3112. <http://doi.org/10.1002/app>
- Deitzel, J. M., Beck Tan, N. C., Kleinmeyer, J. D., Rehrmann, J., Tevault, D., Sendjarevic, I., & McHugh, A. (1999). Generation of Polymer Nanofibers Through Electrospinning. (No. ARL-TR-1989). ARMY RESEARCH LAB ABERDEEN PROVING GROUND MD.
- Duque Sánchez, L. M., Rodríguez, L., & López, M. (2014). Electrospinning : la era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14(1), 10–27.
- García Cruz, D. M., Sardinha, V., Escobar Ivirico, J. L., Mano, J. F., & Gómez Ribelles, J. L. (2013). Gelatin microparticles aggregates as three-dimensional scaffolding system in cartilage engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(2), 503–513. <http://doi.org/10.1007/s10856-012-4818-9>
- Gómez Ribelles, J. L., Almeida, R., Tamaño-Machiavello, M. N., Cordón, L., Senent, L., Correia, D. M., ... Sempere, A. (2016). Behaviour of hMSC cultured on piezoelectric quasi-3D substrates: growth and osteogenic differentiation. In *10th World Biomaterials Congress* (pp. 17–22). Montreal, Canadá.
- Gómez Tejedor, J. A., Overberghe, N. Van, Rico, P., & Gómez Ribelles, J. L. (2011). Assessment of the parameters influencing the fiber characteristics of electrospun poly(ethyl methacrylate) membranes. *European Polymer Journal*, 47(2), 119–129. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.10.034>
- Gómez-Gaete, C. (2014). Nanopartículas poliméricas: tecnología y aplicaciones farmacéuticas, 7, 7–16.
- Guarino, V., Altobelli, R., Cirillo, V., Cummaro, A., & Ambrosio, L. (2015). Additive electrospaying: a route to process electrospun scaffolds for controlled molecular release. *Polymers for Advanced Technologies*, 26(May), 1359–1369. <http://doi.org/10.1002/pat.3588>
- Hossain, K. M. Z., Patel, U., & Ahmed, I. (2014). Development of microspheres for biomedical applications: a review. *Progress in Biomaterials*, 4(1), 1–19. <http://doi.org/10.1007/s40204-014-0033-8>
- Jaworek, A., & Sobczyk, A. T. (2008). Electrospaying route to nanotechnology: An overview. *Journal of Electrostatics*, 66(3), 197–219. <http://doi.org/10.1016/j.elstat.2007.10.001>
- Kyle, R. A., Gertz, M. A., Witzig, T. E., Lust, J. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., ... Greipp, P. R. (2003). Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proceedings*, 78(1), 21–33. <http://doi.org/10.4065/78.1.21>
- Lee, B. B., Ravindra, P., & Chan, E. S. (2009). New drop weight analysis for surface tension

- determination of liquids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 332(2), 112–120. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.09.003>
- Ma, Q., Gu, L., Ma, S., & Ma, G. (2002). Study on synthesis and morphology control of poly(4-vinylpyridine-co-butyl acrylate)/poly(styrene-co-butyl acrylate) composite microspheres. *Journal of Applied Polymer Science*, 83(6), 1190–1203. <http://doi.org/10.1002/app.2285>
- Pérez Olmedilla, M., Garcia-Giralt, N., Pradas, M. M., Ruiz, P. B., Gómez Ribelles, J. L., Palou, E. C., & García, J. C. M. (2006). Response of human chondrocytes to a non-uniform distribution of hydrophilic domains on poly (ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymers. *Biomaterials*, 27(7), 1003–1012. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.030>
- Rayleigh, L. (1882). On the equilibrium if liquid conducting masses charged with electricity. *Phil. Mag. Ser. 5*, 14, 184–186.
- Ross, P. J. (1996). *Taguchi techniques for quality engineering: loss function, orthogonal experiments, parameter and tolerance design*.
- Shenoy, S. L., Bates, W. D., Frisch, H. L., & Wnek, G. E. (2005). Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer-polymer interaction limit. *Polymer*, 46(10), 3372–3384. <http://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.03.011>
- Silva, C. S. R., Luz, G. M., Gamboa-Martínez, T. C., Mano, J. F., Gómez Ribelles, J. L., & Gómez Tejedor, J. A. (2014). Poly(ϵ -caprolactone) electrospun scaffolds filled with nanoparticles. Production and optimization according to Taguchi's methodology. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 53(5), 781–799. <http://doi.org/10.1080/00222348.2013.861304>
- Taylor, G. (1964). Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 280(1382), 383–397.
- Xie, J., & Wang, C. H. (2007). Encapsulation of proteins in biodegradable polymeric microparticles using electrospray in the Taylor cone-jet mode. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(5), 1278–1290. <http://doi.org/10.1002/bit.21334>
- Yu, M., Ahn, K. H., & Lee, S. J. (2016). Design optimization of ink in electrohydrodynamic jet printing: Effect of viscoelasticity on the formation of Taylor cone jet. *Materials and Design*, 89, 109–115. <http://doi.org/10.1016/j.matdes.2015.09.141>
- Zeleny, J. (1914). The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces. *Physical Review*, 3(2), 69–91.

11. ANEXOS.

ANEXO I. SEGURIDAD ELÉCTRICA DEL EQUIPO DE ELECTROESPRAY.

Este equipo presenta riesgos de lesiones graves por electrocución. Hay que evitar en todo momento tocar el borne positivo de la fuente de tensión.

Siempre comprobar antes de manipular cualquier elemento del montaje que la fuente de tensión está apagada.

Durante la utilización de este equipo se trabaja con voltajes muy elevados, y aunque el amperaje sea bajo, es necesario trabajar con un cuidado especial.

La bomba de jeringa se conectará por defecto en un enchufe convencional. En caso de dar problemas de chispazos, o arcos eléctricos entre la aguja y la bomba, se pasará a conectarla a la fuente de corriente continua (batería de coche).

Si durante el funcionamiento, se hace imprescindible limpiar la aguja, hacerlo con sumo cuidado y con ayuda de una barra de cristal (no conductora); y prestando atención a no tocar ningún elemento más del montaje.

Una vez encendida la fuente de tensión, mantener en la medida de lo posible la guillotina bajada.

Utilizar los EPIs adecuados y consultar la información sobre PRL. Importante utilizar gafas de protección, ya que el electrohilado puede saltar hacia el usuario. Utilizar bata de laboratorio, máscara y guantes.

Preparación del montaje

- Proteger los ojos (gafas), cara (máscara de gases), manos (guantes) del contacto con la disolución.
- Asegurarse que la ventilación del laboratorio está funcionando.
- Si no lo estuviera no se debe utilizar el equipo.
- Comprobar que los bornes (+) y (-) no están en contacto ni podrán llegar a estarlo con facilidad.
- En caso de deterioro o avería no manipular el equipo.

Durante el funcionamiento del equipo

- Asegurarse que la ventilación del laboratorio es adecuada
- Mantener en la medida de lo posible la guillotina bajada
- No tocar los elementos conductores cuando la fuente de tensión esté encendida, y en la medida de lo posible, evitar manipular el resto del equipo y tocar la campana.
- No manipular sustancias inflamables en las cercanías del equipo.
- Antes de cambiar el colector comprobar que la fuente de tensión está apagada.