



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

Universitat Politècnica de València

---

# MEMBRANAS ELECTROHILADAS DE ÁCIDO POLILÁCTICO PARA LA LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS COMO AYUDA A LA CICATRIZACIÓN

---

TRABAJO FINAL DE GRADO

Grado en Biotecnología

*Autor:* Ana Belén Paes Martí

*Director:* José Luis Gómez Ribelles

*Codirector:* José Antonio Gómez Tejedor

6 de julio de 2016

Parte I

**Memoria**

# Resumen

**Título:** *Membranas electrohiladas de ácido poliláctico para la liberación de proteínas como ayuda a la cicatrización.*

**Palabras clave:** *Ácido poliláctico, albúmina de suero bovino, emulsión, electrohilado, liberación in vitro de proteína.*

El proyecto pretende desarrollar membranas que puedan utilizarse como apósitos para el suministro controlado de fármacos en enfermedades raras de la piel. En particular, el proyecto de investigación en el que está enmarcado este Trabajo Final de Grado (TFG) pretende la liberación local del péptido LL37. Sin embargo, debido a su alto costo, en la puesta a punto de la emulsión y técnica de liberación se van a utilizar otras proteínas modelo, como la Albúmina de Suero Bovino (BSA). Se preparará una emulsión de la proteína disuelta en medio acuoso junto con una disolución de ácido poliláctico disuelta en un disolvente orgánico. La emulsión se someterá a un proceso de electrohilado para producir la membrana de microfibras, se analizará la influencia de los parámetros del electrohilado sobre la formación de las mismas. Por otra parte se caracterizará la cinética de liberación de la proteína en medio acuoso. Por último se realizará también un ensayo de degradación de membranas creadas mediante electrohilado, donde se pretende caracterizar la pérdida de peso de las mismas, y la variación del Módulo de Young con el tiempo de degradación.

**Autora:** Ana Belén Paes Martí

**Tutor Académico:** Profesor Don José Luis Gómez Ribelles

**Cotutor:** Don José Antonio Gómez Tejedor

Valencia, julio de 2016

# Abstract

**Title:** *Electrospinning polylactic acid membranes for the release of helping wound healing proteins.*

**Key words:** *Poly(L-lactic acid), bovine serum albumin, emulsion, electrospinning, in vitro protein release.*

The project aims to develop membranes that can be used as dressings for drug delivery rare skin diseases. In particular, the research project in which it is framed this TFG seeks local release of the peptide LL37. However, due to its high cost, the development of the membrane are to use other model proteins such as bovine serum albumin. An emulsion of protein dissolved in an aqueous medium together with a solution of polylactic acid dissolved in an organic solvent is prepared. The emulsion was subjected to an electrospinning process to produce microfibers membrane, the influence of electrospinning parameters on the formation thereof will be discussed. Moreover the release kinetics of the protein is characterized in aqueous medium. Finally there will also be a test for degradation of membranes created by electrospinning which aims to characterize the weight loss thereof, and the variation of Young's Modulus with time degradation.

**Author:** Ana Belén Paes Martí

**Academic Tutor:** Professor Don José Luis Gómez Ribelles

**Cotutor:** José Antonio Gómez Tejedor

Valencia, july 2016

# Agradecimientos

Este Trabajo de Fin de Grado, forma la parte final de mi Grado en Biotecnología, y se ha conseguido con la ayuda de unas pocas personas, a las que me gustaría dar las gracias aquí por su apoyo.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a El Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Sobre todo, quiero expresar mi agradecimiento a mi tutor académico el Prof. José Luis Gómez Ribelles, por su orientación, explicaciones y apoyo durante el desarrollo de los experimentos para mi trabajo final de grado. Un agradecimiento especial también para mi cotutor José Antonio Gómez Tejedor, por su ayuda y asistencia a través de los aspectos teóricos y prácticos de este proyecto, y por su disponibilidad y el tiempo dedicado cada vez que me enfrentaba a un problema. Además, quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que trabajan en el CBIT: profesores, doctorandos, y demás estudiantes por el buen ambiente de trabajo y la ayuda inmediata que prestaban cada vez que se requería.

A mis padres y hermana quiero dedicarles también estas líneas de agradecimiento, ya que sin su apoyo a lo largo de toda mi carrera no habría podido llegar hasta aquí. Finalmente, también mencionar a mis amigos de siempre, por los buenos ratos que pasamos y pasaremos juntos, y cómo no, a los grandes compañeros con los que he compartido estos cuatro años de universidad y ahora ya, amigos para toda la vida.

# Índice general

<b>I</b>	<b>Memoria</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
1.1.	Estudios de liberación controlada de proteína como fármaco . . . . .	1
1.2.	Epidermolisis Bullosa Distrófica . . . . .	3
1.3.	Proteínas . . . . .	4
1.3.1.	LL37 . . . . .	4
1.3.2.	Albúmina de Suero Bovino . . . . .	4
1.4.	Polímero: Ácido poliláctico . . . . .	5
1.5.	Electrohilado . . . . .	6
1.6.	Técnicas de análisis . . . . .	8
1.6.1.	Análisis de las membranas electrohiladas y films . . . . .	8
1.6.2.	Cinética de liberación de proteínas . . . . .	10
1.6.3.	Degradación del ácido poliláctico . . . . .	11
<b>2.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>12</b>
<b>3.</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>13</b>
3.1.	Formación de la Emulsión . . . . .	13
3.1.1.	Solución PLLA/CHCL <sub>3</sub> /DMF . . . . .	13
3.1.2.	Solución BSA/PBS . . . . .	14
3.1.3.	Emulsión PLLA/BSA . . . . .	14
3.2.	Formación de los films . . . . .	15
3.2.1.	Estudio morfológico de la superficie de los films . . . . .	15
3.2.2.	Estudio morfológico de la sección transversal de los films . . . . .	15
3.3.	Formación de las membranas electrohiladas . . . . .	16
3.3.1.	Estudio de la superficie de membranas electrohiladas . . . . .	16
3.3.2.	Variación de las condiciones de electrohilado . . . . .	16
3.3.3.	Estudio de la morfología de las microfibras al SEM . . . . .	17
3.4.	Ensayo de liberación de BSA . . . . .	18
3.4.1.	Cuantificación de la proteína liberada . . . . .	18
3.5.	Caracterización de la degradación de PLLA electrohilado . . . . .	20
3.5.1.	Pérdida de peso . . . . .	20
3.5.2.	Estudio de las propiedades mecánicas . . . . .	20

<b>4. Resultados y Discusión</b>	<b>22</b>
4.1. Microestructura de los films . . . . .	22
4.1.1. Comparación morfológica de la superficie de los films . . . . .	22
4.1.2. Comparación morfológica de la sección transversal de los films . . . . .	23
4.2. Membranas electrohiladas . . . . .	24
4.2.1. Comparación de la superficie de las membranas electrohiladas . . . . .	24
4.2.2. Morfología de las microfibras vistas al SEM . . . . .	25
4.3. Ensayo de liberación de BSA . . . . .	28
4.3.1. Cuantificación del ensayo en films . . . . .	28
4.3.2. Cuantificación del ensayo en membranas electrohiladas . . . . .	31
4.4. Caracterización degradación PLLA electrohilado . . . . .	33
4.4.1. Pérdida de peso . . . . .	33
4.4.2. Estudio de las propiedades mecánicas . . . . .	35
<b>5. Conclusiones</b>	<b>36</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>36</b>
<b>II Anexo</b>	<b>40</b>
<b>6. Comparación morfológica de las microfibras</b>	<b>41</b>
<b>7. Ensayo Liberación BSA</b>	<b>48</b>
<b>8. Pérdida de masa</b>	<b>51</b>

# Nomenclatura

BSA	Albúmina de Suero Bovino
CHCL <sub>3</sub>	Cloroformo
DEB	Epidermis Bullosa Distrófica
DMF	Dimetilformamida
DPBS	Tampón fosfato salino de Dulbecco
EB	Epidermis Bullosa
FESEM	Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo
PLLA	Ácido Poliláctico
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido
TMA	Equipo de Análisis Termomecánico
UPV	Universidad Politécnica de Valencia
W/O	Agua en Aceite
WR	Reactivo de Trabajo



# Índice de figuras

1.1. Estereoformas de láctidas, (Nampoothiri et al., 2010). . . . .	5
1.2. Esquema de una configuración básica de laboratorio del equipo de electrohilado, (Crespy et al., 2012). . . . .	6
1.3. Una gota de una solución de 54 % de poli (óxido de etileno) (PEO) en agua, teñida con fluoresceína: A) en ausencia de un voltaje aplicado; B) a un voltaje aplicado de 20 kV, con un flujo perpendicular al electrón opuesto; C) a un voltaje aplicado de 20 kV, con un flujo diagonal para el electrodo opuesto, (Greiner and Wendorff, 2007). . . . .	7
1.4. Componentes del SEM, (Schweitzer, 2014). . . . .	8
1.5. Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo. . . . .	9
3.1. Equipo de electrohilado, CBIT. . . . .	16
3.2. Placa multipocillo P96. . . . .	19
3.3. TMA. . . . .	20
3.4. Diagrama de tensión-deformación, (Smith et al., 2006). . . . .	21
4.1. Fotos de la superficie de los films a distintos aumentos: A) film control a 1000x; B) film emulsión a 1000x; C) film control a 10000x; D) film emulsión a 10000x. . . . .	22
4.2. Fotos de la microestructura del criocorte de los films a 1000x: A) film control; B) film emulsión. . . . .	23
4.3. Superficie de la membrana control: A) 20000x; B) 6740x; C) 13660x; D) 7320x. . . . .	24
4.4. Superficie de la membrana emulsión: A) 3320x; B) 10000x; C) 20000x; D) 20710x. . . . .	24
4.5. Recta patrón concentraciones BSA del film . . . . .	28
4.6. Representación gráfica de la BSA acumulada en el ensayo de liberación de proteína del film. . . . .	29
4.7. Representación gráfica de la BSA acumulada en el ensayo de liberación de proteína de las membranas electrohiladas. . . . .	32
4.8. Representación gráfica del efecto del tiempo sobre el módulo de Young de las membranas electrohiladas control y emulsión. . . . .	35
7.1. Ensayo liberación BSA de membranas electrohiladas: A) Réplica 1; B) Réplica 2; C) Réplica 3. . . . .	50
8.1. Disolución control: Pérdida de masa respecto del tiempo. . . . .	51
8.2. Emulsión: Pérdida de masa respecto del tiempo. . . . .	51

# Índice de tablas

1.1. Efectos de los parámetros de electrohilado en la morfología de la fibra, (Sill and von Recum, 2008). . . . .	7
4.1. Disolución control: variación del voltaje manteniendo fijada la distancia y el caudal. . . . .	25
4.2. Disolución control: variación del caudal manteniendo fijada la distancia y el voltaje. . . . .	25
4.3. Disolución control: variación de la distancia manteniendo fijado el caudal y el voltaje. . . . .	26
4.4. Emulsión: variación del voltaje manteniendo fijada la distancia y el caudal. . . . .	26
4.5. Emulsión: variación del caudal manteniendo fijada la distancia y el voltaje. . . . .	27
4.6. Emulsión: variación de la distancia manteniendo fijado el caudal y el voltaje. . . . .	27
4.7. Cuantificación de la proteína liberada del film. . . . .	29
4.8. Ensayo de liberación del film emulsión. . . . .	30
4.9. Cuantificación de la proteína liberada de las membranas electrohiladas. . . . .	31
4.10. Ensayo de liberación de la membrana electrohilada emulsión. . . . .	32
4.11. Ensayo degradación membrana electrohilada control. . . . .	33
4.12. Ensayo degradación membrana electrohilada emulsión. . . . .	34
4.13. Módulo de Young de la membrana electrohilada control con el paso del tiempo. . . . .	35
4.14. Módulo de Young de la membrana electrohilada emulsión con el paso del tiempo. . . . .	35
6.1. Disolución control: variación del voltaje manteniendo fijada la distancia (10 cm) y el caudal (1 ml/h). . . . .	41
6.2. Disolución control: variación del voltaje manteniendo fijada la distancia (10 cm) y el caudal (2 ml/h). . . . .	42
6.3. Disolución control: variación del caudal manteniendo fijada la distancia y el voltaje. . . . .	43
6.4. Disolución control: variación de la distancia manteniendo fijado el caudal y el voltaje. . . . .	44
6.5. Emulsión: variación del voltaje manteniendo fijada la distancia (10 cm) y el caudal (1 ml/h). . . . .	45
6.6. Emulsión: variación del voltaje manteniendo fijada la distancia (10 cm) y el caudal (2 ml/h). . . . .	45
6.7. Emulsión: variación del caudal manteniendo fijada la distancia y el voltaje. . . . .	46
6.8. Emulsión: variación de la distancia manteniendo fijado el caudal y el voltaje. . . . .	47
7.1. Réplica 1: Cuantificación de la proteína liberada de la membrana electrohilada. . . . .	48
7.2. Réplica 2: Cuantificación de la proteína liberada de la membrana electrohilada. . . . .	49
7.3. Réplica 3: Cuantificación de la proteína liberada de la membrana electrohilada. . . . .	49

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Estudios de liberación controlada de proteína como fármaco

La tecnología de liberación controlada de fármacos representa una de las áreas de más rápido avance de la ciencia en la que los químicos e ingenieros químicos están contribuyendo a la salud humana. Tales sistemas de suministro ofrecen numerosas ventajas en comparación con formas de dosificación convencionales que incluyen la mejora de la eficacia, y la toxicidad reducida.

Dichos sistemas a menudo utilizan polímeros sintéticos como vehículos para los medicamentos. Al hacerlo así, los tratamientos que de otro modo no sería posible, ahora están siendo usados de manera convencional.

Todos los sistemas de liberación controlada tienen como objetivo mejorar la eficacia de las terapias médicas. Esta mejora puede adoptar la forma de aumento de la actividad terapéutica en comparación con la intensidad de los efectos secundarios, la reducción del número de administraciones del fármaco requerida durante el tratamiento, o eliminando la necesidad de la administración especializada del fármaco, (Uhrich et al., 1999).

Se pueden lograr dos tipos de control sobre la liberación del fármaco, control temporal y control de la distribución del mismo. En el control temporal, los sistemas de suministro de fármacos tienen como objetivo administrar el fármaco de manera prolongada o en un momento específico durante el tratamiento. Especialmente cuando un fármaco se metaboliza y se elimina del cuerpo después de la administración rápidamente, un sistema de liberación controlada temporal es favorable a un tratamiento convencional.

Cuando el fármaco se libera a través de una inyección, las concentraciones de fármaco fluctúan ampliamente durante las 24 horas y la concentración se mantiene sólo durante un pequeño periodo de tiempo en la ventana terapéutica. Por otra parte, cuando el fármaco se administra por un sistema de liberación controlada, la concentración de fármaco es estable y se mantiene dentro de la ventana terapéutica durante casi 24 horas.

Entre los numerosos sistemas de liberación controlada, los sistemas de administración de fármacos que utilizan polímeros biodegradables se han investigado ampliamente recientemente, (Xu et al., 2008). Uno de los requisitos que deben cumplir los polímeros biodegradables para ser utilizados en sistemas de administración de fármacos es su eliminación natural y completa del cuerpo, (Siepmann et al., 2011). Deben ser compatibles con el agente terapéutico y no deben interferir con el fármaco. Los productos de degradación de polímeros no deben producir respuesta inmunogénica ni ser tóxicos.

Los polímeros biodegradables se pueden clasificar como sintéticos o naturales. Los polímeros naturales, como el colágeno, la gelatina y el quitosano, son las proteínas y los polisacáridos presentes en las plantas o animales. Las desventajas de este grupo de polímeros utilizados en sistemas de administración de fármacos, son la falta de una tasa de degradación reproducible (debido a su degradación enzimática) y una corta vida media de liberación del fármaco (ya que son hidrogeles y producen una rápida difusión del fármaco encapsulado).

Por otra parte, los polímeros sintéticos se pueden producir con propiedades de liberación, mecánicas y de procesamiento específicas para aplicaciones exactas. Los polímeros sintéticos más comunes que se utilizan en aplicaciones de administración de fármacos son los poliésteres, tales como el ácido poliglicólico, ácido poliláctico, ácido poliláctico-co-glicólico, etc. En este proyecto, se utilizará el ácido poliláctico para hacer membranas biodegradables. Las características de este polímero se detallarán más adelante en este trabajo.

## 1.2. Epidermolisis Bullosa Distrófica

El término Epidermolisis Bullosa (EB) engloba un grupo de enfermedades ampollosas hereditarias que pueden amenazar la vida de los recién nacidos, (Das and Sahoo, 2004). EB afecta principalmente a la piel y la membrana mucosa; existe una considerable variabilidad fenotípica y la presencia de manifestaciones externas aumenta la complejidad de este trastorno, y, por lo tanto, un diagnóstico preciso de la enfermedad en el período neonatal puede ser difícil.

La Epidermolisis bullosa distrófica (DEB) es una enfermedad rara que se caracteriza por la formación de ampollas debajo de la lámina densa de la membrana basal, (Stamell and Krishnamurthy, 2013). DEB es causada por mutaciones autosómicas dominantes y recesivas del colágeno tipo VII, un componente principal de las fibrillas de anclaje. El resultado es una unión defectuosa de la membrana basal a la dermis subyacente.

En la actualidad no existe ningún tratamiento específico disponible para tratar la DEB, (Das and Sahoo, 2004). La terapia es multifactorial y debe orientarse hacia la prevención del trauma de la piel para evitar la formación de nuevas ampollas, la prevención de la infección bacteriana secundaria, el tratamiento agresivo de la infección cuando ocurre; también debe centrarse en encontrar las medidas para mejorar la cicatrización de las heridas, en buscar el tratamiento de todas las complicaciones que pueden corregirse y, por último, la recuperación última del paciente.

Las heridas de diferente etiología, profundidad y capa superficial, difieren en el pronóstico clínico y deben ser tratadas de diferente manera. La normal cicatrización de la herida se origina a partir de la proliferación de células epidérmicas en los apéndices de la capa dérmica profunda, tales como los folículos pilosos. En el borde de la herida también se produce crecimiento de la piel, pero es ineficaz para las heridas más grandes de unos pocos centímetros. Se puede concluir que las heridas grandes y profundas, debido a la falta de una correcta capa dérmica regenerada, conforman un auténtico desafío clínico y deberían tener unos tratamientos específicos e innovadores.

El apósito sintético ideal que podría desempeñar esta función debería tener las siguientes características: estar libre de antígenos, compatible con el tejido, ausencia de toxicidad local o sistémica, impermeable a microorganismos exógenos, transmisión del vapor de agua de manera similar a la piel normal, adherencia a la superficie de la herida y sus irregularidades, elástico, resistente, larga vida media, biodegradable y bajo coste, (Ehrenreich and Ruszczak, 2006).

## 1.3. Proteínas

El péptido humano antimicrobiano LL37 puede tener un papel clave en la regeneración de heridas, (Ramos et al., 2011b). Sin embargo, la albúmina de suero bovino se usa como proteína modelo en la fase experimental de este trabajo, ya que es una de las proteínas más estables y ampliamente utilizada para la evaluación de nuevos sistemas de administración de fármacos de liberación controlada, (Mukherjee et al., 2008). A continuación se detalla más información sobre estas dos proteínas.

### 1.3.1. LL37

Los péptidos antimicrobianos han sido descritos como mediadores de la respuesta de defensa innata del cuerpo. Entre las diferentes familias, las catelicidinas incluyen el péptido LL37 humano, que se expresa en neutrófilos y queratinocitos relacionados con la inflamación de la piel. Además del papel en la defensa del huésped contra la infección, existen otras actividades que parecen ser mediadas por el receptor que se ha reportado para este péptido antimicrobiano, (Carretero et al., 2008). Varios informes indicaron que LL37 también es capaz de mediar en las respuestas celulares que contribuyen a la respuesta inmune y puede mejorar el proceso de curación de heridas, (Bals and Wilson, 2003); (Bardan et al., 2004).

Según se ha demostrado experimentalmente, (Ramos et al., 2011a); el péptido sintético y recombinante LL37 acelera fuertemente el proceso de curación con una re-epitelización casi completa después de 7 días. Por otra parte, un número significativo de nuevos vasos sanguíneos estaban presentes en las heridas tratadas con el péptido. Ya se ha presentado la importancia de LL37 en la cicatrización de heridas, también se ha probado que LL37 se puede utilizar por vía tópica para apoyar la cicatrización de heridas. La aplicación tópica del péptido permite una mejor regulación del proceso, además de que las concentraciones aplicadas, pueden ser fácilmente controladas y la administración se puede interrumpir en cualquier momento mediante el uso de sistemas de entrega de liberación controlada del péptido.

### 1.3.2. Albúmina de Suero Bovino

Las albúminas son un grupo de proteínas ácidas que se producen en abundancia en los fluidos corporales, tejidos de los mamíferos y algunas veces en semillas de plantas. En general, las albúminas tienen pesos moleculares bajos, son solubles en agua, son fácilmente cristalizables y contienen un exceso de aminoácidos ácidos.

La albúmina de suero bovino (BSA) es una proteína del suero ampliamente utilizada en investigación debido a su bajo coste, su amplia disponibilidad y su estructura conocida, (Chaudhary et al., 2014). La proteína BSA está compuesta por una única cadena de polipéptido, con una secuencia de aminoácidos que consiste en 583 residuos con un peso molecular de 66,4 kDa. La estructura se compone de dominios helicoidales (I, II y III) dispuestos en una molécula en forma de corazón, (Majorek et al., 2012).

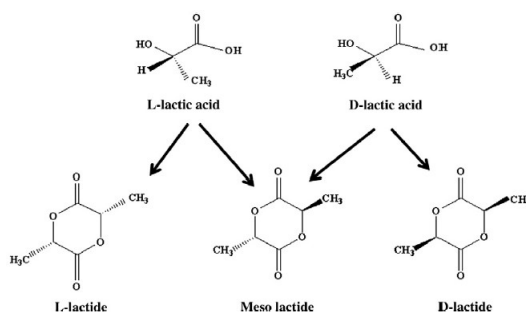
## 1.4. Polímero: Ácido poliláctico

El ácido poliláctico (PLLA) ha generado un gran interés como uno de los materiales más innovadores que se están desarrollando para una amplia gama de aplicaciones. Este polímero es termoplástico y biodegradable, lo que lo hace muy atractivo para aplicaciones biológicas y médicas. Puede transformarse por electrohilado en filamentos para la posterior fabricación de membranas que pueden ser usadas como apósitos. Las aplicaciones médicas de este polímero se derivan de su biocompatibilidad: el producto de degradación, ácido láctico, es metabólicamente inocuo; las fibras se pueden fabricar en diversas formas y pueden ser utilizados para los implantes y otras aplicaciones quirúrgicas tales como suturas, (Gupta et al., 2007).

En las aplicaciones biomédicas interesan este tipo de polímeros que después de implantarse se degradan y se eliminan del organismo sin dejar ningún tipo de residuos. Entre los numerosos tipos de polímeros degradables desarrollados, el ácido poliláctico, a veces llamado polilactida, un poliéster termoplástico biocompatible y alifático, es actualmente un material muy prometedor y popular, (Nampoothiri et al., 2010).

El ácido poliláctico existe como una hélice polimérica, con una celda unitaria ortorrómbica. Sus propiedades dependen de los isómeros de sus componentes, de la temperatura de tratamiento, el tiempo y el peso molecular. La poli-L-lactida (PLLA) es el producto resultante de la polimerización del isómero L-lactida, tiene una cristalinidad de alrededor de 37%, una temperatura de transición vítrea entre 50 hasta 80°C y una temperatura de fusión entre 173 a 178°C. La capacidad de cristalización de las polilactidas disminuye con la estereorregularidad de su cadena y por debajo del 43% de cristalización la pureza óptica ya no es posible, (Fraschini et al., 2005).

La forma más común para obtener ácido poliláctico de alto peso molecular, es a través de la polimerización de apertura del anillo de lactida. La lactida intermedia, un dímero cíclico de ácido láctico, se forma en la primera etapa cuando el agua producto de la condensación se elimina por evaporación durante la oligomerización. Tres estereoformas de lactida son posibles: L-lactida, D-lactida, y meso-lactida (**Figura 1.1**), (Nampoothiri et al., 2010).

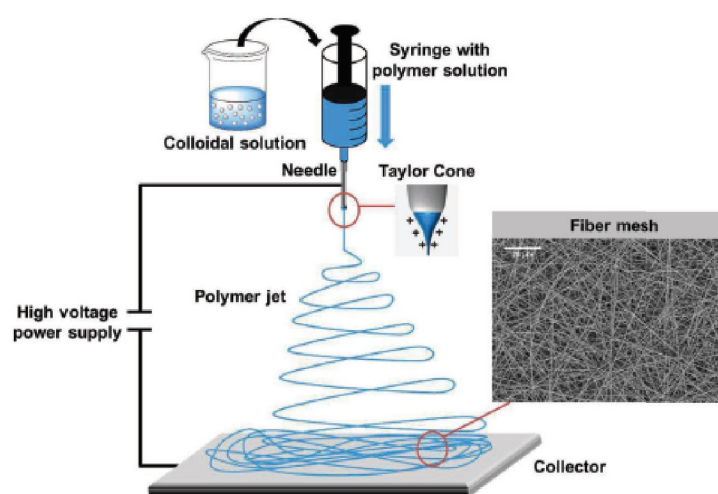


**Figura 1.1:** Estereoformas de láctidas, (Nampoothiri et al., 2010).

## 1.5. Electrohilado

La emulsión que contiene BSA y PLA se convertirá en membranas a través de la técnica del electrohilado, cuyos fundamentos son discutidos a continuación. La técnica de Electrohilado es actualmente la única que permite la fabricación de fibras continuas con diámetros de hasta unos pocos nanómetros. El método se puede aplicar tanto a los polímeros sintéticos como a los naturales, aleaciones de polímeros, polímeros cargados con cromóforos, nanopartículas, o agentes activos, así como a los metales y cerámicas, (Greiner and Wendorff, 2007).

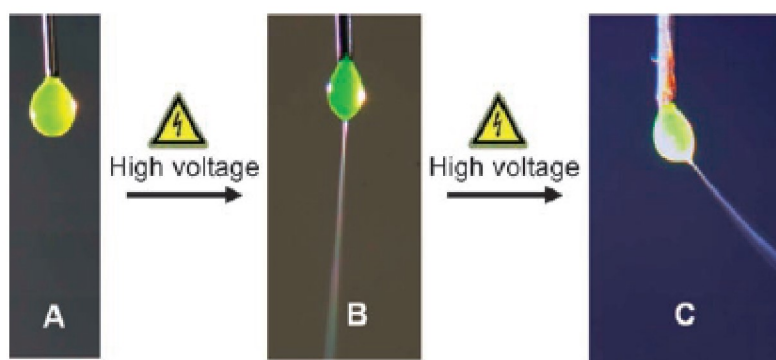
La configuración básica de electrohilado a escala de laboratorio, requiere tres componentes principales: una fuente de alimentación de alta tensión (1-30 kV), un conjunto de jeringa y aguja de metal, y un colector eléctricamente conductor colocado opuesto a la jeringa y aguja (**Figura 1.2**). La solución del polímero orgánico o inorgánico se alimenta a través de la jeringa y aguja de metal a una velocidad de flujo constante formando una gota en la punta de la aguja. Cuando un fuerte campo eléctrico se aplica al líquido, la gotita se somete a una deformación cónica, llamada cono de Taylor, que culmina en la expulsión de un chorro de polímero líquido hacia el contraelectrodo (colector) una vez que las fuerzas electrostáticas superan la tensión superficial de las gotitas. Este chorro se somete a un fuerte proceso de adelgazamiento y estiramiento en su camino hacia el colector debido a la evaporación del disolvente y las fuerzas de repulsión electrostáticas, (Crespy et al., 2012).



**Figura 1.2:** Esquema de una configuración básica de laboratorio del equipo de electrohilado, (Crespy et al., 2012).

Como ya se ha comentado, la tensión aplicada causa una deformación en forma de cono en la gota de solución de polímero, en la dirección del electro opuesto (**Figura 1.3**). Si se aplican voltajes más altos, un jet se forma de la gota deformada, que se mueve hacia el electrodo opuesto y se estrecha en el proceso; en el camino hacia el contraelectrodo, el disolvente se evapora, y las fibras sólidas con diámetros que van de micrómetros a nanómetros se precipitan a altas velocidades en el colector, (Greiner and Wendorff, 2007).





**Figura 1.3:** Una gota de una solución de 54% de poli (óxido de etileno) (PEO) en agua, teñida con fluoresceína: A) en ausencia de un voltaje aplicado; B) a un voltaje aplicado de 20 kV, con un flujo perpendicular al electrón opuesto; C) a un voltaje aplicado de 20 kV, con un flujo diagonal para el electrodo opuesto, (Greiner and Wendorff, 2007).

Los parámetros de la solución, también juegan un papel importante en la formación y estructura de la fibra. En un orden relativo de impacto en el proceso de electrohilado se pueden encontrar la concentración de polímero, la volatilidad del disolvente y la conductividad del disolvente. De ahí que se pueden extraer un número de relaciones generales entre los parámetros de procesamiento y la morfología de las fibras (**Tabla 1.1**), es importante darse cuenta de que la relación exacta será diferente para cada sistema de polímero y disolvente. Por lo tanto, es difícil dar relaciones cuantitativas que se pueden aplicar en una amplia gama de sistemas de polímero/disolvente, (Sill and von Recum, 2008).

**Tabla 1.1:** Efectos de los parámetros de electrohilado en la morfología de la fibra, (Sill and von Recum, 2008).

Parámetro	Efecto en la morfología de las fibras
Voltaje aplicado aumenta	Primero diámetro disminuye, después aumenta
Velocidad de alimentación aumenta	Diámetro aumenta
Distancia aumenta	Diámetro disminuye
Concentración del polímero aumenta	Diámetro aumenta
Conductividad de la disolución aumenta	Diámetro disminuye
Volatilidad del solvente aumenta	Fibras con micro texturas, porosas

## 1.6. Técnicas de análisis

En este apartado, se explicarán las técnicas que se utilizarán para estudiar la morfología de las fibras creadas mediante el electrohilado, además de las técnicas usadas para demostrar la presencia de BSA dentro de las membranas electrohiladas y los films, compuestos por la emulsión de la proteína BSA y el polímero PLLA.

### 1.6.1. Análisis de las membranas electrohiladas y films

Las membranas electrohiladas, se analizan mediante el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), con el objetivo de estudiar los posibles cambios de morfología de las fibras al variar los parámetros de electrohilado. El Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM), se utiliza también con el objetivo de caracterizar la superficie y estructura interna de las membranas electrohiladas, en comparación a la estructura obtenida de los mismos materiales pero en films.

#### Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)

Un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), utiliza un haz de electrones enfocado para escanear la superficie de una muestra y producir imágenes, (Yoshimura, 2013). Los electrones emitidos interactúan con los átomos de la muestra, produciendo señales que pueden ser detectadas y que contienen información acerca de la topografía de la superficie y la composición de la muestra. Los componentes claves de un microscopio electrónico de barrido son la fuente de electrones, la columna hacia abajo, por donde los electrones viajan gracias a lentes electromagnéticas, el detector de electrones, la cámara de muestra y un ordenador con una pantalla para ver las imágenes, (Schweitzer, 2014). La **Figura 1.4** muestra la configuración del SEM con sus componentes principales.

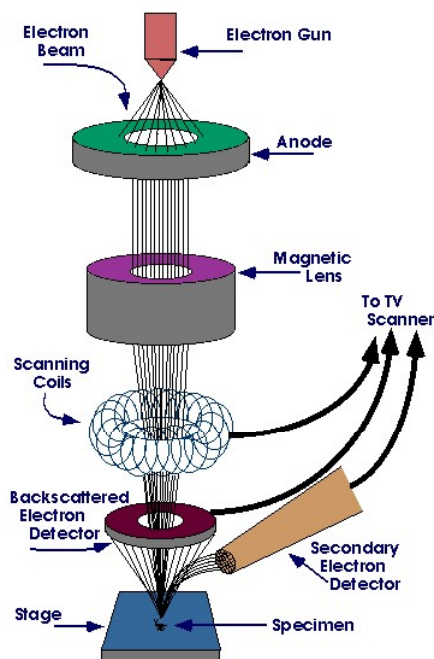
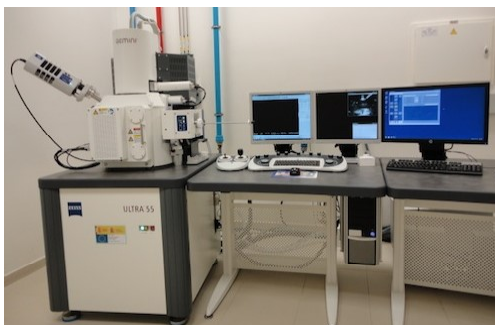


Figura 1.4: Componentes del SEM, (Schweitzer, 2014).

Los electrones se producen en la parte superior de la columna, aceleran por la columna mientras pasan a través de una combinación de lentes electromagnéticas que producen un haz enfocado de electrones, (Schweitzer, 2014). Cuando el haz incide sobre la superficie de la muestra, colocado en el área de la cámara, se lleva a cabo una interacción de los electrones con la muestra, produciendo una serie de 21 señales que pueden ser detectadas por un detector de electrones. Las muestras se pueden observar en alto vacío o bajo vacío y se pueden lograr resoluciones de hasta 1 nm, (Yoshimura, 2013).

### Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM)

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) (**Figura 1.5**), es un instrumento que al igual que el SEM es capaz de ofrecer una amplia variedad de información procedente de la superficie de la muestra, pero con mayor resolución y con un rango de energía mucho mayor. El funcionamiento es igual al de un SEM convencional; se barre un haz de electrones sobre la superficie de la muestra, mientras que en un monitor, se visualiza la información que nos interesa en función de los detectores disponibles.



**Figura 1.5:** Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo.

La mayor diferencia entre un FESEM y un SEM, reside en el sistema de generación de electrones. El FESEM utiliza como fuente de electrones un cañón de emisión de campo que proporciona haces de electrones de alta y baja energía muy focalizados, lo que mejora notablemente la resolución espacial y permite trabajar a muy bajos potenciales, (0.02 - 5 kV); esto ayuda a minimizar el efecto de carga en especímenes no conductores y a evitar daños en muestras sensibles al haz electrónico. Otra característica muy destacable de los FESEM, es la utilización de detectores dentro de la lente. Estos detectores están optimizados para trabajar a alta resolución y muy bajo potencial de aceleración, por lo que son fundamentales para obtener el máximo rendimiento al equipo, (UPV, 2012).

### 1.6.2. Cinética de liberación de proteínas

Para estudiar la cinética de liberación de la proteína BSA contenida en los films y en las membranas electrohiladas se usan varios sistemas de detección y cuantificación, a saber, la técnica de espectroscopía UV visible y la técnica colorimétrica mediante la utilización del kit enzimático de MicroBCA.

#### Espectroscopía Ultravioleta Visible

La Espectroscopía de Ultravioleta Visible, es un método analítico basado en la absorción de luz ultravioleta (UV) o luz visible (Vis), para determinar la concentración de un cierto componente en una muestra. Normalmente, se utiliza una luz no polarizada con un rango de longitudes de onda entre 185 nm y 760 nm, (Braun et al., 2012). La muestra se irradia con la luz y las moléculas son capaces de absorber la radiación, gracias a la radiación de la energía absorbida, las moléculas alcanzan el estado excitado, que es un nivel de energía más alto que el estado fundamental original. Las moléculas pueden volver al estado fundamental por la pérdida de la energía extra en forma de calor o de luz.

La aplicaciones de la espectroscopía UV en el análisis cuantitativo de los grupos que producen absorción es muy importante. Su aplicación se basa en la ley de Lambert-Beer. La ley de Lambert-Beer indica que la intensidad de la radiación disminuye logarítmicamente a medida que la longitud del paso óptico y la concentración aumentan aritméticamente. En otros términos, podríamos decir que la absorbancia ( $A$ ) es directamente proporcional a la anchura de la cubeta ( $b$ ) y a la concentración de la muestra ( $c$ ), siendo la constante de proporcionalidad ( $\epsilon$ ) un parámetro característico denominado absorptividad. De esta forma, midiendo la absorbancia de una muestra, podremos conocer por ejemplo, la concentración del analito, (Blauch, 2014).

#### Colorimetrías

Las técnicas colorimétricas, se basan en la medida de la absorción de radiación en la zona visible por sustancias coloreadas. En algunas ocasiones, la muestra que deseamos determinar no posee color por sí misma; en tal caso, es preciso llevar a cabo un desarrollo de color empleando reactivos que den lugar a sustancias coloreadas con la muestra que interesa estudiar. En general, las medidas se realizan dentro del espectro comprendido entre 220 y 800 nm, y este espectro, a su vez, puede dividirse en dos amplias zonas: la zona de la radiación visible, situada por encima de 380 nm, y la zona de la radiación ultravioleta situada por debajo de estos 380 nm. La región del infrarrojo se sitúa por encima de los 800 nm. En el proceso de absorción de la radiación, un fotón incidente transmite su energía a una molécula (llamada absorbente), lo que da lugar a su excitación pasando a un nivel de energía superior.

Siempre que sea posible, es aconsejable la construcción de una curva de calibración que cubra la zona de concentraciones que se van a encontrar en la práctica. La elaboración de la curva debe ser la fase primera al montar y estandarizar cualquier procedimiento fotométrico, (Panreac, 2000).

### 1.6.3. Degradación del ácido poliláctico

A continuación, se detalla información sobre las características del ácido poliláctico relacionadas con su degradabilidad; además de una sencilla descripción de las técnicas ideales para la caracterización de este proceso, mencionando también como afecta a las propiedades mecánicas del material dicho deterioro con el tiempo. Siendo las técnicas elegidas el estudio de la pérdida de masa y un ensayo mecánico de tracción.

#### **Pérdida de masa**

El comportamiento de los scaffolds porosos durante su degradación, juega un papel importante en el proceso de ingeniería de creación de un nuevo tejido. La tasa de degradación de scaffolds porosos afecta a la vitalidad celular, el crecimiento celular, e incluso a la respuesta del huésped. Una vez implantado en el cuerpo, un scaffold poroso debe mantener las propiedades mecánicas y la integridad estructural hasta que las células se adapten al entorno y excreten la cantidad suficiente de matriz extracelular. Por otra parte, después de que el scaffold haya cumplido su misión, el deseo general es que sea completamente degradado y absorbido por el cuerpo, sin dejar ningún rastro en la mayoría de los casos. Se cree que la velocidad ideal de degradación in vivo, debe ser similar o ligeramente inferior a la tasa de formación de nuevo tejido. Finalmente, el espacio tridimensional ocupado por los scaffolds porosos se sustituye por el tejido recién formado, (Wu and Ding, 2004).

#### **Ensayo Mecánico**

Desde el punto de vista de la ingeniería tisular, las fuerzas mecánicas experimentadas por las células cultivadas en un scaffold, son propensas a ser influenciadas por los comportamientos mecánicos del mismo scaffold en sí y el medio ambiente y microestrés que proporciona. Una cierta cantidad de resistencia mecánica es necesaria para que in vivo, el dispositivo no sea aplastado cuando se implanta; además pueden ser muy importantes los cambios de las propiedades mecánicas producidos con el tiempo, ya que soportan mucho peso cuando se trata de aplicaciones como ingeniería del tejido óseo. Por lo tanto, la comprensión de las propiedades mecánicas y la forma en que cambian durante la degradación, es muy útil para la buena comprensión y predicción eficaz del proceso de deterioro; de modo que uno pueda diseñar dispositivos para aplicaciones particulares con todos sus requerimientos cubiertos, (Wu and Ding, 2004).

Uno de los ensayos más completos por la información que aporta respecto al comportamiento de los materiales, es el ensayo de tracción. El ensayo de tracción, tiene por objeto definir la resistencia elástica, resistencia última y plasticidad del material cuando se le somete a fuerzas uniaxiales para lo que es necesario, conseguir la rotura del material, por lo que es un ensayo destructivo.

## Capítulo 2

# Objetivos

El objetivo principal de la línea de investigación en la que se enmarca el TFG, es la obtención de membranas electrohiladas de un polímero biodegradable que puedan contener un fármaco y liberarlo de forma controlada, con aplicaciones en regeneración de tejidos epiteliales. Para ello, el método elegido es el electrohilado, gracias a la flexibilidad que le confiere al material.

Para lograr este propósito, se han de lograr una serie de objetivos fundamentales como son:

- Formación de una emulsión que permita la perfecta homogenización del polímero hidrófobo PLLA y la proteína BSA hidrófila.
- Elaboración de los films compuestos por el polímero puro, disuelto en sus disolventes orgánicos, el cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y la dimetilformamida (DMF); además del film compuesto por la emulsión.
- Electrohilado de las disoluciones, del polímero puro y de la emulsión. Además de la creación de las membranas electrohiladas para los ensayos de liberación de proteína y el estudio de degradación del PLLA, se realizan otras membranas en las que se estudia mediante microscopía la influencia de los parámetros de electrohilado en la morfología de las microfibras formadas.
- Montaje del experimento de liberación de proteína, a partir de los materiales creados, los films y las membranas electrohiladas; además de su posterior toma de muestra a los tiempos indicados y estudio de los resultados pertinentes.
- Estudio de la influencia de la degradación con el tiempo de las membranas electrohiladas con dos experimentos, una medida de la pérdida de masa con el tiempo, y un análisis de las propiedades mecánicas, en el que se estudia si el módulo de Young del PLLA se ve afectado por el tiempo de degradación, a la vez que se comparan los resultados obtenidos entre el material compuesto por el polímero únicamente y el que contiene la proteína diluida en la emulsión.

## Capítulo 3

# Materiales y Métodos

### 3.1. Formación de la Emulsión

#### 3.1.1. Solución PLLA/CHCL<sub>3</sub>/DMF

##### Materiales

- PLLA 4042D (Ingeo® NatureWorks)
- Cloroformo
- Dimetilformamida
- Balanza analítica (Denver Instrument, Bohemia, NY)
- Placa de agitación magnética

##### Método

Para preparar la disolución de PLLA en CHCL<sub>3</sub> y DMF, el primer paso es pesar los gramos necesarios del polímero. Teniendo en cuenta que se prepara para tener un volumen final de 100 ml, y que el porcentaje en peso de PLLA es un 10 % (w/v), se pesan 10 gramos de PLLA mediante la balanza y se añaden a un frasco ISO de vidrio. A continuación se añade el volumen correspondiente de los disolventes orgánicos del PLLA, sabiendo que la relación de CHCL<sub>3</sub>/DMF es 4:1. Por lo que primero se añaden 80 ml de CHCL<sub>3</sub> y se deja en agitación overnight. Al día siguiente, se añade el volumen restante del otro disolvente orgánico del PLLA, la DMF, una vez se añaden estos 20 ml y tras una rápida agitación, la disolución del polímero ya está completa. Con esto se consigue un volumen final de 100 ml, del cual la mitad se utilizará para establecer un control, en el que solo está el polímero en sus disolventes orgánicos; mientras que el volumen restante se utilizará para crear la emulsión, es decir, se mezclará con la proteína BSA.

### 3.1.2. Solución BSA/PBS

#### Materiales

- Albúmina de suero bovino (SIGMA)
- DPBS (Gibco® by Life Technologies<sup>TM</sup>)
- Balanza analítica electrónica (Mettler Toledo AX205)

#### Método

La preparación de la solución de BSA, disuelta en DPBS con una concentración del 20 % (w/v), consiste en disponer 2 g de la proteína BSA pesados en una balanza en un vial de vidrio, a continuación se añade el volumen necesario de DPBS, en este caso 10 ml. Mediante una agitación suave, la proteína se disuelve rápidamente en cuestión de minutos.

### 3.1.3. Emulsión PLLA/BSA

#### Materiales

- Solución PLLA/CHCl<sub>3</sub>/DMF al 6 % (w/v)
- Solución BSA/DPBS al 20 % (w/v)
- Instrumento de dispersión de alto rendimiento (IKA® T25 digital ULTRA-TURRAX®, Staufen, Germany)
- Bomba de jeringa (New Era Pump Systems Inc, NE-4000, Fatmingdale, NY)

#### Método

El ratio de la fase acuosa y la fase orgánica de la emulsión es un 5 % (v/v), por lo que se introducen 47,5 ml de la solución de PLLA/CHCl<sub>3</sub>/DMF en un vaso de precipitados de 250 ml. De la solución de BSA/DPBS se necesitan 2,5 ml, que se introducen en una jeringa de plástico; la cual se conecta a un tubo de plástico, que por el otro extremo tiene una aguja con un diámetro interno de 0,5 mm. La jeringa se coloca en la bomba, que se programa con un caudal de alimentación de 0,2 ml/min, de manera que la disolución de BSA/DPBS cae gota a gota en la disolución del polímero en el vaso de precipitados. Todo este proceso dura 20 minutos; se produce bajo unas condiciones de agitación de aproximadamente 6400 rpm gracias al equipo de homogenización y a temperatura ambiente. Es importante realizar los films o la membranas electrohiladas inmediatamente después de haber realizado la emulsión, puesto que tras 24 horas la emulsión W/O pierde su estado homogéneo.



## 3.2. Formación de los films

### Materiales

- Emulsión W/O (PLLA/BSA)
- Disolución PLLA/CHCl<sub>3</sub>/DMF al 6 % (w/v)
- Placas petri de plástico
- Pipeta pasteur

### Método

Se realizan dos tipos de films, el control, compuesto de la disolución de PLLA/CHCl<sub>3</sub>/DMF; y el film de BSA, formado por la emulsión de PLLA/CHCl<sub>3</sub>/DMF y BSA/PBS. Para hacer el film control mediante una simple pipeta pasteur de plástico, se añade el volumen necesario a una placa Petri. En este caso, para una placa Petri de pequeñas dimensiones con 5 ml se alcanzó el tamaño de film óptimo. Con 24 h de secado a temperatura ambiente y semi cerrado, se consigue la perfecta formación del film. Para la realización del film prueba, se siguen las mismas indicaciones que para el film control.

### 3.2.1. Estudio morfológico de la superficie de los films

Para el estudio de la superficie de los films y su visualización al FESEM, se cortan trozos de las muestras de aproximadamente 1 x 1 cm, se pegan al soporte de muestra del FESEM mediante cinta de carbono, y se recubren con paladio para hacerlas conductoras. Una vez realizada la preparación de las muestras, ya pueden ser visualizadas al equipo y tomarse las fotos a diferentes aumentos.

### 3.2.2. Estudio morfológico de la sección transversal de los films

Para la criofractura, se sumerge un trozo de muestra suficientemente grande en nitrógeno líquido, después se saca súbita e inmeditamente y se coge con dos pinzas con las que se fractura. A continuación, teniendo siempre presente la posición exacta de dicha fractura, se corta un trozo de muestra y se deja la fractura hacia arriba, de modo que en el microscopio se observa la sección transversal (el espesor) del film. Para que la muestra sea estable dentro del microscopio, se pega dicho trozo de muestra al soporte circular con cinta de carbono, e igualmente se recubre con paladio antes, para verla en el FESEM.

### 3.3. Formación de las membranas electrohiladas

#### Materiales

- Emulsión W/O (PLLA/BSA)
- Disolución PLLA/CHCl<sub>3</sub>/DMF al 6 % (w/v)
- Equipo de electrohilado

#### Método

Para el proceso de electrohilado, se sigue el mismo procedimiento en la creación de la membrana control, compuesta por la disolución de PLLA/CHCl<sub>3</sub>/DMF y para la membrana de prueba, formada por la emulsión de PLLA con BSA. Los parámetros seleccionados del electrohilado son los siguientes: una aguja de diámetro interno de 0,45 mm, una distancia de 10 cm entre la punta de la aguja y el colector, una velocidad de alimentación de 1ml/h, y una diferencia de potencial de 20 kV; (**Figura 3.1**). El proceso se realiza a temperatura ambiente y dura aproximadamente de 3-4 horas, considerando que se gastan alrededor de 8-10 ml de cada disolución.



**Figura 3.1:** Equipo de electrohilado, CBIT.

#### 3.3.1. Estudio de la superficie de membranas electrohiladas

Para el estudio de la superficie de las membranas electrohiladas y su visualización al FESEM, se cortan trozos de las muestras de aproximadamente 1 x 1 cm, se pegan al soporte de muestra del FESEM mediante cinta de carbono, y se recubren con paladio para hacerlas conductoras. Una vez realizada la preparación de las muestras, ya pueden ser visualizadas al equipo y tomarse las fotos a diferentes aumentos.

#### 3.3.2. Variación de las condiciones de electrohilado

El objetivo de hacer varias muestras de electrohilado, es para poder comparar como afecta la variación de condiciones como voltaje, distancia, y velocidad de alimentación, a la formación de las microfibras, su diámetro, forma y demás características. En este caso, el proceso de electrohilado es muy rápido y su duración ronda los 10 minutos. Se realiza por duplicado, por un lado se prueba la disolución control, formada por el PLLA y sus disolventes; y por el otro lado la emulsión, formada ya por la mezcla homogénea del polímero y la proteína BSA.

En el caso de la disolución control, para probar como afecta la variación del voltaje, se mantienen fijados los otros dos parámetros variables, en este caso la distancia entre la aguja y el colector son 10 cm, mientras que el caudal se mantiene en 1 ml/h; el voltaje se prueba a tres niveles diferentes, a 15, 20 y 25 kV. Este ensayo para el voltaje se realiza en las mismas condiciones, pero esta vez con una mayor velocidad de alimentación, 2 ml/h. Para estudiar el efecto del caudal, se mantienen las condiciones de distancia y voltaje fijadas, a 10 cm y 20 kV respectivamente; variando la velocidad de alimentación 0,5 ml desde 1 hasta 3 ml/h. Y por último, en el caso de la distancia, se mantiene un caudal de 2 ml/h y un voltaje de 20 kV; mientras que la distancia se prueba a 10, 15 y 20 cm.

Para el caso de la emulsión, se realiza un ensayo similar al ya comentado para la disolución control, se fija la distancia a 10 cm, el caudal primero a 1 ml/h y posteriormente a 2 ml/h; variando el voltaje entre 15 y 20 kV solamente esta vez. Después se fija la distancia a 10 cm y el voltaje a 15 kV, y se varía el caudal desde 1 hasta 3 ml/h, como en el control. Para la distancia, el voltaje se mantiene en 15 kV y el caudal en 3 ml/h, probando la distancia a 10, 15 y 20 cm.

### 3.3.3. Estudio de la morfología de las microfibras al SEM

La visualización de las muestras al SEM, requiere de un proceso de preparación previo de las mismas. Las membranas electrohiladas, formadas tras la variación de los parámetros del electrohilado, han de ser cortadas en pequeños trozos de aproximadamente 0,5 x 0,5 mm, los cuales se colocan sobre pequeños portas. A continuación, las muestras se bañan en oro, con lo que ya se pueden visualizar al SEM (JEOL JSM-6300). Para ello se utiliza un voltaje de 20 kV y una distancia de trabajo de 10 mm.

De cada muestra se toman distintas fotos, primero una a 500x y posteriormente cuatro fotos a 5000x; a partir de las cuales se puede obtener la media del diámetro de las fibras, así como la desviación estándar de estas medidas. En total se hacen 100 medidas y se obtiene el promedio, todo esto se realiza gracias al software ImageJ.

### 3.4. Ensayo de liberación de BSA

El objetivo de este ensayo de liberación de BSA, es cuantificar la cantidad de proteína BSA que se va liberando gracias a la degradación del film o membrana electrohilada que la contiene. Este ensayo se lleva a cabo de manera paralela con los dos tipos de films creados, el control compuesto de PLLA/CHCL<sub>3</sub>/DMF y el de prueba que contiene la emulsión de PLLA/CHCL<sub>3</sub>/DMF y BSA/DPBS; además de con las membranas electrohiladas, una también como control, formada únicamente por el polímero y sus disolventes orgánicos, y otra de prueba conteniendo la emulsión con la proteína BSA.

Una vez los films y las membranas electrohiladas están formadas, se dispone el ensayo de liberación, para ello se cortan pequeños trozos de film o de membrana, con un tamaño aproximadamente de 1x1 cm, se pesan y se colocan en pequeños vasos de vidrio junto con 1 ml de DPBS. A partir de ese momento, se empieza a medir la liberación de proteína a determinados tiempos, 3 horas, 6 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 7 días, 14 días y 21 días. El volumen de muestra recogido es siempre 0,5 ml, una vez retirado este volumen e introducido en un eppendorf, se añade 0,5 ml de DPBS al bote donde se está produciendo la liberación, de manera que permanezca en todo momento con un volumen constante.

#### 3.4.1. Cuantificación de la proteína liberada

##### Espectroscopía UV visible

Se realiza una prueba con el HPLC con el objetivo de cuantificar la concentración de la proteína BSA obtenida en el ensayo de liberación con los films. El buffer utilizado para este propósito fue DPBS. Se probaron los dos detectores disponibles, el de índice de refracción y el ultravioleta. El UV permite establecer dos longitudes de onda para la detección de dos compuestos diferentes. Mediante investigación en literatura se establecieron las longitudes de onda para detectar nuestros compuestos de interés, el PLLA y la BSA.

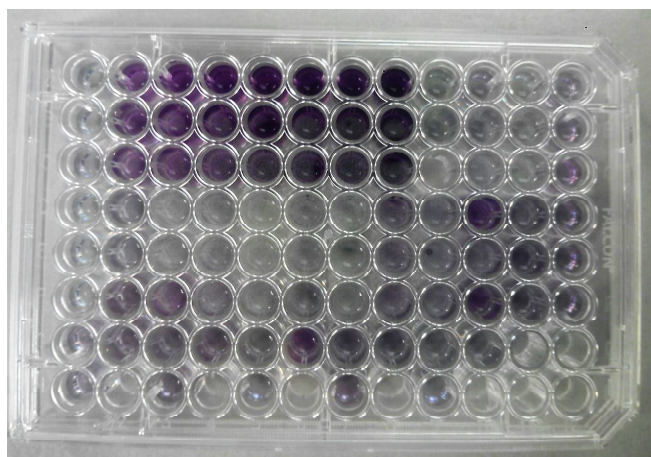
##### MicroBCA Protein Assay Kit

###### Materiales

- Micro BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Thermo scientific, 23235)
- Multilabel reader (Perkin Elmer, VICTOR3 TM, Waltham , Massachusetts)
- Software 'Wallac 1420'
- Muestras en eppendorfs de films control y prueba
- Muestras en eppendorfs de membranas electrohiladas control y prueba

### Método

Otra manera de detectar el contenido de proteína de los sobrenadantes es utilizando el Kit de ensayo de proteínas Micro BCA. Se midieron tres réplicas técnicas de cada muestra. Siguiendo el protocolo estándar para el Kit de ensayo de proteínas Micro BCA, el reactivo de trabajo (WR) se preparó a partir de 25 partes de Micro BCA Reactivo A (MA), 24 partes de Micro BCA Reactivo B (MB) y 1 parte de Micro BCA Reactivo C (MC). La curva de calibración estándar de la proteína se obtuvo mediante una serie de disoluciones de BSA de concentraciones conocidas. En una microplaca de 96 pocillos, (**Figura 3.2**), se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de WR y 100  $\mu\text{l}$  de los estándares de calibración o de las muestras, esto se realiza previa incubación durante 90 minutos a 37°C. Después de la incubación, se midió la absorbancia con un lector Multilabel a 570 nm. Todas las absorbancias fueron corregidas por el correspondiente duplicado en blanco.



**Figura 3.2:** Placa multipocillo P96.

### 3.5. Caracterización de la degradación de PLLA electrohilado

El estudio de la degradación del PLLA en forma de membranas electrohiladas, se lleva a cabo mediante medidas de la pérdida de peso tras ciertos tiempos de incubación con 1 ml de DPBS a una temperatura de 37°C. Los tiempos a los que se someten los trozos de membrana electrohilada (tanto control como emulsión), que miden aproximadamente 5 x 30 mm, son los siguientes: 2, 4 y 8 semanas. Posteriormente a las medidas de peso de las muestras electrohiladas de PLLA, se realiza un ensayo mediante el Equipo de Análisis Termomecánico (TMA), con el objetivo de determinar la pérdida de propiedades mecánicas tras el proceso de degradación, este ensayo consiste en una medida de la tensión y deformación para obtener el módulo de Young.

#### 3.5.1. Pérdida de peso

Una vez las muestras de membrana electrohiladas cumplen su tiempo de degradación, han de sufrir un lavado para eliminar los posibles restos de sales presentes debido al DPBS, se realizan dos lavados con agua destilada. Posteriormente se secan a temperatura ambiente, y a continuación a vacío mediante extracción continua. Después de esto, ya pueden ser pesados con una balanza analítica.

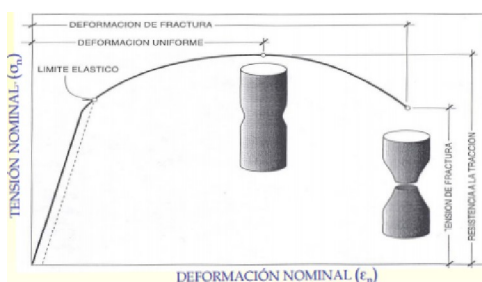
#### 3.5.2. Estudio de las propiedades mecánicas

El ensayo de tracción se realiza con el equipo TMA (**Figura 3.3**), que es capaz de registrar las fuerzas que se aplican y los alargamientos que sufre la muestra en cuestión. Dicha muestra se coloca bien sujeta gracias a unas mordazas, que permitirán que sufra una carga de una fuerza determinada, con una velocidad de aplicación definida y constante, en este caso, se permite un máximo desplazamiento de 100 mm con un ratio de desplazamiento de 2000 mm. Este ensayo dura aproximadamente 20 minutos, los datos obtenidos se tratan con el objetivo de obtener el módulo de Young del PLLA y poder determinar como ha afectado el proceso de degradación al mismo.



Figura 3.3: TMA.

En el ensayo se mide la deformación (alargamiento) de la muestra entre dos puntos fijos de la misma a medida que se incrementa la carga aplicada, y se representa gráficamente en función de la tensión (carga aplicada dividida por la sección de la probeta), (**Figura 3.4**), (Shackelford et al., 2010). El coeficiente de proporcionalidad entre la tensión y la deformación se denomina módulo de elasticidad o de Young y es característico del material.



**Figura 3.4:** Diagrama de tensión-deformación, (Smith et al., 2006).

A partir de los ensayos de tracción realizados a todas las muestras y sus réplicas, se obtendrán a continuación los parámetros ya comentados que definen el comportamiento del material bajo estudio al verse sometido a tensiones de tracción.

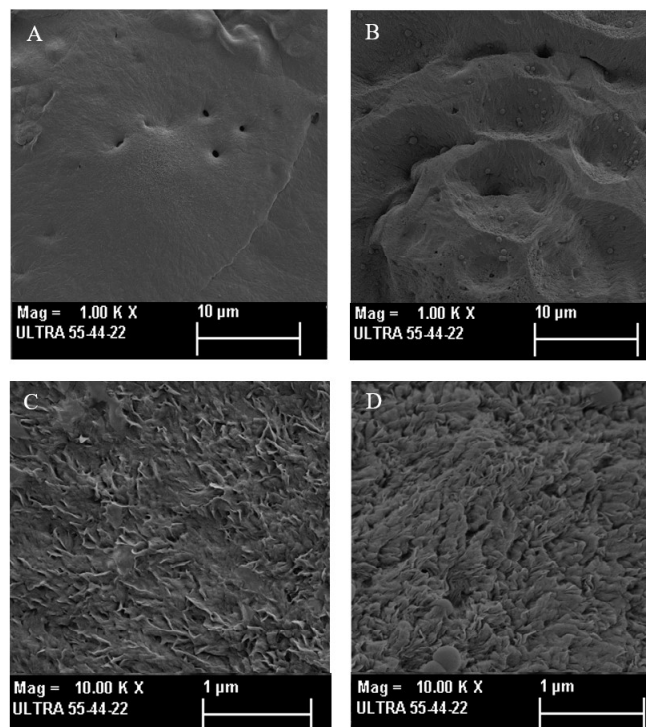
## Capítulo 4

# Resultados y Discusión

### 4.1. Microestructura de los films

#### 4.1.1. Comparación morfológica de la superficie de los films

Viendo las imágenes (**Figura 4.1**) tomadas a la superficie de los films control y emulsión, se puede apreciar la diferente conformación de su cara externa; ya que el film emulsión tiene una superficie más erosionada, con cráteres de mayor profundidad, que el film control.

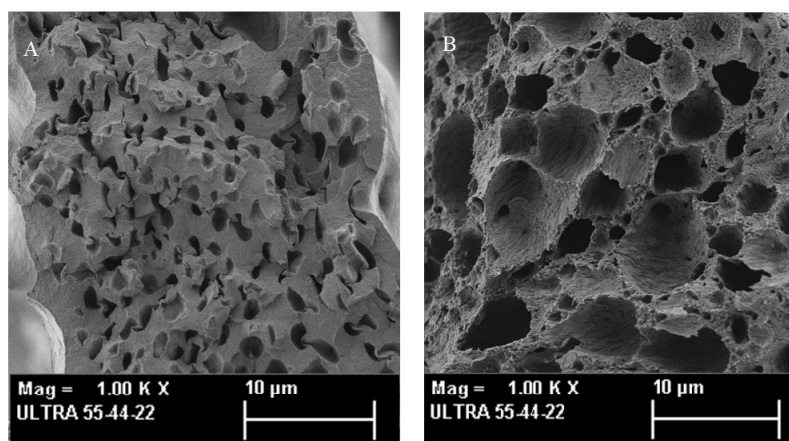


**Figura 4.1:** Fotos de la superficie de los films a distintos aumentos: A) film control a 1000x; B) film emulsión a 1000x; C) film control a 10000x; D) film emulsión a 10000x.



#### 4.1.2. Comparación morfológica de la sección transversal de los films

En la siguiente imagen, (**Figura 4.2**), se puede apreciar la diferente estructura interna que se forma en los films cuando contiene proteína y cuando no. El film control, compuesto únicamente por el polímero PLLA y sus disolventes orgánicos, tiene poros de tamaños más pequeños, en comparación a los poros del film compuesto por la emulsión del polímero y su proteína. Además de que el film de la emulsión tiene unos poros de mayor tamaño, también están interconectados, ofreciendo canales para el paso y liberación de la proteína.



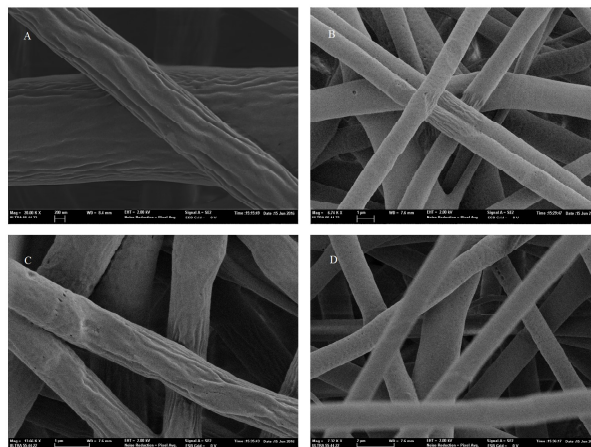
**Figura 4.2:** Fotos de la microestructura del criocorte de los films a 1000x: A) film control; B) film emulsión.

Este es un resultado interesante, ya que la diferencia entre una muestra y otra es la presencia o no, de la proteína en la fase acuosa de la emulsión, en la fase orgánica formada por la disolución de PLLA. Con la presencia de la proteína cambian propiedades como la tensión superficial de la fase acuosa, su densidad o la velocidad de evaporación del agua al formarse el film. Como se aprecia en la **Figura 4.2**, donde la dispersión es mucho más fina en el caso de dispersar sólo agua en la fase orgánica. De cara a la liberación de la proteína es crucial conseguir que los poros que contienen la proteína estén conectados entre sí, lo que da camino a su difusión hacia el medio exterior.

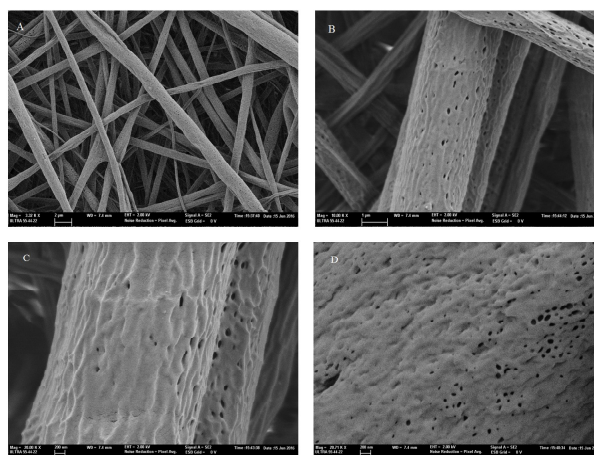
## 4.2. Membranas electrohiladas

### 4.2.1. Comparación de la superficie de las membranas electrohiladas

Los resultados de la comparación de la superficie de la membrana control y emulsión se muestran a continuación en la **Figura 4.3** y **4.4**. Como bien muestran las imágenes, se aprecia una estructura más porosa en las microfibras formadas a partir de la emulsión del PLLA y la proteína BSA.



**Figura 4.3:** Superficie de la membrana control: A) 20000x; B) 6740x; C) 13660x; D) 7320x.



**Figura 4.4:** Superficie de la membrana emulsión: A) 3320x; B) 10000x; C) 20000x; D) 20710x.

El efecto mostrado en los films, en el que la presencia de la proteína produce la formación de una estructura muy porosa, no se ve del mismo modo en el caso de las fibras electrohiladas, al menos no en la misma medida. Se aprecia mayor rugosidad en la superficie de las fibrillas formadas con la emulsión que contiene la proteína, pero no se aprecian grandes poros como en el film. Hay que tener en cuenta que el proceso de evaporación de los disolventes, el agua y el disolvente orgánico, es completamente distinto en el caso del film y en el del electrohilado. En el electrohilado la evaporación se produce bruscamente en el tránsito del "jet" entre la aguja y el colector.

### 4.2.2. Morfología de las microfibras vistas al SEM

Gracias a las imágenes tomadas mediante el SEM y el software de análisis ImageJ, se obtiene la media del diámetro de las microfibras, a la vez que la desviación estándar de estas medidas. En el **Anexo**, se puede ver la representación principal de estas imágenes tomadas a las muestras electrohiladas de la disolución control y la emulsión del polímero con la proteína.

La **Tabla 4.1** muestra los resultados del estudio de la morfología de las microfibras formadas de la disolución control (polímero y sus disolventes) cuando se varía el parámetro del voltaje en el electrohilado de la misma, manteniendo fijados los otros dos parámetros, la distancia a un valor de 10 cm entre la aguja y el colector, y el caudal a un valor de 1 ml/h. Posteriormente, en la misma tabla, se pueden observar los resultados del mismo ensayo, pero esta vez con una velocidad de alimentación superior, de 2 ml/h. Estos valores indican que el voltaje no afecta de manera significativa al diámetro de las microfibras en estas condiciones testadas.

**Tabla 4.1:** Disolución control: variación del voltaje manteniendo fijada la distancia y el caudal.

Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Caudal (ml/h)	Diámetro medio ( $\mu\text{m}$ )	Desviación ( $\mu\text{m}$ )
15	10	1	1,23	0,16
20	10	1	1,15	0,15
25	10	1	1,48	0,24
15	10	2	1,18	0,13
20	10	2	1,15	0,13
25	10	2	1,25	0,19

La **Tabla 4.2** muestra los resultados del estudio de la morfología de las microfibras formadas de la disolución control (polímero y sus disolventes) cuando se varía el parámetro del caudal en el electrohilado de la misma, manteniendo fijados los otros dos parámetros, la distancia a un valor de 10 cm entre la aguja y el colector, y el voltaje a 20 kV. Los valores del diámetro de estas microfibras no muestran una diferencia significativa al aumentar el caudal de alimentación de la disolución en el proceso de electrohilado de la misma.

**Tabla 4.2:** Disolución control: variación del caudal manteniendo fijada la distancia y el voltaje.

Caudal (ml/h)	Distancia (cm)	Voltaje (kV)	Diámetro medio ( $\mu\text{m}$ )	Desviación ( $\mu\text{m}$ )
1,0	10	20	1,15	0,15
1,5	10	20	1,23	0,14
2,0	10	20	0,99	0,12
2,5	10	20	1,22	0,20
3,0	10	20	0,96	0,18

La **Tabla 4.3** muestra los resultados del estudio de la morfología de las microfibras formadas de la disolución control (polímero y sus disolventes) cuando se varía el parámetro de la distancia en el electrohilado de la misma, manteniendo fijados los otros dos parámetros, la velocidad de alimentación a un valor de 2 ml/h, y el voltaje a 20 kV. Con estos resultados no se puede concluir que el aumento de la distancia entre la aguja y el colector afecte al diámetro de las microfibras formadas, puesto que no se aprecia una diferencia significativa ni progresiva en los valores de los diámetros tomados a partir de las fotos.

**Tabla 4.3:** Disolución control: variación de la distancia manteniendo fijado el caudal y el voltaje.

Distancia (cm)	Caudal (ml/h)	Voltaje (kV)	Diámetro medio ( $\mu\text{m}$ )	Desviación ( $\mu\text{m}$ )
10	2	20	0,99	0,12
15	2	20	1,13	0,19
20	2	20	0,94	0,12

A continuación se muestran los resultados del ensayo de la morfología de las microfibras formadas en el proceso de electrohilado de la emulsión, por motivos de insuficiencia de espacio las fotos obtenidas mediante el SEM de dichas microfibras se pueden ver en el **Anexo**.

En este caso, la **Tabla 4.4** muestra la variación en el diámetro de las fibras y la desviación estándar de estas medidas cuando se aumenta el voltaje y se deja fijada la distancia y el caudal. A diferencia de lo ocurrido en la disolución control, estos resultados sí que muestran una influencia clara de este parámetro, puesto que al producirse un aumento del voltaje aplicado en el proceso de electrohilado se aprecia una disminución en el diámetro de las microfibras.

**Tabla 4.4:** Emulsión: variación del voltaje manteniendo fijada la distancia y el caudal.

Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Caudal (ml/h)	Diámetro medio ( $\mu\text{m}$ )	Desviación ( $\mu\text{m}$ )
15	10	1	0,67	0,12
20	10	1	0,64	0,08
15	10	2	0,80	0,25
20	10	2	0,66	0,10

La **Tabla 4.5**, dónde se muestra la influencia del caudal en la morfología de las microfibras, indica que un aumento de la velocidad de alimentación provoca un pequeño aumento del diámetro de las fibras. Este resultado se mantiene en cuatro de los cinco casos probados, el caudal a 2,5 ml/h es la excepción a esta tendencia.

**Tabla 4.5:** Emulsión: variación del caudal manteniendo fijada la distancia y el voltaje.

Caudal (ml/h)	Distancia (cm)	Voltaje (kV)	Diámetro medio ( $\mu\text{m}$ )	Desviación ( $\mu\text{m}$ )
1,0	10	15	0,67	0,12
1,5	10	15	0,88	0,12
2,0	10	15	0,94	0,13
2,5	10	15	1,15	0,20
3,0	10	15	1,07	0,18

En la **Tabla 4.6**, a diferencia de lo ocurrido con la disolución control, se puede deducir una tendencia de estos resultados, ya que con el aumento de la distancia entre la aguja y el colector, se observa una disminución del diámetro de las fibras formadas.

**Tabla 4.6:** Emulsión: variación de la distancia manteniendo fijado el caudal y el voltaje.

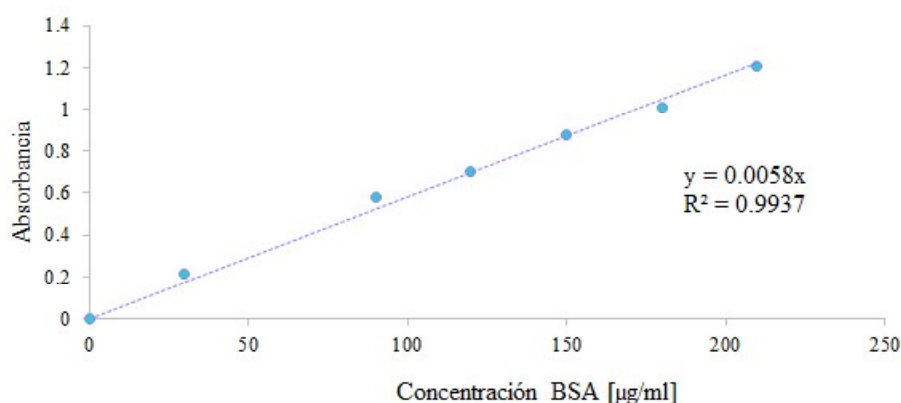
Distancia (cm)	Caudal (ml/h)	Voltaje (kV)	Diámetro medio ( $\mu\text{m}$ )	Desviación ( $\mu\text{m}$ )
10	3	15	1,07	0,18
15	3	15	0,93	0,16
20	3	15	0,86	0,13

### 4.3. Ensayo de liberación de BSA

En este apartado, se muestran los resultados del ensayo de liberación de la proteína BSA en sus correspondientes experimentos en los films y membranas electrohiladas. La cuantificación de la proteína se realizó mediante dos procedimientos, el HPLC y el Kit MicroBCA. Los resultados de las medidas del HPLC no son concluyentes, puesto que la sensibilidad del equipo no fue suficiente para detectar las concentraciones con las que se trata en este ensayo. Por lo que a continuación, se detallan los datos obtenidos de la cuantificación realizada únicamente con el kit MicroBCA.

#### 4.3.1. Cuantificación del ensayo en films

En la **Figura 4.5** se muestra la recta patrón realizada para obtener la ecuación de la recta que permite calcular la concentración de la proteína con el valor de su absorbancia. Las concentraciones de las disoluciones usadas para este propósito son las siguientes: 0, 30, 90, 120, 150, 180 y 210  $\mu\text{g/ml}$ . Gracias a esta representación, dividiendo la absorbancia entre 0,0058 se obtiene la cantidad de proteína presente en cada muestra.



**Figura 4.5:** Recta patrón concentraciones BSA del film

Los resultados obtenidos tras la medida de la absorbancia de las muestras del film llevadas a ensayo se muestran en la **Tabla 4.7**, el tiempo se muestra en días de incubación de la muestra en DPBS, la concentración inicial hace referencia a la existente antes de tomar muestra, mientras que la final es la de después de tomar la muestra, el total equivale a la cantidad total de proteína, y por último, el acumulado muestra la liberación acumulada en el tiempo de la proteína. A simple vista se pueden apreciar unas concentraciones decrecientes de la proteína BSA conforme aumenta el tiempo de incubación de la muestra. Estas concentraciones a cada tiempo se obtienen gracias a una medida por triplicado de cada muestra, los cálculos y tablas referentes a este hecho se pueden encontrar en el **Anexo**.

Tabla 4.7: Cuantificación de la proteína liberada del film.

Tiempo (días)	Inicial ( $\mu\text{g}$ )	Final ( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )	Acumulado ( $\mu\text{g}$ )
0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,125	201,42	100,71	201,42	201,42
0,25	154,52	77,26	53,81	255,23
1	152,17	76,08	74,91	330,14
2	109,88	54,94	33,80	363,93
3	77,56	38,78	22,62	386,55
6	56,41	28,21	17,63	404,19
8	32,71	16,35	4,50	408,68
10	25,79	12,89	9,44	418,12
14	22,05	11,02	9,15	427,27
21	19,96	9,98	8,93	436,21

En la **Figura 4.6** se representan los valores de proteína liberada en el ensayo del film, estos resultados, junto con los indicados en la anterior tabla, indican que la máxima cantidad de proteína liberada está alrededor de los 400  $\mu\text{g}$ , y que al cabo de 6 - 8 días, se produce la máxima liberación posible de la BSA.

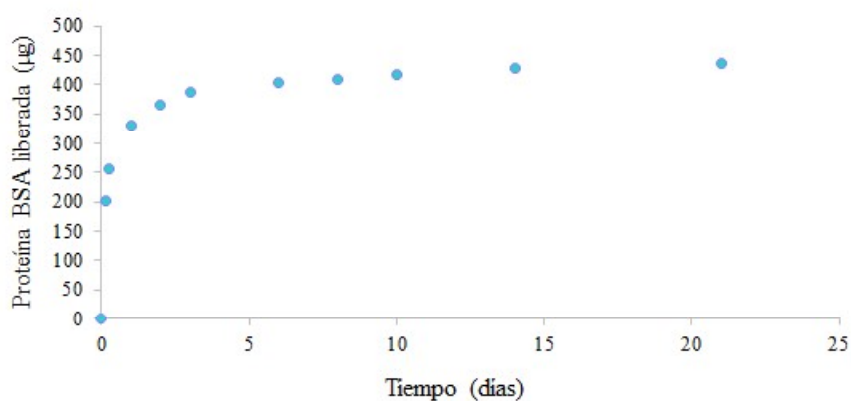


Figura 4.6: Representación gráfica de la BSA acumulada en el ensayo de liberación de proteína del film.

En la siguiente **Tabla 4.8**, se muestra la relación entre la cantidad máxima teórica de BSA que puede liberar el film y la obtenida mediante el ensayo de liberación. La máxima concentración teórica se calculó teniendo en cuenta el peso del film, de manera que el 5% de tal cantidad, es la existencia total de BSA en el film.

**Tabla 4.8:** Ensayo de liberación del film emulsión.

<b>Film emulsión: 28,9 mg</b>	
Máxima [BSA] teórica	1,445 mg
Máxima [BSA] real	0,436 mg
BSA liberada	30,17 %

El resultado obtenido está relacionado con la microestructura que vimos en el apartado **4.1. Microestructura de los films**, la interconexión entre los poros que contienen la proteína crea vías para su difusión y liberación al medio acuoso en el que sumerge la muestra. Es de destacar que el PLLA no es permeable a la proteína. Si las moléculas de BSA se encuentran completamente rodeadas por el polímero, no pueden liberarse hasta que las cadenas de polímero no se degradan y, como veremos en el apartado siguiente, eso ocurre en tiempos considerablemente mayores que los de la liberación.



### 4.3.2. Cuantificación del ensayo en membranas electrohiladas

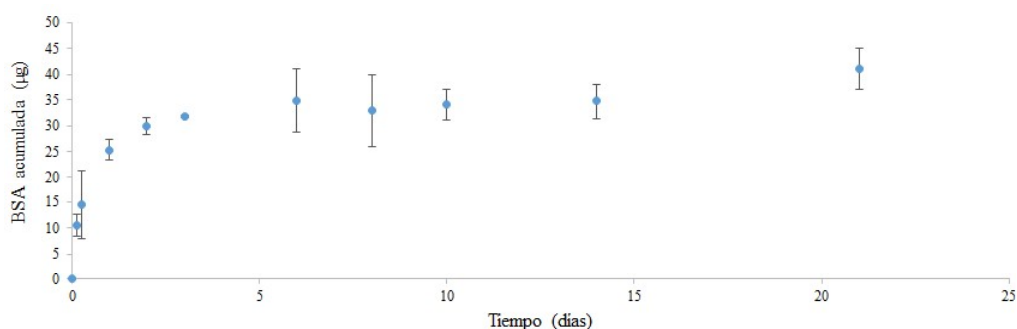
De igual manera que en el caso de los films, en el ensayo de liberación de la proteína en las membranas electrohiladas, se realizó el experimento con tres réplicas biológicas, pero en este caso se midieron todas, con sus respectivas tres réplicas técnicas, los resultados de las medidas de las réplicas técnicas se pueden encontrar en el **Anexo**.

En la **Tabla 4.9** aparecen los resultados de la concentración acumulada a lo largo de los 21 días del experimento de liberación, detallando los resultados de las tres réplicas biológicas además del promedio utilizado posteriormente para la representación gráfica.

**Tabla 4.9:** Cuantificación de la proteína liberada de las membranas electrohiladas.

Tiempo (días)	Réplica 1 ( $\mu\text{g}$ )	Réplica 2 ( $\mu\text{g}$ )	Réplica 3 ( $\mu\text{g}$ )	Promedio ( $\mu\text{g}$ )
0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,125	8,15	12,40	11,10	10,55
0,25	6,89	17,50	19,38	14,59
1	26,87	26,05	23,00	25,31
2	31,77	28,72	29,04	29,84
3	32,12	31,52	31,63	31,76
6	27,93	39,94	36,51	34,80
8	26,59	31,67	40,36	32,87
10	31,34	33,77	37,32	34,14
14	32,60	32,78	38,63	34,67
21	38,81	38,67	45,62	41,03

Al igual que en el experimento de liberación del film, la representación gráfica de la proteína liberada (**Figura 4.7**) sigue una tendencia exponencial, con una liberación máxima a los 6 - 8 días, con la diferencia significativa de que esta vez la máxima proteína liberada ronda el valor de los 40  $\mu\text{g}$ .



**Figura 4.7:** Representación gráfica de la BSA acumulada en el ensayo de liberación de proteína de las membranas electrohiladas.

En la siguiente **Tabla 4.10**, se muestra la relación entre la cantidad máxima teórica de BSA que puede liberar la membrana electrohilada, calculada gracias al promedio del peso de las tres réplicas biológicas medidas en este ensayo; y la obtenida mediante el ensayo de liberación.

**Tabla 4.10:** Ensayo de liberación de la membrana electrohilada emulsión.

<b>Membrana emulsión: 21,63 mg</b>	
Máxima [BSA] teórica	1,081 mg
Máxima [BSA] real	0,041 mg
BSA liberada	3,79 %

En este caso la mayor parte de la proteína queda retenida en las fibrillas de PLLA y la liberación se espera que tenga lugar en tiempos más largos. Ha quedado pendiente (por la falta de disponibilidad del equipo) la medida mediante termogravimetría del contenido total de proteína encapsulada en las membranas electrohiladas, para descartar que parte de la proteína introducida en la emulsión se perdiera en el proceso de electrohilado, aunque eso no se considera probable porque la cantidad de proteína es suficientemente alta como para que se hubiera detectado en el colector o en la jeringuilla después del proceso.

## 4.4. Caracterización degradación PLLA electrohilado

### 4.4.1. Pérdida de peso

A continuación, en la **Tabla 4.11**, se muestran los resultados del ensayo de degradación de la membrana control de PLLA. Dicho ensayo, se lleva a cabo en un espacio de tiempo de 8 semanas, en el cual, las muestras de membrana electrohilada están embebidas en DPBS, lo que provoca que, pese a los lavados con agua destilada realizados, se hayan incorporado sales del suero al interior de la membrana, resultando en un aumento de peso de la muestra. Esto hecho junto con el mínimo deterioro de la muestra, sugiere que el tiempo de degradación del PLLA electrohilado es mayor al probado en este experimento.

**Tabla 4.11:** Ensayo degradación membrana electrohilada control.

	Peso i (mg)	Peso f (mg)	Diferencia	Promedio (mg)	Tiempo
<b>T1-1</b>	5,60	6,10	0,089		
<b>T1-2</b>	5,30	6,00	0,132		
<b>T1-3</b>	3,20	3,40	0,062	0,07	2 semanas
<b>T1-4</b>	6,03	6,10	0,012		
<b>T2-1</b>	6,58	6,51	-0,011		
<b>T2-2</b>	5,87	6,58	0,121		
<b>T2-3</b>	5,02	5,14	0,024	0,01	4 semanas
<b>T2-4</b>	6,45	5,94	-0,079		
<b>T3-1</b>	5,71	5,78	0,012		
<b>T3-2</b>	5,94	5,99	0,008		
<b>T3-3</b>	4,53	4,58	0,011	0,01	8 semanas
<b>T3-4</b>	6,37	6,37	0,000		

En el caso del ensayo de degradación de la membrana emulsión (**Tabla 4.12**), donde se prueba la degradación de la mezcla del polímero con la proteína BSA, los resultados indican unas conclusiones similares a las de la membrana control. A las 2 y 4 semanas se aprecia un ligero aumento de peso, propio de la incorporación de las sales del DPBS a la membrana, solo a las 8 semanas, se ve una disminución del peso de la muestra, un valor muy pequeño, pero que nos indica que se necesitan grandes tiempos de degradación para este material, además de que la presencia de la proteína facilita este mecanismo.

**Tabla 4.12:** Ensayo degradación membrana electrohilada emulsión.

	<b>Peso i (mg)</b>	<b>Peso f (mg)</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Promedio (mg)</b>	<b>Tiempo</b>
<b>T1-1</b>	2,98	3,40	0,141		
<b>T1-2</b>	4,17	5,00	0,199	0,126	2 semanas
<b>T1-3</b>	3,20	3,40	0,062		
<b>T1-4</b>	2,45	2,70	0,102		
<b>T2-1</b>	2,46	2,53	0,028		
<b>T2-2</b>	2,45	2,51	0,024	0,010	4 semanas
<b>T2-3</b>	3,29	3,31	0,006		
<b>T2-4</b>	2,45	2,40	-0,020		
<b>T3-1</b>	3,03	3,01	-0,007		
<b>T3-2</b>	3,01	2,91	-0,033	-0,019	8 semanas
<b>T3-3</b>	3,75	3,67	-0,021		
<b>T3-4</b>	2,89	2,85	-0,014		

Cabe añadir, que puesto que al máximo tiempo testado, 8 semanas, las muestras control no muestran una pérdida de peso apreciable, y que las muestras de la emulsión presentan una pérdida de masa menor del 2%, la conclusión de este experimento, es que no hay degradación apreciable en lo que se refiere a la pérdida de masa del material.

#### 4.4.2. Estudio de las propiedades mecánicas

En la **Tabla 4.13** y **4.14**, se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de tracción al que se han sometido las muestras electrohiladas, compuestas por la disolución control y la emulsión. En ella, nuevamente se observa que no existe una degradación significativa del material, puesto que el módulo no cambia con el tiempo de la manera esperada.

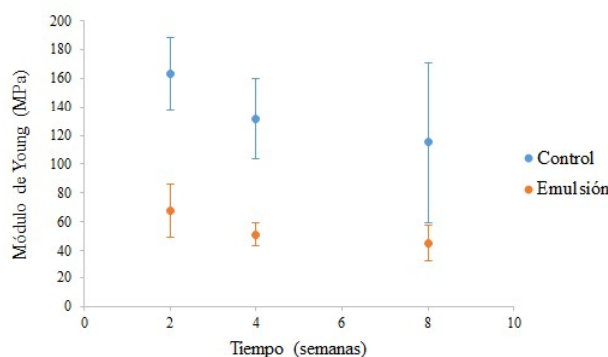
**Tabla 4.13:** Módulo de Young de la membrana electrohilada control con el paso del tiempo.

	Control	
	Promedio (MPa)	Desviación (MPa)
<b>2 semanas</b>	163	25
<b>4 semanas</b>	131	28
<b>8 semanas</b>	114	55

**Tabla 4.14:** Módulo de Young de la membrana electrohilada emulsión con el paso del tiempo.

	Control	
	Promedio (MPa)	Desviación (MPa)
<b>2 semanas</b>	67	18
<b>4 semanas</b>	51	8
<b>8 semanas</b>	44	12

Lo que se puede apreciar también de la anterior Tabla y de la siguiente **Figura 4.8**, es que el valor promedio del módulo de Young correspondiente a las muestras de la emulsión es ligeramente inferior al obtenido en las muestras a partir de la disolución control. Lo que confirma el hecho de que la incorporación de la proteína disminuye la resistencia del material, es decir, que es un material más deformable para la misma tensión aplicada.



**Figura 4.8:** Representación gráfica del efecto del tiempo sobre el módulo de Young de las membranas electrohiladas control y emulsión.

## Capítulo 5

# Conclusiones

Las conclusiones principales de este Trabajo Final de Grado son las siguientes:

- La comparación de la superficie y microestructura de los films control y emulsión, indica que la incorporación de la proteína a la disolución del polímero crea diferencias en su conformación superficial e interna, ya que el film emulsión posee una superficie más erosionada, además de unos poros mucho mayores e interconectados.
- En el caso de las microfibras formadas por electrohilado, existe una diferencia entre las provenientes del control y las provenientes de la emulsión, las que contienen la proteína tienen una superficie más porosa.
- Del estudio de los parámetros de electrohilado y su influencia en la morfología de las fibras formadas se puede concluir que en el caso de la disolución control, ninguno de los parámetros testados, distancia, caudal y voltaje, afecta de manera significativa al diámetro de las microfibras. Para el caso de la emulsión ocurren cosas distintas, ya que el aumento del voltaje aplicado provoca una disminución en el diámetro de las fibras; también, un aumento de la velocidad de alimentación provoca un pequeño aumento del diámetro de las fibras; y por último, con el aumento de la distancia entre la aguja y el colector, se observa una disminución del diámetro de las fibras formadas.
- De los experimentos realizados de liberación de las proteínas BSA en films y membranas electrohiladas, se deduce que el film la libera más rápidamente, obteniéndose además cantidades de proteína liberada 10 veces mayores que en la membrana de electrohilado. Ambos materiales coinciden en que la máxima liberación posible de la proteína BSA se produce al cabo de 6 - 8 días.
- Los ensayos de degradación de las membranas electrohiladas indican que son necesarios mayores tiempos de degradación para obtener resultados concluyentes, además de que es necesario realizar un lavado exhaustivo de las muestras con el objetivo de eliminar todos los restos salinos posibles.

# Bibliografía

- Bals, R. and Wilson, J. (2003). Cathelicidins-a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(4):711–720.
- Bardan, A., Nizet, V., and Gallo, R. L. (2004). Antimicrobial peptides and the skin. *Expert opinion on biological therapy*, 4(4):543–549.
- Blauch, D. N. (2014). Espectroscopía ultravioleta-visible. <http://www.liceoagb.es/quimiorg/uv2.html>. Accessed: 2016-06-17.
- Braun, D., Cherdron, H., Rehahn, M., Ritter, H., and Voit, B. (2012). *Polymer synthesis: theory and practice: fundamentals, methods, experiments*. Springer Science & Business Media.
- Carretero, M., Escámez, M. J., García, M., Duarte, B., Holguín, A., Retamosa, L., Jorcano, J. L., del Río, M., and Larcher, F. (2008). In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin ll-37. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(1):223–236.
- Chaudhary, A., Gupta, A., Khan, S., and Nandi, C. K. (2014). Morphological effect of gold nanoparticles on the adsorption of bovine serum albumin. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(38):20471–20482.
- Crespy, D., Friedemann, K., and Popa, A.-M. (2012). Colloid-electrospinning: Fabrication of multicompartiment nanofibers by the electrospinning of organic or/and inorganic dispersions and emulsions. *Macromolecular rapid communications*, 33(23):1978–1995.
- Das, B. B. and Sahoo, S. (2004). Dystrophic epidermolysis bullosa. *Journal of perinatology*, 24(1):41–47.
- Ehrenreich, M. and Ruzczak, Z. (2006). Update on tissue-engineered biological dressings. *Tissue engineering*, 12(9):2407–2424.
- Fraschini, C., Plesu, R., Sarasua, J.-R., and Prud’Homme, R. E. (2005). Cracking in polylactide spherulites. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 43(22):3308–3315.
- Greiner, A. and Wendorff, J. H. (2007). Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(30):5670–5703.
- Gupta, B., Revagade, N., and Hilborn, J. (2007). Poly (lactic acid) fiber: an overview. *Progress in polymer science*, 32(4):455–482.
- Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J., Chruszcz, M., and Minor, W. (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular immunology*, 52(3):174–182.

- Mukherjee, B., Santra, K., Pattnaik, G., and Ghosh, S. (2008). Preparation, characterization and in-vitro evaluation of sustained release protein-loaded nanoparticles based on biodegradable polymers. *International journal of nanomedicine*, 3(4):487.
- Nampoothiri, K. M., Nair, N. R., and John, R. P. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (pla) research. *Bioresource technology*, 101(22):8493–8501.
- Panreac (2000). Colorimetría y fotolorimetría. <http://www.patacake.net/panreac/spanish/practicas/p29.pdf>. Accessed: 2016-06-17.
- Ramos, R., Silva, J. P., Rodrigues, A. C., Costa, R., Guardão, L., Schmitt, F., Soares, R., Vilanova, M., Domingues, L., and Gama, M. (2011a). Wound healing activity of the human antimicrobial peptide ll37. *Peptides*, 32(7):1469–1476.
- Ramos, R. R., Domingues, L., and Gama, F. (2011b). Ll37, a human antimicrobial peptide with immunomodulatory properties. *Science against Microbial Pathogens : Communicating Current Research and Technological Advances*.
- Schweitzer, J. (2014). How does a sem work? <https://www.purdue.edu/ehps/rem/rs/sem.htm>. Accessed: 2016-06-16.
- Shackelford, J. F., Piris, A. M., Mur, G., Marrero, F. J. C., Mur, J. M. J. G., Manero, J. M. C., Mamlouk, M. S. Z., Mamlouk, J. P. M. S., Zaniwski, J. P., Bazo, R. H., et al. (2010). *Introducción a la ciencia de materiales para ingenieros*. Number 691. Pearson:.
- Siepmann, J., Siegel, R. A., and Rathbone, M. J. (2011). *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery*. Springer Science & Business Media.
- Sill, T. J. and von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13):1989–2006.
- Smith, W. F. H., Cázares, J. N., Gabriel, G. C., Alejandro, P., et al. (2006). *Fundamentos de la ciencia e ingeniería de materiales*. Number 691. McGraw-Hill,.
- Stamell, E. and Krishnamurthy, K. (2013). Infectious emergencies in dermatology. In *Buka's Emergencies in Dermatology*, pages 19–41. Springer.
- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., and Shakesheff, K. M. (1999). Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical reviews*, 99(11):3181–3198.
- UPV (2012). Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo. <http://www.upv.es/entidades/SME/info/859071normalc.html>. Accessed: 2016-06-16.
- Wu, L. and Ding, J. (2004). In vitro degradation of three-dimensional porous poly (d, l-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 25(27):5821–5830.
- Xu, X., Chen, X., Ma, P., Wang, X., and Jing, X. (2008). The release behavior of doxorubicin hydrochloride from medicated fibers prepared by emulsion-electrospinning. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(1):165–170.
- Yoshimura, N. (2013). *Historical Evolution Toward Achieving Ultrahigh Vacuum in JEOL Electron Microscopes*. Springer Science & Business Media.