



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR  
D'ENGINYERIA AGRONÒMICA  
I DEL MEDI NATURAL

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

# HIDROGEL NANOREFORZADO PARA LA LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA REGENERACIÓN DE PIEL

Autora: Mariola Ferrández Rives  
Tutor: José Luís Gómez Ribelles  
Cotutor: José Antonio Gómez Tejedor

Curso académico: 2015-2016

Valencia, Julio de 2016

## **Título Trabajo Fin de Grado**

Hidrogel nanoreforzado para la liberación de proteínas en la regeneración de piel.

## **Resumen Trabajo Fin de Grado**

El objetivo del proyecto es el desarrollo de membranas de hidrogel (polialcohol vinílico, PVA) producidas por electrohilado desde las que se pueda liberar un fármaco. De cara a dotar al gel de consistencia mecánica y para modular la cinética de liberación, se introducirá un refuerzo por nanoarcillas que se exfolian en la disolución del polímero. El proyecto en el que está involucrado nuestro grupo de investigación pretende la liberación local de la proteína LL37. Sin embargo debido a su alto costo, en la puesta a punto de la membrana se van a utilizar otras proteínas modelo. Se preparará una suspensión de nanopartículas en la disolución del polímero en un disolvente adecuado conteniendo la proteína que se pretende liberar. Esta suspensión se someterá a un proceso de electrohilado para producir la membrana de nanofibras. Se analizará la influencia de los parámetros del proceso sobre la formación de las nanofibras. Por otra parte se caracterizará la cinética de liberación en medio acuoso.

The aim of this project is to produce electrospun hydrogel membranes (polyvinyl alcohol, PVA) for drug delivery. To provide mechanical consistency to the gel and to modulate the delivery kinetics, a reinforcement of exfoliated nanoclays will be introduced in the polymer matrix. The project in which our research group is involved, intend the local delivery of the protein LL37. Nevertheless, owing to its high cost, other model proteins will be used in the tuning of the membrane. A suspension of nanoparticles in the polymer solution will be prepared in an adequate solvent containing the protein that is expected to be delivered. This suspension will be subjected to an electrospinning process to produce the nanofiber mat. The influence of the process parameters over the nanofibers microstructure will be analyzed. On the other hand, the delivery kinetics in an aqueous medium will be characterized.

## **Palabras clave**

Polyvinyl alcohol, electrospinning, crosslinking, nanoclay, drug delivery.

Polialcohol vinílico, electrohilado, entrecruzamiento, nanoarcilla, liberación de fármacos.

## **Autor del Trabajo Fin de Grado**

Alumna: Dña. Mariola Ferrández Rives

## **Tutor académico**

Prof. D. José Luís Gómez Ribelles

## **Cotutor**

D. José Antonio Gómez Tejedor

Valencia, Julio de 2016

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradecer al tutor y cotutor de este Trabajo Fin de Grado, D. José Luis Gómez Ribellés y D. José Antonio Gómez Tejedor, del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) de la Universitat Politècnica de València (UPV) por su ayuda y experiencia aportada a dicho trabajo, sin la cual, la realización del mismo no habría sido posible.

Del mismo modo, agradecer a todos aquellos que forman parte del CBIT por su interés y disposición a ayudar en cualquier momento.

Por último, agradecer a mi familia por su apoyo y motivación durante todo el proceso de realización de este trabajo.

## ÍNDICE DE LA MEMORIA

1.	OBJETIVOS .....	1
1.1.	Objetivo general e hipótesis.....	1
1.2.	Objetivos específicos.....	1
1.3.	Justificación y antecedentes.....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
2.1.	Ingeniería tisular .....	2
2.2.	Polialcohol vinílico.....	3
2.3.	Electrohilado.....	3
2.4.	Entrecruzamiento .....	6
2.5.	Montmorillonita.....	7
2.6.	Liberación de proteínas.....	9
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
3.1.	Materiales.....	10
3.2.	Preparación de la disolución de PVA.....	10
3.3.	Técnica de electrohilado .....	11
3.3.1.	<i>Determinación de las condiciones óptimas del proceso</i> .....	11
3.3.2.	<i>Proceso de formación de las membranas electrohiladas</i> .....	11
3.4.	Visualización de las membranas electrohiladas al microscopio electrónico.....	12
3.5.	Medida del diámetro de las fibras .....	12
3.6.	Preparación de la suspensión de nanoarcilla .....	13
3.7.	Determinación de la densidad y la tensión superficial de las disoluciones.....	14
3.8.	Preparación de films de PVA y nanoarcilla .....	16
3.9.	Ensayo de entrecruzamiento.....	17
3.10.	Ensayo de hinchado .....	19
3.11.	Ensayo de absorción y liberación de proteína.....	19
3.12.	Cuantificación de proteína liberada.....	20
3.13.	Análisis termogravimétrico.....	21
3.14.	Análisis estadístico .....	21
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22
4.1.	Selección de parámetros de electrohilado.....	22
4.2.	Efecto de los parámetros de electrohilado sobre las fibras .....	22
4.3.	Efecto del contenido de nanoarcilla sobre la morfología y el diámetro de las fibras..	27
4.4.	Efecto del entrecruzamiento sobre las fibras.....	28
4.5.	Evaluación de la densidad y la tensión superficial de las disoluciones.....	29
4.6.	Capacidad de absorción de agua de los films y membranas electrohiladas .....	31
4.7.	Determinación de la cantidad de proteína liberada .....	33

5. CONCLUSIÓN.....	37
6. BIBLIOGRAFÍA.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Estructura química del PVA.....	3
Figura 2.2: Reacción de alcoholólisis .....	3
Figura 2.3: Diagrama esquemático del montaje del equipo de electrohilado con colector en vertical (a) y en horizontal (b) .....	4
Figura 2.4: Formación del cono de Taylor .....	4
Figura 2.5: Cuentas formadas durante el electrohilado .....	4
Figura 2.6: Reacción química entre el PVA y el GA en condiciones ácidas .....	6
Figura 2.7: Representación esquemática de las distintas formas que puede presentar la nanoarcilla en la matriz de polímero. (a) Matriz polimérica, (b) capas de nanoarcilla, (c) agregados, (d) nanoarcilla intercalada, (e) exfoliación parcial, (f) exfoliación completa .....	7
Figura 3.1: Equipo de electrohilado de fabricación propia .....	11
Figura 3.2: Membrana electrohilada .....	12
Figura 3.3: Representación de las fuerzas cohesivas establecidas entre las moléculas internas y las de la superficie de un líquido en contacto con el aire .....	15
Figura 3.4: Agujas empleadas para determinar la tensión superficial, ordenadas de mayor a menor diámetro externo.....	15
Figura 3.5: Formación de la gota y fuerzas que en ello actúan según la ley de Tate.....	15
Figura 3.6: Films realizados con los diferentes contenidos de nanoarcilla .....	17
Figura 3.7: Geles obtenidos tras añadir el entrecruzador en la disolución polimérica (0, 2, 10, 40% de nanoarcilla, respectivamente).....	18
Figura 4.1: Imágenes de SEM de membranas con un voltaje de 20 kV y una velocidad de flujo de 4 mL/h. 1= 500 aumentos; 2= 5000 aumentos; A= 10 cm; B= 15 cm; C= 20 cm; D= 25 cm. Las imágenes tomadas a 500 aumentos tienen unan escala de 100 $\mu\text{m}$ y las de 5000 aumentos de 10 $\mu\text{m}$ .....	23
Figura 4.2: Imágenes de SEM de membranas realizadas con una distancia de 20 cm y una velocidad de flujo de 4 mL/h. 1= 500 aumentos; 2= 5000 aumentos; A= 10 kV; B= 15 kV; C= 20 kV; D= 25 kV. Las imágenes tomadas a 500 aumentos tienen unan escala de 100 $\mu\text{m}$ y las de 5000 aumentos de 10 $\mu\text{m}$ .....	24
Figura 4.3: Imágenes de SEM de membranas realizadas con una distancia de 20 cm cm y un voltaje de 20 kV. 1= 500 aumentos; 2= 5000 aumentos; A= 1 mL/h; B= 4 mL/h; C= 7 mL/h; D= 10 mL/h. Las imágenes tomadas a 500 aumentos tienen unan escala de 100 $\mu\text{m}$ y las de 5000 aumentos de 10 $\mu\text{m}$ .....	25
Figura 4.4: Imágenes de SEM de membranas realizadas con una distancia de 20 cm, un voltaje de 20 kV y una velocidad de flujo de 4mL/h. 1= 500 aumentos; 2= 5000 aumentos; A= 0% nanoarcilla; B= 2% nanoarcilla; C= 10% nanoarcilla; D= 40% nanoarcilla. Las imágenes tomadas a 500 aumentos tienen unan escala de 100 $\mu\text{m}$ y las de 5000 aumentos de 10 $\mu\text{m}$ .....	27
Figura 4.5: Imágenes de SEM de membranas entrecruzadas realizadas con una distancia de 20 cm, un voltaje de 20 kV y una velocidad de flujo de 4mL/h. 1= 500 aumentos; 2= 5000 aumentos; A= 0% nanoarcilla; B= 2% nanoarcilla; C= 10% nanoarcilla; D= 40% nanoarcilla. Las imágenes tomadas a 500 aumentos tienen unan escala de 100 $\mu\text{m}$ y las de 5000 aumentos de 10 $\mu\text{m}$ .....	28

Figura 4.6: Representación de la masa de 1 gota de disolución de los diferentes contenidos de nanoarcilla en función del radio externo de las agujas.....	30
Figura 4.7: Representación del ratio de hinchado de los films control en función del tiempo...	31
Figura 4.8: Representación del ratio de hinchado de los films prueba en función del tiempo...	32
Figura 4.9: Representación del ratio de hinchado de las membranas control en función del tiempo.....	32
Figura 4.10: Representación del ratio de hinchado de las membranas prueba en función del tiempo.....	32
Figura 4.11: Representación del porcentaje total de proteína liberada en función del tiempo por los films.....	34
Figura 4.12: Representación del porcentaje total de proteína liberada en función del tiempo por las membranas electrohiladas.....	34
Figura 4.13: Representación de la masa de los films para los diferentes contenidos de nanoarcilla en función de la temperatura.....	35
Figura 4.14: Representación de la masa de las membranas electrohiladas para los diferentes contenidos de nanoarcilla en función de la temperatura.....	35
Figura 4.15: Representación del porcentaje total de muestra en los films para los diferentes contenidos de nanoarcilla en función de la temperatura.....	36
Figura 4.16: Representación del porcentaje total de muestra en las membranas electrohiladas para los diferentes contenidos de nanoarcilla en función de la temperatura.....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1: Composición de la disolución acuosa de entrecruzamiento .....	18
Tabla 4.1: Parámetros del electrohilado controlados en el trabajo .....	22
Tabla 4.2: Media y desviación estándar de la medida del diámetro de las fibras a diferentes distancias.....	23
Tabla 4.3: Media y desviación estándar de la medida del diámetro de las fibras a diferentes voltajes .....	25
Tabla 4.4: Media y desviación estándar de la medida del diámetro de las fibras a diferentes velocidades de flujo .....	26
Tabla 4.5: Análisis de varianza para el diámetro – Suma de Cuadrados Tipo III .....	26
Tabla 4.6: Media y desviación estándar de la medida del diámetro de las fibras con diferentes contenidos de nanoarcilla .....	28
Tabla 4.7: Media y desviación estándar de la medida del diámetro de las fibras con diferentes contenidos de nanoarcilla tras realizar el entrecruzamiento.....	29
Tabla 4.8: Densidad de las disoluciones en función del contenido de nanoarcilla .....	29
Tabla 4.9: Coeficiente $C_2$ y tensión superficial de las disoluciones en función del contenido de nanoarcilla .....	30
Tabla 4.10: Tensión superficial de las disoluciones en función del contenido de nanoarcilla ....	30
Tabla 4.11: Cantidad teórica de BSA absorbida y porcentaje de BSA liberado por cada muestra .....	34
Tabla 4.12: Contenido teórico y real de los films y las membranas electrohiladas.....	36

## NOMENCLATURA Y ABREVIATURAS

BCA	Ácido bicinconónico
BSA	Albúmina de suero bovino
CBIT	Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular
CIBER-BBN	Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina
d	Distancia desde la punta de la aguja al colector
GA	Glutaraldehído
MMT	Montmorillonita
NIBIB	Instituto Nacional de Bioingeniería e Imágenes Biomédicas
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/Volumen
PBS	Tampón fosfato salino
POX	Polioxalato
PVA	Polialcohol vinílico
Q	Velocidad de flujo
RB	Rodamina B
SAXRD	Difracción de rayos X de ángulo bajo
SEM	Microscopio electrónico de barrido
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
UPV	Universitat Politècnica de València
V	Voltaje
v/v	Volumen/volumen

# 1. OBJETIVOS

## 1.1. Objetivo general e hipótesis

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado es la obtención de un hidrogel nanoreforzado a partir de membranas electrohiladas que pueda contener un fármaco y liberarlo de forma controlada, con aplicaciones en regeneración de tejidos epiteliales.

La hipótesis principal que se plantea en este trabajo es que las nanopartículas que se añaden a la disolución polimérica se encuentran dispersas en la matriz del hidrogel, creando un camino tortuoso para el movimiento de la proteína a través de esta matriz, con lo que se espera modular la cinética de liberación de la proteína.

## 1.2. Objetivos específicos

Del objetivo general anterior derivan una serie de objetivos específicos a realizar en dicho Trabajo Fin de Grado:

- Determinar las condiciones para producir una membrana de PVA por electrohilado.
- Relacionar el diámetro de las microfibras obtenidas y su homogeneidad con los parámetros de electrohilado.
- Una vez elegidos los parámetros del proceso de electrohilado, preparar con ellos membranas de nanocompuestos conteniendo un 0, 2, 10 y 40% de nanoarcilla.
- Caracterizar mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) el cambio en la morfología de las fibrillas debido a la presencia de la nanoarcilla.
- Definir el protocolo de entrecruzamiento químico de las cadenas de PVA para formar el gel utilizando para ello películas finas o films de PVA y de los nanocompuestos y determinar el grado de entrecruzamiento mediante la capacidad de absorción de agua.
- Entrecruzar las membranas electrohiladas de PVA siguiendo el protocolo obtenido.
- Determinar la densidad y tensión superficial de las disoluciones.
- Medir la capacidad de carga de una proteína modelo, la albúmina de suero bovino (BSA).
- Medir la cinética de liberación en tampón fosfato salino (PBS).

## 1.3. Justificación y antecedentes

El Trabajo Fin de Grado se enmarca en la línea de investigación que investigadores del CBIT llevan adelante en colaboración con el grupo de la Dra. Marcela del Río de la Universidad Carlos III de Madrid para la regeneración de piel en el caso de quemados y en ciertas enfermedades raras que implican dificultades para la cicatrización. En esta línea se han realizado previamente trabajos de liberación de proteínas desde diferentes sistemas poliméricos biodegradables. El proceso de regeneración implica no sólo la liberación del fármaco sino que se pueden emplear técnicas de ingeniería tisular con el trasplante de células madre de piel o queratinocitos que pueden tener un efecto paracrino o directamente migrar a la zona dañada. Estas células se trasplantarían sembradas en un vehículo sintético adecuado. En este trabajo abordamos el estudio de la liberación de una proteína desde una membrana constituida por un gel bioestable que se aplicaría como un apósito sobre la zona dañada.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Ingeniería tisular

La ingeniería tisular es un área de investigación multidisciplinar que aplica conocimientos de medicina, biología e ingeniería para reemplazar, reparar o regenerar tejidos. En concreto, la ingeniería tisular emplea una combinación de células vivas, materiales biodegradables y herramientas de la ingeniería para desarrollar nuevas estructuras y soportes biocompatibles y biodegradables para conseguir estos objetivos (CIBER-BBN, 2016; NIBIB, 2013).

Para regenerar tejidos pueden emplearse diferentes tipos de células, destacando el uso de células madre tanto multipotenciales como pluripotenciales. Del mismo modo, estas células pueden ser autólogas, extraídas del propio paciente, procesadas de manera controlada y reimplantadas de nuevo en el propio paciente, o alógenas, lo que hace referencia a células extraídas de un paciente, procesadas de nuevo, y reimplantadas en otro paciente diferente.

En el organismo existen algunos tejidos con una capacidad de regeneración muy elevada y continua, como es el caso de la sangre o la piel, mientras que muchos otros tejidos como el tejido articular, no presentan regeneración espontánea. Esto provoca que tras un daño en un tejido u órgano a causa de una enfermedad, un defecto congénito o un suceso traumático, exista la necesidad de reparar o sustituir determinados órganos o tejidos. Por todo esto, la ingeniería de tejidos es un área de investigación muy activa y en constante evolución.

Para conseguir estos objetivos, la ingeniería tisular dispone de diversas estrategias que buscan desencadenar la regeneración por parte del propio tejido. Una de estas estrategias consiste en el implante de células solas, es decir, colocar células en el lugar del daño de modo que a estas les lleguen los factores de crecimiento del entorno, permitiéndoles producir su propia matriz extracelular y desencadenando la regeneración del tejido. Esta misma técnica presenta una variante, y es el implante de las células en un soporte biodegradable o scaffold en cuyo interior se siembran las células, implantándose posteriormente en el lugar del daño. En este caso, se busca que el scaffold sirva de andamio para las células, permitiendo que éstas se adhieran y proliferen, fabricando su matriz extracelular y regenerando el tejido a medida que el scaffold va desapareciendo progresivamente. Otra de las estrategias consiste en el implante de soportes que liberan factores de crecimiento de manera controlada, de modo que éstos induzcan la regeneración de las propias células que hay en el tejido.

Estos scaffolds pueden estar fabricados a partir de diferentes materiales, los cuales deben ser biocompatibles y en general deben ser biodegradables, aunque en ciertas aplicaciones, como la que nos interesa en este trabajo pueden ser bioestables, pudiendo presentar diferentes arquitecturas de poro, o estar formados por micropartículas o membranas de nanofibras, presentando también diferentes propiedades químicas, físicas y superficiales. Algunos scaffolds se producen con materiales de origen natural como el colágeno o el ácido hialurónico, componentes de la piel, o el quitosano, polisacárido presente en el caparazón de los crustáceos. Otros pueden presentar materiales de origen sintético derivados de polímeros como el ácido poliláctico o el polialcohol vinílico.

Una de las aplicaciones de la ingeniería tisular consiste en el desarrollo de hidrogeles capaces de absorber grandes cantidades de agua, ya que se trata de una red de polímero reticulada y tridimensional. Uno de los polímeros más empleados para el desarrollo de estos hidrogeles es el PVA, el cual, tras ser sometido a un proceso de entrecruzamiento, puede aplicarse como apósitos para heridas o para la liberación de proteínas (Guo et al., 2014; Rojas et al., 2008).

## 2.2. Polialcohol vinílico

El polialcohol vinílico (PVA) es un polímero de fórmula química general  $(C_2H_4O)_n$  (Figura 2.1) que, a diferencia de muchos polímeros vinílicos, no se obtiene por polimerización del monómero correspondiente, si no que se obtiene por alcoholólisis parcial o completa del poliacetato de vinilo, al cual se le eliminan los grupos acetato empleando etanol o metanol y un ácido o base como catalizador, tal y como se muestra en la Figura 2.2 (Billmeyer, 1975).

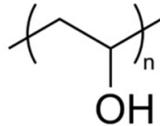


Figura 2.1: Estructura química del PVA. Fuente: [http://1.bp.blogspot.com/-a6V7Q6DdpcU/T2xy\\_RpOcgI/AAAAAAAAABv8/rWmXW3d5buw/s1600/pvoh.jpg](http://1.bp.blogspot.com/-a6V7Q6DdpcU/T2xy_RpOcgI/AAAAAAAAABv8/rWmXW3d5buw/s1600/pvoh.jpg). Consulta: 5 de enero de 2016.

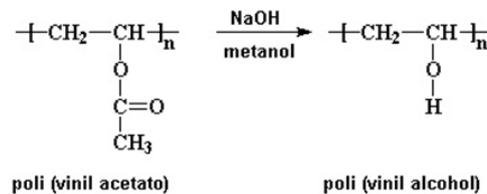


Figura 2.2: Reacción de alcoholólisis. Fuente: [http://1.bp.blogspot.com/-TFn\\_n\\_CGx3I/T2xzNmWDCI/AAAAAAAAABwE/yriHxo680Y0/s1600/pva02.jpg](http://1.bp.blogspot.com/-TFn_n_CGx3I/T2xzNmWDCI/AAAAAAAAABwE/yriHxo680Y0/s1600/pva02.jpg). Consulta: 5 de enero de 2016.

Se trata de un polímero sintético, semicristalino, hidrofílico, soluble en agua, no tóxico, biocompatible y biodegradable. Se disuelve rápidamente en agua tras aplicar temperaturas de 80 °C o superiores. Estas características junto con sus propiedades térmicas y mecánicas y su estabilidad química, permiten su uso en diversos campos, destacando su empleo en el ámbito biomédico aplicando la técnica de electrospinning o electrohilado para generar membranas y desarrollar, por ejemplo, sistemas de liberación transdérmica de fármacos. (Lee et al., 2016; Nugroho et al., 2013; Pathan et al., 2015). Además, se trata de un polímero que se comercializa en un amplio rango de pesos moleculares y a bajo coste, lo que contribuye a su utilización en films o membranas de fibras (Ji et al., 2009).

## 2.3. Electrohilado

El proceso de electrohilado consiste en la formación de fibras de escala micro o nanométrica a partir de una disolución de polímero en un disolvente adecuado y a una determinada concentración, por efecto de un campo eléctrico. Se trata de método de bajo coste en el que el equipamiento es sencillo y está constituido fundamentalmente de tres partes:

- Bomba de inyección: impulsa una determinada cantidad de disolución de polímero contenida en una jeringuilla por unidad de tiempo. Esta parte del equipo permite configurar la velocidad de flujo a la que se suministra de la disolución.
- Colector: placa metálica conductora de la electricidad sobre la que se depositarán las fibras, la cual, se recubre con papel de aluminio para recuperar la membrana formada mayor facilidad para poder realizar la caracterización de las fibras obtenidas.
- Fuente de tensión: proporciona el voltaje necesario para generar una diferencia de potencial entre la punta de la aguja y el colector, sobre los cuales estarán situados dos electrodos, permitiendo así la formación de las fibras. Además, también permite limitar el valor máximo de intensidad que proporciona la fuente. La fuente de tensión

dispone de 2 bornes: el borne (+) que se conecta a la aguja de la jeringuilla, y el borne (-) que se conectará al colector (Wendordd et al., 2012).

En función de la disposición del colector existen dos montajes diferentes de este equipo, tal y como se observa en la Figura 2.3: vertical (a) y horizontal (b). En la orientación vertical la aguja se coloca en vertical encima del colector. Esta orientación presenta la ventaja de que la deposición de las fibras en el colector es facilitada por la fuerza de la gravedad; sin embargo presenta un inconveniente, y es que al estar la jeringuilla colocada sobre el colector pueden caer gotas de la disolución sobre éste, dañando la membrana de fibras que se ha formado. En el caso de la orientación horizontal, la aguja se coloca horizontalmente y enfrente del colector, que se encuentra en posición vertical. En este trabajo se va a emplear la disposición horizontal, evitando así el problema comentado en la orientación vertical.

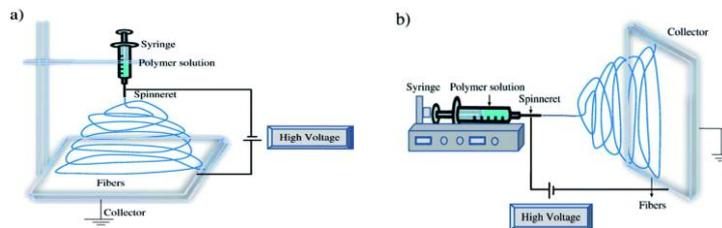


Figura 2.3: Diagrama esquemático del montaje del equipo de electrohilado con colector en vertical (a) y en horizontal (b) (Bhardwaj y Kundu, 2010).

El funcionamiento del equipo se basa en la aplicación de un alto voltaje de modo que a medida que la disolución avanza por la aguja, ésta se va cargando y las gotas de disolución que alcanzan el extremo de la aguja quedan cargadas. En este momento, la repulsión electrostática contrarresta a la tensión superficial de la disolución y la gota comenzará a estirarse hasta un punto crítico en el que un chorro de líquido sale de la superficie de la gota, generando lo que se conoce como cono de Taylor (Figura 2.4).

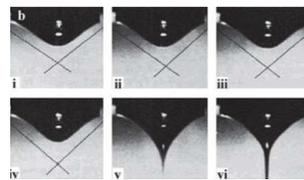


Figura 2.4: Formación del cono de Taylor (Di et al., 2011).

Si la cohesión molecular del líquido es suficientemente alta, se forma un flujo continuo o jet de disolución. A medida que el jet se dirige hacia el colector, el disolvente se va evaporando de manera más o menos rápida según su volatilidad, de modo que se formarán fibras que se depositarán en el colector formando una membrana. Para asegurar que dicha membrana no contiene restos de disolvente que no se han evaporado, es posible introducirla en una estufa o secarla al aire. El objetivo de este procedimiento es obtener una membrana de fibras de un diámetro lo más homogéneo posible y sin impurezas. Sin embargo, uno de los defectos más comunes es la formación de cuentas que consisten en engrosamientos de las fibras a modo de pequeñas gotas. Estos defectos se observan en la Figura 2.5.

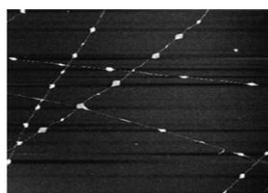


Figura 2.5: Cuentas formadas durante el electrohilado (Huang et al., 2003).

Debido a que algunos polímeros o disolventes pueden emitir olores desagradables o vapores tóxicos, es imprescindible la consulta de las fichas de seguridad de cada reactivo a utilizar y, en caso de que fuera necesario, se emplearán gafas de protección o máscara de gases.

Existen diferentes parámetros que pueden influir en la formación de las fibras durante el proceso de electrohilado, tanto en su tamaño, cantidad y diámetro (Bhardwaj y Kundu, 2010; Doshi y Reneker, 1995):

- Propiedades de la disolución: viscosidad, elasticidad, conductividad y tensión superficial, así como la naturaleza, peso molecular y concentración del polímero y el disolvente empleado.
- Parámetros del proceso de electrohilado: diámetro interno de la aguja, distancia desde la punta de la aguja hasta el colector, voltaje, velocidad de flujo, etc.
- Parámetros ambientales: flujo de aire, humedad y temperatura del ambiente.

De todos estos parámetros, en este trabajo en concreto se controlarán algunos de ellos, como el polímero con el que se trabaja, el disolvente empleado, la concentración de la disolución, el voltaje aplicado, la distancia entre la aguja y el colector, el diámetro interno de la aguja y la velocidad de flujo de la disolución. Sin embargo, otros parámetros como la temperatura del ambiente, la presión atmosférica o la humedad relativa no podrán ser controlados.

Para el proceso del electrohilado son muy importantes dos parámetros básicos de la disolución: el tipo de disolvente y la concentración de PVA en la disolución. Basándonos en la búsqueda bibliográfica, se ha determinado que uno de los disolventes más empleados para los procesos de electrohilado es el agua desionizada, tal y como se emplea en el trabajo de Lee et al. (2016), en el que realizaron una membrana de PVA entrecruzada con glutaraldehído (GA) y reforzada con nanotubos de halloysita a partir de una disolución de PVA en agua destilada al 10% p/v. Esta disolución también se emplea como disolución de partida en otros trabajos como el de Pathan et al. (2015) con la finalidad de evaluar su citotoxicidad. Por otro lado, también se han empleado mezclas de disolventes como es el caso del agua destilada y el ácido acético glacial o anhídrido en el estudio realizado por Koosha et al. (2015) para evaluar diferentes aplicaciones biomédicas de membranas de quitosano y PVA reforzadas con nanoarcillas de montmorillonita (MMT). En este caso, la disolución contenía un 7% p/p y una relación de disolvente de ácido acético glacial/agua destilada 70/30 (v/v). Durante la búsqueda bibliográfica, no se han encontrado referencias en las que se emplee una concentración mayor del 10% de PVA.

En cuanto al peso molecular que debe tener el PVA para realizar el electrohilado, es necesario superar un cierto umbral que permita a las cadenas de polímero enmarañarse o entrelazarse, de modo que puedan formarse las fibras. En los trabajos consultados se emplean diferentes pesos moleculares de PVA, que varían desde 66.000 g/mol (Lee et al., 2016) hasta los 146.000 g/mol (Pathan et al., 2015). En este trabajo, se va a emplear un PVA de elevado peso molecular disponible en el laboratorio de 130.000 g/mol. Un alto peso molecular provoca que la disolución de polímero sea más viscosa, permitiendo que la membrana electrohilada esté compuesta por fibras más largas y en general de mayor diámetro, evitando con ello la formación de gotas o grumos en la membrana. Que la membrana esté formada por fibras más largas permite además que éstas formen un entramado, que se entrelacen y que no se separen con facilidad, manteniendo la estructura de la membrana. Sin embargo, las fibras de la membrana no están unidas de manera química y el PVA es soluble en agua, de modo que al entrar en contacto con una disolución acuosa, la membrana tiende a disolverse rápidamente debido a la composición química del PVA, que presenta una gran cantidad de grupos hidroxilo activos en sus cadenas carbonadas, que interaccionan con el agua durante su inmersión en una

disolución acuosa. En determinadas aplicaciones, como el uso de membranas electrohiladas para liberación de fármacos, el uso de PVA como polímero está limitado debido a esta propiedad del polímero. Por lo tanto, para mantener la integridad de la membrana y para mejorar su resistencia al agua y aportar estabilidad a su estructura, es necesario realizar un entrecruzamiento de las cadenas (Lee et al., 2016; Nugroho et al., 2013).

## 2.4. Entrecruzamiento

El entrecruzamiento permite unir las cadenas de PVA entre sí, de modo que al introducir un film o una membrana electrohilada en una disolución acuosa, la muestra no se disuelva y se forme un hidrogel con capacidad de absorción de agua. El entrecruzamiento puede ocurrir de manera física o química.

El entrecruzamiento físico se realiza mediante ciclos de congelación-descongelación en los que la disolución de partida se congela y descongela introduciéndose regiones cristalinas que actúan como entrecruzadores, juntando las cadenas de PVA y cristalizándolas. Sin embargo, este tipo de entrecruzamiento no es permanente y únicamente produce una cristalización parcial de las cadenas, de modo que presenta el inconveniente de que las cadenas acabarán disolviéndose, y esto limita su uso en aplicaciones que requieren insolubilidad o aplicaciones a largo plazo. Por otro lado, el entrecruzamiento químico se realiza mediante la adición de un agente que reaccionará químicamente con los grupos hidroxilo de las cadenas, entrecruzándolas. De este modo, al introducir una membrana de PVA en agua, ésta absorberá el agua actuando como un hidrogel pero no se disolverá. Sin embargo, en su aplicación para electrohilado, se debe tener la precaución de que los entrecruzadores químicos pueden provocar la gelificación del polímero antes o después del electrohilado debido a su elevada reactividad (Nugroho et al., 2013).

Existen diferentes formas de realizar un entrecruzamiento químico. Es posible añadir el entrecruzador directamente en la disolución de partida como se realiza en el trabajo de Nugroho et al. (2013) en el que emplean como entrecruzador persulfato potásico al 0,5% p/v. Otro método para entrecruzar químicamente consiste en aplicar luz ultravioleta a la membrana electrohilada (Zhang et al., 2016). Por otro lado, es posible entrecruzar un film o una membrana de electrohilado sumergiéndola en una disolución de entrecruzador, como es el caso del trabajo de Kim et al. (1993) en el que utilizan una solución de entrecruzamiento que contiene GA, ácido sulfúrico y sulfato sódico. Otro método empleado con bastante frecuencia es el entrecruzamiento en fase de vapor. Para ello, uno de los agentes químicos más utilizados en la literatura como entrecruzador de PVA es el GA, un compuesto químico perteneciente a la familia de los aldehídos, cuya estructura química se muestra en la Figura 2.6. Por cada extremo, esta molécula reacciona con una cadena de PVA, de modo que se une a dos OH consecutivos de cada cadena formando enlaces acetal, tal y como se ilustra en la Figura 2.6.

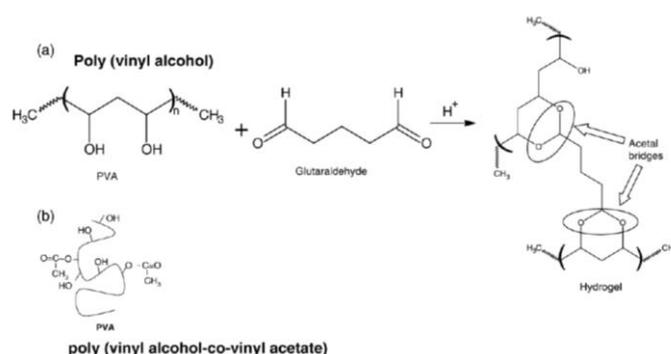


Figura 2.6: Reacción química entre el PVA y el GA en condiciones ácidas (Mansur et al., 2008).

En el estudio realizado por Lee et al. (2016), la membrana electrohilada se expuso a GA al 25% v/v en fase vapor en un desecador junto con una solución del 35-37% de ácido clorhídrico (HCl) durante 1 día, el cual, actúa como catalizador creando un ambiente ácido necesario para la catálisis. Tras esto, la membrana fue lavada con agua destilada para eliminar el GA residual y secada en una estufa. En otros trabajos, como el realizado por Destaye et al. (2013), la membrana de PVA se puso en contacto con la fase vapor únicamente de GA al 25% v/v en el interior de un recipiente sellado. Se prepararon 4 condiciones diferentes de GA (0,5, 1, 2 y 2,56 M) y se expusieron las membranas durante 4 tiempos diferentes (6, 12, 24 y 48 h) para cada concentración, a temperatura ambiente. Al igual que en el caso anterior, es necesario crear unas condiciones ácidas para que ocurra la catálisis, por lo que la disolución se ajustó a pH 3 añadiendo a la disolución de polímero HCl en solución acuosa. En el caso del estudio realizado por Tsai et al. (2014), también se empleó GA como entrecruzador a diferentes tiempos (0, 6, 12 y 24 h) y tras esto, se enjuagaron las membranas con una disolución de glicina para eliminar los grupos aldehído que no hubieran reaccionado durante el entrecruzamiento y que pudieran ser tóxicos para las células al reaccionar con grupos amina. En todos estos trabajos se observaba que, conforme se aumenta el tiempo de exposición al GA, aumentaba la estabilidad de las membranas en disolución.

## 2.5. Montmorillonita

La montmorillonita (MMT) es un tipo de nanoarcilla muy empleado en la actualidad como refuerzo de membranas electrohiladas. Este nanocompuesto permite mejorar de manera notable las propiedades térmicas, mecánicas o de barrera de las nanofibras. Estas mejoras en las propiedades de los materiales se deben a la dimensión nanométrica de estas arcillas, lo que les aporta un alto nivel de refuerzo incluso con un contenido bajo de las mismas, de en torno al 1-10% p/p. Por otro lado, las láminas de nanoarcilla individuales son muy parecidas entre sí, así como su morfología, de modo que les permiten exfoliarse y dispersarse bien en la matriz de polímero (Ji et al., 2009; Rosales et al., 2009).

Las nanoarcillas se encuentran en forma de capas o láminas unas sobre otras, las cuales pueden exfoliarse total o parcialmente y separarse, distribuyéndose de manera uniforme en la matriz de polímero. No obstante, es posible que estas nanoláminas formen agregados más o menos grandes, o se encuentren intercaladas en la matriz polimérica, tal y como se representa esquemáticamente en la Figura 2.7:

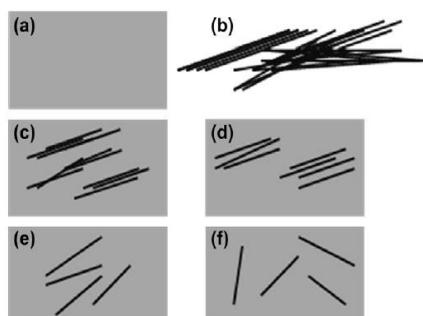


Figura 2.7: Representación esquemática de las distintas formas que puede presentar la nanoarcilla en la matriz de polímero. (a) Matriz polimérica, (b) capas de nanoarcilla, (c) agregados, (d) nanoarcilla intercalada, (e) exfoliación parcial (f) exfoliación completa (Islam et al., 2012).

Se han encontrado varios trabajos en los que se realizan membranas electrohiladas a partir de una disolución de PVA y nanoarcilla.

En el trabajo de Ji et al. (2009) se preparan membranas electrohiladas a partir de una disolución acuosa que contiene una mezcla de PVA de alto y medio peso molecular, junto con

MMT. Para dispersar la MMT, la disuelven en agua destilada con agitación durante 1 h y a temperatura ambiente, tras lo que añaden ambos tipos de PVA a la disolución, calentando a 80 °C con agitación para su completa disolución durante 2 h, enfriándola posteriormente a temperatura ambiente. Esta disolución se preparó con una concentración del 7,5% p/p, empleando diferentes proporciones en masa de PVA de alto y medio peso molecular respectivamente (10/0, 9/1, 7/3 y 5/5) y diferentes concentraciones de MMT (1%, 3%, 5% y 10%). Para evaluar si la nanoarcilla se ha exfoliado, es decir, si se ha separado en nanoláminas y se encuentran distribuidas en la matriz de polímero emplean el microscopio electrónico de transmisión (TEM), con el que demuestran que en la mayoría de los casos, las láminas de MMT se han exfoliado y están bien distribuidas en las nanofibras.

Por otro lado, en el trabajo de Islam et al. (2012) realizan electrohilado de pululano/PVA/MMT. El pululano es un polisacárido extracelular microbiano producido por hongos con excelentes propiedades que le permiten ser usado como agente gelificante, revestimiento de alimentos o lentes de contacto. En este caso dispersan la MMT en agua doblemente destilada empleando agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Después añaden el PVA a la solución, calentado a 80 °C durante 2 h con agitación, enfriando posteriormente a temperatura ambiente. El pululano lo disuelven en agua doblemente destilada con agitación magnética durante 2 h, de nuevo a temperatura ambiente. Tras esto mezclan ambas disoluciones, empleando una concentración de sólido total del 14% p/p con unas proporciones en masa de pululano/PVA de 100/0, 90/10, 80/20 y 60/40, y un 5% p/p de MMT. Al igual que en el caso anterior, para confirmar si las nanoláminas se han exfoliado emplean el TEM.

Un caso en el que emplean un método diferente para observar si la nanoarcilla se ha exfoliado es el trabajo de Koosha et al. (2015), en el que emplean electrohilado para preparar membranas de quitosano, PVA y nanoarcilla para aplicaciones biomédicas. Para ello, disuelven 1.400 mg de quitosano en 20 cm<sup>3</sup> de disolvente, para lo que emplean una relación 30/70 en volumen de agua destilada/ácido acético. Esta mezcla se mantiene en agitación durante una noche para preparar una disolución al 7% p/p. Se realizó esta misma disolución pero con PVA en vez de con quitosano, agitando durante 2 h a 80 °C. Se mezclaron ambas disoluciones para preparar 20 cm<sup>3</sup> de disolución con un ratio en volumen de quitosano/PVA de 30/70. Para incorporar la MMT, se preparó una solución con 1 g de MMT dispersa en 100 mL de ácido acético al 70%, agitando durante 72 h a 50 °C para exfoliar las nanoláminas. De esta disolución, se añadió una cantidad a la mezcla de PVA/quitosano para conseguir un 1% y 3% de nanoarcilla sobre el total de polímero sólido, agitado durante una noche para su correcta homogeneización. Tras esto, se realizó electrohilado para obtener una membrana de nanofibras. A diferencia de los anteriores casos, confirman que la nanoarcilla está completamente exfoliada en la estructura de nanofibras empleando difracción de rayos X de ángulo bajo (SAXRD).

Además de los métodos descritos en los artículos anteriores para exfoliar las nanoarcillas en la disolución de polímero, existen otros métodos para este fin entre los que destaca el uso de ultrasonidos. El mecanismo principal para la dispersión de las nanopartículas por ultrasonidos es la cavitación, es decir, la formación, crecimiento y rápido colapso de burbujas en la suspensión. Durante la cavitación pueden alcanzarse altos valores de temperatura hasta 5000 K y de presión, hasta 1000 atm (Kahraman et al., 2013).

En el trabajo de Kahraman et al. (2013) emplean para la exfoliación un sonicador a una frecuencia de 20 kHz y 108 W, durante 30 min. Durante este proceso se colocó la muestra en un recipiente por el que circulaba agua a 21 °C para evitar un alto aumento de la temperatura. Kaboorani et al. (2013) estudian en su artículo la eficiencia de la técnica de ultrasonidos para dispersar la nanoarcilla en PVA. Para ello, dispersaron la nanoarcilla empleando ultrasonidos

de alta intensidad aplicando 60 kHz durante 3-5 min. La temperatura se mantuvo por debajo de 50 °C empleando un baño con recirculación de etilenglicol para que las altas temperaturas que se alcanzan no afecten a los resultados.

## 2.6. Liberación de proteínas

Existen múltiples aplicaciones de las membranas electrohiladas, por ejemplo como sistemas de filtración, biosensores, inmovilización de enzimas o incluso en el ámbito de los cosméticos. En el campo de la ingeniería tisular en concreto, cabe destacar su uso como sistemas de liberación de fármacos (Bhardwaj y Kundu, 2010).

En el trabajo de Najafi-Tajer et al. (2015) emplean electrohilado coaxial para generar un sistema de liberación transdérmico. Esta variante de electrohilado permite obtener fibras en las que la parte externa está formada por un determinado compuesto, y el relleno interno es otro diferente, los cuales no influyen ni se afectan entre sí. En concreto, generan una membrana de PVA y quitosano que contiene ácido ascórbico en el interior, una molécula antioxidante que protege a la piel de las especies reactivas de oxígeno producidas por la radiación ultravioleta o la contaminación, entre otros, lo que puede derivar en cáncer de piel. Para producir estas membranas, realizaron en primer lugar dos disoluciones por separado, una de PVA y quitosano, y otra de ácido ascórbico. Tras esto cargaron las disoluciones en dos jeringuillas diferentes de 5 mL conectadas por dos agujas situadas concéntricamente de calibre 17 y 24 para generar el relleno y la parte externa respectivamente. En este trabajo, la liberación del ácido ascórbico se realiza en PBS.

Por otro lado, Ngawhirunpat et al. (2009) desarrollaron unas membranas electrohilada de PVA que contenía un agente terapéutico, generando así un sistema de liberación transdérmica de fármacos. El agente terapéutico empleado es el meloxicam, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo empleado para controlar la inflamación y el dolor causados por enfermedades reumáticas. Para ello, disolvieron una cantidad de PVA en agua destilada a 80 °C durante 3 h para producir una disolución al 10% p/v. Tras enfriar a temperatura ambiente, añadieron el meloxicam a 4 concentraciones distintas en base al peso seco del PVA: 2,5, 5, 10 y 20%. Por último agitaron durante 4 h para su completa disolución.

Otro ejemplo de utilización de membranas electrohiladas para la liberación de fármacos es el trabajo de Phromviyo et al. (2015), en el que realizaron por electrohilado una membrana de PVA y polioxalato (POX) para liberar localmente rodamina B (RB) empleando peróxido de hidrógeno, el cual rompe los enlaces de la matriz polimérica en la que la RB está encapsulada, permitiendo su liberación. En primer lugar prepararon una disolución de POX (5% p/p) y RB (1% p/p) en diclorometano a la que añadieron una disolución acuosa de PVA para generar diferentes ratios en masa de PVA/POX (10/0, 9/1, 8/2, 7/3, 6/4, 5/5), lo que les permitió evaluar la influencia del contenido en POX en la regulación de la liberación del material encapsulado. Agitaron durante 5 h a temperatura ambiente para la completa disolución de la RB y para obtener una disolución homogénea de polímero para realizar el electrohilado. Una vez preparadas las membranas evaluaron la liberación de la RB en PBS, con y sin peróxido de hidrógeno para realizar una comparativa de la influencia de dicha molécula en la liberación.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

El polímero empleado es polialcohol vinílico (PVA) con un peso molecular de 130.000 g/mol, 99+% hidrolizado de Sigma-Aldrich Química, S.L. Dicho polímero se disolvió en agua destilada y en ácido acético glacial de Scharlau Chemie, S.A., con un peso molecular de 60,05 g/mol. Para el resto de ensayos, el agua empleada es agua desionizada. La membrana se refuerza con nanopartículas de arcilla, en concreto de bentonita hidrofílica o montmorillonita (MMT) de Sigma-Aldrich Química, S.L., con un peso molecular de 180,1 g/mol. Para el entrecruzamiento se emplea glutaraldehído (GA) al 25% v/v como entrecruzador de Scharlau Chemie, S.A., con un peso molecular de 100,12 g/mol. Por un lado, el GA se combina con una solución acuosa de ácido clorhídrico (HCl) al 37% de Sigma-Aldrich Química, S.L. con un peso molecular de 36,46 g/mol para crear las condiciones ácidas necesarias para la catálisis y, por otro lado, se emplea en una disolución de entrecruzamiento compuesta además por ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), 95 – 97%, para síntesis de Scharlau Chemie, S.A., con un peso molecular de 98,08 g/mol, y sulfato sódico decahidratado ( $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ ) de Sigma-Aldrich Química, S.L., con un peso molecular de 322,20 g/mol. Para el ensayo de liberación de proteínas, la proteína empleada es la albúmina de suero bovino (BSA), cold ethanol fraction, pH 5,2,  $\geq 96\%$  de Sigma-Aldrich Química, S.L., con un peso molecular de 66.430 Da. La absorción y liberación de BSA se realizó empleando tampón fosfato salino (PBS).

#### 3.2. Preparación de la disolución de PVA

El primer paso a realizar es determinar la concentración de la disolución de PVA y el disolvente adecuado con el que se trabajará. Tras consultar la bibliografía, se realizó en primer lugar una disolución de PVA en agua desionizada al 10% p/p (Destaye et al., 2013). La disolución obtenida era muy viscosa y por ello, se decidió diluir al 6% p/p para realizar el electrohilado. Dicha disolución se introdujo en una jeringuilla para electrohilar con las condiciones que diferentes artículos empleaban (Barzegar et al., 2015; Koosha et al., 2015; Nugroho et al., 2013; Pathan et al., 2015) pero no se consiguió la formación del cono de Taylor y en consecuencia, de la membrana. Esto puede ocurrir porque el polímero con el que se trabaja en los artículos tiene un peso molecular diferente al empleado en este trabajo, además de que el agua desionizada, al no contener iones, no presenta la conductividad necesaria que permite que al aplicar un voltaje determinado, la disolución se cargue, se forme el cono de Taylor y se obtenga una membrana.

Debido a esto, a la disolución del 6% p/p en agua desionizada se le añadió un 1% p/v de cloruro sódico (Arayanarakul et al., 2006) con la finalidad de que, al añadir iones a la disolución, ésta se cargara al aplicar el campo eléctrico y se pudiera formar la membrana. Sin embargo, al realizar el electrohilado no se consiguió tampoco la formación de membrana, posiblemente debido a que todavía la conductividad no era la necesaria.

Tras esto se realizó una disolución al 8% p/p de PVA en agua destilada, que contiene más iones que el agua desionizada, pero debido a que tampoco se encontraron condiciones adecuadas para el electrohilado con esta disolución, se optó por cambiar el disolvente. En este caso, se empleó una mezcla de ácido acético glacial y agua destilada, en un ratio de 70/30 en volumen (Koosha et al., 2015), de nuevo al 8% p/p de PVA. Con esta disolución sí que funcionaron correctamente los parámetros en el electrohilado.

### 3.3. Técnica de electrohilado

El equipo de electrohilado utilizado consiste en un equipo de fabricación propia que se muestra en la Figura 3.1. Dicho equipo consta de tres partes fundamentales comentadas en el apartado 2.3. Electrohilado: fuente de tensión, bomba de inyección y colector.

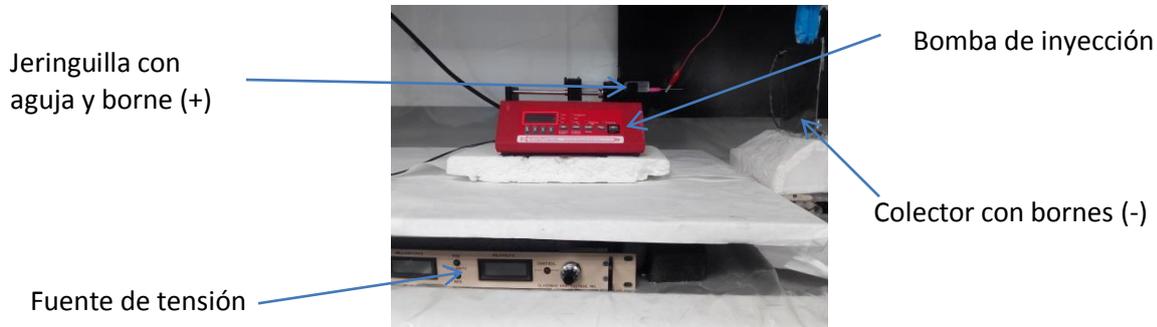


Figura 3.1: Equipo de electrohilado de fabricación propia.

#### 3.3.1. Determinación de las condiciones óptimas del proceso

Con el fin de determinar las condiciones más adecuadas para realizar las membranas de electrohilado y para determinar posteriormente el efecto de la variación de los parámetros del proceso sobre las fibras, se realizaron varias pruebas manteniendo fijo el valor del diámetro interno de la aguja, 0,6 mm, y variando la distancia desde la punta de la aguja al colector, el voltaje aplicado y la velocidad de flujo.

En primer lugar, se fijaron los parámetros de voltaje a 20 kV y velocidad de flujo a 0,5 mL/h para variar la distancia a 10 cm, 15 cm, 20 cm y 25 cm. A continuación, se fijaron los parámetros de distancia a 10 cm y velocidad de flujo a 0,5 mL/h, y se varió el voltaje a 10 kV, 15 kV, 20 kV y 25 kV. Tras esto, se observaron las membranas obtenidas al microscopio óptico modelo Nikon Eclipse E600 para confirmar la presencia de fibras, visualizando las muestras con un objetivo 20X (200 aumentos). Debido a que en todos los casos se observaron fibras, se determinaron como condiciones para el electrohilado las condiciones centrales, es decir, una distancia de 20 cm y un voltaje de 20 kV. Con estos dos parámetros decididos, se probaron diferentes velocidades de flujo hasta alcanzar la máxima velocidad de flujo, resultando esta de 4 mL/h. El hecho de determinar la máxima velocidad de flujo posible se debe a la ventaja que esto conlleva, y es que a mayor velocidad de flujo, menor es el tiempo requerido para la formación de las membranas.

#### 3.3.2. Proceso de formación de las membranas electrohiladas

Para realizar las membranas electrohiladas (Figura 3.2), se introdujeron 6-8 mL de cada disolución en una jeringuilla de 12 mL. La jeringuilla que contiene la disolución tiene un diámetro interno de 15,5 mm. Se coloca en la bomba y se le ajusta una aguja de electrohilado con un diámetro interno de 0,6 mm. Se emplea una velocidad de flujo de 4 mL/h, y la distancia entre el colector y la punta de la aguja es de 20 cm, aplicando un voltaje de 20 kV. El proceso se llevó a cabo a humedad y temperatura ambiente. Una vez depositadas las fibras sobre el colector, se comprueba de nuevo la presencia de fibras en el microscopio óptico para posteriormente, visualizar las muestras al microscopio electrónico de barrido para evaluar el efecto de la variación de los parámetros del proceso sobre las fibras. Una vez realizado el electrohilado, las muestras se secan a temperatura ambiente para eliminar los restos de disolvente que puedan quedar y se guardan para su posterior uso.



Figura 3.2: Membrana electrohilada.

### 3.4. Visualización de las membranas electrohiladas al microscopio electrónico

Todas las membranas obtenidas por electrohilado se visualizaron al microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6300 para posteriormente, evaluar el efecto de la variación de los diferentes parámetros sobre la morfología de las muestras y sobre el diámetro de las fibras. Las condiciones de adquisición de la imagen fueron un voltaje de 20 kV y una distancia de trabajo de 10 mm. El software utilizado para la adquisición de la imagen fue el programa INCA, generado por Oxford Instruments.

Antes de proceder a la visualización de las muestras, se requiere una preparación de las mismas. Para ello, se emplea un porta metálico sobre el cual se colocará un trozo de cinta adhesiva de doble cara sobre la que se pegará un trozo de membrana, preferiblemente de la zona de mayor espesor. Es muy importante que en este paso el porta quede bien identificado con la muestra que contiene. A pesar de que el trozo de membrana está sobre el papel de aluminio, y éste sobre un porta metálico conductor de electricidad, es conveniente colocar un poco de disolución puente sobre la membrana y el porta para asegurar la conductividad eléctrica y que la muestra no se queme. Para finalizar con la preparación de las muestras, éstas reciben un baño de oro.

Una vez preparadas las muestras, se procede a la visualización de las mismas. Para ello, se colocan los portas sobre un soporte que se introducirá en el equipo de microscopía. Tras enfocar la imagen y ajustar el brillo y contraste se procede a la toma de las fotografías.

### 3.5. Medida del diámetro de las fibras

Para estudiar el efecto de la variación del voltaje, la velocidad de flujo y la distancia sobre las fibras y para caracterizar las muestras, se empleó el programa ImageJ, el cual permite medir los diámetros de diferentes fibras y obtener un valor medio de dichos diámetros y la desviación estándar.

Para obtener estos resultados, se realizaron 100 medidas de diámetro en total para cada una de las muestras, empleando 3 imágenes tomadas por el microscopio electrónico de cada una de las condiciones. Sobre cada fibra, se toman 3 medidas en diferentes posiciones, midiendo aproximadamente 33-34 fibras por imagen hasta alcanzar un total de 100 medidas. Una vez realizadas estas medidas, se obtiene un valor medio de dicho diámetro y la desviación estándar de la medida.

### 3.6. Preparación de la suspensión de nanoarcilla

Con el fin de reforzar las membranas de electrohilado para evitar la liberación inmediata de la proteína de su interior cuando se coloquen en una disolución acuosa, se adicionó a la disolución de partida nanopartículas de arcilla del tipo montmorillonita, la bentonita.

Para la preparación de la suspensión de nanoarcilla es necesario seguir un protocolo de carga de nanopartículas en soluciones para su uso en el laboratorio, el cual se basa en el peso de la nanopartícula en la cantidad deseada y su adición a volúmenes previamente medidos del disolvente, en este caso, agua desionizada. Todo esto, se realiza en el interior de una cabina hermética de metacrilato para evitar el contacto de la nanoarcilla con el ambiente exterior.

De manera previa a la preparación de la cabina de trabajo, se prepararon todos los materiales necesarios para el procedimiento. Dichos materiales fueron el vial que contiene la bentonita, una espátula metálica para trabajar con bentonita, un vidrio de reloj para el pesado de la nanoarcilla, la cantidad de agua destilada donde se dispersará la nanoarcilla, un pulverizador con agua para la limpieza, papel secante, la cabina de trabajo, bridas, guantes, una balanza analítica y varias bolsas grandes de cierre zip para la limpieza.

En primer lugar se preparó la cabina de trabajo. Para ello, se cubrió toda la superficie de la vitrina de trabajo con papel de filtro y se colocó la cabina sobre la balanza y su fuente de alimentación de manera que ambas queden situadas en el interior de la cabina. Tras esto, se introdujo todo el material necesario en el interior de la cabina.

A continuación, se procedió al pesado de la cantidad necesaria de nanopartícula. Antes de abrir el vial, se roció el interior de la cabina con el pulverizador de agua con la finalidad de que las partículas volátiles queden atrapadas por el líquido, siendo conveniente repetir este paso cada cierto tiempo durante todo el proceso de preparación. Una vez pesada la nanoarcilla, se cerró el bote para evitar la contaminación del mismo por la humedad. Las suspensiones preparadas en este trabajo contenían un 5% y un 23% de nanoarcilla.

Tras esto, se realizó la limpieza de la cabina y de todo el material de su interior. Durante esta parte del proceso es muy importante que todo esté húmedo ya que el nanocompuesto estará al descubierto, realizándose este paso con la máxima celeridad posible. Se roció todo el interior de la cabina con agua y se limpió con papel secante para retener la mayor parte de las nanopartículas que se hubieran podido volatilizar. Se comprobó que todos los botes estuvieran cerrados y se abrió la puerta de la cabina para sacar todo el material, previamente humedecido y secado. Se limpió tanto el exterior como el interior de la cabina con agua y se guardó. Se recogió todo el papel de filtro de la bancada, empapándolo previamente y se guardó en una bolsa de cierre zip, considerándose como residuo sólido de nanopartícula.

Por último, para terminar con la preparación de la suspensión de la nanopartícula en agua, se introdujo la suspensión en un sonicador de BANDELIN, modelo *SONOPULS* HD 3200, el cual, exfolia las nanopartículas para que éstas se separen en nanoláminas y se homogenice la muestra. Durante este paso, se colocó la muestra en un baño de hielo debido a que el sonicador aumenta la temperatura de la muestra, a fin de evitar que este aumento de temperatura interfiera en los resultados posteriores. Los parámetros empleados en el sonicador fueron un tiempo de 30 min y una potencia de 100 W, siguiendo el trabajo realizado por Kahraman et al. (2013). La temperatura final que alcanzó el agua fue de 5 °C.

Antes de proceder a la carga de cualquier nanopartícula, es imprescindible familiarizarse con los riesgos que estas pueden suponer para la salud de la persona que las manipula, y de

aquellas que están alrededor. En general y con independencia del tipo de nanocompuesto, los que se encuentran en forma disgregada y seca suponen un grave riesgo para la salud ya que presentan una alta volatilidad, lo que provoca que sea muy fácil inhalarlos si no se emplean las medidas de protección adecuadas. Además, debido a su pequeño tamaño, pueden causar irritación pulmonar e inflamación, y exposiciones prolongadas a estos compuestos pueden llevar a la cronificación de estos procesos. Además, si no se emplean los equipos de protección necesarios, es posible que la nanopartícula penetre por contacto con la piel descubierta. Por todo esto, hay que proceder con la máxima seguridad posible.

El equipo básico de protección personal para trabajar con nanopartículas se basa en cubrir toda la piel, sellando bien todas las juntas de la bata con cinta aislante, y cubrir la parte abierta de los guantes, que serán de un tipo u otro según los disolventes que se empleen. Del mismo modo, debe cubrirse el pelo con un plástico y no con una tela, ya que las nanopartículas pueden penetrar fácilmente a través de ella. Por último, es necesario emplear una máscara integral, que protege de gases, vapores y partículas. Tal y como se ha comentado antes, otro punto importante a tener en cuenta en la seguridad es que antes de empezar a trabajar con la nanopartícula, es imprescindible asegurarse de haber preparado todas las disoluciones y materiales que se necesiten durante el trabajo en la cabina, ya que una vez que se han expuesto los nanocompuestos al aire dentro de la cabina, ésta no se puede volver a abrir hasta realizar la limpieza. Una vez que la nanopartícula esté disuelta en agua, ya es posible manipularla fuera de la cabina.

Una vez preparada la suspensión de nanoarcilla se añadió a la disolución de polímero para actuar como refuerzo de la membrana electrohilada, haciendo que la liberación de la proteína tenga que seguir caminos más tortuosos y con ello, que se libere más lentamente. Concretamente, se realizaron 4 disoluciones con 4 contenidos diferentes de nanoarcilla en peso con respecto al peso total del polímero: 0, 2, 10 y 40%. Tras esto, se realizó un entrecruzamiento de las membranas con el fin de que las cadenas se entrecrucen unas con otras, permitiendo que la membrana al introducirse en agua se convierta en un hidrogel, absorba agua y no se degrade.

### **3.7. Determinación de la densidad y la tensión superficial de las disoluciones**

La tensión superficial es un parámetro físico que participa en el proceso de formación de gotas y en el tamaño de las mismas, dependiendo de la naturaleza del líquido, del medio que le rodea y de la temperatura. Este fenómeno es causado por las fuerzas de cohesión entre las moléculas de un líquido (Atkins y Jones, 2006; Esteban et al., 2012). Cuando un líquido está en contacto con un gas se distinguen dos tipos de moléculas. Por un lado están las moléculas internas del líquido, las cuales están completamente rodeadas de otras moléculas del líquido, de modo que las fuerzas cohesivas que se forman entre ellas están equilibradas. Por otro lado, están las moléculas de la superficie, localizadas en la interfase entre el líquido y el gas. Debido a que estas moléculas no están completamente rodeadas por moléculas del líquido, establecen fuerzas cohesivas más fuertes con las otras moléculas de la interfase, de modo que cada molécula de la superficie es atraída además por las moléculas internas hacia el centro del líquido. De este modo, se forma en la superficie una especie de membrana tensa elástica (Butt et al, 2003; Lee et al., 2009). Este comportamiento se muestra en la Figura 3.3. Aquellos líquidos que tengan fuerzas cohesivas más fuertes tendrán una tensión superficial mayor.

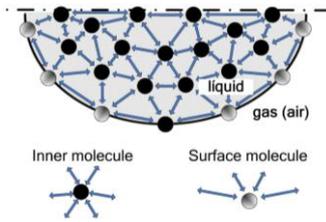


Figura 3.3: Representación de las fuerzas cohesivas establecidas entre las moléculas internas y las de la superficie de un líquido en contacto con el aire (Riba y Esteban, 2014).

Debido a que la tensión superficial es una de las propiedades de la disolución que influyen en el proceso de electrohilado, y a modo de evaluación de la influencia del contenido en nanoarcilla en este parámetro, se determinó la tensión superficial para cada una de las disoluciones empleadas en este trabajo. Existen diversos métodos para medir la tensión superficial de los líquidos, empleándose en este trabajo un método basado en el pesado de gotas de disolución. En concreto, se han empleado dos variantes de este método, una de las cuales emplea además la densidad de las disoluciones.

En primer lugar se realizó el método llevado a cabo en su trabajo por Lee et al. (2009), en el cual tratan de verificar la validez de los métodos de pesado de gotas para determinar la tensión superficial de varios líquidos mediante el uso de líquidos de tensión superficial conocida, de modo que comparando ambos datos, determinaron la validez del método. Se trata de un método barato y sencillo que se basa en pesar gotas de cada disolución, las cuales se dispensan a través de agujas de diferentes diámetros externos. Para este método se empleó una balanza de precisión de METTLER TOLEDO, XS105 DualRange con una precisión de 0,01 mg/0,1 mg. Para ello, se preparó un pequeño recipiente en el que se dispuso un poco de disolución en la base para evitar que al dispensar las gotas, estas evaporen el disolvente rápidamente. Tras tarar la balanza, se dispensaron 10 gotas de la disolución y se anotó el peso en miligramos de esas 10 gotas. Este paso se realizó 3 veces para obtener 3 réplicas de pesos con cada una de las agujas. Las agujas empleadas tienen un diámetro externo de 1,849, 1,662, 1,286, 0,926, 0,523 y 0,421 mm (Figura 3.4). Este procedimiento se realizó para cada una de las disoluciones empleadas: 0, 2, 10 y 40% de nanoarcilla.



Figura 3.4: Agujas empleadas para determinar la tensión superficial, ordenadas de mayor a menor diámetro externo.

Una vez obtenidos los datos, se determinó el peso de 1 gota y se realizó un promedio. A continuación, se representó en una gráfica la masa de una gota (en gramos) en función del radio externo de las agujas. Para determinar la tensión superficial, se ajustaron los puntos experimentales obtenidos a una línea de tendencia polinómica de orden 2 (Ecuación 1):

$$\text{Ecuación 1: } m = -C_1(r^2) + C_2(r)$$

En el trabajo consultado, a partir del coeficiente  $C_2$  de este ajuste, proponen una ecuación semiempírica lineal (Ecuación 2) para determinar la tensión superficial de las disoluciones:

$$\text{Ecuación 2: } \gamma = 171.2 C_2$$

En la Ecuación 2,  $\gamma$  es la tensión superficial (mN/m) y  $C_2$  es el coeficiente que multiplica a la  $x$  en la ecuación cuadrática de la línea de tendencia obtenida.

Tras evaluar los datos, se observó que no existía una tendencia en la tensión superficial con respecto al contenido en nanoarcilla, de modo que se empleó otro método para verificar estos resultados. Dicho método es empleado por Riba y Esteban (2014) en su artículo, en el que se empleaba además del peso de 1 gota, la densidad de las disoluciones. Para la determinación de la densidad de cada una de las disoluciones se empleó un pequeño vial del cual se determinó el peso. A continuación se rellenó con agua destilada y se anotó el peso. Mediante la diferencia de ambos valores se obtuvo el peso del agua añadida, y empleando la densidad del agua destilada a temperatura ambiente,  $997 \text{ kg/m}^3$ , se determinó el volumen de agua añadido al vial, que corresponde con la capacidad del mismo. A continuación se rellenó el vial con las diferentes disoluciones y mediante el peso de la cantidad añadida y el volumen calculado, se determinó la densidad de cada una de las disoluciones. Una vez obtenidos estos valores, para determinar la tensión superficial empleaban la Ecuación 3, que contiene las fuerzas que actúan en la formación de la gota según la ley de Tate (Figura 3.5):

$$\text{Ecuación 3: } m \cdot g = F \cdot \gamma \cdot 2 \cdot \pi \cdot r$$

En la Ecuación 3,  $m$  es la masa de la gota (kg),  $g$  es la aceleración de la gravedad,  $\gamma$  es la tensión superficial (mN/m),  $2 \cdot \pi \cdot r$  es el perímetro de mojado, siendo  $r$  el radio mojado por la gota, que se corresponde con el diámetro interno o externo del capilar dependiendo de la disolución. En nuestro caso, como la disolución moja la aguja empleada para dispensar las gotas, este radio se corresponde con el radio externo de la aguja.  $F$  es un factor de corrección, que viene dado por la Ecuación 4:

$$\text{Ecuación 4: } F \left( \frac{r}{V^{1/3}} \right) = 1.000 - 0.9121 \cdot \left( \frac{r}{V^{1/3}} \right) - 2.109 \cdot \left( \frac{r}{V^{1/3}} \right)^2 + 13.38 \cdot \left( \frac{r}{V^{1/3}} \right)^3 - 27.29 \cdot \left( \frac{r}{V^{1/3}} \right)^4 + 27.53 \cdot \left( \frac{r}{V^{1/3}} \right)^5 - 13.58 \cdot \left( \frac{r}{V^{1/3}} \right)^6 + 2.593 \cdot \left( \frac{r}{V^{1/3}} \right)^7$$

En la Ecuación 4,  $r$  es de nuevo el radio externo de la aguja (mm) y  $V$  corresponde con el volumen de la gota ( $\text{m}^3$ ), calculado empleando el peso de la gota y la densidad de la disolución. Una vez que se obtienen los datos, se aplican las ecuaciones y se obtiene un valor de tensión superficial promedio de las tensiones superficiales determinadas para cada una de las agujas, en cada una de las disoluciones.

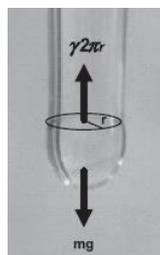


Figura 3.5: Formación de la gota y fuerzas que actúan en ello según la ley de Tate (Riba y Esteban, 2014).

### 3.8. Preparación de films de PVA y nanoarcilla

Para determinar las condiciones de entrecruzamiento adecuadas se trabajó con films en vez de con la membrana de electrohilado ya que en el caso del film la densidad de entrecruzamiento se puede determinar con facilidad a partir de la capacidad de absorción de agua de la muestra

medida por pesada. Una vez se determinaron las condiciones, se realizó el entrecruzamiento de las membranas con los diferentes contenidos de nanoarcilla.

Para la realización de los films (Figura 3.6), se partió de la disolución de PVA en agua destilada/ácido acético glacial (30/70 v/v) al 8% p/p. Con esta disolución, se prepararon los films del 0% de nanoarcilla. Una determinada cantidad de esta disolución se añadió en un recipiente junto con suspensión de nanoarcilla en agua desionizada al 5% para realizar los films con un contenido del 2 y 10% de nanoarcilla, y suspensión de nanoarcilla al 23% para realizar los films con un contenido en nanoarcilla del 40%. Los recipientes que contienen las mezclas se colocaron en agitación con aspas para evaporar el disolvente y obtener una mezcla más espesa. Este proceso se llevó a cabo a una temperatura de entre 70-80 °C y a una velocidad de 350 rpm. Tras esto, se colocaron las muestras en un desecador a vacío para eliminar todo el aire y evitar la formación de burbujas en el film y la formación de espuma en las placas. A continuación, se vertió una determinada cantidad de la mezcla en una placa Petri hasta conseguir una capa lo más fina posible, lo cual, permitirá que el proceso de entrecruzamiento ocurra adecuadamente. Por último, se dejaron secar las placas para eliminar por completo el disolvente y obtener el film seco de PVA y nanoarcilla.



Figura 3.6: Films realizados con los diferentes contenidos de nanoarcilla.

### 3.9. Ensayo de entrecruzamiento

Para los ensayos de entrecruzamiento se emplearon en primer lugar films de PVA y nanoarcilla con el objetivo de determinar las condiciones de entrecruzamiento más adecuadas para realizar posteriormente el entrecruzamiento de las membranas electrohiladas. Para ello, se cortaron rectángulos de 0,5x3 cm de cada film con un contenido de nanoarcilla, realizando 6 réplicas de cada contenido en nanoarcilla: 3 controles y 3 pruebas. Cada una de estas réplicas se pesaron para obtener su masa antes del inicio del ensayo ( $t = 0$  h). Para realizar el entrecruzamiento se probaron varios métodos diferentes.

Se realizó en primer lugar un entrecruzamiento en fase vapor de GA y ácido clorhídrico. El GA, que es el agente entrecruzante, requiere un ambiente ácido para que la reacción se lleve a cabo. Para aportar este ambiente ácido ( $\text{pH} = 2$ ) se empleó el ácido clorhídrico. Se colocaron los films en el interior de un desecador de plástico junto con un vaso con GA al 25% y otro vaso de ácido clorhídrico al 37% (Lee et al., 2016). Se dejó entrecruzar durante 6, 12 y 24 h. Tras realizar el ensayo de hinchado se observó que los films no habían entrecruzado mediante este método.

A continuación, se determinó el pH de las disoluciones empleadas mediante tiras reactivas de pH. Dado que el pH de todas las disoluciones era de 2, se procedió a realizar un nuevo ensayo de entrecruzamiento pero esta vez sólo con GA, ya que el ambiente ácido lo proporcionaba el ácido acético glacial de la disolución. Se colocaron de nuevo muestras en el desecador junto con un vaso de GA y se entrecruzó durante 6, 12, 24 y 48 h (Destaye et al., 2013). De nuevo, tras realizar los ensayos de hinchado pertinentes, se determinó que con este método tampoco se consiguió entrecruzamiento.

Durante estos ensayos, se observó que el vaso que contenía el GA, el cual era un líquido amarillento antes del entrecruzamiento, se volvía de un color marrón oscuro, por lo que se pensó que era posible que el GA se saturara por el ambiente ácido y llegara un momento en el que ya no realizaba su función. Por eso, se realizó de nuevo un entrecruzamiento en fase vapor en dos etapas. En primer lugar, las muestras se colocaron en el desecador junto con un vaso de ácido clorhídrico para que este formara la fase de vapor y penetrara en las muestras durante 24 h y tras ese tiempo, se cambió el vaso por uno con GA, para que éste penetrara posteriormente en las muestras donde ya había penetrado el ácido clorhídrico, durante 72 h. A pesar de esta variación, tampoco se consiguió realizar el entrecruzamiento, por lo que se decidió cambiar el método de entrecruzamiento.

Se valoraron otras dos posibilidades alternativas al entrecruzamiento en fase vapor: introducir el entrecruzador en la disolución polimérica antes de realizar los films y las membranas electrohiladas, o una vez formadas estas, introducir las en una disolución que contuviera el agente entrecruzante.

En el primer caso, se introdujo una determinada cantidad de GA en la disolución polimérica de manera previa a la formación del film. En el artículo de Mansur et al. (2008) realizaron mezclas de 1, 2, 3 y 5 mL de GA al 25% en solución acuosa con 20 mL de disolución de PVA al 5 y 10% p/p. Tomando como referencias 5 mL de GA y una concentración de PVA del 5%, se realizaron los cálculos pertinentes para ajustar dicha cantidad de GA a las diferentes disoluciones de PVA/nanoarcilla con las que se trabajó, de modo que existiera la misma relación en moles de GA/PVA que la empleada en el artículo. Según esta bibliografía, la cinética de la reacción de entrecruzamiento en este caso era lenta, sin embargo, la mezcla entrecruzó rápidamente y se formó un gel antes de poder verter una cantidad en una placa Petri para formar los films, por lo que se descartó este método rápidamente. En la Figura 3.7 se muestran los geles formados con este método de entrecruzamiento, con los distintos contenidos de nanoarcilla. Por supuesto, este método es también inviable para la realización del electrohilado, puesto que si la disolución entrecruza tan rápidamente, no es posible hacerla pasar por la aguja de electrohilado antes de que gelifique.



Figura 3.7: Geles obtenidos tras añadir el entrecruzador en la disolución polimérica (0, 2, 10 y 40% de nanoarcilla, respectivamente).

A continuación, se probó el último método comentado en el que los films, una vez cortados y pesados, se introdujeron en una disolución acuosa que contenía GA como agente entrecruzante, ácido sulfúrico como regulador del pH y sulfato sódico decahidratado para asegurar que los films, al introducirse en la disolución no se disolvieran. Estos reactivos se añadieron en las concentraciones mostradas en la Tabla 3.1 hasta conseguir un volumen de 400 mL (Kim et al., 1993). El agua añadida a esta disolución hasta alcanzar el volumen deseado fue agua desionizada.

Tabla 3.1.: Composición de la disolución acuosa de entrecruzamiento (Kim et al., 1993).

Componente	Concentración (mol/L)
Glutaraldehído	0,03
Ácido sulfúrico	0,15
Sulfato sódico decahidratado	0,96

Con este método los films sí que entrecruzaron de modo que se eligió para entrecruzar las membranas de electrohilado y continuar con los ensayos. En el caso de los films, no se pudo trabajar con las muestras del 0% de nanoarcilla debido a que se rompieron en varias ocasiones durante su manipulación.

### **3.10. Ensayo de hinchado**

Una vez realizado el entrecruzamiento, el siguiente paso es comprobar que éste ha ocurrido de manera correcta. Para ello, se realizó un ensayo de hinchado. Con este método, no sólo se confirma que el entrecruzamiento ha ocurrido, sino que además, permite evaluar la capacidad de absorción de agua de los hidrogeles mediante la variación de peso que ocurre en ellos.

En este ensayo los films o membranas electrohiladas tras el entrecruzamiento se sumergieron en placas Petri con agua desionizada, correctamente etiquetadas para cada una de las muestras y sus correspondientes réplicas. Tras cada hora, las muestras se sacaron del agua, se secaron en papel absorbente para eliminar el agua superficial y se tomó una medida del peso en una balanza analítica de METTLER TOLEDO modelo AX205 con una precisión de 0,01 mg. Tras esto, se volvieron a introducir en el agua hasta la siguiente medida. Este proceso se realizó hasta que se observó que la masa de agua absorbida en una gráfica se mantenía estable, realizándose este procedimiento durante 5 h. Durante este procedimiento, el agua se cambió cada 2 h. Una vez finalizado el ensayo de hinchado, las muestras se secaron al aire y a vacío y se pesaron para obtener el peso de las muestras sin agua.

### **3.11. Ensayo de absorción y liberación de proteína**

Una vez entrecruzados los films y las membranas electrohiladas, el siguiente paso es introducir la proteína en su interior por absorción y realizar su liberación para cuantificar la cantidad de proteína liberada y la cinética de liberación.

Para absorber la proteína en el interior de los films y de las membranas electrohiladas, se preparó una disolución al 20% de BSA en PBS. Las réplicas de los controles no absorbieron proteína, mientras que las réplicas de las pruebas se sumergieron en 2 mL de dicha disolución para absorber la proteína durante 24 h. Durante ese periodo de tiempo, las réplicas de pruebas se pesaron a los 15, 30, 45 min, 1, 2, 3, 4, 5 y 24 h. Tras esto se secaron al aire y a vacío. En un primer momento, se determinó la cantidad teórica de proteína absorbida por diferencia de peso entre las muestras secas tras la absorción de BSA y las muestras secas antes de la absorción. Sin embargo, tras realizar la cuantificación, el valor real de proteína liberada fue superior al teórico estimado. Por ello, se planteó la hipótesis de que el 20% del peso total de disolución que las muestras habían absorbido ( $t = 24$  h), corresponde a la cantidad teórica de BSA absorbida por las muestras, y esto permitirá posteriormente calcular la cantidad de proteína liberada con el tiempo.

El ensayo de liberación de proteínas se realizó tanto con las réplicas de pruebas como de los controles, ya que el propio material puede dar valores de absorbancia en la longitud de onda que estamos analizando, y que deben tenerse en cuenta a la hora de cuantificar la cantidad real de proteína que se ha liberado. Para la liberación, las pruebas y los controles se sumergieron en 1 mL de PBS y se tomaron muestras del sobrenadante cada cierto tiempo durante 5 h. Concretamente, se extrajeron 500  $\mu$ L a los 30 min, 1, 2, 3, 4 y 5 h. Tras cada extracción, se añadieron otros 500  $\mu$ L de PBS para mantener el volumen total de 1 mL. La cuantificación de proteína se realizó únicamente con una de las réplicas (con sus correspondientes controles y pruebas), la cual se conservó en nevera hasta su preparación para la cuantificación, y las otras dos se congelaron por si fuera necesario realizar otra medida.

### 3.12. Cuantificación de proteína liberada

Para la cuantificación se empleó el kit Micro BCA Protein Assay de Thermo. Se trata de un método colorimétrico para la detección y cuantificación de proteínas, compatible con detergentes mediante ácido bicinconínico (BCA), que se basa en la reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  por las proteínas en un medio alcalino (reacción de Biuret). Este método tiene una alta sensibilidad y selectividad colorimétrica para la detección de los cationes cuprosos ( $\text{Cu}^{+1}$ ) empleando un reactivo que contiene BCA. El color morado que se observa tras la reacción se produce por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión de cobre. Se forma un complejo soluble en agua que presenta una absorbancia a 562 nm y tiene una relación proporcional con el incremento de la concentración de proteínas en un rango que va desde 20-2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0,5-20  $\mu\text{g}$  con el kit MicroBCA). Debido a que la reacción de coloración no se detiene, este método no es definitivo. Sin embargo debido a que el proceso es lento, es posible medir muchas muestras a la vez.

El primer paso para realizar la cuantificación de la proteína es la preparación de los estándares y la solución de trabajo. Para los estándares, se prepararon disoluciones de BSA en PBS de concentraciones crecientes y conocidas que permitirán obtener una recta patrón a partir de la cual, se obtendrá una ecuación para el cálculo de la concentración de proteína de las muestras. Para los films, las concentraciones empleadas para los estándares fueron 0, 60, 90, 120, 180, 240 y 312  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ya que se estimó en un primer momento por diferencia de peso la cantidad máxima teórica de proteína absorbida, y esta resultó ser de 270  $\mu\text{g}$  aproximadamente. Sin embargo, tras obtener los resultados de absorbancia, se observó que la cantidad real de proteína absorbida era superior al patrón, de modo que para las membranas electrohiladas, se realizaron estándares de 0, 120, 240, 312, 480 y 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ya que el método comentado para determinar la cantidad máxima de proteína absorbida no era adecuado, se planteó la hipótesis de que la muestra, al introducirla en la disolución de BSA, un 20% del peso absorbido era proteína. La curva patrón debe realizarse cada vez que se realice un nuevo ensayo de BCA, no pudiendo usarse rectas patrón de ensayos anteriores. A continuación, se preparó la solución de trabajo con el reactivo WR, el cual, debe prepararse el mismo día que se va a realizar la cuantificación ya que es fotosensible y precipita al poco tiempo de realizar la mezcla de sus componentes. Esta solución está compuesta de tres componentes: MA, MB y MC. Estos componentes se mezclan en dicho orden en un tubo Falcon que se cubre con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz del reactivo y su degradación. Para determinar las cantidades que se debe añadir de cada componente, se aplicó la Ecuación 5:

*Ecuación 5:*

$$(\#estándares + \#muestras + \#reactivo) \cdot (\#réplicas) \cdot (\#volumen \text{ de WR por muestra}) = \text{volumen total de WR}$$

En la Ecuación 5, #estándares hace referencia al número de puntos que formarán la recta patrón, #muestras hace referencia al número de pruebas y controles con los que se trabaja, #reactivo indica al control de reactivo WR que se pondrá en la placa multipocillo, #réplicas hace referencia al número de réplicas técnicas que se realizarán con el equipo y #volumen total de WR corresponde a la cantidad de la mezcla que se colocará por muestra en cada eppendorf.

A pesar de que el resultado de esta fórmula indica la cantidad total de solución WR necesaria para el ensayo, se preparó un volumen un poco mayor para tener de sobra y poder rellenar posteriormente algún pocillo de la placa multipocillo a modo de control para asegurarnos de que el reactivo no esté contaminado. Tras esto, se calculó la cantidad de cada uno de los

reactivos teniendo en cuenta que en la mezcla, 25 partes son de reactivo MA, 24 partes son de MB y 1 parte es de MC (25:24:1, solución MA:MB:MC). Tras realizar la mezcla, se agitó el tubo Falcon durante 30 s.

El siguiente paso es la preparación de las muestras. Se trabajó con 3 réplicas técnicas de cada una de los controles y pruebas, de modo que por cada uno de ellos, se prepararon 3 eppendorfs correctamente rotulados e identificados en los que se dispensaron 100  $\mu$ L de disolución en cada uno. Tras esto, se añadió a cada eppendorf 100  $\mu$ L del reactivo WR y se centrifugó mediante un spin durante 30 s. A continuación, todos los eppendorfs y el reactivo WR que sobró se incubaron durante 1 h y 30 min en una estufa a 37 °C, tras lo cual se volvieron a centrifugar todos los eppendorfs. Una vez realizado este paso, se colocaron los controles y las pruebas en una placa multipocillo P96, así como las réplicas del reactivo WR que confirmarán la ausencia de contaminación si no aparece coloración morada.

El último paso consiste en medir la absorbancia de las réplicas. Para ello se emplea un equipo de PerkinElmer, VICTOR3, 1420 Multilabel Counter. El software empleado es WALLAC 1420, en el que se introdujo el programa a utilizar, Absorbance@ 570 (0.1 s) que permitió medir las muestras a 570 nm. Tras seleccionar las posiciones vacías de la placa multipocillo, el equipo midió la absorbancia de todos los pocillos.

### 3.13. Análisis termogravimétrico

La termogravimetría es un método de análisis térmico que permite obtener un registro continuo de pérdida de masa en función del tiempo o de la temperatura. La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o la temperatura se denomina termograma o curva de descomposición térmica. Este método ofrece información sobre la composición de un material y su estabilidad térmica, siendo un método muy rápido en el que se emplean muestras muy pequeñas.

En este trabajo se ha empleado esta técnica con el objetivo de comprobar si el porcentaje de nanoarcilla inicial que suponemos que tiene la muestra es real o no. El termogravímetro empleado es un TGA/DSC 2 STAR System de METTLER TOLEDO. Este equipo la muestra se quema por completo. En primer lugar se colocan en el equipo las cápsulas donde se colocarán las muestras. A continuación, se emplea el software STARe para programar el método a emplear. El método consiste una isoterma a 30 °C durante 1 min para estabilizar la temperatura y una rampa de temperatura de 30 a 1000 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 K/min. Se selecciona el flujo de nitrógeno a 50 mL/min. Se introduce el tipo de técnica, TGA, y el tipo de cápsula a utilizar, cápsulas de platino de 70  $\mu$ L. Tras esto, se hace una línea base, que se restará automáticamente a las siguientes medidas. Después de preparar el método se pesan todas las cápsulas vacías y a continuación se colocan las muestras en su interior para lanzar el experimento. Una vez finalizado el procedimiento, se obtienen unas curvas de pérdida de masa en función del tiempo y la temperatura. Como las nanoarcillas se degradan a temperatura mucho más alta que el PVA empleado, el residuo sólido que quede en la muestra se corresponde exclusivamente con la nanoarcilla contenida en la muestra, lo cual permite calcular el porcentaje real inicial de nanoarcilla en la muestra.

### 3.14. Análisis estadístico

Para evaluar la significación de los datos obtenidos al evaluar el efecto de los parámetros del proceso de electrohilado sobre el diámetro de las fibras se ha realizado un test ANOVA empleando el programa Statgraphics XVI.i.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Selección de parámetros de electrohilado

De todos los parámetros que influyen en el proceso de electrohilado comentados en el apartado 2.3. Electrohilado, se muestran en la Tabla 4.1 aquellos que han sido controlados y decididos en este trabajo, según sean parámetros de la disolución o parámetros del proceso de electrohilado, ya que los parámetros ambientales no han sido controlados en este trabajo.

Tabla 4.1: Parámetros del electrohilado controlados en el trabajo.

Parámetros de la disolución	
Naturaleza del polímero	PVA
Concentración	8% p/p
Peso molecular	130.000 g/mol
Disolvente	Agua destilada/ácido acético glacial (30/70 v/v)
Parámetros del proceso	
Distancia	20 cm
Voltaje	20 kV
Velocidad de flujo	4 mL/h
Diámetro interno de la aguja	0,6 mm

### 4.2. Efecto de los parámetros de electrohilado sobre las fibras

A continuación se muestran las imágenes obtenidas de microscopía electrónica para evaluar el efecto de los parámetros de electrohilado: distancia, voltaje y velocidad de flujo.

En la Figura 4.1 se muestran las imágenes de las membranas electrohiladas en las que se varió la distancia entre la punta de la aguja y el colector. En estas imágenes se observa que las fibras tienen una disposición aleatoria, siendo continuas y homogéneas. Del mismo modo, en ningún caso se observa la formación de cuentas, engrosamientos de las fibras o defectos en las mismas. En la Tabla 4.2 se muestran los valores de la media y la desviación estándar obtenidos tras la medida del diámetro de las fibras de cada muestra. En este caso se observa que la relación entre la variación de la distancia y el diámetro de las fibras no es lineal, ya que a medida que aumenta la distancia desde 10 a 20 cm, disminuye el diámetro de las fibras. Sin embargo, al trabajar a 25 cm se observa que el valor medio del diámetro aumenta considerablemente.

Podemos intentar explicar esta variación del diámetro de la fibra con la distancia considerando dos fenómenos que se producen simultáneamente, pero que provocan tendencias opuestas. Por un lado, al aumentar la distancia manteniendo la diferencia de potencial, se disminuye la intensidad del campo eléctrico, lo cual produce una menor aceleración de las fibras y por tanto, un menor estiramiento de las mismas, formándose fibras más gruesas. Por otro lado y con tendencia opuesta, al aumentar la distancia las fibras tienen más tiempo para secarse y por tanto, a llegar con menos disolvente y más finas al colector. No hay forma de saber cuál de estos dos fenómenos es dominante en el proceso, y la combinación de ambos provoca primero la disminución del tamaño de la fibra para distancias de 10 a 20 cm y el posterior aumento a distancias de 25 cm.

En general, el efecto de la distancia en el electrohilado implica que al trabajar con distancias muy pequeñas se forman gotas en la punta de la aguja que llevan a un goteo de la disolución,

además de que tanto a distancias muy pequeñas como muy grandes se forman cuentas en las fibras. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que es necesaria una distancia óptima para cada disolución que permita que el disolvente se evapore antes de llegar al colector. (Buchko et al., 1999; Zhang et al., 2005).

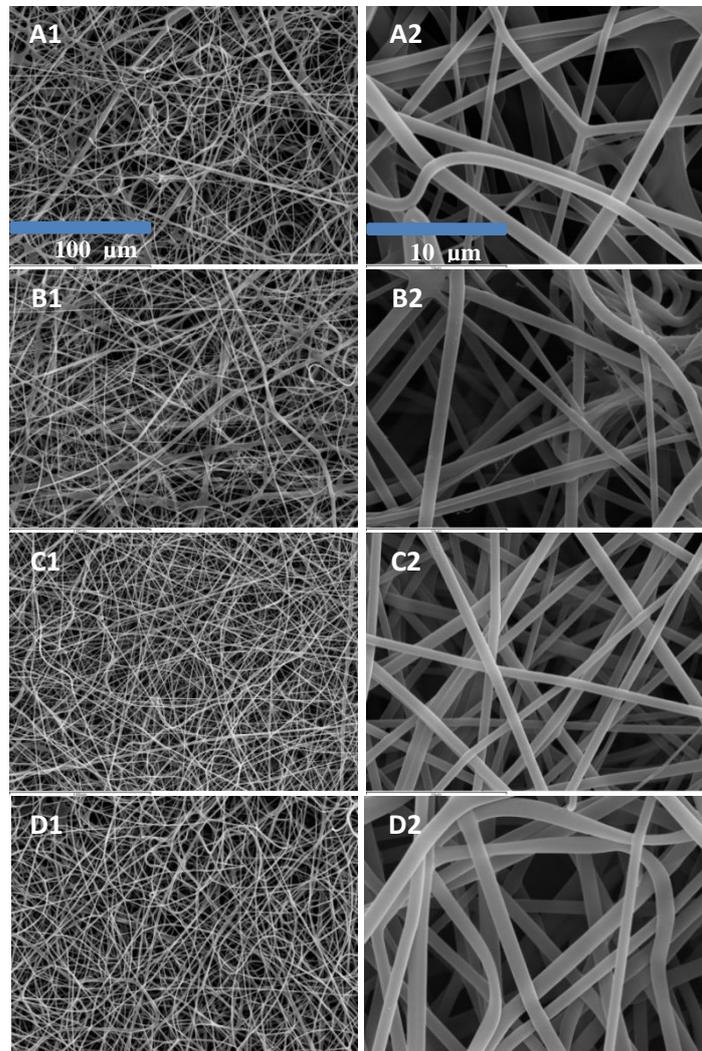


Figura 4.1: Imágenes de SEM de membranas realizadas con un voltaje de 20 kV y una velocidad de flujo de 4 mL/h. 1= 500 aumentos; 2= 5000 aumentos; A= 10 cm; B= 15 cm; C= 20 cm; D= 25 cm. Las imágenes tomadas a 500 aumentos tienen una escala de 100 μm y las de 5000 aumentos de 10 μm.

Tabla 4.2: Media y desviación estándar de la medida del diámetro de las fibras a diferentes distancias.

Distancia (cm)	Media (μm)	Desviación estándar
10	0,84	0,30
15	0,81	0,31
20	0,73	0,22
25	1,05	0,28

Las imágenes de microscopía electrónica de las membranas electrohiladas obtenidas tras variar el voltaje se muestran en la Figura 4.2. De nuevo, se observa que las fibras son aleatorias, continuas y homogéneas, sin cuentas, engrosamientos o defectos. En la Tabla 4.3 se muestran los valores de la media y la desviación estándar tras medir el diámetro de las fibras de cada muestra. Evaluando los resultados, se observa que la relación entre la variación del

voltaje y el diámetro de las fibras no es lineal, formándose fibras de mayor diámetro al trabajar con 15 y 20 kV, mientras que las fibras de menor diámetro se obtienen con 10 y 25 kV.

De nuevo, en este caso se observan dos fenómenos opuestos. Por un lado, al aumentar la diferencia de potencial manteniendo la distancia, aumenta el campo eléctrico y por tanto la aceleración a que se someten las fibras. Esto produce un estiramiento de las mismas, obteniendo fibras más finas. Al mismo tiempo, al ser mayor la aceleración a la que se someten las fibras, disminuye el tiempo que tardan en depositarse en el colector, y por tanto tienen menos tiempo para evaporar el disolvente, con lo cual llegan con más cantidad de disolvente al colector, produciéndose fibras más gruesas. La combinación de ambos fenómenos produce que en primer lugar aumente el diámetro de la fibra al aumentar la diferencia de potencial, para luego disminuir.

El efecto de la variación del voltaje implica que al aumentar el voltaje, el diámetro de las fibras disminuye, mientras que si el voltaje es bajo, se forma una gota suspendida en la punta de la aguja que lleva a un goteo de la disolución, al igual que ocurriría con las distancias bajas. Del mismo modo, es necesario superar un determinado umbral de voltaje para que las fibras puedan salir eyectadas del cono de Taylor hacia el colector (Pham et al., 2006).

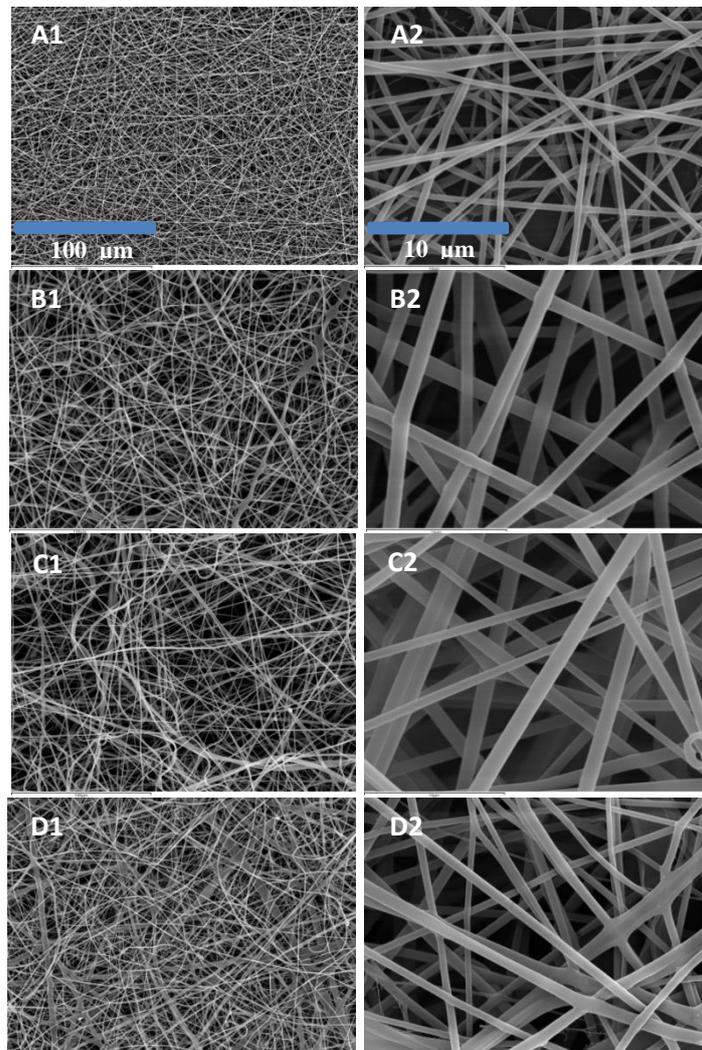


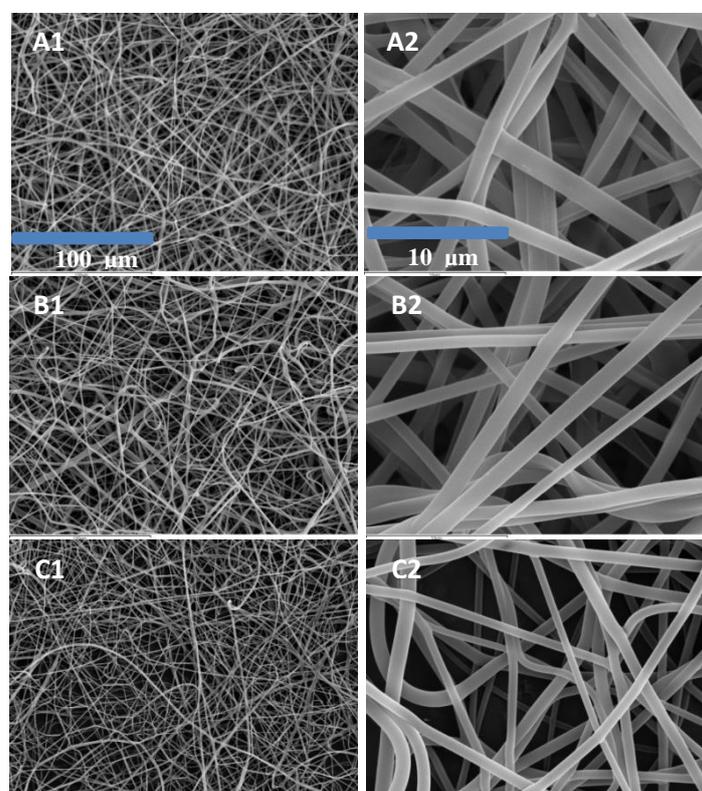
Figura 4.2: Imágenes de SEM de membranas realizadas con una distancia de 20 cm y una velocidad de flujo de 4 mL/h. 1= 500 aumentos; 2= 5000 aumentos; A= 10 kV; B= 15 kV; C= 20 kV; D= 25 kV. Las imágenes tomadas a 500 aumentos tienen una escala de 100  $\mu\text{m}$  y las de 5000 aumentos de 10  $\mu\text{m}$ .

Tabla 4.3: Media y desviación estándar de la medida del diámetro de las fibras a diferentes voltajes.

Voltaje (kV)	Media ( $\mu\text{m}$ )	Desviación estándar
10	0,47	0,14
15	0,97	0,24
20	0,90	0,19
25	0,66	0,21

Por último se muestran en la Figura 4.3 las imágenes de microscopía electrónica de las membranas electrohiladas obtenidas al variar la velocidad de flujo en la bomba. Al igual que en los otros casos las fibras son aleatorias, continuas y homogéneas, sin presencia de cuentas, engrosamientos o defectos. En la Tabla 4.4 se muestran los valores de la media y la desviación estándar obtenidos tras la medida el diámetro de las fibras de cada muestra. Tanto en las imágenes como en la tabla se observa que a medida que aumenta la velocidad de flujo, el diámetro medio de las fibras disminuye de modo que para las condiciones con las que se trabaja, se concluye que la velocidad de flujo influye de manera directa en el diámetro de las fibras, de modo que variando dicho parámetro es posible obtener fibras de mayor o menor diámetro, según se necesite.

La velocidad de flujo influye en el diámetro de las fibras de tal modo que, a menores velocidades de flujo, menor es el diámetro de las fibras, mientras que si la velocidad de flujo es demasiado elevada, se forman fibras más gruesas, con más cuentas y defectos, ya que el disolvente no puede evaporarse antes de llegar al colector (Li y Wang, 2013; Pham et al., 2006; Sill and von Recum, 2008; Zhang et al., 2005; Zuo et al., 2005). Para obtener un cono de Taylor estable debe mantenerse un valor mínimo de velocidad de flujo, que a su vez, debe ser lo suficientemente bajo para permitir la evaporación del disolvente (Duque et al., 2013).



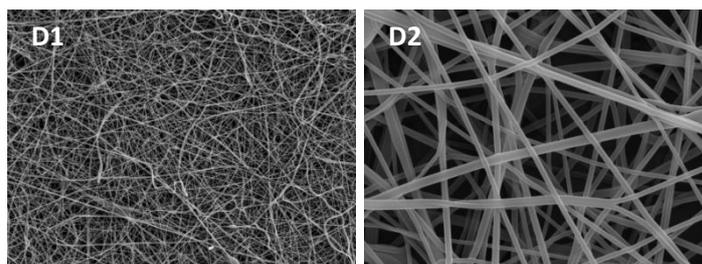


Figura 4.3: Imágenes de SEM de membranas realizadas con una distancia de 20 cm y un voltaje de 20 kV. 1= 500 aumentos; 2= 5000 aumentos; A= 1 mL/h; B= 4 mL/h; C= 7 mL/h; D= 10 mL/h. Las imágenes tomadas a 500 aumentos tienen una escala de 100  $\mu\text{m}$  y las de 5000 aumentos de 10  $\mu\text{m}$ .

Tabla 4.4: Media y desviación estándar de la medida del diámetro de las fibras a diferentes velocidades de flujo.

Velocidad de flujo (mL/h)	Media ( $\mu\text{m}$ )	Desviación estándar
1	1,07	0,23
4	1,05	0,21
7	0,77	0,26
10	0,42	0,12

En la Tabla 4.5 se muestran los resultados obtenidos tras realizar el análisis estadístico para determinar la significancia de los resultados del diámetro medio de las fibras para los diferentes parámetros del proceso de electrohilado: distancia, voltaje y velocidad de flujo. Los valores del P-valor demuestran la significancia estadística de cada uno de los factores debido a que los 3 valores son menores de 0,05. Por lo tanto, es posible concluir con un 95% de nivel de confianza que el diámetro, el voltaje y la velocidad de flujo tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el diámetro de las fibras.

Tabla 4.5: Análisis de varianza para el diámetro– Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Distancia (cm)	3,24341	3	1,08114	18,40	0,0000
B: Velocidad de alimentación (mL/h)	24,6662	3	8,22207	139,93	0,0000
C: Voltaje (kV)	18,1067	3	6,03558	102,72	0,0000
RESIDUOS	69,9247	1190	0,0587602		
TOTAL (CORREGIDO)	116,435	1199			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La tendencia encontrada en la bibliografía para el efecto de la variación de estos tres parámetros es diferente a los resultados obtenidos. El hecho de que los resultados obtenidos en este trabajo difieran de la tendencia general es debido a que son multitud de parámetros los que influyen en el proceso de electrohilado, algunos de los cuales en este trabajo no se han podido controlar. Además, se han establecido unas condiciones óptimas de referencia que funcionan adecuadamente con las disoluciones con las que se trabaja, de modo que existe la posibilidad de que al variar esos parámetros óptimos fijados, los resultados sean diferentes a los obtenidos y se ajusten más a la tendencia general encontrada en la bibliografía.

### 4.3. Efecto del contenido de nanoarcilla sobre la morfología y el diámetro de las fibras

En la Figura 4.4 se muestran las imágenes de microscopía electrónica de las membranas electrohiladas en las que se varió el contenido en nanoarcilla. En la Tabla 4.6 se muestran los resultados de la media y la desviación estándar obtenidos tras medir el diámetro de las fibras de dichas muestras. En las imágenes se observan fibras aleatorias y continuas. Sin embargo, se aprecia que a medida que aumenta el contenido en nanoarcilla aumenta la presencia de cuentas en las fibras. Estos engrosamientos se deben a las partículas de nanoarcilla que quedan en el interior de las fibras, las cuales forman pequeños agregados que provocan engrosamientos en las mismas, disminuyendo la homogeneidad de la muestra a medida que aumenta el contenido en nanoarcilla al igual que ocurre en los trabajos bibliográficos consultados en los que emplean nanoarcilla junto con PVA (Islam et al., 2012; Islam et al., 2015; Ji et al., 2009; Koosha et al., 2015). Los resultados de la Tabla 4.6 muestran una ligera disminución en el diámetro medio de las fibras desde el 0 al 10% de nanoarcilla, mientras que en el caso del 40% de nanoarcilla, el diámetro medio de las fibras vuelve a aumentar debido a la gran cantidad de engrosamientos que se forman en las fibras por el elevado contenido de nanoarcilla de la muestra.

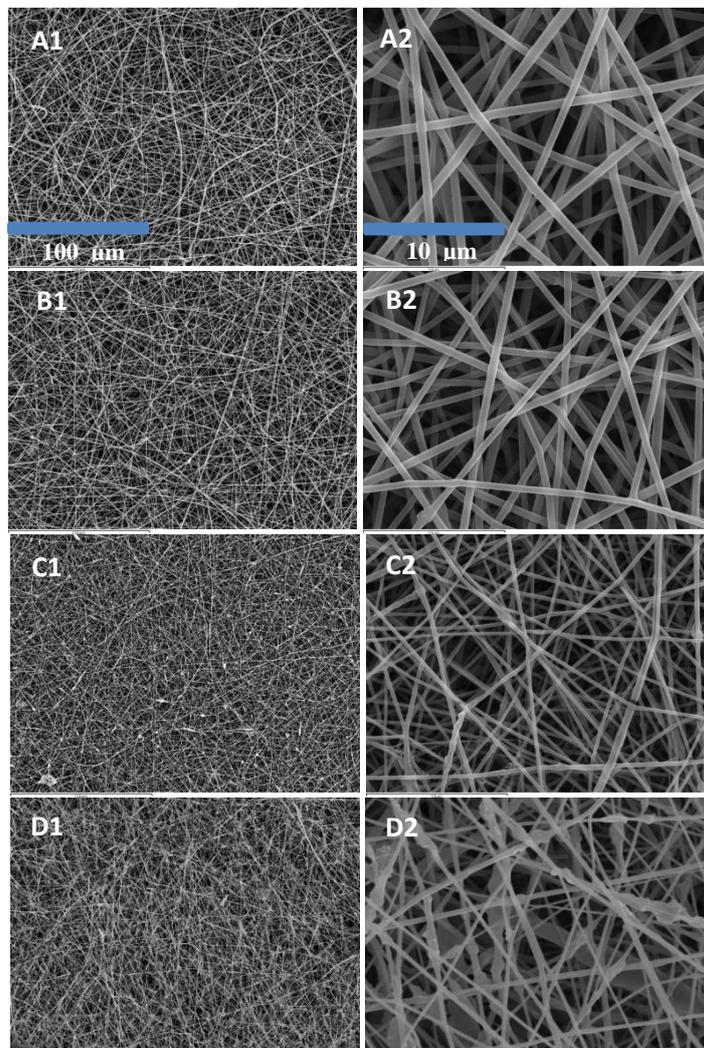


Figura 4.4: Imágenes de SEM de membranas realizadas con una distancia de 20 cm, un voltaje de 20 kV y una velocidad de flujo de 4 mL/h. 1= 500 aumentos; 2= 5000 aumentos; A= 0% nanoarcilla; B= 2%

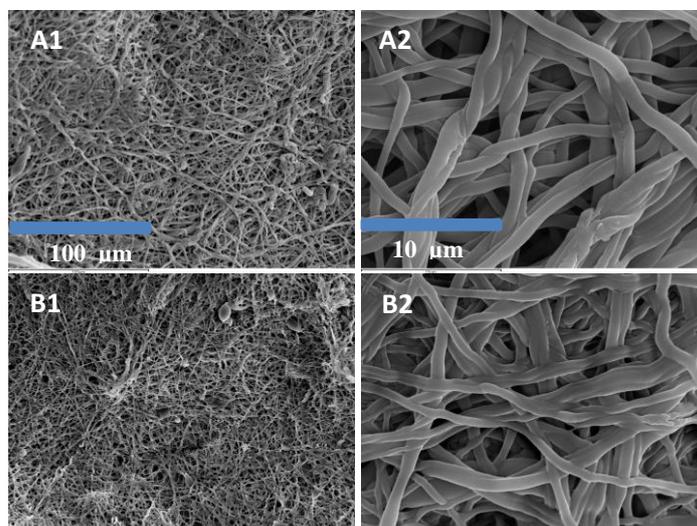
nanoarcilla; C= 10% nanoarcilla; D= 40% nanoarcilla. Las imágenes tomadas a 500 aumentos tienen una escala de 100  $\mu\text{m}$  y las de 5000 aumentos de 10  $\mu\text{m}$

Tabla 4.6: Media y desviación estándar de la medida del diámetro de las fibras con diferentes contenidos de nanoarcilla.

Contenido en nanoarcilla (%)	Media ( $\mu\text{m}$ )	Desviación estándar
0	0,61	0,09
2	0,52	0,08
10	0,25	0,06
40	0,32	0,08

#### 4.4. Efecto del entrecruzamiento sobre las fibras

En la Figura 4.5 se muestran las imágenes de SEM de las membranas electrohiladas con nanoarcilla obtenidas tras realizar el entrecruzamiento y secar las muestras al aire y a vacío. Comparando con las imágenes de SEM antes de entrecruzar (Figura 4.4), se observa un claro cambio de morfología en las fibras, las cuales aparecen más entrelazadas unas con otras a consecuencia de la reacción de entrecruzamiento, además de que las fibras han aumentado su grosor. En todas las imágenes se observan claramente las fibras salvo en el caso de la muestra con el 40% de nanoarcilla, en la que se observa que las fibras se encuentran en el interior de unos grumos, posiblemente debidos a grandes agregados de nanoarcilla o a que el entrecruzamiento no se haya realizado de manera completa al tener un contenido en nanoarcilla tan elevado, de modo que al ponerlo en agua, las regiones de polímero que no han entrecruzado del todo se han disuelto, dispersando las fibras y formando esos grandes aglomerados. En la Tabla 4.7 se muestran los valores de la media y la desviación estándar obtenidos tras la medida del diámetro de las fibras de las muestras entrecruzadas con 0, 2 y 10% de nanoarcilla, ya que la muestra del 40% de nanoarcilla no ha podido medirse a causa de los grumos que aparecen en la muestra. Comparando con los resultados de la Tabla 4.6, se observa claramente un aumento del diámetro de las fibras con el entrecruzamiento. Esto puede ser debido, por un lado, a restos de agua absorbida por las muestras que puedan quedar en el interior de las fibras, a pesar de haber secado al aire y a vacío las muestras, y por otro lado, a que las fibras al entrecruzar, se unen unas con otras, aumentando así su diámetro.



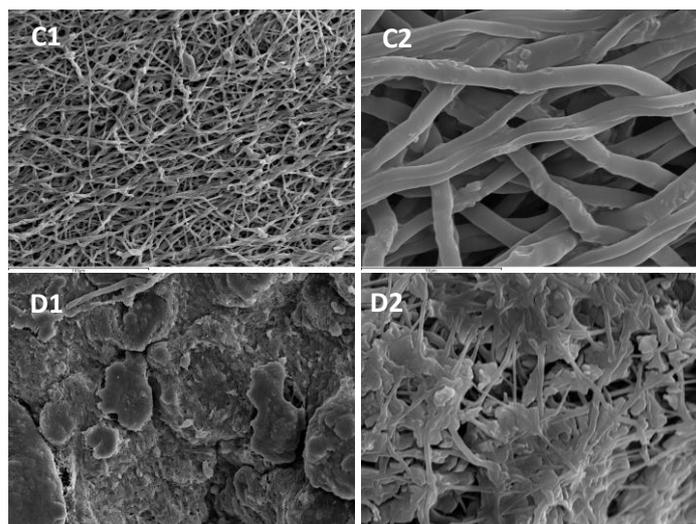


Figura 4.5: Imágenes de SEM de membranas entrecruzadas realizadas con una distancia de 20 cm, un voltaje de 20 kV y una velocidad de flujo de 4 mL/h. 1= 500 aumentos; 2= 5000 aumentos; A= 0% nanoarcilla; B= 2% nanoarcilla; C= 10% nanoarcilla; D= 40% nanoarcilla. Las imágenes tomadas a 500 aumentos tienen una escala de 100  $\mu\text{m}$  y las de 5000 aumentos de 10  $\mu\text{m}$ .

Tabla 4.7: Media y desviación estándar de la medida del diámetro de las fibras con diferentes contenidos de nanoarcilla tras realizar el entrecruzamiento.

Contenido en nanoarcilla (%)	Media ( $\mu\text{m}$ )	Desviación estándar
0	0,93	0,19
2	0,65	0,17
10	1,24	0,25

#### 4.5. Evaluación de la densidad y la tensión superficial de las disoluciones

En la Tabla 4.8 se muestran las densidades obtenidas de cada una de las disoluciones en función del contenido en nanoarcilla. Tal y como se observa, a medida que aumenta el contenido de nanoarcilla de la disolución, mayor es la densidad de la misma.

Tabla 4.8: Densidad de las disoluciones en función del contenido de nanoarcilla.

Disolución (% nanoarcilla)	Densidad ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )
0	1076
2	1082
10	1089
40	1097

A continuación se muestran los resultados de la tensión superficial de las disoluciones obtenidos por los dos métodos empleados. Aplicando el método de Lee et al. (2009), se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 4.6, en la que se representa el promedio de la masa de 1 gota con respecto al radio externo de las agujas, además de mostrarse la ecuación cuadrática obtenida para cada una de las disoluciones. En la Tabla 4.9 se muestran, para cada disolución en función del porcentaje de nanoarcilla, el valor del coeficiente  $C_2$  y la tensión superficial de cada disolución.

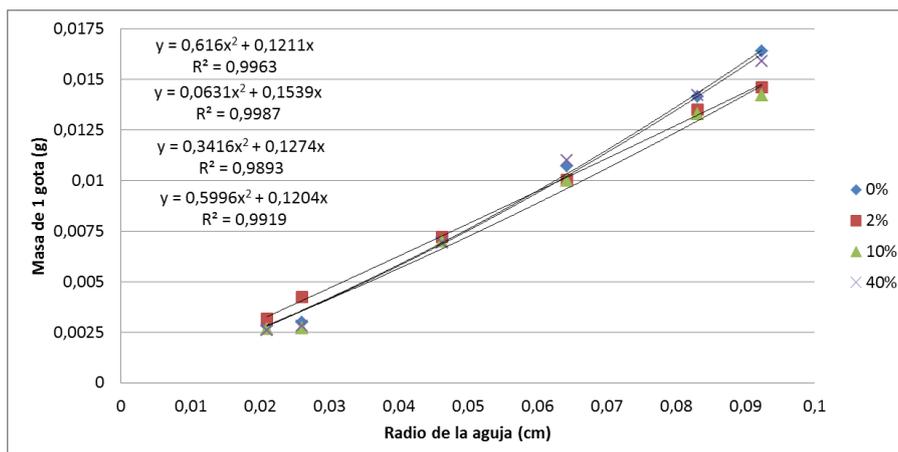


Figura 4.6: Representación de la masa de 1 gota de disolución de los diferentes contenidos de nanoarcilla en función del radio externo de las agujas.

Tabla 4.9: Coeficiente  $C_2$  y tensión superficial de las disoluciones en función del contenido de nanoarcilla.

Disolución (% nanoarcilla)	Coeficiente $C_2$	Tensión superficial (mN/m)
0	0,1211	20,7
2	0,1539	26,3
10	0,1274	21,8
40	0,1204	20,6

Tal y como se observa en estos resultados no se aprecia una tendencia en el valor de la tensión superficial con respecto al porcentaje de nanoarcilla, manteniéndose en un rango de entre 20 y 27 mN/m. Esto puede ser debido a que la variación en el contenido de nanoarcilla de las disoluciones no influya en el valor de la tensión superficial de las gotas formadas, y esta variación se encuentre dentro del margen de error de este método.

Para confirmar esto, se realizó el segundo método empleado por Riba y Esteban (2014). Los resultados obtenidos con este método se muestran en la Tabla 4.10, en la que se representa, para cada porcentaje de nanoarcilla en la disolución, el valor de la tensión superficial obtenido.

Tabla 4.10: Tensión superficial de las disoluciones en función del contenido de nanoarcilla.

Disolución (% nanoarcilla)	Tensión superficial (mN/m)
0	31,7
2	32,4
10	29,6
40	31,1

De nuevo, los resultados obtenidos no muestran ninguna tendencia en la tensión superficial con respecto al contenido de nanoarcilla, por lo que se puede confirmar que, efectivamente, dentro de los márgenes de precisión de estos métodos, este parámetro de la disolución no está influenciado por el contenido de nanoarcilla de la disolución.

Tras la búsqueda bibliográfica, se observó que el efecto de la tensión superficial sobre las fibras formadas consiste en que este parámetro intenta reducir el área por unidad de masa, de modo que si se reduce la tensión superficial, las fibras en las que se forman cuentas se

convierten en fibras finas, al mismo tiempo que si se aplica un voltaje elevado que se oponga a la tensión superficial, se favorece la formación de fibras finas por el aumento de superficie (Doshi y Reneker, 1995; Duque et al., 2013).

#### 4.6. Capacidad de absorción de agua de los films y membranas electrohiladas

En las Figuras 4.7, 4.8, 4.9 y 4.10 se representa el ratio de hinchado de los films y membranas electrohiladas control y prueba en función del tiempo de hinchado, respectivamente. El ratio de hinchado es una medida de la capacidad de absorción de agua de las muestras, y representa la cantidad de agua que absorbe la muestra sobre la cantidad de polímero seco. Este ratio se obtiene aplicando la Ecuación 6:

$$\text{Ecuación 6: } \text{Ratio de hinchado (g/g)} = \frac{m_s - m_h}{m_s}$$

En la Ecuación 6,  $m_s$  es la masa de la muestra seca antes de realizar el hinchado, la cual no contiene agua al estar seca, y  $m_h$  es la masa de la muestra hinchada, que se sustituye por la masa de la muestra pesada a los diferentes tiempos de hinchado, la cual contiene agua en su interior. El valor que se obtiene al aplicar la Ecuación 6 permite conocer los gramos de agua que absorbe la muestra por cada gramo de polímero seco.

En las Figuras 4.7 y 4.8 se representa el ratio de hinchado en función del tiempo de las muestras correspondientes a los films control y prueba, respectivamente. En ambos casos, se observa que la muestra que más agua absorbe por gramo de polímero es la muestra del 2% de nanoarcilla, seguida de la muestra del 10% de nanoarcilla y finalmente, la que menos agua absorbe es la muestra del 40% de nanoarcilla. Concretamente en el caso del control, se observa que la muestra del 2% absorbe aproximadamente 1 g de agua por cada gramo de polímero, seguido de la muestra del 10% de nanoarcilla, que absorbe algo menos de 1 g de agua por cada gramo de polímero y por último, la muestra del 40%, que absorbe casi 0,6 g de agua por cada gramo de polímero. Por otro lado, en el caso de los film prueba, de nuevo el del 2% de nanoarcilla es el que más cantidad de agua absorbe, superando el gramo de agua por gramo de polímero, seguido del 10% con una absorción de 0,9 g de agua por gramo de polímero aproximadamente y finalmente, el 40% de nanoarcilla, al igual que en el caso control con casi 0,6 g de agua absorbidos por gramo de polímero. En resumen, se puede concluir que a mayor contenido de nanoarcilla de la muestra en el caso de los films, menor capacidad de absorción de agua.

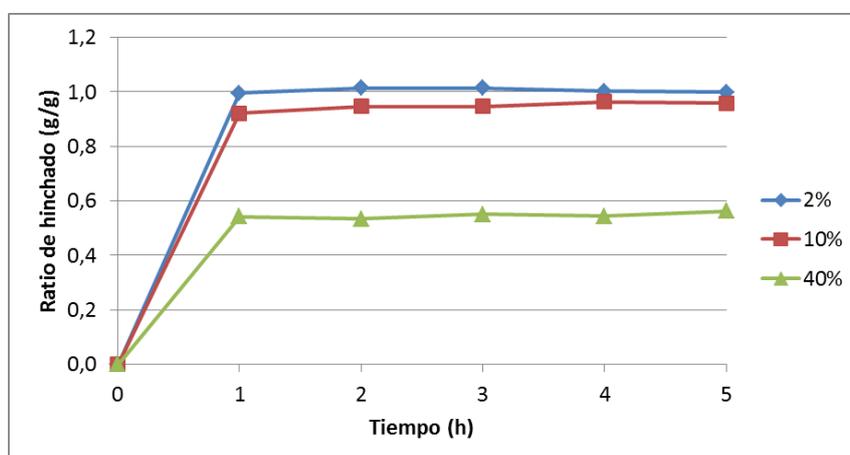


Figura 4.7: Representación del ratio de hinchado de los films control en función del tiempo.

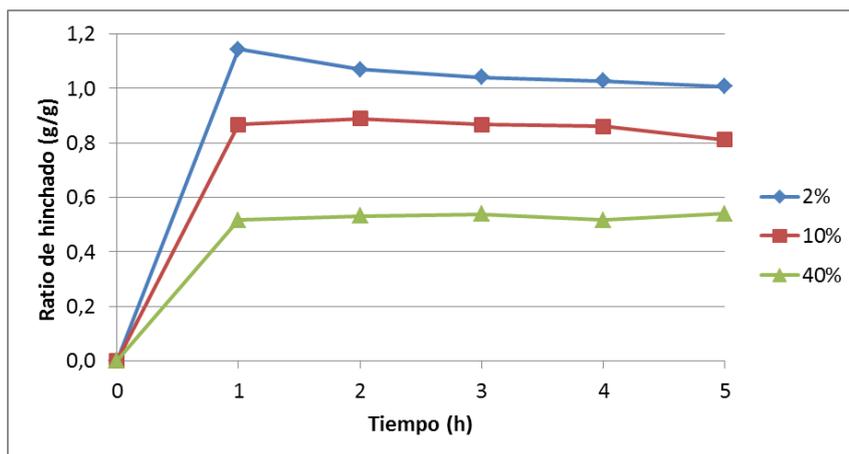


Figura 4.8: Representación del ratio de hinchado de los films prueba en función del tiempo.

Por otro lado, en las Figuras 4.9 y 4.10 se representa el ratio de hinchado en función del tiempo de las muestras de membranas electrohiladas, de nuevo tanto control como prueba, respectivamente. En contraposición al caso de los films, no se observa una gran diferencia entre las muestras con distintos contenidos de nanoarcilla en cuanto a su ratio de hinchado. En ambos casos, la capacidad de absorción de agua se encuentra en torno a los 2,5 g de agua absorbidos por cada gramo de polímero.

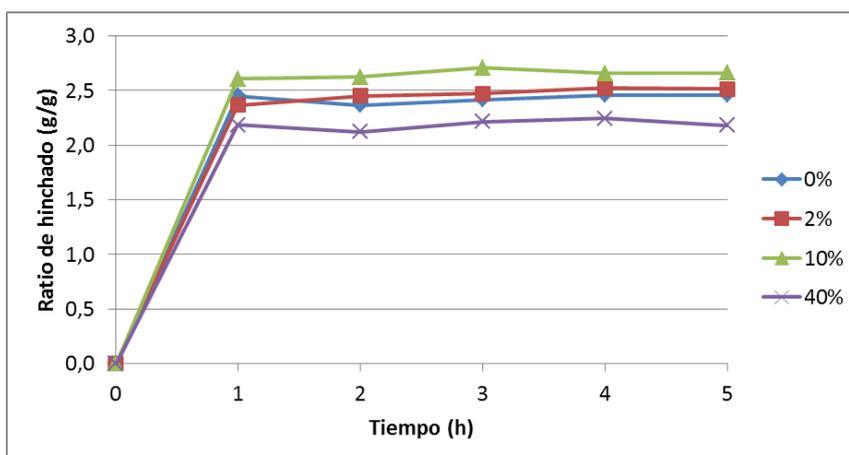


Figura 4.9: Representación del ratio de hinchado de las membranas control en función del tiempo.

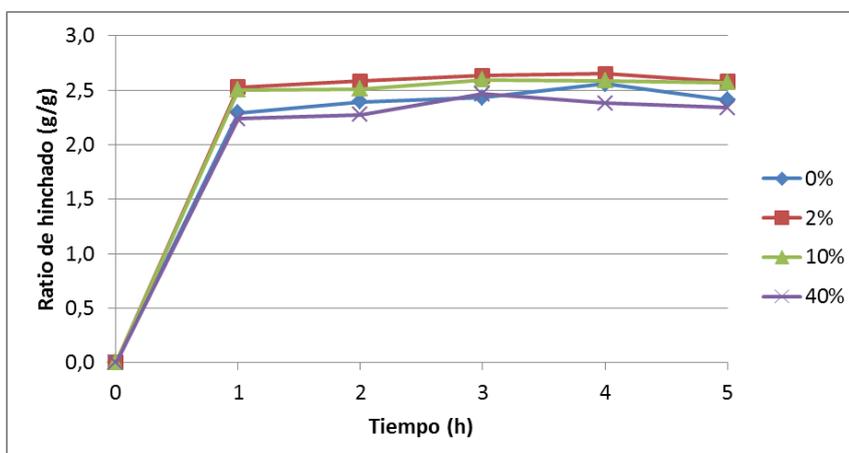


Figura 4.10: Representación del ratio de hinchado de las membranas prueba en función del tiempo.

#### 4.7. Determinación de la cantidad de proteína liberada

En este apartado se muestran los resultados obtenidos tras la absorción de BSA y su liberación en PBS a distintos tiempos, tanto para los films como por las membranas electrohiladas. Para realizar la cuantificación de la BSA una vez absorbida, se va a emplear únicamente una de las tres réplicas con las que se ha trabajado, ya que tan solo es necesaria medir una de las réplicas biológicas para determinar la cantidad de proteína liberada. Se parte de la hipótesis de que todas las muestras han absorbido de BSA un 20% del peso total absorbido en el último tiempo de absorción (24 h), mostrándose la cantidad de proteína absorbida para cada una de las muestras en la Tabla 4.11, ya que cada una tiene un peso inicial diferente. Los resultados de la cuantificación de proteína liberada se muestran en las Figuras 4.11 y 4.12, en las que se representa el porcentaje de proteína liberada en función del tiempo de liberación, el cual, ha sido de 5 h.

En el caso de los films, en la Figura 4.11 se observa que las 3 muestras con los distintos contenidos en nanoarcilla han liberado en torno a un 20-25% de su contenido total en proteína, observándose que a las 5 h de liberación, este porcentaje parece estabilizado. En la Tabla 4.11 se muestra el porcentaje real de proteína total que se ha liberado a las 5 h, siendo la muestra del 10% de nanoarcilla la que más proteína ha liberado de su interior en ese tiempo, seguido del 40% y 2% de nanoarcilla, respectivamente. Estos resultados tan similares pueden deberse al hecho de que los films presentan una microestructura mucho más uniforme que las membranas electrohiladas debido a su proceso de formación, lo que puede provocar que para un mismo tiempo, a pesar de tener un contenido en nanoarcilla diferente, liberen aproximadamente el mismo porcentaje de su total.

Por otro lado, en los resultados de la cuantificación de proteína liberada por las membranas electrohiladas se observa una mayor diferencia entre las muestras. En este caso sí que se observa en la Figura 4.12 que el contenido de nanoarcilla influye en el porcentaje de liberación de proteínas. Para el tiempo de liberación estudiado, las muestras con 0 y 10% de nanoarcilla liberan aproximadamente un 30% de su contenido total, seguidas de la muestra del 40% de nanoarcilla que libera casi un 40% de su contenido total, destacando la cantidad liberada por la muestra del 2% de nanoarcilla, que corresponde con más de un 50% de su contenido total en proteína. Sin embargo, al contrario que ocurría con los films, al cabo de 5 h de liberación no se observa una estabilización en la cantidad de proteína liberada, de modo que sería necesario continuar realizando medidas de estas muestras para evaluar la liberación de BSA en un rango de tiempo más extenso. En la Tabla 4.11 se muestran los porcentajes exactos de proteína liberada por cada una de las muestras. El hecho de que la muestra del 2% de nanoarcilla libere un porcentaje mayor de proteína con respecto a las otras muestras puede deberse a que la microestructura de dicha membrana sea menos tupida, de modo que la proteína encuentra con mayor facilidad una salida al exterior que en el caso de las otras muestras, en las que es posible que una estructura más tupida sea la responsable de que el porcentaje de proteína liberado se mantenga en un rango más ajustado, entre un 30-40%.

Con todo esto, es posible concluir que en el caso de los films, el contenido de nanoarcilla no influye en la cinética de liberación tras 5 h, manteniéndose estable la liberación a dicho tiempo, mientras que en el caso de las membranas electrohiladas sería necesario realizar medidas en tiempos de liberación mayores que permitan determinar con una mayor exactitud la influencia del contenido de nanoarcilla en la cinética de liberación de la BSA.

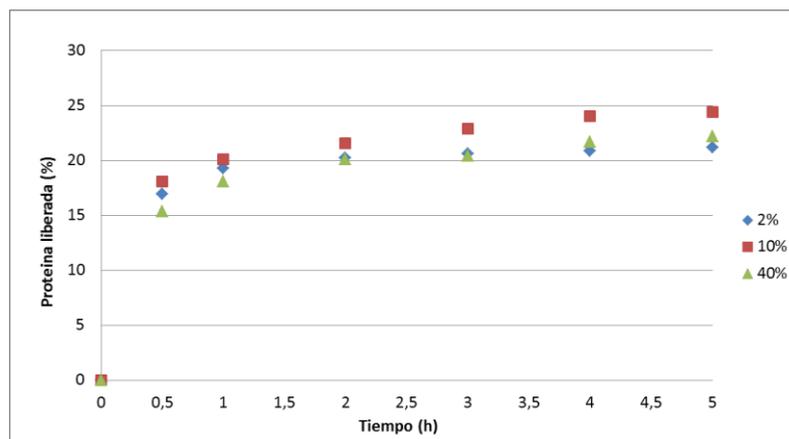


Figura 4.11: Representación del porcentaje total de proteína liberada en función del tiempo por los films.

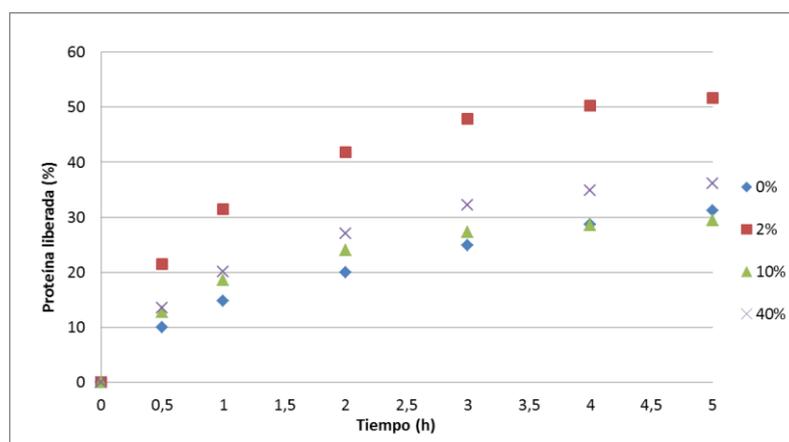


Figura 4.12: Representación del porcentaje total de proteína liberada en función del tiempo por las membranas electrohiladas.

Tabla 4.11: Cantidad teórica de BSA absorbida y porcentaje de BSA liberado por cada muestra.

	Muestra (% nanoarcilla)	Cantidad teórica de BSA absorbida (mg)	Cantidad de BSA liberada (%)
<b>Films</b>	2	2,45	21,16
	10	1,84	24,39
	40	2,66	22,16
<b>Membranas electrohiladas</b>	0	5,40	31,26
	2	2,62	51,72
	10	4,39	29,47
	40	4,10	36,17

#### 4.8. Determinación del contenido de nanoarcilla real de las membranas electrohiladas

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras realizar el análisis termogravimétrico de las muestras, tanto films como membranas electrohiladas de cada uno de los porcentajes de nanoarcilla. En las Figuras 4.13 y 4.14 se muestran los resultados originales obtenidos para los films y las membranas electrohiladas, respectivamente. En dichas figuras se representa la evolución de la masa de la muestra en función de la temperatura. En ambos casos se observa que, entre 100 y 200 °C se produce una primera caída en la masa de la muestra, que corresponde con la pérdida del disolvente que pudiera haber quedado en la muestra. Por ello,

y para normalizar los resultados debido a que cada muestra tiene un peso inicial diferente, se realizó la evaluación de los datos mediante su representación como la variación en el porcentaje de masa de la muestra en función de la temperatura. Dicha temperatura se representó en un rango entre 200 y 700 °C, debido a que a 200 °C ya se ha perdido todo el disolvente, y a 700 °C se observa que la muestra se ha estabilizado en términos de porcentaje en masa. Dicha representación se muestra en las Figuras 4.15 y 4.16 para los films y las membranas electrohiladas, respectivamente.

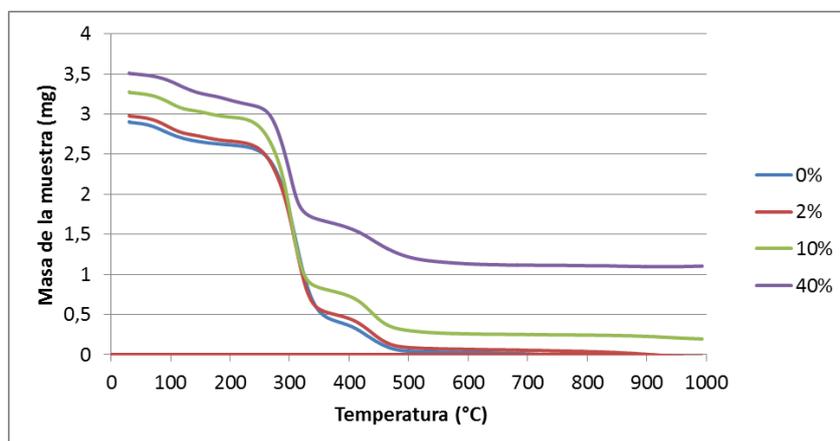


Figura 4.13: Representación de la masa de los films para los diferentes contenidos de nanoarcilla en función de la temperatura.

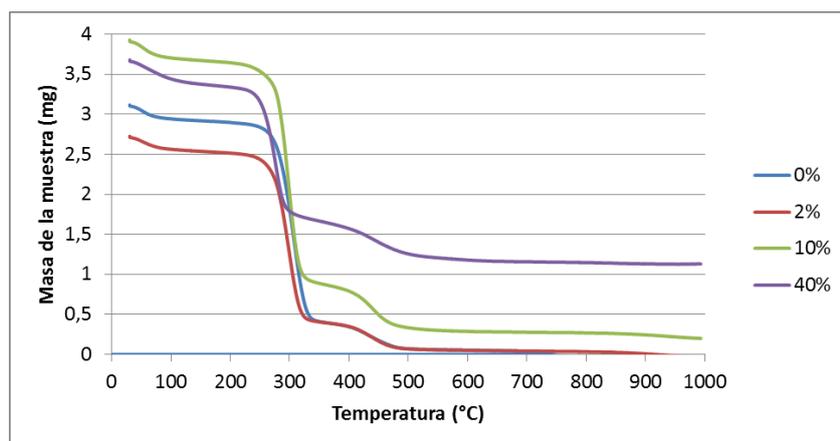


Figura 4.14: Representación de la masa de las membranas electrohiladas para los diferentes contenidos de nanoarcilla en función de la temperatura.

Tras analizar las Figuras 4.15 y 4.16 se distinguen diferentes tramos en el proceso de descomposición de la muestra, al igual que los resultados de trabajos consultados sobre análisis termogravimétricos de muestras de PVA (Barzegar et al., 2015; Islam et al., 2015; Ji et al., 2009).

Entre 200 y 350 °C aproximadamente, se observa un primer descenso en el porcentaje total de masa de las muestras, que se corresponde con la descomposición de las cadenas laterales de PVA. A continuación, se observa entre 350 y 500 °C el siguiente tramo de descomposición, que corresponde a la descomposición de la cadena principal de PVA. Finalmente, en el tramo de 500 a 700 °C se observa una estabilización en el porcentaje total de masa, lo que corresponde al residuo de muestra que queda, en este caso, al contenido en nanoarcilla de la misma. Por otro lado, en ambos casos se observa que la muestra en la que al final del proceso queda un mayor porcentaje de residuo corresponde con la de un contenido teórico de nanoarcilla del 40%, seguido de la muestra con un 10, 2 y 0% de nanoarcilla, respectivamente.

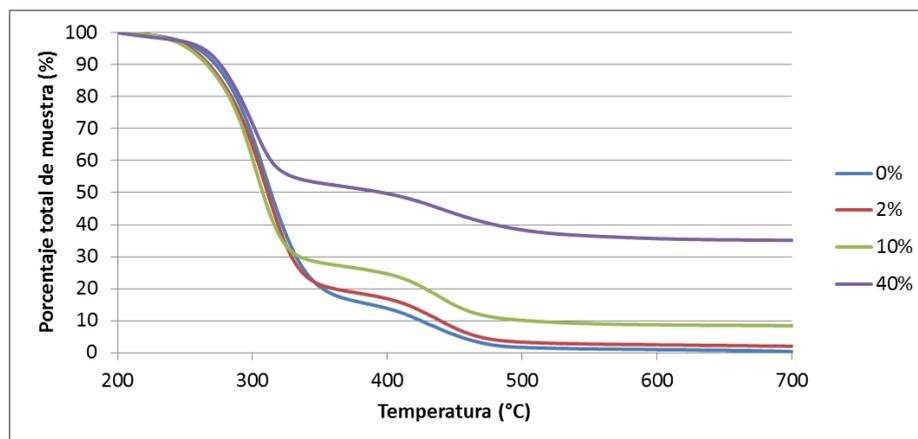


Figura 4.15: Representación del porcentaje total de muestra en los films para los diferentes contenidos de nanoarcilla en función de la temperatura.

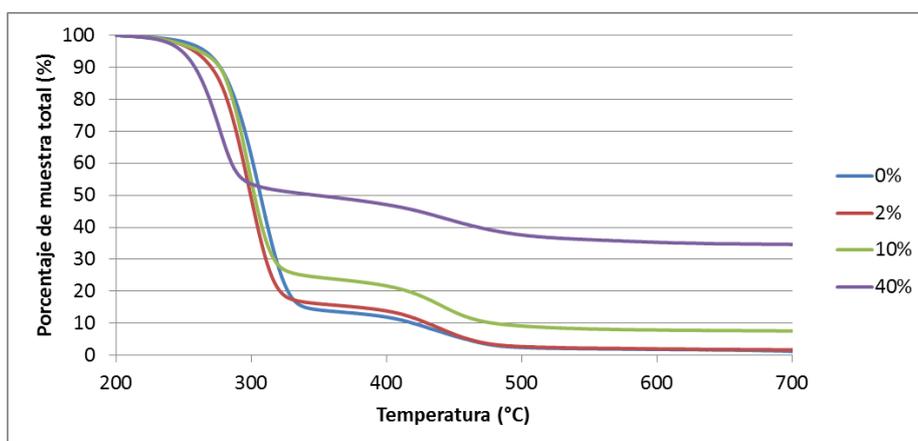


Figura 4.16: Representación del porcentaje total de muestra en las membranas electrohiladas para los diferentes contenidos de nanoarcilla en función de la temperatura.

En la Tabla 4.12 se muestran los resultados del porcentaje total de muestra que queda al final del proceso, que corresponde a la cantidad de nanoarcilla real de la muestra. Tal y como se observa, el contenido real tanto para los films como para las membranas electrohiladas es ligeramente inferior al contenido teórico supuesto. Estos resultados pueden deberse a que una pequeña cantidad de nanoarcilla pueda haber precipitado en la manipulación durante el proceso de formación de las muestras y no haya quedado integrada en la matriz polimérica. En concreto, en el caso de las membranas electrohiladas donde esta diferencia es más notable, puede deberse a que durante el electrohilado, parte de la nanoarcilla haya precipitado y quedado en el interior de la jeringuilla o la aguja durante la formación de las membranas electrohiladas.

Tabla 4.12: Contenido teórico y real de los films y las membranas electrohiladas.

Contenido teórico de nanoarcilla (%)	Contenido real de nanoarcilla en los films (%)	Contenido real de nanoarcilla en las membranas electrohiladas (%)
0	0	0
2	1,92	1,59
10	8,41	7,52
40	35,10	34,53

## 5. CONCLUSIÓN

El electrohilado es una técnica que permite la elaboración de membranas de nanofibras con multitud de aplicaciones, entre las que destaca la liberación controlada de proteínas, objetivo principal a evaluar en este Trabajo Fin de Grado.

Uno de los objetivos generales es determinar la influencia de algunos parámetros del electrohilado sobre la formación de fibras, concretamente de los parámetros del proceso: distancia, voltaje y velocidad de flujo. Tras evaluar su significación estadística, se ha determinado que los tres influyen significativamente con un nivel de confianza del 95%.

Se ha conseguido dispersar de forma efectiva hasta un 40% en peso de bentonita en una disolución del 8% p/p de PVA en agua destilada/ácido acético glacial (30/70 v/v). Mediante termogravimetría se ha comprobado que la nanoarcilla está presente en el film obtenido por evaporación del agua o en la membrana electrohilada, aunque una pequeña parte se pierde en el proceso.

Para evitar su disolución y poder generar un hidrogel para la liberación de fármacos se realizó un entrecruzamiento de las muestras mediante el empleo de una disolución de agente entrecruzante, el GA, que reacciona con los OH del PVA para unir químicamente sus cadenas.

Para comprobar que el entrecruzamiento se ha realizado y evaluar la capacidad de absorción de agua del hidrogel formado, las muestras se sumergieron en agua durante 5 h. La cantidad de agua absorbida por el hidrogel se determinó por pesado de las muestras, resultando ser para los films mayor cuanto menor era el contenido de nanoarcilla, entre 0,5 y 1 g de agua absorbido por gramo de polímero, y de 2,5 g de agua por gramo de polímero en los casos de las membranas electrohiladas.

Para evaluar si el contenido en nanoarcilla de los hidrogeles modula la cinética de liberación de proteínas, éstos se cargaron con la proteína sumergiéndolos en una disolución de BSA en PBS al 20%. Partiendo de la hipótesis de que el 20% de la cantidad absorbida por las muestras era BSA, se realizó la liberación en PBS durante 5 h y se tomaron muestras para determinar el porcentaje de BSA liberada del total. En el caso de los films, se determinó que el contenido en nanoarcilla no influía en la modulación de la cinética de liberación ya que para los distintos contenidos de esta, todas las muestras liberaron en torno a un 30% del total absorbido, manteniéndose estable dicho valor a las 5 h. Por otro lado, en las membranas electrohiladas sí que se observó una diferencia notable en el caso del 2% de nanoarcilla, el cual liberó un 50% del contenido total absorbido, posiblemente debido a que su microestructura de fibras fuera menos tupida que los otros contenidos de nanoarcilla, que liberaron un 30-40% del total absorbido.

Se determinó la densidad de las disoluciones, la cual aumentaba con el contenido en nanoarcilla, y la tensión superficial, ya que es un parámetro que influye en el electrohilado. Sin embargo, para las condiciones con las que se trabaja y la precisión del método utilizado se determinó que el contenido de nanoarcilla no influye en la tensión superficial de las disoluciones.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

ARAYANARAKUL, K.; CHOKTAWEEESAP, N.; AHT-ONG, D.; MEECHASUE, C. & SUPAPHOL, P. (2006). Effects of poly (ethylene glycol), inorganic salt, sodium dodecyl sulfate, and solvent system on electrospinning of poly (ethylene oxide). *Macromolecular Materials and Engineering*, 291(6), 581-591.

ATKINS, P. W. y JONES, L. (2006). *Principios de química: los caminos del descubrimiento*. Editorial Médica Panamericana. España.

BARZEGAR, F.; BELLO, A.; FABIANE, M.; KHAMLICH, S.; MOMODU, D.; TAGHIZADEH, F.; DANGBEGNON J. & MANYALA, N. (2015). Preparation and characterization of poly (vinyl alcohol)/graphene nanofibers synthesized by electrospinning. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 77, 139-145.

BHARDWAJ, N. & KUNDU, S. C. (2010). Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), 325-347.

BILLMEYER, F. W. (1975). *Ciencia de los polímeros*. Editorial Reverté. Barcelona.

BUCHKO, C. J.; CHEN, L. C.; SHEN, Y. & MARTIN, D. C. (1999). Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*, 40(26), 7397-7407.

BUTT, H. J.; GRAF, K. & KAPPL, M. (2003). *Physics and chemistry of interfaces*. Editorial Wiley-VCH. Weinheim.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED EN BIOINGENIERÍA, BIOMATERIALES Y NANOMEDICINA (CIBER-BBN), 2016. *Ingeniería de tejidos*. <<http://www.ciber-bbn.es/programas-transversales/programa-de-difusion-e-internacionalizacion/biomedicina-con-y-para-la-sociedad/miniserie-de-tv/ingenieria-de-tejidos>>. [Consulta: 5 de enero de 2016]

DESTAYE, A. G.; LIN, C. K. & LEE, C. K. (2013). Glutaraldehyde vapor cross-linked nanofibrous PVA mat with in situ formed silver nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(11), 4745-4752.

DI, J.; ZHAO, Y. & YU, J. (2011). Fabrication of molecular sieve fibers by electrospinning. *Journal of Materials Chemistry*, 21(24), 8511-8520.

DOSHI, J. & RENEKER, D. H. (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*, 35, 151-160.

DUQUE, L. M.; RODRIGUEZ, L. Y LÓPEZ, M. (2013). Electrospinning: la era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14(1), 10-27.

ESTEBAN, B.; RIBA, J. R.; BAQUERO, G.; PUIG, R. & RIUS, A. (2012). Characterization of the surface tension of vegetable oils to be used as fuel in diesel engines. *Fuel*, 102, 231-238.

GUO, Y.; DRUM, J.; QU, C. & CAKMAK, M. (2014). Mechanical reinforcement of hydrogels by nanofiber network undergoing biaxial deformation. *Polymer Composites*, 37, 709-717.

HUANG, Z. M.; ZHANG, Y. Z.; KOTAKI, M. & RAMAKRISHNA, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63(15), 2223-2253.

INSTITUTO NACIONAL DE BIOINGENIERÍA E IMÁGENES BIOMÉDICAS (NIBIB), 2013. *Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa*. <[https://www.nibib.nih.gov/sites/default/files/Ingenier%C3%ADa%20de%20Tejidos%20y%20Medicina%20Regenerativa\\_0.pdf](https://www.nibib.nih.gov/sites/default/files/Ingenier%C3%ADa%20de%20Tejidos%20y%20Medicina%20Regenerativa_0.pdf)>. [Consulta: 7 de enero de 2016]

ISLAM, M. S.; RAHAMAN, M. S. & YEUM, J. H. (2015). Electrospun novel super-absorbent based on polysaccharide–polyvinyl alcohol–montmorillonite clay nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 115, 69-77.

ISLAM, M. S.; YEUM, J. H. & DAS, A. K. (2012). Effect of pullulan/poly (vinyl alcohol) blend system on the montmorillonite structure with property characterization of electrospun pullulan/poly (vinyl alcohol)/montmorillonite nanofibers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 368(1), 273-281.

JI, H. M.; LEE, H. W.; KARIM, M. R.; CHEONG, I. W.; BAE, E. A.; KIM, T. H.; ISLAM, M. D.; JI, B. C. & YEUM, J. H. (2009). Electrospinning and characterization of medium-molecular-weight poly (vinyl alcohol)/high-molecular-weight poly (vinyl alcohol)/montmorillonite nanofibers. *Colloid and Polymer Science*, 287(7), 751-758.

KABOORANI, A.; RIEDL, B. & BLANCHET, P. (2013). Ultrasonication technique: a method for dispersing nanoclay in wood adhesives. *Journal of Nanomaterials*, 2013(3), 1-9.

KAHRAMAN, H. T.; GEVGILILI, H.; KALYON, D. M. & PEHLIVAN, E. (2013). Nanoclay dispersion into a thermosetting binder using sonication and intensive mixing methods. *Journal of Applied Polymer Science*, 129(4), 1773-1783.

KIM, K. J.; LEE, S. B. & HAN, N. W. (1993). Effects of the degree of crosslinking on properties of poly (vinyl alcohol) membranes. *Polymer Journal*, 25(12), 1295-1302.

KOOSHA, M.; MIRZADEH, H.; SHOKRGOZAR, M. A. & FAROKHI, M. (2015). Nanoclay-reinforced electrospun chitosan/PVA nanocomposite nanofibers for biomedical applications. *RSC Advances*, 5(14), 10479-10487.

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.

LEE, I. W.; LI, J.; CHEN, X. & PARK, H. J. (2016). Electrospun poly (vinyl alcohol) composite nanofibers with halloysite nanotubes for the sustained release of sodium d-pantothenate. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(4), 42900.

LI, Z. & WANG, C. (2013). *One-Dimensional Nanostructures: Electrospinning Technique and Unique Nanofibers*. Editorial Springer. New York.

MANSUR, H. S.; SADAHIRA, C. M.; SOUZA, A. N. & MANSUR, A. A. P. (2008). FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering: C*, 28(4), 539-548.

- NAJAFI-TAHER, R.; DERAKHSHAN, M. A.; FARIDI-MAJIDI, R. & AMANI, A. (2015). Preparation of an ascorbic acid/PVA–chitosan electrospun mat: a core/shell transdermal delivery system. *RSC Advances*, 5(62), 50462-50469.
- NGAWHIRUNPAT, T.; OPANASOPIT, P.; ROJANARATA, T.; AKKARAMONGKOLPORN, P.; RUKTANONCHAI, U. & SUPAPHOL, P. (2009). Development of meloxicam-loaded electrospun polyvinyl alcohol mats as a transdermal therapeutic agent. *Pharmaceutical Development and Technology*, 14(1), 73-82.
- NUGROHO, R. W. N.; ROY, P. K.; ODELIUS, K. & ALBERTSSON, A. C. (2013). Crosslinked PVAL nanofibers with enhanced long-term stability prepared by single-step electrospinning. *Polymers for Advanced Technologies*, 24(4), 421-429.
- PATHAN, S. G.; FITZGERALD, L. M.; ALI, S. M.; DAMRAUER, S. M.; BIDE, M. J.; NELSON, D. W.; FERRAN, C.; PHANEUF, T. M. & PHANEUF, M. D. (2015). Cytotoxicity associated with electrospun polyvinyl alcohol. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 103(8), 1652-1662.
- PHAM, Q. P.; SHARMA, U. & MIKOS, A. G. (2006). Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue engineering*, 12(5), 1197-1211.
- PHROMVIYO, N.; LERT-ITTHIPORN, A.; SWATSITANG, E. & CHOMPOOSOR, A. (2015). Biodegradable poly (vinyl alcohol)/polyoxalate electrospun nanofibers for hydrogen peroxide-triggered drug release. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 26(14), 975-987.
- RIBA, J. R. & ESTEBAN, B. (2014). A simple laboratory experiment to measure the surface tension of a liquid in contact with air. *European Journal of Physics*, 35(5), 1-11.
- ROJAS, M. G.; VALLEJO, B. M. Y PERILLA, J. E. (2008). Biopolymers as materials for product development in pharmaceutical applications and biomedical uses. *Ingeniería e Investigación*, 28(1), 57-71.
- ROSALES, C.; PERERA, R.; MATOS, M.; CONTRERAS, V.; PALACIOS, J.; NUÑEZ, K.; ICHAZO, M.; GONZÁLEZ, J.; ROJAS, H.; AREINAMO, M. G.; VILLARREAL, N. Y PASTOR, J. M. (2009). Nanoarcillas y su aplicación en polímeros. *Suplemento de la Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 2(1), 27-28.
- SILL, T. J. & VON RECUM, H. A. (2008). Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989-2006.
- TSAI, R. Y.; HUNG, S. C.; LAI, J. Y.; WANG, D. M. & HSIEH, H. J. (2014). Electrospun chitosan–gelatin–polyvinyl alcohol hybrid nanofibrous mats: Production and characterization. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(4), 1975-1981.
- WENDORDD, J. H.; AGARWAL S. & GREINER, A. (2012). *Electrospinnig. Materials, Processing and Applications*. Editorial Wiley-VCH. Weinheim.
- ZHANG, C.; YUAN, X.; WU, L.; HAN, Y. & SHENG, J. (2005). Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal*, 41(3), 423-432.
- ZHANG, X.; TANG, K. & ZHENG, X. (2016). Electrospinning and Crosslinking of COL/PVA Nanofiber-microsphere Containing Salicylic Acid for Drug Delivery. *Journal of Bionic Engineering*, 13(1), 143-149.