

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**GENERACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE MICRO Y
NANOFIBRAS CON MORFOLOGÍA CORE-SHELL A BASE DE
BIOPOLÍMEROS**

AILIÑ MAWEN QUINTANA QUINTANA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

PROFESOR GUÍA: DR. ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO

FONDECYT N° 1140660
FONDAP ACCDiS N° 15130011
SANTIAGO, CHILE
AÑO 2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**GENERACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE NANOFIBRAS CON
MORFOLOGÍA CORE-SHELL A BASE DE BIOPOLÍMEROS**

AILIÑ MAWEN QUINTANA QUINTANA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

Nota Final.....

Prof. Guía	ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO	Firma.....
Profesor Corrector	JOSÉ IGNACIO ARIAS	Firma.....
Profesor Corrector	M. SOLEDAD FERNÁNDEZ	Firma.....

PROFESOR GUÍA: DR. ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO

FONDECYT N° 1140660
FONDAP ACCDiS N° 15130011
SANTIAGO, CHILE
AÑO 2016

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Quisiera agradecer a toda la gente que me ha acompañado en el camino de convertirme en un medico veterinario. Gracias por al apoyo brindado por mi familia quienes son el pilar fundamental sobretodo mi hija y mi marido, mi profesor guía que ha sido un excelente apoyo y gran motivador, mis profesores correctores por la excelente disposición y trabajo y a dios por darme las herramientas y la fuerza para completar esta tarea.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

	Pág.
RESUMEN	5
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	14
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFÍA	24
ANEXO 1: PROTOCOLO DE USO DEL EQUIPO FLUIDNATEK® MODELO ESTRETCHING LE-10	27
ANEXO 2: ÍNDICE DE FIGURAS	29
ÍNDICE TABLAS	30
ÍNDICE DE GRAFICOS	30

RESUMEN

Las nanofibras son fibras poliméricas que poseen al menos una dimensión de 100 nm estas pueden ser creadas a través de la técnica de electrospinnig que consta de una bomba de flujo, fuente de poder y colector. Los usos son variados entre ellos; liberación de fármacos, recubrimientos de tejidos, transporte de medicamentos, etc. Por esto mismo el área biomédica es una de las áreas con mayor aplicación.

La formación de nanofibras esta basado en un elongamiento uniaxial y coaxial de la solución polimérica a través de la aplicación de un campo eléctrico. El electrospinnig coaxial o core-shell produce una fibra nanométrica que posee un núcleo que no necesariamente debe poseer propiedades dieléctricas. Esto permite encapsular materias de diferentes naturalezas, ampliando aún más el uso de estas fibras.

En este trabajo se plantea que el alginato que no posee características dieléctricas para generar fibras mediante el proceso de electrospinning si puede ser utilizado como core al hacer electrospinnig coaxial al usar el polímero poli ϵ -caprolactona (PCL), que es un material ampliamente utilizado en medicina.

Adicionalmente, se generó un protocolo de uso general y se logró formar con éxito fibras coaxiales de PCL – Alginato además de estudiar como afectan los diferentes parámetros propios de la técnica de electrospinning en los diámetros de las fibras formadas.

SUMMARY

Nanofibers are polymeric fibers that have a maximum diameter of 100 nm this are made through the electrospinning technique that consists in a syringe, power source and a collector. These fibers have many uses such as drug release, tissue dressing, drug carriage, etc. This is why they are more useful in the biomedical field area.

The development of nanofibers is based in a uniaxial or coaxial elongation of a polymeric solution when a electric field is applied. Coaxial electrospinning of a polymer forms a fiber which has a core and a shell. The core does not necessarily have to have dielectric proprieties to be electrospun, this allows the use of more kinds of material and expand even more its uses.

In the current work it was demonstrate that alginate, which has no dielectric properties to be electrospun, could be used as core when performing a core-shell electrospinning using polycaprolactone (PCL) as ha shell. PCL is a widely used polymer in medicine.

In addition, a general usage protocol that successfully formed core-shell nanofibers was developed using alginate– PCL and how the modulation of different parameters used in the electrospinning technique affected the diameter of the electrospun fibers.

INTRODUCCIÓN

El interés en las nanofibras preparadas mediante la técnica de electrospinning ha aumentado drásticamente a lo largo de los años debido fundamentalmente a los múltiples usos que ellas exhiben en diferentes áreas de estudio. Estas se basan en su relación área de superficie por unidad de volumen y peso. Las nanofibras exhiben propiedades especiales que han abierto un gran abanico de aplicaciones en diferentes disciplinas del conocimiento (Supaphol *et al.* 2011).

Las nanofibras pueden ser usadas como substratos en sistemas de filtración, pueden tener aplicaciones médicas como en la administración de fármacos, fabricación de tejidos sintéticos y coberturas de heridas y quemaduras, materiales protectores tanto de químicos como aislantes del sonido, textiles funcionales, en indumentaria de seguridad, cosméticos, placas y baterías solares, también en nanoelectrónica y en la industria alimenticia (Duque *et al.* 2012).

Una de las técnicas principales para producir nanofibras es el proceso de electrospinning, el cual es reconocido como un método versátil para la fabricación de fibras continuas ultrafinas utilizando fuerzas eléctricas (Frenot *et al.* 2003).

La técnica de electrospinning es un proceso delicado donde el campo eléctrico, la viscosidad de la solución polimérica, la distancia desde la máquina al receptor (plano o colector) de fibras, temperatura, humedad relativa y otros parámetros son claves en la formación, calidad y uso de las fibras electrohiladas (Duque *et al.* 2012).

Además de producir micro y nano-fibras sólidas únicas el proceso de electrospinning permite producir nanofibras con morfología coaxial, las cuales consisten en un núcleo (core) y una cubierta (shell) polimérica de diferentes materiales (Supaphol *et al.* 2011). Estas fibras coaxiales con morfología core-shell tienen diferentes e interesantes usos como encapsulación, catálisis, refuerzo de materiales, entre otros (Duque *et al.* 2012).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La ventaja importante del electrospinning es que permite la producción de fibras muy finas (nanómetros), a través de un proceso simple, las cuales poseen como característica principal que abarcan grandes superficies con poco volumen y por lo mismo tienen versatilidad de usos y propiedades mecánicas superiores.

Las nanofibras, definidas como fibras que poseen como máximo una dimensión de 100

nm, son utilizadas actualmente en muchas áreas tales como: liberación de fármacos, recubrimiento de tejidos, implantes, ingeniería de tejidos, biosensores, baterías de litio, vestimentas de seguridad, etc (Supaphol *et al.*, 2011).

Estas aplicaciones están basadas en sus características únicas como: área superficial muy grande respecto al volumen, flexibilidad, porosidad entre fibras y la posibilidad de generar fibras porosas.

El área biomédica es una de las áreas con mayores posibilidades de aplicación de estas nanofibras, las cuales ya sido utilizadas como filtros, material proyectivo, aplicaciones eléctricas y ópticas, sensores, formación de tejidos sintéticos y como vehículos de diferentes fármacos (Agarwal *et al.*, 2008).

La ingeniería de tejidos, es un área interdisciplinaria que involucra conocimiento de medicina, biología, ingeniería y ciencia de los materiales (Frenot *et al.* 2003). La ingeniería de tejidos usa andamios poliméricos para proveer soporte a las células de manera que éstas generen una nueva matriz extracelular (MEC), sin provocar respuesta inmunológica, la cual ha sido destruida por alguna enfermedad, lesión o efecto congénito.

La MEC natural, compuesta de proteínas y glicosaminoglicanos (GAGs) que son polímeros carbohidratados, forman parte de diferentes tejidos generando una malla de soporte alrededor de las células entregándoles anclaje (Agarwal *et al.*, 2008). La técnica de electrospinning genera matrices porosas 3D de polímeros que están libremente conectadas pudiendo imitar la estructura de la MEC, haciendo que esta técnica sea muy utilizable en la ingeniería de tejidos. La arquitectura de los andamios es otro factor muy importante ya que afecta las uniones celulares (Fig.1).

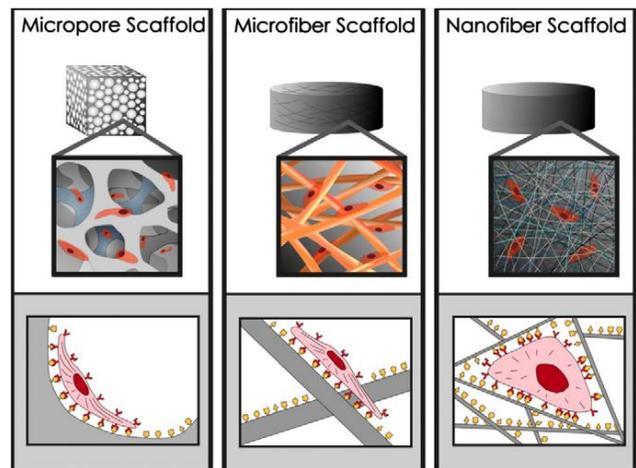


Fig. 1. Arquitectura de diferentes andamios poliméricos y como es afectada la unión y diseminación celular (Zhu and Chen, 2013).

Las células unidas a los andamios con arquitectura de microescala tienden a aplastarse y extenderse como si estuvieran siendo cultivadas en una superficie plana.

Los andamios con arquitectura de nanoescala poseen mayor superficie para absorber proteínas y presentan mayores lugares de unión a los receptores de membrana (Agarwal *et al.*, 2008). De esta manera las proteínas absorbidas pueden cambiar su conformación al ser expuestas a lugares de unión adicionales, lo cual genera una ventaja en la generación de tejidos sobre la arquitectura de microescala (Agarwal *et al.*, 2008).

La técnica de electrospinning tiene una conformación muy simple Fig. 2, la cual que consta de una jeringa (a) conectada a una bomba de flujo (b), una fuente de poder (c) que le suministra carga al sistema y un colector (plano o rotatorio) (d) donde se depositan las fibras.

La forma en que estos elementos se conjugan y funcionan es más compleja ya que interactúan varias fuerzas, como la fuerzas de coulomb y la repulsión electrostática de las cargas (Garg and Bowlin, 2011).

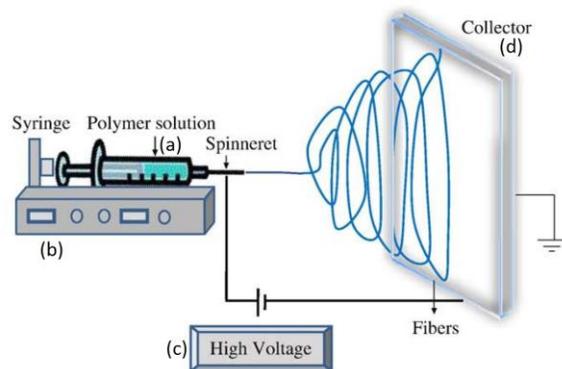


Fig. 2. Componentes de un equipo de electrospinning: jeringa con solución polimérica, bomba de flujo, fuente de poder y colector (Zhu and Chen, 2013).

Así, la bomba de flujo ejerce presión sobre la solución polimérica para ser eyectada, la fuente de poder le suministra carga eléctrica a esta solución rompiendo la tensión superficial del líquido y pudiendo así ser posteriormente elongado en forma de fibras que son depositadas en el colector el cual se ubica a una distancia determinada. En el proceso de formación de fibras el solvente se evapora mientras el jet de polímero formado fluye en la dirección del campo eléctrico hacia la placa colectora de fibras.

Para obtener fibras es preciso primero considerar la concentración límite de la solución polimérica para que esta tenga una viscosidad óptima que permita el electrohilado del polímero. Esto dado que para que se produzca la salida del chorro de solución (jet) primero deben interactuar las

fuerzas de repulsión de cargas y fuerzas de coulomb generadas por el suministro de energía entregado por la fuente de poder, para ordenar las cargas de la solución de manera que pasen de una forma esférica a un cono con un ángulo mayor a $49,3^\circ$ como se ilustra en la Fig.3. Cuando esto se logra se vence la tensión superficial del polímero y finalmente es eyectado el jet (Garg and Bowlin, 2011).

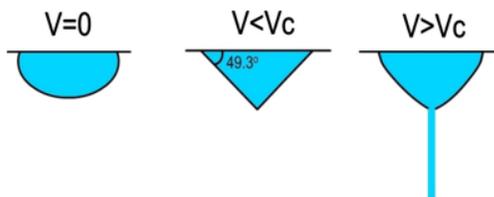


Fig. 3. Cambios en la gota de solución polimérica al aplicar voltaje (Garg y Bowlin, 2011).

La elongación del jet para la formación de fibras depende de varios factores. Deitzel *et al.*, una forma de ejemplificarlo es considerar el jet a un cilindro el cual hay que llenar. Al poseer una solución de alta viscosidad a la cual no le aplico la suficiente velocidad de flujo, el radio del jet disminuirá rápidamente (Garg and Bowlin, 2011). Por el contrario si tengo una solución con viscosidad baja y un alto flujo el radio del jet disminuirá lentamente. Esto se visualiza en la siguiente ecuación (fig. 4):

$$\frac{A}{V} = \frac{2}{R}$$

Fig. 4. Relación volumen radio del jet. **A**: superficie del área del volumen cilíndrico, **V**: volumen y **R**: radio del jet (Garg y Bowlin, 2011).

Según lo anterior es posible concluir que la aceleración es directamente proporcional al nivel de carga de la masa. Si aumenta el radio del jet la aceleración del fluido disminuirá (fig. 5).

$$a = E \left(\frac{q}{m} \right)$$

Fig. 5. Ecuación de aceleración.

a: aceleración, **E**: fuerza del campo eléctrico, **q**: carga aplicada y **m**: masa del elemento volumen (Garg and Bowlin, 2011).

Por otro lado, el jet eyectado es sujeto a variadas fuerzas con efectos opuestos, como resultado pueden ocurrir inestabilidades que se manifiestan en ramificaciones. Estas ramificaciones ocurren cuando hay soluciones muy concentradas y viscosas o cargas eléctricas muy altas debido a cambios en la forma y carga por área del jet dado por la elongación y la evaporación del solvente lo que provoca cambios en el balance entre

tensión superficial y las fuerzas eléctricas generando un jet inestable.

Esta inestabilidad a veces es buscada debido a que permite formar partículas del polímero, proceso denominado electrospray. La repulsión electrostática de las cargas tienden a aumentar y la tensión superficial tiende a reducir el área total de la superficie del jet, por lo que el jet se rompe en partículas, las cuales presentan un área superficial de forma esférica fenómeno conocido como inestabilidad de Rayleigh. (Garg y Bowlin, 2011).

Al llegar las fibras al colector la tasa solidificación depende de la distancia del colector a la punta de la jeringa, campo electrostático y la concentración del polímero (Garg y Bowlin, 2011).

Los parámetros más influyentes en la formación de fibras se muestran en la tabla 1:

Parámetro	Característica que aporta
Concentración de la solución de polímero	↑ Dificulta el paso de la solución a través del capilar
	↓ Partículas
Voltaje	↑↑ Fibras gruesas, distorsión del flujo y aparición de cuentas
	↓ Poco impulso para la llegada de la solución al colector
Velocidad de flujo	↑ Fibras mas gruesas, cuentas de mayores tamaños
	↓ Mayor tiempo de evaporación del solvente. Fibras sin defectos
Distancia (aguja al colector)	↑ Fibras pueden romperse debido a su propio peso. Mayor estiramiento de la solución. Fibras delgadas.
	↑ O ↓ Aparición de defectos (cuentas) en las fibras
	↓ Poco tiempo para la evaporación del solvente por lo tanto las fibras llegan húmedas al colector.

Tabla 1. Efecto de los distintos parámetros que afectan la formación de las fibras poliméricas usando electrospeinning (Duque *et al.*, 2013).

A continuación se describen los parámetros principales involucrados en la formación de fibras por la técnica de electrospeinning:

Concentración del polímero: Influye tanto la viscosidad (fluidez) como la tensión o fuerzas cohesivas entre las moléculas de la solución. La formación de fibras a través del electrospinning está basado en un elongamiento uniaxial del flujo eyectado. Así, a concentraciones muy bajas el flujo no posee suficiente fuerza para soportar las cargas eléctricas y por lo tanto se rompe en esferas pequeñas. Todo lo contrario cuando aumenta la concentración, la morfología de los productos obtenidos cambia a fibras con esferas. Al aumentar más la concentración se producen fibras homogéneas. Así, concentraciones excesivamente altas interrumpen el flujo de la solución, ya que la viscosidad aumenta demasiado, haciéndose difícil el paso de polímero a través del capilar. Con un rango óptimo de concentración según el polímero se pueden obtener fibras de diámetro uniformes, las cuales aumentan su diámetro al aumentar su concentración (Supaphol *et al.*, 2011).

Voltaje: El diámetro de la fibra puede ser controlado a través del voltaje aplicado, sin embargo los resultados cambian enormemente según el o los polímeros utilizados. La fuerza del campo eléctrico aplicado controla el diámetro de las fibras, desde micrómetros a nanómetros. Un voltaje inadecuado puede provocar defectos en las

fibras formadas o incluso en la formación del flujo. Hay varios estudios que muestran que hay un rango óptimo de voltaje para cada sistema polímero-solvente, uno de los requisitos que debe cumplir este último es poseer una concentración suficientemente alta que permita el alargamiento del polímero pero a su vez no tan alta para que prevenga el movimiento que provoca el campo eléctrico. Frenot y Chronakis, 2003 reportaron que el voltaje afecta la morfología de las fibras formadas a macroescala, las que pueden resultar en estructuras esféricas heterogéneas o 3D (Supaphol *et al.*, 2011).

Velocidad de flujo: Tiene un impacto en el tamaño de las fibras y puede modificar la porosidad y geometría de éstas. A velocidades de flujo altas se pueden observar varias formaciones de esferas, probablemente asociada a un “secado” inadecuado del flujo, antes de que éste llegue al colector. Además, un secado ineficiente puede generar la formación de fibras planas o tipo cintas (Supaphol *et al.*, 2011).

Distancia del capilar con el colector: este parámetro influye en el tamaño de la fibra, ya que, disminuye a medida que la distancia entre la punta del capilar y el colector aumenta. Además, hay cambios morfológicos cuando disminuye la distancia entre la punta del capilar y el sustrato,

apareciendo la formación de esferas o la aglutinación de las fibras adyacentes, lo que se explicaría por un secado inadecuado de la fibra del polímero (Supaphol *et al.*, 2011).

Electrospinning coaxial o core-shell

Es una modificación o ampliación de la técnica convencional que ha permitido electrohilar simultáneamente diferentes polímeros dentro de una estructura formada por un núcleo central (core) y una corteza o cubierta (shell) de micro o nanofibras lo que lo ha convertido en una de las mejores opciones para la obtención de fibras con elementos de diferente naturaleza. Esta variante del electrospinning utiliza los mismos principios que la técnica convencional pero se basa en una boquilla pequeña dentro de otra más grande que resulta en una estructura de nanofibras con morfología core-shell (Fig 6).

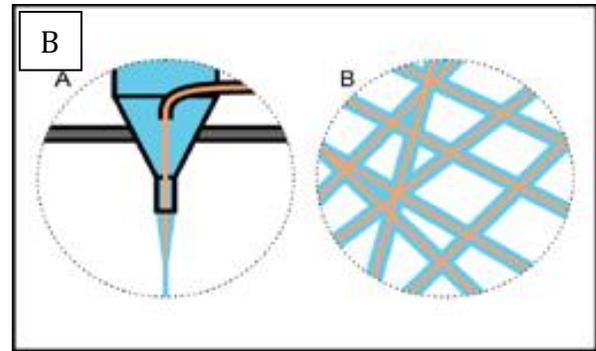
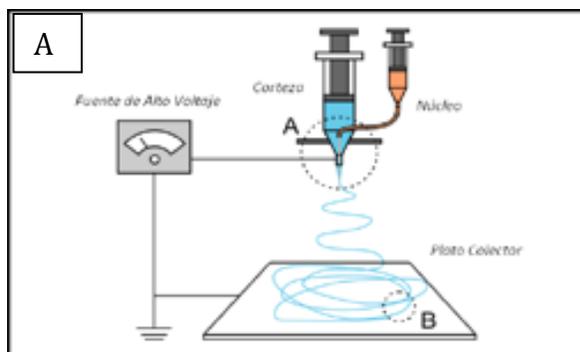


Fig. 6. Electrospinning coaxial. A) Sistema de boquillas del sistema coaxial, donde existe un núcleo (core) y una corteza (Shell). B) Vista aumentada de las fibras co-electrohiladas (Duque *et al.* 2013).

En este tipo de sistemas, diferentes drogas y proteínas pueden ser incorporadas en el núcleo protegidas por la cubierta que puede ser de un polímero más estable mecánicamente o en su efecto menos degradable. Las fibras con morfología core-shell añaden una capa adicional sobre la velocidad de liberación del fármaco, lo que permite un mayor control y la obtención de un perfil de liberación sostenido (Duque *et al.* 2013).

El electrospinning coaxial permite aun mayor versatilidad debido a que la solución que forma el núcleo no necesariamente debe tener las propiedades dieléctricas para someterse al proceso de electrohilado, la solución que actúa como corteza puede servir como vehículo de esa solución principal permitiendo encapsular fármacos

de diferente naturaleza y con diversas características. De igual forma es posible fabricar fibras huecas por medio de esta configuración (Duque *et al.* 2013).

HIPÓTESIS

Alginato podrá ser utilizados como core y policaprolactona como shell para la preparación de micro y/o nanofibras electrohiladas con morfología core-shell. Se espera que la variación de los parámetros como voltaje aplicado, velocidad de flujo y concentración de la solución polimérica modulen la morfología final de las fibras obtenidas.

OBJETIVO GENERAL

Generar un protocolo de uso para la obtención de micro y/o nanofibras con morfología core-shell a base de alginato (ALG) como core y policaprolactona (PCL) como shell mediante la técnica de electrospinning coaxial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar un protocolo para la obtención de fibras y fibras core-shell.
2. Obtener micro y/o nanofibras con morfología *core-shell* usando ALG y PCL mediante electrospinning.

3. Evaluar el efecto de voltaje aplicado, velocidad de flujo y la concentración en la obtención de las fibras con morfología core-shell mediante microscopía electrónica de barrido usando ALG y PCL.
4. Conocer la morfología de las películas electrohiladas compuestas de ALG y PCL.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para obtener el protocolo se utilizó como polímero referencial la polivinilpirrolidona (PVP) 6% y 11% para la formación de fibras únicas. Además, se utilizaron mezclas con colorantes Violeta Cristal (CV) (0,2% p/v) y Naranja Metilo (MO)(2% p/v) en las fibras core-shell.

Se usó poli ϵ -caprolactona (PCL) 12%, con diferentes solventes como: acetona, cloroformo (CF), dimetilacetamida (DMAc) y tetrahidrofurano (THF) con el fin de encontrar el o los solventes más adecuados (co-solvencia) operativamente. Por otro lado, se utilizó alginato (ALG) comercial (Aldrich®) de mediana viscosidad.

Para la preparación de las fibras electrohiladas se utilizó un instrumento de electrospinning marca Fluidnatek® modelo eStretching LE-10.

Finalmente, para el estudio de diámetro de las fibras se utilizó el programa ImageJ con el pugin DiameterJ.

RESULTADOS

Como una primera actividad de aproximación al funcionamiento del equipo Fluidnatek® modelo eStretching LE-10 y la generación de un protocolo de uso para la obtención de fibras se utilizó el polímero polivinilpirrolidona (PVP). Se prepararon fibras únicas utilizando dos soluciones poliméricas de PVP de concentraciones de 6 y 11% p/v, además se modificaron los parámetros de distancia: 12 - 20 cm, velocidad de flujo: 800 – 1000 $\mu\text{l/h}$ y Voltaje aplicado: 8 – 10 kV. En todos esos rangos se logró formar fibras comprobando experimentalmente en nuestro laboratorio lo descrito en la bibliografía sobre la facilidad de electrohilar PVP (fig. 7).

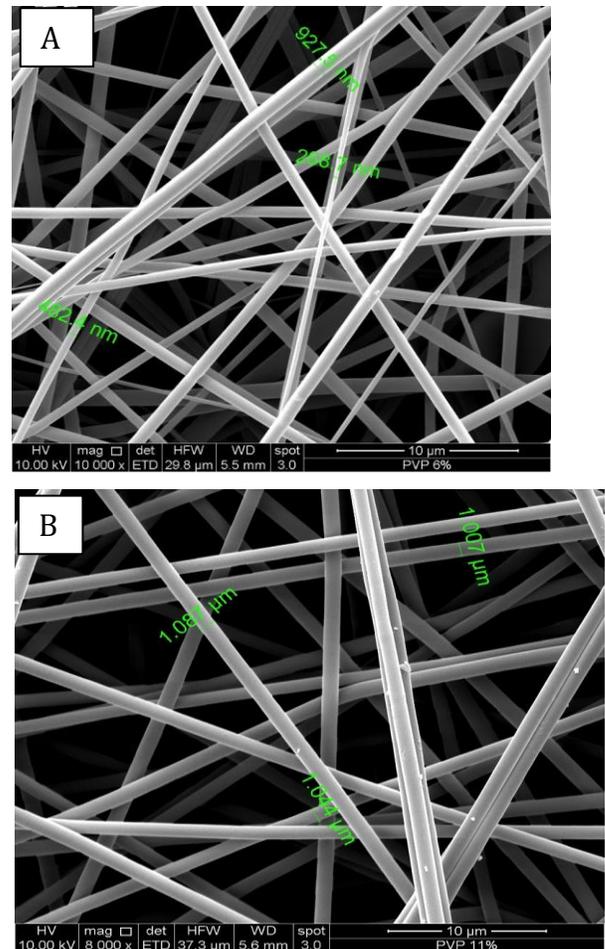


Fig. 7. Imágenes SEM de fibras de PVP micro y nanoelectrohiladas. A) Nanofibras de PVP obtenidas a 6%, B) Microfibras de PVP obtenidas a 11%.

Adicionalmente, con el objeto de ilustrar la formación de de fibras con morfología core-shell y la formación de partículas se utilizó PVP 6 %p/v y dos colorantes, los cuales fueron incorporados a las soluciones de polímeros. Para esto a la solución de PVP 6% se mezcló con el colorante naranja de metilo como shell y a una solución de alginato con el colorante cristal violeta como

core. Para este ensayo se utilizó parámetros similares a los descritos en la bibliografía para morfología core-shell con PVP, los cuales fueron: velocidad Shell: 1000 $\mu\text{l/h}$, velocidad Core: 200 $\mu\text{l/h}$, voltaje: 10 kV y Distancia: 20 cm), obteniendo fibras y partículas (fig. 8).

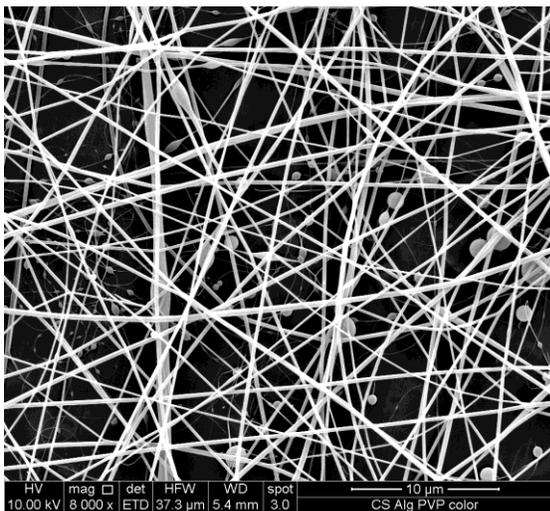


Fig. 8. Imágenes SEM de fibras core shell y partículas ALG – PVP 6%

La figura 9 demuestra la naturaleza interna del core de la fibra de PVP con morfología core-shell, es posible apreciar claramente el flujo de la solución de alginato mezclado con el colorante cristal violeta mediante SEM.

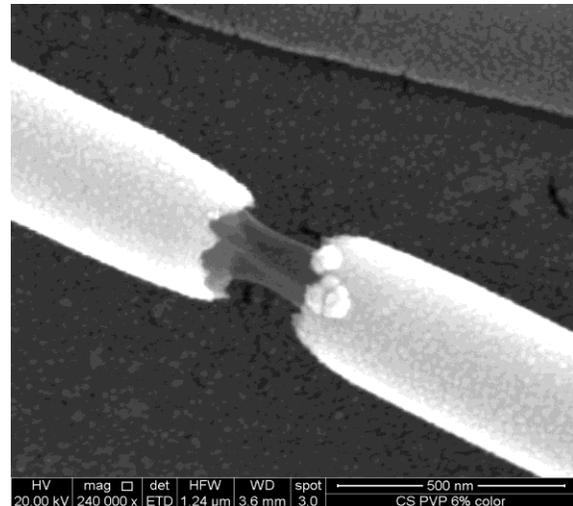


Fig. 9. Imagen SEM de fibra core-shell ALG-PVP 6% donde se muestra claramente el interior de alginato y la cobertura de PVP. Por otro lado, modificando los diversos parámetros que controlan la técnica de electrospinning fue posible obtener fibras de PVP con diferentes “errores” morfológicos, los cuales son descritos como:

- Cuentas: son englobamientos de las fibras.
- Fibras húmedas: es cuando el solvente no alcanza a evaporarse completamente.
- Presencia de partículas: las cuales pueden ser deseadas o no.

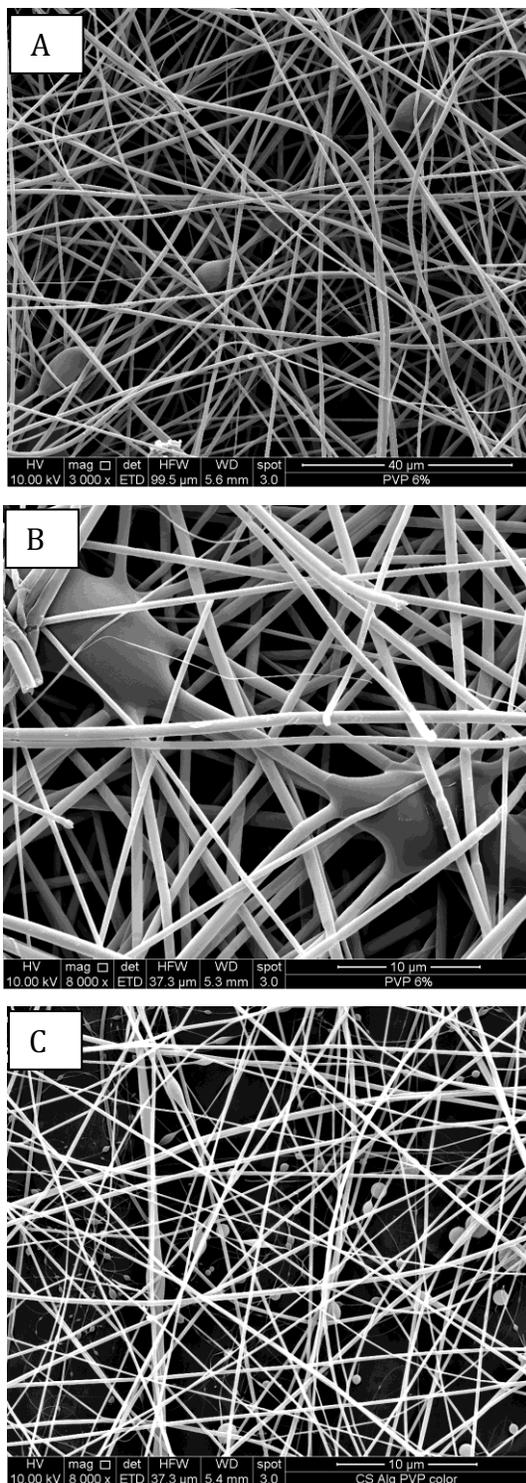


Fig. 10. Imágenes SEM de defectos comunes en la formación de fibras. A) Cuentas, B) Fibras húmedas y C) Partículas

Para corroborar la existencia del core, en las morfologías de fibras core-shell, como un centro que permite el flujo interno de posibles moléculas, las cuales pueden estar contenidas en la solución polimérica en la fibra con morfología core-shell, se procedió a generar fibras huecas por electrospinning coaxial usando PVP como cubierta utilizando aire durante el proceso de electrospinning. El resultado de las morfologías obtenidas mediante SEM se observan en la figura 11.



Fig. 11. Imagen SEM de fibra PVP 6% hueca.

De los diferentes resultados y aproximaciones de uso del equipo Fluidnatek[®] modelo eStretching LE-10 se generó el protocolo de uso del equipo, las condiciones de trabajo y del operario y el

uso del sistema de visualización del cono de Taylor (ver anexo 1).

Como el objetivo era obtener fibras core-shell de PCL, se procedió a formar fibras únicas de PCL para tener rangos de referencia al momento de hacer las fibras core-shell. Como el PCL es un polímero sólido a temperatura ambiente en general es utilizado como una variante de la técnica de electrospinning en la cual se utiliza calor y alcanzar la temperatura de fusión del polímero a utilizar durante el proceso de formación de fibras denominado melt-electrospinnig.

Dado las características químicas de PCL se utilizaron diferentes solventes que nos permitieran mantener el PCL en estado de solución, proporcionaran facilidad operacional como también fibras sin defectos y fibras uniformes en diámetro. Los solventes utilizados fueron acetona (fig. 12), acetona-DMAc (fig. 13), CF-DMAc (fig. 14) y THF (fig. 15), respectivamente.

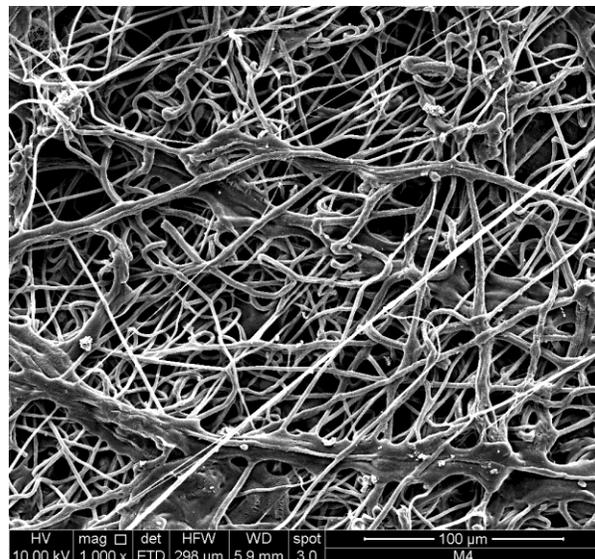


Fig. 12. Imágenes SEM de fibras de PCL en acetona a 12% p/v.

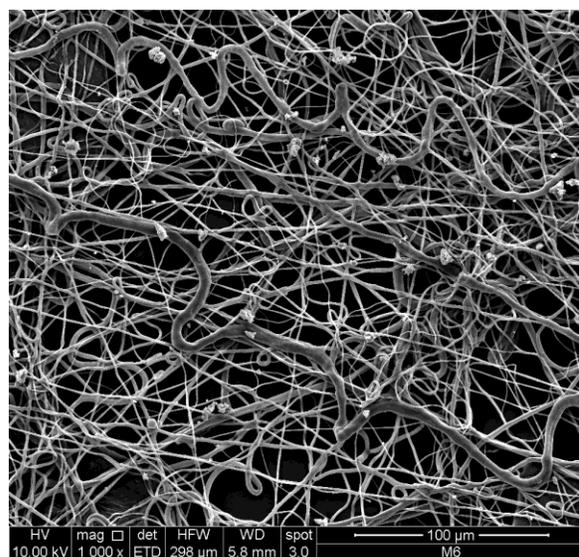


Fig. 13. Imágenes SEM de fibras de PCL en acetona-DMAc a 12 % p/v.

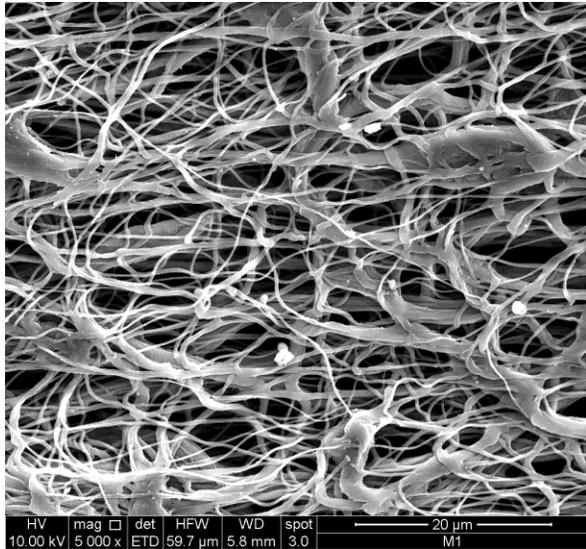


Fig. 14. Imágenes SEM de fibras de PCL en CF-DMAc a 12 % p/v.

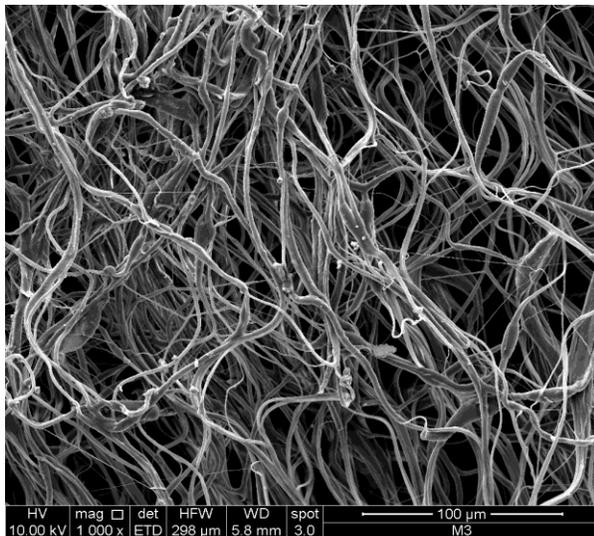


Fig. 15. Imágenes SEM de fibras de PCL usando solución de PCL en THF a 12 % p/v.

Del análisis morfológico mediante SEM es posible demostrar que en todos los casos obtuvimos fibras pero con CF-DMAc y THF hubo mayor facilidad operacional ya que no se observó solidificación en la punta de la

jeringa al aplicar el voltaje necesario para que ocurra la formación del cono de Taylor cargado y la posterior eyección de la solución continua (jet) previo a la formación de fibras usando el PCL. De lo anterior se procedió a seleccionar estos solventes para realizar las fibras con morfología core-shell.

En la figura 16 muestra la formación de fibras con morfología core-shell a base de ALG-PCL utilizando mezclas de solventes o co-solvencia para mejorar la disolución del polímero de ambos polímeros utilizados al variar el parámetro voltaje de 13 hasta 16 Kv. En general para la formación de fibras de ALG-PCL se utilizaron las siguientes condiciones experimentales: Velocidad Shell: 2000 $\mu\text{l/h}$, Velocidad Core: 1000 $\mu\text{l/h}$, Distancia: 16 cm y Voltaje: 13-16kV (fig. 16)

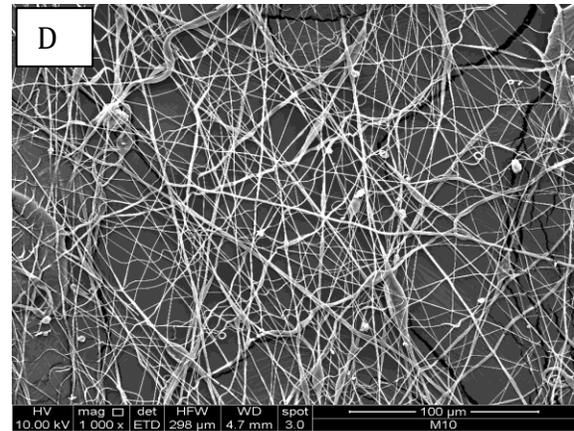
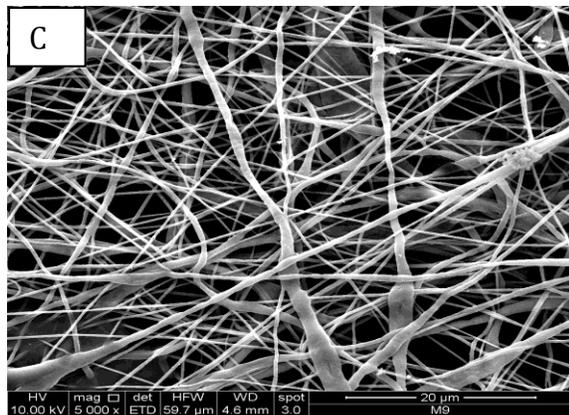
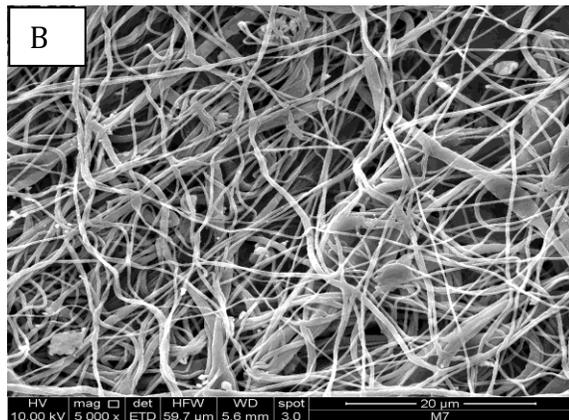
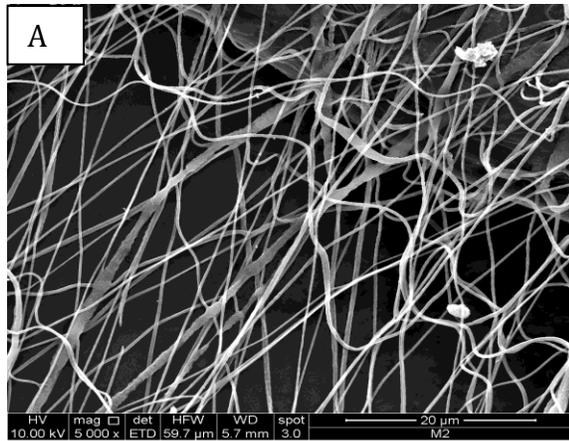


Fig. 16. Imágenes SEM de fibras core-shell de ALG-PCL disueltas en CF/DMAc utilizando diferentes voltajes. A) 13 volt, B) 14 volt, C) 15 volt y D) 16 volt

Una vez formadas las fibras se estudió de diámetro la variación del diámetro de las fibras ALG-PCL en función del voltaje aplicado (Gráfico 1). La variación fue siempre en el orden de los micrómetros, alcanzando el mayor diámetro de las fibras de 16 μm con un voltaje de 14, es posible apreciar que a voltajes 15 y 16 se obtuvo fibras con diámetros del orden de los 7 μm .

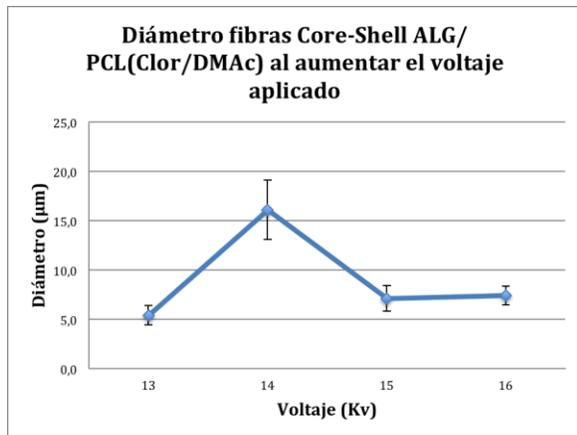


Gráfico 1. Variación del diámetro de las fibras de ALG-PCL en co-solvente al variar en voltaje durante el proceso de electrospinning.

Cuando se prepararon fibras de ALG-PCL usando THF como único solvente se procedió a estudiar todos los parámetros involucrados en el proceso de electrospinning. Los rangos de los parámetros experimentales fueron:

Velocidad Shell: 200 - 3500 µl/h, Velocidad Core: 20 - 1000 µl/h, Distancia: 10 - 16 cm y Voltaje: 12 -16 kV. Luego, se estudió el efecto de la variación de los parámetros tales como: diámetro de las fibras comprobando por ejemplo que a una misma velocidad y voltaje al aumentar la distancia, la fibra se elongará mucho mas obteniendo diámetros del orden de las nanofibras (Gráfico 2).

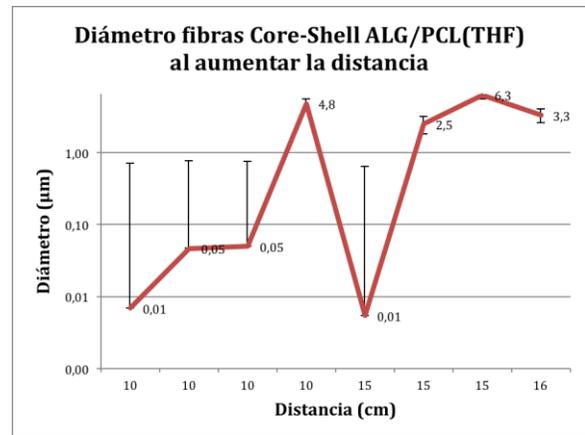


Gráfico 2. Variación del diámetro de las fibras de ALG-PCL al variar la distancia durante el proceso de electrospinning.

Por el contrario, al disminuir la distancia se observó que la aparición de defectos aumenta presentándose como fibras húmedas y cuentas (fig. 17).

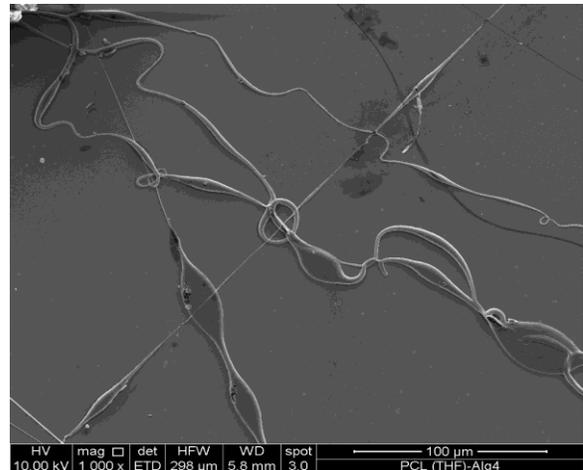


Fig. 17. Imágenes SEM de fibras core-shell de ALG-PCL 12% p/v, al variar el parámetro de velocidad Shell: 2000 µl/h, Velocidad Core: 100 µl/h, Voltaje: 15 kV y Distancia: 10 cm

Por otro lado, al variar el parámetro de velocidad de flujo del polímero durante el proceso de electrospinning, comprobamos que al llevar la velocidad a extremos (muy lenta 200 $\mu\text{l/h}$ o muy rápida 3500 $\mu\text{l/h}$) se obtienen diámetros de fibras del orden nano y micrométricos (Gráfico 3). A velocidades de flujo muy altas el sistema no alcanza una elongación correcta y por ende la evaporación del solvente, con lo cual la formación de fibras disminuye y se observan la aparición de defectos morfológicos (fig. 18).

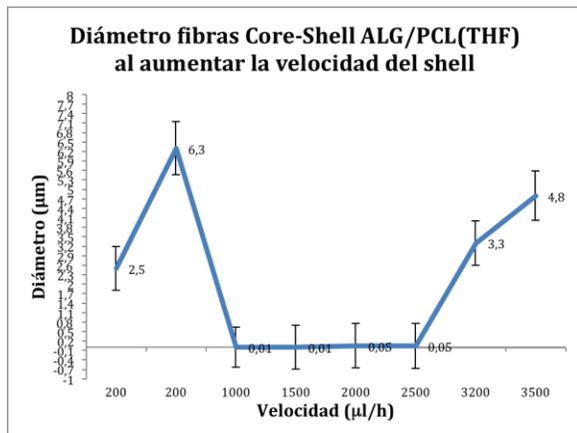


Gráfico 3. Variación del diámetro de las fibras de ALG-PCL al variar la velocidad de flujo durante el proceso de electrospinning.

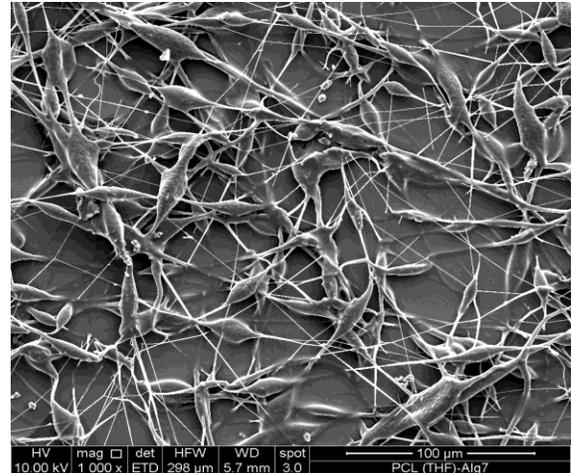


Fig. 18. Imágenes SEM de fibras core-shell de fibras ALG-PCL 12% p/v. Velocidad Shell: 3500 $\mu\text{l/h}$, Velocidad Core: 1000 $\mu\text{l/h}$, Voltaje: 16 kV y Distancia: 10 cm.

A esta misma velocidad al aumentar la distancia se pueden corregir estos defectos y lograr formación de fibras continuas como se muestra en la fig. 19.

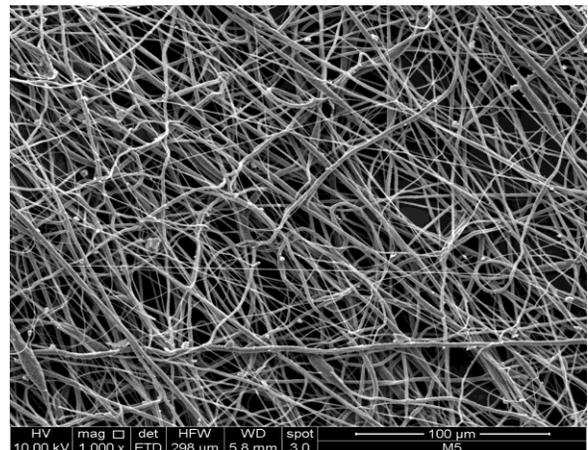


Fig. 19. Imágenes SEM de fibras core-shell de fibras ALG-PCL 12% p/v. Velocidad: 3200 $\mu\text{l/h}$, Velocidad Core: 1000 $\mu\text{l/h}$, Voltaje: 16 kV y Distancia: 16 cm

Con el objetivo de comprobar el efecto de los parámetros en la formación de fibras se compararon los diámetros con las fibras obtenidas inicialmente con la co-solvenencia, uso de dos solventes simultáneamente en un sistema de solución, se comprobó que a los mismos voltajes fue posible obtener fibras nano y micrométricas. Por lo tanto, el rango de voltaje con el que se trabajó es un voltaje conocido donde se obtienen fibras (gráfico 4)

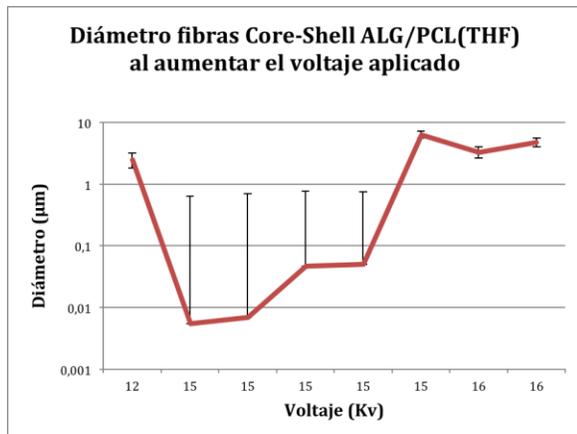


Gráfico 4. Variación del diámetro de las fibras de ALG-PCL al variar el voltaje aplicado durante el proceso de electrospinning.

DISCUSIÓN

Se realizó un primer acercamiento exitoso a la técnica de electrospinning, la cual nos permitió conocer los diferentes parámetros involucrados en la formación de fibras electrohiladas a base de polímeros. Los

parámetros que se pueden considerar para formar micro o nanofibras poliméricas son muchos, sin embargo en la presente Memoria de título se evaluaron los más importantes. La formación de fibras con tamaños nano y micrométricos de PCL en solución fue un gran desafío debido a la dificultad experimental de solidificación del cono de Taylor al trabajar a temperatura por debajo de la temperatura de fusión de PCL. Se pudo comprobar que aparte de las variables propias de la técnica es posible manejar otras variables como temperatura (ambiental y de la solución) y humedad. A su vez, el uso de PVP en la formación de fibras resultó ser un polímero muy adecuado y fácil de nano y/o micro-electrohilar y una muy buena opción para utilizarlas en experiencias futuras con distintas aplicaciones.

La técnica de electrospinning es bastante simple y manejando los parámetros se pueden obtener fibras o partículas con diferentes características y propiedades, por lo mismo se vuelve una técnica muy versátil y simple.

CONCLUSIONES

Se generó un protocolo de uso para fibras únicas y core-shell para el equipo eStretching LE-10; Fluidnatek®.

Se generaron fibras core-shell de ALG/PCL 12% utilizando CF/DMAc como un sistema de co-solvencia y THF como solvente único. Se demostró el efecto de la variación de los parámetros: velocidad de flujo, concentración, distancia y voltaje en el tamaño de la fibra y comprobamos que:

a. La concentración de la solución de polímero es clave para obtener fibras o partículas mediante electrospinning – electrospray, respectivamente. Así, fue posible conocer que para PCL al 10% es la concentración límite.

b. La selección adecuada de los parámetros velocidad, distancia y voltaje permite la obtención de fibras nanométricas o micrométricas.

Finalmente, se comprobó que PVP genera fibras micrométricas y en cambio PCL fibras nanométricas y micrométricas, lo cual está en concordancia con lo reportado en literatura.

BIBLIOGRAFÍA

AGARWAL S., WENDORFF J., GREINER A. 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 49: 5603-5621.

BONINO C., KREBS M., SAQUING C., JEONG S., SHEARER K., ALSBERG E., KHAN S. 2011 Electrospinning alginate-based nanofibers: From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems. *Carbohydrate Polymers* 85: 111-119

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: 389-407.

DOSHI J., RENEKER D. H. 1995. Electrospinning process and applications of electrospun fibres. *Journal of Electrostatics* 35: 60-151.

DUQUE L., RODRIGUEZ L., LOPEZ M., 2013. Electrospinning: la era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 14: 10-27.

EGAÑA, R. 2012. Preparación de esferas de alginato purificado de origen comercial y desde algas chilenas *lessonia nigrescens* como implante para terapia celular. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 13 p.

FRENOT A., CHRONAKIS J. 2003. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface. Science* 8: 64-75.

GARG K., BOWLIN G., 2011. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics* (5) 013403.

JIANG H., HU Y., ZHAO P., LI Y., ZHU K. 2006. Modulation of protein release from biodegradable core-shell structured fibers prepared by coaxial electrospinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 79: 50-57

KAYAMAN-APOHAN N., ÇAKMAKÇ E., ÇİÇEK C., KAHRAMAN M., ARSLAN M., KURUCA S., 2013. Poly (α -hydroxy ester-urethane) based electrospun biomaterials for tissue engineering. vol 32. [en línea] <http://www.aidic.it/cet/13/32/182.pdf>

LI W., COOPER JR. J., MAUCK R, TUAN R. 2006. Fabrication and characterization of six electrospun poly(α -hydroxy-ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* 2: 377-385.

NGUYEN T., CHUNG O., PARK J. 2011. Coaxial electrospun poly(lactic acid)/chitosan (core/shell) composite nanofibers and their antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers* 86:1799-1806

PAREDES N., RODRÍGUEZ-GALÁN A., PUIGGALÍ J., PERAIRE C. 1998. Studies on the biodegradation and biocompatibility of a new poly(ester amide) derived from L-alanine. *Journal of Applied Polymer Science* 69: 1537-1549.

SUPAPHOL P, SUWANTONG O, SANGSANOH P, SRINIVASAN S., JAYAKUMAR R., NAIR S. 2012. Electrospinning of biocompatible polymers and their potentials in biomedical applications. *Advances in Polymer Science* 246: 213-240.

TIWARI S., TZEZANA R., ZUSSMAN E., VENKATRAMAN S. 2010. Optimizing partition-controlled drug release from Electrospun Core-Shell fibers. *Int. J. Pharm* 392: 209-217.

ZHANG Y., OUYANG H., TECK LIM C., RAMAKRISHNA S., HUANG Z. 2005. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*

Part B: Applied Biomaterials 72: 156-165.

ZHU N., CHEN X. 2013. Biofabrication of tissue scaffolds. Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications [en

línea]

<<http://www.intechopen.com/books/advances-in-biomaterials-science-and-biomedical-applications/biofabrication-of-tissue-scaffolds>>

ANEXO 1: PROTOCOLO DE USO DEL EQUIPO FLUIDNATEK® MODELO ESTRETCHING LE-10

Condiciones de Trabajo y del Operario:

- Utilizar guantes para no contaminar tanto la muestra y disminuir el riesgo de recibir una descarga de voltaje.
- Acondicionar la sala de electrospinning: Calefaccionar la sala de electrospinning a la temperatura adecuada para que el polímero se mantenga en estado líquido y verificar el porcentaje de humedad.
- Asegurarse de que la solución de polímero se encuentre en las condiciones mencionadas u otras de ser necesaria.
- **Siempre** verificar que las piezas del equipo estén limpias y libres de residuos para que permitan un flujo continuo
- **Siempre** colocar una lámina de aluminium foil en el colector plano u rotatorio.
- Ajustar la distancia de trabajo del colector.
- **Siempre** utilizar Jeringas del tipo Luer Lock (que se atornillan)
- Cebear con el solvente de la solución de polímero, al terminar para eliminar los residuos que pueden tapar los conductos del equipo electrospinning.

Uso del Equipo de Electrospinning LE-10:

1. Preparar las Jeringas (5 ó 10 ml) con la solución de polímero.
2. Colocarlas el porta jeringa del equipo LE-10 asegurando bien las jeringas, tanto al Nozzle equipo como a las mangueras.
3. Hacer fluir un poco de solución para que todo el sistema de mangueras quede completamente con solución (sin burbujas). Esto evita esperar demasiado la salida de la solución de nanofibras.
4. Una vez puesto la lámina de aluminium foil en el colector plano. Es posible además colocar (sobre el aluminio) algún receptor para las fibras como: portaobjeto, aluminio más pequeño, cubreobjeto, etc. Esto facilita el análisis in situ por microscopía óptica u SEM y en duplicado del material nanoelectrohilado.
5. Verificar la posición de la llave del Modo de Seguridad ubicada en el Panel trasero del equipo **LE-10**. Ajustarla a la condición de Modo seguro de trabajo o no, según se requiera. **Modo seguro: Posición ON en posición Vertical.** *Si la llave se torna a la derecha en posición horizontal OFF se encuentra en Modo no seguro!*
6. Encender el equipo desde el botón de encendido ON/OFF ubicado en Panel trasero.
7. Encender el equipo desde el botón de encendido ON ubicado en Panel de Control.
8. Revisar y ajustar los parámetros de electrospinning del Panel de control y Touch Screen: diámetro de las jeringas, velocidad de flujo, voltaje, etc.
9. Encender el ventilador del equipo LE-10 sólo si es necesario según protocolo. Éste podría facilitar la solidificación de la muestra en la zona de eyección.

10. Para detener el experimento se debe detener el flujo y bajar el voltaje a 0 desde el Panel de Control delantero “**FLUIDNATEK LE-10. Software**”. Luego se puede proceder a apagar el equipo desde el switch trasero.
11. En caso de emergencia se debe presionar el boton rojo marcado como “emergency stop” el cual detiene inmediatamente el equipo y todos sus procesos. Para volver a usar se debe girar el boton rojo para que vuelva a su posicion inicial y prender nuevamente el equipo.

Uso del Sistema de visualización del Cono de Taylor:

1. Abrir el programa Ueye cockpit. Iniciar siempre en Expert mode.
2. Posicionar la cámara USB en dirección de la salida del flujo. La cámara USB debe estar previamente conectada al PC.
3. Colocar y ajustar los lentes apropiados para visualizar el cono de Taylor
4. El foco de la imagen se consigue ajustando los anillos (rings) de los aumentos respectivos.
5. Para abrir la cámara y comenzar la visualización se debe hacer click en “open camera”
6. Para sacar una foto hacer click en la imagen del disket “save image”
7. Para grabar un video hacer click en la imagen de cinta de video “record video sequence”, seleccionar ubicación del video y click en “create”.

ANEXO 2: ÍNDICE DE FIGURAS – TABLAS – GRÁFICOS

ANEXO 2: ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Arquitectura de diferentes andamios poliméricos y como es afectada la unión y diseminación celular	7
Fig. 2. Componentes de un equipo de electrospinning: jeringa con solución polimérica, bomba de flujo, fuente de poder y colector	8
Fig. 3. Cambios en la gota de solución polimérica al aplicar voltaje	9
Fig. 4. Relación volumen radio del jet. <i>A</i> : superficie del área del volumen cilíndrico, <i>V</i> : volumen y <i>R</i> : radio del jet.	9
Fig. 5. Ecuación de aceleración. <i>a</i> : aceleración, <i>E</i> : fuerza del campo eléctrico, <i>q</i> : carga aplicada y <i>m</i> : masa del elemento volumen.	9
Fig. 6. Electrospinning coaxial. A) Sistema de boquillas del sistema coaxial, donde existe un núcleo (core) y una corteza (Shell). B) Vista aumentada de las fibras co-electrohiladas	12
Fig. 7. Imágenes SEM de fibras de PVP micro y nanoelectrohiladas. A) Nanofibras de PVP obtenidas a 6%, B) Microfibras de PVP obtenidas a 11%.	14
Fig. 8. Imágenes SEM de fibras core shell y partículas ALG – PVP 6%	15
Fig. 9. Imagen SEM de fibra core-shell ALG-PVP 6% donde se muestra claramente el interior de alginato y la cobertura de PVP.	15
Fig. 10. Imágenes SEM de defectos comunes en la formación de fibras. A) Cuentas, B) Fibras húmedas y C) Partículas	16
Fig. 11. Imagen SEM de fibra PVP 6% hueca.	16
Fig. 12. Imágenes SEM de fibras de PCL en acetona a 12% p/v.	17
Fig. 13. Imágenes SEM de fibras de PCL en acetona-DMAc a 12 % p/v.	17
Fig. 14. Imágenes SEM de fibras de PCL en CF-DMAc a 12 % p/v.	17
Fig. 15. Imágenes SEM de fibras de PCL usando solución de PCL en THF a 12 % p/v.	18
Fig. 16. Imágenes SEM de fibras core-shell de ALG-PCL disueltas en CF/DMAc utilizando diferentes voltajes. A) 13 volt, B) 14 volt, C) 15 volt y D) 16 volt	19
Fig. 17. Imágenes SEM de fibras core-shell de ALG-PCL 12% p/v, al variar el parámetro de velocidad Shell: 2000 µl/h, Velocidad Core: 100 µl/h, Voltaje: 15 kV y Distancia: 10 cm	20
Fig. 18. Imágenes SEM de fibras core-shell de fibras ALG-PCL 12% p/v. Velocidad Shell: 3500 µl/h, Velocidad Core: 1000 µl/h, Voltaje: 16 kV y Distancia: 10 cm.	21

Fig. 19. Imágenes SEM de fibras core-shell de fibras ALG-PCL 12% p/v. Velocidad: 3200 μ l/h, Velocidad Core: 1000 μ l/h, Voltaje: 16 kV y Distancia: 16 cm	21
---	-----------

ANEXO 2: ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Efecto de los distintos parámetros que afectan la formación de las fibras poliméricas usando electrospinning	10

ANEXO 2: ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Grafico 1. Variación del diámetro de las fibras de ALG-PCL al variar en voltaje durante el proceso de electrospinning.	19
Grafico 2. Variación del diámetro de las fibras de ALG-PCL al variar la distancia durante el proceso de electrospinning.	20
Gráfico 3. Variación del diámetro de las fibras de ALG-PCL al variar la velocidad de flujo durante el proceso de electrospinning.	20
Gráfico 4. Variación del diámetro de las fibras de ALG-PCL al variar el voltaje aplicado durante el proceso de electrospinning.	21