



**Universidad  
Europea**

**UNIVERSIDAD EUROPEA DE MADRID**

**ESCUELA DE ARQUITECTURA, INGENIERÍA Y DISEÑO**

**GRADO EN FÍSICA**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS HÍBRIDAS  
DE PLGA/PCL OBTENIDAS POR ELECTROSPINNING PARA EL  
ANÁLISIS DE EXPANSIÓN IN-VITRO DE DISPOSITIVOS  
BIOMÉDICOS CON MEMORIA DE FORMA**

**Mario Peláez Morales**

**Dirigido por:**

**Dra. María Fuencisla Gilsanz Muñoz**

## **CURSO 2024-2025**

Mario Peláez Morales

---

**TÍTULO:** Desarrollo y caracterización de membranas híbridas de PLGA/PCL obtenidas por *electrospinning* para el análisis de expansión in-vitro de dispositivos biomédicos con memoria de forma.

**AUTOR:** Mario Peláez Morales

**TITULACIÓN:** Grado en Física

**DIRECTOR/ES DEL PROYECTO:** Dra. María Fuencisla Gilsanz Muñoz

Dra. Jennifer Patterson

**FECHA:** Junio de 2025

## RESUMEN

Este trabajo forma parte del proyecto BIOMET4D realizado en el Instituto IMDEA Materiales. BIOMET4D busca desarrollar nuevos dispositivos médicos para la expansión de piel y realizar un modelo in-vitro que imite la expansión de piel a partir de actuadores metálicos biodegradables 4D. La línea principal de estudio de este trabajo se centra en sintetizar y caracterizar membranas híbridas de PLGA y PCL, polímeros biocompatibles, para el estudio y análisis de la expansión in-vitro con dispositivos biomédicos con memoria de forma.

Las intervenciones médicas y quirúrgicas que involucran la expansión de piel requieren de procedimientos complejos e intrusivos, la intención principal de este proyecto es facilitar estos procedimientos mediante la creación de membranas con cualidades similares a la piel. Para ello las membranas sintetizadas se compararán con unas membranas comerciales llamadas Biopore™. La principal diferencia entre ambas es el proceso de desarrollo ya que las membranas creadas para este proyecto se harán mediante *electrospinning* creando estructuras formadas por fibras de la disolución de polímeros utilizados.

El proyecto se centrará en el estudio de la síntesis de estas membranas, así como su caracterización mecánica y química, además de comprobar la viabilidad del cultivo de fibroblastos humanos en el producto resultante.

**Palabras clave:** Biomateriales, Polímeros biocompatibles, Caracterización mecánica, Cultivos celulares, Membranas, *Electrospinning*.

## ABSTRACT

This project is part of the BIOMET4D project created in IMDEA Materiales Institute. The BIOMET4D project aims to develop new medical devices for skin expansion and create an in-vitro model that mimics skin expansion to study the metallic biodegradable 4D actuators. The main line of work in this project consists of the development and characterization of hybrid membranes of PLGA and PCL, biocompatible polymers, for the study and analysis of the in-vitro expansion with biomedical shape-shifting devices.

Medical and surgical interventions involving skin expansion require complex and intrusive procedures. The main focus of this project is facilitating these procedures by creating membranes with similar qualities to skin as an in vitro alternative. For this purpose, the synthesized membranes will be compared to a commercial membrane called Biopore™. The principal difference between these commercial membranes and the ones created for this project is the development process. The PLGA/PCL membranes are made with *electrospinning* forming a scaffolding made with fibers of the polymers used.

This project addresses the study of the synthesis of the membranes as well as their mechanical and chemical characterization. In addition, the project will test the viability of the seeding of human fibroblasts on the resulting product.

**Keywords:** Biomaterials, Biocompatible polymers, Mechanical characterization, Cellular seeding, Membranes, *Electrospinning*.

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría dar las gracias principalmente a la persona con la que he realizado cada paso de este proyecto, la otra codirectora de este trabajo, la futura doctora Ángela Castro, por soportar cada error que he cometido a lo largo de todas y cada una de las pruebas realizadas y ayudarme cada vez que el *electrospinning* decidía no funcionar.

También agradecer a mi tutora, María Fuencisla, por leerse y corregir tantas versiones de esta memoria a lo largo de los cinco meses que ha durado su realización.

A mis mejores amigas Becca y Eli, por el apoyo constante. A mis amigos de la universidad Jacobo, Pedro, Manolo, Iñigo, Menchen y Jesús por las risas que nos hemos echado y los grandes momentos vividos a lo largo de todos estos años.

Por último, agradecer a mi familia por darme la vida que me ha llevado hasta este momento y por haberme permitido estudiar la carrera que quería a pesar de las condiciones adversas.

## TABLA RESUMEN

	<b>DATOS</b>
<b>Nombre y apellidos:</b>	Mario Peláez Morales
<b>Título del proyecto:</b>	Desarrollo y caracterización de membranas híbridas de PLGA/PCL obtenidas por <i>electrospinning</i> para el análisis de expansión in-vitro de dispositivos biomédicos con memoria de forma.
<b>Directores del proyecto:</b>	Dra. María Fuencisla Gilsanz Muñoz Dra. Jennifer Patterson
<b>El proyecto se ha realizado en colaboración de una empresa o a petición de una empresa:</b>	SÍ
<b>El proyecto ha implementado un producto:</b> (esta entrada se puede marcar junto a la siguiente)	NO
<b>El proyecto ha consistido en el desarrollo de una investigación o innovación:</b> (esta entrada se puede marcar junto a la anterior)	SÍ
<b>Objetivo general del proyecto:</b>	Desarrollo de membranas híbridas para el análisis de expansión de dispositivos biomédicos con memoria de forma.

# Índice

RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	5
TABLA RESUMEN .....	7
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN .....	14
1.1 Estado del arte .....	14
1.2 Contexto y justificación .....	15
1.3 Planteamiento del problema .....	16
Capítulo 2. OBJETIVOS .....	17
2.1 Objetivos generales.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
2.3 Beneficios del proyecto.....	17
Capítulo 3. DESARROLLO DEL TFG .....	18
3.1 Planificación del trabajo fin de grado .....	18
3.2 Descripción de la solución, metodologías y herramientas empleadas .....	18
3.2.1 Disoluciones .....	18
3.2.2 <i>Electrospinning</i> .....	20
3.2.3 Proceso de recubrimiento .....	21
3.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	22
3.2.5 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier .....	22
3.2.6 Espectroscopía Raman .....	24
3.2.7 Ángulo de contacto .....	25
3.2.8 Ensayos de tracción.....	25
3.2.9 Presión de ruptura .....	26
3.2.10 Test de expansión.....	28
3.2.11 Cultivo celular.....	29
3.3 Recursos requeridos.....	29
3.4 Resultados del TFG .....	30
3.4.1 Síntesis de membranas .....	30

Mario Peláez Morales

---

3.4.2	Recubrimiento superficial con PDA.....	35
3.4.3	Análisis morfológico de las membranas obtenidas.....	40
3.4.4	Propiedades mecánicas.....	44
3.4.5	Cultivos celulares.....	50
Capítulo 4.	DISCUSIÓN.....	52
4.1	Síntesis de las membranas .....	52
4.2	Análisis químico.....	53
4.3	Propiedades mecánicas.....	53
4.4	Cultivo celular.....	55
Capítulo 5.	CONCLUSIONES .....	56
5.1	Conclusiones del trabajo .....	56
5.2	Conclusiones personales .....	57
Capítulo 6.	FUTURAS LÍNEAS DE TRABAJO .....	58
Capítulo 7.	REFERENCIAS.....	59
Capítulo 8.	ANEXO .....	62

## Índice de Figuras

Figura 1: Cronograma del desarrollo de las actividades a lo largo de la realización del proyecto. ....	18
Figura 2: Frasco con disolución de PLGA/PCL sobre agitador magnético en proceso de disolución. ....	19
Figura 3: Dispositivo para la realización de electrospinning. En la imagen aparecen ya colocadas las diversas piezas necesarias para comenzar la síntesis de la membrana. ....	21
Figura 4: Dispositivo de espectroscopía Raman.....	25
Figura 5: Dispositivo DMA usado para la realización de los ensayos de tracción. Se puede observar en la imagen una muestra rota como ejemplo de la realización del ensayo.....	26
Figura 6: a) Molde empleado para el corte de las membranas, del cual únicamente se emplea la zona central. b) Muestra de la membrana cortada para ensayos mecánicos. c) Prensa hidráulica “Specac” empleada para realizar el corte de las muestras de tracción.....	26
Figura 7: Dispositivo encargado de realizar la medición de la presión aplicada a las membranas. En la imagen aparece también, en el perfil inferior derecho de color gris, el dispositivo de sujeción de las membranas.....	27
Figura 8: Imagen de la morfología de las membranas comerciales Biopore™. ....	31
Figura 9: Membranas de concentración al 10%. a) Membrana 1. b) Membrana 2. c) Membrana 3. d) Membrana 4. Scalebar: 20µm.....	32
Figura 10: Membranas de concentración al 15% 5004. a) Membrana 1. b) Membrana 2. c) Membrana 3. Scalebar: 20µm.....	33
Figura 11: Membranas de concentración al 15% 5010. a) Membrana 1. b) Membrana 2. c) Membrana 3. Scalebar: 20µm.....	34
Figura 12: Membranas de concentración al 20%. a) Membrana 1. b) Membrana 2. c) Membrana 3. Scalebar: 20µm.....	35
Figura 13: Imágenes de las membranas tras su recubrimiento con PDA. a) Biopore™. b) Concentración al 10%. c) Concentración al 15% PLGA 5004. d) Concentración al 15% PLGA 5010. e) Concentración al 20%. Scalebar: 20µm.....	36
Figura 14: Gráfico resultante de la espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier. Se muestran los resultados individuales del PDA y los dos polímeros usados en la síntesis de las membranas, PLGA y PCL, además de las membranas con disolución de concentración al 10% y 20% de polímero y las membranas comerciales Biopore™ con y sin el recubrimiento de PDA. ....	37
Figura 15: La figura muestra los espectros obtenidos del análisis Raman en muestras aisladas de PLGA, PCL y PDA. ....	38

Figura 16: Resultados obtenidos tras la espectroscopía Raman de cada una de las membranas. a) Biopore™. b) Concentración al 10%. c) Concentración al 15% con PLGA 5004. d) Concentración al 15% con PLGA 5010. e) Concentración al 20%..... 38

Figura 17: Resultados del análisis de ángulo de contacto. a) Biopore™. b) Concentración al 10%. c) Concentración al 15% PLGA 5004. d) Concentración al 15% PLGA 5010. e) Concentración al 20%. Se observa la diferencia clara entre una membrana permeable como Biopore™ con las membranas hidrofóbicas que se han sintetizado a lo largo del proyecto. .... 39

Figura 18: Resultados del análisis de ángulo de contacto. a) Biopore™. b) Concentración al 10%. c) Concentración al 15% PLGA 5004. d) Concentración al 15% PLGA 5010. e) Concentración al 20%. Se observa la diferencia clara entre una membrana permeable como Biopore™ con las membranas hidrofóbicas que se han sintetizado a lo largo del proyecto. .... 39

Figura 19: Ángulo medio de cada membrana tras el análisis de ángulo de contacto..... 40

Figura 20: Representación comparativa de las membranas no recubiertas en la que se muestran los valores de diámetro de la fibra área de los poros y grosor de las membranas. Además, se muestra los resultados de un análisis ANOVA entre los resultados de cada membrana, los asteriscos representan: '\*\*\*\*'  $P < 0.0001$ , '\*\*\*'  $P < 0.001$ , '\*\*'  $P < 0.01$ , '\*'  $P < 0.5$ . .... 42

Figura 21: Representación comparativa de las membranas recubiertas con PDA en la que se muestran los valores de diámetro de la fibra área de los poros y grosor de las membranas. Además, se muestra los resultados de un análisis ANOVA entre los resultados de cada membrana, los asteriscos representan: '\*\*\*\*'  $P < 0.0001$ , '\*\*\*'  $P < 0.001$ , '\*\*'  $P < 0.01$ , '\*'  $P < 0.5$ . .... 44

Figura 22: Representación comparativa de las membranas con y sin recubrimiento de PDA en la que se muestran los valores de estrés máximo, deformación máxima y módulo elástico. Además, se muestra los resultados de un análisis ANOVA entre los resultados de cada membrana, los asteriscos representan: '\*\*\*\*'  $P < 0.0001$ , '\*\*\*'  $P < 0.001$ , '\*\*'  $P < 0.01$ , '\*'  $P < 0.5$ . .... 47

Figura 23: Gráfica resultante de los ensayos de tracción en la que se muestran todos los ensayos de cada una de las membranas utilizadas. a) Sin recubrimiento de PDA. b) con recubrimiento de PDA..... 48

Figura 24: Valor promedio de presión de ruptura y el radio formado por las membranas justo antes de su ruptura para cada disolución preparada. .... 49

Figura 25: Resultados de los cultivos celulares en las membranas de Biopore™ y de concentración de 10%, 15% y 20% tras 72 horas..... 50

Figura 26: Resultados de los cultivos celulares en las membranas de Biopore™ y de concentración de 10%, 15% y 20% con recubrimiento de PDA tras 24, 48 y 72 horas. .... 51

Figura 27: Remedio utilizado para la sujeción de las membranas durante las pruebas de presión de ruptura. .... 54

Figura 28: Recipientes con muestras de membrana tras el proceso de recubrimiento. Las muestras se hayan sobre un agitador donde se han encontrado durante 24 horas..... 62

Figura 29: Muestras usadas para la toma de imágenes de la morfología de las membranas. ... 62

Figura 30: Imágenes usadas para la obtención del valor del radio en las pruebas de presión de ruptura. a) Membranas 10%. b) Membranas 15%. c) Membranas Biopore ..... 62

## Índice de Tablas

Tabla 1: Picos de los grupos funcionales del PLGA en el análisis FTIR [15].....	23
Tabla 2: Picos de los grupos funcionales del PLGA en el análisis FTIR [16].....	24
Tabla 3: Picos de los grupos funcionales del PLGA en el análisis FTIR [17].....	24
Tabla 4: Valor promedio de las diversas características morfológicas de las membranas sin recubrimiento de PDA tras las mediciones. ....	41
Tabla 5: Valor promedio de las diversas características morfológicas de cada tipo de disolución usado para crear las membranas sin recubrimiento de PDA.....	41
Tabla 6: Valor promedio de las diversas características morfológicas de las membranas con recubrimiento de PDA tras las mediciones. ....	43
Tabla 7: Valor promedio de las diversas características morfológicas de cada tipo de disolución usado para crear las membranas con recubrimiento de PDA. ....	44
Tabla 8: Valor promedio de los valores máximos de estrés deformación y módulo elástico de las tres muestras de cada membrana sin recubrimiento de PDA. ....	46
Tabla 9: Valor promedio de los valores máximos de estrés deformación y módulo elástico de las tres muestras de cada membrana con recubrimiento de PDA.....	47
Tabla 10: Tabla de los valores promedio de los diversos tipos de membrana usados a lo largo del proyecto a lo largo de las pruebas de presión de ruptura. Se muestran los valores de presión máxima hasta la ruptura de la membrana (mbar), el radio de la esfera formada por la membrana antes de romper (cm), el grosor de la membrana usada ( $\mu\text{m}$ ) y la presión de ruptura (mbar). 49	

# Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Estado del arte

En la actualidad la expansión de piel consiste en un tratamiento quirúrgico típico de la cirugía plástica y reconstructiva. Este tratamiento permite el crecimiento de piel a partir del tejido ya existente mediante el uso de expansores de silicona situados bajo la piel que estiran gradualmente el tejido, creando así más tejido para cubrir aquellas zonas que necesitan reconstrucción.

Aunque se trata de una técnica que permite producir tejido de buen color y textura, es un procedimiento complejo que requiere tiempo, es incómodo para el paciente y puede ocasionar algunos problemas como dolor, infecciones o necrosis del tejido. Por ello, la creación de nuevos enfoques para el tratamiento es importante. La realización de pruebas preclínicas de nuevos dispositivos médicos involucra realizar pruebas en animales, por ello se necesitan estructuras in vitro para poder evaluar la expansión de piel como alternativa ética a modelos animales y que sirvan como alternativas artificiales a este procedimiento.

Este proyecto pretende crear y caracterizar membranas híbridas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y policaprolactona (PCL) creadas por *electro spinning* para usarlas como sustratos reemplazables para el crecimiento de células creando así una simulación in vitro de la piel.

Para el desarrollo de estas membranas se emplean técnicas usadas en la actualidad como la síntesis de micromateriales o el uso de materiales con memoria de forma, aunque no se han encontrado proyectos que traten de desarrollar productos para usos parecidos. Cabe destacar que se han empleado tecnologías con una base teórica obtenida mediante otras investigaciones como la capacidad de usar métodos de *electrospinning* en ácido poli(láctico-co-glicólico), determinando que es un polímero capaz de crear fibras uniformes si la concentración es lo suficientemente alta [1]; el desarrollo de membranas porosas de PLGA/PCL obtenidas por *electrospinning* para la ingeniería de tejidos donde las membranas resultantes tienen mejoras notables en referencia al diámetro de las fibras, el tamaño de los poros y sus propiedades mecánicas [2, 3]; o la viabilidad de la adhesión de células en membranas creadas por *electrospinning* [4], donde se determina que el proceso de fijación de las células a estas membranas puede resultar complicado sin el uso de agentes que promuevan esta fijación. Por lo que, aunque haya investigaciones parecidas que tratan, por ejemplo, de desarrollar sensores

de sudor mediante el uso de plataformas de piel artificial [5], el equipo de BIOMET4D está realizando una investigación muy innovadora y con pocas investigaciones similares.

En el pasado el equipo de BIOMET4D ya ha hecho pruebas preliminares en el desarrollo de estas membranas [6]. La metodología llevada a cabo durante el proyecto puede resumirse en: Sintetizar membranas con materiales biodegradables, en concreto se usan soluciones de PLGA/PCL (poliláctico-co-glicólico y policaprolactona) disueltos en HFIP (hexafluoroisopropanol), dicha solución es electrohilada para la creación de las membranas. Obteniendo y comparando varias membranas con disoluciones de distintas concentraciones del 10%, 15% y 20% de PLGA/PCL y una membrana comercial llamada Biopore™. Además, y teniendo en cuenta su futura aplicación biomédica las membranas se estudian sin recubrir la superficie y con un recubrimiento de Polidopamina (PDA) con el objetivo de estudiar la posible mejora de la adhesión celular.

## 1.2 Contexto y justificación

Los procedimientos quirúrgicos usados para la expansión de piel para diversas intervenciones son complejos e invasivos. Uno de los métodos más comunes en la inserción de expansores tisulares rectangulares o redondos de diversos materiales en zonas adyacentes al lugar donde se quiere realizar la restructuración de tejido [7]. Estos procesos, en ocasiones, pueden llegar a no cumplir las demandas del crecimiento tisular más complejos pudiendo limitar su efectividad a largo plazo.

Este proyecto, en colaboración con el equipo de BIOMET4D en IMDEA Materiales, está orientado a estudiar la posibilidad de desarrollar modelos de piel artificiales in-vitro mediante el desarrollo de membranas de polímeros biocompatibles [8, 9] creadas mediante *electrospinning* para usarlas como sustratos reemplazables para el cultivo de células de la piel creando así una simulación in-vitro de esta. La porosidad de estas estructuras favorece la posibilidad de fijación celular. Además, el equipo de BIOMET4D también trata de crear dispositivos con cambio de forma para diversas aplicaciones médicas como la craneosinostosis y la expansión de la piel.

Se usaron diversos métodos para caracterizar las membranas: ensayos de tracción para medir resistencia y deformabilidad del material ya que para la expansión se necesitan materiales flexibles y resistentes; microscopía electrónica de barrido para obtener imágenes del material para evaluar su morfología, midiendo la porosidad, la homogeneidad y el diámetro de las fibras; estudios de presión de ruptura mediante un método creado para este proyecto y por último testeos de expansión mediante el uso de dispositivos usados en el proyecto BIOMET4D, que permiten una expansión progresiva de las membranas dando lugar a un comportamiento 4D.

### **1.3 Planteamiento del problema**

El objetivo de este proyecto es mejorar las condiciones actuales de los procedimientos de expansión de piel, por ello, la fabricación de las membranas de PLGA/PCL busca condiciones similares a los tejidos de piel humanos justificando así los diversos procedimientos de caracterización mecánica que se realizarán a lo largo del proyecto. Es importante también la viabilidad de la fijación de las células en la membrana por lo que se verá también las características mecánicas de las membranas con un recubrimiento de polidopamina usado para favorecer esta fijación.

Para determinar que el recubrimiento sea correcto se hace la caracterización química de las membranas tanto con PDA como sin ello, además de la observación de las membranas mediante la toma de imágenes con el uso de SEM.

## Capítulo 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos generales

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo y caracterización de membranas de PLGA/PCL creadas por *electrospinning* como sustratos reemplazables para el crecimiento de células creando así una réplica in vitro de la piel.

### 2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar membranas híbridas de los polímeros PLGA y PCL mediante *electrospinning*.
- Realizar un recubrimiento de las membranas con polidopamina para favorecer la fijación celular.
- Realizar un análisis químico de las membranas para ver la diferencia de composición tras añadirles el recubrimiento de PDA.
- Visualizar la morfología de las membranas resultantes antes y después de cubrirlas con PDA y analizarla.
- Medir las propiedades mecánicas de las membranas con y sin PDA.
- Hacer un cultivo de células sobre las membranas y analizar su fijación y proliferación.

### 2.3 Beneficios del proyecto

Con la obtención de buenos resultados en este proyecto se obtendrían membranas con características similares a la piel que no solo serían efectivas en la aplicación directa en procedimientos médicos sino también para el estudio in vitro de las diversas características de la piel o del efecto que podría tener sobre la piel los diversos procedimientos necesitados.

## Capítulo 3. DESARROLLO DEL TFG

### 3.1 Planificación del trabajo fin de grado

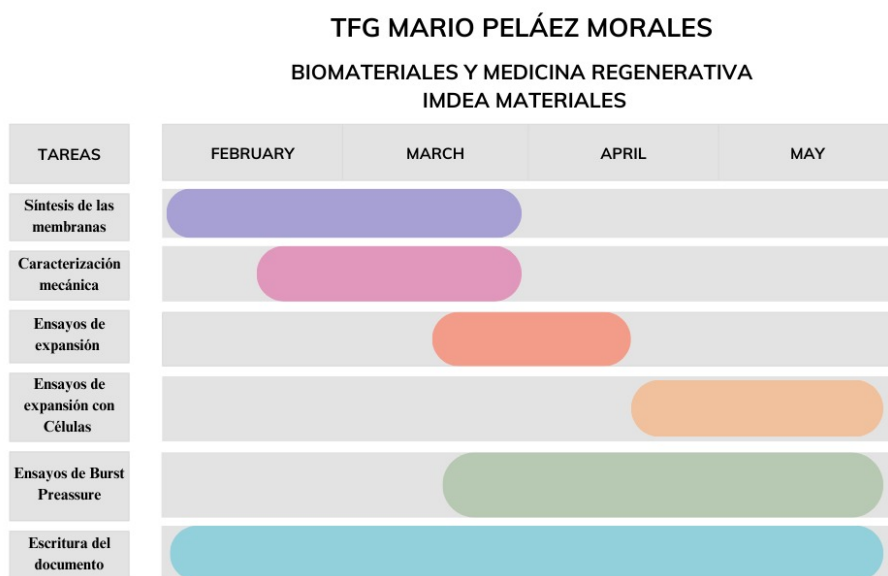


Figura 1: Cronograma del desarrollo de las actividades a lo largo de la realización del proyecto.

Además, se hacen reuniones con la directora del proyecto Jennifer Patterson semanalmente para ver el avance del mismo y los resultados que se han ido obteniendo.

### 3.2 Descripción de la solución, metodologías y herramientas empleadas

#### 3.2.1 Disoluciones

Para la elaboración de las membranas se usarán soluciones de PLGA (50:50 láctico/glicólico) y PCL (80000 MW) en una ratio de 7:3 en concentraciones de un 10%, 15% y 20% disueltas en 1,3-dioxole fluoropropanol, con un volumen total de 15 ml para cada solución.

El proceso se hará bajo una campana de extracción de humos debido al potencial peligro del fluoropropanol, el cual es volátil.

Mario Peláez Morales

---

Las masas de polímeros usadas para la síntesis de las disoluciones a los diferentes porcentajes son:

- 10%: 1.05g de PLGA y 0.45g de PCL, dando un total de 1.5 gramos (10% de 15ml).
- 15%: 1.575g de PLGA y 0.675g de PCL, dando un total de 2.25 gramos (15% de 15ml).
- 20%: 2.1g de PLGA y 0.9g de PCL, dando un total de 3 gramos (20% de 15ml).

Tras la adición del disolvente se añade un agitador magnético y se coloca sobre una placa magnética a temperatura ambiente y con una agitación de 500 rpm hasta que se disuelva completamente, lo cual puede llevar múltiples horas. Se considera que está completamente disuelto cuando no hay partículas visibles en la disolución.



*Figura 2: Frasco con disolución de PLGA/PCL sobre agitador magnético en proceso de disolución.*

En caso de que los polímeros no se disuelvan se aumentará la velocidad de agitado o se elevará levemente la temperatura, además de asegurarse de que las propiedades del almacenamiento de los polímeros sean correctas. Para evitar la formación de aglomeraciones se tratará de no añadir los polímeros demasiado rápido y se hará el agitado gradualmente para realizar de manera óptima la disolución.

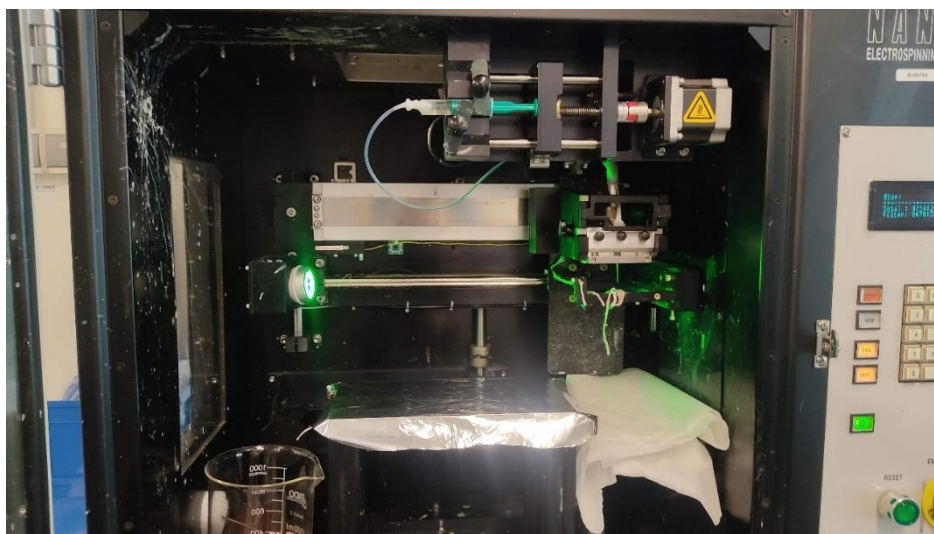
### 3.2.2 *Electrospinning*

El proceso de *electrospinning* se utiliza para obtener fibras a escala nano o micrométrica mediante el estiramiento coaxial de una solución viscoelástica. A estas escalas se encuentran propiedades únicas como una relación superficie-volumen muy alta, flexibilidad en la superficie, alta porosidad, interconexión de poros y rendimientos mecánicos superiores en comparación a otras formas ya conocidas del mismo material; características que hacen de las nanofibras y microfibras materiales muy útiles para diversas aplicaciones [10].

La técnica de *electrospinning* consiste en inducir la elongación de soluciones poliméricas mediante la aplicación de campos eléctricos de alta intensidad. Cuando se aplica un campo eléctrico suficientemente fuerte, las fuerzas coulombianas superan la tensión superficial de la solución polimérica cargada, lo que resulta en la formación de un chorro fino expulsado desde el capilar hacia un colector. A medida que el chorro viaja a lo largo de la dirección del campo eléctrico, experimenta una elongación debido a fuerzas externas e internas. Durante este proceso, el chorro puede experimentar inestabilidades, lo que conduce a un movimiento no lineal. A medida que el disolvente se evapora gradualmente durante el vuelo, se forman fibras sólidas de polímero y posteriormente se depositan sobre un sustrato, generalmente de manera aleatoria [11, 12].

El proceso de *electrospinning* para la síntesis de membranas de PLGA/PCL se lleva a cabo en el dispositivo "Mecc NANON-01B" durante 3 horas usando un volumen de 1 ml por hora. El voltaje al que se somete la disolución es de 15kV. Se usa como sustrato papel de horno o papel de aluminio. Se usa una aguja de 22 gauge, una jeringa de 5ml, un cable de plástico, dos piezas de unión de plástico, una pieza metálica y de las herramientas de protección de laboratorio necesarias como bata, guantes y gafas de protección.

Para la preparación del sistema de *electrospinning* como se muestra en la Figura 3: Dispositivo para la realización de electrospinning. En la imagen aparecen ya colocadas las diversas piezas necesarias para comenzar la síntesis de la membrana. se une a ambos lados del cable las piezas de unión de plástico, a un extremo se le coloca la pieza metálica y a esa pieza se le añade la aguja, mientras que al otro extremo se une la jeringa. Cada extremo se asegura mediante el uso de film de laboratorio para asegurar que no haya fugas de la disolución. Se introduce la disolución en la jeringa y se coloca el dispositivo completo en la máquina de *electrospinning* según se indica por el fabricante. Sobre el colector se coloca el papel de horno o de aluminio para recoger las fibras.



*Figura 3: Dispositivo para la realización de electrospinning. En la imagen aparecen ya colocadas las diversas piezas necesarias para comenzar la síntesis de la membrana.*

Después de las tres horas se desmonta todo lo colocado en el *electrospinning* limpiando cada una de las piezas reusables con acetona y desechando las no reusables. Además, para no perder el material se trata de recuperar toda la disolución que no haya sido utilizada durante el *electrospinning*. El sustrato con la membrana resultante se coloca durante al menos 24 bajo una campana de extracción de humos para su secado y completa evaporación del disolvente. La membrana posteriormente será almacenada en un lugar limpio y seco, además de apropiadamente etiquetado.

### 3.2.3 Proceso de recubrimiento

Se crea primero una solución tampón con el objetivo de mantener un pH constante entre 8.5 y 9. Para ello en un recipiente se prepara una solución de (hidroximetil) Metilamina (TRIS) en agua destilada al 10mM y se agita hasta tener una mezcla homogénea, después se ajusta el pH a 8.5 si es necesario con NaOH o HCl ya que sino no se iniciará la reacción al añadir la polidopamina. Una vez la reacción ha sido ajustada se añade la polidopamina en una concentración de 2mg/ml.

Una vez la disolución está preparada la reacción comenzará inmediatamente por lo que es necesario añadirla sobre la membrana de forma que quede en el interior de un Petri donde estén colocadas las muestras que se quieren recubrir tratando de asegurar que estas muestras estén completamente sumergidas. Posteriormente se debe de dejar las muestras en PDA incubando a temperatura ambiente durante 24 horas.

Tras la incubación se extraen las muestras de la solución de PDA colocándolas en un Petri y añadiendo agua desionizada para limpiar cuidadosamente la superficie de las muestras, repitiendo este proceso tantas veces como sea necesario sin dañar las muestras (2 o 3 lavados). Posteriormente se deja secar las muestras a temperatura ambiente entre 12 y 24 horas y asegurándose de que están completamente secas antes de usarlas.

### **3.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Para este tipo de microscopía se incide en la muestra con un haz de electrones generando diferentes señales que permiten identificar diferentes características de las muestras, estas señales son: electrones secundarios, rayos X y electrones retrodispersados. El haz atraviesa las diversas lentes y realizando un barrido a lo largo de la muestra mediante bobinas de barrido. Un detector contará el número de electrones secundarios de baja energía que hayan sido emitidos por cada punto de la superficie de la muestra. [13]

Se hace uso del dispositivo “Thermoscientific SEM Apreo 2” en el que se toman imágenes de las superficies de las membranas y de su sección transversal. Estas imágenes se utilizarán más tarde para medir el diámetro de las fibras, el tamaño de sus poros y el grosor de la membrana. Se toman tres imágenes de la superficie de cada una de las membranas y dos o más del perfil. Para realizar las medidas se hace uso del software ImageJ, obteniendo cincuenta medidas de cada muestra para el diámetro de fibra y los poros teniendo un total de ciento cincuenta medidas.

### **3.2.5 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier**

En los interferómetros de Michelson el haz de radiación proveniente de la fuente es dividido mediante un espejo semipermeable en dos haces parciales que son reflejados en dos espejos, uno fijo y otro móvil, vuelven al espejo semipermeable y son recombinados en interferencia. El desplazamiento del espejo móvil cambia el camino óptico de ese lado del interferómetro creando una diferencia de fase entre haces y de ese modo un cambio en la amplitud de la interferencia. La intensidad de señal llegada al detector tras pasar a través de la muestra es representada como función de la diferencia entre la trayectoria de los dos haces, lo que es conocido como interferograma. Mediante una radiación monocromática se obtiene una señal coseno, que en caso de caminos ópticos idénticos en ambos lados da una interferencia constructiva en la que no se encuentra una diferencia de fase entre haces dando una intensidad máxima. Si la fuente suministrara diferentes radiaciones el patrón de interferencia corresponderá a la suma de las señales generadas por las frecuencias individuales. Este proceso proporciona información acerca de la respuesta por parte de la muestra a las frecuencias usadas en el rango de estudio. La transformada de Fourier de las ondas complejas traducidas a

frecuencias e intensidades proporcionará la información de la composición del material analizado [14].

Este método, al igual que la espectroscopía Raman, se usa para determinar las diferencias composicionales entre las membranas antes y después de su recubrimiento con PDA con la intención de determinar el correcto recubrimiento de las membranas.

Los picos que muestran los grupos funcionales del polímero PLGA son los siguientes:

Grupo funcional	Banda correspondiente (cm <sup>-1</sup> )
Grupo final OH	3450 – 3500
Estiramientos del enlace C-H	2885 – 3010
Estiramiento del enlace C=O	1762.2
Estiramiento del enlace C-O	1186 – 1089
Flexiones del enlace C-H	1450 – 850

*Tabla 1: Picos de los grupos funcionales del PLGA en el análisis FTIR [15].*

En el caso del polímero PCL los picos de sus grupos funcionales en el análisis FTIR son:

Grupo funcional	Banda correspondiente (cm <sup>-1</sup> )
Estiramiento asimétrico grupo CH <sub>2</sub>	2949
Estiramiento simétrico grupo CH <sub>2</sub>	2865
Estiramiento grupo carbonil	1727
Estiramiento en fase cristalina de grupos C-O y C-C	1293

Mario Peláez Morales

Grupo funcional	Banda correspondiente (cm <sup>-1</sup> )
Estiramiento asimétrico grupo COC	1240
Estiramiento grupo OC-O	1190
Estiramiento simétrico grupo COC	1170
Estiramiento en fase amarga de grupos C-O y C-C	1157

Tabla 2: Picos de los grupos funcionales del PLGA en el análisis FTIR [16].

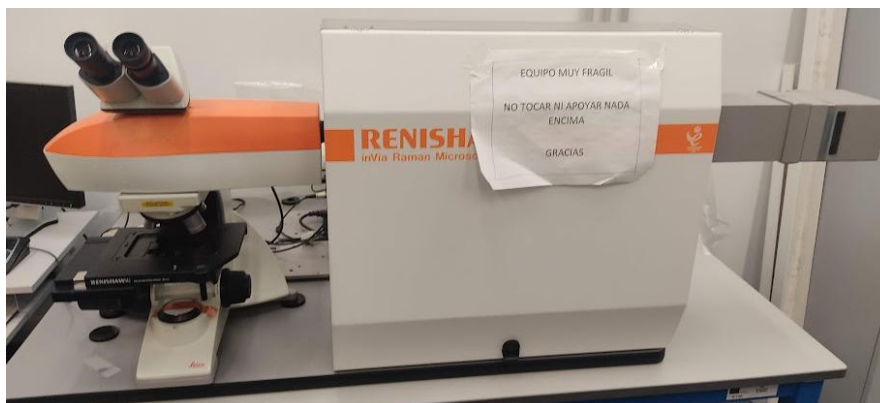
Para la polidopamina los picos de los grupos funcionales son los siguientes:

Grupo funcional	Banda correspondiente (cm <sup>-1</sup> )
Grupo N-H y O-H	3520
Grupos C-H	2962, 2925, 2852
Grupo C=O	1723
Grupo C=C	1580

Tabla 3: Picos de los grupos funcionales del PLGA en el análisis FTIR [17].

### 3.2.6 Espectroscopía Raman

El efecto Raman ocurre al iluminar una sustancia cualquiera y recolectar la luz que reemite haciendo posible describir su composición química. La espectroscopía Raman es un método usado para estudiar muchos enlaces químicos siendo especialmente sensible en el estudio de los enlaces principales de las cadenas de los polímeros [18].



*Figura 4: Dispositivo de espectroscopía Raman.*

La espectroscopía Raman se utiliza para determinar la diferencia de composición química de las membranas tras el recubrimiento de PDA para determinar el correcto recubrimiento de estas. Se hace uso del dispositivo “Renishaw inVia Raman microscope”.

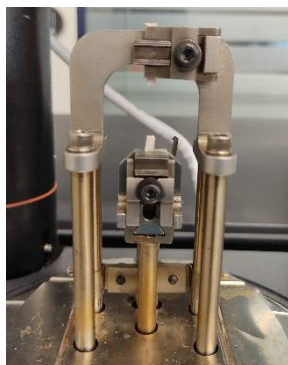
### **3.2.7 Ángulo de contacto**

Las pruebas de ángulo de contacto son usadas para la caracterización de propiedades fundamentales de la superficie de materiales sólidos o para el estudio de propiedades efectivas del material en su estado natural. El ángulo de contacto mide el ángulo entre la tangente de la superficie de la gota en la línea de contacto y la superficie del material. Esta medida se puede usar para medir la energía en la superficie, la permeabilidad o la adhesión a de materiales con una baja energía en la superficie [19].

En este proyecto esta prueba se realizará para medir si las membranas sintetizadas son o no hidrofóbicas antes y después de realizar el recubrimiento con PDA. Para realizar las pruebas se hace uso del dispositivo “Krus DSA25 Drop Shape Analyzer”.

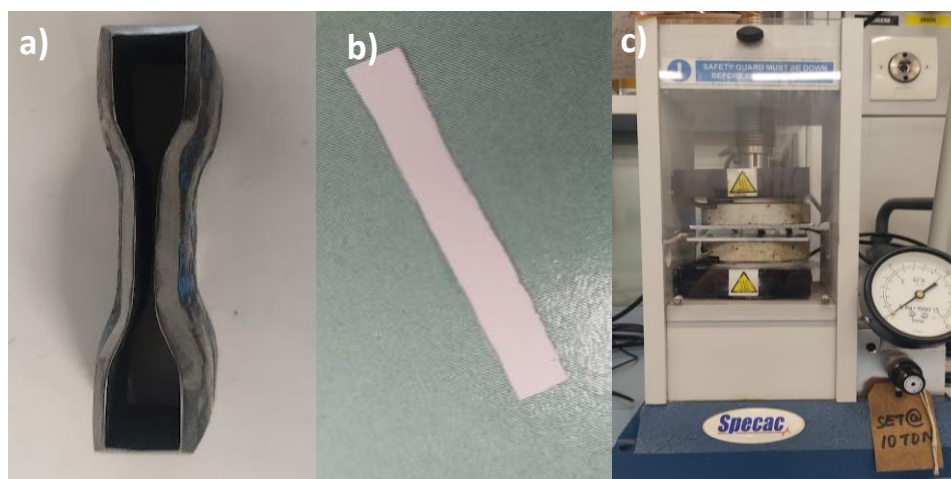
### **3.2.8 Ensayos de tracción**

Se realiza para obtener los comportamientos elástico y plástico de la membrana, así como la elongación del material antes de la rotura, el módulo de Young del material y registrar la fuerza realizada sobre él, además de poder determinar si sufre una deformación elástica o plástica al terminar el ensayo.



*Figura 5: Dispositivo DMA usado para la realización de los ensayos de tracción. Se puede observar en la imagen una muestra rota como ejemplo de la realización del ensayo.*

Se hace uso del dispositivo DMA (Dynamic Mechanic Analysis) "TAInstruments DMA Q800". En él se colocan muestras rectangulares de 24 mm de largo, 3 mm de ancho y el grosor se determina tras el procesamiento de las imágenes tomadas con SEM. Para cortar las muestras se utiliza la prensa "Specac" y un molde metálico con una forma normalizada para dichos ensayos de tracción obteniendo cuatro muestras por membrana sintetizada. La velocidad de tracción se establecerá a 0.8N/min con una tensión máxima de 18N.



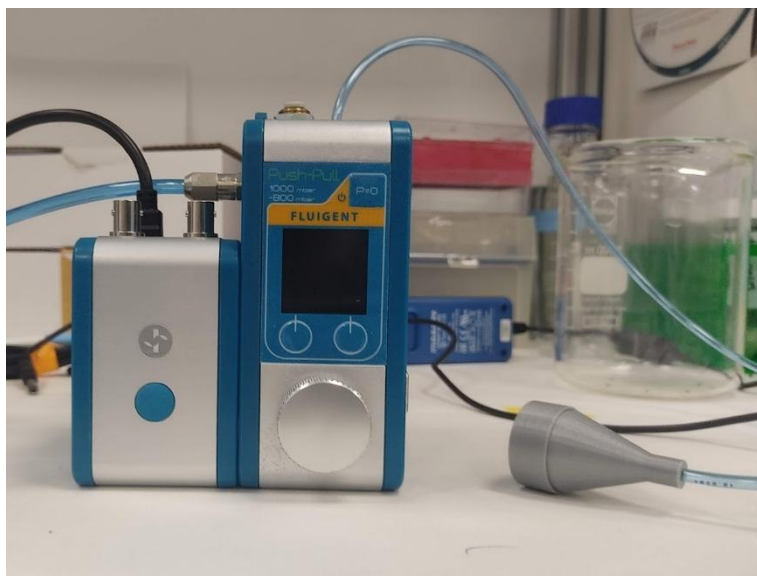
*Figura 6: a) Molde empleado para el corte de las membranas, del cual únicamente se emplea la zona central. b) Muestra de la membrana cortada para ensayos mecánicos. c) Prensa hidráulica "Specac" empleada para realizar el corte de las muestras de tracción.*

### 3.2.9 Presión de ruptura

Para la realización de esta prueba se usa un método creado por el equipo del proyecto BIOMET4D. Durante el ensayo, la presión ejercida sobre la muestra incrementa de manera

controlada a lo largo de un tiempo determinado, mediante un dispositivo fabricado por impresión 3D que permite fijar la membrana de forma segura [6].

La prueba se lleva a cabo usando el sistema Oxygen de Fluigent, junto con el dispositivo de medición y control de presión Push-Pull, un compresor de aire y un soporte diseñado mediante impresión 3D para la sujeción de la membrana. Mediante el software de control, se programa un incremento de presión controlado hasta alcanzar 1000mbar, mantenido durante cuatro minutos. El soporte impreso en 3D está compuesto por dos partes: una base inferior, que asegura la correcta posición de la membrana, y una pieza superior que estabiliza el conjunto durante el ensayo. Para evitar fugas de aire, se interpone un pequeño recorte de plástico proveniente de un guante entre la membrana y la base inferior del soporte actuando como barrera adicional de sellado, dada la naturaleza porosa del material de la membrana.



*Figura 7: Dispositivo encargado de realizar la medición de la presión aplicada a las membranas. En la imagen aparece también, en el perfil inferior derecho de color gris, el dispositivo de sujeción de las membranas*

Para el desarrollo del experimento el dispositivo de sujeción se conecta mediante un tubo por la parte inferior al sistema de presión y se revisa que no haya fugas de aire. Para determinar la finalización del experimento en el programa se muestra una bajada de la presión una vez que la membrana no sea capaz de soportar más la presión. Para la segura realización de las pruebas de presión de ruptura se debe de observar que la calibración sea correcta además de que todas las conexiones estén aseguradas para prevenir la salida accidental de altas presiones.

El valor de la presión de ruptura se determina mediante el cálculo de la presión radial que afecta a la superficie de la esfera que forma la membrana a lo largo del experimento. Para este cálculo se tienen en cuenta la presión  $p$ , el radio de la esfera formada por la membrana en el momento antes de la ruptura  $r$  y el grosor de la membrana  $t$  [20]. Como el experimento se lleva a cabo usando un recorte de plástico para evitar las fugas de aire se considerará la presión máxima soportada por la membrana como la diferencia de la presión máxima en el momento de ruptura y el mínimo que aparece tras la ruptura.

$$\sigma = \frac{pr}{2t}; \Delta\sigma = \frac{1}{2t} \left( r\Delta p + p\Delta r + \frac{pr}{t}\Delta t \right) \text{ MPa} \quad \text{Ec. 1}$$

### 3.2.10 Test de expansión

Se coloca la muestra sobre una estructura creada por impresión 3D con polímeros biodegradables con el objetivo de observar cuanta presión es capaz de aguantar la membrana causada por la extensión de la estructura 3D y cuánto puede llegar a extenderse [6].

Se hace uso de dos estructuras con forma de anillo con perforaciones para el paso de agua, uno más pequeño que se amarra a una placa cuadrada mediante un adhesivo sirviendo de base para la prueba.

Encima del anillo pequeño se coloca la membrana a analizar asegurándose de que está tensionada de manera uniforme a lo largo del anillo sin que haya arrugas. El anillo más grande se coloca sobre la membrana de manera que asegure que la estructura completa esté sujeta. Con el uso de una aguja se hacen pequeñas perforaciones en la membrana que estén alineadas con los agujeros de los anillos, estos agujeros permitirán que el agua entre y salga ayudando al proceso de expansión. Se cubre la estructura completa con agua iniciando el proceso de expansión, debe de haber suficiente agua para cubrir la estructura una vez que la muestra se expanda. Se debe de tener cuidado de que la membrana no se rompa durante el procedimiento de expansión.

Se coloca una cámara grabando el proceso durante al menos dos horas y treinta minutos con la función de “time-lapse” para capturar el proceso de expansión de la membrana. Después de que pase el tiempo de la prueba se para la grabación y se examina la membrana para ver los cambios en tamaño que haya sufrido.

### 3.2.11 Cultivo celular

El cultivo comienza con la preparación de medio mediante el uso de medio basal de fibroblastos suplementado con el kit de crecimiento de fibroblastos con bajo contenido en suero y solución antimicrobiana-antimicótica al 1%. A continuación, se descongelan los dermofibroblastos neonatales humanos y se siembran en un frasco de cultivo T75 a una densidad de un millón de células, dejándolas en cultivo durante dos días. Tras este tiempo, las células se tripsinizan y se prepara la suspensión celular para la siembra sobre las membranas, utilizando una densidad de veinte mil células por membrana con un número de pase celular 6.

Para la preparación de las membranas, previamente se esterilizan mediante óxido de etileno y se montan en *transwells* diseñados para el cultivo celular. Una vez listas se colocan en placas de 12 pocillos y se humedecen con medio de fibroblastos mientras la suspensión celular es preparada.

Cuando la suspensión celular está lista, se resuspenden las células en el volumen adecuado para depositar 200µl por pocillo, conteniendo el número deseado de células por *transwell*. Luego, se incuban por treinta minutos, tras lo que se añaden lentamente 400µl adicionales de medio por las paredes del pocillo con el propósito de no perturbar la siembra.

### 3.3 Recursos requeridos

- Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).
- Policaprolactona (PCL).
- Hexafluoruroisopropanol (HFIP).
- Dispositivo de *electrospinning* “MECC NANON-01B”.
- Jeringa de 5ml.
- Tubo de plástico.
- Piezas de conexión de plástico.
- Pieza metálica.
- Aguja.
- (Hidroximetil) Metilamina (TRIS)
- Agua destilada
- Medidor de pH
- NaOH
- HCl
- Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) “Thermoscientific SEM Apreo 2”.

- Software de procesamiento de imágenes ImageJ.
- Software de procesamiento de datos Excel.
- Campanas de extracción de gases.
- Guantes.
- Gafas de seguridad.
- Bata de laboratorio.
- Báscula.
- Varilla magnética.
- Agitador magnético.
- pH-metro.
- Agua desionizada.
- Hidrocloruro de dopamina.
- Pinzas.
- Espectrómetro Raman “Renishaw inVia Raman microscope”.
- Espectrómetro FT-IR.
- Kruss DSA25 Drop Shape Analyzer.
- DMA (Dynamic Mechanic Analysis) “TAInstruments DMA Q800”.
- Prensa “Specac”.
- Molde metálico.
- Software Oxygen Fluigent.
- Dispositivo Oxygen Fluigent “Push-Pull -800 to 1000 mbar”.
- Dispositivo de sujeción de membranas para prueba de presión de ruptura.
- Estructura para la realización del test de expansión.
- Cámara.
- Medio basal de fibroblastos
- Fibroblastos dérmicos humanos neonatales.
- *Transwells*.
- Microscopio confocal.

## 3.4 Resultados del TFG

### 3.4.1 Síntesis de membranas

En un primer momento se prepararon dos soluciones una al 10% de concentración y otra al 20%. Tras la caracterización de estas membranas se consideró importante probar una solución con una concentración de 15%, una concentración intermedia ya que la solución de 10% era muy líquida y la de 20% era muy viscosa. Además, al pedir más polímero de PLGA el suministrador recomendó usar otra muestra distinta a la utilizada previamente por lo que se hicieron dos

Mario Peláez Morales

---

soluciones distintas de 15% de concentración una con PLGA 5010, mismo tipo que las soluciones de 10% y 20%, y otra con PLGA 5004.

De la disolución de 10% se obtuvieron cuatro membranas, de 20% tres membranas, de 15% con PLGA 5004 tres membranas y con PLGA 5010 tres membranas. Todas las membranas se hicieron con la misma configuración de *electrospinning* excepto con la segunda membrana de 20% ya que hubo un problema con el hilado de la membrana y se elevó el voltaje aportado a 20kV.

### 3.4.1.1 SEM

Tras la obtención de las diversas membranas se consiguieron las siguientes imágenes.

Membranas Biopore™:

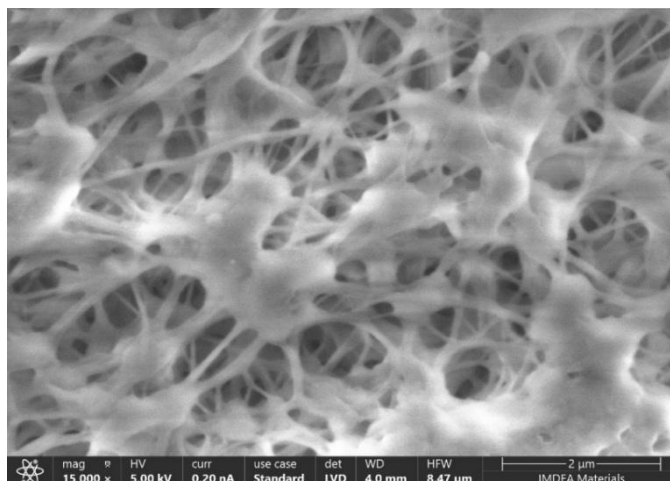
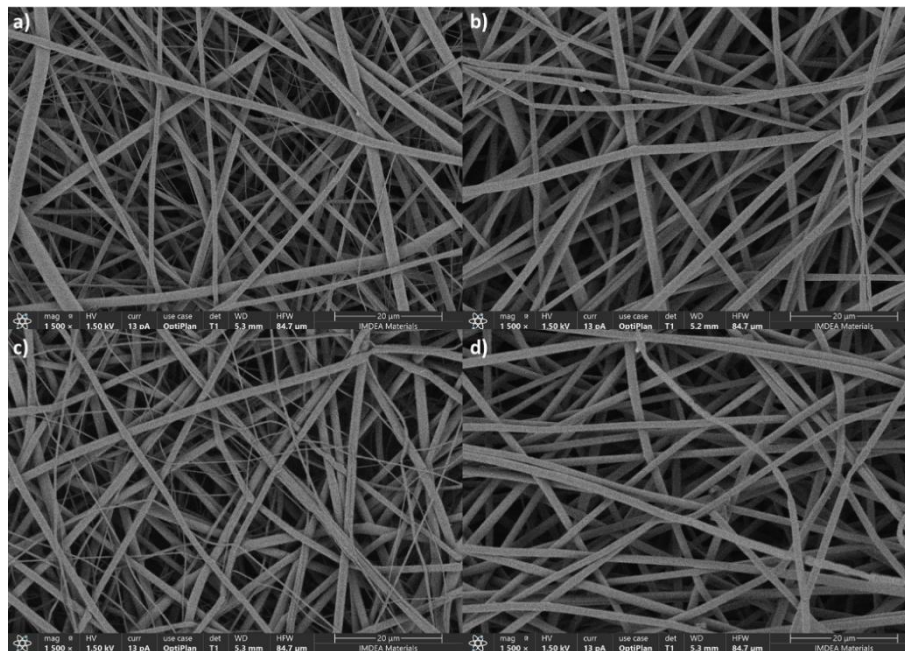


Figura 8: Imagen de la morfología de las membranas comerciales Biopore™.

El método usado para la creación de estas membranas es desconocido, pero se observó una estructura porosa, con poros de pequeño tamaño y no formada por fibras, algo no ideal para la fijación celular.

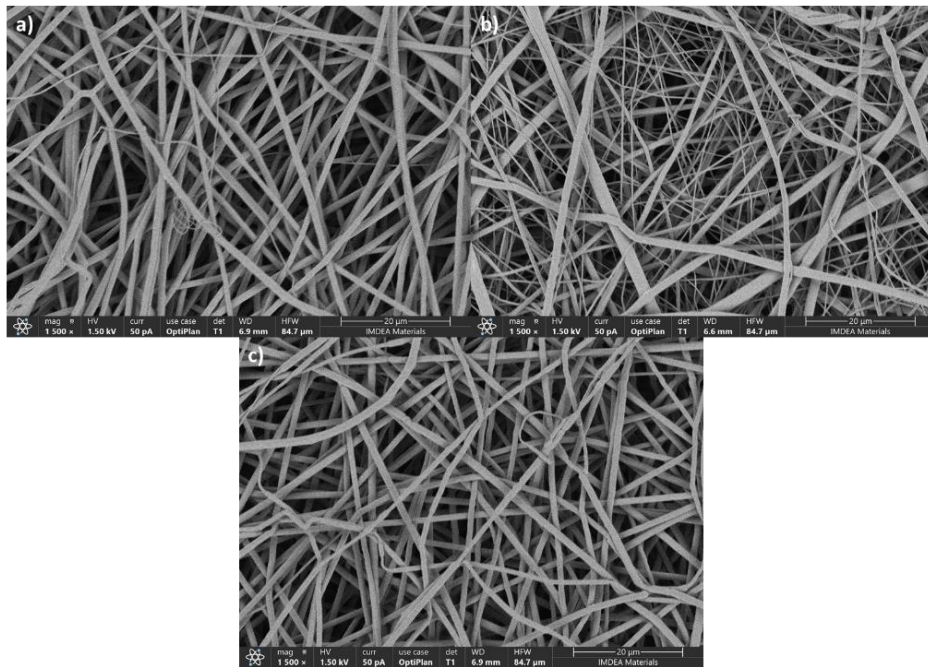
Membranas de la solución de concentración al 10%:



*Figura 9: Membranas de concentración al 10%. a) Membrana 1. b) Membrana 2. c) Membrana 3. d) Membrana 4. Scalebar: 20μm.*

Se pudo observar una estructura con fibras finas y grandes poros, pero el diámetro de las fibras pareció ser muy heterogéneo.

Membranas de la solución de concentración al 15% con PLGA 5004:

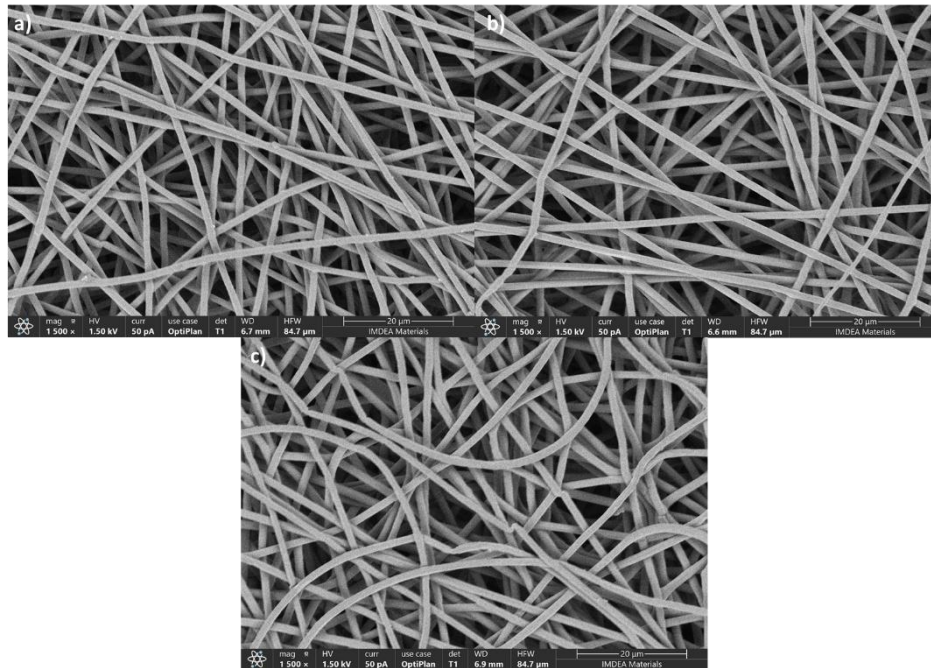


*Figura 10: Membranas de concentración al 15% 5004. a) Membrana 1. b) Membrana 2. c) Membrana 3. Scalebar: 20μm.*

Se observó una formación de fibras heterogéneas y con deformaciones, a pesar de ello, las membranas poseían una buena porosidad.

Membranas de la solución de concentración al 15% con PLGA 5010:

Mario Peláez Morales



*Figura 11: Membranas de concentración al 15% 5010. a) Membrana 1. b) Membrana 2. c) Membrana 3. Scalebar: 20µm.*

Se consiguieron membranas formadas por fibras bastante homogéneas con poros más pequeños que en las membranas obtenidas con la solución al 10% pero consistentes a lo largo de toda la membrana.

Membranas de la solución de concentración al 20%:

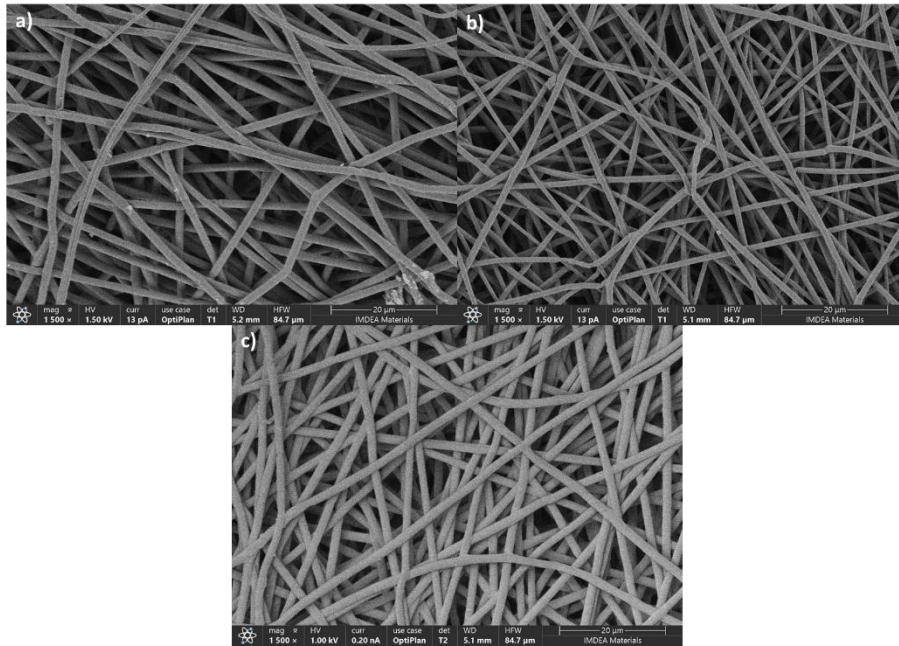


Figura 12: Membranas de concentración al 20%. a) Membrana 1. b) Membrana 2. c) Membrana 3. Scalebar: 20 $\mu$ m.

Se consiguió una formación de fibras muy homogénea, aunque de diámetro muy alto afectando al tamaño de los poros.

### 3.4.2 Recubrimiento superficial con PDA

Tras la obtención de las membranas se realizó el procedimiento de recubrimiento de polidopamina en cada una de las membranas. Y se obtuvieron imágenes mediante SEM para la observación de la morfología de las membranas tras el recubrimiento. Los resultados se muestran en la Figura 13.

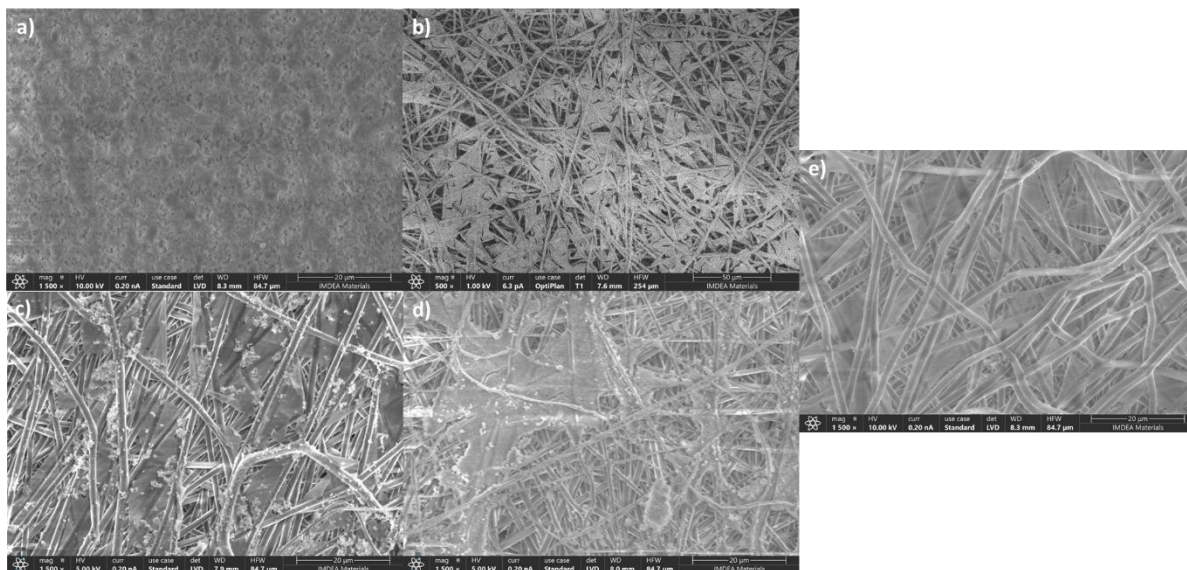


Figura 13: Imágenes de las membranas tras su recubrimiento con PDA. a) Biopore™. b) Concentración al 10%. c) Concentración al 15% PLGA 5004. d) Concentración al 15% PLGA 5010. e) Concentración al 20%. Scalebar: 20µm.

En estas imágenes se pudo observar como el recubrimiento de PDA genera una capa sobre la membrana que cierra en gran medida su porosidad. Esto indica que el recubrimiento no se realizó únicamente sobre la superficie de las fibras. Para justificar que el recubrimiento de las membranas se ha llevado a cabo, se realizaron varios análisis de las muestras que son detallados a continuación.

### 3.4.2.1 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier

Se realizaron los espectros inicialmente de membranas de 10% y 20%, así como de las muestras de PLGA, PCL y PDA y las membranas comerciales de Biopore™ tanto sin como con recubrimiento. Posteriormente se analizaron los datos teniendo en cuenta los picos característicos de cada material mostrados en la Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 3. Al no poder emplear esta técnica para observar este recubrimiento las membranas de concentración 15% no fueron evaluadas por esta técnica y se intentó detectar mediante espectroscopía Raman como se muestra a continuación.

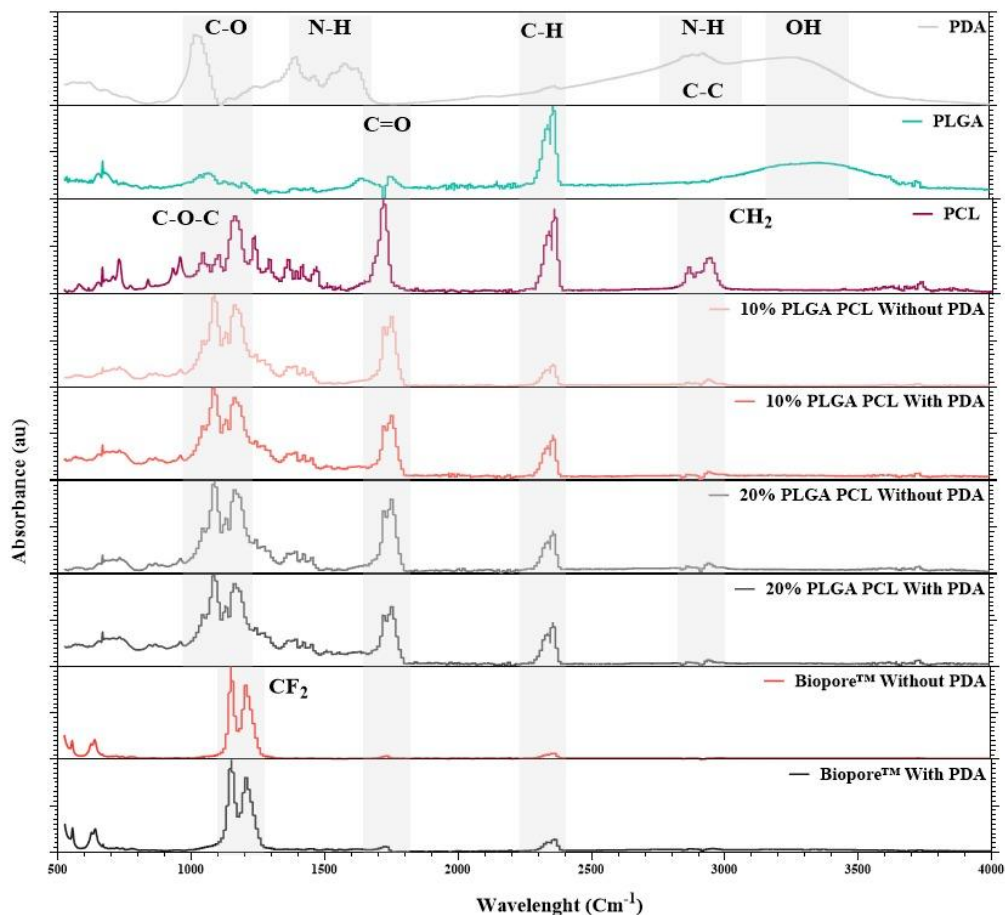


Figura 14: Gráfico resultante de la espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier. Se muestran los resultados individuales del PDA y los dos polímeros usados en la síntesis de las membranas, PLGA y PCL, además de las membranas con disolución de concentración al 10% y 20% de polímero y las membranas comerciales Biopore™ con y sin el recubrimiento de PDA.

### 3.4.2.2 Espectroscopía Raman

Debido a que con la técnica anterior no se pudo identificar la presencia del PDA por el solapamiento de las bandas en el espectro infrarrojo, se evaluaron las membranas mediante espectroscopía Raman.

Inicialmente se obtuvieron los espectros de los tres materiales que se pueden encontrar en las membranas recubiertas (PLGA, PCL y PDA). Estos espectros se emplearon para tratar de comparar el resultado de la espectroscopía entre las membranas sin y con recubrimiento buscando picos similares entre la muestra de PDA y las membranas recubiertas, y que no deberían aparecer en las muestras sin recubrir.

Mario Peláez Morales

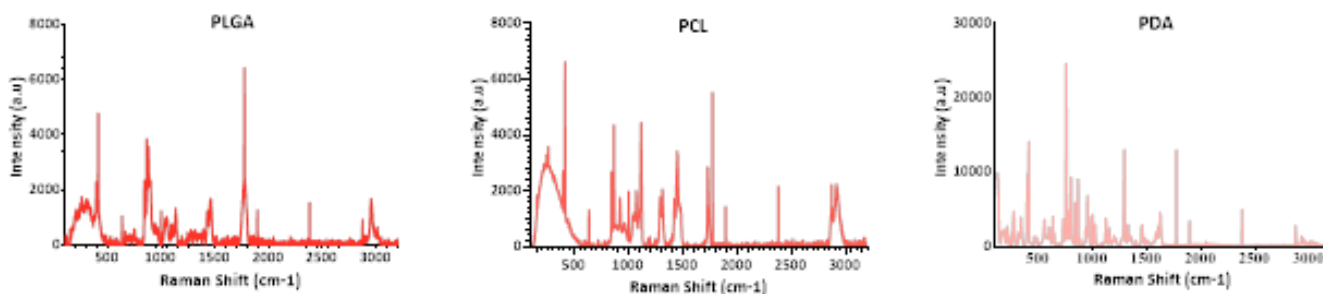


Figura 15: La figura muestra los espectros obtenidos del análisis Raman en muestras aisladas de PLGA, PCL y PDA.

Tras el análisis de las membranas se obtuvieron los siguientes resultados:

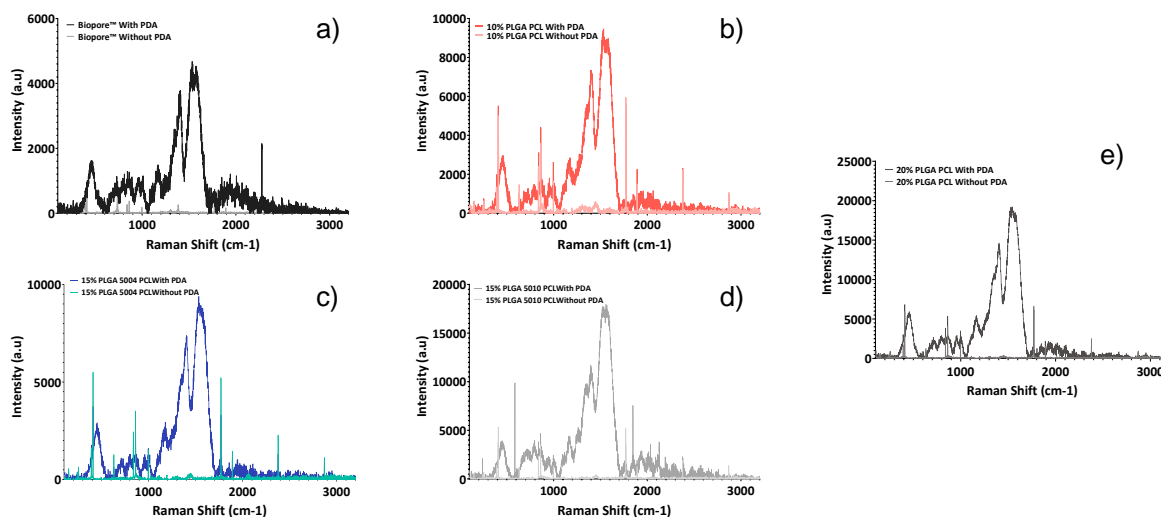
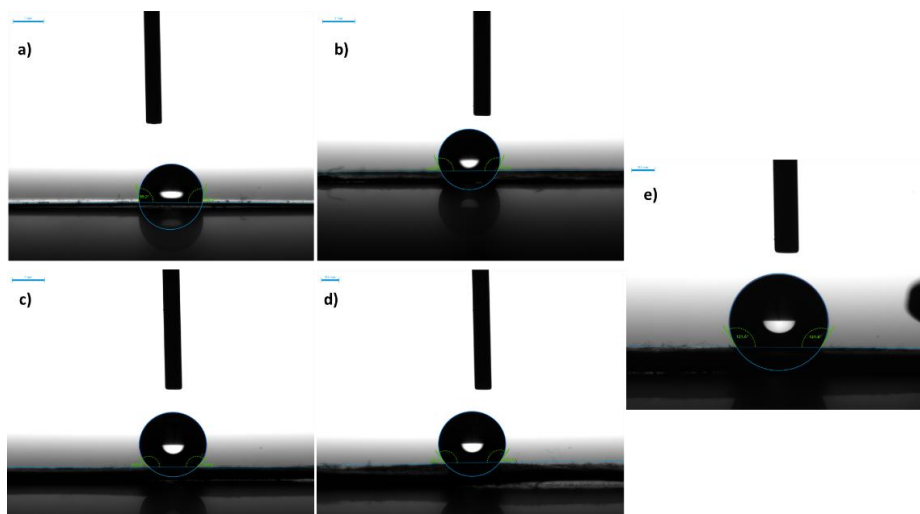


Figura 16: Resultados obtenidos tras la espectroscopía Raman de cada una de las membranas. a) Biopore™. b) Concentración al 10%. c) Concentración al 15% con PLGA 5004. d) Concentración al 15% con PLGA 5010. e) Concentración al 20%.

Estos resultados mostraron una gran diferencia entre los resultados obtenidos de las membranas con recubrimiento y sin él.

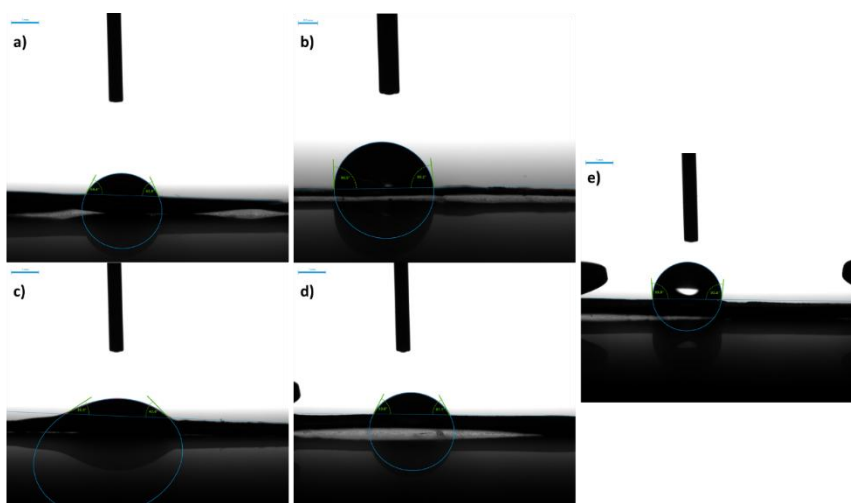
### 3.4.2.3 Ángulo de contacto

Uno de los problemas principales que se intuyeron durante el proceso de recubrimiento de las membranas y de cultivo es la naturaleza hidrofóbica de estas. Para analizarlo se hicieron pruebas de ángulo de contacto para comprobar la permeabilidad de las muestras obteniendo los siguientes resultados:



*Figura 17: Resultados del análisis de ángulo de contacto. a) Biopore™. b) Concentración al 10%. c) Concentración al 15% PLGA 5004. d) Concentración al 15% PLGA 5010. e) Concentración al 20%. Se observa la diferencia clara entre una membrana permeable como Biopore™ con las membranas hidrofóbicas que se han sintetizado a lo largo del proyecto.*

En estas pruebas cuando el ángulo que forma la gota de agua con el plano del material que se está analizando es mayor de  $90^\circ$  significa que se trata de un material hidrofóbico [19]. En la Figura 17 y la Figura 18 se puede afirmar que las membranas sin recubrimiento son hidrofóbicas ya que los ángulos que forma la gota en las membranas sin recubrimiento es mayor de  $90^\circ$  mientras que en las membranas con recubrimiento es menor de  $90^\circ$ .



*Figura 18: Resultados del análisis de ángulo de contacto. a) Biopore™. b) Concentración al 10%. c) Concentración al 15% PLGA 5004. d) Concentración al 15% PLGA 5010. e) Concentración al 20%. Se observa la diferencia clara entre una membrana permeable como Biopore™ con las membranas hidrofóbicas que se han sintetizado a lo largo del proyecto.*

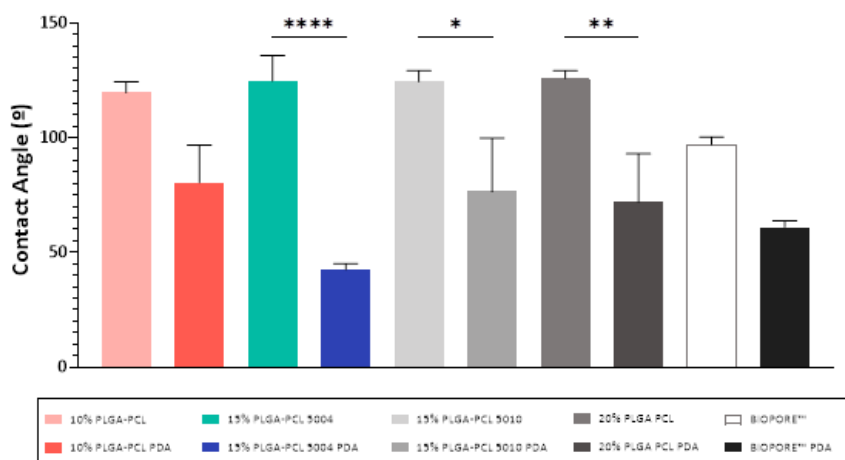


Figura 19: Ángulo medio de cada membrana tras el análisis de ángulo de contacto.

### 3.4.3 Análisis morfológico de las membranas obtenidas

Tras la obtención de las imágenes de las membranas tanto sin recubrimiento como con recubrimiento de PDA, se evaluaron tanto el diámetro de las fibras como la superficie de los poros y el grosor de las membranas de cada una de ellas. En las siguientes tablas se muestra el valor promedio de los aspectos mencionados previamente con su respectivo error.

Membranas no recubiertas con PDA			
Membrana	Diámetro fibras ( $\mu\text{m}$ )	Superficie poros ( $\mu\text{m}^2$ )	Grosor membrana ( $\mu\text{m}$ )
Biopore™	Membrana no fibrosa	$0.52 \pm 0.17$	$68 \pm 7$
10% Membrana 1	$1.33 \pm 0.25$	$21.00 \pm 12.00$	$97 \pm 13$
10% Membrana 2	$1.42 \pm 0.16$	$31.00 \pm 4.00$	$165 \pm 12$
10% Membrana 3	$1.50 \pm 0.20$	$26.00 \pm 9.00$	$58 \pm 6$
10% Membrana 4	$1.54 \pm 0.13$	$13.00 \pm 7.00$	$162 \pm 13$
15% 5004 Membrana 1	$1.22 \pm 0.15$	$8.00 \pm 3.00$	$71 \pm 12$

Membranas no recubiertas con PDA			
Membrana	Diámetro fibras ( $\mu\text{m}$ )	Superficie poros ( $\mu\text{m}^2$ )	Grosor membrana ( $\mu\text{m}$ )
15% 5004 Membrana 2	$0.89 \pm 0.30$	$3.10 \pm 1.30$	$112 \pm 4$
15% 5004 Membrana 3	$1.16 \pm 0.11$	$6.60 \pm 2.70$	$137 \pm 17$
15% 5010 Membrana 1	$1.33 \pm 0.06$	$8.00 \pm 3.00$	$132 \pm 12$
15% 5010 Membrana 2	$1.34 \pm 0.07$	$8.00 \pm 3.00$	$107 \pm 3$
15% 5010 Membrana 3	$1.43 \pm 0.06$	$9.00 \pm 3.00$	$277 \pm 4$
20% Membrana 1	$1.47 \pm 0.12$	$13.00 \pm 7.00$	$63 \pm 13$
20% Membrana 2	$1.43 \pm 0.06$	$9.00 \pm 4.00$	$75 \pm 19$
20% Membrana 3	$1.55 \pm 0.06$	$9.00 \pm 4.00$	$268 \pm 10$

Tabla 4: Valor promedio de las diversas características morfológicas de las membranas sin recubrimiento de PDA tras las mediciones.

Membranas no recubiertas con PDA			
Membrana	Diámetro fibras ( $\mu\text{m}$ )	Superficie poros ( $\mu\text{m}^2$ )	Grosor membrana ( $\mu\text{m}$ )
Biopore™	Membrana no fibrosa	$0.52 \pm 0.17$	$67.9 \pm 7.0$
10%		$26.61 \pm 3.00$	$93.8 \pm 5.0$
15% 5004		$4.17 \pm 1.09$	$109.0 \pm 4.0$
15% 5010		$8.52 \pm 1.80$	$154.9 \pm 2.2$
20%		$9.51 \pm 3.00$	$176.4 \pm 7.0$

Tabla 5: Valor promedio de las diversas características morfológicas de cada tipo de disolución usado para crear las membranas sin recubrimiento de PDA.

**MORFOLOGÍA DE LAS MEMBRANAS SIN PDA**

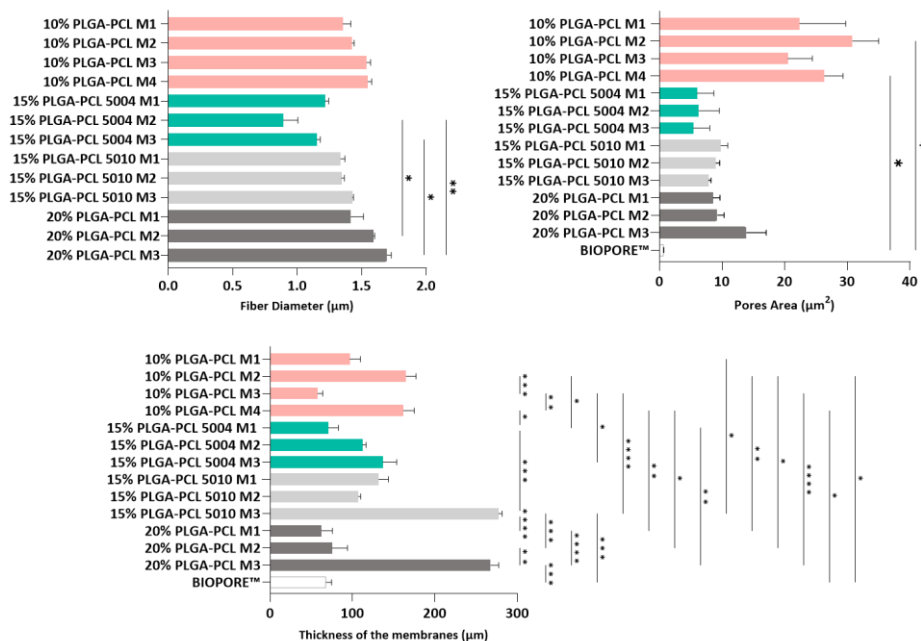


Figura 20: Representación comparativa de las membranas no recubiertas en la que se muestran los valores de diámetro de la fibra área de los poros y grosor de las membranas. Además, se muestra los resultados de un análisis ANOVA entre los resultados de cada membrana, los asteriscos representan: '\*\*\*\*'  $P < 0.0001$ , '\*\*\*'  $P < 0.001$ , '\*\*'  $P < 0.01$ , '\*'  $P < 0.05$ .

Tras la toma de imágenes se observó que en muchas de las membranas el recubrimiento de PDA tapó los poros visibles. En la siguiente tabla las casillas completadas con "N/A" son el resultado de aquellas membranas de las que no fue posible sacar los suficientes valores como para tener una muestra significativa.

Membranas recubiertas con PDA			
Membrana	Diámetro fibras (µm)	Superficie poros (µm²)	Grosor membrana (µm)
Biopore™	Membrana no fibrosa	0.028 ± 0.016	30 ± 3
10% Membrana 1	1.26 ± 0.16	0.9 ± 0.400	73 ± 24
10% Membrana 2	1.32 ± 0.17	0.52 ± 0.290	102 ± 12

Membranas recubiertas con PDA			
Membrana	Diámetro fibras ( $\mu\text{m}$ )	Superficie poros ( $\mu\text{m}^2$ )	Grosor membrana ( $\mu\text{m}$ )
10% Membrana 3	$1.15 \pm 0.29$	$1.2 \pm 0.600$	$73 \pm 15$
10% Membrana 4	$1.50 \pm 0.20$	N/A	$95 \pm 4$
15% 5004 Membrana 1	$1.11 \pm 0.13$	N/A	$82 \pm 5$
15% 5004 Membrana 2	$1.60 \pm 0.30$	N/A	$67 \pm 5$
15% 5004 Membrana 3	$1.42 \pm 0.13$	N/A	$121 \pm 13$
15% 5010 Membrana 1	$1.33 \pm 0.07$	N/A	$131 \pm 13$
15% 5010 Membrana 2	$1.40 \pm 0.07$	N/A	$101 \pm 12$
15% 5010 Membrana 3	$1.26 \pm 0.19$	N/A	$158 \pm 17$
20% Membrana 1	$1.10 \pm 0.11$	N/A	$62 \pm 13$
20% Membrana 2	$1.58 \pm 0.06$	N/A	$93 \pm 10$
20% Membrana 3	$1.64 \pm 0.05$	N/A	$175 \pm 18$

Tabla 6: Valor promedio de las diversas características morfológicas de las membranas con recubrimiento de PDA tras las mediciones.

Membranas recubiertas con PDA			
Membrana	Diámetro fibras ( $\mu\text{m}$ )	Superficie poros ( $\mu\text{m}^2$ )	Grosor membrana ( $\mu\text{m}$ )
Biopore™	Membrana no fibrosa	$0.028 \pm 0.016$	$16 \pm 3$
10%	$1.32 \pm 0.09$	$0.737 \pm 0.220$	$94 \pm 4$

Membranas recubiertas con PDA			
Membrana	Diámetro fibras ( $\mu\text{m}$ )	Superficie poros ( $\mu\text{m}^2$ )	Grosor membrana ( $\mu\text{m}$ )
15% 5004	$1.29 \pm 0.09$	N/A	$77 \pm 3$
15% 5010	$1.36 \pm 0.05$	N/A	$124 \pm 8$
20%	$1.53 \pm 0.05$	N/A	$97 \pm 7$

Tabla 7: Valor promedio de las diversas características morfológicas de cada tipo de disolución usado para crear las membranas con recubrimiento de PDA.

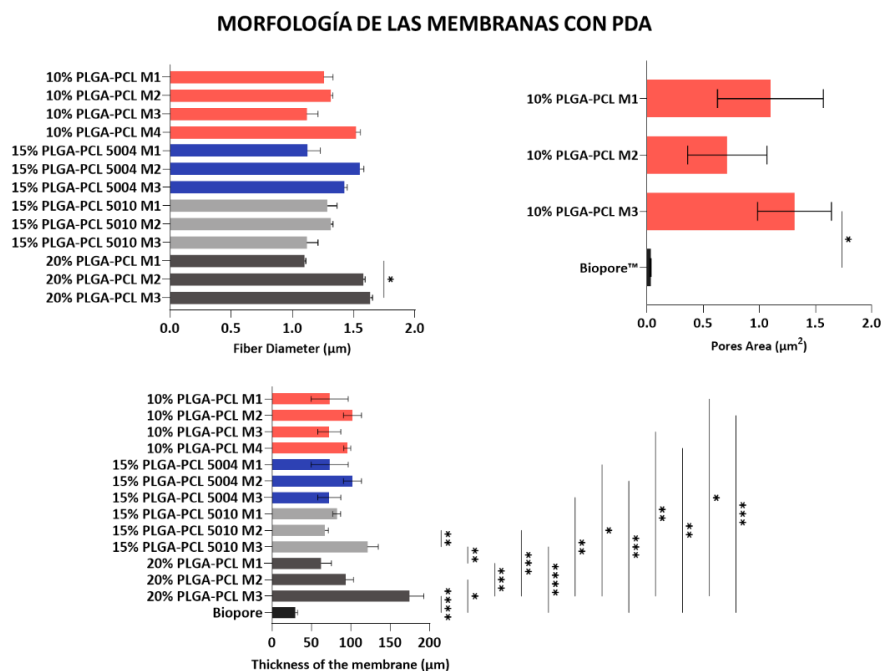


Figura 21: Representación comparativa de las membranas recubiertas con PDA en la que se muestran los valores de diámetro de la fibra área de los poros y grosor de las membranas. Además, se muestra los resultados de un análisis ANOVA entre los resultados de cada membrana, los asteriscos representan: '\*\*\*\*'  $P < 0.0001$ , '\*\*\*'  $P < 0.001$ , '\*\*'  $P < 0.01$ , '\*'  $P < 0.05$ .

### 3.4.4 Propiedades mecánicas

Tras la realización los diversos procedimientos anteriormente mencionados para la medición de las diversas propiedades morfológicas de interés para el análisis de las membranas. A

continuación, se muestran los resultados de los ensayos de tracción con el uso de un DMA, pruebas de presión de ruptura y de expansión de las membranas.

### 3.4.4.1 Ensayos de tracción

Se tomaron los resultados de tres muestras de cada membrana, se hizo uso de una cuarta en caso de fallo durante el procedimiento. Los valores en las siguientes tablas son los promedios de las medidas de cada una de las muestras de cada membrana.

Membranas no recubiertas con PDA			
Membrana	Estrés máximo (MPa)	Deformación máxima (%)	Módulo elástico (MPa)
Biopore™	11.0 ± 1.8	163 ± 9	16 ± 3
10% Membrana 1	1.75 ± 0.29	143 ± 19	33 ± 7
10% Membrana 2	1.4 ± 0.7	163 ± 14	22 ± 9
10% Membrana 3	4.9 ± 0.5	173 ± 8	103 ± 14
10% Membrana 4	3.2 ± 0.6	259 ± 50	54 ± 22
15% 5004 Membrana 1	5.0 ± 0.8	125 ± 13	129 ± 19
15% 5004 Membrana 2	5.1 ± 0.9	167 ± 19	116 ± 10
15% 5004 Membrana 3	3.27 ± 0.13	93 ± 8	93 ± 7
15% 5010 Membrana 1	4.5 ± 0.6	208 ± 90	85 ± 13
15% 5010 Membrana 2	4.8 ± 0.6	173 ± 50	97 ± 30
15% 5010 Membrana 3	2.44 ± 0.08	121 ± 60	48 ± 18

Membranas no recubiertas con PDA			
Membrana	Estrés máximo (MPa)	Deformación máxima (%)	Módulo elástico (MPa)
20% Membrana 1	13.8 ± 1.4	97 ± 18	324 ± 50
20% Membrana 2	9.89 ± 2.02	114 ± 29	254 ± 30
20% Membrana 3	5.8 ± 0.8	141 ± 60	151 ± 40

Tabla 8: Valor promedio de los valores máximos de estrés deformación y módulo elástico de las tres muestras de cada membrana sin recubrimiento de PDA.

Membranas recubiertas con PDA			
Membrana	Estrés máximo (MPa)	Deformación máxima (%)	Módulo elástico (MPa)
Biopore™	15.8 ± 0.6	258 ± 26	33 ± 2
10% Membrana 1	3.4 ± 1.2	108 ± 21	68 ± 24
10% Membrana 2	2.6 ± 1.1	93 ± 29	57 ± 40
10% Membrana 3	3.0 ± 0.7	104 ± 40	75 ± 29
10% Membrana 4	4.4 ± 0.6	116 ± 30	99 ± 14
15% 5004 Membrana 1	2.87 ± 0.11	40 ± 23	97 ± 60
15% 5004 Membrana 2	7.0 ± 1.5	77 ± 9	178 ± 30
15% 5004 Membrana 3	3.2 ± 0.5	127 ± 10	85 ± 15
15% 5010 Membrana 1	3.08 ± 0.24	103 ± 26	78 ± 21
15% 5010 Membrana 2	6.4 ± 0.8	174 ± 101	93 ± 50

Membranas recubiertas con PDA			
Membrana	Estrés máximo (MPa)	Deformación máxima (%)	Módulo elástico (MPa)
15% 5010 Membrana 3	6 ± 2	180 ± 100	131 ± 50
20% Membrana 1	11.6 ± 0.4	174 ± 70	233 ± 50
20% Membrana 2	8.1 ± 0.9	139 ± 50	178 ± 30
20% Membrana 3	7.2 ± 0.6	100 ± 40	247 ± 8

Tabla 9: Valor promedio de los valores máximos de estrés deformación y módulo elástico de las tres muestras de cada membrana con recubrimiento de PDA.

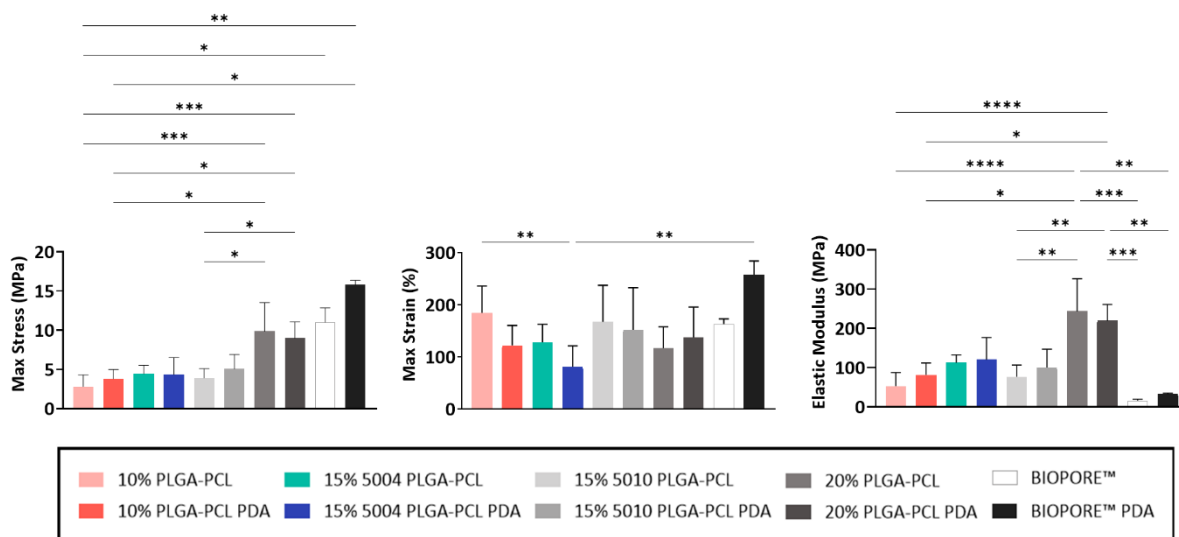


Figura 22: Representación comparativa de las membranas con y sin recubrimiento de PDA en la que se muestran los valores de estrés máximo, deformación máxima y módulo elástico. Además, se muestra los resultados de un análisis ANOVA entre los resultados de cada membrana, los asteriscos representan: '\*\*\*\*' P<0.0001, '\*\*\*' P<0.001, '\*\*' P<0.01, '\*' P<0.05.

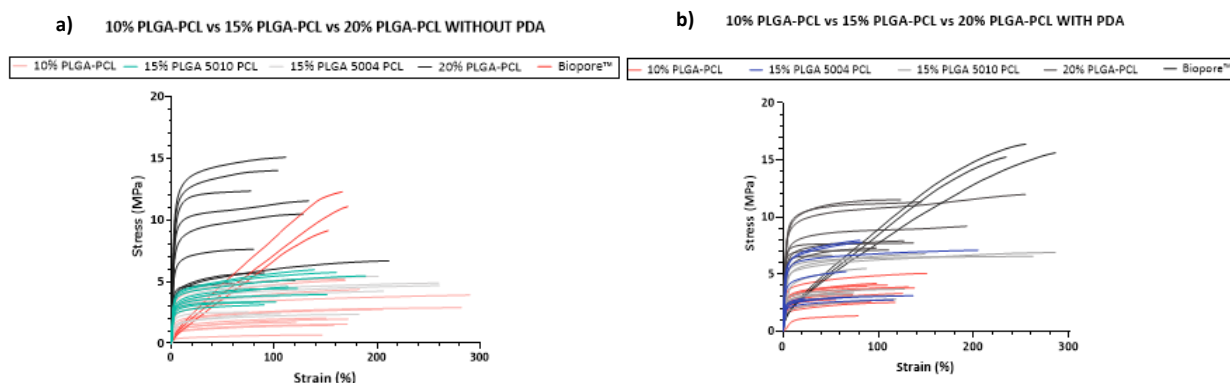


Figura 23: Gráfica resultante de los ensayos de tracción en la que se muestran todos los ensayos de cada una de las membranas utilizadas. a) Sin recubrimiento de PDA. b) con recubrimiento de PDA.

### 3.4.4.2 Presión de ruptura

Debido a la cantidad de muestra restante se tuvo que sintetizar nuevas membranas, pero solo se hizo uso de PLGA 5010. Se obtuvieron tres membranas para cada solución. Los resultados obtenidos para las pruebas de presión de ruptura fueron los siguientes:

Membranas no recubiertas con PDA				
Membrana	Presión máxima soportada (mbar)	Radio de la esfera formada (cm)	Grosor membrana ( $\mu\text{m}$ )	Presión de ruptura (mbar)
Biopore™ 1	$366.1 \pm 0.1$	$1.153 \pm 0.0002$	$68 \pm 7$	$28527 \pm 2900$
Biopore™ 2	$310.6 \pm 0.1$	$1.063 \pm 0.0002$	$68 \pm 7$	$24281 \pm 2500$
Biopore™ 3	$381.9 \pm 0.1$	$1.199 \pm 0.0002$	$68 \pm 7$	$33686 \pm 3000$
10% M1	$30.9 \pm 0.1$	$1.705 \pm 0.0002$	$139 \pm 15$	$1886 \pm 208$
10% M2	$222.8 \pm 0.1$	$1.569 \pm 0.0002$	$115 \pm 15$	$15201 \pm 1900$
10% M3	$20.2 \pm 0.1$	$1.633 \pm 0.0002$	$99 \pm 13$	$1667 \pm 220$
15% 5010 M1	$126.9 \pm 0.1$	$1.443 \pm 0.0002$	$132 \pm 14$	$6917 \pm 700$

Membranas no recubiertas con PDA				
Membrana	Presión máxima soportada (mbar)	Radio de la esfera formada (cm)	Grosor membrana ( $\mu\text{m}$ )	Presión de ruptura (mbar)
15% 5010 M2	$141.4 \pm 0.1$	$1.576 \pm 0.0002$	$146 \pm 17$	$7647 \pm 900$
15% 5010 M3	$228.5 \pm 0.1$	$1.430 \pm 0.0002$	$236 \pm 6$	$6390 \pm 170$

Tabla 10: Tabla de los valores promedio de los diversos tipos de membrana usados a lo largo del proyecto a lo largo de las pruebas de presión de ruptura. Se muestran los valores de presión máxima hasta la ruptura de la membrana (mbar), el radio de la esfera formada por la membrana antes de romper (cm), el grosor de la membrana usada ( $\mu\text{m}$ ) y la presión de ruptura (mbar).

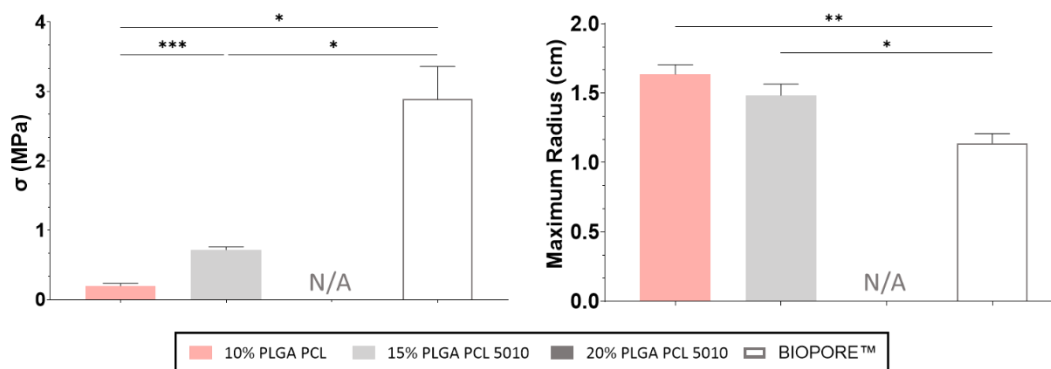


Figura 24: Valor promedio de presión de ruptura y el radio formado por las membranas justo antes de su ruptura para cada disolución preparada.

En la Figura 24 se puede observar los resultados obtenidos en estas pruebas, el valor denominado como “ $\sigma$ ” es el valor de presión de ruptura calculado para cada membrana y “Maximum Radius” es el radio máximo de la esfera conformada por la membrana justo antes de su ruptura.

### 3.4.4.3 Test de expansión

Las pruebas de expansión no se pudieron realizar debido a la ausencia de la estructura de anillos creados por impresión 3D.

### 3.4.5 Cultivos celulares

Tras la realización del cultivo de fibroblastos sobre las membranas se tomaron imágenes con SEM para la observación de forma cualitativa su morfología. Las imágenes de la figura 20 corresponden al cultivo celular de fibroblastos sobre las membranas sin recubrimiento de PDA tras 72 horas de cultivo. Posteriormente se tomaron imágenes de las membranas recubiertas con PDA para 24, 48 y 72 horas posteriores al cultivo celular. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 25 y la Figura 26.

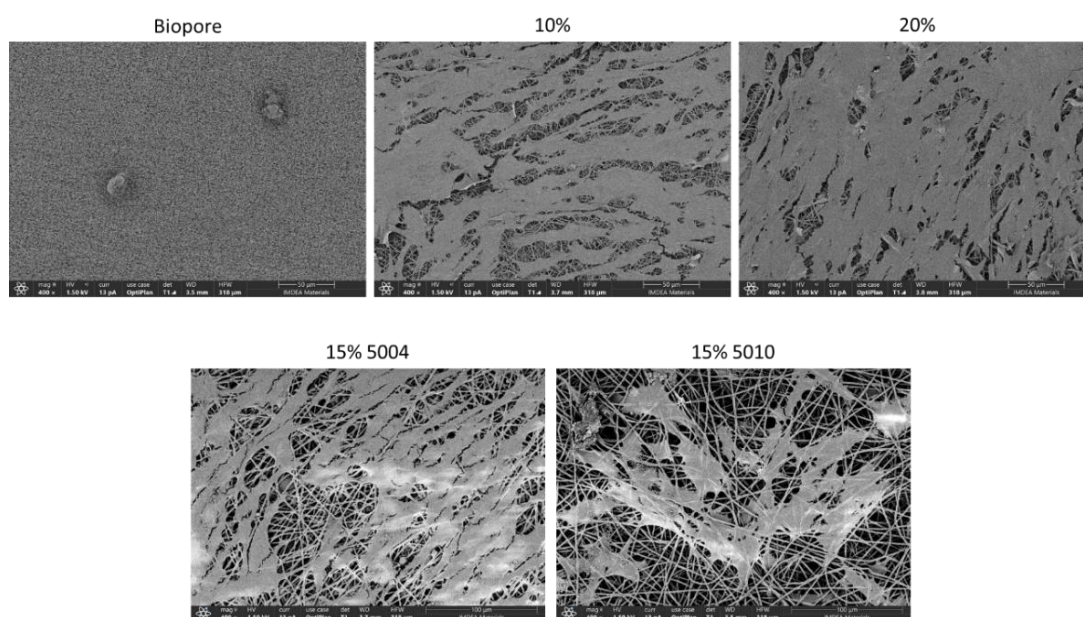


Figura 25: Resultados de los cultivos celulares en las membranas de Biopore™ y de concentración de 10%, 15% y 20% tras 72 horas.

Mario Peláez Morales

---

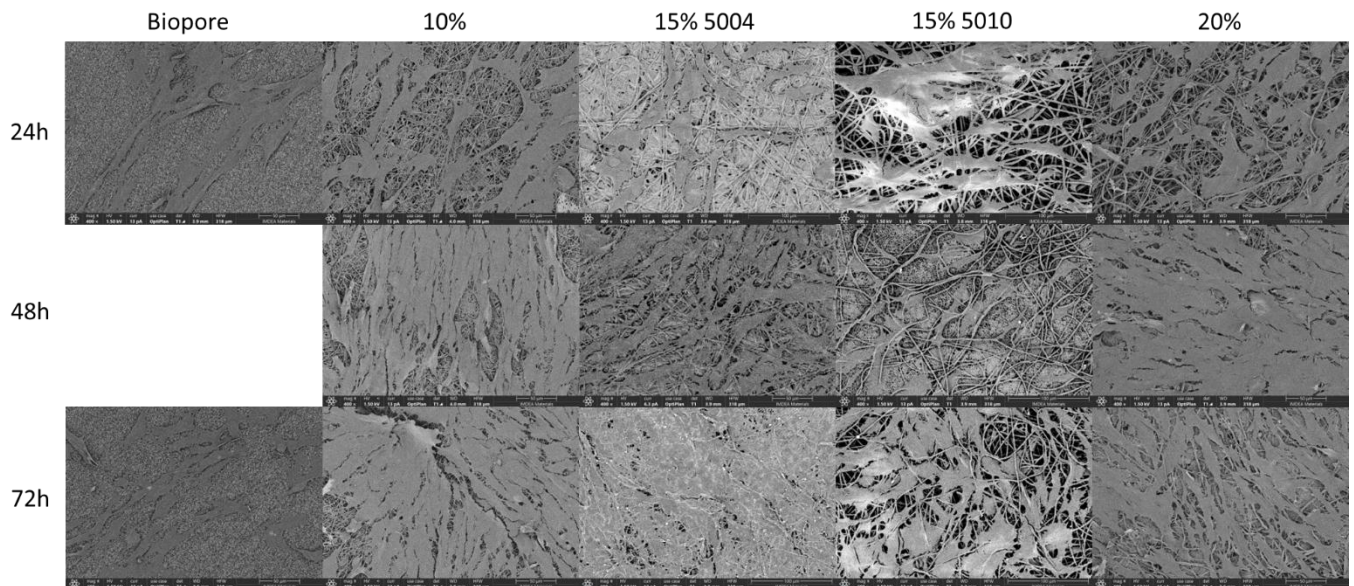


Figura 26: Resultados de los cultivos celulares en las membranas de Biopore™ y de concentración de 10%, 15% y 20% con recubrimiento de PDA tras 24, 48 y 72 horas.

## Capítulo 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Síntesis de las membranas

Cabe destacar que durante la síntesis de las membranas el funcionamiento del proceso de *electrospinning* fue muy variable y complejo. Se planteó que la falta de control de temperatura y humedad durante la síntesis podía causar problemas de formación de las fibras. Además, los problemas al iniciar el proceso de hilado hicieron aumentar el voltaje aplicado en la segunda membrana de disolución al 20% de concentración, este cambio puede afectar al diámetro de las fibras formadas [21, 22]. A pesar de ello, tras hacer múltiples ajustes al inicio de la síntesis de cada membrana se consiguió obtener resultados muy similares entre las membranas resultantes de cada disolución. Como es posible comprobar en la Figura 8, Figura 9, Figura 10, Figura 11 y Figura 12 y en la Figura 20 se consiguió sintetizar membranas conformadas por fibras de características bastante homogéneas entre las fibras de las mismas membranas además de obtener membranas porosas en las que los poros tienen una gran superficie. Tras la síntesis y observación de la morfología se pudo ver, como se estudia en el artículo de X. Liu et. Al [1], que las membranas que usan una disolución de mayor concentración forman fibras más uniformes entre ellas, así como un diámetro mayor. Como se describe por Elder et al. [2] y Bazgir et al. [3], las membranas muestran propiedades morfológicas más interesantes para el proyecto que se está realizando que otras membranas como las Biopore™ gracias a la síntesis por *electrospinning*. Tras el recubrimiento con PDA se puede comprobar en la Figura 21 que no ocurren cambios drásticos en grosor de las fibras de las membranas sintetizadas, pero sí en el grosor de las membranas.

También fue posible observar que la disolución obtenida cambiaba su viscosidad a medida que pasaba el tiempo, siendo más viscosa tras uno o dos días de sintetizar las membranas lo que podría afectar al resultado posiblemente justificando el aumento sistemático del grosor de las fibras para las últimas membranas sintetizadas de cada disolución y como resultado de una ligera evaporación del disolvente al abrir y cerrar el bote que contiene la disolución.

Al igual que se muestra en las imágenes tomadas previamente por el equipo de BIOMET4D de las membranas que sintetizaron previamente [6] se mantiene la diferencia del diámetro de las fibras según la concentración de disolución usada. La única diferencia encontrada en las síntesis a nivel morfológico es el grosor de las membranas siendo las membranas sintetizadas para este proyecto más gruesas que las realizadas anteriormente, además, las membranas anteriormente sintetizadas tenían un grosor muy heterogéneo en cada membrana probablemente causado por algún error de síntesis.

## 4.2 Análisis químico

Para comparar los espectros obtenidos, se tuvo en cuenta que la única diferencia composicional entre el PDA y los polímeros PLGA y PCL es un grupo NH por lo que es la diferencia que se busca entre las membranas recubiertas y las que no lo están. Sin embargo y como muestra la Figura 14, mediante esta técnica no fue posible identificar grandes diferencias entre los espectros de las muestras sin y con recubrimiento, esto pudo ser causado por el solapamiento de las diferentes bandas presentes en el material haciendo que los picos debidos al enlace NH no se pudieran observar. En cambio, tras el análisis de espectroscopía RAMAN en la Figura 16 sí que se pueden observar diferencias significativas que afirman la existencia de un recubrimiento de las membranas con PDA con picos alrededor de  $1600\text{ cm}^{-1}$  que pueden corresponder con este recubrimiento [23].

## 4.3 Propiedades mecánicas

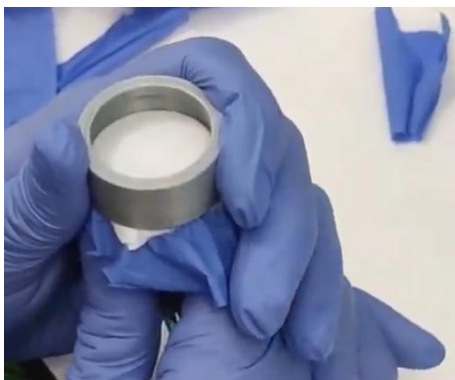
En las pruebas de tracción se llegó a conseguir resultados consistentes para las diferentes muestras de cada membrana como se puede observar en la Figura 22. Si bien se usaron para los resultados tres muestras para cada membrana, para alguna de ellas se necesitó obtener más muestras. Se observó que muchas de las fracturas de las muestras ocurrieron muy cerca de las mordazas que sujetaban las muestras lo que puede alterar las características reales de las membranas. Estos problemas con los resultados se asociaron a las malas condiciones del filo del molde utilizado para obtener las muestras. En la Tabla 8 y la Tabla 9, la Figura 22 y la Figura 23 se muestra una mejora de las propiedades mecánicas de las membranas tras el recubrimiento. Las membranas muestran un módulo elástico variable según la disolución utilizada, las membranas con el módulo elástico más alto son las conseguidas con la disolución de 20% de concentración llegando hasta  $324 \pm 50\text{MPa}$ . Las membranas sintetizadas con las disoluciones de 10% y 15% con PLGA 5010 presentan los módulos de elasticidad más bajos, aunque se pueden encontrar altos valores como en la membrana 3 de la concentración de 10% con un valor de  $103 \pm 14\text{MPa}$ . Es destacable la diferencia entre las membranas de PLGA/PCL y las Biopore™, teniendo estas últimas un módulo de elasticidad de  $16 \pm 3\text{MPa}$ , mucho menor que la mayoría de las membranas sintetizadas.

Al comparar estos resultados a los resultados obtenidos previamente por el equipo de BIOMET4D [6], se observa que los nuevos resultados son muy similares a los anteriores, aunque las nuevas membranas muestran mayor capacidad de soporte de estrés y de elongación, pero un menor módulo de Young. También la piel muestra un módulo de Young que puede oscilar entre 0.4MPa y 2MPa dependiendo de las condiciones de la piel [24], aunque también se

encuentran algunos estudios que establecen el valor para la piel en la dermis e hipodermis en pocos kilopascuales [25], por lo que las membranas que se han sintetizado muestran unas propiedades elásticas mucho más altas que la piel llegando hasta cientos de megapascuales.

Las pruebas de presión de ruptura tuvieron diversos problemas, el primero fue la incapacidad de realizar varias pruebas para cada membrana debido a la ausencia de material suficiente. El segundo problema observado guarda relación con el montaje para la realización de la prueba, el dispositivo de sujeción realizado por impresión 3D cuenta con un pequeño espacio entre las dos piezas para la posibilidad de la colocación entre estas de la membrana como de la porción de guante que previene el escape de aire. Además, debido a la ruptura de varias de las muestras de las disoluciones al 15% se tuvieron que hacer dos medidas, una para cada tipo de PLGA, con membranas de nueva síntesis con una segunda disolución de cada tipo. Durante la ejecución de los experimentos se observó que, para las membranas de mayor grosor, el espacio en el dispositivo de sujeción era tan pequeño que al colocar la membrana esta se quebraba. Se encontró una solución a este problema que consistió en la colocación parcial del dispositivo de sujeción y la sujeción manual de la estructura durante la duración del experimento como se ve en la Figura 27. Para poder realizar las pruebas correctamente y poder obtener el valor del radio estipulado en la Ec. 1 se imprimieron nuevos anillos de sujeción que permitieran realizar el montaje sin quebrar las membranas, además de necesitar sintetizar nuevas membranas para cada disolución aunque solo se hizo uso del polímero PLGA 5010 ya que tras hacer el estudio morfológico de las membranas con PLGA 5004 se descartaron. Tras ello se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 10

Fue imposible realizar estas pruebas con las membranas de concentración al 20% debido a que el límite de 1000 mbar no era suficiente para romper estas membranas.



*Figura 27: Remedio utilizado para la sujeción de las membranas durante las pruebas de presión de ruptura.*

#### 4.4 Cultivo celular

Cabe destacar que, para el desarrollo del análisis de los resultados de la caracterización biológica, únicamente se llevó a cabo un estudio cualitativo por imagen. Antes de la realización de los cultivos celulares y tras hacer unos experimentos preliminares y obtener una baja adhesión de células a la superficie, se decidió usar un recubrimiento de PDA que, en base a la bibliografía, incrementa la adhesión celular [23]. En las imágenes obtenidas por SEM después del cultivo de los dermofibroblastos neonatales humanos, se puede observar en la Figura 25 como para las membranas no recubiertas y a diferencia del estudio preliminar, en esta replica y las 72h de cultivo la adhesión celular era buena y con una morfología celular con el citoesqueleto bien estirado sobre la superficie de la membrana. No obstante, y como se muestra en la Figura 26 en el caso de las muestras con PDA la adhesión celular es mejor incluso desde las 24h incrementando la proliferación y por tanto la densidad celular sobre la membrana con el tiempo de cultivo. También se demostró que, tanto sin el recubrimiento como con él, el cultivo celular es mejor que en el control positivo de las membranas comerciales Biopore™.

Se observaron complicaciones durante el procedimiento del cultivo relativas a la hidrofobia de las membranas, que mejoró con el recubrimiento de PDA. Al aplicar el recubrimiento en todas las membranas se pudo observar la mejora de la adhesión celular en todos los casos, sobre todo observado en las membranas Biopore™, pero también notable en las membranas de PLGA/PCL confirmando las conclusiones obtenidas por Bazgir et al. [4].

## Capítulo 5. CONCLUSIONES

### 5.1 Conclusiones del trabajo

Durante la realización de este proyecto se consiguió desarrollar membranas híbridas de los polímeros biocompatibles PLGA y PCL obteniendo como resultados membranas conformadas por fibras de tamaños homogéneos y de propiedades similares. Se consiguió recubrir las membranas con PDA para mejorar la fijación de células en ellas y se completó un análisis químico para afirmar el correcto recubrimiento. Se hizo un estudio de las propiedades mecánicas de las membranas concluyendo que son muy elásticas y capaces de deformarse ampliamente. Por último, tras la realización de los cultivos celulares sobre las células se observó una buena capacidad de proliferación de las células en las membranas mejorando aún más tras el recubrimiento de las membranas con PDA.

Las fibras de las membranas obtenidas tienen un diámetro de entre 1 y 2 $\mu\text{m}$ , conformando unas estructuras porosas con poros que superan los 4 $\mu\text{m}^2$ , en el caso de las membranas Biopore™ cuentan con poros más pequeños, cualidad que perjudica la fijación celular. Las membranas sintetizadas cuentan con un alto grosor que llega a alcanzar los 277 $\mu\text{m}$  provocado por el método de síntesis y la cantidad de disolución usada para cada membrana.

Las membranas sintetizadas a pesar de su alta porosidad son muy hidrofóbicas, condición que mejora con el recubrimiento realizado con PDA mejorando las condiciones del cultivo celular en las membranas.

Las membranas presentaron un módulo de Young alto y por lo tanto una alta elasticidad, mayor que las membranas Biopore™, además de una alta capacidad de deformación llegando en ocasiones a deformarse hasta un 250% del tamaño original de la muestra, aunque tanto el estrés que son capaces de soportar y la elongación máxima es menor que en estas membranas comerciales. En cambio, estas propiedades se ven afectadas tras el recubrimiento con PDA mejorando el estrés máximo soportado por las membranas.

Los resultados de las pruebas de presión de ruptura revelaron la menor capacidad de soporte de presión por parte de las membranas sintetizadas en comparación a las membranas Biopore™ a pesar de su gran diferencia de grosor.

Tras el proceso de cultivo celular se comprobó que las células son capaces de fijarse y proliferar en las membranas sintetizadas mejor que en las comerciales, pero esta capacidad mejora con el recubrimiento de PDA.

## 5.2 Conclusiones personales

Este trabajo ha supuesto una aproximación al campo de la investigación importante para mí. Me ha descubierto el mundo científico y las grandes personas que hay en él. Me ha dado la capacidad de aplicar diversas técnicas que he estudiado a lo largo de la carrera como el método de *electrospinning* o los ensayos de tracción. He tenido la posibilidad de unir los dos campos de la ciencia que más aprecio, la física y la biología, en un proyecto que de ser continuado y mejorado en un futuro puede suponer un avance favorecedor a la medicina.

## Capítulo 6. FUTURAS LÍNEAS DE TRABAJO

Sería beneficioso para la realización sistemática de las diversas membranas la obtención de un dispositivo de *electrospinning* con el que sea posible tener control sobre la temperatura y humedad en el interior del dispositivo. También se podría estudiar cómo controlar la viscosidad de la disolución a lo largo del tiempo que se sintetizen todas las membranas de la misma concentración.

El correcto recubrimiento de las membranas mediante el uso de PDA es un paso importante para la mejor fijación de los fibroblastos en las membranas por ello un posible paso a seguir sería estudiar cómo mejorar la permeabilidad de las membranas con la intención de que el PDA recubra las fibras de manera individual en vez de recubrir las membranas tapando los poros necesarios para la fijación de las células como ocurre en los ejemplos de la Figura 13.

Para la mejor realización de las pruebas de tracción se necesitaría mejorar las condiciones del molde metálico usado para cortar las muestras. También sería favorecedor la obtención de más muestras para comparar los datos de manera más extensa y con mayor precisión.

En las pruebas de presión de ruptura se debería de revisar el diseño de la estructura de sujeción debido al alto grosor de las membranas. Para prevenir problemas con el ancho de las membranas. Se podría también plantear una forma de sintetizar estas membranas haciéndolas más anchas. Una posibilidad sería utilizar durante la síntesis un adaptador de cable que conecte con dos o tres agujas en vez de una, asegurando así una mayor anchura y reduciendo el grosor.

Por último, sería importante realizar las pruebas de expansión ya que muestran la capacidad de expansión de las membranas y la posibilidad de su uso como modelo in-vitro capaz de imitar la expansión de piel.

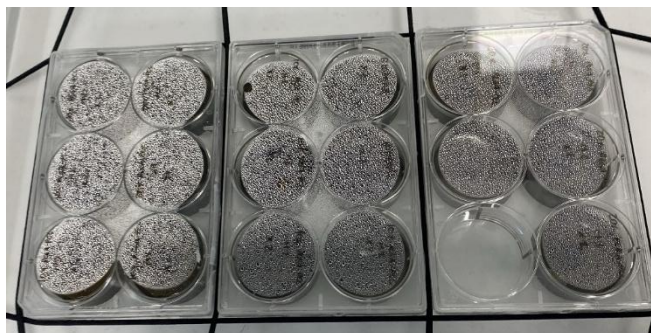
## Capítulo 7. REFERENCIAS

- [1] X. Liu *et al.*, «Electrospinnability of Poly Lactic-co-glycolic Acid (PLGA): the Role of Solvent Type and Solvent Composition», *Pharm Res*, vol. 34, n.º 4, pp. 738-749, abr. 2017, doi: 10.1007/s11095-017-2100-z.
- [2] S. Elder *et al.*, «Evaluation of Electrospun PCL-PLGA for Sustained Delivery of Kartogenin», *Molecules*, vol. 27, n.º 12, jun. 2022, doi: 10.3390/molecules27123739.
- [3] M. Bazgir *et al.*, «Fabrication and characterization of pcl/plga coaxial and bilayer fibrous scaffolds for tissue engineering», *Materials*, vol. 14, n.º 21, nov. 2021, doi: 10.3390/ma14216295.
- [4] M. Bazgir *et al.*, «Investigation of Cell Adhesion and Cell Viability of the Endothelial and Fibroblast Cells on Electrospun PCL, PLGA and Coaxial Scaffolds for Production of Tissue Engineered Blood Vessel», *J Funct Biomater*, vol. 13, n.º 4, dic. 2022, doi: 10.3390/jfb13040282.
- [5] E. J. M. Moonen, T. ul Islam, S. van Kemenade, E. Pelssers, J. Heikenfeld, y J. M. J. den Toonder, «A versatile artificial skin platform for sweat sensor development», *Lab Chip*, vol. 23, n.º 9, pp. 2268-2275, abr. 2023, doi: 10.1039/d3lc00109a.
- [6] M. Grande *et al.*, «Electrospun PLGA/PCL skin-like membranes for in vitro skin expansion testing of 4D-printed shape-shifting metallic devices». [En línea]. Disponible en: <https://materials.imdea.org/3d-flip-book/miguel-grande-wab2024-post/>
- [7] J. A. León-Pérez, J. Alberto, C.-R. Ruth, A. López-G, y R. Palafox-Sánchez, «Tratamiento de las alteraciones cutáneas de cabeza y cuello mediante expansión tisular». [En línea]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=7531>
- [8] Y. Z. Zhang, J. Venugopal, Z. M. Huang, C. T. Lim, y S. Ramakrishna, «Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-Collagen nanofibers using fibroblasts», *Biomacromolecules*, vol. 6, n.º 5, pp. 2583-2589, sep. 2005, doi: 10.1021/bm050314k.
- [9] J. M. Anderson y M. S. Shive, «Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres», 1997. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.004>.
- [10] L. M. Duque Sánchez, L. Rodríguez, y M. López, «Electrospinning: La era de las nanofibras», 2014. [En línea]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4115102>
- [11] N. Bhardwaj y S. C. Kundu, «Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique», mayo de 2010. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.

- [12] W. E. Teo y S. Ramakrishna, «A review on electrospinning design and nanofibre assemblies», *Nanotechnology*, vol. 17, n.º 14, jul. 2006, doi: 10.1088/0957-4484/17/14/R01.
- [13] A. Mohammed y A. Abdullah, «Scanning Electron Microscopy (SEM): A review». [En línea]. Disponible en: <https://fluidas.ro/hervex/proceedings2018/77-85.pdf>
- [14] J. Luis y S. Martínez, «Posgrado en ingeniería del agua y del terreno. Curso: Instrumentación y métodos de análisis químico Tema: espectroscopía infrarroja 1- Fundamentos. Espectroscopia infrarroja». [En línea]. Disponible en: [https://www.upct.es/~minaees/espectroscopia\\_infrarroja.pdf](https://www.upct.es/~minaees/espectroscopia_infrarroja.pdf)
- [15] G. Singh, T. Kaur, R. Kaur, y A. Kaur, «Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA», 2014. [En línea]. Disponible en: <http://ijppsjournal.org>
- [16] T. Elzein, M. Nasser-Eddine, C. Delaite, S. Bistac, y P. Dumas, «FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces», *J Colloid Interface Sci*, vol. 273, n.º 2, pp. 381-387, may 2004, doi: 10.1016/j.jcis.2004.02.001.
- [17] R. A. Zangmeister, T. A. Morris, y M. J. Tarlov, «Characterization of polydopamine thin films deposited at short times by autoxidation of dopamine», *Langmuir*, vol. 29, n.º 27, pp. 8619-8628, jul. 2013, doi: 10.1021/la400587j.
- [18] J. C. Ramos, A. E. Villanueva Luna, y C. M. Ortiz Lima, «Espectroscopia Raman y sus aplicaciones», *Optica Pura y Aplicada*, vol. 46, n.º 1, pp. 83-95, 2013, doi: 10.7149/OPA.46.1.83.
- [19] G. Giridhar, R. K. N. R. Manepalli, y G. Apparao, «Contact Angle Measurement Techniques for Nanomaterials», en *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*, vol. 3, Elsevier, 2017, pp. 173-195. doi: 10.1016/B978-0-323-46139-9.00008-6.
- [20] «7.3 The Thin-walled Pressure Vessel Theory». [En línea]. Disponible en: [https://pkel015.connect.amazon.auckland.ac.nz/SolidMechanicsBooks/Part\\_I/BookSM\\_Part\\_I/07\\_ElasticityApplications/07\\_Elasticity\\_Applications\\_03\\_Presure\\_Vessels.pdf](https://pkel015.connect.amazon.auckland.ac.nz/SolidMechanicsBooks/Part_I/BookSM_Part_I/07_ElasticityApplications/07_Elasticity_Applications_03_Presure_Vessels.pdf)
- [21] C. Zhang, X. Yuan, L. Wu, Y. Han, y J. Sheng, «Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats», *Eur Polym J*, vol. 41, n.º 3, pp. 423-432, mar. 2005, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2004.10.027.
- [22] Z. Li y C. Wang, «Effects of Working Parameters on Electrospinning», en *SpringerBriefs in Materials*, Springer, 2013, pp. 15-28. doi: 10.1007/978-3-642-36427-3\_2.
- [23] M. Sianipar, S. H. Kim, C. Min, L. D. Tijng, y H. K. Shon, «Potential and performance of a polydopamine-coated multiwalled carbon nanotube/polysulfone nanocomposite membrane for ultrafiltration application», *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 34, pp. 364-373, feb. 2016, doi: 10.1016/j.jiec.2015.11.025.

- [24] P. G. Agache, C. Monneur, J. L. Leveque, y J. De Rigal, «Original Contributions Mechanical Properties and Young's Modulus of Human Skin in Vivo», 1980. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00406415>.
  
- [25] J. Van Kuilenburg, M. A. Masen, y E. Van Der Heide, «Contact modelling of human skin: What value to use for the modulus of elasticity?», *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology*, vol. 227, n.º 4, pp. 349-361, abr. 2013, doi: 10.1177/1350650112463307.

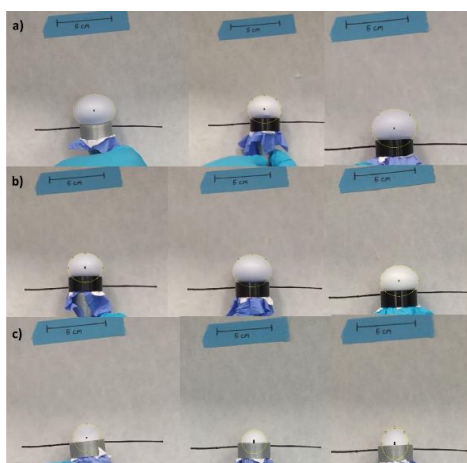
## Capítulo 8. ANEXO



*Figura 28: Recipientes con muestras de membrana tras el proceso de recubrimiento. Las muestras se hayan sobre un agitador donde se han encontrado durante 24 horas.*



*Figura 29: Muestras usadas para la toma de imágenes de la morfología de las membranas.*



*Figura 30: Imágenes usadas para la obtención del valor del radio en las pruebas de presión de ruptura. a) Membranas 10%. b) Membranas 15%. c) Membranas Biopore*

