

Electrohilado y obtención de nanofibras de gelatina con hidroxiapatita

Joaquín Anún¹, Fabio J. Bagatello¹, Mariana P. Cid^{2,3}, Romina Comín^{2,3}

¹Escuela de Ingeniería Biomédica, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

²Departamento de Química, Escuela de Ingeniería Biomédica, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

³Instituto de investigaciones Biológicas y Tecnológicas, (IIByT – CONICET – UNC), Córdoba, Argentina

Fecha de recepción del manuscrito: 12/03/2018

Fecha de aceptación del manuscrito: 01/09/2018

Fecha de publicación: 28/09/2018

Resumen— El siguiente proyecto busca describir el proceso de diseño, fabricación e implementación de un equipo para la producción de nanofibras de gelatina e hidroxiapatita, a partir de la técnica denominada electrohilado (*electrospinning*). Integra conocimientos adquiridos a través de la investigación bibliográfica relacionada al tema y análisis experimentales realizados por los autores.

Palabras clave—Electrohilado, nanofibras, hidroxiapatita

Abstract— The following project seeks to describe the process of design, manufacture and implementation of an equipment for the production of gelatin and hydroxyapatite nanofibers by electrospinning technique. It integrates concepts obtained from the literature and experimental analysis performed by the authors.

Keywords— Electrospinning, nanofibers, hydroxyapatite

INTRODUCCIÓN

Disponer de tejidos u órganos para su trasplante es una de las dificultades que la medicina enfrenta, pero también lo es la posible falta de recuperación funcional. El problema se ha incrementado con el aumento en la expectativa de vida del último siglo que ha convertido a este en uno de los principales problemas mundiales en los sistemas de salud.^[1]

En este contexto, científicos, médicos e ingenieros se han abocado al desarrollo de nuevas tecnologías y metodologías que satisfagan la alta demanda existente. En la actualidad, uno de los campos de mayor aplicación es el de ingeniería de tejidos. En este ámbito se investiga principalmente la fabricación de andamios o soportes celulares, con el fin de favorecer el crecimiento celular y la regeneración tisular.

La técnica de electrohilado (*electrospinning*), ha sido ampliamente estudiada durante los últimos años gracias a la posibilidad de crear fibras en escala micro y nanométrica para una gran variedad de aplicaciones biomédicas, como ingeniería de tejidos, curación de heridas, filtros, membranas, entre muchos otros. Esta técnica aporta a los elementos desarrollados diversas características como:

amplia superficie por unidad de área, porosidad nanométrica y propiedades mecánicas variables, siendo atractiva a nivel biotecnológico.

El electrohilado es una técnica para la fabricación de fibras que está basada en una serie de conceptos electromagnéticos, como la carga electrostática, en donde una solución, generalmente polimérica, se ve inducida por este efecto, y da como resultado fibras de diversos tamaños, obteniendo así productos de diámetros inferiores al micrón. Esta técnica comparte características del electrospray. En electrohilado es común realizar el proceso con las soluciones a temperatura ambiente y con tensiones superiores al kilovoltio.^[2]

Durante el proceso, una disolución polimérica es forzada a salir por un orificio delgado, por ejemplo, el de una aguja de una jeringa, a la cual se conecta el ánodo de la fuente de alto voltaje. Como consecuencia de ello, la disolución polarizada es atraída por el colector conectado al cátodo (ver Fig. 1). En el trayecto recorrido hacia el colector se produce la evaporación del disolvente y la formación de fibras relativamente largas y con diámetros del orden de las decenas o centenas de nanómetros que van tapizando la superficie del colector y del que finalmente se puede separar la estructura resultante.^[3]

La clave del proceso es conseguir una estabilidad en el flujo que, partiendo de la aguja conectada a la fuente de alta tensión, acabe en el colector en forma de una acumulación de fibras relativamente homogéneas en lo que a diámetro se refiere.

Dirección de contacto:

Ing. Fabio Bagatello, Gervasio Méndez 2696 – Córdoba, Argentina X5009, Tel: +543513711392, fjbagatello@hotmail.com

Ing. Joaquín Anún, Manzana G Lote 4 Los Cielos, Valle Escondido – Córdoba, Argentina X5003, Tel: +543513973686, joacoanun@gmail.com

Para ello se deben dar diversas condiciones. La primera es asegurar un cierto equilibrio entre el caudal de la disolución cargada eléctricamente y la atracción de la misma por el colector. En ese equilibrio entra también en juego la tensión superficial de la gota que se va formando en el extremo de la boquilla o jeringa. Esa condición de equilibrio se alcanza cuando la salida de la disolución se produce continuamente en forma del llamado cono de Taylor, que asegura un flujo continuo de disolución que, posteriormente, “vuela” hacia el colector en un proceso de latigazo o *whipping*, mediante el cual las fibras llegan secas al colector.^[4]

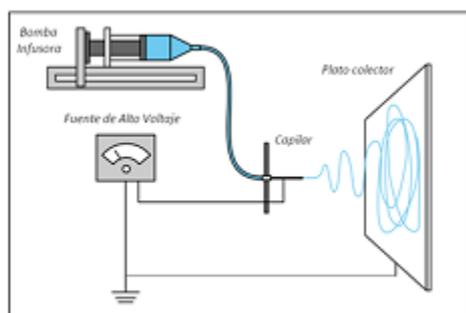


Fig. 1: Esquema básico de electrohilado por infusión horizontal^[5]

Evidentemente, el proceso no es tan sencillo y se ve afectado por múltiples variables provenientes tanto de la propia disolución, como del montaje de los instrumentos que se estén utilizando o de ciertas variables ambientales, como temperatura y humedad. La comprensión de lo que ocurre durante el proceso de electrohilado necesita, por otro lado, conocimientos relativos a electrostática, reología, disoluciones poliméricas, etc. Con todo ello, se trata de conseguir un flujo con la suficiente cohesión como para soportar las inestabilidades superficiales generadas por las cargas eléctricas y los esfuerzos de tracción generados en el vuelo hacia el colector.^[6]

MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se desarrolló en diferentes etapas. Cada bloque del equipo de electrohilado se implementó por separado, y puesto a prueba y medido de tal manera que cumpla con las características requeridas. Luego, todos los bloques fueron conectados entre sí, para verificar la funcionalidad total, mediante las mediciones correspondientes.

Las distintas etapas de trabajo se listan a continuación:

Etapa 1: Estudio completo y exhaustivo de la teoría relacionada al electrohilado.

Etapa 2: Diseño de los diferentes bloques que forman parte del equipo de electrohilado.

Etapa 3: Implementación y control de cada uno de los bloques por separado. Si no se cumplen con las características requeridas, dicho bloque será rediseñado.

Etapa 4: Unión de todos los bloques, para la verificación del correcto funcionamiento de cada uno de ellos funcionando como un solo sistema.

Etapa 5: Realización de ensayos, para su posterior análisis.

Etapa 6: Microscopía en Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos X (LAMARX), para la visualización y medición de las muestras.

Etapa 7: Caracterización de muestras y obtención de resultados y conclusiones.

Componentes del equipo

El equipo fabricado en este trabajo consta de cinco partes constitutivas como se puede observar en la Fig. 2, a saber:

1. La bomba de infusión.
2. Circuito de alta tensión.
3. La placa colector.
4. La fuente de alimentación.
5. Sistema de control y sensado.

Y materiales accesorios utilizados:

6. Instrumental de medición
7. Software (Rhinoceros, IDE Arduino, LEXT OLS 4100)



Fig. 2: Equipo de electrohilado. Partes constitutivas.

RESULTADOS

Fabricación del equipo

La configuración y control de los parámetros de la bomba de infusión (Jeringa a utilizar, flujo deseado y volumen del bolo) se realiza a través de dos placas Arduino conectadas a través de una comunicación serial. Una de estas placas controla el driver del motor Paso A Paso (PAP), se encarga exclusivamente del cálculo y ejecución de los parámetros intervinientes en dicho proceso de inyección y se encuentra

dentro del gabinete de la bomba de infusión. La otra placa Arduino, se encarga de la interfaz con el usuario a través de una pantalla LCD y botones presentes en el “shield” seleccionado (DFR0009). Gracias a esta interfaz el usuario puede configurar los parámetros deseados para la inyección que luego son enviados a través de la conexión serial antes mencionada a la placa de control del PAP. También tiene la posibilidad de colocar el valor de alta tensión deseado y el display devuelve el valor al cual debe regularse la fuente de baja tensión para obtener a la salida un aproximado del valor de AT. Por último, en base al flujo y volumen configurado se calcula y se muestra el tiempo que resta para que el proceso finalice, y gracias a un sensor de humedad y temperatura podemos observar también estos parámetros que tan importantes son para la correcta ejecución del proceso.

En cuanto a la fabricación de la fuente de alta tensión, se logró generar un máximo de 22kV con una fuente de alimentación continua de 36V máximo gracias a la implementación de un driver Mazzilli ZVS. Esta tensión es más que suficiente para realizar electrohilado con el polímero seleccionado. Gracias a que la fuente de baja tensión es regulable, se puede configurar el valor de alta tensión deseado en función del voltaje de salida configurado en la fuente.

Obtención de nanofibras

Inicialmente se utilizó “GELATINA ORO” de la marca PANREAC sin hidroxapatita (HA) con el objetivo de definir condiciones iniciales a partir de las cuales se obtiene un flujo continuo de polímero y, consecuentemente la formación de nanofibras.

Como puede observarse en la Fig. 3, los parámetros configurados en el proceso son fuertemente determinantes de la calidad, morfología y tamaño de las fibras y la densidad del entramado final.

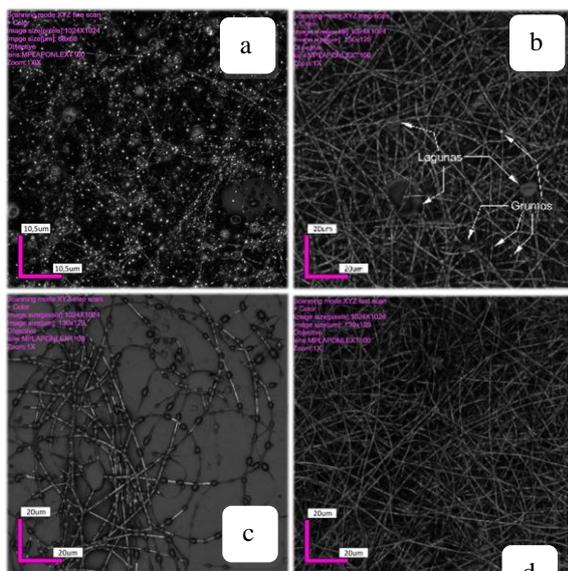


Fig. 3: Micrografías del proceso modificando parámetros. a) Electro spray b) Electrohilado con defectos. c) Entramado poco denso y con defectos. d) Electrohilado con entramado óptimo

El electro spray (Fig. 3a) se obtiene debido a la baja concentración de la solución utilizada (10% p/v en

etanol:agua 50:50) produciendo un flujo discontinuo del polímero que resulta en nanopartículas.

En función de la temperatura a la que se realice el proceso se obtienen fibras con más defectos a medida que la temperatura disminuye, ya que el solvente utilizado no logra evaporarse completamente en el transcurso de su “vuelo” hacia el colector. Así, se obtienen entramado con defectos (lagunas y grumos o *beads*).

El aumento del tiempo de vuelo del Jet, es decir, el incremento de la distancia entre ánodo y cátodo manteniendo constante la relación voltaje-distancia, produce un entramado poco denso y con defectos, que no son útiles a los efectos de la producción de nanofibras. Esto es debido a la dispersión que se produce en el Jet antes de impactar contra el cátodo.

Observando y teniendo en cuenta estas variaciones y resultados, se ajustaron los parámetros iniciales para obtener un entramado sin defectos y con una densidad aceptable como se observa en la Fig.3d. La Tabla 1 detalla los parámetros iniciales utilizados en la obtención de esta última matriz:

TABLA 1: PARÁMETROS INICIALES PARA LA OBTENCIÓN DE NANOFIBRAS.

| PARÁMETRO | VALOR |
|------------------------|--|
| SOLUCIÓN | Gelatina al 15% p/v en etanol:agua (50:50) |
| VOLTAJE | 15 kV |
| DISTANCIA | 20 cm |
| FLUJO | 5 μ L/min |
| T° AMBIENTE | 27°C |
| HUMEDAD RELATIVA | 40% |
| DIÁMETRO INTERNO AGUJA | 0,8 mm |

Una vez determinados los parámetros iniciales con los que se obtiene un entramado acorde a las características de electrohilado, se incorpora HA (de origen bovino obtenida en laboratorio) en partículas que varían su tamaño entre 300 y 1000 nm, obtenidas mediante un proceso especial que combina técnicas de ultrasonido y molienda con mortero.

Los resultados obtenidos con una solución de soluto al 15% p/v, y una proporción de HA-gelatina 16,6%-83,7%, se muestran en la Fig. 4. Las diferencias que se observan en las matrices a), b) y c) se deben a la variación en el flujo de infusión, el cual se configuró a 5, 7 y 10 μ L/min respectivamente.

En las microscopías se observan fibras de tamaño nanométrico (de 250 nm a 400 nm) con cristales de HA. También pueden distinguirse variaciones cualitativas en la cantidad de aglomerados en la matriz a medida que se modifica el flujo de infusión, siendo el entramado de la Fig. 4b, realizada a 7 μ L/min, la que menos defectos de este tipo tiene y la que posee un entramado más denso.

Analizando estos resultados, podemos concluir que el parámetro de velocidad de flujo óptimo para soluciones de gelatina al 15% p/v sin HA es de 5 μ L/min, pero al momento de incorporar HA, este valor se eleva a 7 μ L/min.

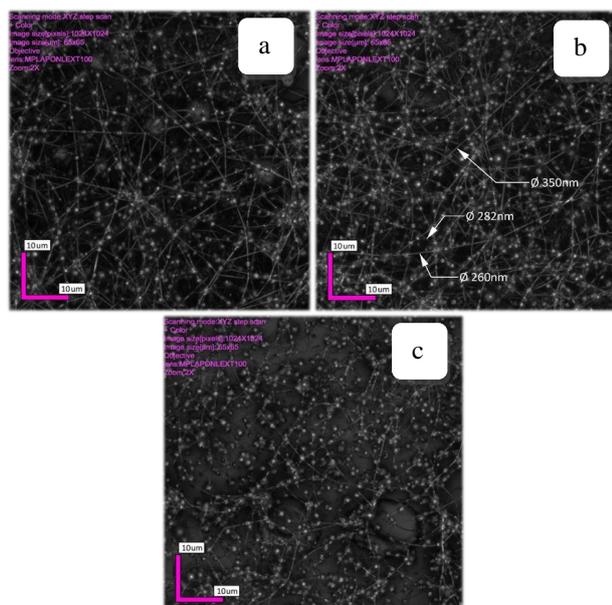


Fig. 4: Micrografías de entramados de Gelatina e HA a diferentes flujos. a) 5 ul/min b) 7 ul/min c) 10 ul/min

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, el trabajo de investigación y el diseño resumido en esta publicación, se puede decir que el equipo de electrohilado fabricado cuenta con las características necesarias para ser utilizado por personal idóneo de forma sencilla e intuitiva y obtener resultados satisfactorios en la fabricación de nanofibras.

Si bien dicho equipo puede mejorarse significativamente y los resultados se limitan a la obtención de nanofibras de gelatina con hidroxiapatita, se sentaron las bases para un gran abanico de futuros proyectos en la Facultad, ya sea en el área de investigación con nanofibras, la producción de fármacos de liberación controlada, el diseño de estructuras o andamios para crecimiento celular, la fabricación de nuevos biomateriales y mejora de la biocompatibilidad de tejidos; como también proyectos que tengan que ver con la electrónica de programación y de potencia.

El hecho de que la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales pueda contar con un equipo de estas características para uso cotidiano y propio, le permite introducirse en un campo interdisciplinario de investigación de la nanotecnología que actualmente está en crecimiento constante.

Cabe destacar que esta publicación es un resumen de un proyecto integrador en el cual se ven más desarrollados los conceptos y resultados aquí mencionados. ^[7]

PERSPECTIVAS

Al finalizar el proyecto se realizó un análisis acerca de las posibles mejoras que pueden implementarse el equipo de electrohilado, a fin de mejorar su rendimiento, y además poder obtener otro tipo de tejidos.

- Realizar los experimentos en un ambiente controlado
- Rediseño del sistema colector
- Realizar distintos tipos de colectores
- Adquirir una fuente comercial de alto voltaje
- Implementar un sistema de seguridad eléctrica
- Ensamblar el sistema en una unidad

APÉNDICES

Detalles técnicos

Componentes necesarios para el armado del circuito de alta tensión Mazili ZVS:

- Resistencias de 10kΩ (dos).
- Resistencias de 470Ω 5W (dos).
- Diodos Zener 1N5349B (dos).
- Mosfet IRFP250N (dos).
- Diodos rápidos MURF1660 (dos).
- Bobina de 120uH.
- Capacitor de poliéster 250V 0,15µF.
- Flybacks (dos).
- Borneras (tres).

Componentes necesarios para el armado de la bomba de infusión:

- Motor PAP NEMA 17 de alto torque (4.4 kg/cm²)
- Driver Pololu DVR8825
- 2 Arduino UNO®
- 1 Shield Display LCD 16x2 con teclado
- 1 Sensor de T° y Humedad DTH11

REFERENCIAS

- [1] Pablo C. Caracciolo, Pablo R. Cortez Tornello, Fabian Buffa, Florencia Montini Ballarin, Teresita R. Cuadrado, Gustavo A. Abraham; "Pequeñas fibras, grandes aplicaciones"; Ciencia Hoy, 21 (121), 57-64, 2011
- [2] Ziabicki, A.; "Fundamentals of fiber formation"; Ed. John Wiley and Sons; London (1976); ISBN 0-471-98220-2.
- [3] Liang D, Hsiao BS, Chu B.; "Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications". Adv Drug Deliv Rev (2007); 59:1392:412.
- [4] Duque L.M.; "Electrospinning: la era de las nanofibras". Revista Iberoamericana de Polímeros, vol. 14 (2013); 12, 14.
- [5] Calzón Gutiérrez, Adrián; "Desarrollo de un equipo de electrospinning para obtención de nanofibras alineadas de recombinámeros tipo elastina"; Universidad de Valladolid. Escuela de Ingenierías Industriales (2016).
- [6] Bhardwaj, N. & Kundu, S. C.; "Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique"; Biotechnology Advances, vol. 28 (2010); 326.
- [7] Joaquin Anún, Fabio J. Bagatello, Mariana P. Cid, Romina Comín; "Diseño e implementación de un equipo de electrohilado para la obtención de nanofibras de hidroxiapatita en gelatina"; Universidad Nacional de Córdoba - FCEFN; (2017)