



Universidad Miguel Hernández de Elche



Instituto de Investigación, Desarrollo e
Innovación en Biotecnología Sanitaria de
Elche

Optimización de fabricación de nanofibras electrohiladas de soluciones proteicas

Jordan Serrano Espinosa

Tutor/Cotutor

Juan Alberto Falcó Graciá/Ricardo Mallavia Marín

Máster en Biotecnología y Bioingeniería
Facultad de Ciencias Experimentales
Curso académico 2020/20



D. Juan Alberto Falcó Graciá, Investigador Senior del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), y

D. Ricardo Mallavia Marín, Catedrático de Universidad en el área de Química inorgánica del Departamento de Farmacología, Pediatría y Química orgánica de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH),

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo que lleva por título “Optimización de fabricación de nanofibras electrohiladas de soluciones proteicas”, presentado por Jordan Serrano Espinosa, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández (UMH).

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firman el presente certificado a continuación.

RESUMEN

En los últimos años, el interés por la nanotecnología aplicada a la biomedicina ha experimentado un gran aumento con el desarrollo de nuevos nanomateriales. Estos elementos nanométricos presentan una serie de propiedades únicas que pueden ser muy importantes en el desarrollo futuro de la medicina. En nuestro caso, las nanofibras, que pueden cumplir varias funciones como mejorar la curación de heridas, actuar como parches en cirugía, o la administración de fármacos *in situ*. Uno de los aspectos más importantes a la hora de utilizar estas nanofibras en biomedicina son los materiales con los cuales se fabrican. Para la creación de nanofibras mediante electrohilado, existen muchas clases de polímeros que pueden usarse, pero los que muestran un gran potencial por sus propiedades fisicoquímicas y elevada biocompatibilidad son los naturales, más específicamente los péptidos y proteínas. Sin embargo, la implementación de estas moléculas presenta desafíos que se deben superar para su adecuado electrohilado. Para ello, se ha propuesto como objetivo de este estudio la optimización de algunas de estas proteínas, más concretamente la albúmina de suero bovino (BSA), una proteína reconocida, los otros péptidos que se van a utilizar en los experimentos son péptidos extraídos de mucosidades de peces. Para empezar, se hicieron varias disoluciones de BSA, tanto por separado como junto otros polímeros que la ayudasen a electrohilar. Se determinó que algunas de las disoluciones hechas a partir de una mezcla de BSA junto a PEO, un copolímero, fueron óptimas para una buena electrohilatura. Estas se estudiaron y se determinó que debido a sus parámetros las nanofibras óptimas para nuestro objetivo fueron las de la disolución del 3 % de copolímero y 15 % de BSA. Así pues, se analizó la cantidad de proteína que retenían las fibras. Con lo que se pudo observar que las únicas que no mantenían la concentración esperada de proteínas fueron las que contenía un 4 % de copolímero. Una vez hecho esto, se intentó repetir los resultados con la extracción mucosa, pero no se consiguió electrohilar nanofibras adecuadas a partir de ella.

Palabras clave: "Electrohilatura", "nanofibras", "BSA", "Péptidos de peces".

ABSTRACT

In recent years, the interest for the biomedical-applied nanotechnology have experimented a great rise thanks to the development of new nanomaterials. Those nanometric elements show a series of unique properties which could be important in the future development of medicine. In our case, the nanofibers, which could accomplish some functions such as improve the wound healing, function as surgery patches or drug delivery in situ. One of the important matters to the use of these nanofibers for biomedicine are the materials from which the fibers are fabricated from. For the creation of electrospun nanofibers, there are different polymers which could work, but the ones where more potential is shown due to its physicochemical properties and elevated biocompatibility and biodegradability are the natural ones, more specifically peptides and proteins. However, the implementation of those molecules presents challenges to surpass. Therefore, the objective of this study is the optimization of some of the natural proteins, concretely the bovine serum albumin (BSA), a well-known protein, the other peptides we are going to use in the experiments are peptides extracted from fish mucus. To start, various solutions were made from BSA, alone and with other polymers to facilitate the electrospinning. It was determined that some solutions from a mix of BSA and a copolymer, the PEO, were optimal to a good electrospinning. These were analysed and, due to its parameters, the better fitting for our objective were the ones from a solution with 15 % of BSA and 3 % of the copolymer. So, after the selection, we studied the amount of protein which remained in the fibers. The only ones which did not maintain the wanted amount of protein were the ones which were from a solution with 4 % of copolymer. Once done with those studies, we tried to repeat these results with the mucus extraction. However, we could not get proper electrospun nanofibers from it.

Keywords: "Electrospinning", "nanofibers", "BSA", "fish peptides"

ÍNDICE

1. Introducción y antecedentes	6
1.1. Nanofibras y nanotecnología	6
1.2. Proteínas en nanotecnología	8
1.2.1. Albúmina de suero bovino	10
1.3. Electrohilatura	11
1.4. Polímeros relevantes	12
1.4.1. Polietilenglicol y óxido de polietileno	12
1.4.2. Quitosano	13
1.4.3. Acetato de celulosa	14
1.4.4. PVME/MA	14
2. Objetivos	16
3. Procedimiento experimental	17
3.1. Polímeros utilizados	17
3.2. Preparación de disoluciones	17
3.3. Medida de viscosidades	18
3.4. Elaboración de las nanofibras mediante electrohilatura	18
3.5. Microscopía óptica	19
3.6. Microscopía electrónica de barrido	19
3.7. Cuantificación de proteínas	20
3.8. Tratamiento de datos	21
4. Resultados	22
4.1. Estudio de la saturación de distintos polímeros en disolución	22
4.2. Combinación de la BSA con otros compuestos para mejorar la electrohilatura	23
4.2.1. Combinación del PEO con extracción mucosa dérmica de pez	24
4.2.2. Combinación de PEO con quitosano para electrohilatura	25
4.2.3. Medida de viscosidades	26
4.3. Fabricación de nanofibras a partir de las disoluciones	27
4.4. Optimización de nanofibras de polímero y proteína BSA	28

4.5.	Análisis de los parámetros de las nanofibras mediante microscopía óptica	29
4.6.	Análisis de diámetro de fibras seleccionadas mediante microscopía electrónica de barrido	32
4.7.	Cuantificación de proteínas	36
5.	Discusión	39
6.	Conclusiones	42
7.	Bibliografía	43

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En los últimos años, el avance de la nanotecnología no ha dejado indiferente a nadie, desde el uso de nanopartículas hasta matrices complejas hechas por capas de materiales nanométricos, el uso de estos nanomateriales ha supuesto un foco de investigación en campos como la biomedicina o la biología industrial. Entre estos elementos, uno de los que presenta mayor protección son las nanofibras, debido a su versatilidad y relativa facilidad de manufactura tienen la posibilidad de ser una de las bases sobre la que se construyan ciertas estructuras que ayuden a mejorar la medicina, al ofrecer nuevos materiales más adaptables y seguros para el cuerpo humano.

Uno de los objetivos que se plantea para la mejora de estas nuevas tecnologías es encontrar y optimizar estos materiales para facilitar el uso y las funciones que puedan aportar. En este estudio se tiene como objetivo poder mejorar y avanzar en materiales biocompatibles, siendo en el caso de este estudio los péptidos y las proteínas, unos elementos muy interesantes en medicina, debido a la capacidad que tiene el cuerpo de absorberlas con facilidad. Con ello, este estudio tiene como objetivo la optimización de proteínas para poder observar las distintas capacidades y parámetros para facilitar el proceso de electrohilatura de nanofibras de estos polímeros naturales.

1.1. Nanofibras y nanotecnología

La nanotecnología se ha especializado en la caracterización, fabricación y manipulación de nanoestructuras o nanomateriales. Los materiales nanoestructurados son aquellos que tienen al menos una de sus dimensiones en la escala nanométrica entre los elementos que componen esta categoría se incluyen nanopartículas de muchas clases, nanovarillas o *nanorods*, *nanofilms* y materiales voluminosos que están formados por varias capas de nanoestructuras que entran dentro de la nanoescala (1). A nivel macroscópico, el uso de materiales en forma de filamentos u objetos alargados es una parte importante de la naturaleza, con ejemplos como podría ser el hilo de araña o la formación de capullos de los gusanos de seda. En la sociedad humana, el uso de fibras naturales se remonta a la prehistoria, habiendo evidencias de productos textiles de algodón que datan hasta del 5000 AC y el cultivo de gusano de seda para la industria textil comenzó alrededor del 2700 AC. (2, 3).

Las nanofibras son nanoestructuras que pueden fabricarse mediante varios métodos, como templado, dibujado, separación de fase por inducción termal, autoensamblado y *electrospinning* (electrohilatura), siendo este último el que es considerado el método más simple y sencillo para hacer nanofibras sueltas con polímeros de alto peso molecular (4). Las nanofibras están ganando importancia en campos tan diversos como biomedicina, alimentación, cosmética y farmacéutica debido a las distintas propiedades intrínsecas que estas tienen, como una gran área superficial, flexibilidad, biocompatibilidad, biorreconocimiento (5) y la capacidad que tienen de conjugarse con otros elementos nanotecnológicos como nanopartículas (6). Las nanofibras pueden estar formadas por distintos materiales tanto orgánicos como inorgánicos, entre ellos los llamados biomateriales, que son aquellos materiales biocompatibles. Estos biomateriales tienen que presentar una estabilidad mecánica y química apropiada, y llevar a una respuesta determinada de un organismo *in vivo* o de tejidos o células *ex vivo*. El contacto entre el biomaterial y el destino tiene que estudiarse caso por caso dependiendo de la función que queramos que ejerzan nuestras nanofibras, si se trata de simple observación, un tratamiento o directamente el reemplazo de algún tejido. La toxicidad, antigenicidad y respuesta inflamatoria que ocasionen tiene que estar dentro de unos parámetros aceptables (4, 5, 7).

Las nanofibras pueden tener una gran variedad de aplicaciones en el apartado biomédico, como podría ser la creación de membranas sobre las cuales colocar tejido artificial para ayudar a sanar heridas superficiales o en implantes para cirugía (8-10). Aparte de esto, las nanofibras pueden contener una serie de compuestos que ayuden a la absorción mediante vía cutánea, por ello también es posible que las nanofibras se utilicen para otra aplicación muy importante, que es el transporte de fármacos (11). Además, estas funciones no son excluyentes unas de otras, pues un parche de nanofibras puede aplicarse como base para sanar heridas y además que según este parche se vaya degradando al contacto con la piel, vaya liberando compuestos que ayuden a la curación de las heridas (12, 13).

Los materiales electrohilables tienen la ventaja de que tienen una gran proporción de superficie respecto a su volumen, lo que facilita la adhesión celular y la sorción de fármacos, por eso mismo es apropiado el uso de material peptídico para combinar las propiedades de las proteínas con aquellas propias de las nanofibras (14). De entre las distintas conformaciones que pueden establecerse con nanofibras aquellas que se asemejan a una conformación de fibras de la matriz extracelular, son aquellas que tienen un mayor potencial en biomedicina.

Con esta idea en mente, durante las últimas décadas se han realizado una serie de esfuerzos en conseguir fibras que imiten dicha estructura, utilizando para ello soluciones exclusivamente proteicas, como por ejemplo colágeno, fibroína de seda y elastina, con la esperanza de que esta clase de nanofibras, como se ha mencionado antes, reduzcan la reacción de rechazo de los pacientes (15, 16).

En el tema de la electrohilatura de péptidos y proteínas se comprende el uso de proteínas y péptidos naturales (17), péptidos sintéticos y combinaciones de estos polímeros orgánicos. A nivel clínico, las nanofibras proteicas tienen un potencial muy elevado, desde la generación de tejidos artificiales para bioimplantes con poco o nada de rechazo en el huésped, o en el caso de parches cutáneos con compuestos bioactivos entretejidos en las fibras (7).

1.2. Proteínas en nanotecnología

Una proteína es un polímero lineal de aminoácidos que ha adoptado una estructura compleja tridimensional, en muchos casos, este péptido original se pliega sobre sí mismo y puede llegar a mostrar varios niveles de organización estructural. Llegando fácilmente hasta una estructura en la que varias subunidades se unen para formar una estructura cuaternaria de varios miles de aminoácidos. Los péptidos y proteínas son los polímeros programables más versátiles que hay, son parte fundamental de la biología funcional, y al menos en principio, permite diseño de estructuras artificiales funcionales iguales a las que encontraríamos en la naturaleza (18). Dentro de la nanotecnología se ha intentado hacer que las proteínas tengan un papel principal, sobre todo las derivadas de proteínas que ya se hallen en el ser humano que, gracias a su naturaleza química, tienen menor probabilidad de generar una gran respuesta inmunitaria. Sin embargo, en la bibliografía se ha podido observar que las proteínas que se utilizan en nanotecnología pueden ser tanto artificiales como provenir de fuentes naturales, que pueden ser animales, BSA, colágeno o la fibroína de seda, o vegetales, zeína o proteína de soja (19).

Entre las proteínas utilizadas en la fabricación de nanofibras existen muchas que se han probado en estudios anteriores y que se han conseguido electrohilar con éxito, ya sea por separado o combinadas con otros polímeros para mejorar parámetros y agilizar procesos, entre estas proteínas se encuentran tanto proteínas específicas, como el colágeno o la elastina (20), como mezclas indeterminadas de estas denominadas gelatinas, que contienen varios péptidos en proporciones desconocidas, debido a ello pueden llegar a ser muy útiles en

campos como la medicina regenerativa. (21). Sin embargo, las disoluciones para electrohilatura de proteínas naturales presentan problemas que los polímeros artificiales no tienen, principalmente la estructura terciaria de las mismas, debido a la gran estabilidad las proteínas con una estructura terciaria, se hace muy complicado desenredarlas en un campo con flujo extensivo como es el electrohilado y previene que se produzca una respuesta viscoelástica necesaria para la estabilización del *jet* (16).

Tabla 1: Lista de proteínas utilizadas como polímeros para nanofibras. Abreviaturas en el Anexo 1

Proteína	Copolímeros	Disolvente	Referencia
Fibroína de seda	Quitina	HFP	(22)
		CaCl ₂	(23)
	PLLA-CL	Agua	(22, 24)
	PLC	Cloroformo	(25)
	PEO	HFP	(22)
Proteína de soja	SA/PEO	Agua	(26)
Fibrinógeno		HFP	(27)
BSA	PEO	Agua	(28)
	BME/NH ₄ OH	TFE	(29)
Colágeno	PEO	Agua, HCl 10 %	(20, 30, 31)
	Quitosano	HPF	(22, 32)
		HPF	(22)
	Elastina	HPF	(22)
	Quitina	HPF	(22)
	PCL	HPF	(22)
	Curcumina	TFE	(33)
	PLGA	Cloroformo	(34)
PLLA-CL	HPF	(22)	
Quitina	BGA	HPF	(22)
α-Lactalbumina	PEO	Agua	(35)
Caseína	PEO	Agua	(7, 36)
Hemoglobina	Colágeno/CNT	TFE	(37)
Zeína		Ácido fórmico	(38-40)
	PLA	Agua	(14)
Proteína de soja	PEO		(39)
Elastina	PLGA	HFIP	(39)
	PEO	HCL 10 %	(20)
	PDO	HFIP	(15)
Albúmina de huevo	PVA	Ácido fórmico	(5)

Tabla 1: Continuación

Proteína	Copolímeros	Disolvente	Referencia
Gelatina	PLGA		(22)
	PCL	TFE	(22)
	PLA	TFE	(22)
	PLLA-CL	TFE	(22)
		TFE	(21, 22)

1.2.1. Albúmina de suero bovino

La albúmina de suero bovino (BSA) (Figura 1), también conocida como fracción V, es una proteína derivada del suero sanguíneo de vacas. Esta proteína contiene 583 residuos de aminoácidos, un peso molecular de 66,43 KDa y un punto isoeléctrico de 4,7 en agua a 25 °C. La BSA y la proteína de suero humana (HSA) tienen una homología del 76 %, así como un patrón de puentes disulfuro muy conservado (16). Como estructura secundaria consiste en laminas β y α hélices. La estructura terciaria de la BSA se compone de tres dominios homólogos (I, II, III), los cuales se estabilizan con 35 residuos de cisteína que componen un total de 17 puentes disulfuro (29). La BSA se mantiene estable a 40 °C, y tiene un cambio conformacional reversible de 42 °C a 50 °C. Se deshace el plegamiento y comienza la β -agregación a los 60°C. Más allá de 70 °C la proteína comienza el proceso de gelificación (41).

Debido a la naturaleza propia de la BSA, en disolución acuosa se pueden formar cristales coloidales en los que los glóbulos naturales de la BSA se pueden unir formando un enrejado debido a las interacciones no covalentes intermoleculares, y por lo tanto es posible que no se forme la viscoelasticidad apropiada para la electrohilatura, por ello, según la literatura, sería apropiado intentar anular la estructura tridimensional de la proteína antes del electrohilado (16, 42).

La BSA tiene un importante interés en la biotecnología debido a su capacidad de ser un agente bloqueante, un nutriente en cultivo celular, un estabilizador enzimático y el motivo por el que nos podría llegar a interesar, puede actuar como transportador o *carrier*. Debido a su estabilidad, adhesividad y que es bastante económica lo hacen un gran candidato para la formación de nanofibras (43).

Estudios describen que fibras de BSA con PEG pueden formar complejos coaxiales con otras fibras, como en este caso de PCL, en el que se vio que este complejo ayudaba a la regeneración

natural de la piel, otros estudios marcaron que tenían la capacidad de poder liberar fármacos in vitro sin problemas (39).

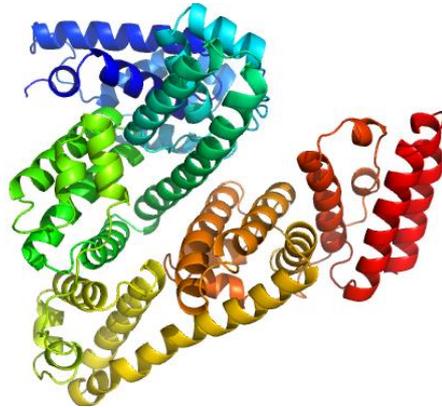


Figura 1: Modelo de la BSA. Fuente: Protein Database (PDB)

1.3. Electrohilatura

Las nanofibras pueden fabricarse usando varias técnicas entre las que se incluyen: Síntesis basada en moldes, separación de fases, autoensamblaje, deposición de vapor, crecimiento espontáneo, nanolitografía y la que nos concierne en este estudio, el electrohilado (*Electrospinning* en inglés). En este estudio se aprovechará la electrohilatura para la fabricación de las nanofibras debido a su facilidad de uso y su versatilidad para de hacer nanofibras largas y consistente, además, presenta un coste muy bajo en relación con su efectividad y tiene una posibilidad bastante aceptable de escalado industrial, con lo que sus aplicaciones biomédicas serían fácilmente trasladables desde el laboratorio al público en general (44-46).

La electrohilatura está basada en la creación de un campo electrostático elevado entre dos polos, siendo estos polos la aguja de la cual se proyecta la solución que queremos electrohilar y un colector metálico conductor hacia el cual se dirigen las nanofibras. Las fibras se proyectan debido a la aplicación de un voltaje superior a la tensión superficial que tiene una gota de la disolución que está expulsando la aguja de eyección. Esta gota al sufrir este voltaje se distorsiona en su capa superficial y adquiere la forma que denominamos “Cono de Taylor”, desde donde se expelen hilos de disolución, estos hilos se llaman *jets*, que viajan por el campo electrostático y contactan con el colector. A lo largo de este *jet*, el disolvente de la solución se evapora, dejando únicamente la matriz polimérica (15, 47).

El equipo de electrohilatura se podría colocar tanto en vertical como en horizontal. Esto implica solamente la diferencia de qué en una disposición vertical, el investigador se asegura

de coleccionar la disolucion completa mientras que, en la horizontal, se evita la posibilidad de que una gota de disolucion sin electrohilatura caiga sobre el coleccionador, sin embargo, se perderia una cantidad de fibras bajo el coleccionador debido a la gravedad, aunque habiendo estudiado correctamente la colocacion del coleccionador, esta perdida seria minima, esto se puede observar en la figura 2 (2, 48).

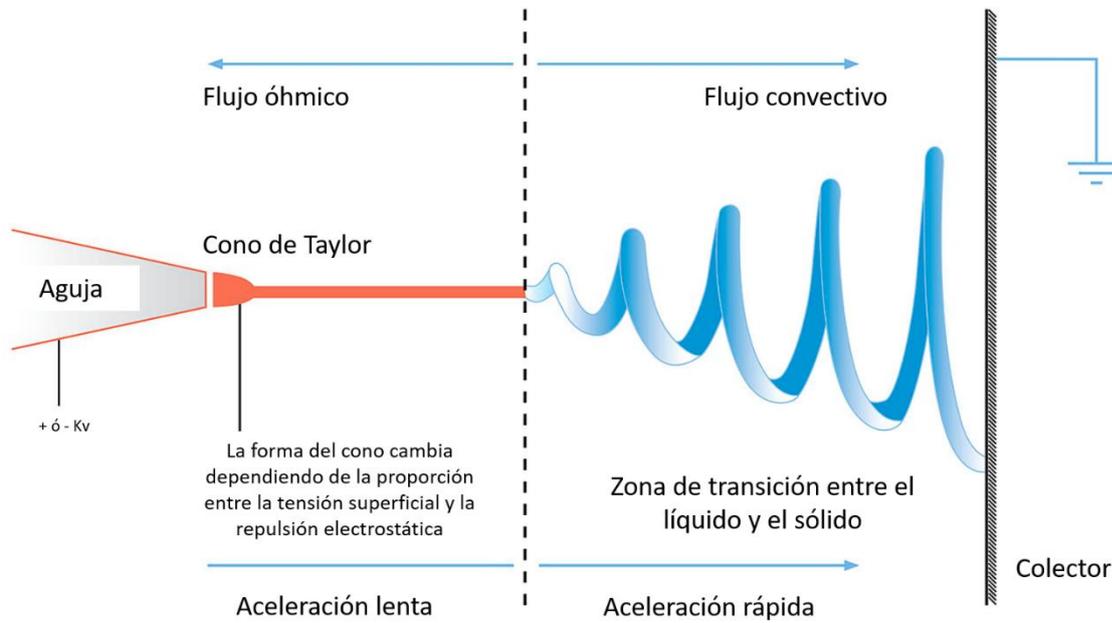


Figura 2: Esquema del funcionamiento de una máquina de electrohilatura. Fuente: *The New Zealand Institute for Plant and Food Research Ltd, 2008.*

Si se ajustan los parámetros de la electrohilatura, entre los que se incluyen las características de la solución utilizada y las condiciones experimentales. Los parámetros más importantes serían el polímero y su concentración, la velocidad de flujo durante la eyección, el voltaje generado por la fuente, la distancia entre los polos, humedad y temperatura ambientales (31, 49).

1.4. Polímeros relevantes

En este estudio aparte de las proteínas se utilizarán varios polímeros que se consideraron relevantes para poder comprobar su compatibilidad con las proteínas:

1.4.1. Polietilenglicol y óxido de polietileno

El polietilenglicol (PEG) (Figura 3) es un compuesto derivado del óxido de etileno (-CH₂-CH₂-O). El óxido de polietileno (PEO) es un compuesto derivado a su vez del polietilenglicol, con la única diferencia entre los dos es que el PEO tiene mayor peso molecular

y se fabrica exclusivamente de forma química (50). Este polímero es muy utilizado en la nanotecnología debido a que es un polímero no tóxico y con una alta compatibilidad con una gran cantidad de otros polímeros y disolventes (51). Debido a la diferencia en la longitud de su cadena química, las propiedades físicas son completamente diferentes a pesar de tener propiedades químicas prácticamente idénticas. Estos compuestos son poliéteres hidrofílicos con un amplio rango de porcentaje de cristalinidad, peso molecular, punto de fusión y velocidad de degradación dependiendo de la técnica de síntesis que se ha utilizado. Gracias a su gran compatibilidad con otros compuestos, como puede ser el quitosano o la α -lactalbúmina (35), el mezclarlo con compuestos como el ácido poliláctico (PLA) o la policaprolactona (PLC) provoca una mejoría en parámetros como la velocidad de degradación (50).

El PEO es un polímero conocido por la capacidad que tiene de suprimir la adhesión de proteínas, por lo tanto, es posible que se pueda usar como una cobertura antiinflamatoria polimérica para biomateriales y elementos que deban suministrarse o implantarse. Varias publicaciones utilizan este polímero como sustrato anfifílico para nanofibras poliméricas, otras propiedades que tiene el PEO son la elevada biocompatibilidad, liberación adaptable de fármacos y la capacidad de afectar la diferenciación de células troncales mesenquimáticas (52).

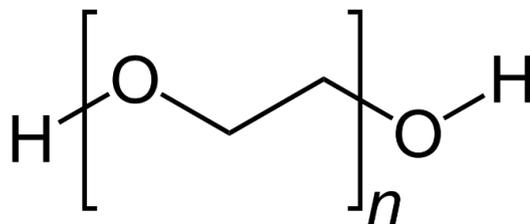


Figura 3: Formula química del PEG

1.4.2. Quitosano

El quitosano (Figura 4) es un biopolímero no tóxico, biodegradable y biocompatible. Debido a las grandes fuerzas repulsivas entre los grupos iónicos que componen la molécula. Es más, es un polímero catiónico muy espeso, estas características pueden generar, según la bibliografía, una separación no homogénea en los *jets* durante el electrohilado (53-55). Entre los usos que se han dado para las nanofibras de quitosano se ha visto que son un buen sistema para administración de fármacos para bacterias gram positivas como podrían ser *Staphylococcus epidermitis* y *Staphylococcus aureus*, (56, 57), además de tener actividad

hemostática (51). Por ello, en varios estudios anteriores se ha realizado mezclas de polímeros para facilitar el *electrospinning*, entre los polímeros que se han usado en la bibliografía se encuentran polímeros sintéticos como el PEO (54), debido a su capacidad comprobada de actuar como agente de cohilatura debido a sus características específicas y otros polímeros naturales como el colágeno, debido a su capacidad de formar complejos complementarios (32).

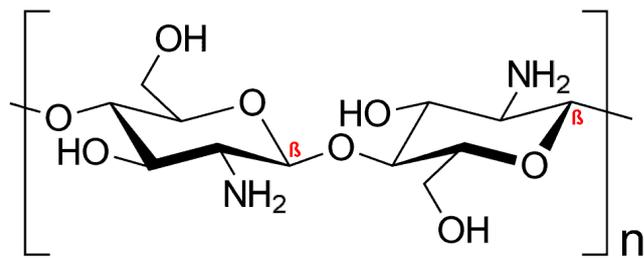


Figura 4: Formula química del quitosano

1.4.3. Acetato de celulosa

El acetato de celulosa (CA) (Figura 5) es un polímero natural derivado de la acetilación de la celulosa, a nivel nanotecnológico tiene valor debido a que es un polímero no tóxico con una gran estabilidad y sostenibilidad (46). Este polímero se ha utilizado en la estudios anteriores debido a que tiene las fibras obtenidas a partir de este polímero tienen capacidad de ser porosas, lo que facilita la función de las mismas como efectoras de administración de medicamentos (58).

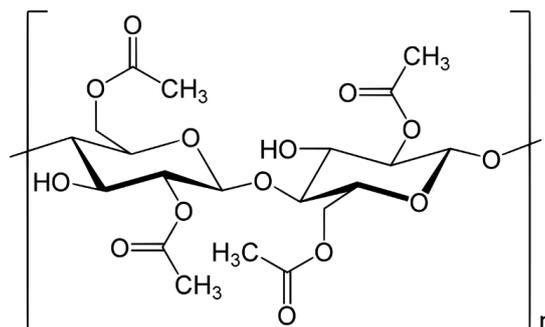


Figura 5: Formula química del acetato de celulosa

1.4.4. PMVE/MA

Los copolímeros de metil-vinil-éter y anhídrido maleico (*poly-methyl vinyl ether-alt-maleic anhydride*, PMVE/MA) (Figura 6) y sus formas derivadas, se tratan de polímeros biodegradables con demostrada baja toxicidad y una alta biocompatibilidad. Debido a sus propiedades bioadherentes, estos compuestos se han utilizado en la biomedicina como

encapsulantes de agentes farmacológicos en nanopartículas, habiendo además estudios en los que se han utilizado compuestos que contienen estos polímeros en nanofibras electrohiladas con capacidad de administración de fármacos (59).

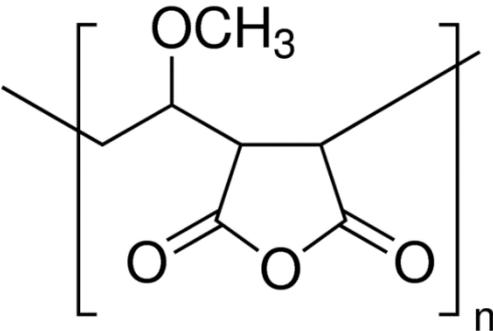


Figura 6: Formula química del PMVEMA

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo de fin de máster es el desarrollo de nanofibras peptídicas y proteicas mediante electrohilatura utilizando proteínas conocidas y proteínas extraídas de mucosidad de anguila. Con ello se pretende estudiar la capacidad de las proteínas de electrohilar y mantener la actividad y conformaciones originales.

Para la electrohilatura de estas nanofibras peptídicas se utilizarán dos clases de proteínas, la primera que se utilizará y optimizará será albúmina de suero bovino, una proteína conocida y estudiada con parámetros internos claros, la segunda serían una serie de péptidos extraídos de mucosidad de anguila, estas proteínas, aunque conocidas, no se han estudiado en electrohilatura con anterioridad.

Con el fin de completar el objetivo general planteado para este estudio, se han establecido una serie de objetivos específicos que intentar alcanzar:

- Optimización del proceso de electrohilatura de nanofibras proteicas y peptídicas, comenzando con la optimización de nanofibras a partir de soluciones de BSA ya sea por separado o en combinación con otros polímeros.
- Caracterización de las nanofibras de BSA obtenidas tras el proceso de optimización. Diámetro y morfología de las nanofibras se determinará por el análisis de las imágenes tomadas por microscopía óptica y electrónica de barrido
- Fabricación y optimización del proceso de electrohilatura para la obtención de nanofibras de proteína purificada de mucosidad de pez.
- Caracterización de las nanofibras obtenidas tras la fabricación, midiendo los parámetros obtenidos mediante microscopía óptica y electrónica de barrido.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Polímeros utilizados

Durante la realización de este estudio se utilizaron varios polímeros, tanto en solitario como combinados para poder obtener nanofibras, entre ellos se encuentran la proteína BSA (*BSA Heat Shock Fraction, Sigma-Aldrich, CAS: 9048-46-8, Mw: ~66 kDa*), Quitosano de bajo y medio peso molecular (*Sigma-Aldrich, CAS: 9012-76-4, Mw bajo peso molecular: 50 000~190 000 kDa, Mw medio peso molecular: 190000~310000 kDa*), PEO y PEG, cuya única diferencia es que el PEO es de mayor peso molecular y es de síntesis química, (*Polyethylene oxide/Polyethylene glycol, ACROS organicstm, CAS: 25322-68-3, Mw: ~900 000 kDa y Mw: ~8 000 kDa*), Acetato de celulosa (*Sigma-Aldrich, CAS:9004-35-7, Mw: ~30 000 kDa*), PMVE/MA ácido (*Sigma-Aldrich, CAS: 25153-40-6, Mw: ~1 980 000 kDa*) y PMVE/MA éster (*Sigma-Aldrich, CAS: 9011-16-9, Mw: ~1 980 000 kDa*).

Junto con estos polímeros se utilizaron los siguientes disolventes para la obtención de disoluciones poliméricas, agua ultrapura, etanol, acetona, ácido acético al 10 % y ácido trifluoroacético (TFA). Estos disolventes se testaron con varios de los polímeros para poder comprobar la solubilidad de estos, sobre todo la BSA, que es el polímero de interés para este proyecto.

3.2. Preparación de disoluciones

El primer paso para la optimización de las nanofibras fue hacer pruebas para realizar las distintas disoluciones con los distintos polímeros. La primera de estas pruebas incluyó comprobar la saturación de la proteína en los disolventes mencionados anteriormente, para ello se probaron concentraciones en peso desde el 5 % al 45 % de proteína en los disolventes dependiendo de la solubilidad que demostrase tener el soluto en dicho disolvente. Con los otros polímeros se realizaron pruebas del mismo estilo de una forma más limitada para comprobar si eran compatibles con los mismos disolventes que la propia proteína.

Después se realizaron mezclas de los polímeros compatibles con la proteína para poder determinar el punto en el que serían compatibles ambos compuestos. Una vez determinada la disolución apropiada de cada una de las mezclas, se pasó a realizar el electrohilado.

3.3. Medida de viscosidades

Uno de los parámetros importantes que tener en cuenta para la buena electrohilatura de las disoluciones es la viscosidad de estas, para ellos se utilizaron viscosímetros Cannon Fenske. Este método mide la viscosidad de las disoluciones a través del tiempo que tardan en cruzar de un punto a otro de un ensanchamiento en un tubo de vidrio. Esta medida junto con la densidad de la disolución, que se midió justo antes, y una constante que marca el modelo del viscosímetro usado y la temperatura a la que se tomó la medida permitió calcular la viscosidad (centipoises) y la viscosidad cinemática (centistokes).

3.4. Elaboración de las nanofibras mediante electrohilatura

Las nanofibras pueden elaborarse utilizando diversas técnicas, como el crecimiento espontáneo, síntesis mediante moldes, electrohilatura y litografía. De todas ellas, en nuestra experimentación se ha seleccionado la electrohilatura, debido a la gran versatilidad que tiene la técnica y a que es la más apropiada para nuestro objetivo. Los parámetros necesarios para cada uno de los materiales utilizados para nanofibras varían según el polímero. Las condiciones ambientales de humedad y temperatura se intentaron mantener estables, entre 35 % y 60 %, y entre 20 °C y 35 °C, respectivamente.

Para la síntesis, además de las soluciones proteicas, fue necesario un equipamiento de electrohilatura específico. Este equipamiento cuenta con una bomba de infusión, modelo *kdScientific 100*, que tiene la función de dosificar de forma permanente y constante la solución contenida en una jeringa. Dicha jeringa está equipada con una aguja 316 de acero inoxidable (modelo) de Sigma-Aldrich de calibre 18 (diámetro externo 1,270 mm y diámetro interno 0,838 mm), de 5,08 cm de longitud, cuya función consiste en expulsar la solución a la que se le aplica la carga electrostática, sirviendo de polo positivo. La fuente de alta tensión (*Glassman High Voltage Inc.*, modelo FC60P2) transmite la carga negativa al polo opuesto, el colector conductor donde se plasman las fibras debido al campo electrostático entre ellos, que favorece la transmisión del polímero cargado y que permite la síntesis de nanofibras

La recolección de las fibras puede hacerse de varias formas distintas según lo que se quiera hacer con ellas. Para microscopía óptica se coloca un portaobjetos o un cubreobjetos sobre el colector, para el SEM se emplea un objeto conductor que se pueda introducir en el microscopio, como un cubreobjetos recubierto de papel de aluminio o una moneda, para otros estudios, se pueden recoger las fibras directamente mediante raspado del colector.

3.5. Microscopía óptica

Las fibras obtenidas mediante el proceso anterior de electrohilatura se observaron mediante microscopía óptica. Esto permitiría ver la morfología de las fibras para un análisis de la calidad, y así ser capaces de acotar los parámetros establecidos durante el electrohilado hasta que sean los óptimos. La microscopía óptica permite estudiar el grosor, la morfología, la uniformidad, la estabilidad en la longitud, la firmeza y la linealidad de nuestras fibras. Todas ellas salvo el grosor se observarían de manera subjetiva a simple vista. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio óptico LEICA DMI 3000B equipado con una fuente de luz compacta EL6000 y una cámara digital LEICA DFC3000G. Se obtuvieron imágenes de contraste de fases, que fueron monitorizadas a tiempo real gracias a la cámara incorporada de serie en el microscopio y al programa informático *Leica Suite AF6000 Module Systems*, que permite el procesamiento de la imagen manualmente.

Es necesario aclarar que no es posible cuantificar el grosor de las fibras de forma precisa empleando el microscopio óptico, ya que la resolución de la cámara, en conjunto con el aumento insuficiente del microscopio, imposibilita la delimitación de los límites de la fibra.

3.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para una visualización con mayor definición de las fibras es necesario hacer uso de la microscopía electrónica, en nuestro caso de microscopía electrónica de barrido (SEM). El microscopio utilizado para la visualización de las muestras será el JEO 6100.

Gracias a la microscopía electrónica de barrido se puede analizar con una mayor precisión la totalidad de las características de la morfología de la fibra, al tener una resolución superior a la de la microscopía óptica. A pesar de ello, el tamaño de las fibras puede llegar a ser tan pequeño que la determinación cuantitativa de ciertos parámetros concretos puede resultar extremadamente difícil, e incluso imposible y se tienen que dar cifras con mayor margen de error, lo que se podría afirmar desde un principio sería que los valores se encuentran por debajo de ciertos puntos micrométricos o nanométricos.

Una vez obtenidas las imágenes de microscopía electrónica, para poder hacer las medidas de diámetro de las distintas nanofibras obtenidas de las distintas disoluciones se utilizó el programa *ImageJ* (*National Institutes of Health* (NIH), Versión 1.8.172) que utiliza una extrapolación del número de píxeles de una imagen junto con una escala determinada con anterioridad para poder calcular las distancias reales entre dos puntos de la escala

nanométrica, con la ayuda de este programa se realizarán 100 medidas en distintas nanofibras de cada muestra para poder hacer una gráfica que componga la distribución normal de las fibras.

3.7. Cuantificación de proteínas

Para realizar una cuantificación de las proteínas que están contenidas en las nanofibras que se obtengan de las distintas disoluciones que se han probado, se utilizaron dos métodos. El primero y principal consiste en el método de Bradford. Este método consiste en la utilización del reactivo de Bradford, un reactivo que se encarga de teñir los residuos de los aminoácidos básicos (histidina, arginina y lisina) para detectar la cantidad de proteína que hay en una disolución mediante la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

Para realizar esta técnica primero se debe realizar una recta de calibrado, esto se hace así para poder tener un elemento conocido con el que comparar la cantidad de proteína que se obtenga de la medición de las muestras. Para ello se hace una serie de disoluciones con concentraciones ascendentes (0, 100, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$). Una vez tenemos las disoluciones deseadas, se prepararán *ependorf* con 0,5 ml de reactivo de Bradford que se ha preparado con anterioridad y se añaden 10 μg de nuestra disolución proteica, acto seguido se les da un golpe de vórtex para que se mezcle uniformemente, esto se ve debido al cambio de color que sufre la disolución. Se pasan 100 μg de la mezcla de reactivo de Bradford y proteína homogeneizada a una placa multipocillo, y se repite esto 4 veces para poder hacer la media de las medidas. Después, se utilizará un espectrofotómetro *Biotek Cytation 3 Imaging Reader* para medir la absorbancia de las muestras. Con esto se hace una gráfica con la recta de calibrado y gracias a esta se podrá determinar la cantidad de proteína que tendrán las nanofibras.

El otro método para cuantificar proteínas que se usó es mediante *nanodrop*, este método es menos complejo que el de Bradford, se trata un espectrofotómetro de nanogotas *Thermo Scientific Nanodrop 1000* que permite obtener la concentración de proteína de una disolución mediante espectrometría a 280 nm, en lugar de 595 nm como el método de Bradford. Sin embargo, debido a que no es tan preciso a la hora de cuantificar proteínas como podría ser el método de Bradford, este método se utilizó para confirmar resultados obtenidos mediante el anterior método.

3.8. Tratamiento de datos

Para poder procesar los datos obtenidos durante la experimentación, fueron necesarios varios programas informáticos que trataran los datos y nos los ofreciesen de una manera más limpia y eficaz para poder interpretarlos de manera clara y precisa. Para poder realizar el tratamiento estadístico de los datos obtenidos se utilizó *Microsoft Excel* (*Microsoft*, Versión estable 2019) mediante este programa se hicieron las tablas y se procesaron los datos para poder hacer gráficas mediante *Prism 7* (*GraphPad*, Versión 7.04, 28 de noviembre de 2017), con el *Prism* se terminaron de realizar las gráficas para que los datos se puedan ver de forma más directa, se pueda analizar con mayor facilidad para así comentarlas en la discusión y así poder sacar conclusiones.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de la saturación de distintos polímeros en disolución

Para comprobar la saturación de la proteína que se va a utilizar para electrohilar, se hizo un gradiente de concentraciones desde el 5 % hasta el 50 % en agua ultrapura. La proteína resultó soluble con facilidad a temperatura ambiente hasta el 40 %, después, debido a la alta viscosidad de la solución, fue necesario aplicarle calor para que se disolviese hasta el 45 %. Después de eso la solución ha alcanzado la saturación y no admite más BSA. La BSA se decidió probar con otros disolventes para poder combinarlo con otros polímeros, en el caso de que no se pudiese electrohilar por separado. Sin embargo, se probaron aparte del agua ultrapura, otros dos disolventes, el etanol y la acetona, uno para juntarlo con el PMVE/MA y otro para juntarlo con el CA.

Cuando se comprobó la solubilidad de la proteína se hicieron dos gradientes de agua y etanol, en proporciones de 50:50 y 25:75 respectivamente, para poder asegurarnos de que se pudiese juntar con otros biopolímeros que sabemos son electrohilables, como el PMVE/MA ácido o el éster, ya que este último necesita etanol para solubilizarse. Sin embargo, tras las pruebas se comprobó que la BSA no puede disolverse en ninguno de los dos gradientes, por lo tanto, queda descartado combinarlo con el PMVE/MA éster para electrohilar.

Una vez comprobada la solubilidad, se intentó desnaturalizar la proteína utilizando ácido acético y TFA (ácido trifluoroacético), para ello se realizaron disoluciones crecientes de BSA con 10 % de ácido acético y un 1 % de TFA. En el caso del ácido acético, a la concentración de 20 % de BSA la proteína gelifica parcialmente y a partir de 30 % gelifica completamente, obviamente a estas concentraciones es imposible electrohilar nanofibras de proteína. Con el TFA se consiguió una disolución adecuada para la electrohilatura, pero presenta los mismos problemas que tiene la disolución de la proteína sola y a altas concentraciones tiende a gelificar parcialmente o no disolverse en su totalidad.

Otro parámetro que se optó por cambiar cuando se intentó desnaturalizar la proteína fue la temperatura, para ello se decidió aplicar un choque de calor de 60 °C durante una hora, sin embargo, esto se descartó debido a que la proteína dejó de estar líquida y se convirtió en un gel blanquecino.

4.2. Combinación de la BSA con otros compuestos para mejorar la electrohilatura

Una vez observada la saturación de la proteína en agua, se probó realizar mezclas con PMVE/MA ácido de bajo peso molecular (216 000 kDa) a distintas concentraciones tanto de BSA como de PMVE/MA en peso. Se hicieron las siguientes disoluciones (Tabla 2):

Tabla 2: Tabla de combinaciones de disoluciones de BSA y PMVEMA ácido a varias concentraciones

[PMVEMA ac.] ^a	[BSA] ^a	Resultado	Observaciones
1 %	1 %		
2,5 %	2,5 %		
5 %	5 %		
10 %	10 %		
20 %	20 %		
0,5 %	0,5 %	Se forma un precipitado blanco	
0,1 %	0,1 %		
0,5 %	1 %		El soluto entra en suspensión
0,1 %	1 %		
10 %	1 %		
20 %	1 %		

^a, concentración en % p/p.

Sin embargo, en el momento en el que ambos compuestos se ponen juntos en la misma disolución, precipitan en forma de un precipitado blancuzco, esto puede ser debido a que el PMVE/MA reacciona con la naturaleza proteica del BSA actuando como floculante y precipitándola a la fuerza. Después se probó con PVME/MA de alto peso molecular (1 980 000 kDa), con un resultado similar, formando un sedimento blanco amarillento en el fondo de la disolución.

Una vez observada y desestimada la compatibilidad de la BSA con el PMVE/MA, se decidió probar con otros compuestos. El primero de ellos fue el CA, un compuesto electrohilable orgánico, pero al comprobar la compatibilidad de disolventes, se observó que la proteína no era soluble en acetona, por lo tanto, se decidió descartarla para el caso de la BSA.

Por último, se decidió utilizar tanto el PEO de 900 000 kDa como el PEG de 8 000 kDa, con la diferencia de que el PEO se sintetiza de manera química y tiene un mayor peso molecular que el PEG, estos compuestos está comprobado que tienen unas propiedades químicas adecuadas para que sean compatibles con los mismos disolventes que la BSA y, además se ha

estudiado que es compatible con otros compuestos de naturaleza proteica, haciendo estos compuestos ideales para el propósito de este estudio.

Primero se probó con varias concentraciones de PEG, en un rango de entre 3 % hasta el 20 %, sin embargo, en ninguno de esos casos se pudo electrohilar, ni solo ni mezclado con BSA. Además, no se consiguió una viscosidad adecuada para el procedimiento de electrohilatura, por lo que se descartó rápidamente.

Se probaron varias concentraciones tanto de PEO, al 3 % y 4 %, como de BSA, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % y 25 %, con estas mezclas se comprobó que la compatibilidad era buena en todas ellas y se pudo ver que la electrohilatura se realizaba con éxito. De estas soluciones se seleccionaron las que estuviesen disueltas homogéneamente y estuviesen en una viscosidad adecuada. Debido a la alta viscosidad no se pudieron hacer las disoluciones a partir de stock, ya que a la concentración del 6 % ya comienza a tener consistencia de gel, por lo tanto, todas las disoluciones se hicieron directamente a partir del polímero en polvo.

4.2.1. Combinación del PEO con extracción mucosa dérmica de pez

Una vez seleccionado un polímero compatible con proteínas, se procedió a probar con un extracto mucoso proveniente de piel de anguila, que contiene unos péptidos que podrían llegar a tener aplicaciones biomédicas debido a su supuesta capacidad antibacteriana, para ello se combinó un 15 % de esta mucosidad liofilizada, sin purificar los péptidos que pudiera contener, es decir, con otras moléculas como lípidos y glúcidos incluidas, con un 3 % de PEO, una proporción que se ha observado que es compatible con la BSA. Una vez se hubo disuelto, se comprobó que la disolución no se pudo homogeneizar correctamente, esto puede ser por las contaminaciones propias de una mezcla de esta clase. Se probó a intentar electrohilar la disolución, pero no se consiguió que formase un cono de Taylor apropiado ni siquiera para un *electrospray*. Se decidió que antes de poder electrohilarlo, sería necesario purificar los péptidos para eliminar todo compuesto que se pueda considerar que entre en conflicto con el polímero y evite el correcto electrohilado de los péptidos. Sin embargo, debido a causas externas a este estudio, la cantidad de mucosidad que se pudo obtener fue insuficiente para estas pruebas y se tuvo que dejar de lado. Sería interesante continuar por este camino para observar este tipo de nanofibras compuestas por extractos de esta clase con estas características.

4.2.2. Combinación de PEO con quitosano para electrohilatura

Otro de los compuestos que se probaron fue el quitosano, un compuesto aminopolisacárido con una alta cantidad de fibra en su composición, como experimento paralelo, se probó la posibilidad de combinar el quitosano con el PEO para ver si se podía electrohilar de manera sencilla. Las disoluciones se realizaron utilizando dos tipos de quitosano, de bajo y medio peso molecular, estas disoluciones se realizaron a partir de un stock de quitosano al 1,5 % de quitosano en una disolución de 10 % de ácido acético, aunque como ya se ha explicado antes, el PEO se utilizó directamente en polvo debido a que a partir de ciertas concentraciones toma características de gel.

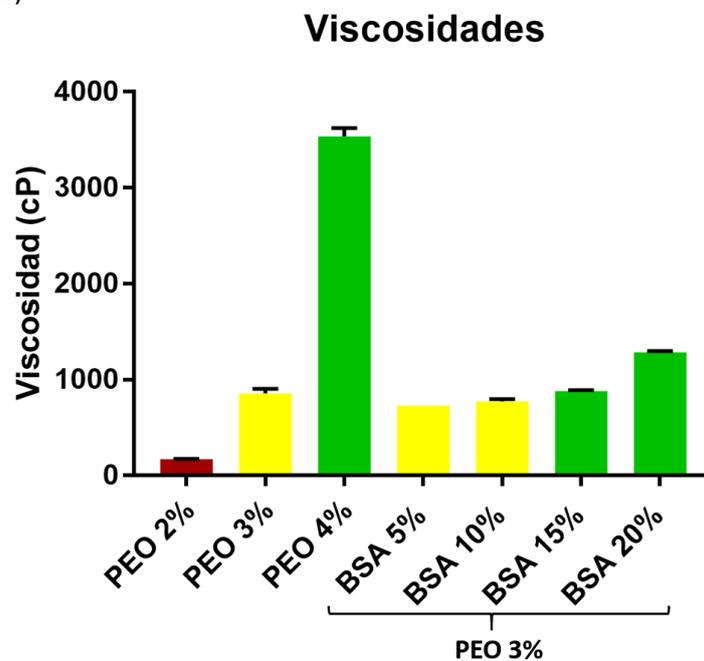
Con esto se realizaron varias concentraciones combinando ambos quitosanos con un 3 % y un 4 % de PEO, por lo que se realizaron cuatro disoluciones a partir de cada stock de quitosano: dos de 0,75 % de quitosano tanto en 3 % como 4 % de polímero y dos de 0,5 % de quitosano todas ellas en un 10 % de ácido acético debido a que el quitosano presenta dificultades al disolverse solamente agua o a menores concentraciones de ácido acético. Todas estas disoluciones se disolvieron correcta y homogéneamente. Se decidió electrohilar las disoluciones que contenían un 0,75 % de quitosano. Una vez hecho se observó que las muestras tenían problemas similares a los del PEO por separado, que se intentan electrohilar, pero no se consigue o las fibras se rompen conformando un mosaico en el que sale un *electrospray*, las partículas están conformando en muchas ocasiones la forma de fibras, pero sin llegar a ser fibras. Este mosaico se repitió en las disoluciones que contenían un 4 % de PEO, pero debido a que una disolución sin quitosano a estas concentraciones sí que se consigue electrohilar sin mayor dificultad, se planteó que fuese debido al 10 % de ácido acético. Por lo que se procedió a realizar disoluciones de PEO en ácido acético al 10 %, con lo que se comprobó que, aunque gelificaba a una concentración más baja que en agua, al 6 %, a una concentración de solamente 4 % se puede ver que la disolución es más líquida que si se hubiese disuelto exclusivamente en agua ultrapura.

El último experimento que se probó combinando quitosano fue comprobar si se podía electrohilar mezclándolo con tanto PEO como BSA, por lo que se hicieron disoluciones con un 15 % de BSA y un 3 % de PEO, que es la que se eligió como la que presentaba unas mejores características de electrohilatura. Al realizar las disoluciones de 0,75 % en 10 % de ácido

acético se pudo observar que en estas había dos fases bien diferenciadas, una blanquecina en la parte superior del vial, bastante más viscosa que la fase inferior de color amarillo dorado. Esto se observó tanto en la disolución de quitosano de bajo peso molecular como en el de medio peso molecular.

4.2.3. Medida de viscosidades

Uno de los parámetros más importantes para determinar la correcta electrohilatura de las distintas disoluciones es la viscosidad de estas, por ello se realizó una medida de estas viscosidades de varias de las disoluciones que se pudiesen electrohilar junto con otras que no. Los resultados expresados en centipoises (cP), unidad de viscosidad dinámica, fueron los siguientes (Gráfica 1):



Gráfica 1: Gráfica de viscosidades de varias disoluciones de PEO sólo y junto a BSA. Rojo: no electrohilan, amarillo: electrohilado parcial, verde: electrohilan correctamente

En esta gráfica se puede ver que la viscosidad aumenta ligeramente en cuanto aumenta la cantidad de proteína. Aparte de eso se puede ver que la diferencia en viscosidades varía principalmente debido a la cantidad de PEO que se encuentra en la disolución original, aun así, no parece ser lo determinante en este caso para la correcta electrohilatura, porque a pesar de que haya una viscosidad drásticamente mayor en la disolución de 4 % de PEO, se verá más adelante no es la mejor muestra de nanofibras obtenida. Sin embargo, algo sí que influye debido a que en el caso de las disoluciones con proteína las que tienen una mayor viscosidad salen las nanofibras más gruesas, llegando a ser microfibras en la última de las disoluciones.

También se realizaron pruebas de viscosidad con disoluciones de PEG a varias concentraciones para comprobar que se pueda hacer una comparativa con el PEO, que es el mismo compuesto con una composición química mucho más repetitiva y alargada. Sin embargo, ninguna de las disoluciones realizadas de PEG tuvieron suficiente viscosidad y tuvieron una consistencia muy parecida al agua.

4.3. Fabricación de nanofibras a partir de las disoluciones

Para hacer nanofibras de BSA, se decidió elaborar un gradiente de concentraciones de solución para electrohilar, 30 %, 35 % y 40 % en masa, debido a su elevada viscosidad aparente. Con cada una de ellas se probó con un rango de los siguientes parámetros para ver si se formaba el cono de Taylor y si se formaban nanofibras (Tabla 3).

Tabla 3: Tabla de concentraciones de BSA y los parámetros en los que se forma el cono de Taylor

Concentración	Velocidad de flujo ^a	Voltaje ^b	Distancia ^c	Parámetros en los que se forma cono de Taylor
30 %	0,02-0,05	12-15	12-15	0,02 ml/h ;12 kV; 15 cm 0,05 ml/h; 14 kV; 15 cm
35 %	0,02-0,05	14-15	12-16	0,02 ml/h; 13 kV; 16cm 0,02 ml/h; 14 kV; 13cm
40 %	0,1-0,25	12-15	12-14	0,25 ml/h; 15 kV; 14 cm 0,1 ml/h; 15 kV; 12 cm

^a, en ml/h; ^b, en kV; ^c, en cm.

Todas estas mediciones se realizaron a temperatura y humedad ambientales de 20°C y 56 % de humedad ambiental.

A concentraciones altas, la BSA resulta muy viscosa a temperatura ambiental, con lo que a la hora de realizar la electrohilatura de la solución al 40 % se tiene el riesgo de bloquear la aguja. Una vez procesadas por el equipo de electrohilado, se observaron las muestras obtenidas con estas disoluciones, sin embargo, no se pudieron observar nanofibras completas, sino pequeñas nanogotas en la superficie del portaobjetos (Figura 7).

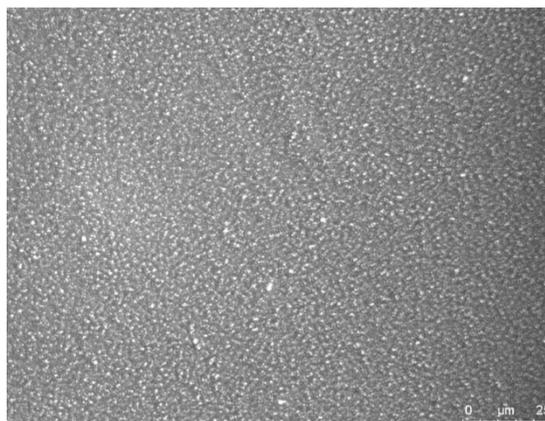


Figura 7: *Electrospray* a partir de una disolución al 30 % de BSA. Foto tomada mediante microscopía óptica a 63X

Como se puede observar en la figura 7, la proteína por separado solo es capaz de hacer un *electrospray*, que es una capa de nanopartículas desordenadas, por mucho que se cambien los parámetros físicos o la concentración de la disolución no se es capaz de hacer fibras. Por ello se decidió optar por mezclar la proteína con polímeros con propiedades electrohilables conocidas, cómo se ha explicado con anterioridad, se descartaron varios y se decidió ir por el PEO.

4.4. Optimización de nanofibras de polímero y proteína BSA

Una vez obtenidas las disoluciones apropiadas para la electrohilatura, procedemos a optimizar el proceso para obtener las mejores fibras posibles, es decir, que no tengan malformaciones u otro tipo de artefactos que eviten la formación de nanofibras.

Una vez probadas se determinaron los siguientes parámetros para la obtención de las nanofibras combinadas de PEO y BSA (Tabla 4).

Tabla 4: Tabla de concentraciones de BSA junto a PEO y parámetros a los que electrohilan.

[PEO] ^a	[BSA] ^a	Velocidad de flujo ^b	Voltaje ^c	Distancia ^d
4 %	0 %		12-16	15-17
4 %	5 %		12-14	15
4 %	10 %			15
3 %	0 %		12-18	15-17
3 %	5 %	0,2-0,3		17
3 %	10 %			17
3 %	15 %		14-18	18
3 %	20 %			18
3 %	25 %			18

^a, concentración en % p/p; ^b, en ml/h; ^c, en kV; ^d, en cm.

Todas estas nanofibras se tomaron en un rango de humedades entre 50 % y 70 % y a un rango de temperaturas entre 20 °C y 35 °C.

4.5. Análisis de los parámetros de las nanofibras mediante microscopía óptica

En la figura 8 se pueden observar las nanofibras que se generan con el PEO al 3 % y 4 %

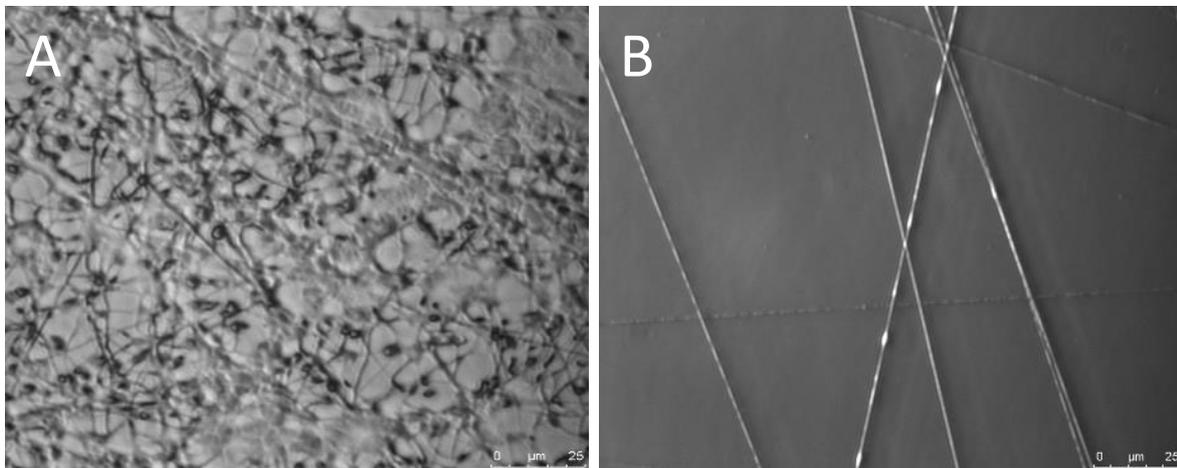


Figura 8: Nanofibras de disoluciones al 3 %(A) y 4 %(B) de PEO. Imágenes tomadas mediante microscopía electrónica a 63x.

En estas imágenes se puede apreciar que, aunque salen nanofibras con el polímero por separado, en la disolución de 3 % de PEO, no llegan a apreciarse fibras completas, sino que se ve una mezcla entre burbujas de polímero y fibras rotas y con muchas deformidades. En el caso del 4 % por otro lado, sí se ven fibras muy finas y completas, estas presentan variaciones muy grandes en el grosor de las fibras y tiene lo que se llaman “perlas”, que son series de engrosamientos durante la longitud de la fibra que forman algo parecido a un collar. La figura siguiente (Figura 9) muestra las nanofibras formadas a partir de disoluciones de 3 % de PEO junto con 5 % y 10 % de BSA:

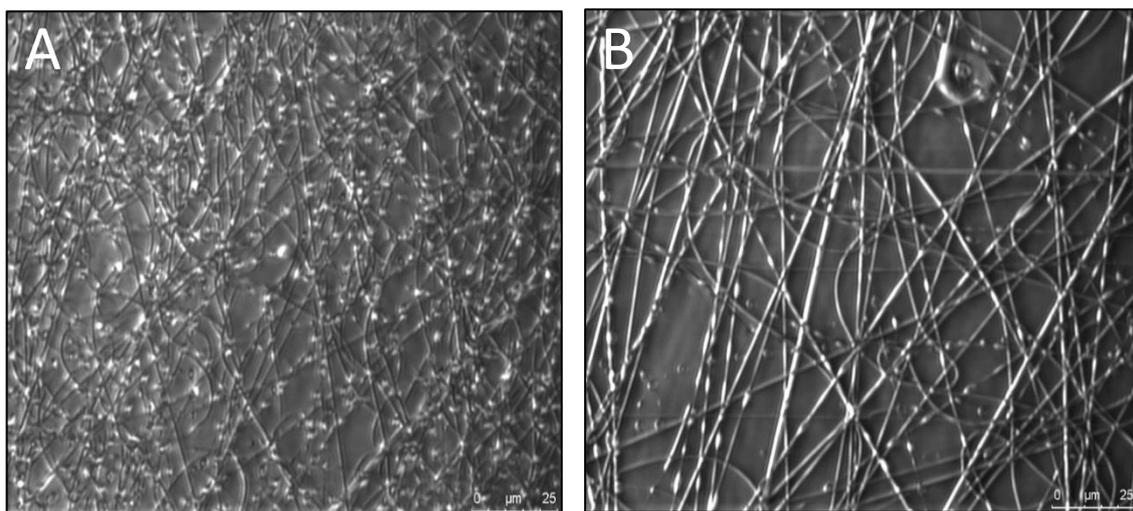


Figura 9: Nanofibras de disoluciones al 3 % de PEO y al 5 %(A) y 10 %(B) de BSA. Imágenes tomadas mediante microscopía electrónica a 63x.

Estas nanofibras son las correspondientes a las del 3 % de PEO junto con 5 % y 10 % de BSA respectivamente, como se puede ver, con solo el 5 % de proteína ya se aprecian fibras completas, aunque muy finas y con muchos engrosamientos a lo largo de las fibras, además de parecer bastante frágiles debido a que hay muchas de las fibras partidas o rotas. Con el 10 % de proteína las fibras siguen teniendo muchas irregularidades en el tamaño de las fibras con muchas perlas a lo largo de las fibras. Sin embargo, lo que sí que se ve es que por lo general son fibras más gruesas.

En la figura 10 se pueden ver el resto de las fibras que se hicieron con un 3 % de PEO

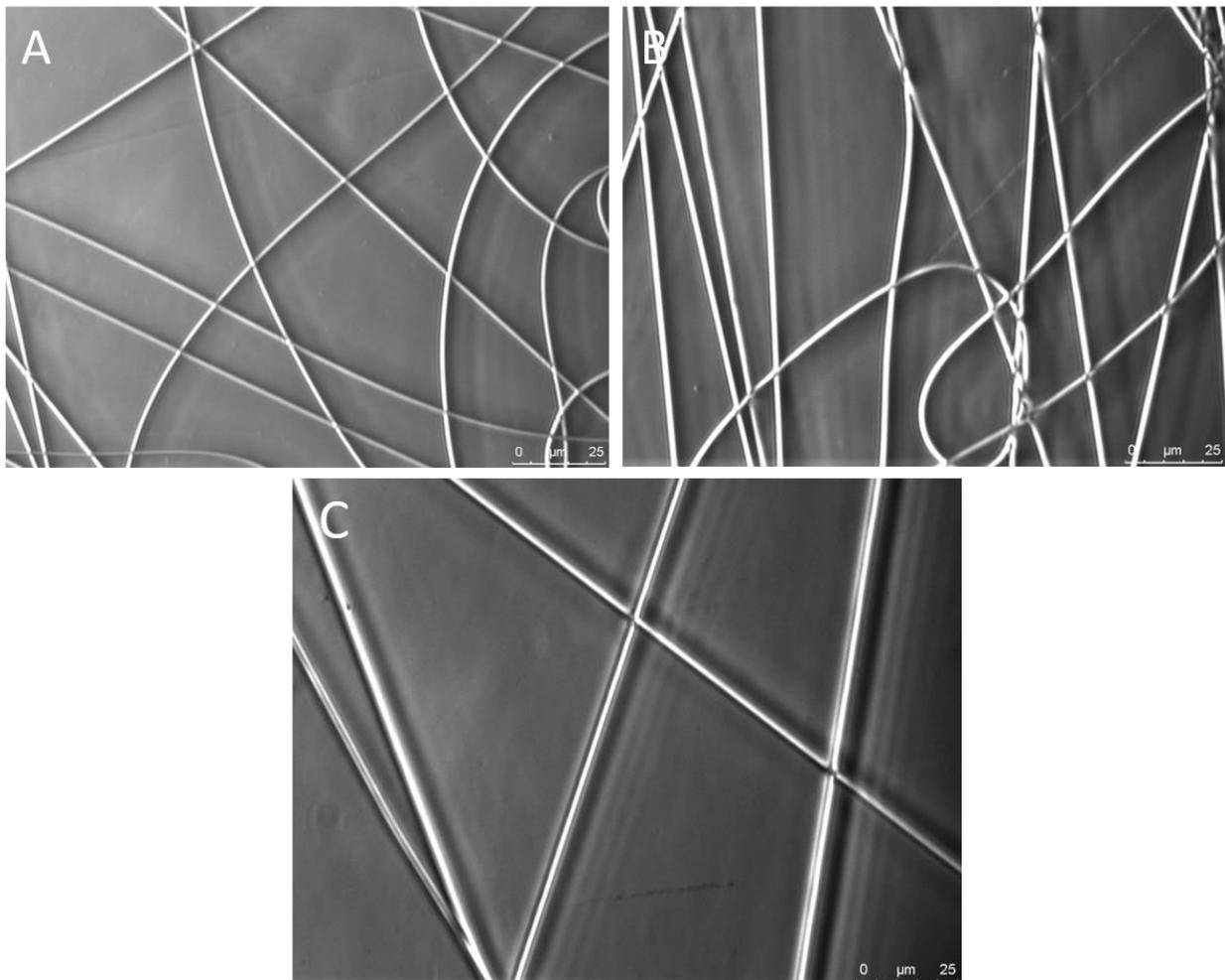


Figura 10: Nanofibras de disoluciones al 3 % de PEO junto 15 %(A), 20 %(B) 25 %(C) de BSA. Imágenes tomadas mediante microscopía electrónica a 63x.

Estas fibras son las correspondientes a un 3 % de PEO y a un 15 %, 20 % y 25 %, se puede ver que las fibras a estas cantidades de proteína las fibras son bastante más completas y uniformes. Siendo las de 15 % las que a simple vista se ve que son más finas, a falta del análisis mediante microscopía electrónica de barrido para hacer las medidas y poder ver el diámetro

sin los problemas de birrefringencia que se observan con el microscopio óptico. Aun así, en las fibras del 25 % de BSA hay más variación en el grosor a simple vista.

Las últimas imágenes que se tomaron en microscopía óptica fueron las que se hicieron con una concentración del 4 % de PEO (Figura 11), superior a las de las imágenes anteriores.

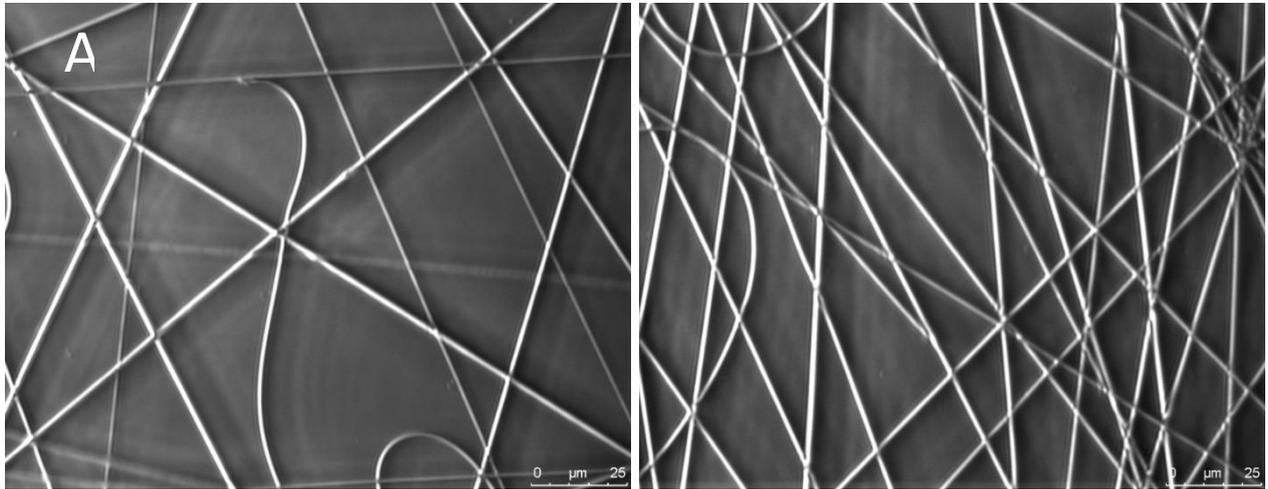


Figura 11: Nanofibras de disoluciones al 4 % de PEO junto con 5 %(A) y 10 %(B) de BSA. Imágenes tomadas mediante microscopía electrónica a 63x.

Las últimas fibras que se observaron mediante microscopía son las correspondientes a las disoluciones que contenían un 4 % de PEO, en este caso con 5 % y 10 % de BSA. Como se puede ver, a diferencia de con las disoluciones que contenían un 3 % de polímero, estas si forman nanofibras completas desde bajas concentraciones de proteína, sin embargo, como puede apreciarse en la primera imagen, en el caso de un 5 % de BSA las fibras tuvieron una visible variación en el grosor de las mismas, así como varias fibras rotas o bífidas, esto ya no se pudo apreciar en las fibras que provienen de una disolución que contenía el 10 % de BSA, donde se puede apreciar que las fibras son bastante uniformes y más gruesas que la disolución anterior.

3.6. Análisis de diámetro de fibras seleccionadas mediante microscopía electrónica de barrido

De todas estas muestras, para poder medir los parámetros se seleccionaron las tres que se consideraron más apropiadas a nivel de uniformidad y regularidad de las nanofibras, con una mayor proporción de proteína respecto a polímero. Estas muestras se enviaron al SEM para la obtención de imágenes de mayor resolución y así medir el diámetro de las fibras, debido a la elevada longitud de estas, este parámetro no es posible medirlo mediante estos métodos. Con lo que se obtuvieron las siguientes imágenes a partir de las disoluciones al 15, 20 y 25 % de proteína, todas al 3 % de PEO, ya que nuestro objetivo era reducir el máximo posible la cantidad de polímero ayudante en este estudio. En la figura 12 se pueden apreciar las fibras obtenidas mediante microscopía de barrido a partir de una disolución de 3 % de PEO y 25 % de BSA

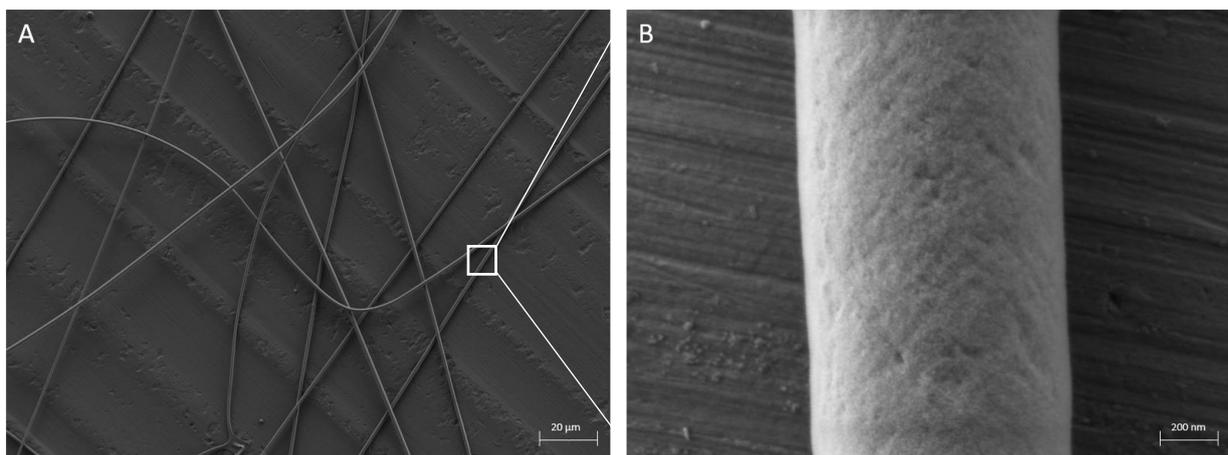
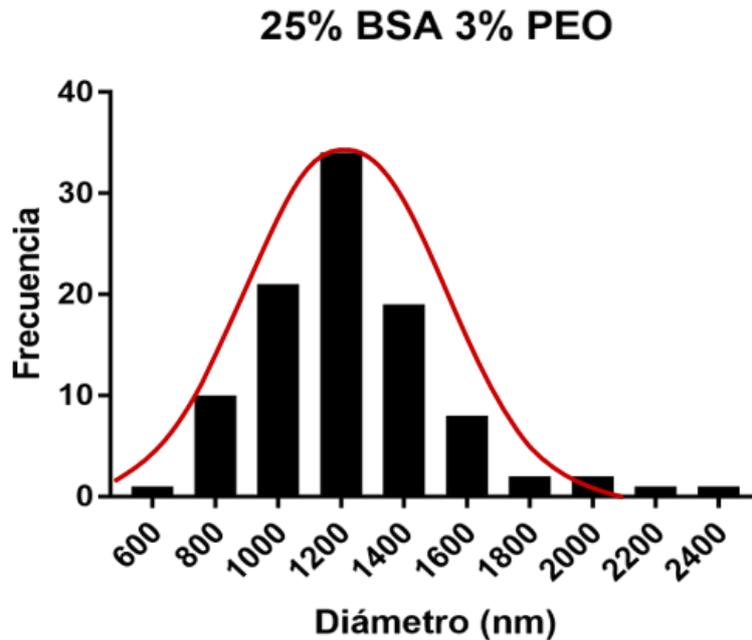


Figura 12: Imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de barrido de una disolución de 3 % de PEO y 25 % de BSA. Imágenes tomadas con un campo de 30 µm (A) y de 200 nm (B)

Tal y como se puede ver en las imágenes anteriores, las nanofibras correspondientes a la disolución de 25 % de BSA presentan una apariencia uniforme, sin una gran variación en el diámetro y con una disposición más o menos homogénea, sin grandes deformaciones ni fibras rotas apreciables. Por otro lado, en la imagen de 200 nm se puede ver con claridad la superficie de la fibra, siendo de apariencia algodonosa sin porosidad aparente, esto hace que las propiedades de las fibras varíen respecto a su aplicación biomédica. De estas fibras se hicieron 100 medidas y se hizo una gráfica con ellas para comprobar la variación de diámetro (Gráfica 2)



Gráfica 2: Disposición normal de los diámetros de las fibras obtenidas de la disolución de 3 % de PEO junto con 25 % de BSA. La línea roja es el ajuste a una distribución gaussiana, cuyos parámetros fueron media de 1 187 nm, 31,77 de amplitud y una desviación estándar (SD) de 235,7 nm, con un $R^2=0,97$

Con los diámetros obtenidos se pudo observar que las fibras siguen esta distribución, con una media de $1\ 187 \pm 236$ nm y un R^2 de 0,97, así que se podría afirmar que según los diámetros siguen una distribución gaussiana. Siendo así, se puede apreciar, que con estos parámetros de la disolución las fibras se salen de la escala nanométrica en dos de sus dimensiones, lo que indicaría que se forman microfibras en lugar de nanofibras. Estas fibras para el objetivo de nuestro experimento se salen de los parámetros establecidos, sin embargo, también tendrían las mismas propiedades aplicables a la biomédica, con la posibilidad de que, al ser de mayor tamaño tarden más cuando se degraden.

En la figura 13 se pueden observar imágenes de microscopía electrónica de barrido que se tomaron de las nanofibras obtenidas de la disolución de 20 % de BSA y 3 % de PEO.

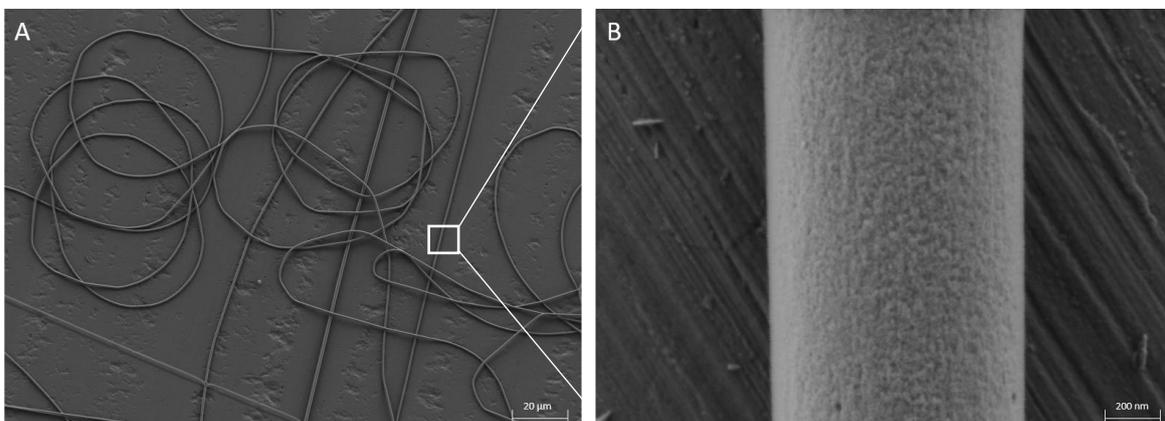
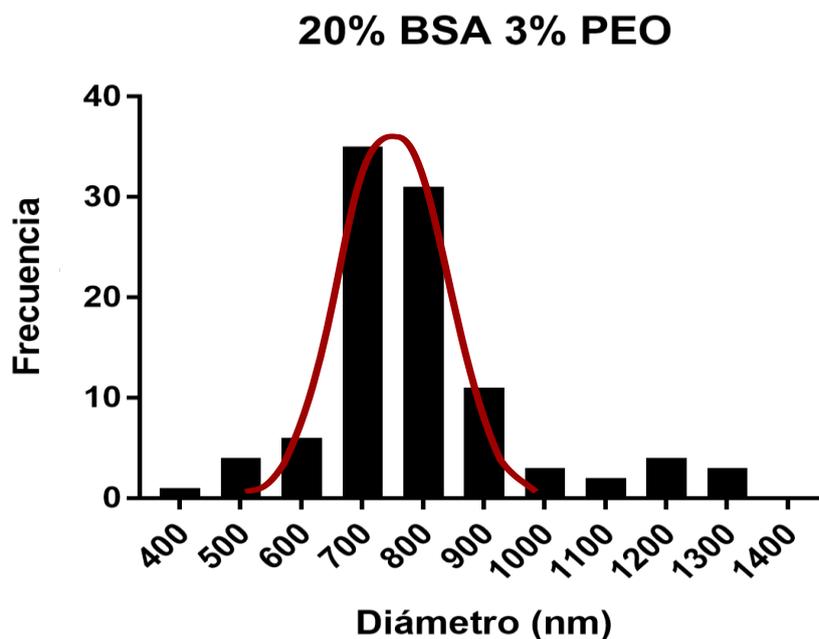


Figura 13: Imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de barrido de una disolución de 3 % de PEO y 20 % de BSA. Imágenes tomadas con un campo de 30 µm (A) y de 200 nm (B)

Como se puede ver en las imágenes, las nanofibras de esta disolución son más finas que en la de 25 % de BSA, además de eso, se puede apreciar que son menos rectas y forman bucles, esto podría ser por la forma en la que se hicieron las nanofibras, siendo la humedad ligeramente superior esta muestra respecto a la anterior o incluso por que la foto fue tomada en otro punto relativo de la muestra. Sin embargo, se aprecia que al igual que en la primera muestra, las fibras son bastante uniformes en tamaño. En cuanto a la apariencia, se ve que las fibras mantienen esa apariencia algodonosa, siendo incluso más prevaleciente, pareciendo más compactada que en la anterior disolución, manteniendo la falta de porosidad de la disolución anterior. Tal y como se hizo en el caso anterior, se tomaron 100 medidas de diámetros y se graficaron para comprobar la distribución de los diámetros de las fibras (Gráfica 3):



Gráfica 3: Disposición normal de los diámetros de las fibras obtenidas de la disolución de 3 % de PEO junto con 20 % de BSA. La línea roja es el ajuste a una distribución gaussiana, cuyos parámetros fueron media de 750,1 nm, 38,56 de amplitud y SD de 88,5 nm, con un $r^2=0,95$

En este caso, las nanofibras de la muestra con un porcentaje del 20 % de BSA, se puede apreciar que el tamaño de las fibras es menor que en el caso anterior y que aproximadamente la mitad de las fibras están rondando los 750 nm de diámetro. Además, también seguiría una distribución gaussiana, ya que, como se puede ver en la gráfica tiene una R^2 de 0,95, entrando en el error aceptable.

La figura 14 sería la correspondiente a una disolución de 15 % de BSA:

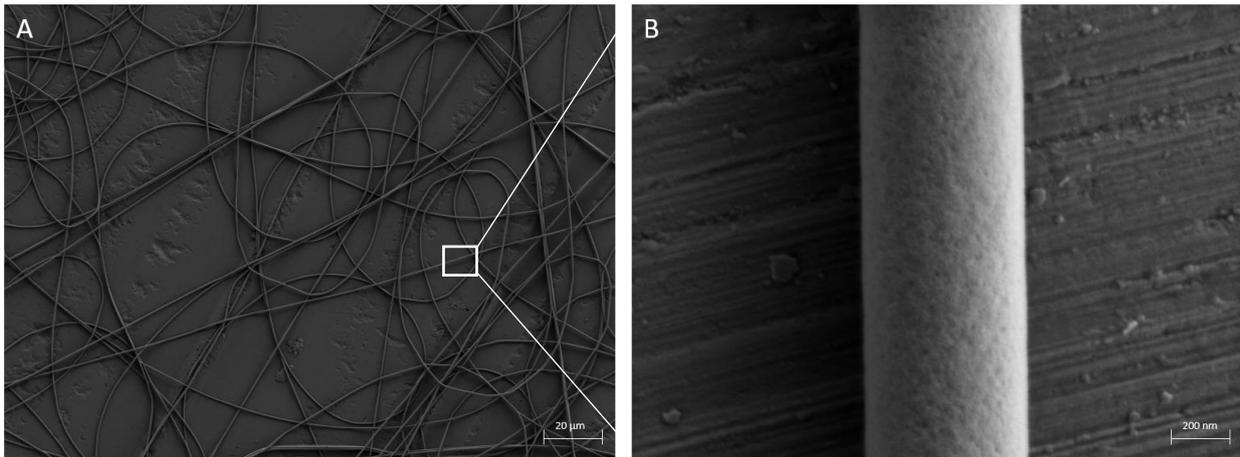
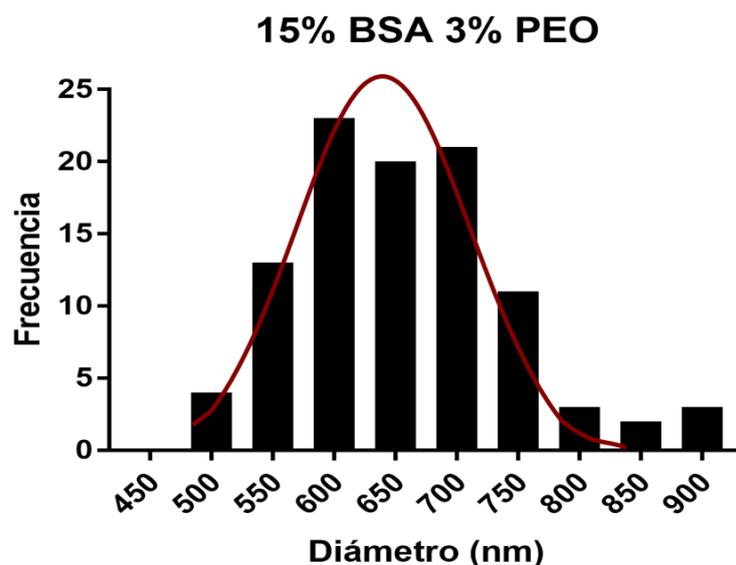


Figura 14: Imágenes tomadas mediante microscopia electrónica de barrido de una disolución de 3 % de PEO y 15 % de BSA. Imágenes tomadas con un campo de 30 μm (A) y de 200 nm (B)

Como se puede apreciar en la imagen, estas fotos tienen una mayor cantidad de fibras en el campo de observación, esto es así debido a que las fibras, al ser más finas, es más difícil determinar si están en el portaobjetos. Por lo tanto, a simple vista se puede ver que las fibras en esta muestra son más finas que en las dos anteriores. Además, en las imágenes se puede apreciar que siguen siendo bastante homogéneas, aunque si es cierto que ya en la imagen se ve un poco más de variedad en el momento de observar los distintos diámetros, nada muy disparatado. A nivel de apariencia de las fibras, al igual que en las disoluciones anteriores se puede apreciar como las fibras parecen tener una textura algodonosa bastante regular con porosidad nula. Después de tomar las imágenes se hicieron 100 medidas y se graficaron para ver la distribución de los diámetros de las fibras tomadas (Gráfica 4):

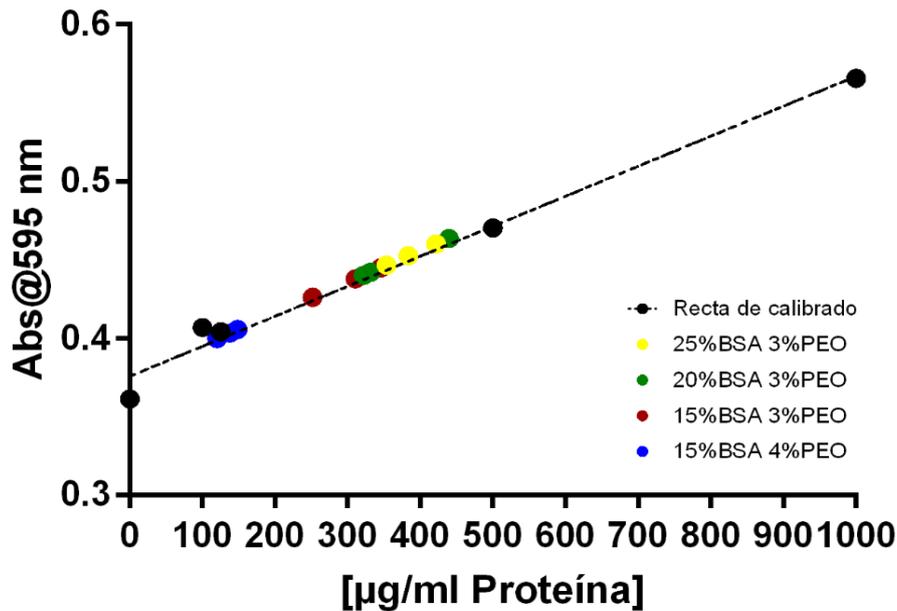


Gráfica 4: Disposición normal de los diámetros de las fibras obtenidas de la disolución de 3 % de PEO junto con 15 % de BSA. La línea roja es el ajuste a una distribución gaussiana, cuyos parámetros fueron media de 644,8 nm, 23,61 de amplitud y SD de 84,01 nm, con un $r^2=0,95$

En este caso, en el cual hay presente una proporción de 5:1 proteína-polímero, con un 15 % de BSA frente a 3 % de polímero, se puede ver que las nanofibras son las más finas de todas las que se han medido, rondando entre 550 y 750 nm de diámetro, respecto a su distribución, estas también están dentro de una gaussiana, con una media de 645 nm y un R^2 de 0,95. con una menor variación en el tamaño entre las más gruesas y las más finas. Siendo las fibras más apropiadas para el objetivo que se tenía en este proyecto.

4.7. Cuantificación de proteínas

Una vez observadas las nanofibras y medidos sus parámetros físicos, se midió la cantidad de proteína que había en estas, para ello se utilizaron dos métodos. El primero de ellos se trata del método de Bradford, un método por el cual se usa la espectrometría a 595 nm para poder determinar la cantidad de proteínas que contiene la muestra gracias a que el reactivo de Bradford reacciona con los aminoácidos básicos de la proteína (histidina, arginina y lisina), y con los datos obtenidos se puede extrapolar la cantidad de proteína presente, para ello es necesario hacer una recta de calibrado para poder determinar la cantidad de una determinada proteína que contiene dicha disolución. Para ello se realizaron cinco disoluciones de proteína correspondientes a la recta de calibrado y se pusieron en la placa junto con el reactivo de Bradford para poder establecer una escala sobre la que colocar las muestras que se han obtenido a través de la nanofibras de polímero con proteína. Una vez hecha dicha recta, se diluye la proteína de las nanofibras hasta que entre dentro de un rango en el cual se puedan cuantificar las proteínas dentro del rango de la escala y así poder determinar que nanofibras de todas las obtenidas tienen una mejor proporción de proteínas frente al polímero con el que se ha combinado. Con los resultados obtenidos se hizo la gráfica 5, en la que están representados tanto la recta de calibrado como los datos de las nanofibras.



Gráfica 5: Gráfica de absorbancia a 595 nm frente a concentración de proteína en µg/ml tomada mediante método de Bradford.

En esta gráfica se puede ver que a pesar de haber diluido las muestras hasta la misma concentración de proteína, se puede apreciar que hay algunas que presentan una menor cantidad resultante, siendo estas las que contienen un 4 % de PEO, en comparación con aquellas que presentan una menor cantidad de PEO en su composición. Esto se puede comprobar observando los puntos correspondientes a las fibras que contenían un 15 % de BSA en la disolución inicial, debido a que son las que se pueden comparar con mayor facilidad pues hay muestras tanto de aquellas que contenían tanto 3 % como 4 % de PEO en sus respectivas disoluciones iniciales, ambas disoluciones se diluyeron de manera similar, calculando un punto en el que estuviesen parejas siguiendo las proporciones de las disoluciones iniciales. Sin embargo, aunque en la disolución al 3 % de PEO la cantidad de proteína que se obtiene mediante este método está en un rango entre 250 y 350 µg/ml, en la disolución al 4 % se puede observar que la proteína se encuentra en un rango alrededor de 150 µg/ml. Por otro lado, las nanofibras correspondientes a las otras disoluciones se encuentran en un punto entre 350 y 450 µg/ml, lo que se corresponde con el resultado esperado, por lo tanto, se puede observar que la proteína que retienen las nanofibras es mayor a menores proporciones de PEO. Esto puede ser debido a que la proteína por separado no es capaz de electrohilar en nanofibras, por lo tanto tendría que combinarse con el polímero de manera que si aumenta el polímero, hay demasiado polímero para que la proteína se una con facilidad y se queda en disolución o incluso puede ser que el polímero absorba disolvente y entrelazado entre las

fibras se encuentre una matriz acuosa que no se llega a evaporar del todo en el campo electromagnético haciendo que las proporciones calculadas no sean del todo correctas, para poder solucionar esto, sería interesante estudiar a futuro este mismo proceso pero cambiando el agua por algún disolvente menos resiliente que el agua, tal como podría ser el THF.

El otro método que se ha utilizado para el análisis y la cuantificación de proteínas que se puede encontrar en las nanofibras fue el *nanodrop*, este método también utiliza la espectrometría, pero a diferencia del método de Bradford, este detecta absorbancia a 280 nm, debido a que a esta longitud de onda no se detecta de forma tan específica las proteínas como en el método anterior. Este método se realizó principalmente como una segunda prueba para comprobar los resultados que se han obtenido en la prueba anterior. En la tabla 5 se pueden ver los resultados obtenidos mediante el *nanodrop*.

Tabla 5: Tabla de concentraciones de proteína que se obtuvieron a mediante nanodrop.

Muestras	[Proteína] ^a	Muestras	[Proteína] ^a
	0,09		0,11
3 % PEO 25 % BSA	0,12	3 % PEO 15 % BSA	0,09
	0,13		0,15
	0,15		0,01
3 % PEO 20 % BSA	0,12	4 % PEO 15 % BSA	0,02
	0,13		0,02

^a, concentraciones en mg/ml

Con los resultados que se muestran en la tabla se puede ver que los resultados se corresponden con los obtenidos en la prueba anterior, pudiéndose ver que en efecto se puede apreciar una pérdida de proteínas en cuanto hay una mayor cantidad de polímero. Estando en las disoluciones que contienen 3 % de PEO alrededor de los 10 mg/ml mientras que en la muestra que contenía un 4 % estaban rondando el 0,01 y el 0,02.

5. DISCUSIÓN

Durante este estudio se intentó optimizar la producción de nanofibras a partir de proteínas, tanto de una proteína conocida como es la BSA como de un extracto natural. Sin embargo, con los resultados obtenidos y por motivos ajenos a la investigación, este último objetivo no pudo completarse.

En los últimos años, las nanofibras han tenido cada vez más relevancia en la biotecnología debido a sus peculiares características, como por ejemplo la capacidad de ser un elemento que mimetice la membrana extracelular (3). Uno de los elementos en los que se ha querido centrar la investigación es en el uso de biomateriales como pueden ser las proteínas (39) u otros compuestos, como podría ser la celulosa (46, 56). Esto es debido a las diversas funciones que han demostrado tener estas nanofibras que van desde el uso de estas como base para la ingeniería tisular (27) hasta su uso como biosensores (28).

Para este estudio lo primero que se hizo fue probar la solubilidad de la BSA, ya que es una proteína hidrofílica se pudo disolver hasta altas concentraciones, llegando fácilmente hasta el 40 %. Sin embargo, en el momento en el que se probó electrohilarla por separado, tal y como se puede leer en la bibliografía, no dio resultado (28), saliendo un *electrospray* que se podría corresponder a la forma cristalizada que esta proteína toma en disolución. Esto podría deberse a que la proteína ese comportamiento en agua, Dror et al, 2008 (29) y Regev et al, 2010 (16) propusieron solucionarlo cambiando el tipo de disolvente a TFE y añadiéndole BME para poder desenrollar la proteína. Sin embargo, en este estudio se decidió intentar desestabilizar la estructura de la proteína con cambios tanto químicos como físicos, aplicándole un choque térmico o añadiéndole ácido acético, sin embargo, ambos resultados resultaban en la gelificación de la proteína, esto puede ser debido a que, al aplicarle un cambio drástico del medio, la proteína desnaturalizada comienza a colocarse en una posición determinada y al unirse en forma de red, lo que formaría ese gel.

Lo siguiente sería probar combinándolo con otros polímeros para el electrohilado, primero se probó con el PMVE/MA ácido, pero al mezclarlo con la BSA, estos dos compuestos se unían y precipitaban al instante, esto podría debido a que el PMVE/MA podría actuar como floculante al unirse a la proteína, sería interesante observar si este comportamiento se repite en el caso de otras proteínas o es exclusivo de ciertos tipos. Otros polímeros que se probaron

fueron el acetato de celulosa, un polímero que ya se ha probado en otros compuestos orgánicos como el quitosano (56) o proteínas como la zeína (13). Sin embargo, se descartó la opción por la poca compatibilidad de disolventes. Finalmente, se probaron tanto el PEG de 8 000 kDa y el PEO de 900 000 kDa, el primero se descartó debido a que no se pudo conseguir una disolución con una viscosidad apropiada para el electrohilado. El PEO por otro lado es un polímero altamente compatible con proteínas que se ha utilizado ya con anterioridad tanto con la BSA (28) como con otras proteínas tanto globulares, como la α -lactalbúmina (35), como lineales como la elastina (20). Con esta mezcla se consiguió electrohilar la proteína con facilidad, dando lugar a disoluciones del 3 % y 4 % de PEO junto con una gran variedad de rangos de proteínas, desde el 5 % al 25 % en alguna de las disoluciones. Con esto se obtuvieron fibras estables, estas fueron de un diámetro desde alrededor de 1200 nm en las disoluciones con 25 % de proteína hasta rondar los 600 nm en las que contenían un 15% de BSA. Esto puede ser porque hay una mayor cantidad de proteína en la disolución. Sin embargo, esto contrasta con las fibras que Kowalczyk et al, 2008 (28) describió, que rondaban los 400 nm de diámetro, esto puede ser por que utilizó otro disolvente, y la proporción de PEO era superior a las realizadas en este experimento, además, Kowalczyk aclara en su artículo que las fibras obtenidas son insolubles en agua, mientras que en los experimentos que se han realizado en este estudio las fibras si eran completamente solubles y de hecho se disolvieron para hacer la siguiente parte del experimento. Por otro lado, Jiang et al, 2005 (60) obtuvo fibras de alrededor del mismo diámetro usando en lugar de PEO, una mezcla entre PCL y PEG.

Lo siguiente que se hizo fue comprobar la cantidad de proteína que quedaba dentro de una de las nanofibras, para ello se realizó el método de Bradford y un *nanodrop*, en ambos métodos se observó que la única disolución que contenía un 4 % de PEO mantuvo una cantidad inferior de proteína en referencia a la cantidad que se calculó originalmente que debía tener. Es posible que esto se debiera a que la proteína se degradó entre que se realizaron las nanofibras y se hizo el proceso del método de Bradford, sin embargo, debido a que todas las disoluciones y nanofibras se hicieron en un periodo de tiempo parecido, con una diferencia de unas pocas horas entre ellas, esto querría decir que a una concentración mayor de PEO la proteína contenida en las fibras podría degradarse más rápidamente. Otra opción sería que en las nanofibras que resultasen de esta disolución no se adhiriese la cantidad esperada de proteína al PEO, o no se distendiese de la misma manera al haber demasiado PEO en disolución. Este resultado fue similar en las dos pruebas que se realizaron.

Una vez realizadas las pruebas con la BSA, se decidió establecer los parámetros para poder hacer nanofibras a partir de un extracto de mucosa dérmica de anguila, para ello se utilizó la proporción que se observó que salían mejores nanofibras, que era la que contenían un 3 % de PEO con un 15 % del compuesto objetivo. Para hacer una prueba inicial, debido a la poca cantidad de secreción que se obtuvo en principio y que si se extrajeran los péptidos se perdería mucha de la masa, se probó directamente con la secreción. Sin embargo, no se pudo disolver de manera homogénea junto con el polímero y, por lo tanto, tampoco se pudo electrohilar correctamente, esto puede ser que fuese por la cantidad de agua y contaminantes, como secreciones lipídicas y glúcidos de los peces, que hay en la mucosa. Después de esto, sería necesario extraer péptidos a partir de las secreciones mucosas, pero no se pudo obtener mucha más muestra, aunque sería interesante continuar a futuro con esta investigación utilizando directamente péptidos de la mucosa.

Por último, se realizó como experimento secundario el uso de quitosano junto con los dos polímeros anteriores, tanto con PEO como con PEO y BSA para comprobar la capacidad de la electrohilatura de estas mezclas. Por ello se hicieron varias mezclas con quitosano y PEO al 3 % y 4 %, pero ninguna de las disoluciones dio lugar a nanofibras, aun así, en la bibliografía si se han descrito nanofibras que se componen de estos dos compuestos juntos (57). Pero esta diferencia puede ser por la diferencia de disolvente, ya que en este estudio se utilizó ácido acético al 10 % mientras que en el artículo se utilizó ácido acético al 90 %, además de que aparte de usar PEO y quitosano, se le añadió vancomicina. Respecto a las mezclas de quitosano con BSA y PEO, en las disoluciones se formaron dos fases diferenciadas, una blanquecina opaca en la parte superior y una semitransparente amarilla en la parte inferior. Esto puede ser debido a que el PEO tiene una mayor afinidad con el quitosano que con la BSA.

Una vez dicho esto, se puede apreciar que la investigación de las nanofibras de proteínas tiene todavía mucho camino por recorrer, y mucho hueco para la optimización. También sería muy importante seguir investigando en un futuro este tema que tiene mucho potencial en la biomedicina y la industria.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo de fin de máster se ha conseguido optimizar el proceso de electrohilatura de proteínas, sobre todo de la proteína modelo BSA, que presenta unas dificultades claras para formar nanofibras según la bibliografía. También se ha intentado la electrohilatura de péptidos propios de la mucosa dérmica de peces.

En resumen, las conclusiones extraídas de este estudio son las siguientes:

- Mezclando la BSA con el PEO es posible realizar la electrohilatura a un amplio rango de concentraciones de proteínas. Además, a menores concentraciones de BSA dentro de las disoluciones de PEO, las fibras tienen un menor diámetro, rondando en el 15 % los 600 nm y en el 25 % los 1200 nm.
- En las nanofibras obtenidas a partir de una disolución del 4 % de PEO, se pierde una mayor parte de proteínas que en las que ha salido a partir de las disoluciones al 3 % de PEO
- No es posible electrohilar secreciones base de mucosa de peces polimerizándolo junto con el PEO.
- En una disolución de ácido acético al 10 % no se pueden obtener fibras mezclando quitosano con PEO.

De este estudio se puede sacar que este tema sería necesario investigar para poder refinar los resultados obtenidos de mucosidad de peces, así como expandir este tipo de optimizaciones a otras proteínas importantes, puesto que las propiedades que estos polímeros a nivel biomédico en un futuro podrían significar un cambio en el paradigma en medicina personalizada debido a su facilidad para la fabricación de las nanofibras y la escalabilidad del proceso de electrohilatura a nivel industrial.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Nasrollahzadeh M, Issaabadi Z, Sajjadi M, Sajadi SM, Atarod M. Types of nanostructures. *Interface science and technology*. 2019;28:29-80.
2. Xue J, Wu T, Dai Y, Xia Y. Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. *Chemical reviews*. 2019;119(8):5298-415.
3. Xie X, Chen Y, Wang X, Xu X, Shen Y, Aldalbahi A, et al. Electrospinning nanofiber scaffolds for soft and hard tissue regeneration. *Journal of Materials Science & Technology*. 2020.
4. Gundloori RV, Singam A, Killi N. Nanobased intravenous and transdermal drug delivery systems. *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems: Elsevier*; 2019. p. 551-94.
5. Rathna GVN, Jog JP, Gaikwad AB. Development of non-woven nanofibers of egg albumen-poly (vinyl alcohol) blends: influence of solution properties on morphology of nanofibers. *Polymer journal*. 2011;43(7):654-61.
6. Ghorbani-Choghamarani A, Taherinia Z. Synthesis of biaryls using palladium nanoparticles immobilized on peptide nanofibers as catalyst and hydroxybenzotriazole as novel phenylating reagent. *Chinese Journal of Catalysis*. 2017;38(3):469-74.
7. Khadka DB, Haynie DT. Protein-and peptide-based electrospun nanofibers in medical biomaterials. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2012;8(8):1242-62.
8. Zong X, Kim K, Fang D, Ran S, Hsiao BS, Chu B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*. 2002;43(16):4403-12.
9. Sfakis L, Kamaldinov T, Khmaladze A, Hosseini ZF, Nelson DA, Larsen M, et al. Mesenchymal cells affect salivary epithelial cell morphology on PGS/PLGA core/shell nanofibers. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(4):1031.
10. Chen L, Cheng L, Wang Z, Zhang J, Mao X, Liu Z, et al. Conditioned medium-electrospun fiber biomaterials for skin regeneration. *Bioactive materials*. 2021;6(2):361-74.
11. Wang Y, Qiao W, Wang B, Zhang Y, Shao P, Yin T. Electrospun composite nanofibers containing nanoparticles for the programmable release of dual drugs. *Polymer journal*. 2011;43(5):478-83.

12. Shin HJ, Lee CH, Cho IH, Kim Y-J, Lee Y-J, Kim IA, et al. Electrospun PLGA nanofiber scaffolds for articular cartilage reconstruction: mechanical stability, degradation and cellular responses under mechanical stimulation in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2006;17(1-2):103-19.
13. Liu F, Li X, Wang L, Yan X, Ma D, Liu Z, et al. Sesamol incorporated cellulose acetate-zein composite nanofiber membrane: An efficient strategy to accelerate diabetic wound healing. *International journal of biological macromolecules*. 2020;149:627-38.
14. Jiang Q, Reddy N, Yang Y. Cytocompatible cross-linking of electrospun zein fibers for the development of water-stable tissue engineering scaffolds. *Acta biomaterialia*. 2010;6(10):4042-51.
15. Sell S, McClure MJ, Barnes CP, Knapp DC, Walpoth BH, Simpson DG, et al. Electrospun polydioxanone–elastin blends: potential for bioresorbable vascular grafts. *Biomedical materials*. 2006;1(2):72.
16. Regev O, Khalfin R, Zussman E, Cohen Y. About the albumin structure in solution and related electro-spinnability issues. *International journal of biological macromolecules*. 2010;47(2):261-5.
17. Wijedasa NP, Broas SM, Daso RE, Banerjee IA. Varying fish scale derived hydroxyapatite bound hybrid peptide nanofiber scaffolds for potential applications in periodontal tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;109:110540.
18. Ulijn RV, Jerala R. Peptide and protein nanotechnology into the 2020s: beyond biology. *Chemical Society Reviews*. 2018;47(10):3391-4.
19. Tansaz S, Boccaccini AR. Biomedical applications of soy protein: A brief overview. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2016;104(2):553-69.
20. Buttafoco L, Kolkman NG, Engbers-Buijtenhuijs P, Poot AA, Dijkstra PJ, Vermes I, et al. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2006;27(5):724-34.
21. Aoki H, Miyoshi H, Yamagata Y. Electrospinning of gelatin nanofiber scaffolds with mild neutral cosolvents for use in tissue engineering. *Polymer Journal*. 2015;47(3):267-77.
22. Gunn J, Zhang M. Polyblend nanofibers for biomedical applications: perspectives and challenges. *Trends in biotechnology*. 2010;28(4):189-97.

23. Sukigara S, Gandhi M, Ayutsede J, Micklus M, Ko F. Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning. Part 2. Process optimization and empirical modeling using response surface methodology. *Polymer*. 2004;45(11):3701-8.
24. Gao Y, Shao W, Qian W, He J, Zhou Y, Qi K, et al. Biom mineralized poly (l-lactic-co-glycolic acid)-tussah silk fibroin nanofiber fabric with hierarchical architecture as a scaffold for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2018;84:195-207.
25. Bhattacharjee P, Naskar D, Maiti TK, Bhattacharya D, Kundu SC. Non-mulberry silk fibroin grafted poly (ε-caprolactone)/nano hydroxyapatite nanofibrous scaffold for dual growth factor delivery to promote bone regeneration. *Journal of colloid and interface science*. 2016;472:16-33.
26. Wongkanya R, Chuysinuan P, Pengsuk C, Techasakul S, Lirdprapamongkol K, Svasti J, et al. Electrospinning of alginate/soy protein isolated nanofibers and their release characteristics for biomedical applications. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. 2017;2(3):309-16.
27. McManus MC, Boland ED, Simpson DG, Barnes CP, Bowlin GL. Electrospun fibrinogen: feasibility as a tissue engineering scaffold in a rat cell culture model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2007;81(2):299-309.
28. Kowalczyk T, Nowicka A, Elbaum D, Kowalewski TA. Electrospinning of bovine serum albumin. Optimization and the use for production of biosensors. *Biomacromolecules*. 2008;9(7):2087-90.
29. Dror Y, Ziv T, Makarov V, Wolf H, Admon A, Zussman E. Nanofibers made of globular proteins. *Biomacromolecules*. 2008;9(10):2749-54.
30. Huang L, Nagapudi K, P. Apkarian R, Chaikof EL. Engineered collagen–PEO nanofibers and fabrics. *Journal of biomaterials science, Polymer edition*. 2001;12(9):979-93.
31. Vasita R, Katti DS. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of nanomedicine*. 2006;1(1):15.
32. Chen Z, Wang P, Wei B, Mo X, Cui F. Electrospun collagen–chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell. *Acta biomaterialia*. 2010;6(2):372-82.

33. Ghavimi MA, Shahabadi AB, Jarolmasjed S, Memar MY, Dizaj SM, Sharifi S. Nanofibrous asymmetric collagen/curcumin membrane containing aspirin-loaded PLGA nanoparticles for guided bone regeneration. *Scientific reports*. 2020;10(1):1-15.
34. Brown JH, Das P, DiVito MD, Ivancic D, Tan LP, Wertheim JA. Nanofibrous PLGA electrospun scaffolds modified with type I collagen influence hepatocyte function and support viability in vitro. *Acta biomaterialia*. 2018;73:217-27.
35. Kalouta K, Stie MB, Janfelt C, Chronakis IS, Jacobsen J, Mørck Nielsen H, et al. Electrospun α -Lactalbumin Nanofibers for Site-Specific and Fast-Onset Delivery of Nicotine in the Oral Cavity: An In Vitro, Ex Vivo, and Tissue Spatial Distribution Study. *Molecular Pharmaceutics*. 2020;17(11):4189-200.
36. Selvaraj S, Thangam R, Fathima NN. Electrospinning of casein nanofibers with silver nanoparticles for potential biomedical applications. *International journal of biological macromolecules*. 2018;120:1674-81.
37. Li J, Mei H, Zheng W, Pan P, Sun X, Li F, et al. A novel hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin-collagen-CNTs composite nanofibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;118:77-82.
38. Foraida ZI, Kamaldinov T, Nelson DA, Larsen M, Castracane J. Elastin-PLGA hybrid electrospun nanofiber scaffolds for salivary epithelial cell self-organization and polarization. *Acta biomaterialia*. 2017;62:116-27.
39. Yıldız A, Kara AA, Acartürk F. Peptide-protein based nanofibers in pharmaceutical and biomedical applications. *International journal of biological macromolecules*. 2020;148:1084-97.
40. DeFrates K, Markiewicz T, Xue Y, Callaway K, Gough C, Moore R, et al. Air-jet spinning corn zein protein nanofibers for drug delivery: Effect of biomaterial structure and shape on release properties. *Materials Science and Engineering: C*. 2021;118:111419.
41. Wang J, Zhang B. Bovine serum albumin as a versatile platform for cancer imaging and therapy. *Current medicinal chemistry*. 2018;25(25):2938-53.
42. Huong DTM, Chai WS, Show PL, Lin Y-L, Chiu C-Y, Tsai S-L, et al. Removal of cationic dye waste by nanofiber membrane immobilized with waste proteins. *International journal of biological macromolecules*. 2020;164:3873-84.

43. Babitha S, Rachita L, Karthikeyan K, Shoba E, Janani I, Poornima B, et al. Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. *International journal of pharmaceutics*. 2017;523(1):52-90.
44. Cai Y, Wei Q, Huang F. Processing of composite functional nanofibers. *Functional Nanofibers and their Applications*: Elsevier; 2012. p. 38-54.
45. Tort S, Acartürk F. Preparation and characterization of electrospun nanofibers containing glutamine. *Carbohydrate polymers*. 2016;152:802-14.
46. Lu W, Duan C, Zhang Y, Gao K, Dai L, Shen M, et al. Cellulose-based electrospun nanofiber membrane with core-sheath structure and robust photocatalytic activity for simultaneous and efficient oil emulsions separation, dye degradation and Cr (VI) reduction. *Carbohydrate Polymers*. 2021;258:117676.
47. Castro Coelho S, Nogueiro Estevinho B, Rocha F. Encapsulation in food industry with emerging electrohydrodynamic techniques: Electrospinning and electrospraying-A review. *Food Chem*. 2021:127850-.
48. Cabrera L, Felix M, Pérez-Pruyana V, Romero A. Membrana de nanofibras procesadas mediante electrohilado con potencial uso en la encapsulación de enzimas. *Afinidad*. 2019;76(587).
49. Veeramuthu L, Venkatesan M, Liang F-C, Benas J-S, Cho C-J, Chen C-W, et al. Conjugated copolymers through electrospinning synthetic strategies and their versatile applications in sensing environmental toxicants, pH, temperature, and humidity. *Polymers*. 2020;12(3):587.
50. Bhattarai DP, Aguilar LE, Park CH, Kim CS. A review on properties of natural and synthetic based electrospun fibrous materials for bone tissue engineering. *Membranes*. 2018;8(3):62.
51. Yu L, Dou S, Ma J, Gong Q, Zhang M, Zhang X, et al. An Antimicrobial Peptide-Loaded Chitosan/Polyethylene Oxide Nanofibrous Membrane Fabricated by Electrospinning Technology. *Frontiers in Materials*. 2021;8:70.
52. Kupka V, Dvořáková E, Manakhov A, Michlíček M, Petruš J, Vojtová L, et al. Well-blended PCL/PEO electrospun nanofibers with functional properties enhanced by plasma processing. *Polymers*. 2020;12(6):1403.

53. Du J, Tan E, Kim HJ, Zhang A, Bhattacharya R, Yarema KJ. Comparative evaluation of chitosan, cellulose acetate, and polyethersulfone nanofiber scaffolds for neural differentiation. *Carbohydrate polymers*. 2014;99:483-90.
54. Yildiz E, Sumnu G, Kahyaoglu LN. Monitoring freshness of chicken breast by using natural halochromic curcumin loaded chitosan/PEO nanofibers as an intelligent package. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;170:437-46.
55. Yan K, Xu F, Ni Y, Yao K, Zhong W, Chen Y, et al. Electrodeposition of poly (vinyl alcohol-co-ethylene) nanofiber reinforced chitosan nanocomposite film for electrochemically programmed release of protein. *Polymer*. 2020;193:122338.
56. Du J, Hsieh Y-L. Cellulose/chitosan hybrid nanofibers from electrospinning of their ester derivatives. *Cellulose*. 2009;16(2):247-60.
57. Kalalinia F, Taherzadeh Z, Jirofti N, Amiri N, Foroghinia N, Beheshti M, et al. Evaluation of wound healing efficiency of vancomycin-loaded electrospun chitosan/poly ethylene oxide nanofibers in full thickness wound model of rat. *International journal of biological macromolecules*. 2021;177:100-10.
58. Zhang Q, He S, Zhu X, Luo H, Gama M, Peng M, et al. Heparinization and hybridization of electrospun tubular graft for improved endothelialization and anticoagulation. *Materials Science and Engineering: C*. 2021;122:111861.
59. Mira A, Mateo CR, Mallavia R, Falco A. Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid) and ethyl monoester as building polymers for drug-loadable electrospun nanofibers. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-13.
60. Jiang H, Hu Y, Li Y, Zhao P, Zhu K, Chen W. A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *Journal of Controlled Release*. 2005;108(2-3):237-43.