

## Fabricación de un *scaffold* de nanofibras 3D mediante *electrospinning* secuencial

# Fabrication of 3D nanofiber scaffold by sequential electrospinning

Valentina Cortés<sup>1</sup>, alumna 6to año. Stephanie Polanco<sup>2</sup>, alumna magister 2do año. Yingge Zhou<sup>3</sup>, profesor asistente. George Z. Tan<sup>3</sup>, profesor asistente.

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad Técnica Federico Santa María.

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad Politécnica de Puerto Rico.

<sup>3</sup>Departamento de Ingeniería Industrial, Manufactura y Sistemas, Texas Tech University.

\*Autor para correspondencia: george.tan@ttu.edu.

Valentina Cortés<sup>1</sup>, 6th year student. Stephanie Polanco<sup>2</sup>, 2nd year masters student. Yingge Zhou<sup>3</sup>, assistant professor. George Z. Tan<sup>3</sup>, assistant professor

<sup>1</sup>Departament of Industrial Engineering, Universidad Técnica Federico Santa María.
<sup>2</sup>Departament of Industrial Engineering, Universidad Politécnica de Puerto Rico.
<sup>3</sup>Industrial, Manufacturing and Systems Engineering Department, Texas Tech University.
\*Correspondence author: george.tan@ttu.edu.

#### RESUMEN

La generación de un scaffold poroso 3D que pueda imitar la matriz extracelular natural de tejidos y órganos es un tópico de gran interés en ingeniería de tejidos. El electrospinning es una técnica ampliamente utilizada en el área ya que genera fibras de diámetro nanométrico con una gran superficie. En efecto, una gran cantidad de estudios han aplicado este método en la creación de scaffolds 3D. Esta investigación propone una nueva aproximación que consiste en la aplicación de ciclos de electrospinning secuencial sobre un colector rotacional, que durante pausas entre cada ciclo permite la solidificación de las fibras y la disipación de las cargas eléctricas de las capas superiores. Se demostró que el espesor del scaffold se incrementa linealmente con cada ciclo. Adicionalmente, al comparar con el electrospinning continuo el nuevo método genera un scaffold que presenta casi el doble de espesor y una porosidad similar.

Palabras clave: ingeniería de tejidos, electrospinning secuencial, scaffold 3D, arquitectura porosa.

## ABSTRACT

The generation of a 3D porous scaffold that would mimic the native extracellular matrix of tissue and organs is a topic of interest in tissue engineering. Electrospinning is a widely used technique in the area because it generates fibers of nanometric diameter with high surface, so several studies have applied it in the creation of 3D scaffolds. This research proposes a new approach that consists on the application of sequential electrospinning cycles over a rotational collector leaving a timespan between each cycle in which the fibers solidify and the electrocharges on the upper layer are dissipated. It was proven that the thickness of the scaffold increases linearly with each cycle. There is an increase in porosity and decrease in fiber diameter as the lavers built up. Additionally, when compared to continuous electrospinning the novel method generates a scaffold which presents almost double the thickness size and a similar porosity.

*Key words: tissue engineering, sequential electrospinning, 3D scaffold, porous architecture.* 

## 1. INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario emergente que se centra en el diseño y el desarrollo de tejidos humanos tridimensionales funcionales para investigación médica y aplicaciones terapéuticas. Una de las áreas centrales es el desarrollo de un SCAFFOLD que imite la MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) con el fin de promover la regeneración de tejido. Esta es una disposición compleja de biomateriales de micro a nano escala que forma una estructura sustentante para las células, lo que promueve su crecimiento, adhesión, migración y diferenciación (Sell et al., 2007). La imitación de la arquitectura porosa 3D de la MEC es esencial para el éxito del scaffold. La red de poros debe ser adecuada para el crecimiento celular hacia el interior, la promoción de contacto célula a célula (Wulkersdorfer et al., 2010) y debe permitir la difusión de nutrientes, metabolitos y factores solubles (Kim & Kim, 2006). Las nanoestructuras 3D con un espesor considerable han recibido un creciente interés de parte de ingenieros de tejidos.

El **ELECTROSPINNING** es un proceso en que fibras poliméricas se forman por la aplicación de un fuerte campo eléctrico sobre una solución polimérica o disolución. Esta técnica ha generado gran interés en ingenieros de tejidos puesto que las nanofibras electrohiladas presentan un área superficial extremadamente grande, y así trabajan como una excelente plataforma para estudiar interacciones entre células y el medio, efectos de factores de crecimiento, administración de fármacos, etc., (Tan, Huang, & Wu, 2007; Liang, Hsiao, & Chu, 2007). Uno de los requerimientos centrales de los *scaffolds* es reproducir las topografías

#### 1. INTRODUCTION

Tissue engineering is an emerging multidisciplinary field that focuses on design and development of functional, three-dimensional human tissue for medical research and therapeutic applications. One of the key research areas is the development of a SCAFFOLD that mimics the EXTRACELLULAR MATRIX (ECM) to promote tissue regeneration. This is a complex arrangement of biomaterials in micro to nano scale that forms a supportive structure for cells, promoting their growth, adhesion, migration and differentiation (Sell et al., 2007). Mimicking the 3D porous architecture of the ECM is essential for the success of the scaffold. The pore network must be suitable for cellular ingrowth, promote cell-to-cell contact (Wulkersdorfer et al., 2010), and allow the diffusion of nutrients, metabolites and soluble factors (Kim & Kim, 2006). 3D nanostructures with a significant thickness are increasingly being investigated by tissue engineers.

Electrospinning is a process in which polymer fibers are formed by the application of a strong electric field on a polymer solution or melt. This technique has raised great interests among tissue engineers because electrospun nanofibers present extremely high surface area, and thus work as an excellent platform to study the cell-environment interactions, effects of growth factors, drug delivery, etc., (Tan, Huang, & Wu, 2007; Liang, Hsiao, & Chu, 2007). One of the key requirements of scaffolds is to replicate the topographies and spatial structures of native ECM in order to facilitate cellular penetration, growth and differentiation (O'Brian, 2011; Cai, Xu, Jiang, & Yang, 2013). The 3D y las estructuras espaciales de la MEC natural con el fin de facilitar tanto la penetración como el crecimiento y la diferenciación celulares (O'Brian, 2011; Cai, Xu, Jiang, & Yang, 2013). La estructura de poros 3D es una de las características críticas para un scaffold ideal (Bagherzadeh, Najar, Latifi, Tehran, & Kong, 2013). Sin embargo, el proceso de *electrospinning* ha generado mayormente capas delgadas 2D [usualmente de 200 a 1.000 nm (Ahirwal, Hébraud, Kádár, Wilheim, & Schlatter, 2013)] de nanofibras compactas con pequeños poros, limitando así su aplicación en ingeniería de tejidos (Hejazi, Mirzadeh, Contessi, Tanzi, & Faré, 2017). El electrospinning tradicional presenta dificultades en la generación de scaffolds 3D, en primer lugar, debido a la repulsión generada por la acumulación de carga electroestática entre las fibras depositadas y las entrantes (Ahirwal, Hébraud, Kádár, Wilheim, & Schlatter, 2013) y, en segundo lugar, puesto que las fibras que alcanzan el colector están húmedas y blandas (el solvente no se evapora completamente durante el vuelo), provocando que la configuración 3D de la inyección colapse en una capa 2D cuando se deposita en el colector (Sun et al., 2012). Diversos estudios han afrontado este hecho mediante el estudio de nuevas técnicas, tales como electrospinning húmedo, electrospinning integrado de fibras espesas y electrospinning con porogens (Cai, Xu, Jiang, & Yang, 2013).

Para abordar este problema, este estudio comprobará si un *scaffold* espeso y poroso puede ser desarrollado mediante la técnica de *electrospinning* secuencial. Este trabajo presenta un nuevo método simple de *electrospinning* para la creación de *scaffolds* de nanofibras 3D, mediante *electrospinning* secuencial de nanofibras poliméricas sobre una capa solidificada. Entre cada ciclo de *electrospinning*, el *scaffold* se deja secar con el fin de evitar la disolución de fibras durante el *electrospinning* continuo. El objetivo de este estudio es comprobar si esta técnica puede incrementar el espesor de las estructuras de nanofibras con **POROSIDAD** constante.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### **2.1 MATERIALES**

Una solución de agua y alcohol polivinilico (10% p/p, PVA, Tongli Tech, China) fue utilizada como el material de nanofibra.

## 2.2 MONTAJE DEL ELECTROSPINNING

Un cilindro colector de acero inoxidable (Diámetro = 100 nm, largo = 300 nm) fue instalado dentro de la Plataforma Robótica de Electrospinning (TL-Pro-BM, Tongli Tech, China). El colector fue ubicado de manera perpendicular al inyector para crear una distancia lineal de desplazamiento para la inyección de fibras; este colector fue conectado a un voltaje negativo y rotado a una velocidad de 1000 rpm. Una aguja gauge 23 (0,33 de diámetro interno) de acero inoxidable fue montada en el inyector, que se conecta a

pore structure is one of the critical features for an ideal scaffold (Bagherzadeh, Najar, Latifi, Tehran, & Kong, 2013). However, the electrospinning process has generated mostly 2D thin layers [usually between 200 to 1000 nm (Ahirwal, Hébraud, Kádár, Wilhelm, & Schlatter, 2013)] of compact nanofibers with small pores, thus limiting its application in tissue engineering (Hejazi, Mirzadeh, Contessi, Tanzi, & Faré, 2017). Traditional electrospinning presents difficulties to generate 3D scaffolds, in the first place, due to the repulsion generated by the accumulation of electrostatic charge between the already deposited fibers and the incoming ones (Ahirwal, Hébraud, Kádár, Wilhelm, & Schlatter, 2013), and secondly, because the fibers that reach the collector are wet and soft (the solvent doesn't evaporate completely during the flight) making the 3D configuration of the jet collapse into a 2D layer when deposited on the collector (Sun et al., 2012). Several studies have addressed this issue by testing new techniques such as wet electrospinning, coarse fibers integrated electrospinning, and electrospinning with porogens (Cai, Xu, Jiang, & Yang, 2013).

To address this problem, this study will test if a thick and porous scaffold can be developed by using the sequential electrospinning technique. This work presents a novel facile electrospinning method for creating 3D nanofiber scaffolds. The scaffolds were fabricated by sequentially electrospinning the polymer nanofibers on a solidified layer. Between each electrospinning cycle, the scaffold was left to dry in order to avoid fiber dissolution during continuous electrospinning. The objective of this study is to test whether this technique can increase the thickness of nanofiber scaffolds with consistent **POROSITY**.

#### 2. MATERIALS AND METHODS

#### **2.1 MATERIALS**

Poly vinyl alcohol (10 % wt, PVA, Tongli Tech, China) water solution was used as the nanofiber material.

## **2.2 ELECTROSPINNING SETUP**

A stainless steel cylinder collector (Diameter = 100 mm, length = 300 mm) was installed inside the Electrospinning Robotic Platform (TL-Pro-BM, Tongli Tech, China). The collector was located perpendicular to the spinneret to create a lineal jet fiber travel distance; this collector was connected to a negative voltage and rotated at speed of 1000 rpm. A stainless-steel needle was assembled on the spinneret with a 23 gauge (0.33 mm inner diameter) which is connected to a positive voltage supplier. The tip of syringe un suministro de voltaje positivo. La punta de la jeringa tuvo una distancia fija de 122 nm y un ángulo de 45° con respecto al colector. Esta se movió paralelamente al colector a una velocidad de 5 nm/s.

Un scaffold de ocho capas fue construido mediante la técnica de electrospinning secuencial, con un punto de partida de 10 nm y una distancia de desplazamiento de 250 nm. Cada capa fue producida en una hora de ciclos de electrospinning manteniendo los parámetros. Para permitir la solidificación de la capa previa y la disipación de las cargas eléctricas, existió una pausa de al menos 3 horas de duración entre los ciclos. Antes de comenzar un nuevo ciclo una pequeña muestra de estera (1 cm x 5 cm aprox.) fue desprendida del colector. El ciclo fue repetido 8 veces, lo que significó 8 horas hasta que el electrospinning estuviera completo. Cada muestra fue etiquetada posteriormente por la cantidad de capas que esta contiene, p.e. por la generación de una muestra luego de que se completaran 3 ciclos de electrospinning. Además, una estera de control fue construida mediante la técnica tradicional de electrospinning. La distancia de desplazamiento usada para este montaje fue 63 nm y la duración del electrospinning fue 2 horas. Es necesario notar que la razón entre la distancia de desplazamiento vs. el tiempo del proceso es casi el mismo para ambos montajes.

## 2.3 MEDICIÓN DE ATRIBUTOS

Los atributos de interés para este estudio son espesor, porosidad, **ORIENTACIÓN**, y diámetro de fibra, con un foco en los primeros dos. El espesor de cada muestra fue registrado con un medidor gauge de espesor (Mitutoyo, Japan). Las imágenes de las muestras 1 y 8 fueron obtenidas con un microscopio de barrido electrónico (Hitachi S4300SE/N). Las ampliaciones usadas fueron 700 y 1500 para la vista superior, y 800 para la vista transversal. En seguida, las imágenes fueron analizadas para obtener los atributos requeridos con el software de acceso libre ImageJ. El espesor del *scaffold* fue medido manualmente a partir de la imagen. Porosidad, orientación y diámetro fueron calculados mediante los módulos DiameterJ y PorosityJ. had a fixed distance of 122 mm to the collector with a fixed angle of 45°. It was moved parallel to the collector at speed of 5 mm/s.

An eight-layer scaffold was built using sequential electrospinning technique, with a start point of 10 mm and a travel distance of 250 mm. Each layer was produced in one hour long electrospinning cycles maintaining the parameters. To allow the solidification of the previous layer and the dispersion of electrocharges, there was at least a 3 hours long pause in between the cycles. Before starting a new cycle one small sample (1 cm x 5 cm app) of mat was peeled off the collector. The cycle was repeated 8 times, which mean 8 hours of electrospinning were completed. Each sample was named after the amount of layers it includes, e.g. to generate sample 3 three cycles of sequential electrospinning where completed. Also, a control mat was built using the traditional electrospinning method. The travel distance used for this setup was 63 mm and the duration of the electrospinning was 2 hours. Notice the ratio travel distance vs. process time is almost the same for both setups.

#### 2.3 ATTRIBUTES MEASUREMENT

The attributes of interest for this study are thickness, porosity, **ORIENTATION** and fiber diameter, with a focus in the first two. The thickness of each sample was measure with a thickness gauge (Mitutoyo, Japan). Images of samples 1, 8 and control were obtained with the scanning electron microscope (Hitachi S4300SE/N). The magnifications used were 700 and 1500 for top view, and 800 for cross sectional view. The images were then analyzed to obtain the required attributes with ImageJ open source software. The thickness of the scaffold was measure manually from the image. Porosity, orientation and diameter size were calculated by the DiameterJ and PorosityJ plugin.



#### **Figura 1.** Gráfico de dispersión y regresión lineal de los registros de espesor, realizados mediante el medidor gauge, para las ocho muestras de electrospinning.

**Figure 1.** Scatter plot and linear regression of thickness measurements by gauge for the eight sequential electrospinning samples.

En primer lugar, las muestras electrohiladas fueron examinadas visualmente para distinguir atributos observables tales como color o dureza. Las primeras dos muestras fueron translúcidas y muy delicadas; estas portaban una gran carga electrostática. Muestras 6, 7 y 8 fueron opacas y firmes.

Los valores de espesor de las muestras obtenidas con el medidor gauge son representados como un gráfico de dispersión, al cual se ajusta una curva lineal (**Figura 1**). Los valores siguen una tendencia lineal con un valor  $R^2$  de 0,9764. Cada ciclo adicional de *electrospinning* agrega aproximadamente 0,0045 nm al *scaffold* final. El valor-*p* para el coeficiente es inferior a 5% (significancia). Con el estudio se verifica que el espesor del *scaffold* se incrementa linealmente con cada ciclo secuencial.

El espesor de las muestras 1, 8 y control también fue registrado usando imágenes transversales SEM, tal como se presenta en la **Figura 2**. La diferencia de espesor se observa en las fotografías. Los registros obtenidos se presentan en la **Tabla 1**. Para este estudio específico, el *scaffold* construido por *electrospinning* secuencial alcanza casi el doble de espesor que el obtenido por *electrospinning* continuo.

Como se observa en la **Figura 2**, la muestra de control tiene el diámetro de fibra más pequeño y las fibras no tienen orientación, Los valores de los atributos obtenidos mediante el software ImageJ se presentan en la **Tabla 1**. La muestra de control presenta una mayor porosidad que

## **3. RESULTS**

Firstly, the electrospun samples were visually examined to distinguish observable attributes such as color or hardness. The first two samples were translucent and very delicate; they possessed a high electrostatic charge. Samples 6, 7 and 8 were opaque and firmer.

The thickness values of the samples obtained with the gauge are presented as a scatter plot adjusted to a linear curve (**Figure 1**). The values follow a linear tendency with an  $\mathbb{R}^2$ value of 0.9764. Each additional sequential electrospinning cycle is adding approximately 0.0045 mm to the final scaffold. The *p*-value for the coefficient is less than 5% (significant). With the study it is verified that the thickness of the scaffold increases linearly with each sequential cycle.

The thickness of samples 1, 8 and control were also measured using SEM cross sectional images and are presented in **Figure 2**. The difference in thickness is observable in the photographs. The measurements obtained are presented in **Table 1**. For this specific study the scaffold built by sequential electrospinning reached almost double the thickness of the one by continuous electrospinning.

As shown in **Figure 2** the control sample has the smallest fiber diameter and the fibers have no orientation. The values of the attributes obtained by ImageJ software are presented in **Table 1**. The control sample presents a higher porosity than the sample obtained by sequential electrospinning, which indicates that the control sample has less amount of polymer deposited. One possible explanation of this



**Figura 2.** Fotografías obtenidas mediante SEM. a, b y c corresponden a cortes transversales de las muestras 1, 8 y control, respectivamente. Ampliación 800. d, e y f son vistas superiores de las muestras 1, 8 y control, respectivamente. Ampliación 1500.

**Figure 2.** Photographs obtained by SEM. a, b and c correspond to the cross sectional cuts of samples 1, 8 and control, respectively. Magnification 800. d, e and f are top views of samples 1, 8 and control, respectively. Magnification 1500.

| Sample  | Gauge Thickness<br>(mm) | SEM Thickness<br>(mm) | Porosity | Fiber Diameter<br>(μm) |
|---------|-------------------------|-----------------------|----------|------------------------|
| 1       | 0.0034                  | 0.0047                | 36.7%    | 0.9589                 |
| 8       | 0.0348                  | 0.0582                | 46.7%    | 0.6655                 |
| Control | 0.0286                  | 0.0306                | 50.7%    | 0.4852                 |

 Table 1. Summary of measurements obtained by analyzing SEM images of Sample 1, 8 and Control with image processing software ImageJ. Thickness measurements are compared to those obtained by gauge.

la muestra obtenida por *electrospinning* secuencial, lo que indica que la muestra de control tiene una menor cantidad de polímero depositado. Una posible explicación para este fenómeno es que la acumulación de carga eléctrica en el colector genera una fuerza repulsiva que causa que la fibra polimérica eyectada tenga un diámetro reducido (Thompson, Chase, Yarin, & Reneker, 2007). Por lo tanto, existe una disminución en la cantidad de polímero depositado en el colector. Un punto debe ser alcanzado en el que las cargas eléctricas acumuladas son tales que el proceso de *electrospinning* se detiene. Cuando se aplica el *electrospinning* secuencial, este problema se reduce puesto que existe una pausa entre ciclos de *electrospinning*, que permiten la disipación de la carga eléctrica.

Cuando se comparan los atributos de las muestras 1 y 8 (**Tabla 1**), se determina que la muestra 8 tiene mayor porososidad y diámetro de fibra. Esto puede ser explicado por la topología de la superficie sobre la cual las fibras de cada muestra se depositan. Las fibras de la muestra 1 se depositan directamente sobre la superficie lisa del colector de acero, causando que sus fibras se empaquen densamente con una porosidad menor. Por el contrario, las fibras de la muestra 8 se depositan sobre una superficie irregular formada por los 7 ciclos previos de *electrospinning*, de tal forma que la porosidad se incrementa.

La principal razón de usar un colector rotacional es la creación de estructuras de fibras alineadas. La mayoría de las matrices extracelulares naturales tiene una arquitectura orientacional definida o regular en relación a la función del tejido, por lo tanto, el alineamiento de fibras es un requisito para ciertas estructuras (Zhong et al., 2006). Se observó que en la muestra de control las fibras no estaban alineadas, a pesar de que para la muestra 8 la orientación vertical de las fibras aún pudo ser detectada. La acumulación de cargas eléctricas en la muestra de control genera una fuerza repulsiva que causa el depósito aleatorio de fibras en el colector,

Debe tenerse en consideración que el espesor total de la estera construida por *electrospinning* secuencial alcanza solamente decenas de micrones, sin embargo, en ingeniería de tejidos un *scaffold* funcional debe tener una estructura 3D con al menos un espesor milimétrico. Se ha descubierto que el espesor añadido al *scaffold* se comporta linealmente; consecuentemente, el espesor deseado puede ser obtenido por repetición de ciclos. Sin embargo, se aconseja realizar

phenomenon is that the accumulation of electrocharge on the collector generates a repulsive force which causes the polymer jet to have a reduced diameter (Thompson, Chase, Yarin, & Reneker, 2007). Therefore, there is a decrease in the amount of polymer deposited on the collector. A point should be reached in which the accumulated electrocharges are such that the electrospinning process to stop. When sequential electrospinning is applied, that problem is reduced since there is a timespan between cycles of electrospinning in which the electrocharges are allowed to dissipate.

When comparing the attributes of sample 1 and 8 (**Table 1**), it is determined that sample 8 has a bigger porosity and fiber diameter. This can be explained by the topology of the surface on which the fibers of each sample are deposited. Sample 1 fibers are deposited straightly over the smooth surface of the steel collector, causing its fibers to be densely packed with a smaller porosity. On the contrary the fibers of sample 8 are deposited over the irregular surface formed by 7 previous electrospinning cycles in a way that the porosity is increased.

The main reason of using a rotational collector is the creation of aligned fiber scaffolds. Most native extracellular matrices have a regular or defined orientation architecture significant for tissue function, therefore fiber alignment is a requirement for certain scaffolds (Zhong et al., 2006). It was observed that fibers in the control sample are not aligned, yet, for sample 8 the vertical orientation of the fibers could still be detected. The accumulation of electrocharges in the control sample generates a repulsive force causing the fibers to be deposited in a random way on the collector.

It must be taken into consideration that the total thickness of the mat built by sequential electrospinning reached only the tens of microns, however, in tissue engineering a functioning scaffold must have a 3D structure with at least a millimetric thickness. It was discovered that the thickness added to the scaffold behaves linearly; consequently, the desire thickness could be obtained by repetition of cycles. However, it is encouraged to realize the experiment with an additional number of cycles to prove that the thickness curve maintains its linearity.

Another drawback is the length of fabrication time, considering that before starting with the new layer the previous one has to be dry. If each cycle only adds 10

el experimento con un número adicional de ciclos para probar que la curva de espesor mantiene su linealidad.

Otra desventaja es la extensión del tiempo de fabricación, considerando que antes de empezar con una nueva capa la anterior debe estar seca. Si cada ciclo agrega solo 10 micrones de espesor, entonces, para alcanzar 1 mm deben ser completados alrededor de 100 ciclos. Un estudio centrado en determinar cuál es la máxima cantidad de material aplicado en cada ciclo se propone.

## 4. CONCLUSIÓN

Una nueva aproximación al *electrospinning* fue propuesta para generar *scaffolds* porosos 3D. El *electrospinning* secuencial consiste en la repetición de ciclos de *electrospinning* en el mismo colector, separados por una pausa de secado. Se demostró que el espesor del *scaffold* se incrementa linealmente con cada ciclo. *Scaffolds* construidos con los métodos secuencial y continuo fueron comparados. El espesor obtenido utilizando el nuevo método casi dobla al obtenido por el método tradicional. A pesar de que las porosidades de ambas estructuras son similares, el método tradicional alcanza un mayor porcentaje de porosidad. Podría ser interesante continuar futuros estudios para mejorar la porosidad e incrementar el espesor alcanzado.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mi compañera de laboratorio Stephanie; nos complementamos mutuamente y formamos un gran equipo. Yingee nos ayudó desde el primer día cuando nos enseñó cómo usar la máquina de *electrospinning*, hasta cuando llegamos al SEM. El Dr. George tuvo abiertas las puertas de su oficina para responder cualquiera de nuestras preguntas con paciencia y una sonrisa, Gracias al Director Albert Sacco, Jr., a Zaida Gracia y a Andrea Arias por darnos la oportunidad de participar en el programa REU en TTU. microns of thickness then to be able to reach 1 mm around a 100 cycles must be completed. A study focused in determining what is the maximum amount of material applied in each cycle is proposed.

## 4. CONCLUSION

A novel approach for electrospinning was presented to generate 3D porous scaffolds. Sequential electrospinning consists of the repetition of electrospinning cycles on the same collector separated by a drying time gap. It was proved that the thickness of the scaffold increases linearly with each cycle. Scaffolds built with the sequential and the continuous methods were compared. The thickness obtained using the novel method almost doubles the traditional one. Although the porosities of both scaffolds are similar, the traditional method achieved a bigger porosity percentage. It would be interesting to continue further studies to improve the porosity and increase the thickness achieved.

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank my lab partner Stephanie; we complemented each other and formed a great team. Yingge helped us from the very first day when he taught us how to use the electrospinning machine to the day we went to the SEM. Dr. George had the doors of his office open for us to answer any of our questions with patience and a smile. Thank you to Dean Albert Sacco, Jr., Zaida Gracia and Andrea Arias for giving us the opportunity to participate in the REU program at TTU.

#### **GLOSARIO**

*ELECTROSPINNING:* técnica usada para la generación de nanofibras.

**MATRIZ EXTRACELULAR:** arreglo complejo de biomateriales que provee soporte estructural para el crecimiento celular.

ORIENTACIÓN DE FIBRA: ángulo de fibras.

**POROSIDAD:** fracción de espacio vacío en los *scaffolds*. *SCAFFOLD*: molde de biomaterial para la formación de tejidos.

#### GLOSSARY

**ELECTROSPINNING:** technique used for the generation of nanofibers.

**EXTRACELLULAR MATRIX:** complex array of biomaterials that provide structural support for cell growth.

FIBER ORIENTATION: fiber angle.

**POROSITY:** fraction of the void spaced in the scaffolds. **SCAFFOLD:** biomaterial manmade template for tissue formation.

## PRINCIPIO CIENTÍFICO

El *electrospinning* es una técnica utilizada para la generación de fibras poliméricas submicrónicas y nanométricas. Existen tres componentes principales del mecanismo: 1) un suministro de alto voltaje, 2) un tubo capilar con una pipeta de diámetro pequeño que contenga una solución polimérica (o disolución) y una 3) pantalla recolectora (Huang, Zhang, Kotaki, & Ramakrishna, 2003).

Un electrodo es conectado al tubo y un alto voltaje (de 5 a 50 kV) es aplicado, lo que crea una diferencia de potencial entre la punta capilar y el colector (sistema de puesta a tierra) (Kopp, Bergman, & Amorin, 2013). A medida que el campo eléctrico se incrementa, la fuerza repulsiva generada entre cargas durante el depósito se opone a la tensión superficial del fluido, lo que induce una gota que adquiere una forma cónica conocida como el cono de Taylor. Con el incremento de potencial, se alcanza un punto crítico donde la fuerza repulsiva vence a la tensión superficial y el chorro cargado del fluido es eyectado desde la punta del cono. La inyección se compone de dos etapas: 1) un flujo laminar estable y 2) un flujo más delgado y alargado, que se convierte en un flujo circular (Stanger, Tucker, & Staiger, 2005).

## SCIENTIFIC PRINCIPLE

Electrospinning is a technique used for the generation of submicronic and nanometric polymer fibers. There are three main components of the mechanism: 1) a high voltage supplier, 2) a capillary tube with a pipette of small diameter containing a polymer solution (or melt) and a 3) collecting screen (Huang, Zhang, Kotaki, & Ramakrishna, 2003).

An electrode is connected to the tube and a high voltage (5 to 50 kV) is applied, creating a potential difference between the capillary tip and the collector (ground system) (Kopp, Bergmann, & Amorim, 2013). As the electric field is increased the repulsive force generated between charges in the drop oppose the surface tension of the fluid resulting in the droplet changing form into a conical shale known as the Taylor cone. With an increase of potential, a critical point where the repulsive force overcomes the surface tension is reached and the charged jet of the fluid is ejected from the tip of the cone. The jet is composed by two stages: 1) laminar a stable flow and 2) a thinner, more elongated and unstable flow, turning into circular spirals (Stanger , Tucker, & Staiger, 2005).



**Figure 3.** Formación de una fibra eyectada.

Figure 3. Fiber jet formation.

## REFERENCES

- Ahirwal, D., Hébraud, A., Kádár, R., Wilhelm, M., & Schlatter, G, (2013), From self-assembly of electrospun nanofibers to 3D cm thick hierarchical foams, Soft Matter, 9, 3164-3172.
- Bagherzadeh, R., Najar, S., Latifi, M., Tehran, M., & Kong, L, (2013), A theoretical analysis and prediction of pore size and pore size distribution in electrospun multilayer nanofibrous materials, Society for Biomaterials, 101, 2107-2117.
- Cai, S., Xu, H., Jiang, Q., & Yang, Y. (2013), Novel 3D Electrospun Scaffolds with Fibers Oriented Randomly and Evenly in Three Dimensions to Closely Mimic the Unique Architectures of Extracellular Matrices in Soft Tissues: Fabrication and Mechanism Study, Langmuir, 29, 2311-2318.
- Hejazi, F., Mirzadeh, H., Contessi, N., Tanzi, M., & Faré, S, (2017), Novel class of collector in electrospinning device for the fabrication of 3D nanofibrous structure for large defect load-bearing tissue engineering application, Society for Biomaterials, 105, 1535-1548.
- Huang, Z., Zhang, Y., Kotaki, M., & Ramakrishna, S, (2003), A review on polymer nanofibers by electrospinning, 63.
- Kim, G., & Kim, W, (2006), Highly Porous 3D Nanofiber Scaffold Using an Electrospinning Technique, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 104-110,
- Kopp, A., Bergmann, C., & Amorim, F. (2013), Novel Synthesis and Characterization of Nanostructured Materials, Springer.
- Liang, D., Hsiao, B., & Chu, B, (2007), Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications, Advance Drug Delivery Reviews, 59, 1392-1412.
- O'Brian, F. J. (March de 2011), Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, Materials Today, 14(3), 88-95.
- Sell, S., Barnes, C., Smith, M., McClure, M., Madurantakam, P., Grant, J., , , Bowlin, G, (2007), Extracellular matrix regenerated: tissue engineering via electrospinning biomimetic nanofibers, Polymer International, 56, 1349-1360,
- Stanger, J., Tucker, N., & Staiger, M, (2005), Electrospinning, 16(10),
- Sun, B., Long, Y.-Z., Yu, F., Li, M,-M., Zhang, H,-D., Li, W,-J., & Xu, T,-X, (2012), Self-assembly of a three-dimensional fibrous polymer sponge by electrospinning, Nanoescale, 4, 2134-2137,
- Tan, S., Huang, X., & Wu, B, (2007), Some fascinating phenomena in electrospinning processes and applications of electrospun fibers, Polymer International, 56, 1330-1339.
- Thompson, C., Chase, G., Yarin, A., & Reneker, D, (2007), Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model, Polymer, 48, 6913-6922.
- Wulkersdorfer, B., Kao, K, K., Agopian, V, G., Ahn, A., Dunn, J, C., Wu, B, M., & Stelzner, M, (2010), Bimodal Porous Scaffolds by Sequential Electrospinning of Poly(glycolic acid) with Sucrose Particles, International Journal of Polymer Science.
- Zhong, S., Teo, W, E., Zhu, X., Beuerman, R, W., Seeram, R., & Yung, L, Y, (2006), An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture, Journal of Biomedical Materials Research, 79, 456-463.

#### **EQUIPO DE INVESTIGADORES / RESEARCH TEAM**



Polanco

Valentina Cortés

Yingge Zhou George Z. Stephanie Tan

