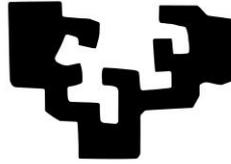


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

# ANDAMIOS POROSOS

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

**Iban Sandonis Oleaga**

Dirigida por:

Dra. Esperanza Díaz Tajada

Portugalete 2015



## AGRADECIMIENTOS

*Primeramente me gustaría agradecer a la Doctora Esperanza Díaz Tajada por darme la oportunidad de realizar este estudio, además de por su trabajo e inestimable ayuda. También a mis compañeros de laboratorio Igor, y especialmente a Blanca, y a Itsaso por la ayuda prestada y sus siempre oportunos ánimos.*

*Gracias a Ainhoa, Pedro y Sonia por toda vuestra colaboración.*

*Gracias a mi aita, a mi ama y a mi hermana por haberme ayudado a ser la persona que soy.*

*Gracias a Atxarte, Bea, Marta, Naia, Sonia, Oiakue y Zaloa por aguantar, darme su apoyo y estar ahí en los momentos difíciles.*

*Gracias Vero por encender la luz al final del camino y enseñarme que siempre hay algo más allá.*

*Por último gracias a todas esas personas que querrían haberme ayudado, pero que por una razón u otra les ha sido imposible.*

**ESKERRIK ASKO GUZTIEI.**



## RESUMEN

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio de la degradación in vitro de soportes porosos, para ingeniería de tejidos, fabricados con diferentes polímeros y disolventes y con partículas bioactivas de nanohidroxiapatita. Los polímeros utilizados han sido la policaprolactona y la polilactida y los disolventes el 1,4 dioxano, el cloroformo y una mezcla de 1,4 dioxano y agua. La técnica de fabricación empleada ha sido la separación de fases inducida térmicamente (liofilización). Tras realizar la degradación in vitro de los scaffolds hemos caracterizado los distintos sistemas encontrando que los soportes porosos fabricados sin nHA, mantienen mejor sus propiedades mecánicas con el tiempo de degradación. También podemos advertir que la adición de nanopartículas aumenta la velocidad de degradación, lo cual sugiere la posibilidad de regular ésta mediante el uso de diversas concentraciones de las mismas.



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Ingeniería de tejidos.....	3
1.2. Bibliografía.....	9
<b>2. PARTE TEÓRICA</b> .....	15
2.1. Historia del arte.....	17
2.2. Tipos de biomateriales.....	19
2.3. Soportes porosos o scaffolds.....	33
2.4. Técnicas de fabricación de scaffolds.....	36
2.5. Factores que influyen en la degradación.....	42
2.6. Bibliografía.....	43
<b>3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES</b> .....	57
3.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	59
3.1.1. Preparación de muestras.....	62
3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	65
3.2.1. Preparación de muestras.....	68
3.3. Cromatografía de permeación de gel (GPC).....	69
3.3.1. Preparación de muestras.....	72
3.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	73
3.4.1. Preparación de muestras.....	75
3.5. Propiedades mecánicas.....	77
3.5.1. Preparación de muestras.....	78
3.6. Bibliografía.....	79
<b>4. MATERIALES</b> .....	81

<b>5. PREPARACIÓN DE MUESTRAS</b> .....	85
<b>5.1. Separación de fases inducida térmicamente</b> .....	89
5.1.1. Liofilización.....	91
<b>5.2. Estudio de la degradación in vitro. Caracterización de las muestras</b> .....	94
5.2.1. Absorción de agua y pérdida de masa.....	96
5.2.2. Porcentaje de porosidad.....	96
5.2.3. Cromatografía de permeación de gel (GPC).....	97
5.2.4. Propiedades mecánicas.....	97
5.2.5. Variación del pH.....	98
5.2.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	98
5.2.7. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	98
5.2.8. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	99
<b>5.3. Bibliografía</b> .....	105
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	107
<b>6.1. Morfología y propiedades mecánicas de los sistemas PLLA y PCL</b> .....	110
6.1.1. Influencia del disolvente.....	112
6.1.2. Influencia del tratamiento térmico.....	120
6.1.3. Propiedades mecánicas.....	125
<b>6.2. Sistema PLLA</b> .....	131
6.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	133
6.2.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)....	135
6.2.3. Propiedades mecánicas.....	141
6.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	146

6.2.5. Estudio del pH.....	156
6.2.6. Absorción de agua.....	157
6.2.7. Pérdida de masa.....	159
6.2.8. Variación de peso molecular y polidispersidad.....	161
<b>6.3. Sistema PCL.....</b>	<b>163</b>
6.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	167
6.3.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)....	175
6.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	182
6.3.4. Propiedades mecánicas.....	187
6.3.5. Pérdida de masa.....	192
6.3.6. Variación de peso molecular y polidispersidad.....	193
6.3.7. Absorción de agua.....	196
6.3.8. Variación de pH.....	198
6.4. Bibliografía.....	200
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>215</b>
<b>8. ÍNDICE DE ACRÓNIMOS.....</b>	<b>219</b>



## **1.INTRODUCCIÓN**



### **1.1. INGENIERÍA DE TEJIDOS.**

La pérdida o fallo de un órgano o tejido debido a accidentes, malformaciones o enfermedades es y ha sido uno de los mayores problemas para la salud humana durante toda la historia [1- 5]. La reparación o sustitución del órgano o tejido dañado ha sido la meta de la medicina desde siempre. Aun así, el reemplazo de tejido dañado o necrosado sigue siendo un área de investigación poco desarrollada en la medicina, aunque sea de gran interés en muchos campos de la misma, como la cirugía de trauma-ortopédica, la reumatología, la pediatría y la genética, entre otras [6 -9].

Hoy en día existen dos soluciones para la sustitución del tejido dañado o la reparación del mismo [10- 16]. Una de ellas consiste en la utilización de prótesis, las cuales estarán fabricadas con materiales sintéticos, aunque este uso tiene la desventaja de que en muchas ocasiones no son capaces de recuperar todas las funciones de los órganos o tejidos reemplazados.

Otra solución pasa por la utilización de implantes, aunque también existen otras técnicas, como las terapias de reconstrucción, las prótesis sintéticas y otros recursos médicos. Esta técnica, es uno de los sistemas más utilizados en el caso de pérdida o fallo de un órgano o tejido.

Existen tres técnicas de implante usadas hoy en día [17]:

- Autoimplantes o implantes autólogos
- Aloimplantes o aloinjertos
- Xenoimplantes o xenoinjertos

En los autoimplantes o implantes autólogos el tejido a trasplantar se obtiene del propio paciente [18]. Este tipo de implantes, a pesar de tener un alto porcentaje de éxitos y evitar, en la mayoría de los casos, el rechazo del tejido trasplantado [19], tiene sus limitaciones, como la cantidad de tejido que puede ser utilizada, así como la morbilidad asociada al lugar de donde se realice la extracción del tejido a trasplantar [20, 21].

Para llevar a cabo los aloimplantes o aloinjertos se usan tejidos u órganos obtenidos de un individuo diferente al paciente con tejidos u órganos dañados, es decir, es necesario la existencia de un donante para realizar este tipo de implantes. Esta técnica es menos utilizada que la de los implantes autólogos, teniendo un menor porcentaje de éxito, ya que aunque a priori la existencia y disponibilidad de tejido trasplantable es mayor, este tejido puede causar problemas en el receptor, como una reacción inmune en el mismo, pudiendo, además, transmitir patógenos del donante al receptor [22, 23].

Los xenoimplantes o xenoinjertos representan el más bajo porcentaje de uso en lo referido a la terapia de implantes. En este tipo de implantes usaremos tejido obtenidos de animales de otras especies diferente a la humana. Hoy en día se están investigando animales modificados genéticamente.

Todas estas técnicas de injertos que hemos visto tienen problemas asociados a las mismas, como la morbilidad causada por la cirugía adicional necesaria, en caso de los implantes autólogos, así como los efectos secundarios, tales como el riesgo de infección o dolor crónico en el área trasplantada. Además, otro problema de la técnica de implantes radica en la falta de tejido existente para realizar los mismos.

Una alternativa muy prometedora a la terapia de implantes pasa por el uso de tejidos obtenidos mediante la ingeniería de tejidos. Podemos definir la ingeniería de tejidos como una área interdisciplinar de la medicina regenerativa, que combina los principios de la ingeniería, la biología, la ciencia de los materiales y la enfermería, para obtener un tejido funcional in vitro que pueda ser trasplantado a un individuo que tenga tejido dañado o falta del mismo [24].

La ingeniería de tejidos es un campo orientado a la comprensión de la estructura y la función de los tejidos normales y patológicos de los mamíferos, y el consecuente desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar su función [25].

El concepto de ingeniería de tejidos fue introducido por los doctores Langer y Vacanti a mediados de la década de los años ochenta, definiéndola como “un campo interdisciplinario de investigación que aplica los principios de la ingeniería y de otras ciencias para desarrollar sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de un tejido” [26]. Inicialmente se referían al diseño de los scaffolds para transporte celular, en contraposición al sembrado de células en matrices naturales, con la dificultad añadida a la hora de manipular las propiedades físicas y químicas de las mismas. El concepto actual

de ingeniería de tejidos implica la combinación de un scaffold con células y/o biomoléculas para promover la reparación y/o regeneración de tejidos dañados [27].

Hoy en día, la ingeniería de tejidos es una disciplina que trata de paliar la falta de tejido trasplantable, reparando o reemplazando el tejido dañado [28]. Un nuevo tejido funcional es fabricado utilizando células vivas, las cuales utilizan una matriz 3D o scaffold como guía para el desarrollo del mismo [29].

La combinación de células de tejido vivo, junto con biomateriales para la producción de estructuras vivas, con el suficiente tamaño y funcionalidad para que ocurra una mejora en la vida de los pacientes es una estrategia de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. El fin de la ingeniería de tejidos es la creación de un dispositivo vivo que pueda restaurar, mantener y mejorar la función del tejido u órgano dañado [30, 31]. Este fin, que es el que debe prevalecer en la fabricación de nuevos tejidos funcionales, combinará los esfuerzos de la biología celular, la ingeniería, la ciencia de los materiales, y la genética para tener éxito [32].

El proceso seguido en la ingeniería de tejidos para la creación de tejidos nuevos es el siguiente, y podemos observarlo en la Figura 1.1:

- En primer lugar deberemos obtener del propio paciente células madre adultas, para posteriormente realizar una expansión de las mismas en el laboratorio.
- A continuación insertaremos las células en una estructura tridimensional, denominada andamio poroso o scaffold, en el cual también se encontrarán diversas sustancias bioactivas, como

factores de crecimiento, que ayudarán a la diferenciación celular, para que crezca y se desarrolle el tejido deseado.

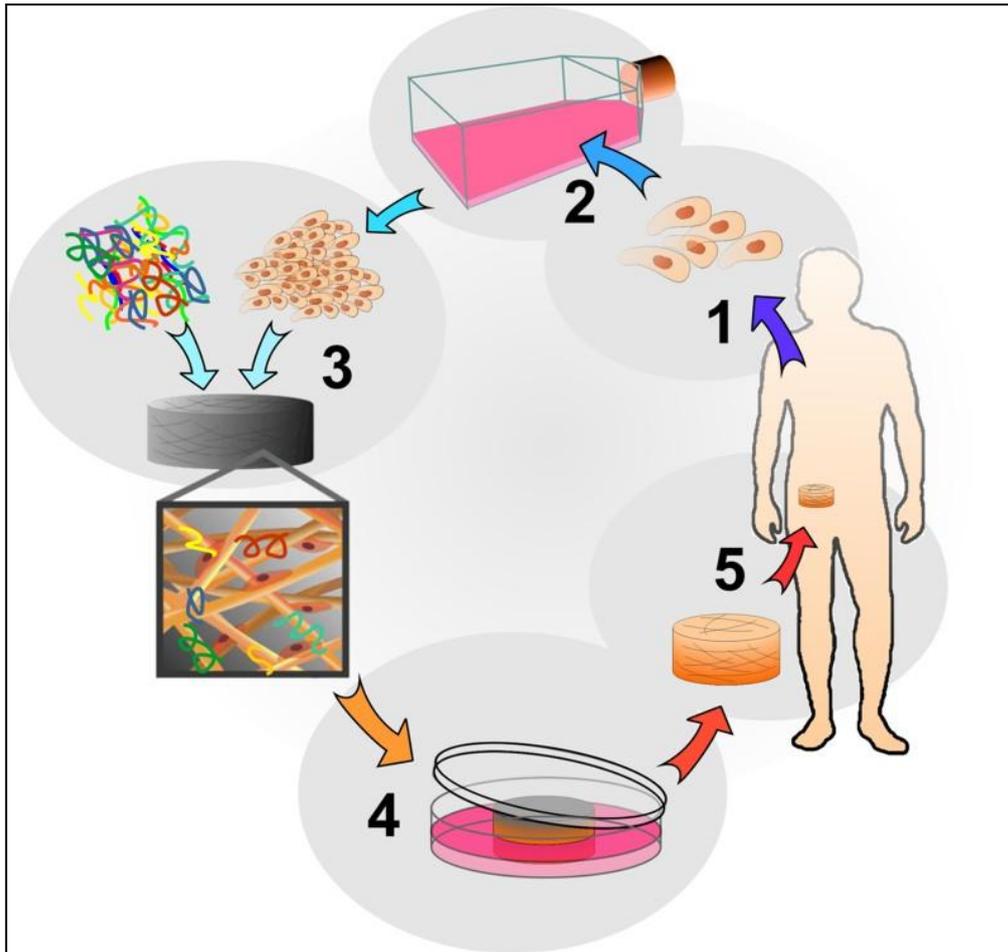
- La combinación de scaffolds y células madres, tras su crecimiento en un soporte adecuado, estará preparada para reemplazar el tejido dañado o inexistente.

El tejido obtenido mediante la ingeniería de tejidos debe ser funcional, trasplantable y obtenido in vitro, es decir, en un laboratorio.

Los scaffolds o soportes porosos, son una de las partes o componentes más importantes dentro de la ingeniería de tejidos [33-35]. Estos deben disponer de unas características que los hagan óptimos para realizar la labor necesaria.

Los materiales usados para fabricar scaffolds, así como los diseños de los mismos, juegan un importante papel en la ingeniería de tejidos.

Los scaffolds actúan como sustitutos temporales de las matrices extracelulares para el desarrollo de tejido nuevo, partiendo de células aisladas y proveen de un soporte tridimensional adecuado y un buen soporte mecánico para las células trasplantadas, hasta que el tejido regenerado adquiera unas propiedades estructurales adecuadas [36]. El volumen ocupado inicialmente por el scaffold, es reemplazado por el nuevo tejido formado [37, 38].



**Figura 1.1.** Esquema de la ingeniería de tejidos: Las células madre son extraídas (1) y cultivadas (2), el uso de matrices tridimensionales así como moléculas de señalización (factores de crecimiento) facilita su crecimiento y especialización (3). El cultivo puede realizarse "in vitro" (4), el objetivo final en cualquier caso será el implante para la sustitución del tejido dañado (5).

## 1.2. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Griffith L.G., Naughton G., "Tissue engineering- Current challenges and expanding opportunities", *Science*, 295, 1009-1014, 2002.
- [2] Schugens C., Maquet V., Grandfils C., Jerome R., Teyssie P., "Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation. I. Preparation of polylactide foams by liquid-liquid phase separation", *Journal of Biomedical Materials Research*, 30, 449-461, 1996.
- [3] Hu Y.H., Grainger D.W., Winn S.R., "Fabrication of poly(alpha-hydroxy acid) foam scaffolds using multiple solvent systems", *Journal of Biomedical Materials Research*, 59, 563-572, 2002.
- [4] Zhang R., Ma P.X., "Processing Polymer Scaffolds: Phase separation", *Annals of the New York Academy for Sciences*, 715-724, 2002.
- [5] Hutmacher D.W., "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage", *Biomaterials*, 21, 2529-2543, 2000.
- [6] Hou Q., Grijpma D.W., feijen J., "Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique", *Biomaterials*, 24, 1937-1947, 2003.
- [7] Sipe J.D., "Tissue engineering and reparative medicine", *Annals of the New York Academy for Sciences*, 961, 1-9, 2002.

[8] Ho M.H., Kuo P.Y., Hsieh H.J., Hou L.T., Lai J.Y., Wang D.M., "Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods", *Biomaterials*, 25, 129-138, 2004.

[9] Moscato S., Cascone M.G., "Morphological features of ovine embryonic lung fibroblast cultured on different bioactive scaffolds", *Biomaterials*, 1, 214-221, 2005.

[10] Chen Y., Mak A., "PLLA scaffolds with biomimetic apatite", *Surface and Coatings Technology*, 201, 575-580, 2006.

[11] Yang Y., Magnay J., Cooling L., El Hay A., "Development of a mechano-active scaffold for tissue engineering", *Biomaterials*, 23, 2119-2126, 2002.

[12] Yang F., Murugan R., "Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering", *Biomaterials* 25, 1891-1900, 2004.

[13] Mi W.K., Seo J., Zhang R., Ma, P., "Suppression of apoptosis by enhanced protein adsorption on polymer/hydroxyapatite composite scaffolds", *Biomaterials*, 28, 2622-2630, 2007.

[14] Schugens C., Maquet V., Grandfils C., Jerome R., Teyssie P., "Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation. I. Preparation of macroporous polylactide supports by solid-liquid phase separation", *Polymer*, 37, 1027-1038, 1996.

[15] Braddock M., Houston P., Campbell C., Ashcroft P., "Born again bone: tissue engineering for bone repair", *News in Physiological Sciences*, 16, 208-213, 2001.

[16] Hollister S.J., "Porous scaffold design for tissue engineering", *Nature*, 4,518-524, 2005.

[17] Porter J.R., Ruckh T.T., Popat K.C., "Bone Tissue engineering: A Review in Bone Biomimetics and Drug Delivery Strategies", *American Institute of Chemical Engineers*, 25, 1539-1560, 2009.

[18] Ramoshebi L.N., Matsaba T.N., Teare J., Renton L., Patton J., Ripamonti U., "Tissue engineering; TGF[-beta] superfamily members and delivery systems in bone regeneration", *Experts reviews in molecular medicine*, 4, 1-11, 2002.

[19] Fodor W.L., "Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potencial to replace, repair and regenerate", *Reproductive biology and endocrinology*, 1, 102, 2003.

[20]Salgado A.J., Coutinho O.P., Reis R.L., "Bone tissue engineering: state of the art and future trends", *macromolecular bioscience*, 4, 743-765, 2004.

[21] Spitzer R.S., Perka C., Lindenhayn K., Zippel H., "Matrix engineering for osteogenetic differentiation of rabbit periosteal cells using alpha-tricalcium phosphate particles in a three-dimensional fibrin culture", *Journal of biomedical material research*, 59, 690-696, 2002.

[22] Jayabalan M., "Studies on Thermoset composite towards the development of biodegradable bone fixation devices", *International journal of biomaterials*, 1, 1-10, 2009.

[23] Kim H.D., "Effect of PEG-PLLA diblock copolymer on macroporous PLLa scaffolds by thermally induced phase separation", *Biomaterials*, 25, 2319-2329, 2004.

[24] Kneser U., Schaefer DJ., Munder B., "Tissue engineering of bone", *Minimally invasive therapy & allied technologies*, 11, 107-116, 2002.

[25] Estrada C., Paz A.C., López L.E., "Ingeniería de tejido óseo: Consideraciones básicas", *Revista de la Escuela de Ingeniería de Antioquia*, 5, 93-100, 2006.

[26] Langer R., Vacanti J.P., "Tissue engineering", *Science*, 260, 920-926, 1993.

[27] Hutchmacher D.W., Cool S., "Concepts of scaffold-based tissue engineering- the rationale to use solid free-form fabrication techniques", *Tissue Engineering Review Series*, 11, 654-669, 2007.

[28] Kim B-S, Mooney DJ., "Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering", *Trends in Biotechnology*, 16, 224-230, 1998.

[29] Vacanti JP, Vacanti CA., "Principles of Tissue Engineering", *Academic Press*, 2000.

[30] Kelleher C.M., Vacanti J.P., "Engineering extracellular matrix through nanotechnology", *Journal of the Royal Society Interface*, 7, S717-S729, 2010.

[31] Vacanti J, Langer R., "Tissue Engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation", *Lancet*, 354(Suppl 1), 1999.

[32] Fuchs J.R., Nasser B.A., Vacanti J.P., "Tissue Engineering: A 21st Century Solution to Surgical Reconstruction", *Annals of Thoracic Surgery*, 72, 577-591, 2001.

[33] Park K., Jung H.J., Son J.S., Park K.D., Kim J.J., Ahn K.D., Han D.K., "Preparation of biodegradable polymer scaffolds with dual pore system for tissue regeneration" *Macromolecular Symposia*, 249, 145-150, 2007.

[34] Thomson R.C., Yaszemski M.J., Powers J.M., Mikos A.G., "Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone", *Journal of biomaterials science:Polymer edition*, 7, 23-38, 1995.

[35] Agrawal C.M., Ray R.B., "Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering", *Journal of Biomedical materials research*, 55, 141-150, 2001.

[36] Wu L., Ahang H., Zhang J., Ding J., "Fabrication of Three-Dimensional Scaffolds of Complicated Shape for Tissue Engineering.I.Compression Molding Based on Flexible-Rigid Combined Mold", *Tissue Engineering*, 11, 1105-1114, 2005.

[37] Griffith L.G., Naughton G., "Tissue Engineering.-Current Challenges and Expanding Opportunities", *Science*, 295, 1009-1023, 2002.

[38] Nam Y.S., Parh T.G., "Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation", *Journal of Biomedical Materials Research*, 47, 8-17, 1999.



## **2.PARTE TEÓRICA**



## 2.1 HISTORIA DEL ARTE

Podemos definir biomaterial como una sustancia o conjunto de sustancias que pueden ser usadas para sustituir un tejido, órgano o función en el cuerpo humano. Otra definición válida de biomaterial, nos indica que es un material no vivo, usado como dispositivo médico, que está dirigido a interactuar con un sistema biológico [1].

Los biomateriales han sufrido un desarrollo tecnológico gradual durante su corta historia. Inicialmente, durante la década de 1960 y 1970, se desarrollaron los que se denominan biomateriales de primera generación. La meta consistía en obtener materiales con propiedades físicas lo más similares posibles a los tejidos a sustituir. Además estos materiales debían ser inertes, es decir, que no reaccionasen con el tejido circundante al implante.

Posteriormente, avanzada la década de 1980, aparecieron los denominados biomateriales de segunda generación. La característica que tenían estos consistía en la inducción de una reacción controlada en el tejido vivo circundante, es decir, son materiales bioactivos.

Hoy en día nos encontramos con los biomateriales de tercera generación los cuales son materiales biodegradables y reabsorbibles. Además deben ser materiales capaces de estimular la respuesta celular y molecular de los tejidos circundantes de forma controlada [2].

Debido a esto, actualmente, la definición de biomateriales incluye también dispositivos y sustancias diseñados para el control de medios biológicos y tejidos [3].

Los biomateriales utilizados en el cuerpo humano pueden ser de uso temporal o de uso permanente; y pueden ser de uso intra o extra corpóreo.

La función que pueden tener estos materiales es amplia [4]:

- Pueden servir para trabajar como soporte del tejido vivo.
- También se usan para realizar los diagnósticos de distintas enfermedades, como el cáncer.
- Tienen otros usos relacionados con la medicina, como es el de la liberación de fármacos para el uso en tratamientos médicos.

Como hemos indicado anteriormente, hoy en día, en muchos casos los biomateriales pueden contener células vivas, entre otras sustancias bioactivas, para ayudar en la regeneración y reparación de los diferentes tejidos dañados.

Dependiendo de las propiedades que tengan los distintos biomateriales, en relación al tejido circundante al mismo, estos se pueden clasificar en [5]:

- Biocompatibles: esta denominación se utiliza para materiales que no son tóxicos cuando los utilizamos en un entorno biológico, y no presentan una respuesta adversa del mismo.
- Bioinertes: Son materiales en los que no existe relación entre el material a implantar, y el tejido circundante a la zona de implante. Como ejemplo de este tipo de materiales nos encontramos el titanio, o las fibras de carbono.

- Biotolerados: En este caso, existe una reacción entre el material a implantar y el tejido circundante. Ejemplo de este tipo de materiales son diferentes tipos de metales, así como el polietileno.
- Bioactivos: este tipo de materiales tienen una reacción con el tejido circundante cuando se implantan, y además se produce una unión entre la superficie del tejido y el implante. A este grupo pertenecerían los materiales cerámicos, como la hidroxiapatita.
- Biodegradables: En este caso los materiales a implantar son materiales en los que se produce una degradación del mismo en un entorno biológico.

## **2.2.TIPOS DE BIOMATERIALES.**

Dependiendo del origen que tengan los biomateriales, estos pueden ser naturales o sintéticos [6].

En el caso de los biomateriales de origen natural, existen abundantes materiales usados como scaffolds 3D en la ingeniería de tejidos, entre los que se encuentran el colágeno, la hidroxiapatita y el quitosán entre otros. Estos se pueden considerar como los primeros materiales biodegradables usados clínicamente.

En lo referente a los biomateriales de origen sintético existen cuatro grupos principales de los mismos [8, 9]:

- **Materiales metálicos:** Hoy en día son los más utilizados en el tratamiento de fracturas, debido a sus elevadas propiedades mecánicas, así como a su gran estabilidad mecánica. Sin embargo esto es también un problema, ya que los materiales metálicos son muchos más rígidos que el material del hueso y fragilizan éste.
- **Materiales cerámicos:** Estos materiales comenzaron a utilizarse como materiales que imitaban al hueso. La ventaja de los materiales cerámicos radica en su similitud química, composición y estructura con la parte mineral del hueso, y su mayor desventaja radica en su fragilidad. Al realizar un soporte cerámico poroso, la fragilidad del mismo y sus propiedades mecánicas no son las adecuadas para su utilización como scaffold.
- **Materiales poliméricos:** Para intentar paliar los problemas asociados a los materiales metálicos, se desarrollaron materiales poliméricos semirrígidos, utilizándose a día de hoy polímeros biodegradables. El problema de algunos polímeros radica en sus propiedades mecánicas, debido a que no son las adecuadas para determinadas aplicaciones. Los materiales poliméricos tienen ventajas con respecto a los otros materiales usados. Dentro de estas ventajas se encuentran la facilidad de fabricación con diversas formas, variedad en las propiedades mecánicas y cinética de degradación, dependiendo del uso que se quiera dar al mismo.

- Materiales compuestos: El desarrollo de los materiales compuestos se llevo a cabo combinando un material polimérico y uno cerámico. De esta forma combinamos las ventajas de ambos materiales, minimizando sus desventajas. Mediante esta combinación obtenemos un material con propiedades superiores a las de los materiales cerámicos o poliméricos por separado.

Los biomateriales de origen natural tienen algunas desventajas, en comparación con los de origen sintético. Entre ellas se encuentran la falta de control sobre sus propiedades físico-químicas y sus ratios de degradación, así como la necesidad de desarrollo de técnicas de purificación de los mismos, debido a la posible presencia de patógenos, unido esto a que la resistencia mecánica de los biomateriales de origen natural es menor que la de los de origen sintético. Asimismo, los polímeros sintéticos son, en la mayoría de los casos, más baratos de producir que los polímeros naturales. Además los polímeros sintéticos tienen otra ventaja con respecto a los naturales, ya que disponen de unas propiedades, tanto físicas como mecánicas, predecibles y reproducibles, Los polímeros naturales también tienen ventajas con respecto a los de origen sintético, siendo la principal su mayor hidroficidad, ya que debida a ella, las interacciones del polímero con las células son más sencillas [7].

Los materiales metálicos y cerámicos han contribuido mucho al avance en el campo médico, principalmente en el campo de la ortopedia. Sin embargo tienen el hándicap de no ser biodegradables, además de disponer de una procesabilidad limitada. En cambio, los materiales poliméricos tiene la gran ventaja de tener un gran y fácil control sobre la biodegradabilidad y la procesabilidad [10].

Los biomateriales usados hoy en día, deben tener unas características concretas que hagan que sean válidos para su uso en la ingeniería de tejidos.

Las propiedades que deben tener los materiales son las siguientes [11-13]:

- El material debe ser biocompatible, es decir, debe ser compatible para su uso en ambientes biológicos.
- En caso de que el biomaterial que usemos sea biodegradable, debe tener una velocidad de degradación y resorción controladas y controlables.
- Debe ser químicamente estable tanto el material propiamente dicho como sus productos de degradación.
- El material debe ser osteoconductor y osteoinductor, es decir, debe ser osteoactivo.
- No debe causar ningún tipo de molestias ni respuesta inmune de ningún tipo al receptor del dispositivo.
- No debe ser tóxico, ni el material usado, ni los productos de su degradación.
- Debe tener el tamaño y la forma adecuados para realizar perfectamente su labor. Dicho de otra forma, su diseño debe ser perfecto para realizar su función.
- Deben ser reproducibles y fácilmente procesables y fabricados.

Como ya hemos indicado anteriormente los polímeros utilizados para su uso en ingeniería de materiales pueden ser, o bien polímeros naturales o polímeros sintéticos.

Los polímeros naturales se pueden clasificar en:

- Proteínas, como la seda, el colágeno, la gelatina, la elastina y la queratina.
- Polisacáridos, como la celulosa, la amilasa y el dextrano.
- Polinucleótidos, como el ADN o el ARN.

Los polímeros naturales más utilizados en la ingeniería de tejidos son:

- Colágeno: Utilizado con la glicosamina, se utiliza para la regeneración de piel y del nervio ciático, así como el menisco. Tiene la ventaja de tener un ratio de degradación y porosidad controlable.
- Ácido algínico: Es un polisacárido obtenido de algas marinas, usado en la ingeniería de tejidos en combinación con el calcio. Su principal desventaja se encuentra en la falta de una estructura uniforme.
- Chitosan o quitosano: Se trata de un polisacárido natural, con una estructura similar a la de la glicosamina. El chitosan tiene diversas aplicaciones biomédicas, como membranas para hemodiálisis, sistemas para liberación de fármacos, así como para la síntesis de piel artificial. También se utiliza para realizar recubrimientos ortopédicos y dentales.

- Polipéptidos: Si los utilizamos combinados con aminoácidos estos favorecerán la adhesión celular y tienen gran potencial para su uso en la ingeniería de materiales.
- Hidroxiapatita: Es uno de los fosfatos orgánicos más importante y ha sido estudiado en las décadas pasadas como material biomédico, siendo el componente mineral más común en el hueso humano. Esta puede ser de origen natural o sintético, aunque normalmente, para el uso en ingeniería de tejidos se utiliza la sintética.

Los principales polímeros sintéticos utilizados en ingeniería de tejidos incluyen [14-16]:

- Poliésteres: Entre los más usados, se encuentran el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico o polilactida (PLA) y los copolímeros de ambos o PLGA. Se utilizan tanto en suturas, como en ortopedia en la fijación de fracturas, además de como material para la realización de scaffolds o andamios porosos.
- Polianhídridos: El principal uso de este tipo de polímeros es el de la liberación de fármacos, debido a la rápida degradación del mismo en ambiente biológico.
- Polioctoésteres: La aplicación de este tipo de polímeros es la liberación de fármacos. La ventaja que tienen radica en la variación del ratio de degradación del mismo, dependiendo de la composición, lo que los hace válidos para diversas velocidades de liberación de fármacos.

- Policaprolactonas(PCL): Estos polímeros se emplean principalmente en dispositivos ortopédicos, así como su uso como scaffold o andamio poroso. Tiene una lenta velocidad de degradación, si lo comparamos con otros polímeros sintéticos.
- Policarbonatos: Se emplean mayoritariamente en la liberación controlada de fármacos, aunque los policarbonatos derivados de la tirosina son buenos candidatos para la realización de andamios porosos en la ingeniería de tejidos.
- Polifumaratos: Este tipo de polímeros, a diferencia de los vistos hasta ahora no se presentan en forma sólida, sino en forma líquida o cemento. Esto es lo que los hace ideales para uso como elemento para relleno de defectos en la ingeniería ósea de tejidos.
- Poliuretanos: El principal uso de este grupo de polímeros radica en los implantes médicos, aunque también se pueden utilizar para elementos que se deban degradar.

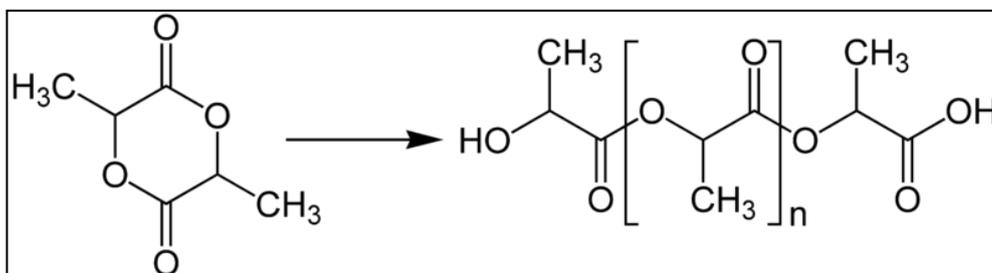
Dependiendo del uso que vayamos a dar al polímero, utilizaremos uno u otro, según sus propiedades y la exigencia que tenga el implante. Hoy en día está más extendido el uso de los polímeros sintéticos, en comparación con los polímeros naturales.

Uno de los polímeros sintéticos más utilizados es el ácido poliláctico o PLA que es un termoplástico, semicristalino, biocompatible y biodegradable poliéster alifático [17], ampliamente usado en aplicaciones biomédicas, tales como sistemas de liberación de fármacos, fijación de prótesis e ingeniería de

tejidos [18, 19]. Las características que hacen que sea muy usado son, principalmente, su alto módulo de elasticidad, su alta rigidez y la facilidad para ser moldeado, además de su comportamiento termoplástico y su biocompatibilidad, unido a la facilidad para combinarlo con otros polímeros, tanto biodegradables como no [20, 21].

El PLA es un poliéster alifático que pertenece a la familia de los ácidos poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres. Hay varios modos de sintetizar el PLA, pero la más utilizada es la síntesis del mismo mediante la polimerización por apertura del anillo de la lactida, un éster cíclico, obteniendo así un polímero de mayor peso molecular, para lo que se utiliza habitualmente octoato de estaño, aprobado por la FDA para su uso como aditivo alimenticio. La descripción de esta reacción la realizó primeramente Carothers et al. [22].

También se utilizan otros métodos para la síntesis de PLA, como la policondensación. Las condiciones de este tipo de polimerización deben estar perfectamente controladas, por lo que la reacción se desarrollará en atmósferas completamente secas, a presión reducida y altas temperaturas, aunque también existen metodologías para sintetizar PLA a temperatura ambiente.

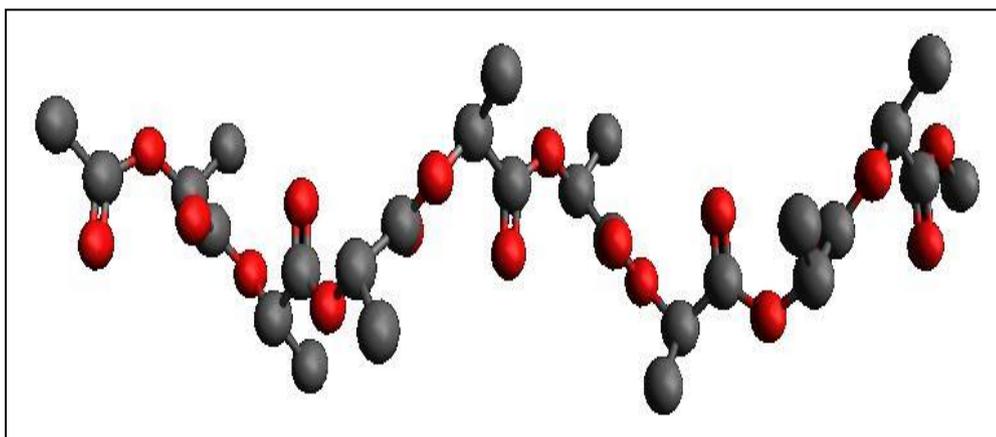


**Figura 2.1.** Reacción de polimerización del PLLA.

El PLA es una molécula quiral, lo que quiere decir que existen dos estereoisómeros o enantiómeros, que darán lugar a cuatro polímeros que serán morfológicamente distintos:

- El PLLA y el PDLA: estos polímeros los obtendremos si partimos de L-lactida o D-lactida, respectivamente. Ambos polímeros serán estereoregulares, siendo la molécula de uno imagen especular del otro.
- A partir de la D,L-lactida podemos obtener meso-PLA o D,L-PLA, que tendrán forma racémica.

El uso del PLLA para aplicaciones en humanos está aprobado por la FDA [23]. La temperatura de fusión del PLLA se encuentra en un rango de entre 173 y 178°C, y la temperatura de transición vítrea entre 60 y 65°C. Estas temperaturas pueden variar debido a la presencia de otros elementos. El PLLA tiene una gran sensibilidad térmica e hidrolítica, por lo que se degrada con gran facilidad [24].



**Figura 2.2.** Modelización de una molécula de PLLA.

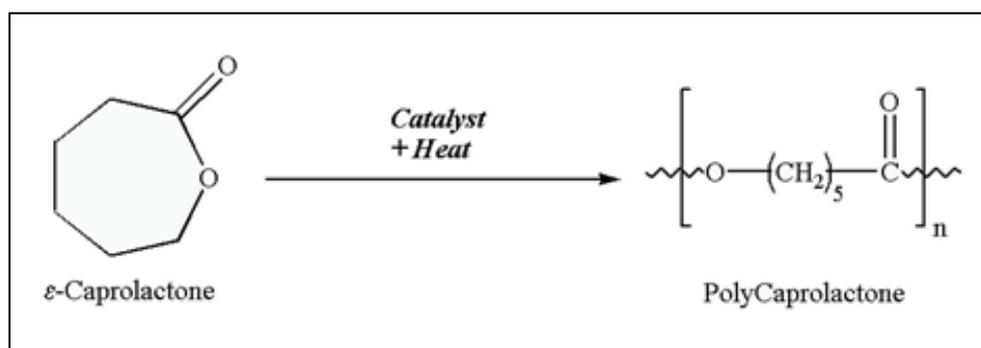
El mecanismo de degradación del PLLA es autocatalítico, no enzimático [25]. Al introducir el PLLA en un medio acuoso tiene lugar la degradación del mismo mediante la escisión por hidrólisis no enzimática de las cadenas que forman el polímero, dando lugar de esta forma, a productos de degradación como el ácido láctico, que será metabolizado por el cuerpo, lo que permite crear estructuras completamente reabsorbibles [26- 28]. La respiración es una de las principales formas de oxidación del ácido láctico, que finalmente se verá descompuesto en CO<sub>2</sub> y eliminado a través de los pulmones [29].

El tiempo de degradación completo del PLLA puede llegar a ser mayor de 24 meses [30], dependiendo su degradación del peso molecular del polímero, su cristalinidad, el pH del medio, así como las dimensiones de la muestra; también se verá influida por el tanto por ciento de PBS absorbido por la muestra durante la degradación [31-36]. La degradabilidad del polímero es muy importante, ya que al ocurrir, permite la penetración y crecimiento de las células [37]. Aunque una rápida degradación del polímero no pone únicamente en peligro el soporte mecánico que debe aportar el scaffold, sino que también produce una acumulación de materia ácida, pudiendo producir inflamaciones en el tejido circundante. La relación existente entre la cristalinidad y la historia térmica del polímero ha sido demostrada [38]. Además también influyen en la degradación del polímero el tratamiento posterior al que sometamos la muestra [39], así como otros parámetros de los scaffolds, como la porosidad, que mejora los efectos de la difusión en el interior del mismo. Además, con un material poroso, se facilita la salida de los productos de degradación del interior del polímero.

La policaprolactona (PCL) es un polímero biocompatible y biodegradable, ampliamente usado en dispositivos médicos [40, 41] La policaprolactona es un

poliéster alifático lineal, reabsorbible y semicristalino, con una cristalinidad que puede llegar al 69%, una temperatura de transición vítrea de unos  $-60^{\circ}\text{C}$ , y una baja temperatura de fusión de alrededor de  $60^{\circ}\text{C}$  [42]. Además es considerado no tóxico y compatible con diferentes tejidos. Dentro de la familia de las lactonas es el polímero más ampliamente estudiado.

La policaprolactona es un material que tiene buenas propiedades mecánicas y buena solubilidad con otros polímeros, siendo uno de los primeros polímeros sintetizados, en la década de 1930 [43].



**Figura 2.3.** Reacción de polimerización del PCL por apertura del anillo.

Los principales métodos de polimerización son mediante la apertura del anillo, a partir del monómero cíclico  $\epsilon$ -caprolactona, o por policondensación a partir de ácido 6-hidroxihexanoico.

La unidad de celda de la policaprolactona es la ortorrómbica, dependiendo sus propiedades físicas, térmicas y mecánicas de varios factores, tales como su peso molecular y grado de cristalinidad. A temperatura ambiente es altamente soluble en cloroformo, benceno o tolueno.

La policaprolactona es un polímero que está sujeto a degradación por hidrólisis de sus enlaces éster, por lo que es un material polimérico, bioreabsorbible y biodegradable, dependiendo la cinética de degradación, en gran parte, del peso molecular del polímero usado [44]. Las estructuras con gran peso molecular emplean más tiempo en degradarse debido a que la longitud de las cadenas poliméricas en estos casos es mayor. Esto requerirá un mayor número de enlaces éster que se deberán escindir, generando de esta forma monómeros/ oligómeros solubles en agua, aunque debido a esto la degradación nos llevara más tiempo [45].

Durante los años setenta y ochenta, la PCL y sus copolímeros fueron ampliamente utilizados como dispositivos liberadores de fármacos, debido a las ventajas que dispone frente a otros polímeros, así como por su cinética de degradación y propiedades mecánicas. Para la liberación de fármacos es también un factor a su favor el alto tiempo de degradación. La policaprolactona está aprobada para su uso médico por la FDA [46] y es un material con muchas posibilidades para su utilización en la ingeniería ósea de tejidos, aunque en la mayoría de los casos lo utilizaremos junto con otros elementos [47-49].

Como hemos indicado anteriormente, el tiempo de degradación de la policaprolactona es muy elevado, pudiendo llegar a ser mayor de tres años [50], y dependerá de factores como el peso molecular, la cristalinidad [51] o las condiciones de degradación, así como de su copolimerización [52], y será tan elevado debido a la alta cristalinidad y gran hidrofobicidad del polímero. La forma de la muestra, así como el tipo de cristales formados también tienen su influencia en el ratio de degradación del mismo, además del pH del medio de degradación o su hidroficidad o hidrofobicidad [53]. Este largo período de degradación ha sido

el responsable de que la policaprolactona haya sido olvidada durante las últimas décadas por la mayoría de los investigadores, pero sus buenas propiedades reológicas y viscoelásticas han reavivado el interés.

La degradación natural tiene lugar inicialmente en la parte amorfa del polímero [54, 55], variando este mecanismo de degradación dependiendo de la temperatura a la que nos encontremos. La degradación se trata de una reacción autocatalizada por la liberación de ácidos carboxílicos procedentes de la hidrólisis. El producto de degradación, el ácido caprónico, se metaboliza mediante el ácido cíclico tricarbónico, y se elimina mediante secreción renal [56]. En la naturaleza existen diversos microorganismos capaces de realizar la degradación enzimática.

La policaprolactona es utilizada en diferentes campos, estando entre ellos la ingeniería de tejidos o sistemas de liberación de fármacos, pero también como adhesivos en microelectrónica o embalajes, así como plastificante para el PVC [57-61].

La hidroxiapatita es una partícula bioactiva utilizada para la realización de scaffolds, bien mezclándola con polímeros, o bien en solitario. Está formada por fosfato de calcio cristalino, siendo su fórmula estequiométrica:  $\text{HCa}_5\text{O}_3\text{P}_3$ .

La hidroxiapatita es uno de los fosfatos orgánicos más importante [62] y ha sido estudiada en las décadas pasadas como material biomédico, siendo el componente mineral más común en el hueso humano. Ésta puede ser de origen natural o de origen sintético, aunque normalmente, para el uso en ingeniería de tejidos se utiliza la sintética.

Una de las razones del éxito de la hidroxiapatita como aditivo de los polímeros en la ingeniería de tejido óseo, así como de otros materiales biocerámicos con base de fosfato cálcico, radica en la mejora de la osteoconductividad [63], así como de la compatibilidad de los implantes. Esto es debido a la alta similitud química que tiene con los materiales que se encuentran en el tejido óseo. También es capaz de variar la cinética de degradación del polímero con el que ha sido mezclada, además de aumentar considerablemente la resistencia a la compresión del scaffold [64].

Los métodos de obtención de la hidroxiapatita sintética son variados, debido a las crecientes aplicaciones de la misma. Dependiendo cual sea la temperatura de obtención de la hidroxiapatita, esta presentará distintas características. La hidroxiapatita sintetizada a altas temperaturas tendrá una cristalinidad elevada, así como un tamaño de cristal grande. En cambio, en la sintetizada a baja temperatura se observa una baja cristalinidad y un tamaño de cristal pequeño. El método de síntesis más utilizado es la técnica de precipitación, aunque también son bastante utilizados el método sol-gel, o el método de coprecipitación [65, 66].

Cuando añadimos hidroxiapatita a una matriz polimérica, podemos convertir un polímero, que inicialmente no era bioactivo, en un polímero bioactivo o aumentar su bioactividad si ya lo era anteriormente, y a la vez, mejorar sus propiedades mecánicas [67-69]. La adición de partículas bioactivas, como la hidroxiapatita, para formar un andamio, se ha comprobado que aunque mejora la osteoconductividad en la ingeniería ósea de tejidos (BTE), también modifica la cinética de degradación [70, 71].

La HA, además de ser bioactiva y biodegradable, dispone de la capacidad de estimulación del hueso para acelerar su crecimiento, razones por las cuales su uso está muy extendido en aplicaciones biomédicas y en regeneración ósea [72, 73]. La interacción que tenga lugar entre la HA y el polímero con el que realicemos los scaffolds, determinará, en gran medida, las propiedades resultantes del scaffold.

### **2.3.SOPORTES POROSOS Ó SCAFFOLDS.**

Podemos definir los scaffolds, andamios porosos o también denominados matrices tridimensionales, como las estructuras poliméricas sólidas, porosas y tridimensionales que se utilizan como base en la ingeniería de tejidos. Estos, tienen un rol único en la ingeniería regenerativa y reparadora. Como ya hemos indicado, muchos materiales biocompatibles tienen potencial para ser usados en la construcción de scaffolds.

Los scaffolds deben de cumplir unas determinadas funciones, que los haga válidos, siendo las principales las de dirigir y facilitar el crecimiento y la migración de las células que se encuentran localizadas en el tejido alrededor del mismo, promoviendo de esta forma la formación del nuevo tejido [74]. Los scaffolds deben:

- Promover la interacción entre las células insertadas y el material utilizado para su fabricación. Además deben facilitar la adhesión celular entre ellos.

- Permitir el transporte de nutrientes y factores que permitan la proliferación y diferenciación celular.
- Ser biodegradables, con una velocidad de resorción controlada.
- Provocar un grado mínimo de inflamación y toxicidad, tanto a la hora de realizar el implante, como en su degradación in vivo.

Como ya hemos indicado anteriormente, los materiales utilizados para la fabricación de scaffolds pueden ser sintéticos o naturales, degradables o no degradables, dependiendo del uso que vayamos a darle. Las propiedades de los distintos polímeros dependerán de su composición, estructura y disposición de sus componentes. Los andamios utilizados en la ingeniería de tejidos desarrollan muchas funciones, y la que tendrá durante la formación del tejido dependerá de las características específicas del polímero elegido.

Los biomateriales usados para la fabricación de scaffolds deben promover la formación de un nuevo tejido, para lo que deben tener unas características que los hagan adecuados [75-83]:

- Deben ser biocompatibles, es decir, deben integrarse en el tejido del huésped sin que aparezca respuesta inmune debido al mismo.
- Los materiales usados en la fabricación del scaffold, así como su diseño juegan un papel muy importante en la ingeniería de tejidos.
- Los scaffolds fabricados deben ser tridimensionales, con una forma específica para ayudar al crecimiento de órganos y tejidos tridimensionales.

- Deben ser muy porosos, con una estructura de poros interconectada, para permitir y promover el transporte de nutrientes y para facilitar que tenga lugar la proliferación y diferenciación celular, e inducir la migración celular de un punto a otro. Además, de esta forma también se consigue la evacuación de los residuos metabólicos generados por las células y por la degradación del scaffold mas fácilmente.
- Deben ser biodegradables, con una velocidad de resorción controlada. El ratio de resorción debe ser parecido al ratio de formación del tejido a sustituir, para que, cuando el tejido esté completamente formado, el scaffold no realice trabajo sobre el mismo.
- No deben ser tóxicos ni carcinógenos, ni el scaffold ni los productos que aparecen en la degradación de los mismos.
- El tamaño de poro que tengamos en el scaffold debe ser el necesario para el tipo del tejido que pretendamos sustituir. Ni demasiado grande ni demasiado pequeño, dependiendo del uso que se le vaya a dar. Los tamaños de poro grande serán ideales si lo que buscamos es reemplazar tejido muscular. En cambio, si lo que necesitamos es reemplazar tejido óseo, se necesitarán tamaños más pequeños.
- Debe tener un alto ratio área-superficie, para facilitar la interacción entre las células y la superficie y ayudar al anclaje celular.
- La superficie de los scaffolds debe ser la adecuada, tanto topográfica como químicamente, para permitir y facilitar la adhesión, diferenciación y proliferación celular. Las propiedades químicas idóneas de la superficie

ayudaran a la adhesión celular, mientras que las propiedades topográficas tendrán relación con el proceso de osteoconducción o migración celular.

- Las propiedades mecánicas de los scaffolds deben ser similares a las del tejido a sustituir, mientras dure la formación del mismo.
- El implante no debe causar ni molestias ni infecciones al huésped.
- Los scaffolds deben ser químicamente estables, tanto el scaffold propiamente dicho, como los productos de su degradación.
- En caso de que el scaffold tenga fibras, estas deberán tener una disposición adecuada para dirigir la orientación tanto de las células como del nuevo tejido a formar.
- El éxito de un biomaterial depende, en gran parte, de la unión entre el tejido y la superficie del biomaterial. Tanto la topografía, como el grado de hidroficidad o hidrofobicidad de la superficie del material serán muy importantes en esta unión.
- El material ideal para la realización de un scaffold debe ser fácilmente reproducible en la forma que sea necesaria.

#### **2.4. TÉCNICAS DE FABRICACIÓN DE SCAFFOLDS.**

Dependiendo de la técnica que utilicemos para la realización de los scaffolds, además del polímero y disolvente utilizados, estos poseerán unas características u otras. Aunque algo importante que debemos tener en cuenta es

que la técnica de fabricación utilizada no afecta a las diferentes propiedades que debe tener, como la biocompatibilidad.

Los materiales utilizados pueden ser naturales o sintéticos, aunque los materiales que utilicemos deben de estar aprobados por la FDA [84, 85] para su uso en humanos.

Las propiedades mecánicas de los scaffolds son especialmente importantes cuando el tejido a regenerar es un tejido duro, como el hueso o el cartílago. Hay muchas características de un scaffold que pueden hacer que las propiedades mecánicas del mismo sean afectadas. Entre ellas están la porosidad, la forma de procesarlo, el peso molecular del material que lo forma, así como su cristalinidad. La forma de un scaffold también influye en sus propiedades mecánicas.

Existen diferentes técnicas de fabricación de scaffolds. Las principales utilizadas hoy en día son [86- 92]:

- Unión de fibras (Fiber Bonding): Con esta técnica obtenemos scaffolds en forma de fibra. Esta técnica de fabricación es utilizada, también, para la producción de suturas biodegradables utilizadas como suturas en medicina. Mediante esta técnica de fabricación obtenemos fibras que poseen una gran porosidad y área.

Una técnica similar es utilizada para la fabricación de scaffolds con forma tubular. La elección del disolvente, así como la inmiscibilidad de los polímeros usados y la diferencia en sus temperaturas de fusión son las mayores restricciones de esta técnica.

- Gel casting: El desarrollo de esta técnica vino dado por la necesidad de evitar los inconvenientes que se encontraron con la de la unión de fibras. Para la fabricación mediante esta técnica realizaremos, primeramente una disolución con el polímero utilizado, para posteriormente eliminar el disolvente, con lo que el resultado será el scaffold. En la mayoría de los casos, para obtener una porosidad concreta se utilizan porógenos como el cloruro sódico.

También podemos aplicarle distintos tratamientos térmicos, con lo que podremos preparar distintos soportes porosos en cuanto a porosidad, tamaño de poro o cristalinidad, en función de su utilización.

Mediante esta técnica se pueden obtener scaffolds con forma de membrana o film, con porosidades superiores al 93%, con una estructura de poros interconectada.

Esta técnica tiene también limitaciones ya que el scaffold producido es quebradizo, con lo que dependiendo del uso que le vayamos a dar puede que no sea apropiado. Además mediante esta técnica no podemos fabricar scaffolds tridimensionales directamente, ya que obtenemos un film, con lo que tendremos que laminar o fundir la membrana obtenida para adecuarse a la forma necesitada.

- Liofilización (Freeze drying): Con este método de fabricación obtenemos scaffolds con una porosidad y tamaño de poro variable. Para la fabricación inicialmente realizaremos una emulsión con el disolvente utilizado y el polímero, para posteriormente realizar la liofilización de la emulsión realizada y separar el disolvente del polímero. Mediante esta

técnica se obtiene una superficie de poro mayor y un tamaño de poro menor.

- Separación de fases (Phase separation): Inicialmente este método se utilizó para resolver el problema de la liberación de fármacos, para posteriormente ser utilizado en la fabricación de scaffolds.

Primeramente se disolverá el polímero en el disolvente a baja temperatura. Tras esto, enfriamos controladamente la disolución para propiciar una separación de fases líquido-líquido. A continuación se enfría para crear un sólido bifásico. Entonces el disolvente solidificado es eliminado mediante un proceso de sublimación, transformándose el espacio ocupado inicialmente por el disolvente en los poros.

- Laminación de membranas (Membrane lamination): Mediante esta técnica obtendremos materiales muy porosos con formas determinadas. Se producirán inicialmente membranas con la forma necesaria para realizar el mismo. Posteriormente, tras la obtención de diferentes capas, iremos uniendo cada una de las membranas obtenidas, hasta la consecución de la forma y tamaño deseado.
- Moldeado por fusión (Melt molding): Es un método que tiene ventajas sobre el método de laminación. Primeramente introduciremos un porógeno, gelatina en la mayor parte de los casos, en un molde de teflón. A continuación verteremos el polímero en forma de polvo o grana en dicho molde. Una vez vertido el polímero, calentamos el molde por encima de la temperatura de fusión del mismo. Una vez solidificada la mezcla, la

separamos del molde, y la introducimos en un medio donde el porógeno sea soluble, para deshacernos de esta forma del mismo.

Con este método se puede variar la forma del scaffold, así como su porosidad y tamaño de poro con facilidad. Además se pueden añadir con facilidad partículas bioactivas, y se pueden satisfacer los requerimientos de cualquier tipo de scaffolds.

- Extrusión: Este método, a pesar de ser muy utilizado en los procesos industriales, no está muy extendido en la fabricación de scaffolds. Usualmente se suele utilizar en combinación con el método de solvent-casting, para la producción de scaffolds tubulares.

El principal parámetro que define este método es la temperatura de extrusión necesaria. Cuanto mayor es ésta, menor será la presión para realizar la misma, a no ser que las temperaturas de extrusión utilizadas sean muy elevadas.

- Impresión 3D (3D printing): Mediante este método se pueden crear scaffolds tridimensionales con formas muy complejas. Pertenece a la familia de las técnicas conocidas como SFF (Solid Freeform Fabrication), entre las que se encuentran también la estereolitografía y el laser sintering.

Para realizar un scaffold mediante esta técnica se depositará inicialmente un aglutinador mediante la impresión del mismo. Posteriormente introduciremos el polímero en forma de polvo en un cilindro, y se espolvoreará el mismo sobre el aglutinador. Este proceso se repetirá

hasta que el scaffold que queramos construir esté acabado. La forma del aglutinador impreso la controlaremos mediante un diseño CAD/CAM previamente realizado. Si queremos aumentar la porosidad del scaffold podemos incorporar materiales porógenos como el cloruro de sodio. Además los poros que aparecen en los scaffolds realizados mediante este método son longitudinales e interconectados.

- Saturación con gas (Gas foaming): Con esta técnica de fabricación se crean soportes porosos sin la necesidad de utilizar disolventes orgánicos, con las ventajas que esto conlleva. En el proceso de fabricación mediante saturación con gas, se comprime inicialmente el polímero a utilizar, para posteriormente exponerlo a dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) a alta presión, que dará lugar a la formación de poros.

Esta técnica se utiliza en muchas ocasiones en combinación con la de arrastre de partículas, que consiste en la eliminación de los porógenos utilizados mediante disolución de los mismos.

- Espumas de materiales compuestos polímero/material cerámico (Polymer/ceramic composite foams): En esta técnica se añaden elementos cerámicos al polímero, para mejorar las propiedades mecánicas del scaffold resultante. Para ello se introducen unas fibras del material compuesto con un porógeno en una disolución realizada con el polímero.

La técnica también se puede llevar a cabo realizando una emulsión con el disolvente, el polímero y las fibras, para posteriormente retirar el disolvente mediante la técnica de liofilización.

- Polimerización in situ: En todas las técnicas vistas hasta ahora, la fabricación del scaffold se realizaba fuera del cuerpo receptor del mismo. En algunos casos, como en el caso de la cirugía ortopédica ósea, es necesario realizar la restauración inmediatamente e in situ. Para esto, se inyecta el polímero en forma de líquido o cemento en el miembro a restaurar, pudiendo modelarlo con la forma que sea necesaria.
- Electrohilado (Electrospinning): Para la realización de scaffolds mediante esta técnica se aplica un campo eléctrico con un alto voltaje, de entre 1 y 10 KV entre un capilar metálico que contiene la solución polimérica y el electrodo colector. Mediante esta técnica se puede cambiar la porosidad y el tamaño de scaffold con facilidad.

## **2.5. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DEGRADACIÓN.**

La degradación es un factor muy importante a tener en cuenta a la hora de la elección del material para la fabricación de un scaffold, ya que la velocidad de degradación debe ser muy similar a la velocidad de formación del tejido.

La degradación de cualquier polímero depende de varios factores, sobre los cuales podremos actuar, y de esta forma adecuaremos el scaffold a las necesidades del tejido que va a reemplazar. Los factores que afectan a la degradación son [94]:

- El peso molecular del polímero utilizado.
- La cristalinidad inicial del polímero.

- La forma y el tamaño del scaffold, así como el tamaño del poro del mismo.
- La composición de los materiales con los que se realice el polímero, es decir, si es un polímero o un copolímero.
- La temperatura y el pH del ambiente en el que se degrada también es importante.
- La hidroficidad o hidrofobicidad del polímero usado.
- La estructura química del mismo.

Además, la técnica utilizada en la realización del scaffold también tiene influencia en la degradación del polímero.

Una perfecta comprensión de la cinética de degradación de los scaffolds es muy importante, ya que la velocidad de degradación debe ser similar a la velocidad de formación del tejido para no poner en peligro el mismo. En caso de que la velocidad de degradación del scaffold sea mayor que la velocidad de formación del tejido, no solo pondríamos en peligro la estabilidad estructural del tejido en formación, sino que podría causar una acumulación de productos de degradación, produciendo una respuesta inflamatoria en los tejidos circundantes [95].

## **2.6. BIBLIOGRAFÍA.**

[1] Ferrer Lozano Y., Vergara Pages J.J., Oquendo Vázquez P., “Hidroxiapatita como sustituto del tejido óseo” Hospital Clínico-Quirúrgico Territorial Docente de Cárdenas Julio M. Aristegui Villamil.

[2] Hench L.L., Polak J.M., "Third-Generation Biomedical Materials", *Science*, 295, 1014-1017, 2002.

[3] Naderi H., Matin M.M., Bahrami A.R., "Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering", *Journal of Biomedical Materials Research*, 55, 141-150, 2001.

[4] Middleton J.C., Tipton A.J., "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices", *Biomaterials*, 21, 2335-2346, 2000.

[5] Hubbel J.A., "Bioactive materials", *Biochemical engineering*, 10, 123-129, 1999.

[6] Dhandayuthapani B., Yoshia Y., Maekawa T., Kumar S., "Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review", *International Journal of Polymer Science*, ID: 290602, 10.1155/ 2011/ 290602 2011.

[7] Chen G., Ushida T., Tateishi T., "Hybrid Biomaterials for Tissue Engineering: A Preparative Method for PLA or PLGA-Collagen Hybrid Sponges", *Advanced Materials*, 12, 455-457, 2000.

[8] Stevens M.M., "Biomaterials for Bone Tissue Engineering", *Materials Today*, 11, 18-25, 2008.

[9] Porter J.R., Ruckh T.T., Popat K.C., "Bone Tissue Engineering: A Review in Bone Biomimetics and Drug Delivery Strategies" *Biotechnology in Progress*, 25, 1539-1560, 2009.

[10] Chen G., Ushida T., Tateishi T., "Scaffold Desing for Tissue Engineering", *Macromolecular Bioscience*, 2, 67-77, 2002.

- [11] Nam Y.S., Park T.G., “Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation”, *Journal of Biomedical Materials Research*, 47, 8-17, 2002.
- [12] Cooper J.A., Lu H.H., Ko F.K., Freeman J.W., Laurencin C.T., “Fiber-based tissue-engineering scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation”, *Biomaterials*, 26, 1523-1532, 2005.
- [13] Shin H., Jo S., Mikos A.G., “Biomimetic materials for tissue engineering”, *Biomaterials*, 24, 4353-4364, 2003.
- [14] Agrawal C.M., Ray R.B., “Biodegradable polymeric scaffolds for muskuloeskeletal tissue engineering”, *Biodegradable Scaffolds*, 141-150, 2001.
- [15] Gunatillake P.A., Adhikari R., “Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering”, *European Cells and Materials*, 5, 1-16, 2003.
- [16] Babensee J.E., Anderson J.M., McIntire L.V., Mikos A.G., “Host response to tissue engineering devices”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 33, 111-119, 1998.
- [17] Deng X.L., Sui G., Zhao M.L., Chen G.Q., Yang X.P., “ Poly(L-lactic acid)/ hydroxyapatite hybrid nanofibrous scaffolds prepared by electrospinning”, *Journal of Biomaterial Science:Polymer Edition*, 18, 117-130, 2007.
- [18] Zhou Z., Yi Q., Liu L., Liu X., Liu Q.; “Influence of Degradation of Poly-L-lactide on Mass Loss, Mechanical Properties, and Crystallinity in Phosphate-Buffered Solution “, *Journal of Macromolecular Science. Part B*, 48, 309-317, 2009.

[19] Nampoothiri K. M., Nair N. R. , John R. P., “An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research”, *Bioresource Technology* , 101, 8493-8501, 2010.

[20] Singh G., Bhunia H., Rajor A., Choudhary V., “Thermal properties and degradation characteristics of polylactide, linear low density polyethylene, and their blends”, *Polymer Bulletin*, 66, 939-953, 2011.

[21] Zoppi R.A., Duek E.A.R., Coraça D.C., Barros P.P., “Preparation and Characterization of Poly (L-lactic Acid) and Poly(Ethylene Oxide) Blends”, *Materials Research*, 4, 117-125, 2001.

[22] Carothers W. H. , Dorough G. L., van Natta F. J.; “Studies of polymerization and ring formation. The reversible polymerization of six-membered cyclic esters”, *Journal of the American Chemical Society*, 54, 761-772, 1932.

[23] Wang M. et Al., “PHBV/PLLA-based composite scaffolds fabricated using an emulsion freezing/freeze-drying technique for bone tissue engineering: surface modification and in vitro biological evaluation” *Biofabrication*, 4, 2012.

[24] Södergard A.,Stolt M.,. “Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition”,*Progress in Polymer Science*, 27, 1123-1163, 2002.

[25] Tsuji H., Shimizu K., Sato Y., “Hydrolytic Degradation of poly(L-lactic acid): Combined Effects of UV Treatment and Crystallization”, *Journal of Applied Polymer Science*, 125, 2394-2406, 2012.

[26] López Ávila R.A., Galán Borda C., “polímeros polilácticos-rewiew” *Química de alimentos. Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia*,1-11, 2010.

- [27] Grizzi I. , Garreau S. , et al. ,”Hydrolytic degradation of devices based on poly (DL-lactic acid) size-dependence”, *Biomaterials*, 16, 305-311, 1995.
- [28] Mattii L., Battolla B., D’Alessandro D., Trombi L., Pacini S., Cascone M.G., Lazzeri L., Bernardini N., Dolfi A., Galimberti S., Petrini M., “Gelatin/PLLA Sponge-Like Scaffolds Allow Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells”, *Macromolecular Bioscience*, 8, 819-826, 2008.
- [29] Hutmacher D.W.,” Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage”, *Biomaterials*, 21, 2529-2543, 2000.
- [30] Gong Y., Zhou Q., Gao C., Shen J., “ In vitro and in vivo degradability and cytocompatibility of poly(L-lactic acid) scaffold fabricated by a gelatin particleleaching method”, *Acta Biomaterialia*, 3, 531-540, 2007.
- [31] Ma P. X., Choi J. W., “ Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network “*Tissue Engineering*, 7, 23-33, 2001.
- [32] Moscato S., Cascone M. G., Lazzeri L., Danti S. , Mattii L., Dolfi A., Bernardini N. ,”Morphological features of ovine embryonic lung fibroblasts cultured on different bioactive scaffolds “,*Journal of Biomedical Materials Research*, 76A, 214-221 ,2006.
- [33] Fukushima K., Tabuani D., Dottori M., Armentano I., Kenny J. M., Camino G. “Effect of temperature and nanoparticle type on hydrolytic degradation of poly(lactic acid) nanocomposites”, *Polymer Degradation and Stability*, 96, 12-22, 2011.

[34] Höglund A., Malberg S., Albertsson A. C., "Assessing the Degradation Profile of Functional Aliphatic Polyesters with Precise Control of the Degradation Products", *Macromolecular Bioscience*, 12, 260-268, 2012.

[35] Saito E., Liu Y., Migneco F., Hollister S. J., "Strut size and surface area effects on long-term in vivo degradation in computer designed poly(L-lactic acid) three-dimensional porous scaffolds" *Acta Biomaterialia*, 8, 2932-2940, 2012.

[36] Chiang M.F., Chu M.Z., Wu T.M., "Effect of layered double hydroxides on the thermal degradation behavior of biodegradable poly(L-lactide) nanocomposites", *Polymer Degradation and Stability*, 96, 60-66, 2011.

[37] Lazzeri L., Cascone M.G., Danti S., Serino L.P., Moscato S., Bernardini N., "Gelatine/PLLA sponge-like scaffolds: morphological and biological characterization", *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 17, 1211-1217, 2006.

[38] Cam D., Hyon S.H., Ikada Y., "Degradation of high molecular weight poly (L-lactide) in alkaline medium", *Biomaterials*, 16, 833-843, 1995.

[39] Weir N.A., Buchanan F.J., Orr J.F., Farrar D.F., Boyd A., "Processing, annealing and sterilisation of poly-L-lactide", *Biomaterials*, 25, 3939-3949, 2004.

[40] Labet M., Thielemans W., "Synthesis of polycaprolactone: a review". *Chemical Society Reviews*, 38, 3484-3504, 2009.

[41] Woodruff M. A., Hutmacher D. W., "The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21<sup>st</sup> century", *Progress in Polymer Science*, 35, 1217-1256, 2010.

- [42] Hutmacher D.W., Schantz J.T., Zein I., Ng K.W., Teoh S.H., Tan K.C., "Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling", *Journal of Biomedical Materials Research.*, 55, 203-216, 2001.
- [43] Van Natta F.J., Hill J.W., Carruthers W.H., "Polymerization and Ring Formation,  $\epsilon$ -caprolactone and Its Polymers", *Journal of America Chemical Society*, 56, 455-459, 1934.
- [44] Eldsäter C., Erlandsson B., Rendstad R., Albertsson A.C., Karlsson S., "The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly( $\epsilon$ -caprolactone)", *polymer*, 41, 1297-1304, 2000.
- [45] Pitt C.G., Chasalow F.I., Hibionada Y.M., Klimas D.M., Schindler A., "Aliphatic polyesters I.: the degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) in vivo". *Journal of Applied Polymer Science*, 26, 3779-3787, 1981.
- [46] Cheng L., Guo S., Wu W., "Characterization and *in vitro* release of praziquantel from poly( $\epsilon$ -caprolactone) implants", *International Journal of Pharmaceutics*, 377, 112-119, 2009.
- [47] Leong K.F., Wiria F.E., Chua C.K., Li S.H. "Characterization of a Poly- $\epsilon$ -Caprolactone Polymeric Drug Delivery Device Built by Selective Laser Sintering". *Biomedical Materials and Engineering*; 17, 147-157, 2007.
- [48] An J., Chua C.K., Leong K.F., Chen C.H., Chen J.P., "Solvent-free fabrication of three dimensionally aligned polycaprolactone microfibers for engineering of anisotropic tissues", *Biomedical Microdevices*, 14 863-872, 2012.

- [49] Seyednejad H., Gawlitta D., Kuiper R.V., de Bruin A., van Nostrum C.F., Vermonden T., Dher W.J.A., Hennink W.E., "In vivo biocompatibility and biodegradation of 3d-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly( $\epsilon$ -caprolactone)", *Biomaterials* 33, 4309-4318, 2012.
- [50] Kweon H.Y., Yoo M.K., Park I.K., Kim T.H., Lee H.C., Lee H.S., Oh J.S., Akaide T., Cho C.S., "A novel polycaprolactone networks for tissue engineering", *Biomaterials*, 24, 801-808, 2003.
- [51] Jenkins M.J., Harrison K.L., "The effect of molecular weight on the crystallization kinetics of polycaprolactone", *Polymers for advanced technologies*, 17, 474-478, 2006.
- [52] Salgado C.L., Sanchez E.M.S., Zavaglia C.A.C., Granja P.L., "Biocompatibility and biodegradation of polycaprolactone-sebacic acid blended gels", *Journal of Biomedical Materials Research A*, 100A, 243-251, 2012.
- [53] Peña J., Corrales T., Izquierdo-Barba I., Doadrio A.L., Vallet-Regí M., "Long Term Degradation of Poly( $\epsilon$ -caprolactona) films in biologically related fluids", *Polymers Degradation and Stability*, 91, 1424-1433, 2006.
- [54] Shen Y., Sun W., Zhu K.J., Shen Z., "Regulation of biodegradability and drug release behavior aliphatic polyesters by blending", *Journal of Biomedical Materials Research*, 50, 528-535, 2000.
- [55] Jenkins M.J., Harrison K.L., "The effect of crystalline morphology on the degradation of polycaprolactone in a solution of phosphate buffer and lipase", *polymers for Advanced Technologies*, 19, 1901-1906, 2008.

- [56] Kweon D. K., Song S. B., Park Y.Y., "Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator", *Biomaterials*, 24(9), 1595-1608, 2003.
- [57] Leung L. H., Naguib H. E., "Viscoelastic properties of poly( $\epsilon$ -caprolactone)-hydroxiapatite micro- and nano- composites", *Polymers Advanced Technologies*, 24, 144-150, 2013.
- [58] Sinha V.R., Bansal K., Kaushik R., Kumria R., Trehan A., "Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview", *International Journal of Pharmaceutics*, 278, 1-23, 2004.
- [59] Gadzinowski M., Sosnowski S., Slomkowski S., "Kinetics of the dispersion ring-opening polymerization of epsilon-caprolactone initiated with diethylaluminum ethoxide" *Macromolecules*, 29, 6404-6407, 1996.
- [60] Löfgren A., Albertsson A.C., Dubois P., Jérôme R., "Recent advances in ring-opening polymerization of lactones and related-compounds ", *Journal of Macromolecular Science-Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics.*, C35, 379-418,1995.
- [61] Mecerreyes D., Jérôme R., Dubois P., "Novel macromolecular architectures based on aliphatic polyesters: Relevance of the "coordination-insertion" ring-opening polymerization ", *Macromolecular Architectures*, 147, 1-59, 1999.
- [62] Huang M.N., Wang Y.L., Luo Y.F., "Biodegradable and bioactive porous polyurethanes scaffolds for bone tissue engineering", *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2, 36-40, 2009.

[63] Wang M., "Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2, 80-84, 2006.

[64] Chuenjittkuntaworn B., Inrung W., Damrongsri D., Mekaapiruk K., Supaphol P., Pavasant P., "Polycaprolactone/ Hydroxiapatite composite scaffolds: Preparation, characterization and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells", Journal of Biomedical Materials Research Part A, 94A, 241-251, 2010.

[65] Costa A.C.F.M., Lima M.G., Lima L.H.M.A., Cordeiro V.V., Vianna K.M.S., Souza V., Lira H.L., "Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações", Revista electrónica de Materiais e Processo, 4(3), 29-38, 2009.

[66] Martínez-Valencia A.B., Esparza-Ponce H.E., "Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis", 21(4), 18-21, 2008.

[67] Liu Q., De Wijn J.R., Bakker D., Van Blitterswijk C.A., "Surface modification of hydroxyapatite to introduce interfacial bonding with polyactive 70/30 in a biodegradable composite", 7, 551-557, 1996.

[68] Wiria F.E., Leong K.F., C.K., Liu Y., "Poly- $\epsilon$ -caprolactona/Hydroxiapatite for Tissue Engineering Scaffold Fabrication Using Selective Laser Sintering", Acta Biomaterialia, 3, 1-12, 2007.

[69] Ang K.C., Leong K.F., Chua C.K., Chandrasekaran M., "Compressive Properties and Degradability of Ploy-caprolactone/Hydroxiapatite Composites Under Accelerated Hydrolitic Degradation", Journal of biomedical materials research Part A, 80A, 655-660, 2007.

- [70] Ebrahimian-Hosseiniabadi M., Ashrafizadeh F., Etemadifar M., Venkatraman S. S., "Preparation and mechanical behavior of PLGA/nano-BCP composite scaffolds during in-vitro degradation for bone tissue engineering", *Polymer Degradation and Stability*, 96, 1940-1946, 2011.
- [71] Delabarde C., Plumer C. J., Bourban P. E., Manson J. A. E., "Accelerated ageing and degradation in poly-L-lactide/ hydroxyapatite nanocomposites", *Polymer Degradation and Stability*, 96, 595-607, 2011.
- [72] Goto T., Kojima T., Iijima, T., Yokokura S., Kawano H., Yamamoto A., Matsuda K., "Resorption of synthetic porous hydroxyapatite and replacement by newly formed bone", *Journal of Orthopedic Science*, 6, 444-447, 2001.
- [73] Khan Y., Katti D., Laurencin C., "Novel polymer-synthesized ceramic composite-based system for bone repair: an in vitro evaluation" *Journal of Biomedical Materials Research*, 69A, 728-737, 2004.
- [74] Patel H., Bonde M., Srinivasan G., "Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue engineering", *Trends in Biomaterials and Artificial organs*, 25, 20-29, 2011.
- [75] Hollister S.J., "Porous scaffold design for tissue engineering", *Nature*, 4, 518-524, 2005.
- [76] Zhang R., Ma P.X., "Poly ( $\alpha$ -hydroxyl acids/hydroxyapatite) porous composite for bone tissue engineering. Preparation and morphology", *Biodegradable Composite Scaffolds*, 10, 446-455, 1999.

[77] Rojas Cortes M.G., Vallejo Díaz B.M., Perilla J.E., “Los biopolímeros como materiales para el uso de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico”, *Ingeniería e Investigación*, 28, 57-71, 2008.

[78] Edwards S.L., Nitchell W., Matthews J.B., Ingham E., Russell S.J., “Design of Nonwoven Scaffold Structures for Tissue Engineering of the Anterior Cruciate Ligament”, *AUTEX Research Journal*, 4, 86-94, 2004.

[79] Alvarez J.F., “Osseous regeneration through tissue engineering”, *RET*, 2, 98-109, 2009.

[80] Çiçek C., Çakmakçia E., Kayaman-Apohan N., Arslanb M., Kurucab S.E., “Fabrication of PLGA based tissue engineering scaffolds, via photocuring and salt leaching techniques”, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 62, 719-725, 2013.

[81] Jiangab S., Guiying L.G., “Synthesis and characterization of biocompatible poly (ethylene glycol)-b-poly(l-lactide) and study on their electrospun scaffolds”, *Polymer-Plastics Technology Engineering*, 51, 1237-1244, 2012.

[82] Estrada C., Paz A. C., López L. E., “Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas”, *Revista de la Escuela de Ingeniería de Antioquia*, 5, 93-100, 2006.

[83] Naderi H., Matin M.M., Bahrami A.R., “Review Paper: Critical Issues in Tissue Engineering: Biomaterials, Cell Sources, Angiogenesis, and Drug Delivery Systems”, *Journal of Biomaterials Application*, 26, 383-417, 2011.

[84] Griffith L.G., Naughton G., “Tissue Engineering: Current Challenges and Expanding Opportunities”, *Science*, 295, 1003-1014, 2002.

[85] Khang G., Park C.S., Rhee J.M., "Preparation and Characterization of Demineralized Bone Particle Impregnated Poly(L-lactide) Scaffolds", Korea Polymer Journal, 9, 267-276, 2001.

[86] Thomson R.C., Shung A.K., Yaszemski M.J., Mikos A.G., "Chapter 21: Polymer Scaffold Processing", Principles of Tissue Engineering. Second Edition, 2000.

[87] Sachlos E., Czernuszka J.T., "Making Tissue Engineering Scaffolds Work. Review on the application of Solid Freeform fabrication Technology to the Production of Tissue Engineering Scaffolds", European cells and Materials, 5, 29-40, 2003.

[88] Holzwarth J.M., Ma P.X., "Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering", Biomaterials, 32, 9622-9629, 2011.

[89] Hutmacher D.W., Cool S., "Concepts of scaffold-based tissue engineering. The rationale to use solid-free-form fabrication techniques", Tissue Engineering Review Series, 11, 654-669, 2007.

[90] Wei G., Ma P.X., "Nanostructured Biomaterials for Regeneration", Advanced Functional Materials, 18, 3566-3582, 2009.

[91] Mikos A.G., Temenoff J.S., "Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering", Electronic Journal of Biotechnology, 3, 1-6, 2006.

[92] R., Ma P.X., "Processing of polymer scaffolds: phase separation", Annals of New York Academy for Sciences, 715-724, 2002.

[93] Zhang R., Ma P.X., "Poly( $\alpha$ -hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone tissue engineering. I. Preparation and morphology", *Journal of Biomedical Materials Research*, 44, 446-455, 1999.

[94] Lu L., Peter S.J., Lyman M.D., Lai H.L., Leite S.M., Tamada J.A., Uyama S., Vacanti J.P., Langer R., Mikos A.G., "In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams", *Biomaterials*, 21, 1837-1845, 2000.

[95] He S., Li X., Yang Y., Jia G., Zou J., "Correlations of in vitro and in vivo degradation tests on electrospun poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) fibers ", *Journal of Applied Polymer Science*, 125, 2207-2215, 2012.

### **3.TÉCNICAS EXPERIMENTALES**



### 3.1. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).

La calorimetría diferencial de barrido, o DSC, es una técnica de análisis térmico en la cual la diferencia de calor transmitido entre una muestra y una referencia es medida en función de la temperatura. Esta técnica fue desarrollada por E.S. Watson y M.J. O'neill en 1962. Tan solo dos años después apareció el primer equipo de medida [1].

El análisis térmico se ocupa de la medida de los cambios ocurridos en las propiedades físicas o químicas en función de la temperatura, detectando de esta forma, en los elementos analizados fenómenos físicos, como la fusión o la cristalización, así como reacciones químicas, como la oxidación o la degradación. La calorimetría diferencial de barrido mide las temperaturas y los flujos de calor asociados a transiciones, en función del tiempo y la temperatura [2-5], representándolos en un termograma.

Según la norma ASTM E 473, la definición de DSC es la siguiente: “la calorimetría diferencial de barrido es una técnica que mide la diferencia de energía entre un material y una referencia en función de la temperatura, cuando se someten tanto al material como a la referencia a un programa controlado de temperatura”.

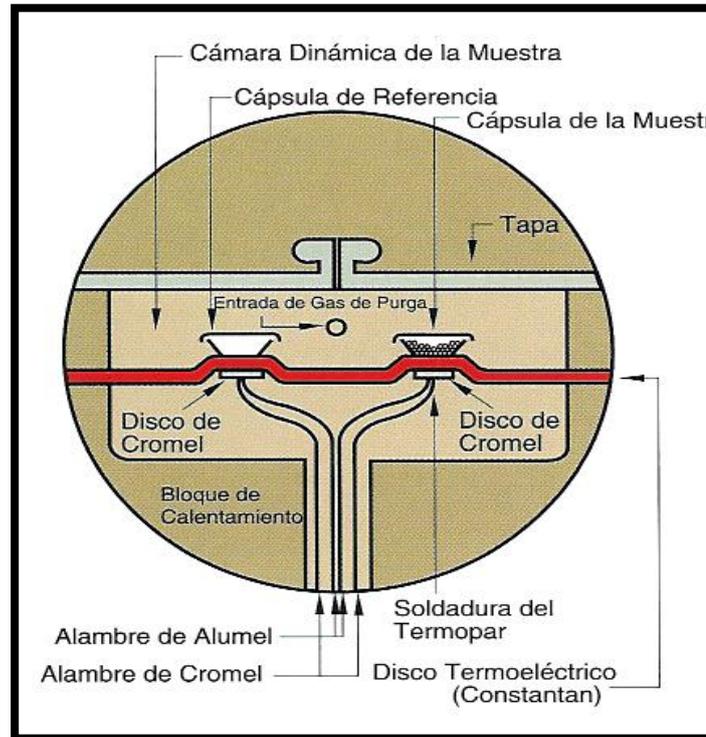
El DSC proporciona una importante información que se puede emplear para caracterizar materiales, diseño de productos, seleccionar los mejores materiales para una aplicación específica, predecir las prestaciones de un producto, optimizar las condiciones de un proceso, y mejorar la calidad.

En la Figura 3.1 se presenta el diagrama de la sección recta de la célula DSC estándar. La célula se basa en un diseño de "flujo de calor" que emplea un disco de constantan como medio principal de transferencia de calor a la muestra y referencia de posición. La muestra contenida en un crisol metálico, en la mayor parte de los casos aluminio, y la referencia (un crisol vacío) se colocan en una plataforma elevada que tiene el disco de constantan. Conforme se transfiere calor al disco, se mide la diferencia de flujo de calor entre la muestra y la referencia mediante los termopares formados por la unión del disco de constantan y las obleas de cromel que están en la cara opuesta de la plataforma. Esta medida continua y directa de la temperatura de la muestra significa una gran repetitividad en las temperaturas de las transiciones y una precisión no disponibles en ningún otro diseño de DSC de flujo de calor o de compensación de energía que determinan la temperatura de la muestra mediante cálculo. La temperatura del ambiente que rodea la muestra se controla mediante un sofisticado control de temperatura de retroalimentación (feed-back) programado con su propio sistema de termopar colocado en el bloque de calentamiento.

Esto permite que la temperatura de la muestra se mantenga constante o suba o baje a una velocidad preprogramadas. Es necesario un ambiente uniforme y térmicamente estable que asegure una excelente planitud de la parte central de la curva de referencia y una excepcional sensibilidad (relación señal/ ruido).

La técnica permite obtener precisiones cercanas al 0,1% en la medición de calor y de 0,05 °C para la temperatura, con ratios de calentamiento entre los 0,1 y 200 °C por minuto, y rangos de temperatura desde -180 hasta 725 °C,

además, si bien la sensibilidad térmica es difícil de estimar, se pueden observar efectos tan pequeños como  $1,0 \mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$ .



**Figura 3.1.** Sección recta de la Célula DSC.

En un DSC de “flujo de calor”, la muestra del material, encapsulado, se coloca junto a otra capsula vacía, utilizada como referencia en unos discos termoeléctricos en un horno. A medida que la temperatura del horno va variando, normalmente de forma lineal, el calor se transfiere a la muestra y a la referencia a través de los discos termoeléctricos. La diferencia entre el flujo de calor de la muestra y el de la referencia es medida mediante unos termopares usando la equivalencia térmica de la ley de Ohm.

$$q = \Delta T/R \quad (3.1)$$

donde q es el flujo de calor de la muestra.

$\Delta T$  diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia.

R la resistencia del disco termoelectrónico.

Esta simple relación no tiene en cuenta, sin embargo, los flujos de calor externos a través del sensor, o entre el sensor y la cápsula de la muestra. El sensor de la célula consta de un cuerpo separado con plataformas elevadas para contenerla muestra y la referencia. Las plataformas están conectadas al bloque de calentamiento (base) por tubos de paredes finas que crean resistencias térmicas entre las plataformas y la base. Detectores de área (termopares) en la parte inferior de la plataforma miden la temperatura de la muestra y de la referencia. Un tercer termopar mide la temperatura en la base.

### **3.1.1. Preparación de muestras.**

Para los ensayos de calorimetría hemos utilizados cápsulas de aluminio del tipo Tzero donde se introduce una cantidad de entre 4 y 11 miligramos de muestra.

Las características térmicas de los polímeros se determinaron mediante un calorímetro diferencial de barrido (DSC, Q200 de TA Instruments) equipado con un enfriador, empleándose como gas de purga nitrógeno, con el fin de evitar la degradación termo-oxidativa de las muestras durante los experimentos.



**Figura 3.1.** Cápsulas utilizadas en el DSC.

Las muestras se someten a un calentamiento desde -20 °C hasta 150 °C, con una velocidad de 10 °C/ minuto, y a continuación a un proceso de enfriamiento hasta -20 °C, con una velocidad de 20 °C/ minuto, para finalizar con un calentamiento hasta la temperatura de 150 °C y con una velocidad de 10 °C/ minuto.

Tras estos ciclos de calentamiento y enfriamiento obtenemos los termogramas de los cuales, tras su análisis, extraemos las entalpías de fusión, la temperatura de fusión y temperatura de transición vítrea. Con las entalpías de fusión podremos calcular la cristalinidad usando la siguiente fórmula:

$$\%C = \frac{\Delta h_f}{\Delta h_0} \times 100 \quad (3.1)$$

siendo:

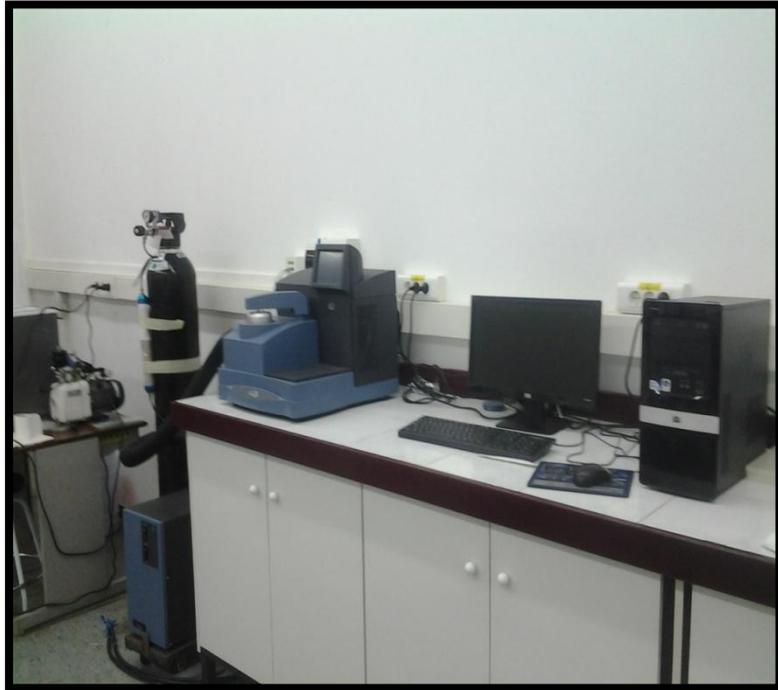
%C el tanto por ciento de la cristalinidad del scaffold.

$\Delta h_f$  la entalpía de fusión del scaffold

$\Delta h_0$  la entalpía de fusión de un polímero que sea 100 % cristalino, para el cual utilizaremos los valores 136 J/ g [6, 7] para el PCL y 93 J/ g [8- 10] para el PLLA.



**Figura 3.2.** Prensa utilizada para el cierre de las cápsulas.



**Figura 3.3.** DSC Q-200.

Se recomienda utilizar como gases de purga aire, argón, helio, nitrógeno u oxígeno.

### **3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).**

El funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido se basa en la formación de una imagen de barrido, obteniendo de esta forma información sobre la superficie de la muestra, o para muestras más gruesas de las estructuras cercanas a la superficie [11].

Su funcionamiento básico se basa en enviar un haz de electrones sobre la muestra que queremos observar, y comprobar la interacción entre ambos mediante los detectores adecuados. Al bombardear la superficie de un sólido con un haz electrónico tienen lugar varios fenómenos, tales como la emisión de una parte de la radiación incidente, o como la emisión de luz o electrones secundarios. La imagen se crea utilizando la señal obtenida por un detector de los electrones secundarios obtenidos. Los electrones secundarios son electrones con poca energía, ya que disponen de menos de 50 eV de energía. Estos, al interactuar con la materia sufren mayor dispersión que los haces de luz, y al ser ésta mayor y la penetración de los electrones muy pequeña, los haces de electrones no llegarán a la superficie de la muestra a analizar. Para evitar dicha dispersión los microscopios electrónicos deben liberar el camino que deben seguir los electrones hasta la muestra. Para ello es necesario que exista el vacío, así como un sistema que garantice el mismo dentro de la columna. Este vacío deberá ser como mínimo de  $10^{-3}$  Pa.

Un microscopio electrónico de barrido está compuesto por [12]:

➤ Un cañón de electrones o emisor de electrones. Los electrones que formarán el haz que enviamos sobre la muestra se deben generar con un emisor adecuado. En la mayoría de los casos este emisor se trata de un filamento de wolframio. Hoy en día es también cada vez más utilizado un emisor de hexaboruro de lantano ( $\text{LaB}_6$ ), que tiene ventajas e inconvenientes con respecto a los filamentos de wolframio. En el campo de las ventajas se encuentran la mayor duración y brillo. Como inconveniente principal destaca la necesidad de un vacío más alto para poder trabajar con él.

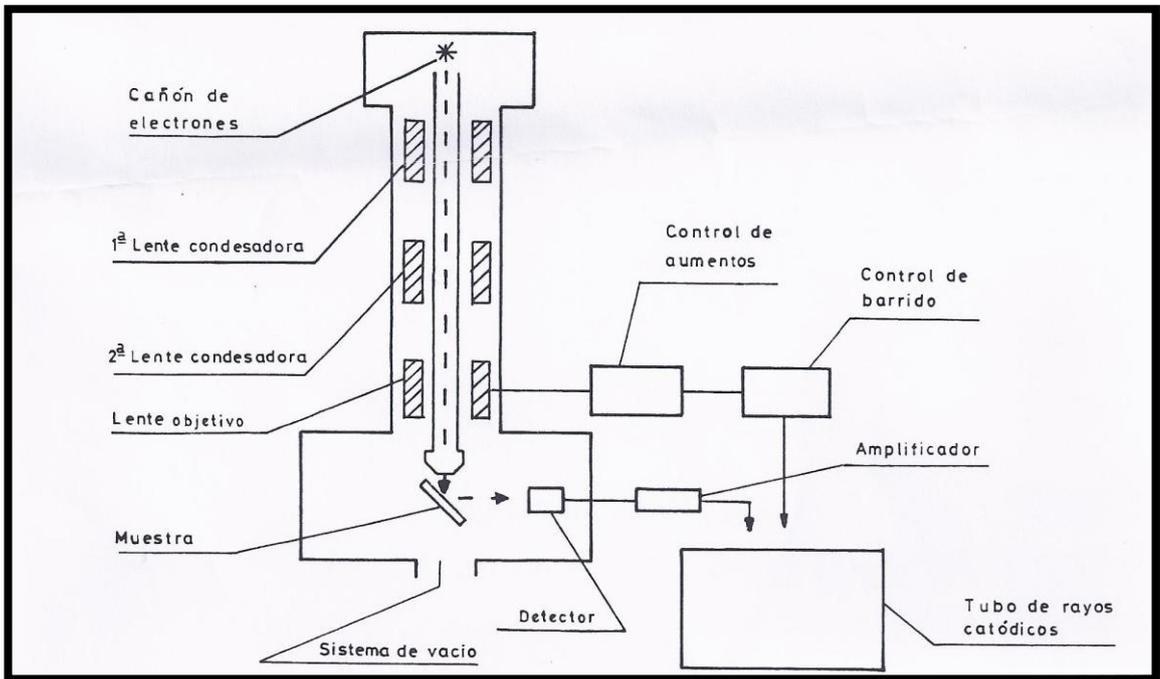
También podemos emplear un cañón de electrones basado en el efecto de emisión de campo. Si lo comparamos con las anteriores técnicas esta última es capaz de producir una mayor densidad de corriente. El problema que plantea es el pequeño tamaño de la zona emisora, con lo que únicamente resulta útil para trabajar con imágenes producidas por electrones secundarios.

➤ Un sistema de lentes magnéticas, situadas en la columna, que son las encargadas de direccionar los electrones, ya que una vez producidos los electrones necesitamos producir un haz fino para enfocarlo sobre la muestra. Para ello utilizamos un conjunto de lentes magnéticas convencionales, que mediante la utilización de campos magnéticos son capaces de redireccionar y producir el haz necesario. En la columna, en la que están situadas estas lentes magnéticas tiene que existir el vacío, como hemos comentado anteriormente, para que el haz de electrones llegue sin problema a la superficie que queremos estudiar.

➤ Un sistema de barrido, para que el haz de electrones formado realice el recorrido del barrido sobre la superficie de la muestra. Esto se consigue mediante la interacción de distintos campos magnéticos con el haz electrónico.

➤ Un sistema adecuado de detección. Cuya función es la de recoger las señales que produce la interacción del haz electrónico con la muestra, para formar así la imagen resultante del barrido.

El resultado del estudio de la muestra, y de la interacción del haz de electrones con la misma producirá una imagen o micrografía.



*Figura 3.4. Componentes de SEM.*

### 3.2.1. Preparación de muestras.



*Figura 3.5. Muestras metalizadas*

Las muestras fueron recubiertas con una fina capa de oro de una micra aproximadamente mediante la técnica de sputtering y en alto vacío para que fueran conductoras. Se colocaron en un portamuestras pegándolas con una cinta adhesiva de grafito por las dos caras, que además es conductora.

El SEM utilizado para obtener las micrografías es de la casa comercial JEOL JSM-6400.



*Figura 3.6. Metalizador.*

### **3.3. CROMATOGRAFÍA DE PERMEACIÓN DE GEL (GPC).**

La cromatografía de permeación de gel o Gel Permeation Chromatography (GPC) es una técnica cromatográfica de exclusión por tamaño o Size

Exclusion chromatography (SEC) que nos posibilita conocer la distribución de pesos moleculares promedio en peso ( $M_w$ ), el peso molecular promedio en número ( $M_n$ ) y el índice de polidispersidad ( $I=M_w/ M_n$ ) de un polímero. Se trata de una cromatografía de columna, en la que la fase móvil es el polímero en disolución, generalmente se utiliza tetrahidrofurano (THF) como disolvente, que se hace fluir a través de una columna rellena con un gel microporoso con una distribución de poros perfectamente definida, y cuya elección dependerá de la resolución y el peso molecular del polímero a fraccionar, que constituye la fase estática.

El gel tiene la función de tamiz molecular, y separa las macromoléculas en función de su tamaño, teniendo las moléculas de mayor tamaño acceso únicamente a los poros mayores eluyendo antes, mientras que las de menor tamaño se quedan retenidas en el gel tardando más tiempo, produciéndose de este modo una elución gradual en función del tamaño molecular de mayor a menor tamaño, pudiendo detectarse, mediante un detector adecuado la concentración del polímero, como podemos observar en la Figura 3.5. De este modo podemos relacionar la concentración y el peso molecular, lo que nos permite determinar la distribución de pesos moleculares de la muestra.

El equipo utilizado consta de dos columnas, siendo una la de referencia y haciendo circular por la otra la muestra. Las muestras eluidas se detectan mediante un sensor, habitualmente un refractómetro diferencial, que realiza la comparación entre la muestra de referencia y la muestra problema, lo que nos permite obtener un cromatograma con información sobre los pesos moleculares.

En realidad lo que medimos mediante esta técnica es el volumen eluído ( $V_e$ ), mediante el cual calculamos los pesos moleculares ( $M$ ) que corresponden a dicho volumen, aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Log } M = A - B.V_e \quad (3.2)$$

siendo  $A$  y  $B$  constantes que dependen del polímero y disolventes utilizados, temperatura o cromatógrafo usado.

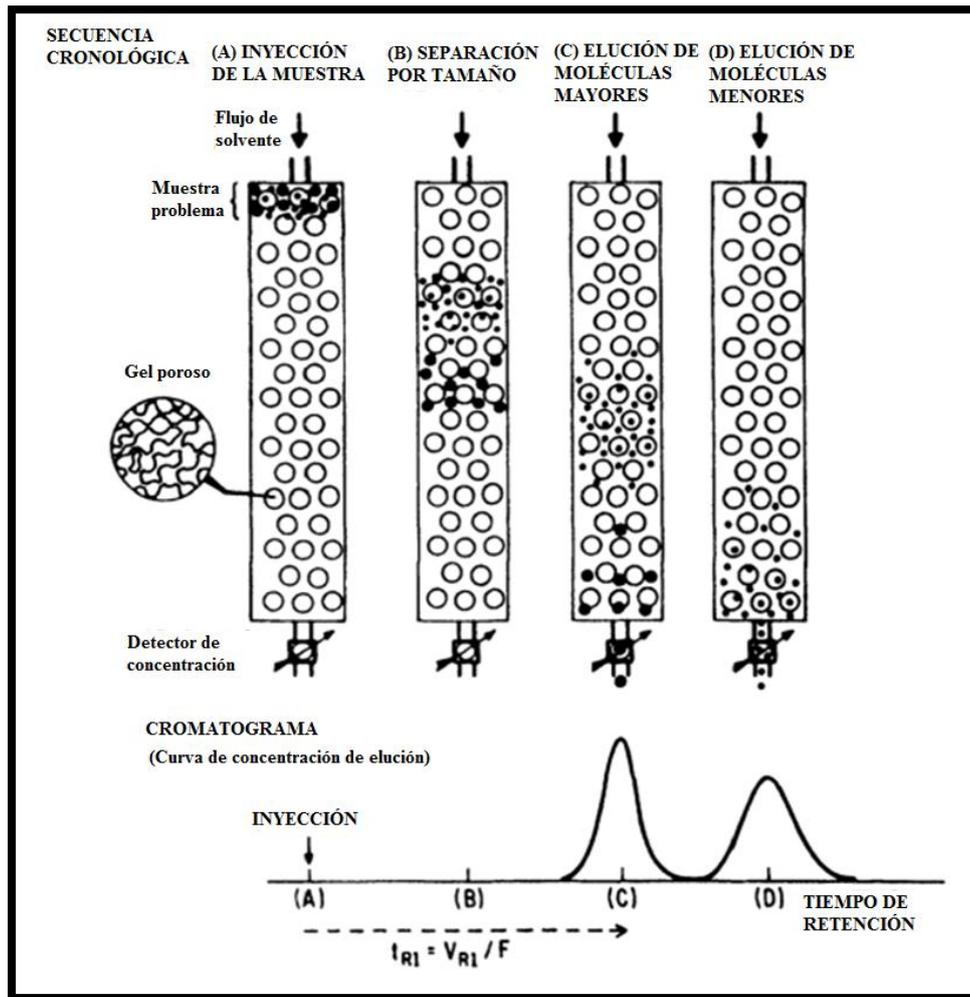
Antes de utilizar el equipo deberemos calibrarlo, pudiéndose utilizar para ello una serie de patrones de muestras monodispersas del mismo polímero que estamos utilizando o utilizando muestras con una distribución de pesos moleculares conocida. El sistema utilizado es el calibrado universal, que se basa en la separación por tamaños moleculares, por lo que será posible obtener una relación entre el volumen de elución y tamaño molecular, independiente del polímero utilizado.

El volumen hidrodinámico ( $V_H$ ) de una macromolécula se mide mediante su viscosidad intrínseca ( $\eta$ ):

$$V_H = [\eta] M \quad (3.3)$$

Se supone que a igual volumen hidrodinámico el volumen de elución será el mismo, a pesar de ser dos polímeros químicamente distintos. El volumen hidrodinámico ( $V_H$ ) y el volumen de elución ( $V_e$ ) se relacionan mediante la siguiente fórmula:

$$\log V_H = \log ([\eta]. M) = A - B.V_e \quad (3.4)$$



**Figura 3.5.** Principio de funcionamiento de una columna GPC.

Se debe tener en cuenta que cada columna tendrá sus propios límites de exclusión y permeación total, lo que nos indicará el tamaño máximo y mínimo que podrán discriminar [13].

### 3.3.1 Preparación de muestras.

Se preparó una pequeña cantidad de disolución de polímero en THF y se almacenó en una jeringuilla para poder inyectarla en la columna y medir así los

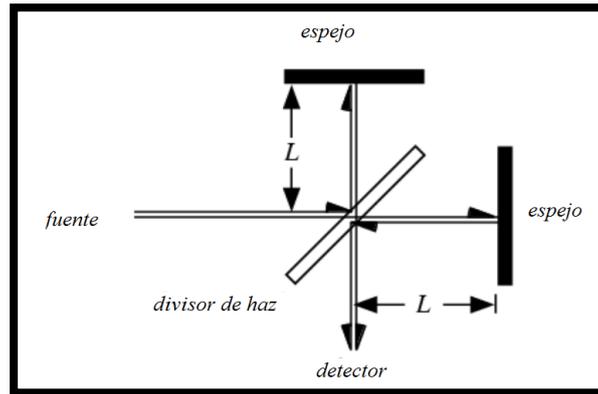
tiempos de elución. La concentración a utilizar depende principalmente del peso molecular y viscosidad de la muestra mientras la cantidad puede depender del equipo, la columna, así como del caudal utilizado. Se determinó el peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ), el peso molecular promedio en número ( $M_n$ ) y el índice de polidispersidad ( $I = M_w / M_n$ ), mediante el uso de un cromatógrafo de permeación de gel (GPC, Perkin Elmer 200). Para ello las muestras fueron disueltas en tetrahidrofurano (THF) al 2 % y se utilizó un refractómetro diferencial Perkin Elmer 200 como detector. La calibración se realizó de acuerdo a los estándares del poliestireno con un caudal de 1 ml/ min. Se utilizaron cuatro columnas Phenogel (Phenomenex) en serie con un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m.

#### **3.4. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER. (FTIR).**

La espectroscopía infrarroja permite identificar los grupos funcionales presentes en la molécula y las interacciones existentes, lo que posibilita obtener una caracterización orientativa del producto que estamos analizando. Si quisiéramos determinar la estructura química de los compuestos deberíamos complementar esta técnica con otras como la resonancia magnética nuclear.

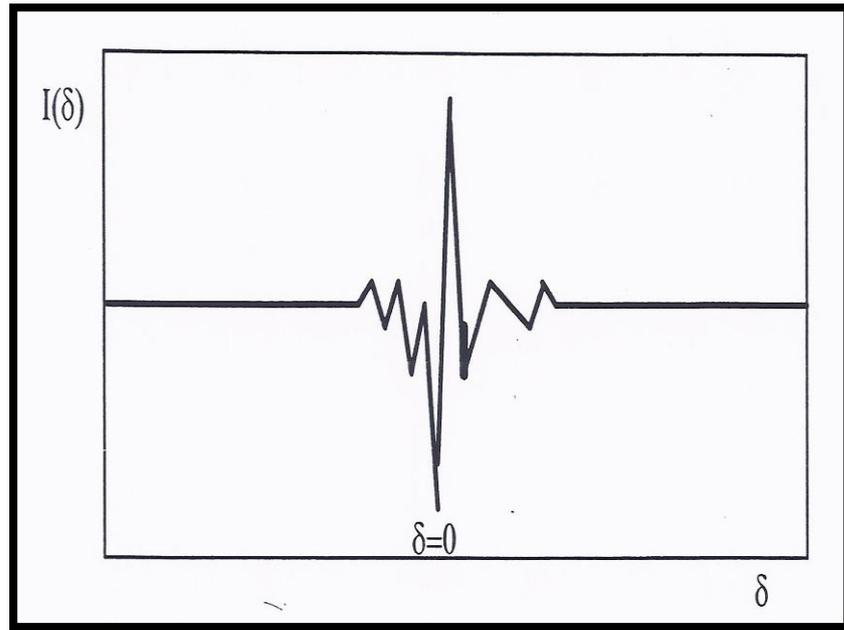
La mayoría de equipos de espectrometría infrarroja se basan en el empleo del interferómetro de Michelson, los principales elementos son: una fuente luminosa, el propio interferómetro y un detector. Como se puede ver en la Figura 3.6, el interferómetro de Michelson está formado por un divisor de haz, que no es más que un espejo semirreflejante colocado con una inclinación de 45° y que divide el haz emitido por la fuente en dos haces iguales pero perpendiculares.

Uno de los haces incide sobre un espejo fijo y el otro sobre un espejo móvil que se puede desplazar a velocidad constante con la ayuda de un motor. Finalmente los haces se recombinan de nuevo en el divisor creando una interferencia que será constructiva o destructiva en función de la posición del espejo móvil respecto al fijo.



**Figura 3.6.** Interferómetro de Michelson.

El haz resultante pasará por la muestra donde se dará una absorción selectiva de longitudes de onda y llegará finalmente al detector. El interferograma obtenido contiene la absorción completa de la muestra para cada longitud de onda por la correspondiente disminución de intensidad luminosa, o lo que es lo mismo, se capta la radiación de todo el espectro simultáneamente, por eso el barrido es tan corto. Este interferograma (Figura 3.7) será digitalizado y un ordenador desarrollará el cálculo de la Transformada de Fourier para obtener un espectro de absorbancia o transmitancia de la muestra problema [14].



**Figura 3.7.** Interferograma típico.

Como interesa el espectro producido únicamente por la muestra, es necesario restar el espectro total resultante de la distribución del fondo (que depende de la fuente emisora, las características del equipo y las impurezas del ambiente), lo que puede realizarse si justo antes de realizar el espectro de la muestra se realiza un espectro en blanco (backup) que se resta del obtenido para la muestra.

#### **3.4.1. Preparación de las muestras.**

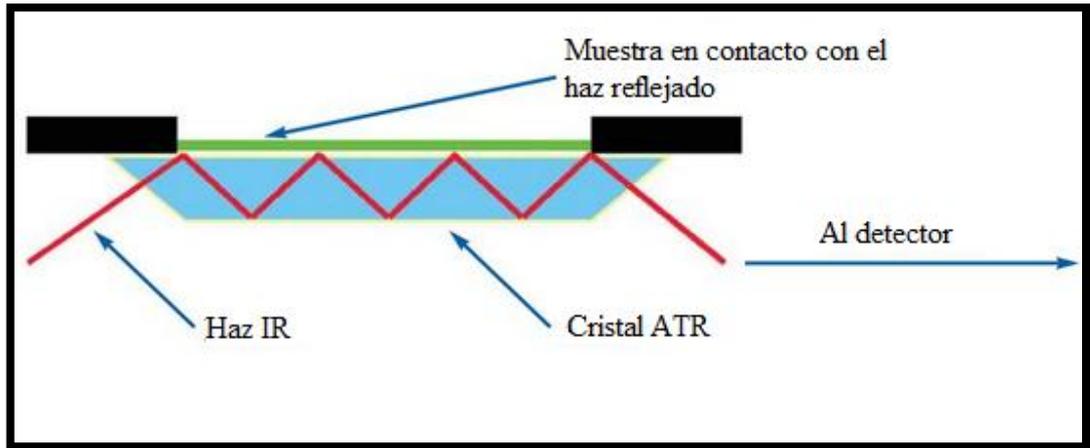
La técnica de ATR (Attenuated Total Reflectance) o RTA (Reflexión Total Atenuada) es la técnica más utilizada en conjunción con la técnica de FTIR, siendo de mucha utilidad para hallar los espectros infrarrojos de muestras que son difíciles de tratar para someterlas a un análisis FTIR.

Esta herramienta nos permite hacer análisis tanto cualitativos como cuantitativos sin prácticamente necesidad de preparación y con una alta velocidad. Debido a la limitada penetración de la onda en la muestra, ésta debe estar en contacto con el prisma, encontrando en el accesorio ATR, elementos para aplicar presión de la muestra sobre el prisma.



**Figura 3.8.** Accesorio ATR.

La gran ventaja que tiene esta técnica es la escasa preparación requerida para las muestras a analizar, únicamente teniendo que asegurar que el contacto entre la muestra y el prisma es correcto.



**Figura 3.9.** Esquema de funcionamiento del ATR.

Los espectros infrarrojos han sido realizados con un FTIR Thermonicolet Avatar 370, utilizando un ATR con un cristal de ZnSe. Se realizaron 32 repeticiones del escaneado entre las longitudes de onda de  $4000$  y  $650\text{ cm}^{-1}$ , con una resolución  $4\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.5. PROPIEDADES MECÁNICAS.

Las propiedades mecánicas pueden definirse como aquellas que tienen que ver con el comportamiento de un material bajo fuerzas aplicadas [15]. Estas se expresan en términos de cantidades que son funciones del esfuerzo o de la deformación o ambas simultáneamente. Las fundamentales son la resistencia, la rigidez, la elasticidad, la plasticidad y la capacidad energética. La resistencia de un material se mide por el esfuerzo según el cual desarrolla alguna condición limitativa específica, siendo las principales condiciones limitativas o criterios de falla la terminación de la acción elástica y la rotura [16].

Tres factores se encuentran involucrados en la definición de la manera en que la carga se aplica: la clase de esfuerzo inducido, la velocidad a la cual se aplica la carga y el número de veces que es aplicada. Existen cinco tipos primarios de cargas en los ensayos mecánicos; según lo dictado por la condición de esfuerzo a inducir: tensión, compresión, corte directo, torsión y flexión.

Con respecto al ritmo según el cual se aplica, los ensayos pueden clasificarse en tres grupos. Si la carga es aplicada durante un período de tiempo relativamente corto, pero con lentitud suficiente para que pueda considerarse que la rapidez del ensayo tenga un efecto prácticamente despreciable sobre los resultados, el ensayo se denomina estático.

Si la carga es aplicada muy rápidamente de modo que el efecto de la inercia y el factor tiempo queden involucrados, los ensayos se llaman dinámicos. Si la carga es sostenida durante un largo período, el ensayo se denomina de larga duración.

Con respecto al número de veces que la carga es aplicada, los ensayos pueden clasificarse en dos grupos: En el primer grupo, el cual incluye el mayor número de ensayos realizado, una sola aplicación de carga constituye el ensayo. En el segundo grupo, la carga se repite muchas veces, millones si es necesario.

### **3.5.1. Preparación de muestras.**

La medición de las distintas propiedades mecánicas se ha realizado en una máquina de medición universal INSTRON modelo 4502(Reino Unido). Los

soportes porosos fueron cortados en discos de 11 mm de diámetro, con un espesor de 2 mm. El módulo de compresión se definió como el módulo lineal inicial, y el límite elástico se determinó mediante la intersección de dos tangentes de la curva tensión-deformación alrededor del límite de elasticidad.

### 3.6. BIBLIOGRAFÍA.

[1] U.S. Patent 3, 263, 484.

[2] Monserrat, S. I Jornadas sobre calorimetría y análisis térmico en polímeros. Madrid, 1992.

[3] Kamal M.R., Sourour S, "Kinetics and thermal characterization of thermoset cure", Polymer Engineering and Science, 13, 59-64, 1973.

[4] Salla, J. M., Martin, J.L., "Dinamic, isothermal and residual heats of curing of an unsaturated polyester resin", Thermochimica Acta, 126, 339-354, 1988.

[5] Dean, John A. "The Analytical Chemistry Handbook". New York. McGraw Hill, Inc. pp. 15.1–15.5, 1995.

[6] Qiu Z., Komura M., Ikehara T., Nishi T., "Miscibility and crystallization behavior of biodegradable blends of two aliphatic polyesters. Poly(butylene succinate) and Poly( $\epsilon$ -caprolactone)" Polymer, 44, 7749-7756, 2003.

[7] Guo Q., Groeninckx G., "Crystallization kinetics of poly( $\epsilon$ -caprolactone) in miscible thermosetting polymer blends of epoxy resin and poly( $\epsilon$ -caprolactone)", Polymer, 42, 8647-8655, 2001.

[8] Zhou Z., Yi Q., Liu L., Liu X., Liu Q., "Influence of degradation of Poly-L-lactide on mass loss, mechanical properties and crystallinity in phosphate buffered solution", *Journal of Macromolecular Science*, 48, 309-317, 2009.

[9] Weir N.A., Buchanan F.J., Orr J.F., Farrar D.F., Boyd A., "Processing annealing and sterilization of poly-L-lactide", *Biomaterials*, 25, 3939-3949, 2005.

[10] Cam D., Hyon S.H., Ikada Y., "Degradation of high molecular weight poly (L-lactide) in alkaline medium", *Biomaterials*, 16, 833-843, 1995.

[11] Gabriel B.L., "SEM: A user's manual for materials science", American Society for Metals, ISBN: 0-87170-202-9, 1985.

[12] Aballe M., López Ruiz J., Badía J.M., Adeva P., "Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis por Rayos X", Editorial Rueda-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, ISBN: 84-7207-094-4, 1996.

[13] Bozzola J.J., Russel L. D., "Electron microscopy, second edition", Jones and Bartlett Publishers International, London, ISBN 0-7637-0192-0, 1999.

[14] Brigham E. O., "The fast Fourier Transform", Prentice-Hall, New Jersey, ISBN 0-13-307496-X, 1974.

[15] Seeley F.B., Smith J.O., "Advanced mechanics of materials", John Wiley & Sons Inc; 2nd edition, ISBN: 978-0471771210, 1952.

[16] Churchill H.D., "Physical testing of metals and interpretation of test results". American Society for Metals, ISBN: 978-0471771210, 1936.

## **4.MATERIALES**







Para realizar los soportes porosos de este estudio, hemos utilizado dos polímeros: la poli-L-lactida y la poli- $\epsilon$ -caprolactona. La poli-L-lactida o PLLA, tiene menos de un 0,01 % en contenido residual de disolvente, y menos de un 0,1 % de monómero residual y ha sido suministrada por la casa Biomer L 9000 (Alemania). En lo referente a la poli- $\epsilon$ -caprolactona fue proporcionada por la casa PURAC BIOMATERIALS PURASORB (Holanda).

Ambos polímeros fueron purificados disolviéndolos en cloroformo antes de su utilización. Podemos observar sus pesos promedios en número, así como en peso, además del índice de polidispersidad de los mismos, calculados mediante GPC en la Tabla 3.1.

Polímero	$M_n$	$M_w$	$I = M_w/M_n$
PLLA	95680.8	141940.8	1.4835
P $\epsilon$ CL	79760	130490	1.636

**Tabla 4.1.** Pesos moleculares promedio en número y promedio viscoso e índices de polidispersidad de los polímeros utilizados.

En la realización de la disolución de los polímeros hemos utilizado 1,4 dioxano, cloroformo y agua destilada en diferentes proporciones. El 1,4 dioxano está estabilizado con 22 ppm de BHT (Butilhidroxitolueno), con un máximo del 0,5 % y un peso molecular de 119,38 g/ mol. El

cloroformo, triclorometano o tricloruro de etilo se ha estabilizado con etanol, con un máximo de 0,2 % y un peso molecular de 88,11 g/ mol. El agua destilada tiene un peso molecular de 18,016 g/ mol. Todos los disolventes han sido suministrados por la casa PANREAC S.A. de Barcelona y destilados antes de su utilización.

También hemos utilizado nanohidroxiapatita como agente bioactivo, tiene un tamaño menor de 200 nm, y un peso molecular de 502,31 g/ mol y ha sido suministrada por la casa ALDRICH-CHEMISTRY de SIGMA – ALDRICH.

Para realizar la degradación se utilizó una solución tampón salina (PBS) suministrada por FLUKA ANALYTICAL (SIGMA ALDRICH, EEUU) con un pH de 7,2.

## **5.PREPARACIÓN DE MUESTRAS**



Para realizar este estudio, hemos realizado scaffolds con dos tipos de polímeros diferentes, la policaprolactona (PCL) y la poli-L-lactida (PLLA) utilizando la técnica de separación de fases inducida térmicamente (TIPS).

Inicialmente, para determinar las condiciones óptimas de fabricación se han realizado los scaffolds con un 2.5 % de polímero en relación a la cantidad de disolvente usado, en proporción peso/ volumen. Para la fabricación de los soportes porosos hemos utilizado los disolventes 1,4 dioxano así como cloroformo, usando estos tanto puros, como con un 1, 2, 5 y 10 % de agua destilada respectivamente. Además, antes de someter los scaffolds al proceso de liofilización hemos templado las muestras a -60, -15 y 0 °C.

Para estudiar la degradación in vitro de los scaffolds, hemos fabricado los soportes porosos con nanohidroxiapatita con un 0, 10, 30 y 50 %, en referencia al polímero utilizado. La concentración del polímero en la disolución será del 2,5 % en relación peso/ volumen.

El proceso de fabricación ha sido el siguiente:

1. Se disolvió la cantidad de polímero necesaria. Para ello se introdujo el polímero en un matraz esférico, y sometimos la mezcla a agitación. Además, mientras la misma se agitaba, la calentamos a 50 °C, para ayudar a su disolución. Este proceso duró dos horas aproximadamente. Para los scaffolds fabricados con agua destilada, la hemos vertido en el matraz en la última parte del proceso de agitación, gota a gota, hasta completar la cantidad necesaria.



**Figura 5.1.** Preparación del scaffold.

2. Transcurridas dos horas, cuando la disolución es ya homogénea rellenamos un molde de aluminio con ella.

Si el scaffold lleva nanohidroxiapatita, antes de verter la disolución en el molde, se debe introducir en el mismo la cantidad necesaria. Para conseguir una distribución homogénea de la nanohidroxiapatita en el soporte poroso, hemos usado un sonicador, donde permaneció alrededor de cinco minutos.



**Figura 5.2.** *Sonicador usado.*

3. A continuación se mete el molde con la disolución homogeneizada en el liofilizador, donde permanecerá durante varios días. De esta forma se elimina el disolvente existente en el scaffold por sublimación, el espacio ocupado por el disolvente serán los poros de la espuma polimérica fabricada.

### **5.1. SEPARACIÓN DE FASES INDUCIDA TÉRMICAMENTE. LIOFILIZACIÓN.**

El proceso denominado TIPS (Thermally Induced Phase Separation) consiste en disminuir la temperatura de una solución polimérica hasta inducir una separación de fases, es decir, una fase que tiene una alta concentración de polímero y otra fase que tiene una baja concentración del mismo. Después se retira el disolvente (por extracción, evaporación o sublimación) y el espacio ocupado por el mismo se convertirá en los poros del scaffold fabricado. Se trata

de un proceso que requiere de dos etapas: la separación de fases en sí y la eliminación del solvente.

La morfología de los poros obtenidos variara como vamos a comprobar dependiendo del polímero, del disolvente, de la concentración de polímero en la solución, así como de la temperatura de temple [1].

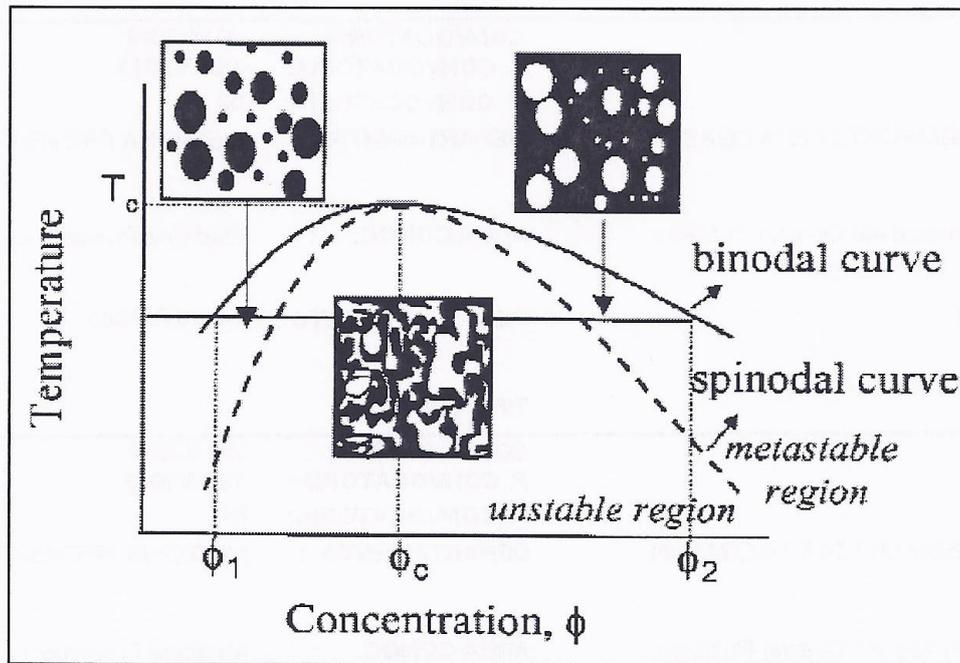
Dependiendo de la temperatura a la que ocurra la separación de fases, tendremos dos tipos [2]:

-Separación sólido-líquido: Si al bajar la temperatura el solvente cristaliza, el polímero se verá expulsado del frente de cristalización y hablaremos de una separación sólido-líquido. En este caso la progresión del frente de cristalización del solvente definirá la principal orientación de poros.

-Separación líquido-líquido: Esta separación tendrá lugar cuando la temperatura de cristalización del solvente sea más baja que la temperatura de separación de fases de la solución polimérica. En este caso pueden ocurrir dos tipos de separación de fases [3, 4] al enfriar la solución polimérica:

- a) Entre las curvas binodal y espinodal del diagrama de fases se dará un fenómeno de nucleación y crecimiento. Las partículas pequeñas al tener un área superficial más grande serán menos estables, por lo que tenderán a disolverse y formar partículas más grandes (fenómeno de coalescencia). El resultado será una estructura más dispersa.

- b) Debajo de la curva espinodal la solución polimérica tenderá a una separación de fases líquido-líquido espontánea (descomposición espinodal). Obtendremos una red interconectada de dos fases.



**Figura 5.3.** Diagrama de fases de una solución polimérica.

Para la realización de nuestros andamios poliméricos nos interesaba la consecución de una red de poros interconectada y lo más regular posible, por lo que trabajamos con una separación de fases sólido-líquido.

### 5.1.1. Liofilización.

La liofilización es un proceso en el cual se deshidratan los productos a baja presión y temperatura. En los otros procesos de deshidratación esta se

realiza evaporando la humedad, en cambio con la liofilización, al trabajar a baja presión y temperatura, dicha deshidratación se realiza mediante sublimación del agua desde el estado sólido, con lo que la humedad debe estar en este estado.

La técnica de la liofilización se desarrollo en los procesos industriales a partir de los años 50, aunque esta técnica era ya utilizada por los Incas, aprovechando las bajas presiones y temperaturas existentes en Los Andes. Es un proceso de freeze-drying o congelación desecación, que consiste en desecar una sustancia o producto, mediante sublimación, para lo que sometemos la sustancia a un alto vacío, suministrando, en muchas ocasiones, calor a la muestra. De esta forma es posible eliminar la humedad de una sustancia, evitando el deterioro debido al recalentamiento.

El proceso de sublimación consta de dos etapas:

**1ª etapa: Congelación.** Etapa de congelación inicial. La duración de esta etapa depende de varios factores, como la cantidad y concentración del producto. Una congelación adecuada al producto a liofilizar es básica para que éste presente un buen aspecto, que sus propiedades originales se conserven, así como que permita que la rehidratación sea rápida. La velocidad de enfriamiento es importante, ya que determina el tamaño de los cristales formados por el disolvente, lo que también definirá el tamaño de los poros. Si la congelación es rápida se producirán cristales pequeños, con lo que será más difícil eliminar el disolvente existente. Si la velocidad de congelación es lenta, los cristales producidos tendrán mayor tamaño.

**2ª etapa: Secado.** Se realizará a bajas presiones, para que la sublimación tenga lugar. Este secado se produce en dos fases, siendo la primera de desecación primaria, y la segunda de desecación secundaria. Para que ocurran estos fenómenos, el disolvente debe de encontrarse en estado sólido.

En la primera fase, llamada de desecación primaria o sublimación, el material congelado es sometido al vacío para que tenga lugar la sublimación. En este momento es cuando ocurre la eliminación de la mayor parte del disolvente presente en el producto. En esta fase debemos tener cuidado al modificar los parámetros de presión, temperatura y tiempo, ya que al estar los tres parámetros relacionados, al variar alguno de ellos modificaremos también los otros. Esta fase finaliza en el momento que se ha sublimado la última porción de hielo existente en la muestra.

En la segunda fase de desecación secundaria o resorción se eliminan las últimas trazas de disolvente que puedan existir en el producto, realizándose la resorción del disolvente adsorbido por la superficie de la muestra. La temperatura que se alcanzará en esta fase será inferior a la temperatura de desnaturalización del producto. Tras esta, se logra una humedad final en el producto menor del 1 %, y se le puede suministrar energía a la muestra en forma de calor, para ayudar a la eliminación del disolvente restante, que se puede realizar por conducción, convección o radiación. Es importante en esta fase lograr las condiciones de presión que permitan la eliminación de las cantidades residuales de disolvente que permanezcan en el producto. Para que la sublimación tenga lugar el producto debe encontrarse con unas características de temperatura y presión parcial inferior al punto triple del disolvente que deseemos eliminar.



**Figura 5.4.** Liofilizador Telstar lyoquest -85.

## 5.2. Estudio de la degradación in vitro y caracterización de muestras.

Una vez finalizado este proceso dispusimos de los scaffolds necesarios para realizar el estudio de la degradación in vitro.



**Figura 5.5.** Scaffolds resultantes tras el proceso de liofilización.

Las muestras fueron cortadas en trozos rectangulares de unos 0,5 cm<sup>2</sup> y peso similar, en torno a los 20 mg. Tras ser pesadas se introdujeron en tubos de ensayo idénticos que contenían 10 ml de solución tampón salina (PBS), sumergiéndolas por completo. La degradación tuvo lugar en una estufa termostata a 37 °C y en condiciones estáticas.



**Figura 5.6.** Degradación *in vitro* en la estufa a 37°C.

Transcurridos los periodos de degradación establecidos (1, 2, 3, 4, 6 y 8 semanas para las muestras de PLLA y 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 y 16 semanas para las de PCL), las muestras eran extraídas, se les retiraba cuidadosamente la humedad superficial y eran pesadas para determinar la absorción de agua. Finalmente las muestras se dejaron secar varias semanas durante las cuales fueron regularmente pesadas hasta que su peso se estabilizó. Así se pudo determinar el peso en seco tras la degradación.

## 5.2.1 Absorción de agua y pérdida de masa.

El porcentaje de agua absorbida ( $W_a\%$ ) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$W_a \% = \frac{W_w - W_r}{W_r} \times 100 \quad (5.1.)$$

donde  $W_w$  es el peso de la muestra tras retirar el agua superficial y  $W_r$  es el peso residual de la muestra seca después de la degradación.

El porcentaje de pérdida de masa ( $W_L\%$ ) se estimó mediante la siguiente ecuación:

$$W_L \% = \frac{W_0 - W_r}{W_0} \times 100 \quad (5.2.)$$

donde  $W_0$  es el peso inicial de la muestra.

## 5.2.2. Porcentaje de porosidad.

La picnometría de mercurio es una técnica que nos permite calcular la porosidad de cada una de las muestras. La técnica consistió en sumergir el andamio en un recipiente lleno de mercurio y medir el volumen de mercurio desplazado, que será igual al volumen de la probeta. Para ello primero se pesó el andamio y después se sumergió en el vaso lleno de mercurio con la ayuda de una pieza metálica. Se pesó el volumen de mercurio desplazado por el andamio mediante una balanza. Conocida la densidad del mercurio ( $\rho_{HG} = 13,57 \text{ g/cm}^3$ ) y su peso calculamos el volumen de mercurio ( $Vol_{HG}$ ). El volumen desplazado de mercurio era igual al volumen de la muestra en cuestión. De este modo conocido el peso del andamio podemos calcular su densidad.

$$\rho_a = M_a / \text{Vol}_{HG} \quad (5.3.)$$

Conocida la densidad del andamio, así como la densidad del polímero, se calcula el porcentaje de porosidad de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%P = (1 - \rho_a / \rho_p) \times 100 \quad (5.4.)$$

donde %P es el porcentaje de porosidad.

### 5.2.3. Cromatografía de permeación de gel (GPC).

Esta técnica nos permite determinar el peso molecular promedio viscoso ( $M_w$ ), el peso molecular promedio en número ( $M_n$ ) y el índice de polidispersidad ( $I = M_w / M_n$ ) mediante el uso de un cromatógrafo de permeación de gel (GPC). Para ello las muestras se disolvieron en tetrahidrofurano (THF) al 2% y se utilizó un refractómetro diferencial PERKIN ELMER 200 como detector. La calibración se realizó de acuerdo a los estándares del poliestireno con un caudal de 1 ml/min. Se utilizaron cuatro columnas Phenogel (Phenomenex) en serie con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.4. Propiedades mecánicas.

La medición de las propiedades mecánicas se ha realizado en una máquina de medición universal INSTRON modelo 4502 (Reino Unido). Los scaffolds fueron cortados en discos de 11 mm de diámetro, con un espesor de 2 mm. El módulo de compresión se definió como el módulo lineal inicial, y el límite elástico se determinó mediante la intersección de dos tangentes de la curva tensión-deformación alrededor del límite de elasticidad.

#### 5.2.5. Variación del pH.

Tras el periodo de degradación correspondiente se realizó la medición del pH del PBS sobrante en el tubo de ensayo. Las variaciones en el pH de la solución tampón fueron determinadas utilizando un pH-metro PCE 228 (Instrumentos PCE, España) y corregidas por temperatura.

#### 5.2.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Las características térmicas de los polímeros se determinaron mediante un calorímetro diferencial de barrido (DSC, Q200 de TA Instruments) equipado con un enfriador. Se utilizaron muestras de entre 4 y 11 mg que fueron encapsuladas en crisoles de aluminio del tipo Tzero. Como gas de purga se empleó nitrógeno con el fin de evitar la degradación termo-oxidativa de las muestras durante los experimentos. Los barridos comprendieron temperaturas de -20 a 150 °C con ratios de calentamiento de 10 °C/min y ratios de enfriamiento de 20 °C/min.

#### 5.2.7. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Se registró el espectro de absorción en el infrarrojo de las muestras mediante un Espectrómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR, Thermo Scientific Nicolet Avatar 370), equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR, Pike Smart MIRacle) y un cristal de ZnSe. Se realizaron barridos entre 4000 y 650  $\text{cm}^{-1}$  a una resolución de 4 $\text{cm}^{-1}$ .

Para la obtención de los espectros IR por medio de ATR lo único que tenemos que hacer es asegurarnos que la muestra a analizar esté en estado sólido, como es nuestro caso, y que el contacto entre la muestra y el cristal del ATR sea óptimo. Para ello usaremos un accesorio que incluye el ATR para facilitar esta labor.

### 5.2.8. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La morfología de los andamios se evaluó mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido (SEM, HITACHI S-3400N, Tokio, Japón). Antes del análisis las muestras fueron metalizadas con una fina capa de oro en un metalizador EMITEC K550X a 1200 V y 5 mA.

La Tabla 5.1 recoge la composición de las muestras fabricadas, así como su método de fabricación y tratamiento térmico empleado.

POLÍMERO	COMPOSICIÓN				TEMPLE (°C)	CICLO DE LIOFILIZACIÓN (horas)	POROSIDAD (%)
	CANTIDAD (mg)	DISOLVENTE	CANTIDAD(ml)	CANTIDAD nHA (mg)			
PCL	302	1,4 dioxano	12,08	-	0-5	150	≥95 %
PCL	276	1,4 dioxano	11,04	-	-15	150	≥95 %
PCL	167	1,4 dioxano	6,68	-	-60	150	≥95 %
PCL	203	1,4 dioxano	8,12	-	0-5	174	≥95 %
		Agua(1%)	0,081				
PCL	197	1,4 dioxano	7,88	-	-15	174	≥95 %
		Agua(1%)	0,079				
PCL	153	1,4 dioxano	6,12	-	-60	174	≥95 %
		Agua(1%)	0,061				
PCL	199	1,4 dioxano	7,96	-	0-5	200	≥95 %
		Agua(2%)	0,159				
PCL	188	1,4 dioxano	7,52	-	-15	200	≥95 %
		Agua(2%)	0,150				
PCL	236	1,4 dioxano	9,44	-	-60	200	≥95 %
		Agua(2%)	0,189				
PCL	159	1,4 dioxano	6,36	-	0-5	120	≥95 %
		Agua(5%)	0,318				
PCL	211	1,4 dioxano	8,44	-	-15	120	≥95 %
		Agua(5%)	0,422				
PCL	150	1,4 dioxano	6	-	-60	120	≥95 %
		Agua(5%)	0,300				
PCL	161	1,4 dioxano	6,44	-	0-5	174	≥95 %
		Agua(10%)	0,644				
PCL	184	1,4 dioxano	7,36	-	-15	174	≥95 %
		Agua(10%)	0,736				
PCL	177	1,4 dioxano	7,08	-	-60	174	≥95 %
		Agua(10%)	0,708				

**Tabla 5.1.** Composición de los andamios fabricados.

## 5. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

POLÍMERO	COMPOSICIÓN				TEMPLE (°C)	CICLO DE LIOFILIZACIÓN (horas)	POROSIDAD (%)
	CANTIDAD (mg)	DISOLVENTE	CANTIDAD (mg)	CANTIDAD nHA (mg)			
PCL	154	Cloroformo	6,16	-	0-5	150	≤50 %
PCL	260	Cloroformo	10,4	-	-15	150	≤50 %
PCL	405	Cloroformo	16,2	-	-60	150	≤50 %
PCL	382	Cloroformo Agua(1%)	15,28 0,153	-	0-5	174	≤50 %
PCL	398	Cloroformo Agua(1%)	15,92 0,159	-	-15	174	≤50 %
PCL	376	Cloroformo Agua(1%)	15,04 0,150	-	-60	174	≤50 %
PCL	311	Cloroformo Agua(2%)	12,44 0,249	-	0-5	200	≤50 %
PCL	154	Cloroformo Agua(2%)	6,16 0,308	-	-15	200	≤50 %
PCL	167	Cloroformo Agua(2%)	6,68 0,134	-	-60	200	≤50 %
PCL	180	Cloroformo Agua(5%)	7,2 0,360	-	0-5	120	≤50 %
PCL	207	Cloroformo Agua(5%)	8,28 0,414	-	-15	120	≤50 %
PCL	175	Cloroformo Agua(5%)	7 0,350	-	-60	120	≤50 %
PCL	137	Cloroformo Agua(10%)	5,48 0,548	-	0-5	174	≤50 %
PCL	211	Cloroformo Agua(10%)	8,44 0,844	-	-15	174	≤50 %
PCL	153	Cloroformo Agua(10%)	6,12 0,612	-	-60	174	≤50 %

Continuación Tabla 5.1

## 5. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

POLÍMERO	COMPOSICIÓN				TEMPLE (°C)	CICLO DE LIOFILIZACIÓN (horas)	POROSIDAD (%)
	CANTIDAD (mg)	DISOLVENTE	CANTIDAD (mg)	CANTIDAD nHA (mg)			
PLLA	263	1,4 dioxano	10,52	-	0-5	150	≥98 %
PLLA	140	1,4 dioxano	5,6	-	-15	150	≥95 %
PLLA	128	1,4 dioxano	5,12	-	-60	150	≥90 %
PLLA	165	1,4 dioxano	6,6	-	0-5	174	≥98 %
		Agua(1%)	0,066				
PLLA	230	1,4 dioxano	9,2	-	-15	174	≥95 %
		Agua(1%)	0,092				
PLLA	129	1,4 dioxano	5,16	-	-60	174	≥90 %
		Agua(1%)	0,052				
PLLA	231	1,4 dioxano	9,24	-	0-5	200	≥98 %
		Agua(2%)	0,185				
PLLA	155	1,4 dioxano	6,2	-	-15	200	≥95 %
		Agua(2%)	0,124				
PLLA	175	1,4 dioxano	7	-	-60	200	≥90 %
		Agua(2%)	0,140				
PLLA	194	1,4 dioxano	7,76	-	0-5	120	≥98 %
		Agua(5%)	0,388				
PLLA	185	1,4 dioxano	7,4	-	-15	120	≥95 %
		Agua(5%)	0,370				
PLLA	126	1,4 dioxano	5,04	-	-60	120	≥90 %
		Agua(5%)	0,252				
PLLA	115	1,4 dioxano	4,6	-	0-5	174	≥98 %
		Agua(10%)	0,460				
PLLA	181	1,4 dioxano	7,24	-	-15	174	≥95 %
		Agua(10%)	0,724				
PLLA	402	1,4 dioxano	16,08	-	-60	174	≥90 %
		Agua(10%)	1,608				
PLLA	322	Cloroformo	12,88	-	0-5	150	≤50 %

Continuación Tabla 5.1

## 5. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

POLÍMERO	COMPOSICIÓN				TEMPLE (°C)	CICLO DE LIOFILIZACIÓN (horas)	POROSIDAD (%)
	CANTIDAD (mg)	DISOLVENTE	CANTIDAD (mg)	CANTIDAD nHA (mg)			
PLLA	155	Cloroformo	6,2	-	-15	150	≤50 %
PLLA	213	Cloroformo	8,52	-	-60	150	≤50 %
PLLA	171	Cloroformo Agua(1%)	6,84 0,068	-	0-5	174	≤50 %
PLLA	163	Cloroformo Agua(1%)	6,52 0,065	-	-15	174	≤50 %
PLLA	149	Cloroformo Agua(1%)	5,96 0,060	-	-60	174	≤50 %
PLLA	147	Cloroformo Agua(2%)	5,88 0,118	-	0-5	200	≤50 %
PLLA	151	Cloroformo Agua(2%)	6,04 0,121	-	-15	200	≤50 %
PLLA	133	Cloroformo Agua(2%)	5,32 0,106	-	-60	200	≤50 %
PLLA	401	Cloroformo Agua(5%)	16,04 0,802	-	0-5	120	≤50 %
PLLA	187	Cloroformo Agua(5%)	7,48 0,374	-	-15	120	≤50 %
PLLA	145	Cloroformo Agua(5%)	5,80 0,290	-	-60	120	≤50 %
PLLA	138	Cloroformo Agua(10%)	5,52 0,552	-	0-5	174	≤50 %
PLLA	174	Cloroformo Agua(10%)	6,96 0,696	-	-15	174	≤50 %
PLLA	113	Cloroformo Agua(10%)	4,52 0,452	-	-60	174	≤50 %
PCL	543	1,4 dioxano	21,72	-	-60	240	≥95 %

Continuación Tabla 5.1

POLÍMERO	COMPOSICIÓN				TEMPLE (°C)	CICLO DE LIOFILIZACIÓN (horas)	POROSIDAD (%)
	CANTIDAD (mg)	DISOLVENTE	CANTIDAD (mg)	CANTIDAD nHA (mg)			
PCL	542	1,4 dioxano	21,68	54,2(10%)	-60	240	≥95 %
PCL	573	1,4 dioxano	22,92	171,9(30%)	-60	240	≥95 %
PCL	611	1,4 dioxano	24,44	305,5(50%)	-60	240	≥95 %
PLLA	520	1,4 dioxano	20,80	-	-60	240	≥90 %
PLLA	571	1,4 dioxano	22,84	57,1(10%)	-60	240	≥90 %
PLLA	549	1,4 dioxano	21,96	164,7(30%)	-60	240	≥90 %
PLLA	576	1,4 dioxano	23,04	288(50%)	-60	240	≥90 %

*Continuación Tabla 5.1*

### 5.3. BIBLIOGRAFÍA.

[1] Schugens C, et al. "Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation", Journal of Biomedical Materials Research, 30,449-461, 1996.

[2] Schugens C., Maquet V., Grandfils C., Jerome R., Teyssie P., "Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation:1. Preparation of macroporous polylactide supports by solid-liquid phase separation", Polymer, 37, 1027-1038, 1996.

[3] Nam Y S, Park., "Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation", Journal of Biomedical Materials Research, 47, N1, 8-17, 1999.

[4] Hua F.J., Park T.G., Lee D.S., "A facile preparation of highly interconnected macroporous poly(D,L-lactic acid-co-glycolic)(PLGA) scaffolds by liquid-liquid phase separation of a PLGA-dioxane-water ternary system", Polymer, 44, 1911-1920, 2003.



## **6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



En este capítulo de la memoria se realiza una descripción y discusión de los resultados obtenidos. Para lo cual hemos dividido la presentación de los mismos en tres apartados.

En el primero de ellos estudiaremos la influencia de diversos factores, como el tipo de disolvente o el tratamiento térmico utilizado en la morfología final de los scaffolds fabricados. Para realizar los soportes porosos sometidos a estudio hemos utilizado la técnica de separación de fases inducida térmicamente (TIPS). De esta forma obtendremos las condiciones de fabricación óptimas para la realización de los mismos, que posteriormente analizaremos en el segundo y tercer apartado del capítulo.

El segundo apartado se centrará en el estudio de la degradación in vitro, en una solución tampón salina de pH 7,2 y a 37 °C, del sistema formado por el polímero PLLA usando como disolvente el 1,4 dioxano. Además en este sistema incorporaremos diferentes cantidades de partículas bioactivas de nanohidroxiapatita.

En el tercer apartado realizaremos una discusión de los principales resultados obtenidos en la degradación in vitro para el sistema PCL/nHA.

En la degradación in vitro analizaremos los principales resultados obtenidos de FTIR, DSC, SEM, porcentaje de la porosidad y propiedades mecánicas de las muestras analizadas.

## 6.1 MORFOLOGÍA Y PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS SISTEMAS PLLA Y PCL.

Las condiciones óptimas de fabricación de los scaffolds, para cada polímero estudiado, dependen del disolvente utilizado y de la temperatura de temple. El estudio de estas condiciones ha permitido obtener la mejor o la más adecuada morfología.

Los polímeros utilizados han sido la poli-L-lactida y la policaprolactona. Los disolventes que hemos elegido han sido tres: el 1,4 dioxano, el cloroformo y una mezcla de agua/ 1,4 dioxano. El agua la hemos añadido en diferentes proporciones siendo estas del 1, 2, 5 y 10% con respecto al 1,4 dioxano.

Para la fabricación de los scaffolds hemos utilizado la separación de fases inducida térmicamente (TIPS), con la que obtendremos un tamaño de poro idóneo en función del tratamiento de temple. Este se ha realizado a tres temperaturas diferentes: (0 – 5) °C, -15 °C y -60 °C.

La técnica TIPS se basa en la disolución de un polímero en un disolvente orgánico, para posteriormente enfriar esa solución, y por sublimación eliminar el disolvente. El espacio que inicialmente era ocupado por el disolvente se convertirá en los poros del scaffold fabricado, tras su eliminación [1, 2]. Como hemos explicado anteriormente, la técnica de fabricación de scaffolds TIPS se basa en la creación de dos fases dentro de la solución polimérica: una rica en polímero y otra pobre [3]. Dependiendo de la temperatura a la que ocurra esta separación de fases, será líquido-líquido o sólido-líquido. La separación de fases sólido-líquido ocurrirá cuando el solvente cristaliza al bajar la temperatura, expulsando al polímero del frente de cristalización, definiendo la progresión del

frente de cristalización del solvente la orientación de los poros. La separación de fases líquido-líquido tendrá lugar cuando la temperatura de cristalización del solvente sea más baja que la temperatura de separación de fases de la solución polimérica.

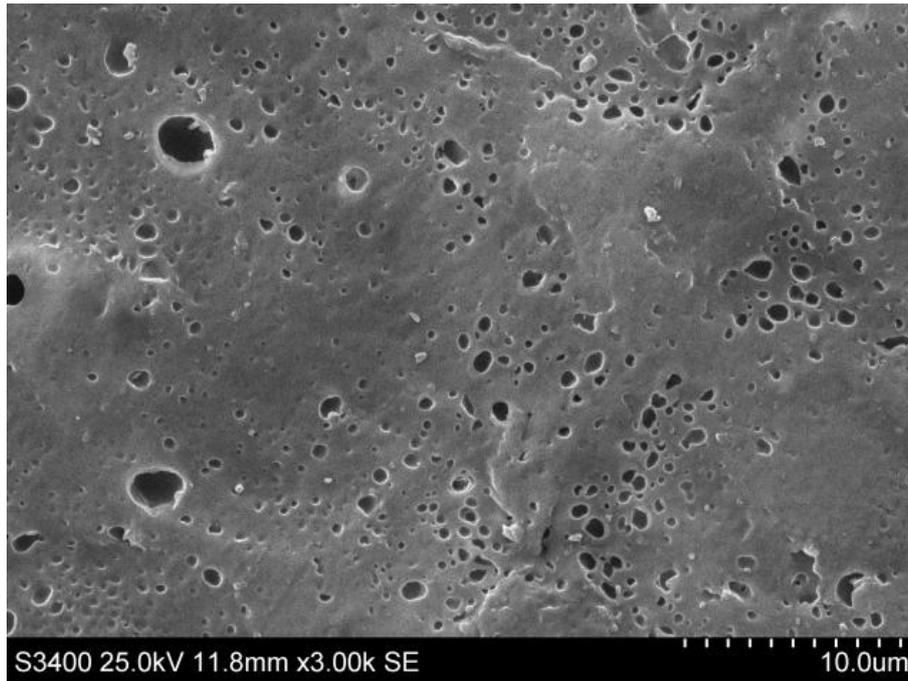
Esta separación de fases se puede dar de dos formas: entre la curva binodal y espinodal o por debajo de la curva espinodal [4]. La curva espinodal dividirá el diagrama de fases en la zona inestable y la zona metaestable, con lo que dependiendo del punto en el que ocurra tendremos dos tipos de separación de fases. Si este mecanismo ocurre entre la curva binodal y espinodal se producirá un fenómeno de nucleación y crecimiento, formando partículas más pequeñas, las cuales tendrán un área superficial más grande y por lo tanto serán más inestables. Éstas tenderán a unirse para formar partículas más grandes, que es lo que se conoce como fenómeno de coalescencia. Por debajo de la curva espinodal obtendremos una separación de fases líquido-líquido espontánea, obteniendo de esta forma una red interconectada de dos fases.

Mediante la técnica de TIPS de fabricación de scaffolds hemos obtenido scaffolds con una porosidad superior al 95 % [5], con una morfología tubular anisotrópica y una estructura con un alto nivel de interconexión [6]. Esta estructura facilitará el crecimiento celular y el transporte de nutrientes. Las superficies de los scaffolds obtenidos mediante esta técnica favorecerán el acceso, la proliferación y la diferenciación celular [7, 8]. Además, los scaffolds así fabricados eran homogéneos. Modificando diferentes parámetros termodinámicos y cinéticos es posible cambiar el tamaño de los poros y la morfología y orientación de los canales que conectan los mismos.

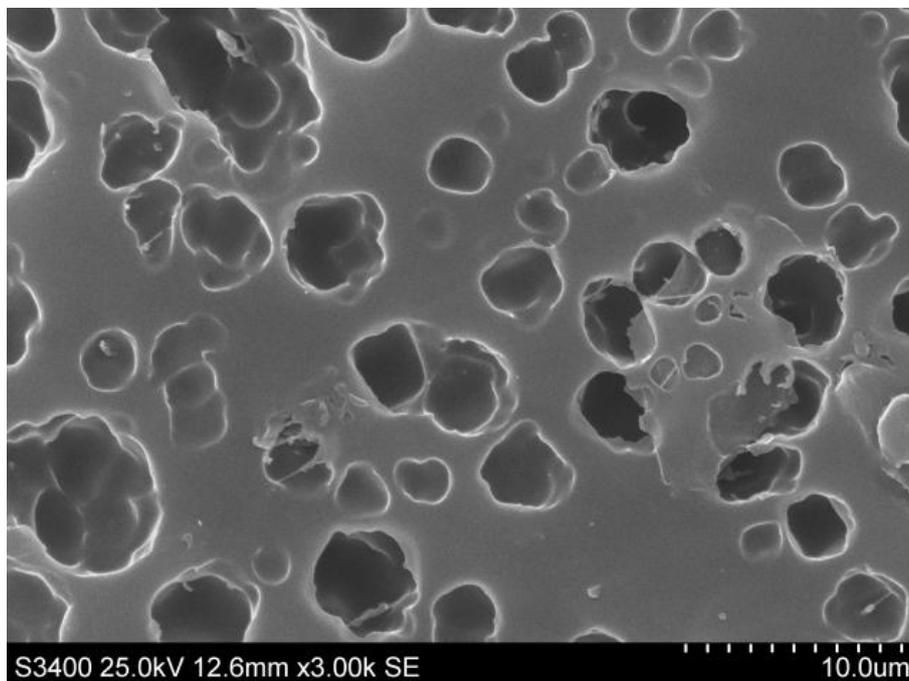
### 6.1.1. Influencia del disolvente.

Para la realización de este trabajo hemos analizado la fabricación con tres disolventes: el 1,4 dioxano, el cloroformo y el agua. Las estructuras tridimensionales obtenidas utilizando cloroformo como disolvente, presentan una morfología y tamaño de poro irregular, con un porcentaje de porosidad menor del 50 %, mostrando un aspecto de film poroso. Esto es debido a la baja temperatura de congelación del cloroformo ( $-63.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), y dado que la temperatura mínima que alcanzará la disolución en la etapa de liofilización es de  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , no llegaremos a congelar el cloroformo presente en la disolución, y en el proceso de liofilización, en lugar de sublimar el cloroformo lo evaporaremos; de ahí la forma de film que adquiere, lo que se puede apreciar en las Figuras 6.1 y 6.2.

Si utilizamos el disolvente 1,4 dioxano no ocurre lo mismo, ya que debido a que su temperatura de solidificación es más alta,  $11.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se congelará totalmente, y posteriormente sublimará. De esta forma, obtendremos una mayor porosidad y uniformidad en el tamaño del poro, además de una buena interconexión entre los mismos [9, 10], independientemente del polímero utilizado, como se puede apreciar en las Figuras 6.3 y 6.4. Ésta es de gran importancia debido a que la distribución de nutrientes y vascularización del tejido formado dependerán del mismo.



**Figura 6.1.** Micrografía de scaffold preparado con PCL y cloroformo como disolvente, templado a  $-60^{\circ}\text{C}$ .

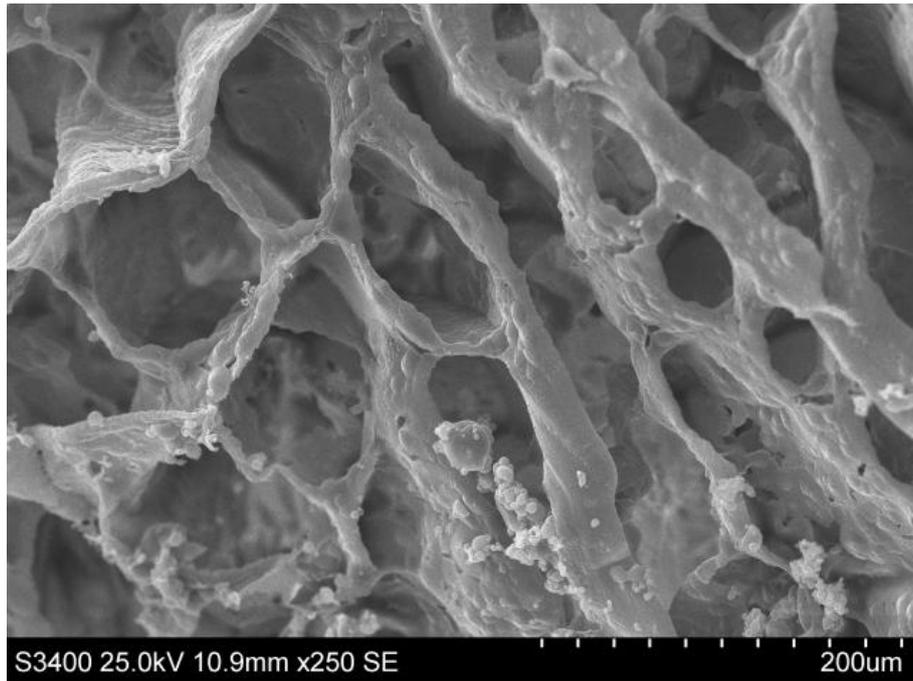


**Figura 6.2.** Micrografía de scaffold preparado con PCL y cloroformo como disolvente y templado a  $-60^{\circ}\text{C}$ .

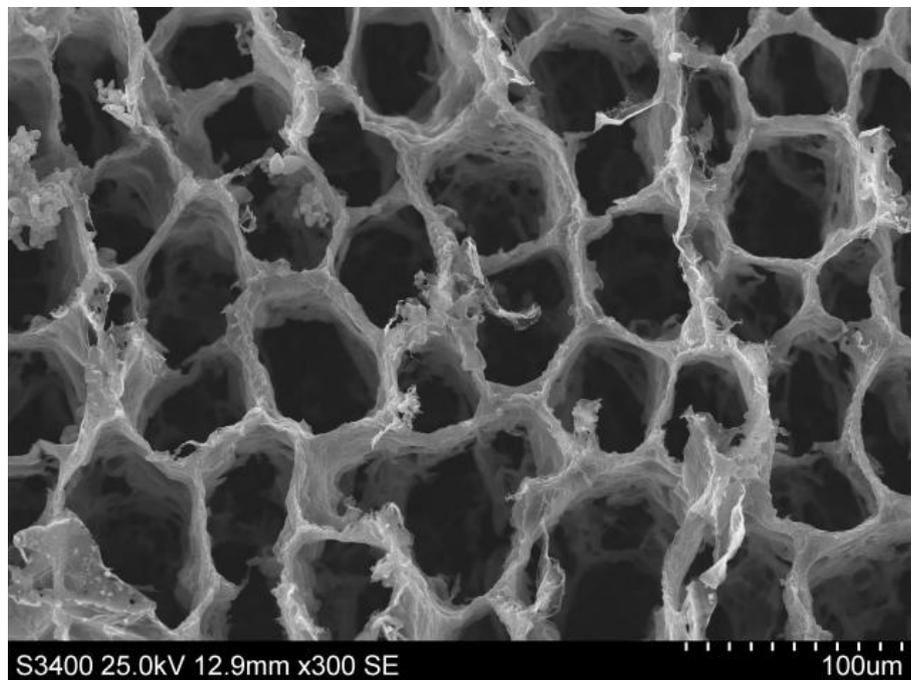
La adición de agua al disolvente tiene una gran influencia en la morfología de los andamios y en sus propiedades mecánicas. Cuando el disolvente utilizado es una mezcla de agua y 1,4 dioxano en cantidades pequeñas de agua, entre el 1 y el 10 % con respecto al volumen de la solución polimérica, los soportes porosos presentan una menor cohesión en su estructura.

Las micrografías obtenidas en el microscopio electrónico de barrido (SEM) muestran la presencia de poros rotos en las mismas, además de una cohesión deficiente entre las distintas capas de andamios, como podemos apreciar en las Figuras 6.5 a 6.10. Esto ocurre debido al hecho de que cuando la cantidad de agua (no solvente) aumenta, disminuye la interacción polímero-diluyente, induciendo la formación de una fase pobre en polímero y favoreciendo la separación de fases líquido-líquido, debido a la reducción de la solubilidad en la mezcla de disolvente/ no solvente [11, 12]. Esto hace que los scaffolds así preparados sean inadecuados para el cultivo celular.

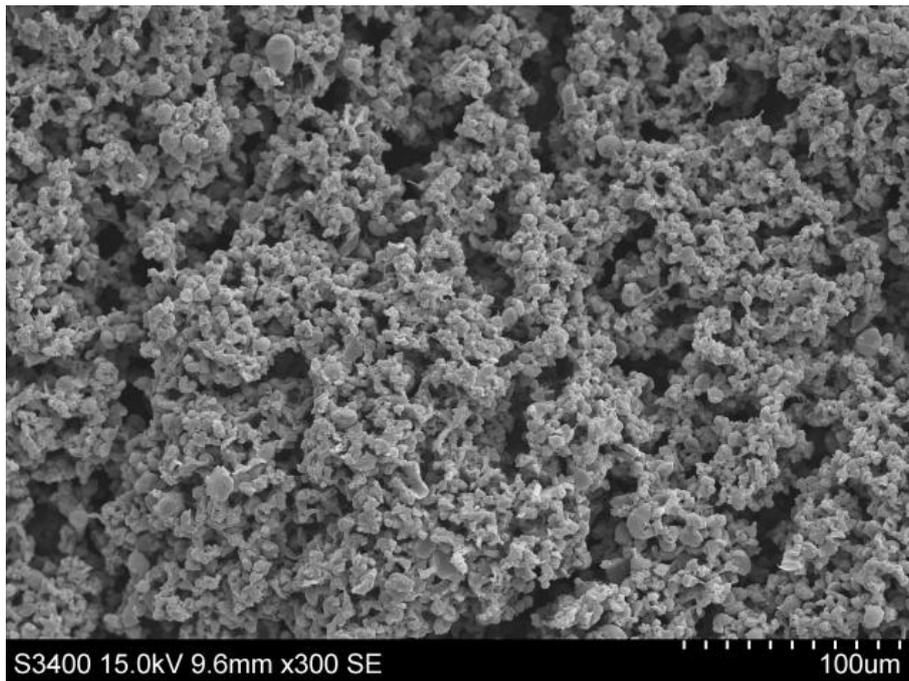
Sin embargo, otros autores [13] han encontrado que la presencia de agua favorece la creación de un sistema dual de poros, con tamaño de poro de 200-300 micrómetros los poros grandes, y de 5 - 20 micrómetros los pequeños. Con la técnica utilizada para la realización de los scaffolds sometidos a estudio, la separación de fases inducida térmicamente, no es necesaria ninguna actuación para conseguirlo, como podemos observar en las Figuras 6.11 y 6.12.



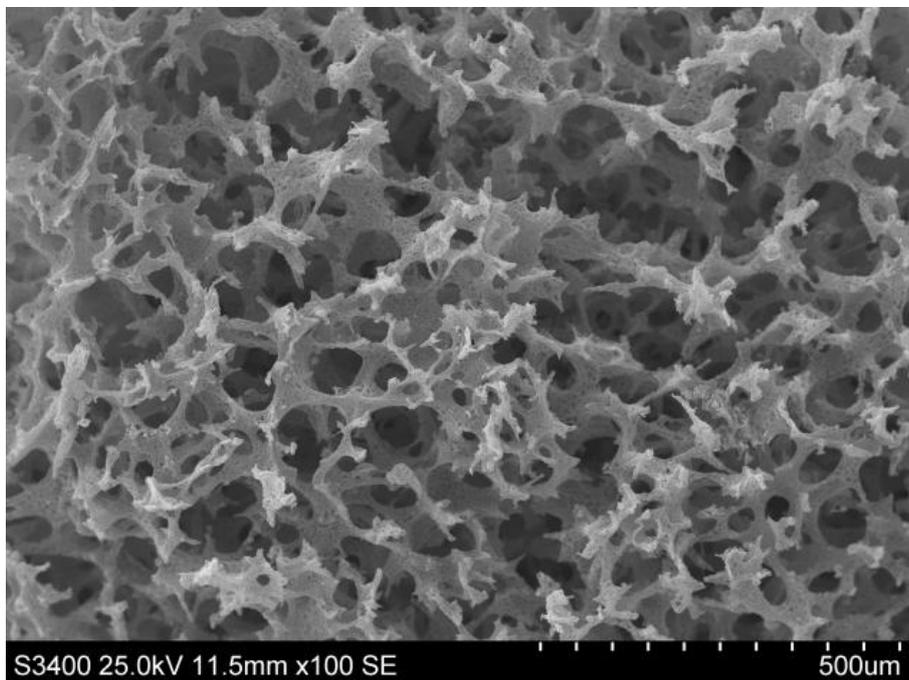
**Figura 6.3.** Micrografía SEM de scaffold preparado con PLLA y 1,4 dioxano templado a  $-60^{\circ}\text{C}$ .



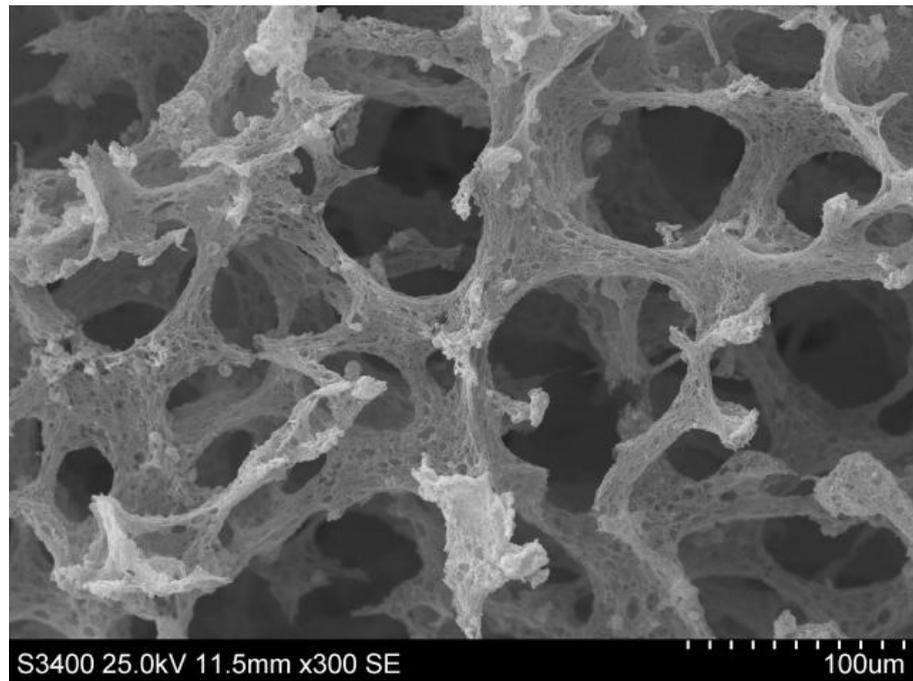
**Figura 6.4.** Micrografía SEM de scaffold preparado con PCL y 1,4 dioxano templado a  $-60^{\circ}\text{C}$ .



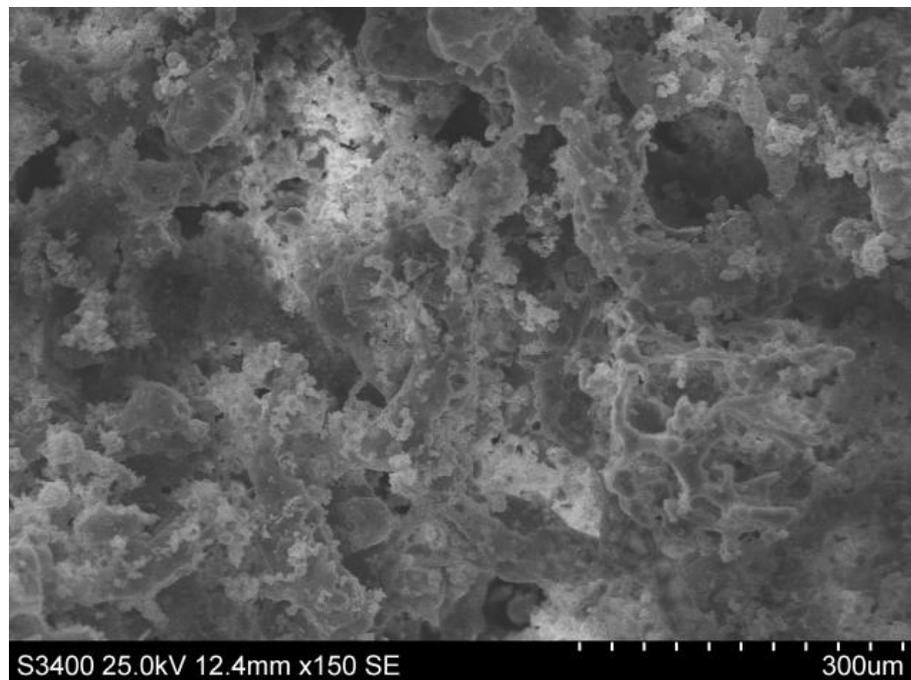
**Figura 6.5.** Micrografía SEM de scaffold de PLLA, templado a  $-60^{\circ}\text{C}$  y fabricado en una proporción (v/v) de 1,4 dioxano y agua 98:2.



**Figura 6.6.** Micrografía SEM de scaffold realizado con PLLA, templado a  $-60^{\circ}\text{C}$  y con una proporción (v/v) de 1,4 dioxano y agua 95:5.



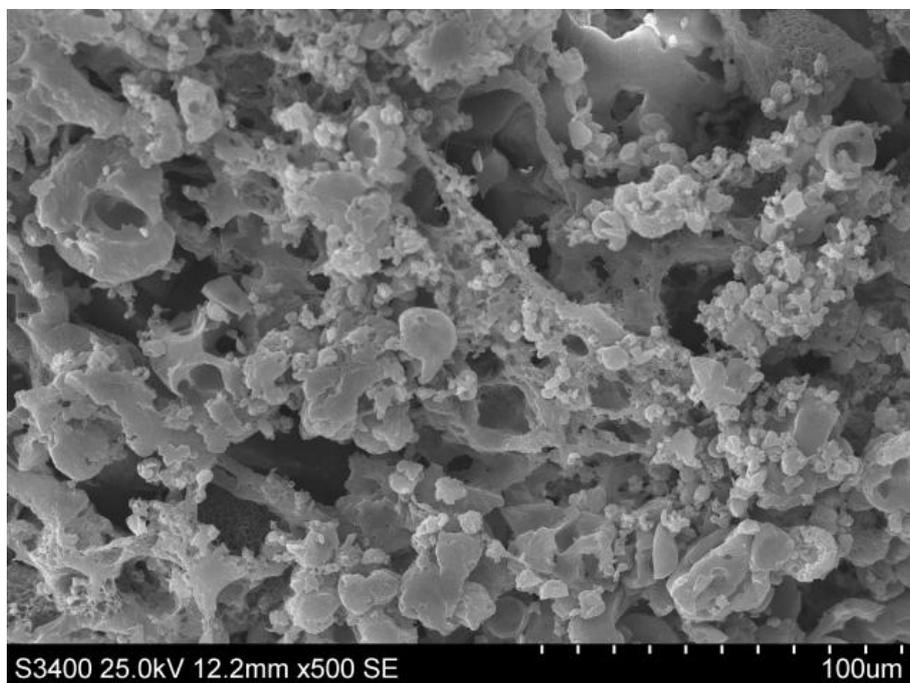
**Figura 6.7.** Micrografía SEM de scaffold realizado con PLLA, templado a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  y con una proporción (v/v) de 1,4 dioxano y agua 95:5.



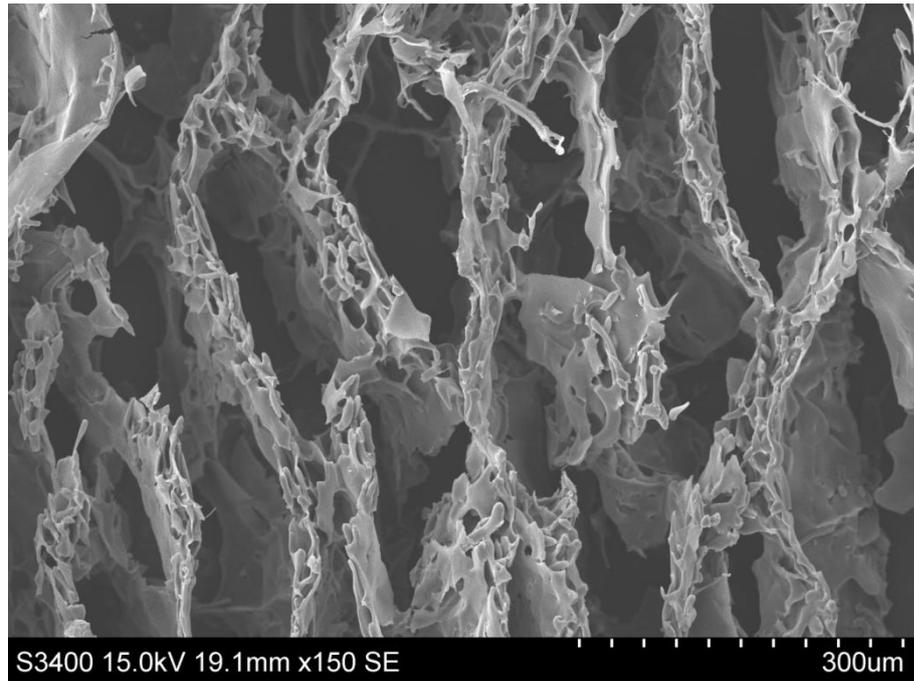
**Figura 6.8.** Micrografía SEM de scaffold realizado con PLLA, templado a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  y con una proporción (v/v) de 1,4 dioxano y agua 90:10.



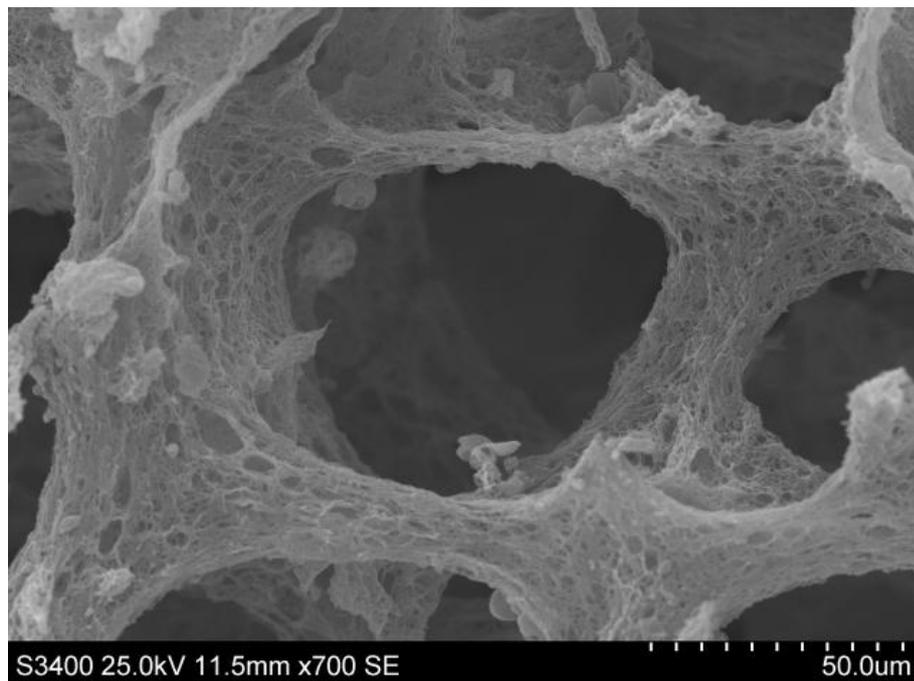
**Figura 6.9.** Micrografía SEM de scaffold realizado con PCL, templado a  $-60^{\circ}\text{C}$ , y con una proporción (v/v) de 1,4 dioxano y agua 99:1.



**Figure 6.10.** Micrografía SEM de scaffold realizado con PCL, templado a  $-60^{\circ}\text{C}$  y con una proporción (v/v) de 1,4 dioxano y agua 90:10.



**Figure 6.11.** Micrografía SEM de scaffold de PLLA preparado con el disolvente 1,4 dioxano y templado a 0 °C.



**Figura6.12.** Micrografía SEM de scaffold de PLLA con una proporción (v/v) de disolvente 1,4 dioxano/ agua de 95:5 y templado a - 60 °C.

### 6.1.2. Influencia de los tratamientos térmicos.

El tratamiento térmico que utilicemos durante la fabricación de los soportes porosos tendrá una gran influencia en la morfología final del mismo [14]. En nuestro caso, hemos aplicado un temple con tres temperaturas distintas:  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en el intervalo  $(0 - 5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Este tratamiento térmico lo aplicaremos antes de realizar el proceso de liofilización, provocando una separación de fases diferente según el mismo.

Los resultados obtenidos para los dos polímeros estudiados se pueden ver en la Tabla 6.1. En esta tabla podemos observar que los scaffolds realizados con poli-L-lactida presentan un tamaño de poro mayor que los realizados con policaprolactona a cualquier temperatura de temple. Esto es muy adecuado, ya que hay aplicaciones, como los implantes para reparación ósea [15, 16] en los cuales es más apropiado utilizar un tamaño de poro menor para mejorar las propiedades mecánicas de los scaffolds. Como se puede observar en las Figuras 6.13 a 6.18, la porosidad obtenida es mayor del 95 %, con una buena interconectividad entre sus poros, para ambos polímeros estudiados.

En la Tabla 6.1, podemos observar, como la porosidad de los diferentes scaffolds realizados mediante el método de liofilización, depende de la velocidad de enfriamiento de la solución polimérica. Un temple rápido, es decir, a muy baja temperatura, produce un tamaño de poro reducido. Esto es debido a que en el caso de una velocidad de enfriamiento elevada, las fases formadas se congelan rápidamente, formándose de esta forma poros de pequeño tamaño. Si por el contrario la velocidad de enfriamiento es más lenta, es decir, a mayor temperatura, aparece el fenómeno de coalescencia, reduciendo la energía interfacial y produciéndose poros más grandes. Los scaffolds con tamaño de poro

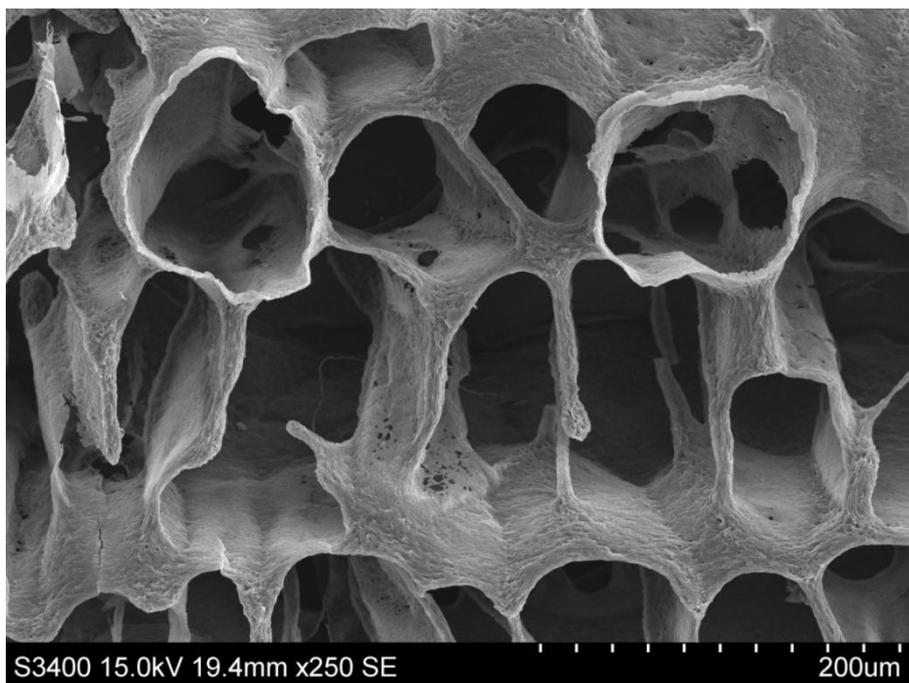
mayor son los templados a 0 °C.

T <sup>a</sup> de temple (°C)		0-5	-15	-60
PLLA	( $\mu\text{m}$ )	250-300	50-100	70-120
	% P	$\geq 98$	$\geq 95$	$\geq 90$
PCL	( $\mu\text{m}$ )	50-100	5-20	20-50
	% P	$\geq 95$	$\geq 95$	$\geq 95$

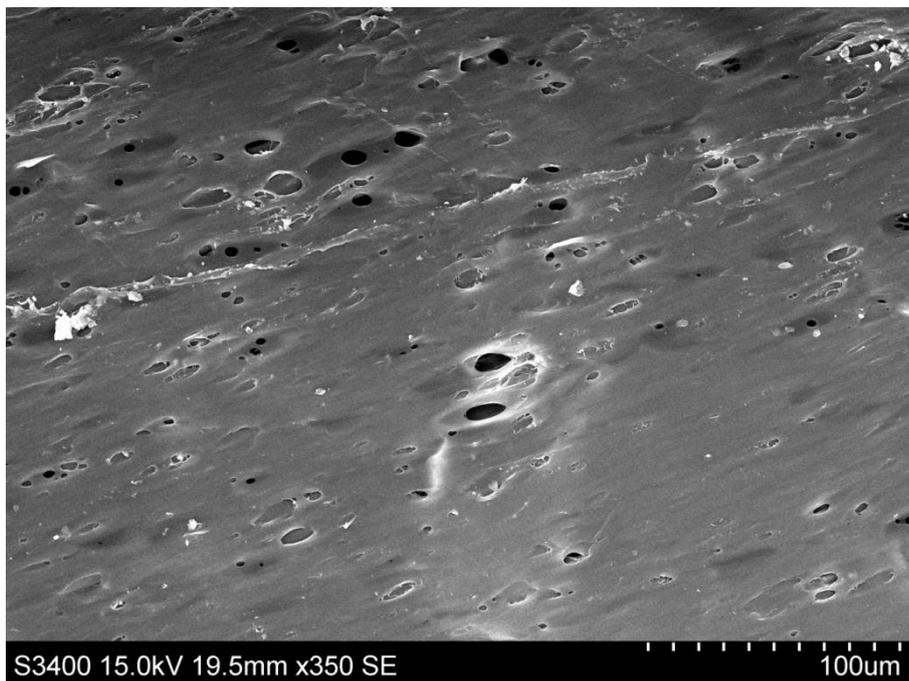
**Tabla 6.1.** Tamaño de poro y porosidad de scaffolds de PLLA y PCL en función del tratamiento térmico.

La temperatura de temple también condiciona la cristalización del disolvente [17]. Cuando esta es baja, el disolvente cristalizará muy rápido, produciéndose una separación de fases sólido-líquido. Los scaffolds obtenidos con una baja temperatura de temple disponen de una morfología tubular muy anisotrópica, con una estructura interna similar a una escalera. Las cavidades son paralelas a la dirección de solidificación con divisiones repetitivas. La progresión del frente de solidificación del disolvente define la principal orientación de los poros, siendo los ejes largos paralelos a la dirección de enfriamiento, como se puede observar en la Figura 6.11.

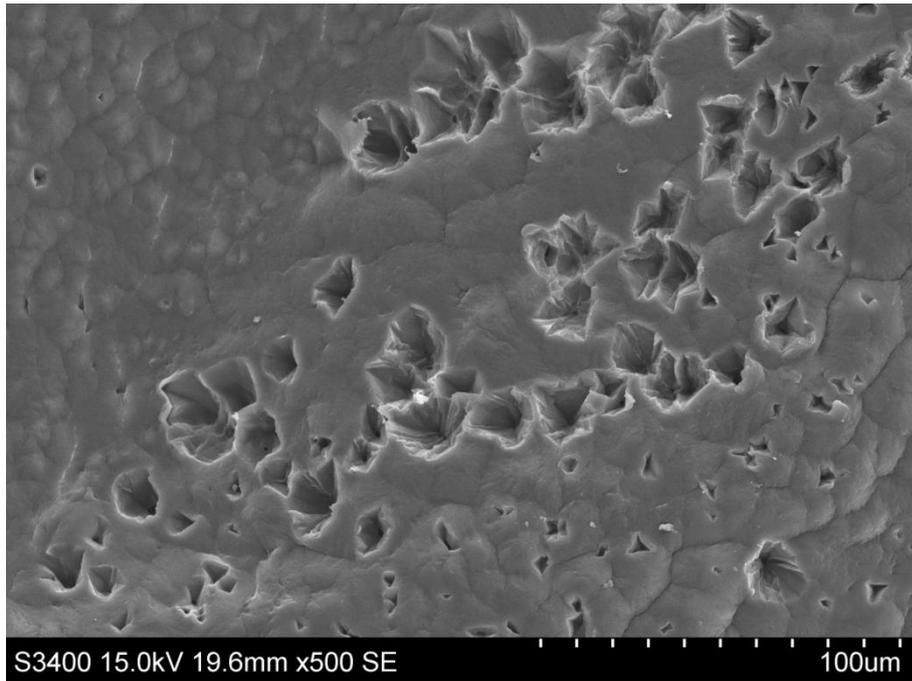
Además las distintas propiedades de los scaffolds tienen una relación directa con la historia térmica de los mismos [18]. Por el contrario, si la temperatura de temple es próxima a la de cristalización del disolvente, la cristalización será más lenta, favoreciendo la separación de fases líquido-líquido.



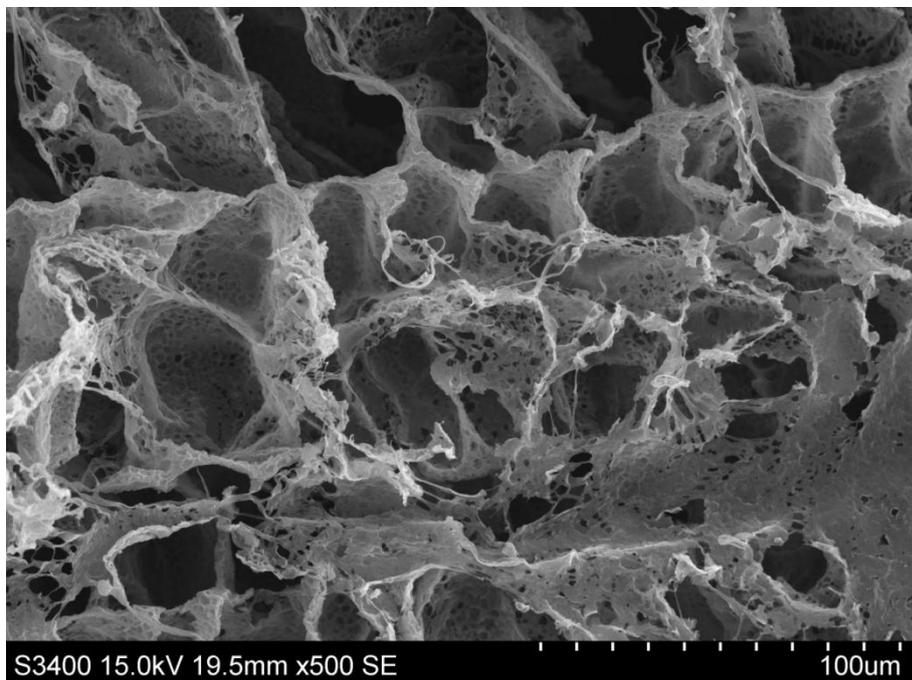
**Figura 6.13.** Micrografía SEM de scaffold de PLLA, templado a  $-15^{\circ}\text{C}$  y con 1,4 dioxano como disolvente.



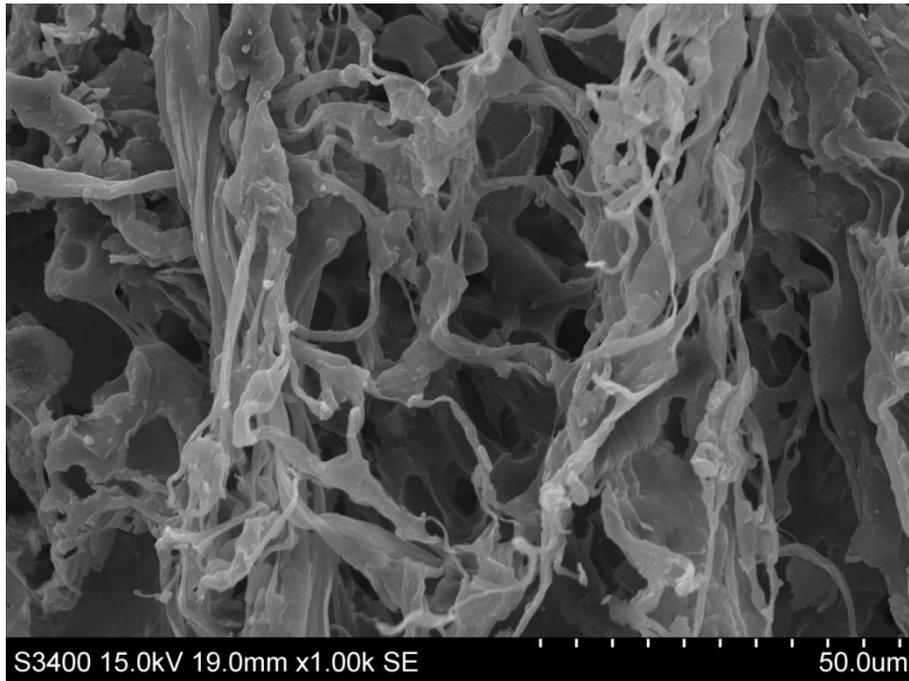
**Figura 6.14.** Micrografía SEM de scaffold de PLLA, templado a  $0^{\circ}\text{C}$  y con cloroformo como disolvente.



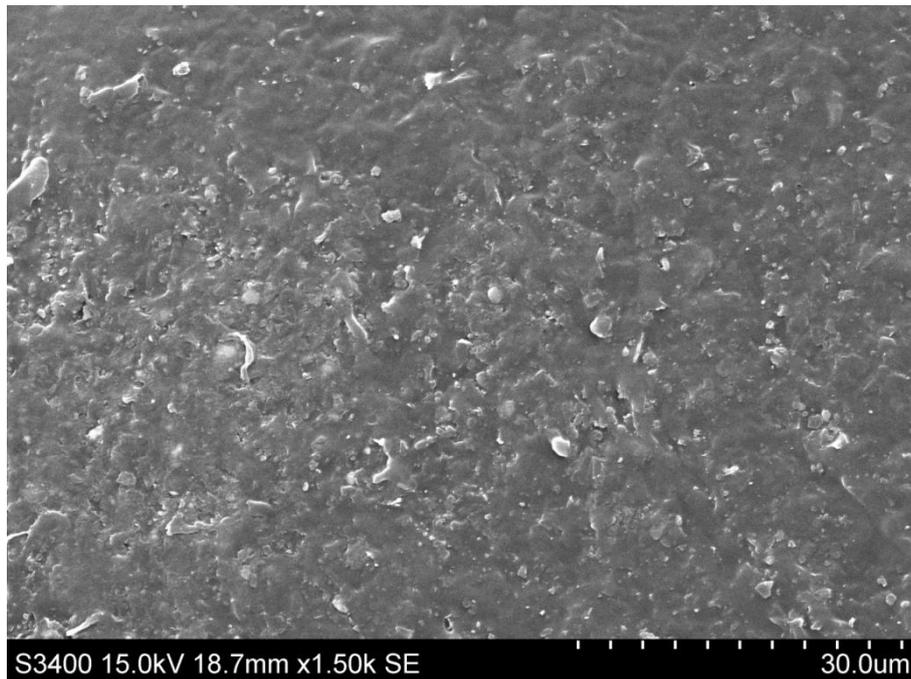
**Figura 6.15.** Micrografía SEM de scaffold de PLLA, templado a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y con cloroformo como disolvente.



**Figura 6.16.** Micrografía SEM de scaffold de PCL, templado a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  y con 1,4 dioxano como disolvente.



**Figura 6.17.** Micrografía SEM de scaffold de PCL templado a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y con 1,4 dioxano como disolvente.



**Figura 6.18.** Micrografía SEM de scaffold de PCL templado a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y con cloroformo como disolvente.

Si esta ocurre entre la curva binodal y espinodal del diagrama de fases, la separación de fases líquido-líquido se producirá mediante un mecanismo de nucleación y crecimiento, lo que da lugar a la obtención de una estructura generalmente dispersa.

En cambio, si la separación de fases tiene lugar por debajo de la curva espinodal, la solución polimérica es propensa a una separación de fases líquido-líquido espontánea, con la aparición de una red interconectada de poros en la estructura polimérica como se puede apreciar en las Figuras 6.11 y 6.12, es decir, se forman poros en las paredes de los macroporos.

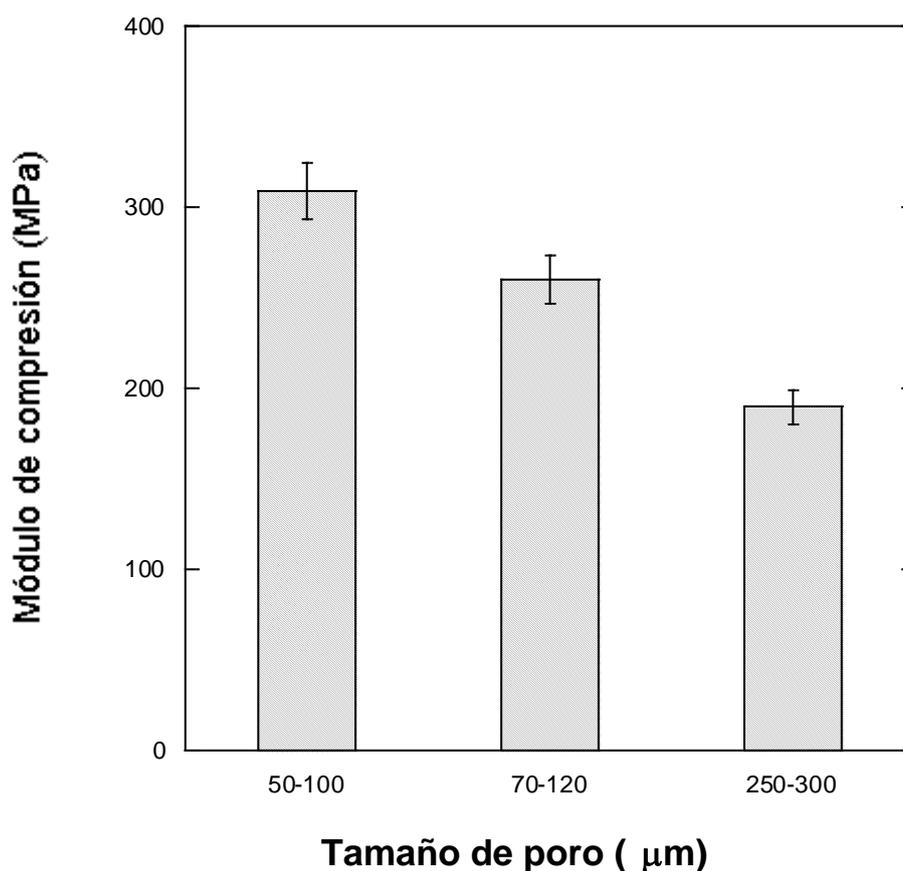
### **6.1.3. Propiedades mecánicas.**

En los scaffolds fabricados mediante la técnica TIPS, conseguiremos la formación de una red porosa, con una buena interconexión entre sus poros [19], facilitando de esta forma, la llegada de nutrientes a todas las células del sistema. La obtención de las propiedades mecánicas adecuadas en los scaffolds [20] es, probablemente, el requerimiento más difícil de obtener en los mismos, ya que deben soportar las necesidades mecánicas del tejido dañado durante el proceso de regeneración del mismo, lo que implica que las propiedades y el mecanismo de degradación del soporte poroso deben funcionar perfectamente [21], sincronizándose la formación del nuevo tejido con la degradación del mismo [22, 23].

Los ensayos para la obtención de las propiedades mecánicas de los soportes porosos fabricados, fueron realizados usando una máquina universal de ensayos (Instron, modelo 4502 UK).

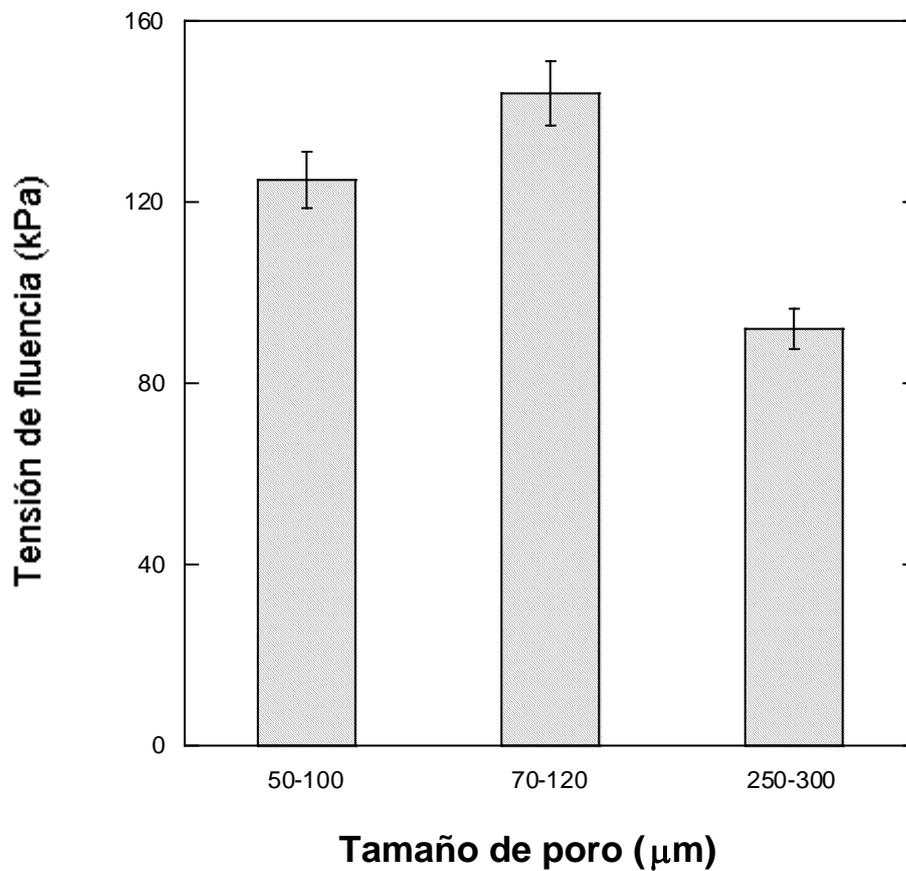
Hemos evaluado las propiedades mecánicas de los scaffolds realizados con PLLA y PCL con tres tamaños de poro diferente. Todos los scaffolds estudiados disponían de una porosidad superior al 90 %.

En las Figuras 6.19 a 6.22 podemos observar como el módulo de compresión y el límite de fluencia dependen del tamaño de poro para ambos polímeros estudiados.



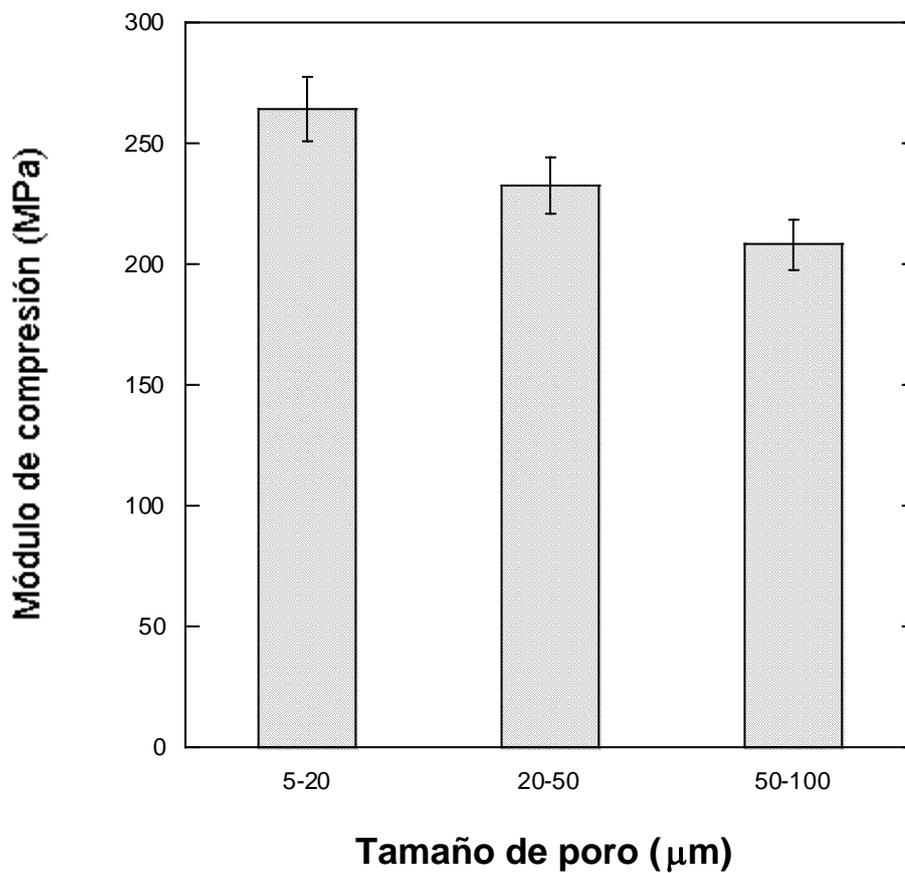
**Figura 6.19.** Módulo de compresión de scaffolds de PLLA, preparados con 1,4 dioxano como disolvente, para distintos tamaños de poro.

Las peores propiedades mecánicas de los scaffolds se obtuvieron para los soportes de mayor tamaño de poro debido al reducido contenido de polímero, resultados que coinciden con los obtenidos por otros investigadores [24].



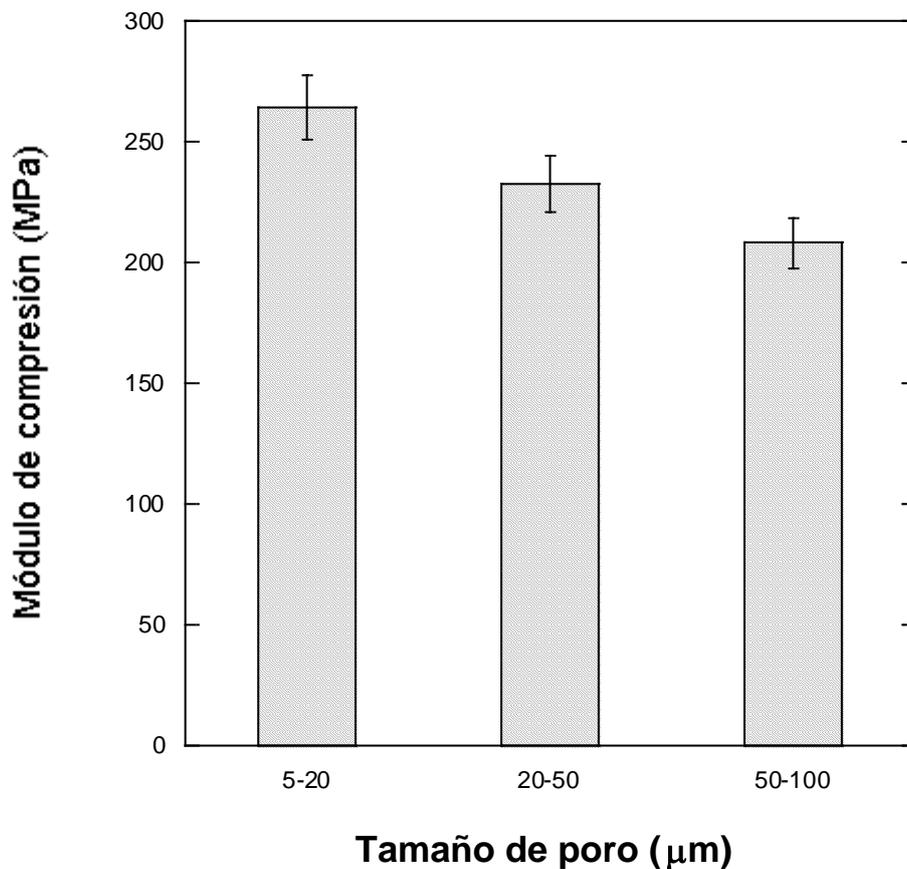
**Figura 6.20.** Tensión de fluencia de scaffold de PLLA, preparados con 1,4 dioxano como disolvente, para distintos tamaños de poro.

Para los dos polímeros estudiados, observamos que las propiedades mecánicas se reducen a medida que el tamaño del poro aumenta. También podemos observar que el PLLA, que posee poros mayores que el PCL, tiene mejores propiedades mecánicas.



**Figura 6.21.** Módulo de compresión de scaffolds de PCL, preparados con 1,4 dioxano como disolvente, para distintos tamaños de poro.

Este comportamiento es debido a la cristalinidad del polímero, ya que los scaffolds producidos con polímeros semicristalinos son más porosos (debido a su mayor organización estructural), con una densidad menor y diferente morfología del poro, dependiendo sus propiedades mecánicas fuertemente de su cristalinidad.

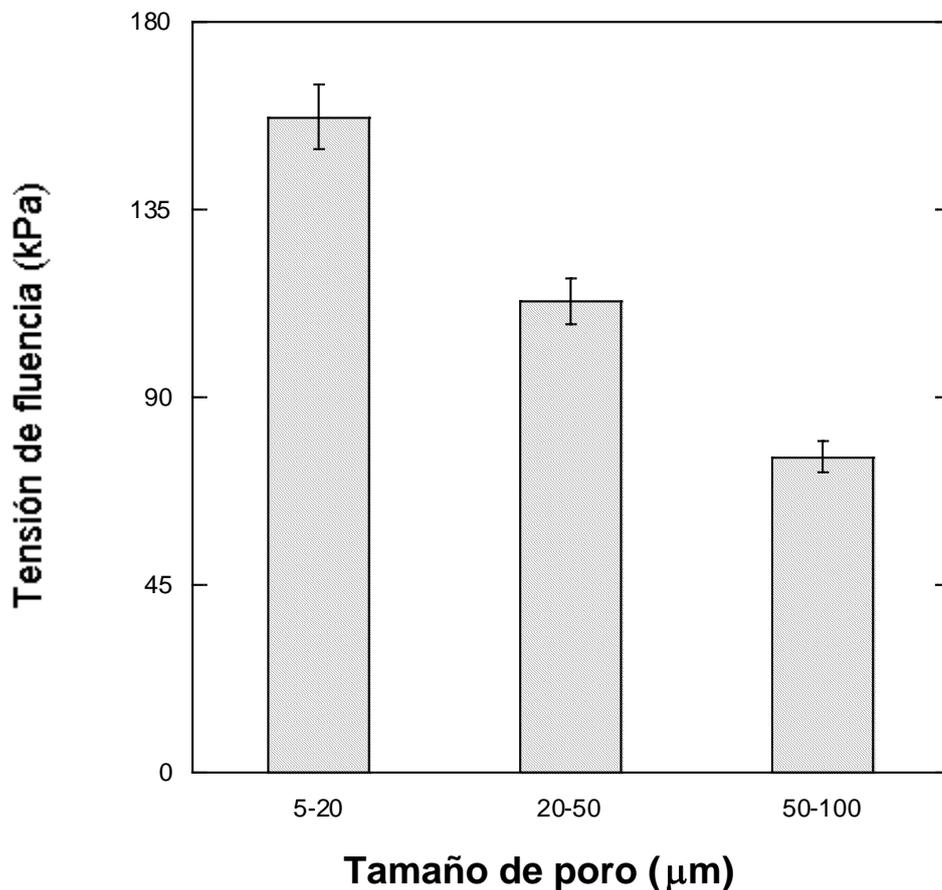


**Figura 6.21.** Módulo de compresión de scaffolds de PCL, preparados con 1,4 dioxano como disolvente, para distintos tamaños de poro.

En síntesis, podemos afirmar que scaffolds realizados con dos polímeros diferentes, con un tamaño de poro parecido, implicaría que han seguido el mismo

proceso a la hora de realizar la separación de fases (sólido-líquido o líquido-líquido).

Para la producción de scaffolds para regeneración ósea, necesitaremos unas propiedades mecánicas óptimas, pero también debemos disponer de un tamaño de poro y morfología adecuados para permitir una buena adhesión y proliferación celular bajo carga, que es cuando mayores problemas pueden surgir en el transporte de nutrientes [25].



**Figura 6.22.** Tensión de fluencia de scaffolds de PCL, preparados con 1,4 dioxano como disolvente, para distintos tamaños de poro.

## 6.2. SISTEMA PLLA.

En este capítulo vamos a analizar los resultados obtenidos en la degradación de los scaffolds realizados con PLLA, utilizando 1,4 dioxano como disolvente, y partículas bioactivas de nHA en una proporción de 0, 10, 30 y 50 % del total de la masa del polímero.

El PLLA es un polímero hidrosoluble, biodegradable y biocompatible. Su degradación tiene lugar mediante la ruptura aleatoria por hidrólisis no enzimática [26-28], también denominada desesterificación hidrolítica [29, 30], de los enlaces éster situados en la cadena principal. Estos enlaces al romperse generan grupos de ácido láctico, los cuales, a su vez, autocatalíticamente, aceleran la reacción de degradación. El ácido láctico es un producto intermedio natural en el metabolismo de los carbohidratos presente en el cuerpo humano, que es fisiológicamente eliminado por vía natural [31-33].

La degradación del PLLA sigue el perfil de degradación general en dos etapas típicas de los poliésteres alifáticos bioabsorbibles semicristalinos [34, 35]. La primera etapa comienza con la difusión del agua en las zonas amorfas lo que da lugar a la escisión hidrolítica aleatoria de los enlaces éster [36]. La segunda etapa tiene lugar cuando han sido degradadas las zonas amorfas. Los trabajos experimentales realizados por otros autores [37-39] demuestran que la degradación del PLLA tiene lugar de forma más rápida en el centro que en la superficie del polímero, debido a que los oligómeros producidos cerca de la superficie pueden escapar, mientras que en el centro del polímero no pueden difundirse fuera del mismo. Este proceso es más evidente cuando los poros y los canales de comunicación de los scaffolds son muy grandes y se conoce como degradación heterogénea o mecanismo de autocatálisis [40]. Esto se traduce en

una acidez interna superior, con grupos carboxilos terminales, y una diferencia en la velocidad de degradación entre el interior y la superficie del mismo. El polímero retiene su volumen durante un tiempo de degradación y se observa una pérdida de peso molecular y propiedades mecánicas, para acabar con una reducción de la masa del mismo [41]. Esta degradación heterogénea se da en lactidas y glicolidas. Sin embargo, el grado en el que se produce la degradación depende de la morfología, cristalinidad, etc.

Hay varios aspectos que influirán en la degradación de los scaffolds. Entre estos se encuentran el balance de hidroficidad/ hidrofobicidad y la cristalinidad del mismo [42, 43]. También influirán la porosidad y morfología del scaffold [44], ya que la facilidad que tenga el agua para acceder al interior del polímero será importante [45, 46]. Además, su degradación también se verá afectada por el método de fabricación que se utilice. El peso molecular de las cadenas del polímero también tiene su influencia en la degradación del mismo.

El proceso de degradación de los scaffolds sometidos a estudio lo realizaremos introduciendo las muestras en una solución tampón salina (PBS), con un pH de 7.2, a una temperatura de 37 °C. Una vez que las muestras estén introducidas en dicha solución, sacaremos las mismas tras 1, 2, 3, 4, 6 y 8 semanas de permanencia en la solución fisiológica simulada. Tras esto realizaremos las comprobaciones y mediciones de las diferentes características y propiedades y estudiaremos como han variado las mismas en el período de degradación estudiado. Con la medición de las propiedades de los scaffolds en cada etapa de la degradación, comprobaremos si estos se pueden utilizar como estructura momentánea del tejido a reemplazar, mientras éste se desarrolle, ya

que tanto las propiedades del scaffold, así como su tiempo de degradación deben ser las idóneas para la formación del tejido a sustituir.

### **6.2.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).**

La degradación del PLLA cristalino ocurre mediante la hidrólisis aleatoria de los enlaces éster que se encuentran en las cadenas de polímero, para continuar después con una degradación total del polímero. La primera etapa de la degradación comienza con la difusión de agua en la región amorfa, iniciando de esta forma, la escisión hidrolítica de los enlaces éster. La segunda etapa de la degradación tiene lugar cuando la mayoría de enlaces en la región amorfa se han roto, comenzando entonces la degradación en la zona cristalina [47].

Los segmentos de las macromoléculas con un empaquetamiento menos rígido (regiones amorfas) disponen de más libertad de movimiento, por lo que son más vulnerables al ataque de las moléculas de agua, razón por la cual se degrada primeramente la región amorfa, para pasar posteriormente a la cristalina. La degradación de la parte amorfa y la escisión de las cadenas producen cadenas macromoleculares más cortas, que se pueden empaquetar más fácilmente, provocando un aumento de la cristalinidad del material polimérico restante, impulsando de esta forma, una nueva reorganización de los finales de las cadenas. Este comportamiento lo podemos ver en las Tablas 6.2 y 6.3. En la tabla 6.2 observamos las entalpías de fusión de cada una de las muestras analizadas. Conociendo éstas, podemos calcular el tanto por ciento de cristalinidad de cada una de las muestras (Tabla 6.3), sabiendo que la entalpía de fusión del PLLA 100 % cristalino es de 93 J/ g [48].

Tiempo de degradación (semanas)	$\Delta H_m$ (J/g)	$\Delta H_m$ (J/g)	$\Delta H_m$ (J/g)	$\Delta H_m$ (J/g)
	PLLA	PLLA/ 10% nHA	PLLA/ 30% nHA	PLLA/ 50% nHA
<b>0</b>	41.8	33.3	16.9	23.0
<b>1</b>	35.3	31.1	30.8	21.5
<b>2</b>	37.6	31.2	31.4	23.1
<b>3</b>	37.7	32.5	29.6	23.4
<b>4</b>	40.0	33.6	31.6	19.6
<b>6</b>	42.1	34.2	35.5	26.3
<b>8</b>	45.3	34.3	33.5	26.9

**Tabla 6.2.** Entalpías de fusión  $\Delta H_m$  (J/g) de los scaffolds de PLLA/ nHA en función del tiempo de degradación.

Tiempo de degradación (semanas)	$X_c$ (%)	$X_c$ (%)	$X_c$ (%)	$X_c$ (%)
	PLLA	PLLA/ 10% nHA	PLLA/ 30% nHA	PLLA/ 50% nHA
<b>0</b>	45.0	35.8	18.2	24.8
<b>1</b>	38.0	33.4	33.1	23.1
<b>2</b>	40.4	33.6	33.7	24.9
<b>3</b>	40.5	34.9	31.8	25.2
<b>4</b>	43.0	36.1	34.0	21.1
<b>6</b>	45.2	36.8	38.1	28.3
<b>8</b>	48.7	39.9	36.0	28.9

**Tabla 6.3.** Cristalinidad  $X_c$  (%) de los scaffolds de PLLA/ nHA en función del tiempo de degradación.

En las tablas 6.2 y 6.3 vemos que el porcentaje de cristalinidad ( $X_c$  %) y las entalpías de fusión ( $\Delta H_m$ ) aumentan aproximadamente un 10% en todas las muestras estudiadas [49, 50].

Como hemos mencionado anteriormente, debido a la rotura de enlaces de las partes amorfas de las cadenas poliméricas, éstas pueden reorganizarse contrarrestando los efectos de la nanohidroxiapatita, que favorece la rigidez de las cadenas poliméricas, produciendo una elevación considerable de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), como podemos ver en la Tabla 6.4. Este resultado ha sido observado por otros autores [51]. Como era de esperar, en la Tabla 6.5 podemos ver la ausencia de cambios significativos en la temperatura de fusión del polímero.

Tiempo de degradación (semanas)	$T_g(^{\circ}\text{C})$	$T_g(^{\circ}\text{C})$	$T_g(^{\circ}\text{C})$	$T_g(^{\circ}\text{C})$
	PLLA	PLLA/ 10% nHA	PLLA/ 30% nHA	PLLA/ 50% nHA
<b>0</b>	44.5	51.9	43.7	56.3
<b>1</b>	48.5	62.6	65.3	59.4
<b>2</b>	65.2	63.0	66.2	60.5
<b>3</b>	52.3	63.9	67.2	61.1
<b>4</b>	67.4	65.3	67.4	63.1
<b>6</b>	68.2	65.7	69.5	64.1
<b>8</b>	68.5	67.6	69.5	64.8

**Tabla 6.4.** Temperatura de transición vítrea  $T_g$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) de los scaffolds de PLLA/nHA en función del tiempo de degradación.

En resumen, las muestras con mayor contenido de partículas de nHA disponen de menor cristalinidad y entalpías de fusión. Esto es debido a que las partículas de nHA aumentan la rigidez de las cadenas poliméricas, lo cual es observable tanto en el porcentaje de cristalinidad, como en la temperatura de transición vítrea.

La presencia de nHA en los scaffolds favorece una degradación más rápida en la parte amorfa del polímero, lo cual favorece la movilidad y reorganización de las cadenas poliméricas. La muestra de PLLA/ 50 wt% nHA no sigue el mismo comportamiento que los scaffolds preparados con otras cantidades de nanopartículas. Esto se debe al hecho de que la morfología de estos soportes porosos es muy irregular por el alto contenido de nanopartículas, como podemos observar en las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Tiempo de degradación (semanas)	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$T_m(^{\circ}\text{C})$
	PLLA	PLLA/ 10% nHA	PLLA/ 30% nHA	PLLA/ 50% nHA
<b>0</b>	168.7	168.0	168.1	167.9
<b>1</b>	169.1	168.1	167.6	168.3
<b>2</b>	168.2	168.1	167.8	168.2
<b>3</b>	168.5	167.9	167.7	168.1
<b>4</b>	168.9	167.9	168.0	168.1
<b>6</b>	168.9	168.2	167.9	168.3
<b>8</b>	168.5	167.9	167.8	167.9

**Tabla 6.5.** Temperaturas de fusión  $T_m$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) de los scaffolds de PLLA/ nHA en función del tiempo de degradación.

### 6.2.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).

Mediante la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier podemos determinar los distintos grupos funcionales que componen un material. Esto es debido a que dichos grupos tienen unas bandas de absorción de infrarrojo característica, con distintas intensidades, las cuales representaremos en función de la longitud de onda a las que aparecen. En la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), se utiliza radiación a la que absorbe cada banda para la caracterización de los enlaces químicos. La vibración de una estructura es analizada en términos de grados de libertad que la estructura a analizar posea, proporcionando una información muy valiosa de su estructura química.

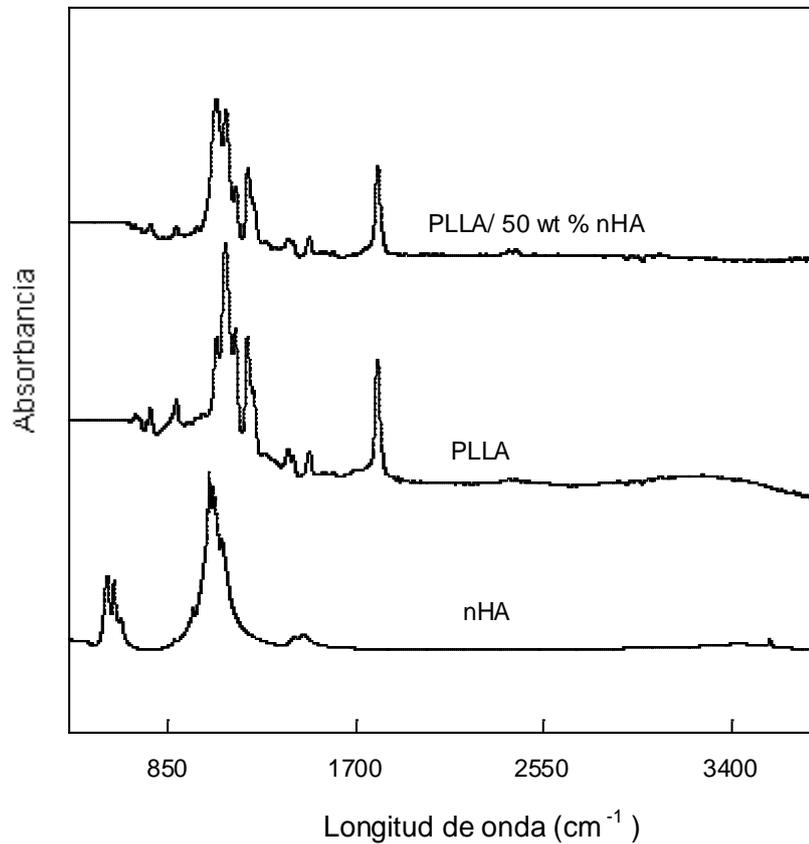
Esta técnica no sólo permite caracterizar las muestras sometidas a degradación, sino que también nos dará indicios sobre cuál será el posible mecanismo de degradación que sufrirán teniendo en cuenta las condiciones experimentales a las que han sido sometidas. Esto se realiza tomando en cuenta las diferencias que se pueden observar entre los espectros infrarrojos obtenidos con las muestras degradadas y los obtenidos en las muestras sin degradar. Los cambios pueden incluir desplazamientos en la frecuencia de absorción de la señal, incremento en el ancho de banda y cambios en la absorbancia o aparición de bandas atribuibles a los posibles subgrupos o especies de degradación.

En la Tabla 6.6 se han anotado las bandas de absorción más importantes para el PLLA. Observando los cambios ocurridos en las mismas obtendremos diferentes datos relativos a los mecanismos de degradación [52-55].

Longitud de onda( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupos funcionales
<b>756-871</b>	Fases amorfas y cristalinas del PLLA
<b>956-926</b>	Vibración de la estructura helicoidal $\text{CH}_3$
<b>1090</b>	Vibración de las bandas asimétricas C-O-o
<b>1225</b>	Bandas de estiramiento de los grupos éster (C-O)
<b>1300-1315</b>	Bandas de flexión de los grupos CH
<b>1382-1365</b>	Estiramiento asimétrico C-H
<b>1460</b>	Flexión C-H del $\text{CH}_3$
<b>1750</b>	Estiramiento de los grupos C=O
<b>2900</b>	Estiramiento asimétrico C-H
<b>2950</b>	Estiramiento simétrico de los grupos $\text{CH}_3$
<b>3000</b>	Estiramiento asimétrico de los grupos $\text{CH}_3$

**Tabla 6.6.** Bandas de absorción de IR características para el PLLA.

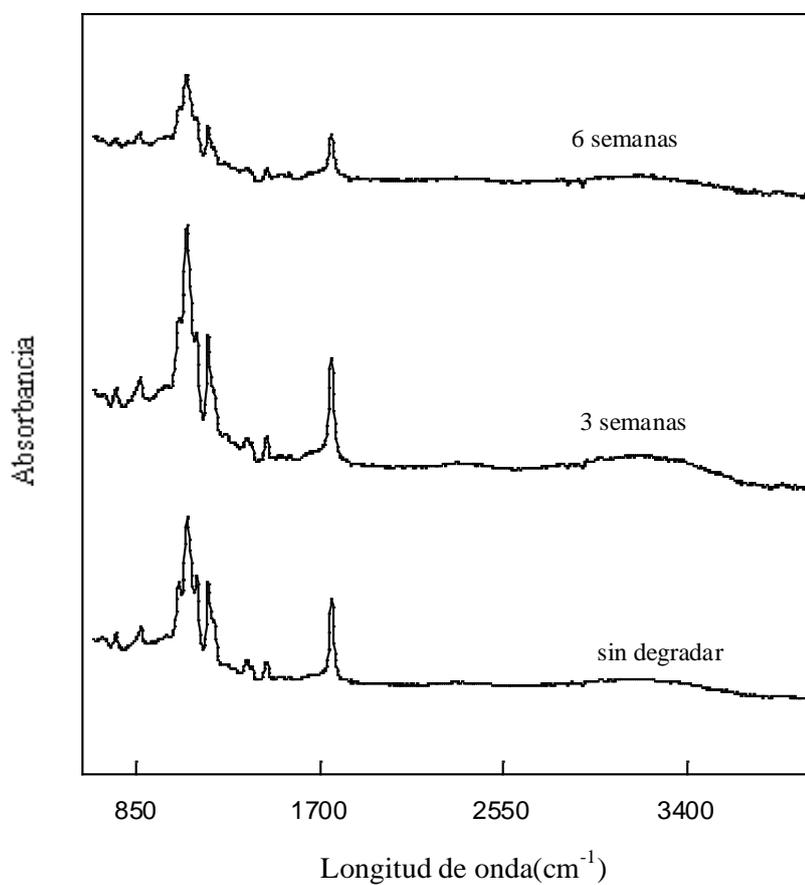
Tanto las partículas de nHA, como los scaffolds de PLLA puro y de PLLA/nHA fueron inicialmente analizados mediante la técnica de FTIR, utilizando un ATR, para no tener que disolver la muestra y modificarla, lo que hubiera provocado un precipitado de nHA, ya que esta no es soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos. El estudio preliminar indicó que las nanopartículas, al igual que sucede con el PCL, no habían interactuado con los grupos funcionales del PLLA, y se encontraban simplemente dispersas en la estructura del polímero. En la Figura 6.23 podemos ver que las bandas de absorción no varían de posición, lo cual nos indica que no existe interacción de las partículas de nHA con el polímero.



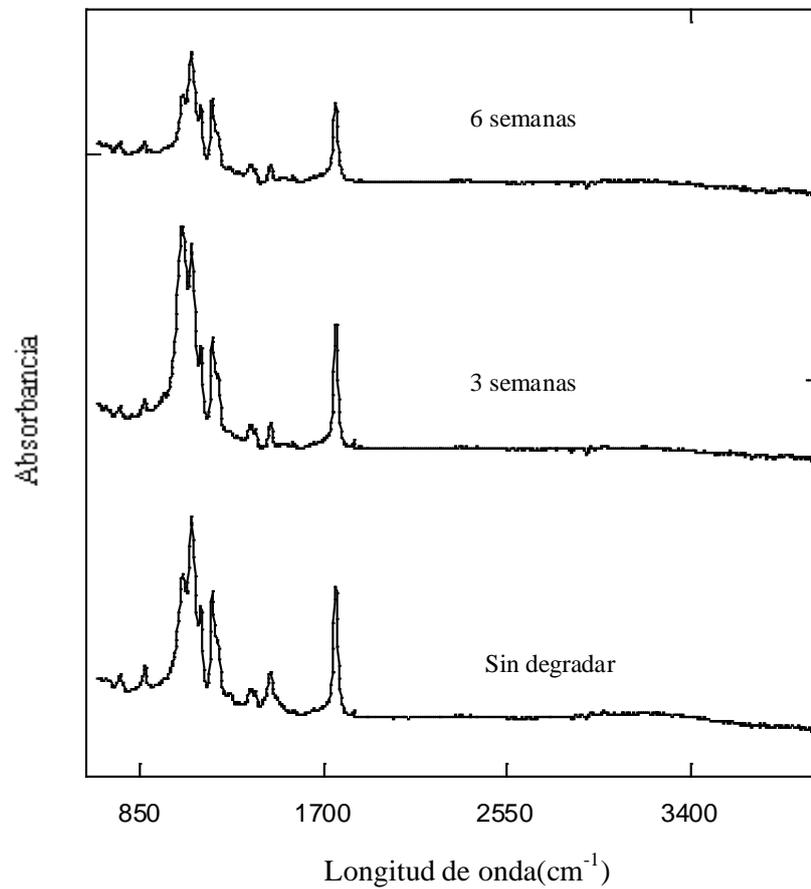
**Figura 6.23.** Espectro FTIR de nHA, PLLA y PLLA/ 50 % nHA.

Esto significa que las partículas se encuentran dispersas en la matriz polimérica, no existiendo interacciones químicas entre las mismas, lo cual concuerda con los resultados experimentales de SEM que mostraremos posteriormente. Sin embargo estos resultados difieren de los obtenidos por otros autores en estudios, en los cuales realizaron los scaffolds mediante la técnica de electrospinning, en lugar de TIPS [51]. También observamos que el pico situado alrededor de  $1750\text{cm}^{-1}$ , es decir, el correspondiente al enlace C=O, tanto en las

muestras de scaffolds con PLLA puro, en la Figura 6.24, como en los scaffolds con PLLA/ nHA, Figura 6.25, se va debilitando a medida que el tiempo de degradación aumenta, debido a la ruptura de los enlaces éster que produce la formación de ácido láctico y alcoholes.



**Figura 6.24.** Espectro FTIR del PLLA a diversos tiempos de degradación.



**Figura 6.25.** Espectro FTIR del PLLA/ 10 % nHA a diversos tiempos de degradación.

### 6.2.3. Propiedades mecánicas.

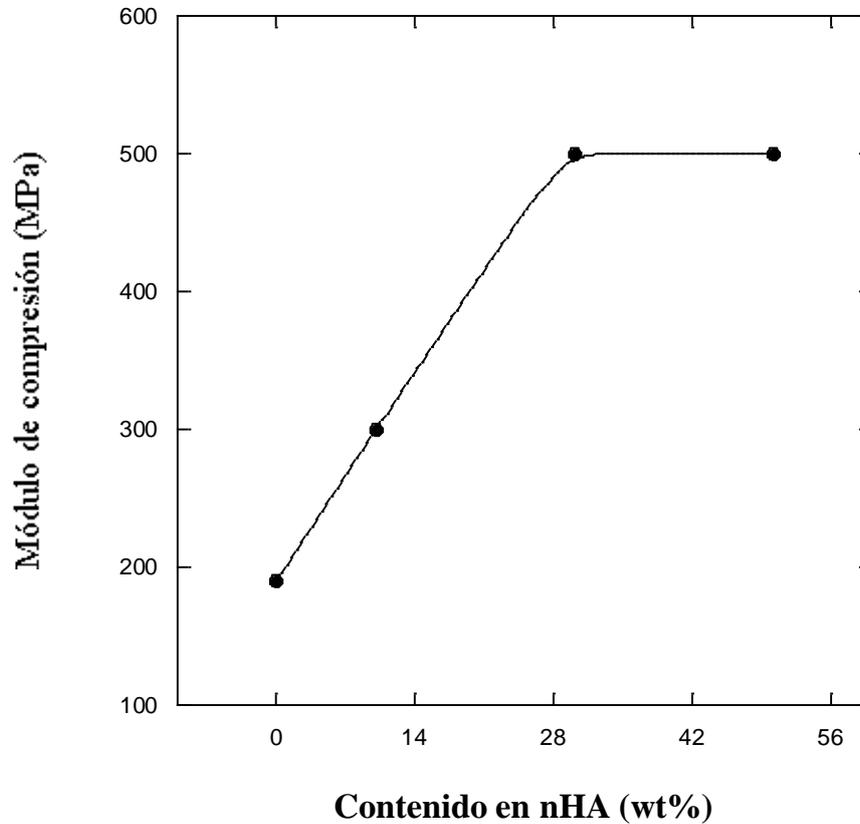
En los scaffolds obtenidos mediante la técnica de fabricación de separación de fases inducida térmicamente (TIPS), tanto la estructura de los poros, como la morfología de las paredes de los scaffolds se pueden controlar con modificaciones en la separación de fases [56].

En los soportes porosos obtenidos con el disolvente 1,4 dioxano, la estructura del poro es el resultado de una separación de fases sólido-líquido en la disolución polimérica. Las características de los poros son determinadas mediante la morfología de los cristales del disolvente y las condiciones en las que hemos realizado el temple

Todos los scaffolds fabricados para nuestro estudio disponen de una porosidad superior al 90 %. Aunque al añadir partículas bioactivas en pequeñas cantidades, hace que estas actúen como agente nucleador [57], la adición de grandes cantidades de estas en la disolución polimérica, perturba la cristalización del disolvente, con lo cual aparecen, debido a esto, poros irregulares y anisotrópicos, y además se observa una disminución en el tamaño de poro del scaffold.

La morfología y el tamaño de los poros son dos factores que influyen de manera muy importante en las propiedades mecánicas de los scaffolds. El módulo de compresión y la resistencia a la fluencia aumentan con el contenido de nanopartículas [58], en los soportes porosos estudiados, como podemos ver en las Figuras 6.26 y 6.27.

El aumento de las propiedades mecánicas no se debe únicamente a la presencia de nHA, que es un material cerámico muy duro, sino que la alta concentración de nHA hace decrecer el tamaño del poro, como hemos indicado anteriormente. En estudios realizados por nuestro grupo de investigación [59] hemos podido observar como el módulo de compresión y la resistencia a la fluencia dependen fuertemente del tamaño del poro, tanto para los soportes porosos de PLLA como para los de PCL.

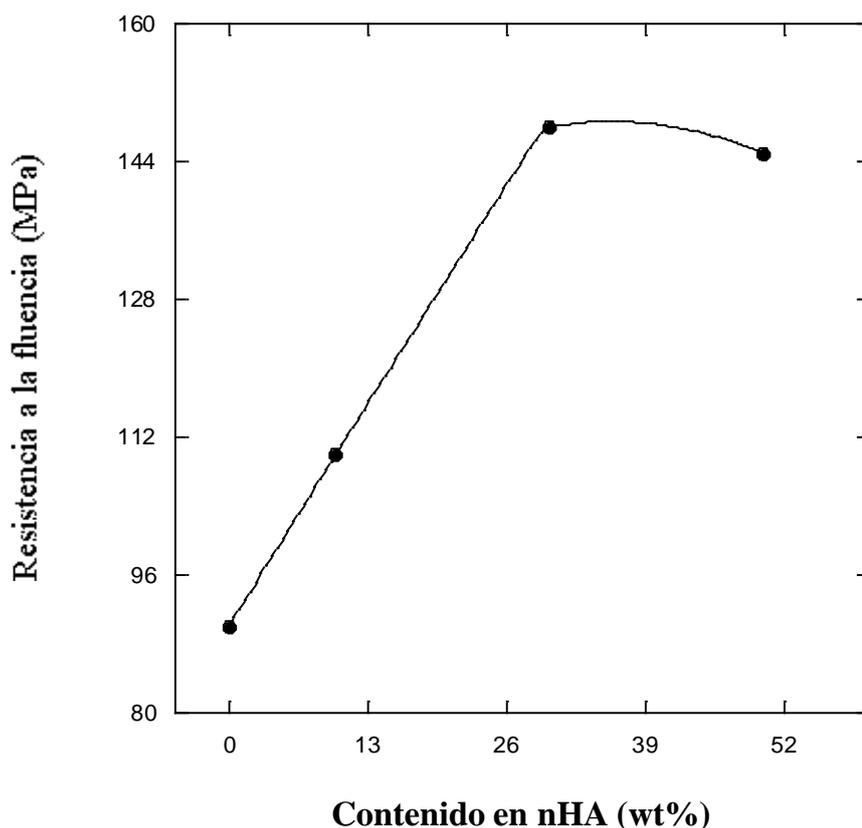


**Figura 6.26.** Módulo de compresión del PLLA en función del contenido en nHA.

Algunos autores en los estudios realizados han encontrado que soportes porosos con tamaño de poro muy grande tenían valores de las propiedades mecánicas pequeñas debido al reducido contenido de polímero en las mismas [60].

En las muestras de PLLA con un alto contenido de nHA (50 wt %) hemos encontrado una gran irregularidad en los poros y una distribución menos uniforme y aglomeración de partículas de nHA en la matriz polimérica. Esto es debido al alto contenido en nanopartículas bioactivas. La aglomeración formada da lugar a partículas más grandes con menor área superficial, lo cual provoca

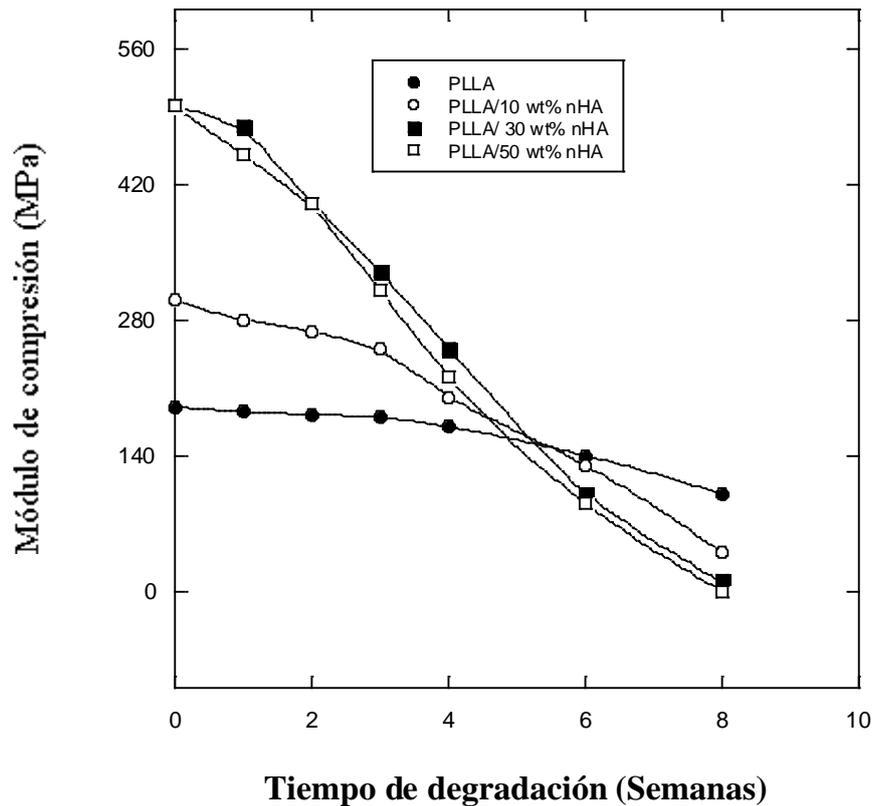
una reducción de las propiedades mecánicas de estos scaffolds, como resultado de un bajo contacto interfacial con la matriz polimérica (Figuras 6.26 y 6.27).



**Figura 6.27.** Resistencia a la fluencia de los scaffolds de PLLA en función de la cantidad de nHA.

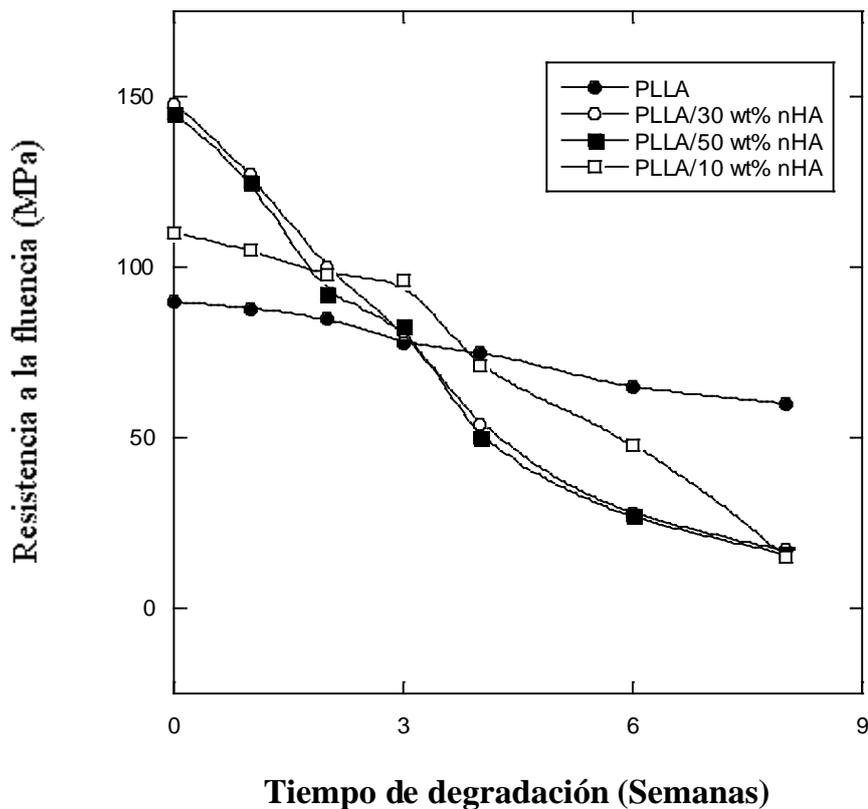
En la Figuras 6.28 y 6.29 podemos observar cómo evolucionan las propiedades mecánicas de nuestras muestras en función del tiempo de degradación. Estas propiedades mecánicas decrecen continuamente hasta la cuarta semana. Las muestras con un mayor contenido de nanopartículas alcanzan valores muy bajos en la octava semana de degradación, mientras que las muestras de PLLA sin nHA retienen sus propiedades mecánicas de forma

muy sostenida con el tiempo. Es decir, las propiedades mecánicas decrecen más drásticamente en las muestras con mayor proporción de nHA.



**Figura 6.28.** Módulo de compresión de los scaffolds de PLLA/ nHA en función del tiempo de degradación.

La degradación de la región amorfa ha producido la rotura de cadenas moleculares y la conexión entre los dominios cristalinos, dando lugar a defectos en los andamios sometidos a procesos de degradación.



**Figura 6.29.** Resistencia a la fluencia de los scaffolds de PLLA/ nHA en función del tiempo de degradación.

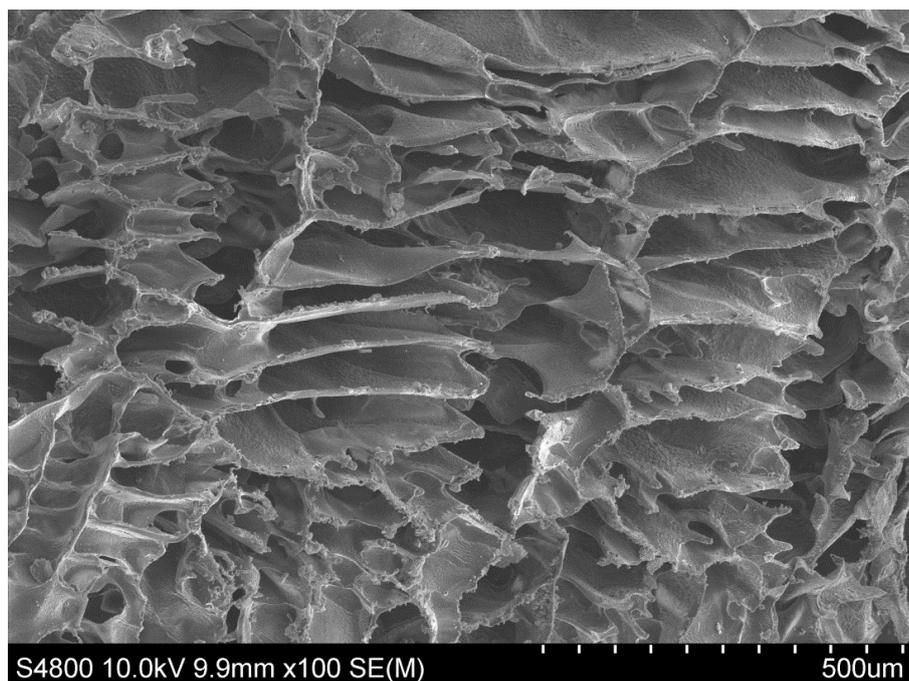
A pesar del efecto neutralizador de la solución de PBS utilizada, la concentración de los grupos carboxilo producidos por la degradación es superior en el interior del scaffold, dando lugar a una degradación mayor de las paredes, lo cual hace disminuir las propiedades mecánicas.

#### 6.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

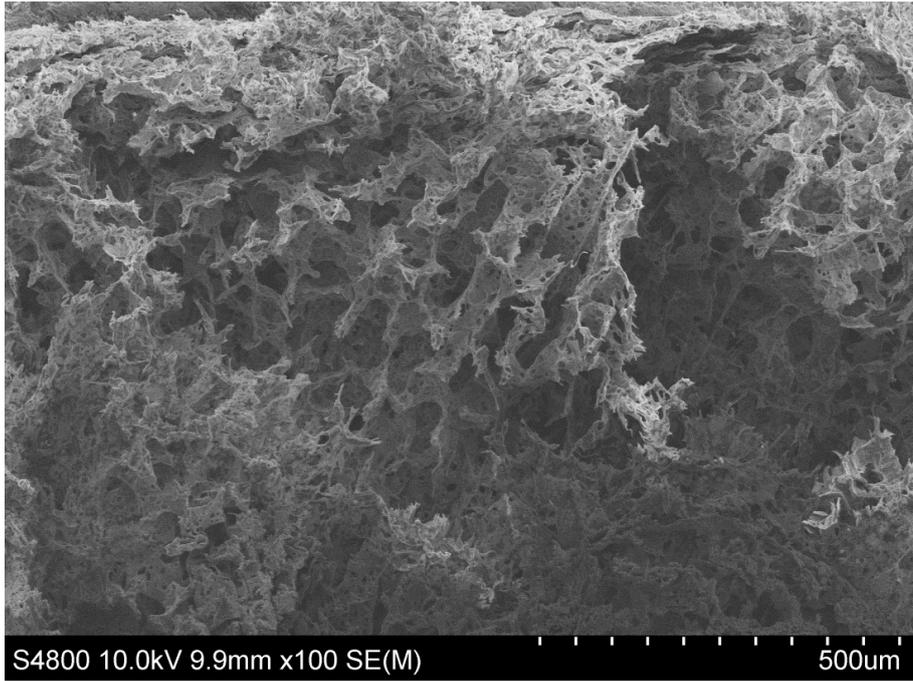
La técnica de caracterización más utilizada para la determinación de las diferentes morfologías de los scaffolds es la microscopía electrónica de barrido (SEM). A través de esta técnica se estudia la morfología de las muestras

sometidas al proceso de degradación. Para su análisis las muestras fueron recubiertas con una capa de oro mediante la técnica de sputtering. Se observó la superficie de las muestras expuestas directamente y también la superficie de fractura de los mismos. Para ello se sumergirán en nitrógeno líquido durante 5 minutos, siendo posteriormente fracturadas.

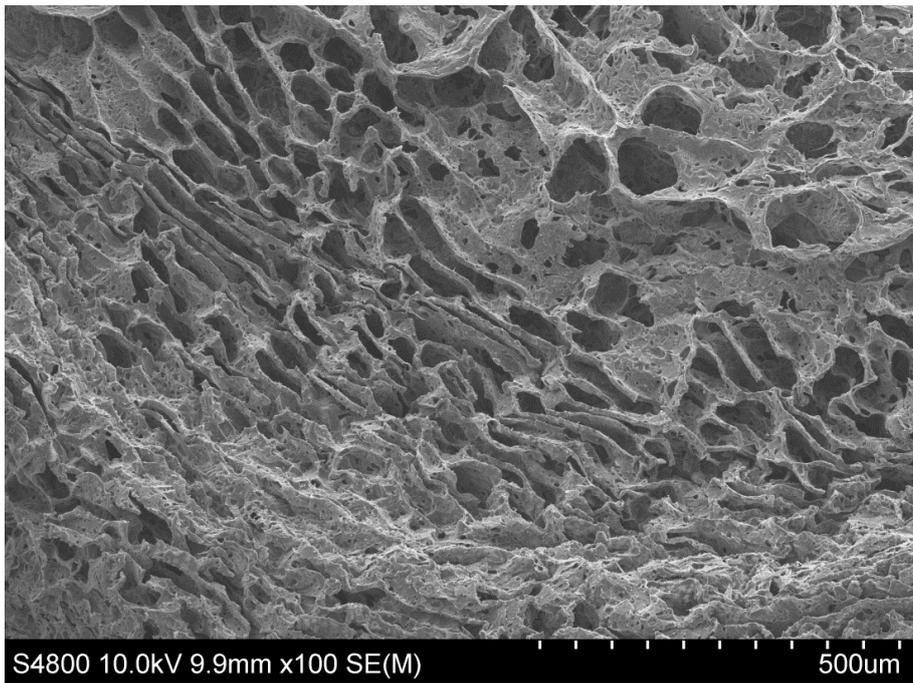
En las Figuras 6.31 a 6.41 podemos ver las micrografías realizadas de los scaffolds de PLLA puro y de PLLA con partículas de nHA, preparadas con dioxano al 2,5 % (w/v) y con un tratamiento térmico de temple a  $-60^{\circ}\text{C}$ .



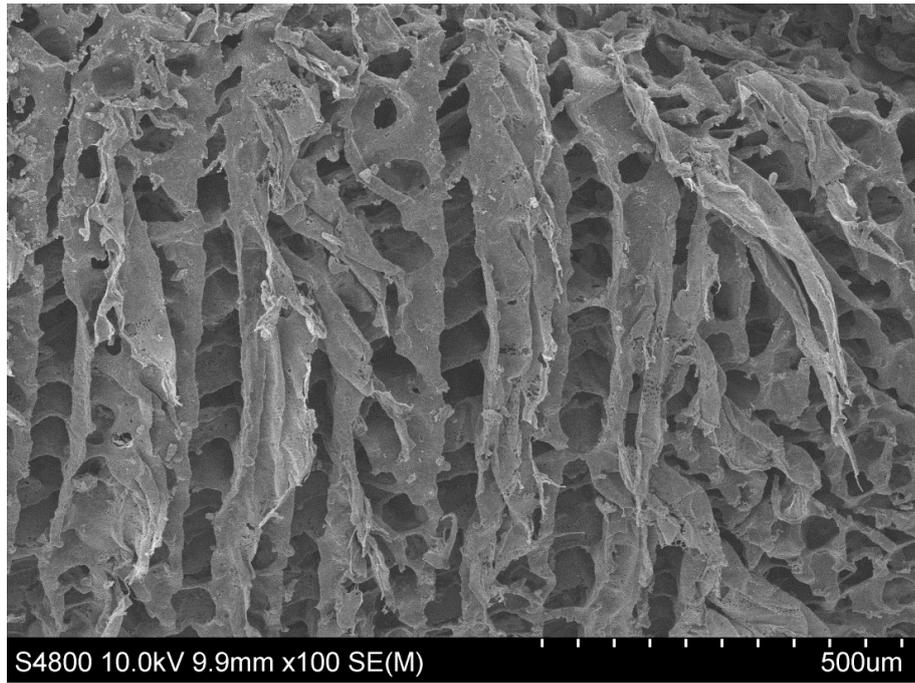
**Figura 6.30.** Micrografía de un scaffold de PLLA sin degradar.



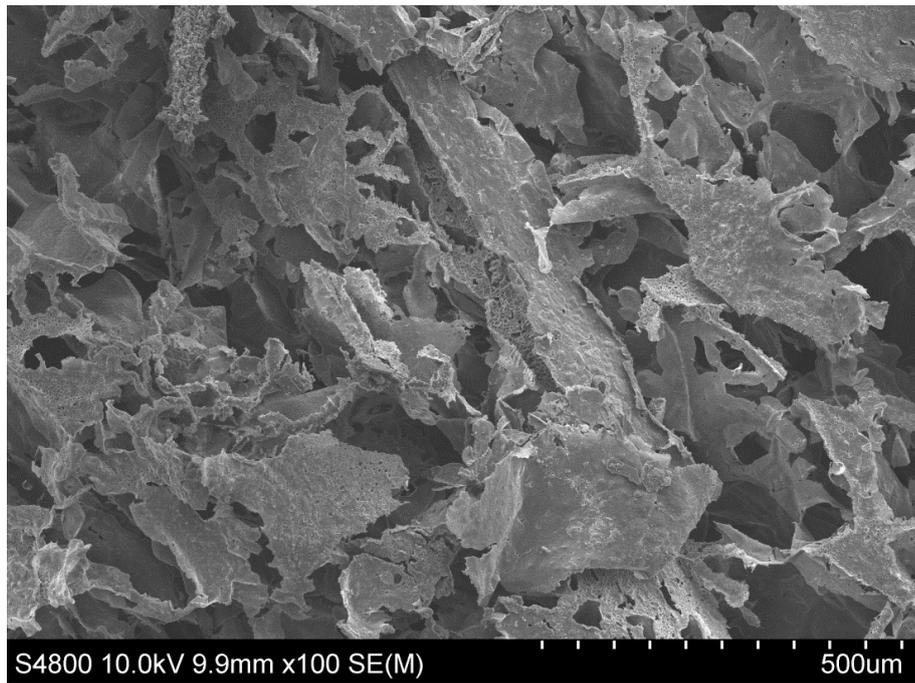
**Figura 6.31.** Micrografía de PLLA / 10 % nHA sin degradar.



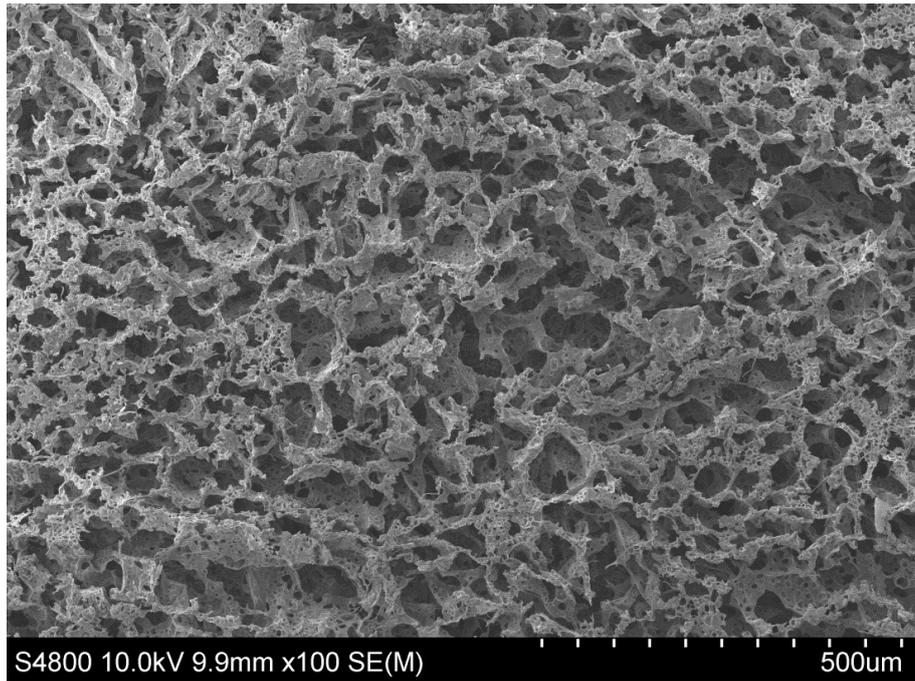
**Figura 6.32.** Micrografía de scaffold de PLLA/ 30 % nHA sin degradar.



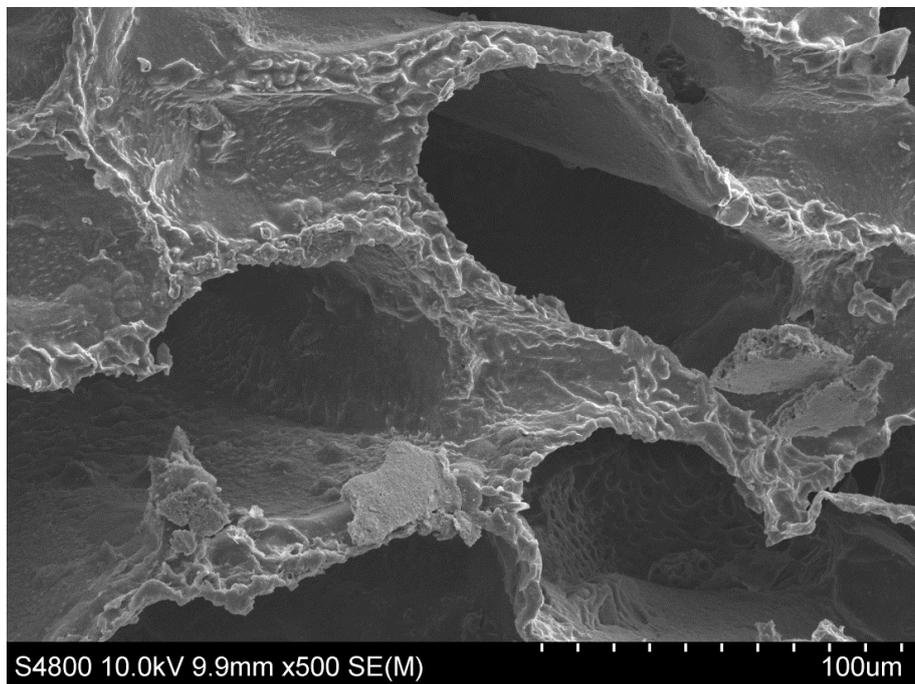
**Figura 6.33.** Micrografía de scaffold de PLLA/ 50 % nHA sin degradar.



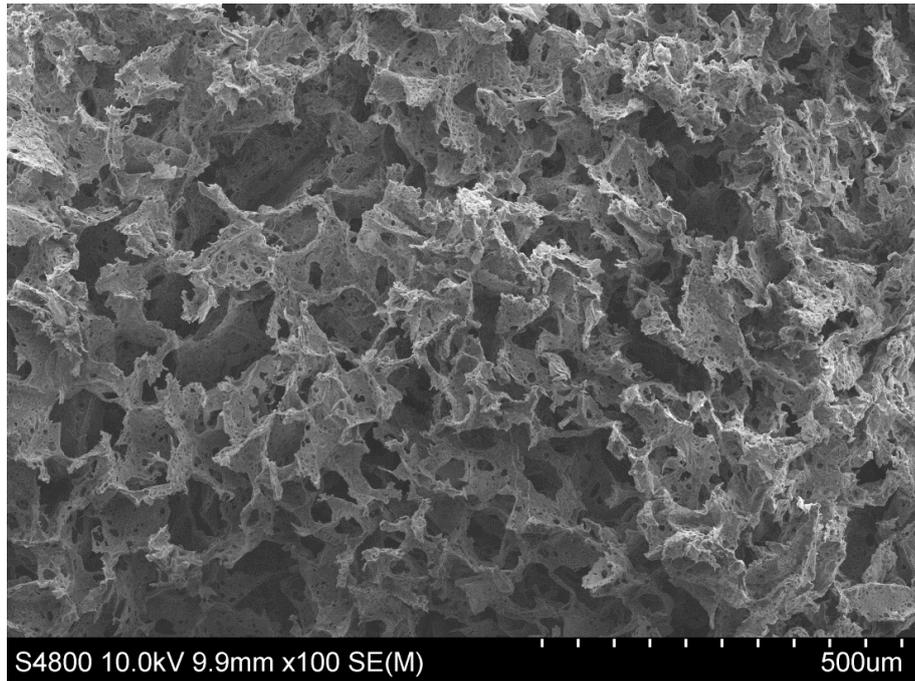
**Figura 6.34.** Micrografía de scaffold de PLLA tras 4 semanas de degradación.



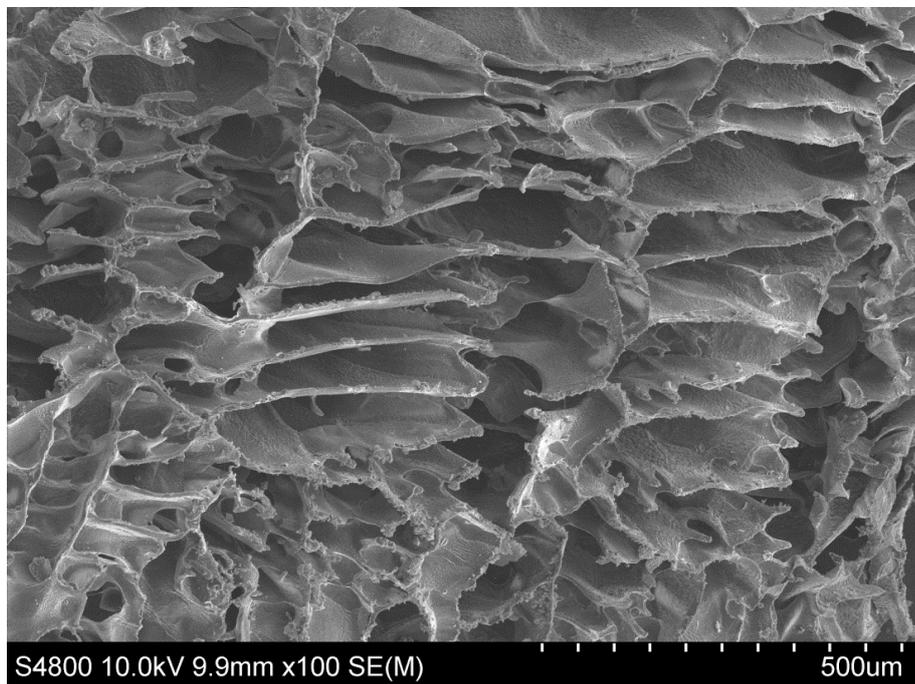
**Figura 6.35.** Micrografía de scaffold de PLLA/ 10 % nHA tras 4 semanas de degradación.



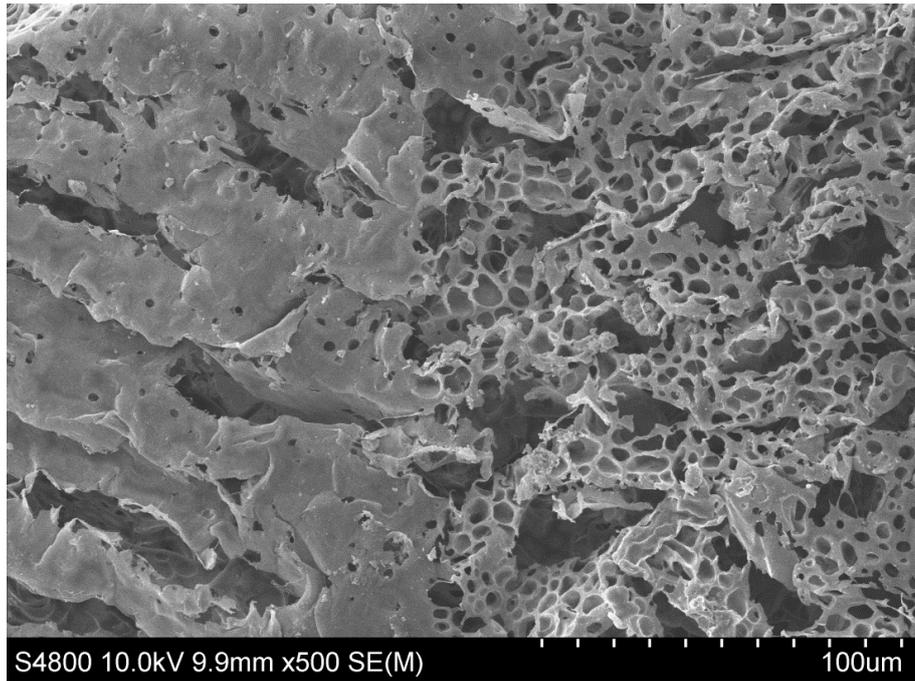
**Figura 6.36.** Micrografía de scaffold de PLLA/ 30 % nHA tras 4 semanas de degradación.



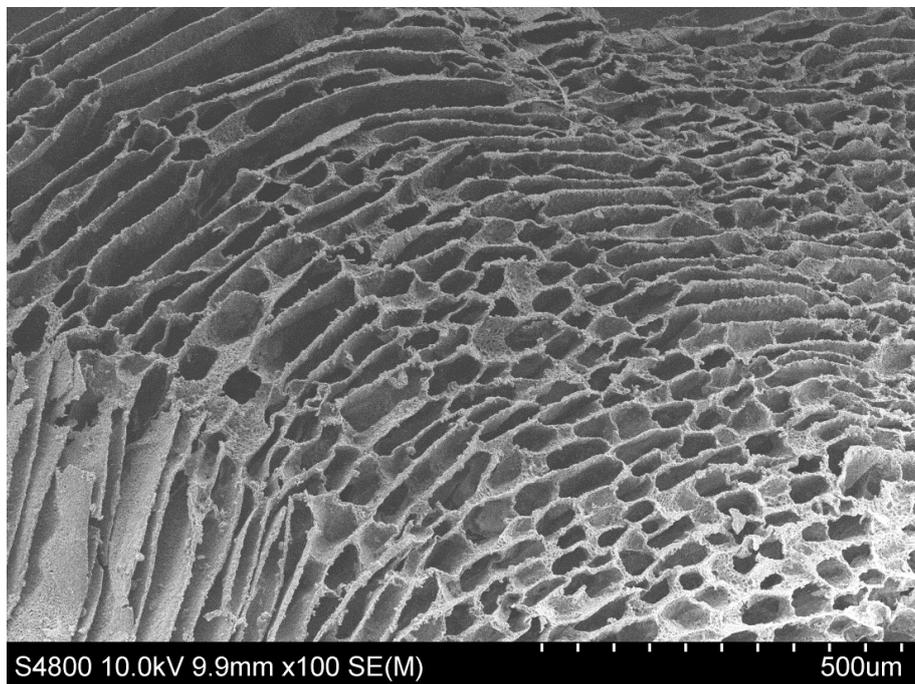
**Figura 6.37.** Micrografía de scaffold de PLLA/ 50 % nHA tras 4 semanas de degradación.



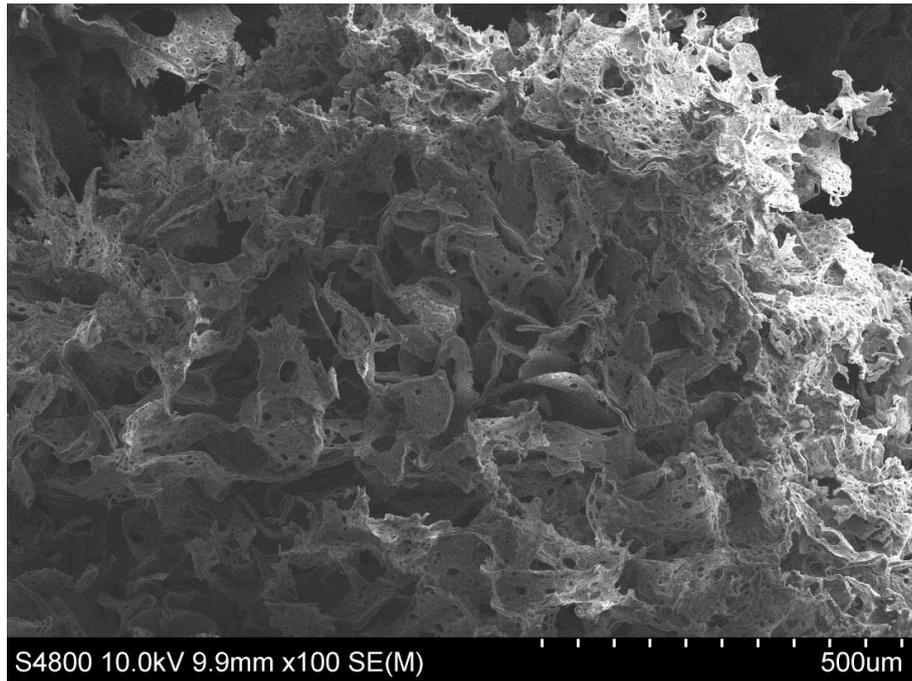
**Figura 6.38.** Micrografía de scaffold de PLLA tras 8 semanas de degradación.



**Figura 6.39.** Micrografía de scaffold de PLLA/ 10 % nHA tras 8 semanas de degradación.



**Figura 6.40.** Micrografía de scaffold de PLLA/ 30 % nHA tras 8 semanas de degradación.



**Figura 6.41.** *Micrografía de scaffold de PLLA/ 50 % nHA tras 8 semanas de degradación.*

Las micrografías obtenidas muestran una estructura continua de poros interconectados. Las paredes de los poros están compuestas por PLLA y partículas de nHA, que se encuentran homogéneamente distribuidas en la matriz polimérica de PLLA.

La morfología de los scaffolds de PLLA puro, y con partículas de nHA es similar a la de otras muestras preparadas con el mismo sistema de fabricación, TIPS. Estos scaffolds poseen una morfología tubular muy anisotrópica, con una estructura interna en forma de escalera. Esta estructura es característica de los scaffolds formados por una separación de fases de la solución polimérica, sólido-líquido, en la cual los canales son paralelos a la dirección de solidificación, es decir, paralelos a la dirección en la que tiene lugar la transmisión de calor. En

cada canal formado, las divisiones en los mismos se repiten, con una distancia uniforme entre ellas, perpendiculares a la dirección de solidificación. La separación de fases sólido-líquido es atribuible a la cristalización del disolvente. Cuando la temperatura de la solución polimérica es menor que la temperatura de solidificación del disolvente, tiene lugar la cristalización del disolvente, siendo expulsada la fase polimérica del frente de cristalización como si fueran impurezas. Tras la sublimación de los cristales de disolvente, el espacio ocupado por estos se transforman en poros en las paredes, con lo que su geometría será similar a los cristales de disolvente.

El gradiente de temperatura en la dirección de solidificación, es decir, la dirección que va de la superficie de la muestra al interior de la misma, puede provocar una estructura porosa muy anisotrópica. Cuando introducimos partículas de nHA en la solución polimérica, estas perturban la cristalización del disolvente, cambiando el crecimiento del mismo, formando unos cristales de disolvente más irregulares que cuando no añadimos las partículas de nHA. La adición de nHA, provoca que tanto las partículas de nHA como el polímero, sean expulsados del frente de cristalización, formando una fase rica y continúa de PLLA/ nHA, formándose poros en los lugares donde anteriormente existían cristales de disolvente. Como consecuencia de la irregularidad de los cristales del disolvente formados, tanto los poros como la estructura serán más anisotrópicos. Este comportamiento lo podemos observar en los scaffolds compuestos por PLLA/ nHA con mayor concentración de nHA, es decir, los scaffolds realizados con 50 % nHA, como se puede observar en la Figura 6.31. Al obtener una estructura de poro irregular no observaremos ni canales regulares en las paredes, ni tampoco estructura en forma de escalera. Además, la adición

de partículas bioactivas de nHA, aunque sea en baja proporción, disminuirá el tamaño de poro de 300 a 50nm aproximadamente. También se observa una buena y homogénea adhesión entre el polímero y las partículas bioactivas de nHA, encontrándose las partículas de nHA situadas en la superficie de las paredes de los poros.

En los soportes porosos con altas concentraciones de nHA (50 % wt) como vemos en las Figuras 6.33, 6.37 y 6.40, se observa una gran porosidad en las paredes de los poros.

La perturbación debido a las partículas de nHA es pequeña a pesar de las elevadas concentraciones, debido a la escala nanométrica de las partículas y a su distribución uniforme. Como resultado de esto, los scaffolds fabricados con PLLA y nHA mantuvieron la principal característica de la arquitectura del poro que encontramos en el método de separación de fases sólido-líquido, es decir, anisotropía regular. En este caso, el efecto de un bajo contenido de nHA en la cristalización del disolvente no fue lo suficientemente significativo para alterar la estructura del poro.

Como hemos indicado anteriormente, las muestras estudiadas las hemos sometido a un proceso de degradación de 8 semanas. En este período de tiempo no se observan cambios apreciables en las micrografías de estas muestras, ni aparecen productos de degradación de las mismas, como podemos ver en las figuras 6.34 a 6.41. Por el contrario si hay un aumento progresivo en la porosidad de las paredes de los poros tras el paso de varias semanas [61]. Podemos concluir diciendo que tras el proceso de degradación de 8 semanas no se pueden apreciar cambios morfológicos grandes en las micrografías del SEM,

ni se aprecian cambios significativos en otros aspectos del estudio, exceptuando la porosidad de las paredes de los soportes porosos.

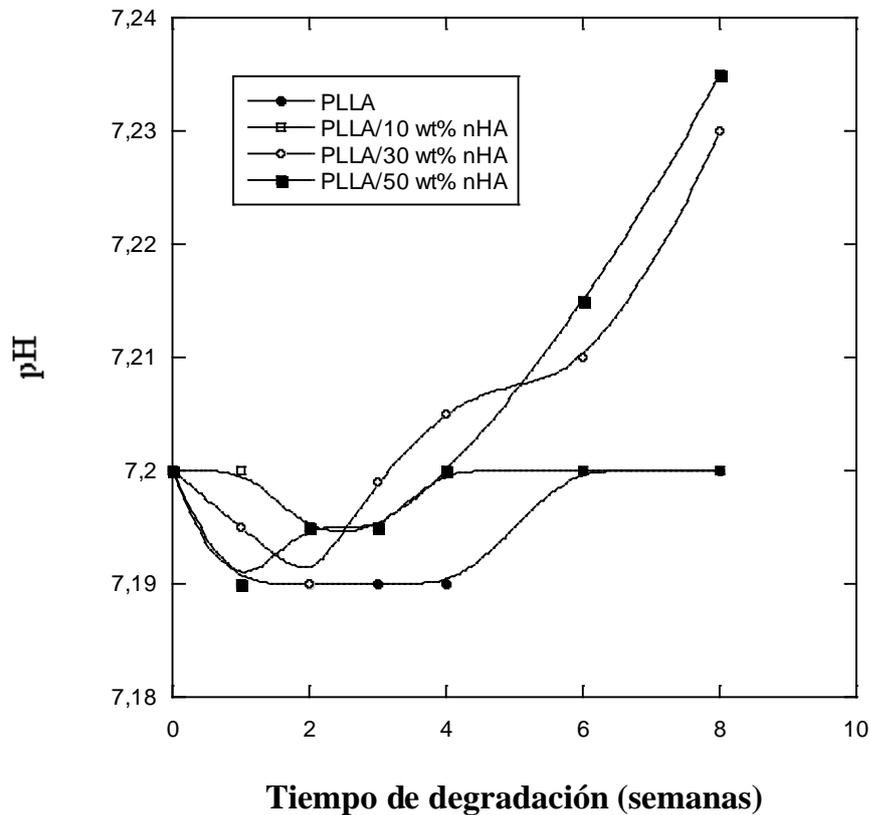
### 6.2.5. Estudio del pH.

Hemos determinado el cambio en el pH del medio acuoso con el tiempo de degradación para comprobar la liberación de residuos ácidos de las muestras de PLLA lo cual nos da una indicación del estado de degradación: a mayor formación de ácido láctico, que es un producto de degradación, mayor será el cambio en el pH. El pH nos aportará información sobre la producción total de residuos ácidos [62]. La Figura 6.42 nos muestra la variación del pH en los scaffolds realizados con PLLA y en los compuestos de PLLA/ nHA en función del tiempo de degradación in vitro.

Todos los soportes estudiados siguen un desarrollo similar hasta la cuarta semana de degradación: el pH sufre una leve caída en las primeras cuatro semanas de degradación, y comienza a subir hasta alcanzar posteriormente el valor original para permanecer constante a partir de este momento hasta la octava semana de degradación. La excepción a esto último son los scaffolds con mayor contenido porcentual de nHA, en los cuales a partir de la cuarta semana el pH sigue subiendo ligeramente hasta culminar el período de degradación estudiado.

En estos casos, el aumento del pH puede ser debido a la gran cantidad de partículas de nanohidroxiapatita existente en estos scaffolds. Estas nanopartículas presentes en la disolución, contrarrestarán el efecto de los ácidos

producidos en el proceso de degradación, ya que el aumento en el pH se cree que puede ser debido a la liberación de radicales  $\text{OH}^-$  que provienen de la degradación de las partículas de nHA.

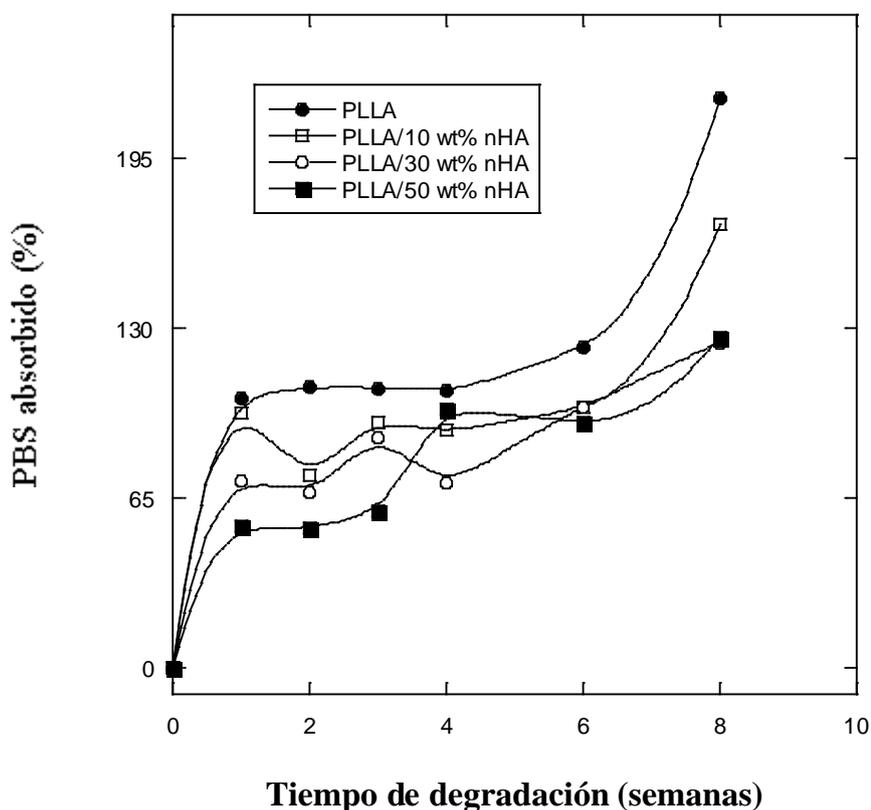


**Figura 6.42.** Cambio en el pH del PBS en función del tiempo de degradación.

### 6.2.6. Absorción de agua.

La absorción de agua es el primer efecto que ocurrirá cuando un scaffold entra en contacto con un medio acuoso y es un reflejo de la degradación hidrolítica.

En la Figura 6.43 podemos observar el porcentaje de agua absorbido por los scaffolds en función del tiempo de degradación. En esta figura se puede ver que desde la primera semana de degradación, la absorción de agua es muy importante para todas las muestras estudiadas. En el período comprendido entre la primera y cuarta semana se observa que las muestras sufrieron un proceso de estabilización con una pequeña absorción de PBS. Sin embargo a partir de la semana seis hasta el final del tiempo estudiado la absorción de PBS es muy importante en todas las muestras



**Figura 6.43.** Absorción de agua de los scaffolds de PLLA/ nHA en función del tiempo de degradación.

También hemos observado que cuanto mayor contenido de partículas bioactivas de nHA contengan las muestras sometidas a estudio, menor cantidad de agua serán capaces de absorber, y menor será la velocidad de degradación, un comportamiento que también ha sido observado por otros autores [62, 63]. Esto parece lógico si nos fijamos en la morfología de los scaffolds, ya que a mayor cantidad de nanopartículas, menor tamaño de poro tendremos, como hemos visto en los resultados del SEM.

El proceso de absorción de agua es un balance entre la disolución de oligómeros en la disolución y el consumo de residuos en el PBS. Un aumento de la absorción de agua refleja un estado inicial en la degradación.

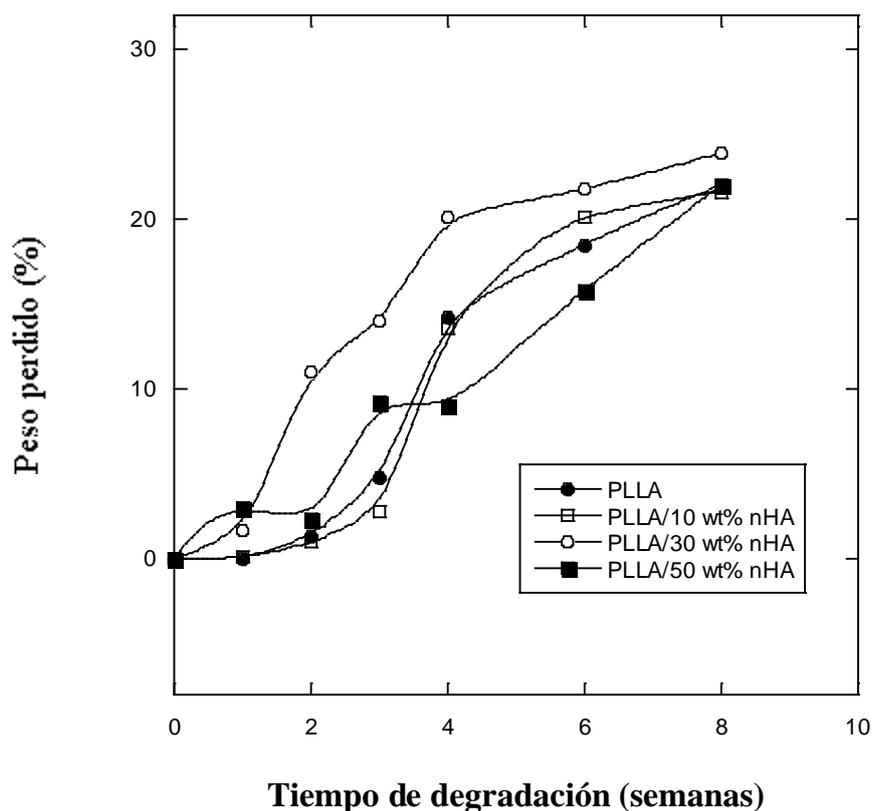
La acumulación de productos hidrolíticos en el interior del scaffold provoca un aumento en la absorción de agua de los scaffolds durante el proceso de degradación.

Cuando la absorción alcanza un determinado valor, la velocidad de la misma se ve reducida como resultado de la disolución de los productos de degradación. Estos introducen partículas de nHA en el interior del scaffold, las cuales ralentizan la velocidad de degradación, debido a que forman soluciones alcalinas que actúan como una barrera física la cual causa una disminución en la velocidad de degradación.

#### **6.2.7. Pérdida de masa.**

La pérdida de masa total de los scaffolds fue calculada siguiendo el protocolo descrito en la sección 5 de esta memoria.

En la Figura 6.44 podemos observar el porcentaje de masa perdida por los soportes porosos durante el período de degradación estudiado. De acuerdo a los valores obtenidos, se observa que cuando aumenta el tiempo de degradación, también aumenta el % de masa perdida por la muestra. Vemos que este comportamiento es común a todos los scaffolds estudiados. Aun así, existe diferencia en el comportamiento de las distintas muestras, ya que mientras que para los scaffolds compuestos por PLLA puro no se observa una pérdida de peso hasta la cuarta semana de degradación, en las muestras con diferente contenido en nHA la pérdida de peso tiene lugar después de la primera semana.



**Figura 6.44.** Pérdida de peso en % de los scaffolds de PLLA/ nHA en función del tiempo de degradación.

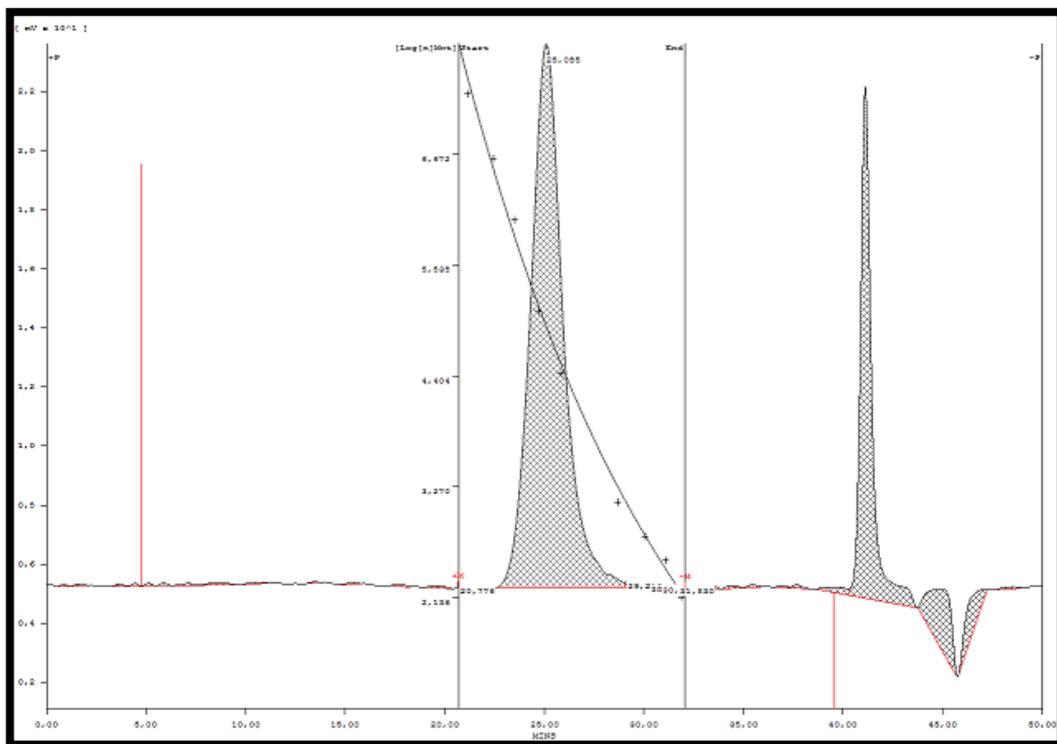
Al final del período de degradación todas las muestras tienen una pérdida de masa de alrededor del 22 %. Estos resultados indican que las muestras de scaffolds con contenido de partículas bioactivas de nHA causan una mayor pérdida de masa inicialmente [64], aunque al finalizar el proceso de degradación estudiado, la pérdida tiende a igualarse para todas las muestras sometidas a estudio.

El mecanismo de degradación en las polilactidas, como el PLLA, es el de la degradación en bloque del scaffold, acelerándose el proceso con el aumento de la cantidad de agua absorbida. Sin embargo, la adición de partículas bioactivas de nHA en los scaffolds disminuye la velocidad de degradación, lo que puede ser debido a la actuación de estos como barrera física, que impediría la entrada de agua en el scaffold [65].

#### **6.2.8. Variación del peso molecular y polidispersidad.**

La técnica estándar para caracterizar la degradación del polímero es la cromatografía de permeabilidad de gel (GPC), la cual se utiliza en los ensayos de degradación. Mediante esta técnica observamos la variación tanto del peso molecular promedio en peso,  $M_w$ , así como en número,  $M_n$ , y el índice de polidispersidad durante el proceso de degradación. Esto ocurre debido a la escisión de las cadenas poliméricas mediante la hidrólisis. El GPC utilizado es un equipo Perkin Elmer 200, realizando la calibración de acuerdo con los estándares para el polietileno, siendo el flujo de 1 mililitro/ minuto. . Los ensayos

se realizaron utilizando tetrahidrofurano como disolvente. En la figura 6.45 se puede ver un cromatograma de un scaffold de PLLA puro sin degradar.



**Figura 6.45.** Cromatograma del PLLA antes del proceso de degradación.

El mecanismo de degradación del PLLA se ve confirmado con los ensayos de GPC al finalizar el período de degradación, como podemos observar en la Tabla 6.7. El polímero de PLLA que hemos utilizado para la realización de los scaffolds tienen un promedio en peso  $M_w=141908.8$ , un promedio en número  $M_n=95680.8$ , y un índice de polidispersidad de 1.4835 antes del proceso de degradación.

% de nHA	$M_w$	$M_n$	$I=M_w/M_n$
<b>0</b>	50365.3	27893.5	1.80
<b>10</b>	53685.2	31000.2	1.73
<b>30</b>	52218.2	29745.2	1.75
<b>50</b>	61245.0	35157.1	1.74

**Tabla 6.7.**  $M_w$ ,  $M_n$  e Índice de polidispersidad de las muestras tras el período de degradación de 8 semanas.

En la Tabla 6.7 podemos advertir que el índice de polidispersidad ha aumentado de 1,48 a aproximadamente 1.74, y como  $M_w$  y  $M_n$  disminuyen mucho, todo ello debido a la escisión de las cadenas poliméricas como resultado de la degradación hidrolítica.

### 6.3. SISTEMA PCL.

En este capítulo vamos a presentar los resultados obtenidos en la degradación de los scaffolds fabricados con PCL, utilizando el 1,4 dioxano como disolvente. En los soportes porosos realizados hemos incorporado partículas bioactivas de nHA, con proporciones, 0, 10, 30 y 50 % del total de la masa del polímero.

La PCL, es un polímero hidrofóbico y semicristalino, y su cristalinidad tiende a aumentar con el peso molecular [66]. La PCL utilizada para la realización de este trabajo, tiene un peso molecular promedio en peso

$M_w=130490$ , un peso molecular promedio en número  $M_n= 79760$  y un índice de polidispersidad  $I= 1.636$ .

De los estudios de degradación presentes en la bibliografía se deduce que la policaprolactona presenta dos etapas de degradación [67, 68]. Primero ocurre una escisión hidrolítica no enzimática de los grupos éster [69, 70]. A continuación, cuando el polímero es más cristalino, muestra una degradación intracelular que le permite ser totalmente reabsorbido y degradado. La degradación de los poli ( $\alpha$ -hidroxi) ésteres, se realiza mediante dos diferentes mecanismos, siendo estos la degradación superficial y la degradación en bloque. El tipo de mecanismo de degradación que tiene lugar en cada momento vendrá determinado por los fenómenos de reacción y difusión existentes en cada caso, como podemos observar en la Figura 6.46.

El mecanismo de degradación superficial, o dicho de otro modo la erosión superficial, implica que la ruptura de los enlaces ésteres únicamente tendrán lugar en la superficie del polímero [71]. Este tipo de degradación superficial ocurrirá cuando la velocidad de escisión hidrolítica de las cadenas poliméricas y la producción de monómeros y oligómeros asociados a la misma y que serán dispersados por el entorno, se da a mayor velocidad que la de entrada del agua al interior del polímero. En este mecanismo de degradación el polímero se irá degradando de fuera hacia dentro, disminuyendo de esta forma su tamaño exterior, manteniendo el peso molecular del polímero invariable(Figura 6.46. a).

Este tipo de degradación tiene sus ventajas, como la facilidad de predicción del proceso, propiedad muy interesante si lo que nos interesa es el estudio de la liberación de fármacos [72, 73].

Otro mecanismo de degradación existente es la llamada degradación en bloque. Este tipo de degradación ocurre cuando el agua penetra en el interior del polímero, causando éste una hidrólisis en el mismo (Figura 6.46.b). Esta escisión hidrolítica de las cadenas poliméricas es aleatoria, y cuando tenga lugar producirá una reducción general en el peso molecular del polímero.

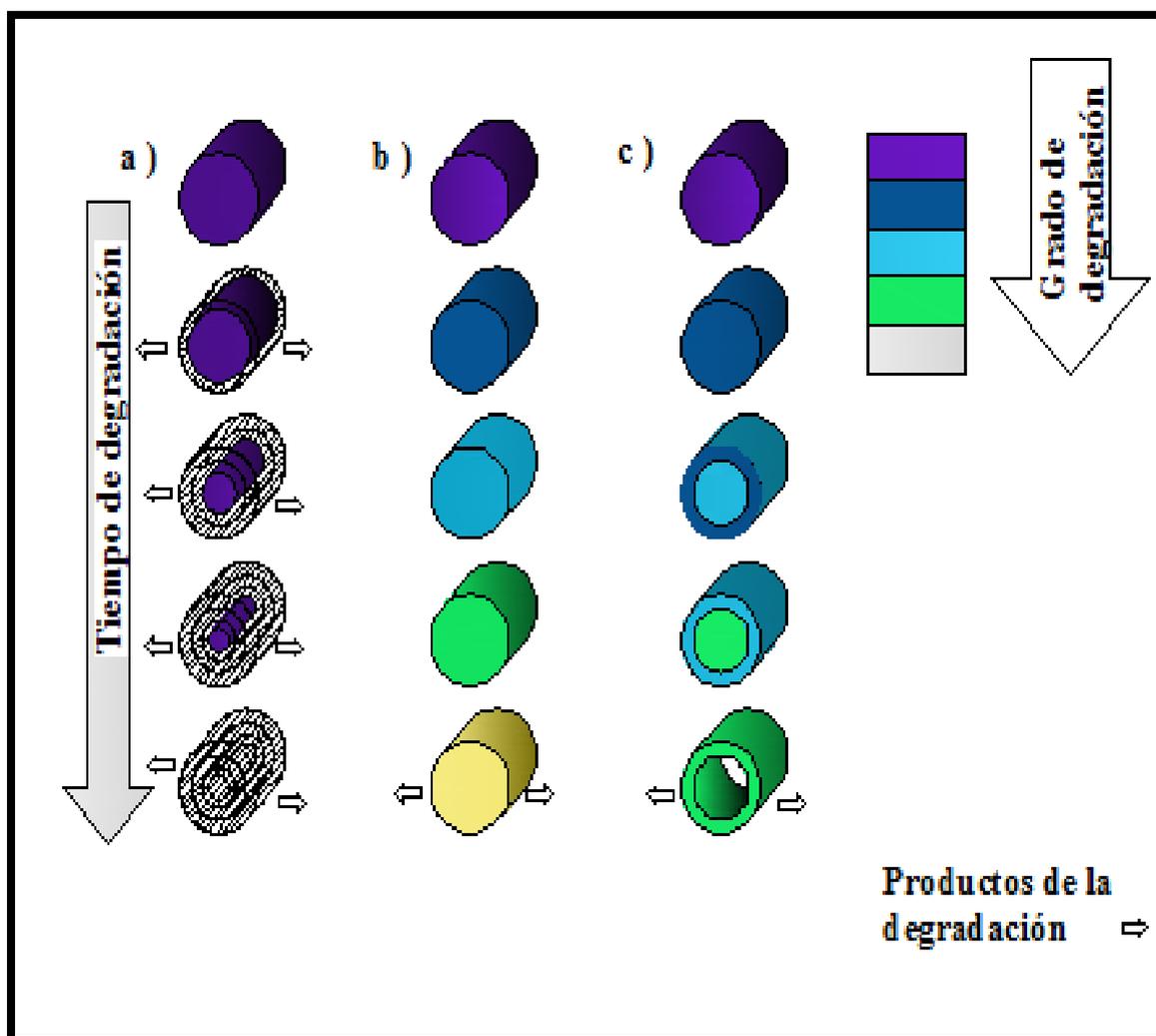
En el caso que las moléculas de agua puedan difundirse al interior del polímero implicará la hidrólisis en el mismo, posibilitando de esta forma la dispersión en el interior de los monómeros y oligómeros creados. De esta forma la degradación ocurrirá gradualmente, afectando a todo el polímero, alcanzándose así un equilibrio en los fenómenos de difusión y reacción.

Si este equilibrio se ve obstaculizado por la ausencia de difusión, el mecanismo de degradación se verá, asimismo, afectado, ocurriendo de esta forma una reacción autocatalítica interna debido a los productos de degradación (Figura 6.46.c).

La acumulación de estos productos producirá una reacción autocatalítica debido a la ruptura de los enlaces éster en el interior del polímero que acelerará la degradación. Al ser la velocidad de degradación del interior del polímero mayor que la del exterior del mismo, la apariencia final será la de una capa exterior de polímero, de mayor peso molecular, o dicho de otra forma, menos degradada, rodeando la parte interna del polímero de menor peso molecular, es decir, más degradada. Cuando los oligómeros obtenidos debido a la degradación del interior del polímero sean los suficientemente pequeños se distribuirán rápidamente hacia la capa exterior, lo cual dará lugar a una pérdida de peso y un

decrecimiento en la velocidad de las escisiones de las cadenas poliméricas, produciendo una estructura hueca de alto peso molecular.

El tiempo de degradación del polímero PCL es de entre dos y cuatro años, dependiendo de factores, como el peso molecular inicial del mismo, la cristalinidad, etc.



**Figura 6.46.** Tipos de degradación en la PCL.

Los scaffolds fabricados los hemos cortado en rectángulos de aproximadamente 5x10 milímetros, y hemos introducido estas secciones en una solución salina (PBS) de pH 7,2 a 37 °C durante un período de dieciséis semanas. Cada 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 y 16 semanas hemos ido sacando las muestras para realizar los estudios de degradación in vitro.

### **6.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).**

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica instrumental que nos permite realizar el estudio de la morfología, tamaño de los poros y la porosidad de las muestras estudiadas, así como su evolución en el proceso de degradación.

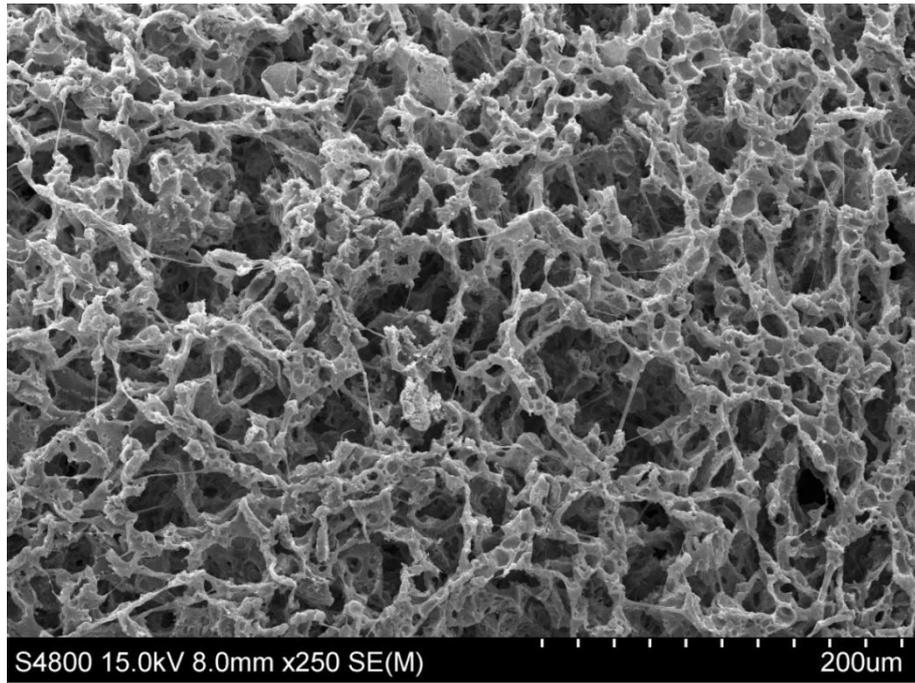
Para que los scaffolds realizados no sufran una deformación de los poros y la morfología de los mismos cuando los cortamos para realizar el análisis mediante el SEM, realizamos una fractura por congelación, que consiste en congelar la muestra antes de realizar el corte, para lo cual introducimos las muestras en nitrógeno líquido.

La adición de partículas de nanohidroxiapatita uniformemente distribuidas en la matriz polimérica, se ha realizado previamente al proceso de liofilización. La estructura de los poros y su morfología son controladas por el proceso de separación de fases ocurrido en la solución polimérica, siendo en este caso la separación de fases sólido-líquido [74, 75]. Esta separación de fases es atribuible a la cristalización del disolvente.

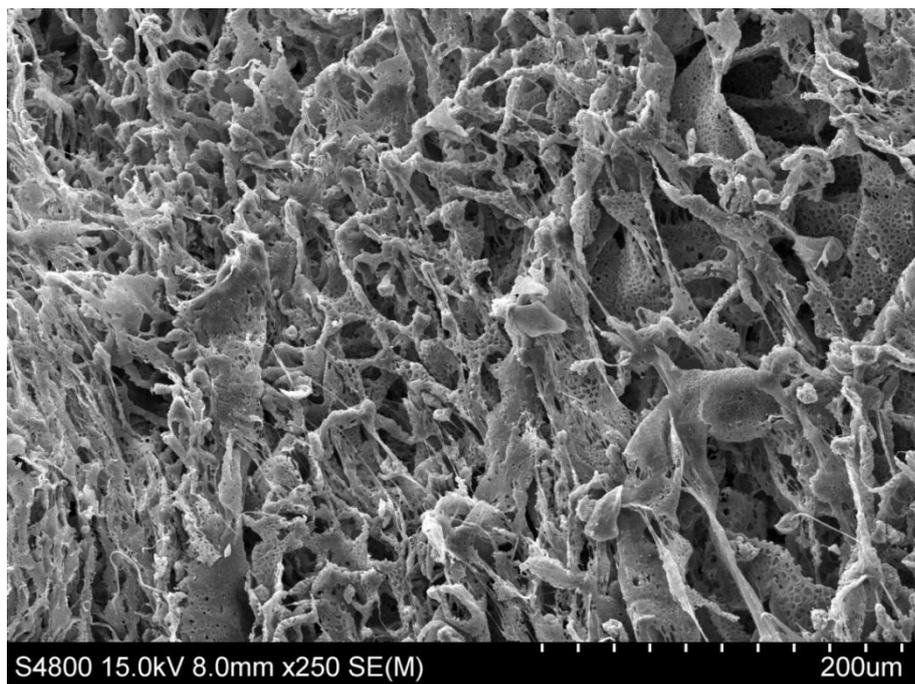
En los scaffolds estudiados hemos observado una porosidad superior al 90 %. Como podemos ver en las Figuras 6.47 a la 6.50, la presencia de partículas de nanohidroxiapatita (nHA) en los scaffolds de PCL no parece que modifique el tamaño del poro. Sin embargo, hemos detectado que la presencia de nHA crea una morfología más irregular en el scaffold, debido a que estas nanopartículas perturban la cristalización del disolvente, cambiando el patrón de crecimiento del cristal y formando de esta forma cristales más irregulares en el disolvente. Tanto el polímero como la nHA, son expulsados del frente de cristalización, formándose una fase rica, y una estructura continua de PCL/ nHA, transformándose los espacios anteriormente ocupados por los cristales del disolvente en los poros del nuevo scaffold formado.

Las muestras con menor contenido en nHA presentan un aspecto más poroso. La adición de grandes cantidades de nanopartículas modifica la estructura del scaffold, dándole una apariencia fibrosa, como podemos observar en las Figuras 6.47 a 6.50.

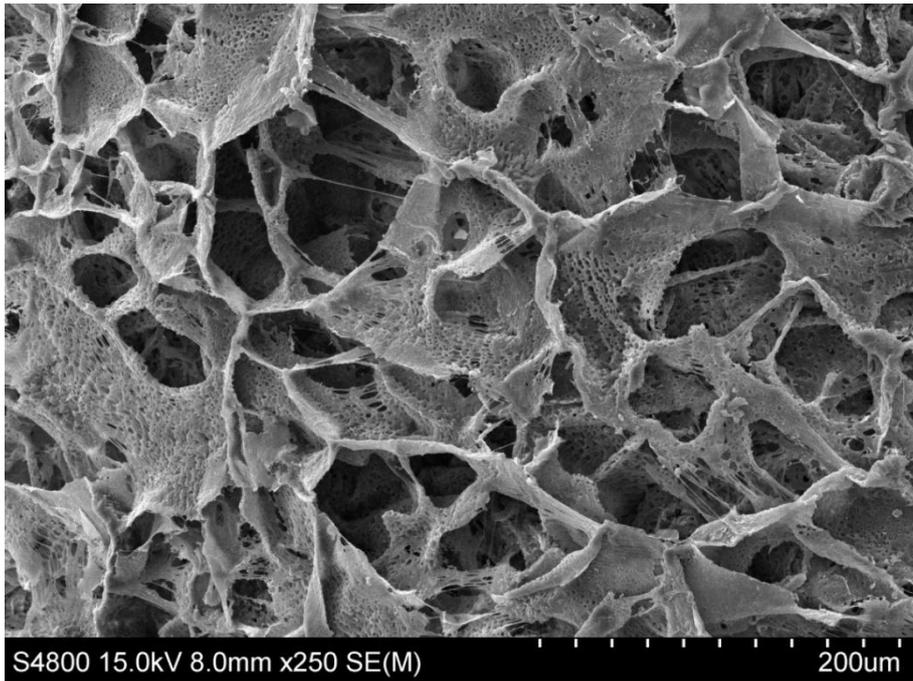
Analizando las Figuras 6.51 a 6.54 vemos que cuanto más tiempo mantenemos el scaffold poroso introducido en PBS para su degradación, más significativo es el engrosamiento de las paredes de los poros.



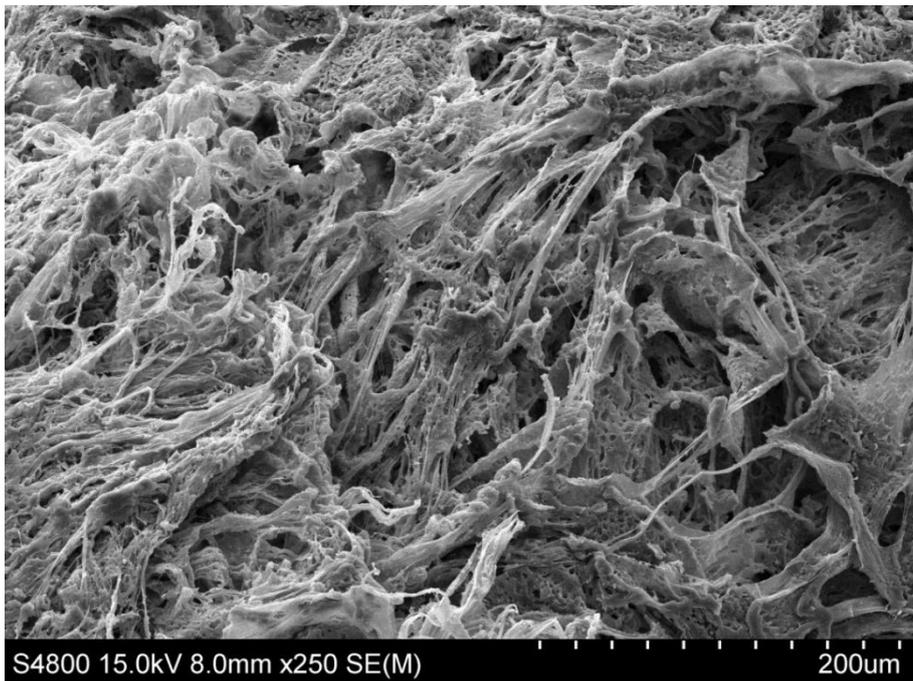
**Figura 6.47.** Micrografía de scaffold de PCL puro sin degradar.



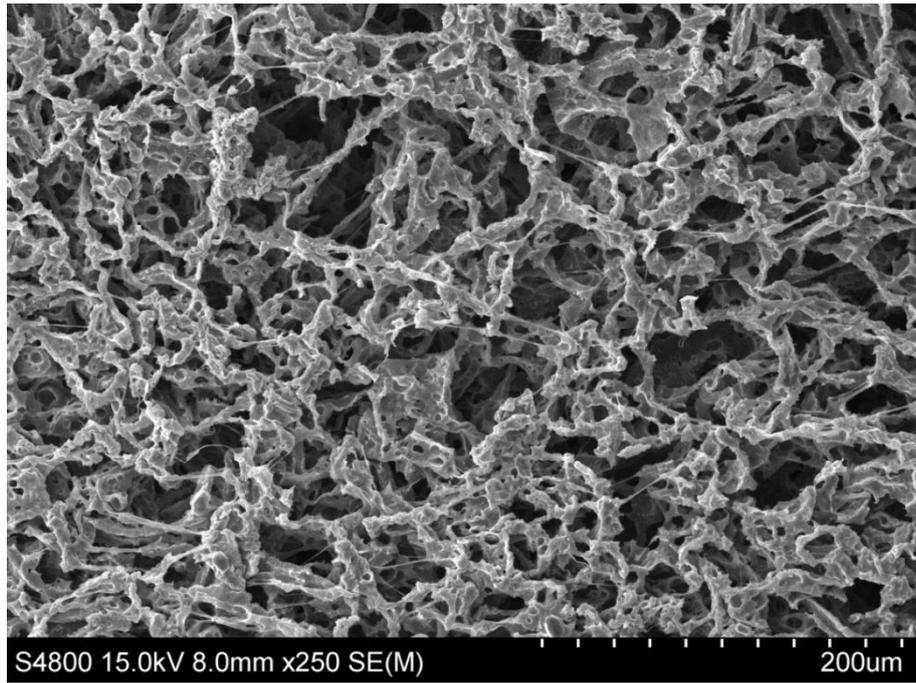
**Figura 6.48.** Micrografía de scaffold de PCL/ 10 % nHA sin degradar.



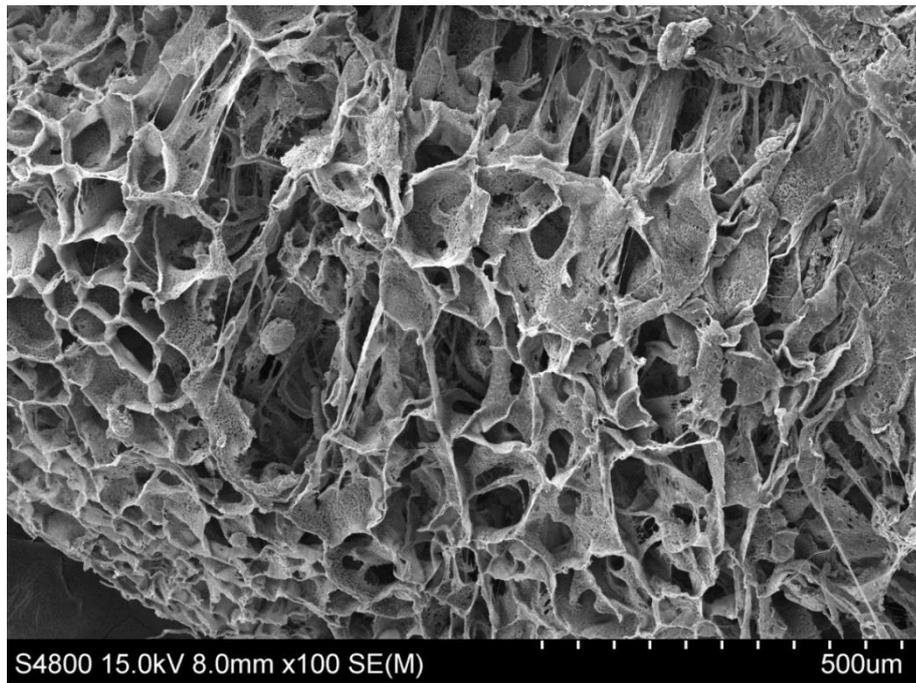
**Figura 6.49.** Micrografía de scaffold de PCL/ 30 % nHA sin degradar.



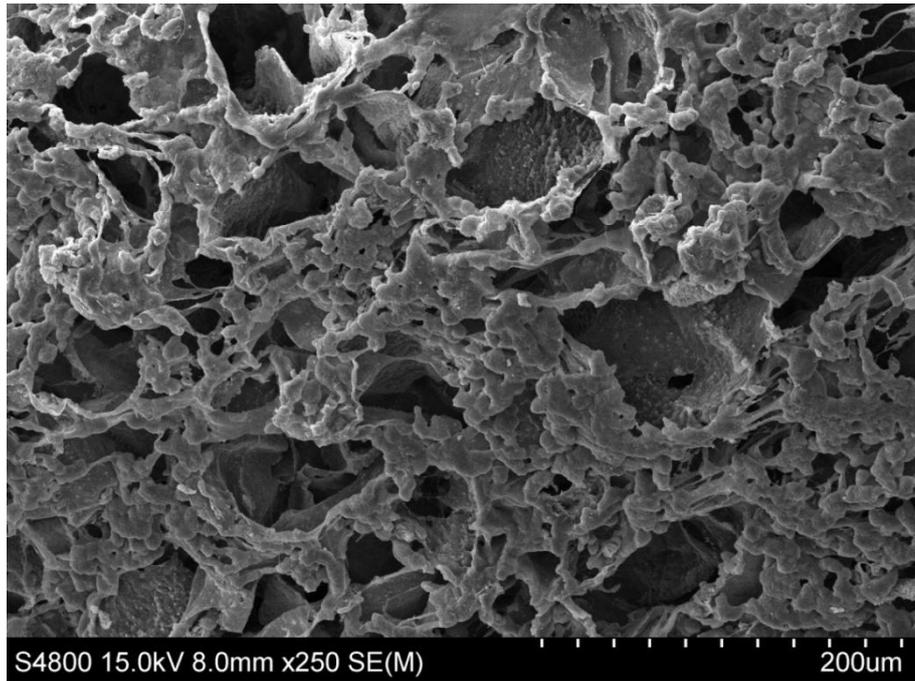
**Figura 6.50.** Micrografía de scaffold de PCL/ 50 % nHA sin degradar.



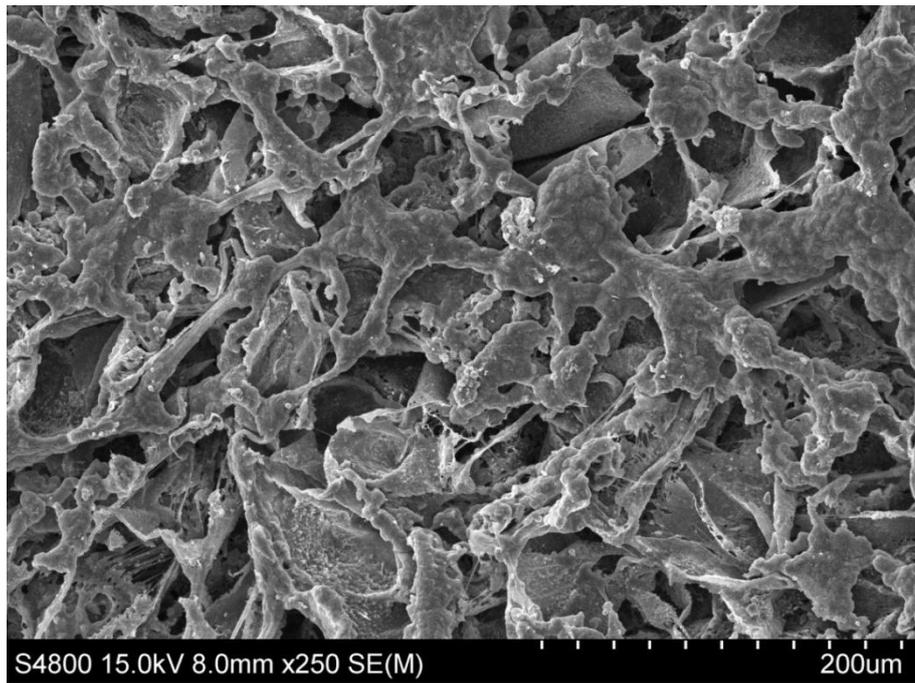
**Figura 6.51.** Micrografía de scaffold de PCL degradado 8 semanas.



**Figura 6.52.** Micrografía de scaffold de PCL/ 10 % nHA degradado 8 semanas.

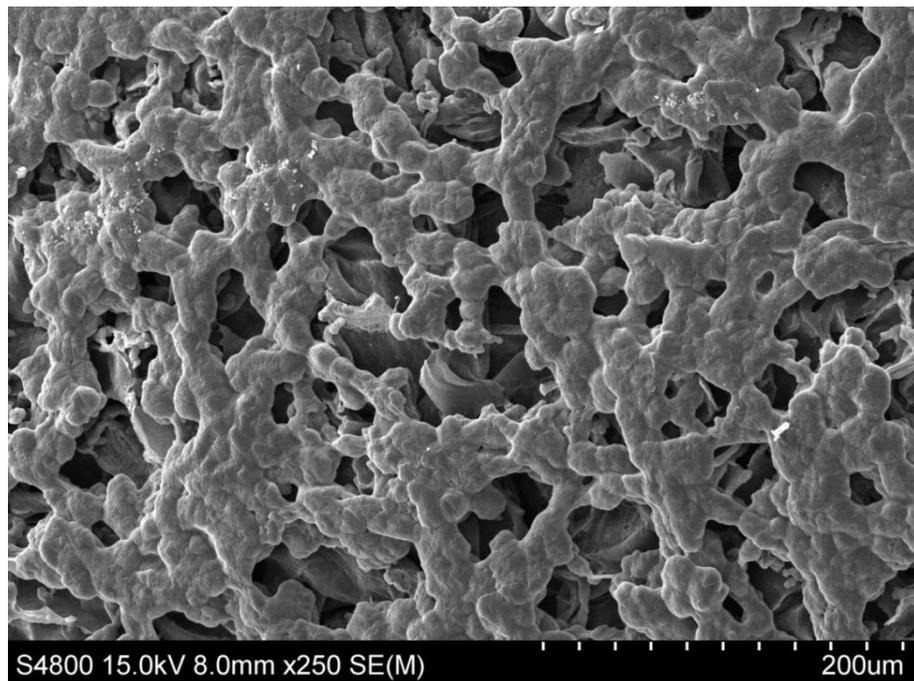


**Figura 6.53.** Micrografía de scaffold de PCL/ 30 % nHA degradado 8 semanas.

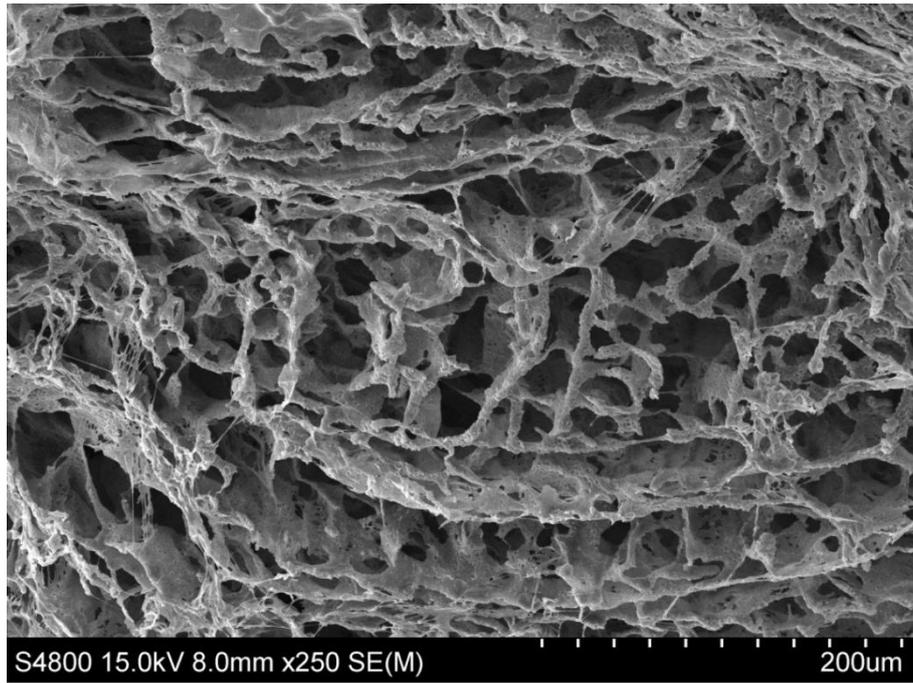


**Figura 6.54.** Micrografía de scaffold de PCL/ 50 % nHA degradado 8 semanas.

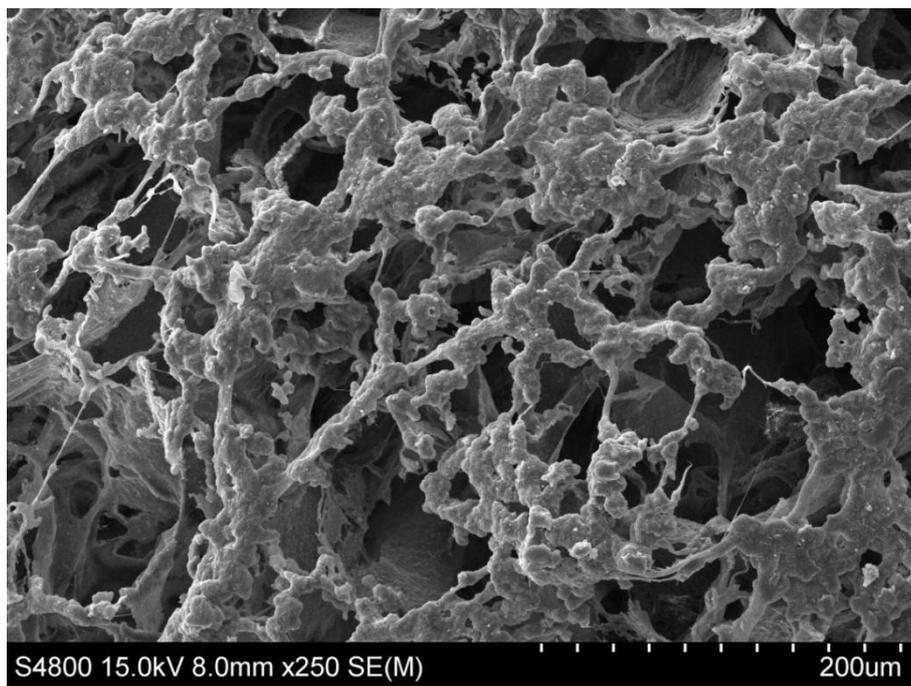
A medida que aumenta el contenido de nHA, se puede apreciar una apariencia más fibrosa, como se observa en las Figuras 6.55 a 6.58, parece como si los poros hayan sido estirados. En las micrografías de estas muestras no aparecen productos de degradación, ni existen partículas de nHA en las partes visibles de las paredes de los scaffolds y no se observa un cambio en la morfología de la superficie de una suave a otra abrupta, como ha sido documentado por otros autores [76- 78].



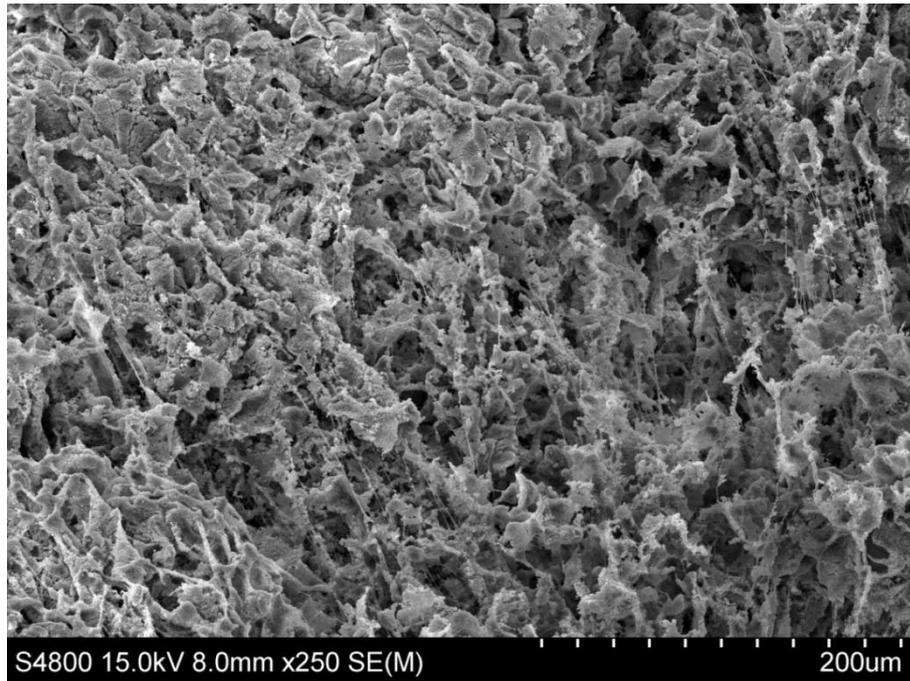
**Figura 6.55.** Micrografía de scaffold de PCL puro degradado 16 semanas.



**Figura 6.56.** Micrografía de scaffold de PCL/ 10 % nHA degradado 16 semanas.



**Figura 6.57.** Micrografía de scaffold de PCL/ 30 % nHA degradado 16 semanas.



**Figura 6.58.** Micrografía de scaffold de PCL/ 50 % nHA degradado 16 semanas.

### 6.3.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

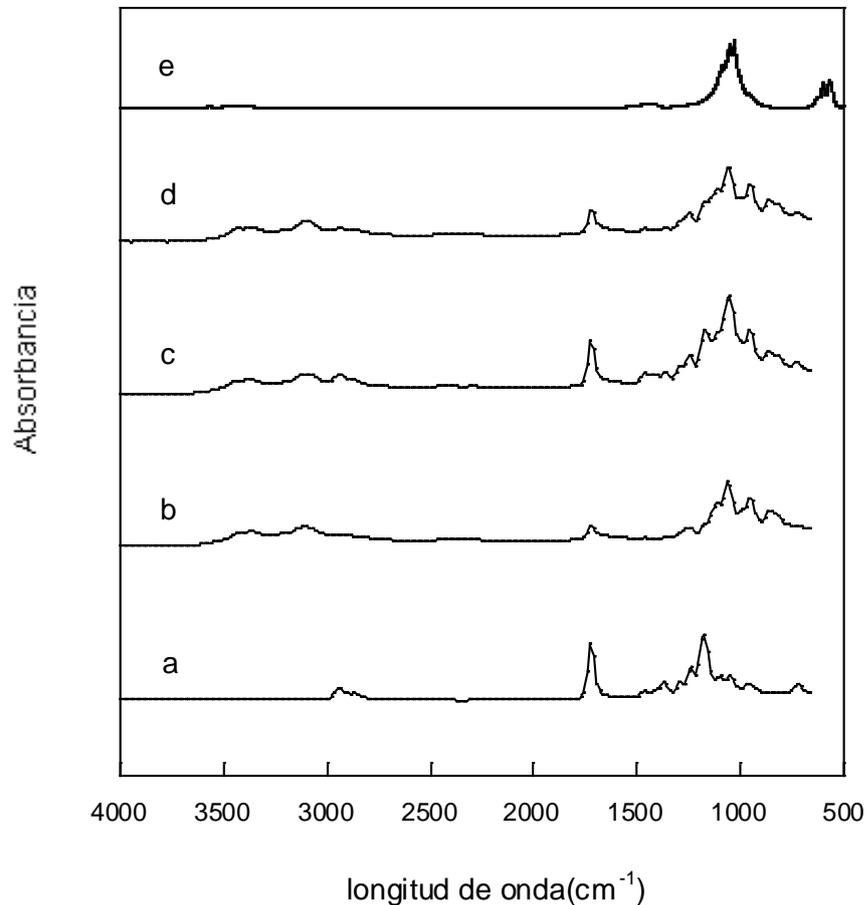
El estudio de FTIR con el uso del ATR nos permitirá identificar los distintos grupos funcionales que existirán en el material, identificando de esta forma la composición del mismo. Además será una herramienta importante a la hora de identificar y verificar los cambios en la composición química, en caso de que los hubiera, tras la degradación hidrolítica de los scaffolds fabricados. La utilización del ATR nos permite estudiar los soportes porosos sin tener que modificar su estado por disolución o preparación de pastillas, es decir, un estudio con las muestras tal como las obtenemos.

En la Tabla 6.8 mostramos las bandas características de absorción de una muestra de PCL y en la Figura 6.59 se pueden ver los espectros de la nHA, así como los del PCL puro y PCL/ nHA.

Longitud de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupos funcionales
600	Vibraciones características de los grupos fosfatos ( $\text{PO}_4^{-3}$ )
630	Estiramientos de los grupos hidroxilo ( $\text{OH}^-$ )
1050	Vibraciones características de los grupos fosfatos ( $\text{PO}_4^{-3}$ )
1160	Estiramientos en la fase amorfa de los grupos C-O y C-C
1170	Estiramiento simétrico del grupo C-O-C
1190	Estiramientos OC-O
1240	Estiramiento asimétrico del grupo C-O-C
1290	Estiramiento en la fase cristalina de C-O y C-C
1730	Estiramiento del grupos funcionales éter (C=O)
2850	Estiramiento asimétrico del grupo $\text{CH}_2$
2865	Estiramiento simétrico del grupo $\text{CH}_2$
3400	Estiramientos de los grupos hidroxilo ( $\text{OH}^-$ )

**Tabla 6.8.** Bandas de absorción IR características para el PCL.

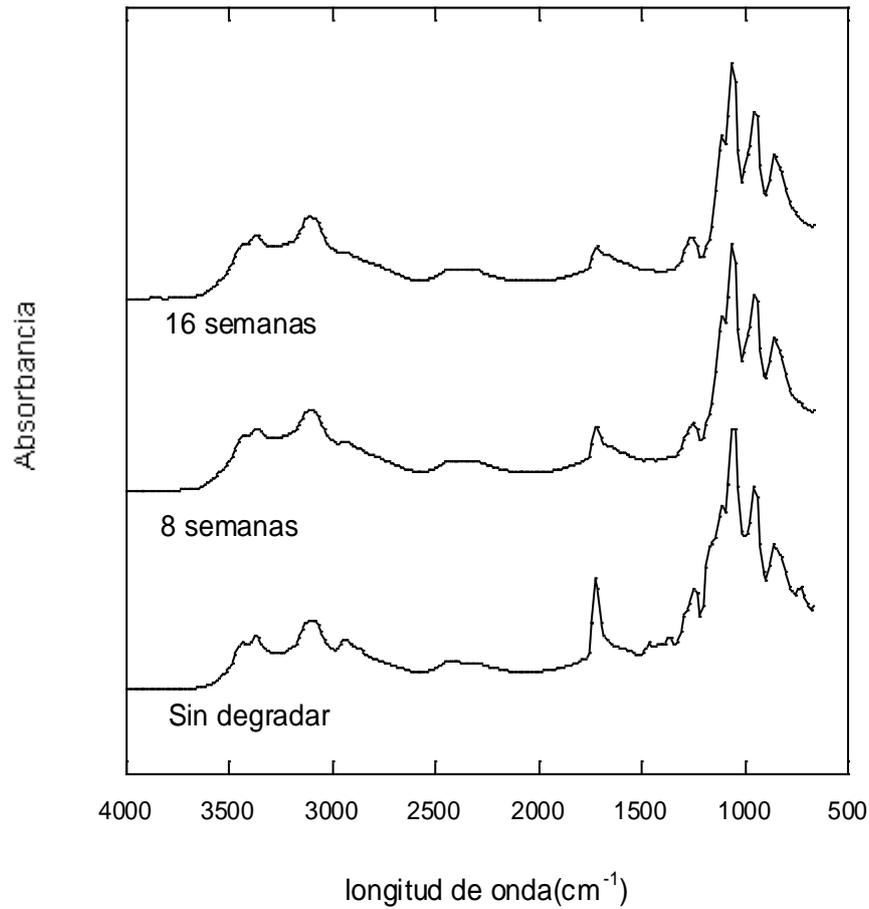
En las Figuras 6.60 a 6.63 podemos observar las diferentes bandas de absorción y su evolución con el tiempo de degradación [79- 81]. Si analizamos estas Figuras, vemos como en el espectro correspondiente a la nHA aparecen unas bandas de absorción alrededor de la longitud de onda  $600 \text{ cm}^{-1}$ , las cuales corresponden a las vibraciones características de los grupos fosfatos ( $\text{PO}_4^{-3}$ ).



**Figura 6.59.** Espectros FTIR de scaffolds de (a) PCL puro, (b) PCL/ nHA 10 % (w/v) (c) PCL/ nHA 30 % (w/v) (d) PCL/ nHA 50 % (w/v) (e) nHA.

Las bandas de absorción aparecidas alrededor de la longitud de onda  $1050\text{ cm}^{-1}$  corresponden también a los grupos funcionales fosfatos. Las bandas de absorción alrededor de la longitud de onda  $1450\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los grupos carbonilos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) de la nHA. Próximas a las longitudes de onda  $630\text{ cm}^{-1}$

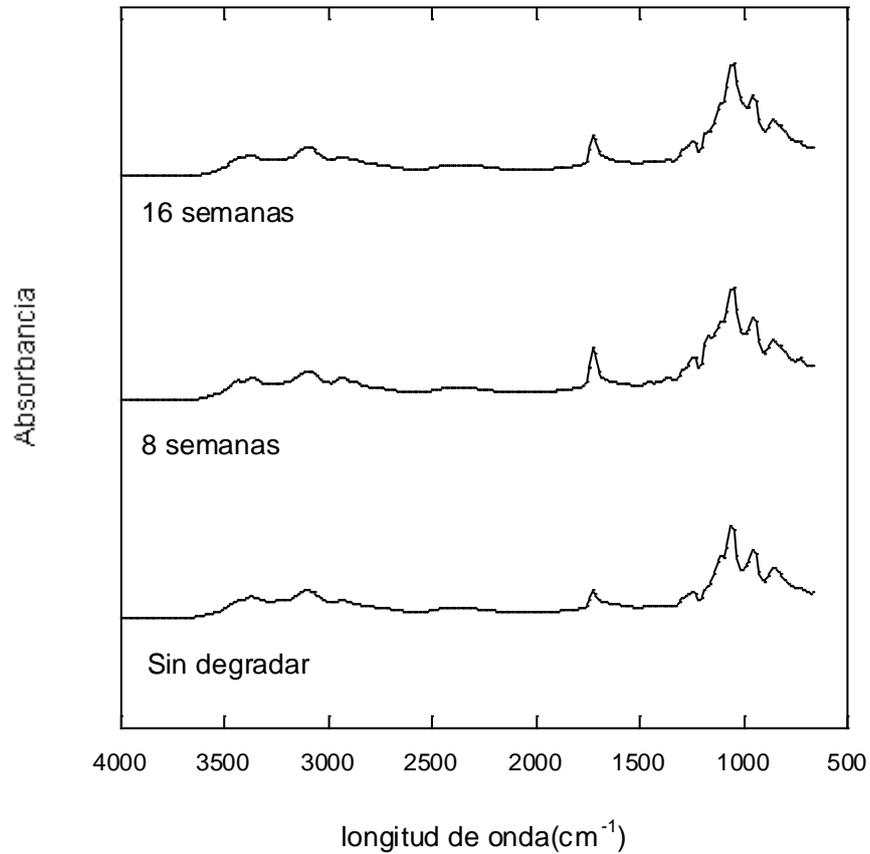
y  $3400\text{ cm}^{-1}$  aparecen las bandas representativas de los grupos hidroxilo( $\text{OH}^-$ ) [82-85].



**Figura 6.60.** Espectros FTIR de scaffolds realizados con PCL a diferentes tiempos de degradación.

Si analizamos los espectros de los scaffolds que contienen PCL, observamos que alrededor de la longitud de onda de  $1000\text{ cm}^{-1}$  hay una banda, que puede ser atribuida a los grupos C-O, o alcoholes primarios. Estos grupos

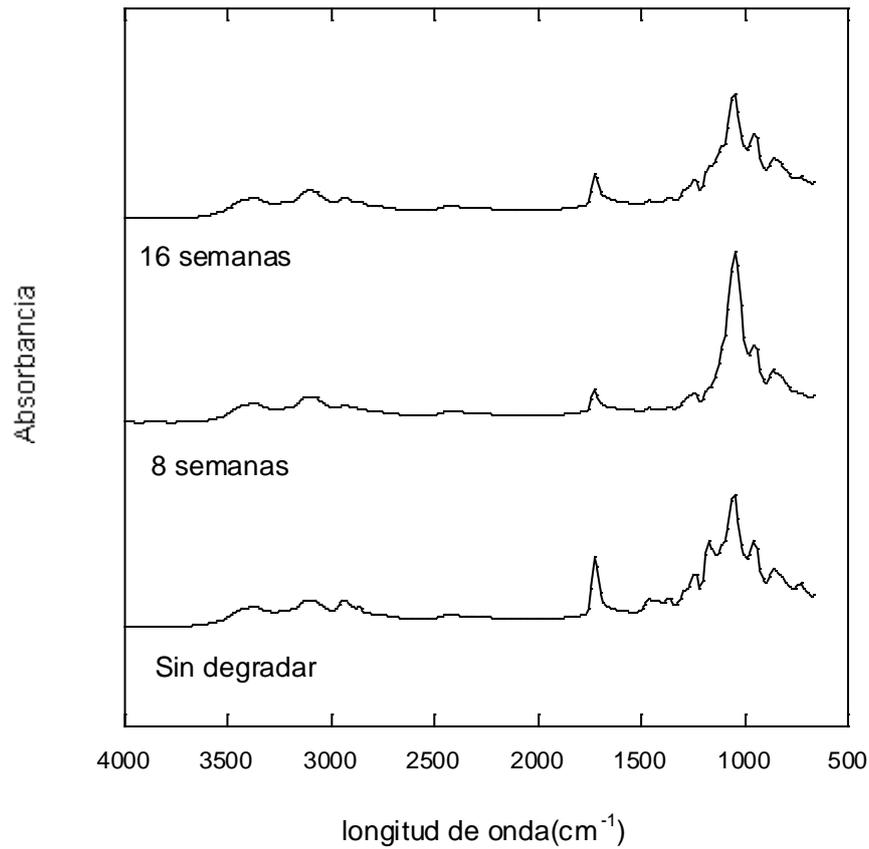
de alcoholes primarios serán también los responsables de la aparición de la banda de absorción en la longitud de onda  $1170\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 6.61.** Espectros FTIR de scaffolds realizados con PCL/ nHA 10 % (w/v) a diferentes tiempos de degradación.

A  $1240\text{ cm}^{-1}$  vemos unas bandas correspondientes a los estiramientos asimétricos de los grupos C-O-C. En los alrededores de la longitud de onda  $1290\text{ cm}^{-1}$  aparecerá otra banda correspondiente, una vez más, al estiramiento de los

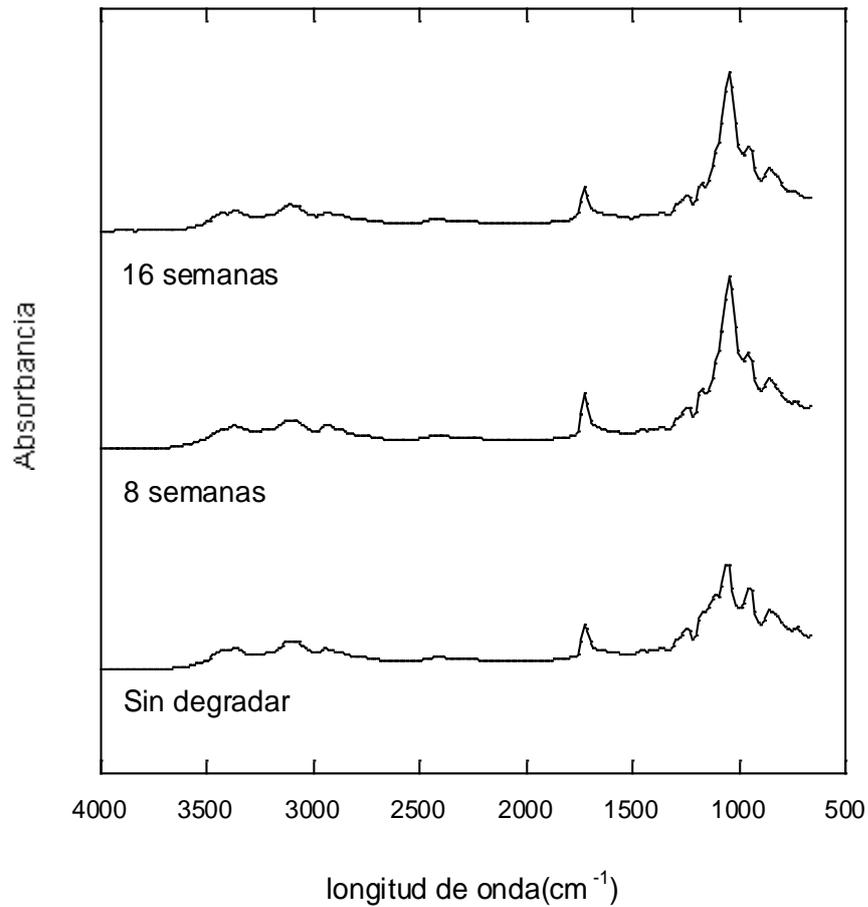
grupos C-O y C-C. Las bandas correspondientes a la longitud de onda  $1730\text{ cm}^{-1}$  se deben al estiramiento de los grupos funcionales éter(C=O).



**Figura 6.62.** Espectros FTIR de scaffolds realizados con PCL/ nHA 30 % (w/v) a diferentes tiempos de degradación.

Las bandas de absorción que aparecen alrededor de la longitud de onda  $2900\text{ cm}^{-1}$  son las debidas al estiramiento, tanto simétrico como asimétrico, de los grupos funcionales  $\text{CH}_2$ .

Por último, podemos observar que las bandas de absorción entre 3000 y 3500  $\text{cm}^{-1}$  pueden ser debidas a la vibración de estiramiento de las bandas OH, de los grupos COOH y  $\text{OH}^-$ .



**Figura 6.63.** Espectros FTIR de scaffolds realizados con PCL/ nHA 50 % (w/v) a diferentes tiempos de degradación.

La banda de absorción correspondiente al grupo carbonilo ( $\lambda=1700 \text{ cm}^{-1}$ ) para las muestras de PCL sin nHA va disminuyendo su intensidad con las

semanas de degradación como se puede apreciar en la Figura 6.60. Esto puede ser debido a la ruptura del enlace carbonilo proveniente del grupo éster del PCL y nos puede permitir realizar un seguimiento del proceso de degradación, ya que la degradación del grupo carbonilo dará lugar a la formación de ácidos y alcoholes.

Durante el período de degradación observamos que desaparecen con el tiempo los grupos ésteres, lo cual indica un ataque hidrolítico en las zonas amorfas. Como hemos indicado, al descomponerse estos grupos ésteres aparecerán grupos ácidos en el medio. Este equilibrio es el que permite explicar la ausencia de fluctuaciones considerables en el pH del medio de degradación.

### **6.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).**

La técnica de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica experimental que nos permitirá determinar parámetros tan importantes como  $\Delta H_m$ ,  $T_g$ ,  $T_c$  y su evolución con las semanas de degradación y el contenido de nanopartículas.

La policaprolactona es un polímero cuya degradación ocurre mediante la escisión por hidrólisis de sus enlaces éster. La cinética de degradación de la PCL responde, en gran medida, al peso molecular del mismo, es decir, a mayor longitud de las cadenas poliméricas que lo forman mayor tiempo de degradación. Existen otros factores, como la cristalinidad o la polimerización que afectarán también a su degradación.

La degradación de la PCL se da en dos etapas [86]. En la primera etapa ocurre una degradación de los scaffolds sin pérdida de masa. En la segunda etapa de la degradación es en la que ocurrirá la pérdida de masa del scaffold analizado [87- 89].

La degradación de la PCL comienza por la parte amorfa del polímero [90]. Una vez que la mayoría de los enlaces en la parte amorfa están rotos, comienza la degradación de la parte cristalina. Esto ocurre así debido a que la mayor libertad de movimiento de las cadenas poliméricas, en las zonas amorfas en comparación con la zona cristalina, hace que la zona amorfa se degrade con más rapidez [91].

Para realizar la caracterización mediante la técnica de DSC hemos realizado diversos barridos a las muestras estudiadas. Primeramente hemos realizado un calentamiento de las muestras desde  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con una velocidad de calentamiento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ . Con este primer barrido obtendremos información sobre el estado actual del polímero, así como de su morfología además nos permitirá conocer tanto la temperatura de fusión ( $T_m$ ) como la entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ). Mediante estas entalpías de fusión, y conociendo la entalpía de fusión de la PCL 100 % cristalina ( $\Delta H_0=136\text{ J/g}$ ) [92, 93] podremos calcular la cristalinidad de cada una de las muestras analizadas.

En segundo lugar enfriaremos la muestra hasta  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  de nuevo, pero esta vez con una velocidad de enfriamiento de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ , para acabar con un nuevo calentamiento hasta los  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nuevamente a una velocidad de calentamiento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ . Con este barrido estudiaremos tanto el equilibrio de nuestro polímero, como su historia térmica. Además obtendremos la

temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), la cual nos dará una idea sobre el movimiento de las cadenas poliméricas. También obtendremos tanto la temperatura de cristalización ( $T_c$ ), como la entalpía de cristalización ( $\Delta H_c$ ).

En las tablas 6.9, 6.10 y 6.11 observamos que la adición de nHA no afecta significativamente a las propiedades térmicas de los distintos scaffolds de PCL. Esto puede ser debido a que la unión entre las partículas de nHA y la PCL no es lo suficientemente fuerte como para dificultar en demasía la movilidad de las cadenas poliméricas [94].

Tiempo de degradación (semanas)	$T_c$ (°C)	$T_c$ (°C)	$T_c$ (°C)	$T_c$ (°C)
	PCL	PCL/ 10% nHA	PCL/ 30% nHA	PCL/ 50% nHA
<b>0</b>	18,9	21,4	22,8	22,5
<b>1</b>	20,1	22,6	22,0	22,8
<b>2</b>	20,7	22,4	20,8	22,7
<b>3</b>	21,2	22,5	23,1	22,7
<b>4</b>	21,8	21,0	22,3	22,8
<b>6</b>	22,8	23,8	24,3	23,0
<b>8</b>	21,0	23,7	25,2	23,1
<b>12</b>	21,9	23,2	24,1	24,0
<b>16</b>	22,1	23,0	23,7	24,1

**Tabla 6.9.**  $T_c$  para los scaffolds fabricados con PCL en función del tiempo de degradación.

En la Tabla 6.9 observamos que la  $T_c$  varía más en los andamios que contienen mayor cantidad de nHA. Esto puede ser debido a que la presencia de nHA favorece la rigidez de las cadenas poliméricas, aumentando de esta forma su  $T_c$ . También puede influir en este comportamiento el efecto que tiene la nHA en la nucleación de la PCL [95].

En lo referente a la temperatura de fusión ( $T_m$ ), podemos observar en la Tabla 6.10 que ésta aumenta con el tiempo de degradación, aunque inicialmente disminuya. Este comportamiento coincide con la variación de cristalinidad de los scaffolds, como se puede comprobar en la Tabla 6.11.

Observamos que inicialmente, cuanto menor es el contenido en nHA de la muestra menor es su  $T_m$ . Tras el período de degradación podemos observar que las  $T_m$  son mayores cuanto mayor es el contenido en nHA de la muestra estudiada. Esto quiere decir que la variación de la  $T_m$  es mayor cuando mayor es la cantidad nHA presente en la muestra analizada [96]. Estos resultados son refrendados por la mayor velocidad de degradación de los scaffolds que contienen menor cantidad de nHA.

En lo referido a la cristalinidad, observamos en la Tabla 6.11, que ésta se reduce con el aumento en la cantidad de nHA en las muestras estudiadas.

Esto puede ser debido a que la presencia de nHA obstaculiza la formación de los núcleos de cristalización del polímero, disminuyendo de esta forma su cristalinidad. Dicho de otra forma, las partículas de nHA ocupan el espacio necesario para el crecimiento del cristal. Además, este comportamiento coincide con la mayor variación de la cristalinidad en los andamios con mayor cantidad de

nHA, corroborando que la degradación es mayor, cuanto mayor es el contenido de nHA en las muestras.

Tiempo de degradación (semanas)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)
	PCL	PCL/ 10% nHA	PCL/ 30% nHA	PCL/ 50% nHA
<b>0</b>	59,4	59,3	59,5	60,2
<b>1</b>	66,6	66,5	67,1	63,7
<b>2</b>	64,6	64,1	64,4	64,1
<b>3</b>	67,4	64,2	64,3	64,2
<b>4</b>	67,4	64,4	64,6	64,0
<b>6</b>	67,4	64,3	67,3	67,5
<b>8</b>	65,1	64,3	65,9	63,7
<b>12</b>	68,3	64,6	64,7	67,4
<b>16</b>	67,3	64,6	64,5	63,3

**Tabla 6.10.** *T<sub>m</sub> para scaffolds producidos con PCL en función del tiempo de degradación.*

La cristalinidad disminuye inicialmente, para aumentar posteriormente debido a la degradación de la parte amorfa del polímero mediante hidrólisis, ya que a mayor tiempo de degradación la cristalinidad será mayor, puesto que inicialmente se degrada la parte amorfa del polímero [97].

Hemos observado que como más adelante comprobaremos, a mayor cantidad de nHA, la muestra se degradará más rápidamente. Esto puede ser debido a que el polímero se convierte en más hidrofílico, disminuyendo su cristalinidad [98].

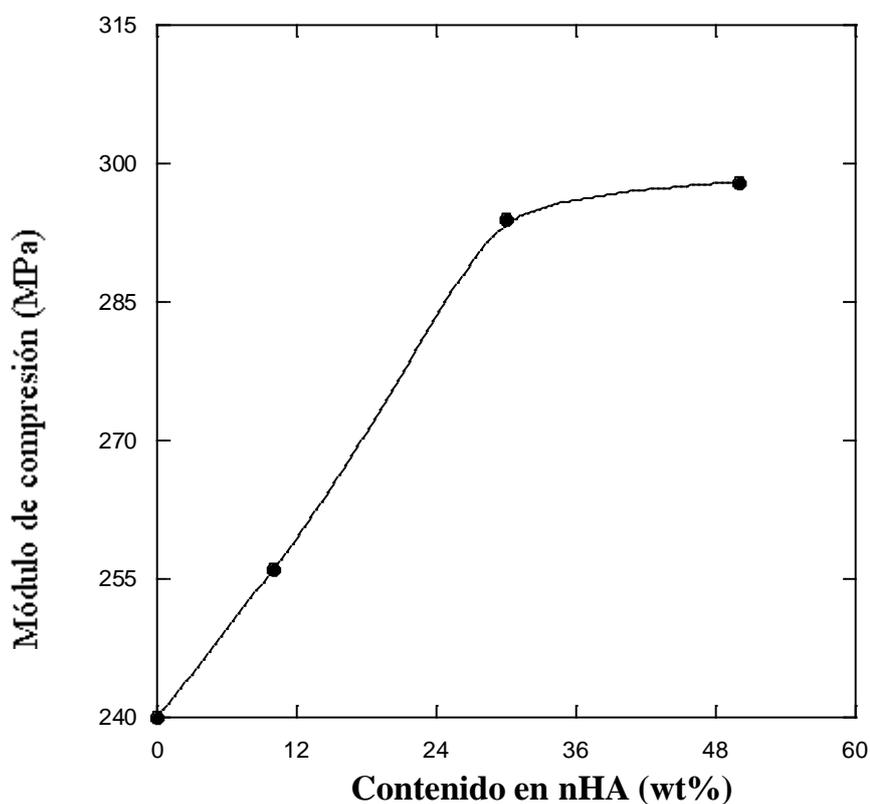
Tiempo de degradación (semanas)	X <sub>c</sub> (%)	X <sub>c</sub> (%)	X <sub>c</sub> (%)	X <sub>c</sub> (%)
	PCL	PCL/ 10%nHA	PCL/ 30%nHA	PCL/ 50% nHA
<b>0</b>	41,8	36,3	37,0	31,2
<b>1</b>	39,2	33,7	29,3	20,9
<b>2</b>	38,8	34,7	30,0	24,5
<b>3</b>	38,4	34,0	29,6	24,4
<b>4</b>	38,7	35,0	30,0	24,6
<b>6</b>	39,6	35,8	29,6	26,9
<b>8</b>	40,1	35,5	24,2	25,4
<b>12</b>	39,2	36,0	30,1	28,6
<b>16</b>	38,7	36,8	29,6	25,7

**Tabla 6.11.** *Cristalinidad de scaffolds realizados con PCL y su variación con el tiempo de degradación.*

#### 6.3.4. Propiedades mecánicas.

La reconstrucción de las secciones de hueso dañadas es necesaria para restaurar la estructura y funcionalidad del tejido afectado. Los scaffolds actúan como un portador y transporte de proteínas y factores de crecimiento, mientras soportan la carga que debería soportar el tejido (hueso) a reparar o sustituir, hasta que éste se haya reparado o restaurado lo suficiente. Debido a esto es importante en nuestra investigación el análisis de las propiedades mecánicas durante el proceso de degradación.

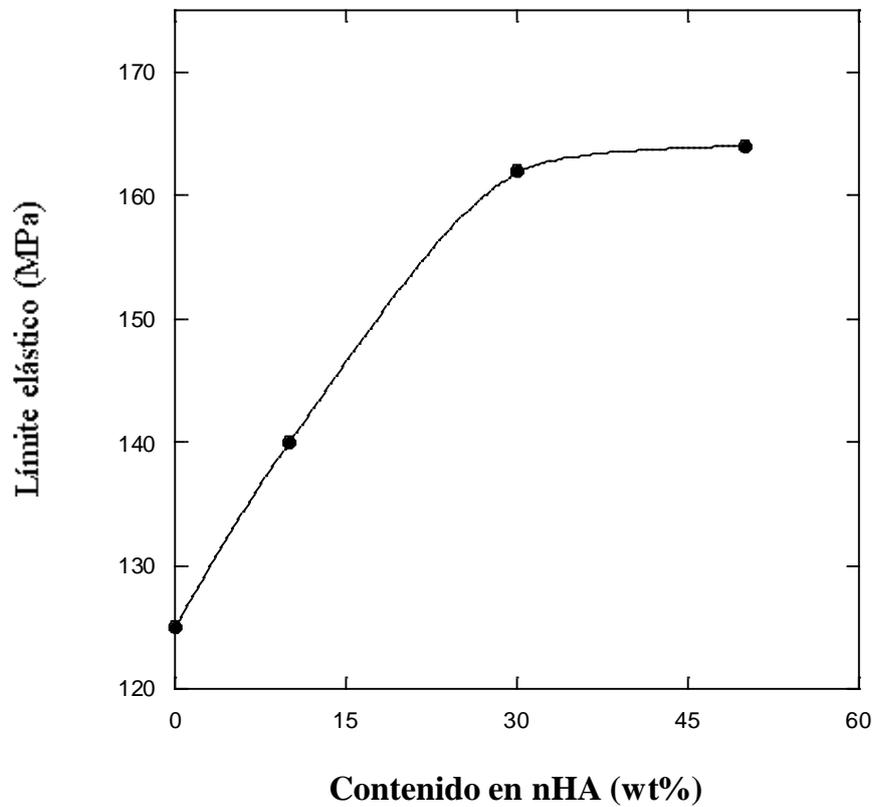
Se ha encontrado que en una gran cantidad de variedad de scaffolds realizados con distintos polímeros, como PLLA y DLGA, las propiedades mecánicas tenían una dependencia directa de la estructura del poro existente, así como de la morfología de las paredes porosas. Las propiedades mecánicas, como el módulo de compresión y la resistencia de fluencia, se puede observar en las Figuras 6.64 y 6.65 en función del periodo de degradación.



**Figura 6.64.** Módulo de compresión en función del contenido en peso de nHA.

También se puede observar que estas propiedades mecánicas aumentan linealmente con la adición de partículas de nHA [99, 100], exceptuando la

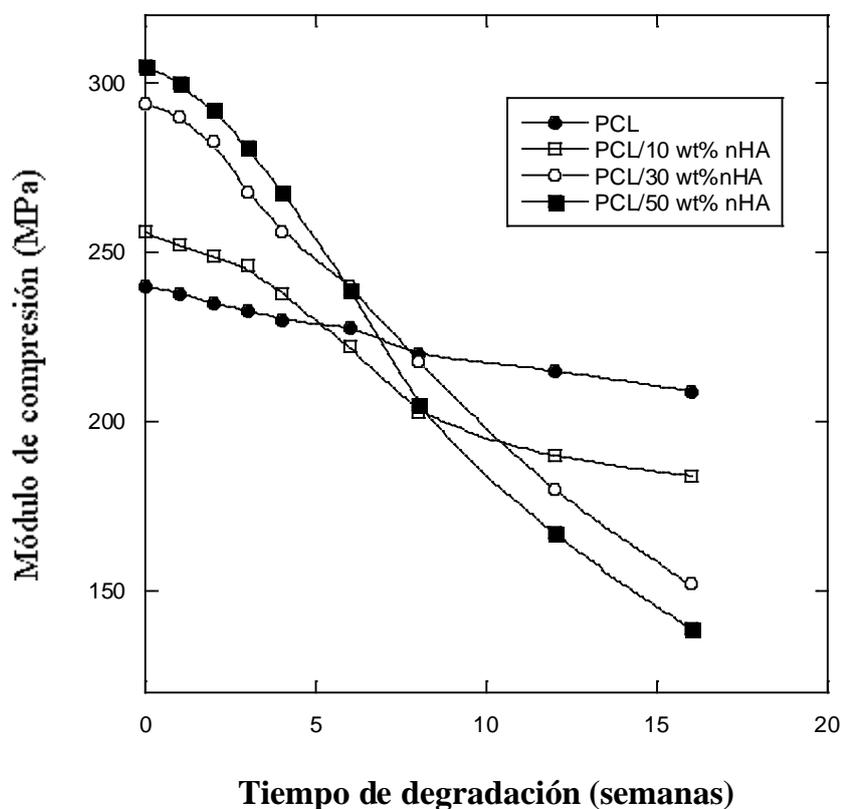
muestra con mayor contenido de nHA en la cual se mantiene constante. Esta diferencia puede ser debido al repentino cambio en la morfología del scaffold, el cual adquiere apariencia fibrosa debido a las altas concentraciones de nanopartículas. La influencia de las partículas de nHA es importante, a pesar de su tamaño nanométrico y distribución uniforme.



**Figura 6.65.** Variación del límite elástico en función del contenido en peso de nHA.

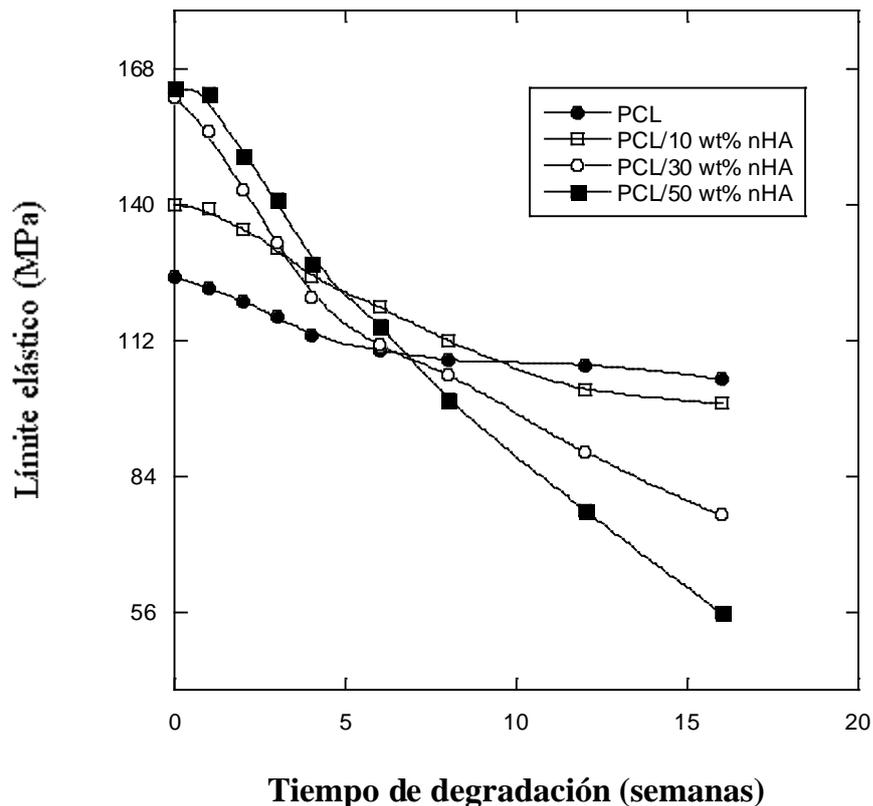
En las Figuras 6.66 y 6.67 podemos observar el módulo de compresión, así como la resistencia a la fluencia en función del tiempo de degradación. Estas propiedades mecánicas decrecen continua y lentamente desde la primera semana.

Las muestras con mayor porcentaje de nHA alcanzan valores bajos tras 12 semanas de degradación. Sin embargo mientras las muestras realizadas con PCL puro conservaran sus propiedades mecánicas con el paso del tiempo de degradación, el proceso de degradación afecta más drásticamente a las muestras que contienen nHA. A partir de la doceava semana de degradación tiene lugar una escisión aleatoria de las cadenas poliméricas mediante hidrólisis, produciéndose de esta forma una reducción en el peso molecular de las mismas.



**Figura 6.66.** Módulo de compresión frente a tiempo de degradación.

En la policaprolactona las regiones amorfas son más susceptibles de sufrir un ataque por hidrólisis que las densas regiones cristalinas, por lo que esta escisión hidrolítica se producirá en las primeras. Si las moléculas de agua pueden difundirse en el interior del polímero posibilitan a los monómeros u oligómeros producidos la difusión de los mismos hacia la parte exterior del polímero, la erosión del mismo ocurrirá de forma gradual y se logrará un equilibrio para este fenómeno de reacción-difusión.



**Figura 6.67.** Límite elástico frente a tiempo de degradación.

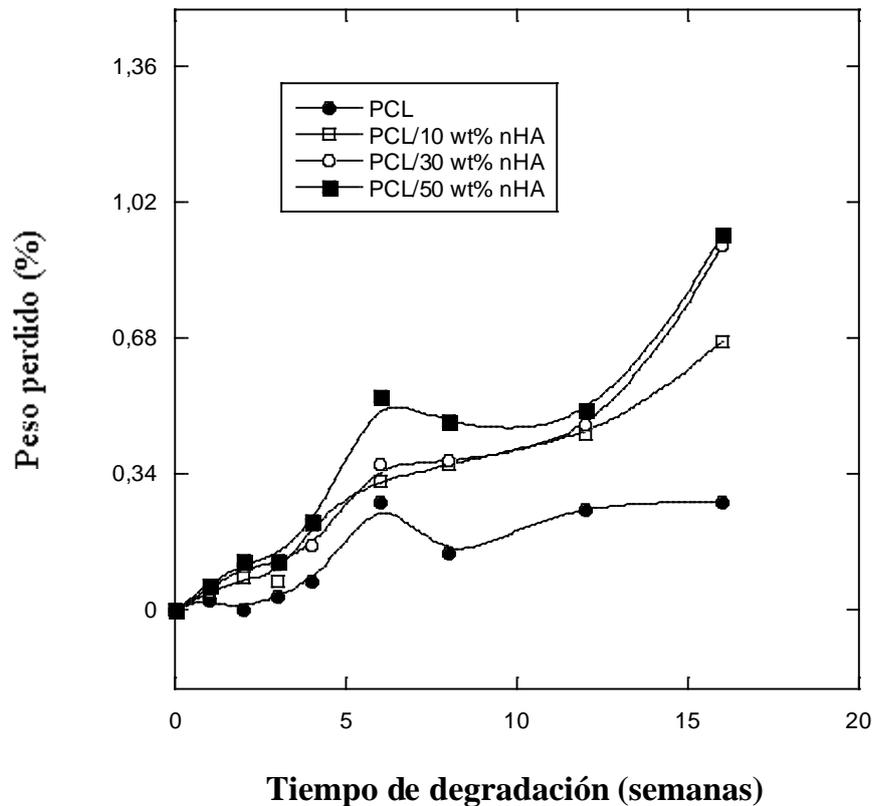
En caso de variarse este equilibrio alcanzado, el mecanismo de degradación puede causar una autocatálisis interna debido a los subproductos con grupos terminales carboxilo o hidroxilo. El estudio de la PCL no detecta evidencias de una catálisis interna durante el periodo de degradación, como se puede observar por la distribución uniforme del peso molecular durante el mismo, y el estudio de la sección de los scaffolds. Los resultados obtenidos para las propiedades mecánicas no son comparables con los obtenidos por otros autores [101, 102]. Esto puede ser debido a las diferentes técnicas de fabricación de scaffolds usadas ya que crearemos scaffolds con diferente morfología y porosidad.

#### **6.3.5. Pérdida de masa.**

La Figura 6.68 muestra el peso perdido por los scaffolds estudiados de PCL y PCL/ nHA durante el tiempo de degradación en una solución PBS, con un pH de 7.2, a 37 °C. La velocidad de degradación de los polímeros, como hemos indicado anteriormente, se verá afectada por su estructura, peso molecular y otras características estructurales. El PCL es un polímero hidrofóbico y dispone de una estructura con una alta cristalinidad, lo cual no permite una rápida penetración del agua en el interior del mismo, lo que explica el largo periodo de degradación del mismo.

Aunque el mecanismo de degradación del PCL es conocido, con una escisión hidrolítica de los enlaces éster de las cadenas poliméricas, la cinética de degradación es relativamente menor que la de otros poliésteres biodegradables, como el PLLA o el DLGA. En la Figura 6.68 observamos cómo tras la semana 16

de degradación, el peso perdido por la muestra de PCL es muy pequeño, alrededor del 0.2 %, aunque las muestras con mayor contenido de nHA experimentan una mayor pérdida de peso [103]. Esto puede ser debido a que las muestras que contengan nHA incrementen la velocidad de degradación. Esto último debe estar en coherencia con los resultados obtenidos en la GPC.

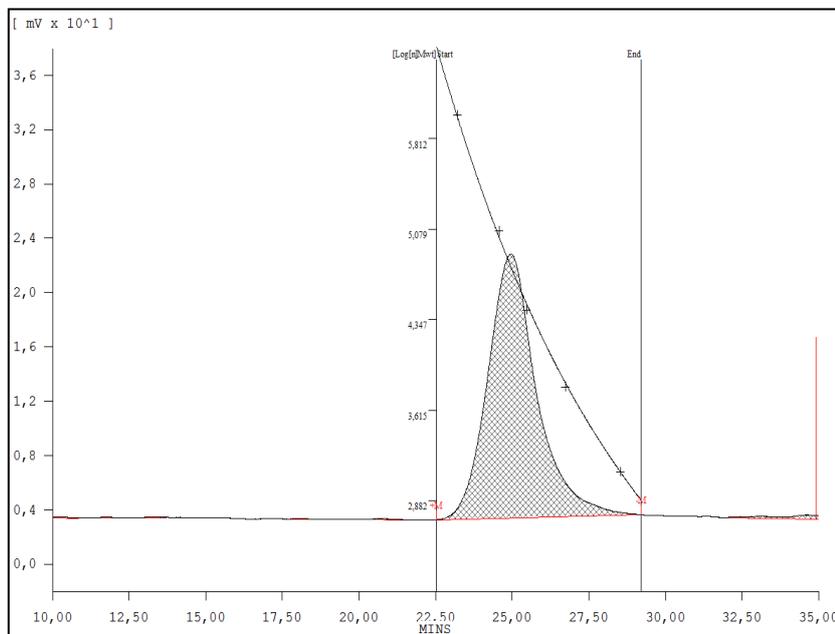


**Figura 6.68.** *Peso perdido en función del tiempo de degradación.*

### 6.3.6. Variación de peso molecular y polidispersidad.

La cromatografía de permeación de gel (GPC) es uno de los indicadores más valiosos para detectar el proceso de degradación en un scaffold. Con ella podemos obtener el peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ), el peso molecular

promedio en número ( $M_n$ ) así como la polidispersidad ( $I$ ) de nuestra muestra. Durante el proceso de degradación se va a producir una escisión de las cadenas macromoleculares como consecuencia del proceso de hidrólisis. Si se trata de un proceso de degradación en bloque tendremos que observar una disminución del peso molecular y un aumento de la polidispersidad, es decir, cadenas más cortas y con diferente peso molecular. En la Figura 6.69 podemos observar un cromatograma del PCL con un 50 % de nHA (w/v).

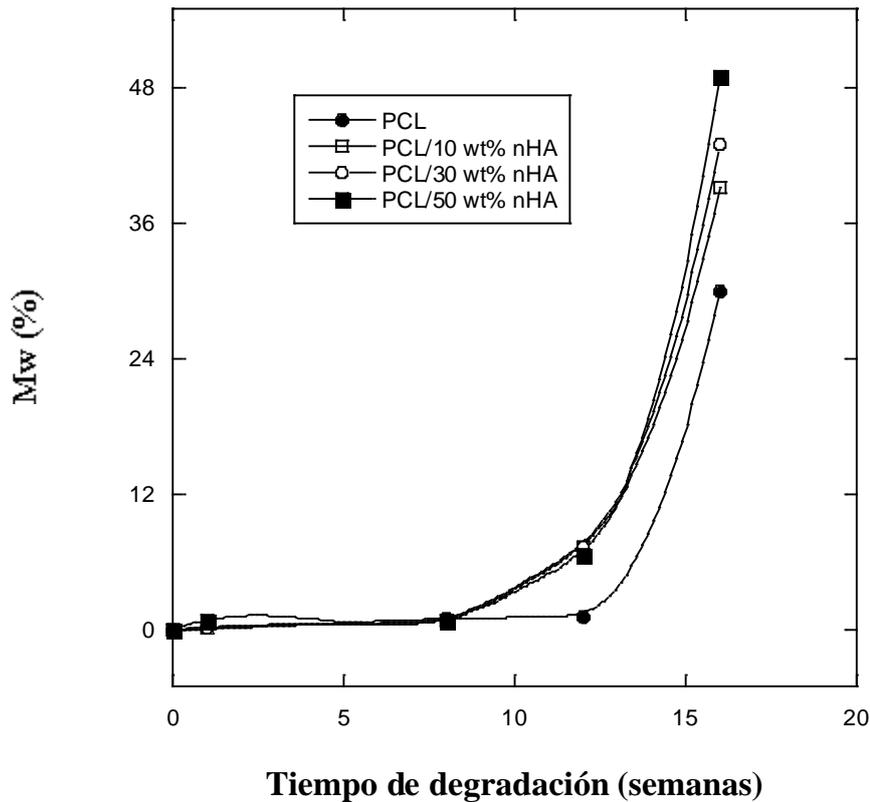


**Figura 6.69.** Cromatograma de PCL/ 50 % nHA.

Los cambios en el proceso de degradación in vitro supone una alteración de la estructura del scaffold, lo cual implica una degradación de la cadena polimérica, y por tanto una disminución en el peso molecular de las cadenas que forman el scaffold durante el tiempo que esté inmerso en el PBS, como podemos

observar en la Figura 6.70. Si nos fijamos en esta figura, podemos ver que la ruptura de las cadenas poliméricas es muy pequeña hasta la semana 12 de degradación, donde hay una pequeña variación en el peso molecular de las mismas. Sin embargo tras la semana 16 el peso molecular del scaffold realizado únicamente con PCL se vio reducido en un 30 %, mientras que los scaffolds realizados con un 10, 20 y 50 % en peso de nanohidroxiapatita, se redujeron en un 39, 43, y 49 % respectivamente. Los índices de polidispersidad para todas las muestras han aumentado, desde 1.37 hasta 1.67 durante el período estudiado, no detectándose ninguna prueba de autocatálisis interna, evidenciada por la distribución uniforme del peso molecular con el tiempo y el examen de la sección transversal.

Esta conducta sugiere que las partículas de nHA actúan como un acelerador de la velocidad de degradación en PBS. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos con polímeros como el PLLA y copolímeros como el DLGA. Otros autores, en estudios del sistema PCL/ nHA han obtenido resultados que muestran una mayor pérdida de peso con la degradación, pero sin embargo la variación en el peso molecular de los mismos eran muy pequeña. Esto puede ser debido a las diferentes técnicas de fabricación de scaffolds utilizada, lo que conllevará diferente morfología del scaffold. Esta diferente morfología hará que los mecanismos de degradación de scaffolds diferentes sean distintos. En nuestro caso la importante pérdida de peso molecular durante la degradación nos indica que en nuestro caso el mecanismo de degradación es el mecanismo de degradación en bloque.



**Figura 6.70.** Variación del peso molecular promedio en función del tiempo de degradación.

### 6.3.7. Absorción de agua.

La degradación hidrolítica ocurre en cuatro etapas diferenciadas. En la primera etapa ocurre la absorción y difusión del agua en el interior del polímero. A continuación, en la segunda etapa, ocurre la reacción de hidrólisis debido a la autocatálisis de los grupos ácidos situados en el final de las cadenas poliméricas.

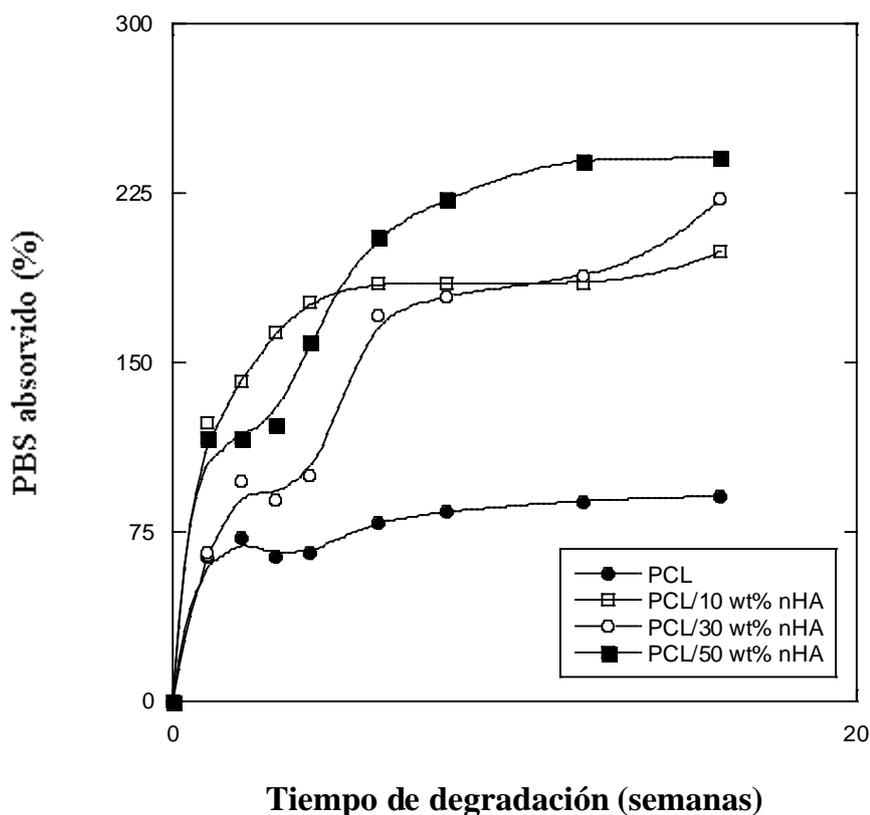
En la tercera etapa se alcanza un peso molecular crítico, comenzando los oligómeros a salir fuera del bloque polimérico. Una vez ocurrido esto, el agua

ocupará el espacio en el que anteriormente se encontraban los oligómeros, estimulando, de esta forma, la difusión de los mismos. De esta forma ocurre un aumento en la liberación de nHA, así como una gran disminución de la masa del polímero. En la etapa final de la degradación, ésta aumenta de forma lenta y homogénea, incrementándose mucho la porosidad.

La Figura 6.71 muestra el tanto por ciento (%) de agua absorbida por las diferentes muestras en función del tiempo de degradación. Esta gráfica de absorción de agua nos muestra que la introducción de partículas bioactivas en los scaffolds aumenta la capacidad para absorber agua en el periodo inicial de degradación.

Esta capacidad varía dependiendo del contenido en nHA de la muestra. La máxima velocidad de absorción tiene lugar hasta la sexta semana de degradación. La muestra producida únicamente con PCL llega al equilibrio en la absorción de agua, lo cual no se observa en las otras muestras. Estos cambios en la absorción de agua son el resultado del equilibrio entre la disolución de los oligómeros en la solución PBS y la absorción del mismo en el material residual restante.

En otras palabras, la velocidad de absorción se reduce debido a la disolución de los productos de degradación. Existen muchos factores, como la morfología y los productos ácidos de la degradación, que modifican la misma cuando la realizamos in vitro.



**Figura 6.71.** Absorción de PBS del PCL/ nHA en función del tiempo de degradación.

### 6.3.8. Variación del pH.

Con los cambios de pH en la solución de PBS con el tiempo de degradación comprobaremos cual ha sido el nivel de liberación de los residuos ácidos de los scaffolds, ya que a mayor formación de productos mayor es la disminución del pH del medio acuoso.

La Figura 6.72 nos muestra los cambios ocurridos en el pH de las muestras de los scaffolds compuestos por PCL y PCL/ nHA en diversas proporciones en función del tiempo de degradación.

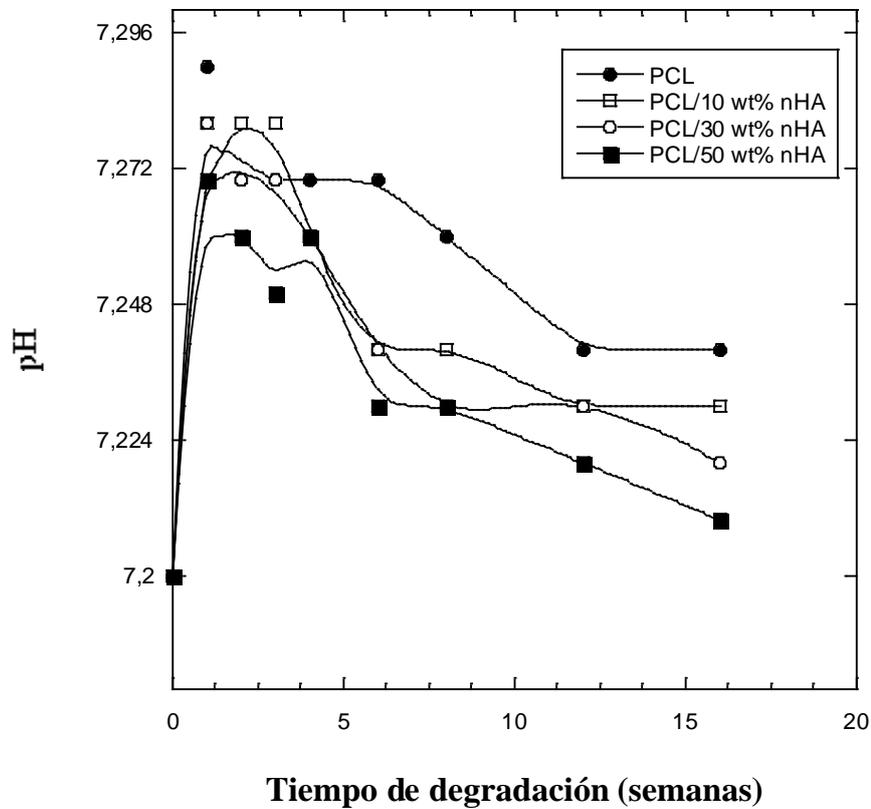
El cambio del pH del medio acuoso en función del tiempo de degradación se determinó para comprobar la liberación de residuos ácidos de las muestras realizadas. Esto también proporciona información sobre la producción total de radicales ácidos durante la degradación.

El pH alcanza su valor más alto durante la primera semana de degradación, y es mayor en la muestra con menor contenido de nHA. Se observa una tendencia lineal para todas las muestras a partir de la semana 6, que tiende a reducir los valores iniciales de pH. Este comportamiento es más claro en las muestras con alto contenido de nHA.

El pH de las muestras de PCL y PCL/ nHA con un 10 % en peso de nanopartículas, se estabiliza tras la décima semana. La incorporación de partículas de nHA en los scaffolds causa una reducción en el pH del medio, tras el tiempo de degradación, como podemos observar en la Figura 6.72.

Otros autores [104] encontraron que la adición de partículas bioactivas compensan la acidificación del PBS debido a los subproductos ácidos producidos en la degradación polimérica, pero en este caso esas partículas tienen un efecto opuesto, acelerando la velocidad de degradación.

En el caso de la degradación de la masa del polímero, la concentración interna de los productos de autocatálisis produce un gradiente ácido, mientras que los grupos terminales carboxilo generados durante la división de los enlaces éster se acumulan. Esto a su vez aumenta la degradación en el interior del scaffold, en contraposición con la degradación superficial, manteniéndose en la parte exterior o superficial del scaffold cadenas de un mayor peso molecular y un soporte degradado interiormente con cadenas de menor peso molecular.



**Figura 6.72.** Variación del pH de los scaffolds de PCL/ nHA con el tiempo de degradación.

En nuestro estudio no llegamos a ese nivel de degradación, ya que el índice de polidispersidad no varía mucho, como hemos visto anteriormente, y como indican otros autores [105, 106].

#### 6.4. BIBLIOGRAFÍA.

[1] Griffith L.G., Naughton G., "Tissue Engineering- Current Challenges and Expanding Opportunities", Science, 295, 1009-1022, 2002.

- [2] Nam Y.S., Park T.G., "Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation", *Journal of Biomedical Materials Research*, 47, 8-17, 1999.
- [3] Ma P.X., "Scaffolds for tissue fabrication", *Materials Today*, 30-40, Mayo 2004.
- [4] He L., Zuo Q., Shi Y., Xue W., " Microstructural Characteristics and Crystallization Behaviors of Poly(L-lactide) Scaffolds by Thermally Induced Phase Separation", *Journal of Applied Polymer Science*, DOI: 10.11002/app.39436, 2013.
- [5] Wei G., Ma P.X., "Nanostructures Biomaterials for Regeneration", *Advanced Functional Materials*, 18, 3566-3582, 2008.
- [6] Chen G., Ushida T., Tateishi T., "Scaffold Desing for Tissue Engineering", *Macromolecular Bioscience*, 2, 67-77, 2002.
- [7] Lazzeri L., Cascone M.G., Danti S., Serino L.P., Moscato S., Bernardini N., "Gelatine/PLLA sponge-like scaffolds: Morphological and biological characterization", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17, 1211-1217, 2006.
- [8] Alvarez J.F., "Osseous regeneration through tissue engineering", *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 2, 98-109, 2009.
- [9] Wang P., Hu J., Ma P.X., "The engineering of Patient-specific, anatomically shaped digits", *Biomaterials*, 30, 2735-2740, 2009.
- [10] Sriputtirat S., Boonkong W., Pengprecha S., Petsom A., Thongchul N., " Low Molecular Weight Poly(Lactide-co-Caprolactone) for Tissue Adhesion and Tetracycline Hydrochloride Controlled Release in Wound Managemenr" , *Advances in Chemical Engineering and Sciences*, 2, 15-27, 2012.

- [11] Wang M., "Composite scaffolds for bone tissue engineering", *American Journal of Biochemical and Biotechnology*, 2, 80-84, 2006.
- [12] Wei G., Ma P.X., "Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, 25, 4749-4757, 2004.
- [13] Park K., Jung H., Son J.S., Park K.D., Kim J.J "Preparation of Biodegradable Polymer Scaffolds with Dual Pore System for Tissue Regeneration", *Macromolecular Symposium*, 249, 145-150, 2007.
- [14] Kim H.D., Bae E.H., Kwon I.C., Pal R.R., Nam J.D., Lee D.S., "Effect of PEG-PLLA diblock copolymer on macroporous PLLA scaffolds by thermally induced phase separation", *Biomaterials*, 25, 2319-2329, 2004.
- [15] Banerje I., Mishra D., Maiti T.K., "PLGA microspheres incorporated gelatin scaffold: Microspheres modulate scaffolds properties", *International Journal of Biomaterials*, 14, 1-9, 2009.
- [16] Owens D.E., Peppas N.A., "Opsonization, biodistribution and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles", *International Journal of Pharmaceutics*, 307, 93-102, 2006.
- [17] Zhang R, Ma P.X., "Poly( $\alpha$ -Hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. Preparation and morphology", *Biodegradable Composite Scaffolds*, 10, 446-455, 1999.
- [18] Weir N.A., Buchanan F.J., Orr J.F., Farrar D.F., Boyd A., "Processing, annealing and sterilization of poly-L-lactide", *Biomaterials*, 25, 3939-3949, 2004.
- [19] Dhandayuthapani B., Yoshida Y., Meakawa T., Kumar S., "Polymeric Scaffolds in Tissue engineering Application: A Review", *International Journal of Polymer Science*, doi: 10.1155/2011/290602.

- [20] Zhang R., Ma P.X., "Processing of Polymer Scaffolds: Phase Separation", *Annals of the New York Accademic Science*, 715-724, 2002.
- [21] Hollister S.J., "Porous scaffold design for tissue engineering", *Nature materials*, 4, 518-524, 2005.
- [22] Çiçeka C., Çakmakçia E., Kayaman-Apohana N., Arslanb M., Kurukab S.E., "Fabrication of PLGA based tissue engineering scaffolds via photocuring and salt leaching techniques", *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 62, 719-725, 2013.
- [23] Jiangab S., Liao G.G., "Synthesis and characterization of biocompatible poly (ethylene glycol)-b-poly(L-lactide) and study on their electrospun scaffolds", *Polymer-Plastics Technology Engineering*, 51, 1237-1244, 2012.
- [24] Ma P.X., Choi J.W., "Biodegradable polymer scaffolds with well defined interconnected spherical pore network", *Tissue Engineering*, 7, 23-29, 2001.
- [25] Fanab X, Guoa L., Liuac T., "Preparation and mechanical properties of PLGA/ $\beta$ -TCP composites", *Polymer plastics technology and engineering*, 52, 621-625, 2013.
- [26] López Ávila R.A., Galán Borda C., "Polímeros polilácticos - Review", *Química de alimentos. Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia*, 2010.
- [27] Singh G., Bhunia H., Rajor A., Choudhary V., "Thermal properties and degradation characteristics of polylactide, linear low density polyethylene, and their blends", *polymer Bulletin*, 66, 939-953, 2011.
- [28] Höglund A., Odelius K., AlbertsonnA.C., "Crucial Differences in the Hidrolytic Degradation between Industrial Polylactide and Laboratory-Scale poly(L-lactide)", *Applied materials and interfaces*, 4, 2788-2793, 2012.

[29] Delabarde C., Plummer C.J.G., Bourban P.E., Manson J.A.E., "Accelerated ageing and degradation in poly-L-lactide/ hydroxyapatite nanocomposites", *Polymer Degradation and Stability*, 96, 595-607, 2011.

[30] Tsuji H., Shimizu K., Sato Y., "Hydrolytic Degradation of poly(L-lactic acid): Combined Effects of UV Treatment and Crystallization", *Journal of applied Polymer science*, 125, 2394-2406, 2012.

[31] Mattii L., Battolla B, D'alesandro D., Trombi L., "Gelatin/PLLA Sponge-Like Scaffolds Allow Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells", *Macromolecular Bioscience*, 8, 819-826, 2008.

[32] Lu L., Peter S.J., Lyman M.D., Lai H.L., Leite S.M., Tamada J.A., "In vitro and in vivo degradation of porous poly(lactic-co-glycolic acid) foams", *Biomaterials*, 21, 1837-1845, 2000.

[33] Khang G., Park C.S., Rhee J.M., "Preparation and Characterization of Demineralized Bone Particle Impregnated Poly (L-lactide) Scaffolds", *Korea Polymer Journal*, 9, 267-276, 2001.

[34] Middleton J.C., Tipton A.J., "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices", *Biomaterials*, 21, 2335-2346, 2000.

[35] Södergard A., Stolt M., "Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition", *Progress in Polymer Science*, 27, 1123-1163, 2002.

- [36] Barbanti S.H., Santos A.R., Zavaglia C.A.C., Duek E.A.R., “Porous and dense poly (L-lactic acid) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds: In vitro degradation in culture medium and osteoblasts culture”, *Journal of materials science: Materials in medicine*, 15, 1315-1321, 2004.
- [37] Li S.M., “Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids”, *Journal of Biomedical Materials Research*, 48, 342-353, 1999.
- [38] Von Burkersroda F., Schedl L., Göpferich A., “Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion”, *Biomaterials*, 23, 4221-4231, 2002.
- [39] Gong Y., Zhou Q., Gao C., Shen J., “In vitro and in vivo degradability and cytocompatibility of poly(L-lactic acid) scaffold fabricated by gelatin particle leaching method”, *Acta Biomaterialia*, 3, 531-540, 2007.
- [40] Li S.M., Garreau H., Vert M., “Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-( $\alpha$ -hydroxy acids) in aqueous media”, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 1, 123-130, 1990.
- [41] Göpferich A., “Mechanisms of polymer degradation and erosion”, *Biomaterials*, 17, 103-114, 1996.
- [42] Cam D., Hyon S.H., Ikada Y., “Degradation of high molecular weight poly (L-lactide) in alkaline medium”, *Biomaterials*, 16, 833-843, 1995.
- [43] Nampoothiri K.M., Nair N.R., Jon R.P., “An overview of recent developments in polylactide (PLA) research”, *Bioresource Technology*, 101, 8493-8501, 2010.

- [44] Saito E., Liu Y., Migneco F., Hollister S.J., "Strut size and surface area effects on long-term in vivo degradation in computer designed poly(L-lactic acid) three-dimensional scaffolds", *Acta Biomaterialia*, 8, 2568-2577, 2012.
- [45] George K.A., Chirila T.V., Wentrup-Byrne E., "Effects of crosslink density on hydrolytic degradation of poly (L-lactide) based networks", *Polymer Degradation and Stability*, 97, 964-971, 2012.
- [46] Törmälä P., Pohjonen T., Rokkanen P., "Bioresorbable polymers: materials technology and surgical applications", *Proceedings of the institution of mechanical engineers part h-journal of engineering in medicine*, 212, 101-112, 1998.
- [47] Zoppi R.A., Duek E.A.R., Coraça D.C., Barros P.P., "Preparation and Characterization of poly(L-Lactic acid) and poly(Ethylene oxide) blends", *Materials Research*, 4, 117-125, 2001.
- [48] Liu T.Y., Lin W.C., Yang M.C., Chen S.Y., "Miscibility, thermal characterization and crystallization of poly (l-lactide) and poly(tetramethylene adipate-co-terephthalate) blend membranes", *Polymer*, 46, 12586-12594, 2005.
- [49] Liu Y., Ann M., Wang L., Qiu H., "Preparation and Characterization of Chitosan-Gelatin/Glutaraldehyde Scaffolds", *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, 48, 309-325, 2009.
- [50] Suuronen R., Pohjonen T., Hietanen J., "A 5-year in vitro and in vivo study of the biodegradation of polylactide plates", *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 56, 604-614, 1998.

- [51] Sui G., Yang X., Mei F., Hu X., "Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 82A, 445-454, 2007.
- [52] Krikorian V., Pochan D.J., "Crystallization Behavior of Poly(L-lactic acid) Nanocomposites: Nucleation and Growth Probed by Infrared Spectroscopy", *Macromolecules*, 38, 6520-6527, 2005.
- [53] Ignjatovic N., Savic V., Najman S., Plavsic M., Uskokovic D., "A study of HAp/ PLLA composite as a substitute for bone powder, using FT-IR spectroscopy", *Biomaterials*, 22, 571-575, 2001.
- [54] Zhang J., Duan Y., Sato H., Tsuji H., Noda I., Yan S., Ozaki Y., "Crystal Modifications and Thermal Behavior of Poly(L-lactic acid) Revealed by Infrared Spectroscopy", *Macromolecules*, 38, 8012-8021, 2005.
- [55] Zhang J., Sato H., Tsuji H., Noda I., Ozaki Y., "Infrared Spectroscopic Study of  $\text{CH}_3\cdots\text{O}=\text{C}$  Interaction during Poly(L-lactide)/Poly(D-lactide) Stereocomplex Formation", *macromolecules*, 38, 1822-1828, 2005.
- [56] Díaz E., Puerto I., Sandonis I., Ibañez I., "Morphology and Mechanical Properties of PLLA and PCL Scaffolds", *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 52, 1-6, 2013.
- [57] Perinovic S., Andricic B., Erceg M., "Thermal properties of poly(L-lactide)/olive stone flour composites", *Thermochimica Acta*, 510, 97-102, 2010.
- [58] Wang X., Song G., Lou T., "Fabrication and characterization of nano composite scaffold of poly(L-lactic acid)/ hydroxiapatite", *Journal of materials science: Materials in medicine*, 21, 183-188, 2010.

- [59] Owens D.E., Peppas N.A., "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles", *International Journal of Pharmaceutics*, 307, 93-102, 2006.
- [60] Verheyen C.C.P.M., Klein C.P.A.T., De Blicck-Hogervorst J.M.A., Wolke J.G.C., Van Blitterswijk C.A., De GroostK., "Evaluation of hydroxiapatite/ poly(L-Lactide) composites: physic-chemical properties", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 4, 58-65, 1993.
- [61] Grizzi I, Garreau H., Li S.M., "Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence ", *Biomaterials*, 16, 305-311, 1995.
- [62] C., Plummer C.J., Bourban P.E., Manson J.A., "Biodegradable polylactide/ hydroxyapatite nanocomposite foam scaffolds for bone tissue engineering applications", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 23, 1371-1385, 2012.
- [63] Ebrahimian-Hosseiniabadi M., Ashrafizadeh F., Etemadifar M., Venkatraman S.S., "Preparation and mechanical behavior of PLGA/ nano-BCP composite scaffolds during in-vitro degradation for bone tissue engineering", *Polymer Degradation and Stability*, 96, 1940-1946, 2011.
- [64] Zhou Z., Yi Q., Liu L., Liu X., Liu Q., "Influence of Degradation of poly-L-lactide on Mass Loss, Mechanical Properties and Crystallinity in Phosphate-Buffered Solution", *Journal of Macromolecular Science Part B: Physics*, 48, 309-317, 2009.

- [65] Deng X.L., Sui G., Zhao M.L., Chen G.Q., Yang X.P., "Poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite hybrid nanofibrous scaffolds prepared by electrospinning", *Journal of Biomaterial Science: Polymer Edition*, 18, 117-130, 2007.
- [66] Castilla-Cortazar I., Mas-Estelles J., Meseguer-Dueñas J.M., Escobar-Ivirico J.L., Marí B., Vidaurre A., "Hydrolytic and enzymatic degradation of a poly ( $\epsilon$ -caprolactone) network", *Polymer Degradation and Stability*, 97, 1241-1248, 2012.
- [67] Li S.M., Chen X.H., Gross R.A., McCarthy S.P., "Hydrolytic degradation of PCL/ PEO copolymers in alkaline media", *Journal of Materials science: Materials in Medicine*, 11, 227-233, 2000.
- [68] Dordunoo S.K., Oktaba A.M.C., Hunter W, Min W., Cruz T., Burt H.M., "Release of taxol from poly( $\epsilon$ -caprolactone) pastes: effect of water-soluble additives", *Journal of controlled release*, 44, 87-94, 1997.
- [69] Yang L, Li J., Yin Y., Li M., Gu Z., "In vitro enzymatic degradation of the cross-linked poly( $\epsilon$ -caprolactone) implants", *Polymer Degradation and Stability*, 112, 10-19, 2015.
- [70] Mondal S., Martin D., "Hydrolytic degradation of segmented polyurethane copolymers for biomedical applications", *Polymer Degradation and Stability*, 97, 1553-1561, 2012.
- [71] Ginde R., Gupta R., "In vitro chemical degradation of poly(glycolic acid) pellets and fibers", *Journal of Applied Polymer science*, 33, 2411-2429, 1987.
- [72] Gopferich A., Karydas D., Langer R., "Predicting Drug-release From Cylindric Polyanhydride Matrix Discs", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41, 81-87, 1995.

- [73] Huang M.H., Li S., Hutmacher D.W., Coudane J., Vert M., "Degradation characteristics of poly( $\epsilon$ -caprolactone)-based copolymers and blends", *Journal of Applied Polymer Science*, 102, 1681-1687, 2006.
- [74] Díaz E., Sandonis I., Puerto I., Ibañez I., "In Vitro Degradation of PLLA/ nHA Composite Scaffolds". *Polymer Engineering and Science*, DOI 10.1002/pen.23806, 2014.
- [75] Díaz E., Sandonis I., Puerto I., Ibañez I., "The effects of bioactive nanoparticles on the degradation of DLGA", *International Journal of Polymeric Materials: Polymeric Biomaterials*, In press, 2014.
- [76] Peña J., Corrales T., Izquierdo-Barba I., Doadrio A.L., Vallet-Regí M., "Long term degradation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) films in biologically related fluids", *Polymer Degradation and Stability*, 91, 1424-1432, 2006.
- [77] Casarin S.A., Malmonge S.M., Kobayashi M., Marcondes Agnelli J.A., "Study on In Vitro Degradation of Bioabsorbable Polymers Poly(Hydroxybutyrate-Co-Valerate)- (PHBV) and Poly(Caprolactone)-PCL", *Journal of Biomaterial and Nanobiotechnology*, 2, 207, 2011.
- [78] Li H., Chang J., "pH-compensation effect of bioactive inorganic fillers on the degradation of PLGA", *Composites science and technology*, 65, 2226-2232, 2005.
- [79] Corden T.J., Jones I.A., Rudd C.D., Christian P., Downes S., McDouglas K.E., "Physical and biocompatibility properties of poly- $\epsilon$ -caprolactone produced using in situ polymerization: a novel manufacturing technique for long-fibre composite materials", *Biomaterials*, 21, 713-724, 2000.

[80] Kweon H.Y., Yoo M.K., Park I.K., Kim T.H., Lee H.C., Lee H.S., Oh J.S., Akaike T., Cho C.S., "A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering", *Biomaterials*, 24, 801-808, 2003.

[81] Taddei P., Tinti A., Reggiani M., Fagnano C., "In vitro mineralization of bioresorbable poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/apatite composites for bone tissue engineering: a vibrational and thermal investigation", *Journal of Molecular Structure*, 744, 135-143, 2005.

[82] Varela-Caselis J.L., Reyes-Cervantes E., Rubio-Rosas E., "Crecimiento en fluido fisiológico simulado de hidroxiapatita sobre películas de PMMA-Sílice-CaO", *Superficies y vacío*, 25, 92-95, 2011.

[83] Martínez-Valencia A.B., Esparza-Ponce H.E., "Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis", *Superficies y vacío*, 21, 18-21, 2008.

[84] Gautam S., Dinda A.K., Mishra N.C., "Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method", *Materials Science and Engineering*, 33, 1228-1235, 2013.

[85] Costa A.C.F.M., Lima M.G., Lima L.H.M.A., Cordeiro V.V., Viana K.M.S., Souza C.V., Lira H.L., "Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações", *Revista Electronica de Materiais e Processos*, 4.3, 29-38, 2009.

[86] Sinha V.R., Bansal K., Kaushik R., Kumria R., Trehan A., "Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview", *International journal of pharmaceutics*, 278, 1-23, 2004.

- [87] Seyednejad H., Gawlitta D., Kuiper R.V., de Bruin A., van Nostrum C.F., Vermonden T., Dhert W.J.A., Hennink W.E., "In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on hydroxyl-functionalized poly( $\epsilon$ -caprolactone)", *Biomaterials*, 33, 4309-4318, 2012.
- [88] Sekosan G., Vasanthan N., "Morphological Changes of Annealed Poly- $\epsilon$ -caprolactone by Enzymatic Degradation with Lipase", *Journal of Polymer Science Part B*, 48, 202-211, 2010.
- [89] Jenkins M.J., Harrison K.L., "The effect of molecular weight on the crystallization kinetics of polycaprolactone", *Polymers for advanced technologies*, 17, 474-478, 2006.
- [90] Salgado C.L., Sanchez E.M.S., Zavaglia C.A.C., Granja P.L., "Biocompatibility and biodegradation of polycaprolactone-sebacic acid blended gels", *Journal of Biomedical Materials Research A*, 100A, 243-251, 2012.
- [91] Eldsäter C., Erlandsson B., Renstad R., Albertsson A.C., Kartsson S., "The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly( $\epsilon$ -caprolactone)", *Polymer*, 41, 1297-1304, 2000.
- [92] Qiu Z., Komura M., Ikedara T., Nishi T., "Miscibility and crystallization behavior of biodegradable polyesters. Poly (butylenes succinate) and Poly( $\epsilon$ -caprolactone)", *Polymer*, 44, 7749-7756, 2003.
- [93] Guo Q., Groeninckx G., "Crystallization kinetics of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) in miscible thermosetting polymer blends of epoxy resin and poly ( $\epsilon$ -caprolactone)", *Polymer*, 42, 8647-8655, 2001.

- [94] Heung L.H., Naguib H.E., "Viscoelastic properties of poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-hydroxyapatite micro- and nano-composites", *Polymers advanced technologies*, 24, 144-150, 2013.
- [95] Chun Y.S., Kyung Y.J., Jung H.C., Kim W.N., "Thermal and rheological properties of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and polystyrene blends" *Polymer*, 41, 8729-8733, 2000.
- [96] Koenig M.F., Huang S.J., "Biodegradable blends and composites of polycaprolactone and starch derivatives", *Polymer*, 36, 1877-1882, 1995.
- [97] de Groot J.H., Zijlstra F.M., Kuipers H.W., Pennings A.J., Klomp maker J., Veth R.P.H., Jansen H.W.B., "Meniscal tissue regeneration in porous 50/50 copoly (L-lactide/ $\epsilon$ -caprolactone) implants", *Biomaterials*, 18, 613-622, 1997.
- [98] Shen Y., Sun W., Zhu K.J., Shen Z., "Regulation of biodegradability and drug release behavior of aliphatic polyesters by blending", *Journal of Biomedical Materials Research*, 50, 528-535, 2000.
- [99] Chuenjitkuntaworn B., Inrung W., Damrongsri D., Mekaapiruk K., Supaphol P., Pavasant P., " Polycaprolactone/ Hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells", *Journal of Biomedical Materials Research part A*, 94A, 241-251, 2010.
- [100] Leung L.H., Naguib H.N., "Viscoelastic properties of poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-hydroxyapatite micro- and nano-composites", *Polymers Advanced Technologies*, 24, 144-150, 2013.

- [101] Wang Y., Liu L., Guo S., "Characterization of biodegradable and cyto compatible nano-hydroxyapatite/ polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro", *Polymer Degradation and Stability*, 95, 207-213, 2010.
- [102] Ang K.C., Leong K.F., Chua C.K., Chandrasekaran M., "Compressive Properties and Degradability of Poly-caprolactone/ Hydroxyapatite Composites Under Accelerated Hydrolytic Degradation", *Journal of biomedical materials research. Part A*, 80A( 3), 655-660, 2007.
- [103] Azevedo M.C., Reis R.L., Claese M.B., Grijpma D.W., Feijen J., "Development and properties of polycaprolactone/ hydroxyapatite composite biomaterials", *Journal of Materials science: Materials in Medicine*, 14, 103-107, 2003.
- [104] Bergsma J.E., de Bruijn W.C., Rozema F.R., Bos R.R.M., Boering G., "Late degradation tissue response to poly (-lactide) bone plates and screws", *Biomaterials*, 16, 25-31, 1995.
- [105] Woodruff M.A., Werner D., "The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21<sup>st</sup> century", *Progress in Polymer Science*, 35 (10), 1217-1256, 2010.
- [106] Wang X.L., Huang F.Y., Zhou Y, Wang Y., "Non isothermal Crystallization Kinetics of Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone)/ Montmorillonite Nanocomposites", *Journal of Macromolecular Science part B*, 48,710-722, 2009.

## **7.CONCLUSIONES**



A la luz de los resultados experimentales obtenidos en la presente Memoria se han extraído las siguientes conclusiones:

- La técnica elegida para la fabricación de los soportes porosos, TIPS (Thermally Induced Phase Separations) es un método eficaz para crear scaffolds altamente porosos y nos permite variando las condiciones de fabricación obtener diferentes morfologías y tamaños de poro.
- En cuanto a los polímeros utilizados, ambos fueron óptimos para la fabricación de scaffolds con estructuras altamente porosas e interconectadas.
- Se observa que los soportes porosos obtenidos utilizando 1,4 dioxano como disolvente tienen mayor porosidad y una red interconectada de poros.
- En los scaffolds realizados con agua y 1,4 dioxano observamos que los poros se rompen, con cualquier contenido de agua. Estos presentan una menor consistencia así como peores propiedades mecánicas.
- Cuanto mayor sea la velocidad de enfriamiento menor será el tamaño de poro que obtenemos, ya que el fenómeno de coalescencia reduce la energía interfacial y produce poros de mayor tamaño cuanto menor sea la misma.
- En cuanto a las propiedades mecánicas, observamos que tanto para el PLLA como para la PCL, disminuyen con el aumento del tamaño del poro como era de esperar.

En lo referente al estudio de la degradación, podemos concluir que tanto el polímero utilizado como la adición de nanopartículas bioactivas influyen en la morfología del soporte poroso. Las conclusiones obtenidas para cada uno de los polímeros son las siguientes:

**PLLA:** Hemos observado una adhesión homogénea entre el PLLA y las nanopartículas de nHA. La adición de estas nanopartículas, aunque sea en pequeñas cantidades, disminuye el tamaño del poro, aunque su presencia no es lo suficientemente importante como para afectar a la morfología de los scaffolds. Además las partículas de nHA disminuyen la velocidad de degradación, ya que al encontrarse en una solución alcalina estas actúan como una barrera física. Durante el tiempo de degradación aumenta el porcentaje de cristalización ( $X_c\%$ ), aumentando considerablemente la temperatura de transición vítrea.

**PCL:** Mediante el estudio de la degradación hemos confirmado que ésta se basa en la escisión hidrolítica de los grupos éster, provocando una ruptura al azar de las cadenas poliméricas, no habiendo detectado ninguna evidencia de catálisis interna en los valores del índice de polidispersidad con el tiempo de degradación. La degradación del PCL es más lenta que la del PLLA. Hemos observado que los soportes porosos fabricados sin nHA, mantienen mejor sus propiedades con el tiempo de degradación. También hemos observado que la adición de nanopartículas aumenta la velocidad de degradación, lo cual sugiere la posibilidad de regular ésta mediante el uso de diversas concentraciones de las mismas.

## **8.ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**



ATR: Attenuated Total Reflectance.

BHT: Butilhidroxitolueno.

DLGA: poli(DL-lactida-co-glicolida).

BTE: Bone Tissue Engineering.

DSC: Differential Scanning Calorimetry (Calorimetría diferencial de barrido)

FDA: US Food and Drug Administration.

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy ( Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier.

GPC: Gel Permeation Chromatography (Cromatografía de permeación de gel)

HA: Hidroxiapatita.

I: Índice de polidispersidad. ( $I = M_w / M_n$ )

ITO: Ingeniería de Tejido Óseo.

nHA: nano hidroxiapatita.

$M_n$ : Peso promedio en peso.

$M_w$ : Peso promedio viscoso.

PBS: Phosphated Buffer Solution.

PCL: Policaprolactona.

PDLA: Poli-D-Lactida.

PGA: Poliglicolida.

PLA: Polilactida.

PLGA: polilactida-co-glicolida.

PLLA: Poli-L-lactida.

PVC: Policloruro de Vinilo.

RTA: Reflexión Total Atenuada.

SEM: Scanning electronic Microscopy.

THF: Tetrahydrofurano.

TIPS: Thermally Induced Phase Separation. (Separación de fases inducida térmicamente).

$T_c$ : Temperatura de cristalización.

$T_g$ : Temperatura de transición vítrea.

$T_m$ : Temperatura de fusión.

$\Delta H_m$ : Entalpía de fusión.

$\Delta H_0$ : Entalpía de fusión de polímero 100% cristalino.



