

GRADO EN MARINA  
**TRABAJO FIN DE GRADO**

***SOPORTES POROSOS PARA INGENIERÍA DE  
TEJIDOS***

**Alumno/Alumna:** Aresti, Berciano, Jon

**Director/Directora:** Díaz, Tajada, Esperanza

**Curso:** 2018-2019

**Fecha:** MARZO, 2019



## Resumen

El propósito de este trabajo ha sido el análisis del impacto de los MWCNTs (Multi Walled Carbon Nanotubes) en la microestructura y en la degradación in vitro de andamios porosos, para la ingeniería de tejidos, fabricados a base de PCL (policaprolactona) y partículas bioactivas de nHA (nanohidroxiapatita). La técnica empleada para la fabricación ha sido TIPS (separación de fases inducida térmicamente). Una vez obtenidos los scaffolds se ha realizado un estudio de degradación in vitro durante ocho semanas estudiando propiedades como la absorción de PBS (Phosphate Buffer Solution), pérdida de masa, variación de pH. También se ha realizado un estudio por medio del análisis térmico diferencial (DSC) y se ha observado su microestructura al SEM (Microscopio Electrónico de Barrido).

**Palabras clave:** PCL, MWCNTs, scaffolds, degradación in vitro.

## Laburpena

Lan honen asmoa, ehunen ingeniartzan, PCL (policaprolactona) eta nHA (nanohidroxiapatita) partikula bioaktiboen bidez fabrikatutako scaffolden mikroegituran eta in vitroko degradazioan izan duen MWCNTs (Multi Walled Carbon Nanotubes) gehiketaren eraginaren azterketa izan da. TIPS (Termikoki Eragindako Fase Banaketa) izan da fabrikaziorako erabilitako teknika. Scaffoldak lortu ondoren, zortzi astez in vitro degradazio-azterketa egin da, hainbat propietate aztertuz: PBSaren (Phosphate Buffer Solution) xurgapenak, masa galtzea, pH-bariazioa. Analisi termiko diferentziala ere egin da (DSC) eta bere mikroegitura SEM sistemaren (Barrido Mikroskopia Elektronikoa) bidez aztertu da.

**Hitz gakoak:** PCL, MWCNTs, scaffoldak, in vitro degradazioa.

## Abstract

The aim of this research is studying the impact of MWCNTs (Multi Walled Carbon Nanotubes) in the microstructure and in vitro degradation of porous scaffolds made of polycaprolactone (PCL) and nanohydroxiapatite (nHA) bioactive particles for tissue engineering. Thermally Induced Phase Separation (TIPS) is the fabrication technology used.

Once composites were obtained, the next step was an eight-week degradation study looking into the absorption of Phosphate Buffer Solution (PBS), weight loss and pH variations. Also, a Differential Calorimetry Scanning (DSC) research was done and the microstructure was observed by the Electronic Scanning Microscopy (SEM).

**Key words:** PCL, MWCNTs, scaffolds, in vitro degradation.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. CONTEXTO</b> .....	4
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	6
<b>4. BENEFICIOS</b> .....	8
<b>5. ESTADO DEL ARTE</b> .....	10
<b>6. PARTE TEÓRICA</b> .....	13
<b>6.1. Biomateriales</b> .....	14
<b>6.2 PCL</b> .....	18
<b>6.3. Hidroxiapatita</b> .....	21
<b>6.4. Nanotubos de carbono</b> .....	23
<b>7. MATERIALES</b> .....	26
<b>8. TÉCNICAS EXPERIMENTALES</b> .....	28
<b>8.1.1. Liofilización</b> .....	30
<b>8.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</b> .....	37
8.2.1. Preparación de muestras.....	39
<b>8.3. Microscopio electrónico de barrido (SEM)</b> .....	42
8.3.1. Preparación de muestras.....	45
<b>8.4. Degradación in vitro</b> .....	46
8.4.1. Preparación de muestras.....	46
<b>9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	50
<b>9.1. SEM</b> .....	51
<b>9.2. Degradación in vitro.</b> .....	58
<b>9.3. DSC</b> .....	63
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	70
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	72

## FIGURAS

Figura 1: Implante óseo.

Figura 2: Policondensación del PCL.

Figura 3: ROP.

Figura 4: Estructura de la hidroxiapatita.

Figura 5: Fullenero.

Figura 6: Fullenero y nanotubo de pared simple.

Figura 7: Estructura de MWCNTs y SWCNTs.

Figura 8: diagrama de fases de una solución polimérica.

Figura 9: Liofilizador Telstar Lyoquest -85.

Figura 10: Andamios porosos fabricados.

Figura 11: Pesaje PCL.

Figura 12: Disolución PCL con 1,4-dioxano.

Figura 13: Removedor magnético.

Figura 14: HA y MWCNTs

Figura 15: Ultrasonidos.

Figura 16: Esquema DSC.

Figura 17: DSC TA Instruments Q200.

Figura 18: Prensa

Figura 19: Porta muestras

Figura 20: HITACHI S-4800 SEM.

Figura 21: Partes del SEM.

Figura 22: Sistema de funcionamiento del SEM.

Figura 23: Fotomultiplicadores del SEM.

Figura 24: Portamuestras SEM.

Figura 25: Metalizador EMITECH K550X.

Figura 26: Estufa termostaticada.

Figura 27: PBS.

Figura 28: Probetas.

Figura 29: Medidor de pH.

Figura 30: PCL sin degradar (x100).

Figura 31: PCL sin degradar (x300).

Figura 32: PCL/10% nHA sin degradar (x100).

Figura 33: PCL/10% nHA sin degradar (x300)

Figura 34: PCL/10% nHA/1wt% MWCNTs sin degradar (x100)

Figura 35: PCL/10% nHA/1wt% MWCNTs sin degradar (x300).

Figura 36: PCL/10% nHA/5wt% MWCNTs sin degradar (x100).

Figura 37: PCL/10% nHA/5wt% MWCNTs sin degradar (x300).

Figura 38: PCL/10% nHA/10wt% MWCNTs sin degradar (x100).

Figura 39: PCL/10% nHA/10wt% MWCNTs sin degradar (x300).

Figura 40: PCL 8 semanas de degradación (x100).



Figura 41: PCL 8 semanas de degradación (x300).

Figura 42: PCL/10% nHA 8 semanas de degradación (x100).

Figura 43: PCL/10% nHA 8 semanas de degradación (x300).

Figura 44: PCL/10% nHA/1wt% MWCNTs 8 semanas de degradación (x100).

Figura 45: PCL/10% nHA/1wt% MWCNTs 8 semanas de degradación (x300).

Figura 46: PCL/10% nHA/5wt% MWCNTs 8 semanas de degradación (x100).

Figura 47: PCL/10% nHA/5wt% MWCNTs 8 semanas de degradación (x300).

Figura 48: PCL/10% nHA/10wt% MWCNTs 8 semanas de degradación (x100).

Figura 49: PCL/10% nHA/10wt% MWCNTs 8 semanas de degradación (x300).

Figura 50: Tipos de degradación del PCL.

Figura 51: Gráfico de pH.

Figura 52: Gráfico de porcentaje de absorción de masa.

Figura 53: Porcentaje de pérdida de masa.

Figura 54: Termografía PCL sin degradar.

Figura 55: Termografía PCL 8 semanas de degradación.

Figura 56: Termografía PCL/10% nHA sin degradar.

Figura 57: Termografía PCL/10% nHA 8 semanas de degradación.

Figura 58: Termografía PCL/10% nHA/1wt% MWCNTs sin degradar.

Figura 59: Termografía PCL/10% nHA/1wt% MWCNTs 8 semanas de degradación.

Figura 60: Termografía PCL/10% nHA/5wt% MWCNTs sin degradar.

Figura 61: Termografía PCL/10% nHA/5wt% MWCNTs 8 semanas de degradación.

Figura 62: Termografía PCL/10% nHA/10wt% MWCNTs sin degradar.

Figura 63: Termografía PCL/10% nHA/10wt% MWCNTs 8 semanas de degradación.

## TABLAS

Tabla 1: Propiedades del PCL.

Tabla 2: Valores del DSC.

## ACRÓNIMOS

CNT: Carbon NanoTubes.

DSC: Diffetential Scanning Calorimetry.

HA: Hidroxiapatita.

IT: Ingeniería de Tejidos.

MWCNT: Multi Walled Carbon NanoTubes.

nHA: Nanohidroxiapatita.

PBS: Phosphate Buffer Solution.

PCL: Policaprolactona.

PMMA: Polimetilmetacrilato.

PVC: Policloruro de vinilo.

ROP: Ring Opening Polymerization.

SWCNT: Single Walled Carbon Nano Tubes.

TIPS: Thermally Induced Phase Separation.

$\epsilon$ -CL: Épsilon caprolactona.

# **1. INTRODUCCIÓN**

Las primeras aplicaciones de los biomateriales en la medicina se producen sobre 1860 con la utilización de técnicas quirúrgicas asépticas. Es a partir de 1900 cuando se utilizan las primeras placas metálicas para reparar fracturas óseas. Durante los siguientes años las aleaciones metálicas son los únicos biomateriales utilizados. En la segunda mitad del siglo XX se empiezan a utilizar los primeros polímeros para aplicaciones biomédicas.

El interés principal de la ingeniería de tejidos (IT) es la regeneración de tejidos, cuya labor e investigación entrama tiempo y dinero con resultados muy beneficiosos.

Las células madre son células indiferenciadas, totipotenciales y bajo ciertas condiciones pueden diferenciarse a células especializadas [1]. La investigación que requieren los biomateriales en la IT no es únicamente la regeneración tisular, sino también gana interés en la medicina reproductiva para problemas de infertilidad en mujeres y en hombres. A partir de las células madre, tratan a los pacientes con gametos donados. No obstante, con los biomateriales de tercera generación (y los de la cuarta generación en camino) [2-3], el objetivo o interés principal es el de la regeneración, implantes, prótesis...

Para el estudio de la presente investigación, se ha llevado a cabo una labor mayoritariamente de laboratorio con los distintos equipos de trabajo. El componente principal que se investiga son los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs), el impacto que tendrán en la microestructura de los scaffolds generados a base de PCL y partículas bioactivas de nHA que avanzan el proceso de la degradación del PCL [1]. Desde que Sumio Iijima descubriese los nanotubos de carbono (CNTs) en el año 1991, se han estudiado posibles aplicaciones de estos debido a sus propiedades eléctricas, térmicas y

estructurales. Áreas como la genética, farmacéutica y la ingeniería tisular se han interesado por los MWCNTs para la regeneración, degradación de medicamentos dentro del cuerpo humano... [4].

El objetivo principal de este trabajo es el del estudio de la degradación in vitro de estructuras porosas de PCL con MWCNTs para su aplicación en la IT.

En un primer paso se procedió a la generación de los distintos tipos de scaffolds. El método escogido fue la de la separación de fases inducida térmicamente. A continuación, se procedió a su estudio en el calorímetro diferencial de barrido (DSC) las muestras de la semana 0 a 8 para analizar el avance de la degradación in vitro. Después, se introducen las muestras, sumergidas en fluido fisiológico simulado, en la estufa termostaticada durante 8 semanas.

Se puede decir para finalizar, que este es un paso más allá en la IT y en la caracterización de andamios porosos desde el descubrimiento de Sumio Iijima (1991), pasando por las investigaciones hechas, hasta la fecha de hoy.

## **2. CONTEXTO**



Este proyecto se ha realizado en el laboratorio de Metalotecnia de Materiales de la Escuela de Ingeniería de Bilbao, en el edificio de Portugalete, dentro de un proyecto de investigación que se está haciendo sobre la adición de nanotubos de carbono de pared múltiple a distintos polímeros biodegradables, bioactivos y biocompatibles para la investigación no solo in vitro sino in vivo en un futuro no muy lejano.

## **3. OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es la síntesis, caracterización y estudio de la degradación in vitro de estructuras porosas de policaprolactona (PCL) con nanohidroxiapatita (nHA) nanotubos de carbono de pared múltiple para su aplicación en ingeniería de tejidos.

## **4. BENEFICIOS**

Este trabajo se trata de un proyecto de investigación, por lo tanto, no aporta beneficios inmediatos o a corto plazo. No obstante, contribuye a amentar el conocimiento de esta investigación innovadora en el campo de la degradación de la policaprolactona con la adición no solo de la nanohidroxiapatita sino también con la adición de nanotubos de carbono de pared múltiple. En el caso de que la investigación continúe, se verá reflejado sobre todo en el campo de la ingeniería de tejidos.

## **5. ESTADO DEL ARTE**

La fabricación de scaffolds porosos de forma, dimensiones y propiedades correctas y exactas, es en el mundo de la ingeniería de tejidos (IT) una labor de extrema importancia. Algunas aplicaciones pueden tener demandas específicas pero lo común es que funcionen para la proliferación, diferenciación y adhesión celular. Partiendo de tejidos nativos no descompuestos, también sirven para la creación de tejidos y órganos. Los scaffolds porosos fabricados deberían ser biocompatibles, porosos, tridimensionales, bioactivos, biodegradables y con propiedades mecánicas similares a los tejidos que van a sustituir. [5]

La policaprolactona (PCL) es de la familia de los polilactonas el más estudiado. Debido a que su transición vítrea es de  $-60^{\circ}\text{C}$ , su temperatura de fusión baja sea de  $60^{\circ}\text{C}$  y la extraordinaria capacidad para mezclarse, han sido alicientes para estudiar sus aplicaciones en la biomedicina. El PCL se puede obtener mediante la policondensación o por la polimerización de anillo abierto (ROP) del monómero  $\epsilon$ -caprolactona. Es un poliéster alifático, semicristalino, biocompatible y considerado como no tóxico. Es un polímero sujeto a la degradación, debido a la susceptibilidad a la hidrólisis de sus enlaces alifáticos de éster. Los productos de la degradación se metabolizan o son eliminados por la secreción renal. [6]

La razón por la cual el PCL ha sido olvidado durante las últimas décadas, es el largo proceso de degradación que tiene; este proceso puede durar de meses a años solo con PCL. Recientemente, se ha estudiado su capacidad y su potencial en la IT; no obstante, se ha llegado a la conclusión de que el PCL solo (sin adición de ningún tipo) no es muy efectivo para la creación de sustitutos óseos. En otros estudios, se ha mezclado con silica e hidroxiapatita (HA) para mejorar su

bioactividad. La adición de estos materiales modifica su estructura y propiedades. [5]

Existen pocos estudios y pocos resultados de degradación sobre la adición de nanohidroxiapatita (nHA) y nanotubos de carbono (CNTs) en PCL. Sí existen bastantes estudios de la degradación del PCL sin adición, con los correspondientes resultados de pH, cristalinidad y porcentaje de agua absorbida entre otros. [6]

La técnica que se ha utilizado es la separación de fases inducida térmicamente (TIPS), con la incorporación previa de nHA y nanotubos de carbono de pared múltiple, Multi Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs), en diferentes porcentajes.

Durante la degradación, puede que las propiedades del polímero cambien y esos cambios serán los que se estudien en detalle en este trabajo; también se analizan los cambios de pH, pérdida de masa, peso molecular, estructura y propiedades mecánicas.



## **6. PARTE TEÓRICA**

## 6.1. Biomateriales

Los biomateriales, o material bioaplicable, son de origen sintético u orgánico y tienen como finalidad principal la creación de unidades capaces de reemplazar un sistema vivo o trabajar con tejidos vivos de manera segura. Son materiales que han trazado una línea en la historia debido a la evolución que han tenido (desde ser inertes a ser bioactivos hoy en día). Se les llama biomateriales a aquellos que van a estar en contacto con sistemas biológicos. El desafío al que se enfrentan los biomateriales es el de sustituir tejidos vivos y tener la capacidad de crecer, regenerarse y repararse. [7]



*Figura 1: Implante óseo. [8]*

Podemos clasificar los biomateriales según su origen:

- 1- Naturales: son complejos, heterogéneos y muy difícil de caracterizar. El colágeno y las fibras proteicas sirven como ejemplo.
- 2- Sintéticos: pueden ser metales, cerámicas o polímeros que se les denomina como materiales biomédicos para diferenciarlos.

Podemos entonces resumir un biomaterial como aquel que se implanta, trata de interactuar con el organismo y reemplaza tejidos, órganos o funciones

corporales. El requisito esencial de un biomaterial es el de la biocompatibilidad. Los tejidos a los que se tienen que sustituir tienen propiedades químicas, físicas y biológicas con las cuales los biomateriales tienen que ser capaces de compatibilizar. En el caso de la biocompatibilidad de los biomateriales va a tener que ser estudiada con el tiempo de degradación. [9]

Estas son algunas de las propiedades de los biomateriales biodegradables: [10]

- El material no podrá desprender nada tóxico una vez implantado en el cuerpo.
- El material debería tener una durabilidad aceptable.
- El proceso de degradación tiene que ir acorde con la durabilidad del proceso de regeneración.
- El material debe tener propiedades mecánicas apropiadas para el tratamiento indicado y debe ser compatible con la durabilidad del proceso de regeneración.
- Los productos que se degradan aparte de no poder ser tóxicos deben poderse eliminar por el cuerpo.
- El material debe tener apropiada permeabilidad y procesabilidad para la aplicación.

Durante las décadas de los 60 y 70, se comenzó a desarrollar los primeros materiales para la introducción dentro del cuerpo humano. A estos se les denomina biomateriales de primera generación. Son la base de la idea de los biomateriales. El objetivo principal de estos primeros, era la sustitución y con ello la aceptación del cuerpo de las propiedades físicas de los tejidos que se iban a

reemplazar; minimiza al máximo la respuesta biológica al cuerpo extranjero. Los materiales más utilizados fueron el acero inoxidable, aleaciones de cobre y cromo y el polimetilmetacrilato (PMMA).

Los biomateriales de segunda generación, se centran sobre todo en que sean bioactivos y que los tejidos sean inertes y con una biocompatibilidad más alta. A mitad de los años 80, los materiales bioactivos alcanzan el uso clínico como por ejemplo el mundo ortopédico y las aplicaciones dentales. Aparecen materiales compuestos con hidroxiapatita (HA) o el Bioglass 45S5 que son capaces de crear una respuesta biológica. El Bioglass es una serie composiciones bioactivas y en su mayoría contiene silica, pero también mayores cantidades de fósforo y calcio a diferencia del vidrio con sosa y cal. En la universidad de Kyoto se desarrollaron compuestos bioactivos y mecánicamente fuertes de cerámica de vidrio para la implantación de unidades vertebrales en aquellos que padecieron tumores espinales.

Los biomateriales de tercera generación, están diseñados para estimular cualquier respuesta celular a nivel biomolecular. En la primera década del siglo XXI, el concepto de materiales bioactivos y reabsorbibles converge; los materiales bioactivos se han convertido en reabsorbibles y los polímeros reabsorbibles se han convertido en bioactivos. Estos materiales se han diseñado para activar genes que estimulan la regeneración de tejidos vivos. [11]

Se podría decir que a día de hoy los biomateriales en los cuales se trabaja entran dentro de la tercera generación, pero existe un solape con los materiales de la cuarta generación que ya no representan tanto el futuro lejano. Si en la primera y segunda generación trataban de ser inertes y en la tercera generación ya resultaban bioactivos, los de la cuarta generación van más allá. Interaccionan a

nivel molecular, celular y tisular. Estimulan células específicas para que el cuerpo pueda curarse y aprenda a reparar sus propios tejidos de manera natural. Llamando a estos biomateriales inteligentes. [12]

## 6.2 PCL

La policaprolactona (PCL) es un poliéster alifático biodegradable compuesto por unidades repetidas de ácido caproico o ácido carboxílico. Es un polímero semicristalino que puede llegar a tener una riqueza hasta del 69% de cristalinidad. La celdilla unidad es ortorrómbica. [13]

Este poliéster biodegradable tiene una temperatura de transición vítrea de  $-60^{\circ}\text{C}$  y llega a tener una temperatura de fusión baja en torno a  $60^{\circ}\text{C}$ . Las propiedades físicas, térmicas y mecánicas del PCL dependen (en gran parte) del peso molecular y del grado de cristalinidad que tenga. A temperatura ambiente se diluye fácilmente en cloroformo, benceno, tolueno... y también es miscible con otros polímeros como el PVC. [13]

A continuación, se muestra una tabla con las propiedades del PCL:

Properties	Range	Ref.
Number average molecular weight ( $M_n/\text{g mol}^{-1}$ )	530–630 000	—
Density ( $\rho/\text{g cm}^{-3}$ )	1.071–1.200	1,3–6
Glass transition temperature ( $T_g/^{\circ}\text{C}$ )	(–65)–(–60)	3–5, 7 and 8
Melting temperature ( $T_m/^{\circ}\text{C}$ )	56–65	3–8
Decomposition temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	350	9
Inherent viscosity ( $\eta_{\text{inh}}/\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )	100–130	5
Intrinsic viscosity ( $\eta/\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )	0.9	1
Tensile strength ( $\sigma/\text{MPa}$ )	4–785	3, 5, 6 and 8
Young modulus ( $E/\text{GPa}$ )	0.21–0.44	3 and 5
Elongation at break ( $\epsilon/\%$ )	20–1000	1, 3, 5, 6 and 8

*Tabla 1: Propiedades del PCL. [13]*

Para la obtención del PCL existen dos métodos de polimerización: apertura de anillo a partir de la *épsilon-caprolactona* ( $\epsilon\text{-CL}$ ) y también por la policondensación partiendo del ácido 6-hidroxihexanoico.

El concepto de la apertura de anillo a partir la  $\epsilon$ -CL o ROP en inglés (Ring Opening Polymerization) consiste en que ciertas unidades se polimerizan en presencia de catalizadores o iniciadores. El catalizador más común es el octoato de estaño ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ) o el estaño 2-etilhexanoato debido a su gran efectividad y a su baja toxicidad. [14]

El concepto de la policondensación del PCL consiste en la síntesis de oligómeros de PCL partiendo del ácido 6-hidroxihexanoico en vacío haciendo desaparecer toda el agua y formando un polímero. [15]

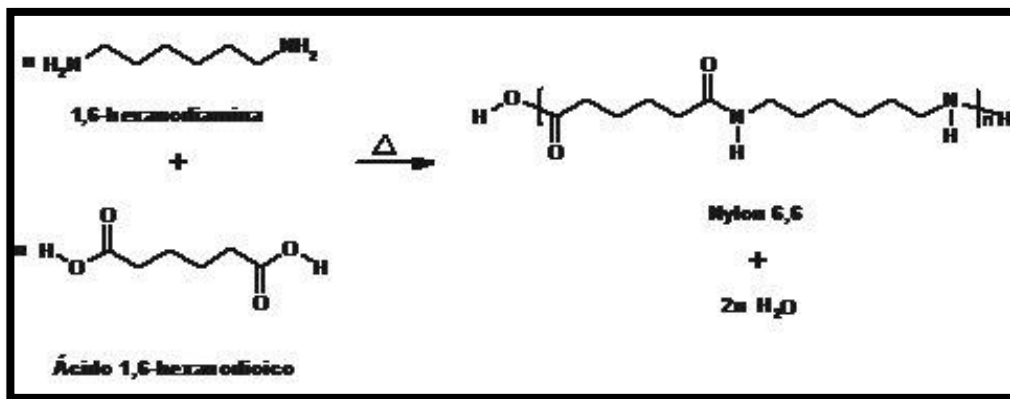


Figura 2: Policondensación del PCL. [16]

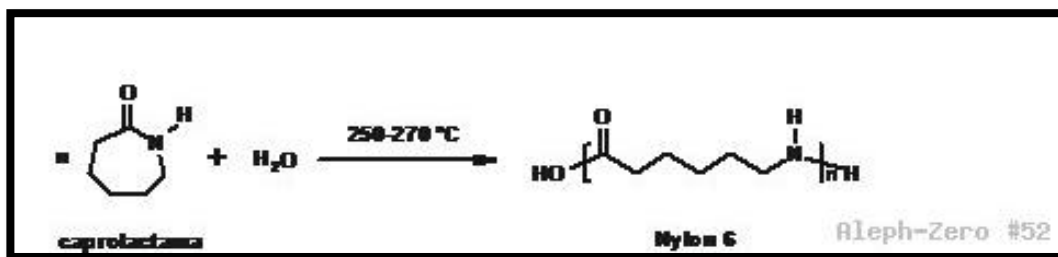


Figura 3: ROP. [16]

El tiempo de degradación que tiene la PCL no está normalizado, pero oscila entre los meses y los años (solo PCL), aunque por supuesto, todo ello depende del peso molecular, del grado de cristalinidad... O sea, del grado de perfección con el que se haya obtenido el PCL. En la naturaleza existen microorganismos que

son capaces de degradarlo enzimáticamente y esta se da primero en la parte amorfa. [10]

Este polímero se ha utilizado en la IT (considerado como de la tercera generación) para aplicaciones como: sistemas de liberación de fármacos, en la industria microeléctrica, etc.



### 6.3. Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HA), con la fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , es un mineral natural formado por fosfato de calcio cristalino. Es uno de los fosfatos más importantes y se puede obtener de manera natural y también de manera sintética. La apatita biológica y la HA, tienen el Calcio (Ca) y el Fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) como principales componentes, y eso demuestra una alta biocompatibilidad, y osteoconductividad a la hora de su aplicación. [17]

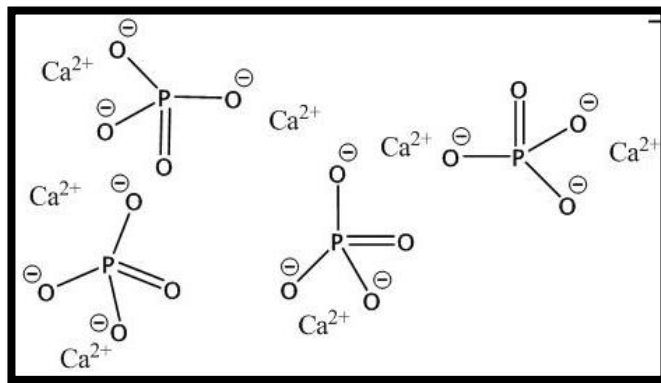


Figura 4: Estructura de la hidroxiapatita. [18]

Debido a sus excelentes características de biocompatibilidad es muy aceptada y adecuada en la osteointegración. La HA aparte de no ser tóxica, ser biodegradable y bioactiva, es capaz de estimular la estructura ósea hasta el punto de acelerar su crecimiento. Razón por la cual es importantísima en la IT y en la biomedicina. [17]

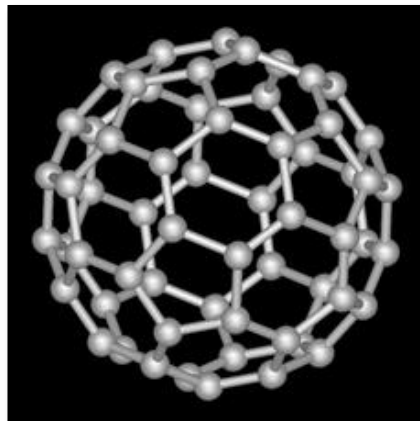
Existen varias maneras de obtener HA sintética pero principalmente tenemos: las sintetizadas a altas temperaturas (que representan buena cristalinidad y gran tamaño de cristales; y las sintetizadas a bajas temperaturas (representan baja cristalinidad y tamaño pequeño de los cristales); y la obtenida mediante la

coprecipitación húmeda manteniendo una temperatura constante, una agitación continua y pH constantes. [19]

La HA se ha utilizado en una amplia variedad de aplicaciones como las matrices para la liberación controlada de medicamentos, en la recuperación de funciones biológicas afectadas por accidentes, en el campo oncológico (liberación prolongada de quimioterapias), etc. [20]

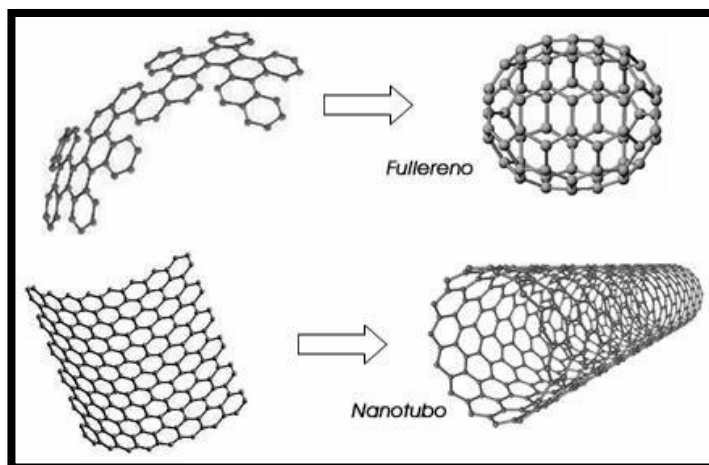
#### 6.4. Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (CNTs) son las uniones de fullerenos o entramados de carbono los cuales forman tubos de un diámetro determinado. Los fullerenos, fulerenos o entramados de carbono, son moléculas que adoptan formas hexagonales recordando a las esferas o elipsoides; las cuales recuerdan al compuesto del grafeno. Estas uniones forman tubos de uniones de fullerenos hexagonales y convexos; no obstante, debido al principio de Euler para los poliedros convexos, tenemos que en cada tubo formado habrá un máximo de 12 pentágonos en estas uniones hexagonales que cierren las uniones tubulares. Por lo tanto, no son todo hexágonos formando uniones perfectas u homogéneas. [21]



*Figura 5: Fullenero. [22]*

Los CNTs, al igual que los fullerenos, provienen del grafeno y se obtienen mediante la unión de láminas de grafeno, unión de tubos concéntricos o también con cadenas de fullerenos. Son muy importantes en la nanotecnología.

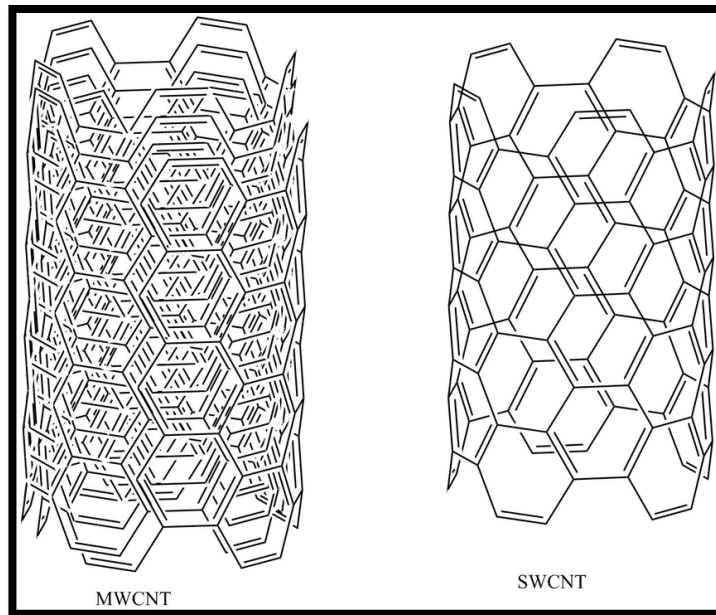


*Figura 6: Fullenero y nanotubo de pared simple. [19]*

Existen diversos tipos de CNTs: de pared simple, pared múltiple, grafenados, dopados con nitrógeno, de copa apilada... Los que interesan para el estudio de esta investigación son los de pared múltiple, en inglés denominados Multi Walled Carbon Nano Tubes (MWCNTs). [23]

Los MWCNTs son de estructura parecida a la del grafeno, excepto que la estructura de estos se dice que es más perfecta. Están formados por cilindros concéntricos y capas laminadas de grafeno. Dicho de otra manera, son tubos concéntricos de pared simple o Simple Walled Carbon Nano Tubes (SWCNTs). Estos tubos concéntricos se quedan unidas entre sí por las fuerzas de Van der Waals. [23]

Los métodos de síntesis para los MWCNTs y SWCNTs son: arco eléctrico, ablación por láser, catalizadores de gas-fase derivados de monóxido de carbono y adición de vapores químicos derivados de los hidrocarburos. [21]



*Figura 7: Estructura de MWCNTs y SWCNTs. [24]*

Las características más importantes de los nanotubos, las cuales han dado pie a su investigación desde el descubrimiento del físico japonés Sumio Iijima, son una alta conductividad, excelente solidez, firmeza y muy buena estructura electrónica. [21]

## **7. MATERIALES**

La policaprolactona fue suministrada por Purac Biomaterials Purasorb PCL 12 (Holanda). El disolvente, 1,4-dioxano (Panreac p.a., Barcelona, España), fue destilado por métodos convencionales. El peso medio relativo molecular  $M_w = 130490$ ,  $M_n = 79760$ , y una polidispersión  $M_w/M_n = 1.636$  de PCL fue determinada usando la técnica de cromatografía permeable de gel (GPC, Perkin Elmer 200) en tetrahidrofurano (THF). La calibración se hizo de acuerdo con los estándares de poliestireno con un flujo de 1 mL/min. La nanohidroxiapatita (nHA) fue suministrada por Aldrich Chemistry (USA), con un tamaño de partícula  $>200$  nm y  $M_w = 502.31$  g/mL. Los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) de 10-20 nm de diámetro, 10-30  $\mu$ m de longitud, lo suministra Nanostructured & Amorphous Materials Inc., Houston, USA. El PBS, lo suministró Fluka Analytical (Sigma Aldrich, USA) con un pH del 7,2 y se utilizó para la degradación in vitro.

## **8. TÉCNICAS EXPERIENTIALES**



## 8.1. Separación de fases inducida térmicamente (TIPS)

El proceso de la separación de fases inducida térmicamente, en inglés Thermally Induced Phase Separation (TIPS), ha sido utilizado por primera vez para la preparación de membranas porosas de polímeros biodegradables. Consiste en disminuir la temperatura de la solución, para formar una primera fase con una alta concentración en polímero y otra segunda fase que tenga una concentración de polímero biodegradable baja. Una vez eliminado el solvente por extracción, evaporación o sublimación, ese espacio libre que deja el solvente eliminado se ocupa inmediatamente por poros creados a partir de la espuma polimérica. Por lo tanto, distinguiremos dos etapas: la primera será la separación de fases y la segunda la eliminación del solvente; por ejemplo, la liofilización, si el disolvente se eliminase por sublimación. [25]

Encontramos dos tipos de TIPS:

- 1- La separación sólido-líquido: la cristalización del solvente puede inducir a la separación de las fases cuando la temperatura baja. Ocurre cuando la temperatura de cristalización del solvente va a ser mayor que la de la separación líquido-líquido de la solución del polímero. Al bajar la temperatura el solvente cristaliza y expulsa al polímero del frente de cristalización del solvente. [26]
- 2- La separación líquido-líquido: ocurre cuando la temperatura de cristalización del solvente es menor que la temperatura de separación de fases de una solución polimérica amorfa. Cuando la solución polimérica

se enfría da lugar a dos tipos de separación: la descomposición espinoidal y la nucleación y crecimiento.

2.1. Descomposición espinoidal: la separación líquido-líquido ocurre de manera espontánea. Se obtiene una red interconectada.

2.2. Nucleación y crecimiento: las partículas pequeñas al tener un área superficial mayor, son menos estables y tenderán a disolverse y formar partículas grandes. Se obtendrá una estructura más dispersa. [26]

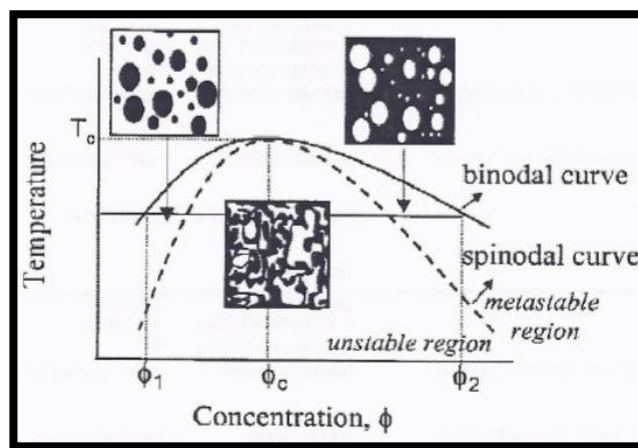


Figura 8: diagrama de fases de una solución polimérica [25]

### 8.1.1. Liofilización

La liofilización (freeze-drying) es un proceso con el cual se consigue la deshidratación de productos a baja presión y temperatura. En los procesos comunes de deshidratación, se realiza mediante la evaporación del agua o del fluido a eliminar. En el caso de la liofilización, esta eliminación se realiza mediante la sublimación. El producto debe estar siempre congelado. [27]

Es una técnica la cual los incas ya utilizaban. Gracias a la altitud en la cual vivían, las bajas presiones y bajas temperaturas que soportaban; dejaban congelar los alimentos por la noche y con los primeros rayos de sol ocurría la sublimación.

Este proceso consta de dos etapas:

- 1- **Congelación:** es la etapa inicial y muy importante, ya que si no se congela no se sublima. Dependerá de factores como la cantidad, concentración y naturaleza propia del producto. La velocidad será importante, ello definirá el tamaño de los cristales y por consecuencia el de los poros.
- 2- **Secado:** se realizan con presiones bajas para que la sublimación sea posible. Tiene dos fases: la desecación primaria y la secundaria.

**2.1. La desecación primaria o sublimación,** es la fase en la cual se elimina la mayor parte de disolvente. El producto tiene que estar completamente congelado para que ocurra la sublimación. La presión sea baja y se aplicará un poco de calor. Este proceso lleva días, ya que no es bueno alterar demasiado el producto con una alta temperatura para una rápida sublimación. Acaba cuando en el producto se ha eliminado todo el disolvente.

**2.2. La desorción o desecación secundaria,** trata de eliminar las últimas trazas de disolvente que en el producto pueda existir. Aproximadamente, quedará una cantidad menor del 1%. La temperatura alcanzada en esta fase será menor a la temperatura de desnaturalización del producto. Se trata de eliminar las interacciones físico-químicas del disolvente con el producto. [28]

Para el presente trabajo se ha utilizado el liofilizador de la marca Telstar.



*Figura 9: Liofilizador Telstar Lyoquest -85. [29]*

#### 8.1.1.1. Preparación de muestras

En el presente trabajo se han fabricado 5 tipos de andamios porosos:

1. PCL al 2,5% (w/v) en 1,4-dioxano.
2. PCL con nHA al 10% respecto al polímero en 1,4-dioxano.
3. PCL con nHA al 10% respecto al polímero y con 1wt% de nanotubos de carbono (MWCNTs) en 1,4-dioxano.
4. PCL con nHA al 10% respecto al polímero y con 5wt% de nanotubos de carbono (MWCNTs) en 1,4-dioxano.
5. PCL con nHA al 10% respecto al polímero y con 10wt% de nanotubos de carbono (MWCNTs) en 1,4-dioxano.



*Figura 10: Andamios porosos fabricados.*

En la fabricación de los andamios porosos se ha seguido el mismo patrón. La única diferencia es la adición de los distintos materiales:

- 1- Primero se retira la PCL del frigorífico. Se pesan aproximadamente unos 0.53g.



*Figura 11: Pesaje PCL.*

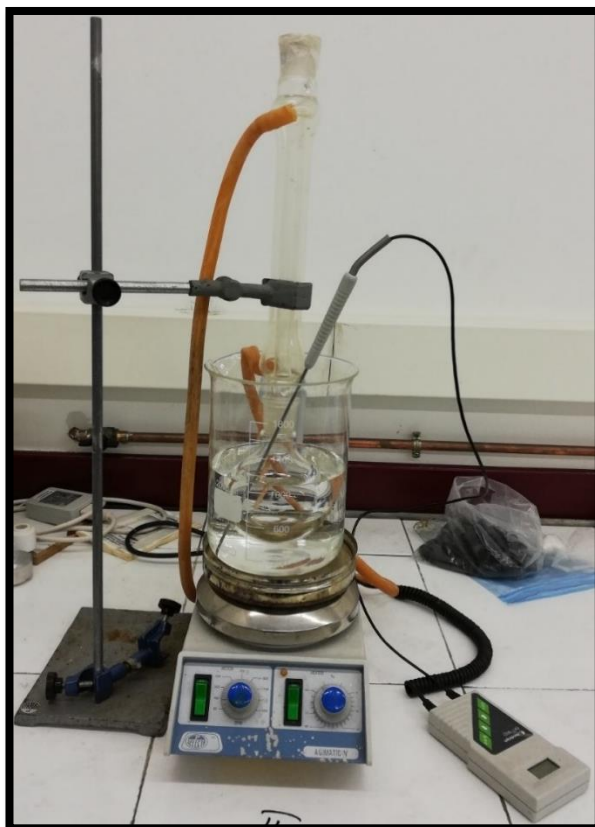
- 2- Una vez pesado el polímero adecuadamente, en un balón de reacción se introduce un imán y se vierte el disolvente al 2,5%. Es decir, con una muestra de 0.534g de PCL tenemos 21,36ml de 1,4-dioxano.



*Figura 12: Disolución PCL con 1,4-dioxano.*

En la manipulación del disolvente es obligatorio utilizar guantes, mascarilla y la campana extractora del laboratorio. Todavía no se ha confirmado al 100% pero el disolvente 1,4-dioxano puede ser cancerígeno.

- 3- Al tener todo esto finalizado, se procede a remover la muestra durante dos horas o dos horas y media aproximadamente a una temperatura de 50°C. Lo haremos en un removedor magnético (para ello el imán) y mediante una columna de refrigeración para que no se evapore el disolvente de la disolución.



*Figura 13: Removedor magnético.*

- 4- Mientras que la disolución se remueve, se pasa a preparar la nHA y los MWCNTs (solo para las muestras arriba descritas).



*Figura 14: HA y MWCNTs.*

- 5- Cuando se finaliza el proceso de remover, se vierte en las muestras necesarias la nHA y MWCNTs. Para que todo ello se mezcle bien

estaremos 3 minutos removiendo con un dispensador eléctrico de manera local; después pondremos la muestra en ultrasonidos de 5 a 8 minutos; para finalizar otra vez 3 minutos con el dispensador eléctrico.



*Figura 15: Ultrasonidos.*

6- Cuando se tiene la mezcla lista, se vierte la disolución en los moldes de aluminio. Los del laboratorio son de un diámetro de 4 cm y 1,5cm de altura. Se introducen los moldes en el liofilizador una semana durante la cual se eliminará el disolvente por sublimación y el espacio que ocupaba el disolvente lo hará la espuma polimérica fabricada.

La receta que se ha utilizado para la liofilización ha sido:

- 1- Congelar durante 12 horas.
- 2- Frío+vacío a 0.5 mbar durante 48 horas.
- 3- Frío+vacío a 0.0 mbar durante 48 horas.
- 4- Calentamiento de bandejas a  $-10^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas.
- 5- Calentamiento de bandejas a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas.



## 8.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En los procesos de control de fabricación las técnicas termoanalíticas se han convertido en imprescindibles. Estos estudios termoanalíticos producen una absorción o desprendimiento de calor; a los cuales se les denomina endotérmicos o exotérmicos.

La calorimetría diferencial de barrido, Differential Scanning Calorimetry (DSC), es una técnica termoanalítica en la que la diferencia de calor entre una muestra y una de referencia se miden como una función de la temperatura. Gracias a esta técnica se determinan los procesos endotérmicos y exotérmicos, cristalizaciones, pureza de compuestos, entalpías de reacción, reacciones de polimerización o despolimerización, degradaciones y lo que es más importante en polímeros las entalpías de fusión y transiciones vítreas. [30]

El funcionamiento básico del DSC radica en mantener las temperaturas de los crisoles (muestra y referencia) a la misma temperatura y estudiar la energía (endotérmica o exotérmica) necesaria para ello y los cambios entálpicos (el cálculo de la entalpía de las reacciones endotérmicas o exotérmicas se determinan por la integración del área del pico de energía). El DSC utilizado para el trabajo consta de dos fuentes de calor (en aparatos más avanzados se pueden llegar a estudiar hasta 3 muestras): una es para la referencia (que será un crisol vacío) y otro para la muestra. En el ordenador, se introducen las características de los cambios y rampas de temperatura. [30]

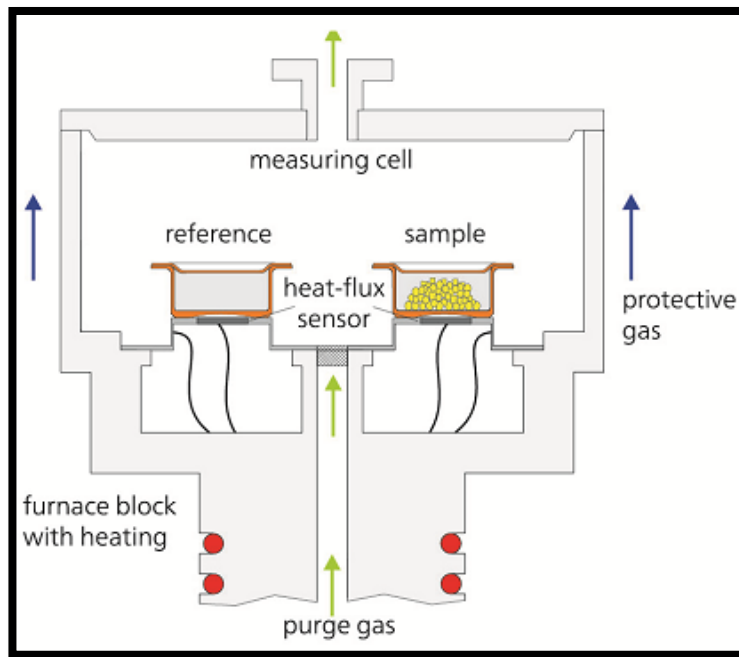


Figura 16: Esquema DSC. [31]

Una vez que se introducen los datos, el DSC comienza a definir las rampas del programa tratando de estudiar la diferencia entálpica que es necesaria para mantener los dos crisoles a la misma temperatura. Estos rangos de temperatura pueden variar desde la temperatura del nitrógeno hasta los 400-500°C y en algunos casos hasta los 600°C. [30]

Esto se hace posible por el principio de "balance-nulo" de medición, en el cual la energía absorbida por la muestra se compensa añadiendo o sustrayendo una cantidad equivalente de energía al calentador de la muestra. [32]

Es muy importante que los crisoles tengan un buen contacto para que las rampas de temperatura sean realizadas correctamente. En el caso de que se creasen demasiados gases de salida se tendría que utilizar crisoles de media o alta presión y siendo de otros materiales distintos del aluminio (que es el que se utiliza en los de este trabajo). [32]

### 8.2.1. Preparación de muestras



*Figura 17: DSC TA Instruments Q200.*

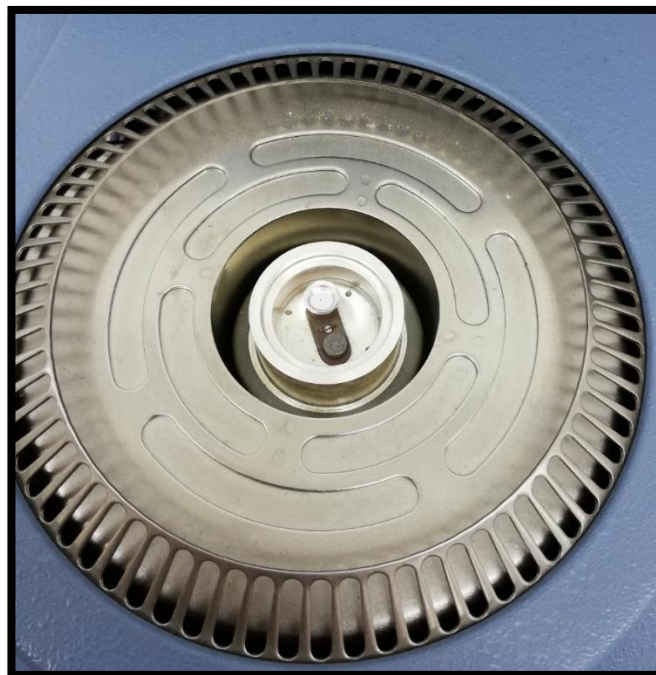
En el proceso de preparación de las muestras para el DSC se siguieron los siguientes pasos:

- 1- Se prepara una muestra de entre 5-7 mg y se encapsulan en crisoles del tipo Tzero Aluminium. Para ello se empieza pesando el crisol para tarar la balanza.
- 2- Después de tarar el crisol, se corta trozos pequeños de scaffold para introducir en el crisol y una vez encapsulado el material compuesto, se tapa la parte superior y para cerrarlo adecuadamente se prensa:



*Figura 18: Prensa.*

- 3- Cuando está preparado el crisol, se introduce en el DSC. Con cuidado para no confundirse con la cápsula de referencia.



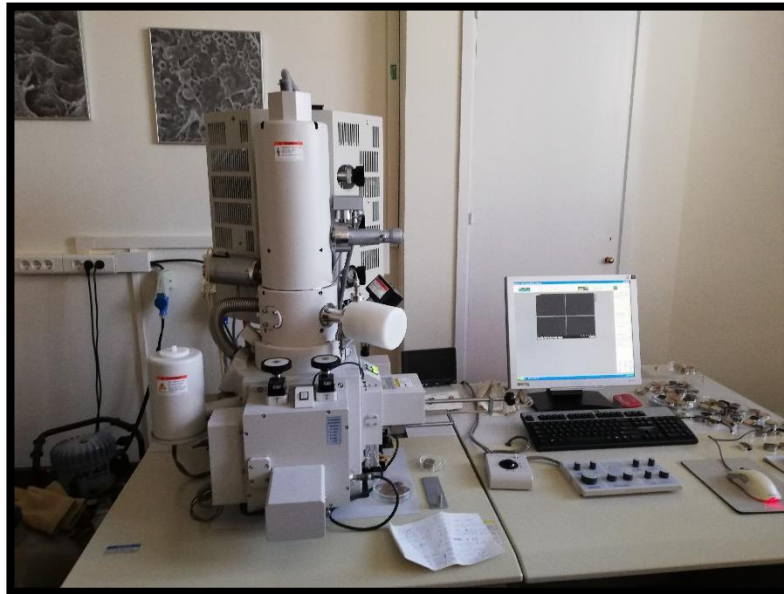
*Figura 19: Porta muestras.*

Cuando se ha realizado todo este proceso y la simulación ha finalizado. Se guardan todos los crisoles.

La muestra introducida se va a someter a un tratamiento térmico, con los termogramas resultantes se analizarán los datos con el programa TA Universal Analysis. El programa introducido en el DSC para analizar nuestras muestras es el siguiente:

- 1- Equilibrate at -20.00°C.
- 2- Data storage On.
- 3- Ramp 20.00°C/min to 250°C
- 4- Mark of end cycle 0.
- 5- Ramp 10.00°C/min to -20°C.
- 6- Mark of end cycle 1.
- 7- Ramp 20.00°C/min to 250°C.
- 8- Mark of end cycle 2.
- 9- Data storage Off.
- 10- Equilibrate at 25.00°C.

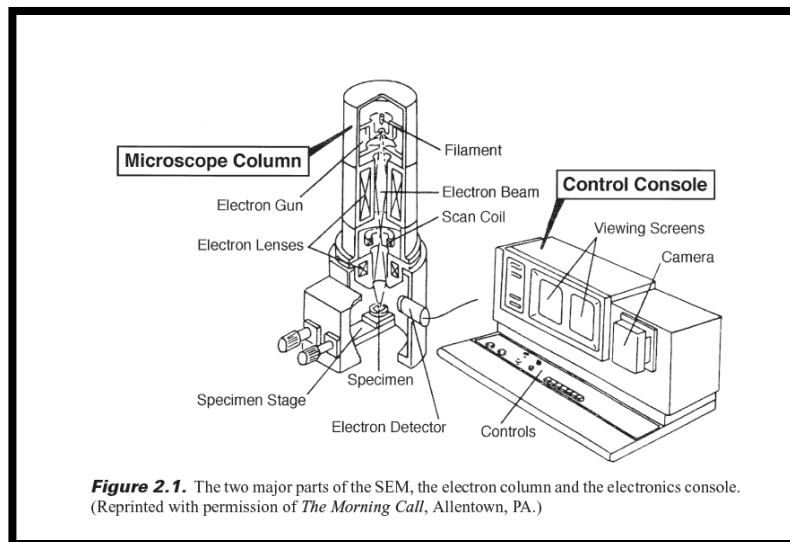
### 8.3. Microscopio electrónico de barrido (SEM)



*Figura 20: HITACHI S-4800 SEM.*

EL microscopio electrónico de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM) es una técnica de microscopía electrónica capaz de generar o producir imágenes de alta resolución en tres dimensiones; tal es así, que la característica que lo define es la correspondencia biunívoca (punto a punto) que une la muestra examinada y la imagen formada. [33]

El microscopio consta, mayormente, de la columna y la consola. La columna está formada por una serie de lentes y un cañón de electrones. En la base se suele encontrar una bomba de vacío que genera un vacío de  $10^{-4}$ PA. La consola de control, tiene un tubo de rayos catódicos (Cathode Ray Tube, CRT), el ordenador y la monitorización de la información. [34]



*Figura 21: Partes del SEM. [33]*

El funcionamiento es el de un barrido de superficie. Un haz electrónico se desplaza hacia la superficie generando unos barridos de idas y venidas (como un pincel) generadas por un sistema de bobinas de barrido situadas en la columna del instrumento. Este haz de electrones que emite, se transmite a través de un cátodo de tungsteno (también existen de hexaboruro de lantano, LaB<sub>6</sub>) a través de una columna en la cual se ha hecho vacío de 10<sup>-4</sup>PA. El haz se concentra por una serie de lentes electromagnéticas desde 25.000-50.000nm hasta 10nm. Esto se consigue acelerando los electrones con una energía de 0.1-30keV (100-30.000 electrovoltios). [34]

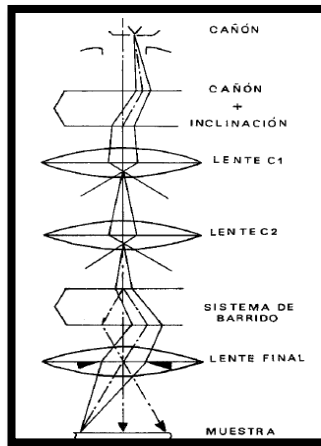


Figura 22: Sistema de funcionamiento del SEM. [33]

Cuando el haz interactúa con la superficie generando esos barridos, se producen electrones secundarios los cuales inciden sobre una centelladora o amplificadora dando origen a fotones que serán los que den la información pasando a través de unos fotomultiplicadores que darán origen a los fotoelectrones con la información de la muestra estudiada. Estos fotoelectrones o electrones secundarios, son los que dan la información de la muestra, pero para ello se tiene que evitar la dispersión de los mismos ya que la penetración que tiene sobre la materia es muy pequeña. Por lo tanto, la bomba de vacío es cuando hace su labor generando en la columna el vacío de mínimo  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  PA.

[35]

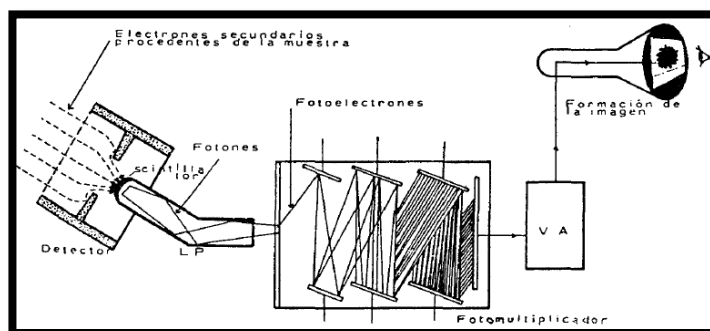


Figura 23: Fotomultiplicadores del SEM. [33]



### 8.3.1. Preparación de muestras

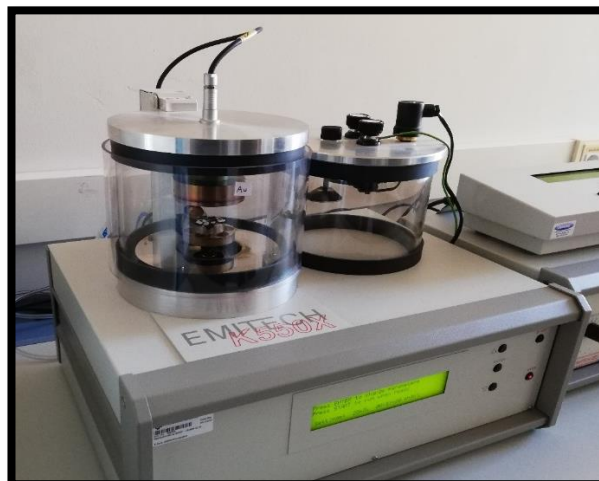
Para el proceso de preparación de las muestras del SEM se siguió el siguiente proceso:

- 1- Se pega en el portamuestras unas tiras de grafeno adhesivas por las dos caras y conductoras. Tiene que dar espacio para 10 muestras, las de la semana 0 y las de la semana 8 de degradación.



*Figura 24: Portamuestras SEM.*

- 2- Una vez pegadas las muestras, se les recubre con una fina capa de oro de 15 nm mediante la técnica sputtering y en vacío, para que sean conductoras.



*Figura 25: Metalizador EMITECH K550X.*

- 3- Para finalizar se mete la muestra en el SEM y se procede a realizar el estudio de la morfología.

## 8.4. Degradación in vitro

### 8.4.1. Preparación de muestras



*Figura 26: Estufa termostaticada.*

Con los scaffolds necesarios finalizados, se pasa a realizar la degradación in vitro.

Las muestras se cortan con una forma rectangular de unos  $0.5\text{cm}^2$  y de un peso que oscila entre 15-25mg. Después de pesarlas, se preparan tubos de ensayo con 10 ml de solución tampón salina (PBS) con un 7,2 de pH; sumergiéndolas por completo. La degradación se hará en una estufa termostaticada a  $37^{\circ}\text{C}$  y en condiciones estáticas.



*Figura 27: PBS.*



*Figura 28: Probetas.*

Los periodos de degradación van a ser de 0,3,6 y 8 semanas.

Una vez transcurridos esos periodos, se procede a retirar las muestras de los tubos de ensayo. La solución salina que contiene se vierte en un recipiente para que se pueda medir el pH después de la degradación. La muestra se pasa por un trozo de papel para retirar la capa superficial de agua y se pesa (se obtiene el peso húmedo “Wh”). Una vez pesado y anotados los datos de peso húmedo y

pH, dejaremos una semana secar la muestra en la misma estufa termostaticada y se secará para obtener el peso seco (“Ws”).

Para calcular el pH se ha utilizado el pHmetro ORP CE-228.



*Figura 29: Medidor de pH.*

La solución salina que contiene el tubo de ensayo se vierte en un recipiente y se mide el pH. Como la muestra ha estado a una temperatura de 37°C, el termómetro se introduce en la cámara termostaticada. Este proceso se repetirá para cada muestra y se anota el resultado para hallar la diferencia de pH inicial y final.

Una vez realizado el proceso de secado (aproximadamente una semana a 37°C), se calcula el porcentaje de agua absorbida y el porcentaje de pérdida de masa:

$$\%W_{abs} = \frac{W_h - W_0}{W_0} \times 100$$

*Ecuación 1: Porcentaje de absorción de agua.*

Donde,  $W_h$  es el peso húmedo, una vez retirada la capa superficial de agua tras retirarla, y  $W_0$  es el peso inicial

$$\% \Delta m = \frac{W_0 - W_s}{W_0} \times 100$$

*Ecuación 2: Porcentaje de pérdida de masa.*

Donde,  $W_s$  es el peso seco, después de pesarla tras el proceso de secado.

## **9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

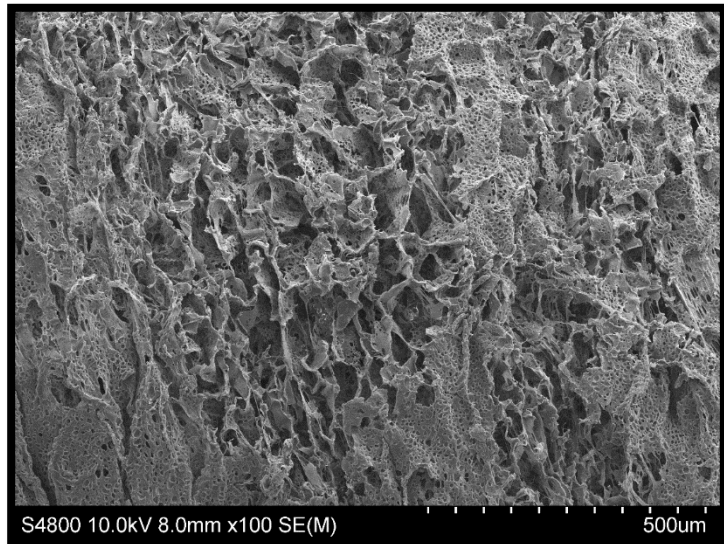
## 9.1. SEM

Las figuras 30-39 que son los andamios porosos que no se han sometido al proceso de degradación in vitro. Los scaffolds de PCL presentan un poro de 500 micrómetros y mucha porosidad en las paredes como se aprecia en las figuras 30-31. Al añadir un 10% de nHA, véase figuras 32-33, los scaffolds se muestran más compactos y con menor porosidad y los poros se ven más pequeños, más compactos. La adición de nHA ha producido una anisotropía en la morfología de los andamios (más irregularidad); sin embargo, al introducir MWCNTs en proporciones de 1% y 5% se produce una estructura muy regular en los que se aprecian perfectamente los canales de comunicación de los poros (figuras 34-37). No obstante, la adición de grandes cantidades (10%) de MWCNTs, se produce unas aglomeraciones de las cuales no se percibe correctamente si son de nHA, MWCNTs o de ambas; de manera que el andamio poroso presenta un aspecto mucho más abrupto e irregular.

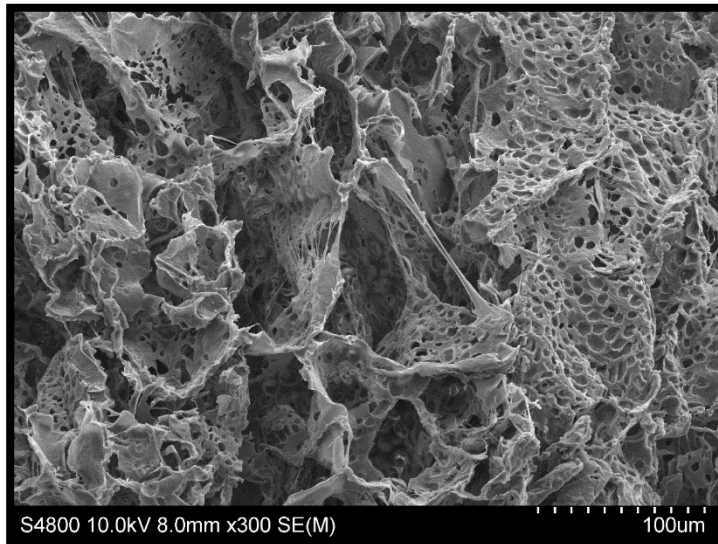
Con las figuras 40-49 (aquellos andamios que se han sometido a la degradación de 8 semanas), se observa como los scaffolds de PCL apenas sufren variaciones en su morfología al igual que las de nHA. No obstante, las muestras que contienen 1% de nanotubos (figuras 44-45) y 5% de nanotubos (figuras 46-47), las cuales presentaban un aspecto regular y ordenado, ahora se ve como han sufrido una transformación importante teniendo una estructura mucho más irregular y apreciando pequeños aglomerados de nanopartículas, nanotubos o ambas. Para las figuras 48-49, la aglomeración es mucho mayor presentando un aspecto mucho más abrupto y desordenado.

Podemos concluir, que si bien la adición de cantidades no muy elevadas de MWCNTs en menos cantidad del 10%, producen una estructura muy regular y parece que los nanotubos aceleran el proceso de la degradación in vitro.

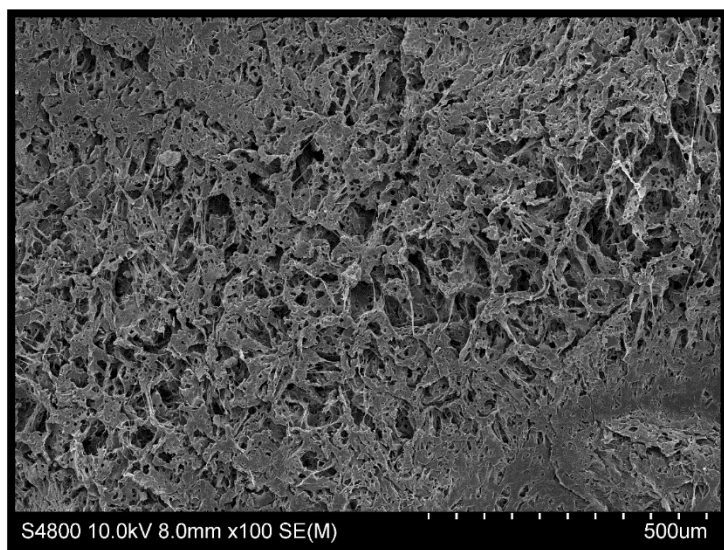




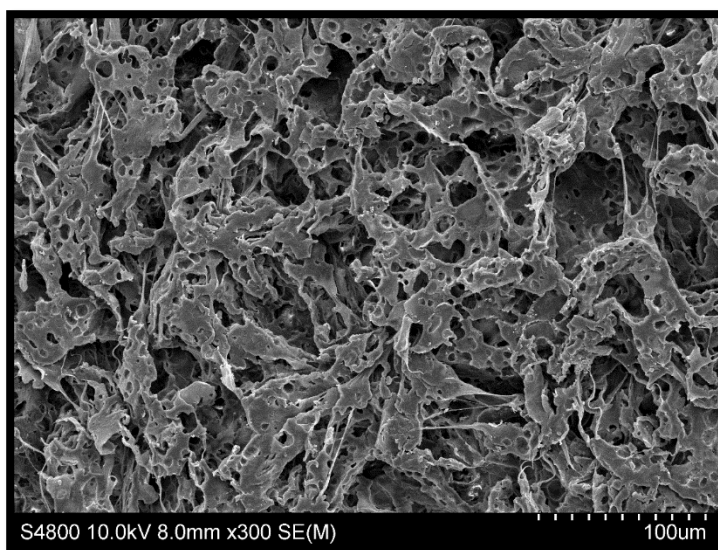
*Figura 30: PCL sin degradar (x100).*



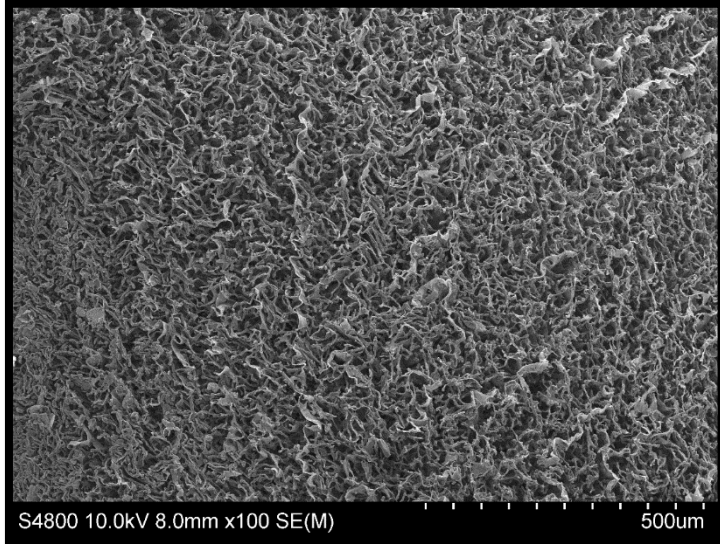
*Figura 31: PCL sin degradar (x300).*



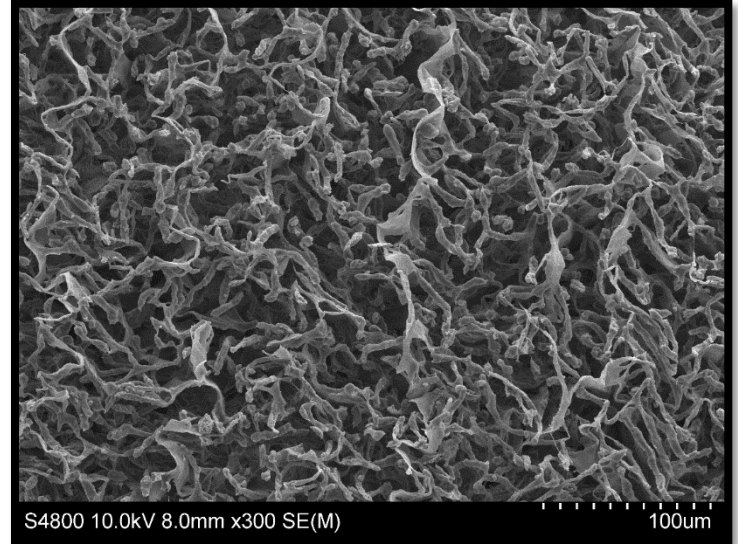
*Figura 32: PCL/10% nHA sin degradar (x100).*



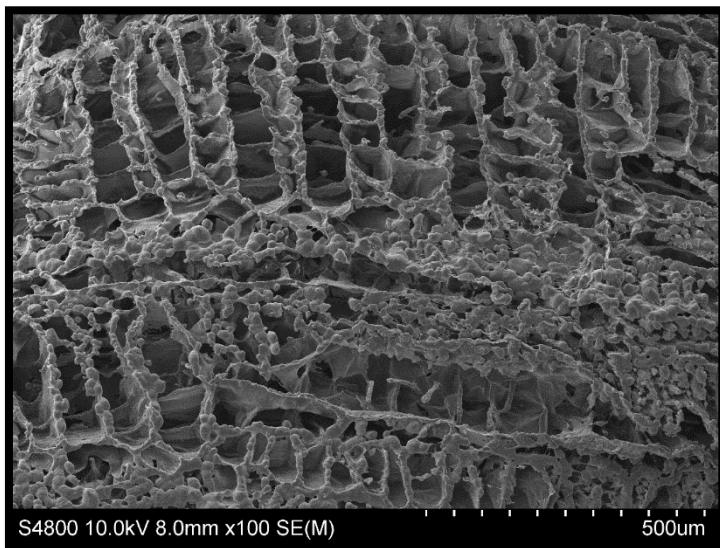
*Figura 33: PCL/10% nHA sin degradar (x300).*



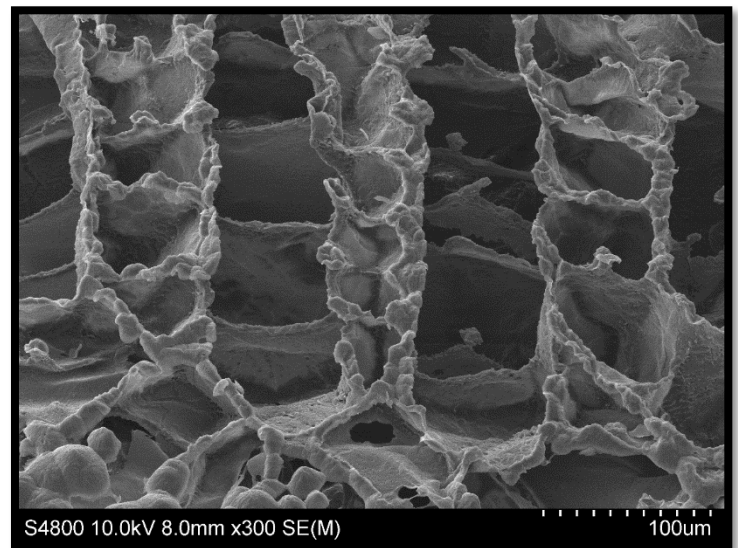
*Figura 34: PCL/10% nHA/1wt% MWCNTs sin degradar (x100).*



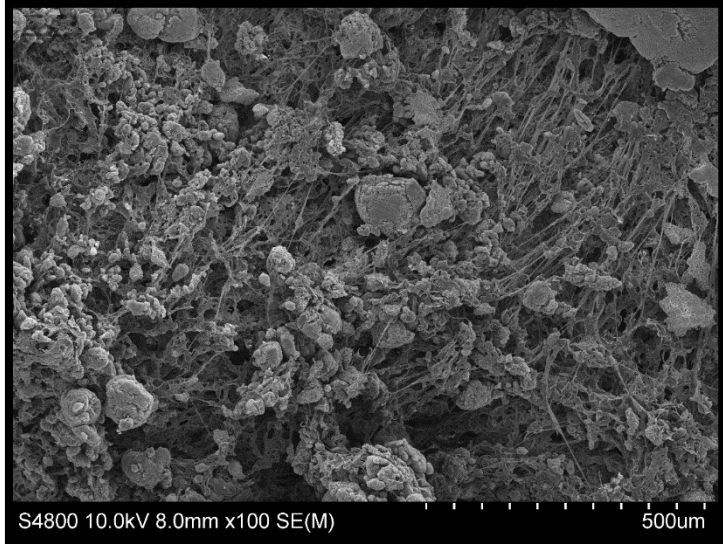
*Figura 35: PCL/10% nHA/1wt% MWCNTs sin degradar (x300).*



*Figura 36: PCL/10% nHA/5wt% MWCNTs sin degradar (x100).*



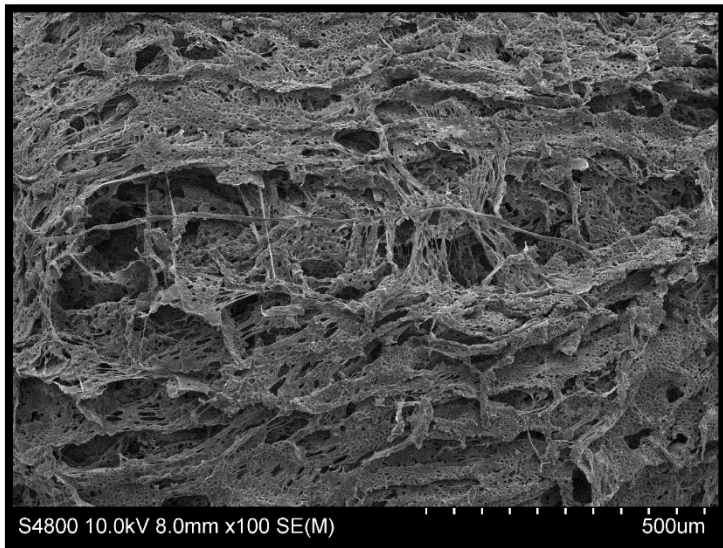
*Figura 37: PCL/10% nHA/5wt% MWCNTs sin degradar (x300).*



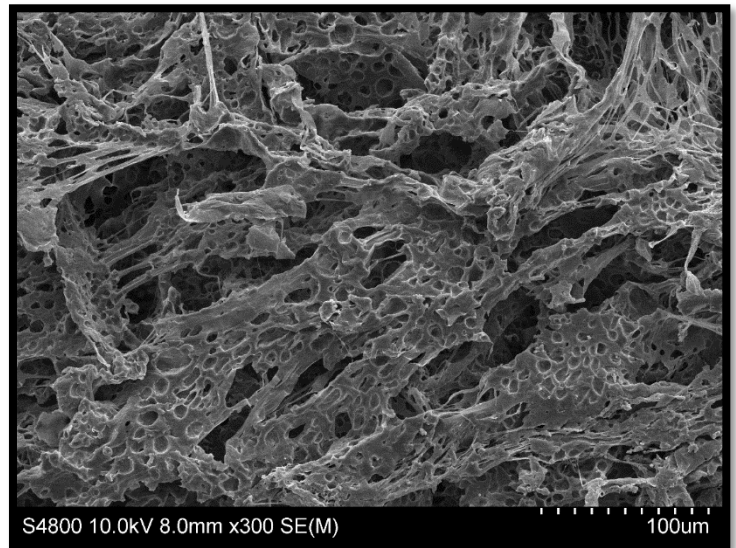
*Figura 38: PCL/10% nHA/10wt% MWCNTs sin degradar (x100).*



*Figura 39: PCL/10% nHA/10wt% MWCNTs sin degradar (x300).*

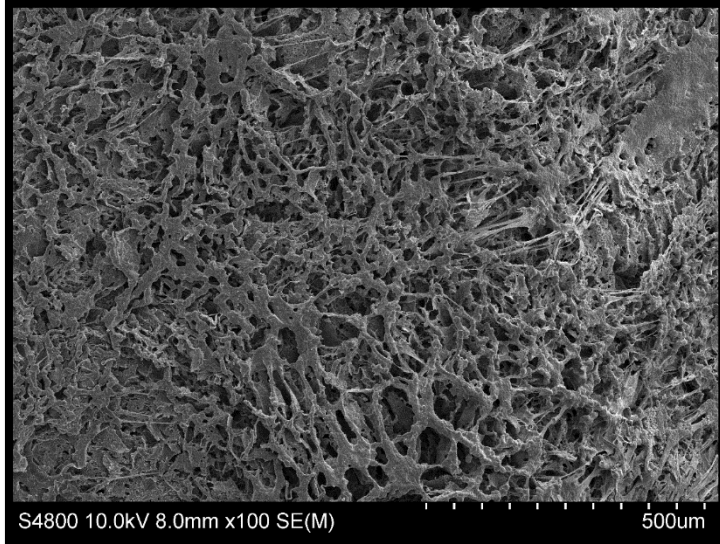


*Figura 40: PCL 8 semanas de degradación (x100).*

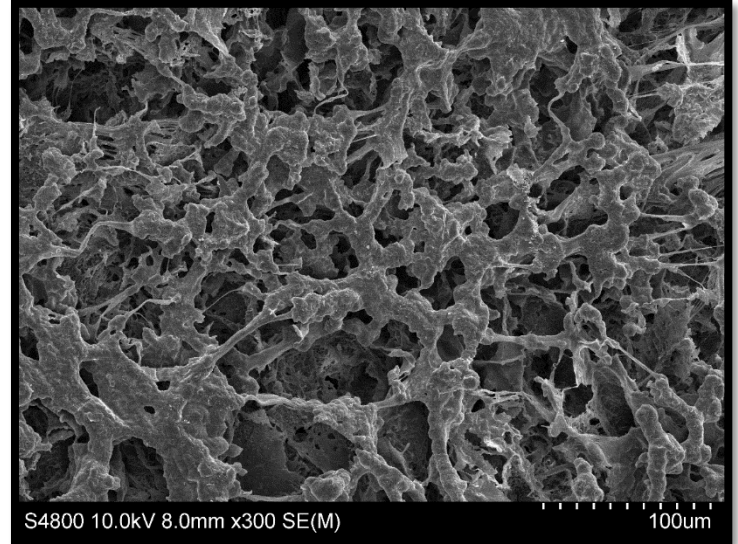


*Figura 41: PCL 8 semanas de degradación (x300).*

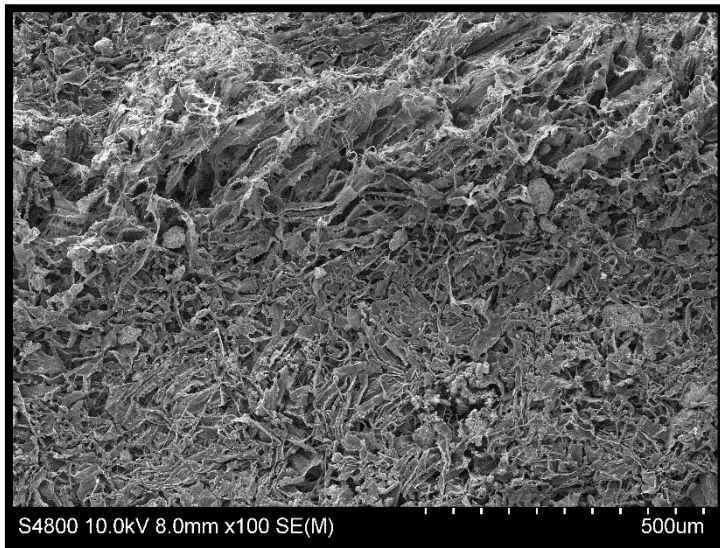




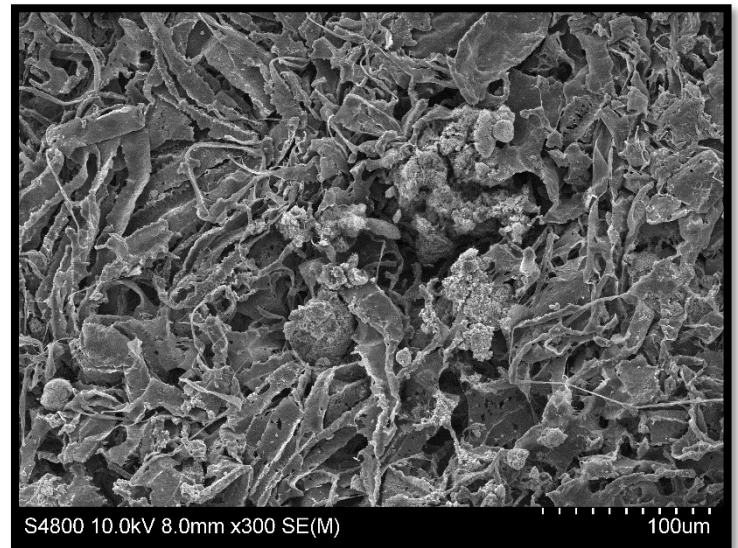
*Figura 42: PCL/10% nHA 8 semanas de degradación (x100).*



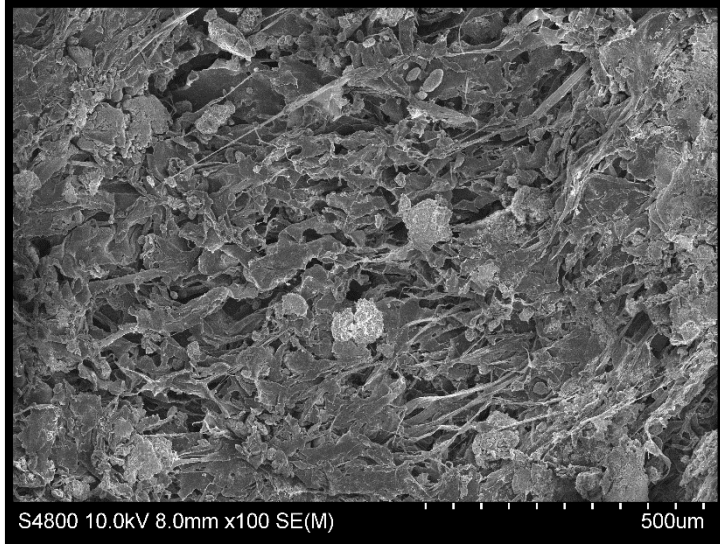
*Figura 43: PCL/10% nHA 8 semanas de degradación (x300).*



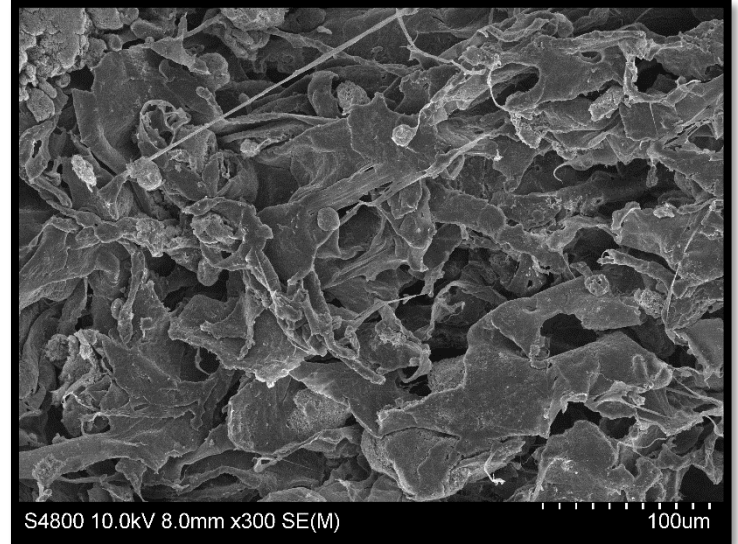
*Figura 44: PCL/10% nHA/1wt% MWCNTs 8 semanas de degradación (x100).*



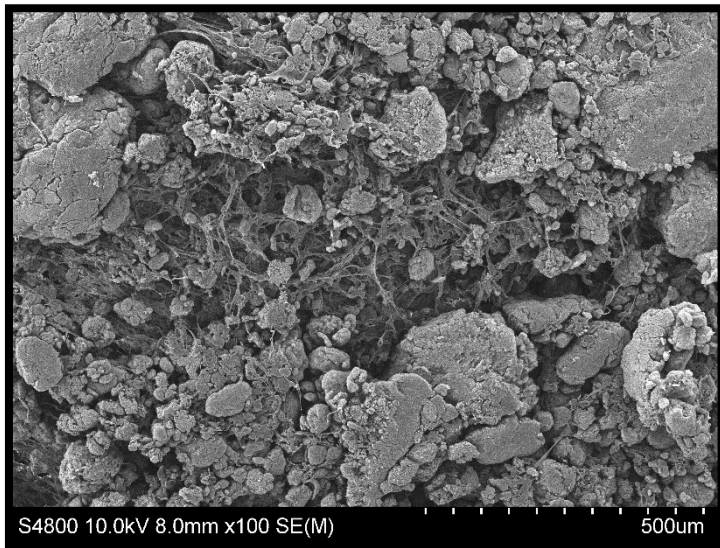
*Figura 45: PCL/10% nHA/1wt% MWCNTs 8 semanas de degradación (x300).*



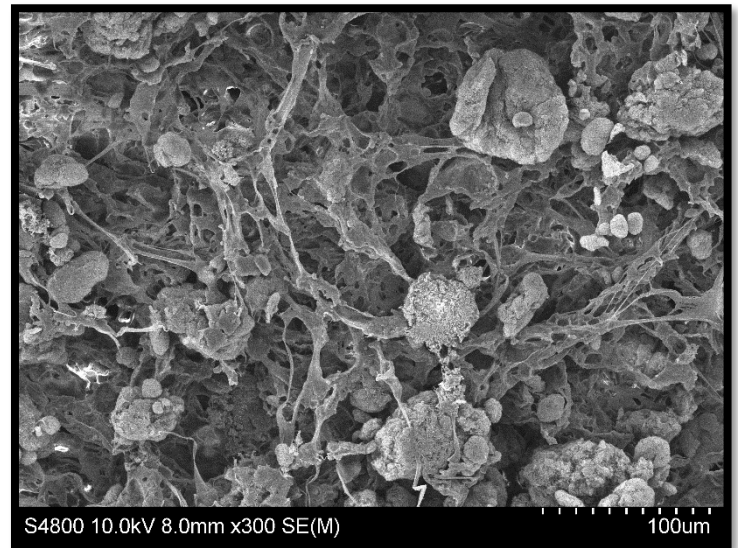
*Figura 46: PCL/10% nHA/5wt% MWCNTs 8 semanas de degradación (x100).*



*Figura 47: PCL/10% nHA/5wt% MWCNTs 8 semanas de degradación (x300).*



*Figura 48: PCL/10% nHA/10wt% MWCNTs 8 semanas de degradación (x100).*



*Figura 49: PCL/10% nHA/10wt% MWCNTs 8 semanas de degradación (x300).*

## 9.2. Degradación in vitro.

Como bien sabemos, la degradación hidrolítica de los poliésteres alifáticos como el PCL, pueden tener lugar a través de una degradación superficial o una degradación en bloque.

Son los procesos de reacción y difusión los que van a determinar el tipo de degradación que tendrá lugar. Si la rotura hidrolítica de las cadenas produce oligómeros y monómeros que se difunden en el entorno, es más rápida la entrada de PBS en el scaffold y se produce una degradación superficial; es decir, el polímero se va a ir reduciendo de fuera hacia dentro sin que su interior se vea muy afectado manteniendo el peso molecular. La degradación en bloque ocurre cuando el PBS penetra en el interior del soporte poroso provocando reacciones hidrolíticas y reduciendo el peso molecular.

Además, si la difusión es la adecuada los oligómeros y monómeros se van a repartir de forma uniforme y todo el soporte se degradará por igual. En cambio, si la difusión se ve obstaculizada, los productos ácidos de la degradación que reaccionan con los grupos éster de los finales de cadena se van acumulando en el interior y dará lugar a una reacción de degradación autocatalizada; el interior se degrada más rápido que el exterior. En el interior, estos productos van a tener más facilidad para reducirse y difundirse y la reducción del peso molecular será menor y más lenta (véase la figura 50).

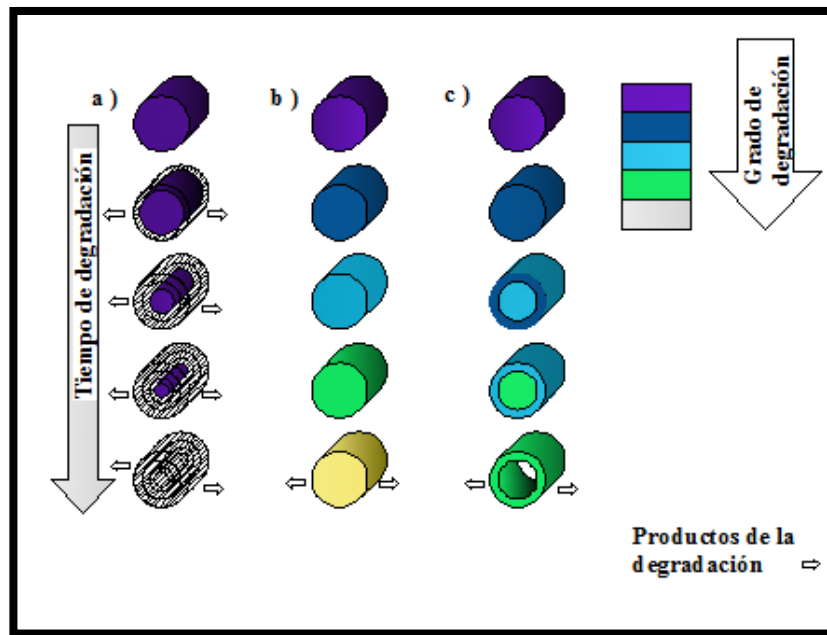


Figura 50: Tipos de degradación del PCL.

Una vez introducida la discusión se ven los gráficos de pH, absorción de agua y pérdida de masa:

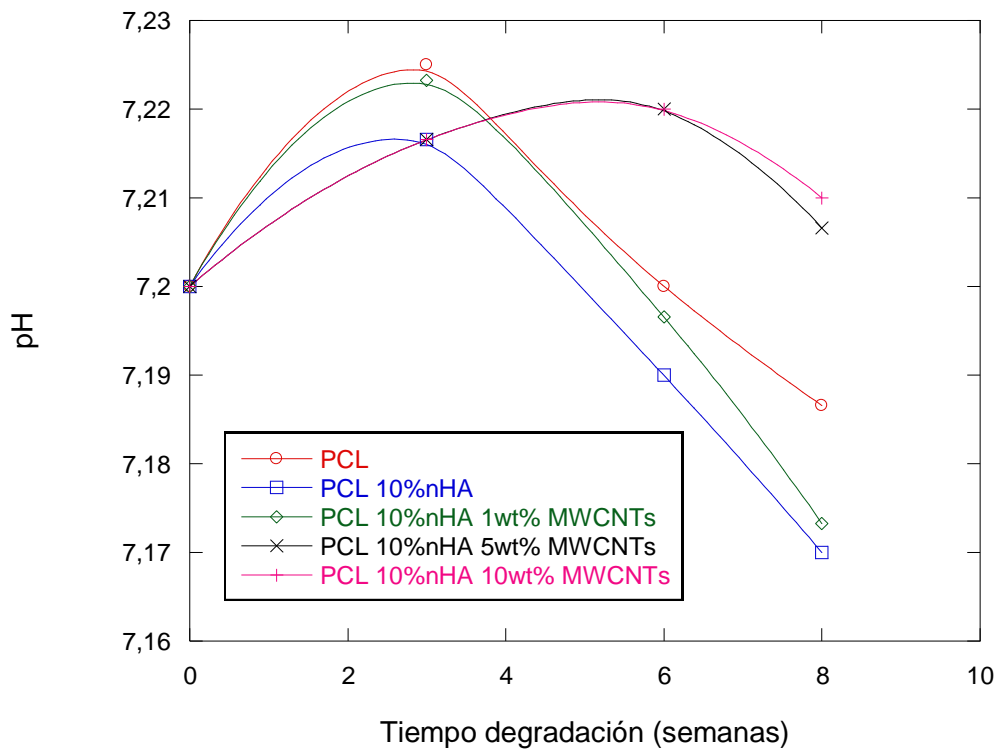


Figura 51: Gráfico de pH.

La degradación del PCL ocurre mediante hidrólisis química a bajo o a muy alto pH originando la hidrólisis de las bandas éster. La variación del pH nos da una idea del progreso de esta degradación. En la figura 51, se observa como para las muestras de PCL/nHA y PCL/nHA/1wt% MWCNTs el pH sube hasta la semana 3 de la degradación in vitro y a continuación empieza a bajar alcanzando valores en torno a 7,17 para algunas muestras. Sin embargo, las muestras con mayor porcentaje en nanotubos, experimentan el mismo comportamiento, pero en la semana 5 para luego descender. En teoría, este comportamiento implicaría un retraso en el proceso de degradación de 2 semanas.

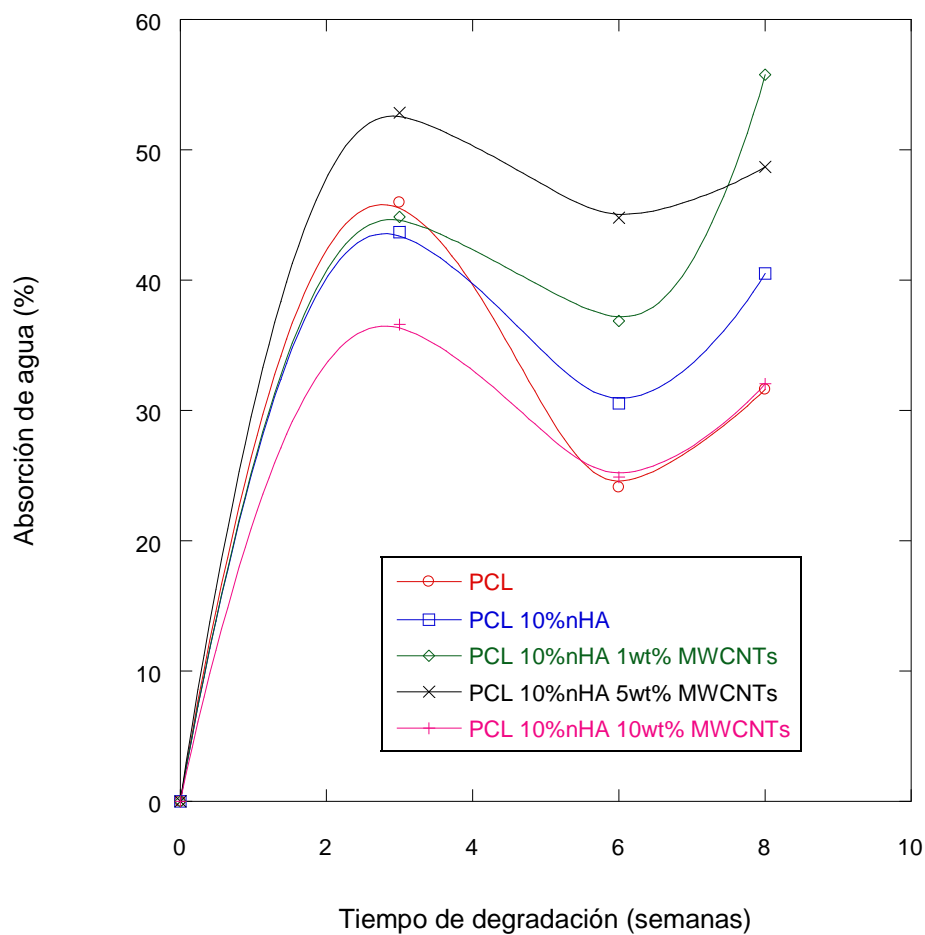


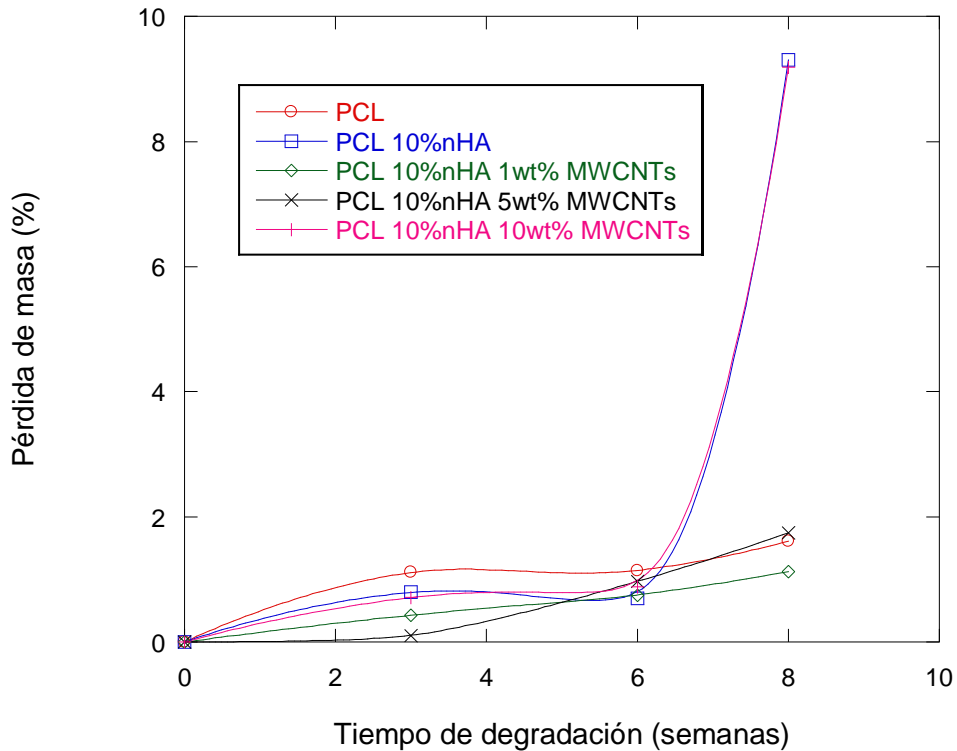
Figura 52: Gráfico de porcentaje de absorción de masa.



El porcentaje de PBS absorbido nos da una idea del estadio en el que se encuentra el proceso de degradación, el cual lo podemos dividir en etapas:

- 1- Absorción y difusión de PBS.
- 2- Los grupos ácidos de las cadenas autocatalizan las reacciones de hidrólisis.
- 3- Se alcanza un peso molecular crítico y los oligómeros salen del bloque polimérico. Se genera una fuerte disminución de la masa polimérica y un gran aumento de la liberación de principios bioactivos que se difunden a través de los poros.
- 4- La matriz polimérica aumenta mucho su porosidad y la degradación avanza de forma homogénea y muy lentamente.

En la figura 52 se observa una gran absorción del PBS alcanzando valores máximos del 55% para la semana 3. A partir de este momento, existe una estabilización en la absorción. Parece que nos encontramos en una primera etapa de absorción y difusión de PBS.

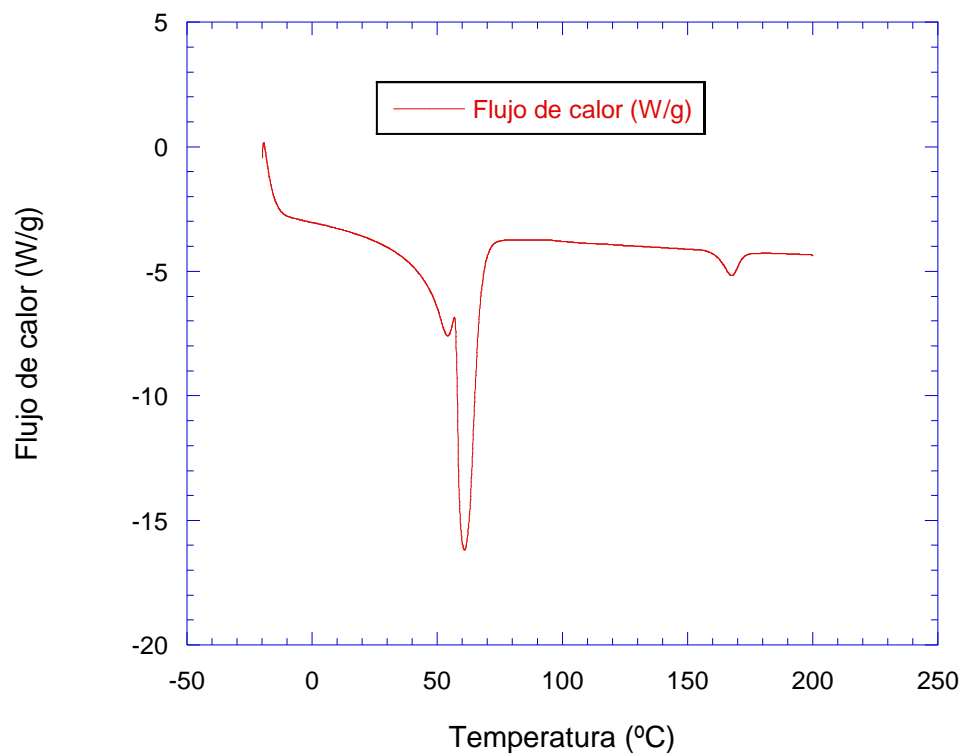


*Figura 53: Porcentaje de pérdida de masa.*

En la figura 53, vemos como al final de la semana 8 de degradación, las muestras de PCL/10% nHA/1wt% MWCNTs y PCL/10% nHA/5wt% MWCNTs sufren una pérdida de masa inferior al 2%. Sin embargo, las muestras de PCL/10% nHA y PCL/10% nHA/10wt% MWCNTs tienen una pérdida de masa cerca del 10%. Esto puede ser debido a que se han producido aglomerados de nHA para la primera muestra y de nHA, o MWCNTs o de ambas para la segunda muestra como se han observado en las micrografías del SEM y en lugar de experimentar estas muestras una degradación superficial, han experimentado una degradación autocatalítica en bloque ya que al parecer estas muestras tienen una morfología más irregular y con menos poros. Una vez que penetra el PBS en el interior del scaffold, los productos resultantes de la degradación encuentran más dificultad para abandonar el scaffold y acelerar el proceso de degradación in vitro.

### 9.3. DSC

El estudio de la calorimetría diferencial de barrido, nos ha dado unas termografías que se han analizado en el TA Universal Analysis y después toda la información se ha aunado en la tabla 2:



*Figura 54: Termografía PCL sin degradar.*

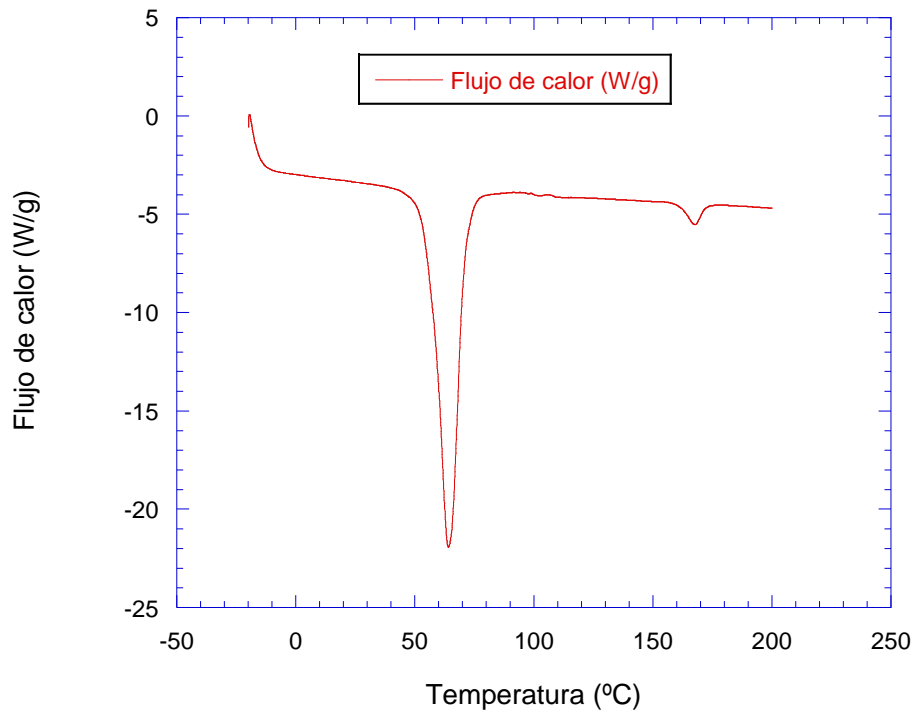


Figura 55: Termografía PCL 8 semanas de degradación.

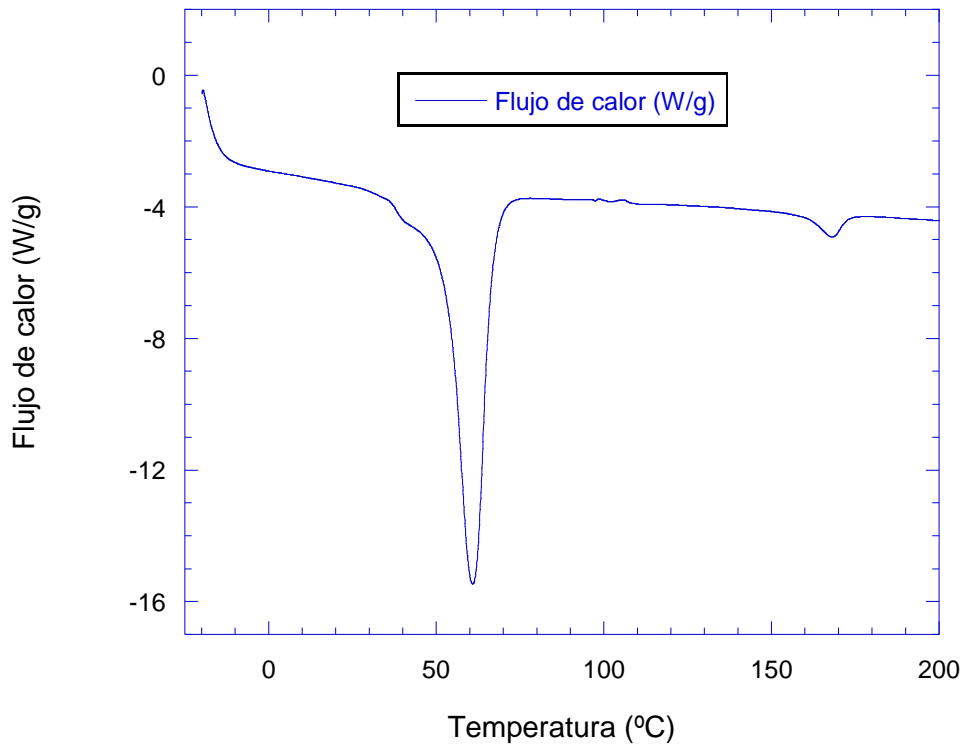


Figura 56: Termografía PCL/10% nHA sin degradar.

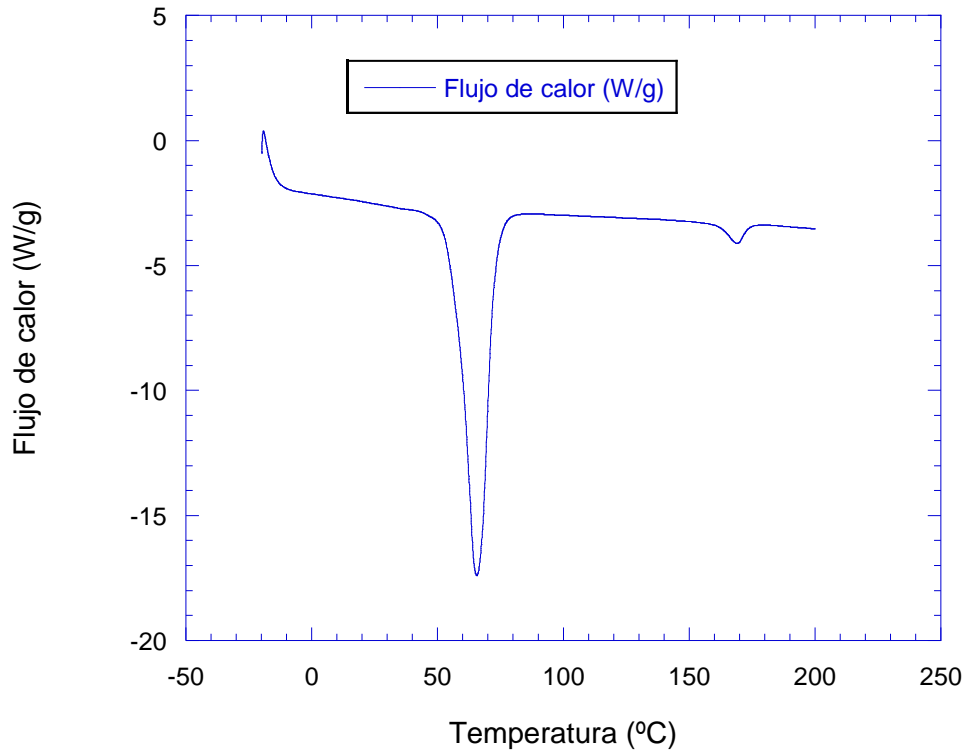


Figura 57: Termografía PCL/10% nHA 8 semanas de degradación.

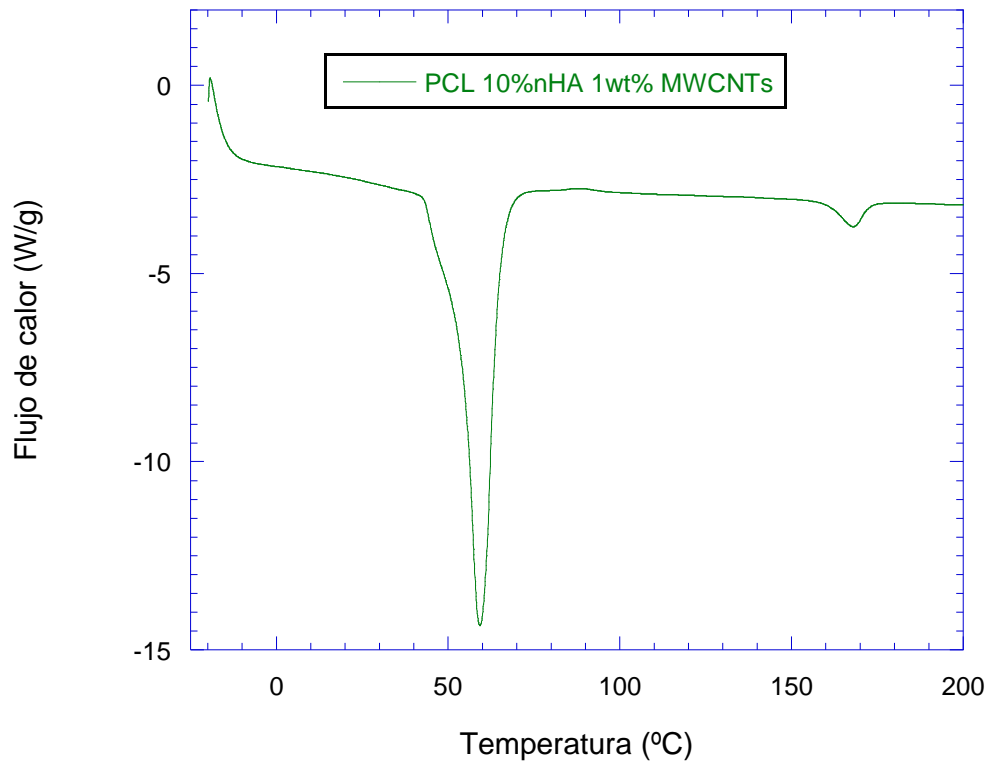


Figura 58: Termografía PCL/10% nHA/1wt% MWCNTs sin degradar.

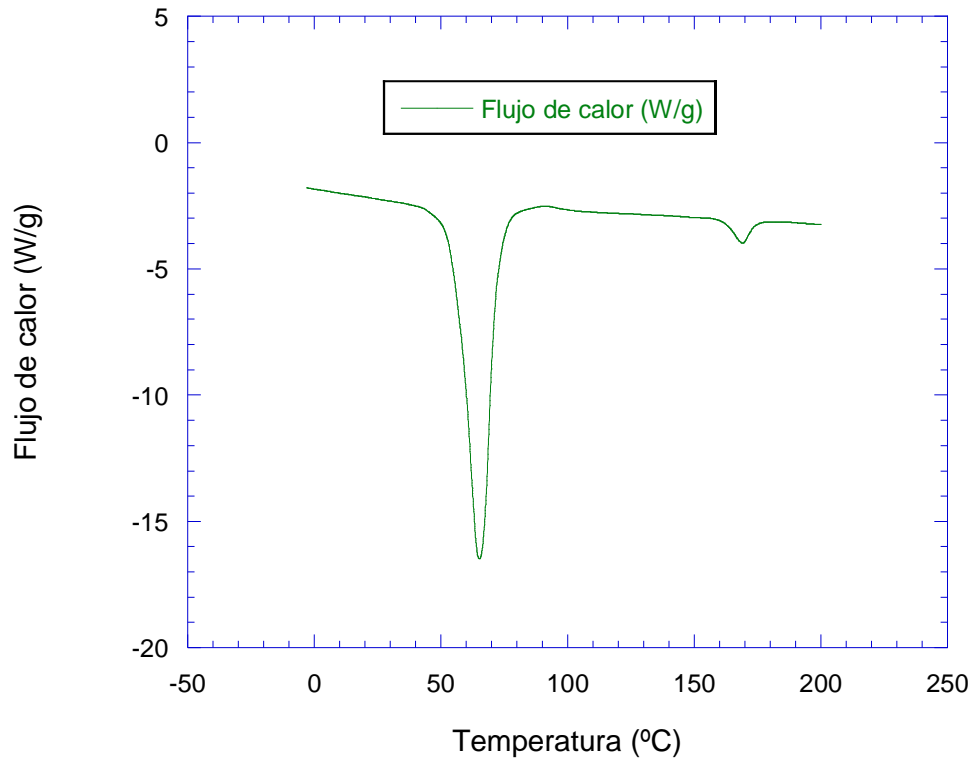


Figura 59: Termografía PCL/10% nHA/1wt% MWCNTs 8 semanas de degradación.

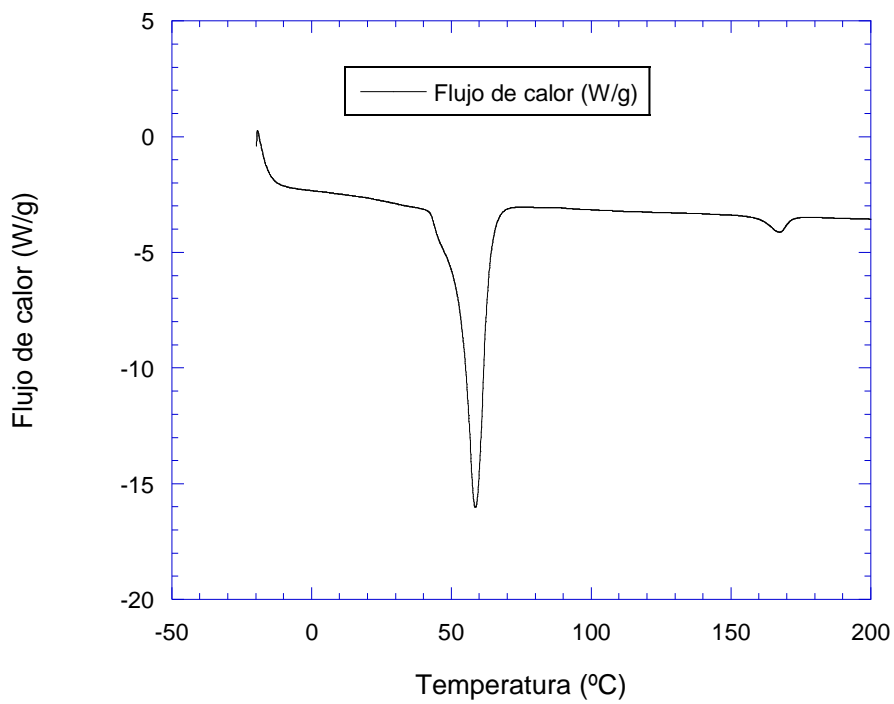


Figura 60: Termografía PCL/10% nHA/5wt% MWCNTs sin degradar.

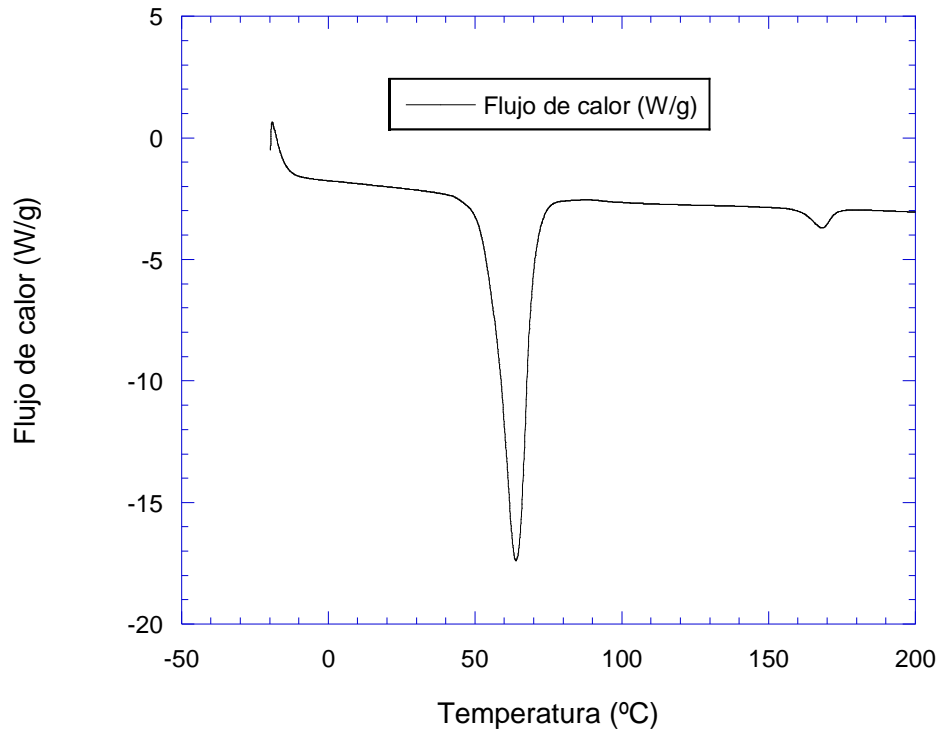


Figura 61: Termografía PCL/10% nHA/5wt% MWCNTs 8 semanas de degradación.

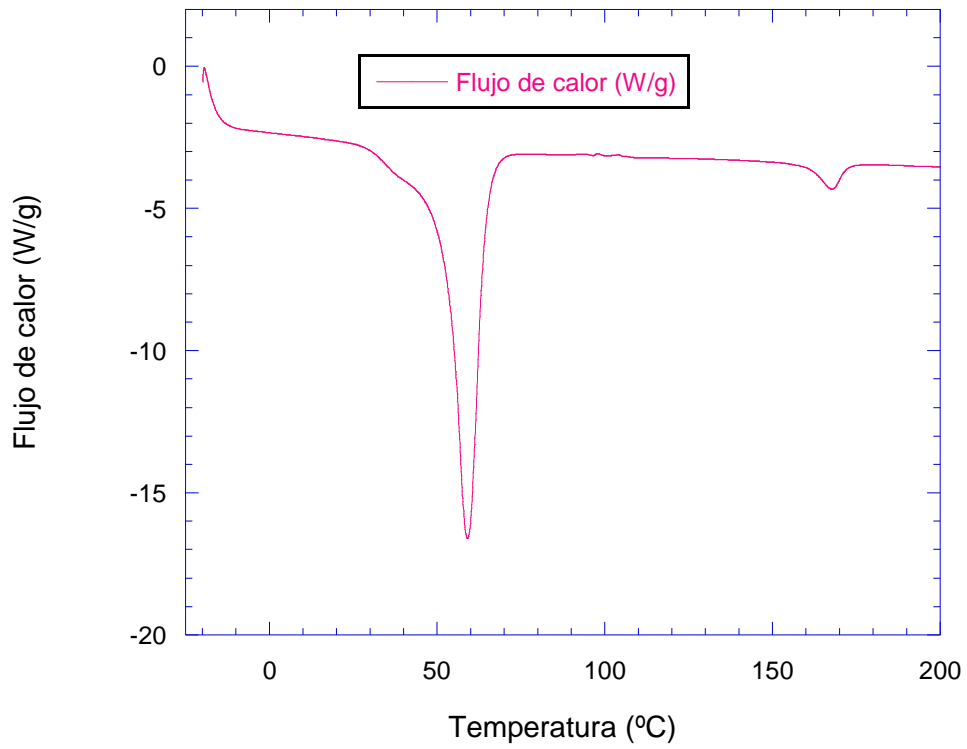
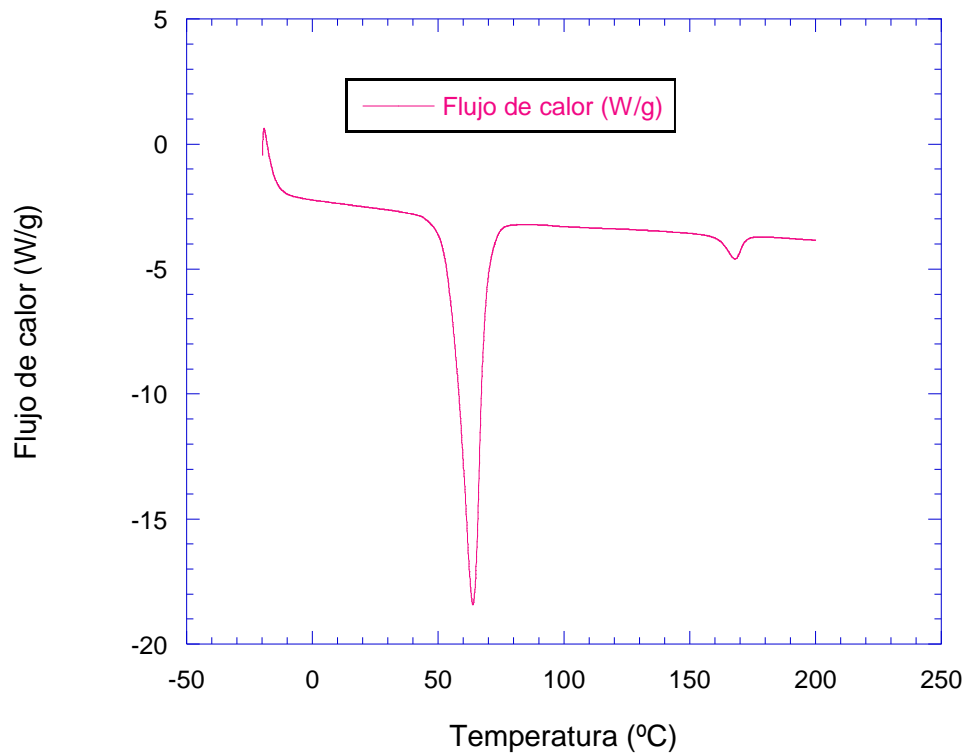


Figura 62: Termografía PCL/10% nHA/10wt% MWCNTs sin degradar.



*Figura 63: Termografía PCL/10% nHA/10wt% MWCNTs 8 semanas de degradación.*

Una vez obtenidos los gráficos, se analiza la temperatura de fusión ( $T_m$ ), entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ) y la temperatura de cristalización ( $T_g$ ). En estas termografías, no se observa ninguna temperatura de cristalización ya que ésta ocurre alrededor de  $-60^\circ\text{C}$ .



<b>COMPUESTO</b>	<b>TIEMPO DE DEGRADACIÓN (semanas)</b>	<b><math>T_m</math> (°C)</b>	<b><math>\Delta H_m</math> (J/g)</b>
<b>PCL</b>	0	60.88	80.10
	8	64.19	88.82
<b>PCL 10%nHA</b>	0	60.86	80.97
	8	65.52	92.35
<b>PCL 10%nHA 1wt% MWCNTs</b>	0	59.28	71.48
	8	65.12	87.40
<b>PCL 10%nHA 5wt% MWCNTs</b>	0	58.59	78.92
	8	63.93	76.86
<b>PCL 10%nHA 10wt% MWCNTs</b>	0	59.09	78.55
	8	63.85	77.64

*Tabla 2: Valores del DSC.*

En los parámetros obtenidos por el DSC de la tabla 2, se ve como la temperatura del pico de fusión ( $T_m$ ) apenas se modifica. Para las muestras sin degradar, tanto las que tienen nanopartículas como las de nanotubos. Lo mismo ocurre para la entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ).

Sin embargo, en las muestras degradadas, se observa que la temperatura de fusión a las 8 semanas de degradación aumenta alrededor de 4°C a 5°C para todas las muestras estudiadas. La entalpía de fusión aumenta entre 8-12°C para las muestras de PCL, PCL/10%nHA y PCL/10%nHA/1wt% MWCNTs, pero para las muestras con 5wt% y 10wt% de MWCNTs apenas varía. Esta variación en la temperatura, puede ser indicativa de la producción de pequeños cristales de distintos tamaños con el proceso de degradación.

## **10. CONCLUSIONES**

La adición de los nanotubos de carbono de pared múltiple, genera una microestructura regular, ordenada y con canales comunicados, óptimos para que circulen las matrices que van a alimentar a las células para concentraciones inferiores a 10% de MWCNTs.

- Este orden que se genera en la morfología, le da una mayor resistencia al andamio poroso; además, la adición de nanopartículas de hidroxiapatita, compacta aún más el andamio.
- Cuanto más nHA se añada, más compacto será el andamio y por lo tanto menos poroso. Ello, se notará en la absorción de agua que será menor debido al tamaño del poro.
- Con la degradación de las muestras, la temperatura de fusión y las entalpías de fusión suben considerablemente debido a la formación de cadenas poliméricas de diferente tamaño que forman multitud de pequeños cristales.
- La adición de MWCNTs en cantidades del 10%, provocan un scaffold con menos porosidad y aglomeraciones de nHA y MWCNTs.

# **11. BIBLIOGRAFÍA**

- [1] V. Cecilia Fabres, “Técnicas del futuro: ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva,” *Rev. Médica Clínica Las Condes*, vol. 21, no. 3, pp. 488–493, 2010.
- [2] R. E. McMahon, L. Wang, R. Skoracki, and A. B. Mathur, “Development of nanomaterials for bone repair and regeneration,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 101 B, no. 2, pp. 387–397, 2013.
- [3] C. Ning, L. Zhou, and G. Tan, “Fourth-generation biomedical materials,” *Mater. Today*, vol. 19, no. 1, pp. 2–3, 2015.
- [4] E. O. Muñoz y Pérez Berumen, Catalina, «Grafeno: el material más fuerte del mundo,» *CIENCIACIERTA*, nº 24, 2011.
- [5] E. Díaz, I. Sardonis, and M. B. Valle, “In vitro degradation of poly(caprolactone)/nHA composites,” *J. Nanomater.*, vol. 2014, p. 8, 2014.
- [6] E. Díaz, I. Ibañez y I. Puerto, «Biopolymer Scaffolds: Manufacture,» de *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric biomaterials*, Munmaya Mishra, 2014, p. 13.
- [7] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials Science*, Elsevier A. San Diego, 2004.
- [8] “Biomateriales-EcuRed.” Available: <https://www.ecured.cu/Biomateriales>.
- [9] L. S. Nair and C. T. Laurencin, “Biodegradable polymers as biomaterials,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 8–9, pp. 762–798, 2007.
- [10] L. L. Hench and I. Thompson, “Twenty-first century challenges for biomaterials,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 7, pp. S379–S391, 2010.

- [11] R. E. McMahon, L. Wang, R. Skoracki, and A. B. Mathur, "Development of nanomaterials for bone repair and regeneration," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 101 B, no. 2, pp. 387–397, 2013.
- [12] C. Ning, L. Zhou, and G. Tan, "Fourth-generation biomedical materials," *Mater. Today*, vol. 19, no. 1, pp. 2–3, 2015.
- [13] M. Labet and W. Thielemans, "Synthesis of polycaprolactone: A review," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 12, pp. 3484–3504, 2009.
- [14] A. C. Albertsson and I. K. Varma, "Recent Developments in Ring Opening Polymerization of Lactones for Biomedical Applications," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 6, pp. 1466–1486, 2003.
- [15] Y. Habibi, A. L. Goffin, N. Schiltz, E. Duquesne, P. Dubois, and A. Dufresne, "Bionanocomposites based on poly( $\epsilon$ -caprolactone)-grafted cellulose nanocrystals by ring-opening polymerization," *J. Mater. Chem.*, vol. 18, no. 41, pp. 5002–5010, 2008.
- [16] "Una ruta para sintetizar macromoléculas: polimerización por apertura de anillo-(ROP):Comprendamos"-Available:  
[http://www.comprendamos.org/alephzero/52/una\\_ruta\\_para\\_sintetizar\\_macromoleculas\\_polimeriz.html](http://www.comprendamos.org/alephzero/52/una_ruta_para_sintetizar_macromoleculas_polimeriz.html).
- [17] A. C. F. M. Costa, M. G. Lima, L. H. M. A. Lima, V. V. Cordeiro, K. M. S. Viana, C. V. Souza, and H. L. Lira, "Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações," *Rev. Eletrônica Mater. e Process.*, vol. 4, no. 3, pp. 29–38, 2009.

- [18] “Química en Acción, El Diente: Formación y Componentes : Esmalte Dental,Hidroxiapatita.”Available:  
<http://quimidontologiaoajr.blogspot.com/2015/06/esmalte-dental-hidroxiapatita.html>.
- [19] A. B. Martínez-Valencia, H. E. Esparza-Ponce, G. Carbajal-De la Torre, and J. Ortiz-Landeros, “Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis,” *Superf. y Vacío*, vol. 21, no. 4, pp. 18–21, 2008.
- [20] B. Chuenjitkuntaworn, W. Inrung, D. Damrongsri, K. Mekaapiruk, P. Supaphol, and P. Pavasant, “Polycaprolactone/Hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, pp. 241–251, 2010.
- [21] P. M. Ajayan, “Nanotubes from Carbon,” *Chem. Rev.*, vol. 99, no. 7, pp. 1787–1800, 1999.
- [22] E. O. Muñoz y Pérez Berumen, Catalina, «Grafeno: el material más fuerte del mundo,» *CIENCIACIERTA*, nº 24, 2011.
- [23] E. T. Thostenson, Z. Ren, and T.-W. Chou, “Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review,” *Compos. Sci. Technol.*, vol. 61, 2001.
- [24] “Dibujo de Nanotubos de pared simple (SWNT’s) y de pared múltiple (MWNT’s). | Download Scientific Diagram.” Available:  
[https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Dibujo-de-Nanotubos-de-pared-simple-SWNT-s-y-de-pared-multiple-MWNT-s\\_fig1\\_257573326](https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Dibujo-de-Nanotubos-de-pared-simple-SWNT-s-y-de-pared-multiple-MWNT-s_fig1_257573326).

- [25] Y. S. Nam and T. G. Park, "Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation," *Dep. Biol. Sci.*, 1999.
- [26] C. Schugens, V. Maquet, C. Grandfils, R. Jerome, and P. Teyssie, "Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation: 1. Preparation of macroporous polylactide supports by solid-liquid phase separation," *Polymer (Guildf.)*, vol. 37, no. 6, pp. 1027–1038, 1996.
- [27] T. Jennings, "Lyophilization, introduction and basic principles," *Cryobiology*, 1999. Available: <https://www.crcpress.com/Lyophilization-Introduction-and-Basic-Principles/Jennings/p/book/9781574910810>.
- [28] S. C. Tsinontides, P. Rajniak, D. Pham, W. A. Hunke, J. Placek, and S. D. Reynolds, "Freeze drying - Principles and practice for successful scale-up to manufacturing," *Int. J. Pharm.*, vol. 280, no. 1–2, pp. 1–16, 2004.
- [29] "LyoQuest | Telstar Life Science Solutions." Available: <https://www.telstarlifesciences.com/tecnologias/sistemas de liofilizacion/liofilizadores de laboratorio/lyoquest.htm?language=es>.
- [30] M. H. Chiu and E. J. Prenner, "Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions," *J. Pharm. Bioallied Sci.*, vol. 3, no. 1, p. 39, 2011.
- [31] "DSC 214 Polyma - NETZSCH Análisis y Ensayo" Available: <https://www.netzsch-thermal-analysis.com/es/productos-soluciones/calorimetria-diferencial-de-barrido/dsc-214-polyma/>.
- [32] C. Michaelson, K. Barmak, and T. P. Weihs, "Investigating the thermodynamics and kinetics of thin film reactions by differential scanning calorimetry," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 30, no. 23, pp. 3167–3186, 1997.



[33] J. Goldstein, D. Newbury, D. Joy, C. Lyman, P. Echlin, E. Lifshin, L. Sawyer, and J. Michael, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Third Edit. New York: Plenum Publishers, 2003.

[34] J. Renau-Piqueras and M. Faura, "Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 323–334, 2005.

[35] P. J. Goodhew, J. Humphreys, and R. Beanland, *Electron Microscopy and Analysis*, Third Edit. Broken Sound Parkway NW, 2000.