

GRADO EN MARINA
TRABAJO FIN DE GRADO

*NANOCOMPUESTOS DE ÓXIDO DE
GRAFENO*

Alumno/Alumna: García, Folgoso, Sendoa

Director/Directora: Díaz, Tajada, Esperanza

Curso: 2018-2019

Fecha: 21, JUNIO, 2019

Resumen

El objetivo de este trabajo ha sido el análisis del efecto de la incorporación del óxido de grafeno (GO) en la microestructura de soportes porosos, para su aplicación en ingeniería tisular, fabricados a base de PLLA (ácido polil-L-láctico), 1,4 dioxano como disolvente y GO. La técnica empleada para la fabricación ha sido TIPS (separación de fases inducida térmicamente). Tras haber creado los andamios porosos o scaffolds se ha realizado un estudio de la degradación in vitro en (PBS) Phosphate Buffer Solution a 37°C durante siete semanas con el fin de simular el comportamiento in vivo en el que se estudiaran propiedades como la variación de pH, la pérdida de masa, absorción de PBS y también un análisis térmico diferencial de barrido (DSC) y se ha observado su microestructura al Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).

Palabras clave: PLLA, GO, scaffolds, degradación in vitro.

Laburpena

Lan honen asmoa, ehunen ingenieritzan, PLLA GO partikula bioaktiboen gehiketaren eta 1,4 dioxanoren bidez sortutako scaffolden mikroegituran eta in vitroko degradazioan izan duten eragina aztertzea izan da. TIPS (Termikoki Eragindako Fase Banaketa) izan da fabrikaziorako erabilitako teknika. Scaffoldak lortu ondoren, zazpi astez in vitro degradazio-azterketa egin da PBSa erabilia, 37°C-ra 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: PLLA, GO, scaffoldak, in vitro degradazioa.

Abstract

The objective of this work has been the effect of the analysis of the incorporation of GO (Graphene Oxide) in the microstructure of scaffolds created by PLLA, 1, 4 dioxane and GO for tissue engineering. Thermally Induced Phase Separation (TIPS) is the fabrication technique used. Once the scaffolds were obtained, it has been done a seven week in vitro degradation in Phosphate Buffer Solution (PBS) at 37°C studying the pH variation, weight loss and the absorption of phosphate buffer solution (PBS). Also, a differential Calorimetry Scanning (DSC) research was done and the microstructure was determined by the Electronic Scanning Microscopy (SEM).

Key words: PLLA, GO, scaffolds, in vitro degradation.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Contexto.....	5
3. Objetivos.....	7
4. Beneficios.....	9
5. Estado del arte.....	11
6. Parte teórica.....	14
6.1. Biomateriales.....	15
6.2. PLA, PLLA.....	19
6.3. Óxido de grafeno.....	22
7. Materiales.....	26
8. Técnicas experimentales.....	28
8.1. Separación de fases inducida térmicamente (TIPS).....	29
8.1.1. Liofilización.....	31
8.1.1.1. Preparación de muestras.....	34
8.2. Calorimetría diferencial de barrido DSC.....	40
8.2.1. Preparación de muestras.....	42
8.3. Microscopio electrónico de barrido SEM.....	44
8.3.1. Preparación de muestras.....	47
8.4. Degradación in vitro	49
8.4.1. Preparación de muestras.....	49
9. Resultados y discusión.....	52
9.1. Calorimetría diferencial de barrido DSC.....	53
9.2. Microscopio electrónico de barrido SEM.....	56
9.3. pH, absorción de PBS y pérdida de masa.....	66
10. Conclusiones.....	69
11. Bibliografía.....	71

FIGURAS

Figura 1: Esquema de ingeniería de tejidos.

Figura 2: Representación esquemática ROP.

Figura 3: Policondensación del ácido D, L- láctico.

Figura 4: Diagrama de fases de una solución polimérica.

Figura 5: Liofilizador telstar.

Figura 6: 1,4- dioxano.

Figura 7: Scaffolds fabricados.

Figura 8: Pesaje del PLLA.

Figura 9: Removedor magnético.

Figura 10: Liofilizador telstar abierto.

Figura 11: Óxido de grafeno.

Figura 12: Incorporación del óxido de grafeno.

Figura 13: Ultrasonidos.

Figura 14: DSC TA instruments Q200.

Figura 15: Funcionamiento DSC.

Figura 16: Crisoles tzero aluminium.

Figura 17: Prensa.

Figura 18: Portador de muestras.

Figura 19: Secuencia de formación de imagen SEM.

Figura 20: Esquema de un equipo SEM.

Figura 21: Componentes del SEM.

Figura 22: HITACHI S-4800 SEM.

Figura 23: Portamuestras SEM.

Figura 24: Metalizador EMITECH K550X.

Figura 25: PBS.

Figura 26: Tubos de ensayo listos para incubar a 37°C.

Figura 27: Estufa termostatazada.

Figura 28: Medidor de pH.

Figura 29: Termograma del PLLA+0,6%GO 7 semanas de degradación.

Figura 30: Termograma del PLLA+1%GO sin degradar.

Figura 31: Termograma del PLLA+1%GO 7 semanas de degradación.

Figura 32: PLLA sin degradar (x100).

Figura 33: PLLA sin degradar (x300)

Figura 34: PLLA 7 semanas de degradación (x100).

Figura 35: PLLA 7 semanas de degradación (x300).

Figura 36: PLLA+0,3%GO sin degradar (x100).

Figura 37: PLLA+0,3%GO sin degradar (x300).

Figura 38: PLLA+0,3%GO 7 semanas de degradación (x100).

Figura 39: PLLA+0,3%GO 7 semanas de degradación (x300).

Figura 40: PLLA+0,6%GO sin degradar (x100).

Figura 41: PLLA+0,6%GO sin degradar (x300).

Figura 42: PLLA+0,6%GO 7 semanas de degradación (x100).

Figura 43: PLLA +0,6%GO 7 semanas de degradación (x300).

Figura 44: PLLA+1%GO sin degradar (x100).

Figura 45: PLLA+1%GO sin degradar (x300).

Figura 46: PLLA+1%GO 7 semanas de degradación (x100).

Figura 47: PLLA+1%GO 7 semanas de degradación (x300).

Figura 48: Variación del pH en función del tiempo de degradación en semanas.

Figura 49: Variación de la absorción de agua en función del tiempo de degradación.

Figura 50: Variación de la masa molecular en función de las semanas de degradación in vitro.

TABLAS

Tabla 1: Propiedades del PLLA.

Tabla 2: Parámetros térmicos de las muestras de PLLA y PLLA/GO estudiadas.

ACRÓNIMOS

GO: Óxido de grafeno.

PLLA: Ácido polil-L-láctico.

TIPS: Thermally Induced Phase Separation.

PBS: Phosphate buffer solution.

DSC: Differential scanning calorimetry.

SEM: Microscopio electrónico de barrido.

PLA: Ácido poliláctico.

PGA: Poliglicol.

ROP: Ring Opening Polymerization.

BHT: Butilhidroxitolueno.

GPC: Cromatografía de penetración de gel.

THF: Tetrahidrofurano.

TA: Universal Analysis.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores problemas en la salud de los humanos ha sido desde siempre la pérdida de órganos o tejidos debido a accidentes, malformaciones o enfermedades. La búsqueda de la manera de reparar estos problemas ha sido siempre objetivo de la medicina. Hoy en día se utilizan dos soluciones como son las prótesis y los implantes, aunque las primeras tienen sus desventajas ya que muchas veces no son capaces de recuperar todas las funciones de los órganos o tejidos reemplazados. En la actualidad dentro de los implantes está cogiendo gran importancia la utilización de tejidos obtenidos mediante la ingeniería de tejidos[1],[2].

La ingeniería tisular es una rama de la bioingeniería que combina conocimientos de biología, ciencias de materiales, ingeniería y medicina[3]. La generación de huesos y cartílagos utilizando trasplantes de células y tejidos es una de las técnicas más prometedoras en la cirugía ortopédica e ingeniería biomédica. Estas técnicas no tienen los problemas de escasez de sitio donante, rechazo inmune y transferencia de patógenos. Los tejidos extraídos del paciente se pueden expandir en cultivo y sembrarse en un andamio que se degradara y reabsorberá lentamente en el cuerpo a medida que las estructuras tisulares crezcan in vitro o in vivo. El andamio o construcción tridimensional proporciona el apoyo necesario para que las células proliferen y mantengan su función diferenciada[4].

En la ingeniería de tejidos se utilizan materiales porosos biocompatibles y biodegradables los cuales sirven para hacer crecer y regenerar tejidos celulares.

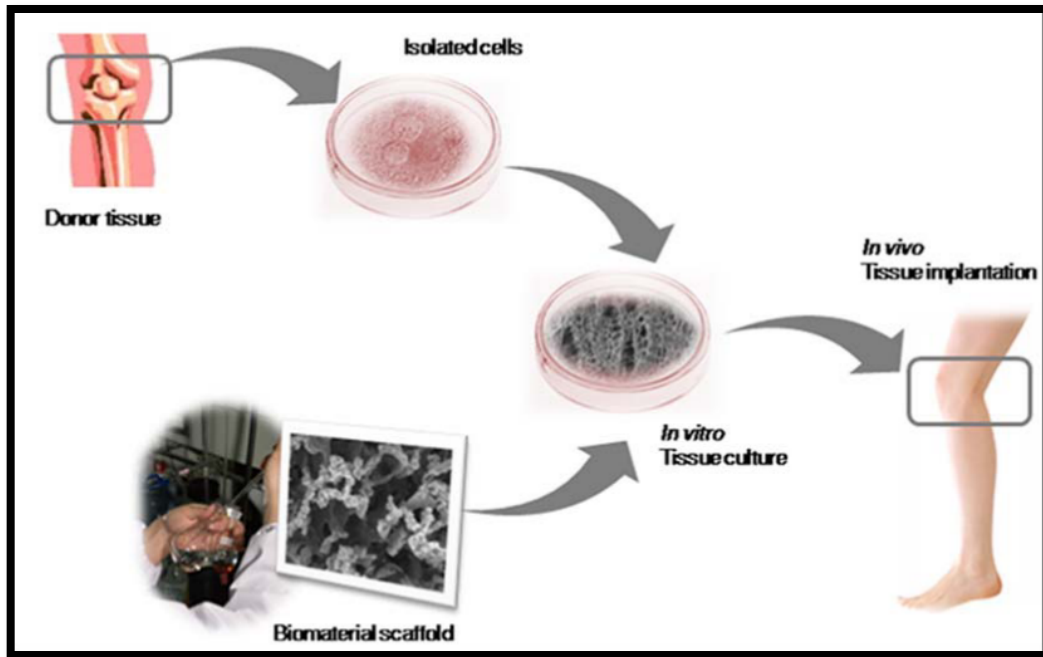


Figura 1: Esquema de ingeniería de tejidos[5].

El proceso seguido en la ingeniería de tejidos para la creación de tejidos nuevos es el siguiente:

- Extracción de las células madre adultas del paciente para cultivarlas posteriormente en el laboratorio.
- Se introducen las células en una estructura tridimensional, llamado andamio poroso o scaffold en el cual se encuentran sustancias bioactivas para hacer crecer y desarrollarse el tejido.
- Reemplazar el tejido dañado por la combinación de las células madres en el scaffold.

Para el estudio de esta investigación, se ha llevado a cabo un trabajo básicamente de laboratorio junto a sus equipos. El componente principal de la investigación es el PLLA junto al Óxido de Grafeno que son los componentes con los que se han formado los andamios porosos. Actualmente científicos han

demostrado que al agregar óxido de grafeno a la hora de crear los scaffolds se mejoran algunas de sus propiedades.

El objetivo principal de este trabajo es el del estudio de la degradación in vitro de estructuras porosas de PLLA con óxido de grafeno para su aplicación en la ingeniería de tejidos. El primer paso para llevar a cabo la investigación ha sido la generación de distintos tipos de scaffolds con diferentes cantidades de GO mediante la técnica de separación de fases inducida térmicamente. A continuación, se procedió al estudio de las muestras aun sin degradar en el DSC (calorímetro diferencial de barrido), para finalizar analizando los cambios ocurridos tras las 7 semanas de degradación in vitro.

2. CONTEXTO

El proyecto se herealizado en la Escuela de ingeniería de Bilbao, en el edificio de Portugalete y en el laboratorio de Metalotecnia y Materiales. La investigación se basa en la fabricación de scaffolds o soportes porosos con el polímero biodegradable y biocompatible de PLLA y óxido de grafeno para después realizar una caracterización y estudio de la degradación in vitro.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto ha sido la síntesis, caracterización y estudio de la degradación in vitro de estructuras porosas de ácido polil-L-láctico (PLLA) con óxido de grafeno para su aplicación en ingeniería tisular.

4. BENEFICIOS

Este trabajo es un proyecto de investigación sobre la aplicación del ácido polil-láctico PLLA con la adición de óxido de grafeno en la ingeniería de regeneración de tejidos, por lo tanto el proyecto no tiene ningún beneficio en este momento o a corto plazo. Sin embargo puede servir de ayuda en el estudio de los biomateriales en la ingeniería tisular y futuros desarrollos.

5. ESTADO DEL ARTE

El grafeno posee un rango de propiedades inusuales como su conductividad térmica y rigidez mecánica con las cuales puede revalidar al grafito. Respecto a la resistencia a la fractura se compara con la de los nanotubos de carbono y también se ha demostrado que las hojas de grafeno contienen extraordinarias propiedades de transporte electrónico. Una posible ruta para aprovechar estas propiedades en aplicaciones sería incorporar hojas de grafeno a un material compuesto.

El óxido de grafeno es un material en capas producido por la oxidación del grafito. Estas capas altamente hidrófilas, permiten que el óxido de grafeno se hinche y se disperse fácilmente en agua. Estudios previos realizados han demostrado que un tratamiento ultrasónico suave de óxido de grafito en agua produce su exfoliación formando hojas de óxido de grafeno totalmente exfoliadas. Como tal, el óxido de grafito ha llamado la atención recientemente como relleno para los nanocompuestos de polímeros [6].

Actualmente existen pocos estudios realizados sobre la fabricación de scaffolds de PLLA con óxido de grafeno. Por lo tanto se dispone de pocos resultados sobre ello, aunque existen bastantes estudios de la degradación del PLLA sin adición, con los resultados propios de pH, porcentaje de masa perdido, porcentaje de agua absorbida entre otros.

Para la producción de los scaffolds se ha usado la técnica de separación de fases inducida térmicamente (TIPS), con la incorporación del óxido de grafeno en diferentes cantidades. En la degradación las propiedades del polímero pueden verse alteradas y esos cambios son los que se analizarán en este

trabajo, tanto propiedades térmicas, como cambios de masa, peso molecular, pH y microestructura[7].

6. PARTE TEÓRICA

6.1. Biomateriales

Se denomina biomaterial a los productos empleados para reproducir la función de tejidos vivos en los sistemas biológicos de forma segura, mecánicamente funcional y aceptable fisiológicamente, que son temporal o permanentemente implantados en el cuerpo y que tratan de restaurar el defecto existente y en algún caso, conseguir la regeneración tisular. El biomaterial en contacto con tejidos vivos no debe producir en ellos ningún tipo de alteración, lo que limita las materias primas con las que se puede abordar su diseño. Para el estudio de los biomateriales es necesario la investigación y desarrollo de materiales que posean un control de calidad tanto en su estructura como en su superficie o sus propiedades mecánicas, definiendo parámetros que permitan evaluar las interacciones entre un biomaterial con un sistema biológico y analizando su comportamiento tras haber sido implantado.

Los requisitos que debe cumplir un biomaterial se pueden resumir en:

- Ser biocompatible, aceptado por el organismo receptor, y no provocar que éste desarrolle mecanismos de rechazo ante la presencia del biomaterial.
- No ser tóxico, ni carcinógeno.
- Ser químicamente estable, o biodegradable en productos no tóxicos, al menos durante el tiempo programado, ya que hay biomateriales biodegradables y biomateriales permanentes.
- La resistencia, propiedades mecánicas, características superficiales, el tiempo de fatiga y el peso sean los adecuados.

- Su diseño, el tamaño y la forma del implante deben ser los adecuados[8].

En el año 1940 se descubrieron los primeros materiales convencionales que podían ser usados en aplicaciones de la biomedicina, diseñados para la utilización dentro del cuerpo humano como la reparación de huesos. En la segunda generación de estos materiales aparecieron los materiales reabsorbibles los cuales poseen una degradación química controlada. Estos biomateriales son capaces de solucionar los problemas de la interfaz entre el material implantado y el tejido como por ejemplo las interacciones y efectos debida a la alta tensión superficial que se crea, propiedades eléctricas y la presencia de grupos iónicos. Gracias a estos materiales es posible evitar una intervención quirúrgica posterior. Un ejemplo del uso de estos materiales fue en 1980 cuando los ácidos polilactida (PLA) y poliglicol(PGA) se utilizaron en casos de fracturas. Sin embargo se descubrió que estos materiales bioactivos y biodegradables correspondientes a la primera y segunda generación no obtenían la respuesta deseada en la mayor parte de las prótesis fabricadas con estos materiales, ya que al transcurrir entre 10 y 20 años después de su implantación era necesario recurrir a la cirugía debido a que los materiales no respondían adecuadamente frente a los factores fisiológicos y biológicos de cuerpo. Los soportes porosos deben tener una superficie adecuada que facilite la adhesión celular y es necesario incorporar moléculas bioactivas sobre ellos. Después de los materiales de primera y segunda generación aparecieron los que en la actualidad se conocen como materiales regenerativos utilizados en la ingeniería de tejidos. Corresponden a los biomateriales de tercera generación los cuales deben interactuar con el tejido de manera específica a través de

estímulos de arrastre a nivel celular y molecular. El desarrollo de biomateriales en la reparación de tejidos se basa en las propiedades de bioabsorbilidad y bioactividad. Estos biomateriales deben estimular el crecimiento del tejido necesario y para ello se requiere una matriz porosa (andamio) y un sustrato celular aceptable y específico. Las propiedades del andamio tienen que estar específicamente preparadas para el tejido en reparación, de modo que el uso de un determinado polímero es fundamental. Los andamios deben ser fabricados cuidadosamente ya que las moléculas bioactivas con las que se junten pueden ser susceptibles de degradación o pueden quedar inactivos como consecuencia de la temperatura, composición química, pH, cargas, etc.[5].

Existen diferentes tipos de polímeros:

- 1. Polímeros naturales:** Producidos por organismos vivos también se llaman biopolímeros, existen en la naturaleza muchos polímeros como la celulosa, caucho natural y además los seres vivos están constituidos por macromoléculas biológicas o biopolímeros (proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos...) que son estructuras monodispersas muy complejas. Existe un amplio conjunto de productos naturales que pueden ser utilizados como biomateriales; sin embargo, presentan el inconveniente de la potencia de inducción de una respuesta inmunológica y consiguiente proceso de rechazo, que puede minimizarse llevando a cabo una preparación previa del material.
- 2. Polímeros sintéticos orgánicos:** Es el grupo más importante de polímeros y comprenden todos aquellos que se pueden sintetizar a partir de monómeros orgánicos. Por ejemplo poliestireno, polimetacrilato de

metilo, PVC... son polidispersos. Normalmente son más baratos y son muy útiles en el campo biomédico ya que sus propiedades pueden ser adaptadas. Son tan utilizados ya que muestran propiedades mecánicas y fisicoquímicas comparables a las del tejido biológico.

- 3. Polímeros sintéticos:** Las propiedades físicas y estabilidad química de este grupo de biomateriales, los polímeros sintéticos, dependen de un conjunto de variables tales como la composición química del polímero y de su grado de entrecruzamiento. Una de las ventajas que presentan es que se les puede dotar de una amplia variedad de propiedades por introducción de aditivos químicos, macromoléculas o segundas fases. La forma, la estructura, la textura, la rigidez y la flexibilidad son propiedades que a priori pueden determinar su utilización.
- 4. Polímeros metálicos:** Desde hace 50 años se vienen utilizando el uso de los implantes metálicos aun sin conocer demasiado sobre sus propiedades. Los metales han sido utilizados como biomateriales con dos propósitos principales: uno la fabricación de prótesis para reemplazar una parte del cuerpo y otro los implantes para la reparación de un tejido. En este tipo de material es muy importante controlar la corrosión ya que esta produce una serie de reacciones que pueden perjudicar al tejido.
- 5. Polímeros cerámicos:** El uso de este tipo de material es muy antiguo y a pesar de que el interés de los materiales cerámicos disminuyó hasta casi extinguirse cuando se observó su empleo en el diseño de implantes óseos y como sistemas transportadores, el interés en este material volvió a realizarse. El interés en estos materiales básicamente se basa

en que son materiales químicamente inertes, no suelen desencadenar respuestas no deseadas en el tejido que se implantan y no son susceptibles de ataque microbiano aunque son bastante débiles mecánicamente hablando. Los materiales clasificados como cerámicas porosas posibilitan el crecimiento del tejido circundante y la adhesión celular al interior a través de sus poros.

6.2. PLA, PLLA

Acido poliláctico (PLA)

Dentro del campo de la ingeniería tisular los soportes porosos tienen una gran importancia y debido a que su tiempo de actuación es limitado han de ser polímeros degradables. Dentro de los andamios la familia de los poliésteres alifáticos son los más importantes. Dentro de esta familia existen polímeros naturales o pueden ser de origen químico como la polilactida (PLA), obtenido tras la polimerización de esteres cíclicos de lactona el cual tiene buenas propiedades mecánicas y excelente disponibilidad. El (PLA) se puede obtener directamente del ácido láctico pero lo más frecuente es obtenerlo tras la polimerización de la lactida por (ROP) apertura de anillo ring opening polymerization. El (PLA) una vez introducido en el cuerpo humano debe desaparecer ya que durante su degradación sufre una separación hidrolítica en su forma monomérica. Mediante la respiración del cuerpo humano se produce la oxidación del ácido láctico, que es descompuesto en CO₂ para después ser eliminado a través de los pulmones. Al ser la lactida una molécula quiral es decir polimérica, existen tres tipos de isómeros dependiendo del isómero que se

parta: L-lactida, D-lactida y meso lactida. Por lo tanto, existen cuatro tipos diferentes de PLA: poli (L-ácido láctico), poli (D- ácido láctico), meso-poli (ácido láctico), poli (DL- ácido láctico) que se obtiene mezclando el acido láctico L y D. De entre estos tipos tan solo el poli (L- láctico) y poli (DL- acido láctico) han sido investigados como biomateriales[5],[9],[10].

La poli-L-lactida (PLLA)

Los poli (hidroxiácidos) son unos tipos de poliésteres que han sido empleados desde hace un par de décadas como material de sutura en el cuerpo humano. Uno de los principales polímeros es el PLLA el cual debido a sus propiedades de biodegradación es absorbido y eliminado por el organismo. La poli-L-lactida (PLLA) es un biomaterial termoplástico, semicristalino, biocompatible y biodegradable (se puede convertir completamente en gas carbónico y agua) el cual ha sido aprobado por la FDA y es muy utilizado actualmente en aplicaciones biomédicas y en ingeniería de tejidos tanto como para fijación de articulaciones como para regeneración de tejidos. Presenta buenas propiedades físicas y mecánicas. El PLLA pertenece a la familia de los poli (α-hidroxiésteres), y normalmente se obtiene por polimerización de apertura de anillo de la lactida.

Métodos de obtención:

- 1. Apertura de anillo:** La polimerización por apertura de anillo (ROP) implica que el anillo del que se parte (D,L-lactida) sea susceptible para abrirse por una especie activa que lo ataque nucleofílicamente o electrofílicamente según sea el caso. Para tal fin es necesario contar con un iniciador, o molécula que favorezca la apertura del anillo[10].

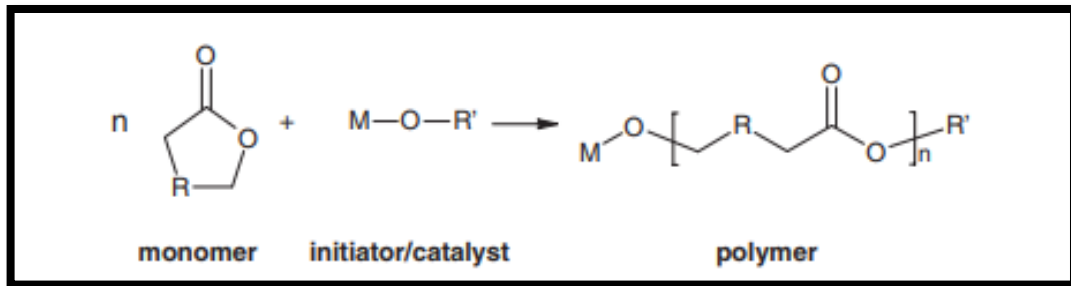


Figura 2: Representacionesquemática ROP[11].

2. **Policondensación:** Se define como una reacción con grupos reactivos en los extremos en la cual las moléculas del ácido L-láctico se juntan y cada vez que se produce esto se libera una molécula de agua.

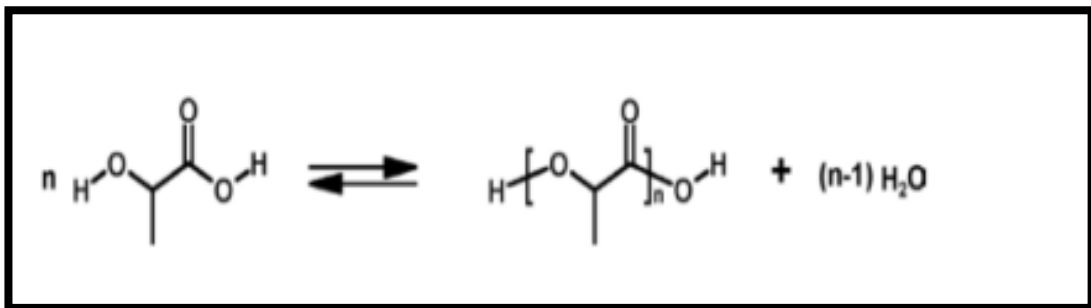


Figura 3: Policondensación del ácido D, L-láctico.

Características de la reacción:

- Para un mayor rendimiento de la reacción se necesita destilar el agua producida en el medio de reacción y con ello desplazar el equilibrio a la derecha; esto bajo el principio de LeChâtelier (Garritz, 2001).
- Debido a la funcionalidad (grupos funcionales: alcohol y ácido carboxílico) inherente que debe tener el monómero (ácido D, L-láctico) para su policondensación, es difícil obtener polímeros con grupos funcionales terminales diferentes a los del monómero al finalizar la reacción.

- Presenta mayor aleatoriedad de reacciones, debido a que los diferentes oligómeros (HO-R-CO₂H) reaccionan con ellos mismos y además con el monómero (ácido D,L-láctico); en consecuencia, el polímero resultante tiene una distribución de pesos moleculares más amplia ($M_w/M_n > 2$).

Teniendo en cuenta los tres puntos anteriores, si bien esta ruta de polimerización es factible, se tienen que considerar las características del producto final para decidir si es conveniente. En este sentido si se compara la polimerización por apertura de anillo (ROP) con la policondensación, (ROP) presenta mayores ventajas ya que no tiene las características de los tres puntos comentados anteriormente de la policondensación respecto a condiciones de reacción. En particular, en la (ROP) no se necesita destilar agua, el polímero puede tener un grupo funcional terminal diferente al de partida y usualmente la distribución de pesos moleculares de polímeros vía ROP es menor. La degradación del PLLA depende mucho de los factores como su peso molecular, temperatura, pH, el tamaño de la muestra, cristalinidad. Se ha demostrado que la degradación es altamente dependiente de parámetros como el tamaño y también la porosidad, que mejoran los efectos de la difusión en el interior del polímero. El PLLA tiene una temperatura de transición vítrea (T_g) entre los 50 y 65 °C y una temperatura de fusión (T_m) entre 170 y 190 °C y se degrada con facilidad [11],[12].

6.3. Óxido de grafeno

El óxido de grafeno (GO), es una lámina de carbono de un átomo de espesor, el cual ha atraído mucha atención debido a sus características fisicoquímicas

únicas, que incluyen propiedades mecánicas extraordinarias, gran área de superficie, dominios de carbono sp^2 y grupos funcionales hidrofílicos. Dado que la hidrofobicidad y las pobres resistencias mecánicas de las nanofibras de los biopolímeros limitan su aplicabilidad, el GO mejora las propiedades químicas de la superficie de los andamios de nanocompuestos de nanofibras con buena hidrofobicidad. El óxido de grafeno es una lámina de grafeno funcionalizada con grupos oxigenados y es objeto de gran atención para el campo de los biomateriales y en consecuencia en aplicaciones biomédicas. Al juntar los andamios porosos con cantidades medidas de óxido de grafeno se descubren nuevas y interesantes mejoras en las propiedades biomédicas en los scaffolds como las propiedades mecánicas, térmicas y eléctricas. Por lo tanto el interés sobre el óxido de grafeno es amplio en los campos de biomateriales, ingeniería tisular y medicina regenerativa. El óxido de grafeno es un derivado oxidado del grafeno y los materiales basados en el mejoran la integración con el sistema neuronal. Los andamios que han sido formados con óxido de grafeno deberían de aumentar la diferenciación y crecimiento de las células madre neuronales. Los métodos más utilizados para la producción del óxido de grafeno son la exfoliación mecánica y química. En la exfoliación mecánica, el GO se obtiene a partir del grafito, que es un conjunto de monocapas de grafeno unidas por fuerzas de van der Waals. Este método se basa en producir una fuerza que sea mayor de las que hay entre las monocapas y hacer que los estratos se separen. Dicha fuerza puede ser perpendicular al plano del grafito, como en el caso de exfoliación utilizando cinta adhesiva, o puede ser lateral, produciendo un movimiento paralelo entre los estratos del grafeno. Por otro lado la exfoliación química se utiliza actualmente en la industria debido a que

puede producirse en gran cantidad pero con el inconveniente de que la calidad obtenida por este método no es óptima, ya que se produce un grafeno con muchas imperfecciones y contaminantes. Esta técnica consiste en exfoliar el grafito con disolvente químicos seguido de una sucesiva sonicación. El disolvente utilizado penetra entre los planos del grafito y lo hincha, con lo que se amplía la distancia entre ellos. De este modo, cuando empieza el proceso de sonicación, los planos del grafito se separan y se quedan en este estado a causa de la presencia del disolvente; finalmente se consiguen aislar mediante una ultra-centrifugación por gradiente de densidad. Existen otros métodos de producción destacando entre ellos la reducción electroquímica y térmica de óxido de grafeno. No existe una estructura exacta del GO ni de la fórmula molecular, estructura y tipo ya que su estequiometría dependen del grafito del cual se haya formado como de las condiciones del proceso de oxidación y exfoliación por el que ha pasado[7],[13],[14],[15],[16].

Los polímeros se ven limitados en sus aplicaciones debidos a ciertas propiedades como la baja conductividad térmica, baja estabilidad térmica, alta resistividad eléctrica y deformación plástica. Como se ha comentado anteriormente los compuestos con GO mejoran estas propiedades. El GO es un material bidimensional con las siguientes propiedades:

- Se disuelve fácilmente en agua mediante agitación mecánica o ultrasonidos.
- El GO al poseer grupos hidroxilo, epoxy y carbonilo en su propia estructura hacen que sea muy hidrofílico, es decir que sus moléculas tienen una gran afinidad por el agua de tal manera que

las moléculas de agua absorbidas tienden a acumularse incluso después de largos periodos de secado.

- Las películas de GO son antibacterianas.

Propiedades eléctricas: La conductividad eléctrica, en la mayoría de los compuestos conductores, aumentan con el incremento del contenido de la carga. En la mayor parte de los casos la incorporación de muy pequeñas cantidades de componente grafítico (1,0 % en peso) en el polímero, conlleva una mejora en la conductividad.

Propiedades térmicas: Una vez realizada la exfoliación de GO se necesita poca cantidad de carga para conseguir alta conductividad térmica, aumentadola con el aumento de nanocarga.

Propiedades mecánicas: Partiendo de que el GO se obtiene del grafito que ya es uno de los materiales más duros conocidos por unidad de peso, las laminas de GO cumplen los requisitos para obtener nanocompuestos de alta resistencia. Mejorando tanto la resistencia a la tracción como el modulo de Young[14].

7. MATERIALES

En este proyecto los soportes porosos han sido formados con poli-L-lactida (PLLA) suministrada por PuracBiochem (TheNetherlands). Los polímeros han sido purificados disolviéndolos en 1,4-dioxano antes de su utilización, suministrado por la casa PANREAC S.A. (Barcelona) el cual está estabilizado con 22 ppm de BHT (Butilhidroxitolueno), con un máximo de 0,5% y un peso molecular de 119,38 g/mol.

Los pesos moleculares de PLLA han sido determinados por GPC cromatografía de permeación de gel usando un Perkin Elmer 200, Waltham, MA, USA en THF (tetrahidrofurano).

Polimero	Mw	Mn	I (Mw//Mn)
PLLA	141.940	95.680	1,48

Tabla 1: Propiedades del PLLA.

Mw: Peso molecular promedio en peso.

Mu: Peso molecular promedio en número.

I: Índice de polidispersión.

Como aditivo en la fabricación de los andamios se utilizo el óxido de grafeno que fue suministrado por Graphenea S.A. (San Sebastian, Spain).

La degradación se lleva a cabo con una solución tampón salina (PBS) suministrada por FLUKA ANALYTICAL (SIGMA ALDRICH, EEUU) con pH de 7,2.

8. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Introducción

Los soportes porosos tridimensionales son muy útiles para la ingeniería de tejidos en la cual funcionan como base 3D para producir una unión celular para después comenzar con la formación de tejido tanto in vitro como en vivo. Para la creación de estos soportes porosos existen diferentes técnicas de fabricación las cuales dependerán del tipo de polímero que se vaya a utilizar y la función que vaya a desarrollar[5]. En este trabajo hemos utilizado la técnica de TIPS (separación de fases inducida térmicamente).

1.1. Separación de fases inducida térmicamente (tips)

El proceso denominado como tips (Thermally induced phase separation) consiste en realizar una disminución de la temperatura de una solución porosa hasta alcanzar una separación de fases, en la cual se obtendrá una fase rica en polímero y otra fase pobre. Esta técnica fue la primera en ser aplicada a los andamios de PLA en 1996 con la cual se obtenían andamios porosos con gran porosidad. Una vez lograda la separación de fases se efectúa la eliminación del solvente a través de la sublimación, extracción o evaporación y este espacio será ocupado por los poros creados de la espuma del polímero. Dentro de este proceso se distinguen dos fases una en la cual se produce la separación de fases y la segunda es la eliminación del solvente. Existen dos tipos de separación de fases las cuales dependen de la temperatura a la cual se producen[17].

- **Separación sólido-líquido**

Al reducir la temperatura se produce la cristalización del solvente y esto induce la separación de fases de la solución polimérica. Es decir en este tipo de separación la temperatura de cristalización es superior a la de separación de fases y el polímero es expulsado del frente de cristalización del solvente. Este tipo de separación de fases de la solución polimérica recibe el nombre de separación sólido-líquido[18].

- **Separación líquido-líquido**

Este tipo de separación ocurre cuando la temperatura de cristalización del solvente es inferior a la de la separación de fases de una solución polimérica amorfa. En este caso al enfriarse la solución polimérica existen dos tipos de separación de fases:

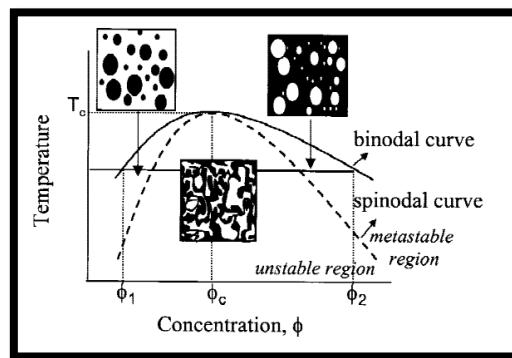


Figura 4: Diagrama de fases de una solución polimérica[17].

Descomposición espinoidal

Por debajo de la curva espinoidal del diagrama de fases la solución polimérica tiende a una separación de fases líquido-líquido espontánea. La solución se convertirá en inestable y obtendrá una red interconectada.

Nucleación y crecimiento

Este tipo de separación se produce entre las curvas binodal y espinodal del diagrama de fases. Las partículas pequeñas tienen un área superficial más grande por lo que serán menos estables, y es por lo que tenderán a disolverse y formar partículas más grandes (coalescencia). El resultado es una estructura más dispersa[18].

En nuestro caso a la hora de formar los andamios porosos nos conviene tener una red de poros interconectada y es por eso por lo que trabajaremos con una separación de fases sólido-líquido.

8.1.1 Liofilización

La liofilización es una técnica utilizada para la fabricación de soportes porosos la cual ya se utilizaba hace muchos años en distintas aplicaciones pero sobre todo en alimentos. Antiguamente los incas aprovechando la altitud en la que vivían utilizaban las bajas presiones y temperaturas para por la noche congelar alimentos en los cuales se producía la sublimación al salir el sol. En la creación de los andamios porosos la solución se separa en dos fases una rica en polímero y otra rica en solvente que será la cual se elimine a través de la liofilización. Con esta técnica se consigue la deshidratación de productos a bajas presiones (vacío) y temperaturas, evaporando el líquido en nuestro caso el solvente mediante sublimación. Para la sublimación es necesario que el producto este congelado y se pasa del estado de congelación al estado gaseoso sin tener que pasar por el estado líquido[19]. El proceso de liofilización consta de dos etapas:

Precongelación: Esta etapa es obligatoria y de gran importancia para que se produzca la sublimación y dependiendo de la velocidad con la que se produzca afectara al tamaño de los poros. Dependiendo del tipo de producto que se utilice la duración será mayor o menor al igual que también depende de la cantidad y de la concentración. Si se realiza una buena congelación se obtendrá un andamio poroso con buen aspecto y conservara sus propiedades originales.

Secado: Esta etapa se produce a presiones bajas para que se produzca la sublimación y en ella se puede distinguir dos fases:

- **Sublimación o desecación primaria:** En esta fase se evapora la gran parte de disolvente hasta un 95% del mismo tras reducir la presión y aplicando el calor necesario para producirse la sublimación. Se puede llegar a pensar que aplicando más calor se reduciría el tiempo y es cierto pero al estar la temperatura, presión y tiempo relacionados mutuamente al incrementar mucho el calor se podría dañar la estructura del andamio por lo que conviene que el proceso sea largo.
- **Desecación secundaria:** En esta fase se lleva a cabo la eliminación de la poca cantidad de disolvente que queda de la fase anterior, lográndose así cantidades inferiores del 1% de disolvente en el andamio poroso. Durante esta fase se incrementa la temperatura llegando a temperaturas superiores a los 0°C pero nunca subiendo la temperatura más de la de desnaturalización del producto[20].



Figura 5: Liofilizadortelstar.

Componentes del liofilizadortelstar.

Una bomba de vacío de doble etapa, provista de lastre de aire. Incorpora una válvula de cierre, que cuando se detiene la bomba aísla a esta del conjunto del liofilizador, manteniéndolo bajo vacío a la vez que se restablece la presión atmosférica en el interior de la bomba, evitándose así el retroceso del aceite. Incorpora también un filtro de expulsión. Un sistema frigorífico, que enfría el serpentín del condensador hasta la temperatura de trabajo. La superficie de condensación esta dimensionada para asegurar la condensación de los vapores de agua desprendidos por el producto en proceso de liofilización, evitando que puedan llegar a la bomba de vacío. El sistema frigorífico está formado por:

- compresor hermético de una tapa condensado por aire.
- condensador de material inoxidable.

Procesos ejecutados:

- **Congelación:** Se pone en marcha el sistema de refrigeración y se enfría el condensador. El sistema de refrigeración requiere un tiempo

de preparación (5 minutos aproximadamente) en el cual la temperatura puede subir ligeramente. Después, la temperatura bajara rápidamente. Este paso debe tener una duración superior a 30 minutos para permitir al sistema alcanzar la temperatura mínima.

- **Frio+vacio:** Se pone en marcha el sistema de refrigeración, se enfría el condensador y se pone en marcha el grupo de vacío. Se inicia el vacío cuando la temperatura de condensador está por debajo del parámetro determinado (típicamente -40). La regulación del nivel de vacío dependerá del Set Point programado. El sistema necesitara más de 20 min para alcanzar el nivel de vacío mínimo.
- **Calefacción de bandejas:** Se activan las resistencias eléctricas de las bandejas para calentar hasta la temperatura programada. También se pone en marcha el grupo de vacío y se inicia el vacío cuando la temperatura del condensador está por debajo del parámetro determinado (típicamente -40). La regulación del nivel de vacío dependerá del Set Point programado.
- **Paro:** Se para el sistema[21].

8.1.1.1 Preparación de muestras

Para buscar el disolvente en el que se disuelva totalmente el PLLA se deposita la misma cantidad de PLLA en diferentes vasos de precipitación con diferentes disolventes para averiguar cuál de ellos es el adecuado. Una vez mezclados los disolventes con el PLLA calentar a no más de 50 grados y remover con la ayuda de imanes. Tras la realización se observa que ni el propanol ni el etanol disuelven con facilidad el PLLA, el disolvente adecuado es el 1,4-dioxano



Figura 6: 1,4-dioxano.

Se han fabricado muestras de 4 tipos de scaffolds diferentes:

- PLLA al 2,5%(w/v) en 1,4 dioxano.
- PLLA con 0,3% de óxido de grafeno respecto al polímero en 1,4 dioxano.
- PLLA con 0,6% de óxido de grafeno respecto al polímero en 1,4 dioxano.
- PLLA con 1% de óxido de grafeno respecto al polímero en 1,4 dioxano.



Figura 7: Scaffolds fabricados.

Paso1: Se coge el PLLA y con la ayuda de la balanza se pesan aproximadamente 0,53g.



Figura 8: Pesaje del PLLA.

Paso2: En este paso se utiliza el disolvente 1,4-dioxano, un balón de reacción y un imán. Se calcula el disolvente necesario al 2,5% del PLLA de la siguiente manera:

Se utiliza 0.55g del polímero PLLA como referencia por lo que se debe calcular los mililitros exactos necesarios para que las muestras sean al 2.5% de PLLA, a través de una regla de tres el resultado son 22ml.

Se introducirán en un balón de reacción elimán, la cantidad de PLLA y la cantidad de 1,4-dioxano calculado.

Paso3: Se remueve la mezcla en el removedor magnético (por eso el imán) durante dos horas con una columna de agua para evitar la evaporación del disolvente y con una temperatura entre 45-50 grados.



Figura 9: Removedor magnético.

Al paso de dos horas se comprueba que el PLLA se ha disuelto totalmente en el disolvente y se vierte en los moldes de velas que tienen la siguiente medida: 1,5 cm de altura y 4 cm de diámetro. Para finalizar se introducen las muestras en el liofilizador.

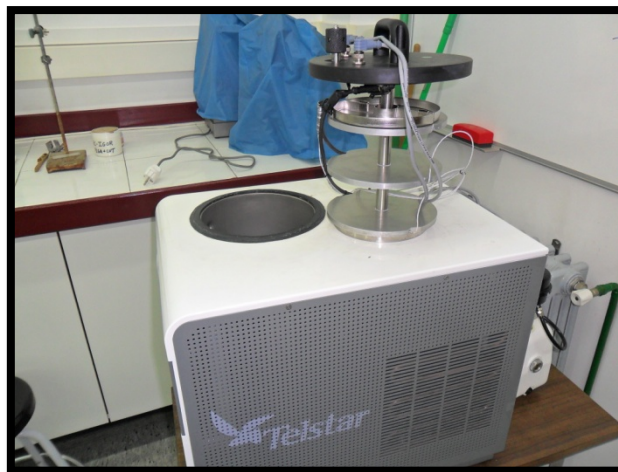


Figura 10: Liofilizador telstar abierto.

Scaffolds de PLLA con óxido de grafeno

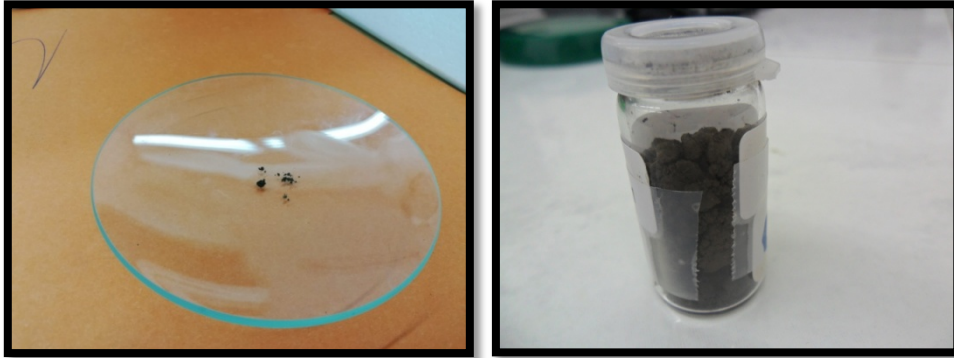


Figura 11: Óxido de grafeno.

Se calcula la cantidad en gramos de óxido de grafeno necesarios para cada muestra al 0,3%, 0,6%, 1% del polímero. Después se siguen los mismos pasos que se han realizado en las muestras anteriores para disolver el PLLA, simplemente estas muestras se diferencian de las primeras en que a estas se les añade la cantidad de óxido de grafeno calculado una vez disueltos el polímero y el disolvente.

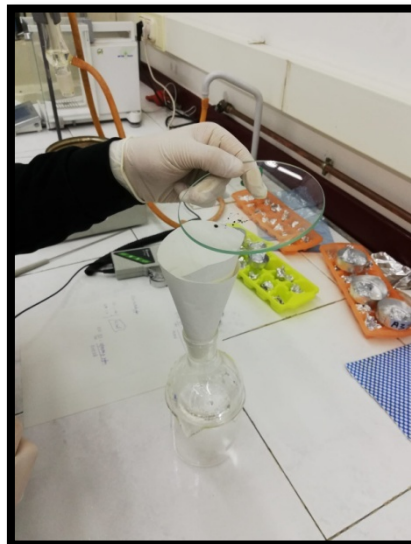


Figura 12: Incorporación del óxido de grafeno.

Tras añadir el óxido de grafeno se remueve con un virador eléctrico manual y se introduce en el ultrasonidos 4 minutos para que se homogenice la mezcla.



Figura 13: Ultrasonidos.

Para finalizar se introducen las muestras en el liofilizador. La receta utilizada para la creación de los andamios en el liofilizador es la siguiente[19],[20]:

- Congelar 6h.
- Frio + vacío, 0.5mb, 36h.
- Frio + vacío, 0mb, 48h.
- Calefacción de bandejas, -15, 48h.
- Calefacción de bandejas, 0 °C, 99h.

8.2. Calorimetría diferencial de barrido DSC.



Figura 14: DSC TA Instruments Q200.

El DSC se utiliza para caracterizar el curado de un poliéster de uso general durante experimentos de escaneo isotérmico [22]. El objetivo del uso de esta técnica es identificar las propiedades térmicas de los andamios porosos obtenidos. Esta técnica realiza un análisis térmico en función del tiempo en la cual la diferencia de calor transmitido entre una muestra y otra que será la de referencia es medida en función de la temperatura. A través de esta técnica se consigue determinar las reacciones endotérmicas y exotérmicas es decir la cantidad de calor que absorbe o desprende una sustancia[23].

Haciendo un estudio de las conclusiones que se extraen de las curvas obtenidas del DSC se consiguen las temperaturas características de transformación o de transición como: fusión, transición vítrea, cristalización, solidificación que tanto interesan en los polímeros. El DSC o la calorimetría diferencial de barrido se lleva a cabo mediante el estudio de dos capsulas o crisoles. Un crisol estará vacío que será la que se utilice como referencia y la otra será la que contenga la muestra que se va a analizar. Cada capsula tiene

su propio foco de energía y un sistema de control será el encargado de controlar cualquier cambio de temperatura, es decir la diferencia de temperatura entre ambas medida mediante los termopares colocados en los discos y las obleas de la cara opuesta. Cuando se lleva a cabo un barrido de temperatura el crisol que contiene la muestra aumentara o disminuirá su temperatura, en caso de existir alguna diferencia de temperatura con la de referencia el sistema de control lo corrige aplicando una cantidad de energía hasta mantener la temperatura de las dos capsulas iguales[23].

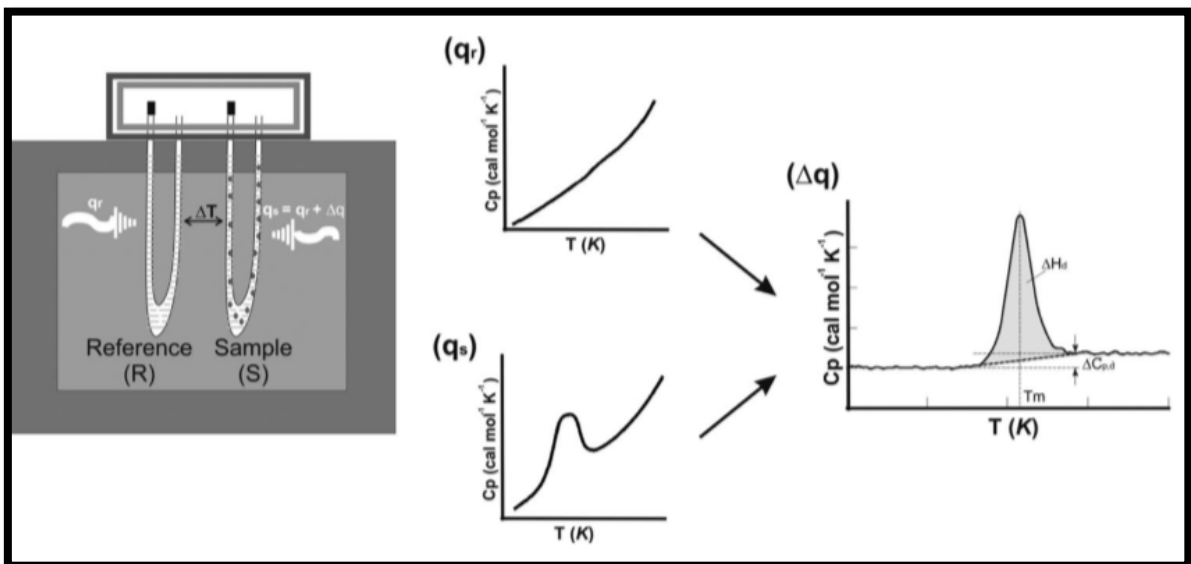


Figura 15: Funcionamiento DSC[24].

En el programa del DSC en el ordenador se introducen los datos de las rampas y cambios de temperatura. Una vez introducidos el DSC comienza a realizar el programa y el estudio de las diferencias de energías necesarias para mantener los crisoles a la misma temperatura, los rangos de temperatura pueden variar de 400°C -600°C. La técnica utilizada por el DSC consigue valores con precisión de 0,1% de la medición de calor y de 0,05 °C, con ratios de

calentamiento entre los 0,1 y 200 °C por minuto, y rangos de temperaturas entre -180 y 725 °C

8.2.1. Preparación de muestras

Se utilizan crisoles del tipo zeroaluminium.

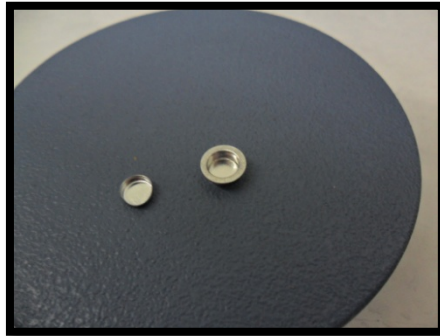


Figura 16: Crisoles zeroaluminium.

Paso1: Se rellena un crisol con la muestra de scaffold a analizar. Con la ayuda de la balanza se pesa entre 5-7g de scaffolds, una vez pesado se introduce en el crisol y se tapa. Se prensa el crisol para que quede totalmente sellado.



Figura 17: Prensa.

Paso2: Se introduce en el DSC tanto el crisol de referencia como el portador de muestra (es muy importante que los crisoles estén bien colocados para que las rampas de temperaturas se realicen adecuadamente).



Figura 18: Portador de muestras.

Paso3: Se introduce en el ordenador el método y programa de temperatura determinando la velocidad de calentamiento, el peso de la muestra, el tipo de crisol utilizado y los rangos de barrido de temperaturas. Una vez el programa listo el equipo comienza con el barrido de temperaturas y registra las graficas de los procesos endotérmicos y exotérmicos. El programa utilizado en el DSC 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.

Los datos de las graficas obtenidas se analizan a través del programa TA Universal Analysis para ser estudiados.

8.3. Microscopio electrónico de barrido SEM

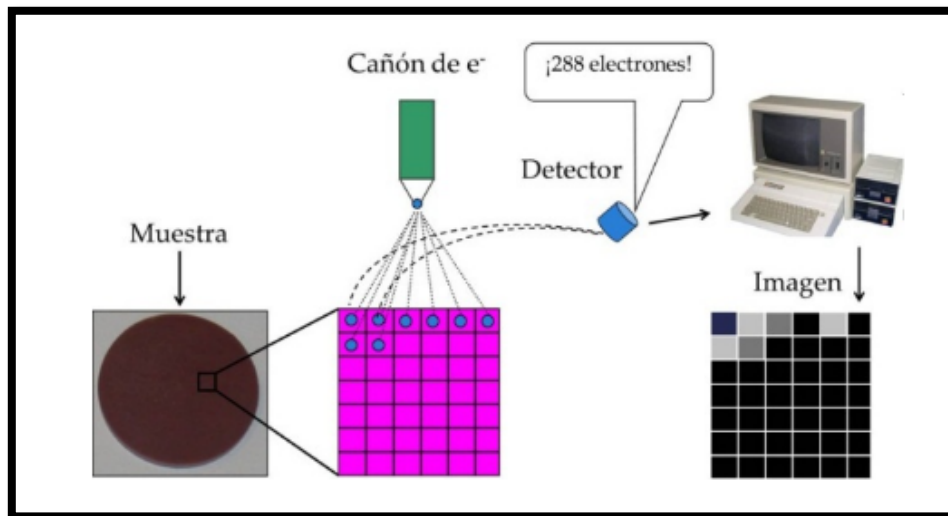


Figura 19: Secuencia de formación de imagen SEM[25].

La microscopia electrónica de barrido se ha convertido en una técnica imprescindible para poder analizar muestras en tres dimensiones y de gran resolución. A medida que ha ido pasando el tiempo el desarrollo de esta técnica ha ido avanzando desde 1965 que fue el año en el que se lanzó el primer SEM por Cambridge Instrument Co. La microscopia de barrido tiene grandes aplicaciones que son de gran interés tanto en el campo biológico como en el de materiales. La finalidad de un (SEM) es producir imágenes de una muestra al haber escaneado la superficie con un haz de electrones enfocado. Al interactuar los electrones con los átomos de la muestra, se producen

señales de las que se obtiene información sobre la superficie de la muestra y su composición[26].

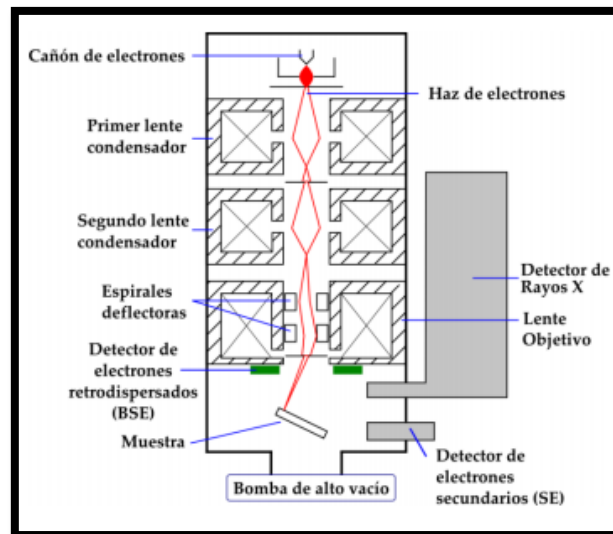


Figura 20: Esquema de un equipo SEM[25].

Un SEM está compuesto, por un lado por una columna que está compuesta por un cañón de electrones, una serie de lentes magnéticas y una bomba de vacío. Por otro lado se tiene la consola de control que está compuesta por un tubo de rayos catódicos (CTR), el ordenador y un sistema de monitorización [26].

- **Cañón de electrones:** Envía un haz de electrones sobre la muestra a través de un emisor, el emisor suele ser un filamento de wolframio o hexaboruro de lantano.
- **Lentes magnéticas:** Se encargan de dar la dirección apropiada a los electrones ya que una vez formados es necesario crear un haz fino que los enfoque sobre la muestra. Para que el haz de electrones llegue perfectamente a la superficie de la muestra que se quiere analizar es

necesario que las lentes magnéticas estén situadas en vacío que es la razón por la que se dispone de una bomba de vacío.

- **Sistema de barrido:** Un sistema que funcione tal que el haz de electrones recorra la muestra que se va analizar, esto se debe a la interacción de los electrones con diferentes campos magnéticos.
- **Un sistema de control:** Su función es la de recoger la monitorización del sistema producida por el haz de electrones para a posterior crear la imagen final del barrido.

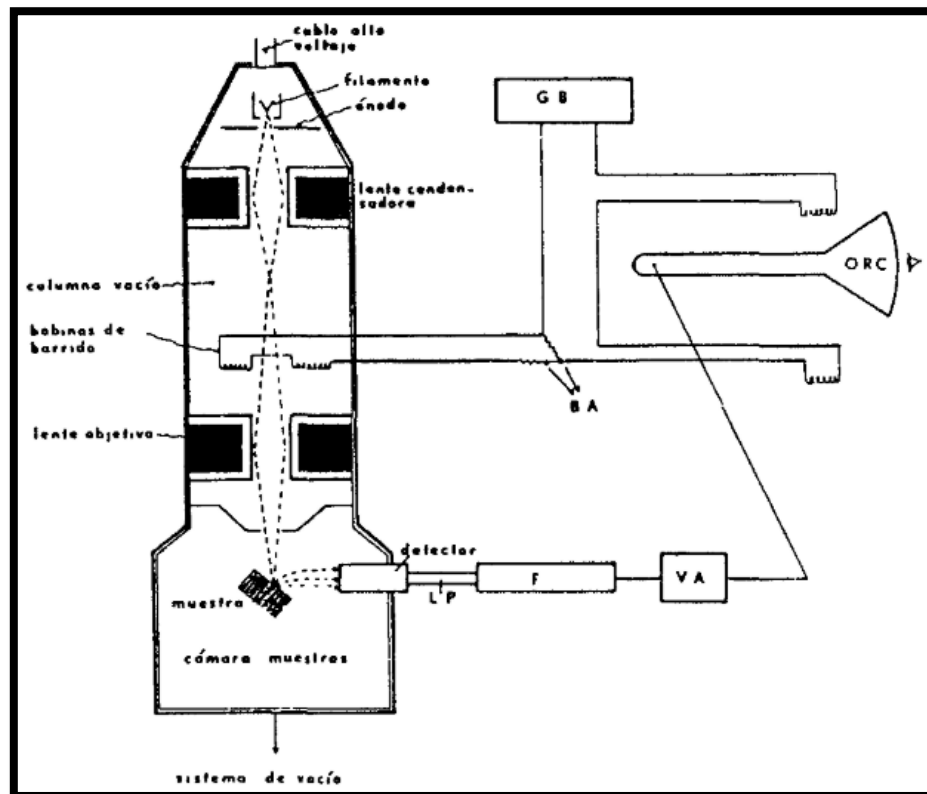


Figura 21:Componentes del SEM[26].

El funcionamiento es el de un barrido de superficie. Los electrones se producen en la parte superior de la columna, se aceleran hacia abajo y se pasan a través de una combinación de lentes y aberturas para producir un haz de electrones enfocado que llega a la superficie de la muestra. El emisor que suele ser un

filamento de tungsteno o hexaboruro de lantano lanza un haz de electrones los cuales tienen 0,2 y 40KeV de energía dentro de la columna en la cual habrá un vacío producido por la bomba de vacío de 10^{-4} Pa. El haz es enfocado por una o dos lentes condensadoras hasta alcanzar un diámetro de 0,4 y 5mm. Mediante un sistema de bobinas el haz de electrones se desplaza generando unos barridos los cuales son escaneados sobre la superficie de la muestra. Cuando el haz empieza a interactuar con la superficie de la muestra se produce un intercambio de energía que incide sobre una amplificadora. El equipo de control encargado de detectar los electrones emitidos por la muestra, es capaz de formar figuras tridimensionales con una resolución entre 4 y 20nm que después se muestran en la pantalla del ordenador. En cuanto al SEM utilizado al igual que la mayoría necesitan que las muestras analizadas sean conductoras, por lo tanto en caso de no serlo es necesario cubrir las muestras con una fina capa de material conductor, generalmente oro o paladio[27].

8.3.1. Preparación de muestras

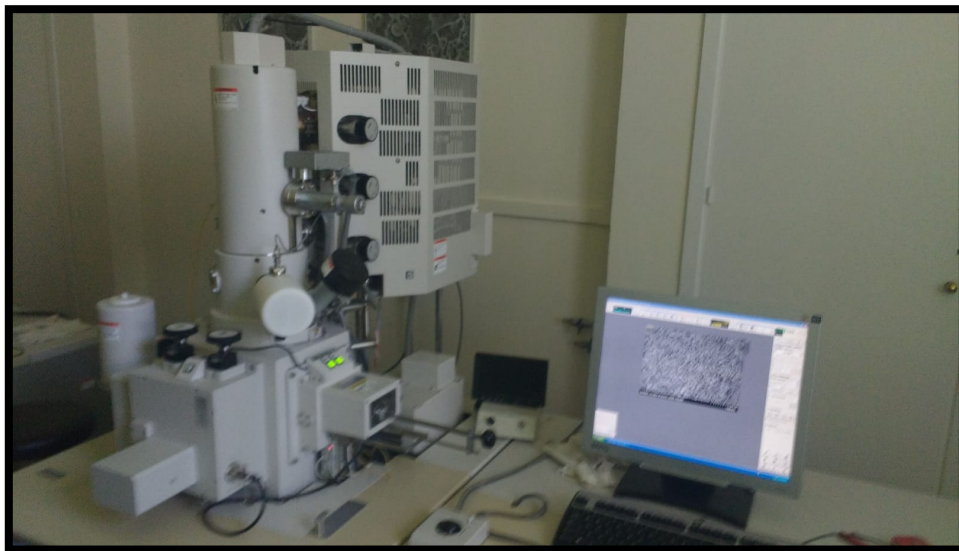


Figura 22: HITACHI S-4800 SEM

Paso 1: Se utiliza un portamuestras en el cual se pegan unas tiras adhesivas. En ellas colocaremos 8 muestras, las correspondientes a las de la semana 0 y 7 de degradación.



Figura 23: Portamuestras SEM

Paso 2: Utilizando la técnica sputtering se cubre el portamuestras con una capa de oro de 15nm para convertirlas en conductoras.



Figura 24: Metalizador EMITECH K550X

Paso 3: En el último paso del proceso se introduce la muestra en el SEM y se realiza el estudio de la morfología.

8.4. Degradación in vitro

8.4.1. Preparación de muestras

Una vez que se ha finalizado la fabricación de todos los scaffolds se continua con la degradación in vitro. Se utilizaran tubos de ensayo en los que se introducirán muestras cortadas de forma rectangular de las muestras de scaffolds realizadas.

Paso1: Se cortan trozos de las muestras con forma rectangular y cada cacho de muestra oscila entre 15-25mg. Una vez introducidas las muestras en los tubos de ensayo se rellena cada tubo con 10 ml de solución salina (PBS) con un 7,2 de pH.



Figura 25: PBS

Paso2: Una vez rellenos todos los tubos de ensayo se colocan en soportes.

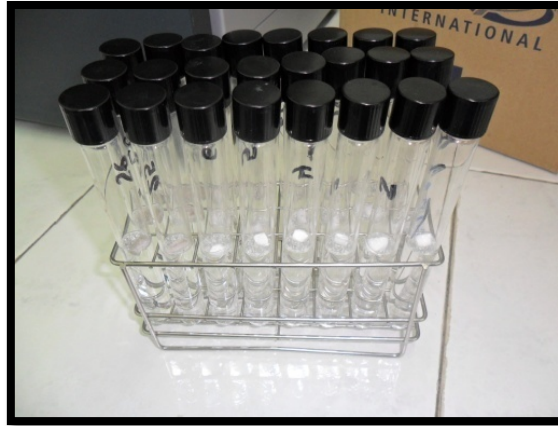


Figura 26: Tubos de ensayo listos para incubar a 37 °C.

Paso3: Se introducen en una estufa termostatzada a 37°C y en condiciones estáticas.



Figura 27: Estufa termostatzada

Los periodos de degradación van a ser de 0, 3, 5 y 7 semanas. Una vez transcurridos estos periodos, se retiran las muestras de los tubos de ensayo y se realizan sus estudios. Por un lado la solución salina que contiene se vierte en un recipiente para que se pueda medir el pH después de la degradación. Tras sacar las muestras de los tubos se secan con trozos de papel para retirar

la capa superficial de agua y se pesa nuevamente. Este pesaje indicará el peso húmedo “Wh” el cual anotaremos junto al pH, después se dejaron una semana secando las muestras en la estufa termostaticada y se secarán para tener el peso seco “Ws”.



Figura 28: Medidor de pH.

La solución salina que contienen los tubos de ensayos se vierten en diferentes recipientes para poder medir el 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, Wh es el peso húmedo una vez quitada la capa superficial de agua y W0 es el peso inicial.

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

Ecuación 2: Porcentaje de pérdida de masa.

Donde Ws es el peso seco después de pesarlo tras el secado.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La degradación del PLLA cristalino tiene lugar mediante la hidrólisis de los enlaces éster de forma aleatoria. La primera etapa de la degradación comienza con la difusión de agua en la región amorfa, iniciándose la escisión hidrolítica de los enlaces éster. La segunda etapa tiene lugar cuando la mayoría de enlaces en la región amorfa se han roto, comenzando entonces la degradación de la parte cristalina. Los segmentos macromoleculares con un empaquetamiento menor (regiones amorfas) disponen de más libertad de movimientos, por lo que son más vulnerables al ataque de las moléculas de agua. Esto implica que se degraden primeramente las regiones amorfas, para pasar posteriormente a las cristalinas. Esto produce cadenas más cortas que se pueden empaquetar más fácilmente, provocando un aumento de la cristalinidad.

La calorimetría diferencial de barrido permite estudiar el avance del proceso de degradación mediante la temperatura de transición vítrea (T_g) y la cristalinidad.

La temperatura de transición vítrea (T_g) depende de la movilidad de las cadenas. La transición vítrea de un material implica un cambio de las características de éste, puesto que pasa de tener un comportamiento dúctil a un comportamiento frágil. Como podemos apreciar en la tabla 2 no encontramos variaciones apreciables en la T_g . La temperatura de cristalización (T_c) nos indica la temperatura a la que comienzan a cristalizar nuestras muestras. Si observamos la tabla 2 vemos que disminuye con la adición de nanopartículas de GO y con el proceso de degradación para todas las muestras estudiadas. La entalpía de cristalización disminuye con el proceso de

degradación, el cual es un comportamiento que no coincide con el que se obtendría con otras nanopartículas. La temperatura que aparece en el pico de fusión no parece variar para las muestras sin degradar y aumenta a medida que avanza el proceso de degradación. Todo esto nos indica que el proceso de degradación apenas ha comenzado.

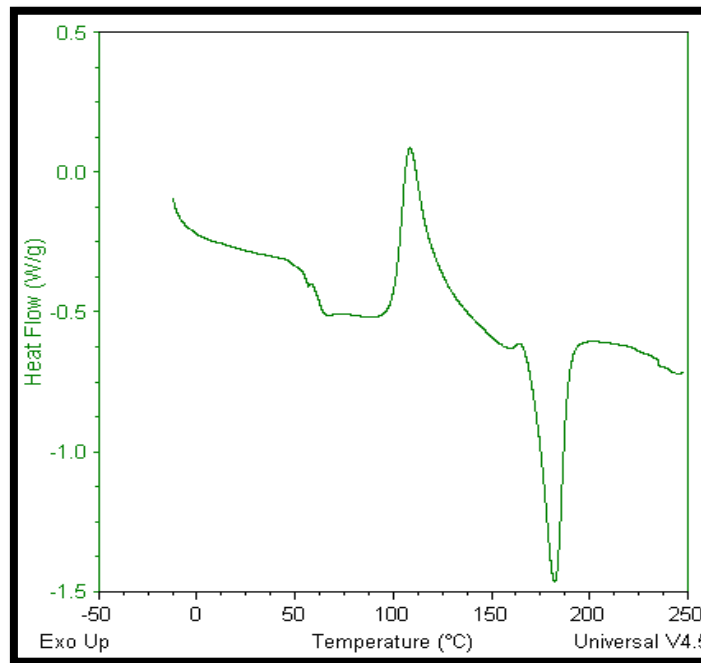


Figura 29: Termograma del PLLA+0,6%GO 7 semanas de degradación.

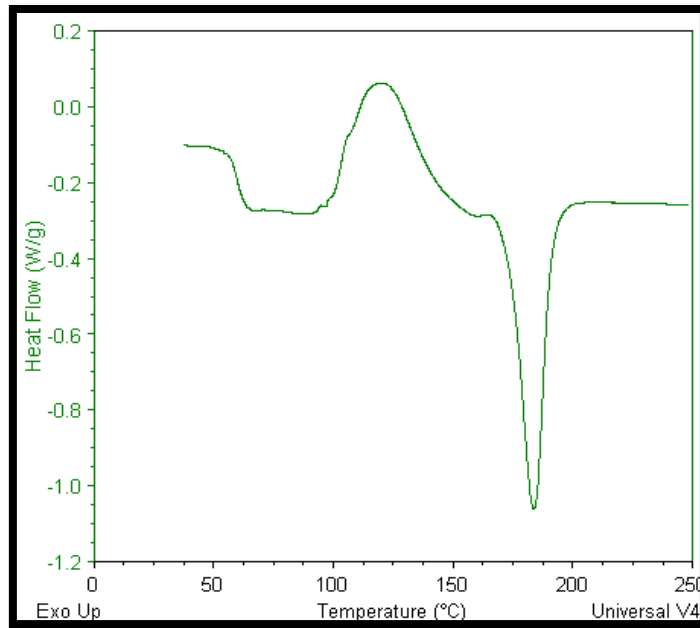


Figura 30: Termograma del PLLA+1%GO sin degradar.

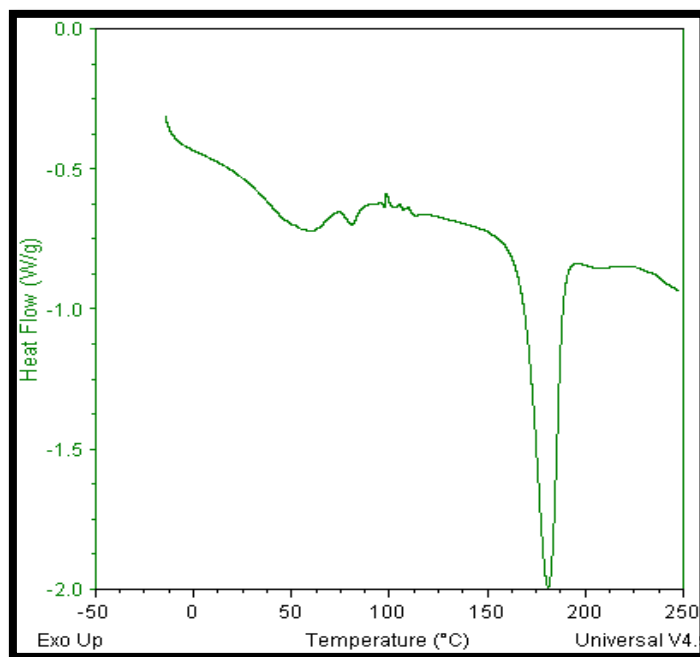


Figura 31: Termograma del PLLA+1%GO 7 semanas de degradación.

Muestras	Tiempo de degradación (semanas)	Tg (°C)	Pico exotérmico		Pico endotérmico	
			Tc(°C)	ΔH_c (J/g)	Tm(°C)	ΔH_m (J/g)
PLLA	0	63	128	28	174	33
	7	63	127	25	174	33
PLLA+0,3%GO	0	54	106	32	170	41
	7	63	107	19	185	52
PLLA+0,6%GO	0	64	117	24	172	29
	7	63	109	25	182	30
PLLA+1%GO	0	63	119	27	173	31
	7	63	117	19	180	37

Tabla 2: Parámetros térmicos de las muestras de PLLA y PLLA/GO estudiadas.

9.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

En las figuras de la 29-44 podemos ver las micrografías correspondientes al sistema de PLLA y PLLA/GO este último con varias suposiciones. La liofilización es una técnica en la que el disolvente es extraído mediante sublimación dejando el polímero o el material compuesto como una esponja. El tamaño del poro va a depender de los cristales que formen el disolvente [5]. En las figuras 29 y 30 vemos como el PLLA tiene poros de aproximadamente 50 μ m y presenta una estructura muy porosa y bastante irregular. La adición de GO en porcentajes de 0,3% provoca una estructura más irregular y con un

tamaño de poro $\approx 100\mu\text{m}$. La adición de 0,6% de GO disminuye el tamaño del poro a ≈ 25 (Figuras 37,38). Cuando añadimos un 1% de GO el material presenta una porosidad muy pequeña y los poros que aparecen son muy irregulares en cuanto a tamaño y forma (Figuras 41 y 42). Con el proceso de degradación in vitro durante 7 semanas el PLLA comienza a mostrar principios de degradación al cambiar la microestructura y la morfología de las muestras. Sin embargo la muestra con 0,3% de GO no parece sufrir un proceso de degradación. Las muestras con 0,6% de GO al aumentar las semanas de degradación disminuye el tamaño de los poros de $\approx 25\mu\text{m}$ a $< 10 \mu\text{m}$ y el aspecto es mucho más compacto. Para la muestra del 1% de GO el aspecto es como si el scaffold se hubiera plastificado.

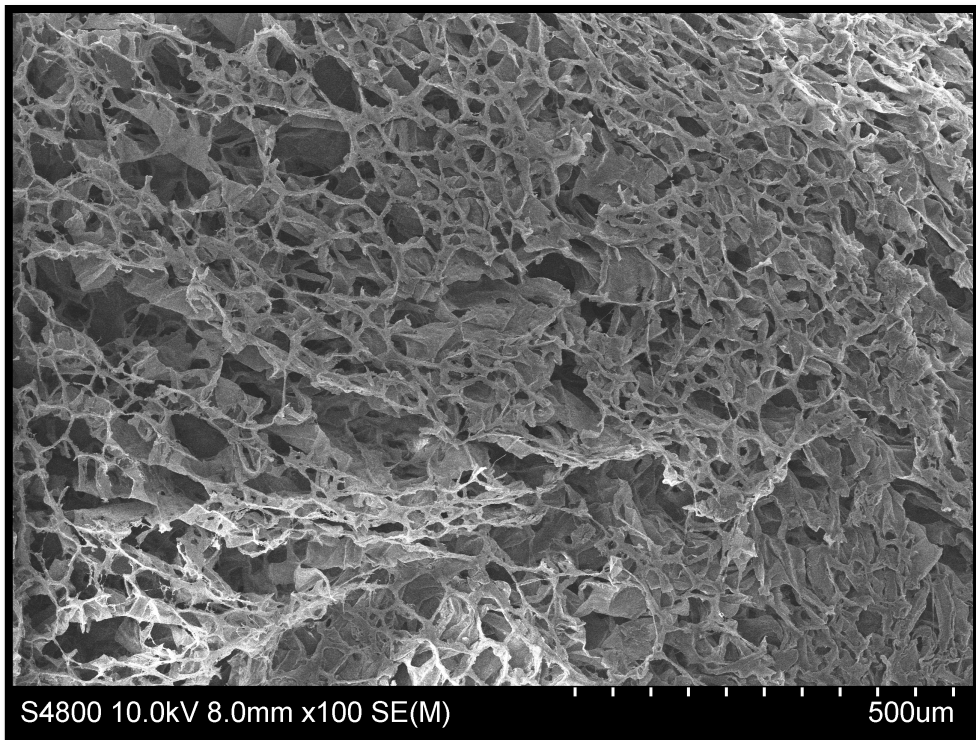


Figura 32: PLLA sin degradar (x100).

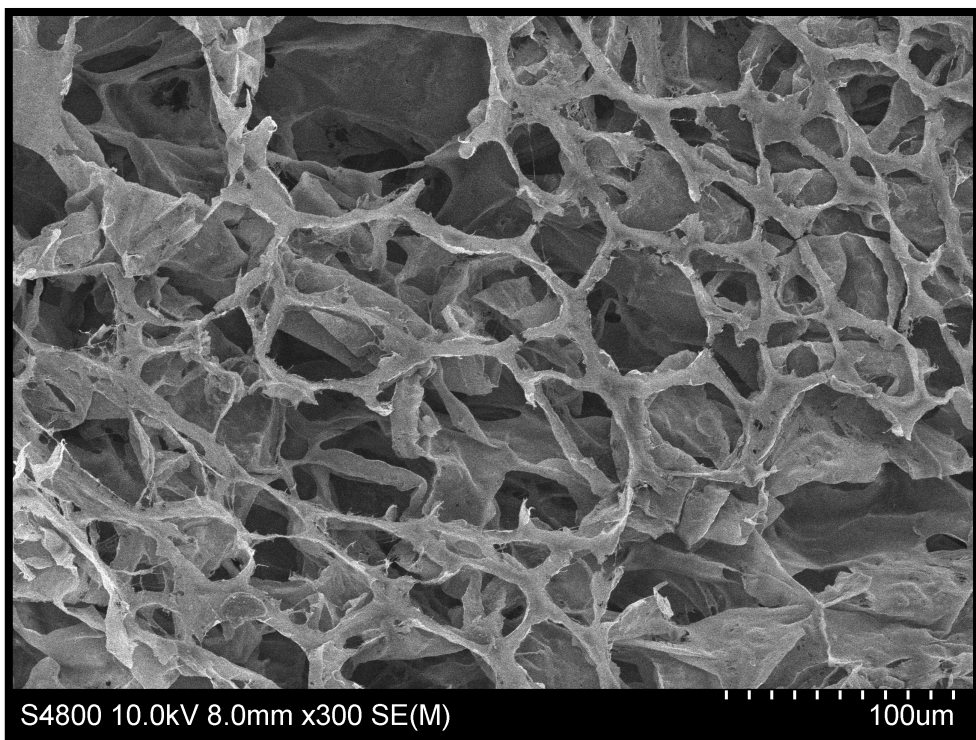


Figura 33: PLLA sin degradar (x300).

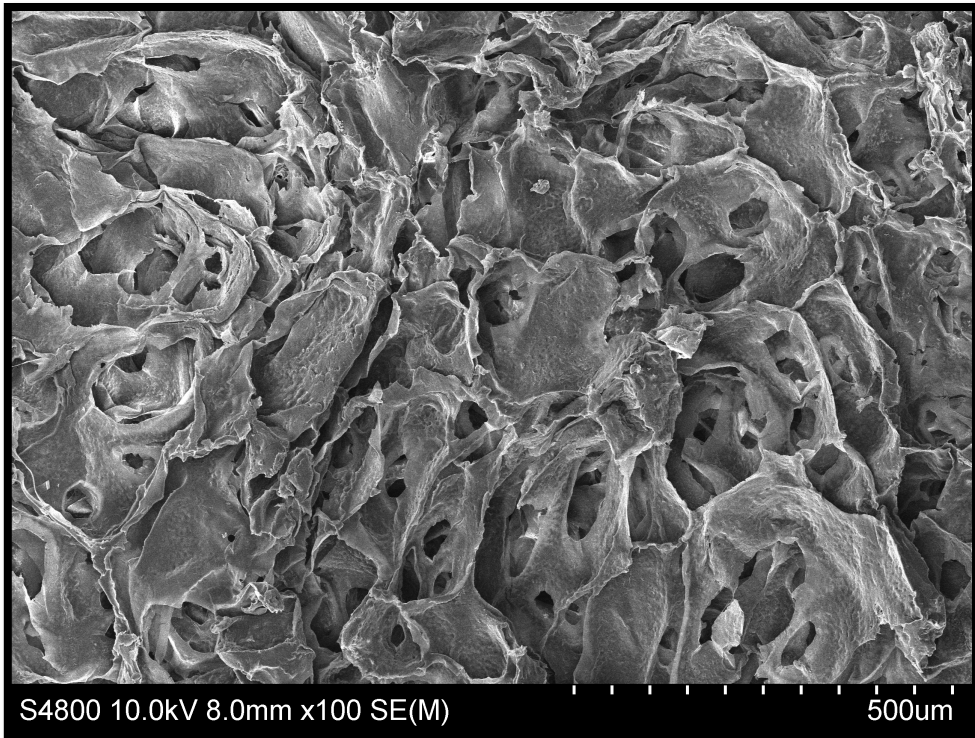


Figura 34: PLLA 7 semanas de degradación (x100).

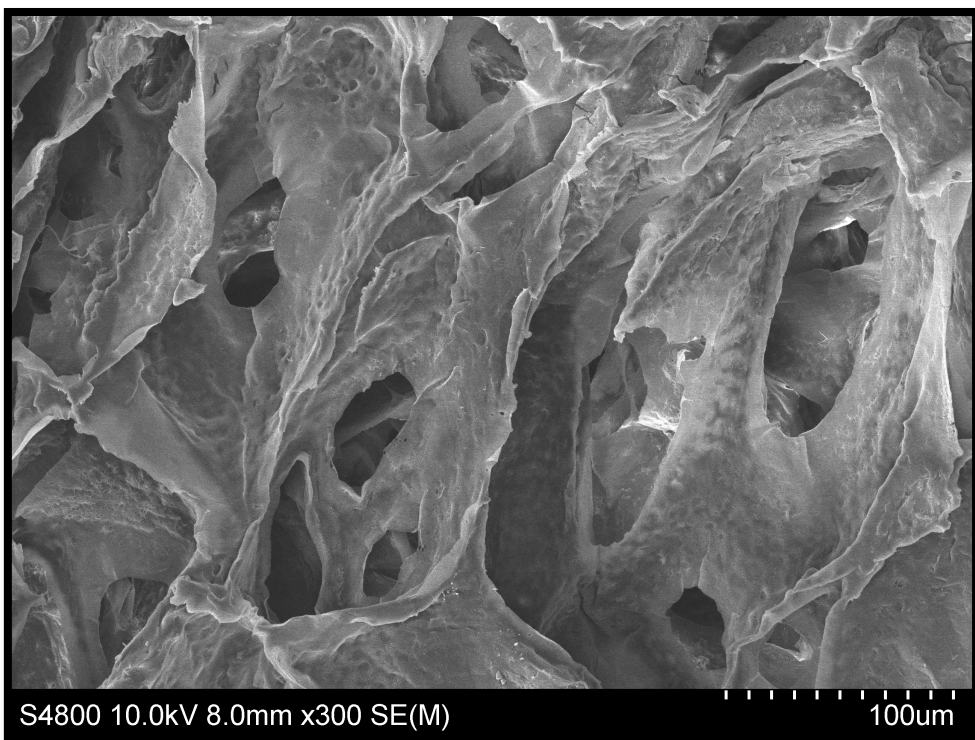


Figura 35: PLLA 7 semanas de degradación (x300).

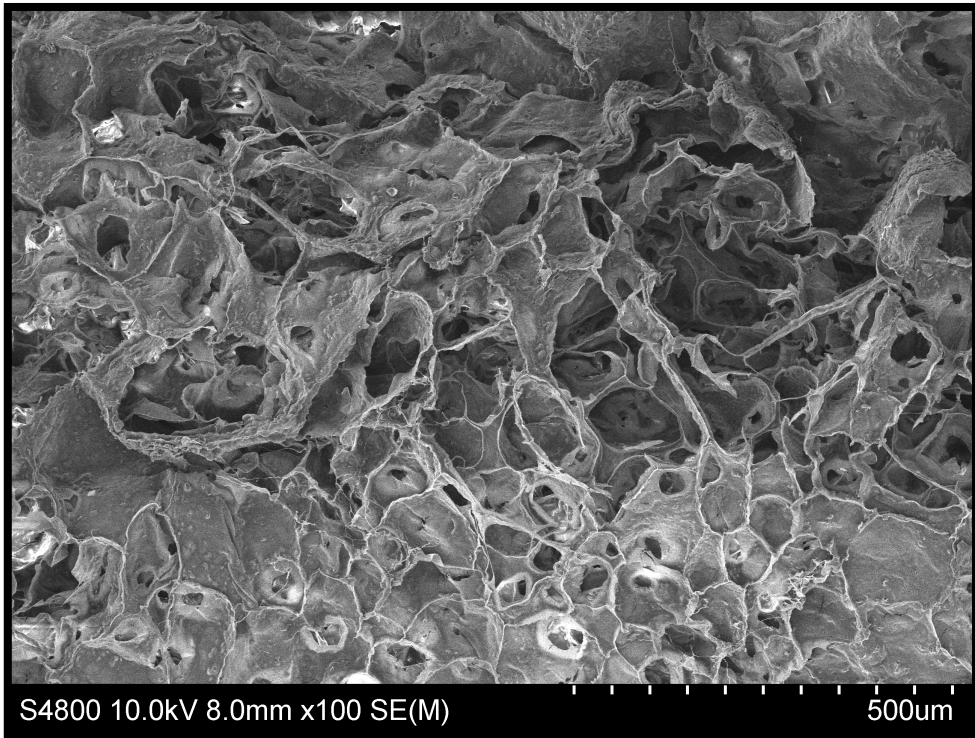


Figura 36: PLLA+0,3%GO sin degradar (x100).

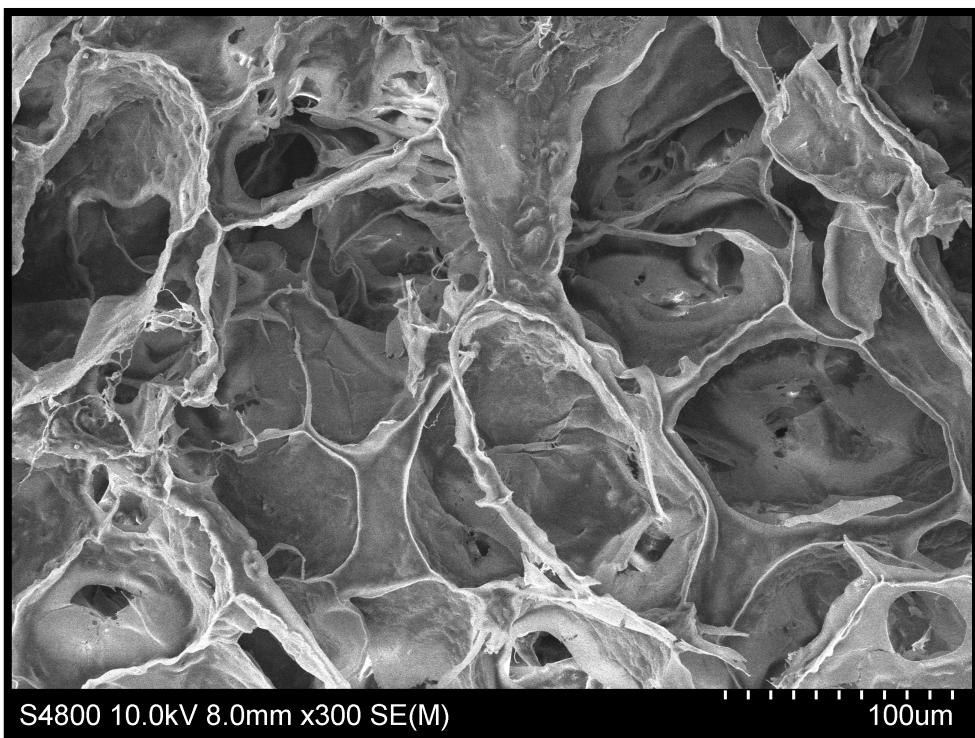


Figura 37: PLLA+0,3%GO sin degradar (x300).

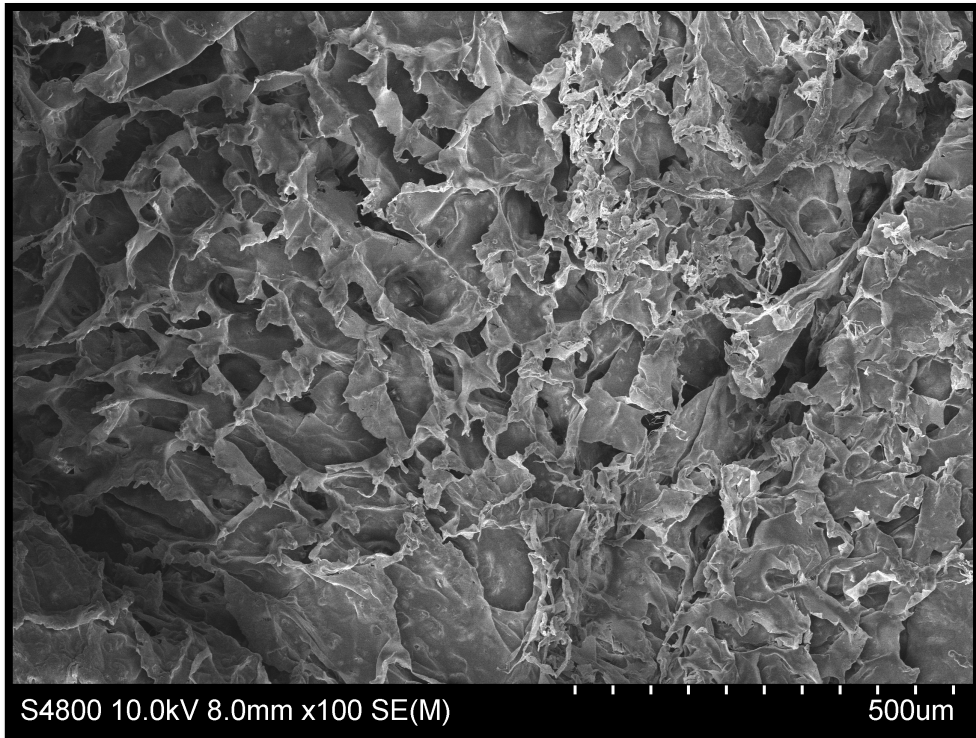


Figura 38: PLLA+0,3%GO 7 semanas de degradación (x100).

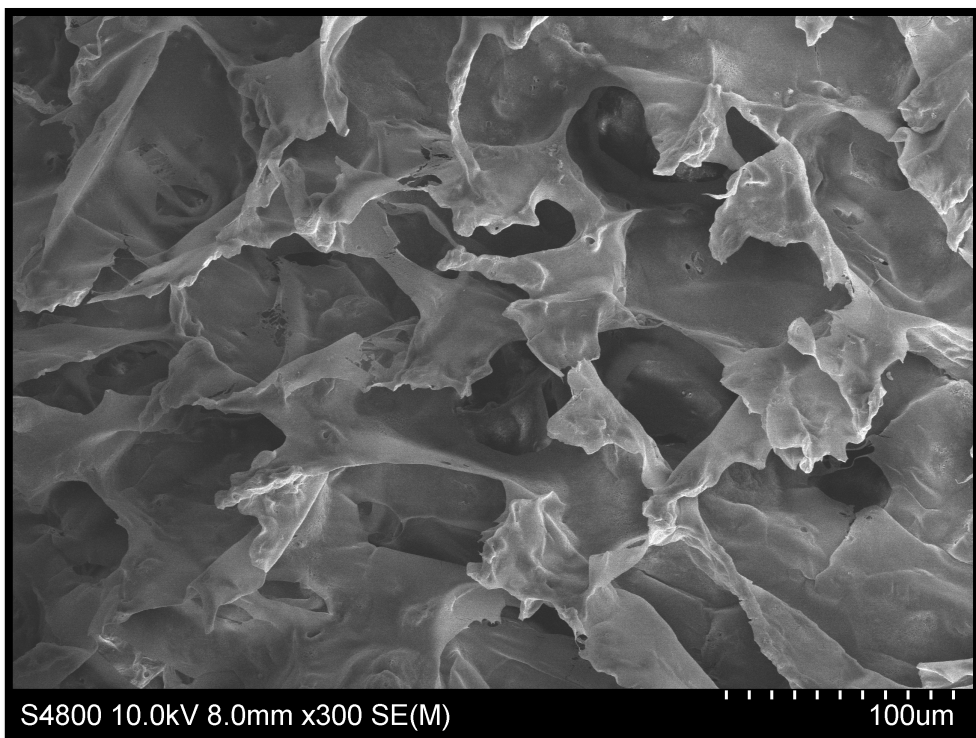


Figura 39: PLLA+0,3%GO 7 semanas de degradación (x300).

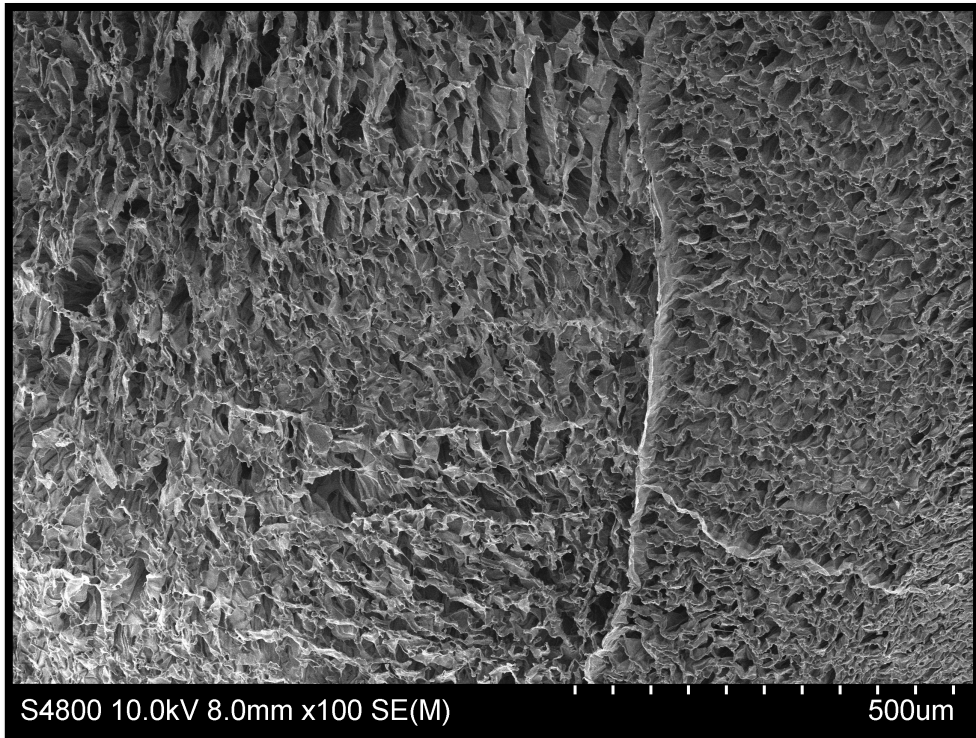


Figura 40: PLLA+0,6%GO sin degradar (x100).

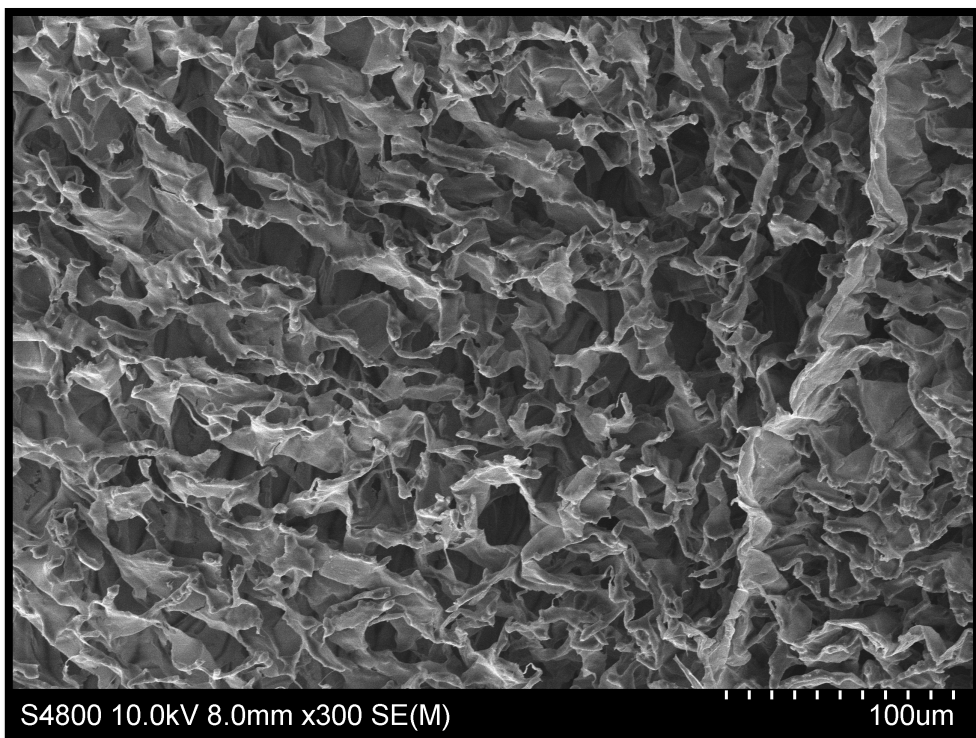


Figura 41: PLLA+0,6%GO sin degradar (x300).

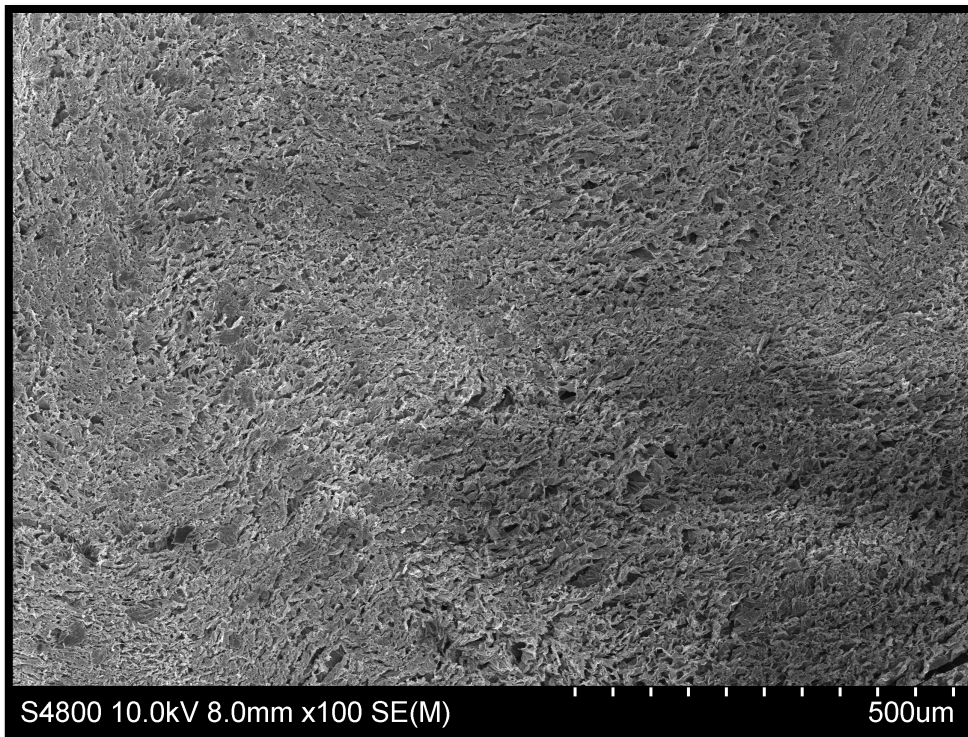


Figura 42: PLLA+0,6%GO 7 semanas de degradación (x100).

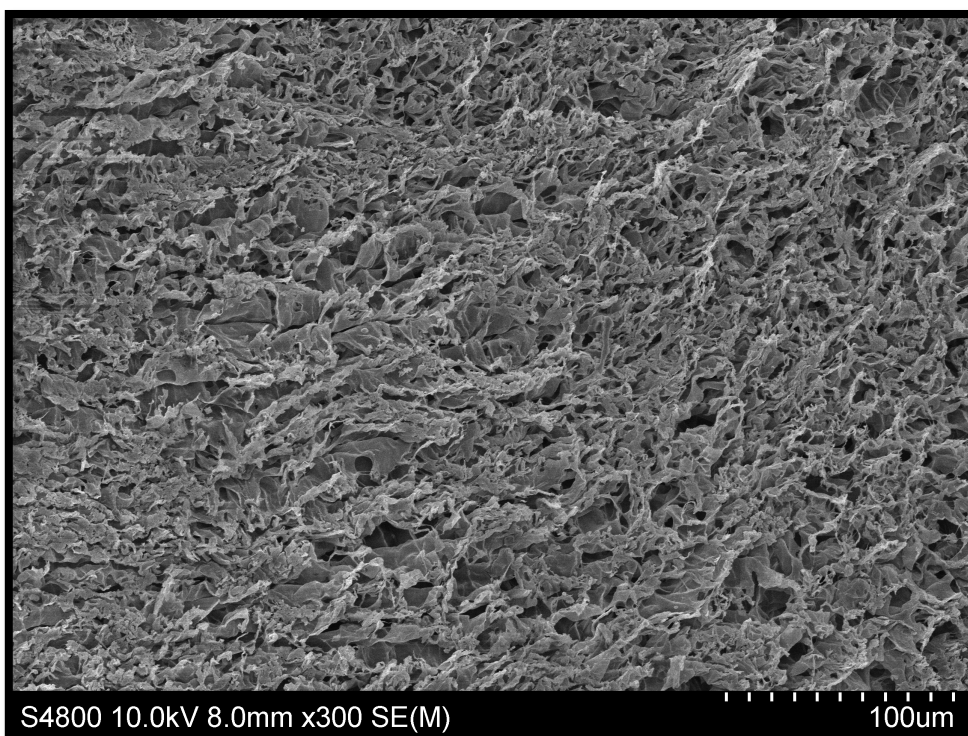


Figura 43: PLLA +0,6%GO 7 semanas de degradación (x300).

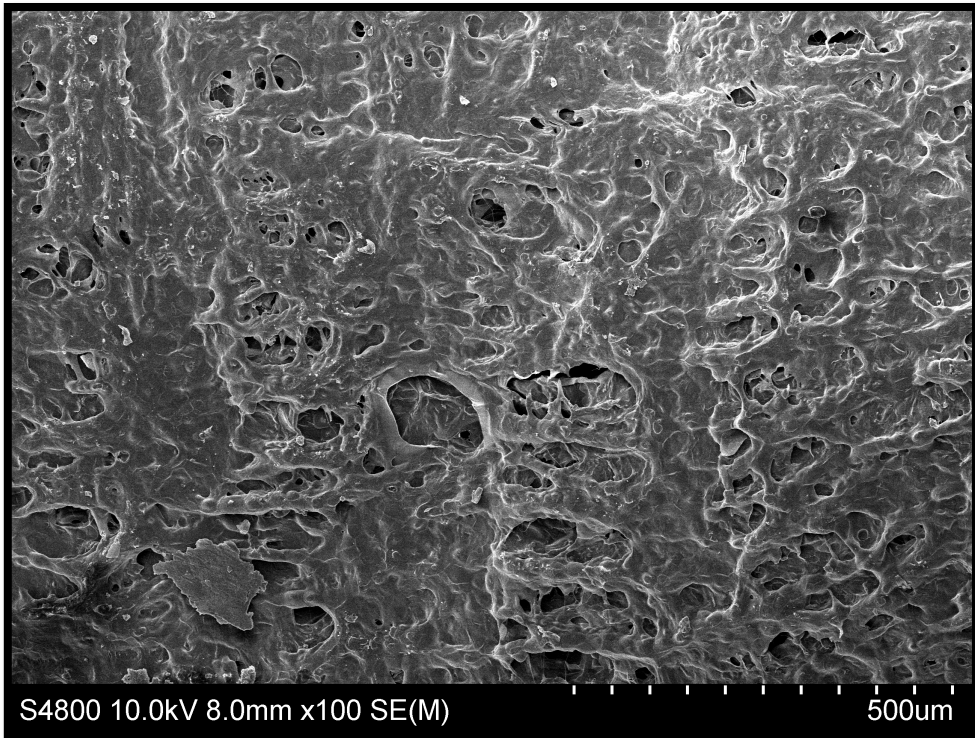


Figura 44: PLLA+1%GO sin degradar (x100).

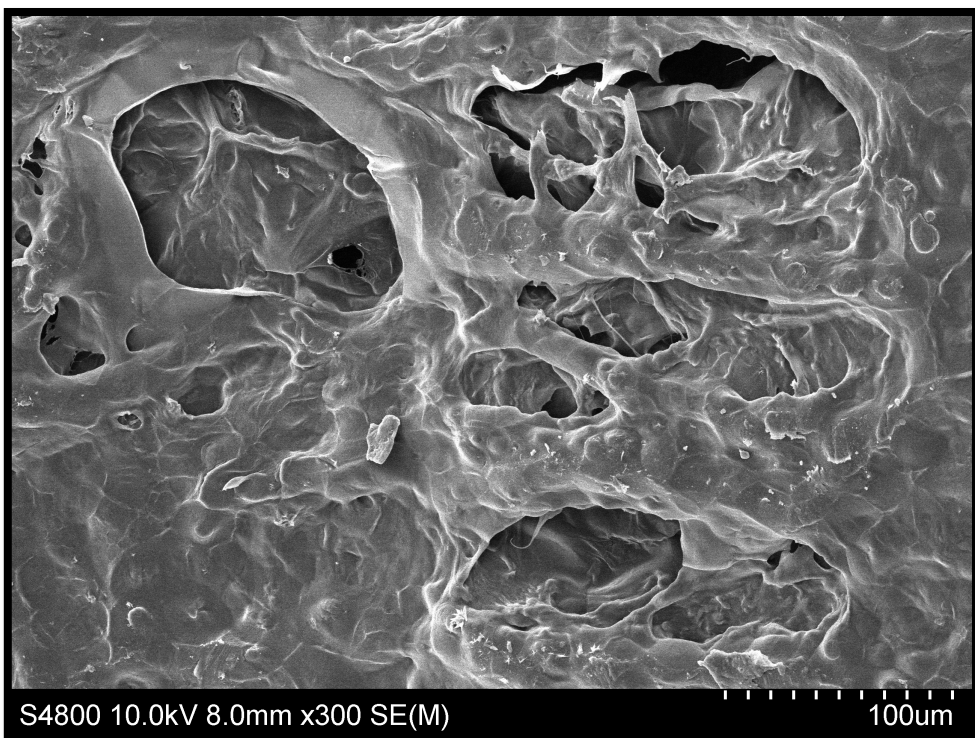


Figura 45: PLLA+1%GO sin degradar (x300).

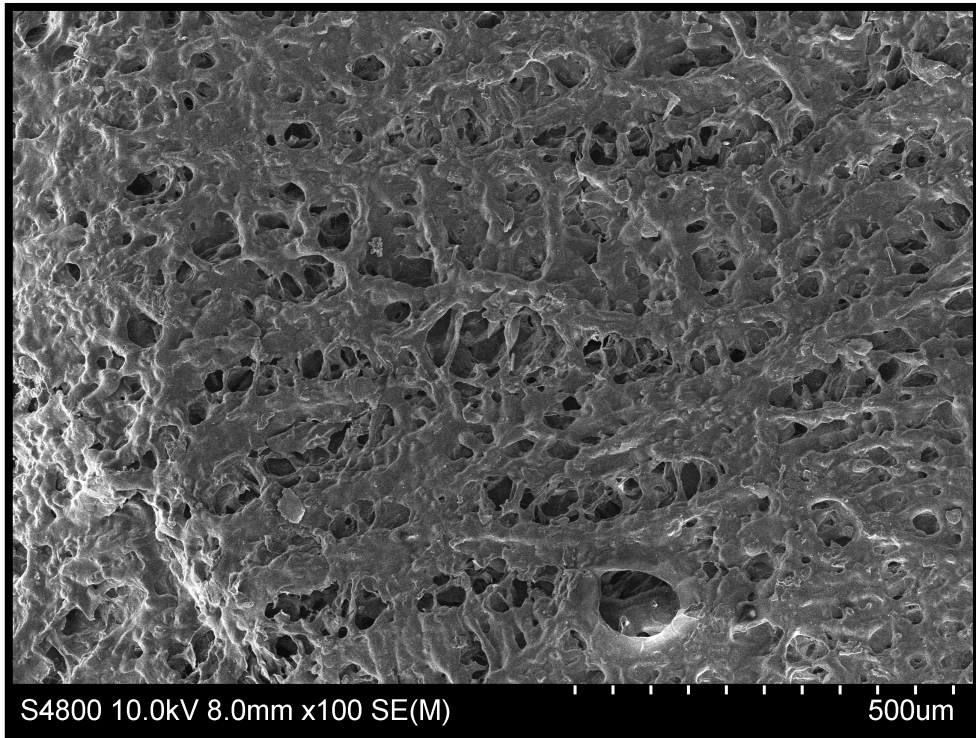


Figura 46: PLLA+1%GO 7 semanas de degradación (x100).

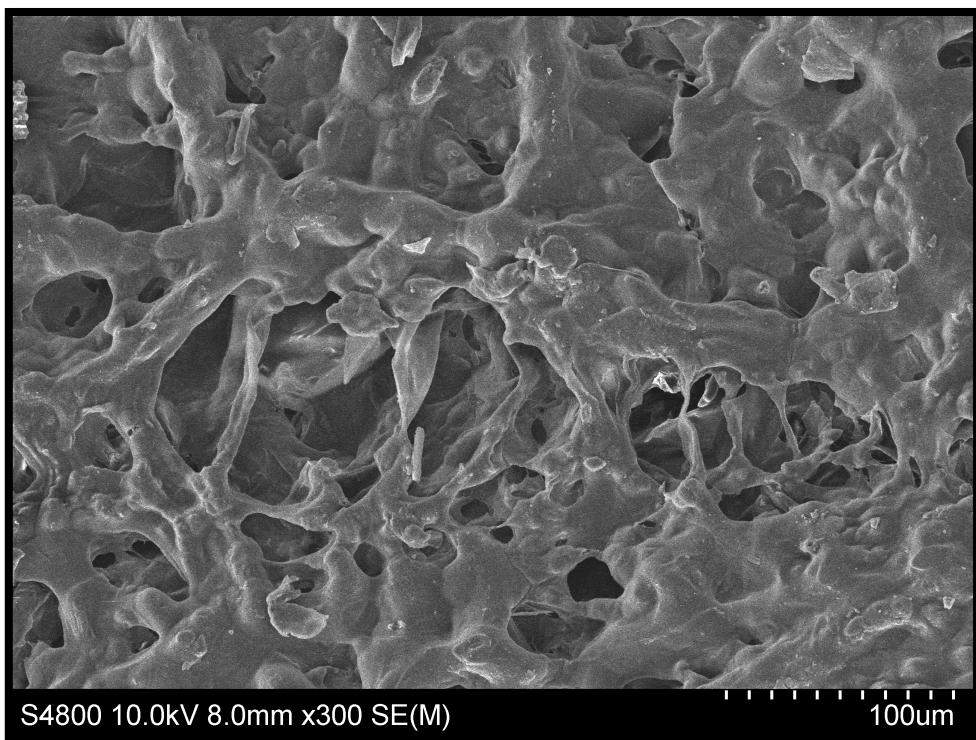


Figura 47: PLLA+1%GO 7 semanas de degradación (x300).

9.3. pH, absorción de PBS y pérdida de masa

En la figura 48 podemos observar los cambios ocurridos en el pH en función del tiempo de degradación in vitro. Los cambios en el pH son un indicador de la liberación de residuos ácidos y por lo tanto del estado de degradación. Todas las muestras han aumentado su pH de 7,2 a $\approx 7,28$ en las semanas que han estado sumergidas las muestras en PBS, un comportamiento que nos indica que el óxido de grafeno actúa como un modulador del pH. Lo normal sería que hubiesen obtenido valores de pH más bajo que 7,2 lo cual nos da idea de la presencia de residuos ácidos resultado del proceso de degradación que en este caso no solo disminuye el pH sino que aumenta hasta valores próximos a 8,3, lo cual nos indica que el GO le confiere un carácter básico lo cual es muy recomendable para evitar procesos inflamatorios en el implante.

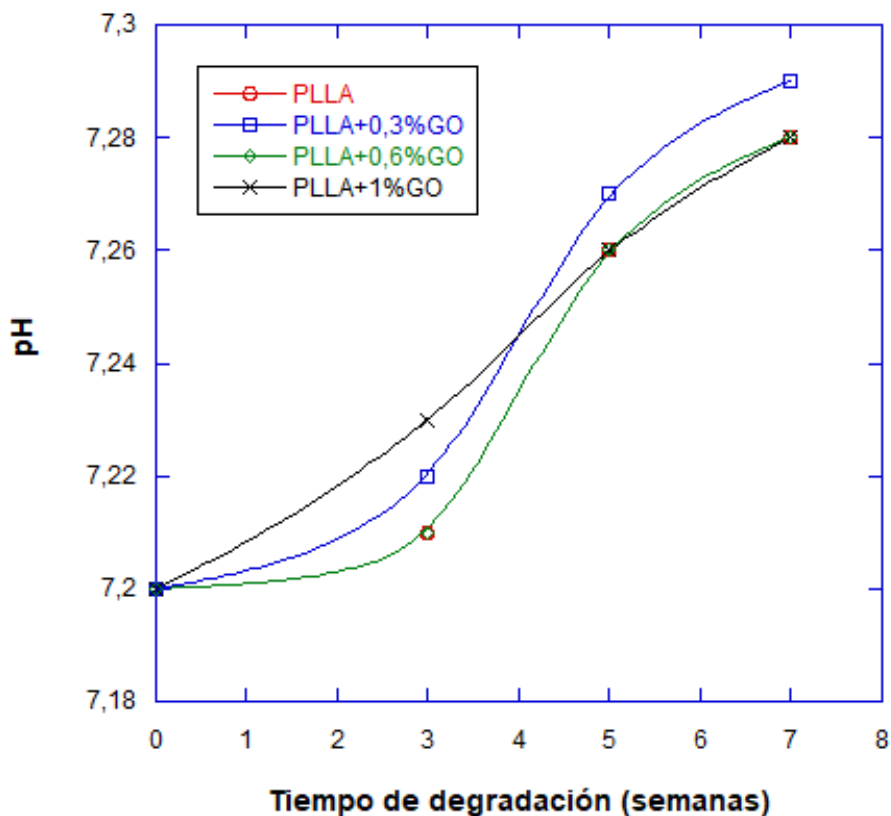


Figura 48: Variación del pH en función del tiempo de degradación en semanas.

La figura 49 muestra el porcentaje de absorción de PBS o agua frente al tiempo de degradación en semanas. En las curvas de absorción de agua podemos ver como la adición de partículas de óxido de grafeno apenas influye en el % de PBS absorbido a excepción de la muestra con un 1% de GO que llega a absorber hasta un 105% de su peso. Esto puede ser debido a la microestructura tan compacta que presenta. Este cambio puede ser debido al resultado de un balance entre la disolución de oligómeros y el agua absorbida, es decir, la velocidad de absorción se reduce cuando los productos de degradación se disuelven.

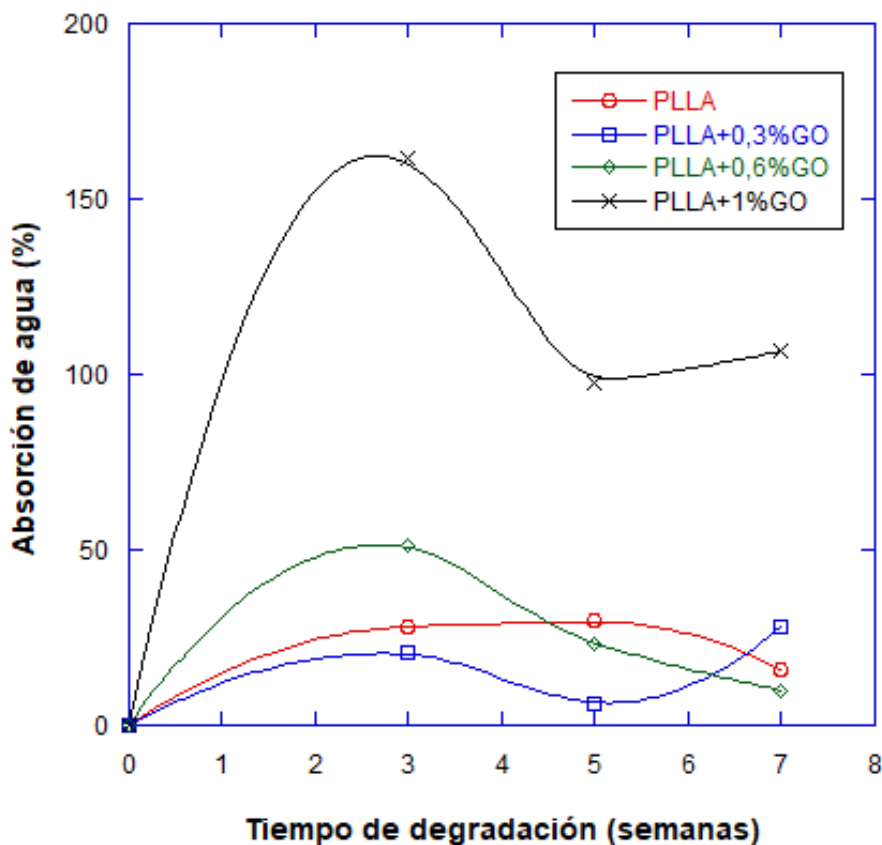


Figura 49: Variación de la absorción de agua en función del tiempo de degradación.

En la figura 50 podemos observar la variación de la pérdida de masa de los scaffolds en función del tiempo de degradación en semanas. Como podemos ver las muestras se encuentran en un estado de degradación no superándose el 13% de pérdida de masa, no encontramos una correlación entre este parámetro y el porcentaje de óxido de grafeno añadido. La absorción de agua no se corresponde con la pérdida de masa, se supone que las muestras que mas absorben son las que más pérdida de masa tienen.

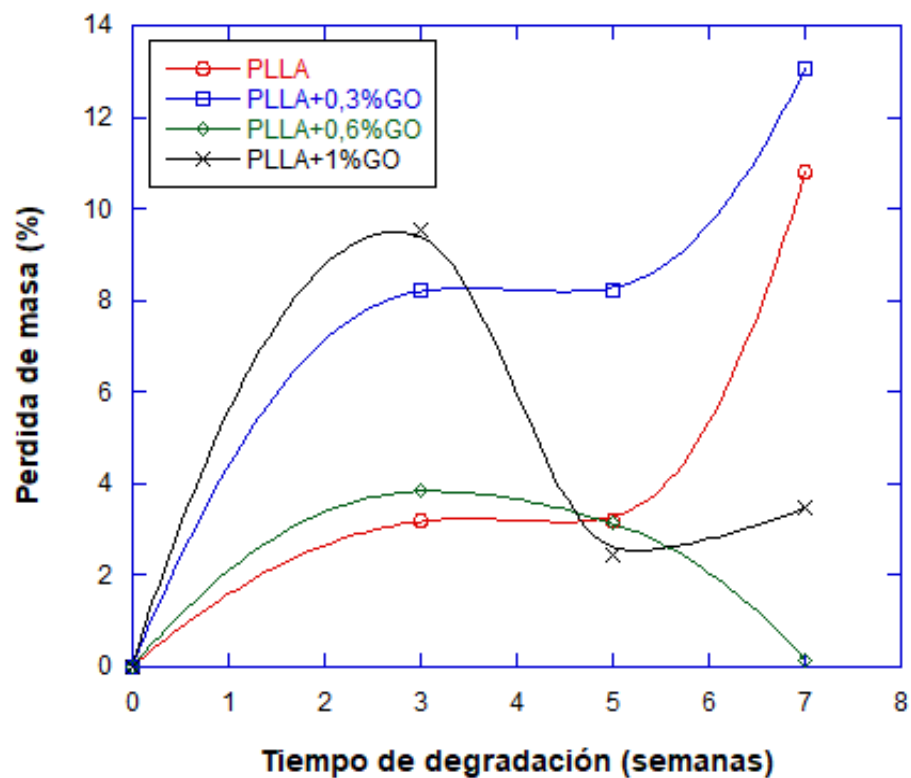


Figura 50: Variación de la masa molecular en función de las semanas de degradación in vitro.

10. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir:

- La técnica elegida para la fabricación de los soportes, TIPS (*ThermallyInducedPhaseSeparation*), demostró ser un método capaz de crear soportes altamente porosos, de morfología tubular y anisotrópica y estructura altamente interconectada. Se trata de una técnica compleja y requiere un gran control sobre todas y cada una de las variables termodinámicas envueltas en el proceso de la separación de fases.
- Los resultados obtenidos por calorimetría diferencial de barrido, la temperatura de transición vítrea y la entalpía de cristalinidad, nos indican que el proceso de degradación apenas ha comenzado.
- Las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) nos indican que la adición de óxido de grafeno en cantidades superiores al 0,3 % disminuye el tamaño de poro de los soportes porosos.
- En el proceso de degradación in vitro las muestras no superan un 13% en la pérdida de masa, lo cual nos indica que el proceso de degradación se encuentra en una etapa inicial.

11. BIBLIOGRAFIA

- [1] J. D. Sipe, "Tissue Engineering Regenerative and Reparative Medicine," vol. 9, pp. 1–9, 2002.
- [2] S. Moscato *et al.*, "Morphological features of ovine embryonic lung fibroblasts cultured on different bioactive scaffolds," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 76, no. 1, pp. 214–221, 2006.
- [3] E. Felli, E. Victoria Martínez, A. J. Campillo-Fernández, Á. Serrano Aroca, and V. San Vicente Mártir Valencia, "El grafeno y sus derivados en la ingeniería tisular," *Nereis*, vol. 8, no. March, pp. 71–81, 2016.
- [4] D. W. Hutmacher, *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*, vol. 21. Woodhead Publishing Limited, 2006.
- [5] E. Díaz, I. Ibáñez, and I. Puerto, "Scaffolds, BioPolymer: Manufacture," *Encycl. Biomed. Polym. Polym. Biomater.*, no. April, pp. 7016–7028, 2016.
- [6] S. Stankovich *et al.*, "Graphene-based composite materials," *Nature*, vol. 442, no. 7100, pp. 282–286, 2006.
- [7] W. Shao *et al.*, "Enhanced bone formation in electrospun poly(L-lactic-co-glycolic acid)-tussah silk fibroin ultrafine nanofiber scaffolds incorporated with graphene oxide," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 62, pp. 823–834, 2016.
- [8] V. I. I. Programa and C. Cient, "Sustitutivos De Tejidos: De Los Biomateriales Ala Ingeniería Tisular," vol. 101, pp. 227–249, 2009.
- [9] X. I. L. lu and P. X. M. A. Eter, "Abstracts of the 40th Annual Meeting of the United Kingdom Environmental Mutagen Society, 25th–28th June 2017 at the Park Inn Hotel, Leuven, Belgium," *Mutagenesis*, vol. 32, no. 6, pp. 607–628, 2018.
- [10] J. E. Báez, "Cómo obtener un polímero degradable en el laboratorio: Síntesis de la poli (D,L-lactida) y caracterización por RMN 1H," *Educ. Quim.*, vol. 21, no. 2, pp. 170–177, 2010.
- [11] K. M. Stridsberg, M. Ryner, and A.-C. Albertsson, "Controlled Ring-Opening Polymerization: Polymers with designed Macromolecular Architecture," *Degrad. Aliphatic Polyesters*, vol. 157, pp. 41–65, 2007.
- [12] S. Domenek *et al.*, "EFFECT OF CRYSTALLIZATION OF POLY (LACTIDE) ON BARRIER PROPERTIES Polymer sample 5 th International Symposium on Food Packaging – 14-16 November 2012 , Berlin , Germany Microstructure of neat annealed PLA," vol. 47, no. 22, p. 935068, 2012.
- [13] J. H. Yang, S. H. Lin, and Y. Der Lee, "Preparation and characterization of poly(L-lactide)-graphene composites using the in situ ring-opening polymerization of PLLA with graphene as the initiator," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 21, pp. 10805–10815, 2012.
- [14] H. Salavagione and G. Martínez, "Nanocompuestos poliméricos de grafeno: preparación y propiedades," *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 12, no. 1, pp. 53–63, 2011.
- [15] S. Pei and H. M. Cheng, "The reduction of graphene oxide," *Carbon N. Y.*, vol. 50, no. 9, pp. 3210–3228, 2012.
- [16] W. Gao, "The chemistry of graphene oxide," *Graphene Oxide Reduct. Recipes, Spectrosc. Appl.*, pp. 61–95, 2015.
- [17] Y. S. Nam and T. G. Park, "Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 47, no. 1, pp. 8–17, 1999.
- [18] 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.
- [19] T. A. Jennings, *Lyophilization*. .
- [20] A. Industry and S. Publication, “An Industry Service Publication,” *A Guid. To Free. Dry. Lab.*, p. 11, 2010.
- [21] TELSTAR, “Liofilizador de laboratorio CRYODOS,” pp. 1–2, 2012.
- [22] M. R. Kamal and S. Sourour, “Kinetics and thermal characterization of thermoset cure,” *Polym. Eng. Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 59–64, 1973.
- [23] S. Suriñach, M. D. Baro, S. Bordas, N. Clavaguera, and M. T. Clavaguera-Mora, “La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales,” *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr.*, vol. 31, no. 1, pp. 11–17, 1992.
- [24] P. Gill, T. T. Moghadam, and B. Ranjbar, “Differential Scanning Calorimetry Techniques : Applications in Biology and Nanoscience,” pp. 167–193, 2010.
- [25] J. Clavijo, “Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM),” *Elementos*, vol. 3, no. 3, 2015.
- [26] 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.
- [27] D. Ge, V. Domnich, and Y. Gogotsi, “In-situ TEM study of thermal stabilities of metastable silicon phases,” *Microsc. Microanal.*, vol. 9, no. SUPPL. 2, pp. 484–485, 2003.