

GRADO EN MARINA  
**TRABAJO FIN DE GRADO**

***SCAFFOLDS DE PLLA CON  
NANOTUBOS DE CARBONO***

**Alumno/Alumna:** Martín, Ballesteros, Julen

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

**Curso:** 2018-2019

**Fecha:** JUNIO, 2019



## **Resumen**

El objetivo de este proyecto final de grado ha sido analizar el impacto de los Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple (MWCNTs) en la microestructura y la degradación in vitro de andamios porosos (Scaffolds en inglés) para la Ingeniería de Tejidos (IT), fabricados a base de PLLA (Poli-L-lactida) y partículas de nanohidroxiapatita (nHA). Para la fabricación se ha empleado la técnica de separación de fases inducida térmicamente (TIPS) mediante un liofilizador. Una vez obtenidos los andamios se ha realizado una degradación in vitro durante varias semanas y se han recogido datos como: cantidad de agua absorbida, variación de pH y la pérdida de masa. Posteriormente se ha realizado un análisis térmico diferencial (DSC) y se ha observado la microestructura en el Microscopio de Barrido Electrónico (SEM) de la universidad.

**Palabras clave:** MWCNTs, Scaffolds, IT, PLLA, nHA, degradación in vitro.

## **Laburpena**

Gradu amaierako lan honen helburua Aniztun Hormako Karbono Nano-hodien (MWCNTs) gehiketa, ehunen ingeniartzan egindako PLLA (Poli-L-lactida) eta nanohidroxiapatita (nHA) partikulez osatutako aldamio porotsuen mikroegituran eta in vitroko degradazioan duen eragina aztertzea izan da. Horretarako, termikoki eragindako fase bereizketa (TIPS) teknika erabili da, liofilizagailu baten bidez. Aldamioak behin lortuta, zenbait asteko in vitro degradazioa egin da, hainbat datu hartuz, hala nola: xurgatutako ur kantitatea, pH-bariazioa eta galdutako masa. Ondoren, analisi termiko diferentziala (DSC) egin da eta unibertsitateko ekorkeka elektronikoko mikroskopioan (SEM) aztertu egin da.

**Hitz gakoak:** MWCNTs, Scaffolds, ehunen ingeniartzita, PLLA, nHA, in vitro degradazioa.

## **Abstract**

The main objective of this final degree work is to analyse the impact of Multiwalled Carbon Nanotubes (MWCNTs) adhesion, in the microstructure and in vitro degradation of porous scaffolds, for tissue engineering, made from PLLA (Poly-L-lactic) and nanohydroxyapatite (nHA) particles. For this, Thermally Induced Phase Separation (TIPS) technique has been used. An in vitro degradation has been realized once the scaffolds obtained, during some weeks, taking some data such as: amount of water absorbed, pH variation and the loss of mass. Then, a Differential Calorimetry Scanning (DSC) has been done and the microstructure has been observed using the Electronic Scanning Microscopy (SEM) of the university.

**Key words:** MWCNTs, Scaffolds, tissue engineering, PLLA, nHA, in vitro degradation.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. CONTEXTO</b> .....	<b>5</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
<b>4. BENEFICIOS</b> .....	<b>9</b>
<b>5. ESTADO DEL ARTE</b> .....	<b>11</b>
<b>6. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>15</b>
<b>6.1. BIOMATERIALES</b> .....	<b>16</b>
<b>6.2. PLLA</b> .....	<b>20</b>
<b>6.3. HIDROXIAPATITA</b> .....	<b>23</b>
<b>6.4. NANOTUBOS DE CARBONO</b> .....	<b>25</b>
<b>7. MATERIALES</b> .....	<b>27</b>
<b>8. TÉCNICAS EXPERIMENTALES</b> .....	<b>29</b>
<b>8.1. SEPARACIÓN DE FASES INDUCIDA TÉRMICAMENTE (TIPS)</b> .....	<b>30</b>
8.1.1. Separación de fases sólido-líquido .....	<b>31</b>
8.1.2. Separación de fases líquido-líquido.....	<b>31</b>
<b>8.2. LIOFILIZACIÓN</b> .....	<b>33</b>
8.2.1. Proceso.....	<b>34</b>
8.2.2. Ventajas y desventajas .....	<b>34</b>
8.2.3. Preparación de las muestras.....	<b>35</b>
<b>8.3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)</b> .....	<b>37</b>
8.3.1. Principio y utilidades .....	<b>37</b>
8.3.2. Preparación de muestras .....	<b>40</b>
<b>8.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)</b> .....	<b>42</b>
8.4.1. Funcionamiento del equipo .....	<b>42</b>
8.4.2. Preparación de muestras .....	<b>45</b>
<b>8.5. DEGRADACIÓN IN VITRO</b> .....	<b>47</b>
<b>9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>50</b>
<b>9.1. DEGRADACIÓN IN VITRO</b> .....	<b>51</b>
9.1.1. Gráfica pH/semanas de degradación .....	<b>52</b>
9.1.2 Gráfica %PBS absorbido/Semanas de degradación.....	<b>53</b>
9.1.3. Gráfica %Peso perdido/Semanas de degradación.....	<b>54</b>

<b>9.2. DSC</b> .....	<b>56</b>
9.2.1. Termogramas.....	<b>58</b>
<b>9.3. SEM</b> .....	<b>63</b>
<b>10. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>65</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>71</b>

## **TABLAS**

Tabla 1: Polímeros sintéticos biodegradables en IT.

Tabla 2: Resumen de propiedades físicas y químicas del PLLA.

Tabla 3: Datos del DSC.



## **FIGURAS**

Figura 1: Esquema de degradación del ácido poliláctico en el organismo.

Figura 2: Ácido Poli-L-Láctico.

Figura 3: Estructura de la Hidroxiapatita.

Figura 4: Estructura de MWCNT's.

Figura 5: Diagrama de fases temperatura-composición de una solución polimérica.

Figura 6: Equipo de liofilización.

Figura 7: Scaffolds.

Figura 8: Esquema básico de DSC.

Figura 9: Modelo DSC TA Instruments Q200.

Figura 10: Esquema de un equipo SEM.

Figura 11: Generación de electrones SE (a) y electrones BSE (b).

Figura 12: Portamuestras SEM.

Figura 13: Equipo SEM.

Figura 14: Medidor de pH.

Figura 15: Gráfica pH/semanas de degradación.

Figura 16: Gráfica %PBS absorbido/Semanas de degradación.

Figura 17: Gráfica %Peso perdido/Semanas de degradación.

Figura 18: Termograma PLLA.

Figura 19: Termograma PLLA (semana 12).

Figura 20: Termograma PLLA/nHa 1%.

Figura 21: Termograma PLLA/nHA 1% (semana 12).

Figura 22: Termograma PLLA/nHA/MWCNT's 1%.

Figura 23: Termograma PLLA/nHA/MWCNT's 1% (semana 12).

Figura 24: Termograma PLLA/nHA/MWCNT's 5%.

Figura 25: Termograma PLLA/nHA/MWCNT's 5% (semana12).

Figura 26: Termograma PLLA/nHA/MWCNT's 10%.

Figura 27: Termograma PLLA/nHA/MWCNT's 10% (semana 12).

Figura 28: PLLA x100.

Figura 29: PLLA x300.

Figura 30: PLLA 24 semanas x100.

Figura 31: PLLA 24 semanas x300.

Figura 32: PLLA/nHA 1% x100.

Figura 33: PLLA/nHA 1% x300.

Figura 34: PLLA/nHA 1% 24 semanas x100.

Figura 35: PLLA/nHA 1% 24 semanas x300.

Figura 36: PLLA/nHA/CNT 1% x100.

Figura 37: PLLA/nHA/CNT 1% x300.

Figura 38: PLLA/nHA/CNT 1% 24 semanas x100.

Figura 39: PLLA/nHA/CNT 1% 24 semanas x300.

Figura 40: PLLA/nHA/CNT 5% x100.

Figura 41: PLLA/nHA/CNT 5% x300.

Figura 42: PLLA/nHA/CNT 5% 24 semanas x100.

Figura 43: PLLA/nHA/CNT 5% 24 semanas x300.

Figura 44: PLLA/nHA/CNT 10% x100.

Figura 45: PLLA/nHA/CNT 10% x300.

Figura 46: PLLA/nHA/CNT 10% 24 semanas x100.

Figura 47: PLLA/nHA/CNT 10% 24 semanas x300.

## **ACRÓNIMOS**

MWCNT's: Multiwalled Carbon Nanotubes

IT: Ingeniería de Tejidos

PLLA: Poli-L-Lactida

nHA: Nanohidroxiapatita

TIPS: Thermally Induced Phase Separation

DSC: Differential Scanning Calorimetry

SEM: Scanning Electron Microscope

FDA: Food and Drug Administration

PGA: Poly (Glycolic Acid)

PDLA: Poli-D-Lactida

PCL: Policaptolactona

POE: Polioroéster

PLA: Ácido Poliláctico

ROP: Ring Opening Polymerization

HA: Hidroxiapatita

SWCNT's: Single-Wall Carbon Nanotubes

FEG: Field Emission Gun

SE: Secondary Electrons

BSE: Back-scattered Electrons

PBS: Phosphate Buffer Solution

# **1. INTRODUCCIÓN**

Algunos de los problemas de salud más graves a los que tiene que hacer frente un ser humano son aquellos que provocan el daño total y pérdida de un órgano o tejido, causados por enfermedades congénitas, traumas o cáncer. Las opciones de tratamiento incluyen la reparación mediante cirugía, prótesis artificiales y trasplantes. Sin embargo, estas opciones no son, en muchas ocasiones, suficientemente satisfactorias debido a la dificultad de la recuperación completa del tejido, dando como resultado un tejido poco funcional y anti estético. El trasplante de órgano puede salvar la vida del paciente o al menos alargar la esperanza pero el éxito del mismo se limita prácticamente a su suerte.

Como alternativa a estos tratamientos se encuentra el área de la ciencia dedicada a la regeneración de tejidos, conocida como "Ingeniería de tejidos" (a partir de ahora IT) y que permite la posibilidad de regenerar las propias células del cuerpo del paciente, evitando así el trasplante y minimizando los riesgos de rechazo. [1]

El campo de la IT es muy amplio y engloba diferentes sectores como son: medicina, biología, ingeniería mecánica, ciencia de los materiales y genética. Esta área de la ciencia se basa en el uso de matrices tridimensionales, también conocidas como andamios o scaffolds, de diferentes materiales y que proporcionan el ambiente adecuado para la regeneración de los tejidos y órganos. Los scaffolds básicamente actúan como plantillas para la creación de los tejidos y generalmente están sembrados con células o, en ocasiones, con estimulantes mecánicos o químicos. Posteriormente estos andamios son

cultivados *in vitro* con el fin de sintetizar los tejidos para poder ser implantados en la parte dañada, pudiéndose también implantar directamente en el cuerpo del paciente y realizar la regeneración *in vivo*. [2]

Cualquier tipo de scaffold que se utilice en IT debe satisfacer unos requerimientos mínimos que aseguran la compatibilidad:

- El primer criterio que debe satisfacer un scaffold es ser biocompatible; las células deben adherirse, funcionar de forma normal y, posteriormente, migrar y seguir proliferando. Además debe ser compatible con el cuerpo del paciente, sin generar una respuesta inmune y evitando el rechazo. [2]
  
- Los scaffolds no están diseñados como implantes permanentes, por lo tanto deben ser biodegradables y permitir a las células construir su propia matriz extra celular. La degradación ha de ir emparejada con la formación del tejido. [2]
  
- Lo ideal es que el scaffold tenga unas propiedades mecánicas similares al tejido que reemplaza [3] y que sea suficientemente fuerte para manipularlo sin riesgo durante la cirugía de implantación. [2]
  
- Deben tener una estructura interna porosa que permita la difusión de nutrientes a las células y la salida de residuos, fruto de la degradación del scaffold, sin interferir con otros órganos o tejidos. [2]



➤ A fin de que un scaffold sea clínicamente y comercialmente viable tiene que tener un coste efectivo que permita la construcción del mismo en un laboratorio de investigación a una escala de producción pequeña. [2]

Desde la aparición de la IT se han utilizado gran variedad de materiales para la creación de scaffolds, pero la gran mayoría de estructuras están elaboradas con materiales poliméricos, debido a las numerosas desventajas que presentan los no poliméricos. Así pues, la investigación sobre la construcción y desarrollo de los andamios porosos actualmente está centrada en tres categorías de materiales [4]:

- I. Polímeros biodegradables y bioabsorbibles aprobados por la FDA, como pueden ser colágeno, poliglicólida (PGA), poliláctida (PLLA y PDLA) y policraptolactonas (PCL).
- II. Polímeros no aprobados como poliorctoésteres (POE), polianhídridos, etc.
- III. Síntesis de otro tipo de polímeros.

## **2. CONTEXTO**

Este proyecto se ha realizado en el laboratorio de Materiales de la Escuela de Ingeniería de Bilbao, en el edificio de Portugalete, perteneciente a la Escuela de Ingeniería de Bilbao, dentro de un proyecto de investigación sobre la adición de nanotubos de carbono de pared múltiple a diferentes polímeros biodegradables, bioactivos y biocompatibles para la investigación tanto in vivo como in vitro en un futuro próximo.

### **3. OBJETIVOS**

El objetivo de este proyecto es la fabricación y posterior estudio de la degradación in vitro de andamios porosos para la IT, a los que se les ha añadido nanopartículas de nanohidroxiapatita (nHA) y Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple (MWCNTs) en diferentes proporciones. Todo ello se ha realizado mediante la técnica de Separación de Fases Inducida Térmicamente (TIPS), utilizando PLLA como polímero y 1.4-dioxano como disolvente.

## **4. BENEFICIOS**

Al tratarse de un proyecto de investigación no aporta beneficios de inmediato o a corto plazo, sino que contribuye a aumentar el conocimiento de esta investigación innovadora en el campo de la degradación del ácido poli-L-láctico, al que se añade, además de nanohidroxiapatita, nanotubos de carbono de pared múltiple. Si la investigación avanza, los beneficios se verán reflejados especialmente en el campo de la Ingeniería de Tejidos.

## **5. ESTADO DEL ARTE**



A lo largo de la década pasada se han realizado numerosas investigaciones sobre scaffolds biodegradables para la regeneración o reparación de tejidos del sistema musculoesquelético, y como resultado de ello tenemos un gran conocimiento sobre los requerimientos de este tipo de construcciones. [5]

La mayoría de técnicas utilizadas para la regeneración de tejidos dañados involucran el uso de polímeros sintéticos de tres dimensiones implantados en el lugar del tejido dañado. Los scaffolds permiten el crecimiento y proliferación de nuevas células, además de servir como portadores de las mismas. Las investigaciones realizadas a lo largo de estos treinta años han permitido ampliar el conocimiento que se tiene sobre los scaffolds biodegradables, conociendo en profundidad sus propiedades mecánicas y físicas, su arquitectura y su comportamiento con las células.

La búsqueda de un polímero biodegradable ideal empezó hace ya más de 50 años, ya que no existe un polímero que satisfaga todas las aplicaciones médicas. A continuación se muestra una tabla con los polímeros más estudiados y utilizados en el área médica.

<b>Polímero</b>	<b>Aplicación</b>
PLA-PGA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Implante óseo</li> <li>• Implante en cartílago</li> </ul>
Polianhídrido	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Implante óseo</li> <li>• Suministro controlado de fármacos.</li> </ul>
Poliorthoester	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suministro de fármacos.</li> </ul>
Policraptolactona	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dispositivo de fijación biodegradable.</li> <li>• Suministro de fármacos.</li> </ul>

Policarbonato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Implante óseo</li> <li>• Dispositivo de fijación biodegradable.</li> </ul>
Polifumarato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Implante óseo</li> </ul>

*Tabla 1. Polímeros sintéticos biodegradables en IT*

Las propiedades mecánicas y térmicas de estos polímeros fueron estudiadas por Engelberg y Kohn, en un trabajo que determinó la fuerza de tensión, el módulo de tensión, el módulo de flexión y la elongación a la hora de doblarse y romperse.

A pesar de que hoy en día hay una gran variedad de polímeros biodegradables destinados a aplicaciones médicas, los más populares siguen siendo el PLA, PGA y PLGA. Los dos primeros son poliésteres alifáticos y suelen ser sintetizados mediante la técnica de apertura del anillo (ROP), dando lugar a polímeros como el PLLA. [6]

En este proyecto se ha optado por el uso de PLLA debido a su gran sensibilidad térmica e hidrolítica, lo que le permite una rápida degradación y obtener unas excelentes propiedades mecánicas. [7]

A lo largo de estos años también se han utilizado diferentes técnicas de preparación, cada una con sus ventajas y desventajas. Las técnicas se diferencian en el uso o no uso de disolventes, la temperatura, la presión o los aditivos utilizados. A continuación se muestra una lista de todas ellas:

- Fundición de la solución.
- Gel-casting

- Fundición del solvente y lixiviación de las partículas.
- Vibración y lixiviación de partículas.
- Creación de espuma de gas y lixiviación de partículas.
- Saturación de gas.
- Liofilización.
- Impresión 3D.
- Unión de fibras.
- Fibras no tejidas.
- Separación de fases.

Las dos técnicas utilizadas en este proyecto para la creación de los andamios han sido la liofilización y la separación de fases inducida térmicamente. Estas técnicas son comúnmente utilizadas para la creación de scaffolds con PLA y nHA.

En definitiva, a lo largo de las décadas pasadas se han realizado muchos avances en el área de la creación de andamios porosos, lo que ha permitido aumentar considerablemente el conocimiento sobre los mismos y hoy en día se sigue investigando, a través de la IT, en una nueva generación de polímeros biodegradables que satisfagan aún más las necesidades médicas necesarias.

[6]

## **6. FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

## 6.1. BIOMATERIALES

Un biomaterial puede definirse como un material capaz de interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. El requisito esencial para catalogar un material como biomaterial es la biocompatibilidad, es decir, la habilidad que tiene el material para conseguir una respuesta satisfactoria por parte del anfitrión en una aplicación específica. En el caso de los biomateriales biodegradables, la biocompatibilidad ha de ser demostrada a lo largo del tiempo. Las propiedades químicas, físicas, mecánicas y biológicas de un material biodegradable pueden variar con el tiempo y los productos degradables pueden tener diferentes grados de compatibilidad en comparación con el principio del proceso de fabricación.

Los polímeros biodegradables están siendo investigados para diferentes aplicaciones terapéuticas como prótesis temporales, estructuras porosas de tres dimensiones en forma de andamios para la IT y para aplicaciones farmacológicas como suministro de medicinas.

Debido a la versatilidad de los materiales poliméricos, están reemplazando rápidamente a otra clase de materiales, como los metales, aleaciones y cerámicas, para su uso como biomateriales. [8]

Actualmente existen tres categorías de biomateriales, y ya se está investigando una cuarta.

Durante los años 60 y 70 se desarrolló la primera generación de materiales especialmente diseñados para su uso dentro del cuerpo humano. Estos estudios se convirtieron en la base del campo de los biomateriales. El profesor Bill Bonfiel fue uno de los primeros en investigar la interacción de los biomateriales con los tejidos vivos. El objetivo de los primeros biomateriales era conseguir una combinación de propiedades físicas adecuadas para poder reemplazar el tejido dañado con la mínima respuesta tóxica en el anfitrión.

La mayoría de los materiales implantados eran adaptaciones de materiales comerciales ya existentes con mayor pureza para eliminar la liberación de subproductos tóxicos y minimizar la corrosión. El principio que subyace a la mayor parte del desarrollo de biomateriales entre las décadas de 1960 hasta 1980 era reducir al mínimo posible el rechazo de un cuerpo extraño por parte del anfitrión. Es importante decir que este principio de diseño de ingeniería es aún válido, 40 años después.

Aún con todo lo anterior descrito la tasa de rechazo era sorprendentemente elevada por lo que numerosos investigadores y laboratorios empezaron a trabajar con nuevos materiales. El grupo de investigación del profesor Bill Bonfiel comenzó a investigar en 1980 un diseño de materiales biocompuestos cuyas propiedades mecánicas eran mucho más parecidas a las del hueso del anfitrión. Este trabajo pionero dio lugar a la creación de un material innovador compuesto por una matriz polimérica y partículas de hidroxiapatita dispersas [9].

Para el año 1984, el campo de los biomateriales había cambiado de énfasis al lograr exclusivamente una respuesta tisular bioinerte. Una segunda generación de biomateriales había sido desarrollada para ser bioactivos. Los materiales bioactivos provocan una acción y reacción controlada en el entorno fisiológico [9]. Se demostró que el mecanismo de unión de las partículas de los materiales bioactivos involucraba una secuencia de once reacciones [10], incluyendo la colonización de células madre, seguido de la proliferación y diferenciación de las células para crear un nuevo hueso igual de fuerte que el tejido reemplazado [9]. A mediados de la década de 1980, los materiales bioactivos eran utilizados en una gran variedad de aplicaciones ortopédicas y dentales. Varios compuestos de cristales bioactivos, cerámicos, cristal-cerámicos se encontraban en ensayo clínico.

Los biomateriales reabsorbibles también se convirtieron clínicamente importantes durante este periodo, como por ejemplo la sutura realizada con copolímero de ácido poliláctico y poliglicólico [9].

Mientras que la segunda generación de biomateriales fue diseñada para ser reabsorbible o bioactiva, la siguiente generación se diseñó combinando ambas propiedades, con el objetivo de desarrollar materiales que, una vez implantados, ayudasen a la curación del cuerpo por sí mismo.

La tercera generación de biomateriales se sigue diseñando para estimular una respuesta celular específica a nivel molecular, interaccionando con las células y estimulando su diferenciación o la activación de determinados genes.

El objetivo principal de estos biomateriales es conseguir la regeneración o crecimiento, in vivo o in vitro, de tejidos. [10]



## 6.2. PLLA

El ácido poli-L-láctico (PLLA por sus siglas en inglés) es producido a partir del ácido láctico, un producto natural, obtenido por fermentación de fuentes renovables [11]. El ácido láctico es, sin duda, el poliéster alifático biodegradable más investigado y utilizado a lo largo de la historia humana. Debido a sus propiedades, el PLA es el biomaterial líder en numerosas aplicaciones de medicina y de industria, reemplazando a los polímeros de base petroquímica convencionales. [12]

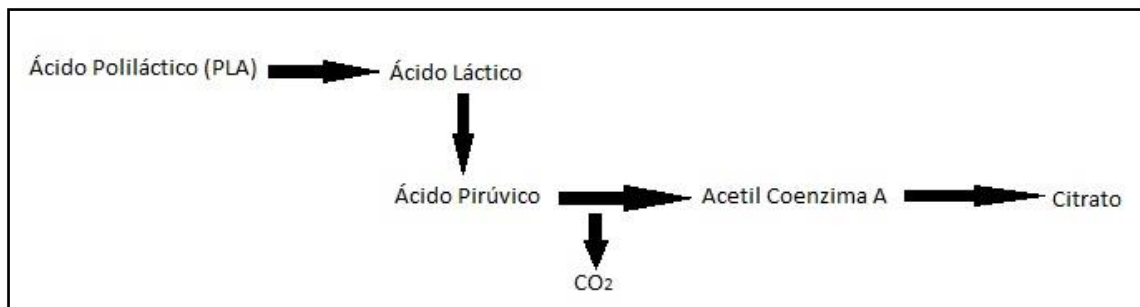


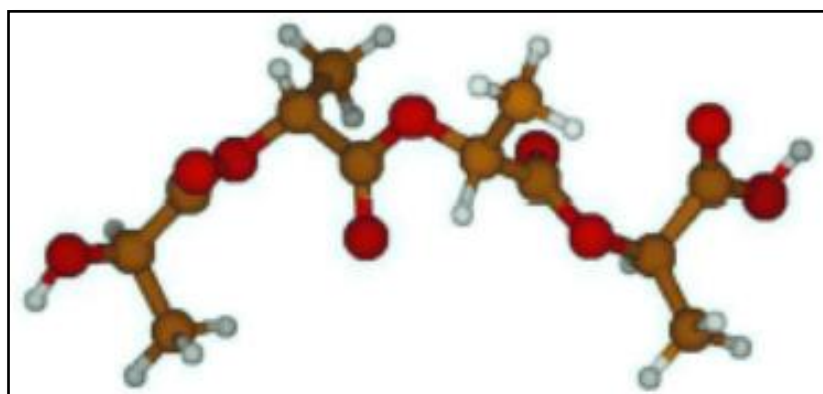
Figura 1. Esquema de degradación del ácido poliláctico en el organismo

El ácido láctico es un compuesto quiral, con una temperatura de transición vítrea de 60-65°C y una temperatura de fusión de unos 175°C [8]. Dependiendo de su origen puede ser el isómero D, el isómero L o una mezcla entre ambos. Si se parte del isómero L se obtiene PLLA y dependiendo de la polimerización se puede obtener PLLA de bajo peso molecular o de alto, con diferentes porcentajes de cristalinidad.

El PLLA de bajo peso molecular se obtiene mediante la policondensación a

unos 150°C de temperatura y 0.05 bares, mientras que para obtener alto peso molecular son necesarias temperaturas más altas y una atmósfera inerte. Para la obtención de este último es muy común utilizar el proceso de polimerización por apertura de anillo (ROP).

Este método incluye policondensación del ácido láctico seguido de una despolimerización afín de obtener el dímero cíclico deseado. La lactida y polímeros de alto peso molecular pueden ser obtenidos tras la apertura del anillo.



*Figura 2. Ácido Poli-L-Láctico*

La despolimerización permite aumentar la temperatura de policondensación y disminuir la presión, y destilación de la lactida producida.

La ventaja de la polimerización por ROP es que la reacción se puede controlar más fácilmente, variando así las características del polímero resultante de una manera más controlada. [13]

A continuación se muestra una tabla con un resumen de las propiedades físicas y químicas del PLLA.

<b>Temperatura de fusión (Tm)</b>	175-178 °C
<b>Temperatura de transición vítrea (Tg)</b>	60-65 °C
<b>Soluble en</b>	Dioxano, Dicloroetano, Heptano, DMF, Isopropanol, MIBK, Octanol, TFH, Tolueno
<b>Estado</b>	Semicristalino

*Tabla 2. Resumen de propiedades físicas y químicas del PLLA*

### 6.3. HIDROXIAPATITA

La hidroxiapatita (HA) es un biocristal, formado por átomos de calcio, fósforo, e hidrógeno, cuya fórmula química es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . La HA pertenece a la familia de las apatitas y se encuentra presente en dientes y huesos, siendo el componente que les proporciona dureza y resistencia mecánica.

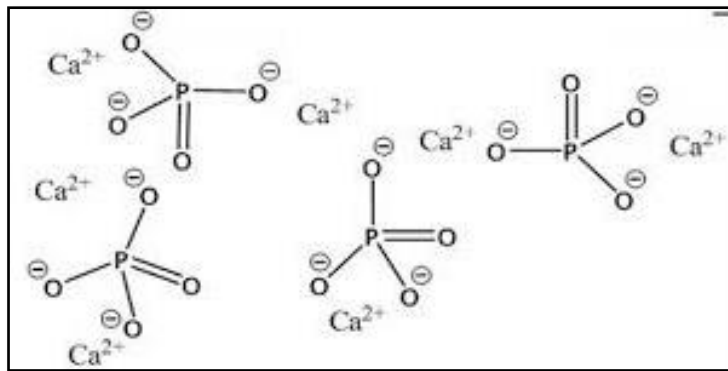


Figura 3. Estructura de la Hidroxiapatita

Principalmente se compone de calcio y fósforo, sin embargo, la HA natural contiene porcentajes mínimos de sodio, cloro, carbonatos y magnesio, los cuales juegan un papel importante en la remodelación de los huesos, por lo que es considerado como un biomaterial por excelencia.

Además de la hidroxiapatita natural también existe la sintética, obtenida a partir de fosfatos, aunque presenta una resistencia mecánica muy pobre, por lo que su uso médico como sustitución ósea no es recomendable, a menos que se combine con sustancias extraídas del propio paciente, en cuyo caso los resultados de la osteoregeneración se optimizan. [14]

Existen varias maneras de obtener HA sintética, pero principalmente tenemos: la síntesis a alta temperatura, dando como resultado una HA que representa buena cristalinidad y gran tamaño de cristales y la síntesis a baja temperatura, consiguiendo HA con baja cristalinidad y cristales de tamaño reducido. Además, también hay que tener en cuenta la obtenida mediante la coprecipitación húmeda, manteniendo una temperatura y pH constantes y una agitación continua. [15]

La principal ventaja de la hidroxiapatita sintética es que tiene unas propiedades de biocompatibilidad muy buenas, por lo que la producción de la misma es de gran interés. Estas propiedades, sumadas a su alta capacidad de absorción hacen de la hidroxiapatita un excelente soporte para matrices de suministro controlado de medicinas o de quimioterapias, en el ámbito oncológico. [16]

## 6.4. NANOTUBOS DE CARBONO

Los nanotubos de carbono son alótopos del carbono, al igual que el diamante, el grafito o los fullerenos, en forma de tubos de tamaño reducido y con un diámetro pequeño. Existen diferentes tipos, dependiendo de la cantidad de capas de grafito que los forman, estos pueden ser nanotubos de pared sencilla (SWCNT's por sus siglas en inglés) o, con los que se trabajará en este proyecto, nanotubos de pared múltiple, conocidos en inglés como Multiwalled Carbon Nanotubes (MWCNT's).

Los nanotubos de pared múltiple pueden considerarse como capas de grafito enrolladas concéntricamente donde cada átomo de carbono está unido con otros tres, conservando una forma tubular. [17]

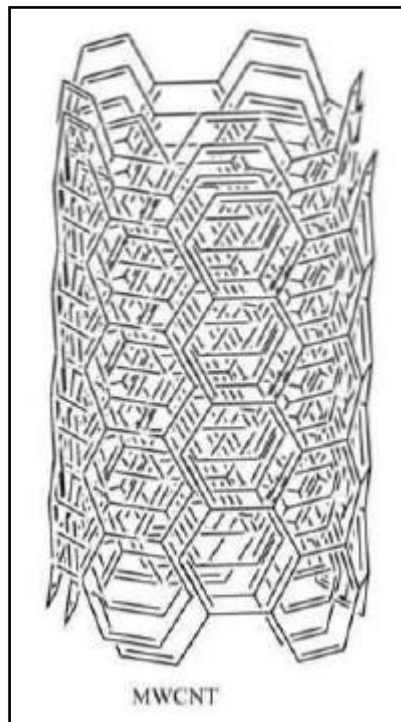


Figura 4. Estructura de MWCNT's

Estos nanomateriales son bien conocidos por tener un gran potencial en aplicaciones biológicas ya que poseen buenas propiedades físicas, mecánicas y químicas, por ello resultan interesantes en la creación de nuevos nanomateriales, por ejemplo en combinación con polímeros. [18]

Las aplicaciones de los MWNCT's son variadas y entre ellas tenemos su uso como biosensores, como transportadores de fármacos y agentes de propiedad antibacteriana. [17]

En este proyecto se usarán los nanotubos de carbono, junto con la hidroxiapatita, para mejorar considerablemente las propiedades mecánicas de los soportes porosos.

## **7. MATERIALES**



Para este proyecto se ha utilizado poli-L-lactida (PLLA) pura con un promedio en peso ( $M_w$ ) de 144221, un promedio en número ( $M_n$ ) de 104042 y una polidispersidad ( $M_w/M_n$ ) de 1,386, suministrada por laboratorios Biomer L9000 (Alemania). El disolvente utilizado ha sido 1,4 Dioxano, destilado por medios convencionales y suministrado por Panreac Química S.A.U. (Barcelona, España). La nanohidroxiapatita con un tamaño menor a 200nm y  $M_w = 502.31$  g/mL fue suministrada por Aldrich Chemistry (USA). Los nanotubos de carbono y pared múltiple (MWCNTs) de 10 a 20 nm de diámetro y 10 a 30  $\mu\text{m}$  de longitud han sido suministrados por Nanostructured & Amorphous Materials Inc. (Houston, USA). Por último, el buffer fosfato salino (PBS) utilizado para la degradación, con un pH de 7,2 lo suministró Fluka Analytical (Sigma Aldrich, USA).

## **8. TÉCNICAS EXPERIMENTALES**

## 8.1. SEPARACIÓN DE FASES INDUCIDA TÉRMICAMENTE (TIPS)

La separación de fases es una técnica comúnmente utilizada para la creación de andamios porosos de materiales biodegradables. Esta separación puede ser inducida de varias maneras pero para este proyecto se ha optado por la técnica de separación de fases inducida térmicamente (TIPS), ya que se trata, posiblemente, de una de las más versátiles y sencillas. [19]

El proceso básico de TIPS es el siguiente [19]:

1. Se forma una solución homogénea del polímero y el diluyente (con un peso molecular menor).
2. Se da la forma deseada a la solución.
3. Se congela la solución para provocar la separación de fases y la solidificación del polímero.
4. Se retira el diluyente para obtener la estructura microporosa.

Entre las numerosas ventajas que tiene esta técnica destacan las siguientes:

- Es un proceso aplicable a un variado rango de polímeros, incluidos los de baja solubilidad.
- Es capaz de producir gran variedad de microestructuras.
- Es capaz de construir microestructuras isotrópicas adecuadas para la liberación controlada de fármacos.

Dentro de la técnica TIPS hay que diferenciar dos vías para la creación de estructuras microporosas: vía sólido-líquido, la cual se observa únicamente cuando el solvente está totalmente congelado, y vía líquido-líquido, que ocurre antes de la congelación del solvente. [20]

### 8.1.1. Separación de fases sólido-líquido

Este método de separación está inducido por la cristalización del propio solvente. En este caso, la temperatura de cristalización del solvente es superior a la de la separación de fases líquido-líquido por lo que, al disminuir la temperatura el solvente se cristaliza y expulsa al polímero del frente de cristalización.

En teoría, los andamios obtenidos a través de esta técnica muestran una alta porosidad y unas buenas propiedades mecánicas, además de una morfología tubular muy anisotrópica con una estructura interna similar a una escalera. [21]

### 8.1.2. Separación de fases líquido-líquido

Este tipo de separación ocurre cuando la temperatura de cristalización del solvente es menor que la temperatura de separación de fases. Suele utilizarse con polímeros vítreos o cristalinos. [22]

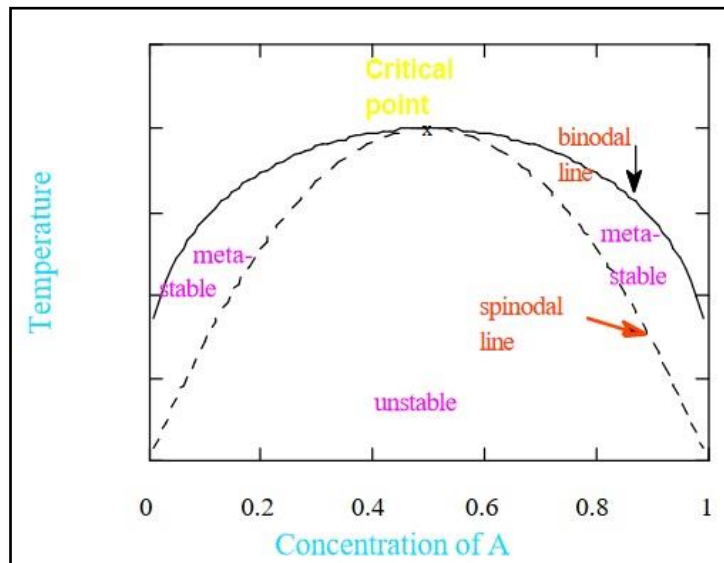


Figura 5. Diagrama de fases temperatura-composición de una solución polimérica

Cuando una solución polimérica se enfría pueden ocurrir dos tipos de separación líquido-líquido. En la región metaestable del diagrama de fases, la separación se produce por un mecanismo de nucleación y crecimiento, en cambio, en la región inestable, la separación es espontánea, mediante descomposición espinodal.

## 8.2. LIOFILIZACIÓN

Una vez la solución está separada en dos fases, es necesario retirar el solvente para que quede únicamente la estructura porosa, para ello se ha utilizado la técnica de liofilización mediante el liofilizador *Telstar Lyoquest* de la Universidad.

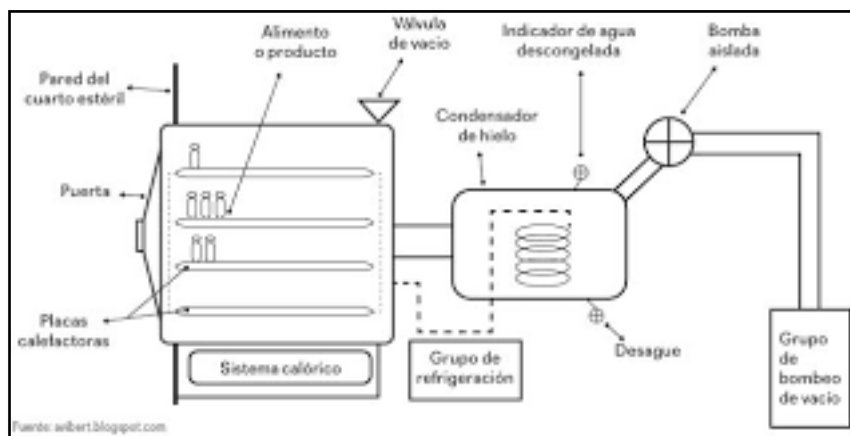


Figura 6. Equipo de liofilización

La palabra liofilización se define como un proceso estabilizador en el cual se congela la solución y, en primer lugar, se reduce la cantidad de solvente mediante la sublimación y después por desorción, a valores en los que ya no soportarán crecimiento biológico o reacciones químicas. [23]

Como proceso industrial se empezó a utilizar en el siglo XX pero sus principios eran ya conocidos y usados por los Incas en el año 200 A.C.

El procedimiento ancestral consistía en dejar los alimentos a la intemperie por la noche para que se congelasen, y por la mañana, con los primeros rayos de sol y debido a la baja presión de la zona de los Andes, el agua congelada se

sublimaba. Esta técnica se utilizó durante la Segunda Guerra Mundial para conservar el plasma y la penicilina. [24]

### 8.2.1. Proceso

Los pasos básicos de la liofilización son los siguientes:

1. **Congelación:** la solución se congela.
2. **Vacío:** se crea un vacío dentro del liofilizador para conseguir que el solvente se sublime, es decir, que pase de estado sólido al gaseoso sin pasar por líquido.
3. **Calentamiento:** con el fin de acelerar el proceso de sublimación se añade calor a la solución. Esto se consigue con el calentamiento de bandejas del liofilizador.
4. **Condensación:** los restos de solvente que quedan dentro del liofilizador se condensan para posteriormente retirarlos.

### 8.2.2. Ventajas y desventajas

La principal ventaja es que permite la eliminación total del solvente dejando intacta la estructura porosa. Además, la temperatura a la que se desarrolla el proceso está por debajo de aquella en la que los productos químicos inestables sufrirían daño.

Como desventaja se podría decir que es un proceso lento y costoso puesto que el aparato tiene un precio elevado y al que hay que sumar el gasto en mantenimiento y energía eléctrica. [23]

### 8.2.3. Preparación de las muestras

En el presente proyecto se han preparado un total de 20 soportes porosos (4 de cada tipo) con diferentes concentraciones, todos ellos con el mismo polímero (PLLA) y el mismo disolvente (1,4 dioxano). Las concentraciones son las siguientes:

- PLLA con nHA al 10% respecto del polímero y 10% de MWCNTs.
- PLLA con nHA al 10% respecto del polímero y 5% de MWCNTs.
- PLLA con nHA al 10% respecto del polímero y 1% de MWCNTs.
- PLLA con nHA al 1% respecto del polímero.
- PLLA al 2,5% respecto del disolvente.



Figura 7. Scaffolds

Los pasos básicos para la preparación de las muestras son los siguientes:

1. Se pesan aproximadamente 0,530 gramos de PLLA en un vaso de reloj.
2. Como la concentración de polímero en el disolvente es de 2,5%, se hace el cálculo equivalente a cada cantidad pesada y se vierte en un matraz de balón con 1,4 dioxano.
3. A continuación se vierte el polímero dentro del balón y se agita la mezcla en el agitador magnético durante dos horas.



4. Una vez transcurridas dos horas, se vierte la cantidad correspondiente de MWCNTs y nHA, y se introduce toda la mezcla en el aparato de ultrasonidos para que termine de homogeneizar todos los componentes.
5. Cuando la mezcla sea totalmente homogénea se vierte sobre dos moldes de aluminio y se introduce al liofilizador para ser enfriada y posteriormente liofilizada.

El programa del liofilizador que se ha utilizado en este proyecto está dividido con los siguientes cinco pasos:

1. Congelación durante 12 horas a -60 °C.
2. Frío + vacío a 0,500 mBar durante 48 horas.
3. Frío + vacío a 0 mBar durante 48 horas.
4. Calentamiento de bandejas a -10 °C durante 72 horas.
5. Calentamiento de bandejas a 0 °C durante 48 horas.

Una vez sacadas las muestras del liofilizador ya están listas para ser utilizadas en las siguientes técnicas.

### **8.3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)**

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) es una técnica experimental dinámica que permite determinar la cantidad de calor que libera o absorbe una sustancia cuando se la mantiene a una temperatura constante, o se calienta y enfría a una velocidad determinada en unos intervalos de tiempo determinados. Debido a su elevado grado de sensibilidad y a su rápida velocidad, esta técnica es una de las más usadas en el campo de la ciencia de los materiales.

El objetivo principal de utilizar el DSC es analizar las propiedades térmicas sobre la microestructura del scaffold y, en consecuencia, las propiedades del material. [25]

Actualmente existen dos tipos de DSC, el DSC por compensación de energía y el DSC por flujo de calor. Cada método tiene sus ventajas y desventajas pero la mayor diferencia entre ambos es que en el DSC por flujo de calor no se utilizan recipientes para la muestra ni la referencia, sino que se coloca directamente el material dentro del aparato [26]. En este proyecto se usará el DSC por compensación de energía.

#### **8.3.1. Principio y utilidades**

En la técnica experimental de DSC se dispone de dos cápsulas. Una de ellas contiene la muestra a analizar y la otra, generalmente vacía, es la cápsula de referencia. El sistema cuenta con dos fuentes de calor independientes para cada cápsula, un baño de líquido refrigerante y un sistema de control que comprueba si se producen diferencias de temperatura entre la muestra y la referencia. Durante el proceso de barrido la temperatura de la muestra aumenta linealmente con el tiempo y en caso de registrarse alguna diferencia,

los calefactores actúan para igualar la temperatura de ambas cápsulas. Es decir, si se produce algún proceso exotérmico o endotérmico el equipo compensa la energía necesaria para mantener iguales las dos cápsulas.

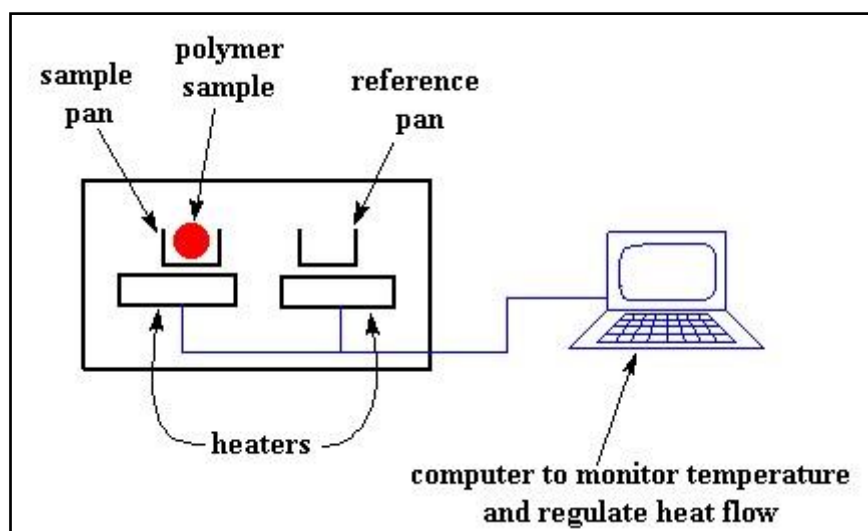


Figura 8. Esquema básico de DSC

Como regla general, puede decirse que todas las transformaciones o reacciones, donde se produce un cambio de energía, pueden medirse con el DSC. Entre las aplicaciones existen las siguientes:

- Medidas de capacidad calorífica aparente (fenómenos de relajación estructural).
- Determinación de temperaturas características de transformaciones o transiciones: transición vítrea, transición ferro-paramagnética, cristalización, transformaciones polimórficas, fusión, ebullición, sublimación, descomposición, isomerización, etc.
- Estabilidad térmica de los materiales.

- Cinética de cristalización de los materiales.

De entre las aplicaciones anteriores, la más útil en el caso de los polímeros es la de cálculo de temperaturas de transición vítrea y de fusión, y las entalpías de cristalización y fusión. [25]

Por último, cabe destacar que para evitar errores y asegurarse de que las medidas son correctas es necesario calibrar el aparato periódicamente.

En este proyecto se ha utilizado el modelo TA Instruments Q200 del laboratorio de Metalotecnia de la universidad.



*Figura 9. Modelo DSC TA Instruments Q200*

### **8.3.2. Preparación de muestras**

Para realizar esta prueba se han utilizado cantidades pequeñas de muestras, de 5 a 8 mg aproximadamente. Estas muestras se introducen al DSC dentro de unas cápsulas de aluminio, también llamados crisoles, y es muy importante saber el peso exacto de la muestra para después introducirlo en el ordenador.

Para ello, lo primero que hay que hacer es tarar la báscula con el crisol vacío y luego introducir la cantidad necesaria de muestra. Una vez conseguida la cantidad adecuada, se cierra el crisol con una pequeña prensa y se introduce al DSC.

En este proceso es recomendable utilizar guantes para evitar cualquier tipo de contaminación de la muestra.

Tras introducir la muestra en el DSC, el siguiente paso sería programarlo. Para ello se utiliza el ordenador que está directamente conectado al equipo, mediante el cual se introducen los parámetros deseados. El tratamiento térmico al que se somete a la muestra es el siguiente:

1. Se equilibra la temperatura a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
2. Se activa el registro de datos (Data storage On).
3. Se calienta hasta los  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .
4. Se marca el final del ciclo 0.
5. Se enfría hasta los  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .
6. Se marca el final del ciclo 1.
7. Se calienta hasta los  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .
8. Se marca el final del ciclo 2.
9. Se desactiva el registro de datos (Data storage Off).

10. Se equilibra la temperatura a 25 °C.

El ordenador registrará todos los datos y dibujará una gráfica con ellos, que más adelante analizaremos.

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

La Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) es una técnica de análisis topográfico, estructural y composicional, la cual se usa extensamente debido a sus posibilidades de resolución (hasta 2 nm), magnificación y versatilidad, que hace que sea una técnica idónea para aplicar a diversidad de muestras, ambientes y necesidades experimentales.

Un equipo SEM genera una imagen de la muestra detectando la respuesta del material a un haz de electrones, en vez de registrar fotones como hace un microscopio óptico. [27] Esta respuesta son señales emitidas por la muestra, que son registradas por diferentes detectores del aparato y que dan información sobre la estructura, la topografía y hasta de la conductividad eléctrica. Para adquirir la imagen es necesario mover el haz de electrones por toda la muestra, y esto se consigue gracias a un sistema de bobinas de barrido situadas en la columna del instrumento. [28]

### **8.4.1. Funcionamiento del equipo**

La idea básica de funcionamiento del equipo SEM es la siguiente: primero se genera un haz de electrones de alta energía, también llamados electrones primarios o incidentes, y mediante un sistema de lentes se enfoca el haz directamente en la muestra, la cual generará a su vez electrones secundarios, que serán detectados mediante dispositivos detectores.

Los equipos detectores (Everhart-Thornley y Solid State Detector) registran la cantidad de electrones detectados y lo convierten en una señal digital que se interpreta como intensidad de color, para construir la imagen.

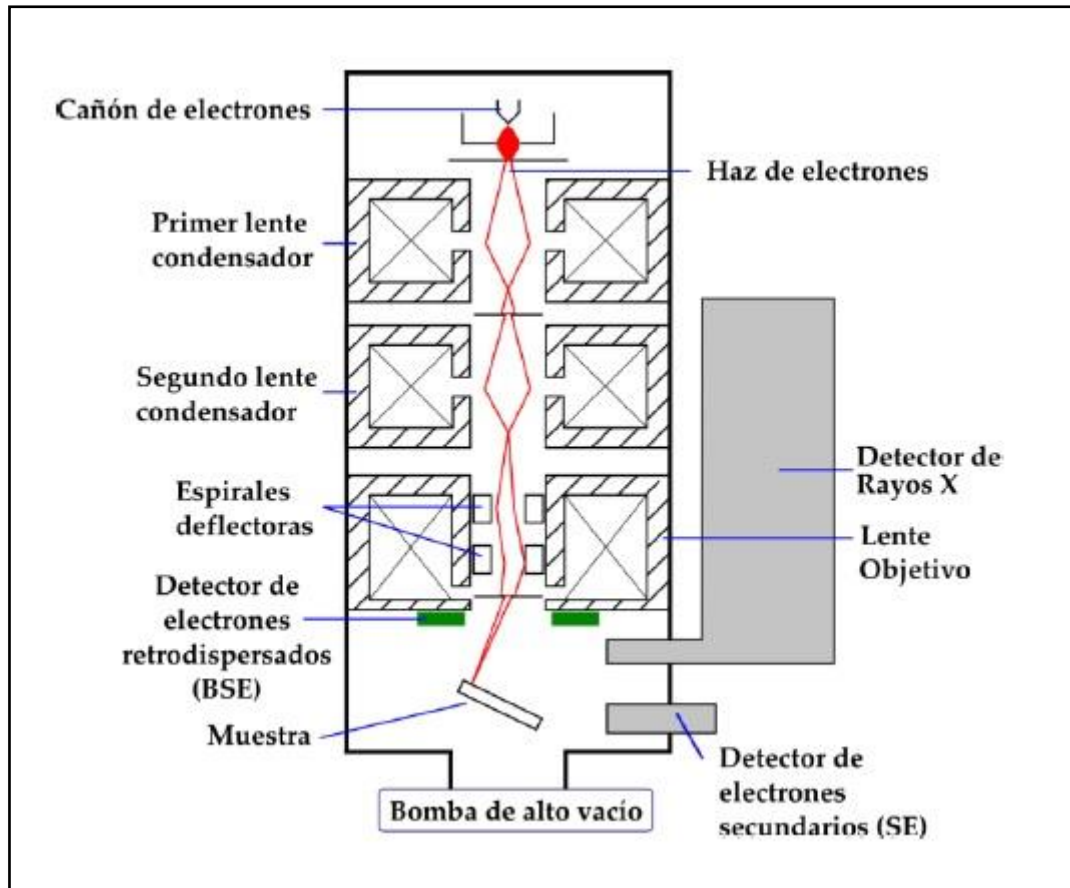


Figura 10. Esquema de un equipo SEM

Existen dos tipos de emisores para generar el haz de electrones primarios: Emisores termoiónicos o los cañones de emisión de campo (FEG). Los termoiónicos generan electrones de alta velocidad cuando se calienta un filamento metálico, generalmente de tungsteno, en cambio los FEG, funcionan cuando una punta cristalina de tungsteno recubierta de óxido de Zirconio, es sometida a un gran campo electrónico.

Una vez que el haz de electrones primario impacta con la muestra, se generan dos tipos de señal: los electrones secundarios (SE) y los electrones retrodispersados (BSE) y cada una de ellas brinda diferente información acerca de la muestra.



Los electrones SE son electrones de baja energía (10 – 50 eV) que se originan por la colisión de los electrones primarios con las primeras capas de la muestra, por lo que pueden escapar con información sobre la morfología de la misma.

En cambio, los electrones BSE son electrones que alcanzan a viajar mucho más adentro de la muestra y, aunque no choquen con ningún átomo, traen información acerca de la estructura interna, debido a que son perturbados por los campos magnéticos de los núcleos atómicos de la muestra que pueden llegar a desviarlos hasta 180°.

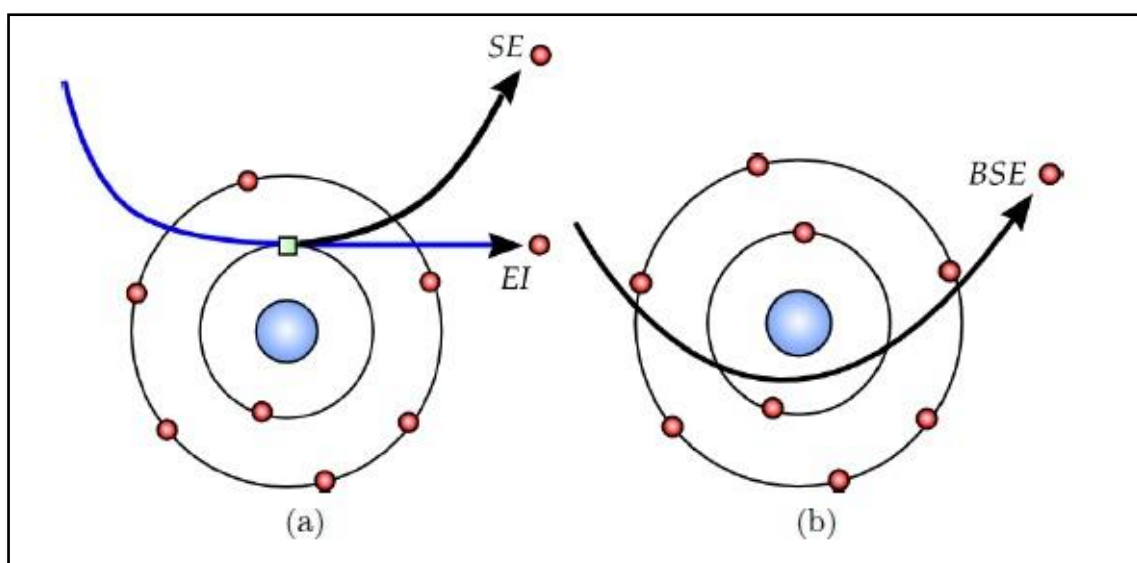


Figura 11. Generación de electrones SE (a) y electrones BSE (b)

En este proyecto se ha utilizado un SEM modelo HITACHI S-3400N perteneciente a la universidad. Antes del análisis las muestras han sido bañadas en oro en un JET Jon Sputter modelo JFC-1100 a 1200 V y 5 mA.

#### 8.4.2. Preparación de muestras

En este proyecto se han analizado un total de 10 muestras en el SEM, con el objetivo de determinar las diferencias morfológicas de muestras degradadas y muestras sin degradar.

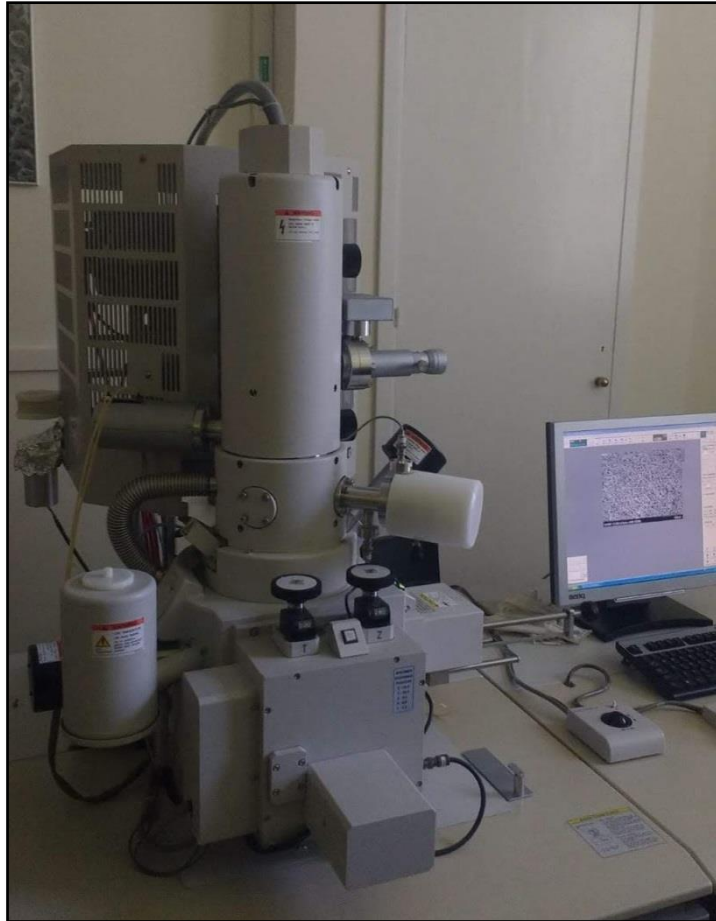
El proceso de preparación de las muestras para su análisis es el siguiente:

1. Se colocan las 10 muestras sobre tiras de grafeno conductoras adheridas al portamuestras.
2. A continuación se cubren las muestras con una capa fina de oro para que sean capaces de conducir la electricidad. Para ello se utiliza la técnica de sputtering, en vacío.



*Figura 12. Portamuestras SEM*

3. Por último, se introduce el portamuestras en el equipo y se procede a analizar las muestras.



*Figura 13. Equipo SEM*

## 8.5. DEGRADACIÓN IN VITRO

Una vez obtenidos los scaffolds, se ha procedido a realizar la degradación in vitro. En concreto se han puesto a degradar 60 muestras, es decir, tres muestras de cada scaffold por cada periodo de degradación de 4, 12, 20 y 24 semanas. Para la realización de la degradación in vitro de los scaffolds se han seguidos los siguientes pasos:

1. En primer lugar se han cortado las muestras con una forma rectangular de unos 5x10 mm y con un peso de entre 15 y 25 mg. A continuación se han pesado para obtener el peso inicial "W0"
2. En segundo lugar, se han introducido todas y cada una de ellas en un tubo de ensayo con 10 mL de solución salina de fosfato (PBS), con un pH promedio de 7,2.
3. Por último, se han introducido todos los tubos de ensayo en la estufa termostaticada a 37 °C, es decir, la temperatura corporal media de una persona.

Una vez transcurrido el tiempo de degradación, se procede a sacar las muestras de los tubos de ensayo y a retirarles el agua superficial con un papel para poder obtener el peso húmedo "Wh". Además, se vacía el PBS en un recipiente, para poder medir el pH final del mismo. Para ello se utiliza el medidor de pH que se muestra a continuación en la imagen, introduciendo el medidor de temperatura dentro de la estufa para que el pH sea medido a temperatura corporal.



*Figura 14. Medidor de pH*

Una vez obtenidos el pH final y el peso húmedo se vuelven a introducir las muestras en la estufa para dejarlas secar por completo, durante una semana aproximadamente.

La variación del pH será la diferencia entre el pH inicial (7,2 en todos los casos) y el pH final.

Cuando las muestras se encuentran totalmente secas, es decir, después de pesarlas durante varios días seguidos y no variar su peso, se obtiene el peso seco "Ws".

Con todos los datos ya obtenidos, se puede calcular la el porcentaje de agua absorbida y la cantidad de masa perdida. Para ello se utilizan las siguientes fórmulas:

- Porcentaje de PBS absorbido →

$$\%PBS_{abs} = \frac{W_h - W_0}{W_0} * 100$$

- Porcentaje de peso perdido →

$$\%W = \frac{W_0 - W_s}{W_0} * 100$$

## **9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 9.1. DEGRADACIÓN IN VITRO

La degradación del PLLA ocurre en dos etapas diferentes. Durante la primera etapa, la degradación ocurre en la zona amorfa del andamio, dando lugar a una difusión del agua, y una vez degradadas todas las zonas amorfas comienza la segunda etapa, en la cual tiene lugar la degradación de las zonas cristalinas. [29]

Generalmente, la degradación ocurre de forma heterogénea, ya que, primeramente se degrada el centro y posteriormente la superficie. Esto es debido a que las macromoléculas de las regiones amorfas tienen más libertad de movimiento, por lo que son más vulnerables al ataque de las moléculas de agua, acelerando su degradación. [30]

Durante la degradación la acidez interna del scaffold tiende a aumentar, es decir, el número de pH disminuye, además de reducir su masa molecular. Todo esto dependerá de la morfología del mismo, la porosidad, la cristalinidad y la hidrofobicidad. [31]

A lo largo de todo el proceso de degradación se han ido recogiendo y anotando diferentes datos, para posteriormente elaborar una serie de gráficas, con el fin de poder comparar los datos entre los diferentes tipos de scaffold, y entender mejor el proceso de degradación de cada uno de ellos. Estas gráficas muestran la diferencia de pH, el porcentaje de PBS absorbido y la masa perdida, en función de las semanas de degradación.



### 9.1.1. Gráfica pH/semanas de degradación

A continuación se muestra la gráfica que relaciona la variación del pH a lo largo de las semanas de degradación.

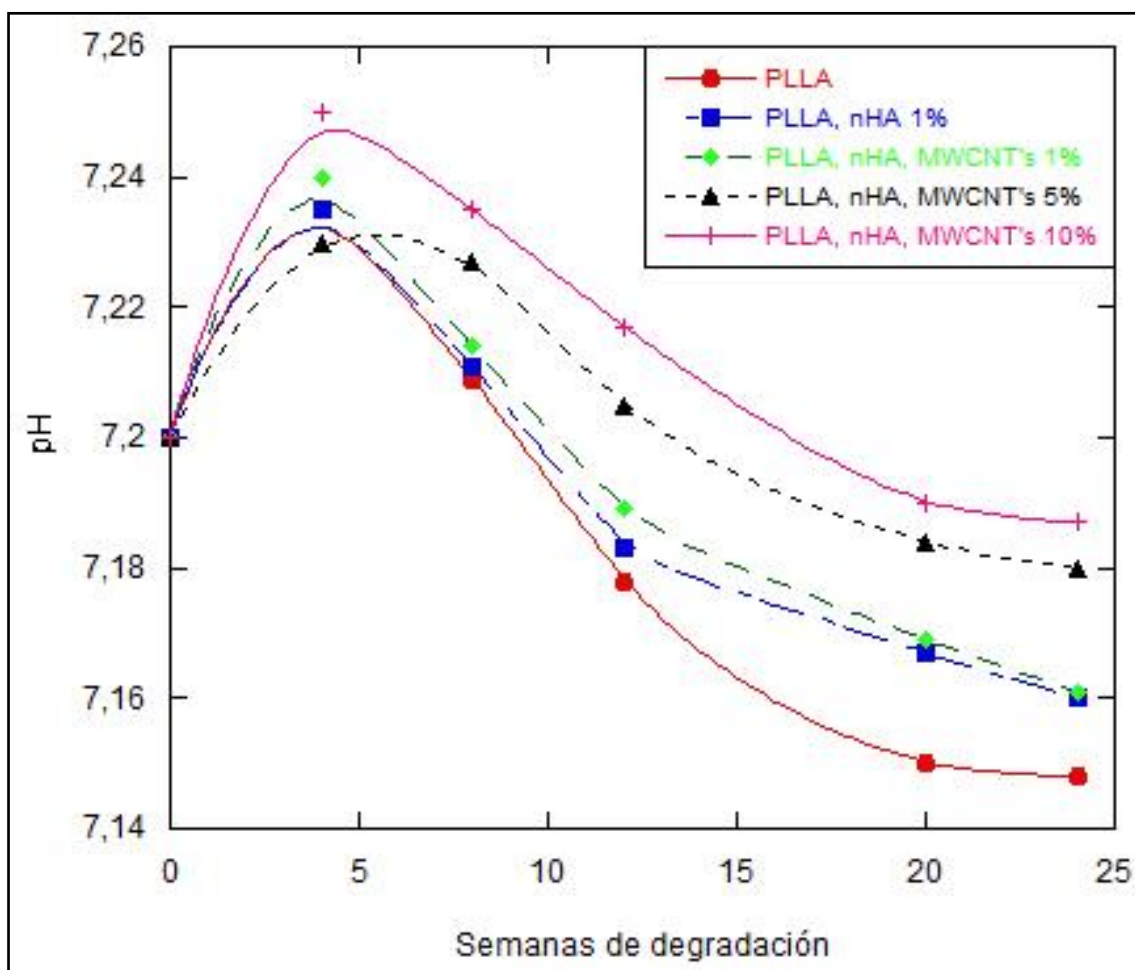


Figura 15. Gráfica pH/semanas de degradación

Todas las muestras estudiadas aumentan su pH hasta la quinta semana de degradación y a partir de este momento comienza a disminuir el pH hasta la semana 25. Las muestras que contienen MWCNTs son las que tienen un pH más parecido al inicial del PBS, el cuál va disminuyendo cuando lo hace su composición en nanotubos.

Parece que los MWCNTs actúan como un modulador del pH y por lo tanto, puede prevenir los procesos típicos derivados de un pH ácido.

### 9.1.2 Gráfica %PBS absorbido/Semanas de degradación

A lo largo del proceso de degradación las muestras han ido absorbiendo parte del PBS en el que estaban sumergidas. A continuación se muestra la gráfica que relaciona el porcentaje de la solución absorbida con las semanas de degradación.

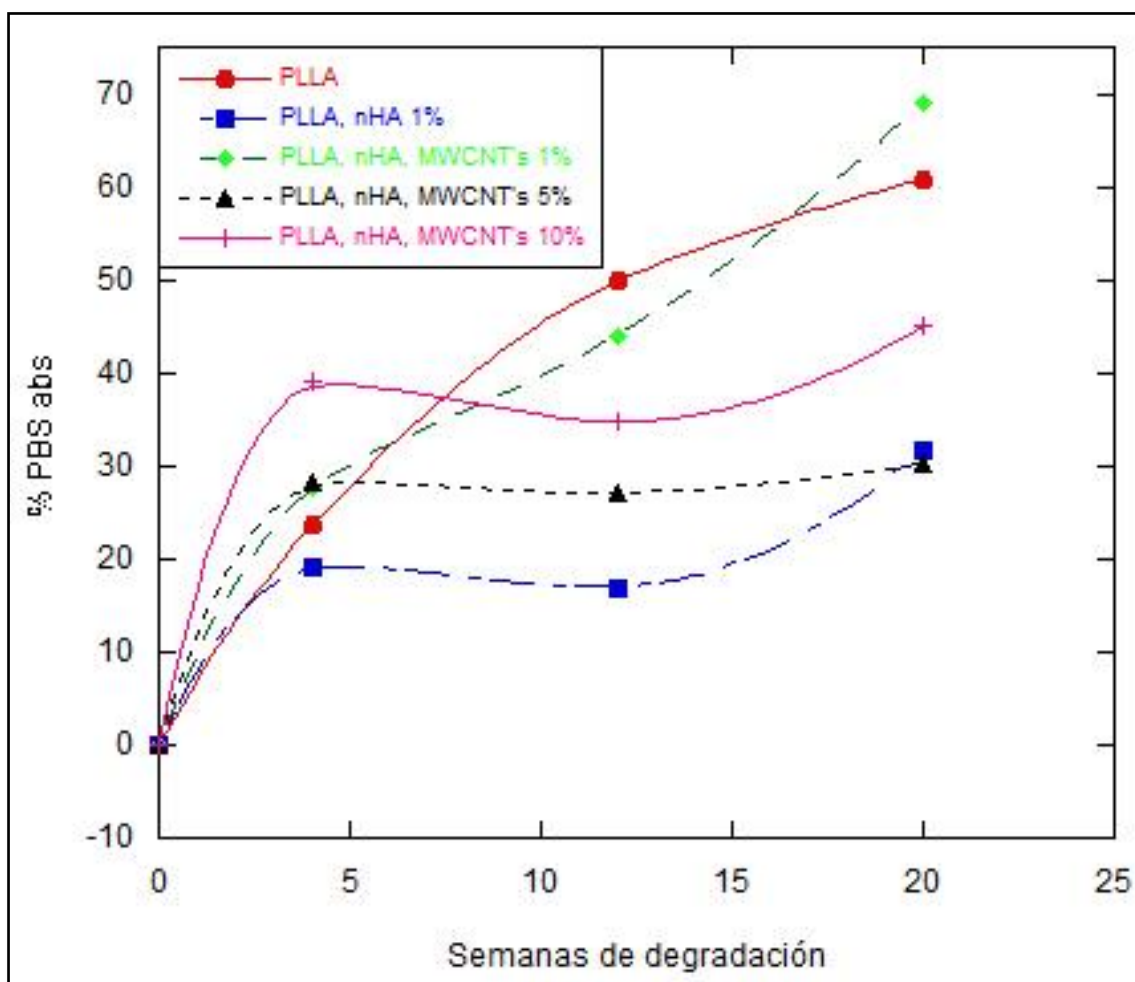


Figura 15. Gráfica %PBS absorbido/Semanas de degradación

Como se puede observar en la gráfica, hasta casi la semana 5 la absorción ocurre de manera rápida, situándose en valores más altos aquellas muestras

que contienen MWCNTs. A partir de la quinta semana, la absorción se estabiliza y ocurre de forma más lenta. Esto es debido a la disolución de los productos de degradación, los cuales introducen partículas de nHA en el interior del scaffold y se forman soluciones alcalinas que actúan como barrera física impidiendo la entrada de PBS.

Las muestras que menos PBS absorben son las que tienen únicamente nHA, lo cual nos indica que la nanohidroxiapatita también puede actuar como barrera física impidiendo parte de la absorción del mismo, ya que, a mayor contenido de nHA menor es el tamaño del poro.

### 9.1.3. Gráfica %Peso perdido/Semanas de degradación

A lo largo del estudio se ha observado cómo el peso de los andamios ha variado en comparación al inicial. A continuación, se muestra la gráfica que relaciona el porcentaje de peso perdido con las semanas de degradación.

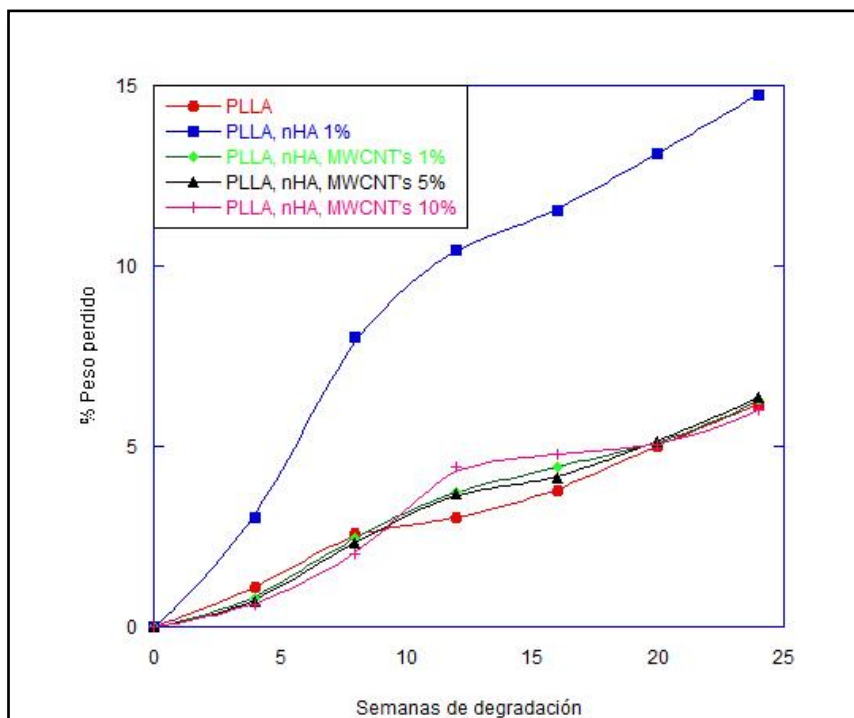


Figura 17. Gráfica %Peso perdido/Semanas de degradación

Como podemos observar en la gráfica, todas las muestras tienen una pérdida de masa de aproximadamente 5,5% a excepción de la muestra de PLLA/nHA 1% que tiene un 15%.

Parece que las partículas de nHA solas aceleran el proceso de degradación, aunque si se compara con la gráfica de PBS absorbido se observa que, curiosamente, la muestra que menos ha absorbido es la de nHA 1%. Esto es, como he mencionado antes, debido a la morfología del scaffold, ya que, tiene una estructura más compacta y los productos ácidos resultantes de la degradación tienen dificultades para salir al exterior, por lo tanto provocan una reacción autocatalítica dando lugar a una mayor degradación.

## 9.2. DSC

Mediante el DSC se ha realizado el estudio de muestras sin degradar y muestras con una degradación de 12 semanas. Los termogramas obtenidos se han analizado con el programa TA Universal Analysis. A continuación se muestra una tabla que recoge los datos obtenidos.

	<b>Tg (°C)</b>	<b>Tc (°C)</b>	<b>ΔHc (J/g)</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>ΔHm (J/g)</b>
PLLA	63,44	126,21	39,45	179,04	52,42
PLLA (12 sem.)	62,90	127,58	41,34	174,39	49,84
PLLA, nHA 1% wt	64,55	133,72	36,97	180,96	47,43
PLLA, nHA 1% (12 sem.)	62,97	119,97	34,76	176,49	43,60
PLLA, nHA, MWCNTs 1%	63,42	106,31	3,686	177,94	18,04
PLLA, nHA, MWCNTs 1% (12 sem.)	62,46	117,62	11,32	178,40	34,75
PLLA, nHA, MWCNTs 5%	62,95	119,87	29,47	177,86	47,59
PLLA, nHA, MWCNTs 5% (12 sem.)	63,54	110,51	15,74	179,74	34,59
PLLA, nHA, MWCNTs 10%	63,83	109,78	19,61	179,35	48,23
PLLA, nHA, MWCNTs 10% (12 sem.)	62,95	109,54	0,9967	174,52	7,629

Tabla 3. Datos del DSC

Siendo:

**T<sub>g</sub>** → Temperatura de transición vítrea.

**T<sub>c</sub>** → Temperatura pico de cristalización.

**ΔH<sub>c</sub>** → Entalpía de cristalización.

**T<sub>m</sub>** → Temperatura pico de fusión.

**ΔH<sub>m</sub>** → Entalpía de fusión.

La temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) es la temperatura a la que el polímero disminuye su ductilidad, dureza, rigidez y porcentaje de elongación. En nuestro caso, como se puede apreciar en la tabla 3, no hay apenas variación en su valor, se puede considerar un error en la medición la pequeña oscilación que sufre.

La temperatura de cristalización (T<sub>c</sub>) aumenta con la composición de nHA y al añadir MWCNT's comienza a disminuir de 126,21 para el PLLA, a 109,54 para el PLLA con nHA y nanotubos, lo cual implica que la cristalización tiene lugar a temperaturas más bajas cuando se añaden nanotubos.

La entalpía de cristalización disminuye con la adición de nanotubos, los cuales dificultan el proceso de cristalización y no actúan como agentes nucleantes de la cristalización, incluso cuando avanza el proceso de degradación.

### 9.2.1. Termogramas

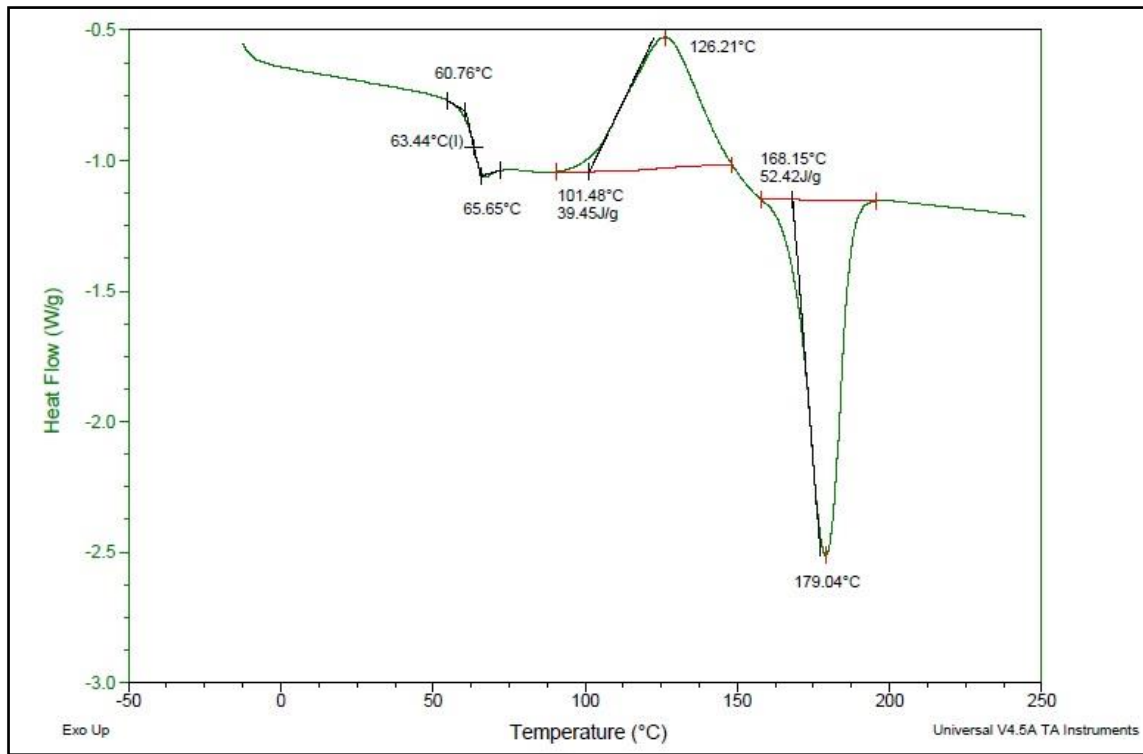


Figura 18. Termograma PLLA

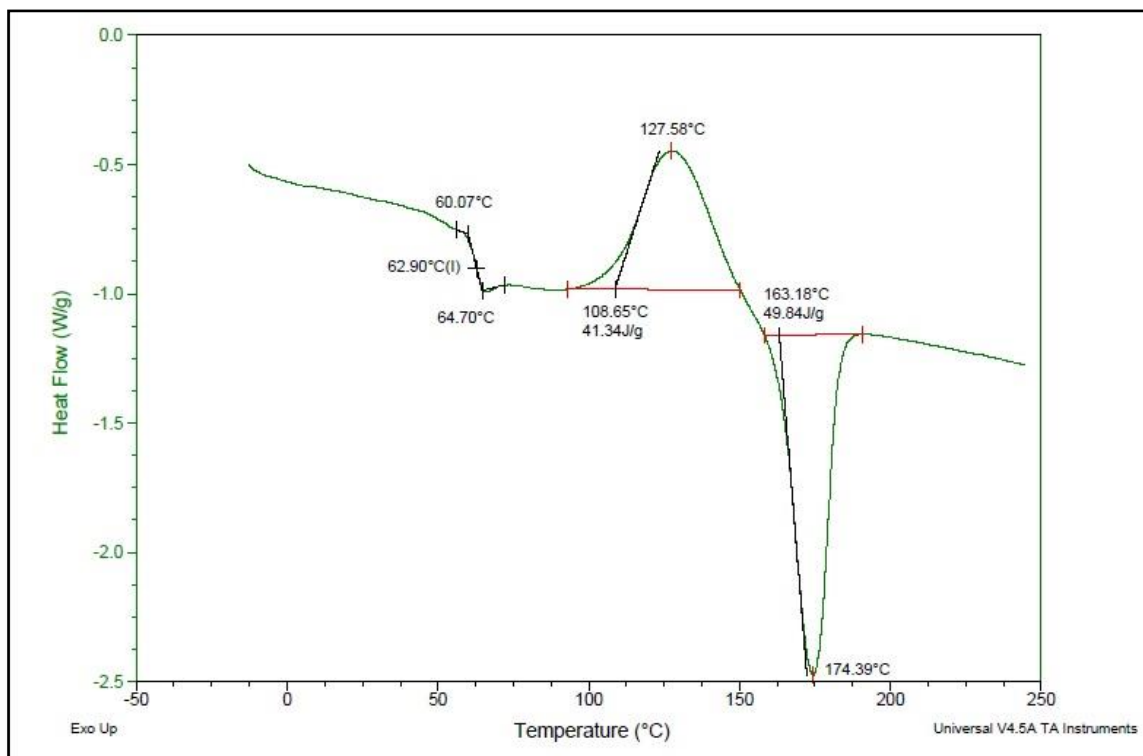


Figura 19. Termograma PLLA (semana 12)

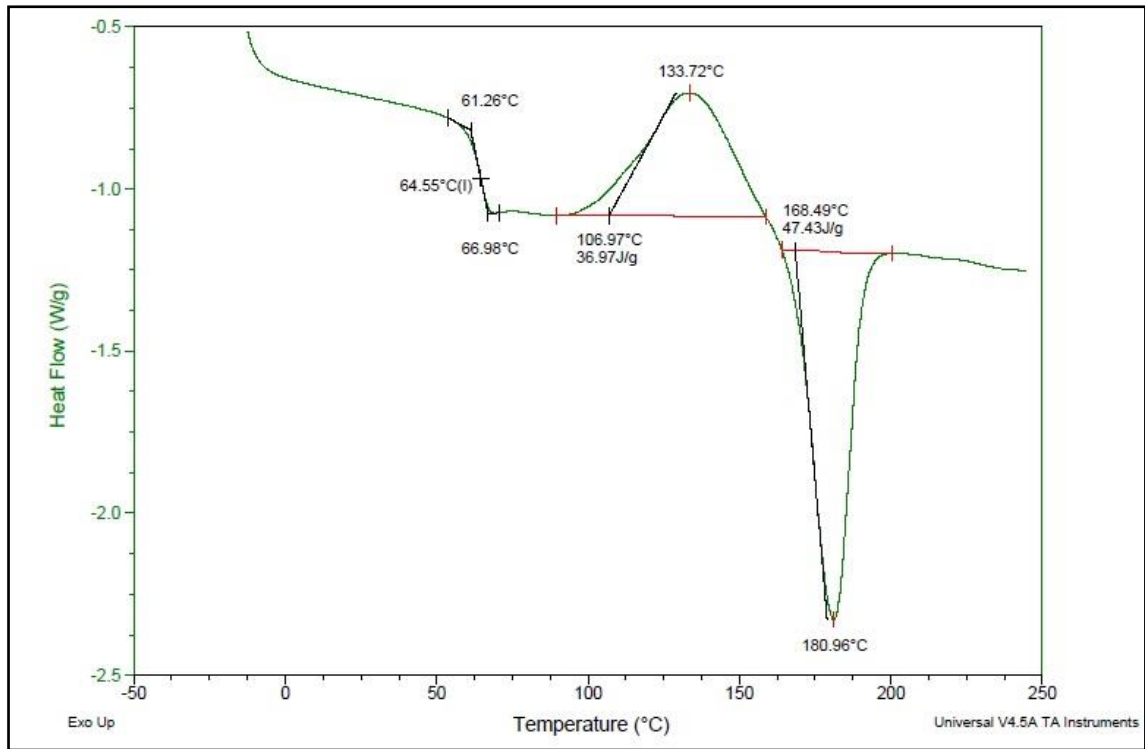


Figura 20. Termograma PLLA/nHA 1%

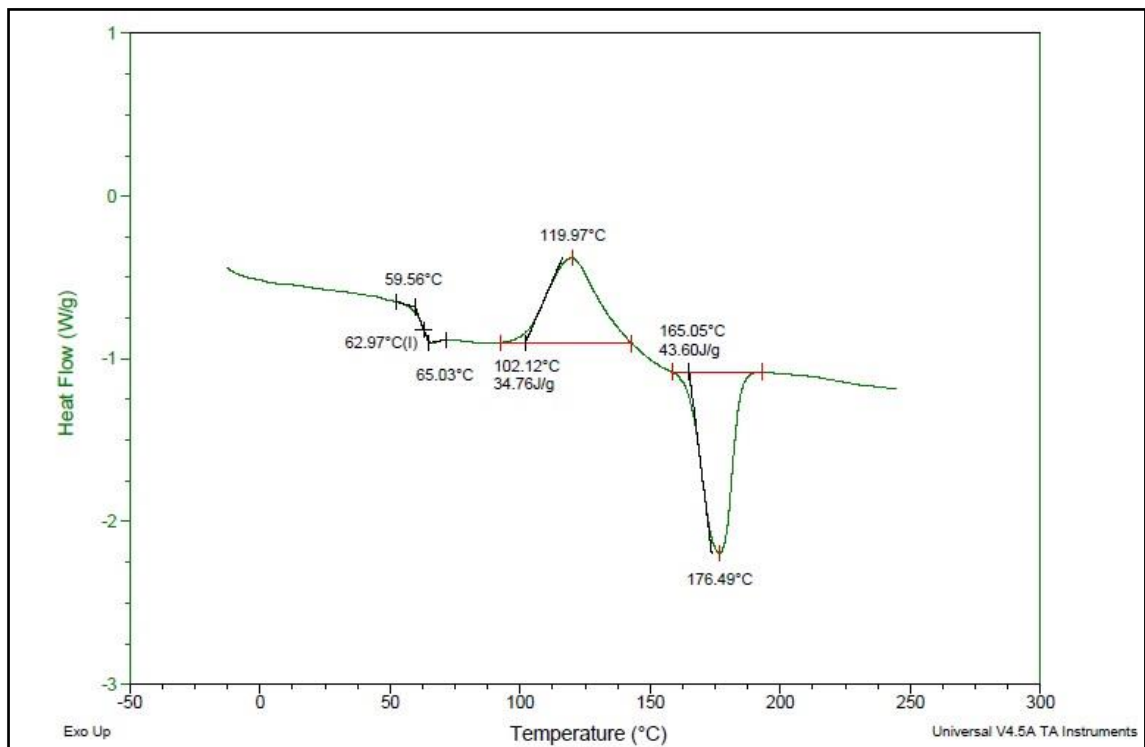


Figura 21. Termograma PLLA/nHA 1% (semana 12)



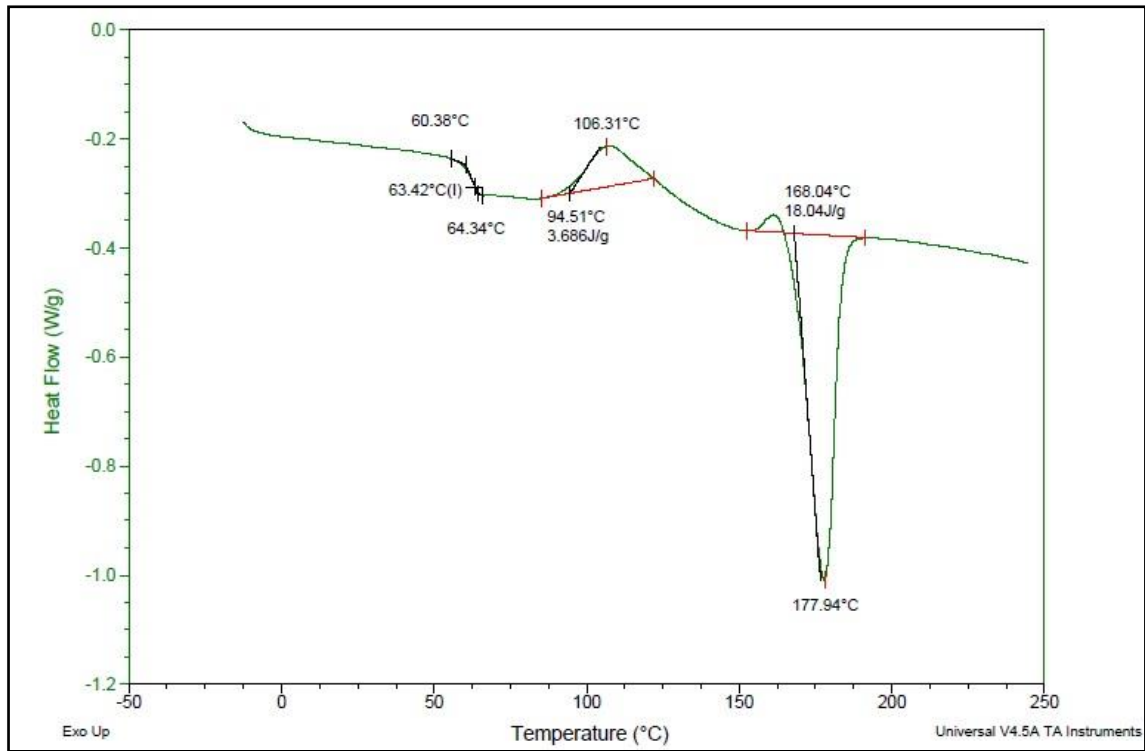


Figura 22. Termograma PLLA/nHAMWCNT's 1%

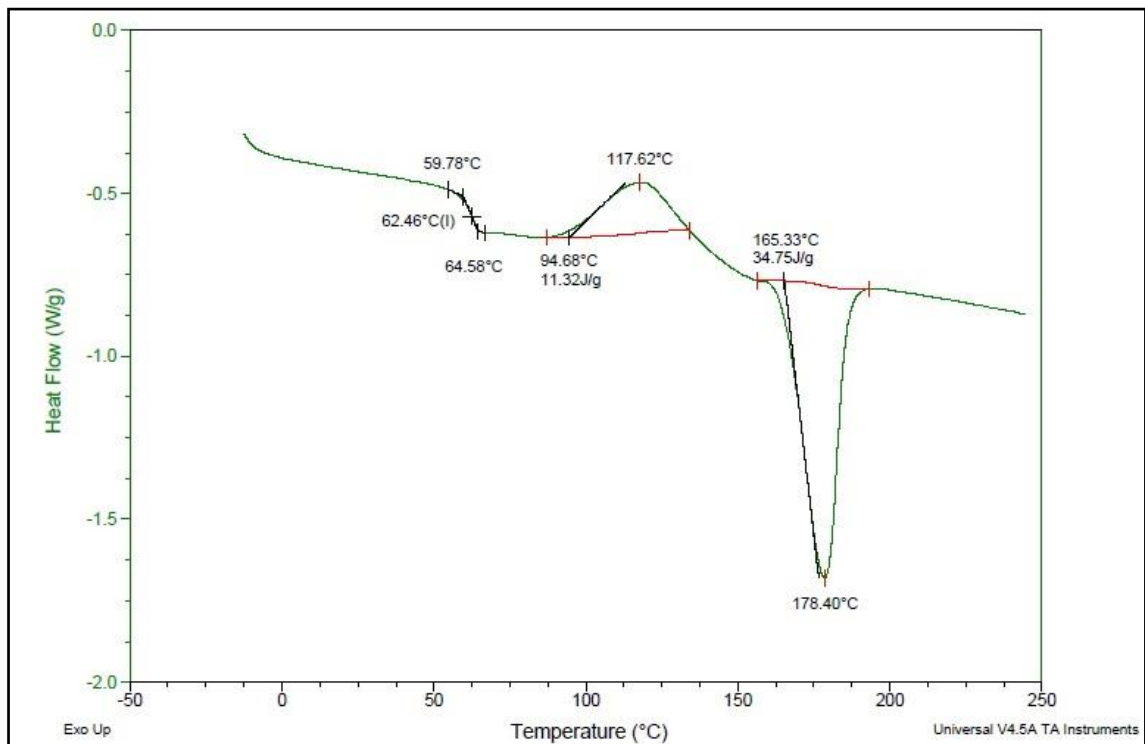


Figura 23. Termograma PLLA/nHAMWCNT's 1% (semana 12)

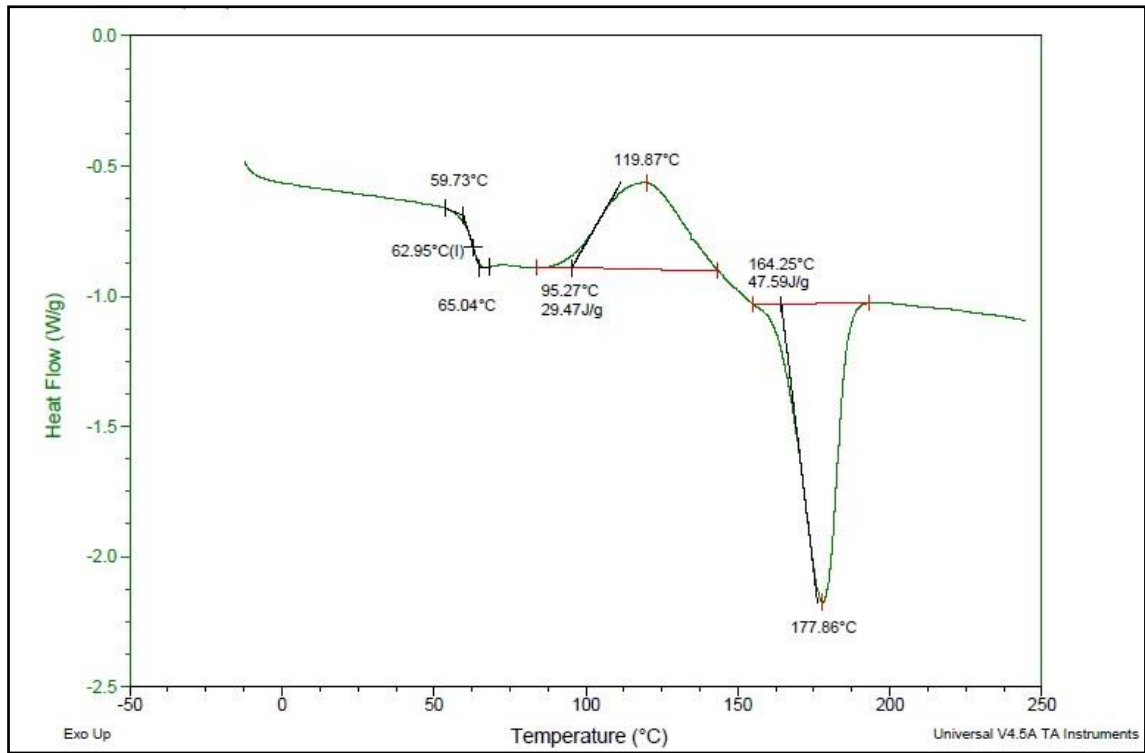


Figura 24. Termograma PLLA/nHAMWCNT's 5%

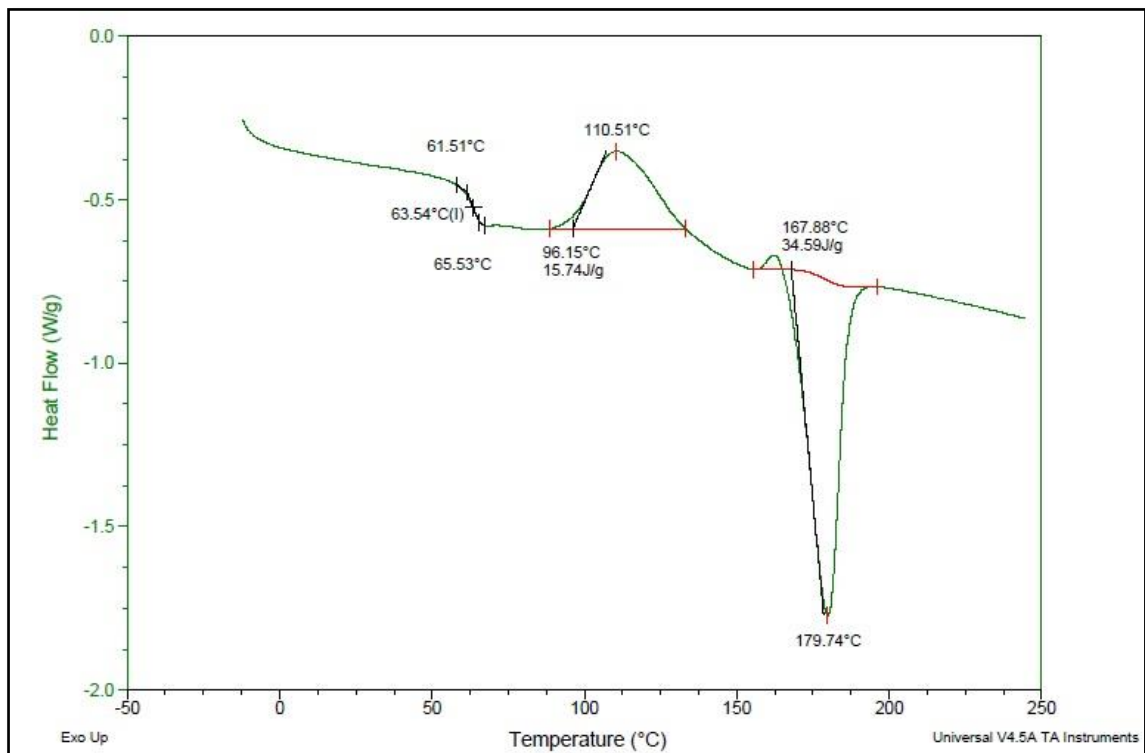


Figura 25. Termograma PLLA/nHAMWCNT's 5% (semana 12)

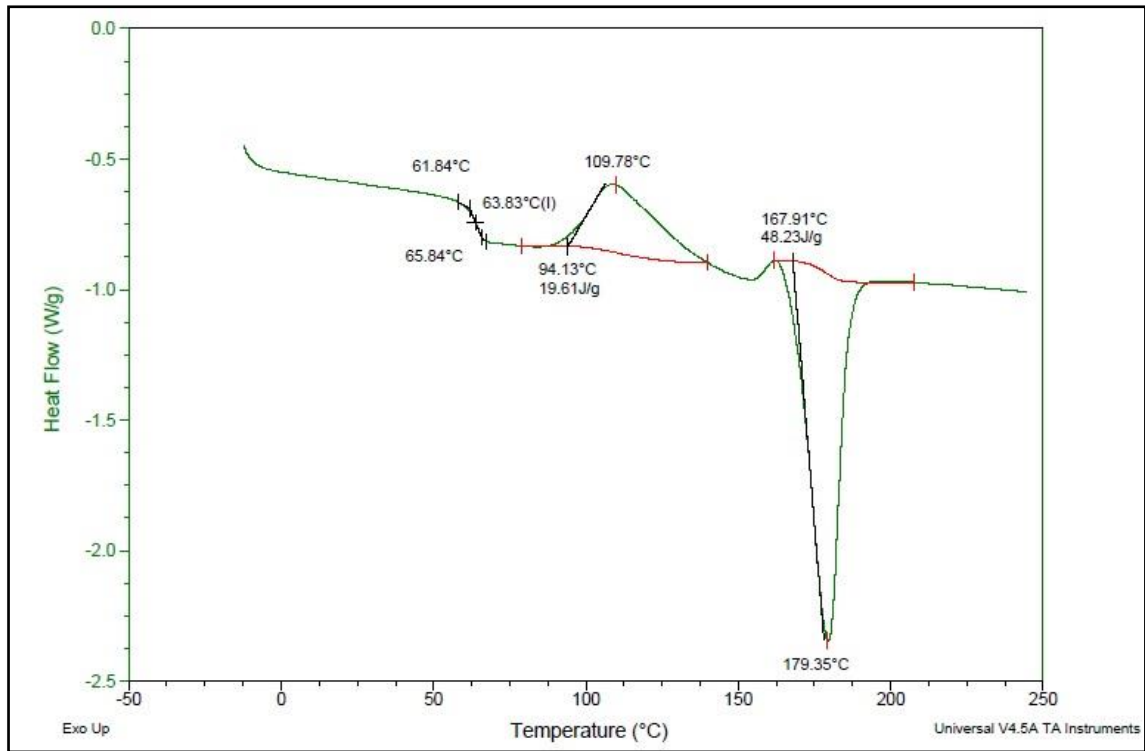


Figura 26. Termograma PLLA/nHA/MWCNT's 10%

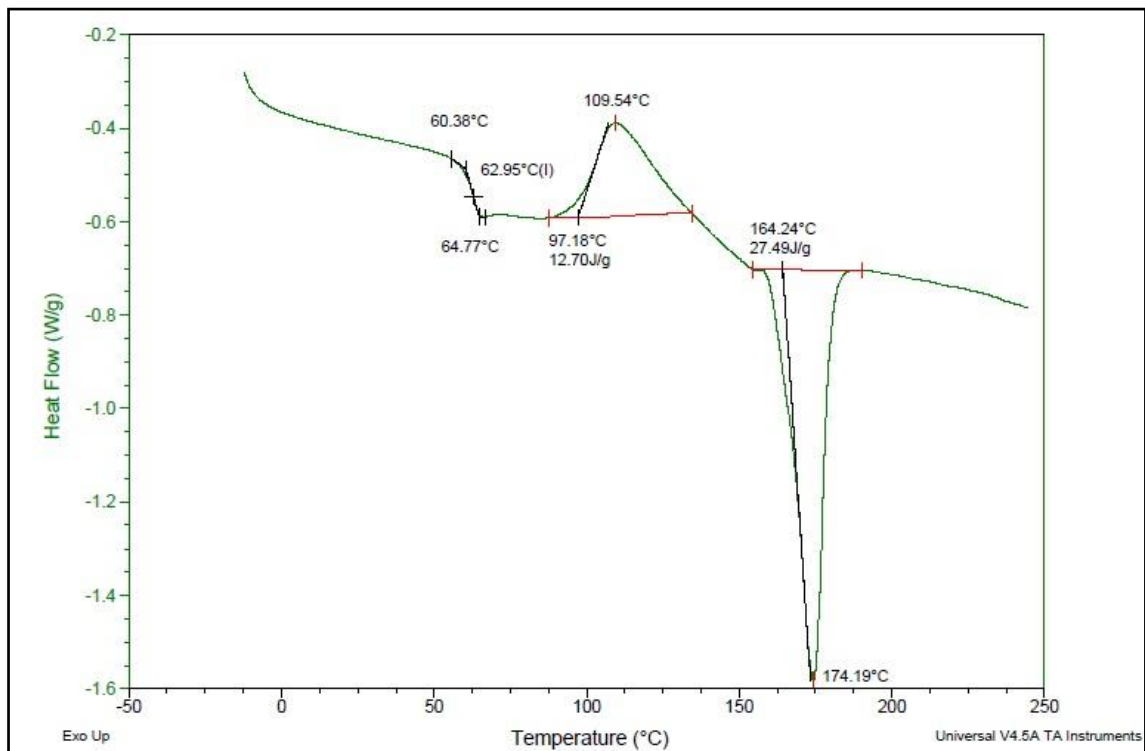


Figura 27. Termograma PLLA/nHA/MWCNT's 10% (semana 12)

### 9.3. SEM

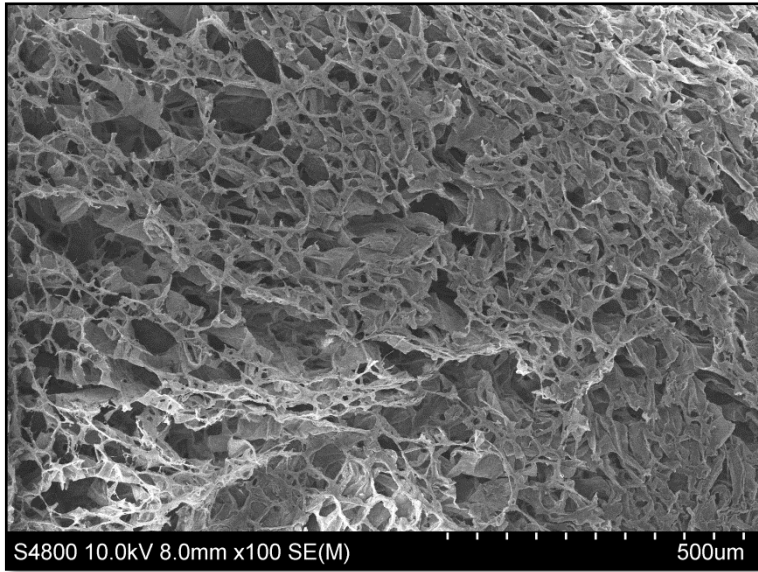
A continuación se muestran las micrografías del PLLA, PLLA/nHA, y PLLA/nHA/MWCNT's antes y después de 24 semanas de degradación. Como podemos ver el PLLA preparado por SEM presenta una alta porosidad y un tamaño de poro del orden de 100  $\mu\text{m}$ . Aunque con el proceso de degradación se mantiene la porosidad, el tamaño del poro disminuye a 20  $\mu\text{m}$  y se engrosan las paredes.

La adición de nHA al PLLA (Figuras 27 a 30) disminuye el tamaño del poro y provoca una morfología más compacta, que con la degradación da lugar a más poros con mayor abertura.

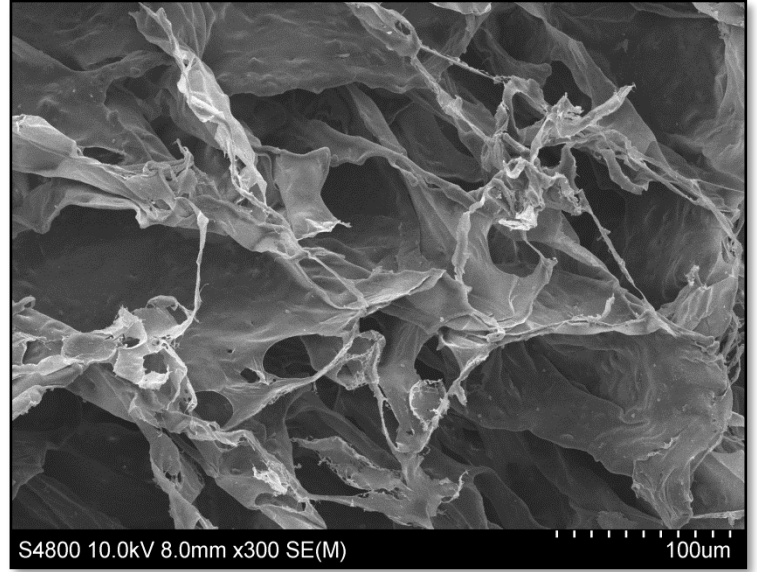
La adición de 1% de nanotubos (Figuras 31 a 34) induce una distribución de los poros menos ordenada, aunque con gran porosidad.

La introducción de un 5% de nanotubos parece ser la composición ideal, pues se observa un estructura muy ordenada y homogénea, sin embargo, cuando los scaffolds tienen un 10% de nanotubos el aspecto es muy esponjoso, como si fuera algodón.

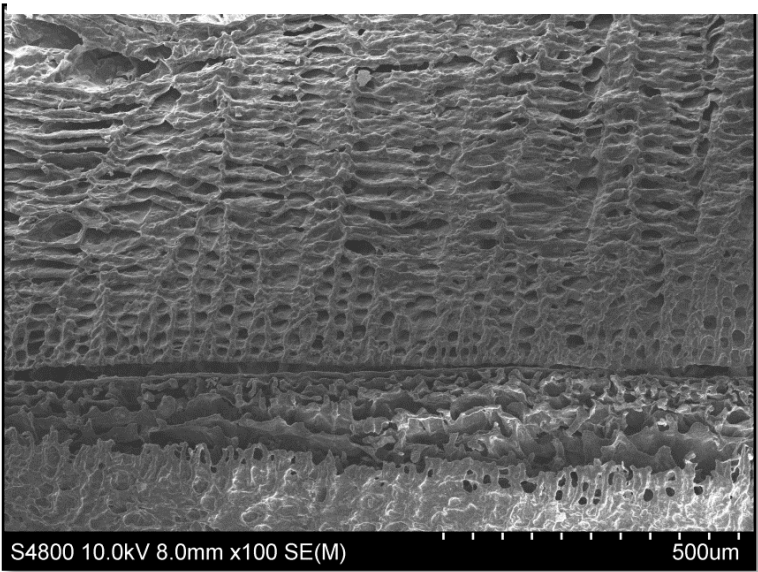
La degradación en las muestras con nanotubos se acelera y presentan una morfología muy irregular.



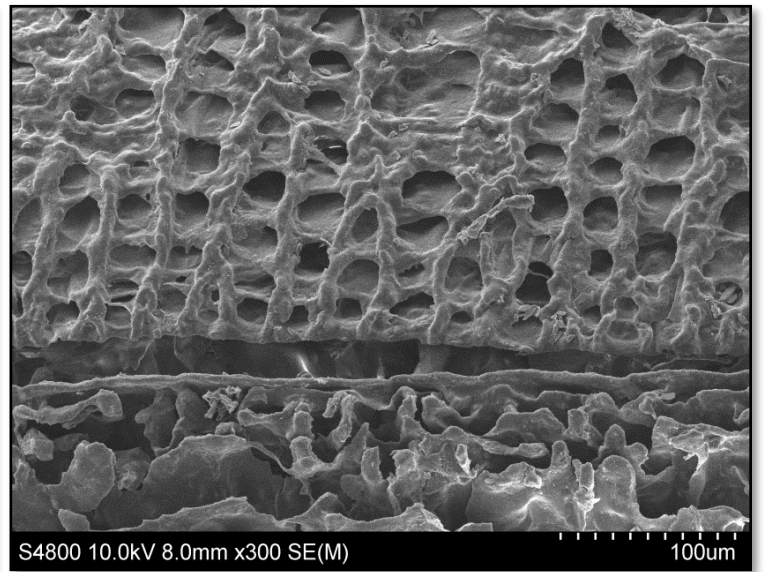
*Figura 28. PLLA x100*



*Figura 29. PLLA x300*



*Figura 30. PLLA 24 semanas x100*



*Figura 31. PLLA 24 semanas x300*

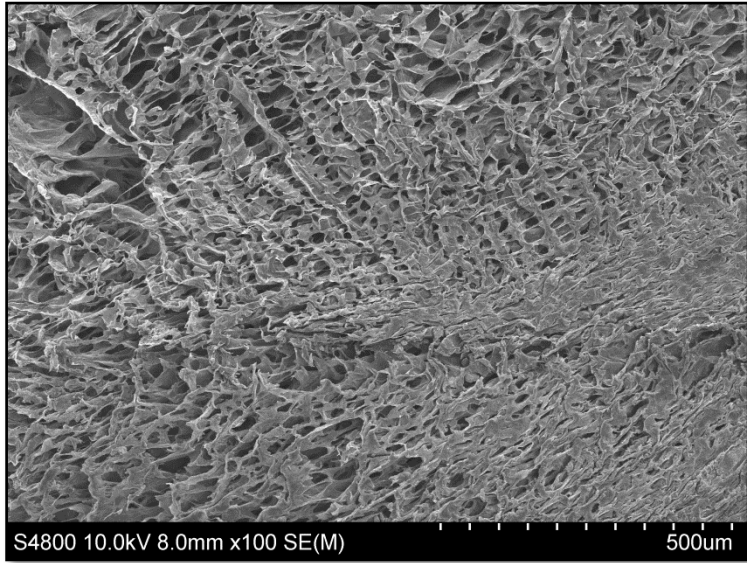


Figura 32. PLLA/nHA 1% x100

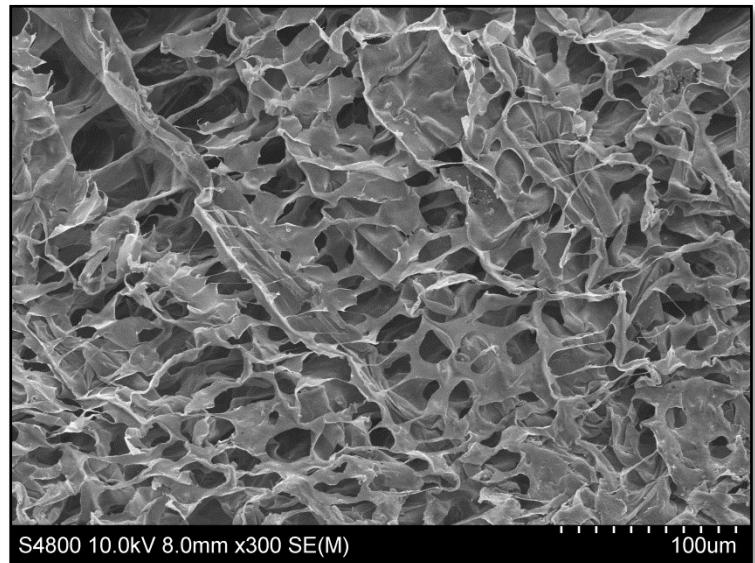


Figura 33. PLLA/nHA 1% x300

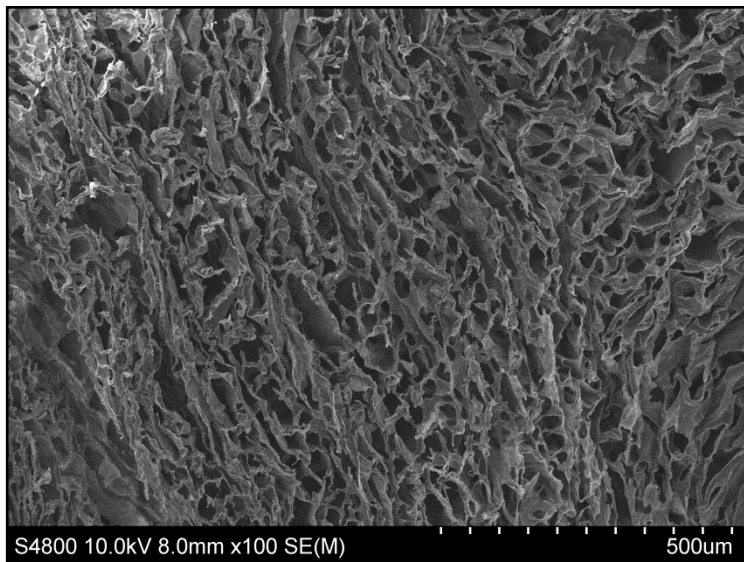


Figura 34. PLLA/nHA 1% 24 semanas x100

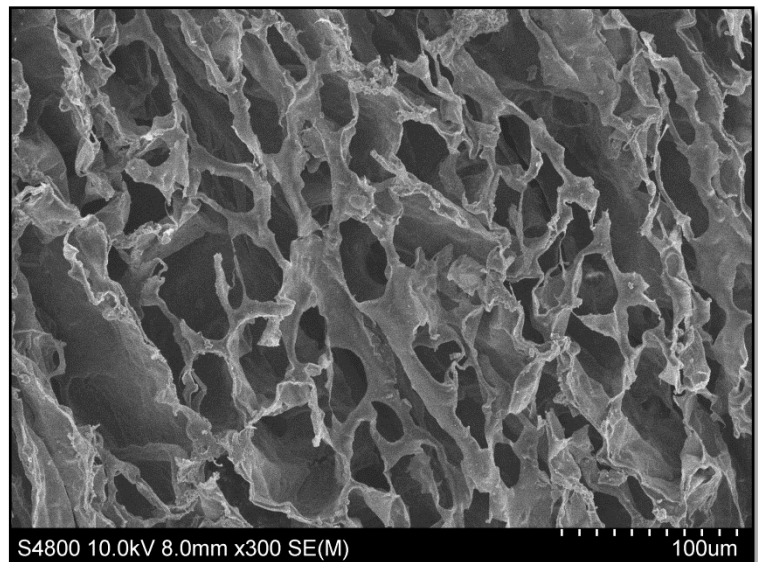


Figura 35. PLLA/nHA 1% 24 semanas x300

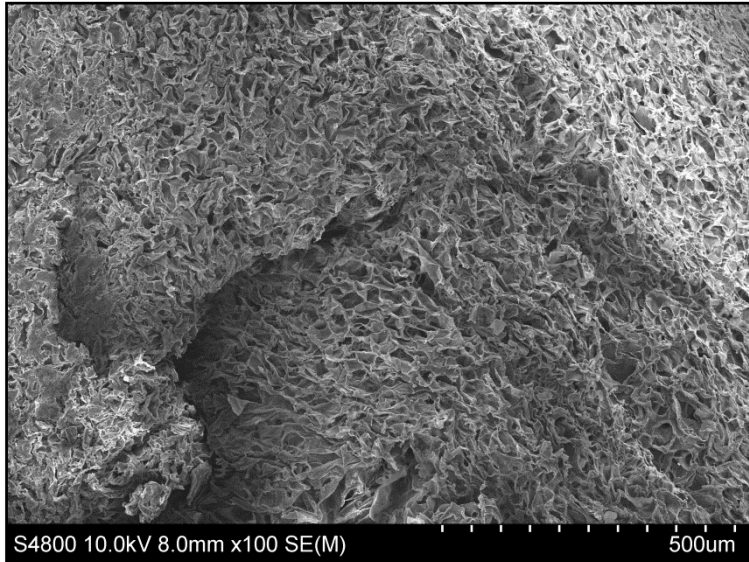


Figura 36. PLLA/nHA/CNT 1% x100

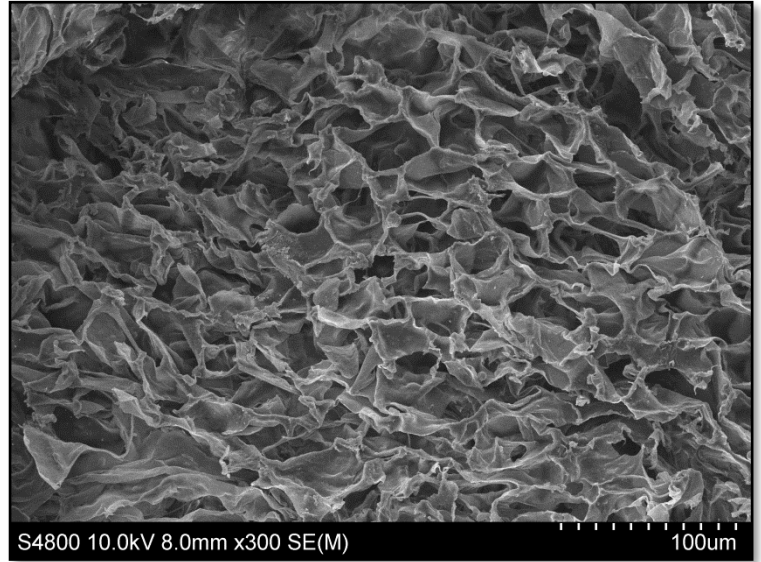


Figura 37. PLLA/nHA/CNT 1% x300

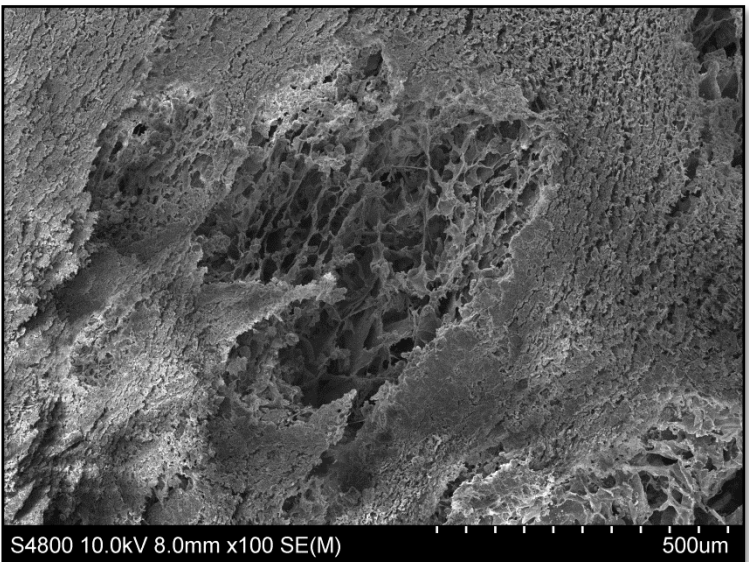


Figura 38. PLLA/nHA/CNT 1% 24 semanas x100

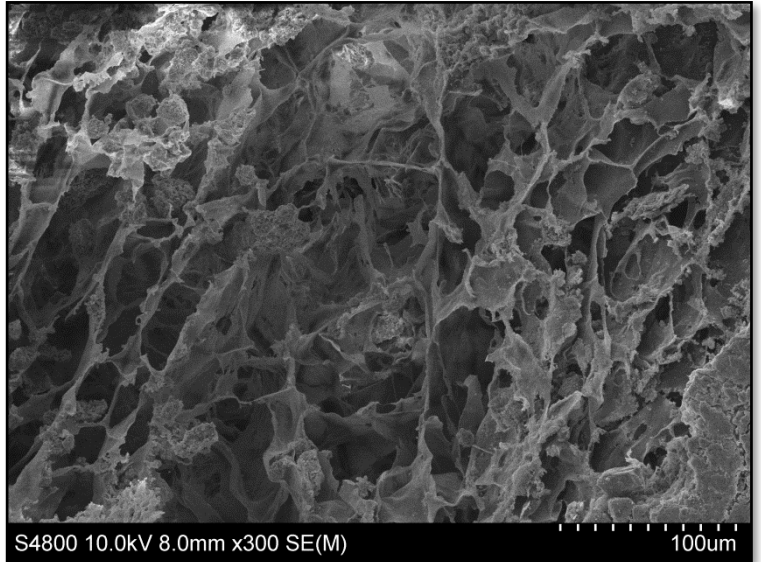


Figura 39. PLLA/nHA/CNT 1% 24 semanas x300

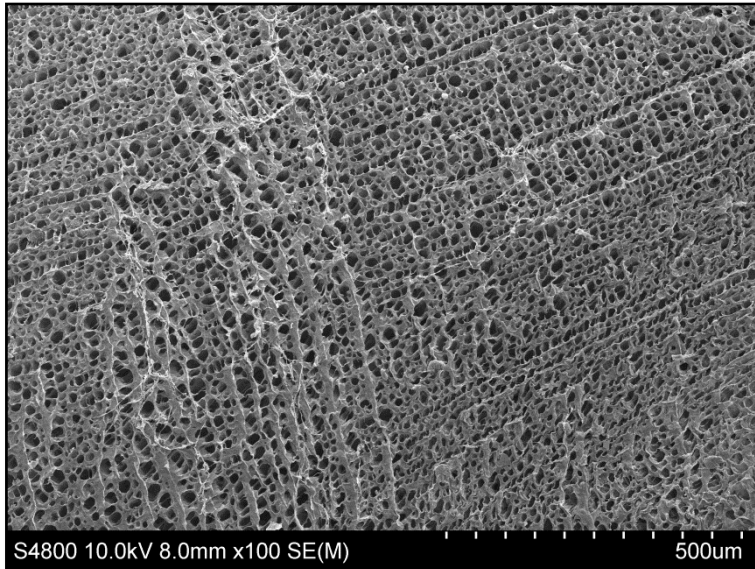


Figura 40. PLLA/nHA/CNT 5% x100

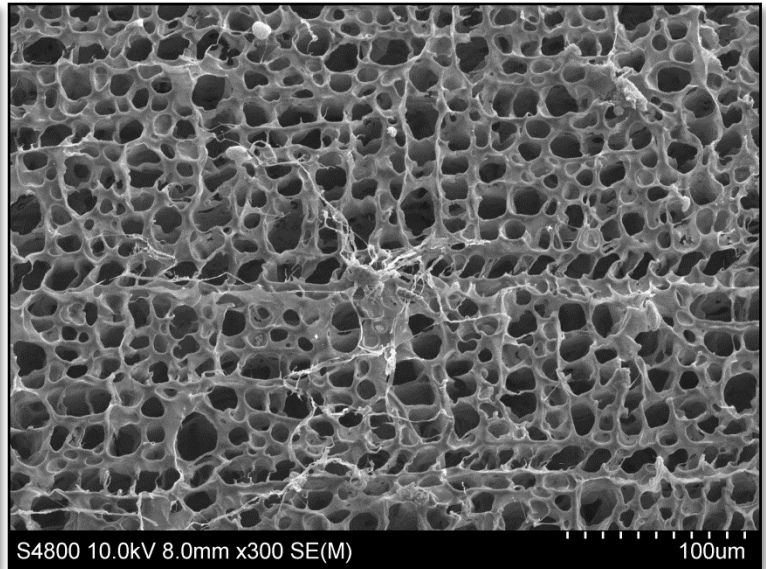


Figura 41. PLLA/nHA/CNT 5% x300

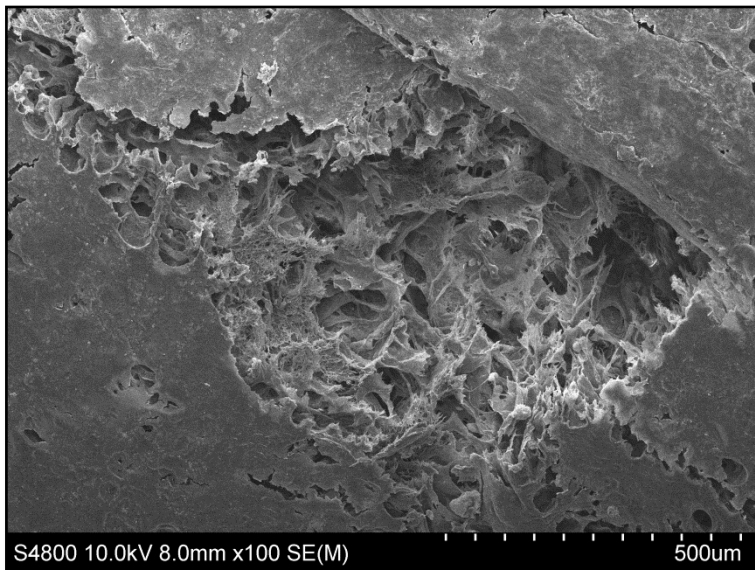


Figura 42. PLLA/nHA/CNT 5% 24 semanas x100

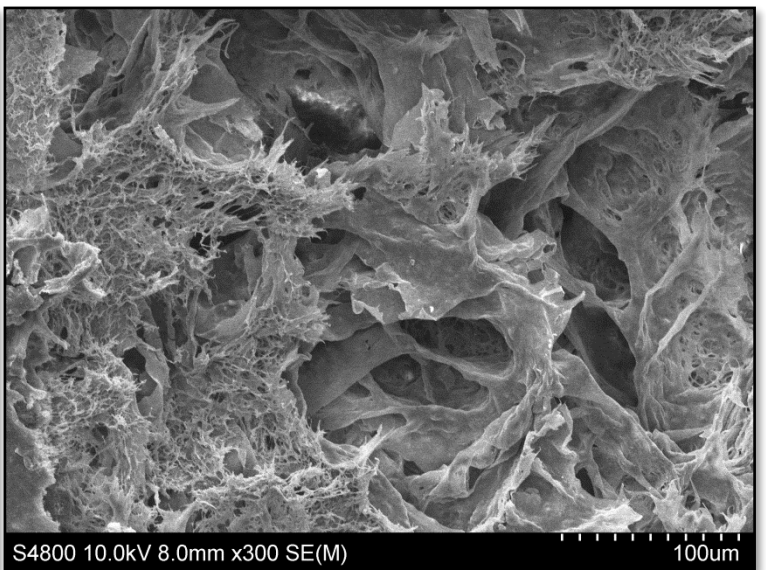


Figura 43. PLLA/nHA/CNT 5% 24 semanas x300



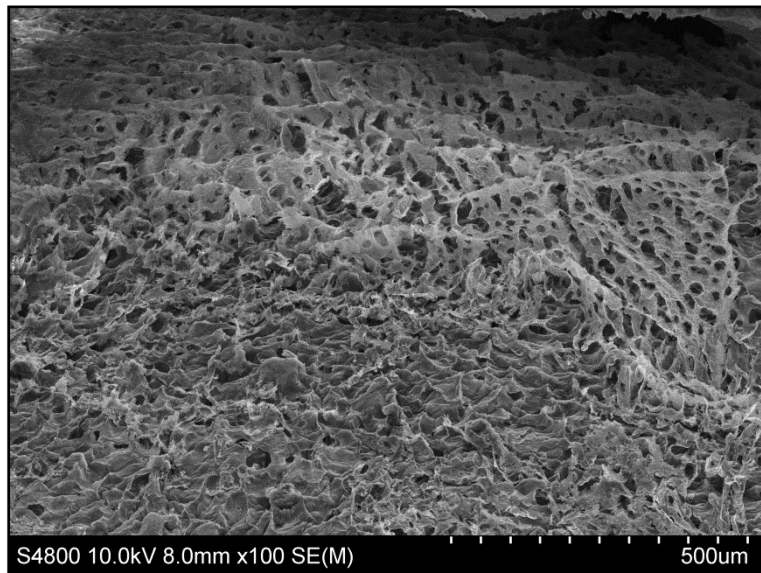


Figura 44. PLLA/nHA/CNT 10% x100

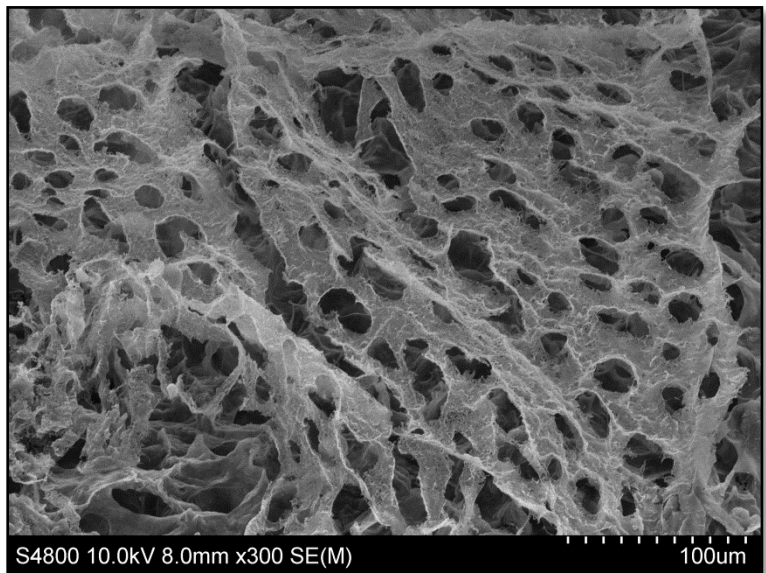


Figura 45. PLLA/nHA/CNT 10% x300

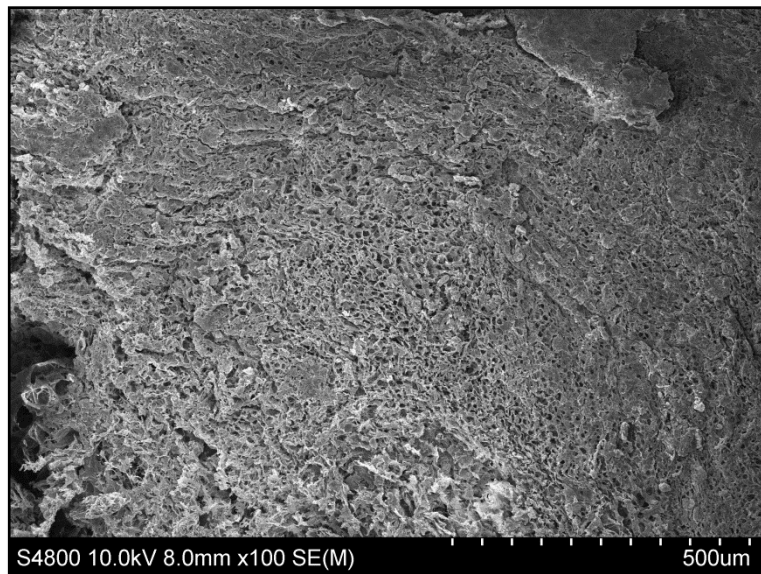


Figura 46. PLLA/nHA/CNT 10% 24 semanas x100

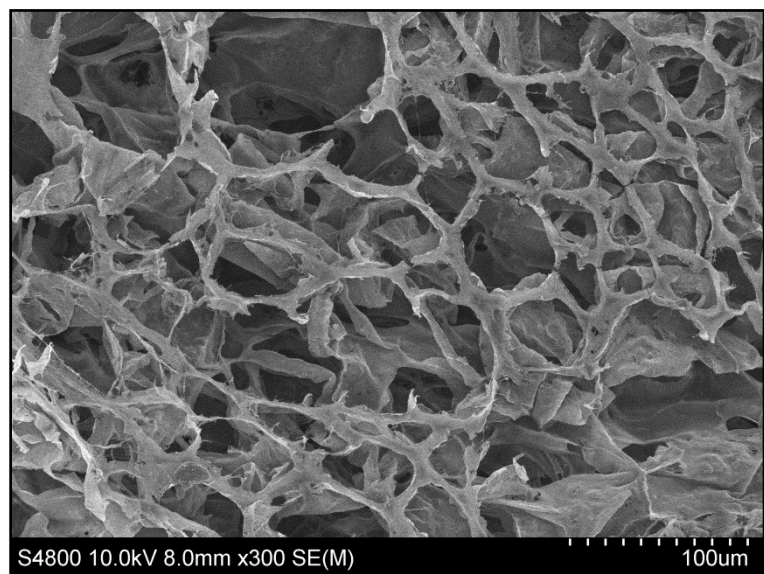


Figura 47. PLLA/nHA/CNT 10% 24 semanas x300

## **10. CONCLUSIONES**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a lo largo del estudio podemos concluir que:

- La adición de partículas de nHA al PLLA, además de acelerar el proceso de degradación, genera andamios con una morfología más compacta, reduciendo así la cantidad de PBS absorbido.
- Con la adición de nanotubos de carbono se consigue una estructura más ordenada y homogénea, aunque si se excede el porcentaje de MWCNT's el aspecto del scaffold tiende a ser más esponjoso, como en el caso de los andamios con una concentración del 10%, dando lugar a una estructura más compacta. El proceso de degradación también se ve acelerado con la adición de los mismos.
- En cuanto a estructura, parece que el porcentaje de nanotubos ideal se sitúa sobre el 5%, ya que se observa prácticamente homogénea, sin aglomeraciones de nHA ni MWCNTs.
- La temperatura de transición vítrea apenas varía con el proceso de degradación o con la adición de nHA y MWCNTs, en cambio, la temperatura y entalpía de cristalización disminuyen a medida que se aumenta la concentración, dificultándose el proceso de cristalización.

## **11. BIBLIOGRAFÍA**

- [1] AKTER, F., 2016, What is Tissue Engineering?. *Tissue Engineering Made Easy*. 2016. P. 1-2. DOI 10.1016/b978-0-12-805361-4.00001-1. Elsevier
- [2] O'BRIEN, FERGAL J., 2011, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011. Vol. 14, no. 3. Elsevier BV
- [3] VELASCO PEÑA, MARCO ANTONIO y GARZÓN ALVARADO, DIEGO ALEXANDER, 2010, Implantes Scaffolds para regeneración ósea. Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2010.
- [4] HUTMACHER, DIETMAR W., 2000, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *The Biomaterials Silver Jubilee Compendium*. 2000.
- [5] DR. INAMUDDIN, ASIRI, ABDULLAH M. and MOHAMMAD, ALI. "Applications of Nanocomposite Materials in Orthopedics".
- [6] AGRAWAL, C. MAULI and RAY, ROBERT B., 2001, Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001. Vol. 55.
- [7] DÍAZ, ESPERANZA, MOLPECERES, ANE LIBE, SANDONIS, IBAN y PUERTO, IGOR, 2018, PLLA/nHA Composite Films and Scaffolds for Medical Implants: In Vitro Degradation, Thermal and Mechanical Properties. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 2018. Vol. 29.
- [8] NAIR, LAKSHMI S. and LAURENCIN, CATO T., 2007, Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007. Vol. 32, no. 8-9. DOI 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017. Elsevier BV

- [9] HENCH, LARRY L. and THOMPSON, IAN, 2010, Twenty-first century challenges for biomaterials. *Journal of The Royal Society Interface*. 2010. Vol. 7. The Royal Society.
- [10] HENCH, L. L., 2002, Third-Generation Biomedical Materials. *Science*. 2002. Vol. 295, no. 5557. American Association for the Advancement of Science (AAAS)
- [11] ZULOAGA, FABIO, 2013, Algunas aplicaciones del ácido Poli-L-Láctico. *Revista academica de Colombia*,. 2013. Vol. 142.
- [12] FARAH, SHADY, et al. "Physical and Mechanical Properties of PLA, and Their Functions in Widespread Applications — A Comprehensive Review." *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 107, Dec. 2016.
- [13] Polimerización del ácido láctico. *Eis.uva.es*.
- [14] GARCÍA, MARGARITA and REYES GASGA, JOSÉ, 2006, La Hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *TIP*. 2006. Vol. 9.
- [15] MARTÍNEZ VALENCIA, A.B., ESPARZA PONCE, H.E., CARBAJAL DE LA TORRE, G. and ORTIZ LANDEROS, J., 2008, Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis. *Superficies y vacío*. 2008. Vol. 21.
- [16] COSTA, A.C.F.M., LIMA, M.G., LIMA, L.H.M.A., CORDEIRO, V.V., VIANA, K.M.S., SOUZA, C.V. and LIRA, H.L., 2009, Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. 2009.

- [17] LARIZA ANDRADE, MARLENE, ITZEL LÓPEZ, LLUVIA and SAÉNZ GALINDO, AIDÉ, 2012, Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. 2012. Vol. 43.
- [18] MEI, FANG, ZHONG, JINSHENG, YANG, XIAOPING, OUYANG, XIANGYING, ZHANG, SHEN, HU, XIAOYANG, MA, QI, LU, JIGUI, RYU, SEUNGKON and DENG, XULIANG, 2007, Improved Biological Characteristics of Poly(L-Lactic Acid) Electrospun Membrane by Incorporation of Multiwalled Carbon Nanotubes/Hydroxyapatite Nanoparticles. *Biomacromolecules*. 2007. Vol. 8, no. 12. American Chemical Society (ACS)
- [19] LLOYD, DOUGLAS R., KINZER, KEVIN E. and TENG, H.S., 1990, Microporous Membrane Formation Via Thermally Induced Phase Separation. I. Solid-Liquid Phase Separation. *Journal of Membrane Science*. 1990. Vol. 52.
- [20] SCHUGEN, CH., MAQUET, V., GRANDFILS, C., JEROME, R. and TEYSSIE, PH., 1996, Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation: 1. Preparation of macroporous polylactide supports by solid-liquid phase separation. *Polymer*. 1996. Vol. 37, no. 6.
- [21] TU, CHIFENG, CAI, QING, YANG, JIAN, WAN, YUQING, BEI, JIANZHONG and WANG, SHENGUO, 2003, The fabrication and characterization of poly(lactic acid) scaffolds for tissue engineering by improved solid-liquid phase separation. *Polymers for Advanced Technologies*. 2003. Vol. 14, no. 8. Wiley

- [22] LLOYD, DOUGLAS R., SOO KIM, SUNG and KINZER, KEVIN E., 1991, Microporous membrane formation via thermally induced phase separation. II. Liquid-liquid phase separation. *Journal of Membrane Science*. 1991.
- [23] JENNINGS, THOMAS A., 1999, Lyophilization. Introduction and Basic Principles. *Informa Healthcare*. 1999.
- [24] ORTIZ GARCÍA, ELENA, 2012, Los incas y el Sol: métodos de observación solar y calendario incaicos. *Revista Española de Antropología Americana*. 42.
- [25] SURINACH, S., BARO, M.D., BORDAS, S., CLAVAGUERA, N. and CLAVAGUERA-MORA, M.T., 1992, La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. . 1992.
- [26] D. MENCZEL, JOSEPH and PRIME, R. BRUCE, 2019, THERMAL ANALYSIS OF POLYMERS Fundamentals and Applications. *Wiley*. 2019.
- [27] CLAVIJO, JOSUÉ, 2013, Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Revista Elementos*. 2013. Vol. 3.
- [28] RENAU PIQUERAS, JAIME and FAURA, MAGDALENA, Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido.
- [29] Barbanti S.H., Santos A.R., Zavaglia C.A.C., Duek E.A.R., “Porous and dense poly (L-lactic acid) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds: In vitro degradation in culture medium and osteoblasts culture”, *Journal of materials science: Materials in medicine*, 15, 2004.



[30] Li S.M., Garreau H., Vert M., "Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-( $\alpha$ -hydroxy acids) in aqueous media", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 1, 1990.

[31] Göpferich A., "Mechanisms of polymer degradation and erosion", *Biomaterials*, 17, 103-114, 1996.