

# **Nanocomposites bioabsorbibles para aplicaciones biomédicas.**

Christian Gómez Sánchez

Directores de Tesis:

Dr. D. Alberto López Arraiza

Dr. D. Jon Aurrekoetxea Narbarte



Para obtener el título de DOCTOR INGENIERO INDUSTRIAL de  
MONDRAGON UNIBERTSITATEA

Departamento de Mecánica y Producción Industrial  
Mondragon Unibertsitatea

Diciembre 2013



*A mi aita y mi ama*



*He pasado mil años viendo cómo mi madre  
trabajaba y llegaba a casa siempre tarde,  
una vez, y otra vez, treinta días al mes.  
Cada noche, después de estar yo acostado,  
la sentía abrir la puerta de mi cuarto.  
Cambió el verme crecer por comer a diario,  
por comer a diario.*

*Vi a mis padres correr en busca de Eldorado,  
vi a mis padres luchar, cada uno por su lado.  
Lo mejor de sus vidas, dónde se ha quedado.  
Quizás yendo detrás del maldito Eldorado.*

*Vi a mi padre luchar contra los elementos,  
naufregar con su vida contra el muro del  
tiempo. No tuvo otra oportunidad.  
Y llegaba a casa con las manos cortadas  
de montar con las manos armarios de chapa.  
No tuvo otra oportunidad, otra oportunidad.*

*Vi a mis padres correr en busca de Eldorado,  
vi a mis padres luchar, cada uno por su lado.  
Lo mejor de sus vidas, dónde se ha quedado.  
Quizás yendo detrás del maldito Eldorado.*

*Intenté resolver solo todas mis dudas,  
y, veinte años después, aún me quedan  
algunas. La vida sigue y yo también.  
Y aunque dicen que el tiempo no pasa en balde,  
cometí mis errores más bien pronto que tarde.  
No usé su ejemplo en aprender,  
y en mi propio universo vi a mis padres caer,  
vi a mis padres caer.*

*Vi a mis padres correr en busca de Eldorado,  
vi a mis padres luchar, cada uno por su lado.  
Lo mejor de sus vidas, dónde se ha quedado.  
Quizás yendo detrás del maldito Eldorado.*

*El Dorado, Revolver.*



---

**DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD**

---



## Declaración de originalidad

---

Declaro a través de este documento que esta tesis, y el trabajo presentado en ella con sus resultados, es el fruto del trabajo de investigación realizado dentro del Grupo de Investigación de Tecnología de Plásticos y Compuestos, en el Departamento de Mecánica y Producción Industrial de la Escuela Politécnica Superior de Mondragon Unibertsitatea, y la colaboración, en materia de cultivo biológico, con el equipo de la Dra. Clara Isabel Rodríguez, del Grupo de Células Madre y Terapia Celular (BioCruces) del Hospital Universitario de Cruces (Barakaldo), la colaboración con los doctores Koldo Gondra y María José Suarez, del centro tecnológico Gaiker-IK4 (Zamudio), en la parte relativa a los análisis de termogravimetría y espectroscopía infrarroja, y la colaboración con los doctores Tomasz Kowalczyk y Tomasz Kowalewski, del Institute of Fundamental Technological Research-Polish Academy of Sciences (IPPT-PAN) de Varsovia (Polonia), en la parte relativa al proceso de *electrospinning* y a la fabricación de *scaffolds* de tipo mat de nanofibras.

Christian Gómez Sánchez  
(Diciembre 2013)



---

**AGRADECIMIENTOS/ACKNOWLEDGMENTS**

---



## Agradecimientos/Acknowledgments

---

Han pasado ya varios años desde que me embarqué en esta aventura. Mediante estas palabras me gustaría dar las gracias a todas las personas e instituciones que me han ayudado durante este tiempo y han hecho posible el desarrollo de esta tesis. En especial a Mondragon Goi Eskola Politeknikoa y a todas las personas que la forman. Intentaré mencionarlos a todos, pero si se me olvida alguien, que me perdone.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis, Jon Aurrekoetxea y Alberto López, por haber llevado el rumbo del barco de manera excelente, incluso capeando el temporal en el que nos vimos inmersos en un momento dado..., pero sobre todo por confiar en mí.

Me gustaría también agradecer de manera muy especial a mi aita y mi ama por todo el apoyo prestado no solo durante estos últimos años, si no desde que era bien pequeño, desde el inicio de mis estudios hasta el final de la tesis. Siempre han estado ahí cuando les he necesitado, apoyándose anímicamente y ayudándome a superar la desmotivación que muchas veces ha ocurrido a lo largo de estos últimos años. Soy lo que soy gracias a ellos. También me gustaría agradecer al resto de mi familia por todo su cariño, en especial a mis abuelas. Aunque suene a tópico, nada de esto hubiera sido posible sin su apoyo.

También quisiera agradecer de manera especial a Lidia su apoyo durante este tiempo. Gracias por darme aliento y cariño en los momentos de bajón, que no han sido pocos. Y perdón por todo el tiempo que la tesis nos ha robado.

I would like to thank Dr. Tomasz Kowalczyk and Dr. Tomasz Kowalewski, from IPPT-PAN Warsaw (Poland), for their support in electrospinning processing and material development, and for their invaluable assistance during my stay there.

También me gustaría agradecer A la Dra. Clara Isabel Rodríguez y a Garbiñe Ruiz de Eguino, del Grupo de Investigación de Células Madre y Terapia Celular (BioCruces) del Hospital de Cruces (Barakaldo), por su inestimable ayuda con los ensayos biológicos de cultivo celular presentados en esta tesis.

Agradezco también al Dr. Koldo Gondra y a la Dra. Maria José Suarez, del centro tecnológico Gaiker-IK4 (Zamudio), por su inestimable ayuda con los análisis de termogravimetría y espectroscopía infrarroja.

Me gustaría también agradecer a mucha gente de Eskola, entre ellos a todos mis compañeros de línea (Mariasun, Modesto, Laurentzi, Mainer...), por la ayuda, consejos y los buenos momentos vividos; a la gente del taller mecánico y del laboratorio, especialmente a Larraitz, por su inestimable ayuda.

También agradecer a Eneko, Gurutze, Andrea y especialmente a Javi, por toda la ayuda mutua que nos hemos prestado en temas de Salud (aunque nos la haya quitado...) para entender algo del apasionante mundo de la biología y células madre. También agradezco a Asier Arostegi por los primeros dos años.

Agradezco especialmente a mis compañeros de piso (y trabajo), Iñiguín, Iran e Izor, por la buena convivencia, amistad y buenos momentos vividos en los últimos años.

Me gustaría agradecer también a todos mis compañeros de departamento y de tesis (Kin, Alain, David, Nuria, Sori, Arkaitz, Jokin, Joanes, Sarriegi, Alaitz, Nagore, Elena, Ione, Joseba, Erik, Pablo, Xabier, Tena, Ariane, Jaione, Jon Ander, y los que se me olvidan). Son muchas las personas que he conocido durante los últimos años y muchas también las “aventuras” vividas con ellos: viajes, pintxopotes, partidos los martes, partidos los miércoles, cafés etc. También está la peña tupper (Buru, Elías, Cuesta, Aitor, Torrano, Llavori...) con la que, además de comer, me he despejado jugando unas partidas de ping-pong. A todos ellos, gracias. Quisiera también agradecer especialmente a mis compañeros del “garito viejo” Luis, Joseba, Aitor, Siku, Pitzo, Jon, Zurbi y Haritz.

Por último agradecer a los incondicionales, a mi cuadrilla, por su apoyo, por ser como son, por animarme y por organizar esos *sports* y juergas nocturnas dignas de *profesionales de la copa* que de vez en cuando te ayudan a cargar pilas y a despejarte, Edy, Salsas, Goibu, Ekain, Martzel, Zapata, Isasti, Borjius, Perlis, Gari, Txabo, Pepi, Juanolo, Jon, Tarzi, Sergay, y los que se me olvidan... Gracias COFA. Un abrazo sabeustel.

---

## **RESUMEN**

---



## Resumen

---

La mayor esperanza de vida y las lesiones deportivas han aumentado la necesidad de solucionar enfermedades crónicas y/o traumatológicas que no pueden ser solventadas mediante técnicas convencionales. La Ingeniería de Tejidos, que combina la investigación de nuevos materiales y técnicas médicas, aparece como una prometedora alternativa multidisciplinar que pretende dar respuesta a estos retos de la sociedad con el objetivo de buscar una mayor calidad de vida.

El objetivo del presente trabajo de investigación es estudiar la viabilidad de un nuevo *biocomposite* peg-POSS/PLLA destinado a la fabricación de *scaffolds* para aplicaciones en crecimiento celular y regeneración de cartílago.

El trabajo se ha dividido en dos partes. Por un lado, la puesta a punto de los procesos de disolución-evaporación y *electrospinning*, y la posterior fabricación de *scaffolds* mediante estos procesos. Por otro lado, la caracterización tanto de los materiales compuestos desarrollados como de los *scaffolds* fabricados. En primer lugar, se ha realizado la caracterización físico-mecánica que ha consistido en el estudio mediante calorimetría (DSC) de la microestructura cristalina de los *nanocomposites*, su estabilidad térmica mediante termogravimetría (TGA), su estructura molecular mediante espectroscopía infrarroja (IR) y sus propiedades mecánicas mediante ensayos de tracción. En segundo lugar, se ha realizado la caracterización biológica de los *scaffolds* fabricados, que ha consistido en estudiar su morfología mediante microscopía electrónica (SEM), su biodegradación hidrolítica en líquido fisiológico, y su biocompatibilidad mediante la realización de un cultivo celular.

La adición de las nanomoléculas de peg-POSS al PLLA ha demostrado no afectar la procesabilidad del material, y ha aumentado su cristalinidad, estabilidad térmica y ductilidad, además de mejorar su resistencia a la biodegradación. El cultivo celular sobre los *nanocomposites* ha resultado satisfactorio, por lo que se concluye que el peg-POSS no ha puesto en compromiso la biocompatibilidad del PLLA.



---

**LABURPENA**

---



Bizi itxaropenaren luzapenak eta kirol lesioek teknika konbentzionalen bitartez konpondu ezin diren gaixotasun kronikoei eta/edo ortopedikoei aurre egiteko beharra areagotu dute. Ehun Ingeniaritza, material eta medikuntza teknika berrien ikerketa konbinatuz, diziplina anitzeko alternatiba itxaropentsu bezala agertu da gizartearen bizikalitate handiagoa bilatzeko erronkari erantzuteko.

Ikerketa honen helburua peg-POSS/PLLA egindako biokonposite berri baten bideragarritasuna aztertzea da. Material berri hau zelula hazkuntzarako eta kartilagoaren birsorkuntzarako erabiliko diren *scaffold*-ak fabrikatzeko erabili ahal izango da.

Lana bi zatitan banatu da. Batetik, *solvent-casting* eta *electrospinning* prozesuen konfigurazioa garatu da, eta prozesu horiek erabiliz *scaffold*-ak fabrikatu dira. Bestaldetik, bai material konposatuen zein *scaffold*-en karakterizazioa burutu da. Lehendabizi, karakterizazio fisiko-mekanikoa burutu da, nanokonpositeen mikroegitura kristalinoa kalorimetriaz (DSC), egonkortasun termikoa termograbitriaz (TGA), egitura molekularra espektroskopia infragorriaz (IR) eta propietate mekanikoak trakzio probaz aztertu dira. Bestetik, fabrikatutako *scaffold*-en karakterizazio biologikoa egin da, morfologia mikroskopia elektronikoa (SEM) erabiliz, biodegradazio hidrolitikoa fluido fisiologiko batean murgilduz, eta biobateragarritasuna aztertzeke zelula-kultibo bat egin delarik.

peg-POSS nanomolekulak PLLA-ri gehitzeak materialaren prozesagarritasuna ez du aldatu. Bestalde, kristalinitatea, egonkortasun termikoa, biodegradazio erresistentzia eta harikortasuna handitu ditu. Nanokonpositezko *scaffold*-etan egindako kultibo zelularra arrakastatsua izan da, beraz, peg-POSS-ek PLLA-ren biobateragarritasuna aldatu ez duela demostratu da.



---

## **ABSTRACT**

---



## Abstract

---

The longer life expectancy and the sports injuries have increased the need to address chronic and/or orthopedic diseases which cannot be met by conventional healing techniques. Tissue Engineering, combining the research on new materials and medical techniques, appears as a promising multidisciplinary alternative which aims to address these societal challenges with the aim of achieving a better quality of life.

The objective of this research is to study the feasibility of a new peg-POSS/PLLA biocomposite intended for use in the manufacture of scaffolds for cell growth and cartilage regeneration applications.

The work has been divided into two parts. On the one hand, the setting of the solvent-casting and electrospinning processes, and the subsequent manufacture of scaffolds by these processes. On the other hand, the characterization of both the developed composite materials and the manufactured scaffolds. Firstly, it has been carried out the physical-mechanical study of the nanocomposites consisting on the analysis of their crystalline microstructure by means of calorimetry (DSC), their thermal stability by thermogravimetric analysis (TGA), their molecular structure characterization using infrared spectroscopy (IR) and their mechanical properties by means of tensile tests. Secondly, it has been carried out the biological characterization of the manufactured scaffolds, which consisted on studying their morphology by electron microscopy (SEM), their hydrolytic biodegradation in physiological fluid, and their biocompatibility by performing a cell culture.

The addition of peg-POSS nanomolecules to the PLLA has shown not to affect the processability of the material, and has increased the crystallinity, the thermal stability and the ductility, in addition to improving its resistance against biodegradation. The cell culture on the nanocomposites has been proved successful, so it can be concluded that peg-POSS has not affected the biocompatibility of the PLLA.



---

## **ÍNDICE DE CONTENIDOS**

---



# Índice de contenidos

<b>1</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Enmarque de la tesis .....</i>	1
1.1.1	Interés socio-económico en biomedicina .....	1
1.1.2	Ingeniería de Tejidos - Medicina Regenerativa .....	4
1.2	<i>Estado del arte .....</i>	6
1.2.1	Antecedentes en la regeneración del tejido cartilaginoso .....	6
1.2.2	Materiales utilizados en la biomedicina .....	9
1.2.2.1	Polímeros biodegradables .....	11
1.2.2.2	Ácido poliláctico (PLA) .....	14
1.2.2.3	<i>Nanocomposites</i> .....	23
1.2.2.4	<i>Polihedral Oligomeric Silsesquioxanes</i> (POSS) .....	28
1.2.3	Tecnologías de fabricación de scaffolds poliméricos .....	31
1.2.3.1	Tipos de <i>scaffolds</i> poliméricos .....	31
1.2.3.2	Procesos de fabricación de <i>scaffolds</i> poliméricos. ....	35
1.2.4	Caracterización de la biodegradabilidad en líquido fisiológico .....	55
1.2.5	Caracterización biológica - Cultivo celular .....	55
1.3	<i>Análisis crítico del estado del arte</i> .....	57
1.4	<i>Objetivos</i> .....	61
1.5	<i>Organización de la memoria de tesis</i> .....	62
<b>2</b>	<b>Materiales y técnicas experimentales .....</b>	<b>67</b>
2.1	<i>Materias primas</i> .....	67
2.1.1	Ácido poli(L-láctico) (PLLA) .....	67
2.1.2	Polyethylene Glycol - Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes (peg-POSS) .....	68
2.1.3	Otros materiales .....	69
2.2	<i>Procesos de fabricación</i> .....	70
2.2.1	Fabricación de films mediante proceso disolución-evaporación .....	70
2.2.2	Fabricación de mat de fibras mediante proceso <i>electrospinning</i> .....	71
2.2.2.1	Configuración del equipo de <i>electrospinning</i> .....	71
2.2.2.2	Fabricación del mat de fibras .....	77
2.3	<i>Caracterización del material compuesto</i> .....	79
2.3.1	Estudio de la fusión y cristalización de los <i>nanocomposites</i> .....	79
2.3.1.1	Ensayos dinámicos de fusión y cristalización .....	81
2.3.1.2	Ensayos isotérmicos de cristalización .....	88
2.3.1.3	Estudio de la fusión en equilibrio .....	90

2.3.2	Análisis termogravimétrico .....	92
2.3.3	Análisis de la estructura molecular mediante espectroscopía infrarroja .....	92
2.3.4	Ensayos de tracción .....	92
2.3.5	Análisis de viscosidad .....	100
2.4	<i>Caracterización de los scaffolds</i> .....	101
2.4.1	Análisis morfológico mediante microscopía .....	101
2.4.2	Caracterización de la biodegradabilidad en líquido fisiológico .....	102
2.4.3	Caracterización biológica de los <i>scaffolds</i> - Cultivo celular .....	104
<b>3</b>	<b>Resultados y discusión</b> .....	<b>111</b>
3.1	<i>Procesado</i> .....	111
3.1.1	Procesado mediante disolución-evaporación .....	111
3.1.2	Procesado mediante <i>electrospinning</i> .....	115
3.2	<i>Caracterización físico-mecánica del nanocomposite peg-POSS/PLLA</i> .....	117
3.2.1	Análisis de la fusión y cristalización de los <i>nanocomposites</i> .....	118
3.2.1.1	Análisis de la fusión tras el proceso de disolución-evaporación .....	118
3.2.1.2	Análisis de la cristalización dinámica desde el fundido .....	120
3.2.1.3	Análisis de la cristalización isotérmica desde el fundido .....	122
3.2.1.4	Análisis de la fusión de las muestras cristalizadas isotérmicamente .....	127
3.2.1.5	Comparativa de <i>nanocomposites</i> basados en PLLA de grado médico y grado comercial .....	133
3.2.2	Análisis termogravimétrico (TGA) .....	137
3.2.3	Análisis de la estructura molecular mediante espectroscopía infrarroja .....	139
3.2.4	Análisis de las propiedades mecánicas .....	141
3.2.5	Análisis de viscosidad .....	142
3.3	<i>Caracterización biológica de los scaffolds fabricados</i> .....	142
3.3.1	Caracterización de la biodegradabilidad en líquido fisiológico .....	143
3.3.2	Caracterización biológica de los <i>scaffolds</i> – Cultivo celular .....	145
3.3.2.1	Cultivo celular sobre <i>scaffolds</i> en forma de film fabricados mediante <i>solvent-casting</i> .....	145
3.3.2.2	Cultivo celular sobre <i>scaffolds</i> tipo mat de fibras fabricados mediante <i>electrospinning</i> .....	153
<b>4</b>	<b>Conclusiones y líneas futuras</b> .....	<b>161</b>
4.1	<i>Conclusiones</i> .....	161
4.2	<i>Aportaciones</i> .....	165
4.3	<i>Líneas futuras</i> .....	166

---

## **LISTA DE FIGURAS**

---



## Lista de figuras

Figura 1 Evolución de la esperanza de vida al nacer en España, por edad y sexo (1900-2045*) [IMSER]. Las fechas marcadas con asterisco son proyecciones.....	2
Figura 2 Inversión realizada por cada país en Biotecnología (2010) [OECD]. .....	3
Figura 3 Mercado global de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Transplantes [MEDM]. Clasificado por áreas clínicas (2009-2018). .....	4
Figura 4 Metodología de Ingeniería de Tejidos [NUHS].....	5
Figura 5 Componentes de la articulación natural. ....	6
Figura 6 Bloque de hidroxiapatita. ....	7
Figura 7 Injerto óseo cilíndrico esponjoso [INJ]. .....	8
Figura 8 <i>Scaffold</i> polimérico. ....	8
Figura 9 Formulación del ácido poliláctico. ....	14
Figura 10 Estructura molecular de los estereoisómeros del ácido láctico. ....	15
Figura 11 Diferentes configuraciones ópticas de la láctida. ....	16
Figura 12 Vías para la polimerización del ácido poliláctico. ....	17
Figura 13 a) Imagen SEM de micro-partículas de Bioglass® b) Imagen SEM de nano-partículas de Bioglass® c) Imagen TEM de nano-partículas de Bioglass® [Misra2008]. .....	26
Figura 14 Fotografía SEM de HA microporosa. La escala es de 10 $\mu\text{m}$ [Cordell2009]. .....	27
Figura 15 Proceso de formación de las estructuras de POSS por medio de las reacciones condensación hidrolítica de los monómeros trifuncionales. ....	28
Figura 16 Estructuras moleculares de los POSS con diferente número de átomos de silicio. “R” corresponde a los grupos funcionales. ....	29
Figura 17 Estructura química del peg-POSS. ....	30
Figura 18 <i>Scaffold</i> laminar 2D.....	31
Figura 19 <i>Scaffold</i> 3D fabricado por SFF [Puppi2010].....	32
Figura 20 <i>Scaffold</i> fabricado por <i>electrospinning</i> y fotografía SEM de las nanofibras [Puppi2010].....	32
Figura 21 Diagrama esquemático de <i>scaffolds</i> laminares y de micro-esferas fabricados mediante el método de espumado. Columna izquierda: membrana porosa de PLGA preparada por emulsión simple agua/aceite. Columna derecha: micro-esferas porosas preparadas por emulsión doble agua/aceite/agua. a) micro-fotografía óptica de las gotas de la emulsión primaria agua/aceite durante la evaporación del disolvente. b) micro-fotografía óptica de las gotas de la emulsión doble agua/aceite/agua durante la evaporación del disolvente. c) imagen SEM de la sección transversal de un film poroso de PLGA. d) imagen SEM de la sección transversal de una micro-esfera porosa de PLGA [Kim2006b].....	34
Figura 22 Matriz de micro-esferas sinterizadas fabricada con micro-esferas de 355–425 $\mu\text{m}$ . Las micro-esferas de PLGA se calentaron durante 24 horas a 62 °C [Borden2002].....	35
Figura 23 Curvas de la pérdida molecular de la PLA en función del tiempo bajo diferentes condiciones de entorno [Drumright2000]. .....	36
Figura 24 Técnica de moldeo por fundido. ....	37
Figura 25 Principales componentes de una máquina de moldeo por inyección. Se muestran el husillo extrusor y las unidades de cierre.....	37
Figura 26 Típica geometría del husillo de una extrusora de simple husillo.....	39
Figura 27 <i>Scaffolds</i> poliméricos 3D producidos por tecnología Bioextruder [Domingos2009]. .....	41

Figura 28	Proceso de disolución- evaporación con adición de partículas porógenas. ....	42
Figura 29	Montaje típico de <i>electrospinning</i> y diferentes sistemas de colector: disco, tambor y electrodos paralelos. ....	43
Figura 30	A) Representación esquemática del sistema NFES. Una gota de la solución polimérica se adhiere a la punta de la misma manera que la tinta a una pluma estilográfica. B) Imagen SEM de la región de la punta del electrodo de diámetro 25 $\mu\text{m}$ . Escala 10 $\mu\text{m}$ . C) Foto óptica mostrando una gota de 50 $\mu\text{m}$ pegada al electrodo de tungsteno. Escala 20 $\mu\text{m}$ . D) Un chorro de polímero es eyectado desde el cono Taylor bajo un campo electrostático. Escala 25 $\mu\text{m}$ . E) El tamaño de la gota decrece a medida que el chorro de polímero continúa creciendo. Escala 25 $\mu\text{m}$ . [Sun2006]. ....	45
Figura 31	A) Líneas paralelas y perpendiculares construidas por NFES. Escala 1 mm. B) Imagen SEM de una fibra de diámetro 300 nm. Escala 500 nm. C) Resultado de una velocidad de movimiento del colector de 5 cm/s, inferior a la de <i>electrospinning</i> , con la consecuente aparición de espirales. Escala 100 $\mu\text{m}$ . D) Velocidad del colector a 10 cm/s. Escala 100 $\mu\text{m}$ . E) Velocidad del colector a 15 cm/s. Escala 100 $\mu\text{m}$ . F) Velocidad del colector a 20 cm/s. Se pueden construir líneas rectas. Las líneas paralelas están separadas 25 $\mu\text{m}$ y bajo el control de un dispositivo x-y. Escala 100 $\mu\text{m}$ . [Sun2006]. ....	46
Figura 32	A) Efecto espiral observado durante un cambio de dirección de 90° del colector, debido a que permanece estático durante 0,5 segundos. La acumulación de material es de diámetro 50 $\mu\text{m}$ . Escala 10 $\mu\text{m}$ . B) Efecto espiral aumentado debido al recubrimiento del sustrato con una capa aislante de dióxido de silicio. Los anillos concéntricos tienen un diámetro de 300 $\mu\text{m}$ . Escala 100 $\mu\text{m}$ . C) Vista ampliada del efecto visto en B. La distancia entre fibras es de 1,5 $\mu\text{m}$ . Escala 1 $\mu\text{m}$ . D) Trazado manual de una “U” por NFES. Se observa la deposición excesiva de fibras en las esquinas debido al efecto comentado en A. Escala 100 $\mu\text{m}$ . E) Caracteres “Cal” trazados manualmente. Escala 1 mm. F) Resultados experimentales de la distancia electrodo-colector vs. voltaje mínimo requerido para activar el proceso de NFES con varias concentraciones de polímero y varios materiales de colector. [Sun2006]. ....	46
Figura 33	Proceso de liofilización. ....	48
Figura 34	Proceso de separación de fases inducida térmicamente. ....	49
Figura 35	Izqda. Fotografía de una red polimérica 3D producida por <i>wet-spinning</i> . Drcha. Imagen SEM de una microfibrilla fabricada por <i>wet-spinning</i> . ....	50
Figura 36	Proceso de <i>wet-spinning</i> . ....	50
Figura 37	Matriz de micro-esferas sinterizadas fabricada con micro-esferas de 355–425 $\mu\text{m}$ . Las micro-esferas de PLGA se calentaron durante 24 horas a 62 °C. ....	51
Figura 38	Proceso de supercritical-CO <sub>2</sub> technology. ....	52
Figura 39	Representación esquemática del proceso de fabricación de <i>scaffolds</i> . A) Preparación del compuesto termoplástico PCL/HA. B) Extrusión del material formando una lámina. C) Mecanizado bi-axial de la lámina. D) Unión de las láminas para formar el <i>scaffold</i> . ....	53
Figura 40	Fabricación de films de PDMS microestructurados. A) Se cubre una lámina de silicio con polímero fotoresistente negativo mediante <i>spinning</i> , y se irradia con luz UV a través de una máscara. B) El polímero fotoresistente que no ha sido polimerizado con UV se lava y se retira quedando la superficie estructurada. C) El PDMS se vierte en la lámina mediante <i>spinning</i> y se polimeriza. D) Los films curados se retiran de la lámina de silicio. ....	54
Figura 41	Granza de PLLA PURASORB® PL18 de grado biomédico. ....	68
Figura 42	Granza de PLLA NatureWorks® 2002D de grado comercial. ....	68
Figura 43	Agitador magnético utilizado para remover la disolución. ....	70
Figura 44	Imágenes SEM comparando morfología de fibra obtenida con diferentes disolventes: cloroformo-DMF (izquierda) y trifluoroetanol (derecha). Las imágenes se han tomado a diferentes aumentos. ....	74
Figura 45	Fotografías de microscopio óptico mostrando una comparativa entre dos caudales de	

alimentación diferentes: 0,1 ml/h, mostrando fibras irregulares (izquierda), y el caudal de alimentación seleccionado de 0,4 ml/h (derecha). Los ensayos se realizaron con una disolución de PLLA con un 10% en peso de peg-POSS.....	76
Figura 46 Scaffold de peg-POSS/PLLA fabricado mediante <i>electrospinning</i> . a) equipamiento de <i>electrospinning</i> ; b) vista óptica; c) imagen SEM. ....	78
Figura 47 Imagen de foto-calorímetro diferencial de barrido (DSC).....	80
Figura 48 Secuencia de análisis DSC: búsqueda de la velocidad óptima de calentamiento.....	82
Figura 49 Resultados de la búsqueda de la velocidad óptima de calentamiento. ....	82
Figura 50 Evolución de los valores de $T_m$ con las diferentes velocidades de calentamiento.....	83
Figura 51 Secuencia de análisis DSC: búsqueda de la velocidad máxima de enfriamiento. ....	84
Figura 52 Resultados de la búsqueda de la velocidad máxima de enfriamiento.....	85
Figura 53 Secuencia del análisis de número máximo de ensayos por muestra antes de degradación térmica. ....	85
Figura 54 Resultados del análisis del número máximo de ensayos por muestra antes de degradación térmica. Se muestran los 10 barridos en función de la temperatura. ....	86
Figura 55 Resultados del análisis del número máximo de ensayos por muestra antes de degradación térmica. Se muestran los 10 barridos en función del tiempo.....	87
Figura 56 Secuencia de ensayo DSC: análisis dinámico.....	88
Figura 57 Secuencia de ensayo DSC: análisis isotérmico.....	89
Figura 58 Determinación del $t_{1/2}$ : aproximación con respecto al tiempo de pico.....	90
Figura 59 Dimensiones de probeta calibrada normalizada para ensayos de tracción. ....	93
Figura 60 Probeta en forma de film para ensayos de tracción. La probeta tiene una fisura en un lateral. ....	94
Figura 61 Obtención manual de las probetas de tracción mediante una cuchilla. ....	95
Figura 62 Punzón metálico con la forma interna de la probeta (probeta hembra). ....	95
Figura 63 Dispositivo utilizado para la obtención de las muestras: prensa manual. ....	96
Figura 64 Proceso de fabricación de los moldes de silicona. Arriba izqda.: machos metálicos en la caja. Arriba dcha.: caja rellena con silicona. Abajo izqda.: conjunto visto desde la parte inferior. Abajo dcha.: molde de silicona y probetas metálicas.....	97
Figura 65 Moldes de silicona con diferente profundidad interior. ....	98
Figura 66 Probetas obtenidas tras la reducción de la concentración de PLLA en la disolución. Izqda: de 1 gr a 0,5 gr. Dcha: de 1 gr a 0,125 gr. ....	98
Figura 67 Efecto de la evaporación del disolvente sobre la morfología de las probetas. Izqda: evaporación al aire libre. Dcha: evaporación en un horno de ventilación forzada a 37 °C. Para ambas muestras la concentración de polímero fue de 0,125 gr por cada 25 ml de cloroformo. ....	98
Figura 68 Plantilla para la obtención de muestras de forma manual mediante unas tijeras. ....	99
Figura 69 Probetas de film fabricadas para ser utilizadas en los ensayos de tracción.....	100
Figura 70 Micro-viscosímetro de caída de bola. ....	100
Figura 71 Microscopio electrónico de barrido (SEM). ....	101
Figura 72 Configuración del baño de agua a 37 °C con los botes en su interior durante el experimento de biodegradación. ....	103
Figura 73 Medición de los valores de pH con la ayuda de un pH-metro digital durante el cambio de líquido fisiológico. ....	104
Figura 74 Comparativa de varios films tras haber sido expuestos a diferentes tipos de evaporación. Izqda.: film liso con evaporación a temperatura ambiente. Centro: evaporación a 40 °C.Dcha.: evaporación a 50 °C. ....	113
Figura 75 Diferentes films de peg-POSS/PLLA fabricados. El contenido en peg-POSS varía desde el 0,5 hasta el 10% en peso.....	113
Figura 76 Fotografía SEM del espesor de un film de peg-POSS/PLLA. ....	114

Figura 77 Incremento de porosidad en las muestras, directamente proporcional a la cantidad de peg-POSS. Izqda.: 0% en peg-POSS. Centro: 1% en peg-POSS. Dcha.: 5% en peg-POSS.....	115
Figura 78 Fotografías SEM comparando las muestras PLLA0, PLLA1 y PLLA5, con diferentes aumentos y medición del diámetro de la fibra. ....	116
Figura 79 Espesor de un <i>scaffold</i> de PLLA1 fabricado mediante electrospinnig. ....	117
Figura 80 Primer calentamiento de una muestra de PLLA0 en forma de film y de material de granza. Las curvas han sido desplazadas en el eje vertical. ....	118
Figura 81 Primer calentamiento de diversas muestras de <i>nanocomposites</i> en forma de film. Las curvas han sido desplazadas en el eje vertical. ....	119
Figura 82 Cristalización dinámica (enfriamiento) de una muestra de PLLA0 en forma de film y de material granza. Las curvas han sido desplazadas en el eje vertical. ....	121
Figura 83 Cristalización dinámica (enfriamiento) de diversas muestras de <i>nanocomposites</i> en forma de film. Las curvas han sido desplazadas en el eje vertical.....	122
Figura 84 Cristalización isotérmica a diferentes $T_{ci}$ de diversas muestras en forma de film: a) PLLA0 y $T_{ci}$ : 75-110 °C; b) PLLA0 y $T_{ci}$ : 105-140 °C; c) PLLA1 y $T_{ci}$ : 80-110 °C; d) PLLA1 y $T_{ci}$ : 105-140 °C; e) PLLA2.5 y $T_{ci}$ : 80-110 °C; f) PLLA2.5 y $T_{ci}$ : 105-140 °C; g) PLLA5 y $T_{ci}$ : 80-110 °C; h) PLLA5 y $T_{ci}$ : 105-140 °C. (Los valores de $T_{ci}$ : 105 y 110 °C se incluyen en ambos rangos de $T_{ci}$ para una mejor comparativa).....	124
Figura 85 Cristalización isotérmica de los <i>nanocomposites</i> a diferentes $T_{ci}$ : a) 120; b) 130 °C. ....	125
Figura 86 Evolución de los valores de $t_{1/2}$ de diversos <i>nanocomposites</i> a diferentes $T_{ci}$ . a) $T_{ci}$ : 80-130 °C; y b) $T_{ci}$ : 130-150 °C. (El valor de $T_{ci}$ : 130 °C se incluye en ambas imágenes para una mejor comparativa).....	126
Figura 87 Fusión de varias muestras de <i>nanocomposites</i> tras la cristalización isotérmica a diferentes $T_{ci}$ : a) PLLA0, b) PLLA1, c) PLLA2.5 y d) PLLA5. Las curvas han sido desplazadas en el eje vertical.....	130
Figura 88 Fusión de los <i>nanocomposites</i> tras la cristalización isotérmica. a) $T_{ci}$ : 120 °C y b) $T_{ci}$ : 130 °C. Las curvas han sido desplazadas en el eje vertical.....	131
Figura 89 Temperatura de fusión en equilibrio de los <i>nanocomposites</i> : a) del primer pico ( $\alpha$ ); y b) del segundo pico ( $\alpha'$ ).....	132
Figura 90 Cristalinidad de las muestras tras la cristalización isotérmica. ....	133
Figura 91 Secuencia de operaciones DSC: a) análisis dinámico, b) análisis isotérmico. ....	134
Figura 92 Comparativa de los dos diferentes grados de PLLA en forma de film: primer barrido de calentamiento en el DSC. Para una mayor claridad las muestras han sido desplazadas en el eje vertical.....	135
Figura 93 Cristalización dinámica de los dos grados de PLLA y de sus <i>nanocomposites</i> (PLLA0 y PLLA5): barrido de enfriamiento en el DSC. Para una mayor claridad las muestras han sido desplazadas en el eje vertical.....	135
Figura 94 Cristalización isoterma de los dos grados de PLLA y de sus <i>nanocomposites</i> (PLLA0 y PLLA5): segundo barrido de calentamiento en el DSC. Para una mayor claridad las muestras han sido desplazadas en el eje vertical.....	136
Figura 95 Pérdida de peso en función de la temperatura para los <i>nanocomposites</i> basados en peg-POSS/PLLA.....	139
Figura 96 Espectros de IR del nanocompuesto con un 5% en peso de peg-POSS (espectro inferior), así como del PLLA puro como referencia (espectro superior).....	141
Figura 97 Ensayo tensión-deformación del nanocompuesto peg-POSS/PLLA.....	142
Figura 98 Porcentaje de pérdida de peso de los <i>nanocomposites</i> tras los puntos de control.....	144
Figura 99 Imágenes obtenidas con la lupa estereoscópica de los <i>scaffolds</i> incubados durante 72 horas con medio de cultivo celular. Arriba izqda.: PLLA0c. Arriba dcha.: PLLA0c2. Abajo izqda.: PLLA0c3. Abajo dcha.: PLLA0c4.....	146
Figura 100 Imagen representativa de las hMSC en cultivo en la PLLA0c tras tres semanas de proliferación.....	147

Figura 101 hMSC tras 3 semanas de proliferación sobre la PLLA0c4, observadas al microscopio de fluorescencia. ....	148
Figura 102 hMSC cultivadas sobre la PLLA0c al microscopio de fluorescencia (izquierda). Imagen en campo claro (derecha). ....	148
Figura 103 Imágenes obtenidas al microscopio óptico tras el periodo de diferenciación sobre la PLLA0c. ....	149
Figura 104 Detalle al microscopio óptico de la formación de tejido cartilaginoso sobre el PLLA0c. ....	150
Figura 105 Acumulación de tejido cartilaginoso al microscopio óptico sobre el PLLA0c2. ....	150
Figura 106 Imágenes obtenidas al microscopio óptico, del <i>scaffold</i> de PLLA0c al término del proceso de diferenciación llevado a cabo durante 6 semanas, en las que se aprecian las regiones de tejido cartilaginoso teñidas con el colorante específico. ....	151
Figura 107 Cuantificación de los GAGs generados en los diferentes <i>scaffolds</i> . ....	152
Figura 108 hMSC's teñidas con Hoechst sobre <i>scaffolds</i> de peg-POSS/PLLA fabricados mediante <i>electrospinning</i> tras la propagación celular. a) PLLA0, b) PLLA1 y c) PLLA5. ....	153
Figura 109 Microfotografías SEM mostrando la formación de una capa continua de hMSC cultivadas durante 2 semanas en varios <i>scaffolds</i> fabricados mediante <i>electrospinning</i> . a) PLLA0, b) PLLA1, c) PLLA5, d) Detalle de las hMSC sobre el <i>scaffold</i> PLLA1. ....	154
Figura 110 Agregados de cartílago que contienen GAG teñido de azul sobre varios <i>scaffolds</i> fabricados mediante <i>electrospinning</i> . a) PLLA0, b) PLLA1, c) PLLA5 y d) PLLA0 sin células (como control negativo). ....	155
Figura 111 Cuantificación del GAG a partir de cartílago derivado de hMSC sobre varios <i>scaffolds</i> fabricados mediante <i>electrospinning</i> . Neg ctrl: control negativo ( <i>scaffold</i> sin células). Los datos se presentan como media $\pm$ SD. ....	156
Figura 112 Expresión del gen relativo de los marcadores de cartílago articular ( <i>COL1</i> , <i>COL2</i> ) en los condrocitos derivados de hMSC cultivados en <i>scaffolds</i> fabricados mediante <i>electrospinning</i> . Los valores mRNA de cada gen se normalizaron en GAPDH. Los datos se presentan como media $\pm$ SD. ....	157



---

## **LISTA DE TABLAS**

---



---

## Lista de tablas

---

Tabla 1 Principales productores de ácido poliláctico. ....	19
Tabla 2 Longitudes y ángulos de enlace entre los diferentes átomos de las moléculas de POSS. ....	29
Tabla 3 Cantidad de PLLA y peg-POSS de los diferentes <i>nanocomposites</i> . ....	69
Tabla 4 Condiciones seleccionadas para el proceso de <i>electrospinning</i> . ....	78
Tabla 5 Parámetros de cristalización isotérmica: temperaturas y tiempos de cristalización. ....	89
Tabla 6 Diferentes muestras enviadas al Hospital de Cruces para la realización del cultivo celular. Se incluyen las muestras fabricadas mediante disolución-evaporación y mediante <i>electrospinning</i> . ....	106
Tabla 7 Diferentes films fabricados mediante el proceso de disolución-evaporación. ....	112
Tabla 8 Datos del primer calentamiento de diversas muestras en forma de granza y film. ....	120
Tabla 9 Datos del enfriamiento dinámico de diversas muestras en forma de material de granza y film. ....	122
Tabla 10 Propiedades de los materiales en forma de film y granza: primer barrido. ....	134
Tabla 11 Propiedades del PLLA0 y PLLA5 de los dos grados de material: segundo barrido de calentamiento. ....	137
Tabla 12 Resultados obtenidos en el TGA para los <i>nanocomposites</i> peg-POSS/PLLA. ....	138
Tabla 13 Muestras fabricadas mediante disolución-evaporación para realizar el cultivo celular. ....	146
Tabla 14 pH de cada material tras 72 horas de incubación con el medio de cultivo. ....	146



---

## **ABREVIATURAS**

---



## Abreviaturas

CNC	Control Numérico Computerizado
COL1	Colágeno tipo I
COL2	Colágeno tipo II
DBPS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DC	Corriente continua ( <i>Direct Current</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimetilformamida ( <i>N,N-dimethyl-formamid</i> )
DSC	Calorimetría diferencial de barrido ( <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )
ECM	Matriz extra-celular ( <i>Extra Cellular Matrix</i> )
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
GAG	<i>Glycosaminoglycan Assay</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GC	Cromatografía de gases ( <i>Gas Chromatography</i> )
HA	Hidroxiapatita
hMSC	Células madre mesenquimales humanas ( <i>Human Mesenchymal Stem Cells</i> )
MMT	Montmorillonita
MSC	Células madre mesenquimales ( <i>Mesenchymal Stem Cells</i> )
MWCNT	<i>Multiwalled Carbon Nanotubes</i>
NFES	<i>Near Field Electrospinning</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCL	Policaprolactona ( <i>Polycaprolactone</i> )
PDLA	Ácido poli(D-láctico) ( <i>Poly (D-lactic) acid</i> )
PDLLA	Ácido poli(DL-láctico) ( <i>Poly (DL-lactic) acid</i> )
PEG	Polietilenglicol ( <i>Poly Ethylene Glycol</i> )
PEO	Óxido de polietileno ( <i>Poliethylene Oxide</i> )
PET	Polietilén tereftalato
PLA	Ácido poliláctico ( <i>Polylactic acid</i> )
PLLA	Ácido poli(L-láctico) ( <i>Poly (L-lactic) acid</i> )
POM	Polioximetileno ( <i>Polyoxymethylene</i> )
POSS	<i>Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes</i>
PVD	<i>Physical Vapor Deposition</i>
ROP	Polimerización por apertura de anillo ( <i>Ring Opening Polimerization</i> )

SCNC	<i>Silylated Cellulose Nanocrystals</i>
SEM	Microscopía electrónica de barrido ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
SFF	<i>Solid Freeform Fabrication</i>
TCP	Fosfato tricálcico ( <i>Tricalcium Phosphate</i> )
TFE	Trifluoroetanol ( <i>Trifluoroethanol</i> )
TGA	Termogravimetría
TIPS	<i>Thermally Induced Phase Separation</i>
UE	Unión Europea
UHMWPE	<i>Ultra High Molecular Weight Polyethylene</i>
UK	Gran Bretaña
USA	Estados Unidos
UV	Luz Ultravioleta

---

## **GLOSARIO**

---



## Glosario

$H$	[%]	Humedad
$V$	[kV]	Voltaje
$\emptyset$	[mm]	Diámetro
$d$	[cm]	Distancia
$M_w$	[g mol <sup>-1</sup> ]	Peso molecular
$Q$	[ml h <sup>-1</sup> ]	Caudal de alimentación de la bomba de electrospinning
$\Delta H_c$	[J · g <sup>-1</sup> ]	Entalpía de cristalización
$\Delta H_m$	[J · g <sup>-1</sup> ]	Entalpía de fusión
$\Delta H_m^\circ$	[J · g <sup>-1</sup> ]	Entalpía de fusión del polímero 100% cristalino
$t_{1/2}$	[s]	Tiempo medio de cristalización ( <i>Half time</i> )
$t_p$	[s]	Tiempo de pico de cristalización ( <i>Peak time</i> )
$T$	[°C]	Temperatura
$T_g$	[°C]	Temperatura de transición vítrea
$T_{ic}$	[°C]	Temperatura de cristalización isoterma
$T_c$	[°C]	Temperatura de cristalización (enfriamiento dinámico)
$T_{cc}$	[°C]	Temperatura de cristalización en frío (recristalización)
$T_1$	[°C]	Temperatura inicial de ensayo
$T_2$	[°C]	Temperatura final de ensayo
$T_m$	[°C]	Temperatura de fusión
$T_m^\circ$	[°C]	Temperatura de fusión del polímero 100% cristalino
$\gamma$	[ - ]	Factor proporcional entre espesor lamelar inicial y final
$\chi_c$	[ % ]	Tasa de cristalinidad
$T_{5\%}$	[°C]	Temperatura a la que se pierde el 5% de la masa
$T_{95\%}$	[°C]	Temperatura a la que se pierde el 95% de la masa
$T_{max}$	[°C]	Temperatura a la que se da la máxima pérdida de masa
$\lambda$	[cm <sup>-1</sup> ]	Longitud de onda
$F$	[ N ]	Fuerza
$m$	[mg]	Masa
$\rho$	[g cm <sup>-3</sup> ]	Densidad
$b$	[mm]	Ancho de la probeta
$e$	[mm]	Espesor de la probeta
$l$	[mm]	Longitud de la probeta

$\varepsilon$	[—]	Deformación
$\delta_R$	[—]	Deformación a rotura
$\sigma_y$	[MPa]	Límite elástico
$E$	[GPa]	Módulo de Young
$\nu$	[mPA s]	Viscosidad dinámica

## Capítulo 1

---

### **Introducción**



# 1 INTRODUCCIÓN

La tesis “*Nanocomposites bioabsorbibles para aplicaciones biomédicas*”, ha sido desarrollada dentro del programa de doctorado “Comportamiento mecánico y materiales” del Departamento de Mecánica y Producción Industrial de la Escuela Politécnica Superior de Mondragon Unibertsitatea en el Grupo de Investigación de Tecnología de Plásticos y Compuestos.

## 1.1 *Enmarque de la tesis*

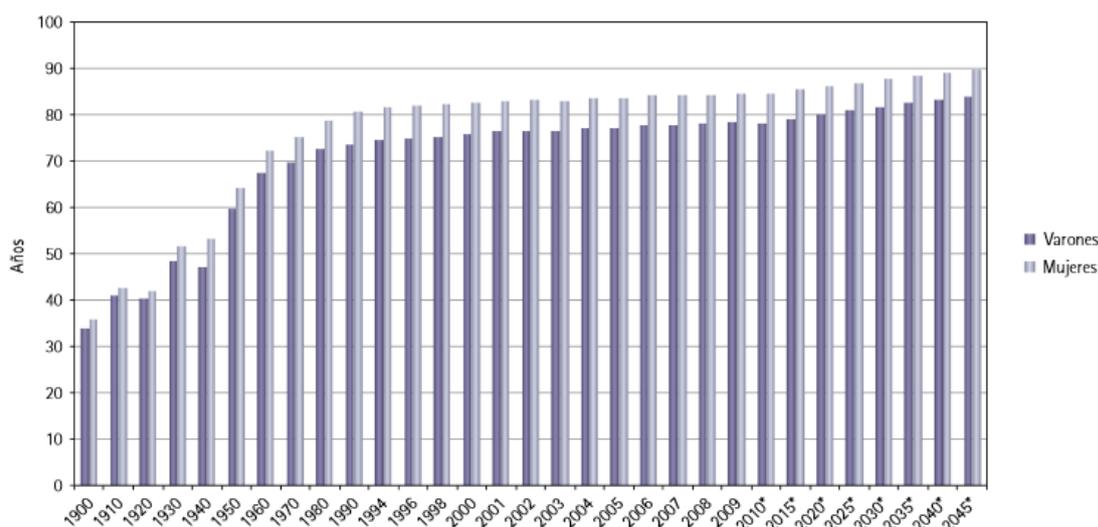
### 1.1.1 **Interés socio-económico en biomedicina**

La evolución de la esperanza de vida a lo largo de los últimos siglos, ha registrado un constante incremento. Esto ha sido posible gracias a mejoras en la alimentación, la higiene, la estabilidad social y la Medicina. Dicho aumento, comenzó con el inicio de la revolución industrial a principios de 1900, que trajo consigo una mayor *renta per cápita*. Esto hizo que la población cambiara de estatus social, abandonando la hambruna y las penurias. Asimismo, a partir de 1950, la estabilidad social y la ausencia de grandes guerras, contribuyeron a que la esperanza de vida pasara en España de 50 años en 1940, a 78 años en 2000 (Figura 1). Paralelamente a todos estos acontecimientos, la Medicina ha contribuido de manera muy relevante en esta evolución, erradicando plagas, epidemias, muertes prematuras y muertes comunes. Algunos avances de la llamada Medicina moderna fueron el descubrimiento de las vacunas a manos del Dr. Edward Jenner y Louis Pasteur a finales del siglo XVIII, y el descubrimiento de los antibióticos y la penicilina a manos de Alexander Fleming, a inicios del siglo XX. Todos estos descubrimientos, han favorecido de manera muy significativa el aumento de la esperanza de vida de las personas.

Sin embargo, el aumento de la esperanza de vida por encima de los 60 años, ha traído un nuevo reto a la Medicina; la necesidad de incrementar los años de vida saludables, con una demanda de mayor calidad de vida, asociada a la autonomía individual, familiar y social. Es decir, es tan importante y necesario vivir más tiempo como vivir mejor durante ese tiempo. Por otro lado, el aumento en la calidad de vida ha influido culturalmente en una mayor práctica del deporte. Esta mayor práctica del deporte se ha dado tanto a nivel amateur por diversos motivos (mejora de la salud y del bienestar, culto a la belleza, deportes recreativos, etc.), como a nivel de la alta competición, siendo este segundo aspecto un poderoso mercado a nivel mundial, y por lo tanto una importante y jugosa parcela de negocio.

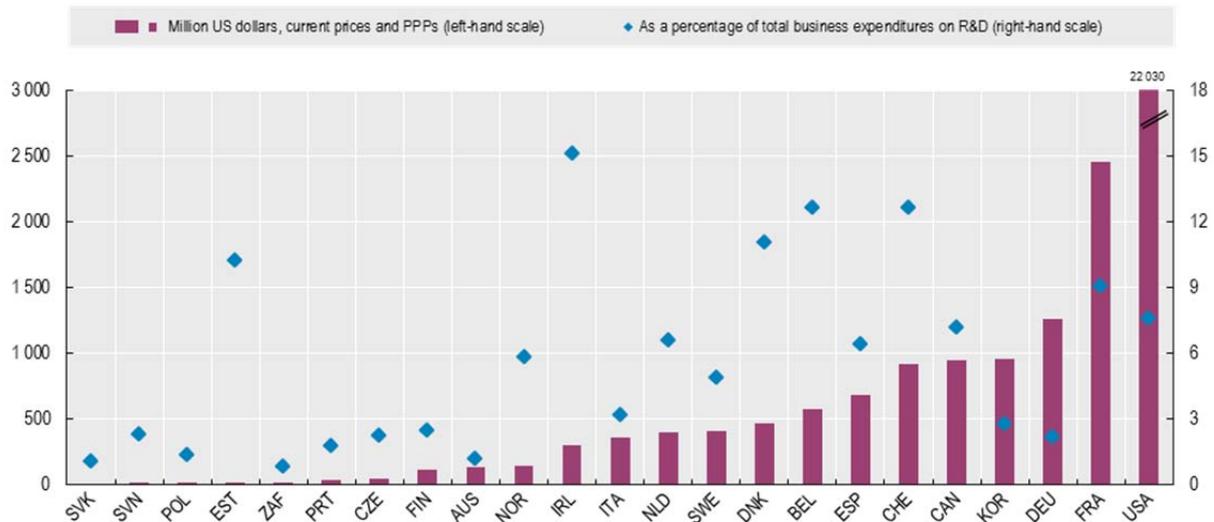
En ambos casos se ha producido un aumento en el número de las lesiones traumatológicas, por lo que cobra especial importancia la investigación de nuevos tratamientos y técnicas de curación más sofisticados, más económicos, con un menor tiempo de recuperación y de mayor fiabilidad, que garanticen el éxito del tratamiento. Se podría resumir que el incremento de la esperanza de vida y sus consecuencias en forma de aumento de calidad de vida, proporcionan una transición epidemiológica, caracterizada por un mayor impacto de las enfermedades traumatológicas, neurológicas y oncológicas entre otras, sobre la salud de la población.

*Esperanza de vida al nacer por edad y sexo, 1900-2045*



**Figura 1** Evolución de la esperanza de vida al nacer en España, por edad y sexo (1900-2045\*) [IMSER]. Las fechas marcadas con asterisco son proyecciones.

El coste asociado al tratamiento y seguimiento de estas patologías, así como la carga negativa derivada en malestar físico, mental y social de los individuos, genera pérdidas millonarias cada año en los países con salud pública universal garantizada. Este hecho, ha sido uno de los precursores de políticas económicas para el desarrollo de nuevas técnicas y procedimientos avanzados, con el fin de conseguir un aumento de los años de vida saludable y con calidad del paciente. Muchas de estas técnicas se basan en nuevos sistemas y nuevos procedimientos, el uso de nuevos materiales, diagnóstico precoz de enfermedades, controles y tratamientos más precisos y efectivos, y de menor coste económico. Para la consecución de estos objetivos, los gobiernos de los diferentes estados, así como diferentes organismos internacionales, como por ejemplo, los Programas Marco de la Unión Europea, han aportado grandes cantidades de dinero para el desarrollo de estas tecnologías embarcadas en el sector biotecnológico, desde 1980. En la Figura 2 se muestra como ejemplo, la inversión realizada en proyectos biotecnológicos para el 2010, respecto al total del PIB de cada estado. Uno de los desarrollos más importantes de los últimos años en este sector, ha venido de la mano de la Bioingeniería.



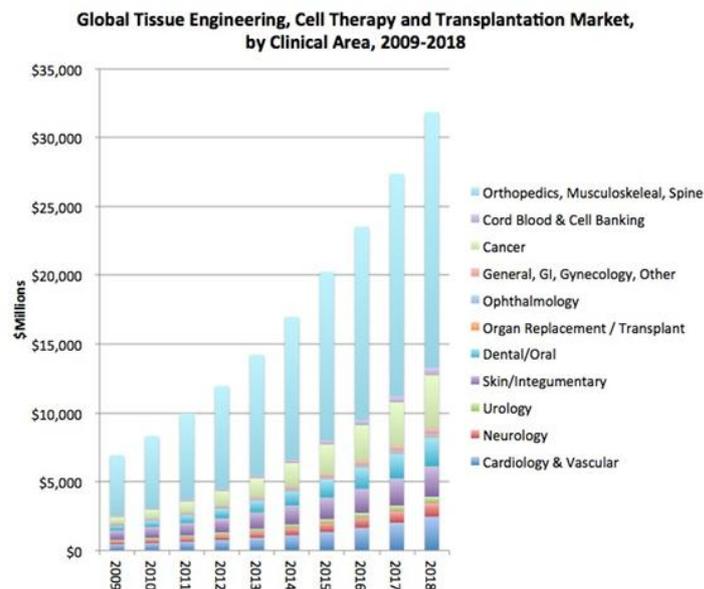
**Figura 2** Inversión realizada por cada país en Biotecnología (2010) [OECD].

La Bioingeniería es probablemente una de las áreas de conocimiento actuales más emergente, que abarca desde la investigación con células madre hasta el desarrollo de modelos bio-mecánicos, pasando por la síntesis de nuevos materiales e incluso por la bioinformática. De ahí, que se presenta la necesidad de compartir conocimientos y crear equipos de trabajo multidisciplinarios que incorporen ciencias o especialidades como la Medicina, Biología, Ingeniería, Ciencia de Materiales, Química e Informática entre otras. Dentro de la Bioingeniería merece mención aparte, por la importancia que ha cobrado en la actualidad, la Medicina Regenerativa (Ingeniería de Tejidos).

En los últimos años la Medicina Regenerativa (especialidad que aplica los principios de la Ingeniería y las Ciencias de la vida en la fabricación de sustitutos biológicos para mantener, restaurar o mejorar la función de órganos y tejidos en el cuerpo humano) ha ido tomando cada vez más interés en el panorama mundial, principalmente debido a los nuevos horizontes que se le han ido abriendo gracias a la colaboración entre diferentes áreas de conocimiento, y a los avances particulares logrados en estas áreas. La creación de un equipo de trabajo multidisciplinar entre investigadores del campo de la Medicina y de la Ingeniería, ha posibilitado el poder compartir y generar nuevos conocimientos, aplicándolos de esta manera a la obtención de productos destinados a la salud y a la calidad de vida de los ciudadanos.

Entre los diferentes campos existentes dentro de la Medicina Regenerativa uno de los que mayor interés suscita es la Ingeniería de Tejidos de lesiones traumatológicas, debido a que implica el uso de biomateriales. Este dominio pretende superar las dificultades causadas por la escasa capacidad de auto-regeneración del propio tejido, la falta de donantes de tejido sano y los problemas de incompatibilidad donante-receptor, mediante el cultivo de células tanto del propio paciente como mesenquimales, en soportes poliméricos porosos, con el fin de

implantarlos e integrarlos dentro del organismo. En la Figura 3 se puede observar el importante volumen de mercado del área clínica de la Ingeniería de Tejidos Traumatológica respecto a otras áreas clínicas. Asimismo, se aprecia también una previsión del importante crecimiento del mercado de la Ingeniería de Tejidos para esta década.



**Figura 3** Mercado global de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Transplantes [MEDM]. Clasificado por áreas clínicas (2009-2018).

### 1.1.2 Ingeniería de Tejidos - Medicina Regenerativa

La Ingeniería de Tejidos combina los conocimientos de la Ciencia de Materiales con la Biología Molecular y Celular. El vertiginoso desarrollo de nuevas aplicaciones en la Medicina se debe en gran medida al avance en la síntesis de nuevos biomateriales y al descubrimiento y la modificación de otros que ofrece la naturaleza. En paralelo, estas nuevas aplicaciones y materiales requieren muchas veces de nuevas técnicas de transformación o conformado adaptadas a sus necesidades de higiene, formas y acabados.

Uno de estos avances es el que se ha llevado a lo largo de los últimos años en el campo médico de las células madre o células indiferenciadas. Hoy en día es posible trasplantar células en el paciente, para curar en cierto modo enfermedades como la leucemia, o para sustituir o reparar lesiones en los tejidos, que de otro modo serían difíciles de curar. La necesidad del uso de las células madre radica en que algunos tejidos del cuerpo humano como el cartílago presentan una escasa capacidad de auto-regeneración, y sólo pueden ser curados por medio de este tipo de técnicas. Cabe destacar que ésto ocurre para algunos tejidos (principalmente tejidos del sistema ortopédico y musculo-esquelético), ya que la mayoría de tejidos de un individuo adulto poseen una población específica propia de células madre que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce algún daño tisular.

El trasplante de células madre se realiza mediante el uso de biomateriales estructurales, muy adecuados para el trasplante de tejidos del sistema musculoesquelético. La metodología de la Ingeniería de Tejidos es la siguiente (Figura 4): primeramente se cultivan las células madre *in vitro* sobre un soporte poroso llamado *scaffold*; las células se introducen en los poros del *scaffold* y se adhieren a las diferentes superficies internas y externas, y proliferan (se dividen en más células); se añaden factores de crecimiento específicos y éstas se diferencian en el tipo de células que se quieran obtener. Una vez llegados a este punto, el conjunto entero se introduce en el lugar dónde existe el defecto dentro del paciente, para lograr así la regeneración del tejido dañado. El soporte debe desaparecer progresivamente del cuerpo humano según el tejido celular va colonizando la zona. Para ello el material debe cumplir ciertos requisitos, siendo los principales los de biocompatibilidad y biodegradabilidad, conllevando que sus productos de deshecho sean no tóxicos y bioabsorbibles.

Un requisito importante del material, y por lo tanto del *scaffold*, es tener unas propiedades mecánicas adecuadas, con el fin de mantener la integridad estructural del sistema hasta la completa expansión del tejido. El material no siempre resiste grandes cargas, por lo que tras estudiar su microestructura, muchas veces se suele mezclar con otros aditivos para mejorar sus propiedades mecánicas. Estos aditivos también se suelen utilizar para mejorar otras propiedades como la resistencia térmica, necesaria para reducir la degradación térmica que se pudiese dar durante el procesado de estos materiales por métodos de fabricación por fundido, y el tiempo de biodegradación. En general, se podría decir que desde el punto de vista de los biomateriales, mezclando los aditivos adecuados al material base, se podrían obtener *composites* a la carta con propiedades mejoradas para ser utilizados en diversas aplicaciones celulares dentro del ámbito de la ingeniería de tejidos.

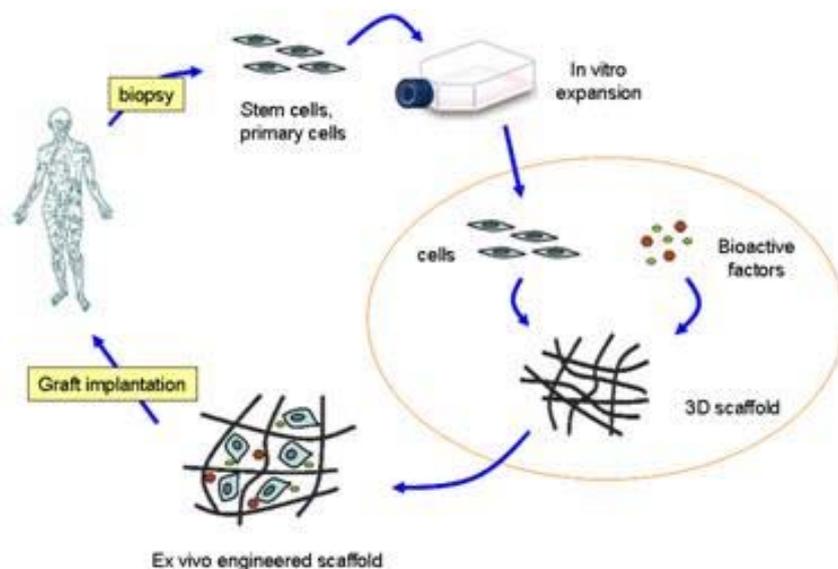
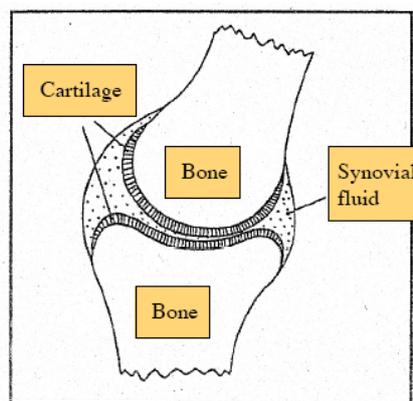


Figura 4 Metodología de Ingeniería de Tejidos [NUHS].

## 1.2 Estado del arte

### 1.2.1 Antecedentes en la regeneración del tejido cartilaginoso

El presente trabajo de investigación, desde el punto de vista médico, trata sobre la regeneración del tejido cartilaginoso, si bien no se contempla una situación en la que sólo se estudie el cartílago de manera aislada ya que junto a hueso y líquido sinovial forman el sistema de la articulación natural (Figura 5), por lo que el estado del cartílago depende también en gran medida del estado del hueso y viceversa [Cancedda2003].



**Figura 5** Componentes de la articulación natural.

El hueso es un tejido vivo que reconstruye continuamente su estructura. Gracias a su capacidad de regeneración espontánea, la mayoría de lesiones óseas, como fracturas, se solucionan adecuadamente con una terapia convencional. Sin embargo, en el caso de grandes defectos o deformidades óseas congénitas, puede que fuera necesario el uso de injertos o sustitutos del hueso para ayudar a la curación. De manera similar, en el caso de que hubiese una separación de la zona articular respecto de la capa ósea, o de grandes defectos osteocondrales, sería necesario el uso de una prótesis artificial [Cancedda2003].

Para el tratamiento de lesiones óseas, tradicionalmente se han utilizado estrategias como el trasplante de hueso. Este procedimiento es adecuado debido a que facilita la integración y evita en parte el rechazo del cuerpo. Sin embargo presenta el inconveniente de tener un largo tiempo de recuperación. Los trasplantes de este tipo pueden ser auto- (material tomado del propio paciente), alo- (de un cadáver) o xenoinjertos (de un animal). Otra estrategia utilizada es la del uso de biomateriales como metales (prótesis de titanio), cerámicas fosfo-cálcicas o hidroxiapatita (HA) (Figura 6).



**Figura 6** Bloque de hidroxiapatita.

La lesión focal de cartílago producida por trauma generalmente ocurre durante la actividad deportiva. Los defectos focales pueden ser tanto condrales como osteocondrales. Las lesiones condrales, en principio no afectan al hueso subcondral que permanece bajo el cartílago, por lo que al no estar involucrados los vasos sanguíneos subcondrales las lesiones no curan espontáneamente. Sin embargo, en los defectos osteocondrales las células mesenquimales condroprogenitoras pueden invadir la lesión y formar cartílago que penetre hacia el hueso subcondral vascularizado, pudiendo ocurrir cierta reparación espontánea [Cancedda2003].

El cartílago se puede reemplazar mediante alguna de las siguientes técnicas:

- a) Un trasplante total proveniente de un cadáver (aloinjerto) o mediante pequeños fragmentos de alguna región de la articulación con menor carga aplicada (autoinjerto).
- b) Mediante la creación de un defecto que penetre totalmente el hueso subcondral. Este defecto se crea mediante abrasión o taladrado. Se crea así un coágulo sobre la superficie ósea que dejándolo sin carga puede proporcionar un *scaffold* natural para la migración de células madre mesenquimales desde el hueso y su diferenciación en condrocitos y osteocitos [Temenoff2000].
- c) Mediante otros tratamientos como la estimulación eléctrica o por láser, *Continuous Passive Motion* (CPM) [CPM].
- d) Mediante el uso de agentes farmacológicos, que representan técnicas menos invasivas para regenerar el cartílago [Temenoff2000].

Las lesiones osteocondrales se solucionan mediante injertos de forma cilíndrica (Figura 7) obtenidos de una zona de la articulación sometida a menor carga e implantados en agujeros previamente taladrados en la zona del defecto [Van2000]. Este tipo de trasplantes puede ser autólogo o tratarse de aloinjertos.



**Figura 7** Injerto óseo cilíndrico esponjoso [INJ].

En los últimos años se ha optado por la prometedora vía del empleo de *scaffolds* o soportes celulares (Figura 8) para solucionar los defectos óseos y cartilagosos [Hunziker2002]. Esta vía tiene un gran potencial de investigación ya que desde el punto de vista de los materiales existen muchísimas combinaciones con diversas propiedades, así como diferentes geometrías que van a depender de los requerimientos de cada tipo de aplicación. Esto, unido al aumento de problemas relacionados con el envejecimiento causado por el aumento de las expectativas de vida de la población, le depara un interesante futuro como alternativa a las técnicas de trasplante alo- o autólogo convencionales [Hutmacher2003, Calvert2003].



**Figura 8** Scaffold polimérico.

En este procedimiento las células recolectadas del tejido donante, que pueden ser células madre embrionarias (pluripotenciales) o células madre adultas (multipotenciales), se cultivan *in vitro* y se asocian a biomateriales absorbibles (*scaffolds*) de origen natural y/o sintético que se implantan en el lugar del defecto. Mediante una óptima interacción entre el implante y el tejido huésped se logra la regeneración del tejido dañado, mientras que el material del implante es reabsorbido por el organismo. Se pueden utilizar factores bioactivos para estimular el crecimiento del tejido y la diferenciación celular mediante dos estrategias. La primera de ellas consiste en tratar *in vitro* las células mesenquimales con factores de crecimiento y de diferenciación antes de ser implantadas. La segunda consiste en introducir esos factores en el propio *scaffold* para que sean liberados según éste se vaya biodegradando [Wozney2004].

En el caso particular del cartílago, la técnica del *scaffold* se utiliza en el tratamiento de lesiones traumáticas articulares y en el tratamiento de la pérdida de tejido causada por osteoartritis [Tuli2003]. Además mediante esta técnica se pueden tratar los defectos generados tanto por lesiones traumáticas, lesiones quirúrgicas o lesiones degenerativas.

### 1.2.2 Materiales utilizados en la biomedicina

Los materiales destinados a la ingeniería de tejidos son los llamados biomateriales, y su característica más importante es la biocompatibilidad. Según la definición del *The Williams Dictionary of Biomaterials* [WILL], biocompatibilidad es “*la capacidad de un material de ser utilizado con una respuesta apropiada del tejido receptor en una aplicación específica*”. Por lo tanto, se entendería como *respuesta apropiada* el no perjudicar el entorno biológico ni resultar tóxico para los tejidos. Partiendo del concepto de biocompatibilidad, se podría realizar una distinción más concreta del comportamiento del material frente a los tejidos biológicos, pudiendo ser bioinertes o bioactivos.

- Bioinertes: Este comportamiento del material se basa en la ausencia de respuestas de cualquier tipo del tejido en el que se implanta. No existe ni rechazo ni ningún tipo de interacción biológica del material con el tejido; es decir, el material pasa totalmente desapercibido. Esto ocurre habitualmente con las prótesis de titanio o los implantes de cadera de UHMWPE.
- Bioactivos: Permiten y favorecen el crecimiento del tejido en contacto con el material. Se podría decir que estos materiales inducen una actividad biológica específica del tejido vivo y estimulan la biocompatibilidad.

A su vez, los biomateriales pueden ser clasificados de varias maneras. Según la definición del *The Williams Dictionary of Biomaterials* [WILL], orgánico se definiría como “*sustancia química que contiene carbono*”. Según ésto, los biomateriales pueden contener carbono o no, por lo que se podrían definir como orgánicos, inorgánicos o como una mezcla de ambos llamada híbridos. Por lo tanto, una de las clasificaciones sería según el tipo de biomaterial: poliméricos (orgánicos), cerámicos (inorgánicos), metálicos (inorgánicos) o *composites*/híbridos (orgánicos-inorgánicos).

- Biopolímeros: El origen de estos biomateriales puede ser a partir de derivados del petróleo (sintéticos) o a partir de fuentes renovables naturales. Existe un gran abanico de polímeros destinados a aplicaciones biomédicas. Esto es debido en parte a su comportamiento biocompatible y biodegradable, a su baja densidad, a sus relativamente buenas propiedades mecánicas y a su facilidad de procesado.

- **Biocerámicas:** Estos biomateriales son biocompatibles, pudiendo ser bioinertes (circonio y alúmina) o bioactivos (vitrocerámica e hidroxiapatita). Presentan muy buenas propiedades mecánicas, ya que tienen una gran rigidez, dureza y resistencia al desgaste, aunque son frágiles. También presentan una buena estabilidad química y resistencia a la corrosión.
- **Metálicos:** Los materiales metálicos son los que mejores propiedades mecánicas presentan, mejorando la resistencia frente al impacto de las biocerámicas. Sin embargo presentan problemas de corrosión y tienen mayor densidad que los biopolímeros. Son escasos los metales biocompatibles y biodegradables, siendo el magnesio un ejemplo de este grupo [Witte2007a,Witte2007b]. Sin embargo, existen diversos metales biocompatibles no-biodegradables que se han utilizado tradicionalmente en la fabricación de prótesis (titanio, aceros de bajo contenido en carbono, aceros 316).
- **Composites:** Estos materiales son mezcla de los tres tipos de biomateriales anteriores, y pretenden aprovechar las ventajas de cada grupo para superar sus puntos débiles, sin perder la biocompatibilidad. Ejemplos de este grupo son los *composites* biopoliméricos (biopolímero+biocerámica), las cerámicas metal-carbono y las aleaciones intermetálicas complejas. Su mayor desventaja es el coste de síntesis y la dificultad del procesado.

Otra forma de clasificación podría ser según su comportamiento frente a la degradación en el tiempo: no degradables, biodegradables o reabsorbibles.

- **No degradables:** Estos materiales no pierden su integridad física a lo largo del tiempo, y se mantienen en condiciones parecidas a las del principio. Se quedarían de modo permanente dentro del cuerpo, y haría falta una posterior intervención quirúrgica para extraerlos.
- **Biodegradables:** Estos materiales se degradan con el tiempo y en las condiciones fisiológicas humanas, es decir, ambiente húmedo, pH alrededor de 7,2 y temperatura cercana a los 37 °C. Este tipo de degradación sería biodegradación hidrolítica. En algunos materiales como los biopolímeros, la biodegradación no sólo podría ocurrir de esta manera, sino que también podría ser enzimática. Una gran ventaja es que estos biomateriales desaparecerían con el tiempo, evitando así segundas intervenciones.
- **Reabsorbibles:** Este tipo de degradación es muy parecida a la de los biodegradables. También ocurre, como en el caso anterior, una biodegradación hidrolítica y/o enzimática, pero en este caso, los productos de deshecho son asimilados y metabolizados totalmente y sin peligro alguno para el organismo.

En el presente trabajo se ha decidido trabajar con materiales biopoliméricos para desarrollar los *biocomposites* por varias razones; la primera de ellas es que se trata de un grupo de biomateriales ampliamente utilizados y de manera exitosa en el sector de la ingeniería de tejidos. Son muchos los biopolímeros que se han estudiado o utilizado para aplicaciones biomédicas, y muchos también los *biocomposites* desarrollados basados en biopolímeros con resultados satisfactorios, por lo que la bibliografía es amplia. Esto nos va a permitir contar con abundantes datos comparativos para obtener la homologación del material de una manera más sencilla, de cara a una posterior comercialización del producto. Cabe destacar que los biopolímeros forman parte de un gran mercado, y son relativamente baratos. Son fáciles de procesar y presentan unas adecuadas propiedades mecánicas. También son fácilmente modificables, como en los tratamientos de biofuncionalización superficial, y permiten obtener una gran variedad de *composites*. Por otro lado, los biopolímeros con los que se va a trabajar van a ser biodegradables para cumplir el principal requisito de biodegradabilidad que exige su aplicabilidad como *scaffolds*.

### 1.2.2.1 Polímeros biodegradables

Durante los últimos años, el desarrollo de nuevos materiales poliméricos biodegradables se ha convertido en una necesidad para ser utilizados en un amplio rango de novedosas aplicaciones en la industria. La mayor concienciación medioambiental establecida en nuestra sociedad ha causado que este mercado haya progresado hacia los polímeros derivados de fuentes renovables, disminuyendo la dependencia de los polímeros derivados del petróleo. La preocupación por la sostenibilidad medioambiental ha causado también la necesidad de reducir la producción de basura, y ha hecho que los polímeros biodegradables hayan pasado a ser ampliamente utilizados hoy en día.

La clasificación de los polímeros que se presenta en este apartado se ha realizado según su método de degradación: hidrolíticamente (mediante reacción química simple con el agua o la humedad) o enzimáticamente (mediante estructuras biológicas protéicas que inducen complejas reacciones químicas) [Nair2007].

En la bibliografía se observa que la clasificación de los polímeros empleados en medicina regenerativa también se puede hacer en base a su naturaleza. En tal caso se clasificarían como polímeros naturales o sintéticos [Puppi2010]. Dentro de la categoría de polímeros naturales entrarían las proteínas, los polisacáridos y los poliésteres de origen microbiano. En la categoría de polímeros sintéticos entrarían los polímeros restantes, es decir, los derivados del petróleo y los renovables.

En el caso concreto de la regeneración de cartílago, en la actualidad la mayoría de los *scaffolds* poliméricos empleados son biodegradables aunque también existen algunos

materiales no degradables que cumplen igualmente con la condición de biocompatibilidad [Seal2001]. En la siguiente lista se muestran los polímeros más comunes utilizados para la fabricación de *scaffolds* biodegradables, incluyendo un apartado con los no degradables:

**a. Polímeros biodegradables**

*a. Polímeros degradables hidrolíticamente*

- i. Poly( $\alpha$ -esters)
  1. Polyglycolide (PGA)
  2. Polylactides (PLA)
    - a. Poly(L-lactide) (PLLA)
    - b. Poly(D-lactide) (PDLA)
    - c. Poly(DL-lactide) (PDLLA)
  3. Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)
  4. Polydioxanone (PDS)
  5. Polycaprolactone (PCL)
  6. Poly(trimethylene carbonate) (PTMC)
  7. Bacterial polyesters (microorganismo)
    - a. Polyhydroxyalkanoates
      - i. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB)
      - ii. Poly-3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate (PHBV)
- ii. Polyurethanes (PUR)
- iii. Poly(ester amide) (PEA)
- iv. Poly(ortho esters) (POE)
- v. Polyanhydrides
- vi. Poly(anhydride-co-imide)
- vii. Cross-linked polyanhydrides
- viii. Poly(propylene fumarate) (PPF)
- ix. Pseudo poly(amino acid)
- x. Poly(alkyl cyanoacrylates)(PCA)
- xi. Polyphosphazenes
- xii. Polyphosphoester

*b. Polímeros degradables enzimáticamente*

## i. Proteins and Poly(amino acids)

1. Collagen
2. Natural poly(amino acids)
3. Synthetic poly(amino acids)
  - a. Poly(L-glutamic acid)
  - b. Poly(aspartic acid)
4. Elastin
5. Elastin-like peptides (ELP)
6. Albumin
7. Fibrin
  - a. Silk fibroin

## ii. Polysaccharides

1. Polysaccharides of human origin
  - a. Hyaluronic acid (HA)
  - b. Chondroitin sulfate (CS)
2. Polysaccharides of non-human origin
  - a. Chitosan and its derivative “chitin”
  - b. Alginates-alginic acid
  - c. Starch-based materials
  - d. Cellulose
  - e. Dextran

**b. Polímeros no degradables [Seal2001]**

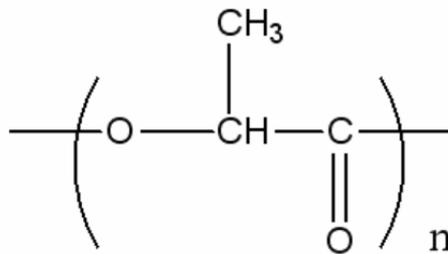
- i. Poly(vinyl alcohol)
- ii. Polyacrylates
- iii. Poly(N-isopropylacrylamide)
- iv. Polyethylene

Entre los polímeros que se muestran en esta lista se va a destacar el ácido poliláctico (PLA), concretamente el que contiene un alto porcentaje de L-lactida, es decir, el ácido poli(L-láctico) (PLLA). El PLLA es un polímero termoplástico ampliamente utilizado en diversos

mercados. Se caracteriza principalmente por sus propiedades biodegradables, típicamente deseables para la mayoría de aplicaciones. También presenta propiedades biocompatibles y bioabsorbibles, que lo hacen ideal para aplicaciones biomédicas. Además, es un material ecológico obtenido de fuentes renovables, y no deja ningún resto en la naturaleza al biodegradarse. El PLLA también presenta una buena resistencia mecánica y rigidez [Tsuji2005]. En la literatura la mayoría de *scaffolds* biodegradables están fabricados o se fabrican a partir de PLLA, lo que lo convierte en una apropiada referencia para diseñar y fabricar *scaffolds nanocomposites* para la regeneración de cartílago.

### 1.2.2.2 Ácido poliláctico (PLA)

El ácido poliláctico (PLA) es un biopolímero termoplástico, perteneciente a la familia de los poliésteres alifáticos; cuya molécula precursora es el ácido láctico. La estructura química del PLA se muestra en la Figura 9. Debido a su biodegradabilidad, propiedades barrera y biocompatibilidad, este biopolímero ha encontrado numerosas aplicaciones ya que presenta un amplio rango de propiedades dependientes de su microestructura, variando ésta desde el estado amorfo hasta el estado semicristalino. Por lo tanto, la microestructura y las propiedades pueden modificarse manipulando las mezclas entre los isómeros D (-) y L (+), los pesos moleculares y la copolimerización [Lunt1998]. En los siguientes párrafos se muestran el proceso de obtención, estructura, propiedades, aplicaciones e información general acerca de la producción global de PLA.



**Figura 9** Formulación del ácido poliláctico.

La obtención del ácido poliláctico generalmente ocurre en dos etapas: en la primera se realiza la síntesis del ácido láctico y en la segunda la polimerización.

La síntesis del ácido láctico ha sido ampliamente estudiada y desarrollada. El primer paso en el proceso es la extracción del almidón de la biomasa. Industrialmente se utilizan como sustratos:

- a) Lactosa, proveniente de lactosuero.
- b) Sacarosa, proveniente de azúcar de caña y remolacha azucarera.

- c) Dextrosa, procedente del almidón de maíz hidrolizado.
- d) Lignocelulosa, proveniente de desechos industriales de la madera y de la biomasa.

La sacarosa refinada y glucosa son los más utilizados [Zhang2007]. Los monómeros de ácido láctico son obtenidos por proceso de fermentación por medio de ciertos microorganismos como se detalla en el siguiente párrafo.

Para la extracción del almidón proveniente de productos no refinados se realiza un molido húmedo. El almidón obtenido se convierte en azúcar por hidrólisis enzimática o ácida, tras lo cual es fermentado mediante bacterias. *Lactobacillus delbrueckii* [Tanaka2006] es el microorganismo utilizado en la producción industrial, ya que tiene la ventaja de consumir eficientemente glucosa y ser termófilo con temperatura óptima de crecimiento en el rango de 45 a 62 °C, lo que reduce costes de enfriamiento y esterilización, así como riesgos de contaminación microbiológica en el fermentador. También se han utilizado otros microorganismos como *Rhizopus fungi* [Zhang2007] para realizar la fermentación con ciertas ventajas frente a la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* como características amilolíticas (conversión del almidón en azúcar) y bajo requerimiento de aporte de nutrientes.

En el método de obtención comercial al sustrato se le adiciona una fuente de vitaminas y de cofactores, se utiliza una mezcla de 10-15% de glucosa, CaCO<sub>3</sub>, cantidades menores de fosfato de amonio y extracto de levadura. El medio se inocula y se agita sin aireación para optimizar la neutralización del ácido formado. La fermentación dura entre 2 a 4 días y se termina cuando todo el azúcar es consumido, con el fin de facilitar la purificación. Al final de la fermentación el medio es ajustado a un valor de pH=10 y calentado para solubilizar el lactato de calcio y coagular proteínas presentes. Posteriormente el medio se filtra para remover sustancias insolubles, así como biomasa. Después de concentrar por evaporación, el ácido libre se obtiene por adición de ácido sulfúrico seguido de filtración para remover el sulfato de calcio formado.

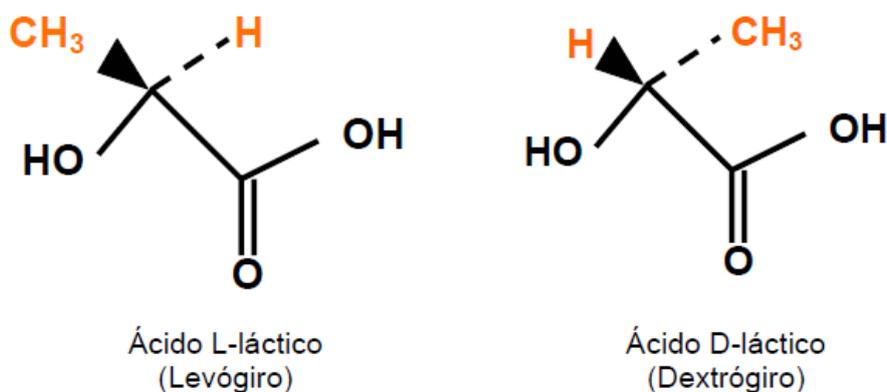
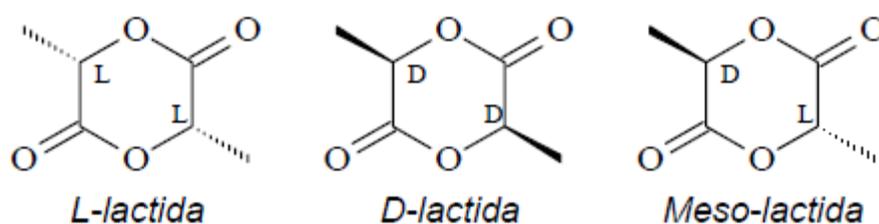


Figura 10 Estructura molecular de los estereoisómeros del ácido láctico.

El ácido láctico, ácido 2-hidroxipropanoico, es el ácido carboxílico más simple con un átomo de carbono asimétrico. En el proceso de fermentación se producen dos enantiómeros ópticamente activos (Figura 10), denominados ácidos lácticos L (+) ó D (-) gracias a la presencia de este átomo de carbono. La producción específica de cada enantiómero puede determinarse utilizando el lacto-bacilo apropiado [Narayanan2004]. El dímero cíclico que se obtiene posteriormente, es decir, el láctido o láctida, puede presentarse como: L-láctida (dos unidades de L-lactato), D-láctida (dos unidades D-lactato) ó meso láctida (una unidad de L-lactato y otra de D-lactato) (Figura 11). La diferencia entre la L-láctida y la D-láctida es que el plano de luz incidente rota en un polarímetro a izquierda (levógiro) y a derecha (dextrógiro) respectivamente.



**Figura 11** Diferentes configuraciones ópticas de la láctida.

La conversión alcanza en general valores por encima del 95% en sustrato de carbohidratos. La fermentación puede realizarse tanto en procesos continuos como por lotes. El ácido láctico debe separarse del cultivo fermentable y purificarse antes de la polimerización en la mayoría de los casos. Los procesos de purificación más comunes involucran neutralización con bases seguido por filtración, concentración y acidificación.

Se han desarrollado dos vías fundamentales para convertir el ácido láctico en polímeros de alto peso molecular (Figura 12): el proceso indirecto vía láctido, cuyo producto se denomina poliláctido, y el proceso directo de polimerización por policondensación, produciendo ácido poliláctico. Ambos productos son agrupados bajo la denominación PLA.

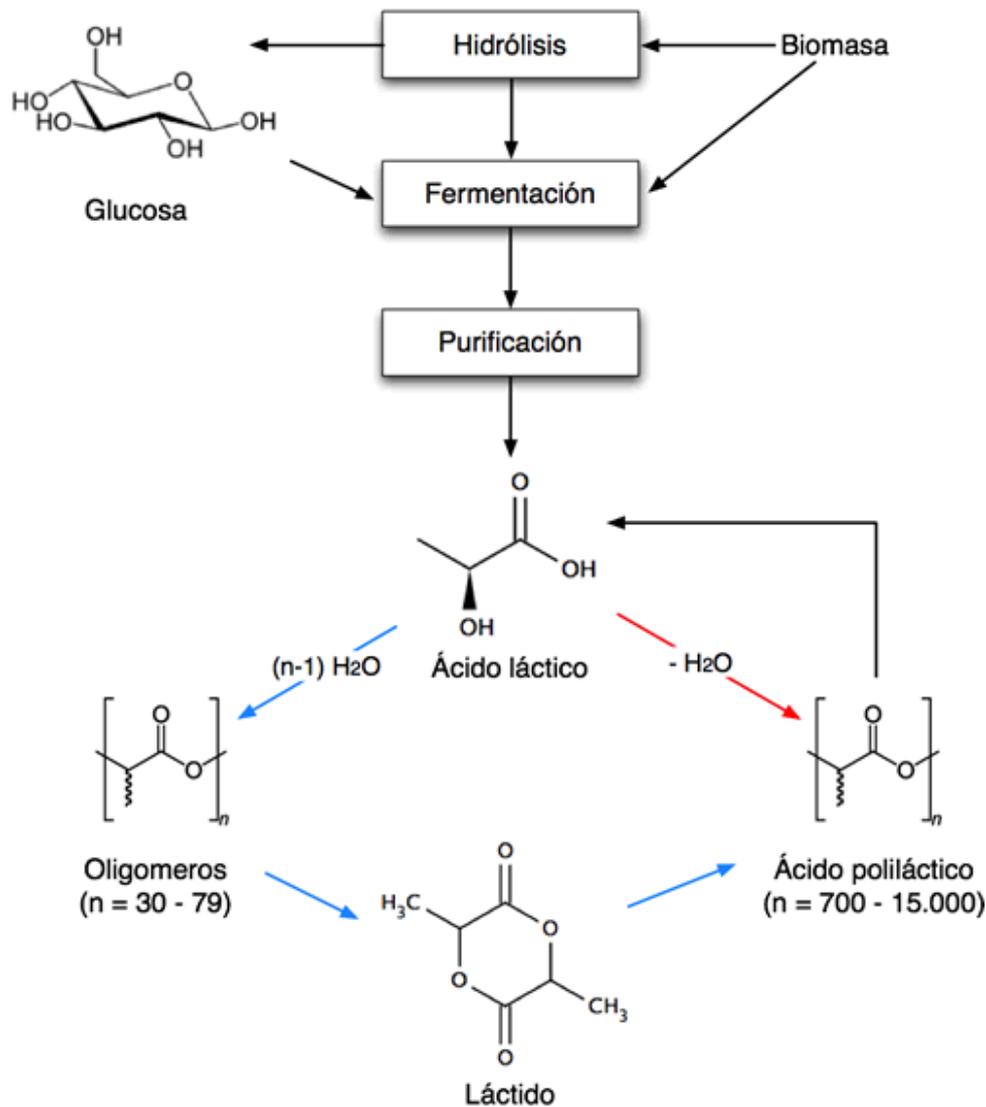


Figura 12 Vías para la polimerización del ácido poliláctico.

El primer camino, empleado por Cargill Dow [Vink2003,Lunt1998], es un proceso continuo utilizando polimerización por apertura de anillo (ROP) del láctido. La condensación del ácido láctico acuoso produce un prepolímero (oligómero) de bajo peso molecular. El prepolímero se depolimeriza incrementando la temperatura de policondensación, reduciendo la presión y utilizando un catalizador organometálico, resultando en una mezcla de estéreo isómeros de láctido. La mezcla de láctidos es purificada por destilación al vacío, puesto que su composición determina las propiedades del producto final. En el paso final, el polímero de alto peso molecular se produce por polimerización catalítica por apertura del anillo del diláctido. Los monómeros remanentes se remueven por vacío y se reciclan.

En la segunda vía, utilizada por Mitsui Chem [Lunt1998], el ácido láctico es policondensado directamente en polímeros de alto peso molecular, manipulando el equilibrio entre: ácido láctico, agua y ácido poliláctico en un solvente orgánico.

Las propiedades físicas y mecánicas, farmacéuticas y de reabsorción dependen de la composición del polímero, de su peso molecular y de su cristalinidad [Lunt1998]. La cristalinidad puede ajustarse desde un valor de 0 a 40% en forma de homopolímeros lineales o ramificados, y como copolímeros al azar o de bloque.

La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) está alrededor de 60 °C para el PLA amorfo y entre 130-180 °C para el PLA semicristalino [Lunt1998], y depende de la proporción de D o L ácido láctico en el polímero. Sin embargo, el PLA puede ser plastificado con su monómero o alternativamente con ácido láctico oligomérico, lo que permite disminuir la  $T_g$ .

El PLA tiene propiedades mecánicas en el mismo rango de los polímeros sintéticos, a excepción de una baja deformación a rotura [Sarasua2005,Nampoothiri2010]. Sin embargo, esta propiedad puede ser mejorada durante la polimerización mediante copolimerización o por modificaciones post-polimerización como por ejemplo, la adición de plastificantes.

Se pueden conseguir poliláctidas ópticamente puras, poli-L-láctida (PLLA) y poli-D-láctida (PDLA) que resultan ser polímeros semicristalinos [Vasanthakumari1983, Miyata1998] con idénticas propiedades químicas y mecánicas. Si hay una distribución irregular en las cadenas, copolímeros de L y D, se obtienen poliláctidas estéreo-irregulares cuyo porcentaje de cristalización disminuye con la pureza óptica [Huang1998, Sarasua1998]. Las poliláctidas ópticamente inactivas, formadas por una distribución aleatoria en la cadena (copolímeros atácticos) resultan ser completamente amorfas (PDLLA) con propiedades mecánicas y tiempos de degradación inferiores a las poliláctidas semicristalinas [Chen2003, Andreopoulos1999].

El PLA tiene potenciales usos en la industria alimenticia, química, farmacéutica, del plástico, textil, la agricultura, etc. aunque actualmente se utiliza para dos aplicaciones principalmente: envase y embalaje, y aplicaciones biomédicas. Esto es debido gracias a sus buenas propiedades mecánicas (polímero relativamente rígido y frágil con una baja deformación a la ruptura), su carácter biocompatible y bajo coste.

La aplicación más habitual del PLA es en envase y embalaje de alimentos y producción de películas para la protección de cultivos en estadios primarios. Como se ha comentado anteriormente, es debido gracias a sus buenas propiedades mecánicas, su carácter biocompatible y bajo coste. Sin embargo, el alto crecimiento fúngico (hongos) en los materiales obtenidos de bases biodegradables es un factor negativo para el uso en alimentos. Por lo tanto el bioempaquetado es más conveniente para alimentos con alta respiración y de vida de almacenamiento corto como vegetales, y para el empaquetado de algunos productos de panadería [Lunt1998].

Otra de las principales aplicaciones se da en el sector de la salud. En los tejidos vivos, el PLA se despolimeriza totalmente por hidrólisis química. Esta característica hace que el PLA sea ampliamente utilizado para la producción de *scaffolds*, hilo para sutura, implantes, cápsulas para la liberación controlada de fármacos, prótesis, tornillos para traumatología, etc. [Crow2005,Yang2005,Kim2006,Georgiou2007,Hu2008].

El PLA es el polímero más importante obtenido a partir de recursos renovables a escala industrial. El consumo de PLA en 2007 fue de alrededor de 60 mil toneladas y, hasta el momento, sólo el 30% del ácido láctico producido se utiliza para fabricar PLA. El productor más importante es sin duda Cargill Dow LLC (Nebraska, EEUU), con su producto NatureWorks [Vink2003], con una capacidad de 140 mil ton/año y precios de venta (por kilogramo) entre los 2,5 y 5,5 €. Sin embargo, el precio del PLA aumenta considerablemente si va a ser utilizada en el sector biomédico, como el PLA Purasorb (Purac biomaterials, Holanda) con precios de venta de alrededor de 3000 €/kg. En la Tabla 1 se resumen los principales productores de ácido poliláctico.

**Tabla 1** Principales productores de ácido poliláctico.

<b>Empresa</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Producto comercial</b>
Cargill Dow LCC	EE.UU.	NatureWorks
Mitsubishi	Japón	Ecoloju
Chronopol	EE.UU.	Heplon
Hycail	Holanda	Hycail HM, LM
Toyota	Japón	Toyota Eco-Plastic
Purac Biomaterials	Holanda	Purasorb *(grado médico)
Durect	EE.UU.	Lactel *(grado médico)
Shimadzu	Japón	Lacty *(grado médico)
Total & Galactic	Bélgica	Futterro
Treofan	Holanda	Treofan
Mitsui Chem	Japón	Lacea

En el presente trabajo se va a trabajar con el PLA con alto contenido en L-lactida, el PLLA.

### **Propiedades térmicas del PLLA**

Como se ha comentado anteriormente, el PLLA es un polímero termoplástico ampliamente utilizado en diversos mercados que se caracteriza principalmente por sus propiedades biodegradables y biocompatibles. El PLLA también presenta una buena resistencia mecánica y rigidez [Tsuji2005]. Sin embargo, el PLLA tiene una baja resistencia a impacto, una cinética de cristalización lenta, una baja temperatura de deformación bajo

carga y una baja estabilidad térmica [Arraiza2007], que podrían limitar el procesado de este polímero mediante métodos de fabricación térmicos, su industrialización en masa, o su utilización para ciertas aplicaciones [Raquez2013]. Un factor clave en la mejora de estos inconvenientes implicaría el estudio del comportamiento de la cristalización del PLLA [Saeidlou2012]. En algunos trabajos se ha demostrado que un mayor grado de cristalinidad del PLLA aumenta su resistencia térmica y sus propiedades mecánicas, ópticas y barrera, y ralentiza su velocidad de biodegradación [Raquez2013,Saeidlou2012].

Para analizar el comportamiento de la cristalización del PLLA se han utilizado principalmente estudios isotérmicos [Yasuniwa2006,Yasuniwa2007,Yasuniwa2008]. Algunos autores también han estudiado el comportamiento de la cristalización del PLLA mediante el uso de métodos no isotérmicos o dinámicos, y métodos de recristalización o cristalización en frío [Picard2011,Tsuji1995,Meaurio2006,Chen2009,Papageorgiou2010]. Es sabido que la cristalinidad de un polímero depende de dos mecanismos principalmente: de la nucleación de cristales y del crecimiento de éstos. La auto-nucleación desde el fundido a partir de las propias cadenas moleculares del polímero se definiría como nucleación homogénea. Sin embargo, el ratio de nucleación homogénea estaría limitado hasta un ratio máximo de creación de núcleos debido a la cinética de cristalización lenta del PLLA comentada anteriormente. Como consecuencia, la cristalinidad final del PLLA se vería afectada. Una manera de incrementar la cristalinidad del PLLA implica la mejora de su cinética de cristalización mediante la adición de agentes nucleantes, con los que incrementar la densidad de nucleación heterogénea de cristales [Saeidlou2012]. La nucleación heterogénea de cristales ocurre en la superficie de contacto entre el agente nucleante y el polímero, ya que es una superficie con una reducida barrera de energía libre para la nucleación [Nofar2013]. El uso de agentes nucleantes heterogéneos incrementa la densidad de nucleación y reduce el tamaño de cristal, pero también puede aumentar la cristalinidad final [Nofar2013]. En este sentido, la cristalinidad ha aumentado tras haber mezclado el PLLA con otros polímeros termo-plásticos o aditivos [Raquez2013, Saeidlou2012]. Algunos ejemplos son los *composites* formados por PLLA y policaprolactona (PCL) [Kim2000], talco [Kolstad1996], óxido de grafeno [Chen2013] o almidón [Ke2003]. No obstante, el uso de aditivos de tamaño nanométrico ha causado que las pobres propiedades del PLLA comentadas anteriormente hayan sido considerablemente mejoradas en comparación con el efecto de los aditivos convencionales, y todo esto sin perder su integridad biodegradable. Algunos ejemplos son los *nanocomposites* formados por nanocristales de celulosa sililada (SCNC) [Pei2010], sepiolita [Fukushima2009], sílice ahumada [Papageorgiou2010] o nanoarcillas como la montmorillonita orgánicamente modificada [Ray2002,Chang2003]. En estos trabajos se informa de un incremento general del ratio de nucleación de cristales mediante la adición de aditivos de tamaño nanométrico, especialmente a bajos contenidos. Sin embargo, se informa

de que el ratio de crecimiento de cristales disminuye con el contenido de aditivos, resultando en un menor tamaño de cristal. Consecuentemente, la cristalinidad total, que depende de la cinética de cristalización, aumenta con el contenido de aditivos. También se informa de que se han conseguido mejores resultados en cristalinidad con aditivos de tamaño nano que con los de tamaño micro.

Otra clase de aditivos son las nanomoléculas *Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes* (POSS), que tienen una baja densidad y presentan el menor tamaño siendo las más monodispersas [Raquez2013]. En este trabajo el PLLA ha sido mezclado con nanomoléculas polyethylene glycol-POSS (peg-POSS) para estudiar su efecto sobre la cristalinidad del polímero y en las propiedades dependientes de ello. Hasta la fecha no se encuentran en la literatura muchos trabajos que traten sobre PLLA y nanomoléculas de POSS. Algunos ejemplos son los *nanocomposites* formados por octamethyl-POSS [Yu2011a], octavinyl-POSS [Yu2011b], octaisobutyl-POSS [Pan2010,Qiu2010], octa(3-chloropropylsilsesquioxane) [Zhang2011] o aminopropylheptakis(isobutyl)-POSS [Goffin2010]. En estos trabajos, a pesar de que cada tipo de POSS pueda afectar distintamente a la cinética de cristalización del PLLA, se observó una mejora general de la cristalinidad del polímero y de sus propiedades termo-mecánicas.

### **Propiedades biodegradables del PLLA**

Como se ha comentado anteriormente, el conjunto entero (*scaffold* con células) se introduce en el lugar dónde existe el defecto para regenerar el tejido dañado. Es por ello que el soporte debe desaparecer progresivamente del cuerpo humano según el tejido celular coloniza la zona. Por lo tanto, el material debe cumplir obligatoriamente los requisitos de biocompatibilidad y biodegradabilidad, conllevando también que sus productos de deshecho sean no-tóxicos y bioabsorbibles. Las propiedades biodegradables del PLLA lo hacen un material muy interesante para este tipo de aplicaciones.

Sin embargo, de cara a poder diseñar *scaffolds* a medida, es importante conocer cuál es la velocidad o ratio de biodegradación del material y bajo qué condiciones de humedad, pH, temperatura etc, que va a permitir otorgarle unos plazos máximos de uso útil. En cuanto a las aplicaciones, estos plazos se deberían de establecer teniendo en cuenta que el material va a soportar en un principio toda la carga, y que debe de conservar unas propiedades mecánicas adecuadas (resistencia, rigidez etc.) hasta que esta carga sea transmitida progresivamente al tejido nuevo. En ese momento se llegará al final del uso útil del *scaffold* y el material seguirá desapareciendo hasta que no quede ningún resto.

El tiempo de degradación de la PLLA dependerá en gran medida de las propias características del material, es decir, de su morfología, de su estructura cristalina, del contenido residual de D-lactato, del peso molecular, del contenido de impurezas etc [Saeidlou2012]. También dependerá directa o indirectamente de otros factores como el proceso de fabricación, la incorporación de algún aditivo etc, que afectarían las características del material mencionadas anteriormente. El efecto detallado de estos puntos sobre el tiempo de biodegradación del material sería el siguiente:

- **Morfología:** La degradación del material ocurre en la superficie del *scaffold*, por lo que su morfología afectará al tiempo de biodegradación. En *scaffolds* tipo laminar (film) la relación superficie-volumen es baja, por lo que el tiempo de biodegradación sería mayor. En cambio, en *scaffolds* tipo nanofibra la relación superficie-volumen es mucho mayor, por lo que el tiempo de biodegradación disminuiría considerablemente. A menor diámetro de las nanofibras menor sería también el tiempo de biodegradación [Andrady2008,Li2009].
- **Estructura cristalina** [Saeidlou2012, Lee2005]: La resistencia a la biodegradación depende directamente de las propiedades del material y de su cristalinidad, por lo que a mayor cristalinidad mayor tiempo o menor ratio de biodegradación.
- **Contenido de D-lactato** [Saeidlou2012]: El contenido de D-lactato residual existente en el PLLA afectaría a la estructura cristalina del material disminuyendo su cristalinidad y por tanto, disminuyendo también el tiempo de biodegradación. La explicación de este efecto sería por interrupción o alteración del cristal.
- **Peso molecular** [Saeidlou2012]: El peso molecular depende de la longitud de las cadenas poliméricas y por lo tanto, a mayor longitud de cadena mayores restricciones para su movimiento, disminuyendo su cristalinidad. A mayor peso molecular el tiempo de biodegradación sería menor, aunque el propio aumento de peso molecular del polímero podría ocasionar también un aumento del tiempo de biodegradación.
- **Aditivos** [Lee2005]: La incorporación de aditivos a la matriz de PLLA afectaría directamente a su cristalinidad, y causaría el efecto comentado anteriormente. Aunque por otro lado, dependiendo del tipo de aditivo también podría ocurrir que éste se degradase antes que la matriz de PLLA [Chen2013b], creando así un mayor espacio e incrementando la relación superficie-volumen del material. Como el ratio de biodegradación es un parámetro importante que debe de ser controlado, varios estudios han analizado su comportamiento en el tiempo tras añadir varios tipos de aditivos al PLLA [Chen2013b, Nieddu2009, Cheung2010, Lee2005, Gaona2012].

- Proceso de fabricación: El proceso de fabricación afectaría tanto a la morfología del *scaffold* como a la estructura cristalina del material. Los efectos serían los comentados anteriormente.

### 1.2.2.3 *Nanocomposites*

Los materiales compuestos (*composites*) se definen como materiales formados por dos o más componentes, o que consisten de dos o más fases. Por tanto, dichos materiales deben ser heterogéneos por lo menos a escala microscópica. Algunas de las razones para desarrollar materiales compuestos son el aumento de propiedades como la rigidez, la resistencia, la estabilidad dimensional, la tenacidad y/o la temperatura de distorsión por calor.

En los macrocomposites o microcomposites la fase dispersa suele tener dimensiones que van desde el orden de micras hasta milímetros. El mecanismo de refuerzo mecánico de estos materiales es bien conocido, y puede ser calculado mediante la suma de las propiedades individuales de cada uno de los materiales normalizados según la fracción de volumen de cada uno de ellos [Kingery1976]. Las propiedades de los materiales compuestos pueden ser mejores a las predichas por la regla de mezclas en presencia de interacciones interfaciales entre ambas fases [Hicks1993]. Asimismo, los diferentes componentes de los *composites* pueden también formar una fase adicional conocida como interfase, que es distinta tanto de la fase continua como de la dispersa [Yang2005b].

A medida que el tamaño de la fase dispersa desciende y las interacciones entre ambas fases aumentan, su contribución hacia las propiedades de los *composites* aumenta, y las interacciones entre las fases afectan en mayor medida a las propiedades de los *composites* [Ginzburg2000].

Los *nanocomposites* poliméricos son materiales compuestos en el que alguna de las dimensiones está en la escala nanométrica (típicamente 1-100 nanómetros). Las propiedades de los *nanocomposites* están determinadas no sólo por las propiedades de cada uno de los componentes, tal y como sucede en los macrocomposites convencionales, sino también por las complejas interacciones entre las diferentes fases, y entre la interfase y dichas fases. El nivel de interacción entre el polímero y la nanopartícula es mucho mayor que en los *composites* convencionales para el mismo nivel de carga empleado, debido principalmente a la alta área específica y las relaciones de aspecto de las nanopartículas.

Los materiales *nanocomposites* se pueden clasificar en tres categorías dependiendo de cuántas de las dimensiones de la nanopartícula dispersa estén en el rango nanométrico [Alexandre2000]:

1. Una dimensión en escala nanométrica: Cargas con forma de capa o lámina con un espesor de 1-100 nanómetros y una longitud de varias micras. Como ejemplo, se pueden destacar los silicatos laminados (nanoclays) y el grafito.
2. Dos dimensiones en escala nanométrica: Cargas donde al menos dos de sus dimensiones están dentro del rango nanométrico. Como ejemplo, se pueden destacar las nanofibras de alúmina, nanotubos de carbono, nanofibras y los whiskers de celulosa.
3. Tres dimensiones en escala nanométrica: Cargas con todas sus dimensiones en la escala nanométrica. Como ejemplo más conocido se puede mencionar las nanopartículas de sílice obtenidas mediante el método sol-gel.

La mayoría de las nanopartículas mencionadas con anterioridad son de naturaleza inorgánica, excepto los nanotubos de carbono y los whiskers de celulosa. La razón principal de emplear nanocargas de naturaleza inorgánica es debido a que propiedades tales como la resistencia mecánica de los materiales inorgánicos es de varios órdenes de magnitud mayor que el de los polímeros orgánicos convencionales. De este modo, se prevé que la combinación de materiales de diferente naturaleza proporcione propiedades únicas que no podrían ser conseguidas con un único material.

Un claro ejemplo de las propiedades que se pueden alcanzar son los *nanocomposites* formados por nylon 6 y montmorillonita donde las propiedades de tracción conseguidas únicamente pueden ser explicadas por las interacciones a escala nanométrica en la interfase entre la parte orgánica e inorgánica [Kojima1993].

Las propiedades de los *nanocomposites* de MMT dependen enormemente de cómo se disperse la arcilla en la matriz de polímero. En general se distinguen 3 modos de dispersión:

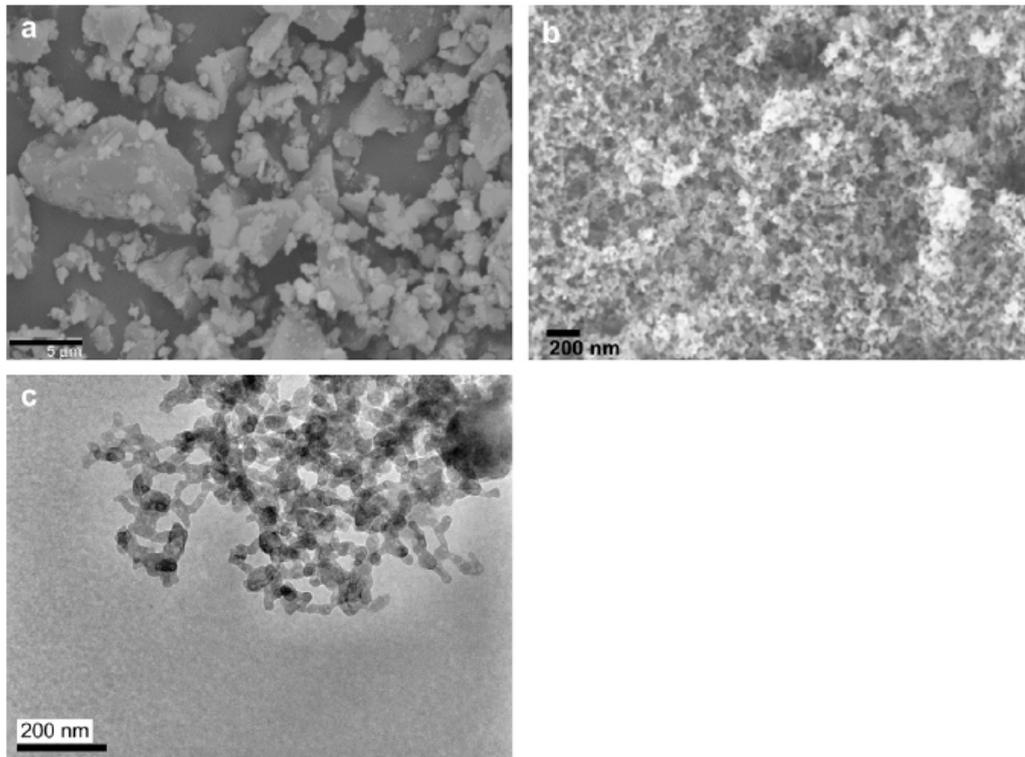
1. Cuando las partículas de arcilla no están delaminadas; el material resultante tiende a exhibir propiedades similares a los microcomposites convencionales. Las láminas sin separar de MMT y rodeadas por el polímero se conocen como tactoides.
2. Cuando las cadenas de polímero se insertan en las galerías de las capas de silicato hinchadas, lo que se conoce como intercaladas. Esto llevaría a una disminución de movilidad de la cadena de polímero, resultando en un refuerzo del material.
3. Cuando la arcilla está completamente delaminada y homogéneamente dispersa en la matriz polimérica. Las capas de silicato forman *nanocomposites* exfoliados, que proporcionan el máximo refuerzo de las propiedades físicas del polímero. Este proceso de exfoliación depende de la compatibilidad química entre la

arcilla y la matriz de polímero, así como de las condiciones del proceso utilizado para dispersar las capas de silicato. Una de las mejores maneras de lograr la dispersión de la MMT en la matriz de PLA es utilizar una mezcladora de doble husillo.

Hay un límite óptimo en la cantidad de arcilla necesaria para obtener la mayor mejoría en las propiedades mecánicas. A contenidos más elevados de MMT las nanopartículas tienden a aglomerarse lo que conlleva a un debilitamiento mecánico.

Aunque el estado del arte del presente trabajo esté orientado hacia *nanocomposites* biodegradables para aplicaciones biomédicas, alguno de los nanorefuerzos analizados en este capítulo podría no cumplir los requisitos de biodegradabilidad o de biocompatibilidad. Sin embargo, se mencionarán todos indistintamente a su comportamiento con el cuerpo humano, porque con los procedimientos adecuados la mayoría de ellos pueden llegar a convertirse en biocompatibles. En la siguiente lista se muestran algunos de los nanorefuerzos más importantes empleados con polímeros:

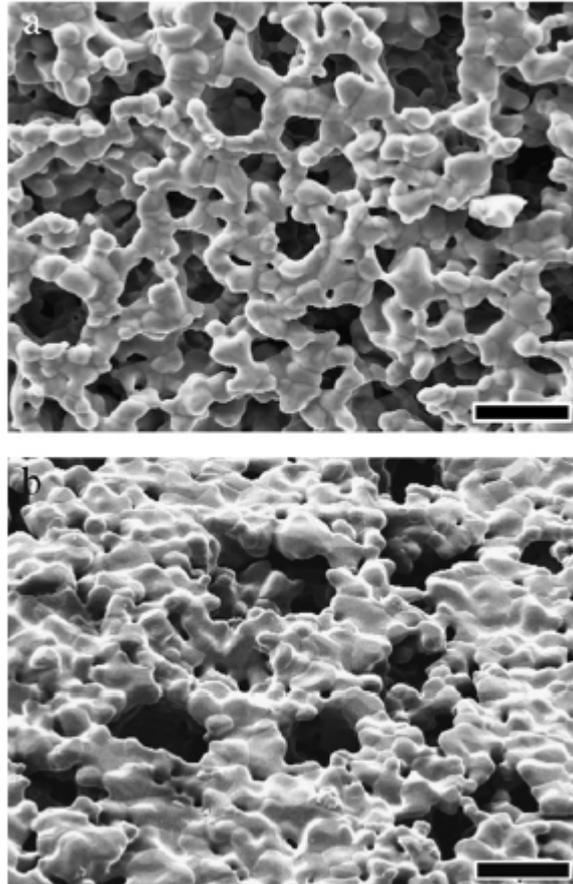
- a) **Nanoarcillas: montmorillonita (MMT):** Se utiliza como refuerzo para mejorar las propiedades mecánicas y barrera de distintos polímeros. Un ejemplo es el de la preparación de nanocompuestos de montmorillonita basados en PLA mediante el método *casting* (disolución-evaporación) [Ogata1997]. En otro ejemplo, junto a la MMT ha sido añadida sepiolita a un *scaffold* de matriz polimérica [Fukushima2009].
- b) **Cerámicas bioactivas (Bioglass®):** Generalmente compuestas de SiO<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>O, CaO y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en diferentes proporciones [Misra2008]. Un ejemplo es el Bioglass® 45S5 [Misra2007], que se fija tanto al tejido blando como al hueso, y que ha sido exhaustivamente utilizado para la fabricación de *composites* dadas sus excepcionales propiedades como biomaterial [Boccaccini2010, Bretcanu2009]. Este material provoca una respuesta fisiológica específica: forma una delgada capa de hidroxicarbonato de apatita (HA), similar a la apatita natural, en la superficie del Bioglass® una vez implantado o en contacto con fluidos biológicos *in vivo* o *in vitro*. Esta capa es la que hace que se formen los fuertes enlaces entre tejido blando y tejido óseo, lo que convierte al Bioglass® (Figura 13) en un material ideal para la colonización y proliferación celular [Boccaccini2010]. Este material es biodegradable, por lo que los finos polvos son absorbidos por el cuerpo. Además, se ha comprobado que los subproductos formados durante la disolución de éste pueden regular la expresión de los genes que controlan la osteogénesis (diferenciación de osteoblastos humanos para crear nuevo hueso) [Boccaccini2010].



**Figura 13** a) Imagen SEM de micro-partículas de Bioglass® b) Imagen SEM de nano-partículas de Bioglass® c) Imagen TEM de nano-partículas de Bioglass® [Misra2008].

- c) **Nanotubos de carbono - Multiwalled Carbon Nanotubes (MWCNT):** Material con buenas propiedades mecánicas, térmicas y eléctricas, por lo que es adecuado para la fabricación de *composites*, aunque no hay todavía muchas aplicaciones orientadas a la salud. Un ejemplo es el de los *scaffolds* inteligentes de poli-3-hidroxibutirato/Bioglass® que contienen MWCNT, destinados a la fabricación de films bioabsorbibles/bioactivos para aplicaciones biomédicas [Misra2007].
- d) **Fibras naturales:** Material ecológico, abundante en la naturaleza (pueden ser residuos no aprovechados de otros procesos) y biocompatible. Algunos de estos materiales naturales pueden ser la seda [Damrongrungruang2007, Cheung2007] o la celulosa [Xing2010].
- e) **Hidroxiapatita (HA):** Es un prometedor material cerámico sustituto del hueso, que se utiliza para reemplazar los injertos óseos auto- y alo-. La estructura y composición son similares a la fase mineral del hueso, por lo que considerando que la matriz extracelular (ECM) del hueso natural es un complejo *composite* orgánico-inorgánico, la HA (Figura 14) ha ganado interés como material de refuerzo de *composites* poliméricos/cerámicos [Wang2010]. Este material es tanto bioactivo como biocompatible, llegando a ser incluso

osteointuctivo y osteoconductor, por lo que es apropiado para aplicaciones como la fabricación de *scaffolds composites* (en forma de polvo y junto a una matriz polimérica), cemento para reparación de defectos óseos o material para la realización de injertos [Cordell2009].



**Figura 14** Fotografía SEM de HA microporosa. La escala es de 10  $\mu\text{m}$  [Cordell2009].

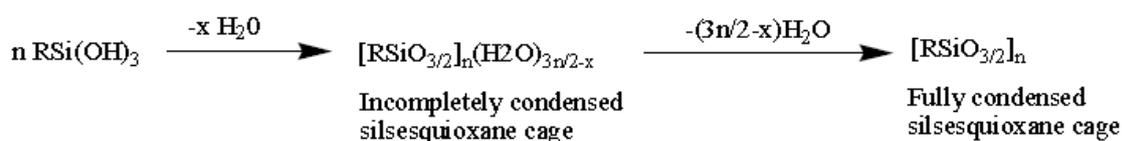
- f) **Fosfato tricálcico (TCP):** Al igual que la hidroxiapatita, es un material sustituto del hueso que puede ser utilizado sólo o en combinación con un polímero biodegradable [Cao2010].
- g) **Nano-yeso (nano-gypsum):** Es un material cerámico basado en sulfato de calcio. Posee buenas propiedades mecánicas. Un ejemplo, el *composite* de matriz polimérica de PLA y sulfato cálcico [Murariu2007].
- h) **Nanofibras auto-reforzadas (self-reinforced):** Cabe destacar que las propias nanofibras de un polímero sirven como refuerzo de ese mismo polímero o de otros polímeros, como en el caso de las nanofibras de nylon-4,6 utilizadas como refuerzo de esa misma matriz [Bergshoef1999].
- i) **Polihedral Oligomeric Silsesquioxanes (POSS):** Se caracterizan por tener una estructura híbrida orgánica-inorgánica. Debido a su tamaño nanométrico y

a sus grupos orgánicos funcionales, que pueden ser sintetizados casi a la carta, estas nanomoléculas presentan un gran potencial para ser utilizadas en la fabricación de diversos *nanocomposites*. Se ha demostrado que los POSS mejoran diversas propiedades como la estabilidad térmica, resistencia mecánica, etc. [Chen2006,Chen2007,Kim2008]. Los POSS son detallados en mayor profundidad en el siguiente apartado por ser los refuerzos empleados en este trabajo.

#### 1.2.2.4 Polihedral Oligomeric Silsesquioxanes (POSS)

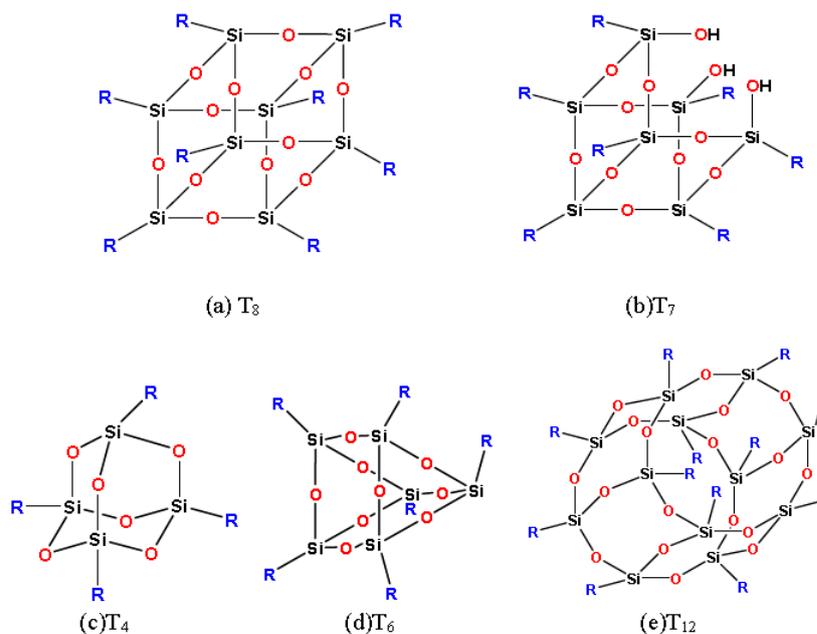
Los POSS son unos materiales híbridos que contienen en su estructura átomos inorgánicos (silicio) y orgánicos (carbono). Estos materiales, que han comenzado a ser comercializados en la pasada década, se dice que combinan las propiedades moleculares más beneficiosas de los sistemas orgánicos e inorgánicos. Dichos materiales poseen una densidad inferior al de las cargas inorgánicas convencionales (talco, mica...). Los POSS tienen el potencial para ser usados en la preparación de materiales *nanocomposites* debido a su pequeño tamaño y rígido esqueleto o núcleo.

Las primeras referencias que aparecen de los POSS datan de 1946 [Scott1946]. El nombre *Silsesquioxane* se deriva de la palabra *sesqui*, que significa uno y medio, y en este caso hace referencia a la relación entre los átomos de silicio y oxígeno presentes en la estructura:  $R_n(\text{SiO}_{3/2})_n$ , donde R hace referencia a los grupos orgánicos presentes en las moléculas. Las moléculas de POSS tienen un esqueleto o una jaula poliédrica nanoestructurada formada por los átomos de silicio y oxígeno. Estos oligómeros tridimensionales se forman por completa condensación hidrolítica de sus monómeros trifuncionales (Figura 15).



**Figura 15** Proceso de formación de las estructuras de POSS por medio de las reacciones condensación hidrolítica de los monómeros trifuncionales.

Las estructuras de POSS contienen entre 4 y 12 átomos de Si, rodeados por los correspondientes 4-12 grupos orgánicos. La relación Si:O en una estructura completamente condensada es 2:3, situándose los átomos de silicio en los vértices de las estructuras, por tanto en la superficie [Scott1946, Lee1998]. En la Figura 16 se muestra la estructura básica de las moléculas de POSS con diferentes geometrías. Cabe destacar que el diámetro de las nanoestructuras POSS se encuentra dentro del rango 1-3 nm [Ayandele2012].



**Figura 16** Estructuras moleculares de los POSS con diferente número de átomos de silicio. “R” corresponde a los grupos funcionales.

El armazón rígido de las moléculas de POSS se parece al armazón de la sílice. Las fuertes fuerzas intermoleculares entre sus moléculas constituyentes y adyacentes, así como su fuerte armazón con cortas longitudes de enlace, hace que los *nanocomposites* de POSS sean extremadamente resistentes a la degradación térmica [Voronkov1981]. En la Tabla 2 se muestran las longitudes y los ángulos de enlace entre los diferentes átomos de las moléculas de POSS.

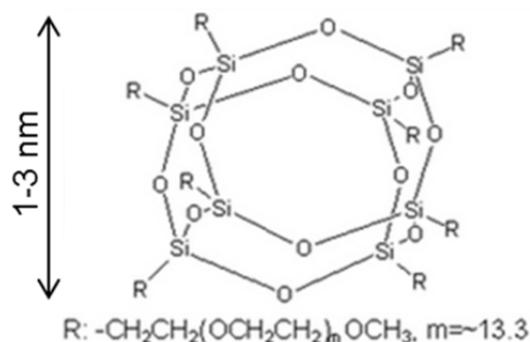
**Tabla 2** Longitudes y ángulos de enlace entre los diferentes átomos de las moléculas de POSS.

Enlace	Longitud de enlace (nm)	Ángulo de enlace (°)
Si-H	0,147	---
Si-O	0,170	---
Si-Si	0,540	---
Si-C	0,230	---
O-Si-O	---	110
Si-O-Si	---	137

Las moléculas de POSS son muy versátiles debido a la gran variedad de grupos orgánicos que se pueden injertar en los átomos de silicio. Por tanto, dichas moléculas pueden ser sintéticamente modificadas para contener grupos capaces de polimerizar, capaces de interaccionar con otros polímeros, sensibles a la luz y mejorar la solubilidad en disolventes orgánicos [Sellinger1996, Lichtenhan1995, Haddad1996].

Estos materiales han atraído recientemente gran atención debido a su potencial uso como materiales intermedios a los polímeros orgánicos y a los cerámicos inorgánicos, ocupando la región conocida como materiales híbridos. Por todo ello, se ha demostrado que el uso de las nanopartículas de POSS es un método eficiente en el diseño de materiales híbridos [Zheng2002], gracias en parte a la versatilidad que se puede disponer con la incorporación de distintos grupos orgánicos [HYBPL]. De este modo, las moléculas de POSS se pueden hacer compatibles con una gran variedad de polímeros, pudiendo llegar a dispersarlos en las matrices poliméricas. Las nanopartículas de POSS se pueden emplear para formar *nanocomposites* poliméricos con mejores propiedades termomecánicas que las matrices poliméricas correspondientes. Por ejemplo, las moléculas de POSS han sido incorporadas satisfactoriamente a varios polímeros como el polipropileno [Chen2007, Baldi2007, Chen2006], polietileno de alta densidad [Joshi2004], policarbonato [Zhao2005, Hao2007], polietileno tereftalato [Yoon2005, Kim2008], nylon [Ricco2005], epoxi [Abad2003, Zhang2007b] y polioximetileno (POM) [Illescas2010, Sánchez2010], aparte de las ya mencionadas en los anteriores apartados.

A lo largo del presente trabajo se ha empleado un tipo de moléculas POSS con grupos funcionales orgánicos polietilenglicol (PEG). La razón de haber elegido este tipo de grupos funcionales es que se ha demostrado que el PEG es un excelente plastificante [Saeidlou2012], lo que permite mejorar propiedades mecánicas como el alargamiento a rotura, uno de los inconvenientes del PLLA. Además, el PEG es un polímero biocompatible, lo que permite utilizarlo para aplicaciones biomédicas [Zhang2002]. El peg-POSS (Figura 17) tiene la fórmula molecular  $[C_{2m+3}H_{4m+7}O_{m+1}]_n(SiO_{1,5})_n$ , donde  $n$  puede tomar valores de 8, 10 o 12 y  $m \approx 13,3$ . El peso molecular es de 5576,6 g/mol. El peg-POSS se caracteriza por ser soluble en poliéteres y poliésteres, y emplearse como cosméticos y agente de hidratado. El peg-POSS es un líquido viscoso a temperatura ambiente. Su estructura química es:



**Figura 17** Estructura química del peg-POSS.

### 1.2.3 Tecnologías de fabricación de scaffolds poliméricos

El presente apartado se divide en dos secciones: por un lado se estudian los diferentes *scaffolds* poliméricos que se emplean en Medicina Regenerativa, y por otro lado la descripción de los procesos de fabricación aplicables a la producción de *scaffolds* poliméricos.

#### 1.2.3.1 Tipos de *scaffolds* poliméricos

Los *scaffolds* poliméricos pueden presentar diferentes formas. Éstas dependerán directamente de las propiedades que se quieran obtener (resistencia a la carga aplicada, resistencia al desgaste, facilidad de inserción, etc.), y a su vez las propiedades dependerán de cada tipo de aplicación. Como ejemplo, para una aplicación que vaya a estar sometida a carga y precise de mantener la integridad estructural del *scaffold* se optará por una lámina (2D) o un bloque (3D), mientras que para las aplicaciones que precisen facilidad de inserción se optará por un hidrogel, que puede ser directamente inyectado en la zona a tratar. Algunos tipos de *scaffolds* se detallan a continuación.

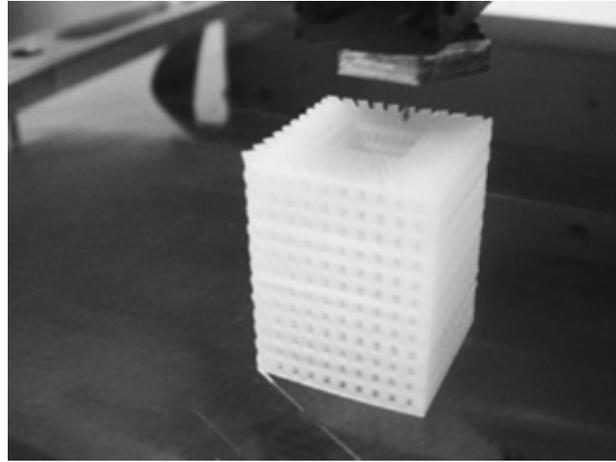
- a) Laminar o 2D: Los *scaffolds* laminares (Figura 18) se fabrican mediante el método de disolución-evaporación (*solvent-casting*) [Chen2008]. Este tipo de *scaffolds* presentan como ventaja mejores propiedades mecánicas que los *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning*, aunque como inconveniente tienen menor bioactividad que éstos debido a la ausencia de poros internos. La bioactividad presente en este tipo de *scaffolds* es debida a la rugosidad superficial.



**Figura 18** Scaffold laminar 2D.

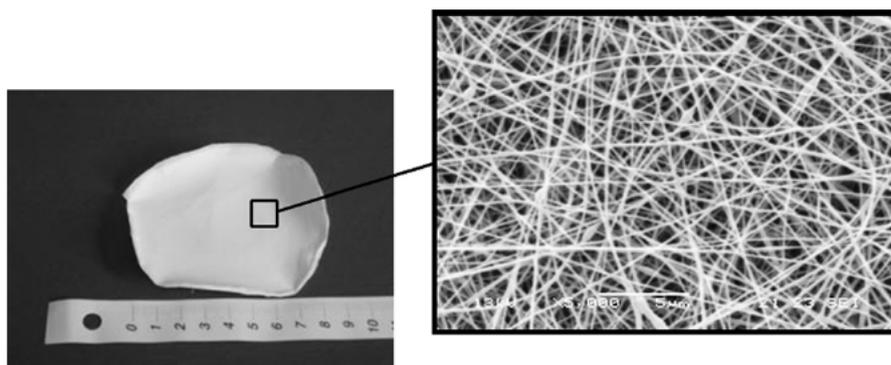
- b) Bloque o 3D: Los *scaffolds* bloque o 3D se pueden fabricar de diferentes maneras: mediante micro-inyección y un posterior micro-mecanizado o mediante prototipado rápido, también llamado Solid Freeform Fabrication (SFF) [Puppi2010] (Figura 19). Este tipo de *scaffolds* se puede modelar dependiendo de la aplicación por lo que sirve para regenerar defectos en los que haga falta cierto volumen de material. Los poros que se pueden obtener mediante estos métodos de

fabricación son menores que los de los *scaffolds* porosos de nanofibras, ya que actualmente no se puede llegar a mecanizar poros de diámetro en la escala nano. Como ventajas presentan grandes propiedades mecánicas y una tasa media-alta de bioactividad (menor que las de *scaffolds* porosos de nanofibras e hidrogeles).



**Figura 19** Scaffold 3D fabricado por SFF [Puppi2010].

- c) Poroso de nanofibras: Los *scaffolds* porosos de nanofibras (Figura 20) se fabrican mediante *electrospinning* [Andrady2008,Thorvaldson2008,Baoqi2008], y consisten en la acumulación en un colector de una gran cantidad de nanofibras proyectadas al azar desde un mecanismo de inyección sometido a una diferencia de potencial entre el colector y éste. De esta manera las nanofibras forman una especie de esponja cuyos poros son los huecos que quedan entre ellas. Este tipo de *scaffolds* presentan como ventaja una alta bioactividad, aunque como inconvenientes tienen menores propiedades mecánicas debido a la fragilidad de las nanofibras.

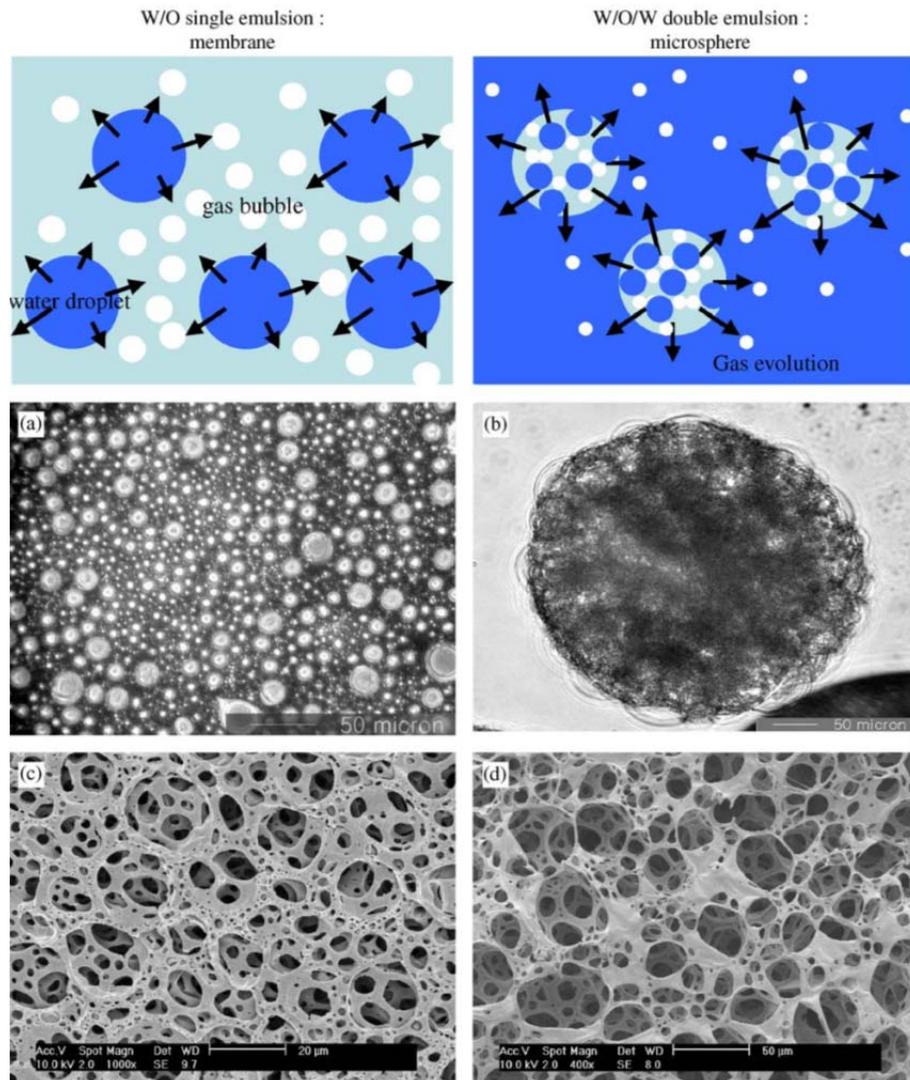


**Figura 20** Scaffold fabricado por *electrospinning* y fotografía SEM de las nanofibras [Puppi2010].

- d) Hidrogel: Los hidrogeles son materiales poliméricos con estructura en forma de red tridimensional, de origen natural o sintético, que en contacto con el agua forman materiales blandos y elásticos [Hu2008]. Una de las propiedades de los

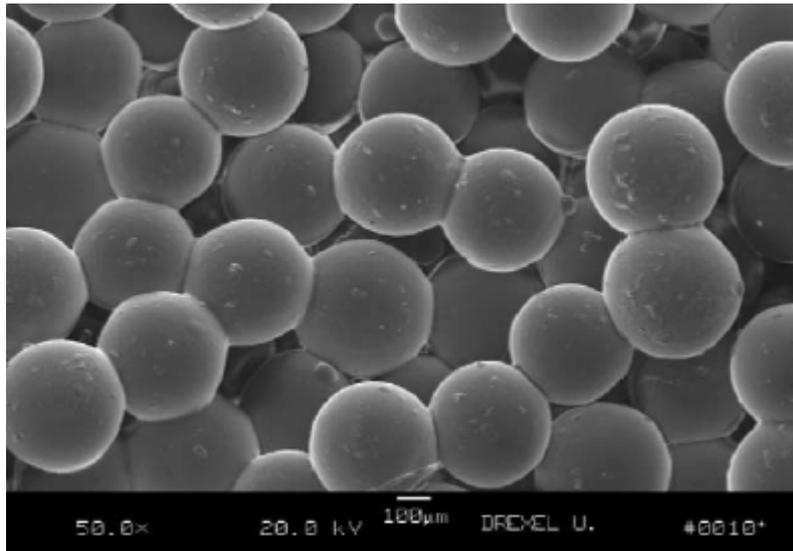
hidrogeles es la de hincharse y aumentar de volumen por absorción de agua y de otras sustancias sin disolverse, propiedad común a todos los tejidos de los organismos formados por materias coloidales (sistema físico-químico formado por dos o más fases: al menos una continua, normalmente fluida, y otra dispersa en forma de partículas; por lo general sólidas). Estos materiales tienen como ventajas que poseen un alto grado de bioactividad y que pueden ser inyectados directamente en la zona a regenerar por lo que adoptan la forma del lugar, mientras que como desventaja presentan sus escasas propiedades mecánicas debido a su inconsistencia.

- e) Espumado de micro-esferas porosas: Los *scaffolds* de micro-esferas porosas (Figura 21) están diseñados para ser inyectados en el interior del defecto junto a las células [Kim2006b]. El proceso de fabricación consiste en la evaporación del disolvente de una doble emulsión agua/aceite/agua modificada y agitada en centrifugadora en dos etapas. Como agente espumante se utiliza una sal efervescente (bicarbonato de amonio) que se incorpora a la emulsión primaria para generar burbujas de dióxido de carbono y amoniaco gaseoso durante el proceso de evaporación del disolvente en la segunda etapa. De esta manera se generan unas micro-esferas con porosidad interconectada de alrededor de 20  $\mu\text{m}$ , muy adecuadas para la bioactividad celular. Como ventajas, presenta la facilidad de aplicación en la zona afectada, ya que puede ser inyectado directamente junto a las células en el interior del defecto, y la alta bioactividad. Como desventaja, las bajas propiedades mecánicas.
- f) Espumado laminar poroso: Este *scaffold* (Figura 21) consiste en una lámina porosa fabricada mediante un proceso muy parecido y con los mismos materiales que los del espumado de micro-esferas porosas [Kim2006b]. La diferencia radica en que la emulsión es simple (agua/aceite) y que se vierte directamente sobre un plato petri tras ser agitado en la centrifugadora. También se pueden fabricar *scaffolds* espumados porosos de mayor grosor (3D) mediante el método Thermally Induced Phase Separation (TIPS) seguido de una sublimación del disolvente por liofilización [Boccaccini2006]. El *scaffold* espumado laminar poroso presenta como ventajas una alta bioactividad y mejores propiedades mecánicas que las micro-esferas. Asimismo, este tipo de *scaffolds* poseen mayor bioactividad que los *scaffolds* 2D comentados con anterioridad.



**Figura 21** Diagrama esquemático de *scaffolds* laminares y de micro-esferas fabricados mediante el método de espumado. Columna izquierda: membrana porosa de PLGA preparada por emulsión simple agua/aceite. Columna derecha: micro-esferas porosas preparadas por emulsión doble agua/aceite/agua. a) micro-fotografía óptica de las gotas de la emulsión primaria agua/aceite durante la evaporación del disolvente. b) micro-fotografía óptica de las gotas de la emulsión doble agua/aceite/agua durante la evaporación del disolvente. c) imagen SEM de la sección transversal de un film poroso de PLGA. d) imagen SEM de la sección transversal de una micro-esfera porosa de PLGA [Kim2006b].

- g) Poroso sinterizado: Este tipo de *scaffolds* (Figura 22) se fabrican sinterizando micro-esferas de polímero [Borden2002], previamente fabricadas mediante una técnica de disolución- evaporación. El proceso de sinterizado consiste en calentar estas micro-esferas en un molde unos 5 °C por encima de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). De esta manera las cadenas poliméricas se activan e interactúan con las cadenas vecinas formando contactos entre las micro-esferas. Al enfriarse a temperatura ambiente estos enlaces se fijan, creando así un *scaffold* polimérico 3D con porosidad interconectada y unas propiedades mecánicas medias-altas. El diámetro de los poros depende directamente del diámetro de las micro-esferas.



**Figura 22** Matriz de micro-esferas sinterizadas fabricada con micro-esferas de 355–425  $\mu\text{m}$ . Las micro-esferas de PLGA se calentaron durante 24 horas a 62 °C [Borden2002].

### 1.2.3.2 Procesos de fabricación de *scaffolds* poliméricos.

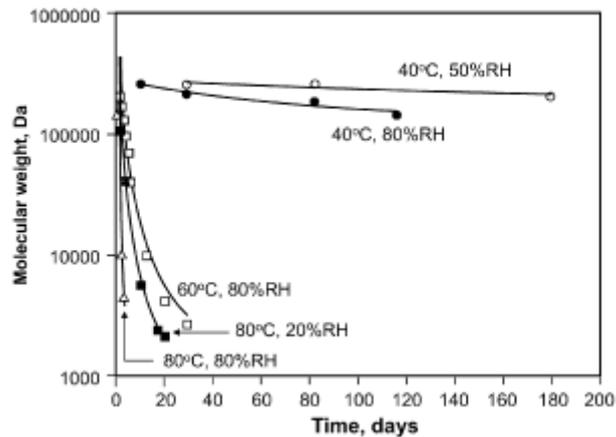
En este apartado se van a describir los diferentes métodos de procesamiento aplicables a la producción de *scaffolds*.

#### Secado

Previo al proceso de fundido, el polímero debe estar suficientemente seco para evitar una hidrólisis excesiva, es decir una disminución del peso molecular, que afecta a las propiedades físicas del polímero. Normalmente el polímero se seca a menos de 100 ppm (0,01 % w/w).

El proceso de secado se realiza mediante un secador deshumidificante, y tiene lugar en un rango de temperaturas entre 80-100 °C [Lim2008]. El tiempo de secado requerido es inversamente proporcional a la temperatura a la que se produzca, y va a depender de si el material cristaliza o no. En el caso del PLA cristalino el secado se realizará a mayor temperatura y durante menos tiempo. Por otro lado, el PLA amorfo se seca por debajo de la  $T_g$  (alrededor de 60 °C) para evitar que la granza se funda y se aglomere, lo que produciría problemas en el sistema de alimentación de las máquinas. Cabe destacar que, debido a que el PLA se degrada a elevadas temperaturas y alta humedad relativa, debería estar protegido de condiciones ambientales de elevada temperatura y humedad.

En la Figura 23 se puede ver la relación entre la pérdida de peso molecular y tiempo de varias muestras de PLA a diferentes temperaturas y humedades relativas.



**Figura 23** Curvas de la pérdida molecular de la PLA en función del tiempo bajo diferentes condiciones de entorno [Drumright2000].

En cuanto al proceso de secado, la grana de PLA se encuentra dentro de una tolva que se purga con aire seco a alta temperatura. El aire seco se genera gracias al desecante. Durante la operación de secado, la corriente de aire que extrae la humedad del polímero pasa a través de una de las cámaras desecantes, mientras que la otra cámara se regenera y mantiene en espera. La corriente de aire caliente del proceso extrae la humedad de la resina que se encuentra en la tolva. El aire entonces se hace circular de vuelta al deshumidificador, donde se enfría y el desecante extrae la humedad. Este aire se calienta antes de ser enviado de nuevo a la tolva. Cuando el desecante del deshumidificador se satura se cambia automáticamente a la cámara desecante que previamente se había secado y estaba en espera, y se procede a la regeneración de la utilizada hasta el momento. Para ello se hace pasar aire caliente a través de la cámara, que se expulsa a la atmósfera una vez absorbida la humedad.

### Moldeo por fundido con adición de agente porógeno

El moldeo por fundido (Figura 24) supone el llenado de un molde con polvos de polímero y con algún componente porógeno, y el calentamiento de éstos por encima de la temperatura de transición vítrea del polímero mientras se aplica una presión al conjunto [Thomson1995]. Este tratamiento hace que las partículas de polímero se unan. Una vez que el molde es retirado, se elimina el porógeno mediante algún líquido y se seca el *scaffold*. Los *scaffolds* producidos de esta manera cobran la forma del molde. Esta técnica permite obtener *scaffolds* 3D, aunque está limitada por la complejidad en el diseño y la producción del molde. También podría presentar problemas de cantidades residuales de porógeno y de la necesidad de una alta temperatura de procesamiento del polímero. Sin embargo, con este método se evita el uso de disolventes. [Hutmacher2000,Leong2003]

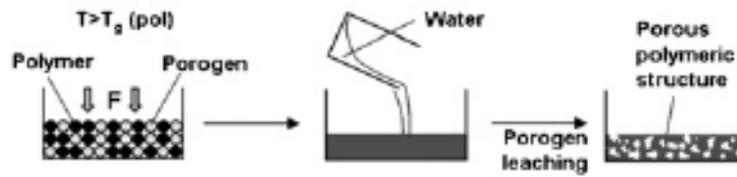


Figura 24 Técnica de moldeo por fundido.

### Moldeo por inyección

El moldeo por inyección es la técnica de transformación más utilizada entre los materiales termoplásticos, especialmente para obtener piezas de forma compleja y elevada precisión dimensional. Es bastante parecido al proceso de extrusión, ya que al igual que en ese proceso, se utiliza un husillo para fundir y mover el polímero (Figura 25). La diferencia radica en dos puntos:

- El husillo de la inyectora puede retroceder dentro del cilindro debido al material acumulado en la punta y a la contra-presión.
- Posee un sistema de inyección que proporciona la presión necesaria para introducir el material dentro de las cavidades del molde.

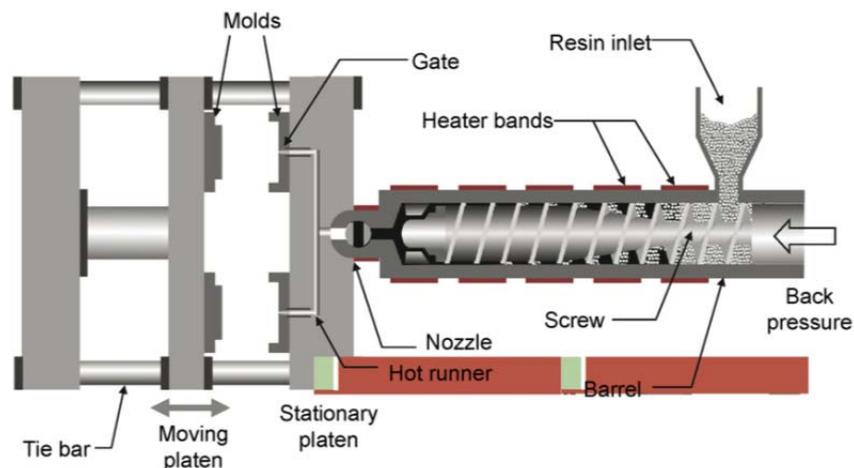


Figura 25 Principales componentes de una máquina de moldeo por inyección. Se muestran el husillo extrusor y las unidades de cierre.

El ciclo de un proceso de inyección es el siguiente: el molde se cierra y se bloquea, la boquilla inyectora se abre y el sistema de inyección avanza inyectando el polímero dentro de la cavidad del molde, manteniendo la presión del polímero fundido durante esta fase para compensar la contracción del material causada por el enfriamiento. Al final de esta fase se retira la boquilla y el husillo empieza a recargar material, haciendo avanzar el polímero

fundido hacia la punta del inyector. El tiempo de enfriamiento debe ser el suficiente para asegurar la correcta extracción de la pieza. Por ello, la extracción de calor se realiza durante las fases de llenado, de mantenimiento y de enfriamiento, además de la fase de apertura del molde, ya que el molde se enfría de manera continua durante todo el proceso.

El tiempo de ciclo es un importante parámetro de proceso que se minimiza frecuentemente para maximizar la productividad. Para reducir el tiempo de ciclo se puede transferir la pieza parcialmente refrigerada a un aparato de refrigeración post-moldeo, que la enfría por contacto directo en una superficie fría y/o por circulación forzada de aire. También es evidente que minimizando los procesos no productivos como apertura y cerrado de molde, expulsión de la pieza, etc se consigue reducir el ciclo. Reduciendo la temperatura del molde se consigue aumentar la tasa de extracción de calor del polímero.

Sin embargo, el PLA es propenso a condensarse en las superficies frías lo que podría afectar al acabado superficial y peso de las piezas inyectadas. Por ello, la temperatura mínima a la que puede estar sometido el PLA se limita a 25-30 °C [Lim2008].

Las etapas de llenado, mantenimiento y enfriamiento que tienen lugar durante el proceso de inyección tienen una implicación importante en la contracción de las piezas. Existen unos diagramas que relacionan presión, volumen y temperatura. Se llaman diagramas PVT, y se puede conocer cómo evoluciona el volumen específico del material mientras se mantiene la presión y se disminuye la temperatura.

En general, las piezas de PLA obtenidas mediante moldeo por inyección son relativamente frágiles. Esta fragilidad se atribuye al rápido envejecimiento físico del polímero [Witzke1997,Lim2008]. Además, parámetros de proceso tales como la temperatura del molde, la presión, la velocidad de enfriamiento y otros procesos posteriores también influyen en el envejecimiento de la PLA.

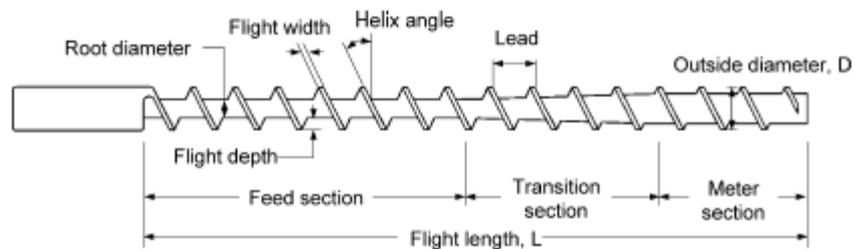
Mediante esta técnica se pueden fabricar *scaffolds* para su uso en la medicina regenerativa [Gomes2001,Neves2005]. Como ventajas, es un proceso que tiene una alta reproducibilidad, facilidad de automatización y elevada eficiencia de producción en comparación con otras técnicas de moldeo.

## **Extrusión**

La extrusión es una de las técnicas más importantes en el procesado por fundido del PLA. La extrusora, además de fabricar granza, puede formar parte de otros procesos como el moldeo por inyección, el moldeo por soplado, la extrusión de films-soplado y el *spinning* en fundido de mezclas poliméricas. La extrusión también se utiliza para realizar el mezclado de los materiales que conforman los *composites*.

La parte más importante de la extrusora es el tornillo o husillo. Consta de tres partes (Figura 26):

1. La zona de alimentación: Es la zona por donde se introduce la granza de material al husillo. La función de la rosca es transportar el material a las posteriores zonas del husillo. Conviene que no se alcance una temperatura próxima a la de fusión del PLA con el fin de evitar que los granos se fundan y se aglomeren atascando así el husillo. En esta zona el diámetro del husillo no es muy grande, y existe un hueco amplio entre husillo y cilindro para que se pueda introducir el máximo de material y no se produzcan presiones que puedan aumentar el rozamiento y la consiguiente generación de calor. Por este motivo conviene que esta zona sea refrigerada.
2. La zona de compresión o de mezcla: El diámetro del husillo aumenta progresivamente de modo que la profundidad entre husillo y cilindro se ve reducida, con lo que se aumenta la presión y se comprime el material aumentando la fricción. Esta misma fricción es suficiente para fundir el material, por lo que no hace falta aportar demasiado calor externo. Existen varios diseños de rosca cuyas funciones en esta zona son homogeneizar la mezcla lo máximo posible y separar la granza todavía sin fundir completamente del polímero fundido, el cual avanza hacia la siguiente zona.
3. Zona de dosificación: Se caracteriza por una profundidad de husillo constante y muy pequeña, casi superficial. Actúa como una bomba para dosificar con precisión la cantidad requerida de polímero fundido.



**Figura 26** Típica geometría del husillo de una extrusora de simple husillo.

La relación  $L/D$  se define como la relación entre la longitud y el diámetro exterior del husillo teniendo en cuenta la rosca. Esta relación tiene influencia en el nivel de cizalla y el tiempo de residencia de la mezcla. Los husillos con gran relación  $L/D$  proporcionan un gran calentamiento por nivel de cizalla, una buena mezcla y un mayor tiempo de residencia de ésta dentro de la extrusora. Las resinas de PLA de grado comercial pueden ser extruidas por medio de una extrusora convencional equipada con un husillo de relación  $L/D$  de aproximadamente\* 24-30.

Otro parámetro importante del husillo es la relación de compresión. Se trata de la relación de la profundidad del husillo entre la zona de alimentación y la de dosificación. Cuanto mayor sea esta relación mayor será el calor generado por el nivel de cizalla. La relación de compresión recomendada para el procesado del PLA está en el rango de 2-3 [NATURW].

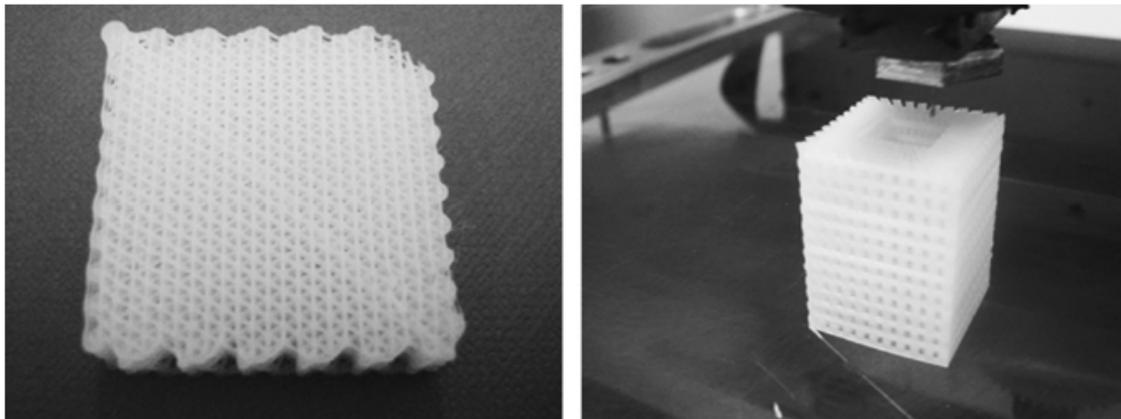
Durante el proceso, la granza de PLA alimenta la extrusora desde una tolva situada en un extremo del cilindro. El husillo, accionado por un motor eléctrico o hidráulico, rota y transporta el material hacia el otro extremo del cilindro. El calor necesario para la fusión lo proporcionan los calentadores, normalmente resistencias, que se encuentran a lo largo y alrededor del cilindro. Como ya se ha comentado antes, al girar el husillo la rosca cizalla y empuja los granos de polímero contra las paredes internas del cilindro, aumentando la presión y la fricción, aportando calor para la fusión. La energía térmica combinada de la resistencia y de la fricción proporciona suficiente calor como para elevar la temperatura hasta el punto de fusión (170-180 °C) en las dos primeras zonas. En la zona de dosificación para asegurar que todo el material se encuentre totalmente fundido y a una viscosidad adecuada para llevar a cabo el proceso, la temperatura se eleva hasta los 200-210 °C. No conviene elevar más la temperatura ni mantenerla durante mucho tiempo con el fin de evitar la degradación del polímero.

### **Técnicas de prototipado rápido**

Una de las técnicas de prototipado rápido más importantes es la de *Solid Freeform Fabrication* (SFF). Esta técnica utiliza métodos de diseño y fabricación asistido por ordenador (sistemas CAD-CAM), lo que permite un mayor control de la porosidad y tamaño de poro del *scaffold* con respecto a técnicas de fabricación convencionales. La tecnología SFF implica la fabricación de objetos 3D (Figura 27) utilizando estrategias de fabricación por capas, en la cual los objetos 3D se construyen capa a capa, convirtiendo en sólido el material que se encuentra en stock en estado líquido o en polvos [Yang2002]. Un modelo sólido 3D informatizado, diseñado directamente por software CAD u obtenido mediante alguna técnica de imagen médica (tomografía computarizada o resonancia magnética), se divide en una serie de secciones transversales a modo de capas con un grosor pre-establecido. Los datos se ejecutan entonces en la máquina de SFF la cual reproduce físicamente el modelo. Empezando el modelo por la parte baja y construyendo las capas hacia arriba, cada nueva capa se adhiere a la anterior. En algunos casos es necesario un post-procesado para eliminar las estructuras temporales de soporte de la pieza final.

Algunas de las tecnologías SFF empleadas en la fabricación de *scaffolds* son: impresión 3D [Fierz2008], estereolitografía [Melchels2009], sinterizado laser selectivo [Simpson2008] y

sistemas basados en extrusión [Domingos2009]. La ventaja de estas técnicas es que permiten obtener formas geométricas complejas, mano de obra mínima, alta precisión, morfología de poro consistente, estructura anisotrópica y diversas condiciones de proceso (se evitan los porógenos, se realiza a temperatura ambiente). Los inconvenientes vienen de la dependencia del proceso y de las bajas propiedades mecánicas.



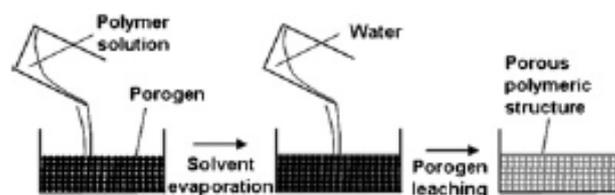
**Figura 27** *Scaffolds* poliméricos 3D producidos por tecnología Bioextruder [Domingos2009].

### Disolución-evaporación (*solvent-casting*)

Esta técnica, también llamada *solvent-casting*, permite obtener *scaffolds* laminares o 2D, teniendo como inconvenientes una escasa porosidad y la limitación del grosor de film. Sin embargo, el inconveniente de la escasa porosidad se puede solucionar mediante la adición de partículas porógenas [Suh2002].

La técnica implica la disolución del polímero en un disolvente apropiado y el vertido en un plato petri, para el caso de láminas finas 2D, o en un molde 3D previamente llenado con partículas porógenas, para el caso de láminas de mayor espesor y porosidad (Figura 28). Las partículas porógenas pueden ser una sal inorgánica como cloruro sódico, cristales de sacarosa, gelatina o esferas de parafina. El tamaño de estas partículas y su porcentaje respecto al polímero afecta directamente al tamaño de poro y a la porosidad de la estructura final. La disolución de polímero se vierte en el recipiente y se deja evaporar el disolvente, quedando la matriz polimérica con las partículas de sal en el interior. Esta estructura se sumerge en baño de agua o de algún disolvente alifático para eliminar solamente el porógeno. Una vez disuelto éste, se obtiene una estructura porosa. Mediante esta técnica se pueden obtener *scaffolds* altamente porosos (hasta 93%) y con un promedio de diámetro de poro de alrededor de 500  $\mu\text{m}$ . La principal ventaja de este método es su facilidad, y que no necesita equipamiento especializado. Además también permite la obtención de un gran rango de tamaños de poro (dependiente del tamaño del porógeno).

Como inconvenientes, el grosor máximo de los *scaffolds* 3D que se puede obtener es de alrededor de 2 mm debido a la dificultad de penetración del líquido en la fase de eliminación del porógeno. También pueden aparecer problemas de aglomeración y de falta de dispersión de las partículas de porógeno. Otro inconveniente es el del uso de disolventes, que si no se asegura su completa evaporación podrían afectar a la biocompatibilidad de los *scaffolds* [Sachlos2003, Yang2002].



**Figura 28** Proceso de disolución-evaporación con adición de partículas porógenas.

### ***Electrospinning***

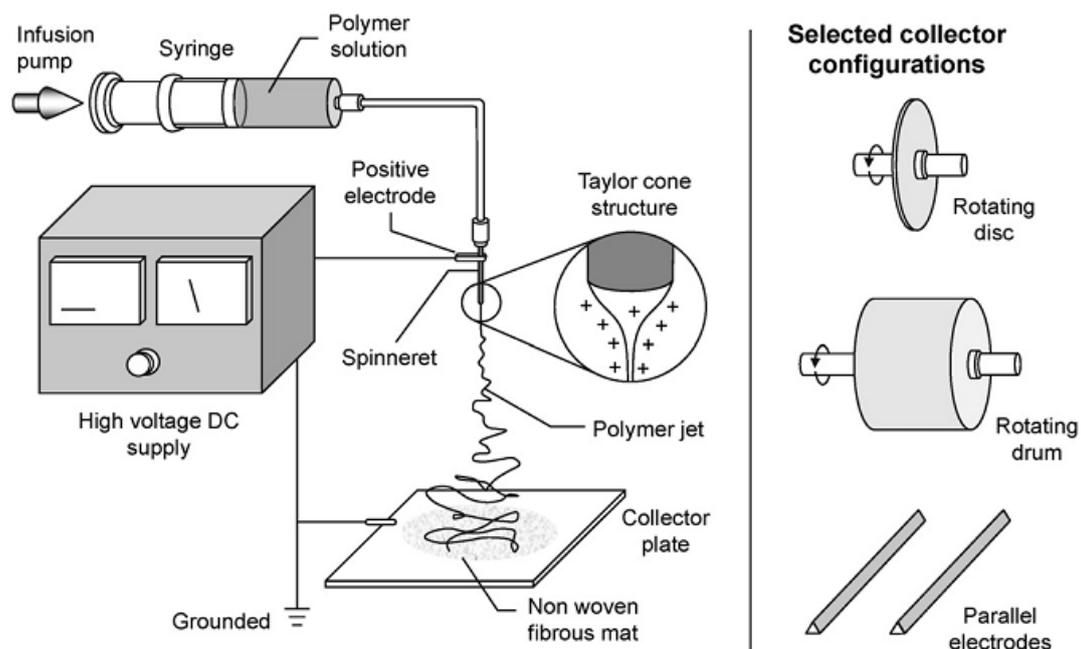
El *electrospinning* es una técnica que permite producir fibras de diámetro mucho menor que el de las producidas mediante técnicas tradicionales. El diámetro de estas fibras ultrafinas varía entre la escala micro y el nanómetro.

El proceso de *electrospinning* requiere la disolución del polímero o mezcla de polímeros en un disolvente, que normalmente consiste en cloroformo, tolueno, trifluoroetanol, dimetilformamida o una mezcla de varios en diferentes proporciones. Este proceso consiste en la fabricación de fibras por hilado a partir de la disolución de polímero y mediante la ayuda de la fuerza electrostática.

Debido al pequeño diámetro de las fibras obtenidas por *electrospinning*, éstas poseen una gran relación área/volumen, lo que las convierte en un material ideal para aplicaciones tales como *scaffolds* para la medicina regenerativa, vendaje de heridas, transporte de medicamentos, filtros de alto rendimiento, relleno para la fabricación de materiales nanocompuestos etc [Huang2003], debido a la posibilidad de control del tiempo de biodegradación.

En la Figura 29 se muestra un aparato de *electrospinning* de laboratorio. Como se puede observar, consta básicamente de los siguientes componentes: una fuente de alimentación de alto voltaje DC (escala kilovoltio), un sistema de inyección cargado, a modo de electrodo, con el voltaje aplicado por la fuente, una bomba que suministra la solución polimérica al sistema de inyección y un colector metálico que actúa a su vez como electrodo contrario atrayendo las fibras. La configuración habitual del aparato es la de aplicar el electrodo positivo al sistema de inyección y el colector a tierra, a modo de contra-electrodo, aunque también es posible fabricar fibra invirtiendo la polaridad. La base del funcionamiento

del *electrospinning* es la de cargar eléctricamente la solución polimérica en la punta de la aguja del sistema de inyección con un voltaje tal que la carga inducida haga salir eyectado al polímero hacia el colector cargado con signo contrario. Cuando se carga la solución polimérica se induce una repulsión electrostática (atracción hacia el colector) que actúa contra la tensión superficial de la misma solución, haciendo que la gota en la punta se alargue y que forme una figura característica conocida como el cono de Taylor. Cuando el voltaje supera un valor crítico (típicamente a partir de 10 kV para un sistema PLA-Cloroformo), la repulsión electrostática supera la tensión superficial de la solución, causando la eyección de ésta hacia el colector. Mientras el chorro de polímero se desplaza por el aire, el disolvente se evapora rápidamente, produciendo una fibra continua que se deposita en el colector [Huang2003, Ramakrishna2005]. La velocidad de evaporación influye en la morfología final de la fibra, ya que ésta puede evaporarse antes de llegar al colector o hacerlo una vez de haber sido depositada, en cuyo caso se soldarían las fibras en estado semisólido formando una red conectada una vez evaporado el disolvente. En el caso en que la evaporación del disolvente fuera especialmente rápida se podrían formar burbujas dentro de la fibra que se trasladarían al exterior creando así poros de tamaño nanométrico, convirtiendo la fibra en muy apropiada para ser utilizada en ciertas aplicaciones biomédicas. La morfología de ésta puede ser variada utilizando diversas configuraciones de colector, como por ejemplo trasladando longitudinalmente en una (x) o dos direcciones (x-y) el plato del colector se puede obtener un gran área de mat de fibra orientada aleatoriamente. En cambio para obtener fibras con un mayor grado de orientación se puede utilizar un tambor rotatorio, un disco o electrodos paralelos [Teo2006].



**Figura 29** Montaje típico de *electrospinning* y diferentes sistemas de colector: disco, tambor y electrodos paralelos.

El PLA es el material más comúnmente utilizado en *electrospinning* para la fabricación de fibras (Figura 20), con frecuentes aplicaciones como las biomédicas y la ingeniería de tejidos. Se pueden fabricar *scaffolds* para la regeneración tisular mediante operaciones como la orientación de fibra y el uso de colectores rotatorios [Zong2005,Yang2005,Vaz2005, Kim2006].

Las disoluciones con baja concentración de polímero favorecen la formación de fibras de pequeño diámetro, aunque son menos consistentes y tienden a proyectar pequeñas gotas de polímero a lo largo de su longitud, causando que los productos resultantes no sean aptos para su uso como *scaffolds*. Estos defectos se pueden reducir bien aumentando la concentración de polímero o bien incorporando una sal orgánica o inorgánica a la solución para mejorar la conductividad eléctrica [Jun2003,Zong2002]. El disolvente utilizado también afecta a la morfología de la superficie de la fibra.

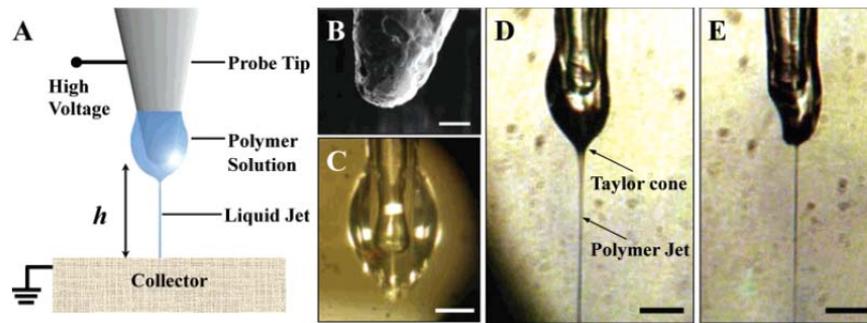
Hasta el momento, la fabricación comercial de fibras mediante *electrospinning* no se ha llevado a cabo por diversos factores entre los que se encuentran: bajo rendimiento, necesidad de uso de disolventes específicos y variación del diámetro de la fibra en el proceso. Aunque por el momento no tiene utilidades comerciales concretas, se puede concluir que es una técnica adecuada para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas.

### **Near field *electrospinning* (NFES)**

El proceso de NFES [Sun2006] se ha desarrollado para depositar sobre una superficie nanofibras sólidas cerámicas, poliméricas y compuestas, así como nanotubos con diámetros menores a 100 nm, de una manera directa, sólida y controlable.

Algunas aplicaciones típicas de este proceso son bio-*scaffolds*, vendaje de heridas, y filtros entre otras. Los investigadores están explorando la posibilidad de utilizar nanofibras para fabricar micro y nano-dispositivos como transistores, sensores ópticos, sensores de gas y deposición de ADN en chips funcionales [Sun2006]. En este tipo de aplicaciones la controlabilidad del proceso es un factor crítico. El proceso común de *electrospinning* en sí es inestable, ya que el jet líquido es incontrolable y se mueve de manera caótica e impredecible.

Existen hasta el momento muy pocos trabajos acerca del control del proceso de *electrospinning*, incluyendo entre ellos el alineamiento de nanofibras mediante campo eléctrico [Li2005] y el uso de ejes mecánicos. Se ha investigado desde el punto de vista de la física y química fundamental para mejorar el control del proceso, así como el efecto de la concentración de polímero, el voltaje aplicado y la distancia entre electrodo y colector [Son2004].

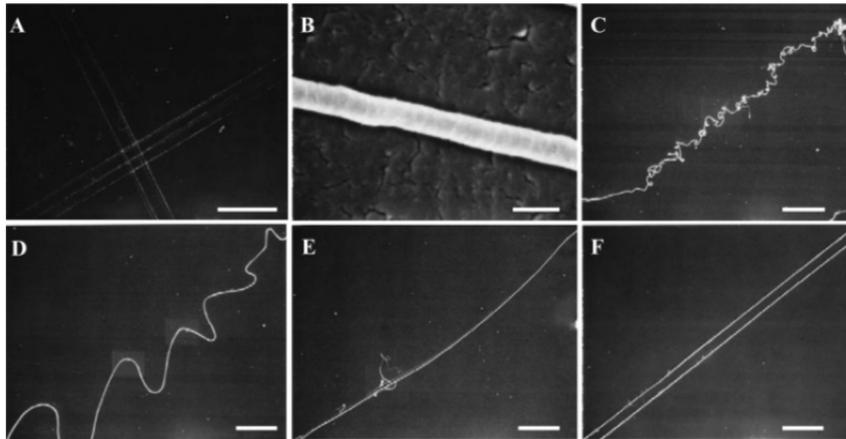


**Figura 30** A) Representación esquemática del sistema NFES. Una gota de la solución polimérica se adhiere a la punta de la misma manera que la tinta a una pluma estilográfica. B) Imagen SEM de la región de la punta del electrodo de diámetro  $25\ \mu\text{m}$ . Escala  $10\ \mu\text{m}$ . C) Foto óptica mostrando una gota de  $50\ \mu\text{m}$  pegada al electrodo de tungsteno. Escala  $20\ \mu\text{m}$ . D) Un chorro de polímero es eyectado desde el cono Taylor bajo un campo electrostático. Escala  $25\ \mu\text{m}$ . E) El tamaño de la gota decrece a medida que el chorro de polímero continúa creciendo. Escala  $25\ \mu\text{m}$ . [Sun2006].

El NFES (Figura 30) presenta varias diferencias respecto al proceso de *electrospinning* común [Sun2006]. En primer lugar, la distancia entre electrodo y colector  $h$  es considerablemente menor encontrándose en el rango de entre  $500\ \mu\text{m}$  y  $3\ \text{mm}$ , con el fin de utilizar la región estable del jet líquido para una deposición controlada. En segundo lugar, se utiliza una aguja de wolframio de  $25\ \mu\text{m}$  de diámetro de punta para obtener nanofibras con diámetro menor a  $100\ \text{nm}$ . En tercer lugar, el voltaje aplicado se reduce debido a la menor distancia entre electrodo y colector mientras que el campo eléctrico necesario para activar el proceso se mantiene en el rango de  $10^7\ \text{V/m}$ , siendo el mismo que en el proceso de *electrospinning* convencional. En cuarto lugar, el suministro de la disolución polimérica se realiza de manera diferenciada a modo de gotas, es decir, de forma análoga a como si se introdujera y sacase la punta del electrodo de tungsteno en la solución polimérica. Esta gota se expone al campo electrostático y forma un cono de Taylor, hasta que es proyectada hacia el colector. A medida que el proceso avanza la disolución polimérica de la punta del electrodo de tungsteno se va consumiendo, y reduce su diámetro, lo que conlleva a un cono de Taylor menor y a obtener nanofibras más finas. En quinto lugar, la velocidad del colector (movimientos x-y) se debe adecuar a la velocidad de *electrospinning* para evitar la falta o acumulación excesiva de material en éste haciendo que se pierda la controlabilidad del proceso.

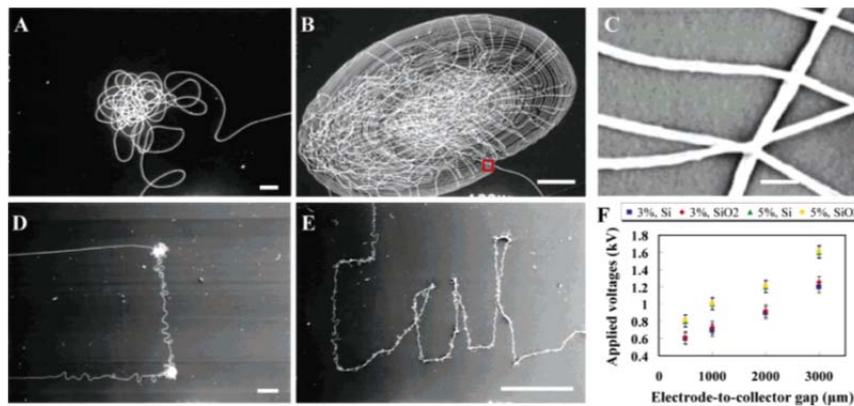
Durante el proceso de *electrospinning* se requiere adecuar además la distancia electrodo-colector al tipo de disolución polimérica para permitir la evaporación del disolvente y la obtención de unas fibras más finas. NFES tiene la ventaja de tener una región estable de jet líquido inmediatamente después de la zona de inyección (punta de la aguja), por lo que aunque se reduce la distancia electrodo-colector se obtiene una deposición controlada. El tamaño de gota, la concentración de la solución de polímero, el voltaje aplicado y la distancia electrodo-colector afectan colectivamente a la morfología de la fibra generada por *electrospinning*. En general la morfología de la fibra generada por NFES es bastante parecida

a la del *electrospinning* convencional. La controlabilidad del proceso se demuestra en la Figura 31 moviendo el colector en línea recta para generar nanofibras.



**Figura 31** A) Líneas paralelas y perpendiculares construidas por NFES. Escala 1 mm. B) Imagen SEM de una fibra de diámetro 300 nm. Escala 500 nm. C) Resultado de una velocidad de movimiento del colector de 5 cm/s, inferior a la de *electrospinning*, con la consecuente aparición de espirales. Escala 100  $\mu\text{m}$ . D) Velocidad del colector a 10 cm/s. Escala 100  $\mu\text{m}$ . E) Velocidad del colector a 15 cm/s. Escala 100  $\mu\text{m}$ . F) Velocidad del colector a 20 cm/s. Se pueden construir líneas rectas. Las líneas paralelas están separadas 25  $\mu\text{m}$  y bajo el control de un dispositivo x-y. Escala 100  $\mu\text{m}$ . [Sun2006].

En la Figura 31A se puede observar un ejemplo de la alta controlabilidad del proceso, en el que aparecen fibras colocadas de forma paralela y perpendicular entre sí utilizando una plataforma x-y (Nano Workcell, Adept Japan Inc.) Las características del experimento son: distancia electrodo-colector 1 mm, voltaje aplicado 1000 V y solución 5% en peso de PEO (Polyethilen Oxide). En la Figura 31B se muestra mediante SEM el diámetro típico de fibra obtenido con este método y estas características de proceso. En el caso del PEO es de 300 nm.



**Figura 32** A) Efecto espiral observado durante un cambio de dirección de 90° del colector, debido a que permanece estático durante 0,5 segundos. La acumulación de material es de diámetro 50  $\mu\text{m}$ . Escala 10  $\mu\text{m}$ . B) Efecto espiral aumentado debido al recubrimiento del sustrato con una capa aislante de dióxido de silicio. Los anillos concéntricos tienen un diámetro de 300  $\mu\text{m}$ . Escala 100  $\mu\text{m}$ . C) Vista amplificada del efecto visto en B. La distancia entre fibras es de 1,5  $\mu\text{m}$ . Escala 1  $\mu\text{m}$ . D) Trazado manual de una “U” por NFES. Se observa la deposición excesiva de fibras en las esquinas debido al efecto comentado en A. Escala 100  $\mu\text{m}$ . E) Caracteres “Cal” trazados manualmente. Escala 1 mm. F) Resultados experimentales de la distancia electrodo-colector vs. voltaje mínimo requerido para activar el proceso de NFES con varias concentraciones de polímero y varios materiales de colector. [Sun2006].

La deposición de la fibra y por lo tanto, su geometría, dependen tanto de la velocidad de salida del jet líquido de polímero como de la velocidad de movimiento de la plataforma (Figura 32). Si la velocidad de *electrospinning* es mayor que la del colector el jet líquido se amontona y crea una espiral que viene como resultado de la repulsión electrostática entre fibras. La espiral disminuye a medida que se aumenta la velocidad de movimiento x-y del colector, resultando en una fibra recta en el momento que se igualan ambas velocidades. Las espirales formadas mediante NFES son, en regla general, de diámetro menor que las formadas por la técnica convencional. Cuando se requiere hacer una deposición controlada puede que surjan problemas como las micro-paradas y los cambios de dirección x-y, en los que aparece el fenómeno de acumulación en espiral. Para evitar este efecto espiral sería necesario no solo controlar la velocidad de movimiento del colector, sino controlar también la velocidad de *electrospinning* y los diversos factores que la afectan como la viscosidad, conductividad y tensión superficial de la solución polimérica, campo eléctrico aplicado, diámetro de punta, tamaño de gota y parámetros ambientales.

En cuanto a los parámetros de proceso, el voltaje mínimo aplicado aumenta según aumenta la distancia electrodo-colector o la concentración de la solución de polímero. El tipo de material de colector también influye en el diámetro de la fibra. En el caso del PEO se tienen dos colectores, uno de silicio y el otro recubierto de una capa de dióxido de silicio. Se consiguen fibras de diámetro en el rango 150-300 nm y 50-200 nm respectivamente.

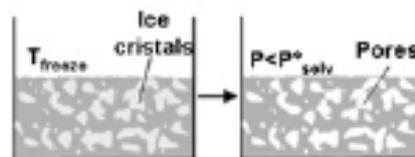
Por tanto, el NFES es un método para la fabricación y deposición de nanofibras con gran control.

## **Liofilización**

El proceso de liofilización [Puppi2010] supone la eliminación de un disolvente (normalmente agua), primeramente por sublimación de la muestra helada, y seguidamente por desorción del restante disolvente (no congelado) de la muestra bajo una reducida presión. Durante el proceso se congela el producto y una vez congelado se introduce en una cámara de vacío para que se separe el agua por sublimación (Figura 33). De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original.

Mediante este proceso se pueden preparar *scaffolds* poliméricos. En la etapa de congelación la disolución polimérica se enfría hasta una temperatura en la que todo el material esté en estado congelado formando cristales de hielo y forzando a las moléculas poliméricas a agregarse en los espacios intersticiales. En la segunda fase, se elimina el

disolvente aplicando una presión menor que la presión de equilibrio de vapor del disolvente congelado. Mientras tanto, puede que cierta cantidad del agua no congelada durante el proceso sea desorbida. Cuando el disolvente congelado se sublima completamente el proceso continúa por medio de un ligero calentamiento hasta lograr un completo secado de la muestra [Pikal1990, Thomson1997]. La sublimación de los cristales de hielo causa la formación de una esponja altamente porosa. La estructura porosa final depende de varios parámetros del proceso como pH, relación de congelación y presión parcial [Dagalakis1980]. Un proceso de congelación rápido y descontrolado conduciría a una nucleación y a un crecimiento de cristales no uniforme y consecuentemente, a una heterogeneidad morfológica del *scaffold* causada por la transferencia de calor a través de un sistema dependiente de las variables de espacio y tiempo. Por lo demás, se pueden obtener *scaffolds* porosos uniformes utilizando un ratio de congelación constante [OBrien2004]. Mediante la liofilización se pueden obtener *scaffolds* altamente porosos, con estructuras interconectadas y pequeño tamaño de poro [Thomson1997].



**Figura 33** Proceso de liofilización.

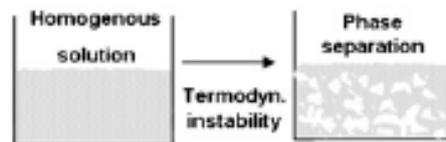
## Separación de fases

La tecnología de separación de fases consiste en establecer una inestabilidad termodinámica en una disolución polimérica homogénea multi-componente que, bajo ciertas condiciones, tiende a separarse en más de una fase para disminuir su energía libre total. La disolución polimérica se separa en dos fases: una rica y la otra pobre en polímero. La fase rica en polímero se solidifica y la fase pobre se elimina, dejando una red polimérica altamente porosa [Mikos2000].

- Separación de Fases Inducida Térmicamente (TIPS)

La técnica de separación de fases más utilizada en la fabricación de *scaffolds* 3D es la Separación de Fases Inducida Térmicamente (TIPS) [Zhang1999]. El principio básico del TIPS consiste en llevar a una disolución polimérica de la región de fase simple homogénea a la región espinodal de su diagrama de fase binaria, mediante un cambio rápido de temperatura. Esto se hace, o bien enfriando rápidamente la disolución polimérica a la temperatura de disolución crítica más alta, o calentando la disolución polimérica a la

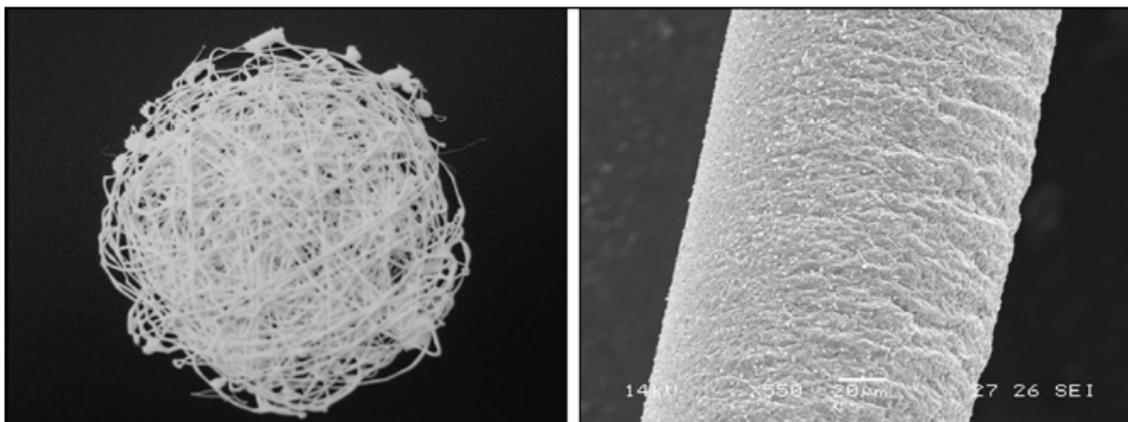
temperatura de disolución crítica más baja (Figura 34). Cuando una disolución polimérica se lleva a la región espinodal, se convierte en inestable y se separa espontáneamente en regiones ricas y pobres en polímero [Mikos2000]. En general, la estructura micro y macro se controla variando diversos parámetros del proceso como la concentración de polímero y la temperatura. Una eliminación incompleta del disolvente, especialmente en construcciones de gran espesor, conduciría a una reducción de biocompatibilidad y a la alteración de los factores activos incorporados. Mediante TIPS se obtienen matrices porosas altamente interconectadas [LaCarrubba2008], aunque no se obtiene un gran rango de tamaños de poro y es difícil el control de la estructura micro y macro [Thomson1997].



**Figura 34** Proceso de separación de fases inducida térmicamente.

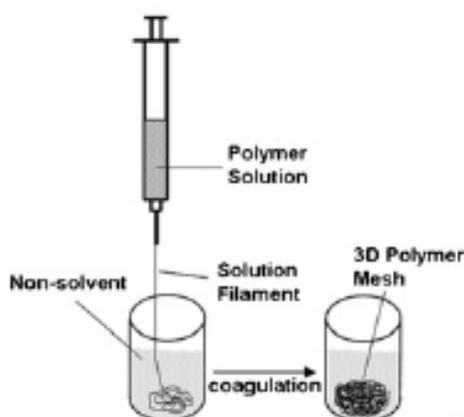
- *Wet-spinning*

El *wet-spinning* es una técnica de inversión de fase que permite obtener fibra de polímero de tamaño micrométrico a través de la precipitación por inmersión. Entre todas las técnicas de fabricación de fibras para su uso en la industria biomédica, el *wet-spinning* es la más utilizada para producir fibras naturales como quitina (chitin) y quitosano (chitosán), que no pueden ser fabricadas por otras técnicas. Una fibra polimérica continua se produce por precipitación (Figura 36) de un filamento de disolución de polímero en un baño coagulante compuesto por un mal disolvente (no-disolvente) o una mezcla de disolvente y no-disolvente, con respecto al polímero procesado. El filamento de disolución homogéneo, compuesto de polímero, disolvente y posibles aditivos, solidifica debido al intercambio entre disolvente y no-disolvente. De esta manera se puede fabricar una red 3D por medio de la deposición aleatoria de la fibra continua coagulada (Figura 35).



**Figura 35** Izqda. Fotografía de una red polimérica 3D producida por *wet-spinning*. Drcha. Imagen SEM de una microfibrilla fabricada por *wet-spinning*.

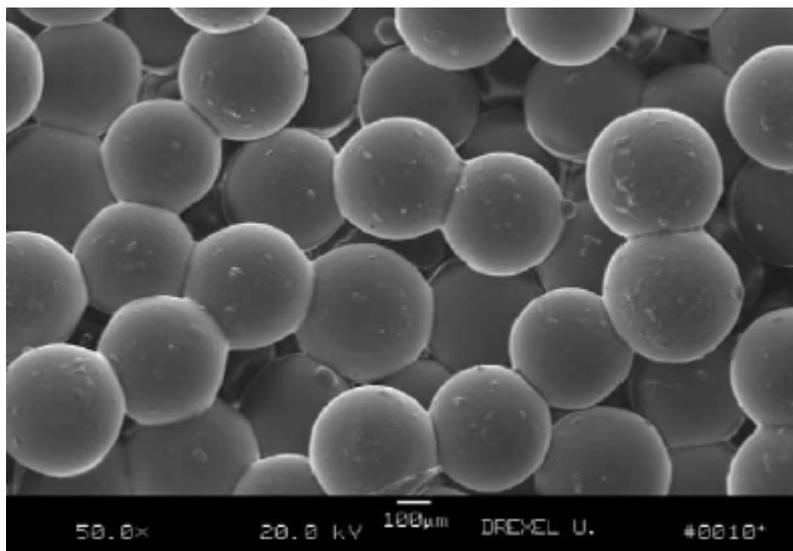
En los últimos años se han fabricado *scaffolds* de varios polímeros como PLLA [Crow2005], PLGA [Crow2006], PCL [Williamson2004], etc para la ingeniería de tejidos. Un ejemplo es el de los *scaffolds* compuestos por PLLA y quitosán fabricados por *wet-spinning* utilizados para la regeneración de tejido óseo debido a su compatibilidad con los osteoblastos [Zhang2007b].



**Figura 36** Proceso de *wet-spinning*.

## Sinterizado

Esta técnica consiste en fabricar *scaffolds* sinterizando micro-esferas de polímero [Borden2002], previamente fabricadas mediante una técnica de disolución-evaporación. El proceso de sinterizado consiste en calentar estas micro-esferas en un molde unos 5 °C por encima de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). De esta manera las cadenas poliméricas adquieren movilidad e interactúan con las cadenas vecinas formando contactos entre las micro-esferas (Figura 37). Al enfriarse a temperatura ambiente estos enlaces se fijan, creando así un *scaffold* polimérico 3D con porosidad interconectada y un diámetro de poro que depende directamente del diámetro de las micro-esferas.



**Figura 37** Matriz de micro-esferas sinterizadas fabricada con micro-esferas de 355–425  $\mu\text{m}$ . Las micro-esferas de PLGA se calentaron durante 24 horas a 62  $^{\circ}\text{C}$ .

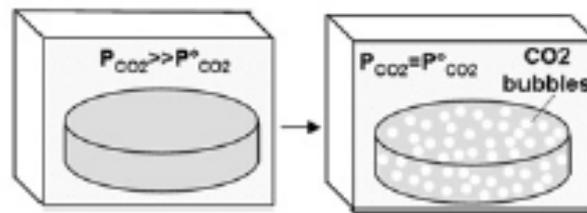
## Espumado

El espumado del PLA se lleva a cabo disolviendo un agente de expansión en una matriz polimérica. La solubilidad del agente gaseoso es reducida rápidamente mediante una inestabilidad termodinámica en la estructura (incremento de temperatura o disminución de presión), para inducir una nucleación de burbujas. Para estabilizar las burbujas y lograr las celdas porosas, la espuma se vitrifica cuando la temperatura se reduce por debajo de la  $T_g$  del polímero [Di2005].

- *Supercritical CO<sub>2</sub> technology*

Un fluido supercrítico se crea cuando una sustancia es expuesta a un entorno en el cual se exceden su temperatura y presión críticas. Bajo estas condiciones los componentes líquidos y gaseosos del material se vuelven idénticos, y una futura compresión del fluido no resultaría en licuefacción. El CO<sub>2</sub> es el fluido más utilizado debido a su baja toxicidad, baja inflamabilidad, bajo coste, fácil disponibilidad, estabilidad y aceptación medioambiental. Las condiciones críticas de presión (73,8 bar) y temperatura (31  $^{\circ}\text{C}$ ) son fácilmente alcanzables [Quirk2004]. Esta tecnología puede ser utilizada para fabricar *scaffolds* altamente porosos [Mooney1996]. Para producir estructuras macroporosas el polímero se expone a CO<sub>2</sub> a alta presión (1-6 MPa) a temperatura ambiente para permitir la saturación del gas en el polímero, formando una disolución polímero-gas. La solubilidad del gas en el polímero se disminuye rápidamente reduciendo la presión CO<sub>2</sub> a nivel ambiental, causando la nucleación y crecimiento de las burbujas de gas (Figura 38) y formando los poros con tamaño de hasta 500  $\mu\text{m}$ . La ventaja de esta técnica es que no requiere del uso de disolventes orgánicos que pondrían en peligro la bioactividad. En cambio, la porosidad no está totalmente

interconectada y la superficie no es porosa aunque el interior del *scaffold* sí que lo sea [Quirk2004, Mooney1996].



**Figura 38** Proceso de supercritical-CO<sub>2</sub> technology.

- Espumado de micro-esferas porosas

Los *scaffolds* obtenidos mediante el espumado de micro-esferas porosas están diseñados para ser inyectados en el interior del defecto junto a las células [Kim2006b]. El proceso de fabricación consiste en la evaporación del disolvente de una doble emulsión agua/aceite/agua modificada y agitada en centrifugadora en dos etapas. Como agente espumante se utiliza una sal efervescente (bicarbonato de amonio) que se incorpora a la emulsión primaria para generar burbujas de dióxido de carbono y amoniaco gaseoso durante el proceso de evaporación del disolvente en la segunda etapa. De esta manera se generan unas micro-esferas que, en conjunto, generan una porosidad interconectada de tamaño de poro 20  $\mu\text{m}$  aproximadamente, muy adecuada para la bioactividad celular.

- Espumado de láminas porosas

Este tipo de *scaffold* consiste en una lámina porosa fabricada mediante un proceso muy parecido y con los mismos materiales que los del espumado de micro-esferas porosas [Kim2006b]. La diferencia radica en que la emulsión es simple (agua/aceite) y que se vierte directamente sobre un plato petri tras ser agitado en la centrifugadora. También se pueden fabricar *scaffolds* espumados porosos de mayor grosor (3D) mediante el método TIPS seguido de una sublimación del disolvente por liofilización [Boccaccini2006, LaCarrubba2008].

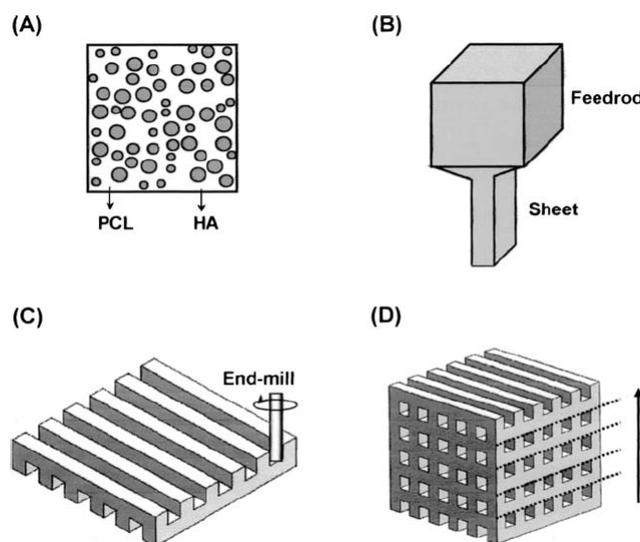
## Micro-fabricación

Los procesos de micro-fabricación se entienden como las operaciones secundarias que se realizarían a la pieza, una vez fabricada, para proporcionarle una mayor porosidad o rugosidad. Estos procesos podrían ser: micro-mecanizado, micro-punzonado o micro-mecanizado laser. También se podrían conocer como micro-fabricación aquellas técnicas encargadas de proporcionar ciertas características topográficas a las piezas mediante métodos de estampación de patrones (a piezas previamente fabricadas), o de litografía.

- Micro-mecanizado

El micro-mecanizado es un proceso secundario en el que se dota al *scaffold* de ciertas propiedades adicionales como porosidad, rugosidad etc. En el siguiente ejemplo se fabrican *scaffolds composites* de PCL/HA mediante una combinación de mecanizado bi-axial y laminación. De esta manera se consigue dotar al *scaffold* de unos micro-canales conectados en 3D, exhibiendo también una gran ductilidad, moderada resistencia y buena respuesta celular [Koh2006].

El esquema del proceso se puede observar en la Figura 39. Se mezcla PCL, a modo de matriz bio-polimérica, con HA, a modo de material cerámico de relleno. El *composite* se prepara mezclando el 60% en peso de HA con el 40% en peso de PCL en estado fundido a 90 °C durante 1 hora con la ayuda de un mezclador. Una vez que el *composite* ha sido fabricado, se introduce en un molde, se calienta a 100 °C y se aplican 30 MPa de presión al conjunto con la ayuda de un cilindro, ocurriendo así la extrusión del material a través de un orificio de 24 x 1 mm. Esto produce una lámina termoplástica continua de 1 mm de grosor. Las láminas termoplásticas se mecanizan bi-axialmente utilizando una mini-máquina CNC comandada por un sistema CAD programado para crear los canales periódicos. El fresado se realiza a 6500 rpm con una fresa de punta de carburo de 500 μm de diámetro. Primeramente se mecaniza una cara, con unos macro-canales paralelos en toda la superficie de 12 x 0,5 x 0,5 mm a modo de matriz, y seguidamente se mecaniza la otra cara con la misma matriz de canales pero con la diferencia de estar 90° girado, obteniendo unos canales perpendiculares a los anteriores. Las láminas resultantes son tratadas con diclorometano a modo de disolvente para producir su unión permanente y construir así el *scaffold* [Koh2006].

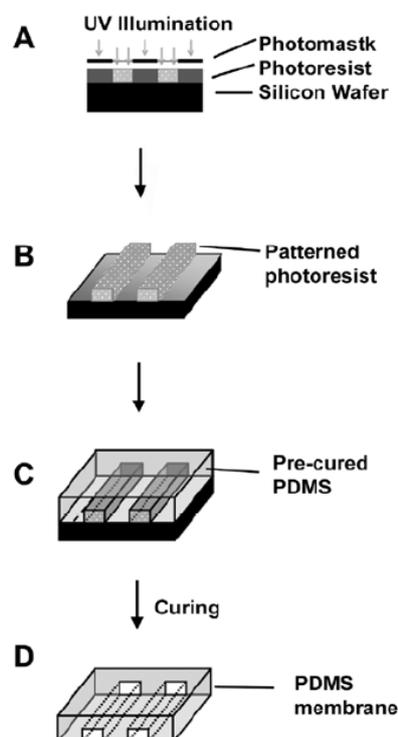


**Figura 39** Representación esquemática del proceso de fabricación de *scaffolds*. A) Preparación del compuesto termoplástico PCL/HA. B) Extrusión del material formando una lámina. C) Mecanizado bi-axial de la lámina. D) Unión de las láminas para formar el *scaffold*.

- Litografía

La micro-fabricación utilizando litografía es una técnica que puede reproducir topográficamente una estructura superficial pre-establecida de una manera altamente reproducible. Las superficies microestructuradas controlan varios aspectos del comportamiento celular, entre los que se incluyen la organización espacial, la migración, la proliferación y la supervivencia celular.

El proceso es el siguiente: primeramente se realiza una máscara que tiene unos canales de dimensiones:  $10\ \mu\text{m}$  de alto x  $10\ \mu\text{m}$  de ancho x 4 cm de largo. Paralelamente se cubre una lámina de silicio con un polímero foto-resistente por medio de *spinning*, con un grosor aproximado de  $3\ \mu\text{m}$ . Seguidamente se instala la máscara sobre la lámina de silicio y el polímero, y se irradia luz UV. Posteriormente, para lograr el endurecimiento final se mete en un horno y se trata con varios productos como una disolución de revelado foto-resistente. De esta manera se obtiene el patrón con el cual fabricar el *scaffold*. En la Figura 40 se puede ver un esquema del proceso. Seguidamente, el polímero se vierte sobre la lámina y se calienta para permitir la polimerización. Una vez polimerizado, se retiran las membranas, se limpian en agua por ultrasonidos y se pre-tratan con plasma de oxígeno y un 2% de gelatina antes de cultivar las células. Las dimensiones finales de los canales del *scaffold* son las mismas que las del patrón [Huang2010].



**Figura 40** Fabricación de films de PDMS microestructurados. A) Se cubre una lámina de silicio con polímero fotoresistente negativo mediante *spinning*, y se irradia con luz UV a través de una máscara. B) El polímero fotoresistente que no ha sido polimerizado con UV se lava y se retira quedando la superficie estructurada. C) El PDMS se vierte en la lámina mediante *spinning* y se polimeriza. D) Los films curados se retiran de la lámina de silicio.

### 1.2.4 Caracterización de la biodegradabilidad en líquido fisiológico

Existen ciertos métodos estándares de determinación de la biodegradabilidad, dependiendo del entorno: agua, tierra o compost. Para un mismo tipo de muestra, la velocidad de degradación varía dependiendo de las condiciones de contenido en agua, pH, temperatura, contenido en nutrientes etc. En el caso de los métodos de evaluación de la biodegradabilidad en laboratorio se siguen los procedimientos descritos en la norma ISO, como el ISO 14851 [ISO], que utiliza un medio acuoso aeróbico para degradación hidrolítica en aplicaciones en Medicina, o el ISO 14855-1 [ISO], que utiliza un compost controlado aeróbicamente para degradación enzimática en aplicaciones de envasado y embalaje. En el procedimiento ISO 14851 se mide la demanda de oxígeno mediante un respirómetro, mientras que el ISO 14855-1, publicado en 2005, se describe como un método de evaluación standard para plásticos biodegradables en compost a 60 °C [Kunioka2006].

En el caso concreto de los *scaffolds* [Li2009], el procedimiento consiste en introducir un cierto número de repeticiones de la muestra en una solución acuosa y salina (*Phosphate Buffered Saline*-PBS) con pH alrededor de 7,4. Esta solución es agitada a 60 rpm a una temperatura de 37 °C durante 4 semanas. El medio de degradación se reemplaza periódicamente durante todo el experimento (semanalmente). Las muestras se limpian con agua destilada y se secan en vacío durante 24 horas antes de medir la biodegradación por medio de la pérdida de masa y del peso molecular [Lee2005].

### 1.2.5 Caracterización biológica - Cultivo celular

En este apartado primeramente se definen los tipos de células madre utilizados en la Ingeniería de Tejidos, y después se describe el procedimiento de cultivo celular en los *scaffolds*.

#### Tipos de células madre

Las células madre o células indiferenciadas son células que tienen la capacidad de auto-renovarse mediante divisiones mitóticas o bien de continuar la vía de diferenciación para la que están programadas y, por lo tanto, producir uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados en función de su grado de multipotencialidad.

Básicamente, en biología se trabaja sobre dos tipos de células madre [Caplan2005]:

- a) **Células madre embrionarias** (pluripotentes): En la actualidad se utilizan como modelo para estudiar el desarrollo embrionario y para entender cuáles son los mecanismos y las señales que permiten a una célula pluripotente llegar a formar

cualquier célula plenamente diferenciada del organismo. En la médula ósea, aunque también en la sangre del cordón umbilical, en la sangre periférica y en la grasa corporal se ha encontrado este tipo de célula madre no-diferenciada, también denominada mesénquimal o MSC (*Mesenchymal Stem Cells*) que puede diferenciarse en numerosos tipos de células de los tres derivados embrionarios (musculares, vasculares, nerviosas, hematopoyéticas, óseas, etc). Actualmente se están realizando abundantes ensayos clínicos para sustituir tejidos dañados por derivados de estas células.

- b) **Células madre adultas:** En un individuo adulto se conocen hasta ahora alrededor de 20 tipos distintos de células madre, que son las encargadas de regenerar tejidos en continuo desgaste (como la piel o la sangre) o dañados (como el hígado). Su capacidad es más limitada para generar células especializadas. Como ejemplos se pueden nombrar, por un lado las células madre hematopoyéticas de médula ósea (encargadas de la formación de la sangre), que son las más conocidas y empleadas desde hace tiempo, y por otro las células específicas del tejido a reparar (condrogénicas), que se encuentran ya diferenciadas como en el caso del cartílago.

Tanto en el primer caso como en el segundo, es necesario disponer de *scaffolds* en los que cultivar las células *in vitro*, y que éstas sean alimentadas mediante un adecuado aporte de nutrientes y sean capaces de desarrollarse (proliferar) y de diferenciarse en células condrocíticas (células de cartílago), antes de ser transplantadas al paciente para regenerar el tejido. Cabe destacar que, a pesar de los rigurosos controles sanitarios y administrativos, no hay mucha dificultad en la obtención de MSC's ya que se encuentran en abundancia en ciertas partes del cuerpo como la médula ósea. Por ejemplo, 0,5 ml de médula ósea aportan cinco millones de células de este tipo [Janjanin2008].

Los *scaffolds* deben cumplir ciertos requisitos, como biodegradabilidad, biocompatibilidad, resistencia y estabilidad mecánica, suficiente porosidad para la adhesión celular y un adecuado y homogéneo transporte de nutrientes a través de los poros [O'Brien2005].

Profundizando en los casos específicos de la porosidad y del adecuado transporte de nutrientes, para una correcta regeneración celular se requiere que los *scaffolds* posean una estructura porosa interconectada, con un tamaño de poro adecuado a las células a cultivar [Hutmacher2000, Ratner1996, Puppi2010], siendo células condrocíticas en este caso. En la bibliografía se pueden encontrar muchos trabajos acerca de los efectos del tamaño de poro sobre el cultivo de células condrocíticas en *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning* y otros procesos [O'Brien2005]. Algunos de ellos informan de tamaños de poro del rango 50-500  $\mu\text{m}$  [Lien2009], 100-400  $\mu\text{m}$  [Yamane2007], 150-200  $\mu\text{m}$  [Lu2007], 2-465  $\mu\text{m}$  [Li2002] y 10-

120  $\mu\text{m}$  [Griffon2006]. Aunque los valores son similares no existe un acuerdo general sobre el tamaño adecuado de poro, excepto para el tamaño de poro mínimo que obviamente debería ser mayor que el propio tamaño de la célula condrocítica (alrededor de 5-15  $\mu\text{m}$ ) [Li2002]. En cualquier caso, en todos estos trabajos en los que se informaba de diferentes tamaños de poro, el cultivo celular condrocítico fue llevado a cabo de manera satisfactoria.

### **Caracterización biológica del *scaffold***

La caracterización biológica de films y *scaffolds* consiste en la comprobación de si ocurre el cultivo celular o no. En el siguiente artículo [Meinel2004] se cultivan células madre (MSC) procedentes de médula ósea. Estas células se tratan con diversos medios antes de ser cultivadas en los *scaffolds*. La diferenciación condrogénica u osteoblástica de las MSC se analiza mediante un *scaffold* sumergido en un medio de control, un medio condrogénico o un medio osteogénico. Las células se mantienen en ese medio durante 24 horas en ciertas condiciones de temperatura (37 °C). El medio se cambia cada 2-3 días. Tras 4 semanas de cultivo los *scaffolds* se limpian, se tratan con varios productos y se comprueba la tinción que, dependiendo del color, indica la presencia de tejido mineralizado óseo, tejido fibroso o tejido cartilaginoso.

### **1.3 Análisis crítico del estado del arte**

Tras revisar la bibliografía existente, es evidente el interés que los nuevos biopolímeros, sobre todo en forma de *biocomposites*, están suscitando en el ámbito de la Medicina Regenerativa. El motivo de tal interés es que los nuevos *biocomposites*, que combinan las propiedades de los materiales base que los componen, presentan ventajas como una mayor resistencia mecánica, una mayor resistencia a la degradación térmica, una menor complejidad de procesamiento o un mayor control de la biodegradabilidad. Ventajas que podrían favorecer la fabricación industrial de *scaffolds* a mayor cadencia de producción, menor coste y mejores propiedades finales.

Los esfuerzos en el presente trabajo de tesis doctoral se han centrado en la fabricación y posterior caracterización de un *biocomposite* reforzado con nanomoléculas, peg-POSS/PLLA, para su aplicación como *scaffold* en la Medicina Regenerativa. Por un lado, existen trabajos en los que se han fabricado *scaffolds* a partir de PLLA o de *composites* basados en PLLA. Sin embargo, estos *scaffolds* presentaban problemas de resistencia mecánica, o de degradación térmica durante el procesado, lo que podría comprometer su

integridad estructural o resistencia mecánica durante el uso clínico [Hutmacher2000,Li2002].

En la bibliografía también se destacan ciertos tipos de POSS utilizados tanto como refuerzo de polímeros en general, como refuerzos de PLA. Sin embargo, son escasos los estudios sobre *composites* reforzados con POSS orientados a aplicaciones con carácter biológico o biomédico; y hasta la fecha, no se ha descrito ningún trabajo sobre peg-POSS para este tipo de aplicaciones.

Por otro lado, en la bibliografía se resumen los procesos más utilizados para fabricar *scaffolds*, a partir de diversos materiales. Uno de los procesos más utilizados es el proceso de *electrospinning*, que confiere un entorno idóneo para el cultivo celular y la consecución exitosa de la regeneración tisular, debido a que se acumulan fibras de tamaño nanométrico que a su vez generan poros entre ellas que biometizan las características biológicas del cuerpo humano. Sin embargo, el proceso de *electrospinning* es un proceso complejo dependiente de diversas variables, y tanto la posibilidad de que se generen fibras como el tamaño de éstas depende enormemente de los materiales utilizados y del medio de disolución. Por eso es importante estudiar la posibilidad de que ocurra el proceso o no con estos materiales, y conocer su influencia en los parámetros de proceso.

En los siguientes puntos se destacan ciertos aspectos del estado del arte, así como las oportunidades para aportar conocimiento:

- Se han estudiado las propiedades del PLA y se han constatado sus puntos débiles y sus fortalezas. El PLA presenta una resistencia y rigidez relativamente buenas, aunque se podrían mejorar. Sin embargo, presenta una baja resistencia a impacto, una cinética de cristalización lenta, una baja temperatura de deformación bajo carga y una baja estabilidad térmica [Arraiza2007], que podrían limitar el procesado de este polímero mediante métodos de fabricación térmicos, su industrialización en masa, o su utilización para ciertas aplicaciones. Tradicionalmente el PLA ha sido mezclado con otros polímeros y/o aditivos, tanto en la escala micrométrica como en la escala nanométrica, para superar estos inconvenientes. En general, se ha constatado que las propiedades de los *composites* basados en PLA y aditivos de tamaño nanométrico son superiores a las de los aditivos de tamaño micrométrico. Por otro lado, en los últimos años ha florecido el uso de las nanomoléculas POSS, que tienen una baja densidad y presentan el menor tamaño de entre los nanoaditivos, siendo también las más monodispersas [Raquez2013]. Hasta la fecha no se encuentran en la literatura muchos trabajos que traten sobre PLA y nanomoléculas de POSS, pero se ha podido comprobar en estudios basados en *composites* de otros polímeros y POSS que las propiedades han mejorado considerablemente respecto al material base y respecto a

otros aditivos, sobre todo en cuanto a la estabilidad térmica. En este trabajo se propone mezclar PLLA con nanomoléculas polyethylene glycol-POSS (peg-POSS), hasta la fecha un *composite* inédito en la literatura, para estudiar su efecto sobre las propiedades termomecánicas del PLLA, poniendo especial énfasis en la cristalinidad del polímero.

- En la literatura se han analizado la estructura cristalina y la cristalinidad del PLA y de diversos *nanocomposites* basados en PLA, tanto por métodos isotermos como no-isotermos. Esta técnica requiere del análisis de las gráficas obtenidas mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de los diferentes materiales. Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio del conjunto peg-POSS/PLLA ni mediante métodos isotérmicos ni dinámicos, por lo que no se conoce la influencia de estas nanomoléculas sobre la cristalinidad y las propiedades estructurales de la matriz de PLA.
- Existen diversos métodos de fabricación de *scaffolds*, contando cada uno de ellos con características únicas. Los más utilizados en la fabricación de *scaffolds* son los procesos de *electrospinning*, de *solvent-casting* y de moldeo-inyección. Sin embargo, el uso de los métodos de *electrospinning* y de *solvent-casting* se limita a pequeños lotes o a incluso, unidades fabricadas en laboratorio, conllevando ello a una baja cadencia y a un gran coste económico. Hasta el momento no se ha dado el paso de optimizar los procesos ni de *electrospinning* ni de *solvent-casting* para poder ser industrializados.
- El proceso de *electrospinning* es un proceso que, desde el punto de vista biomédico, confiere un entorno idóneo para el cultivo celular gracias al tamaño nanométrico de las fibras fabricadas y de los poros que se generan entre ellas. Sin embargo, es un proceso complejo dependiente de múltiples variables, y tanto la posibilidad de que se generen fibras o no como el tamaño de éstas depende enormemente de los materiales utilizados y del medio de disolución. Son escasos los trabajos que se encuentran en la literatura sobre *electrospinning* de *composites* basados en POSS, no existiendo ninguno de peg-POSS/PLLA. Por ello es importante estudiar completamente el proceso, analizando primeramente la posibilidad de que ocurra el proceso y se generen fibras con estos materiales, y analizando posteriormente su influencia en los diversos parámetros del proceso, aportando de esta manera nueva información a la literatura.
- El proceso de moldeo-inyección es un proceso que habitualmente se ha utilizado para la fabricación de grandes lotes de piezas poliméricas por ser un proceso económico, rápido y automatizable. Sin embargo, este proceso podría presentar problemas cuando se trabaja con polímeros con baja estabilidad térmica como el PLA. Sería

interesante aumentar la estabilidad térmica del material de cara a poder fabricar *scaffolds* mediante esta tecnología.

- El proceso de moldeo-inyección, al tratarse de un método térmico, también podría modificar la estructura cristalina del material durante el procesado. De esta manera, el método de fabricación podría comportarse como un tratamiento térmico que mediante el aumento de la cristalinidad, aumentase indirectamente otras propiedades como la resistencia mecánica, la rigidez, el tiempo de biodegradación etc. Como se ha comentado en un punto anterior, en la literatura existen diversos estudios que tratan sobre el comportamiento cristalino del PLA y de diversos *nanocomposites* basados en PLA, tanto por métodos isoterms como dinámicos. Los que más se asemejan a un proceso de fabricación real son los métodos dinámicos, que contemplan rampas de enfriamiento y de calentamiento próximas a las velocidades que se utilizan en procesos reales. Mediante el control de estos parámetros se le podría otorgar al material el grado de cristalinidad requerido para cada aplicación, conllevando ello unas propiedades específicas dependientes de ese grado de cristalinidad. Sin embargo, en la literatura no se describe el comportamiento cristalino no-isotermo de los compuestos peg-POSS/PLLA. La realización de este tipo de estudios podría ayudar a optimizar las propiedades del material directamente durante la fabricación de los *scaffolds* por métodos térmicos, obteniendo así productos con propiedades a la carta.
- En la literatura se encuentran numerosos ejemplos de materiales o compuestos destinados a aplicaciones biológicas. Estos materiales se conocen como biomateriales o *biocomposites*, y tienen que cumplir la condición indispensable de biocompatibilidad. Sin embargo, poder catalogar un material como biocompatible requiere de severas restricciones como la realización de numerosas estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, y de la consecución de diversos permisos, que en casi la totalidad de los casos ocupan varios años, incluso décadas (teniendo en cuenta posibles efectos adversos a corto y largo plazo). Por ello, un primer paso en la fabricación y posible futura comercialización de *scaffolds* consiste en la realización de un cultivo celular para comprobar la biocompatibilidad del material o compuesto que lo forma. Se han encontrado escasos trabajos en la literatura sobre *composites* basados en POSS destinados a aplicaciones biomédicas, si bien ninguno sobre conjuntos peg-POSS/PLLA, desconociéndose la biocompatibilidad de este compuesto.
- Existen en la literatura diferentes trabajos que tratan sobre la biodegradación hidrolítica de los biomateriales. Esta variable se analiza tanto desde el punto de vista de ratio o velocidad de biodegradación como de tiempo de biodegradación. Sea cual

sea, los resultados difieren entre los diversos *nanocomposites* analizados. En algunos, el tiempo de biodegradación aumenta como consecuencia de las propiedades cristalinas y termomecánicas mejoradas, haciendo más resistente al compuesto frente a la biodegradación en el tiempo. Sin embargo, en otros casos puede ocurrir que el aditivo se disuelva o degrade antes que lo haga el material base, dejando huecos y aumentando la superficie específica y por tanto, acelerando la biodegradación. Cabe destacar que muchos *composites* podrían verse afectados por ambos efectos. En la literatura existen muy pocos estudios sobre la biodegradación hidrolítica de compuestos basados en POSS, no existiendo ninguno sobre biodegradación de conjuntos peg-POSS/PLLA.

Por último destacar que, a modo de resumen, aunque se han investigado materiales, procesos y aplicaciones próximas a los que en este trabajo se relatan, a fecha de hoy no existe en la bibliografía información acerca de un compuesto peg-POSS/PLLA. Por lo tanto, ni se han estudiado sus propiedades, ni sus características, ni su efecto sobre los diferentes procesos de fabricación.

## 1.4 Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo de tesis doctoral es estudiar la viabilidad de un nuevo *biocomposite* para aplicaciones en crecimiento celular y regeneración de cartílago. Además se estudiará el efecto del nanorefuerzo sobre el procesado y sobre las propiedades físico-mecánicas.

A partir de la revisión del estado del arte y del análisis crítico del mismo, se han establecido los siguientes objetivos:

- Fabricar materiales compuestos de matriz PLLA reforzados con nanomoléculas de peg-POSS mediante diferentes tecnologías: *solvent-casting* y *electrospinning*.
- Estudiar la influencia del nanocompuesto peg-POSS/PLLA en los parámetros del proceso de *electrospinning* y sobre las diversas variables que lo controlan.
- Estudiar mediante SEM la morfología de las fibras de peg-POSS/PLLA fabricadas mediante *electrospinning*.
- Caracterizar las propiedades físicas, térmicas y mecánicas del nanocompuesto peg-POSS/PLLA.

A su vez, este último objetivo se divide en varios objetivos secundarios, que son:

- 1.- Estudiar la microestructura cristalina del nanocompuesto mediante calorimetría DSC.

- 2.- Estudiar la estructura molecular del nanocompuesto mediante espectroscopía IR.
- 3.- Estudiar su resistencia mecánica mediante ensayos de tracción.
- 4.- Estudiar la degradación térmica del nanocompuesto mediante TGA.
- 5.- Estudiar la biodegradación hidrolítica del nanocompuesto en líquido fisiológico.
- 6.- Estudiar la biocompatibilidad del nanocompuesto mediante cultivo celular.

## 1.5 Organización de la memoria de tesis

La memoria de la tesis recoge los resultados más relevantes del trabajo realizado para llevar a cabo los objetivos propuestos y ha sido dividida en 4 capítulos:

En el presente capítulo (Capítulo 1, *Introducción*) se ha realizado el enmarque de la tesis (apartado 1.1), en el que se ha analizado el interés del tema seleccionado para la investigación y se ha justificado su elección. En el apartado 1.2 (*Estado del arte*) se lleva a cabo una revisión bibliográfica del tema de estudio. En el apartado 1.3 (*Análisis crítico del estado del arte*), se destacan las principales dificultades y carencias detectadas en el análisis del estado del arte, a la hora de abordar el tema de interés de la tesis. Como resultado del apartado anterior, en el apartado 1.4 (*Objetivos*), se establecen los objetivos de este trabajo.

En el capítulo 2, *Materiales y técnicas experimentales*, se describen los materiales empleados tanto para el refuerzo (peg-POSS) como para la matriz (PLLA) del material compuesto (apartado 2.1, *Materias primas*), así como los procesos utilizados para su fabricación (apartado 2.2, *Procesos de fabricación*) y su configuración (apartado 2.2.2.1, *Configuración del proceso de electrospinning*). Además se explican las técnicas utilizadas para la caracterización de los procesos de fabricación y de las propiedades del material compuesto fabricado (apartado 2.3, *Caracterización del material compuesto*), entre las que se incluyen el *Estudio de la fusión y cristalización de los nanocomposites* mediante calorimetría (apartado 2.3.1), el *Análisis termogravimétrico* (apartado 2.3.2), el *Análisis de la estructura molecular mediante espectroscopía infrarroja* (apartado 2.3.3), el *Análisis mecánico* mediante ensayos de tracción (apartado 2.3.4) y el *Análisis de viscosidad* (apartado 2.3.5). Por último se detallan las técnicas utilizadas para la *Caracterización de los scaffolds* fabricados (apartado 2.4.), en los que se incluyen un *Análisis morfológico mediante microscopía* (apartado 2.4.1), la *Caracterización de la biodegradabilidad en líquido biológico* de los *scaffolds* (apartado 2.4.2) y la *Caracterización biológica de los scaffolds* mediante la realización de un *Cultivo celular* (apartado 2.4.3).

En el capítulo 3, *Resultados y discusión*, se muestran los procesos de fabricación mediante los que se han procesado los *nanocomposites* peg-POSS/PLLA (apartado 3.1.) entre los que se incluyen el *Procesado mediante disolución-evaporación* (apartado 3.1.1.) y el *Procesado mediante electrospinning* (apartado 3.1.2.). Además se muestran los resultados de la *Caracterización físico-mecánica del nanocomposite peg-POSS/PLLA* obtenido (apartado 3.2.), entre los que se incluyen los resultados del análisis calorimétrico (apartado 3.2.1, *Análisis de la fusión y cristalización de los nanocomposites*), los resultados del *Análisis termogravimétrico* (apartado 3.2.2.), los resultados del *Análisis de la estructura molecular mediante espectroscopía infrarroja* (apartado 3.2.3.), los resultados del *Análisis de las propiedades mecánicas* (apartado 3.2.4.) y los resultados del *Análisis de viscosidad* (apartado 3.2.5.). En el apartado 3.3 (*Caracterización biológica de los scaffolds fabricados*), se determinan los resultados de la *Caracterización de la biodegradabilidad en líquido fisiológico* de los *scaffolds* (apartado 3.3.1.) y de la *Caracterización biológica de los scaffolds* (apartado 3.3.2.), en las que se describen tanto el proceso de cultivo y diferenciación celular como los resultados, sobre muestras fabricadas mediante disolución-evaporación (apartado 3.3.2.1.) y muestras fabricadas mediante *electrospinning* (apartado 3.3.2.2.).

Finalmente, en el capítulo 4 *Conclusiones*, se presentan a modo de resumen un listado de las principales conclusiones a las que se ha llegado tras el desarrollo de este trabajo; las *Aportaciones*, donde se enumeran las publicaciones en revistas con índice de impacto (de manera provisional) y los trabajos presentados en congresos, fruto del trabajo desarrollado en la presente investigación; y por último las posibles *Líneas futuras*.



## Capítulo 2

---

### **Materiales y técnicas experimentales**



## 2 MATERIALES Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

En este capítulo se describe el trabajo experimental llevado a cabo en esta investigación. En primer lugar se presenta la descripción de la matriz y del refuerzo utilizado para la fabricación del material compuesto. Después, se describen la técnica y los dispositivos utilizados para el procesado del material compuesto, así como las principales técnicas empleadas para la caracterización del proceso, el material compuesto y diversas propiedades.

### 2.1 Materias primas

Se ha fabricado un material compuesto de matriz termoplástica de PLLA reforzada con nanomoléculas POSS. La matriz de PLLA, a su vez, se divide en dos tipos: un PLLA de grado comercial, destinado a realizar pruebas preliminares y ajustes de parámetros de procesos; y otro PLLA de grado médico, para fabricar el material compuesto, los *scaffolds* y para realizar la caracterización de éstos.

#### 2.1.1 Ácido poli(L-láctico) (PLLA)

##### PLLA – Grado médico

El ácido poli(L-láctico) de grado médico utilizado en este trabajo es el PLLA PURASORB® PL18. Se trata de un poliéster termoplástico de alta pureza, destinado principalmente a aplicaciones biomédicas. Este PLLA, inodoro e insoluble en agua, ha sido suministrado por la compañía PURAC® [PURAC] (Gorinchen, Netherland), y se presenta en forma de granza (pequeños granos) de tono blanquecino (Figura 41). La densidad aproximada es de 1,24 g/cm<sup>3</sup>, la viscosidad inherente (obtenida en cloroformo, 25 °C, c: 0,1 g/dl) se encuentra dentro del rango 1,60 – 1,80 dl/g, el rango de temperaturas de fusión (DSC, velocidad de calentamiento 10 °C/min) se encuentra entre 180 - 192 °C, y el calor de fusión (DSC, velocidad de calentamiento 10 °C/min) es de alrededor de 79,3 J/g. El contenido en disolvente residual del PURASORB® PL18 es <0,01%, y el de monómero residual (obtenido mediante cromatografía de gases) <0,1%. El contenido en agua (determinado por coulometría) es <0,5%.



Figura 41 Granza de PLLA PURASORB® PL18 de grado biomédico.

### PLLA – Grado comercial

El ácido poli(L-láctico) de grado comercial utilizado en este trabajo es el PLLA NatureWorks® 2002D (actualmente INGENIO™ Biopolymer). Se trata de un poliéster termoplástico destinado principalmente al sector del envase y embalaje, destacando su uso en aplicaciones como el empaquetado de alimentos debido a su carácter biocompatible y biodegradable. Este PLLA, inodoro e insoluble en agua, ha sido suministrado por la compañía Cargill Dow LLC® [NATURW] (Minnetonka, U.S.A.), y se presenta en forma de granza de tono opaco y traslúcido (Figura 42). La densidad aproximada es de 1,24 g/cm<sup>3</sup>, el índice de fluidez en g/10 min (a 190 °C, 2,16 kg) está en el rango 4 – 8, y el rango de temperaturas de fusión se encuentra entre 150 - 152 °C. El contenido del PLLA NatureWorks® 2002D en D-láctida es del 4,25%, y el de monómero residual es <0,3%. Respecto a las propiedades mecánicas, el límite elástico es  $\sigma_y=60$  MPa, el módulo de Young  $E=3,5$  GPa, y la deformación a rotura de alrededor de  $\delta_R=6\%$ .



Figura 42 Granza de PLLA NatureWorks® 2002D de grado comercial.

#### 2.1.2 Polyethylene Glycol - Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes (peg-POSS)

El refuerzo utilizado para fabricar los compuestos han sido nanomoléculas peg-POSS. Estas nanomoléculas se comercializan como “PEG POSS® Cage Mixture”, y se han obtenido

de Hybrid Plastics® [HYBPL] (Hattiesburg, U.S.A.), utilizándose en las mismas condiciones en las que se recibieron. Este tipo de aditivos se caracterizan principalmente por tener una estructura híbrida orgánica-inorgánica, y por su tamaño dentro de la escala nanométrica. Se componen de un esqueleto o una jaula poliédrica nanoestructurada formada por átomos de silicio y oxígeno, y de grupos orgánicos funcionales polietilenglicol que surgen de los átomos de silicio presentes en los vértices del poliedro. El diámetro de la estructura está dentro del rango 1-3 nm [Ayandele2012]. Su fórmula molecular es  $[C_{2m+3}H_{4m+7}O_{m+1}]_n(SiO_{1,5})_n$ , donde  $n$  puede tomar valores de 8, 10 o 12 y  $m \approx 13,3$ . El peg-POSS presenta un aspecto de líquido viscoso-aceitoso a temperatura ambiente, teniendo un tono amarillento transparente. Se caracteriza por ser soluble en poliéteres y poliésteres, y emplearse como cosméticos y agente de hidratado. También es soluble en agua. El peso molecular es de alrededor de 5576,6 g/mol, y la densidad aproximada es de 1,2 g/cm<sup>3</sup>.

La cantidad de peg-POSS utilizada durante el presente trabajo de tesis doctoral han sido valores de entre el 0 y el 10% en peso de peg-POSS con respecto a 1 g de *nanocomposite*. La descripción de las diferentes muestras preparadas se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3** Cantidad de PLLA y peg-POSS de los diferentes *nanocomposites*.

Denominación	Descripción
PLLA0	PLLA
PLLA0,5	+ 0,5% w/w peg-POSS
PLLA1	+ 1,0% w/w peg-POSS
PLLA2,5	+ 2,5% w/w peg-POSS
PLLA5	+ 5,0% w/w peg-POSS
PLLA7,5	+ 7,5% w/w peg-POSS
PLLA10	+ 10,0% w/w peg-POSS

### 2.1.3 Otros materiales

En el proceso de disolución-evaporación se utilizó como disolvente triclorometano (Cloroformo) estabilizado con etanol, obtenidos de Scharlau® (Barcelona). Este cloroformo presenta una densidad (20°/4°) de 1,479 g/cm<sup>3</sup>, un contenido en etanol (mediante cromatografía de gases) del 0,5%, un contenido en materia residual no-volatil del 0,001%, y en agua del 0,01%. En el proceso de *electrospinning* se utilizaron como disolventes N,N-dimethyl-formamid (DMF), y cloroformo, obtenidos ambos de CHEMPUR® (Poland). También se utilizó trifluoroetanol (TFE) de Alfa Aesar® (USA), como disolvente durante el proceso de configuración del equipo de *electrospinning*.

## 2.2 Procesos de fabricación

Tanto el PLLA virgen como el material nanocompuesto se han procesado mediante diversos métodos: disolución-evaporación, *electrospinning* y moldeo-inyección.

### 2.2.1 Fabricación de films mediante proceso disolución-evaporación

El proceso de disolución-evaporación consiste en, primeramente, disolver un polímero en un disolvente, y posteriormente, verter esta disolución en un recipiente y dejar que se evapore totalmente el disolvente, obteniendo así el producto en forma de film. Para ello, se disuelve 1 g de *nanocomposite* (porcentajes según Tabla 3) en 25 ml de cloroformo a temperatura ambiente. El cloroformo tiene una alta volatilidad y no deja ningún resto una vez evaporado, y es uno de los disolventes más utilizados en la disolución del PLLA según bibliografía [Andrady2008,Lim2008]. La disolución se mezcla mediante un agitador magnético (Carousel Standard, Radleys, UK) hasta quedar completamente disuelta (Figura 43). Posteriormente la disolución se vierte sobre platos petri (Ø100 mm), y se deja evaporar el disolvente durante 24 horas a temperatura ambiente y durante otras 24 horas en un horno de convección forzada a 35 °C, obteniendo así los films de PLLA y de peg-POSS/PLLA sin restos de cloroformo. Para asegurar la correcta evaporación del disolvente, se controló el cambio de peso de los films durante 24 horas mediante una microbalanza, resultando un cambio de peso <0,01%. También se aseguró mediante un análisis de espectroscopía FTIR.



**Figura 43** Agitador magnético utilizado para remover la disolución.

## 2.2.2 Fabricación de mat de fibras mediante proceso *electrospinning*

Este apartado se divide en dos puntos. En el primero de ellos se describen las operaciones de configuración del equipo de *electrospinning*. En el segundo, se describe el proceso de *electrospinning* que se ha seguido para la fabricación del mat de nanofibras.

### 2.2.2.1 Configuración del equipo de *electrospinning*

Mediante el proceso de *electrospinning* se pueden obtener mat de fibras poliméricas muy finas, con diámetros de fibra que van desde la escala micro hasta la escala nano [Andrady2008]. Es generalmente conocido que una microestructura altamente porosa y con una gran superficie específica supone un entorno óptimo para el cultivo y crecimiento celular [Huang2003]. El PLLA en formato nanofibra tiene además un beneficio adicional: el drenaje constante a través de los filamentos finos de la nanofibra previene la acumulación de ácido L-láctico en el polímero restante. Esta acumulación causaría la aceleración del proceso de hidrólisis en los implantes másicos poliméricos basados en poliésteres (PLLA), debido al efecto autocatalítico. Al final del proceso de degradación, el ácido láctico acumulado en las partes internas del *scaffold* irrumpiría en las partes más externas del material remanente, afectando a las células cultivadas.

Para la regeneración de cartílago se requiere una estructura porosa interconectada con un tamaño de poro adecuado (distancia entre fibras) [Hutmacher2000,Ratner1996, Puppi2010]. En la bibliografía se pueden encontrar muchos trabajos acerca de los efectos del tamaño de poro sobre el cultivo de células condrocíticas en *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning*. Algunos de ellos informan de tamaños de poro del rango 50-500  $\mu\text{m}$  [Lien2009], 100-400  $\mu\text{m}$  [Yamane2007], 150-200  $\mu\text{m}$  [Lu2007], 2-465  $\mu\text{m}$  [Li2002] y 10-120  $\mu\text{m}$  [Griffon2006]. Aunque los valores son similares no existe un acuerdo general sobre el tamaño adecuado de poro, excepto para el tamaño de poro mínimo que obviamente debería ser mayor que el propio tamaño de la célula condrocítica (alrededor de 5-15  $\mu\text{m}$ ) [Li2002]. En cualquier caso, en todos estos trabajos en los que se informaba de diferentes tamaños de poro, el cultivo celular fue llevado a cabo de manera satisfactoria. El objetivo del trabajo es obtener estas estructuras de peg-POSS/PLLA, con porosidad altamente interconectada, mediante el proceso de *electrospinning*.

Para poder fabricar los *scaffolds* de peg-POSS/PLLA es necesario un proceso detallado de configuración, ya que el proceso de *electrospinning* es un proceso que depende enormemente del ajuste de múltiples parámetros, la mayoría mediante pruebas experimentales. La búsqueda del proceso de *electrospinning* más estable se ha llevado a cabo siguiendo el guión de anteriores estudios experimentales realizados con otros polímeros por el grupo de los doctores Tomasz Kowalewski y Tomasz Kowalczyk en el IPPT-PAN de

Varsovia [Kowalewski2009, Kowalczyk2008]. Los parámetros seleccionados se han mantenido para el *spinning* de los 3 materiales: PLLA0, PLLA1 y PLLA5. Existen algunos factores clave que podrían afectar al proceso en mayor medida que otros. Estos factores clave consisten en los siguientes parámetros:

- Tipo de disolvente (conductividad y solubilidad).
- Concentración de la disolución (viscosidad).
- Caudal de alimentación de la disolución.
- Distancia entre la boquilla de inyección y el objetivo (colector).
- Diferencia de potencial aplicada.
- Tiempo de *electrospinning*.

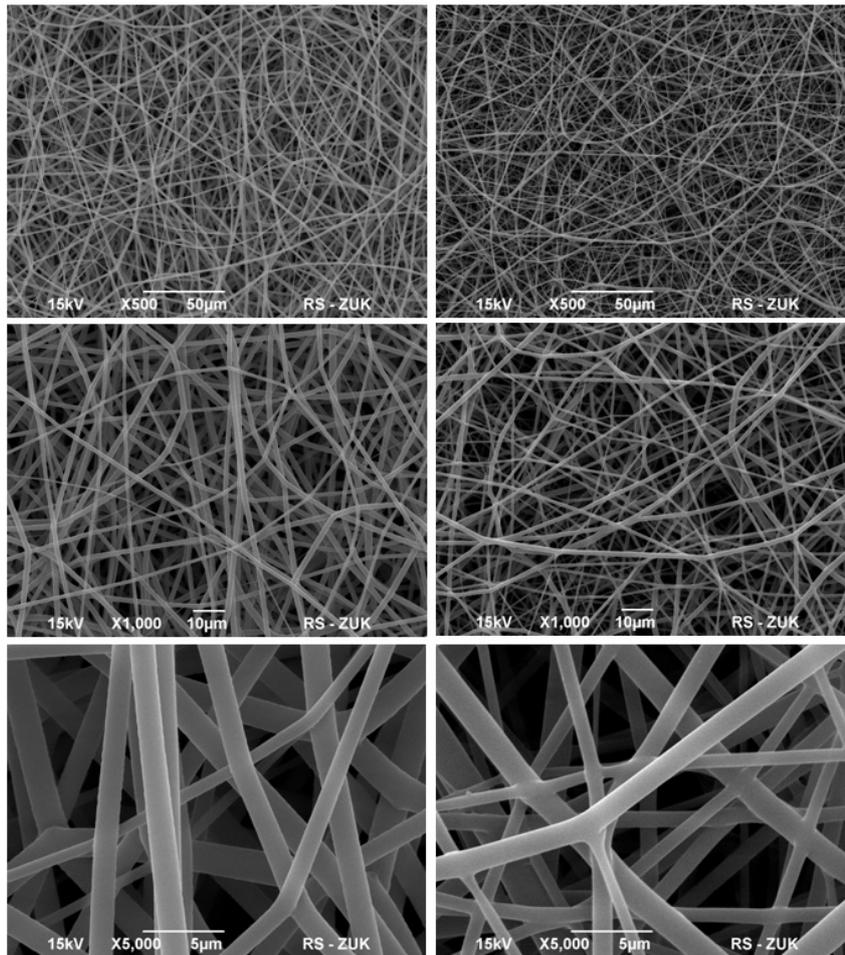
Existen otros parámetros, no tan principales como éstos, como los factores ambientales (temperatura y humedad), el tipo de colector (estático o dinámico) y el tipo de boquilla (longitud y diámetro interno de aguja). El resto de los parámetros permanecieron inalterados para todos los ensayos.

Durante las pruebas llevadas a cabo en el IPPT-PAN de Varsovia (Polonia), primeramente se realizó una comparativa entre varios disolventes para comprobar si el proceso de *electrospinning* era posible, y comparar su efecto sobre la morfología de las fibras. Estos disolventes fueron: por un lado, una mezcla de cloroformo y dimetilformamida (DMF), y por otro lado, trifluoroetanol (TFE). Cabe destacar que las propiedades de la disolución afectan a la estructura de la fibra, y dependen fuertemente de las propiedades de sus componentes, es decir, del polímero y del disolvente [Qian2010]. Por lo tanto, el tipo de disolvente es un factor determinante que afecta a la estructura de la fibra, y su correcta elección es crucial para el éxito del proceso de *electrospinning* [Han2010].

En cuanto al tipo de disolvente, toman importancia los parámetros de conductividad de la disolución y solubilidad del polímero. Según bibliografía, el diámetro de la fibra es menor cuanto mayor sea la conductividad de la disolución [Haroosh2010]. La solubilidad del polímero en el disolvente y su constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) tienen un impacto notable en la estructura de las fibras resultantes [Abdul-Rahman2010]. En cuanto a la solubilidad del polímero, el PLLA se mostró soluble en todos los disolventes (en la mezcla cloroformo-DMF y en el TFE). En cuanto a la conductividad, el DMF tiene una constante dieléctrica alta ( $\epsilon=38,3$ ), mientras que la del cloroformo es menor ( $\epsilon=4,8$ ) [Haroosh2010]. El TFE tiene una constante dieléctrica de ( $\epsilon=26,6$ ) [Gente2000]. La mezcla cloroformo-DMF permite aumentar la polaridad del cloroformo en la disolución (considerado apolar por su baja constante dieléctrica) y que se pueda realizar el *electrospinning* de la mezcla, ya que no se consigue

realizarlo con sólo el cloroformo. Por lo tanto, se podría concluir que el incremento de conductividad de la disolución, debido a su mayor densidad de carga, permitiría obtener fibra continua, de menor diámetro y sin la presencia de gotas de polímero producidas por el efecto electrospray [Haroosh2010]. En la bibliografía se muestran ejemplos de soluciones poliméricas con mayor conductividad que han proporcionado diámetros de fibra menores [Lee2010].

Los tests con ambos disolventes se realizaron bajo las mismas condiciones de distancia entre la boquilla y el colector, caudal de alimentación y voltaje aplicado, minimizando así las variables. Cabe destacar que el efecto particular de estas variables se analiza posteriormente en detalle. El proceso de *electrospinning* resultó posible con ambos disolventes. En la Figura 44 se muestra una comparativa sobre la morfología de fibra obtenida con ambos disolventes. En estas imágenes se pueden observar algunas diferencias: para la mezcla de disolventes cloroformo-DMF (izquierda) las fibras no están unidas entre ellas, mientras que para el caso del trifluoroetanol las fibras están ligeramente unidas, como si estuvieran soldadas (derecha). Las imágenes mostrarían una rápida evaporación de la mezcla de disolventes cloroformo-DMF, ya que la fibra eyectada se seca antes de llegar al colector. Este efecto, probablemente, pudo deberse a la volatilidad del tipo de disolvente, que es un factor que afecta a las propiedades de secado y consecuentemente, a la morfología de la fibra. La baja volatilidad del DMF implicaría una evaporación más lenta del disolvente, por lo que las fibras formadas llegarían todavía húmedas al colector y se unirían [Haroosh2010]. Al mezclar el DMF con cloroformo, que es un disolvente de alta volatilidad, se lograría atenuar ese efecto obteniéndose fibras secas. En el caso del trifluoroetanol, las fibras aún estarían húmedas al llegar al colector soldándose así a las fibras previamente depositadas, y secándose después el conjunto entero de fibras. En este caso se obtienen fibras algo más húmedas que las de la mezcla cloroformo-DMF. Finalmente se escogió una mezcla de disolventes cloroformo-DMF ya que el efecto de la unión de fibras no fue significativamente acusado.



**Figura 44** Imágenes SEM comparando morfología de fibra obtenida con diferentes disolventes: cloroformo-DMF (izquierda) y trifluoroetanol (derecha). Las imágenes se han tomado a diferentes aumentos.

Algunos de los parámetros clave afectan directamente al funcionamiento del proceso, por lo que su correcto ajuste es significativo de cara a asegurar la calidad del proceso de *electrospinning*. Uno de los mayores problemas consiste en el efecto *electro-spray*, el cual ocasiona que se arrojen gotas de polímero al colector en lugar de fibras. El efecto *electro-spray* depende directamente de la relación entre el polímero y el disolvente, y del voltaje aplicado.

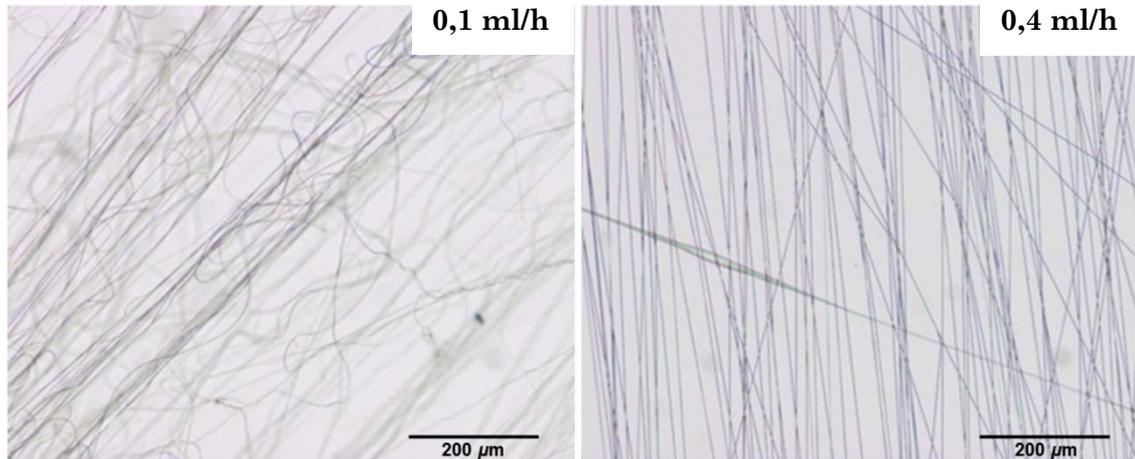
En el primer caso, se estudió la relación adecuada en la concentración de polímero y disolvente. Básicamente, si la concentración de la disolución es lo suficientemente alta (y viscosa) para estabilizar el chorro, se formarían fibras poliméricas en lugar de efecto *electro-spray*. Sin embargo, en el caso del *electro-spray* la concentración de polímero sería lo suficientemente baja para desestabilizar el chorro polimérico, que pasaría a ser discontinuo. Al ser discontinuo se formarían gotas en vez de fibras, que serían proyectadas hacia el colector y dañarían el scaffold. Para que el proceso de *electrospinning* pueda ocurrir se debería evitar una baja concentración y la separación de fases de la disolución polimérica, y para ello se debería escoger el contenido correcto en polímero y disolvente. Se analizaron

algunos porcentajes de disolvente realizando pruebas experimentales de *electrospinning* y comprobando las fibras obtenidas mediante un microscopio óptico. Para ello, se realizó el *electrospinning* de la disolución sobre una lámina portaobjetos de cristal, colocada a su vez sobre una rejilla metálica a modo de contra electrodo. Los porcentajes de disolvente analizados fueron 50:50 y 53:47 (ambos sin éxito), 75:25 (aparecieron algunas fibras) y 90:10. Finalmente se escogió el porcentaje de disolvente 90:10 debido a que se obtuvo una gran densidad de fibras en las pruebas experimentales, y a que la diferencia entre las fibras, vistas mediante microscopio óptico, fue insignificante.

En el segundo caso, una vez escogido el porcentaje adecuado de disolvente, se analizó también el voltaje aplicado, como uno de los parámetros clave que causa el efecto *electrospray*. Se utilizó el mismo equipamiento de *electrospinning*: una lámina portaobjetos de cristal, colocada a su vez sobre una rejilla metálica a modo de contra electrodo. Las muestras se tomaron sobre las láminas portaobjetos de cristal de 60 mm x 24 mm, durante 2 minutos cada una aproximadamente. Tras este tiempo, la lámina de cristal fue reemplazada por una nueva, y el voltaje se incrementó en 2,5 kV antes de comenzar de nuevo el experimento (los voltajes analizados comprendieron valores desde 2,5 kV hasta 30 kV, con aumentos de 2,5 kV). A continuación se analizaron las muestras mediante el microscopio óptico para comparar los resultados. El voltaje mínimo necesario resultó ser 7 kV. Por debajo de este voltaje el proceso de *electrospinning* de fibras no fue posible, apareciendo el efecto *electrospray*. Para valores mayores de 15 kV, apareció cierta inestabilidad en el jet polimérico, aunque no afectó aparentemente a la morfología de las fibras obtenidas. No parece que ocurran grandes diferencias, ni en la morfología ni en la cantidad de fibras, debidas al cambio de voltaje. Finalmente se escogió un voltaje intermedio de alrededor de 15 kV, teniendo en cuenta la igualdad entre los resultados y la experiencia adquirida en trabajos previos realizados con otros polímeros [Fryczkowski2009, Bretcanu2009].

El caudal de alimentación representa otro parámetro clave, ya que la punta de la aguja se debe alimentar con la cantidad adecuada de disolución antes de ser eyectada hacia el colector. La falta de material causaría la eyección de un jet irregular y discontinuo hacia el colector (y también la desaparición del cono de Taylor), y el exceso de material causaría una acumulación progresiva de éste en la punta de la aguja, que llevaría a la posibilidad de que fuese lanzado como una gran gota de disolución hacia el colector, consecuentemente dañando el *scaffold*. En la Figura 45 se muestra una comparativa entre dos caudales diferentes de alimentación, y el efecto de la falta de material causado por un caudal de alimentación insuficiente. Las pruebas se han realizado con valores provisionales de 15 kV de voltaje aplicado y 20 cm de distancia entre boquilla y colector, y las muestras se han tomado en láminas portaobjetos de cristal durante 2 minutos, y se han analizado mediante microscopio óptico. En la primera imagen se puede observar que el caudal de alimentación de 0,1 ml/h

resultó insuficiente, ya que aparecieron fibras altamente irregulares y rizadas. Las fibras válidas se obtuvieron con valores de caudal de alimentación a partir de 0,4 ml/h. No se observaron diferencias significativas con valores superiores a ese, por lo que finalmente se seleccionó el valor de 0,4 ml/h.



**Figura 45** Fotografías de microscopio óptico mostrando una comparativa entre dos caudales de alimentación diferentes: 0,1 ml/h, mostrando fibras irregulares (izquierda), y el caudal de alimentación seleccionado de 0,4 ml/h (derecha). Los ensayos se realizaron con una disolución de PLLA con un 10% en peso de peg-POSS.

La eyección irregular y discontinua del jet polimérico representa un problema, ya que se producen fibras extremadamente rizadas e irregulares. Otra causa de este efecto podría ser la falta de atracción entre los electrodos, que dependería principalmente de la distancia entre ellos (entre la punta de la aguja y el colector a modo de contraelectrodo) y del tiempo de *electrospinning* (directamente proporcional al grosor del mat de fibras).

Respecto a la distancia, una distancia demasiado corta entre la punta de la aguja y el colector ocasionaría que la fibra llegase al objetivo dentro del régimen inestable del cono de Taylor. Sin embargo, una gran distancia ocasionaría que la atracción entre los electrodos (punta de la aguja y colector) desapareciese. En ambos casos se lanzarían fibras irregulares hacia el colector. Por lo tanto, se debe seleccionar una distancia intermedia. En nuestro caso la distancia se fijó en 20 cm.

El tiempo de *electrospinning* es otro parámetro clave que controla la adecuada eyección de fibras. Está limitado por el grosor máximo de material que se puede obtener mediante el método de *electrospinning* y los parámetros de proceso seleccionados. El propio grosor del material actúa como aislante, y cuando se llega a un grosor máximo la atracción entre los electrodos disminuye y como consecuencia, las fibras llegan al colector de manera irregular. El tiempo de *electrospinning* se ajustó a 1 hora.

### 2.2.2.2 Fabricación del mat de fibras

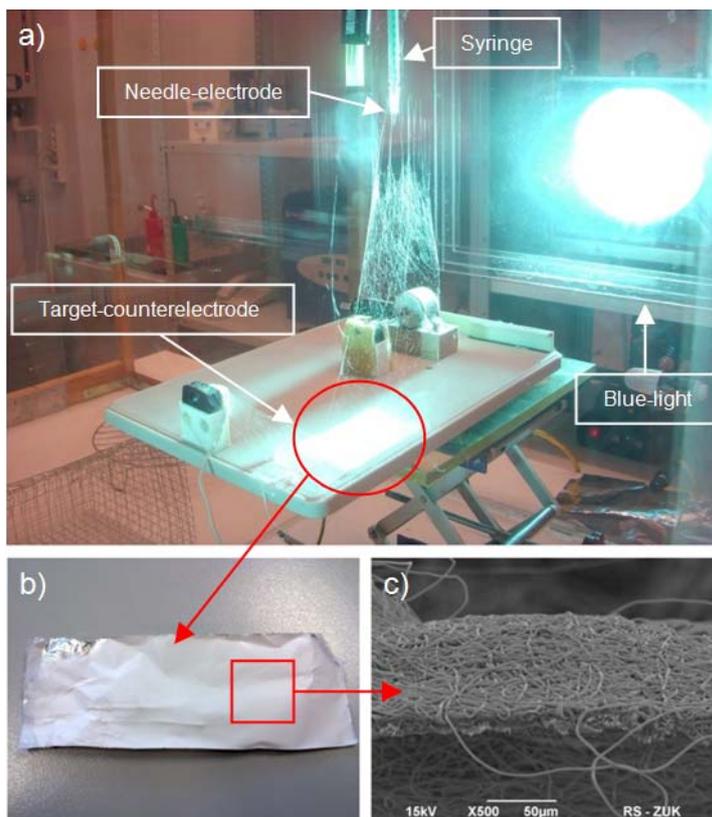
El proceso de *electrospinning* se divide en dos partes: en la primera se disuelve el polímero (al igual que en el proceso disolución-evaporación), y en la segunda se realiza el *spinning* de las fibras.

#### Disolución del polímero

Los diferentes *nanocomposites* fueron preparados disolviendo el PLLA y el peg-POSS en una mezcla de disolventes compuesta por cloroformo y DMF, en proporciones 90:10. Las diferentes soluciones se introdujeron en pequeños botes sellados, y éstos se colocaron en un mezclador vortex con el fin de removerlos hasta su completa disolución. Se preparó también otra solución conteniendo PLLA solamente.

#### *Spinning* de las fibras

Los mat de fibras se fabricaron mediante la técnica de *electrospinning* y en las condiciones mostradas en la Tabla 4. Se introdujeron 0,4 ml de cada solución dentro de jeringuillas de plástico con capacidad de 1 ml (Brand®, Germany). Las soluciones se bombearon con una bomba de jeringuilla (New Era Pump Systems®) a una velocidad de alimentación de 0,4 ml/h. En la punta de la jeringuilla se colocó una aguja de punta roma de 1 cm de largo, con un diámetro externo (interno) de 0,45 mm (0,27 mm). El equipamiento se configuró de modo vertical (jeringuilla, aguja y parte terminal de la bomba) apuntando hacia una placa colectora colocada de manera horizontal, y se puede observar en la Figura 46a. La distancia entre la punta de la aguja y el colector se ajustó a 20 cm. La placa colectora utilizada fue de tipo estático (sin movimiento rotatorio) por lo que la orientación de las fibras obtenidas fue aleatoria (sin orientaciones preferenciales). Sobre la placa colectora de material polimérico se colocó una lámina de papel de aluminio de 5 cm x 12 cm conectada a tierra como se muestra en la Figura 46b. La lámina de aluminio se impregnó con una solución surfactante con el fin de facilitar la extracción de las fibras depositadas en ella (Figura 46c). Al sistema se le aplicó un alto voltaje de 15 kV mediante una fuente reguladora de alimentación DC de alto voltaje (EMCO®, USA), con el fin de generar el chorro polimérico. El tiempo de *spinning* durante el que se depositaron las fibras en el colector fue de alrededor de 1 hora. Tras este tiempo, se retiró de la placa colectora la lámina de aluminio con el mat de fibras depositadas. Esta lámina se cortó manualmente mediante unas tijeras en pequeños cuadrados de 1 cm x 1 cm aproximadamente, fabricando así las muestras de *electrospinning* que posteriormente serían utilizadas para llevar a cabo el cultivo celular.



**Figura 46** Scaffold de peg-POSS/PLLA fabricado mediante *electrospinning*. a) equipamiento de *electrospinning*; b) vista óptica; c) imagen SEM.

Todo el equipamiento del experimento estuvo introducido en un cajón de policarbonato de medidas 1 m x 1 m x 1,5 m, con el fin de aislarlo electrostáticamente del exterior y de evitar también la polución medioambiental. Para limpiar y desinfectar el sistema se utilizó una solución de propan-2-ol y agua (70:30), y papel-toalla tipo “sala limpia” (no deja restos de fibras ni de partículas). Asimismo, para realizar todas estas tareas, incluyendo la manipulación de la lámina de aluminio, se utilizaron guantes de latex estériles sin polvo (tampoco dejan restos). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-25 °C) y con una humedad ambiental de aproximadamente 45%.

**Tabla 4** Condiciones seleccionadas para el proceso de *electrospinning*.

Parámetros	Condiciones seleccionadas
Disolvente	Cloroformo 90% + DMF 10%
Caudal de alimentación	0,4 ml/h
Distancia	20 cm
Voltaje	15 kV
Tiempo de <i>spinning</i>	1 hora

## 2.3 Caracterización del material compuesto

### 2.3.1 Estudio de la fusión y cristalización de los *nanocomposites*

La Calorimetría Diferencial de Barrido (Differential Scanning Calorimetry, DSC) es una técnica de análisis térmico que se basa en medir la diferencia de calor aportado a la muestra del material a analizar y a una muestra de referencia, para que ambas mantengan la misma temperatura, tanto en procesos dinámicos como isotérmicos. Cuando una muestra sufre una transformación de fase, necesita más o menos flujo de calor para mantener su temperatura con respecto a la referencia. El calor neto aportado (o evacuado) sería la suma del calor necesario para: a) realizar el cambio de fase, y b) mantener la temperatura de la muestra. En el caso de que se necesitase aportar más flujo de calor para mantener la temperatura de la muestra, se obtendría un pico endotérmico; mientras que en fenómenos como la cristalización aparecería un pico exotérmico al liberarse calor, y tener que evacuarlo la propia máquina para mantener la temperatura de la muestra. El propio software del DSC realizaría automáticamente la separación y el análisis de estos datos, tomando como referencia la línea base del material y la muestra de referencia. Por lo tanto, esta técnica es adecuada para investigar transformaciones de fase.

Mediante este análisis también se pueden analizar la morfología de los cristales y el grado de cristalinidad del PLLA. Estas características del material dependerían en gran medida del proceso de fabricación (calentamiento y/o enfriamiento) al que se hayan visto sometidas las muestras. Asimismo, mediante el propio análisis en el DSC se podrían simular estas condiciones, es decir, se podría manipular (maximizar o minimizar) la cristalinidad, así como obtener un determinado tamaño de cristal.

El control de estos factores dependería principalmente de dos variables: temperatura de cristalización (°C) y tiempo (min). A grandes rasgos, a una mayor temperatura de cristalización se generaría un menor número de cristales pero de un tamaño mayor, mientras que a una temperatura más baja se generaría un mayor número de cristales pero de un tamaño menor. En ambos casos la cristalinidad final sería función del porcentaje total de área cristalina del polímero. Por otro lado, el tiempo sí que influiría en el porcentaje de cristalinidad: a mayor tiempo para la cristalización más cantidad de polímero amorfo se convertiría en polímero cristalino (antes de llegar al límite máximo de cristalinidad). Teniendo en cuenta los efectos de estas dos variables, se podrían definir dos tipos de cristalización: isotérmica y dinámica (no-isotérmica).

- **Cristalización isotérmica:** La muestra se mantendría a una temperatura de cristalización isotérmica concreta, durante el tiempo suficiente, hasta que toda la

fase amorfa posible se convierta en cristalina. Las principales variables que se manejarían serían: temperatura de cristalización ( $^{\circ}\text{C}$ ) y tiempo (min).

- **Cristalización dinámica:** La muestra se calienta y/o enfría a velocidades de calentamiento y enfriamiento determinadas. Este tipo de cristalización podría simular un proceso de fabricación térmico (moldeo-inyección, extrusión, termoconformado, etc.). Las variables que influyen en mayor medida son: velocidad de calentamiento ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), velocidad de enfriamiento ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) y temperatura de inicio de enfriamiento ( $^{\circ}\text{C}$ ).

El dispositivo utilizado en la presente tesis es un METTLER-TOLEDO DSC1 STARe (METTLER TOLEDO, USA) (Figura 47). Los datos se han tratado con el software STARe System. La calibración se ha realizado con Indio ( $T_m=156,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $\Delta H_m=28,45\text{ J/g}$ ). Para el análisis se han utilizado pequeñas muestras fabricadas mediante el proceso de disolución-evaporación. La masa de estas probetas ha sido medida en una micro-balanza de alta precisión (OHAUS® GALAXY™ 110), oscilando entre 4,5 – 5,5 mg. Las medidas del material se han llevado a cabo en crisoles de aluminio agujereados, con el objetivo de evitar la pérdida de contacto entre la máquina y el crisol debido al abombamiento de este último. Todos los experimentos se han realizado bajo atmósfera inerte de nitrógeno para evitar cualquier mecanismo de degradación debido al oxígeno.



**Figura 47** Imagen de foto-calorímetro diferencial de barrido (DSC).

Los ciclos térmicos se han definido en función del tipo de caracterización térmica realizada: caracterización del proceso de disolución-evaporación mediante ensayos dinámicos (no-isotérmicos), y caracterización del propio material, separándose este último apartado en ensayos dinámicos y ensayos isotérmicos.

### 2.3.1.1 Ensayos dinámicos de fusión y cristalización

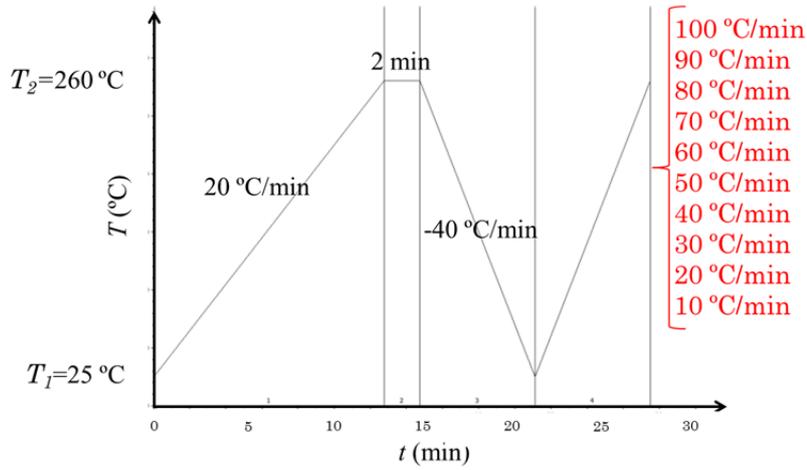
En este apartado se describen los ensayos dinámicos llevados a cabo durante la caracterización del material. Primeramente se muestran los análisis sobre la búsqueda de las velocidades de calentamiento y enfriamiento óptimas. A continuación se muestra el análisis sobre la cantidad máxima de veces que puede ser ensayada una misma muestra sin verse afectada por los fenómenos de degradación térmica. Finalmente se muestra el plan de ensayos dinámicos. Para todos los tipos de caracterización, la temperatura de inicio de análisis fue la temperatura ambiente ( $T_1=25\text{ °C}$ ), y la temperatura final ( $T_2=260\text{°C}$ ), la cual supera ampliamente la temperatura de fusión del PLLA PURASORB® PL 18 ( $T_m$  entre 180-191 °C según la ficha de datos técnicos). De esta manera se asegura el borrado de la historia termo-mecánica del material, como se describe posteriormente en esta misma sección.

#### Búsqueda de velocidad de calentamiento óptima

En este apartado se analiza el efecto de la velocidad de calentamiento sobre la recrystalización (o cristalización en frío) y sobre la intensidad de señal. El análisis de la velocidad de calentamiento óptima tiene importancia a la hora de estudiar las estructuras que se generan durante las distintas etapas. Es decir, si se quiere estudiar únicamente la estructura generada durante la solidificación, se deberá buscar la velocidad óptima de calentamiento que minimice la recrystalización sin comprometer la intensidad de señal del pico de fusión. A grandes rasgos, cuanto mayor sea la velocidad de calentamiento menor será el tiempo que la muestra tenga para recrystalizar durante el calentamiento, resultando en un pequeño pico de recrystalización o en su ausencia. Cuanto mayor sea la velocidad de calentamiento menor será también la intensidad del pico de fusión, resultando éste de menor altura y rango más amplio. En el caso contrario, cuanto menor sea la velocidad de calentamiento mayor será la posibilidad de que ocurra recrystalización, obteniendo así unos resultados no deseados. Por lo tanto, a la hora de definir una velocidad de calentamiento óptima se debe buscar el equilibrio entre esos dos efectos en base al comportamiento del material. También es interesante para reducir el tiempo de análisis total.

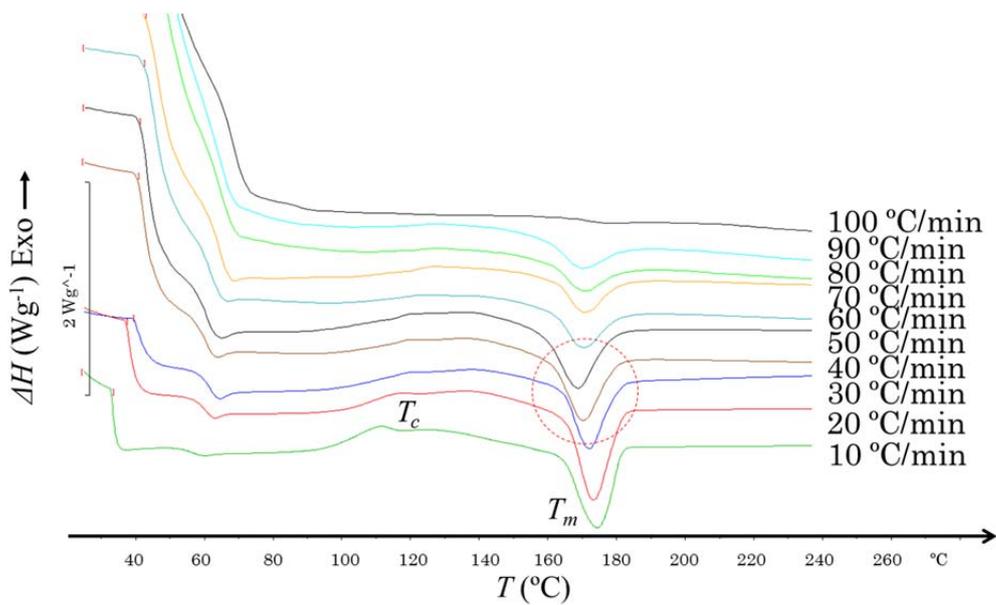
En la Figura 48 se puede observar la secuencia de este análisis. Primeramente, el material se calienta hasta la temperatura final  $T_2=260\text{ °C}$  a una velocidad sin trascendencia de  $20\text{ °C/min}$ , con el objetivo de fundirlo y borrar su historia térmica. Tras 2 minutos la muestra se enfría hasta temperatura ambiente a una velocidad de enfriamiento relativamente alta, con el objetivo de minimizar la cristalización del polímero en la medida de lo posible. Cabe destacar que la velocidad de enfriamiento es preliminar, y que se estudiará en el siguiente apartado. Finalmente, se realizará un segundo calentamiento a

velocidades dentro del rango 10-100 °C. Se hará un barrido por cada muestra para evitar fenómenos de degradación térmica.



**Figura 48** Secuencia de análisis DSC: búsqueda de la velocidad óptima de calentamiento.

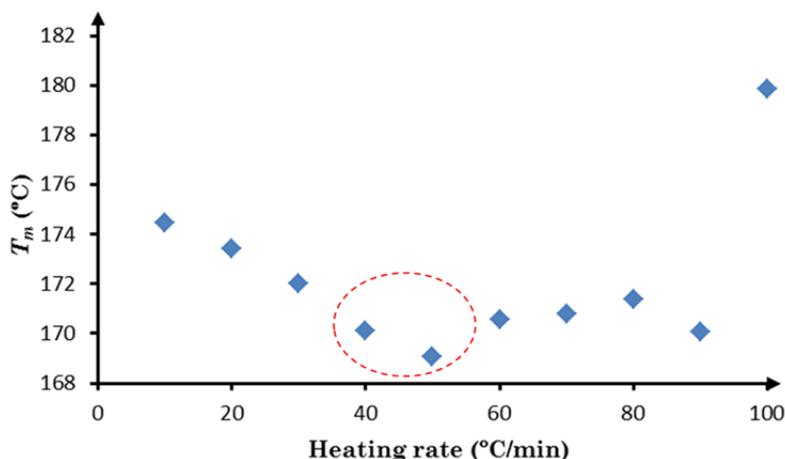
Los resultados se muestran en la Figura 49. En esa gráfica se puede observar que, las velocidades de calentamiento óptimas que presentan un mayor equilibrio entre menor pico de recristalización y pico de fusión más intenso, son aproximadamente las velocidades de 30, 40 y 50 °C/min. Utilizando velocidades dentro de ese rango se minimizan las transformaciones de fase amorfa a cristalina, así como las reordenaciones de los cristales ya existentes, durante el calentamiento.



**Figura 49** Resultados de la búsqueda de la velocidad óptima de calentamiento.

En la gráfica Figura 50 se muestra la evolución de los valores de  $T_m$  para las diferentes velocidades de calentamiento. Se puede observar cómo la  $T_m$  disminuye progresivamente desde la velocidad de 10 hasta la de 50 °C/min, resultando esta última la  $T_m$  mínima. A partir de esa velocidad la  $T_m$  aumenta ligeramente, disparándose para el valor de 100 °C/min. Es interesante que el cristal formado durante el enfriamiento no aumente su tamaño (recristalice) durante el calentamiento, por lo que efectivamente interesarían los valores cercanos a 40-50 °C/min en los que no se da ese fenómeno.

Se puede concluir que, la velocidad de calentamiento óptima que minimiza el efecto de la recristalización durante el segundo calentamiento, perdiendo la mínima amplitud de pico de fusión posible, se encuentra en el rango de 40-50 °C/min. Finalmente se ha escogido la velocidad de calentamiento de 40 °C/min.



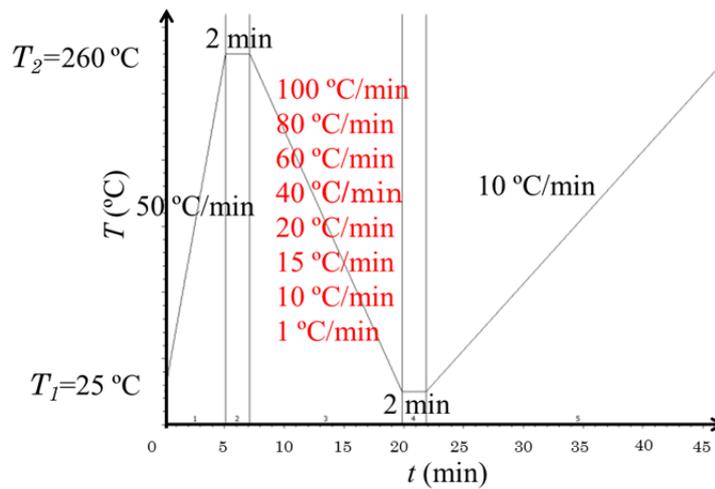
**Figura 50** Evolución de los valores de  $T_m$  con las diferentes velocidades de calentamiento.

### Búsqueda de velocidad de enfriamiento óptima

En este apartado se analiza cuál es la velocidad de enfriamiento máxima real del DSC, manteniendo un control de la temperatura en todo momento. El objetivo de realizar este tipo de análisis es poder enfriar lo más rápido posible hasta las temperaturas de cristalización isotérmica, evitando o minimizando así la posibilidad de cristalización dinámica durante el enfriamiento.

En la Figura 51 se puede observar la secuencia de este análisis. Primeramente, el material se calienta hasta los 260 °C a una velocidad cualquiera. Tras 2 minutos la muestra se enfría hasta temperatura ambiente a diferentes velocidades de enfriamiento (1, 10, 15, 20, 40, 60, 80 y 100 °C/min). Finalmente se realiza un segundo barrido de calentamiento a velocidad 10 °C/min. Este segundo barrido se realiza para comprobar durante el calentamiento y mediante el fenómeno de recristalización si ha ocurrido o no cristalización

durante el enfriamiento. De ahí que se haya optado por una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, que maximice la recristalización.



**Figura 51** Secuencia de análisis DSC: búsqueda de la velocidad máxima de enfriamiento.

Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 52. En esa gráfica se puede observar que, a partir de velocidades de enfriamiento por encima de 20 °C/min, el aparato refrigerador de la máquina no puede seguir el ritmo de enfriamiento impuesto por el programa. De esta manera, no se puede asegurar que la velocidad de enfriamiento real sea la velocidad de enfriamiento programada, siendo ésta una velocidad desconocida. Las zonas fuera de control son las que se encuentran dentro del círculo en la Figura 52, y están determinadas por corchetes.

Por lo tanto, la velocidad máxima de enfriamiento es un parámetro que depende en gran medida de la capacidad de la máquina utilizada. El equipamiento DSC que se ha utilizado para la realización de la presente tesis ha demostrado no ser capaz de efectuar un correcto control de la temperatura a velocidades de enfriamiento superiores a 20 °C/min, por lo que finalmente se ha escogido una velocidad máxima de enfriamiento de 15 °C/min.

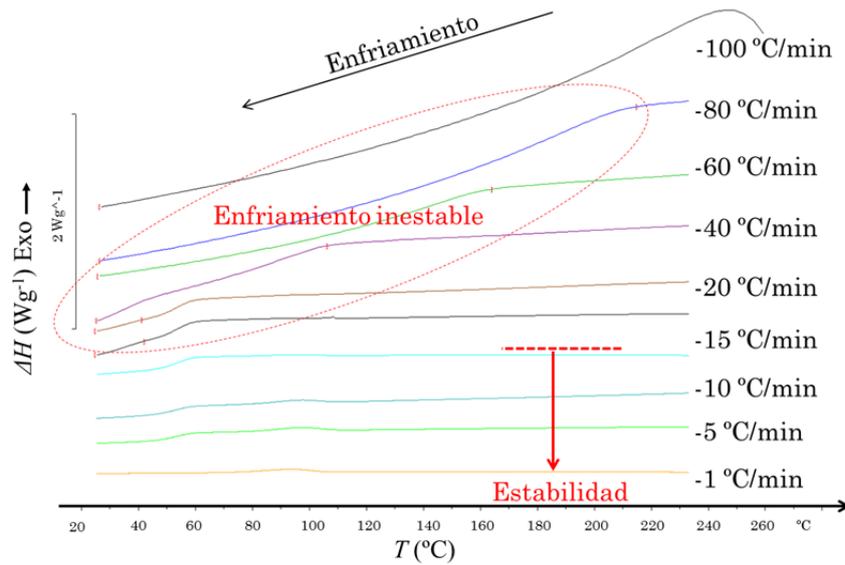


Figura 52 Resultados de la búsqueda de la velocidad máxima de enfriamiento.

### Análisis de número de ensayos por muestra antes de degradación

En este apartado se analiza cuál es el efecto de la degradación térmica sobre las propiedades del material. Para ello se va a analizar el número máximo de ciclos al que se puede someter una probeta. Cabe destacar que es interesante realizar este tipo de análisis de cara al hipotético ahorro en tiempo y material que se pudiera dar, en el caso en que una misma probeta pudiera ser ensayada múltiples veces sin ocurrir degradación térmica alguna.

En la Figura 53 se puede observar la secuencia de este análisis. Primeramente, el material se calienta hasta los 260 °C a una velocidad de 40 °C/min. Tras 2 minutos la muestra se enfría hasta temperatura ambiente también a una velocidad de 40 °C/min. Posteriormente se vuelve a repetir el ciclo. Así el ensayo lo forman 10 ciclos calentamiento-espera-enfriamiento idénticos.

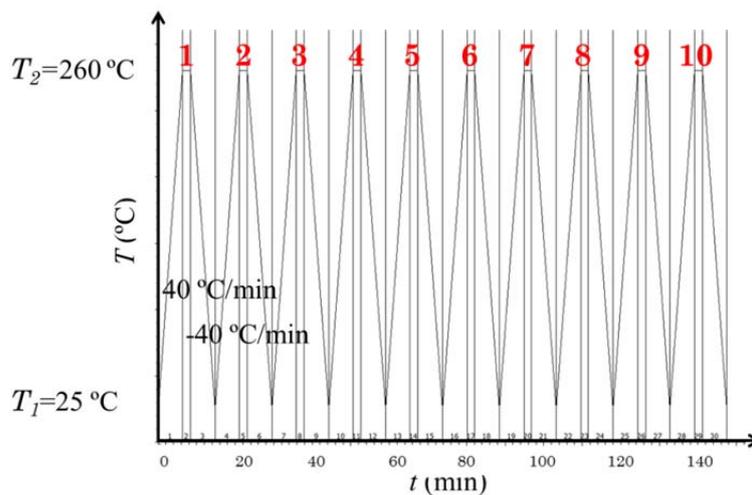
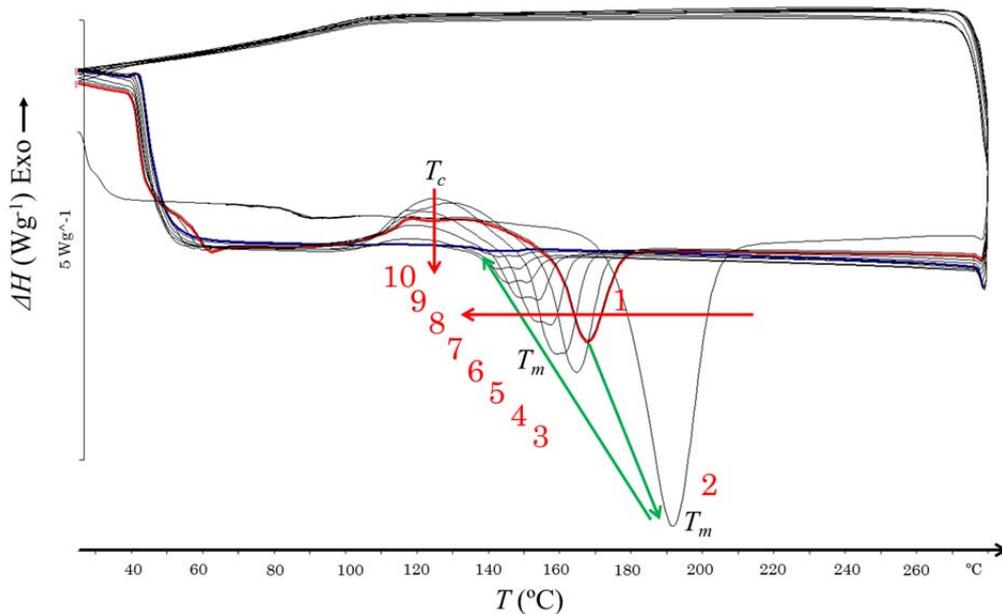


Figura 53 Secuencia del análisis de número máximo de ensayos por muestra antes de degradación térmica.

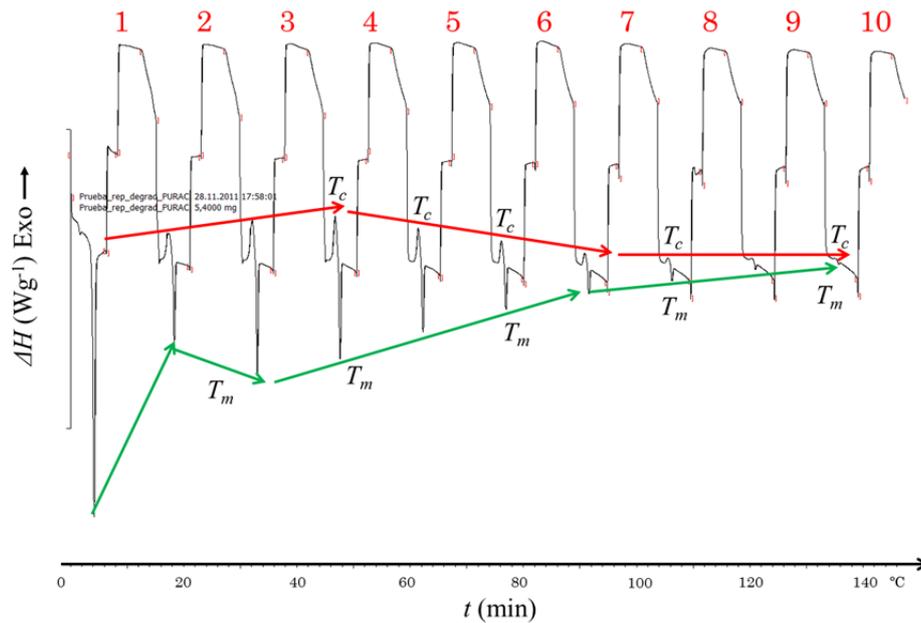
Los resultados de este análisis (en formato entalpía-temperatura) se muestran en la Figura 54. En esta gráfica se puede observar que la degradación térmica provocada por el propio ensayo de DSC es severa. A medida que se aumenta el número de ensayos, tanto la intensidad del pico de fusión ( $T_m$ ) como la entalpía de éste disminuyen. También se puede observar cómo la  $T_m$  se desplaza hacia la izquierda (temperaturas inferiores) indicando que el tamaño de cristal obtenido es menor. Respecto al pico de recrystalización ( $T_{cc}$ ), éste también disminuye a medida que se aumenta el número de ensayos, indicando que la capacidad de cristalización del material se ve perjudicada durante el calentamiento.



**Figura 54** Resultados del análisis del número máximo de ensayos por muestra antes de degradación térmica. Se muestran los 10 barridos en función de la temperatura.

Continuando con este análisis, los resultados en formato entalpía-tiempo se muestran en la Figura 55. En esta gráfica se puede observar la evolución en el tiempo de los valores  $T_c$  y  $T_m$ . Al igual que en el análisis anterior, se observa que la intensidad de pico tanto de la  $T_c$  como de la  $T_m$  disminuyen a medida que aumenta el número de ensayos. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la Figura 54.

Se puede concluir que el comportamiento a fusión y cristalización (incluye recrystalización) es muy sensible a la degradación térmica del PLLA, por lo que se recomienda hacer un solo barrido por cada muestra.



**Figura 55** Resultados del análisis del número máximo de ensayos por muestra antes de degradación térmica. Se muestran los 10 barridos en función del tiempo.

### Plan de ensayos

A continuación se muestra el plan de ensayos que se ha seguido.

- **Caracterización térmica del proceso de disolución-evaporación**

En un primer test se comparó el PLLA virgen (PLLA0), en forma de film y de granza, para analizar la influencia del proceso de fabricación (disolución-evaporación) sobre las propiedades térmicas del PLLA. Para ello se llevó a cabo un análisis dinámico siguiendo la secuencia térmica mostrada en la Figura 56.

- **Caracterización térmica del *nanocomposite***

En esta segunda parte se compararon muestras de varios *nanocomposites* (PLLA1, PLLA2.5 y PLLA5) y de PLLA virgen (PLLA0), todos en forma de film, para analizar las propiedades térmicas del propio material, es decir, la influencia del peg-POSS en el PLLA. Para ello, se llevó a cabo un análisis dinámico siguiendo la secuencia térmica mostrada en la Figura 56.

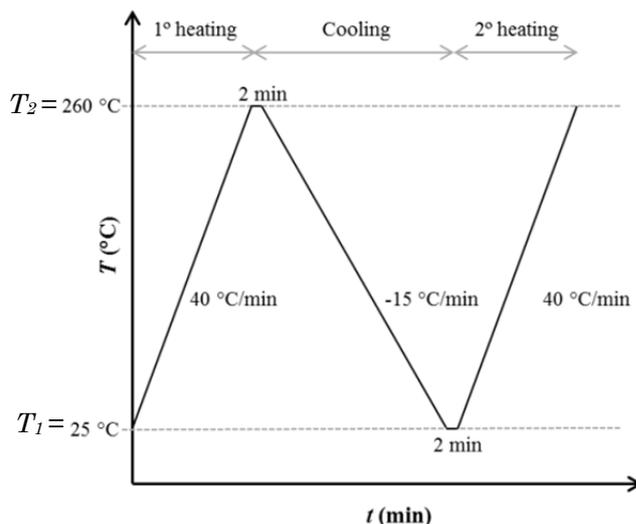


Figura 56 Secuencia de ensayo DSC: análisis dinámico.

### 2.3.1.2 Ensayos isotérmicos de cristalización

En este apartado se describen los ensayos isotérmicos llevados a cabo durante la caracterización del material. Primeramente se muestra el análisis (en este caso es dinámico) sobre la búsqueda del rango de temperaturas de cristalización. Posteriormente se muestra el plan de ensayos isotérmicos.

#### Determinación del rango de temperaturas de cristalización

Mediante este tipo de ensayo se define el rango de temperaturas de cristalización isotérmica a aplicar a la muestra sin que ésta sufra una prematura cristalización dinámica durante el proceso de enfriamiento rápido hasta la temperatura de cristalización isotérmica. Estas temperaturas se obtienen a partir de ensayos de cristalización dinámica. En estos ensayos dinámicos es importante no solo medir el pico de cristalización, que es la temperatura a la que ocurre la máxima cristalización durante el enfriamiento, si no medir también la temperatura de *onset* (directamente de las gráficas), que es la temperatura a la que se da el comienzo de la cristalización dinámica.

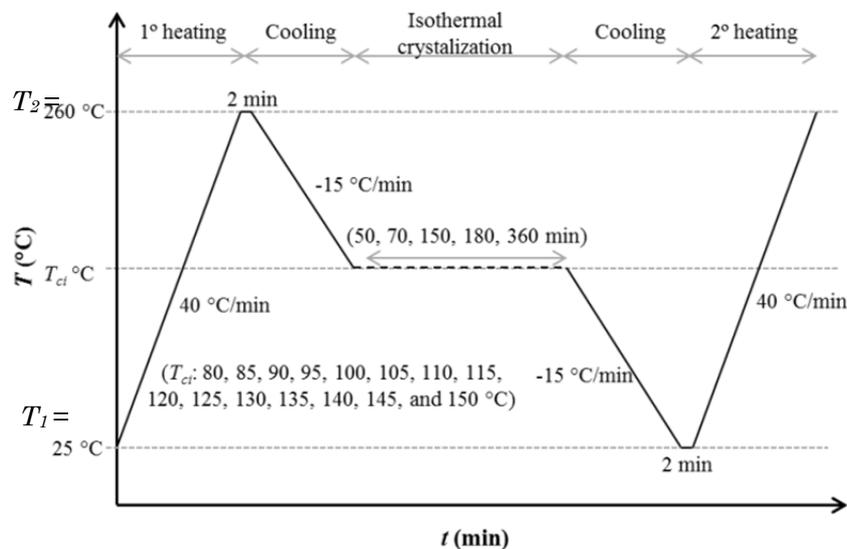
En esta sección se van a analizar tanto el PLLA virgen (PLLA0) como los *nanocomposites*, todos en forma de film. Teniendo en cuenta las gráficas de cristalización dinámica, entre todos los materiales se tomará el mayor valor de *onset* como el más restrictivo. Este valor será la temperatura de cristalización isotérmica mínima a la que programar los ensayos isotérmicos, teniendo la certeza de que no ha ocurrido una prematura cristalización dinámica durante el enfriamiento rápido hasta esa temperatura.

**Plan de ensayos**

En esta parte se realizó un análisis a varias temperaturas de cristalización isotérmica ( $T_{ic}$ ) y tiempos de cristalización ( $t$ ) que se resumen en la Tabla 5. Los valores de  $T_{ic}$ : 75 y 155 °C se utilizaron de manera excepcional en el análisis del PLLA0 para comprobar si ocurría cristalización isotérmica a esas temperaturas. Las muestras se enfriaron desde el fundido hasta la  $T_{ic}$  a la velocidad máxima de enfriamiento posible (15 °C/min), con el fin de evitar cualquier comienzo de cristalización no-isoterma antes de llegar a la temperatura de análisis. Una vez alcanzada cada  $T_{ic}$ , se mantuvo la muestra a esa temperatura durante un tiempo suficiente que asegurase la completa cristalización del material (Tabla 5). La secuencia del análisis isotérmico se muestra en la Figura 57.

**Tabla 5** Parámetros de cristalización isotérmica: temperaturas y tiempos de cristalización.

$T_{ic}$ (°C)	$t$ (min)	$T_{ic}$ (°C)	$t$ (min)
75	720	120	70
80	360	125	70
85	150	130	70
90	50	135	180
95	50	140	180
100	70	145	360
105	70	150	360
110	70	155	720
115	70	160	900



**Figura 57** Secuencia de ensayo DSC: análisis isotérmico.

El tiempo de cristalización parcial (o medio-tiempo) ( $t_{1/2}$ ), definido como el tiempo transcurrido desde el inicio (*onset*) hasta el punto en el que la cristalización se completa al

50%, se calculó tomando como referencia el punto de valor máximo del pico exotérmico (en tiempo) durante la cristalización isotérmica (Figura 58) [Yasuniwa2006]. De esta manera, al tomar ese valor de pico el  $t_{1/2}$  no sería exactamente el punto en el que la cristalización se completase al 50% (lo sería en el caso de que el perfil de la curva fuese simétrico), si no que se consideraría una aproximación debido a la dificultad existente para su determinación en polímeros semicristalinos y en perfiles de curva no simétricos, que tenderían hacia finales de curva asintóticos.

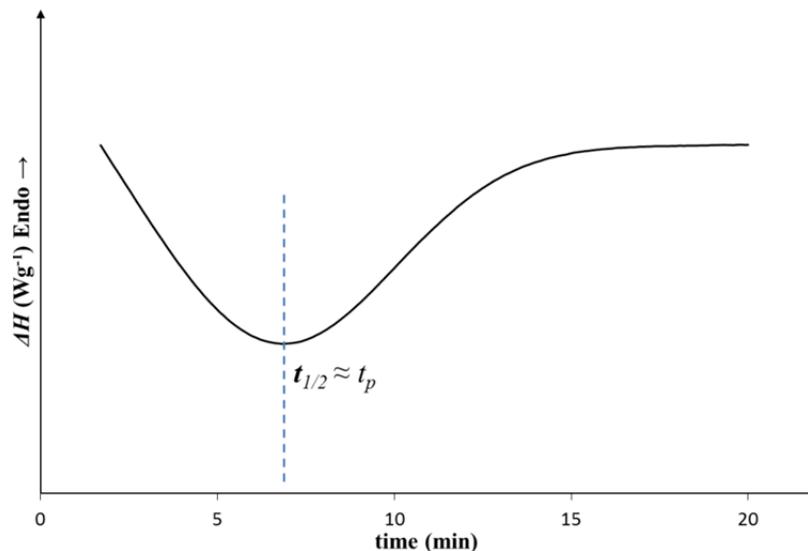


Figura 58 Determinación del  $t_{1/2}$ : aproximación con respecto al tiempo de pico.

### 2.3.1.3 Estudio de la fusión en equilibrio

En este apartado se realizó primeramente un análisis dinámico del material tras haber cristalizado totalmente las muestras de manera isotérmica. Posteriormente se calculó la temperatura de fusión en equilibrio del material. Finalmente se determinó la cristalinidad máxima del material.

#### Fusión de los cristales formados durante la cristalización isotérmica

En esta parte se realizó un análisis dinámico del material tras haber cristalizado totalmente las muestras de manera isotérmica. El ensayo es el correspondiente a un segundo calentamiento dinámico, y su secuencia se puede observar en la segunda parte de la Figura 57 (“2° heating”). De este ensayo se van a medir la temperatura del pico de fusión ( $T_m$ ) y la entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ) de las muestras.

### Determinación de la temperatura de fusión en equilibrio

Una propiedad importante que puede obtenerse de las medidas de DSC es la temperatura de fusión en equilibrio ( $T_m^0$ ). El concepto de  $T_m^0$  consiste en la temperatura de fusión de un polímero 100% cristalino, es decir, de un homocristal de espesor infinito. Cabe destacar que sería un caso hipotético ya que no existen este tipo de materiales, tan solo los semicristalinos. Para calcular la  $T_m^0$ , primeramente hay que analizar la temperatura de pico de fusión ( $T_m$ ) de cada muestra cristalizada isotérmicamente a cada  $T_{ic}$ . La  $T_m$  se determina del análisis del pico endotérmico que ocurre durante el segundo calentamiento. Cabe destacar que la  $T_m$  es un parámetro importante, ya que indica el tamaño aproximado del cristal. Es fundamental que la cristalización sea isotérmica con el fin de obtener un tamaño de cristal lo más homogéneo posible, al contrario que las cristalizaciones dinámicas, en las que debido al continuo cambio de temperatura se obtiene un tamaño de cristal heterogéneo. Posteriormente, cada  $T_m$  extraída se grafica con su correspondiente  $T_{ic}$ , obteniendo así una sucesión de puntos cuasi-lineal. Utilizando la ecuación de Hoffman-Weeks (1) se realiza su extrapolación hasta el punto en el que  $T_m = T_{ic}$ , que se considera la  $T_m^0$  del material [Hoffman1976, Patkar1993, Hoffman1962]. Algunos de los valores de  $T_m^0$  que se pueden encontrar en bibliografía para el PLLA homopolímero son 181, 211, y 212 °C [Tsuji1995], 207 °C [Vasanthakumari1983] y 215 °C [Kalb1980]. El borrado de la historia termomecánica ocurre por encima de esta temperatura de fusión en equilibrio (no la temperatura de fusión del polímero), ya que a partir de esta temperatura los núcleos espontáneos desaparecen completamente.

La ecuación de Hoffman-Weeks (1) se expresa como:

$$T_m = T_m^0 \left(1 - \frac{1}{\gamma}\right) + \frac{T_{ic}}{\gamma} \quad (1)$$

donde  $T_m$  (°C) es la temperatura de fusión de cada muestra cristalizada a cada  $T_{ic}$  (°C),  $T_m^0$  (°C) es la temperatura de fusión del polímero 100% cristalino, y  $\gamma$  es el factor proporcional entre el espesor laminar inicial y final [Hoffman1976].

### Determinación de la cristalinidad máxima del compuesto

Otra propiedad importante que puede obtenerse de las medidas de DSC es el grado de cristalinidad ( $\chi$ ). Integrando el flujo de calor en el tiempo bajo el pico de fusión (área de fusión) se calcula la energía total de fusión del polímero  $\Delta H_m$ . Según bibliografía, el valor más común de la energía necesaria para fundir el PLLA perfectamente cristalizado (cristal de tamaño infinito) es  $\Delta H_m^0 = 93$  J/g [Fischer1973, Migliaresi1991, Delabarde2011, Pyda2004]. El grado de cristalinidad puede calcularse mediante la ecuación (2):

$$\chi_c (\%) = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^0} \times 100 \quad (2)$$

donde  $\Delta H_m$  (J/g) es la entalpía de fundido (también llamada área de fusión), extraída del área existente entre el pico endotérmico de la curva analizada y la línea base; la  $\Delta H_c$  (J/g) es la entalpía de cristalización (en el caso de que aparezca algún pico exotérmico de cristalización en frío o recristalización); y  $\Delta H_m^0$  (J/g) es la entalpía de fusión del PLLA isotáctico completamente cristalino (100%).

### 2.3.2 Análisis termogravimétrico

La estabilidad térmica de los *nanocomposites* ha sido analizada mediante un análisis termogravimétrico (TGA), utilizando un aparato Mettler Toledo TGA/SDTA851e (METTLER TOLEDO, USA). Las muestras, en formato de film y con un peso aproximado de 10 mg, se colocaron en bandejas de aluminio, y se calentaron a una velocidad de 10 °C/min en atmósfera inerte (flujo de nitrógeno de 60 ml/min) hasta 600 °C. Los porcentajes analizados fueron de 0, 0,5, 1, 2,5 y 5% w/w peg-POSS.

### 2.3.3 Análisis de la estructura molecular mediante espectroscopía infrarroja

La estructura molecular de los *nanocomposites* y del material puro de referencia, ambos en formato de film, fue analizada mediante un espectrofotómetro analítico Nicolet™ 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific®, USA). La resolución de los espectros fue de 1 cm<sup>-1</sup>, y el intervalo de longitudes de onda analizado fue entre 4000-400 cm<sup>-1</sup>. Para cada una de las muestras se realizaron 50 barridos. Los porcentajes analizados fueron de 0, 0,5, 1, 2,5, 5 y 10% w/w peg-POSS.

### 2.3.4 Ensayos de tracción

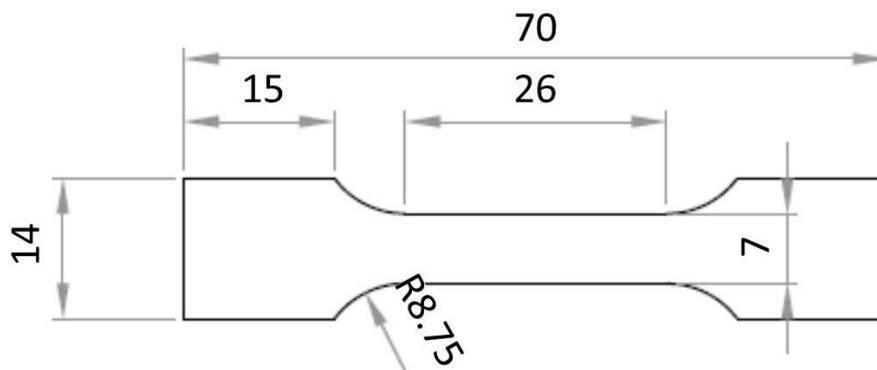
Las propiedades mecánicas de los *nanocomposites* peg-POSS/PLLA se analizaron mediante ensayos de tracción. Primeramente se describen las condiciones de los ensayos de tracción. Posteriormente se detalla el proceso de obtención de las probetas calibradas en forma de film.

### Condiciones de los ensayos de tracción

Los ensayos de tracción se realizaron en una máquina Instron® (Massachusetts, USA) con tecnología Zwick/Roell® (Ulm, Alemania). Se utilizó una célula de carga de 1 kN y un extensómetro. La velocidad de deformación fue de 5 mm/min. Se analizaron 3 probetas de cada tipo de material, en formato film. Los ensayos se realizaron bajo la norma UNE-EN ISO 527-1 y 527-3 [ISO]. Los porcentajes analizados fueron de 0, 0,5, 1, y 5% w/w peg-POSS.

### Obtención de las probetas calibradas a partir de films

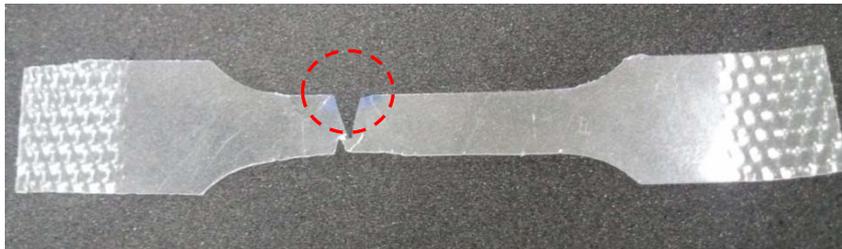
Un ensayo de tracción requiere que el tamaño y forma de la probeta a ensayar esté normalizado. Los ensayos se realizaron bajo la norma UNE-EN ISO 527-1 y 527-3 [ISO], por lo tanto, también las muestras se fabricaron según las directrices de esas normas. En la Figura 59 se muestra una probeta con las dimensiones standard.



**Figura 59** Dimensiones de probeta calibrada normalizada para ensayos de tracción.

En un primer momento se decidió que los ensayos de tracción se realizaran con probetas fabricadas mediante ambos procesos de fabricación, disolución-evaporación y *electrospinning*, con el objetivo de poder comparar las propiedades mecánicas de cada tipo de scaffold. Sin embargo, la obtención de las probetas normalizadas mediante el proceso de electrospinning resultó imposible debido a las características de este tipo de morfología, su fragilidad y su dificultad de manipulación, por lo que se optó por analizar únicamente las probetas normalizadas fabricadas mediante el proceso de disolución-evaporación (tipo film). Sin embargo, la obtención de este tipo de probetas a partir de film no supuso una tarea fácil. El principal problema consistió en obtener una probeta con las dimensiones correctas, así como libre de fisuras que supusiesen el inicio prematuro de la rotura. En la Figura 60 se puede observar una probeta en forma de film (material PLLA0) que ha sido sometida a un ensayo de tracción. A la hora de fabricar la probeta, mediante una inspección visual se detectó la presencia de una de estas pequeñas fisuras en un lateral. Esta fisura se marcó con un rotulador azul con el fin de comprobar si el inicio de la rotura ocurría en ese lugar, y de

manera prematura. Como se puede observar en la imagen, una vez ensayada la probeta se pudo comprobar cómo, efectivamente, la fisura comenzaba y se propagaba desde ese punto. La resistencia a la tracción de la probeta también resultó menor, ya que la grieta se comenzó a propagar antes de llegar a la tensión normal de rotura. De aquí se destaca la importancia de fabricar probetas de tracción sin fisuras para obtener unos resultados válidos en los ensayos de tracción.



**Figura 60** Probeta en forma de film para ensayos de tracción. La probeta tiene una fisura en un lateral.

Con el objetivo de solucionar estos problemas se evaluaron diferentes técnicas: la obtención de la muestra mediante una probeta macho y una cuchilla, la obtención de la muestra mediante troquelado (un punzón-hembra con la forma de la probeta y una mini prensa), el moldeo de la probeta en un molde de silicona mediante el método disolución-evaporación, y por último, la obtención de las probetas directamente desde los films mediante una plantilla modelo y unas tijeras.

- **Obtención de la probeta mediante una probeta macho y una cuchilla.**

Esta técnica consistió en obtener las probetas a partir de films fabricados mediante disolución-evaporación. Para ello, las probetas se cortaron directamente de los films con la ayuda de una cuchilla. La operación se llevó a cabo bordeando con la cuchilla un macho metálico con las mismas dimensiones de la probeta (Figura 61). Sin embargo, esta técnica presentó un problema, ya que resultó habitual que aparecieran fisuras en los bordes de las probetas. Es evidente que la aparición de fisuras es un fenómeno a evitar a la hora de realizar un ensayo de tracción, ya que este tipo de defecto supone un lugar idóneo para el inicio de la propagación de la fisura. Por lo tanto, se debería buscar otro método de fabricación de probetas que evitase la generación de este tipo de defectos. La falta de reproducibilidad de las probetas y la falta de precisión dimensional de éstas, ambas debidas al proceso de corte manual, supondrían un problema menor.



**Figura 61** Obtención manual de las probetas de tracción mediante una cuchilla.

- **Obtención de la probeta mediante troquelado**

Esta técnica consistió en obtener las probetas a partir de films fabricados mediante disolución-evaporación. Para ello, las probetas se cortaron a partir del film mediante un punzón metálico con la forma interna de la probeta (hembra) (Figura 62). La fuerza de corte se aplicó mediante una pequeña prensa manual (Figura 63), y el troquelado se hizo en un solo golpe. El punzón se fabricó mediante electroerosión por hilo, y la parte cortante se afiló mediante una muela abrasiva. A pesar de estar el punzón lo suficientemente afilado y de aplicar la fuerza de corte simultáneamente a lo largo de todo el perímetro de la pieza, esta técnica también presentó problemas de aparición de fisuras. Éstas aparecían al retirar el punzón y sacar la probeta de su interior. Como se ha comentado en el apartado anterior, este tipo de defecto supone un lugar idóneo para el inicio de la propagación de la fisura, por lo que es un fenómeno a evitar a la hora de realizar un ensayo de tracción. En cambio, mediante este método se conseguirían superar otros problemas como la falta de reproducibilidad de las probetas y la falta de precisión dimensional de éstas. Por lo tanto, como en este caso no se soluciona tampoco el problema de la aparición de fisuras, se va a seguir buscando otro método de fabricación de probetas.



**Figura 62** Punzón metálico con la forma interna de la probeta (probeta hembra).



**Figura 63** Dispositivo utilizado para la obtención de las muestras: prensa manual.

- **Obtención de la probeta por moldeo y disolución-evaporación**

Teniendo en cuenta los resultados adversos obtenidos hasta el momento, se intentó fabricar las probetas mediante una técnica diferente a las anteriores. Esta técnica consistió en obtener la muestra, en forma de film, directamente de un molde de silicona cuya cavidad interna tenía la forma de la probeta. La técnica también combinó el proceso de disolución-evaporación, necesario para disolver el material y rellenar el molde. Para ello, primeramente se fabricó el molde de silicona. Se mezclaron silicona y agente de curado en un recipiente, según las instrucciones del fabricante. La mezcla se vertió en una caja de plástico en cuyo interior se encontraban apoyados dos machos metálicos con la forma de la probeta. Estos machos se cubrieron completamente con la mezcla y se dejó endurecer. Una vez solidificada la silicona, se retiraron tanto los machos metálicos del molde como el propio molde de la caja de plástico. El proceso de fabricación de los moldes se puede observar en la Figura 64.



**Figura 64** Proceso de fabricación de los moldes de silicona. Arriba izqda.: machos metálicos en la caja. Arriba dcha.: caja rellena de silicona. Abajo izqda.: conjunto visto desde la parte inferior. Abajo dcha.: molde de silicona y probetas metálicas.

Una vez fabricado el molde se llevó a cabo el proceso de obtención de la probeta. El polímero se disolvió en cloroformo, y la solución se vertió dentro del molde de silicona. Se esperó el tiempo suficiente a que el disolvente se evaporara (típicamente 24 h a temperatura ambiente). A continuación se retiraron las muestras del molde.

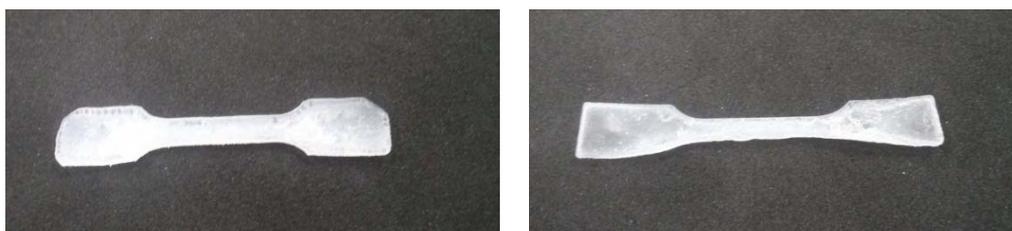
Los resultados no fueron los esperados. Mediante esta técnica no se obtuvo ninguna muestra en condiciones de ser utilizada en un ensayo de tracción. Se observó que la muestra obtenida no presentaba una apariencia correcta, puesto que estaba deformada y doblada, y tenía una superficie muy rugosa y opaca en vez de una superficie lisa y transparente. Además, se observó también que la cavidad interna del molde se deformaba durante el proceso, afectando así a la muestra. El molde se hinchaba durante el llenado (por el peso de la disolución) y se contraía durante la evaporación. Se dedujo que este efecto probablemente sería debido a la poca rigidez del molde, lo que incluiría demasiada altura del molde y poca rigidez de la silicona. También se advirtió que esta técnica (o alguno de sus parámetros) presentaba algún problema en cuanto a la correcta evaporación del disolvente dentro del molde, como sí que ocurría en las muestras obtenidas en placas petri. Con el fin de resolver el problema, se propusieron varias opciones: reducir la concentración de polímero (condiciones iniciales de 1 gr de polímero para 25 ml de cloroformo) a 0,5 y 0,125 gr de polímero por cada

25 ml de cloroformo; introducir el conjunto entero dentro de un horno de ventilación forzada a 37 °C para conseguir una evaporación más rápida del disolvente; y fabricar un molde más bajo para evitar la deformación del molde (Figura 65).



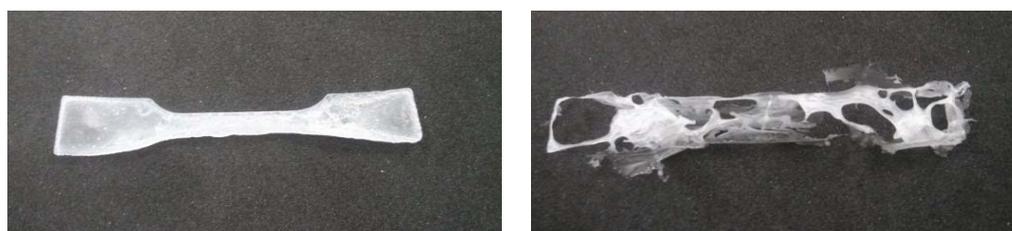
**Figura 65** Moldes de silicona con diferente profundidad interior.

El resumen de las pruebas realizadas se muestra a continuación. Primeramente se redujo la concentración de polímero desde 1 gr a 0,5 gr (Figura 66 izquierda) y 0,125 (Figura 66 derecha) gr de polímero por cada 25 ml de cloroformo.



**Figura 66** Probetas obtenidas tras la reducción de la concentración de PLLA en la disolución. Izqda: de 1 gr a 0,5 gr. Dcha: de 1 gr a 0,125 gr.

Posteriormente, se realizó el secado del conjunto entero dentro de un horno de ventilación forzada a 37 °C con el objetivo de conseguir una evaporación más rápida del disolvente. El resultado que se observa en la Figura 67 es el de una muestra de 0,125 gr de polímero por cada 25 ml de cloroformo. Como se puede apreciar en la fotografía, la muestra evaporada de esta manera resultó completamente inservible.



**Figura 67** Efecto de la evaporación del disolvente sobre la morfología de las probetas. Izqda: evaporación al aire libre. Dcha: evaporación en un horno de ventilación forzada a 37 °C. Para ambas muestras la concentración de polímero fue de 0,125 gr por cada 25 ml de cloroformo.

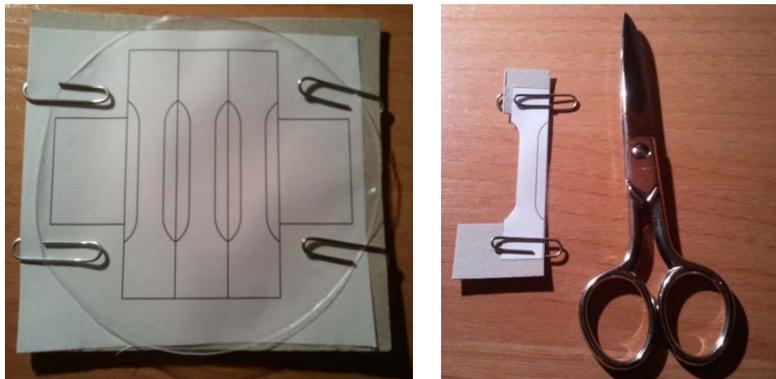
Finalmente, se intentó el moldeo utilizando un molde bajo. El resultado fue similar al del molde alto.

Los problemas de excesivo volumen de solución (altura) que se observaron en la evaporación del disolvente hicieron que no fuese posible obtener muestras adecuadas. Aunque este método se presentaba como el adecuado para obtener muestras sin fisuras y con una mayor cadencia y reproducibilidad, finalmente no se consiguió obtener ninguna muestra válida para realizar ensayos de tracción.

- **Obtención de la probeta mediante un patrón y tijeras**

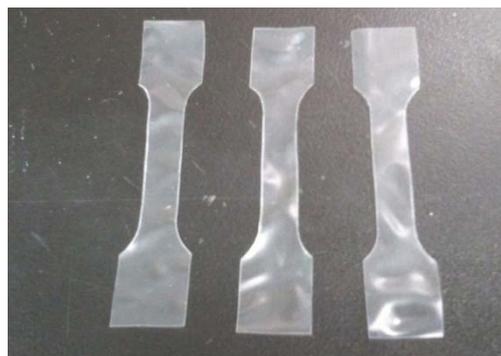
Volviendo atrás a las técnicas concernientes a la obtención de las muestras a partir de films, éstas parecen un método más adecuado que el proceso de moldeo. Esta última técnica se basa en obtener las muestras de manera manual a partir de films, mediante un patrón y tijeras quirúrgicas (Figura 68).

El film se colocó sobre la plantilla con las imágenes de la muestra, y se fijó con algunos clips para evitar movimientos durante el proceso de corte. Después se cortó a mano mediante unas tijeras.



**Figura 68** Plantilla para la obtención de muestras de forma manual mediante unas tijeras.

Esta técnica no asegura la reproducibilidad de las muestras, pero en cambio, se podría evitar la aparición de fisuras. Las dimensiones no serían las mismas para todas las muestras, aunque sí que serían similares, asumiendo un pequeño error. Para minimizarlo sería necesario medir las dimensiones de las muestras con algún instrumento de medición preciso (calibre, micrómetro...) antes de realizar el ensayo de tracción. Finalmente ésta fue la técnica elegida para la obtención de las probetas formato film para ensayos de tracción (Figura 69).



**Figura 69** Probetas de film fabricadas para ser utilizadas en los ensayos de tracción.

### 2.3.5 Análisis de viscosidad

La viscosidad de los diferentes *nanocomposites* se analizó mediante un micro-viscosímetro automático de caída de bola (Anton Paar® AMVn) (Figura 70). Este aparato permite determinar la viscosidad dinámica de los líquidos, con un error máximo experimental por debajo de los 0,002 segundos en la determinación del tiempo de caída de bola. El control de la temperatura del fluido se lleva a cabo mediante un elemento *Peltier* integrado en el propio aparato, y el cual permite un ajuste de la temperatura con una precisión de 0,05 °C. La solución analizada se preparó disolviendo pequeñas muestras de films (previamente fabricadas mediante el proceso de disolución-evaporación) de PLLA virgen y de PLLA con diferentes porcentajes de peg-POSS (1 y 5% w/w) en cloroformo a temperatura ambiente. La concentración de soluto (film) en la disolución fue de 0,846% w/w para todas las muestras. La solución se introdujo dentro de un capilar, y el micro-viscosímetro posicionó el set automáticamente a los diferentes ángulos de inclinación de 40°, 50°, 60° y 70°.



**Figura 70** Micro-viscosímetro de caída de bola.

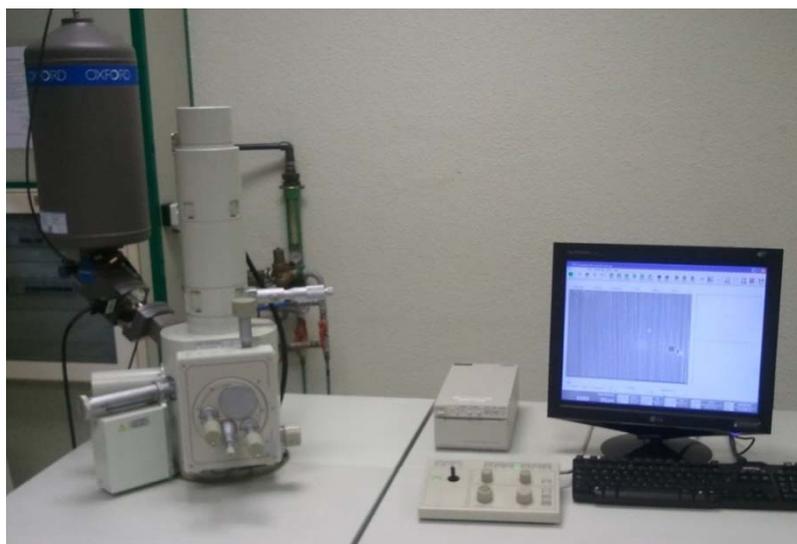
## 2.4 Caracterización de los scaffolds

### 2.4.1 Análisis morfológico mediante microscopía

La microscopía se utilizó para analizar la morfología de los distintos tipos de *scaffold*. Por un lado se analizaron los *scaffolds* fabricados mediante el proceso de disolución- evaporación, y por otro lado los fabricados mediante el proceso de *electrospinning*. En ambos casos la morfología se analizó mediante un microscopio electrónico de barrido. En el caso de los *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning*, se analizaron también mediante microscopía óptica las fibras obtenidas durante las pruebas de ajuste de las variables del propio proceso de *electrospinning*.

#### Microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy, SEM*)

La morfología de los *scaffolds* fabricados, tanto mediante el proceso de disolución- evaporación como la de los fabricados mediante el proceso de *electrospinning*, se analizó mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM, JSM-5500 LV, JEOL®, Japan) (Figura 71). Las fotografías fueron tomadas bajo las siguientes condiciones de trabajo del SEM: aumentos entre 500-5000, modo de alto vacío, y voltaje de aceleración 15 kV. Antes de realizar el análisis, los *scaffolds* se recubrieron con oro en una máquina de recubrimiento por deposición PVD (*Physical Vapor Deposition*) (JFC 1200 JEOL®, Japan). El diámetro de la fibra se analizó directamente de las fotografías obtenidas, mediante el propio software del equipo SEM.



**Figura 71** Microscopio electrónico de barrido (SEM).

## Macroscopía óptica

La macroscopía óptica se ha utilizado para analizar las fibras obtenidas durante las pruebas de ajuste de las variables del proceso de *electrospinning*. El procedimiento de análisis se detalla a continuación. Primeramente se colocó una rejilla metálica sobre la placa colectora del equipo, y sobre esta rejilla se colocó una lámina portaobjetos de vidrio. Posteriormente, debido a la configuración del proceso, se aisló alguna de las variables a ajustar y se puso en marcha el sistema, obteniendo así una deposición de material sobre el portaobjetos. Finalmente, se retiró esta lámina portaobjetos y se analizó en el macroscopio. Se pudieron observar desde pequeñas gotas en forma de spray (no deseable) hasta mat de nanofibras (deseable). Este procedimiento de configuración se llevó a cabo hasta optimizar todas las variables principales del proceso, descritas anteriormente. El equipo utilizado fue un WILD MAKROSKOP M420, y las imágenes se tomaron y guardaron mediante el software del microscopio.

### 2.4.2 Caracterización de la biodegradabilidad en líquido fisiológico

El procedimiento de biodegradación hidrolítica se llevó a cabo según la norma ASTM F 1635-11 [ASTM]. Se prepararon 27 muestras en total a partir de films, consistiendo en 9 réplicas de cada *nanocomposite* (PLLA1 y PLLA5) y en otras 9 de PLLA0 a modo de control. Cada muestra se introdujo de manera individual en botes de plástico de 0,6 ml sellados, rellenos de solución fisiológica salina de tipo Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Gibco® DPBS, Life Technologies™ - Invitrogen™). El conjunto de botes se introdujo en un aparato de laboratorio tipo “baño de agua” (OVAN® BATH200-12L) lleno de agua bidestilada (Figura 72). El agua se calentó a 37 °C, simulando así la temperatura del cuerpo humano durante todo el experimento. El líquido fisiológico (PBS) en el que se encontraban las muestras se renovó semanalmente, con el fin de asegurar el mantenimiento de un pH estable ( $7,4 \pm 0,2$ ) durante todo el experimento. El proceso de cambio semanal de PBS y de la medición de pH se describe posteriormente. La duración del experimento fue de 12 semanas (3 meses), incluyendo 3 checkpoints de 4, 8 y 12 semanas. En cada checkpoint se extrajeron 9 muestras (3 réplicas de cada material) que fueron posteriormente analizadas. El proceso de análisis de estas muestras y de su pérdida de peso se describe en el último apartado.



**Figura 72** Configuración del baño de agua a 37 °C con los botes en su interior durante el experimento de biodegradación.

### **Preparación de las probetas**

Las probetas se fabricaron a partir de films obtenidos mediante el proceso de disolución-vaporación. Las muestras de 30 x 20 mm<sup>2</sup> se obtuvieron directamente de estos films mediante unas tijeras.

### **Preparación del líquido fisiológico**

La solución fisiológica se preparó mezclando los polvos de DPBS y cloruro de calcio con agua bidestilada, siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla se realizó en un recipiente y fue removida mediante un agitador magnético.

### **Cambio semanal de líquido y medición de pH**

El pH de la solución fisiológica se midió semanalmente con un pH-metro electrónico tipo pen (PCE-PH22®, PCE Instruments®). Ya que el líquido fisiológico en el que se encontraban las muestras se cambiaba semanalmente por uno fresco, se aprovechó para medir el pH antes y después de cada cambio, recogiendo estos valores (Figura 73). El objetivo fue asegurar el mantenimiento de un pH estable, dentro de los límites del rango fisiológico (7,4±0,2), durante todo el experimento.



**Figura 73** Medición de los valores de pH con la ayuda de un pH-metro digital durante el cambio de líquido fisiológico.

### Cálculo de pérdida de peso

Las muestras se pesaron antes y después del experimento en una micro-balanza de alta precisión (OHAUS® GALAXY™ 110). El procedimiento consistió en, tras extraer las muestras en cada checkpoint, limpiar y aclarar cada muestra con agua bidestilada, y secarla en un horno de convección forzada a 35 °C durante 72 h, hasta que la diferencia en peso fuera menor que un cambio del 0,05% en 24h. Cada muestra se pesó 3 veces, tanto antes de comenzar el experimento como después de cada checkpoint, y se calculó el peso medio. Con estos datos se calculó el porcentaje de pérdida de peso, y se expresó como media  $\pm$  desviación estándar (SD).

#### 2.4.3 Caracterización biológica de los *scaffolds* - Cultivo celular

La caracterización biológica se realizó sobre los *scaffolds* fabricados tanto por *electrospinning* como por disolución-evaporación. El desglose de operaciones se muestra en los siguientes apartados.

### Preparación de las muestras

Los films de diferentes materiales fabricados mediante el proceso de disolución-evaporación fueron seccionados en varias réplicas con las mismas dimensiones (1 cm  $\times$  1 cm), con el objetivo de que los resultados de los estudios comparativos fueran consistentes. El mat de fibras de diferentes materiales, fabricado mediante el proceso de *electrospinning*, también

fue seccionado en varias réplicas con esas mismas dimensiones. Posteriormente, este mat de fibras fue despegado del papel de aluminio que había servido como colector durante el proceso de *electrospinning*. Finalmente, las réplicas fueron enviadas al equipo de la Dra. Clara Isabel Rodríguez, del Grupo de Células Madre y Terapia Celular (BioCruces) del Hospital Universitario de Cruces (Barakaldo), para la realización del cultivo celular.

### Cultivo celular y siembra

Las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana (hMSC's) se obtuvieron de Inbiobank Stem Cell Bank [INBIOBANK]. Las células fueron procesadas en Inbiobank siguiendo procedimientos de fabricación controlados bajo la norma ISO9001:2000. Las hMSC's generadas mostraron un fenotipo típico CD13+, CD29+, CD73+, CD90+, CD105+, CD166+, CD34-, CD45- y CD31-. También mostraron potencial de diferenciación trilineage, incluyendo la generación de osteocitos, condrocitos y adipocitos. Las hMSC's fueron cultivadas en una solución baja en glucosa de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich®, USA) complementada con un 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich®, USA), seleccionada expresamente para el crecimiento óptimo de las hMSC's. Todos los experimentos se llevaron a cabo con hMSC's con un máximo de 11 pases.

En el laboratorio del Hospital de Cruces se cultivaron 12 réplicas (1 cm × 1 cm) de cada material (PLLA0, PLLA1 y PLLA5), tanto para las muestras fabricadas mediante disolución-evaporación como para las muestras fabricadas mediante *electrospinning*. El resumen de las muestras cultivadas se puede observar en la Tabla 6. Previo al cultivo, todas las muestras fueron esterilizadas mediante óxido de etileno. Este tipo de esterilización se realiza para evitar el posible deterioro debido a las altas temperaturas que conllevaría el proceso tradicional de esterilización por medio de calor mediante autoclave. Este paso previo es fundamental en todo trabajo con células, debido a que es primordial el mantenimiento de unas condiciones de esterilidad y asepsia específicas en un laboratorio de cultivos celulares.

Para todos los experimentos, las hMSC's fueron sembradas en una placa de 24 pocillos con una densidad de  $2 \times 10^5$  células/*scaffold*, y se cultivaron con medio basal durante 2 semanas. El medio fue reemplazado cada 2-3 días. Cabe destacar que los *scaffolds* se trasladaron a una nueva placa con pocillos 5 días después del cultivo celular, con el objetivo de evitar interferencias con las células que también estaban creciendo en la superficie de las placas. Respecto a la diferenciación condrogénica, tras el periodo de proliferación celular las hMSC's fueron inducidas a diferenciarse en condrocitos. Para ello se cultivaron durante 6 semanas con STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit (Life Technologies™, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Tabla 6** Diferentes muestras enviadas al Hospital de Cruces para la realización del cultivo celular. Se incluyen las muestras fabricadas mediante disolución- evaporación y mediante *electrospinning*.

Muestra	Refuerzo (%w/w)	Proceso
PLLA0c	0	<i>Casting</i> /evaporación 24h. aire libre + 24h. horno a 30 °C
PLLA0c2	0	<i>Casting</i> /evaporación 48h. aire libre
PLLA0c3	0	<i>Casting</i> /evaporación 24h. horno a 20 °C
PLLA0c4	0	<i>Casting</i> /evaporación 24h. horno a 40 °C
PLLA1c	1	<i>Casting</i> /evaporación 24h. aire libre + 24h. horno a 30 °C
PLLA5c	5	<i>Casting</i> /evaporación 24h. aire libre + 24h. horno a 30 °C
PLLA0	0	<i>Electrospinning</i>
PLLA1	1	<i>Electrospinning</i>
PLLA5	5	<i>Electrospinning</i>

### Microscopía fluorescente y por contraste de fase

Las células se analizaron por medio de un microscopio invertido (Nikon®, Japan) equipado con lentes de contraste de fase. Las imágenes se fotografiaron mediante una cámara digital (Canon®, Japan) acoplada al microscopio. Con el objetivo de visualizar el núcleo de las células, éstas fueron teñidas con tinte Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich®, USA) y examinadas por medio de un microscopio fluorescente (TE2000, Nikon®, Japan). La formación de cartilago se manifestó mediante un tintado específico de azul alciano (Sigma-Aldrich®, USA). Se analizaron 2 réplicas de cada material.

### Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las células se lavaron en PBS, fueron fijadas en 0,1 M de buffer de Sorensen (pH 7,2) conteniendo un 2% de glutaraldehído, se volvieron a lavar en buffer de Sorensen conteniendo un 4% de sacarosa, fueron de nuevo fijadas en tetróxido con un 1% de osmio, y se volvieron a lavar finalmente en buffer de Sorensen. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas mediante una serie de etanoles, se sumergieron dos veces en hexametildisilazano, se secaron al aire y fueron recubiertas de oro en una máquina de recubrimiento por deposición PVD por pulverización catódica (JFC-1100, JEOL®, Japan). Las imágenes se adquirieron mediante un microscopio electrónico de barrido (S-3400N, Hitachi®, Japan). Se analizó una réplica de cada material.

### Análisis bioquímicos

El contenido en proteoglicanos sulfatados de las muestras se analizó mediante un ensayo Blyscan™ Glycosaminoglycan Assay (GAG, Biocolor®, UK), tras haber sometido a los *scaffolds* a una hidrólisis en 25 U/ml de papaína (Sigma-Aldrich®, USA) a 60 °C durante 12 horas. En esta fase se analizaron 6 réplicas de cada material: 4 se utilizaron para los análisis GAG, y los 2 restantes, para obtener las imágenes del microscopio.

### Análisis PCR en tiempo real

El RNA total se aisló de las células mediante un sistema High Pure RNA Isolation Kit (Roche®, Switzerland) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total se cuantificó con un espectrofotómetro (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific®, USA). La amplificación en tiempo real con detección SYBR® Green (Life Technologies™, USA) se llevó a cabo en un sistema 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems®, USA) a 95 °C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, la temperatura específica de annealing de cada primer set. Después, para el colágeno tipo I (COL1) y Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) se mantuvo a 55 °C, y para el colágeno tipo II (COL2) a 58 °C, ambos durante 1 minuto, y finalmente se llevó a cabo una etapa de extensión final a 72 °C durante 1 minuto. Se incluyeron controles apropiados fuera de patrón en cada reacción PCR de la placa de 96 pocillos, y se llevaron a cabo análisis de disociación al final de cada serie para confirmar la especificidad de cada reacción. Se utilizaron 3 réplicas de cada material. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado, y los valores de las cantidades relativas de los diferentes mRNAs se calcularon utilizando el método Pfaffl [Pfaffl2001]. Para calibrar el sistema se utilizaron hMSC's proliferadas en el mismo *scaffold*. Genes de GAPDH se utilizaron como control interno.



## Capítulo 3

---

### **Resultados y discusión**



## 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos en esta investigación. En primer lugar se presenta el análisis sobre los procesos de fabricación utilizados para obtener los *scaffolds*. En esta parte se analiza también su morfología. En segundo lugar se realiza el análisis de las propiedades de *composites* obtenidos, desde el punto de vista del material. Para ello, primeramente se realiza un completo estudio de la cristalización y fusión de los materiales compuestos obtenidos. Posteriormente se exponen sus propiedades físicas, térmicas y mecánicas. Finalmente se realiza un análisis de la estructura molecular de los materiales compuestos y se analiza su viscosidad. En tercer lugar se caracterizan los *scaffolds* fabricados. Para ello, primeramente se analiza el tiempo de biodegradación del material en líquido fisiológico, y posteriormente se evalúan las propiedades biológicas de los *scaffolds* tras haber realizado el cultivo celular.

### 3.1 *Procesado*

A continuación se analizan los procesos de fabricación utilizados en la presente tesis. Por un lado se describen los propios procesos de fabricación (disolución-evaporación y *electrospinning*), mostrando los resultados obtenidos. En este apartado el análisis de los resultados se realiza por medio de una caracterización morfológica mediante microscopía. Por otro lado, y para el proceso de *electrospinning*, se muestra la influencia de las diferentes variables de proceso sobre el propio proceso de fabricación, y se realiza la configuración del conjunto.

#### 3.1.1 **Procesado mediante disolución-evaporación**

El método de disolución-evaporación es un proceso de fabricación simple que no presenta grandes complicaciones ni en el propio proceso en sí (no necesita de una configuración de proceso previa) ni en la fabricación de los *scaffolds* de PLLA (grado médico). Tampoco ocurren grandes problemas al añadir nanomoléculas de peg-POSS. Las mayores complicaciones se dan respecto al proceso de evaporación, que dependiendo de la velocidad de éste, podrían darse deformaciones en los films o atrapamiento de burbujas, e incluso una ligera porosidad superficial. Esto podría resultar también en una mayor rugosidad que, dependiendo de la aplicación, podría ser beneficioso.

Con el fin de comprobar el efecto de los diferentes tipos de evaporación sobre el aspecto morfológico del film y posteriormente, sobre su biocompatibilidad (3.3.2.1), se llevaron a cabo ensayos sobre la fabricación de muestras con diferentes procesos de evaporación. Estos ensayos sobre tipos de evaporación consistieron básicamente en probar diferentes temperaturas y tiempos de evaporación, y en comprobar la morfología de los films obtenidos. Los diferentes ensayos realizados y films fabricados pueden observarse en la Tabla 7.

**Tabla 7** Diferentes films fabricados mediante el proceso de disolución-evaporación.

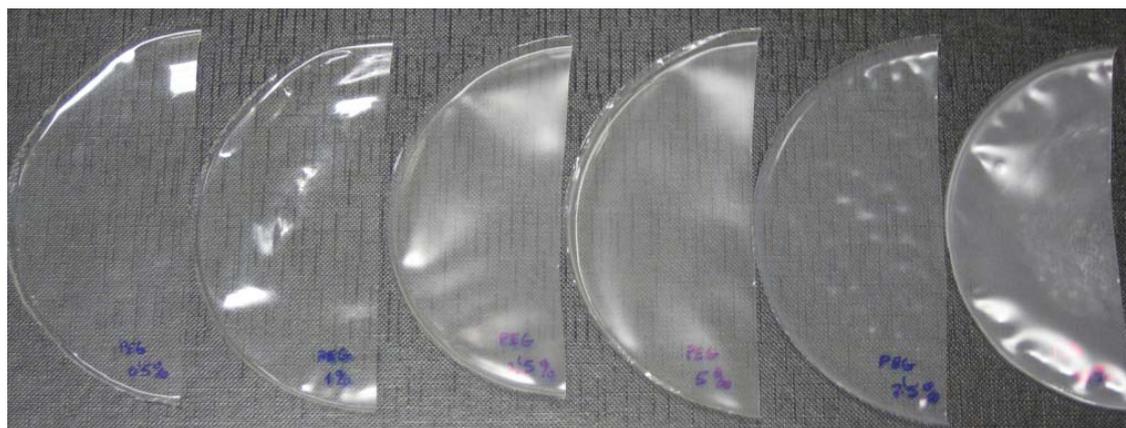
<b>Muestra</b>	<b>Refuerzo (%)</b>	<b>Proceso</b>
PLA0c	0	<i>Casting</i> /evaporación 24h. aire libre + 24h. horno a 30 °C
PLA0c2	0	<i>Casting</i> /evaporación 48h. aire libre
PLA0c3	0	<i>Casting</i> /evaporación 24h. horno a 20 °C
PLA0c4	0	<i>Casting</i> /evaporación 24h. horno a 40 °C
PLA0c5	0	<i>Casting</i> /evaporación 24h. horno a 50 °C
PLA0.5c	0.5	<i>Casting</i> /evaporación 24h. aire libre + 24h. horno a 30 °C
PLA1c	1	<i>Casting</i> /evaporación 24h. aire libre + 24h. horno a 30 °C
PLA2.5c	2.5	<i>Casting</i> /evaporación 24h. aire libre + 24h. horno a 30 °C
PLA5c	5	<i>Casting</i> /evaporación 24h. aire libre + 24h. horno a 30 °C
PLA7.5c	7.5	<i>Casting</i> /evaporación 24h. aire libre + 24h. horno a 30 °C
PLA10c	10	<i>Casting</i> /evaporación 24h. aire libre + 24h. horno a 30 °C

En el estudio sobre de tipos de evaporación, los films fabricados presentaron algunas diferencias. Una alta velocidad de evaporación ocasiona deformaciones, rugosidad y la aparición de burbujas internas en los films, como se puede observar en las Figura 74 centro y Figura 74 derecha, en las que se muestran dos films sometidos a procesos de evaporación a temperaturas de 40 °C y 50 °C respectivamente, durante 24h. Sin embargo, una velocidad baja (a temperatura ambiente) no ocasiona ningún tipo de deformación, y la rugosidad aparente tiende a ser baja, resultando ser films fundamentalmente lisos (Figura 74 izquierda). Además, conviene que el tiempo de evaporación sea el mínimo posible por motivos de productividad. Sin embargo, es importante que los films estén el tiempo suficiente evaporando, con el fin de evitar que queden restos de disolvente. Esto se aseguró comprobando que el peso de los films no cambiase en un porcentaje <0,01% durante un periodo de 24h., con la ayuda de una microbalanza. Finalmente el tipo de evaporación escogido fue uno que no afectó a la morfología de los films: 24 h. a temperatura ambiente y otras 24h. en un horno de convección forzada a 30 °C.



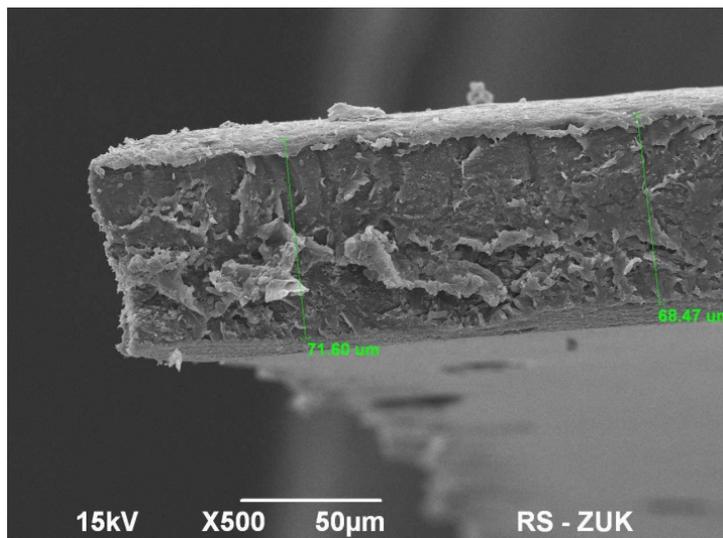
**Figura 74** Comparativa de varios films tras haber sido expuestos a diferentes tipos de evaporación. Izqda.: film liso con evaporación a temperatura ambiente. Centro: evaporación a 40 °C. Dcha.: evaporación a 50 °C.

Los diferentes films fabricados se pueden observar en la Figura 75. Se puede apreciar cómo cambia el color a medida que se añade peg-POSS. El film se vuelve opaco, incluso blanquecino a altos porcentajes (con el 5% en peso y superiores). Esto sería un indicador de que el PLLA (grado médico) ha llegado al límite de saturación y el peg-POSS ha precipitado. También se han fabricado films de peg-POSS/PLLA de grado comercial para realizar el estudio comparativo de calorimetría que se muestra en el apartado (3.2.1.5.).



**Figura 75** Diferentes films de peg-POSS/PLLA fabricados. El contenido en peg-POSS varía desde el 0,5 hasta el 10% en peso.

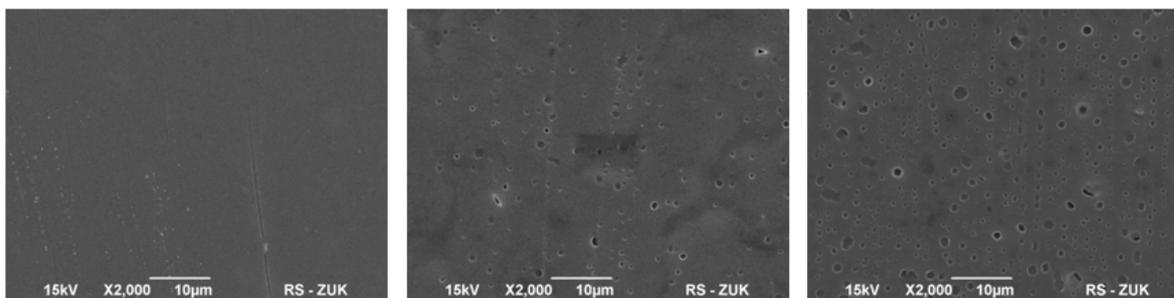
En cuanto a la morfología, los films fueron estudiados mediante SEM. Los films obtenidos mediante este método tuvieron un grosor de alrededor de 70  $\mu\text{m}$  y un diámetro de 100 mm. El grosor de 70  $\mu\text{m}$  es el correspondiente a este tipo de ensayos, según los parámetros generales del proceso: 1 gr de PLLA disuelto en 25 ml de cloroformo, y vertido en plato Petri de diámetro 100 mm. En la Figura 76 se puede observar el perfil de un film de PLLA. Se puede comprobar en la foto que en el film no existe porosidad interna, resultando un perfil compacto. Esto confirma que el método de evaporación escogido es adecuado y no induce burbujas ni porosidad interna.



**Figura 76** Fotografía SEM del espesor de un film de peg-POSS/PLLA.

Esta clase de *nanocomposites* fabricados mediante *casting* habitualmente presentan una rugosidad superficial que es debida al propio proceso de fabricación. Estos films no presentan porosidad interna, principalmente debido a su naturaleza compacta, que es también consecuencia del proceso de fabricación. En el caso de que se requiera porosidad interna habría que añadir partículas porógenas a los films [Mikos1994] o realizar alguna clase de espumado.

Durante la fabricación de los films de *nanocomposites* se observó el siguiente efecto. En la Figura 77 se puede observar la aparición de algunos poros o burbujas sobre la superficie y/o el interior de los films. Esto podría ser debido a la rápida evaporación del disolvente en este tipo de muestras, ya que el peg-POSS también es soluble y no debiera actuar como agente porógeno. Se puede observar cómo la porosidad de los films aumentó de manera directamente proporcional a la cantidad de peg-POSS. Se puede descartar que este efecto esté causado por los parámetros del proceso de disolución-evaporación, ya que fueron los mismos para todas las muestras. Sin embargo, el efecto de aumento en la porosidad pudo deberse a la menor viscosidad causada por una mayor cantidad de peg-POSS en la disolución. Este efecto también se ha podido observar en otros estudios como el de PET/POSS [Kim2008]. La menor viscosidad de la disolución podría alterar el movimiento de las burbujas en la disolución, consecuentemente afectando a su eliminación natural durante la evaporación del disolvente, resultando en films porosos.

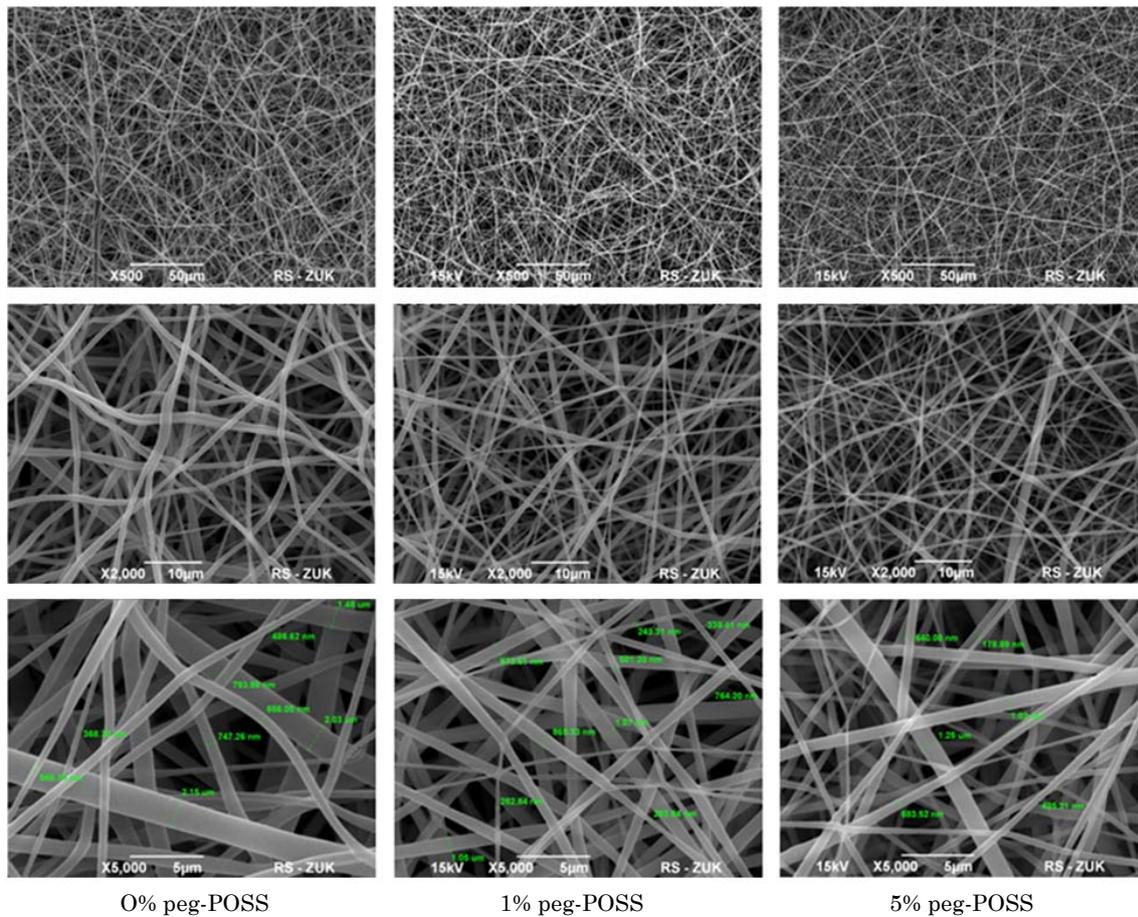


**Figura 77** Incremento de porosidad en las muestras, directamente proporcional a la cantidad de peg-POSS. Izqda.: 0% en peg-POSS. Centro: 1% en peg-POSS. Dcha.: 5% en peg-POSS.

### 3.1.2 Procesado mediante *electrospinning*

A continuación se muestran los resultados del estudio morfológico mediante SEM, tras haber procesado el material mediante *electrospinning*. En la Figura 78 se puede observar el diámetro de fibra de diversos materiales. El diámetro de fibra comprendió desde 300 nm hasta 2  $\mu\text{m}$  para el PLLA0, 250 nm hasta 1  $\mu\text{m}$  para el PLLA1 y 180 nm hasta 1  $\mu\text{m}$  para el PLLA5. Se observó una pequeña disminución en el diámetro de la fibra a medida que aumentó la concentración de peg-POSS. Esta disminución en el diámetro de la fibra tiene como consecuencia el incremento de la superficie específica del *scaffold*, lo que causa una mejora en el cultivo celular tal y como se ha definido en algunos estudios [Chen2009b].

La disminución en el diámetro de la fibra podría explicarse mediante la viscosidad de la disolución (*nanocomposite* disuelto en cloroformo), lo que ha sido identificado como la variable dominante que determina el diámetro de la fibra [Jun2003]. Como se ha visto anteriormente, la concentración de la disolución es uno de los parámetros más importantes que controlan el diámetro de la fibra y el proceso de *electrospinning* [Haroosh2011]. Por otro lado, la viscosidad de la disolución depende directamente de la concentración de polímero, por lo que se puede concluir que el diámetro de la fibra está dominado por la viscosidad de la disolución [Zamani2010]. Las soluciones viscosas presentan un mayor peso molecular y un mayor nivel de enmarañamiento macromolecular que las soluciones poco viscosas [Chen2010]. Un alto nivel de enmarañamiento macromolecular beneficia la formación de un chorro polimérico estable durante el proceso de *electrospinning*. Por lo tanto, al aumentar la concentración de la disolución se aumentaría también el nivel de enmarañamiento macromolecular y la viscosidad de la disolución, lo que daría lugar a un mayor diámetro de fibra y a la menor presencia de gotas de polímero producidas por efecto *electro-spray* [Qian2010]. En este caso, la viscosidad de la disolución disminuye a medida que se incrementa el contenido en peg-POSS. En la bibliografía se ha documentado que el diámetro de las fibras fabricadas mediante *electrospinning* disminuye al hacerlo también la viscosidad de la disolución [Xu2007], por lo tanto, se explicaría así la reducción del diámetro de fibra a medida que aumenta el contenido en peg-POSS.



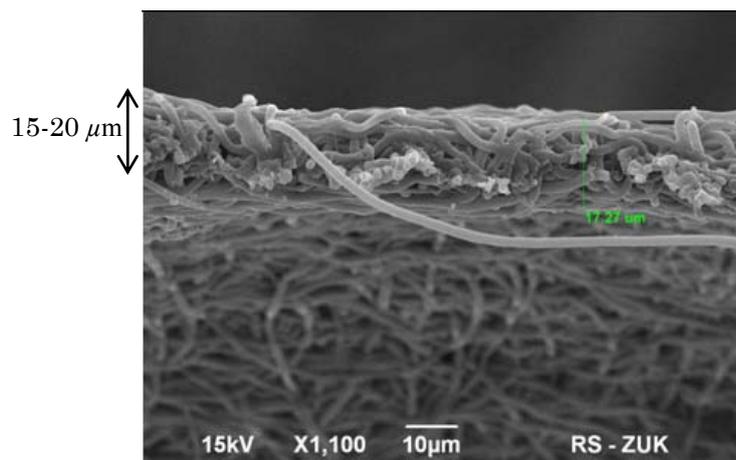
**Figura 78** Fotografías SEM comparando las muestras PLLA0, PLLA1 y PLLA5, con diferentes aumentos y medición del diámetro de la fibra.

En la Figura 78 también se puede observar que el *scaffold* es poroso debido a las cavidades internas entre las fibras, con tamaño de poro de alrededor de 1–10  $\mu\text{m}$ . En las fotografías no se observó ningún tipo de aglomeración de peg-POSS ya que el diámetro se mantuvo regular a lo largo de toda la fibra. Se puede concluir que el peg-POSS se dispersó correctamente.

Respecto a la cantidad de disolvente, la cantidad de PLLA fue prácticamente la misma para las tres muestras fabricadas (1 g, 0,99 g y 0,95 g para PLLA0, PLLA1 y PLLA5 respectivamente), por lo que las concentraciones de polímero cambiaron ligeramente y fueron 9,20, 9,10 y 8,74% en peso respectivamente. Se pudo observar también la influencia directamente proporcional entre concentración de polímero (refiriéndose solamente al PLLA) y diámetro de fibra previamente observada en otros artículos [Andrady2008,Yang2005]. El diámetro de fibra disminuye a medida que la concentración de polímero también lo hace, por lo que de esta manera se explicaría también la disminución del diámetro de fibra.

El máximo espesor de mat de fibra que se pudo fabricar mediante *electrospinning* fue finalmente de alrededor de 15-20  $\mu\text{m}$ , como se muestra en la Figura 79. Tras 1 hora de

*electrospinning* no fue posible continuar con un proceso estable. Probablemente se pudo deber a la repulsión entre el mat de fibras y el jet emergente, o lo que es lo mismo, a la falta de atracción entre la aguja y el colector. Este efecto, como se ha comentado anteriormente, causaría una gran distorsión en el diámetro de fibra, además de un jet intermitente. Por lo tanto, en el caso de querer fabricar mat gruesos de fibras, éstos no se podrían fabricar de una sola vez mediante *electrospinning* y deberían fabricarse de algún otro modo como uniendo varios mat delgados de fibras. Por otro lado, el espesor máximo de mat de fibra obtenido no se vio afectado por la adición de peg-POSS.



**Figura 79** Espesor de un *scaffold* de PLLA1 fabricado mediante *electrospinning*.

Respecto al proceso de fabricación, se podría decir que la adición de peg-POSS no causó ningún efecto perjudicial al proceso de *electrospinning*, ya que no se observó ningún cambio destacable en los parámetros de procesamiento del peg-POSS/PLLA respecto a los del PLLA puro.

### 3.2 Caracterización físico-mecánica del nanocomposite peg-POSS/PLLA

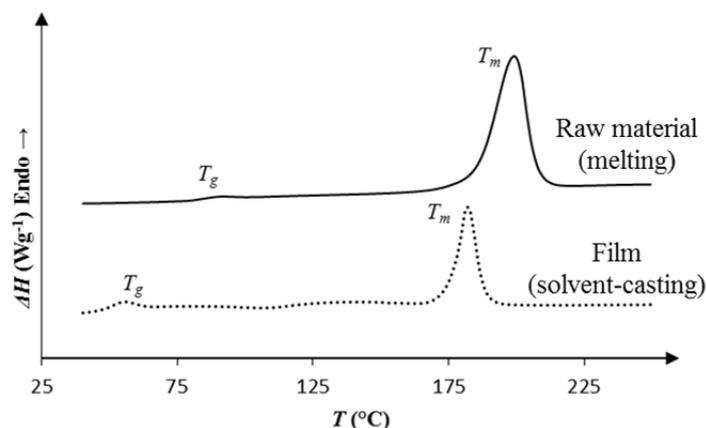
En los siguientes apartados se analizarán las propiedades de los materiales compuestos obtenidos, desde el punto de vista del material. Primeramente se realizará un completo estudio de la cristalización y fusión de los materiales compuestos obtenidos. Posteriormente se expondrán sus propiedades físicas, térmicas y mecánicas. También se realizará un análisis de la estructura molecular. Finalmente se analizará la viscosidad de los materiales compuestos.

### 3.2.1 Análisis de la fusión y cristalización de los *nanocomposites*

A continuación se muestran los resultados sobre la fusión y cristalización de los *nanocomposites*. Primeramente se presentan los resultados sobre la influencia del proceso de disolución- evaporación en la cristalización de las muestras. A continuación se muestran los resultados de la cristalización dinámica de las muestras. Posteriormente se muestran los resultados de la cristalización isotérmica de las muestras, y en otro capítulo se muestran los resultados de la fusión de estas muestras cristalizadas isotérmicamente. Finalmente, se realiza una comparativa del PLLA de grado médico y grado comercial, y de sus *nanocomposites*.

#### 3.2.1.1 Análisis de la fusión tras el proceso de disolución- evaporación

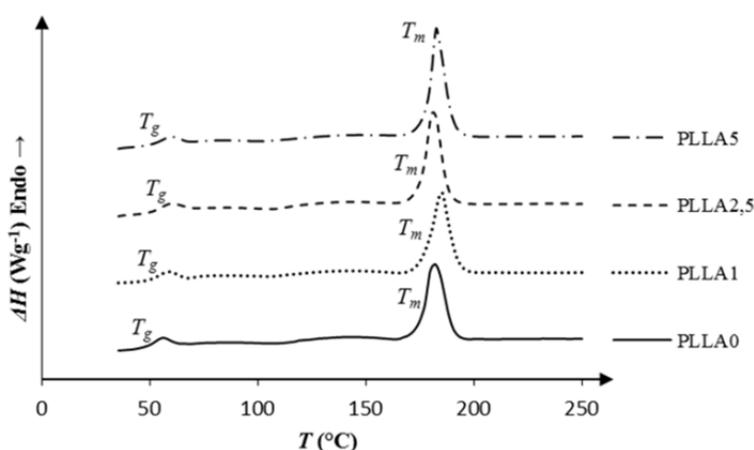
Los resultados del primer calentamiento de una muestra de PLLA0, en forma de film (disolución- evaporación) y en forma de material de granza (material de origen/ fundido), se muestran en la Figura 80. Respecto a la  $T_g$ , se puede observar que tiende a aparecer a menores temperaturas y de manera más intensa para las muestras en forma de film. Respecto al pico de fusión se pueden observar dos efectos: la  $T_m$  ocurre a mayores temperaturas para el material de granza, y la entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ) es también mayor. Los valores se pueden observar en la Tabla 8. Durante el calentamiento del material de granza no apareció ni pico exotérmico ( $T_{cc}$ ) ni entalpía de cristalización en frío ( $\Delta H_{cc}$ ), mientras que sí apareció un pequeño pico exotérmico en el calentamiento de la muestra en forma de film, indicando que el material no llegó a cristalizar totalmente durante la evaporación del disolvente (durante el proceso de fabricación del film). Se podría sugerir que la cristalinidad original del material de granza es mayor que la de las muestras de film.



**Figura 80** Primer calentamiento de una muestra de PLLA0 en forma de film y de material de granza. Las curvas han sido desplazadas en el eje vertical.

Se asume que la menor  $T_g$  del film se debe a una mayor movilidad molecular, ya que la densidad de enmarañamientos es menor cuando la cristalización ocurre desde la disolución [Narladkar2008,Hong2007]. La segunda evidencia es que la muestra en forma de film contiene una mayor fracción amorfa, lo que se justifica por una transición vítrea más intensa, por la presencia de una ligera cristalización en frío, y por una menor entalpía de fusión. La menor cristalinidad de la muestra de film se podría asociar a un menor sobreenfriamiento (por lo tanto menor fuerza motriz), ya que la  $T_m$  del film también es menor (16 °C menor que la  $T_m$  del material de granza).

Los resultados del primer calentamiento para diversos *nanocomposites* en forma de film (disolución- evaporación) se muestran en la Figura 81. Se puede observar que las curvas DSC resultan similares, especialmente en la forma de las curvas. La  $T_m$  aumenta ligeramente para la muestra PLLA1, pero disminuye para las muestras PLLA2.5 y PLLA5, ambas por debajo de la  $T_m$  de la muestra PLLA0. Con la  $\Delta H_m$  también ocurre un comportamiento parecido. Respecto a la  $T_g$ , aumenta ligeramente con el contenido de peg-POSS. En ninguna de las curvas mostradas en la Figura 81 se observó, durante el calentamiento, un fenómeno de cristalización en frío ( $T_{cc}$ ) destacable. Sólo se observó una ligera depresión alrededor de los 110 °C para todas las muestras indicando que el material no cristalizó completamente durante el proceso de disolución- evaporación. La ligera depresión podría ser debida a la velocidad de calentamiento relativamente alta de 40 °C/min, y aparecería de una manera más pronunciada a menores velocidades de calentamiento. Los valores se resumen en la Tabla 8.



**Figura 81** Primer calentamiento de diversas muestras de *nanocomposites* en forma de film. Las curvas han sido desplazadas en el eje vertical.

Al incrementar la  $T_g$ , se podría concluir que la presencia de peg-POSS reduce la movilidad macromolecular. Al analizar el efecto de las nanomoléculas de peg-POSS, la contribución del esqueleto de POSS y de las ramificaciones de PEG se debería considerar por

separado. La naturaleza sólida del POSS podría obstaculizar la movilidad de las macromoléculas de PLLA circundantes. Sin embargo, se ha demostrado que el PEG es un excelente plastificante [Saeidlou2012]. Consecuentemente, el efecto de las nanomoléculas de peg-POSS sería un balance entre la naturaleza plastificante del PEG y el efecto obstaculizador del POSS. En el caso que se describe en el presente trabajo, y basado en el incremento de  $T_g$  con el contenido de peg-POSS, se podría postular que el efecto global de la presencia del peg-POSS es la reducción de la movilidad macromolecular. A pesar de que algunos trabajos se refieren a mayores incrementos en los valores de  $T_g$  tras la adición de refuerzos [Papageorgiou2010], los resultados de ligero aumento de la  $T_g$  obtenidos en este trabajo podrían ser atribuidos al efecto atenuante del grupo funcional del peg-POSS (el PEG), el cual actuaría como plastificante.

El segundo efecto importante de las nanomoléculas de peg-POSS está relacionado con su habilidad para actuar como agentes nucleantes. El incremento, tanto de la  $T_m$  como de la  $\Delta H_m$ , de la muestra PLLA1 con respecto a la PLLA0 indica que este efecto nucleante existe. Sin embargo, para mayores contenidos de peg-POSS (PLLA2.5 y PLLA5), el efecto nucleante se anula o compensa por la menor movilidad macromolecular, y como consecuencia la  $T_m$  y la  $\Delta H_m$  disminuyen.

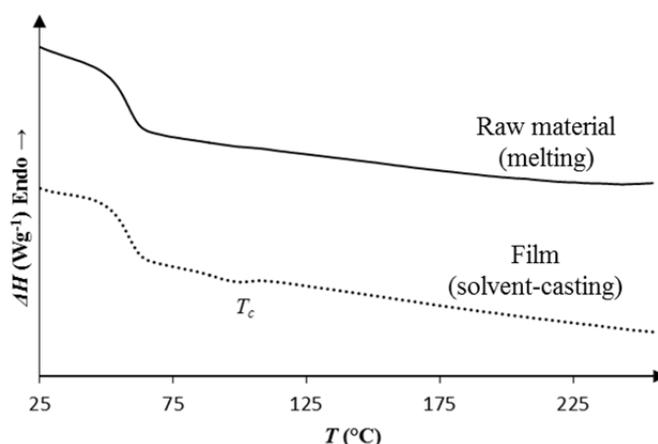
**Tabla 8** Datos del primer calentamiento de diversas muestras en forma de granza y film.

Primer calentamiento DSC	Muestra	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (Wg <sup>-1</sup> )
Granza	PLLA0	79,7	199,2	81,8
	PLLA0	48,4	183,1	35,9
Film (disolución-evaporación)	PLLA1	51,0	185,4	37,7
	PLLA2.5	51,2	182,2	36,4
	PLLA5	52,4	181,6	34,3

### 3.2.1.2 Análisis de la cristalización dinámica desde el fundido

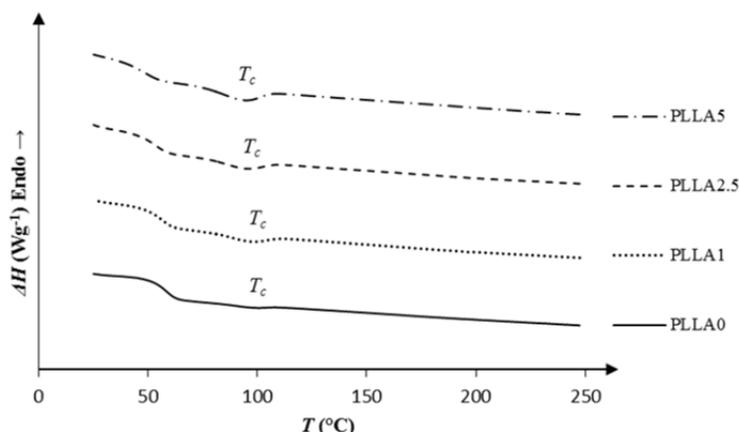
El análisis dinámico de las muestras podría ayudar a comprobar si algún tipo de cristalización no-isotérmica pudiera ocurrir durante el enfriamiento. Este análisis podría ser considerado como una aproximación en la simulación de las condiciones de enfriamiento de un proceso de fabricación real. Consecuentemente, se analizaría si hay tiempo suficiente para que ocurra la cristalización a unas condiciones de enfriamiento específicas, y se mediría la cristalinidad obtenida. En la Figura 82, se puede observar el enfriamiento dinámico a una velocidad de 15 °C/min de muestras de PLLA0 en forma de film y de granza. El material de granza no presenta pico de cristalización, lo que sugiere que no ocurre ningún tipo de cristalización durante el enfriamiento a esa velocidad, aunque podría ocurrir cristalización a

menores velocidades de enfriamiento. Sin embargo, la muestra en forma de film presenta una  $T_c$  alrededor de 100 °C, sugiriendo que la muestra es capaz de cristalizar a esa velocidad de enfriamiento. Esto podría ser debido a un menor enmarañamiento (y al incremento resultante de la movilidad macromolecular) de las muestras fabricadas mediante disolución-evaporación, y la consecuente facilidad para cristalizar [Narladkar2008,Hong2007].



**Figura 82** Cristalización dinámica (enfriamiento) de una muestra de PLLA0 en forma de film y de material granza. Las curvas han sido desplazadas en el eje vertical.

Por otro lado, al analizar la cristalización dinámica de los films de PLLA se puede observar que su comportamiento cambió al añadir peg-POSS. Las curvas se muestran en la Figura 83. La  $T_c$  aumenta ligeramente para la muestra PLLA1, y disminuye para las muestras PLLA2.5 y PLLA5, mostrando que la cristalización a bajos contenidos de peg-POSS comienza antes que a altos contenidos. Este efecto se explicó anteriormente por medio del balance entre el efecto nucleante a bajos contenidos de peg-POSS, y por medio del aumento de este efecto nucleante a mayores contenidos de peg-POSS, que a su vez obstaculizaría la movilidad macromolecular. Sin embargo, la  $\Delta H_c$  aumenta con el contenido de peg-POSS. El aumento en la capacidad de cristalización de las muestras vendría explicado por el efecto global del peg-POSS, que incorporaría tanto el efecto nucleante como el de la movilidad macromolecular. En la bibliografía existen estudios que también informan acerca del efecto nucleante en los *nanocomposites* PLLA/POSS. En estos trabajos el efecto nucleante también aumentó con el contenido de POSS, siendo mayor que el del PLLA puro [Pan2010]. Los valores se resumen en la Tabla 9.



**Figura 83** Cristalización dinámica (enfriamiento) de diversas muestras de *nanocomposites* en forma de film. Las curvas han sido desplazadas en el eje vertical.

Para todos los *nanocomposites*, la cristalización no comienza hasta que la temperatura se enfría alrededor de los 110 °C, como se muestra en la Figura 83. Los datos de la temperatura de comienzo de cristalización se pueden observar en el apartado *Onset* de la Tabla 9. Se puede deducir que la cristalización puramente isotérmica, en ausencia de una cristalización dinámica prematura, debería llevarse a cabo a valores de  $T_{ci}$  mayores que esos (siempre bajo las condiciones de enfriamiento previamente determinadas).

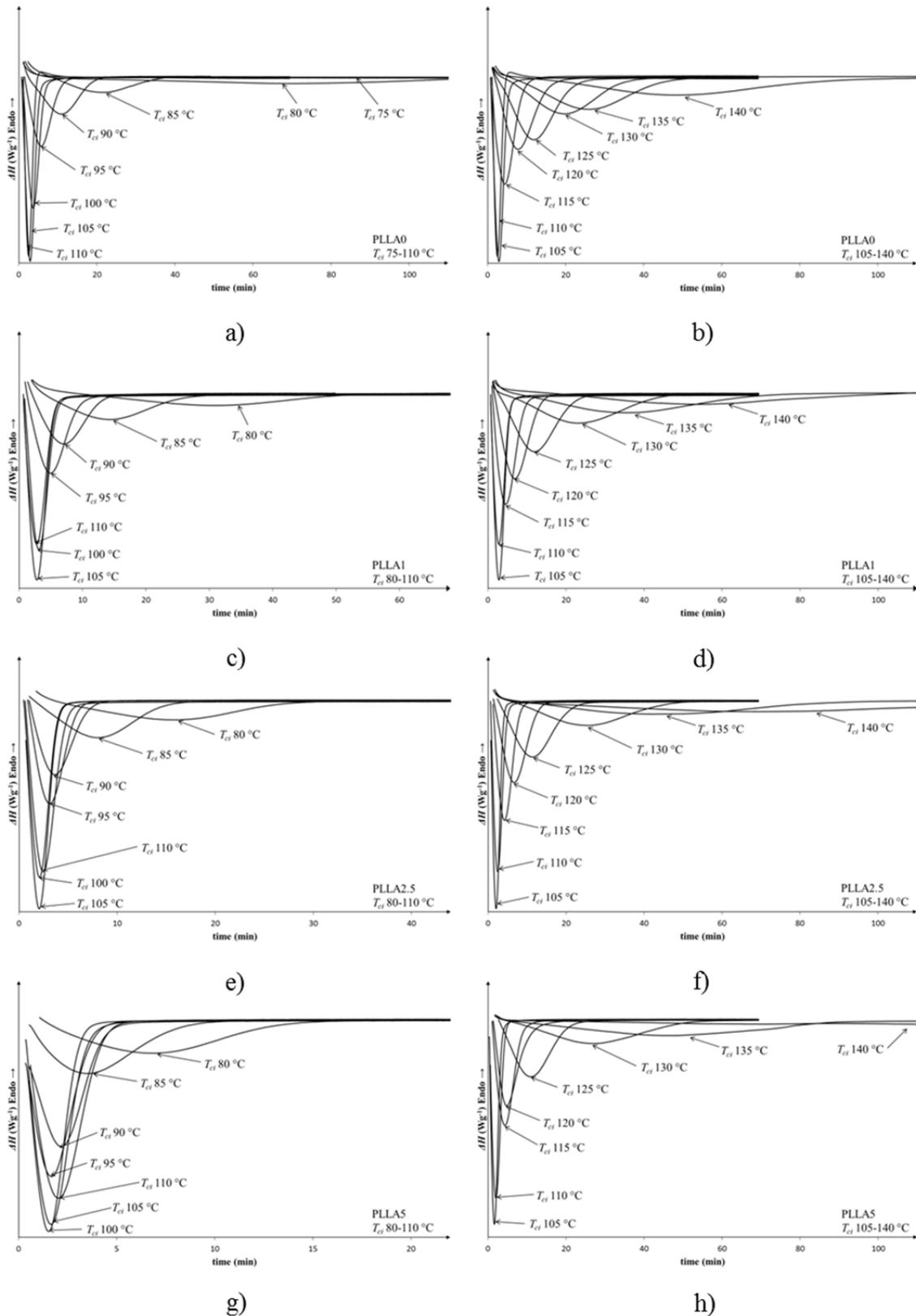
**Tabla 9** Datos del enfriamiento dinámico de diversas muestras en forma de material de granza y film.

Enfriamiento dinámico DSC	Muestra	<i>Onset</i> (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (Wg <sup>-1</sup> )
Granza	PLLA0	-	-	-
Film (disolución-evaporación)	PLLA0	107.3	97.2	-0.1
	PLLA1	109.2	98.5	-1.2
	PLLA2.5	107.7	95.5	-2.1
	PLLA5	105.5	92.9	-3.0

### 3.2.1.3 Análisis de la cristalización isotérmica desde el fundido

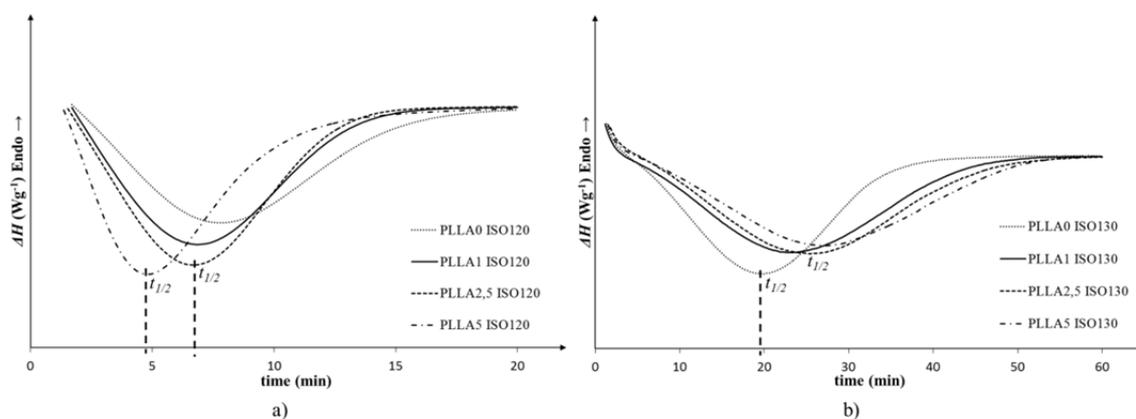
Mediante una cristalización isotérmica se puede obtener la máxima capacidad de cristalización del material a cada  $T_{ci}$ . Esto requeriría el tiempo de cristalización suficiente, a cada  $T_{ci}$ , para asegurar que la cristalización se llevase a cabo de manera completa. La cristalización isotérmica es también un proceso que se utiliza para obtener un tamaño regular de cristal a cada  $T_{ci}$  [Hoffman1962]. Esto es debido a que la temperatura de fusión de un polímero, la cual depende directamente del espesor lamelar, se espera que aumente con la temperatura a la que fue cristalizado [Saeidlou2012,Chen2013]. Consecuentemente, el espesor laminar dependería también de la  $T_{ci}$  aplicada.

En la Figura 84 se muestran las curvas de cristalización isotérmica de los *nanocomposites* a varias  $T_{ci}$  (75-140 °C). La curva de cada *nanocomposite* ha sido a su vez dividida en dos partes (75-110 °C y 105-140 °C), con el propósito de poder comparar mejor los resultados. Cabe destacar que las curvas con  $T_{ci}$  145-150 °C no se incluyen dentro de la imagen debido a la distorsión que causan sus mayores tiempos de cristalización, que adoptan la forma de perfiles de curva asintóticos. En la Figura 84a y la Figura 84b se puede observar para el PLLA0, que en el rango de  $T_{ci}$  90-125 °C la cristalización resulta de manera muy intensa y finaliza en un corto periodo de tiempo, mientras que en el rango de  $T_{ci}$  75-85 °C y  $T_{ci}$  130-150 °C la cristalización es más lenta y suavizada, incluso mostrando la tendencia asintótica previamente comentada. Las curvas de cristalización isotérmica con forma asintótica necesitan un mayor tiempo para completar la cristalización, siendo difícil su control y medición. Las muestras PLLA1 (Figura 84c y Figura 84d), PLLA2.5 (Figura 84e y Figura 84f) y PLLA5 (Figura 84g y Figura 84h) presentan un comportamiento similar que el de la muestra PLLA0. En la Figura 84f y la Figura 84h se puede observar que las curvas de cristalización de las muestras PLLA2.5 y PLLA5 respectivamente toman la forma de perfiles asintóticos, ya que necesitan más tiempo para ser completada la cristalización. Sin embargo, para las muestras PLLA0 (Figura 84b) y PLLA1 (Figura 84d), las curvas de cristalización a esa misma  $T_{ci}$  (140 °C) presentan un final bien definido, sugiriendo que la adición de nanomoléculas de peg-POSS ralentiza la cristalización del PLLA a altos valores de  $T_{ci}$ .



**Figura 84** Cristalización isotérmica a diferentes  $T_{ci}$  de diversas muestras en forma de film: a) PLLA0 y  $T_{ci}$ : 75-110 °C; b) PLLA0 y  $T_{ci}$ : 105-140 °C; c) PLLA1 y  $T_{ci}$ : 80-110 °C; d) PLLA1 y  $T_{ci}$ : 105-140 °C; e) PLLA2.5 y  $T_{ci}$ : 80-110 °C; f) PLLA2.5 y  $T_{ci}$ : 105-140 °C; g) PLLA5 y  $T_{ci}$ : 80-110 °C; h) PLLA5 y  $T_{ci}$ : 105-140 °C. (Los valores de  $T_{ci}$ : 105 y 110 °C se incluyen en ambos rangos de  $T_{ci}$  para una mejor comparativa).

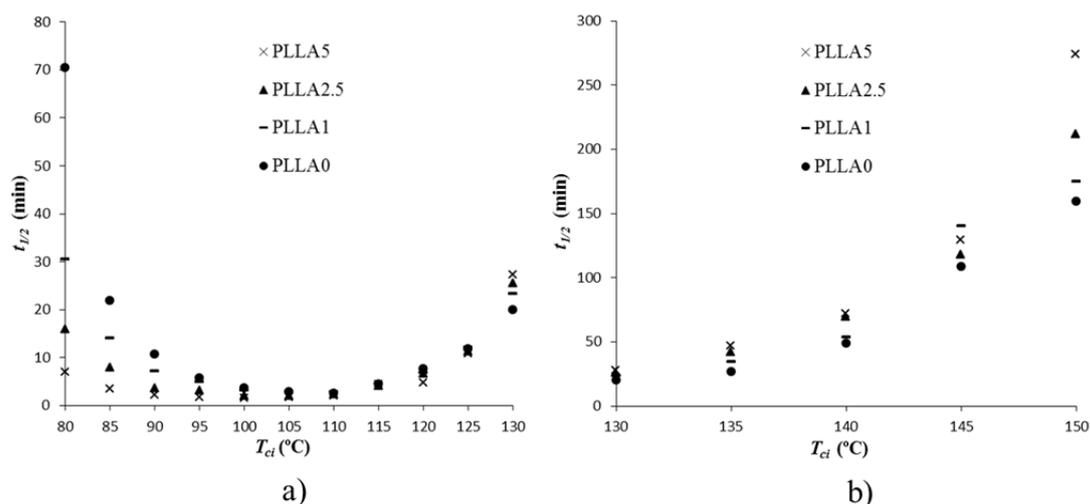
Sin embargo, alrededor del valor de  $T_{ci}$  125 °C ocurre un cambio en el comportamiento a cristalización de los diferentes *nanocomposites*. Consecuentemente, las curvas de cristalización para las  $T_{ci}$  120 y 130 °C se muestran en detalle en la Figura 85a y la Figura 85b respectivamente. En la Figura 85a se puede observar cómo la muestra PLLA5 cristaliza antes (el pico se desplaza hacia la izquierda en el eje *tiempo*) que los otros *nanocomposites*, siendo la muestra PLLA0 la que necesita el mayor tiempo para cristalizar. Sin embargo, en la Figura 85b se puede observar justamente lo contrario, ya que la muestra PLLA0 cristaliza antes que la PLLA5. El cambio de comportamiento en la cristalización se mantiene para los valores de  $T_{ci}$  por encima y por debajo de  $T_{ci}$  125 °C. Este comportamiento se puede observar también en la Figura 86, la cual expresa la evolución de los valores de  $t_{1/2}$ .



**Figura 85** Cristalización isotérmica de los *nanocomposites* a diferentes  $T_{ci}$ : a) 120; b) 130 °C.

Por lo tanto, las muestras cristalizadas a  $T_{ci}$  80-125 °C (Figura 86a) presentan la siguiente secuencia respecto a duración de la cristalización: PLLA5, PLLA2.5, PLLA1 y PLLA0, siendo la muestra PLLA5 la que cristalizó en menor tiempo; y las muestras cristalizadas a  $T_{ci}$  130-150 °C (Figura 86b) presentan la secuencia contraria respecto a duración de la cristalización: PLLA0, PLLA1, PLLA2.5 y PLLA5. En la Figura 86a se muestra el valor de  $t_{1/2}$  respecto a cada  $T_{ci}$  para todos los materiales. En esa figura se pueden apreciar también los valores mínimos de  $t_{1/2}$  y la  $T_{ci}$  a la que ocurrieron para cada material, y se detallan a continuación: 2,5 min y 110 °C para la muestra PLLA0; 2,77 min y 105 °C para la PLLA1; 2,05 min y 105 °C para la PLLA2.5; y 1,53 min y 100 °C para la PLLA5. Consecuentemente, se puede deducir que la cristalización más rápida ocurrió en el rango de  $T_{ci}$  100-110 °C para todos los materiales, similar a los valores de  $T_{ci}$  presentados por Kolstad [Kolstad1996].

Como conclusión, parece que el peg-POSS acelera la cristalización de las muestras cristalizadas a bajas  $T_{ci}$ , mientras que retrasa la cristalización de las muestras cristalizadas a altas  $T_{ci}$ . Por otro lado, el valor mínimo de  $t_{1/2}$  ocurre a menores valores de  $T_{ci}$  y al añadir peg-POSS.



**Figura 86** Evolución de los valores de  $t_{1/2}$  de diversos *nanocomposites* a diferentes  $T_{ci}$ . a)  $T_{ci}$ : 80-130 °C; y b)  $T_{ci}$ : 130-150 °C. (El valor de  $T_{ci}$ : 130 °C se incluye en ambas imágenes para una mejor comparativa).

El cambio en el comportamiento de cristalización alrededor de  $T_{ci}$  125 °C podría deberse a la formación de diferentes clases de estructuras cristalinas durante la cristalización isotérmica, y al predominio de una u otra dependiendo de la  $T_{ci}$  seleccionada [Yasuniwa2006, Yasuniwa2007, Yasuniwa2008]. Esto será comprobado después durante la fusión de las muestras cristalizadas isotérmicamente (sección 3.2.1.4). Podría deberse también al efecto global del peg-POSS sobre el mecanismo de cristalización: nucleación o crecimiento cristalino [Saeidlou2012].

A valores de  $T_{ci} < 130$  °C la nucleación sería el mecanismo predominante. Mediante este mecanismo se generaría un mayor número de cristales debido a la mayor fuerza motriz para la nucleación, resultando así en una gran densidad de cristales y en un menor tamaño de éstos como consecuencia de la baja movilidad macromolecular. Al añadir peg-POSS, se generaría un mayor número de núcleos heterogéneos, y la movilidad sería aún más baja como consecuencia de los numerosos enmarañamientos moleculares causados por los nuevos cristales. Sin embargo, la contribución del fenómeno de nucleación heterogénea sería mayor que la de la pérdida de movilidad macromolecular. Por lo tanto, a pesar de que se obstaculizaría aún más el crecimiento cristalino, la nucleación de cristales se vería aumentada y la cristalización acelerada al añadir peg-POSS [Nofar2013].

Por otro lado, a valores de  $T_{ci} \geq 130$  °C la fuerza motriz para la nucleación sería menor, resultando en la generación de menos cristales. Este efecto, combinado junto al aumento de movilidad macromolecular a altas  $T_{ci}$ , proporcionaría un mayor tiempo a las cadenas poliméricas para ordenarse, consecuentemente resultando en un mayor tamaño de cristal. Al añadir peg-POSS, la contribución del efecto nucleante heterogéneo de estas nanomoléculas a valores de  $T_{ci} \geq 130$  °C no sería tan pronunciada como su efecto obstaculizador.

Consecuentemente, aparte del ligero aumento que se produce en la nucleación, la movilidad macromolecular se reduciría en mayor medida que este aumento del ratio de nucleación. Por lo tanto, la cristalización se ralentizaría al añadir peg-POSS a valores de  $T_{ci} \geq 130$  °C. Los cristales resultantes serían de menor tamaño y menos perfectos que los de la muestra PLLA0.

Este efecto concordaría con la teoría de Hoffman-Lauritzen sobre cinéticas de crecimiento cristalino [Hoffman1976]. Esta teoría, que se refiere a la nucleación secundaria que ocurre en lamelas preformadas, define tres regímenes de cristalización basados en el ratio entre la tasa de nucleación superficial y la tasa de deposición cristalina [Saeidlou2012]. Estos regímenes son: Régimen I, para sobreenfriamientos bajos: la nucleación superficial es lenta, mientras que la movilidad molecular es alta, por lo que la nucleación es el factor limitante. Régimen II: la nucleación superficial aumenta mientras que la movilidad molecular se reduce; la combinación de ambos efectos resulta en mayores tasas de crecimiento cristalino. Régimen III, para sobreenfriamientos altos: la nucleación superficial es máxima y la movilidad molecular es el factor limitante; la tasa de crecimiento cristalino es menor en comparación al régimen II [Saeidlou2012].

Concluyendo, el comportamiento de las muestras cristalizadas a  $T_{ci}$  80-125 °C se podría explicar por la mejora del efecto nucleante del peg-POSS que aceleraría la cristalización, como se muestra en la Figura 86a en la que el PLLA5 fue la muestra que cristalizó en menor tiempo. Sin embargo, a  $T_{ci}$  130-150 °C (Figura 86b) se puede observar cómo, al contrario que en el anterior caso, el PLLA0 es la muestra que cristaliza en menor tiempo. En este caso, el mecanismo predominante sería la disposición (u organización) de las cadenas poliméricas y el crecimiento cristalino, por lo que el incremento en el contenido de peg-POSS afectaría a su movimiento, obstaculizando y retardando la cristalización. En la bibliografía se informa de un efecto similar en *nanocomposites* de PLLA/nanoarcillas, en los que el aumento en el contenido de nanoarcillas retrasó las cinéticas de cristalización [Wu2007]. El valor mínimo de  $t_{1/2}$  que ocurre a  $T_{ci}$  100-110 °C se relaciona con el punto de equilibrio en la competición anteriormente comentada entre movilidad macromolecular y tasa de nucleación, en función de los valores de  $T_{ci}$  [Saeidlou2012].

#### 3.2.1.4 Análisis de la fusión de las muestras cristalizadas isotérmicamente

La estructura cristalina generada durante la cristalización isotérmica se ha analizado mediante un segundo barrido de fusión. En la Figura 87 se muestran las curvas correspondientes a los barridos de fusión de los *nanocomposites* cristalizados a todos los valores de  $T_{ci}$ . En la Figura 87a se muestra la evolución de las curvas de fusión de la muestra

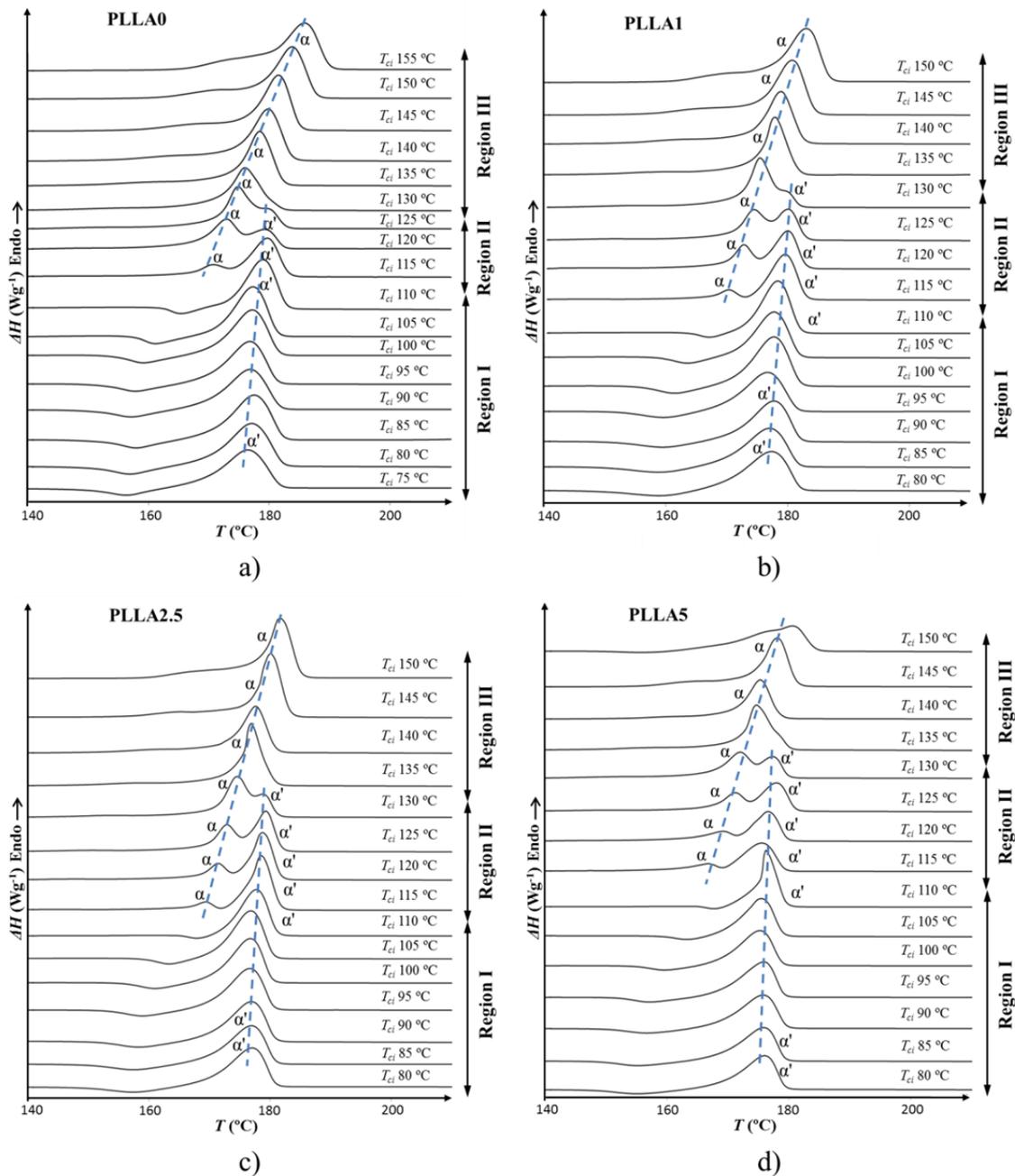
de PLLA0 tras cristalizar isotérmicamente a  $T_{ci}$  75-155 °C. A primera vista, se puede observar cómo el pico se desplaza hacia la derecha al incrementar los valores de  $T_{ci}$ , lo que significa que la  $T_m$  aumenta con la  $T_{ci}$ . Es de sobra conocido que el aumento de  $T_m$  está relacionado con un mayor espesor lamelar, lo que a su vez es directamente dependiente de la  $T_{ci}$  aplicada. Este comportamiento ha sido ampliamente documentado en la bibliografía [Yasuniwa2007,Chen2013,Hoffman1976,Hoffman1962,Tsuji1995,Kalb1980]. Para valores de  $T_{ci}$  entre 75 y 110 °C apareció un único pico  $T_m$ , precedido de cerca por un pico exotérmico, sugiriendo algún tipo de reordenamiento cristalino previo a la fusión. Para valores de  $T_{ci}$  entre 115 y 125 °C apareció otro pico  $T_m$  a menor temperatura, consistiendo en un fenómeno de doble pico. Para valores de  $T_{ci}$  superiores a 130 °C, el pico correspondiente a los valores más bajos de  $T_{ci}$  desaparece, permaneciendo solamente el pico previamente presentado que aparecía a  $T_{ci}$  115-125 °C.

La presencia de un doble pico de fusión sugiere la existencia de dos tipos diferentes de cristales [Yasuniwa2006,Yasuniwa2007], formados durante la cristalización isotérmica. Primeramente, se propuso que las dos estructuras cristalinas formadas a bajas y a altas  $T_{ci}$  correspondían a  $\beta$  (trigonal) y  $\alpha$  (ortorrómbica) [Yasuniwa2006,Yasuniwa2007], respectivamente. Más tarde, algunos autores sugirieron la existencia de una fase desordenada de la estructura  $\alpha$ , llamada  $\alpha'$  (pseudo- ortorrómbica), en lugar de la estructura  $\beta$  [Yasuniwa2008,Zhang2006b,Zhang2005b]. La estructura predominante generada a altos valores de  $T_{ci}$  sería la estructura  $\alpha$ , la cual ocurre en las condiciones del fundido convencional y de la cristalización por disolución [Saeidlou2012], mientras que la estructura  $\alpha'$  se generaría a valores bajos de  $T_{ci}$  [Yasuniwa2008]. La conformación de cadena y sistema cristalino de la estructura  $\alpha'$  sería similar a la de la estructura  $\alpha$ , pero con un empaquetado de cadena menos ordenado y más relajado [Saeidlou2012]. Como consecuencia, la estructura  $\alpha'$  presenta propiedades menores en comparación a la estructura  $\alpha$ , que incluyen desde un menor módulo de Young ( $E$ ) y propiedades barrera más bajas, hasta un mayor alargamiento a rotura [Saeidlou2012].

En la Figura 87 se puede observar también que aparece un pico exotérmico cuando la  $T_{ci}$  es menor de 110 °C, sugiriendo la presencia de algún tipo de cristalización en frío. Ya que la cristalización en frío común ocurría a temperaturas de fusión alrededor de los 100 °C, como se pudo observar previamente durante el primer barrido de calentamiento, este nuevo fenómeno de pico exotérmico podría haber sido causado por la fusión de los cristales generados durante la cristalización isotérmica a bajos valores de  $T_{ci}$ . Esto podría explicarse de la siguiente manera: justo antes de alcanzar la temperatura de fusión, estos cristales desordenados  $\alpha'$  se transformarían en la fase ordenada  $\alpha$  debido al incremento en la movilidad macromolecular a altas temperaturas [Saeidlou2012,Yasuniwa2007]. Los cristales  $\alpha'$ , que se funden a temperatura relativamente baja, se transformarían en cristales  $\alpha$ , se

reorganizarían y cristalizarían formando estructuras más gruesas. Finalmente, estos últimos cristales fundirían a temperaturas relativamente mayores que las de los cristales comunes, dando lugar al característico pico de fusión  $\alpha'$  [Chen2013]. Para valores de  $T_{ci}$  entre 115 y 125 °C, este efecto se acompañaría de la fusión de los cristales  $\alpha$  ordinarios, dando lugar al fenómeno de doble pico de fusión. Por lo tanto, para la muestra PLLA0 se podría concluir la existencia de 3 regiones de cristalización diferentes, dependiendo de la  $T_{ci}$  aplicada: región I ( $T_{ci} \leq 110$  °C), región II ( $115$  °C  $\leq T_{ci} \leq 125$  °C) y región III ( $T_{ci} \geq 130$  °C). En la bibliografía se han documentado similares regiones, con ligeras diferencias en los límites de los valores de  $T_{ci}$ , por Yasuniwa et al. para el PLLA puro [Yasuniwa2007]. Las estructuras cristalinas correspondientes a esas regiones serían:  $\alpha'$  (región I),  $\alpha'$  y  $\alpha$  (región II) y  $\alpha$  (región III) [Yasuniwa2006, Yasuniwa2007, Yasuniwa2008].

En la Figura 87(b, c, y d), se puede observar la evolución de las curvas de fusión tras cada cristalización isotérmica a valores de  $T_{ci}$  (80-150 °C), para las muestras PLLA1, PLLA2.5 y PLLA5 respectivamente. Primeramente cabe destacar que, a juzgar por la similitud en la forma de las curvas, la adición de peg-POSS parece que no modifica el tipo de estructura cristalina. Pan et al observaron también un comportamiento similar [Pan2010]. Para esas muestras, el pico también se desplaza hacia la derecha a medida que se aumentan los valores de  $T_{ci}$ , al igual que ocurría en el caso de la muestra de PLLA0. Para las muestras PLLA1, PLLA2.5 y PLLA5, las diferentes regiones incluirían los siguientes límites de  $T_{ci}$ : región I:  $T_{ci} \leq 110$  °C, región II:  $115$  °C  $\leq T_{ci} \leq 130$  °C, y región III:  $T_{ci} \geq 135$  °C. Estas tres muestras presentan límites de región muy similares, aunque difieren ligeramente. Se puede observar cómo el pico correspondiente a la estructura cristalina desordenada  $\alpha'$  aparece a mayores valores de  $T_{ci}$  a medida que aumenta el contenido en peg-POSS, confirmando que la adición de peg-POSS obstaculiza la movilidad macromolecular, incluso a altos valores de  $T_{ci}$  (como se ha visto en la sección 3.2.1.3).

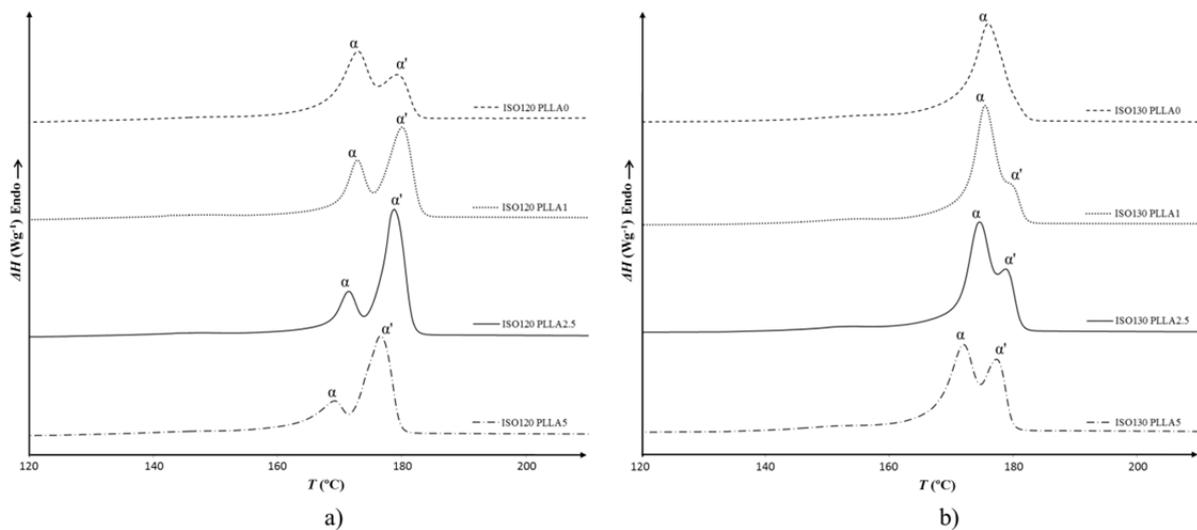


**Figura 87** Fusión de varias muestras de *nanocomposites* tras la cristalización isotérmica a diferentes  $T_{ci}$ : a) PLLA0, b) PLLA1, c) PLLA2.5 y d) PLLA5. Las curvas han sido desplazadas en el eje vertical.

Con el objetivo de observar en detalle este comportamiento, sería necesaria una comparativa de todos los materiales cristalizados a la misma  $T_{ci}$ . En la Figura 88 se muestra una evaluación de las curvas de todas las muestras, cristalizadas a  $T_{ci}$  120 y 130  $^{\circ}\text{C}$ . Estos valores de  $T_{ci}$  coinciden con los valores seleccionados para la cristalización isotérmica de la Figura 85. En la Figura 88a se puede observar cómo, para la  $T_{ci}$  120  $^{\circ}\text{C}$ , el pico  $\alpha'$  tiene la tendencia a aumentar con el contenido en peg-POSS, mientras que el pico de la estructura  $\alpha$  disminuye ligeramente. En la Figura 88b se puede observar el mismo comportamiento para la  $T_{ci}$  130  $^{\circ}\text{C}$ , pero en este caso la muestra de PLLA0 presentaría solamente un pico  $\alpha$  único

en lugar del doble pico que aparece en la Figura 88a. Esto confirmaría el efecto presentado previamente: el pico  $\alpha'$  aparece a mayores valores de  $T_{ci}$  a medida que aumenta el contenido en peg-POSS, por lo que consecuentemente, la adición de peg-POSS obstaculizaría la movilidad macromolecular.

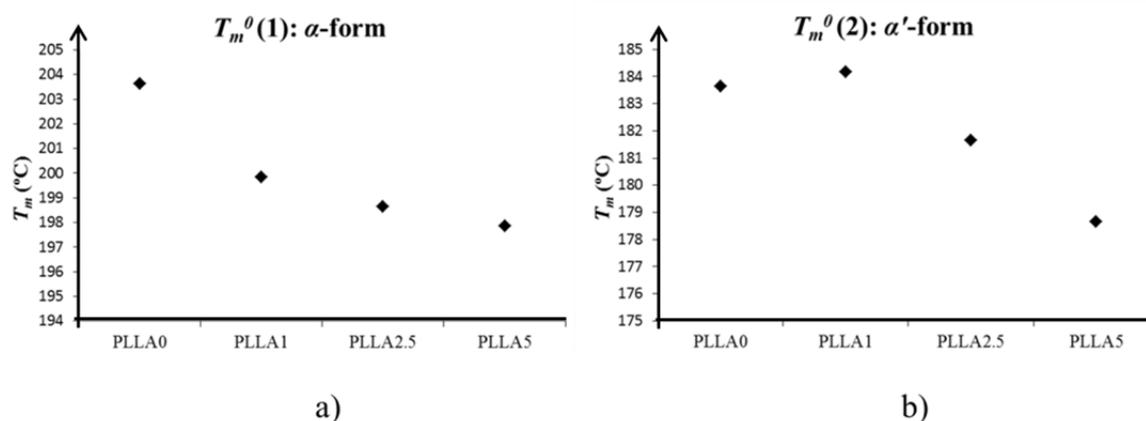
Respecto a la forma de las curvas de la Figura 88a y la Figura 88b, se puede observar para el PLLA0 que tanto el pico de la estructura  $\alpha'$  como el de la  $\alpha$ , tienen la tendencia a aparecer y desaparecer respectivamente al valor de  $T_{ci}$  más bajo (120 °C). Esta tendencia aumenta progresivamente hacia mayores valores de  $T_{ci}$  con el contenido de peg-POSS, y parece que está directamente relacionado con los límites de las regiones, y consecuentemente, con el hecho de que los límites de región de la muestra PLLA0 sean menores que los límites de los *nanocomposites*. Se podría concluir que la presencia de nanomoléculas de peg-POSS favorecería la presencia de estructura  $\alpha'$ , mientras que no favorecería (o retrasaría) la formación de estructura cristalina  $\alpha$  a esos valores de  $T_{ci}$ . Este razonamiento coincidiría con el efecto obstaculizador del peg-POSS anteriormente comentado.



**Figura 88** Fusión de los *nanocomposites* tras la cristalización isotérmica. a)  $T_{ci}$ : 120 °C y b)  $T_{ci}$ : 130 °C. Las curvas han sido desplazadas en el eje vertical.

En la Figura 89 se muestran las  $T_m^0$  de los dos picos ( $\alpha'$  y  $\alpha$ ) de las muestras. El pico  $T_m^0(1)$  corresponde a los cristales generados a altos valores de  $T_{ci}$  ( $\alpha$ ), y el  $T_m^0(2)$  corresponde a los cristales generados a menores valores de  $T_{ci}$  ( $\alpha'$ ). Se puede observar que la  $T_m^0$ , tanto de los cristales  $\alpha$  como de los  $\alpha'$ , disminuye con el contenido en peg-POSS. Este efecto podría explicarse por un grado de perfección cristalina inferior, que estaría causado por el incremento en la nucleación de cristales inducida por el peg-POSS, y por su propio efecto obstaculizador que ralentizaría la movilidad macromolecular y consecuentemente, el

crecimiento cristalino. Esto concordaría con los resultados previos presentados en este trabajo. En la Figura 89b (estructura  $\alpha'$ ), se puede observar también cómo la  $T_m^0$  aumenta para la muestra PLLA1 respecto a la PLLA0. El comportamiento a fusión de los cristales  $\alpha'$  fue el siguiente: los cristales  $\alpha'$  se transformarían en cristales  $\alpha$ , se reorganizarían y cristalizarían formando estructuras más gruesas debido al incremento en la movilidad macromolecular a altas temperaturas, resultando en una fusión a temperaturas relativamente mayores que las de los cristales comunes. Por lo tanto, el aumento en la  $T_m^0$  de la muestra PLLA1 en comparación a la PLLA0 indica que el efecto nucleante del peg-POSS existiría, pero al mismo tiempo, indica que el efecto obstaculizador del peg-POSS sería aún débil a esa cantidad (1% en peso), resultando en una movilidad macromolecular lo suficientemente alta para permitir la posterior reorganización de los cristales. Esto significa que se alcanzaría un equilibrio, resultando en una mayor perfección y tamaño de cristal. Sin embargo, para las muestras PLLA2.5 y PLLA5, el aumento en el efecto nucleante se vería anulado o compensado por la menor movilidad macromolecular, y como consecuencia la  $T_m^0$  disminuiría. Esto conllevaría la obtención de un cristal menos perfecto y de menor tamaño. En la bibliografía se documentó un efecto similar para los *nanocomposites* de PLLA que contenían óxido de grafeno [Chen2013].



**Figura 89** Temperatura de fusión en equilibrio de los *nanocomposites*: a) del primer pico ( $\alpha$ ); y b) del segundo pico ( $\alpha'$ ).

En la Figura 90 se muestra la cristalinidad ( $\chi_c$ ) de todas las muestras, calculada a partir del barrido de fusión. En esa figura también se puede observar el porcentaje de cristalinidad inducido a cada  $T_{ci}$ . Para todas las muestras, se observó un incremento en los valores de  $\chi_c$  con la  $T_{ci}$ , indicando que el ratio de cristalización (cristalinidad) aumenta al aumentar la temperatura de cristalización. Por otro lado, en la Figura 90 se puede observar también que la  $\chi_c$  de los *nanocomposites* es generalmente mayor que la  $\chi_c$  de la muestra PLLA0, y que esta  $\chi_c$  aumenta con el contenido en peg-POSS. De esta manera, se confirma la

habilidad de las nanomoléculas de peg-POSS para actuar como agente nucleante. Para concluir, se puede postular el potencial del peg-POSS como un adecuado agente cristalizante.

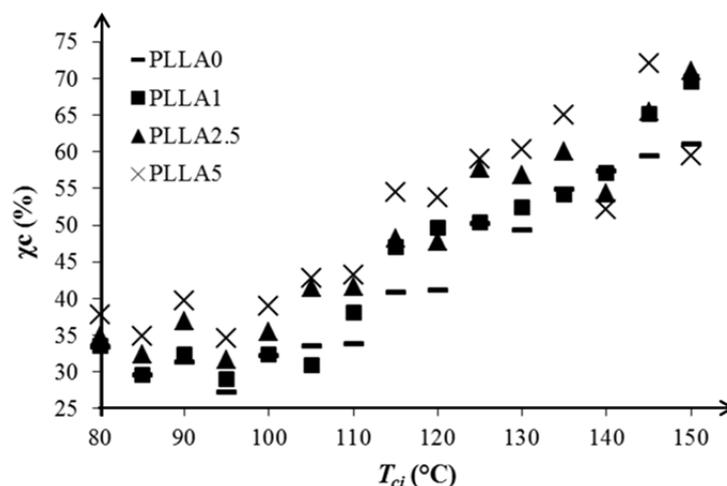
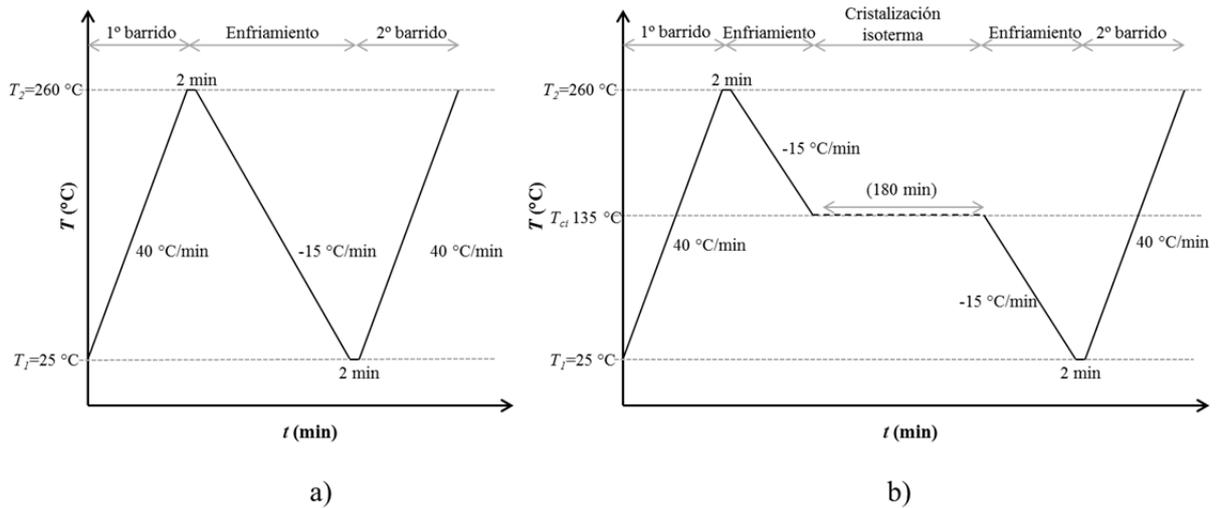


Figura 90 Cristalinidad de las muestras tras la cristalización isotérmica.

### 3.2.1.5 Comparativa de *nanocomposites* basados en PLLA de grado médico y grado comercial

En el presente apartado se analizan el comportamiento a fusión y la estructura cristalina de dos grados de PLLA, uno orientado al sector envase/embalaje (grado comercial-NatureWorks®) y el otro al biomédico (grado biomédico-PURAC®), y sus *nanocomposites* reforzados con un 5% en peso de peg-POSS y fabricados vía disolución-evaporación. Para los *nanocomposites* se ha elegido el valor de 5% en peso de peg-POSS por ser el valor extremo.

Para ello se han analizado mediante calorimetría las muestras en forma de film de los dos grados de PLLA, tanto del material matriz como del *nanocomposite* (PLLA + 5%wt peg-POSS), para conocer las propiedades térmicas del material en sí. Primeramente se realizó un análisis dinámico del PLLA siguiendo la secuencia mostrada en la Figura 91a. Posteriormente, se realizó un análisis isotérmico del PLLA a la temperatura de cristalización isoterma ( $T_{ci}$ ) de 135 °C, manteniéndolo a esta temperatura durante 180 minutos hasta asegurar la completa cristalización del material. La  $T_{ci}$  de 135 °C se ha elegido con el objetivo de evitar, en la medida de lo posible, la aparición del fenómeno de doble pico que, según la experiencia adquirida, aparecía durante el análisis del PLLA a otras  $T_{ci}$ . La secuencia es la mostrada en la Figura 91b.



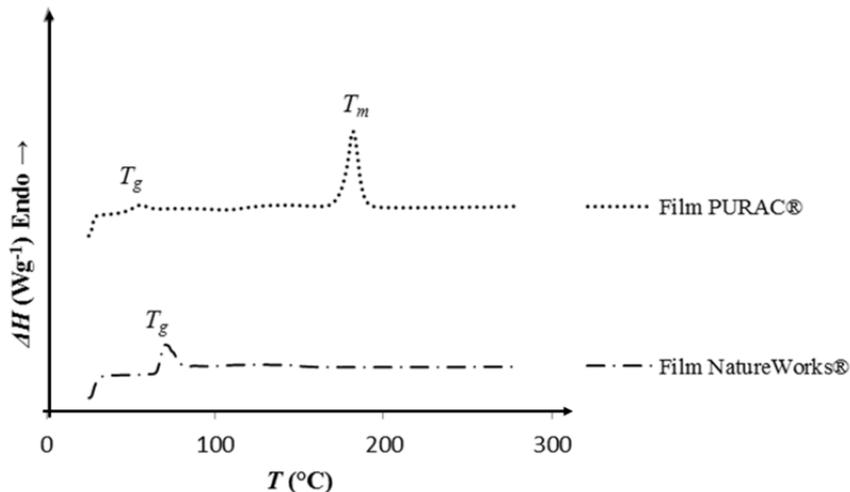
**Figura 91** Secuencia de operaciones DSC: a) análisis dinámico, b) análisis isotérmico.

Los resultados del primer análisis de film entre los dos grados de PLLA indican que el material de grado biomédico tiene una mayor capacidad de cristalización que el del sector envase/embalaje. Este comportamiento se puede apreciar en la Figura 92. En el análisis del material orientado al sector envase/embalaje no se aprecia ningún tipo de cristalización, como así lo indica la inexistencia de un pico de fusión ( $T_m$ ). Con respecto a la temperatura de cristalización vítrea ( $T_g$ ), se puede observar que el material orientado al sector de envase/embalaje tiene una  $T_g$  ligeramente más elevada y de mayor intensidad que el biomédico. Estos valores se pueden observar en la Tabla 10.

**Tabla 10** Propiedades de los materiales en forma de film y granza: primer barrido.

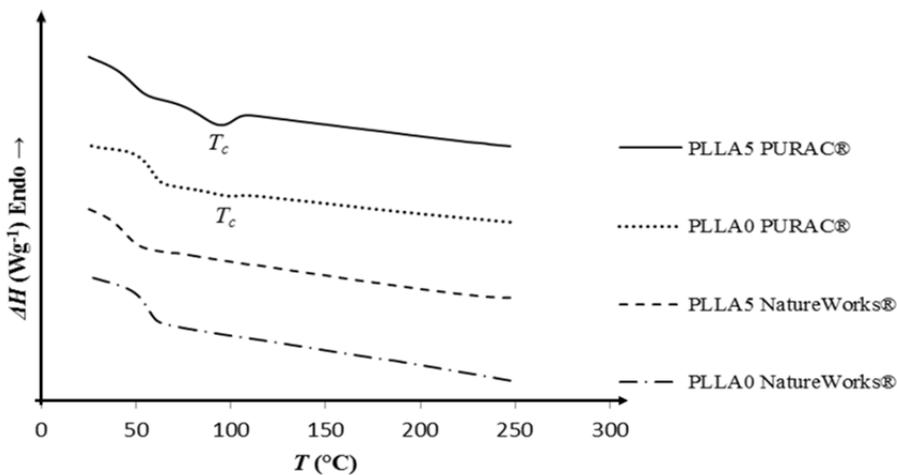
Primer barrido DSC	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (Wg <sup>-1</sup> )
Film PURAC®	46,98	182,11	37,68
Film NatureWorks®	64,81	-	-

En ninguna de las muestras se ha observado durante el calentamiento ningún tipo de fenómeno de cristalización en frío o re-cristalización ( $T_{cc}$ ). Esto podría ser debido a la velocidad de calentamiento relativamente alta de 40 °C/min.



**Figura 92** Comparativa de los dos diferentes grados de PLLA en forma de film: primer barrido de calentamiento en el DSC. Para una mayor claridad las muestras han sido desplazadas en el eje vertical.

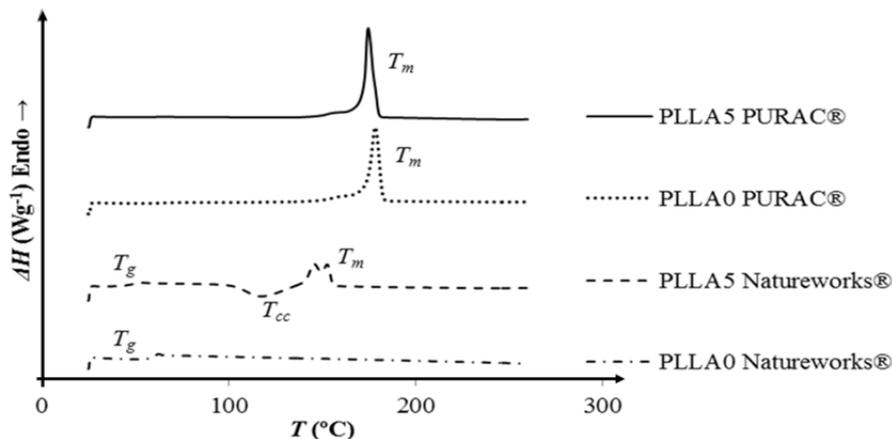
Los resultados del segundo análisis entre los dos grados de PLLA y sus *nanocomposites* indican que en general, el material de grado médico también cristaliza en mayor medida que el de envase/embalaje. En la Figura 93 se puede observar este comportamiento en la cristalización dinámica de los materiales llevada a cabo durante el barrido de enfriamiento a la velocidad de -15 °C/min. Por otro lado, al analizar las transiciones térmicas del PLLA se observa que su comportamiento cambia al añadir nanomoléculas de peg-POSS. La capacidad de cristalización aumenta en la muestra de PLLA5 debido a su efecto nucleante. Este efecto se observa sobre todo en la muestra de material biomédico, mientras que en la muestra de material de envase/embalaje se aprecia de manera muy ligera.



**Figura 93** Cristalización dinámica de los dos grados de PLLA y de sus *nanocomposites* (PLLA0 y PLLA5): barrido de enfriamiento en el DSC. Para una mayor claridad las muestras han sido desplazadas en el eje vertical.

En cualquiera de los casos, en la Figura 93 se puede observar cómo la cristalización dinámica no comienza antes de llegar las muestras a los 125 °C durante el enfriamiento, por lo que aplicando unos 10 °C de seguridad para asegurar que la muestra no comience a cristalizar durante el enfriamiento, se ha procedido a realizar una cristalización isoterma a la temperatura de 135 °C.

En cuanto al estudio isotérmico, en la Figura 94 se muestra el segundo barrido de calentamiento de las muestras tras haberse llevado a cabo la cristalización isotérmica de éstas a 135 °C.



**Figura 94** Cristalización isoterma de los dos grados de PLLA y de sus *nanocomposites* (PLLA0 y PLLA5): segundo barrido de calentamiento en el DSC. Para una mayor claridad las muestras han sido desplazadas en el eje vertical.

Se puede apreciar un aumento en la capacidad máxima de cristalización del PLLA de grado biomédico, tanto para el material base como para el *nanocomposite*. Si bien la capacidad de cristalización ( $\Delta H_m$ ) es ligeramente mayor en el PLLA5, la  $T_m$  es ligeramente superior en el PLLA0, indicando un mayor número de cristales y por lo tanto, un tamaño inferior de éstos debido al efecto nucleante de las partículas de POSS. En la Tabla 11 se pueden observar estos valores. Así pues, la cristalinidad del PLLA5 es mayor que la del PLLA0, aunque son mayores los cristales de este último. En el material de grado envase/embalaje, la cristalización es generalmente menor, siendo inexistente para el PLLA0. Como se puede observar en la Figura 94, el PLLA5 de grado envase/embalaje presenta una recristalización y un fenómeno de doble pico (pese a haber elegido la  $T_{ci}$  135 °C que en principio dificultase su aparición). Como se ha comentado anteriormente (capítulo 3.2.1.4.), ésto sería debido a la formación de dos tipos de cristales diferentes, uno durante la cristalización isoterma a la  $T_{ci}$  y otro durante la cristalización en frío ocurrida durante el segundo barrido de calentamiento [Yasuniwa2007]. En cualquiera de los casos, sería un signo de que el material no ha cristalizado del todo durante la cristalización isoterma, por lo que

sería necesario o aumentar el tiempo de cristalización o realizarlos a otra temperatura de cristalización isoterma.

**Tabla 11** Propiedades del PLLA0 y PLLA5 de los dos grados de material: segundo barrido de calentamiento.

Segundo barrido DSC	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (Wg <sup>-1</sup> )	$T_{cc}$ (°C)	$\Delta H_{cc}$ (Wg <sup>-1</sup> )
PLLA0 PURAC®	-	178,47	49,02	-	-
PLLA5 PURAC®	-	174,77	53,09	-	-
PLLA0 NatureWorks®	57,53	-	-	-	-
PLLA5 NatureWorks®	43,41	145,7/152,86	25,51	117,32	-20,05

Debido a la mayor capacidad de cristalización del PLLA de grado médico y de sus *nanocomposites* (mayores valores de  $\Delta H_m$  y  $T_m$ , cristalización isotérmica más rápida, etc.), y a su aptitud para ser procesado ofreciendo propiedades a medida dentro de las aplicaciones requeridas, finalmente se optó por este material (PLLA PURAC®) para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

### 3.2.2 Análisis termogravimétrico (TGA)

Uno de los mayores inconvenientes del PLLA es su gran tendencia a degradarse durante el fundido [Taubner2001]. La degradación térmica del PLLA puede ser atribuida a diferentes reacciones como la termo-hidrólisis debido a la habilidad para absorber humedad, depolimerización en presencia de trazas de catalizador, degradación termo-oxidativa y reacciones de transesterificación intermoleculares e intramoleculares [Sodergard2002]. Los dos últimos tipos de reacciones suelen ocurrir generalmente en temperaturas cercanas o por encima de la temperatura de fusión del PLLA. A pesar de que el procesado (disolución- evaporación) de los *nanocomposites* peg-POSS/PLLA se ha llevado a cabo a temperatura ambiente, su estabilidad térmica ha sido estudiada mediante TGA. Las muestras, en formato de film y con un peso aproximado de 10 mg, se colocaron en bandejas de aluminio, y se calentaron hasta 600 °C a una velocidad de 10 °C/min en atmósfera inerte (flujo de nitrógeno de 60 ml/min). Los experimentos se han realizado en condiciones inertes, evitando la auto-oxidación y las posibles reacciones con productos secundarios, con el objetivo de analizar la eficacia de las nanomoléculas de peg-POSS como estabilizante térmico del PLLA [Illescas2010].

La pérdida de masa del PLLA tuvo lugar en dos etapas: primeramente un pequeño descenso (aproximadamente el 7%) entre 75 °C y 105 °C, con un máximo descenso a 100 °C. Este descenso parcial a bajas temperaturas podría estar asociado con la presencia de humedad o de impurezas en los films de PLLA, que sería consecuencia del propio proceso de

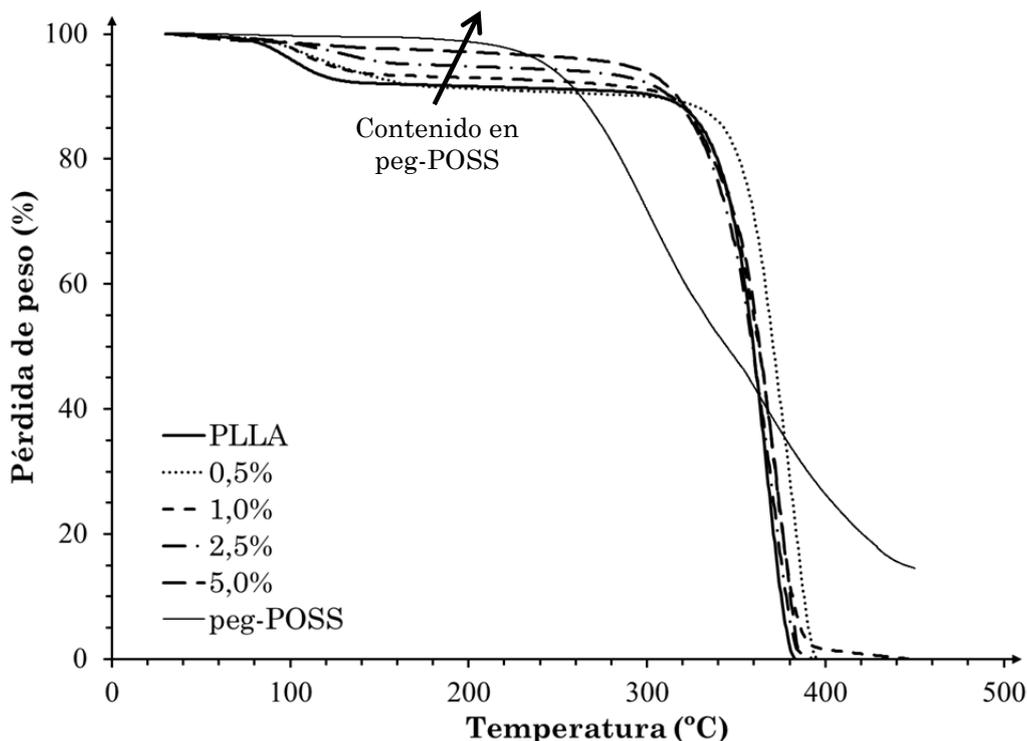
fabricación de los films. Posteriormente, a mayores temperaturas, el descenso más importante ocurría entre 280 °C y 390 °C, con un descenso máximo a  $T_{\max}= 375$  °C. Este descenso está generalmente asociado a reacciones de sustitución nucleofílicas al azar dentro de la cadena polimérica o reacciones radicalarias cíclicas [Kopinke1996].

En la Tabla 12 se muestran las temperaturas en las que el 5% ( $T_{5\%}$ ) y 95% ( $T_{95\%}$ ) de la masa inicial se han volatilizado, así como la temperatura en la que la pérdida de masa es máxima ( $T_{\max}$ ) para el PLLA, el peg-POSS y los *nanocomposites* peg-POSS/PLLA.

**Tabla 12** Resultados obtenidos en el TGA para los *nanocomposites* peg-POSS/PLLA.

Material	$T_{5\%}$ (°C)	$T_{95\%}$ (°C)	$T_{\max}$ (°C)
PLLA	105,5	378,0	96,5/365,5
peg-POSS	244,0	---	292,0
0,5%	125,5	390,5	106,0/382,5
1,0%	122,0	386,0	99,0/370,5
2,5%	184,5	381,0	369,5
5,0%	287,5	383,0	375,5

En la Figura 95 se muestra la pérdida de peso en función de la temperatura. Como se puede observar, la degradación del PLLA cambiaba de forma sustancial tras la adición de las nanomoléculas de peg-POSS. De este modo, la  $T_{5\%}$  aumentaba continuamente hasta 287 °C con la adición de un 5% en peso de peg-POSS. Asimismo, el patrón de degradación pasaba de dos etapas a una única. En el caso de la adición de sólo un 0,5% en peso de peg-POSS, se puede observar cómo pierde rápidamente el 5% de su peso ( $T_{5\%}=125,5$  °C), pero sin embargo es la que más tarde se degrada ( $T_{95\%}=390,5$  °C y  $T_{\max}=382,5$  °C). Esto sería un indicativo de la eficacia del peg-POSS como estabilizante térmico del PLLA, sobre todo a bajos porcentajes. A pesar de las condiciones inertes empleadas, la estabilidad térmica del PLLA bajo la adición de las nanomoléculas de peg-POSS puede considerarse de gran importancia teniendo en cuenta el pequeño contenido de peg-POSS añadido.



**Figura 95** Pérdida de peso en función de la temperatura para los *nanocomposites* basados en peg-POSS/PLLA.

La estabilidad térmica mostrada por los *nanocomposites* peg-POSS/PLLA puede ser consecuencia de la formación de una piel cerámica superficial durante las primeras etapas de la combustión, que protege al material limitando la transferencia de calor y obstaculizando la difusión del oxígeno y la evacuación de los productos de combustión [Lin2006]. Sin embargo, como en muchos sistemas la temperatura de descomposición suele descender tras la adición de diferentes moléculas de POSS, la formación de piel cerámica no puede ser la única razón de la mejoría obtenida.

Generalmente, se suelen obtener mejoras sustanciales en la estabilidad térmica de distintos polímeros cuando hay interacciones o cierta miscibilidad entre ambas fases [Illescas2010, Lin2006], que proporcionan una red más robusta debido a la restricción de la cadena polimérica. Por tanto, el comportamiento observado en los *nanocomposites* peg-POSS/PLLA hace pensar en la presencia de cierta miscibilidad o interacciones entre ambas fases, probablemente debidas al efecto del grupo funcional PEG.

### 3.2.3 Análisis de la estructura molecular mediante espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja es una técnica adecuada para el estudio de la estructura química molecular de los nanocompuestos, debido a que mediante esta técnica se pueden observar desplazamientos o aparición de nuevas bandas de absorción como consecuencia de

las interacciones o reacciones entre los diferentes grupos de los materiales [Iyer2007,Huang2009]. En el caso de los materiales objeto de estudio, los grupos  $\text{CH}_3$  y  $\text{C=O}$  del PLLA son de especial interés debido a que son sus grupos laterales, y en los casos de las nanomoléculas peg-POSS los grupos  $\text{CH}_2\text{-O}$ .

A continuación se definen las longitudes de onda de los grupos característicos del PLLA y del peg-POSS. Como se puede observar las longitudes de onda correspondientes a los grupos característicos del PLLA son [Wu2005,Zhang2005,Carrasco2010]:

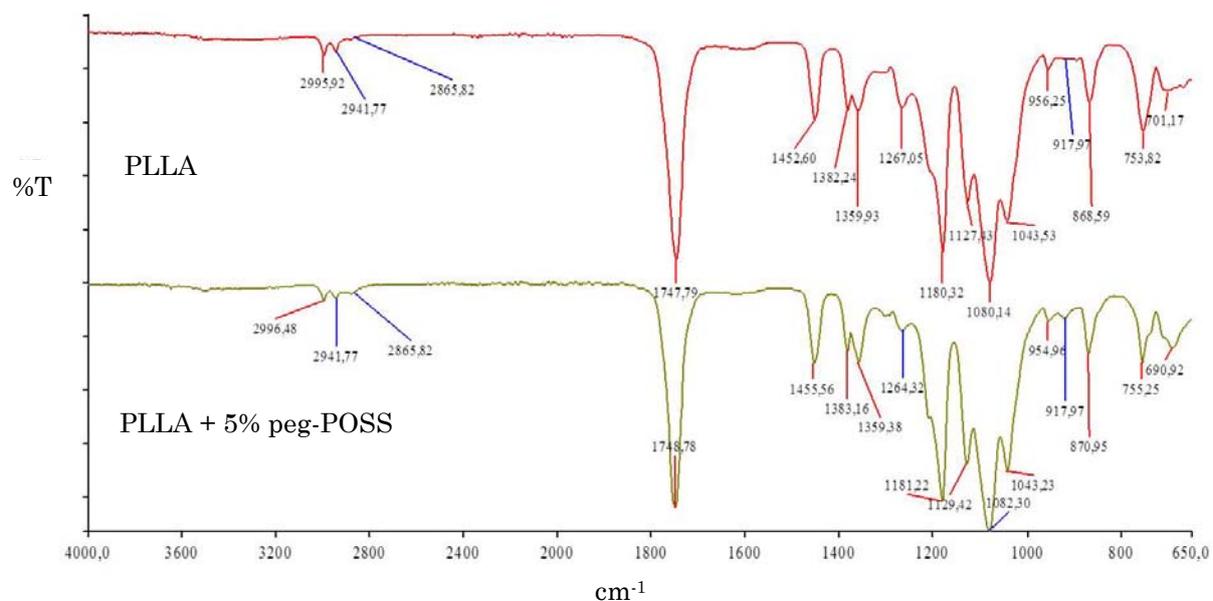
- 2995  $\text{cm}^{-1}$ : vibración de tensión antisimétrica del enlace  $\text{CH}_3$ .
- 1749  $\text{cm}^{-1}$ : vibración de tensión del enlace  $\text{C=O}$ .
- 1207  $\text{cm}^{-1}$ : vibración del enlace del grupo alkyl-cetona.
- 920  $\text{cm}^{-1}$ : vibración de flexión del grupo  $\text{C-H}$ .

Cabe destacar que las bandas de 1207 y 920  $\text{cm}^{-1}$  son características del PLLA cristalino [Carrasco2010].

Todas las moléculas de POSS, independientemente de sus grupos orgánicos, poseen una banda característica a 1084  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de deformación del grupo  $\text{Si-O-Si}$  de la jaula poliédrica. Además de esta banda, cada molécula de POSS presenta una serie de bandas características correspondientes a los grupos orgánicos presentes. De este modo, las bandas correspondientes al grupo orgánico poli(etilén glicol) son [Sánchez2010]:

- 2870  $\text{cm}^{-1}$ : vibración de tensión antisimétrica del grupo  $\text{CH}_2$ .
- 1455  $\text{cm}^{-1}$ : vibración del enlace (tijera) del grupo  $\text{CH}_2$ .

Una vez analizadas las bandas características a cada material puro, en la Figura 96 se muestran los IR correspondientes al nanocompuesto con un 5% en peso de peg-POSS, así como el espectro del PLLA puro como referencia. Los espectros correspondientes a los nanocompuestos con otros porcentajes de peg-POSS no son mostrados, debido a su similitud con los mostrados en la Figura 96.



**Figura 96** Espectros de IR del nanocompuesto con un 5% en peso de peg-POSS (espectro inferior), así como del PLLA puro como referencia (espectro superior).

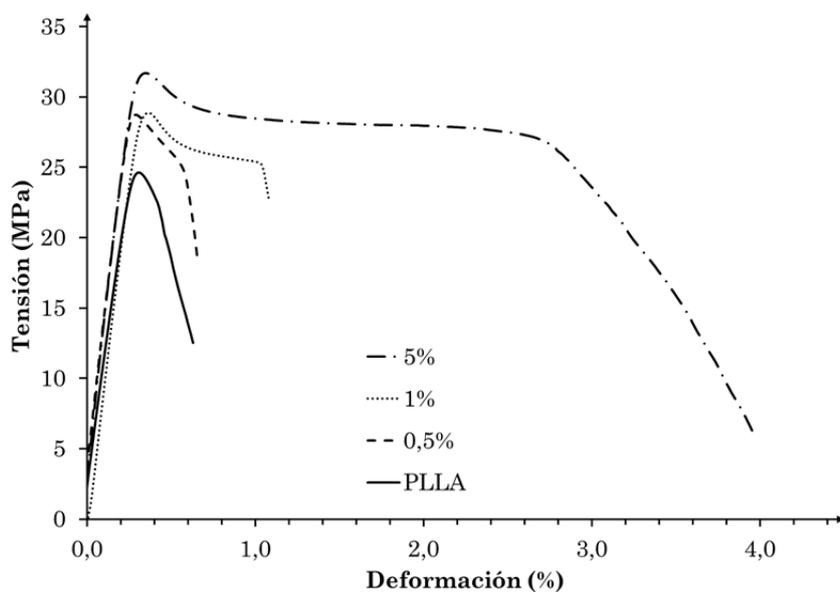
Lo primero de todo cabe destacar que las bandas características correspondientes a la estructura cristalina del PLLA son de muy escasa intensidad (apareciendo como hombros o bandas secundarias de otras bandas), lo que indicaría que los films de PLLA son prácticamente amorfos. Sin embargo, tal y como se puede observar en la Figura 96, la intensidad de dichas bandas es ligeramente más intensa en el nanocompuesto, por lo que se confirma que el PLLA es más cristalino tras el mezclado con las nanomoléculas peg-POSS. La mayor cristalinidad es debida al efecto nucleante de estas nanomoléculas, y coincide con los resultados de las medidas de DSC.

Como se puede observar en la Figura 96, las bandas más características del PLLA permanecen a las mismas longitudes de onda y con similares relaciones de intensidades tras la adición de las nanomoléculas de peg-POSS. Este hecho es indicativo de que la presencia de este tipo de nanomoléculas no interaccionan significativamente con la matriz de PLLA, debido a que no son detectables por IR. Esto es debido a que si las moléculas de POSS, debido a interacciones o reacciones, se uniesen a la cadena polimérica del PLLA, se observarían cambios o desplazamientos en las principales bandas del PLLA, tal y como se ha observado en otros *nanocomposites* basados en POSS [Mya2006, Zhang2006, Mu2007, Sánchez2010].

### 3.2.4 Análisis de las propiedades mecánicas

El resultado de un ensayo de tracción es una gráfica tensión-deformación. Los resultados de los ensayos de tracción de los *nanocomposites* peg-POSS/PLLA en forma de film se muestran en la Figura 97. Primeramente se observa que el módulo de Young ( $E$ ) no

presenta ninguna diferencia resaltable. Por otro lado también se observa cómo el límite elástico ( $\sigma_y$ ) de los *nanocomposites* aumenta progresivamente con la cantidad de peg-POSS. Finalmente se puede observar cómo a medida que se aumenta el porcentaje de peg-POSS la capacidad de deformación a rotura también aumenta. Como conclusión, se puede decir que el peg-POSS aumenta la ductilidad del PLLA y su límite elástico.



**Figura 97** Ensayo tensión-deformación del nanocompuesto peg-POSS/PLLA.

### 3.2.5 Análisis de viscosidad

Este tipo de análisis se realizó para conocer cómo evolucionaba la viscosidad de los *nanocomposites* a medida que se aumentaba la cantidad de peg-POSS. Cabe destacar que la viscosidad de la disolución influye en gran medida sobre ambos procesos de fabricación (sobre todo en el proceso de *electrospinning*), por lo que es importante conocer esta característica. Los valores y desviación estándar de la viscosidad dinámica para el cloroformo (a modo de control) y tres de las muestras (PLLA0, PLLA1 y PLLA5) fueron:  $\nu=0,6017\pm0,0003$  mPa.s,  $\nu=2,3428\pm0,0019$  mPa.s,  $\nu=2,3475\pm0,0028$  mPa.s y  $\nu=2,2193\pm0,0113$  mPa.s, respectivamente. Analizando esos valores se puede deducir que la viscosidad disminuye a medida que aumenta el contenido en peg-POSS.

## 3.3 Caracterización biológica de los scaffolds fabricados

En los siguientes apartados se caracterizarán los *scaffolds* fabricados. Primeramente se analizará el tiempo de biodegradación del material. Posteriormente se evaluarán las

propiedades biológicas de los *scaffolds* mediante la realización de ensayos de biocompatibilidad.

### 3.3.1 Caracterización de la biodegradabilidad en líquido fisiológico

La caracterización de biodegradabilidad se realiza mediante el análisis de la pérdida de peso del material tras su inmersión en líquido fisiológico a 37 °C. Sin embargo, pudiera resultar que debido a la biodegradación del material apareciesen productos de deshecho o elementos secundarios que alterasen el pH del entorno. Con el objetivo de cumplir con el requisito de biocompatibilidad, es necesario comprobar que el nivel del pH permanezca dentro de unos límites previamente establecidos. Para ello, el pH se controlará semanalmente.

#### Análisis de la pérdida de peso

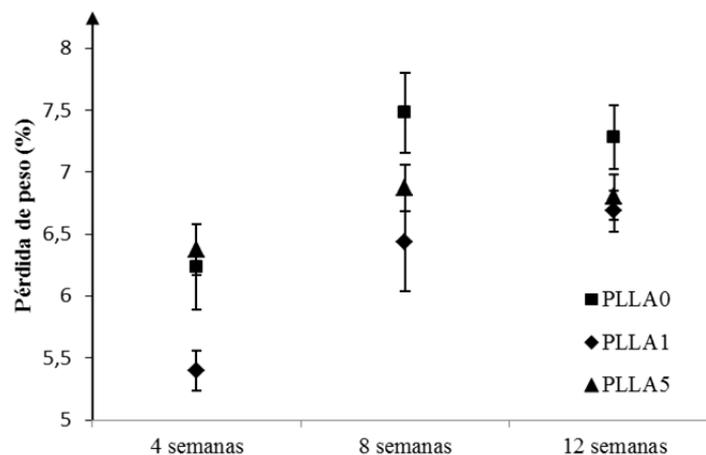
Los ensayos de biodegradabilidad en líquido fisiológico se realizaron sobre *scaffolds* tipo film en vez de tipo mat de fibras. La razón principal es que el film es más restrictivo ya que, como se indica en secciones anteriores, el tiempo de biodegradación debiera ser mayor debido a la baja relación superficie-volumen. En cambio, en *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning* la relación superficie-volumen sería alta y la biodegradación se daría con mayor rapidez, dificultando así la apreciación del verdadero efecto del peg-POSS sobre el tiempo de biodegradación del PLLA. Además, la manipulación de los films (limpieza, aclarado, secado, etc.) resultaría también más fácil que la manipulación de las muestras fabricadas mediante *electrospinning*.

Los resultados de los estudios de biodegradación que se visualizan en la Figura 98 muestran que la pérdida de peso fue de alrededor de un 6% para todas las muestras (PLLA0, PLLA1 y PLLA5) extraídas del baño tras las 4 primeras semanas (6,24%±0,35, 5,4%±0,16, y 6,37%±0,21, respectivamente). La pérdida de peso de las muestras extraídas del líquido fisiológico tras 8 semanas fue de 7,48%±0,33, 6,44%±0,39, y 6,88%±0,19, respectivamente. La pérdida de peso de las muestras extraídas tras 12 semanas fue de 7,29%±0,26, 6,69%±0,17, y 6,8%±0,18, respectivamente. En la Figura 98 se puede observar también que la máxima pérdida de peso ocurre tras las primeras 4 semanas. Esta pérdida de peso podría ser debida a una rápida hidrólisis del PLLA en las capas externas de la muestra, e incluso podría verse ayudada por la disolución inicial de las nanomoléculas de peg-POSS localizadas en la superficie. Tras 8 semanas, el porcentaje de pérdida absoluta de peso de las muestras fue mayor que el de las muestras extraídas tras las primeras 4 semanas. Sin embargo, el porcentaje de pérdida relativa de peso de las muestras extraídas tras 8 semanas respecto a

las de las primeras 4 semanas, no fue tan grande, siendo la diferencia de alrededor de un 1%. En el último punto de control (12 semanas), el porcentaje de pérdida absoluta de peso fue mayor para la muestra PLLA1, aunque no para las otras dos muestras cuyos valores fueron similares o ligeramente inferiores que los de esas mismas muestras extraídas tras 8 semanas. Sin embargo, el porcentaje de pérdida relativa de peso de todas las muestras extraídas al final del experimento sí que fue superior al porcentaje de pérdida de las muestras extraídas tras las primeras 4 semanas.

En la Figura 98 se puede observar cómo la pérdida de peso tiende a estabilizarse tras las 4 primeras semanas. Este comportamiento podría ser debido al hecho de que, al extraer las muestras del fluido, éstas presentaban una especie de piel en su superficie, tratándose probablemente de una deposición de restos de polímero biodegradado y sales de PBS (*Phosphate Buffered Saline*). La causa de este comportamiento podría ser el propio ensayo de biodegradación, pese a estar realizado bajo norma. Al ser éste un ensayo estático no presentaría ningún tipo de convección mecánica que pudiese prevenir el depósito de sales y de restos de polímero biodegradado sobre la superficie de las muestras. Esta piel podría obstruir el proceso de hidrólisis y dificultar el intercambio de polímero en la intercara muestra-fluido. En la bibliografía se puede encontrar un caso similar en los *nanocomposites* poly-D-L-lactide/nano-hydroxyapatite [Chen2013b].

Respecto a los *nanocomposites*, la pérdida de peso de las muestras PLLA1 y PLLA5 fue menor que la de la muestra PLLA0 para todos los puntos de control. Este efecto indicaría una disminución en la biodegradabilidad de los *nanocomposites* con la adición de peg-POSS, por lo que este tipo de nanomoléculas se podrían definir como retardantes de la biodegradación. En cambio, la pérdida de peso de la muestra PLLA1 es menor que la de la muestra PLLA5, indicando un posible efecto de saturación a mayores contenidos de peg-POSS.



**Figura 98** Porcentaje de pérdida de peso de los *nanocomposites* tras los puntos de control.

### **Análisis del pH tras distintos períodos de inmersión en líquido fisiológico**

El pH permaneció dentro de los límites ( $7,4\pm 0,2$ ) durante todo el experimento, por lo que el cultivo celular no se vería afectado. Al realizar la medición semanal se observó que ocurría una pequeña disminución en los valores del pH a medida que las muestras se biodegradaban, es decir, el pH del PBS recién preparado era alrededor de 0,2 puntos mayor que el del PBS final. Cabe destacar que este PBS final contenía restos del polímero biodegradado.

### **3.3.2 Caracterización biológica de los *scaffolds* – Cultivo celular**

En este apartado se describe el proceso de caracterización biológica de los materiales. Primeramente se analiza el cultivo celular sobre *scaffolds* en forma de film fabricados mediante disolución-evaporación, y posteriormente se analiza sobre *scaffolds* tipo mat de fibras fabricados mediante *electrospinning*.

#### **3.3.2.1 Cultivo celular sobre *scaffolds* en forma de film fabricados mediante *solvent-casting***

A continuación se muestran los resultados de la caracterización biológica relativos al cultivo de células madre, proliferación celular y diferenciación celular en *scaffolds* poliméricos en forma de film fabricados mediante el método de disolución-evaporación.

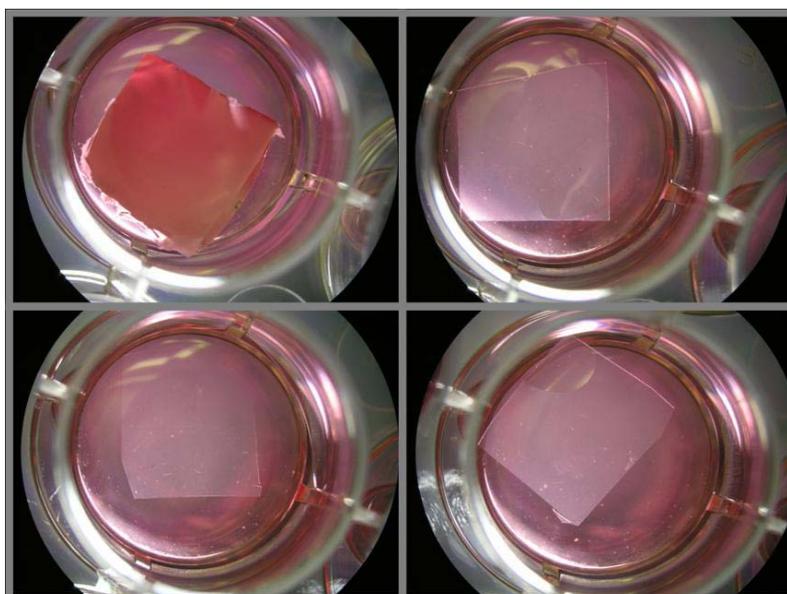
Primeramente se procedió al cultivo de las células madre mesenquimales en el *scaffold*. Para ello se prepararon las células madre mesenquimales humanas (hMSC), y el medio adecuado para su crecimiento en la matriz o soporte celular (*scaffold*), previamente fabricado.

Se analizaron varias muestras de PLLA puro (sin moléculas de POSS) fabricadas mediante disolución-evaporación para comprobar el efecto de los diferentes métodos de evaporación (temperatura y tiempo) en la rugosidad superficial, y por lo tanto, en el cultivo celular. También se analizaron varias muestras de PLLA, igualmente fabricadas mediante disolución-evaporación, pero con la adición de nanomoléculas de peg-POSS en porcentajes de 1 y 5% en peso. La descripción de las muestras analizadas se puede observar en la Tabla 13. En esa tabla también se detalla el método de evaporación para cada muestra.

**Tabla 13** Muestras fabricadas mediante disolución- evaporación para realizar el cultivo celular.

Muestra	Refuerzo (% w/w)	Proceso
PLLA0c	0	Casting/evaporación 24h. aire libre + 24h. horno a 30 °C
PLLA0c2	0	Casting/evaporación 48h. aire libre
PLLA0c3	0	Casting/evaporación 24h. horno a 20 °C
PLLA0c4	0	Casting/evaporación 24h. horno a 40 °C
PLLA1c	1	Casting/evaporación 24h. aire libre + 24h. horno a 30 °C
PLLA5c	5	Casting/evaporación 24h. aire libre + 24h. horno a 30 °C

Los distintos *scaffolds* fueron incubados durante 72 horas en el medio de cultivo celular para hidratarlos y comprobar su comportamiento en este medio. El medio con que se cultivan las células posee un indicador de pH denominado rojo fenol el cual vira de color dependiendo del pH. Como se observa en las fotografías siguientes tomadas con la lupa estereoscópica, no se produjeron cambios de pH apreciables a simple vista (Figura 99).



**Figura 99** Imágenes obtenidas con la lupa estereoscópica de los *scaffolds* incubados durante 72 horas con medio de cultivo celular. Arriba izqda.: PLLA0c. Arriba dcha.: PLLA0c2. Abajo izqda.: PLLA0c3. Abajo dcha.: PLLA0c4.

El pH del medio de cultivo celular en contacto con las distintas muestras fue medido con la ayuda de tiras de glucosa, manteniéndose todos ellos en un rango de una unidad de pH (entre 8-8,5), tal y como se puede apreciar en la tabla adjunta (Tabla 14).

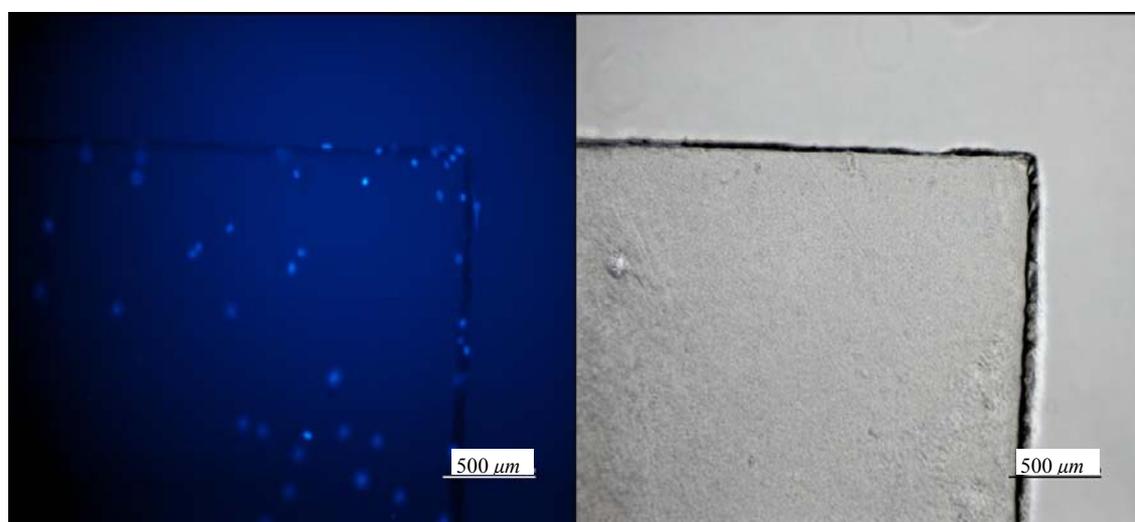
**Tabla 14** pH de cada material tras 72 horas de incubación con el medio de cultivo.

Scaffold	PLLA0c	PLLA0c2	PLLA0c3	PLLA0c4
pH	8-8,5	8	8	8

En paralelo, las hMSC (provenientes de médula ósea de donantes) fueron expandidas hasta pase 5. Para individualizar las células y separarlas del frasco de cultivo, se sometieron a una digestión enzimática mediante tratamiento con tripsina/EDTA y se resuspendieron en medio de cultivo (DMEM low glucose SIGMA, Fetal bovine serum SIGMA, pen/strep INVITROGEN) a una alta densidad (aproximadamente  $2 \cdot 10^6$  células/ml). Una vez sembradas las células se mantuvieron desde ese momento hasta la finalización del cultivo en un incubador a 37 °C y una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Con una frecuencia de 3 veces por semana se procedió al cambio de medio de cultivo.

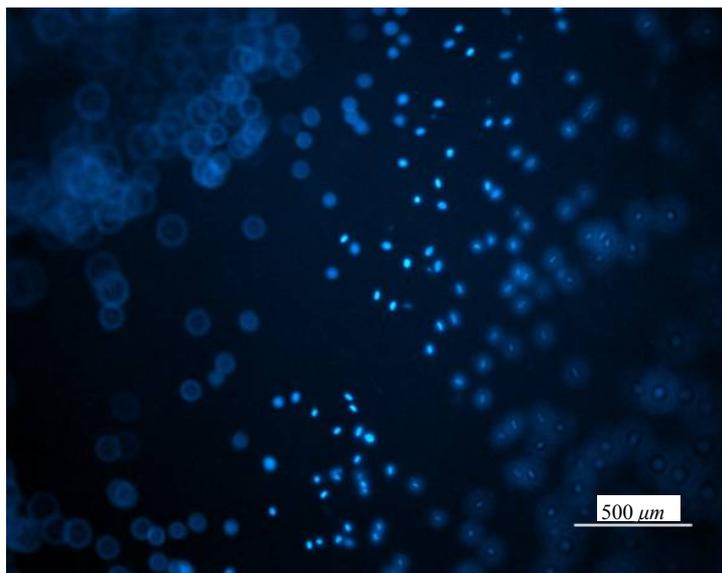
Para el análisis de la proliferación celular sobre los distintos *scaffolds*, las hMSC se tiñeron con el colorante específico Hoechst 33258, a una concentración final de 1 µg/ml. Se trata de un colorante fluorescente que se une al DNA de doble hebra, concentrado en el núcleo celular, lo que permite la identificación de las células sobre los soportes o *scaffolds* mediante microscopía de fluorescencia. La presencia de este colorante no afecta a la viabilidad celular, por lo que tras su observación, se puede proseguir con el cultivo.

A continuación se muestran varias imágenes representativas de las hMSC en cultivo en los distintos *scaffolds*, tras tres semanas de proliferación. En la Figura 100 podemos observar, tanto a microscopía de fluorescencia (imagen de la izquierda), como al microscopio óptico (imagen de la derecha), las hMSC proliferando sobre el *scaffold* PLLA0c.



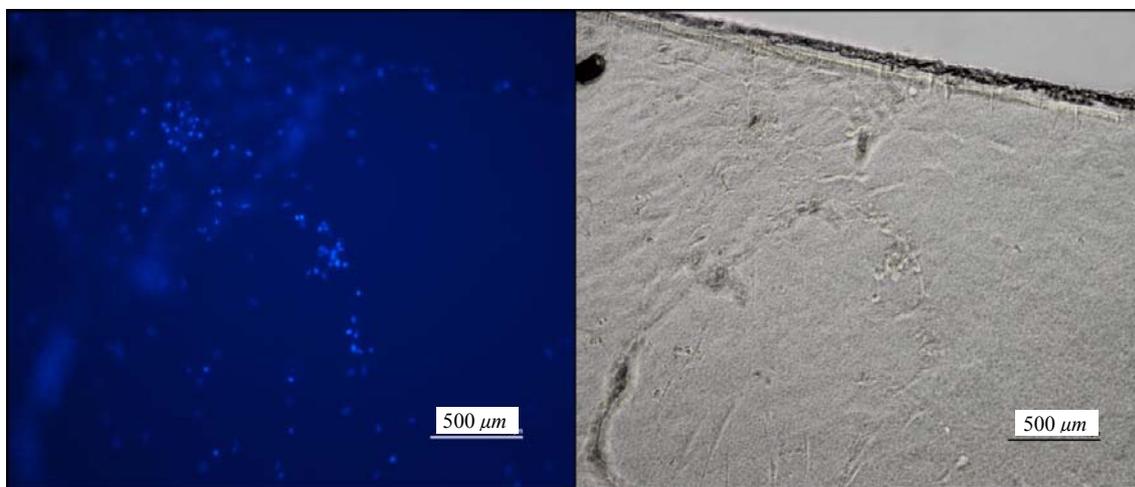
**Figura 100** Imagen representativa de las hMSC en cultivo en la PLLA0c tras tres semanas de proliferación.

En la Figura 101 se pueden apreciar en el centro de la fotografía los núcleos de las células en azul, mientras que en los laterales la imagen resulta desenfocada por los distintos planos que posee el material.



**Figura 101** hMSC tras 3 semanas de proliferación sobre la PLLA0c4, observadas al microscopio de fluorescencia.

En la Figura 102 se puede observar la acumulación de hMSC tanto en los bordes de la muestra como en las zonas en las que existe rugosidad, tras 3 semanas de proliferación sobre el soporte PLA0c. Debido a la acumulación de hMSC que presentaron las muestras en algunas regiones, se podría concluir que una mayor rugosidad favorece el cultivo y la proliferación celular, mientras que en las zonas “lisas” se da una menor bioactividad.



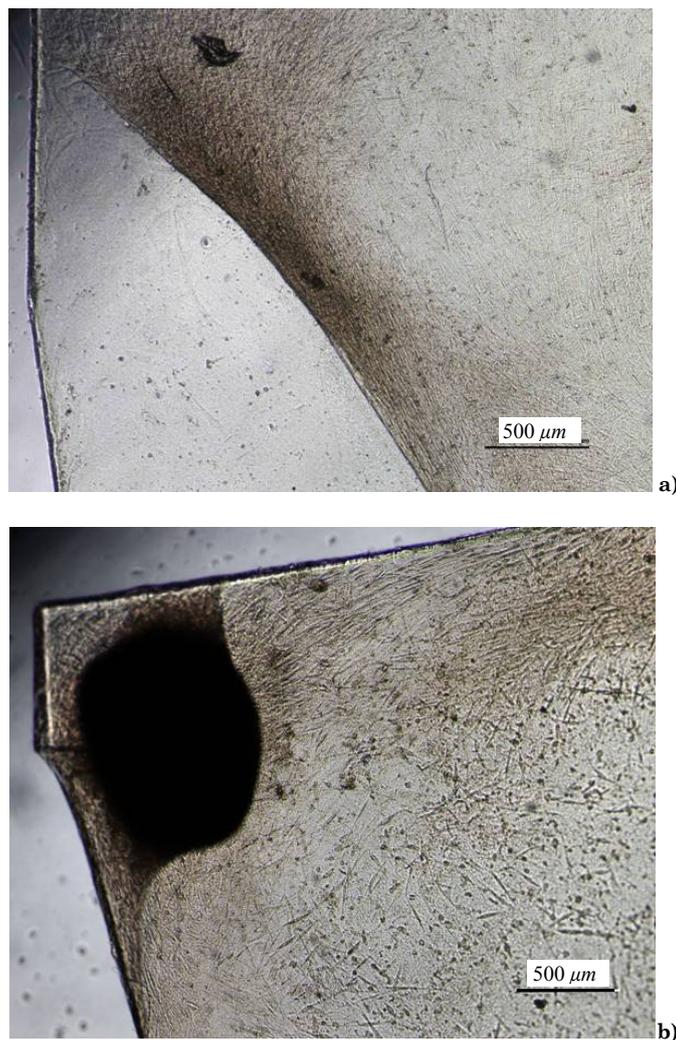
**Figura 102** hMSC cultivadas sobre la PLLA0c al microscopio de fluorescencia (izquierda). Imagen en campo claro (derecha).

En cuanto a la morfología celular, las hMSC se adhirieron correctamente a cada tipo de material, aunque con ligeras diferencias. Se pudieron observar las características que definen este tipo celular: su morfología fusiforme, gran tamaño y núcleo con varios nucléolos.

Tras el periodo de proliferación se promovió la diferenciación celular a tejido cartilaginoso. Para ello se cultivaron las células en medio de diferenciación suplementado con

el factor de crecimiento recombinante TFG- $\beta$ , utilizando el kit específico de Lonza “hMSC Chondrogenic SingleQuots” y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se mantuvieron durante 6 semanas bajo estas condiciones, reemplazando el medio de cultivo cada 2 ó 3 días.

Tras un mes de diferenciación se comprobó cómo parte de la población celular había modificado su morfología hasta adquirir la típica de condrocitos, tal y como se observa en estas imágenes (Figura 103a y Figura 103b) tomadas con el microscopio óptico en campo claro a 40 aumentos.



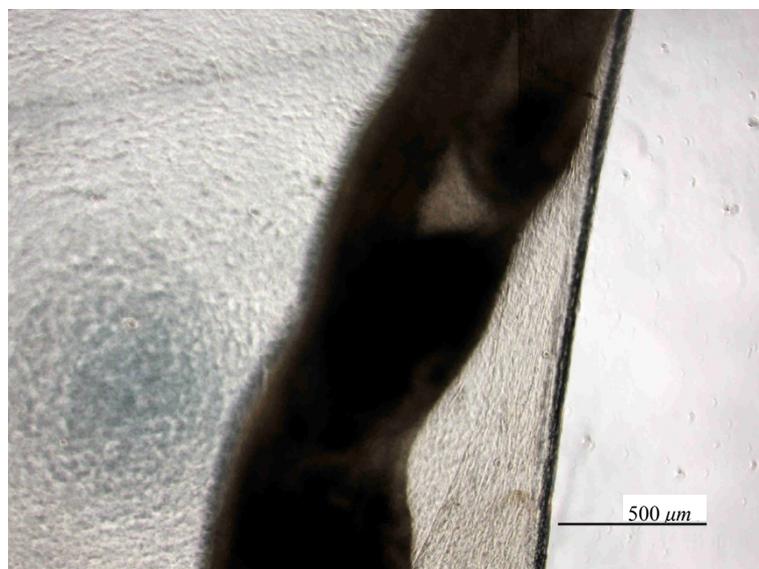
**Figura 103** Imágenes obtenidas al microscopio óptico tras el periodo de diferenciación sobre la PLLA0c.

Al concluir el proceso de diferenciación, algunas de las muestras presentaron zonas con mayor número de células diferenciadas a tejido cartilaginoso, gracias a la formación de varias capas de tejido (Figura 104). Estas zonas resultaron ser los bordes y las zonas rugosas, confirmando la mayor aptitud de éstas para la diferenciación celular, además del cultivo y proliferación.



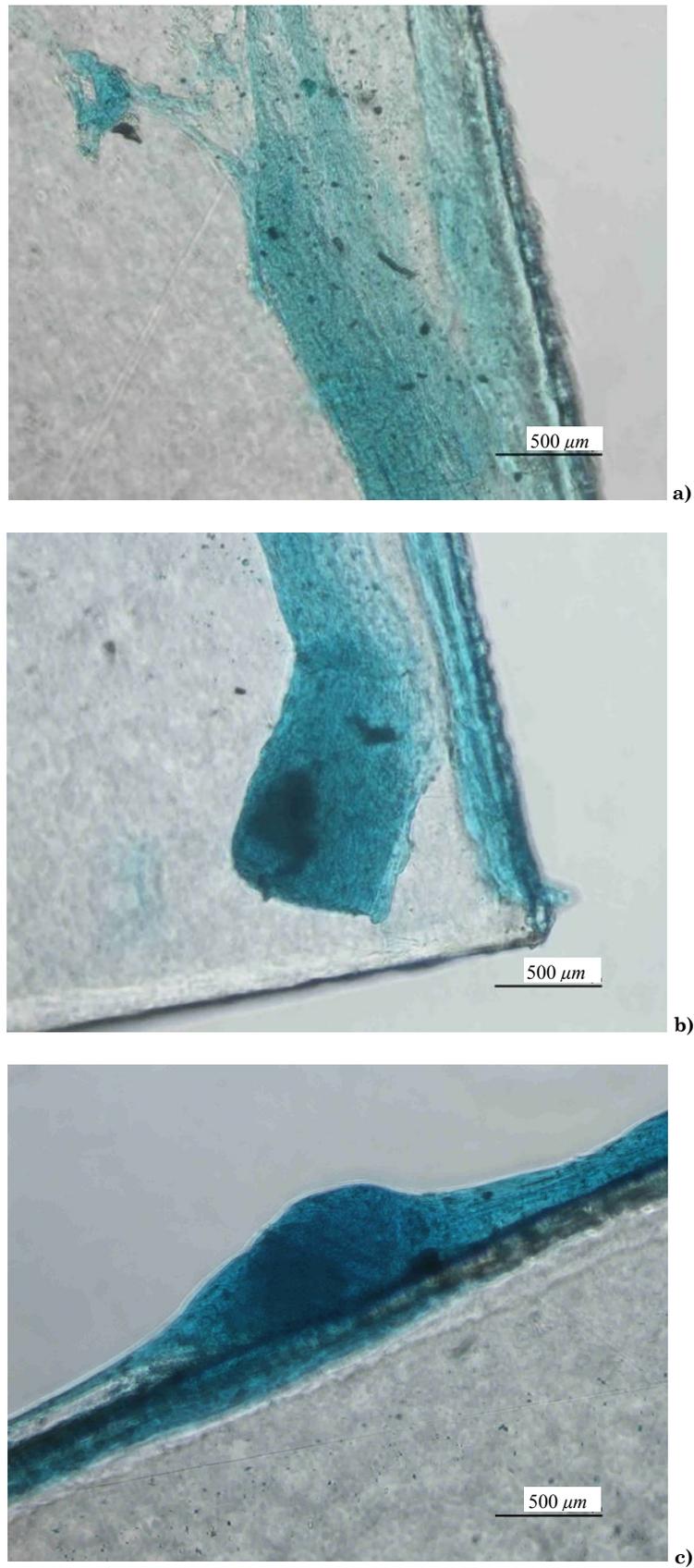
**Figura 104** Detalle al microscopio óptico de la formación de tejido cartilaginoso sobre el PLLA0c.

La imagen siguiente (Figura 105) corresponde al soporte PLLA0c2. En esa imagen se muestran las hMSC diferenciadas a condrocitos tras 6 semanas de cultivo. Se pueden observar las numerosas acumulaciones celulares de tejido cartilaginoso que se produjeron, sobre todo en las zonas cercanas a los bordes. Este comportamiento se observó en todas las muestras.



**Figura 105** Acumulación de tejido cartilaginoso al microscopio óptico sobre el PLLA0c2.

En cuanto al análisis histológico, se realizó una tinción de las muestras con azul alcian que es un colorante específico para los proteoglicanos, componentes principales de la matriz extracelular del cartílago. Éstos quedan teñidos de color azul, tal y como se puede apreciar en las imágenes de la Figura 106(a, b y c).

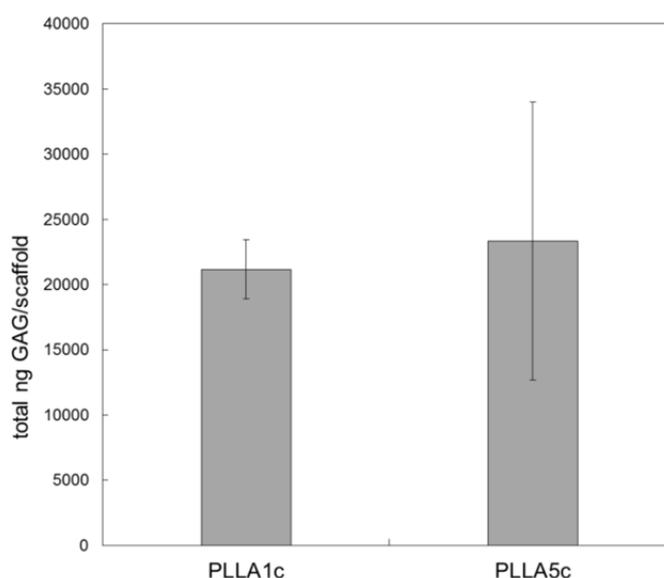


**Figura 106** Imágenes obtenidas al microscopio óptico, del *scaffold* de PLLA0c al término del proceso de diferenciación llevado a cabo durante 6 semanas, en las que se aprecian las regiones de tejido cartilaginoso teñidas con el colorante específico.

A continuación se muestran los resultados del análisis de las matrices generadas. El grado de diferenciación a cartílago de las diferentes muestras se determinó cuantificando la cantidad de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs), uno de los componentes fundamentales de la matriz extracelular del tejido cartilaginoso.

Se realizó una digestión enzimática de las muestras con papaína durante 12 horas y en agitación. Los glicosaminoglicanos sulfatados resultantes se incubaron con el reactivo Blyscan® (azul de 1,9-metilmetileno), lo que produjo la formación de unos complejos coloreados insolubles que se cuantificaron por medio del espectrofluorímetro a una longitud de onda de  $\lambda=656$  nm. El contenido de glicosaminoglicanos sulfatados, tipo de proteoglicanos específicos del cartílago hialino, se cuantificó usando como estándar el condroitín-4-sulfato.

En el gráfico siguiente (Figura 107) se pueden observar los resultados correspondientes a las muestras PLLA1c y PLLA5c. Se detectó la presencia de GAGs en todas las muestras analizadas, lo que indica que ocurrió diferenciación en cartílago hialino.

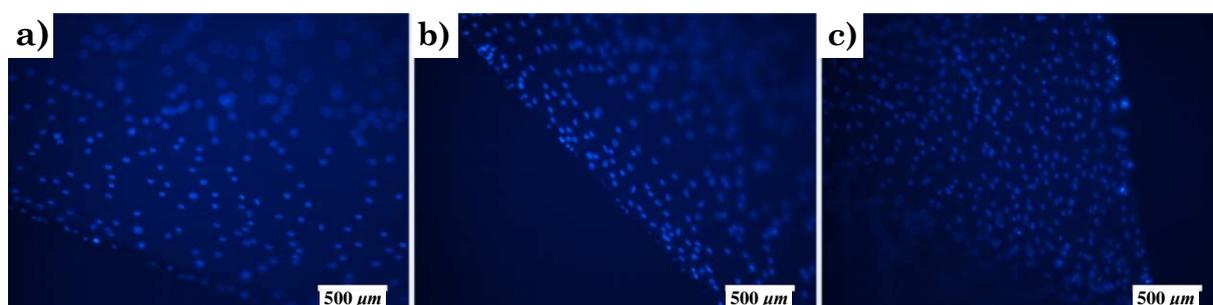


**Figura 107** Cuantificación de los GAGs generados en los diferentes *scaffolds*.

Son necesarios estudios complementarios para profundizar en el conocimiento de la capacidad de diferenciación de las hMSC cultivadas sobre *scaffolds* poliméricos. Estos estudios, mucho más completos, se han realizado sobre *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning*, y se detallan en el siguiente capítulo (3.3.2.2).

### 3.3.2.2 Cultivo celular sobre *scaffolds* tipo mat de fibras fabricados mediante *electrospinning*

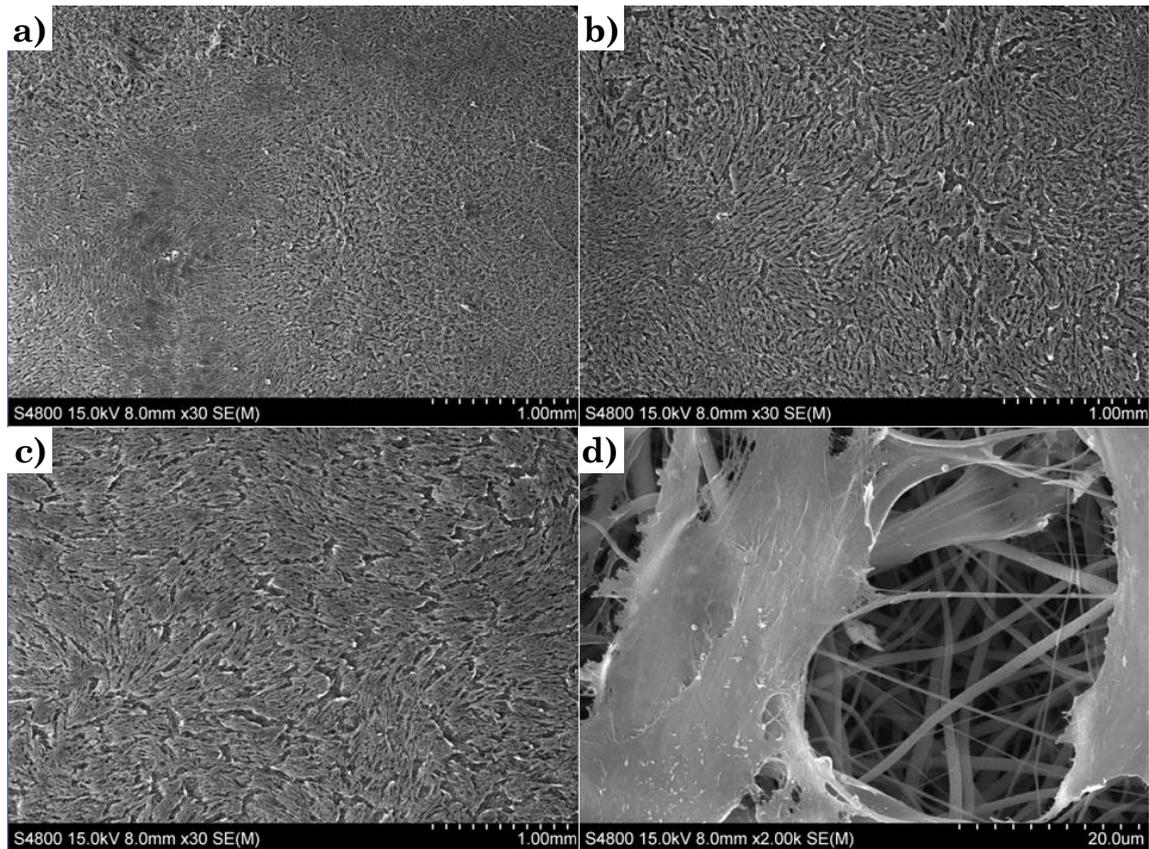
Las hMSC fueron cultivadas durante 2 semanas en *scaffolds* de peg-POSS/PLLA fabricados mediante *electrospinning*. Tras ese periodo las células se tiñeron con tinte Hoechst, con el objetivo de estudiar su viabilidad y su capacidad de adhesión. La Figura 108 muestra los núcleos teñidos de las hMSC en los *scaffolds* PLLA0, PLLA1 y PLLA5. Estas fotos evidencian que las hMSC fueron capaces de adherirse y propagarse de manera similar sobre los diferentes *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning* (2 de ellos compuestos de peg-POSS/PLLA y otro solamente de PLLA). En estas fotos también se observa que la adición de nanomoléculas de peg-POSS no disminuye la viabilidad celular.



**Figura 108** hMSC's teñidas con Hoechst sobre *scaffolds* de peg-POSS/PLLA fabricados mediante *electrospinning* tras la propagación celular. a) PLLA0, b) PLLA1 y c) PLLA5.

Las hMSC son células madre adultas capaces de diferenciarse en lineage cartilaginoso. Para llevar a cabo un proceso condrogénico óptimo es crítico contar con una apropiada confluencia celular. Los análisis morfológicos mediante SEM se realizaron para confirmar si las hMSC lograron el nivel de confluencia óptima para su diferenciación en condrocitos.

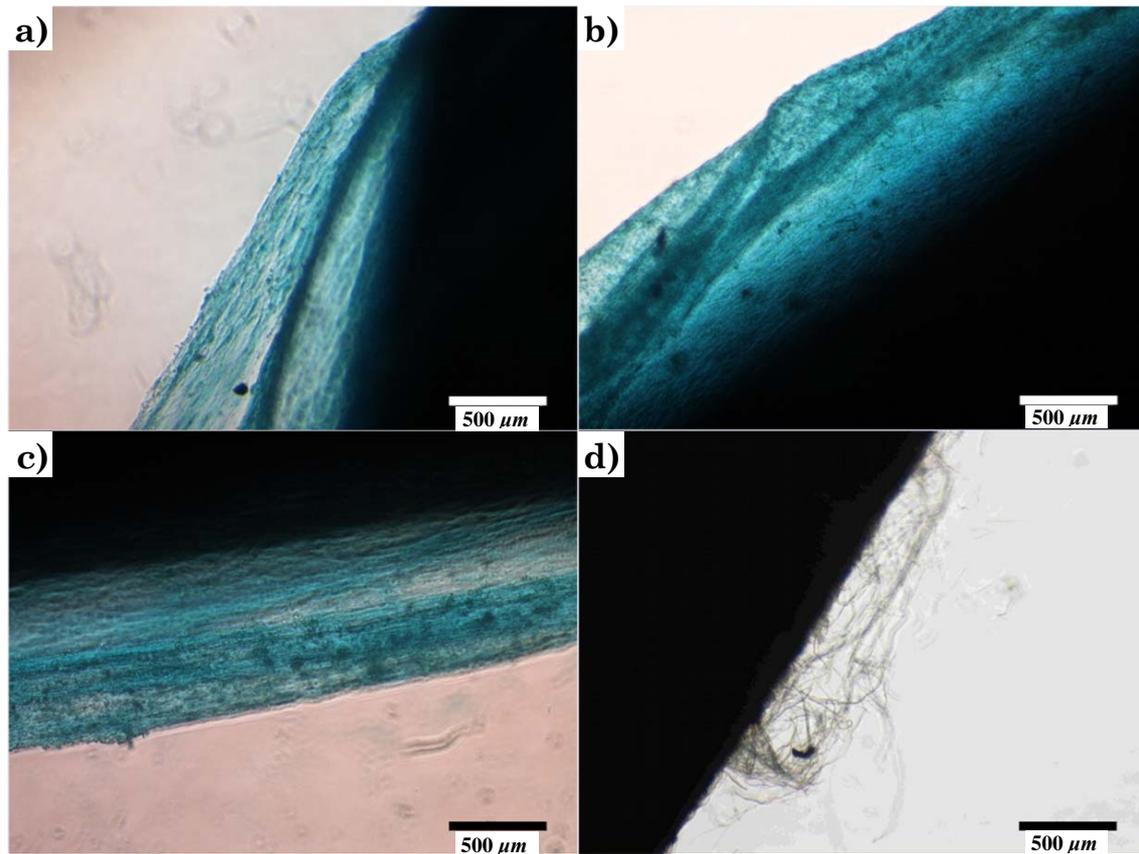
Las hMSC cultivadas durante 2 semanas sobre los tres *scaffolds* de diferente material (PLLA0, PLLA1 y PLLA5), formaron una capa continua de apariencia similar al ser observadas mediante SEM (Figura 109a, Figura 109b y Figura 109c), respectivamente), por lo que se puede decir que la adición de peg-POSS no disminuyó la capacidad de formar esta monocapa. La figura en detalle (Figura 109d) muestra la capa formada sobre las fibras de la muestra PLLA1. Estos resultados predicen un proceso subsecuente de condrogénesis de alta calidad.



**Figura 109** Microfotografías SEM mostrando la formación de una capa continua de hMSC cultivadas durante 2 semanas en varios *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning*. a) PLLA0, b) PLLA1, c) PLLA5, d) Detalle de las hMSC sobre el *scaffold* PLLA1.

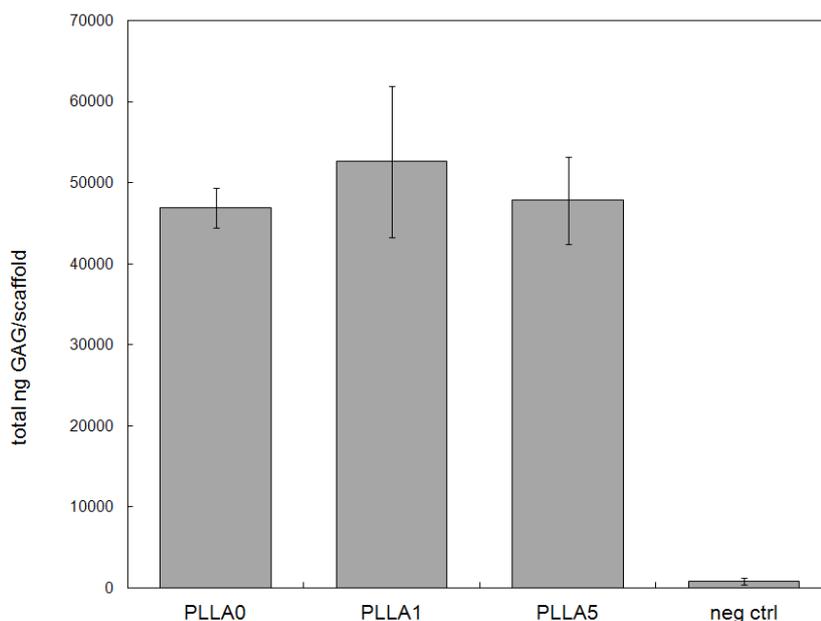
Una matriz extracelular (ECM) que tenga una deposición abundante de glicosaminoglicanos (GAG) es una característica de los condrocitos maduros funcionales [Hu2003]. El cartílago contiene alrededor de un 15–25% en peso seco de GAG [Aufderheide2004]. Los proteoglicanos compensan la matriz extracelular del cartílago articular y contribuyen a sus propiedades mecánicas [Hu2003,Eleswarapul2011]. Las hMSC fueron inducidas a sufrir un proceso de condrogénesis durante 6 semanas. Tras este proceso los *scaffolds* fueron teñidos con tinte azul alciano, el cual se utiliza para teñir de manera específica los glicosaminoglicanos [Duarte2011].

La Figura 110 muestra los agregados de cartílago sobre los tres *scaffolds* de diferente material. Se puede apreciar cómo estos agregados contienen GAG teñido de azul. Estos resultados demuestran la presencia de glicosaminoglicanos en todos los *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning*.



**Figura 110** Agregados de cartílago que contienen GAG teñido de azul sobre varios *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning*. a) PLLA0, b) PLLA1, c) PLLA5 y d) PLLA0 sin células (como control negativo).

Con el objetivo de comparar la habilidad para producir glicosaminoglicanos de las hMSC inducidas a la diferenciación en este tipo de *scaffolds*, se analizó la cantidad de GAG generado en cada *scaffold*. Todos los *scaffolds* mostraron un alto grado de producción de GAG. Además, el grado de secreción de GAG fue similar para todos ellos. Como se representa en la Figura 111, no se observaron diferencias significativas en el contenido de GAG entre los tres tipos de *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning*. Estos resultados indican que la competencia de los condrocitos derivados de hMSC para secretar GAG no se vio afectada por causa de la adición de peg-POSS. Incluso se podría decir que, comparando las muestras que contienen peg-POSS (PLLA1 y PLLA5) con las que no lo contienen (PLLA0), esta competencia para secretar GAG aumentó ligeramente en las muestras con peg-POSS. Por lo tanto, se puede concluir que el peg-POSS no inhibe la secreción de GAG.



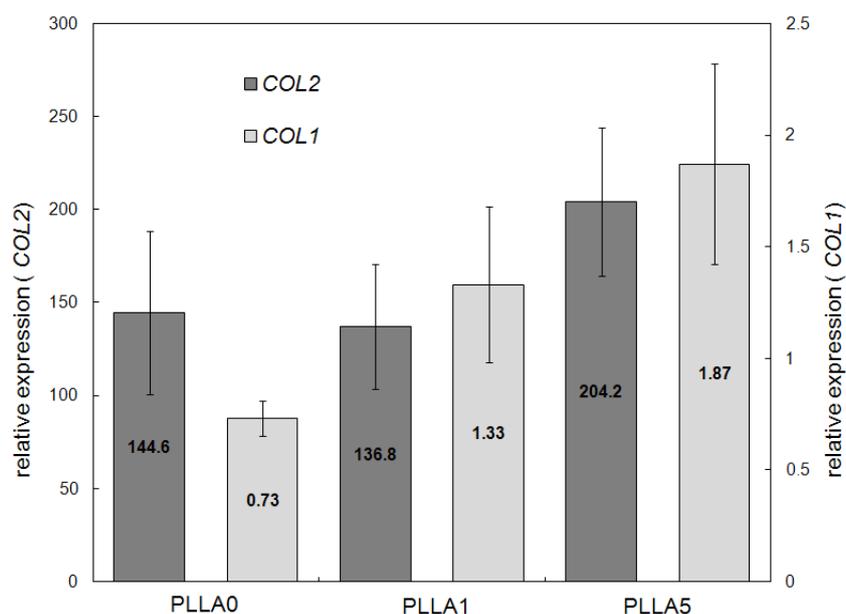
**Figura 111** Cuantificación del GAG a partir de cartílago derivado de hMSC sobre varios *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning*. Neg ctrl: control negativo (*scaffold* sin células). Los datos se presentan como media  $\pm$  SD.

El colágeno tipo II (*COL2*) es el marcador típico de los condrocitos diferenciados en cartílago hialino; justo lo contrario que el colágeno tipo I (*COL1*), que se manifiesta por ser el marcador típico de los condrocitos desdiferenciados, como el fibrocartílago. El cartílago articular contiene un 95% de fibras de colágeno tipo II, lo que conforma el 50% del peso seco del cartílago. Esta red le proporciona al tejido resistencia a la tracción [Aufderheide2004,Ochsner2010]. El análisis PCR en tiempo real se llevó a cabo para analizar la expresión mRNA de los genes específicos de cartílago articular en los condrocitos diferenciados de hMSC, con respecto a las hMSC normalizadas [Minogue2010,Martin2001, Lin2008].

La expresión de los genes *COL2* y *COL1* en los condrocitos derivados de hMSC mostró algunas diferencias entre los tres tipos de *scaffolds*. Para todos los *scaffolds* (PLLA0, PLLA1 y PLLA5), la expresión relativa del gen *COL2* se incrementó en gran medida en los condrocitos derivados de hMSC con respecto a las hMSC (144,58 $\pm$ 4406, 136,81 $\pm$ 33,61 y 204,17 $\pm$ 39,91, respectivamente), mientras que la expresión relativa del gen *COL1* se incrementó ligeramente (0,73 $\pm$ 0,08, 1,33 $\pm$ 0,35 y 1,87 $\pm$ 0,45, respectivamente) (Figura 112). El fuerte incremento (en número de veces) de la expresión del gen *COL2* de las células sembradas en los diferentes *scaffolds* con respecto a las hMSC no diferenciadas (un incremento de más de 100 veces) demuestra que el proceso condrogénico se indujo adecuadamente. Además, la muestra PLLA5 indujo la expresión del gen *COL2* en mayor medida que la muestras PLLA0 y PLLA1. En contraste, el nivel de inducción del gen *COL1* fue muy débil, y las diferencias entre los *scaffolds* no fueron ni relevantes ni comparables a

las diferencias observadas en la expresión del gen *COL2*. Para todos los *scaffolds*, los altos niveles de la expresión del gen *COL2* en comparación a la del *COL1* sugieren un proceso adecuado de diferenciación de cartílago. Asimismo, en los condrocitos derivados de hMSC, el mayor ratio de la expresión del gen *COL2* respecto al *COL1* significa un progreso hacia el fenotipo de cartílago maduro, como se ha visto en la bibliografía [Janjanin2008, Toegel2008].

Estos resultados sugieren que la adición de peg-POSS al PLLA no disminuyó la capacidad de las hMSC para diferenciarse en condrocitos en los *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning*. Se podría deducir que el peg-POSS parece no causar ningún tipo de nanotoxicidad.



**Figura 112** Expresión del gen relativo de los marcadores de cartílago articular (*COL1*, *COL2*) en los condrocitos derivados de hMSC cultivados en *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning*. Los valores mRNA de cada gen se normalizaron en GAPDH. Los datos se presentan como media  $\pm$  SD.

Por otro lado, el incremento en la superficie específica del *scaffold* (debido a la disminución de diámetro de fibra) parece no tener ningún efecto sobre el cultivo celular condrocítico, aunque podría ser adecuado para el cultivo de otro tipo de células. Cabe destacar que, teniendo nuestros *scaffolds* un tamaño de poro (1-10  $\mu\text{m}$ ) considerablemente menor que el documentado en bibliografía, las hMSC's fueron capaces de experimentar una diferenciación condrogénica adecuada, como se muestra por la presencia de GAG y la creciente expresión de los genes específicos de cartílago (*COL2* y *COL1*), demostrando así que es posible un cultivo celular adecuado con menores tamaños de poro.



## Capítulo 4

---

### **Conclusiones**



## 4 CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

En este capítulo se muestran las conclusiones generales derivadas del presente trabajo de investigación, las aportaciones más relevantes del mismo, así como las posibles líneas futuras que permitirían completar el trabajo desarrollado en esta tesis.

### 4.1 Conclusiones

A continuación se detallan las conclusiones a las que se ha llegado tras el desarrollo de la tesis.

#### Disolución-evaporación

- No se ha detectado que la adición de peg-POSS haya afectado a ningún parámetro del proceso de disolución-evaporación.
- A altos contenidos de peg-POSS (con el 5% en peso y superiores) los films se vuelven de color opaco, incluso blanquecino. Esto indicaría que el *nanocomposite* estaría saturado y precipitaría el peg-POSS.
- El proceso de evaporación de los films permite obtener *scaffolds* con diferentes rugosidades y porosidades. En la presente tesis se ha visto que tanto la rugosidad como la porosidad de los films contribuyen a una mayor actividad biológica, por lo que se podrían controlar mediante la evaporación.

#### Electrospinning

- La adición de peg-POSS no afecta de manera remarcable a la fibra de PLLA ni a sus características. Tan solo se observa una ligera disminución en el diámetro de la fibra al aumentar el contenido de peg-POSS, lo que vendría explicado por la disminución de la viscosidad de la disolución al aumentar el peg-POSS. El diámetro de la fibra disminuye al disminuir también la viscosidad de la disolución.
- Mediante el proceso de *electrospinning*, el peg-POSS parece que se dispersa adecuadamente en las fibras de PLLA, a juzgar por las imágenes SEM que indican que ni cambia la morfología de la fibra ni se producen aglomeraciones.

- La disminución del diámetro de fibra tiene como consecuencia el aumento del área específica del *scaffold*, lo que ha sido señalado como un factor positivo para mejorar el cultivo celular.
- La adición de peg-POSS tampoco afecta a la procesabilidad del PLLA. No se observó ningún efecto perjudicial en los parámetros de proceso respecto a los del PLLA.
- El grosor máximo del *scaffold* que se podría obtener mediante *electrospinning*, debido a la falta de atracción entre la aguja y el colector, sería de alrededor de 15-20  $\mu\text{m}$ . La adición de peg-POSS no afecta al grosor máximo de *scaffold* obtenido. Para fabricar *scaffolds* de este tipo con mayores grosores se deberían buscar métodos alternativos, o post-procesos tales como juntar y adherir varios *scaffolds* de grosor fino.

### Estudio de calorimetría

- El efecto de las nanomoléculas de peg-POSS combina la naturaleza plastificante del PEG y el efecto obstaculizador del POSS. Al aumentar la  $T_g$  con el contenido de peg-POSS, se deduce que el efecto global de la presencia de este *nanocomposite* es la reducción de la movilidad macromolecular.
- Los resultados muestran que la adición de peg-POSS obstaculiza la formación del cristal  $\alpha$  y favorece la nucleación y crecimiento del  $\alpha'$ , lo que sería interesante para mejorar la ductilidad del PLLA.
- Al añadir peg-POSS, las transiciones entre esas dos estructuras cristalinas tienen lugar a mayores temperaturas de cristalización isotérmicas. Además, las cinéticas de cristalización se acelerarían al generarse cristales  $\alpha'$ , mientras que ocurriría lo contrario para los cristales  $\alpha$ .
- La temperatura de fusión en equilibrio de ambos tipos de cristales se reduce al añadir peg-POSS, lo que indica que se obtienen estructuras menos estables.
- Para todas las muestras, la cristalinidad aumenta con la cantidad de peg-POSS. La cristalinidad también aumenta con la temperatura de cristalización isoterma.
- Al analizar el contenido de peg-POSS óptimo, se podría concluir que corresponde al 1% en peso. A ese porcentaje, se llegaría a un equilibrio en el que se aumentaría su efecto nucleante sin afectar demasiado a la movilidad macromolecular que permitiría el crecimiento cristalino.
- Respecto a la comparativa de los dos grados de PLLA, los resultados indican que el de grado biomédico tiene mayor capacidad de cristalización que el del sector envase/embalaje. Es probable que ésto se deba a la diferencia en peso molecular, a la menor cantidad de monómero residual, y/o a la menor presencia de impurezas. Por

otro lado, al analizar las transiciones térmicas del PLLA se observa que su comportamiento cambia al añadir nanomoléculas de peg-POSS. La capacidad de cristalización aumenta debido a su efecto nucleante. En cuanto al estudio isotérmico, se aprecia también un aumento en la capacidad máxima de cristalización, sobre todo para la muestra de grado biomédico.

### Termogravimetría

- La resistencia a la degradación térmica de la PLLA se aumentó de manera sustancial tras la adición de peg-POSS. Este comportamiento hace pensar en la presencia de cierta miscibilidad o interacciones entre ambas fases.

### Propiedades mecánicas

- Las propiedades mecánicas de las muestras mejoraron tras la adición de peg-POSS. El límite elástico de los *nanocomposites* aumentó ligeramente y de manera progresiva con la cantidad de peg-POSS. La deformación a rotura y la tenacidad también aumentaron, pero de manera más notable, sobre todo para los porcentajes altos en peg-POSS (5% en peso).
- No fue posible realizar ensayos de tracción convencionales (normalizados bajo norma ISO) sobre los *scaffolds* fabricados mediante *electrospinning*, principalmente debido a su fragilidad y a la dificultad de manipulación. Para ensayar estos *scaffolds* se deberían buscar ensayos mecánicos alternativos, que se adecuasen a sus circunstancias.

### Biodegradación en líquido fisiológico

- El ratio de biodegradación o porcentaje de pérdida de peso del material en líquido fisiológico disminuye a medida que aumenta el peg-POSS, mostrando una durabilidad mayor del *nanocomposite* en el tiempo.
- Para todas las muestras, el ratio de biodegradación en líquido fisiológico tiende a estabilizarse en el tiempo. Esto sería debido a la deposición de sales sobre la superficie de la muestra, formando una especie de piel que ralentizaría la difusión polímero-fluido en la zona de intercambio.
- El pH se mantuvo estable durante todo el experimento y para todas las muestras. Por lo tanto, el cultivo celular no se vería afectado como consecuencia de un cambio de pH.

### Biocompatibilidad y cultivo celular

- La adición de peg-POSS al PLLA no afecta a la biocompatibilidad de los *scaffolds* para obtener cartílago hialino a partir de hMSC's, por lo que las propiedades

biológicas del PLLA no se ven afectadas. Se podría deducir que el peg-POSS parece no causar ningún tipo de nanotoxicidad.

- Los *scaffolds* de nanofibras presentaron mejores propiedades biológicas que los fabricados mediante el proceso de disolución-evaporación, a juzgar por los resultados obtenidos en diversas pruebas.
- Los estudios biológicos muestran que las hMSC's fueron capaces de adherirse y extenderse de una manera similar a través de todos los *scaffolds*. La adición de peg-POSS no parece disminuir ni la viabilidad celular ni la capacidad de formar una monocapa.
- Los estudios SEM también confirman que las hMSC's alcanzaron una confluencia óptima para su diferenciación en condrocitos, lo que predice un proceso de condrogénesis de alta calidad.
- Los resultados también demuestran la capacidad de las hMSC's para diferenciarse en condrocitos en todos los *scaffolds*. Los condrocitos diferenciados a partir de hMSC's secretaron GAG, una característica específica de los condrocitos maduros, a gran nivel y de manera eficiente. Además, todos los *scaffolds* exhibieron un nivel parecido de secreción de GAG, por lo que parece que la adición de peg-POSS no inhibe la secreción de GAG (incluso la aumenta) y por lo tanto, tampoco perjudica a la diferenciación celular.
- El cartílago derivado de hMSC mostró altos niveles de expresión del gen *COL2* en comparación al *COL1* para todos los *scaffolds*, confirmando un proceso de diferenciación a cartílago adecuado. Los niveles de expresión del gen *COL1* fueron similares en todos los *scaffolds*. No así los del *COL2*, que sufrieron un importante incremento. Se puede deducir que la adición de peg-POSS no altera significativamente la expresión de los marcadores condrogénicos.
- El aumento del área específica del *scaffold* debido a la disminución del diámetro de fibra, parece no afectar al cultivo celular condrogénico, aunque podría ser beneficioso para el cultivo de otro tipo de células.
- Cabe destacar que, teniendo nuestros *scaffolds* un tamaño de poro (1-10  $\mu\text{m}$ ) considerablemente menor que el documentado en bibliografía, las hMSC's fueron capaces de experimentar una diferenciación condrogénica adecuada, como se muestra por la presencia de GAG y la creciente expresión de los genes específicos de cartílago (*COL2* y *COL1*), demostrando así que es posible un cultivo celular adecuado con menores tamaños de poro.

## 4.2 Aportaciones

Las aportaciones más relevantes derivadas de la investigación desarrollada en esta tesis, han sido las siguientes:

- Fabricación de *scaffolds* de peg-POSS/PLLA, de tipo mat de nanofibras, mediante el método de *electrospinning*, y la caracterización de su comportamiento biológico. También se ha analizado la configuración de los parámetros del proceso de *electrospinning*, la viscosidad del material y la resistencia a la biodegradación en líquido fisiológico. Los resultados se han comparado con los de un *scaffold* de PLLA puro. El trabajo ha sido enviado a la revista *Journal of Biomaterial Science: Polymer Edition* [Gómez-Sánchez2014], y a fecha de depósito de este documento, se encuentra en revisión.
- Estudio del comportamiento de la fusión y cristalización de *nanocomposites* peg-POSS/PLLA mediante calorimetría diferencial de barrido. Se ha realizado un estudio de la cristalización dinámica de las muestras, otro estudio de la cristalización isotérmica de las muestras, y por último, un estudio sobre la fusión de las muestras cristalizadas isotérmicamente, calculando a partir de ahí la cristalinidad máxima del material y la temperatura de fusión en equilibrio. Los resultados se han comparado con los del PLLA sin reforzar. Estos resultados han sido enviados a la revista *Polymer* [Gómez-Sánchez2014b], y a fecha de depósito de este documento, se encuentra en revisión.
- Estudio del comportamiento de la fusión y cristalización de *nanocomposites* peg-POSS/PLLA, en forma de film, mediante calorimetría diferencial de barrido. Los films se han fabricado mediante el método de disolución-evaporación, a partir de PLLA de grado médico y de grado comercial. Por un lado, se estudia el efecto del proceso de fabricación sobre la cristalización de las muestras. Por otro lado, se realiza una comparativa de los dos grados de PLLA y de sus *nanocomposites*, mediante una cristalización dinámica y su posterior fusión. Los resultados fueron presentados en una comunicación oral en el XII Congreso Nacional de Materiales Compuestos MATCOMP (Algeciras, 2013). [Gómez-Sánchez2013]
- Estudio de las propiedades térmicas de *nanocomposites* peg-POSS y amino-propil isobutil-POSS basados en PLLA. Se analizó la degradación térmica y el comportamiento a fusión de los materiales. Los resultados fueron presentados en una comunicación oral en el XI Congreso Nacional de Materiales (Zaragoza, 2010). [Gómez-Sánchez2010].

### 4.3 Líneas futuras

Las principales líneas de investigación que han quedado abiertas tras el desarrollo del presente trabajo de investigación son las siguientes:

- Fabricación de *scaffolds* 3D mediante el proceso de moldeo-inyección, y su posterior caracterización. A estos *scaffolds* se les podría aplicar operaciones posteriores con el fin de aumentar su rugosidad superficial o porosidad interna, mejorando así su biocompatibilidad. Una vez fabricados estos *scaffolds*, se llevaría a cabo una completa caracterización que incluiría el estudio de las propiedades físicas y termo-mecánicas, el estudio de las propiedades biológicas y el estudio del tiempo de biodegradación en líquido fisiológico.
- Análisis de la cristalinidad de las muestras tras realizarse ensayos dinámicos de cristalización a diferentes velocidades de enfriamiento, con el fin de simular un proceso de fabricación de *scaffolds* basado en el moldeo-inyección, y poder relacionarlo con las propiedades mecánicas.
- Análisis de las propiedades mecánicas de las fibras obtenidas mediante *electrospinning*. Para ello, se deberían buscar ensayos mecánicos alternativos, que se adecuasen a las características de estos *scaffolds*.
- Análisis de cómo afectaría la estructura cristalina obtenida (aumento de cristalinidad obtenida tras la cristalización isotérmica), al tiempo de biodegradación. Para ello habría que optimizar los ensayos de biodegradación, buscando algún modo de evitar la aparición de la capa que se formaba en la superficie de las muestras, y que impedía una correcta biodegradación del material en sí. Este problema enmascararía el ratio de biodegradación real del material, por lo que quizás no se apreciarían diferencias a pesar de aumentar la cristalinidad de éste.
- Estudio de cómo afectaría la estructura cristalina (aumento de cristalinidad) a las propiedades mecánicas tras cristalización isotérmica.
- Realizar ensayos biológicos complementarios *in vitro* e *in vivo* de los *nanocomposites*, siguiendo la normativa vigente impuesta por la Food and Drug Administration (FDA) con el fin de comprobar su bioresorbabilidad y su correcta integración en el organismo. Sería necesario un control de estos *nanocomposites* en el tiempo para asegurar que el peg-POSS es biocompatible y no produce efectos adversos a largo plazo.

---

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



---

## Bibliografía

---

[Abad2003] Abad M.J., Barral L., Fasce D.P., Williams R.J.J. Epoxy networks containing large mass fractions of a monofunctional Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS). *Macromolecules*, *36*, 3128, (2003).

[Abdul-Rahman2010] Abdul-Rahman N., Gizdavic-Nikolaidis M., Ray S., Eastal A., Travas-Sejdic J. Functional electrospun nanofibres of poly (lactic acid) blends with polyaniline or poly (aniline-co-benzoic acid). *Synthetic Metals*, *160*, 2015–2022, (2010).

[Alexandre2000] Alexandre M., Dubois P. Polymer-layered silicate nanocomposites: Preparation, properties and uses of a new class of materials. *Materials Science Engineering: Reports*, *R28*, 1, (2000).

[Andrady2008] Andrady A.L. Science and Technology of Polymer Nanofibers (Vol. 44). Hoboken, NJ: *John Wiley & Sons*, Inc, (2008)

[Andreopoulos1999] Andreopoulos A.G., Hatsi E., Doxastakis M. Synthesis and properties, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, *10*, 29, (1999).

[Arraiza2007] Arraiza A.L., Sarasua J.R., Verdu J., Colin X. Rheological behavior and modeling of thermal degradation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and poly (l-lactide). *Int. Polym. Proc.*, *22*, 389–394, (2007).

[ASTM] <http://www.astm.org/>

[Aufderheide2004] Aufderheide A.C., Athanasiou K.A. Mechanical stimulation toward tissue engineering of the knee meniscus. *Ann. Biomed. Eng.*, *32*, 1161–1174, (2004).

[Ayandele2012] Ayandele E., Sarkar B., Alexandridis P. Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS)-Containing Polymer Nanocomposites. *Nanomaterials*, *2*, 445–475, (2012).

[Baldi2007] Baldi F., Bignotti F., Fina A., Tabuani D., Ricco T. Mechanical characterization of polyhedral oligomeric silsesquioxane/polypropylene blends. *Journal Applied Polymer Science*, *105*, 935, (2007).

[Baoqi2008] Baoqi Z., Feng Z., Lun B. Study on the phase distribution of electrospun SF/PLA blends nanofibers. *Textile Bioengineering and Informatics Symposium Proceedings*, 14-16 August, Hong Kong, China, p. 649–653, (2008).

[Bergshoef1999] Bergshoef M.M., Vancso G.J. Transparent nanocomposites with ultrathin, electrospun nylon-4,6 fiber reinforcement. *Advanced Materials*, *11(16)*, 1362–1365, (1999).

[Boccaccini2006] Boccaccini A.R., Blaker J.J., Maquet V., Chung W., Jerome R., Nazhat S. N. Poly(D,L-lactide) (PDLLA) foams with TiO<sub>2</sub> nanoparticles and PDLLA/TiO<sub>2</sub>-Bioglass® foam composites for tissue engineering scaffolds. *Journal of Materials Science*, *41*, 3999–4008, (2006).

- [Boccaccini2010] Boccaccini A.R., Erol M., Stark W.J., Mohn D., Hong Z., Mano J.F. Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review. *Composites Science and Technology*, 70, 1764–1776, (2010).
- [Borden 2002] Borden M., Attawia M., Khan Y., Laurencin C.T. Tissue engineered microsphere-based matrices for bone repair: Design and evaluation. *Biomaterials*, 23, 551–559, (2002).
- [Bretcanu2009] Bretcanu O., Misra S.K., Yunos D.M., Boccaccini A.R., Roy I., Kowalczyk T., et al. Electrospun nanofibrous biodegradable polyester coatings on Bioglass®-based glass-ceramics for tissue engineering. *Materials Chemistry and Physics*, 118, 420–426, (2009).
- [Calvert2003] Calvert J.W., Weiss L.E., Sundine M.J. New frontiers in bone tissue engineering. *Clin. Plast. Surg.*, 30, 641–648, (2003).
- [Cancedda2003] Cancedda R., Dozin B., Giannoni P., Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol.*, 22, 81–91, (2003).
- [Cao2010] Cao H., Kuboyama N. A biodegradable porous composite *scaffold* of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering. *Bone*, 46, 386–395, (2010).
- [Caplan2005] Caplan A.I. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue engineering*, 11(7-8), 1198–1211, (2005).
- [Carrasco2010] Carrasco F., Pagès P., Gámez-Pérez J., Santana O.O., MasPOCH M.L. Processing of poly(lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties. *Polymer Degradation and Stability*, 95, 116–125, (2010).
- [Chang2003] Chang J., An Y., Sur G. Poly (lactic acid) nanocomposites with various organoclays. I. Thermomechanical properties, morphology, and gas permeability. *J. Polym. Sci. Pol. Phys.*, 41, 94–103, (2003).
- [Chen2003] Chen C.C., Chue J.Y., Tseng H.M., Huang H.M., Lee S.Y. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. *Biomaterials*, 24, 1167, (2003).
- [Chen2006] Chen J.H., Chiou Y.D. Crystallization behavior and morphological development of isotactic polypropylene blended with nanostructured polyhedral oligomeric silsesquioxane molecules. *Journal Polymer Science: Polymer Physics*, 44, 2122, (2006).
- [Chen2007] Chen J.H., Yao B.X., Su W.B., Yang Y.B. Isothermal crystallization behavior of isotactic polypropylene blended with small loading of polyhedral oligomeric silsesquioxane. *Polymer*, 48, 1756, (2007).
- [Chen2008] Chen Y., Mak A., Wang M., Li J., Wong M. *In vitro* behavior of osteoblast-like cells on PLLA films with a biomimetic apatite or apatite/collagen composite coating. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 2261–2268, (2008).
- [Chen2009] Chen H., Pyda M., Cebe P. Non-isothermal crystallization of PET/PLA blends. *Thermochimica Acta*, 492, 61–66, (2009).
- [Chen2009b] Chen M., Patra P.K., Lovett M.L., Kaplan D.L., Bhowmick S. Role of electrospun fibre diameter and corresponding specific surface area (SSA) and cell attachment. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3, 269–279, (2009).

- [Chen2013] Chen H.M., Zhang W.B., Du X.C., Yang J.H., Zhang N., Huang T., Wang Y. Crystallization kinetics and melting behaviors of poly(L-lactide)/graphene oxides composites. *Thermochimica Acta*, 566, 57–70, (2013).
- [Chen2013b] Chen L., Tang C.Y., Tsui C.P., Chen D.Z. Mechanical properties and *in vitro* evaluation of bioactivity and degradation of dexamethasone-releasing poly-D-L-lactide/nano-hydroxyapatite composite scaffolds. *J. Mech. Behav. Biomed.*, 22, 41–50, (2013).
- [Cheung2007] Cheung H.Y., Lau K.T., Lu T.P., Hui D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites Part B: Engineering*, 38, 291–300, (2007).
- [Cheung2010] Cheung H.Y., Lau K.T., Pow Y.F., Zhao Y.Q., Hui D. Biodegradation of a silkworm silk/PLA composite. *Compos. Part B-Eng.*, 41, 223–228, (2010).
- [Cordell2009] Cordell J.M., Vogl M.L., Wagoner A.J. The influence of micropore size on the mechanical properties of bulk hydroxyapatite and hydroxyapatite scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2, 560–570, (2009).
- [CPM] <http://www.arthroscopy.com/sp06000.htm>
- [Crow2005] Crow B.B., Borneman A.F., Hawkins D.L., Smith G.M., Nelson K.D. Evaluation of *in vitro* drug release, pH change, and molecular weight degradation of poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactide-coglycolide) fibers. *Tissue Eng.*, 11, 1077–1084, (2005).
- [Crow2006] Crow B.B., Nelson K.D. Release of bovine serum albumin from a hydrogel-cored biodegradable polymer fiber. *Biopolymers*, 81, 419–427, (2006).
- [Dagalakis1980] Dagalakis N., Flink J., Stasikelis P., Burke J.F., Yannas I.V. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. *J. Biomed. Mater. Res.*, 14, 511–528, (1980).
- [Damrongrungruang2007] Damrongrungruang T., Siritapetawee M., Kamanarong K., Limmonthon S., Rattanathongkom A., Maensiri S., et al. Fabrication of Electrospun Thai Silk Fibroin Nanofiber and Its Effect on Human Gingival Fibroblast: A Preliminary Study. *Journal of Oral Tissue Engineering*, 5, 1–6, (2007).
- [Delabarde2011] Delabarde C., Plummer C.J.G., Bourban P., Manson J.E. Accelerated ageing and degradation in poly-L-lactide/hydroxyapatite nanocomposites. *Polym. Degrad. Stab.*, 96, 595, (2011).
- [Di2005] Di Y., Iannace S., Di Maio E., Nicolais L. Reactively modified poly(lactic-acid): properties and foam processing. *Macromol. Mater. Eng.*, 290, 1083–1090, (2005).
- [Domingos2009] Domingos M., Dinucci D., Cometa S., Alderighi M., Bártolo P.J., Chiellini F. Polycaprolactone scaffolds fabricated via bioextrusion for tissue engineering applications. *Int. J. Biomat.*, 2009, 1–9, (2009).
- [Drumright2000] Henton D.E., Gruber P., Lunt J., Randall J. Polylactic acid technology. In: Mohanty A.K., Misra M., Drzal L.T., editors. *Natural fibers, biopolymers, and biocomposites*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis; p.527–577, (2005).
- [Duarte2011] Duarte R., Glazebrook M.A., Castro V., Vasconcelos A.C. Achilles tendinosis-a morphometrical study in a rat model. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 4, 683–691, (2011).

- [Eleswarapul2011] Eleswarapul S.W., Responde D.J., Athanasiou K.A. Tensile properties, collagen content, and crosslinks in connective tissues of the immature knee joint. *PLoS one* 6:e26178. (doi:10.1371/journal.pone.0026178), (2011).
- [Fierz2008] Fierz F.C., Beckmann F., Huser M., Irsen S.H., Leukers B., Witte F., et al. The morphology of anisotropic 3D-printed hydroxyapatite *scaffolds*. *Biomaterials*, 29, 3799–3806, (2008).
- [Fischer1973] Fischer E.W., Sterzel-Wegner H.J., Kolloid Z. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions. *Polym.*, 251, 980, (1973).
- [Fryczkowski2009] Fryczkowski R., Kowalczyk T. Nanofibres from polyaniline/polyhydroxybutyrate blends. *Synthetic Met.*, 159, 2266–2268, (2009).
- [Fukushima2009]. Fukushima K., Tabuani D., Camino G. Nanocomposites of PLA and PCL based on montmorillonite and sepiolite. *Materials Science and Engineering C*, 29, 1433–1441, (2009).
- [Gaona2012] Gaona L.A., Gómez-Ribelles J.L., Perilla J.E., Lebourg M. Hydrolytic degradation of PLLA/PCL microporous membranes prepared by freeze extraction. *Polym. Degrad. Stabil.*, 97, 1621–1632, (2012).
- [Gente2000] Gente G., La Mesa C. Water—Trifluoroethanol Mixtures: Some Physicochemical Properties. *Journal of Solution Chemistry*, 29, 11, (2000).
- [Georgiou2007] Georgiou G., Mathieu L., Pioletti D.P., Bourban P.E., Manson J.A.E., Knowles J.C., Nazhat S.N. Polylactic Acid-Phosphate Glass Composite Foams as *Scaffolds* for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials research PartB: Applied Biomaterials*, 322–331, (2007).
- [Ginzburg2000] Ginzburg V.V., Singh C., Balzas A.C. Theoretical phase diagrams of polymer/clay composites: the role of grafted organic modifiers. *Macromolecules*, 33, 1089, (2000).
- [Goffin2010] Goffin A.L., Duquesne E., Raquez J.M., Miltner H.E., Ke X., Alexandre M., Van Tendeloo G., Van Mele B., Dubois P. From polyester grafting onto POSS nanocage by ring-opening polymerization to high performance polyester/POSS nanocomposites. *Journal of Materials Chemistry*, 20, 9415–9422, (2010).
- [Gomes2001] Gomes M.E., Ribeiro A.S., Malafaya P.B., Reis R.L., Cunha A.M. A new approach based on injection moulding to produce biodegradable starch-based polymeric *scaffolds*: morphology, mechanical and degradation behaviour. *Biomaterials*, 22, 883–889, (2001).
- [Gómez-Sánchez2010] Gómez-Sánchez C., López-Arraiza A., Gondra K., Suarez M.J., Aurrekoetxea J., Arostegui A. Nanocomposites basados en ácido poliláctico. In proceedings: *XI Congreso Nacional de Materiales-Zaragoza (Spain)* (2010).
- [Gómez-Sánchez2013] Gómez-Sánchez C., López-Arraiza A., Sarrionandia M., Aurrekoetxea J. Fusión y cristalización de nanocomposites PLLA/POSS basados en grados industriales y médicos. In proceedings: *X Congreso Nacional de Materiales Compuestos COMATCOMP-Algeciras (Spain)* (2013).
- [Gómez-Sánchez2014] Gómez-Sánchez C., López-Arraiza A., Ruiz De Eguino G., Kowalczyk T., Infante A., Rodriguez C.I., Kowalewski T.A., Sarrionandia M., Aurrekoetxea J.

*Electrospinning* of poly(lactic acid)/polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposites and their potential in chondrogenic tissue regeneration. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, (2014).

[Gómez-Sánchez2014b] Gómez-Sánchez C., López-Arraiza A., Sarrionandia M., Aurrekoetxea J. Effect of poly(ethylene glycol)-polyhedral oligomeric silsesquioxane nanomolecules on the isothermal crystallization and melting behavior of poly(L-lactide) acid nanocomposites. *Polymer*, (2014).

[Griffon2006] Griffon D.J., Sedighi M.R., Schaeffer D.V., Eurell J.A., Johnson A.L. Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomater.*, May2(3), 313–320, (2006).

[Haddad1996] Haddad T.S., Lichtenhan J.D. Hybrid organic-inorganic thermoplastics: styryl-based polyhedral oligomeric silsesquioxane polymers. *Macromolecules*, 29, 7302, (1996).

[Han2010] Han J., Branford-White C., Zhu L. Preparation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/poly (trimethylene carbonate) blend nanofibers by electrospinning. *Carbohydrate Polymers*, 79, 214–218, (2010).

[Hao2007] Hao N., Bohning M., Goering H., Schönhals A. Nanocomposites of polyhedral oligomeric phenethylsilsesquioxanes and poly(bisphenol A carbonate) as investigated by dielectric spectroscopy. *Macromolecules*, 40, 2955, (2007).

[Haroosh2011] Haroosh H.J., Chaudhary D.S., Dong Y. Effect of solution parameters on electrospun PLA/PCL fibers. Chemeca 2011: *Engineering a Better World*: Sydney Hilton Hotel, NSW, Australia, 18-21 September, (2011).

[Hicks1993] Hicks L.D., Dresselhaus M.S. Effect of quantum-well structures on the thermoelectric figure of merit. *Physical Review B: Condensed Matter and Materials Physics*, 47, 12727, (1993).

[Hoffman1962] Hoffman J.D., Weeks J.J. Melting process and equilibrium melting temperature of polychlorotrifluoroethylene. *J. Res. Nat. Inst. Stand. Technol.*, 66A, 13–28, (1962).

[Hoffman1976] Hoffman J.D., Davis T.G., Lauritzen J.I. The rate of crystallization of linear polymers with chain folding. In: Hannay N.B., editor. *Treatise on Solid State Chemistry*, Vol. 3: Crystalline and Noncrystalline Solids, Plenum Press, New York, chap.7, p:497–614, (1976).

[Hong2007] Hong H., Liang G. Concentration dependence of solution crystallization for poly(L-lactide) in p-xylene. *Materials letters*, 61, 1384–1387, (2007).

[Hu2003] Hu J.C.Y., Athanasiou K.A. Chapter 4: Structure and function of articular cartilage. In: An Y.H., Martin K.L., editors. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Totowa, NJ: Humana Press, pp.73–95, (2003).

[Hu2008] Hu X., Zhou J., Zhang N., Tan H., Gao C. Preparation and properties of an injectable scaffold of poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles/chitosan hydrogel. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1, 352-359, (2008).

[Huang1998] Huang J., Lisowski M.S., Runt J., Hall E.S., Kean K.T., Buehler N., Lin J.S. Crystallization and Microstructure of Poly (L-lactide-co-meso-lactide) Copolymers, *Macromolecules*, 31, 2593, (1998).

[Huang2003] Huang Z.M., Zhang Y.Z., Kotaki M., Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by *electrospinning* and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63, 2223–2253, (2003).

[Huang2009] Huang K.W., Tsai L.W., Kuo S.W. Influence of octakis-functionalized polyhedral oligomeric silsesquioxanes on the physical properties of their polymer nanocomposites. *Polymer*, 50, 4876–4887, (2009).

[Huang2010] Huang N., Lee R., Li S. Engineering of aligned skeletal muscle by micropatterning. *American Journal of Translational Research*, 2(1), 43–55, (2010).

[Hunziker2002] Hunziker E.B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 432–463, (2002).

[Hutmacher2000] Hutmacher D.W. *Scaffolds* in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529–2543, (2000).

[Hutmacher2003] Hutmacher D.W., Sittinger M. Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Eng.*, 9, 45–64, (2003).

[HYBPL] <http://www.hybridplastics.com>

[Illescas2010] Illescas S., Arostegui A., Schiraldi D.A., Sánchez-Soto M., Velasco J.I. The role of polyhedral oligomeric silsesquioxane on the thermo-mechanical properties of polyoxymethylene copolymer based nanocomposites. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10, 1349, (2010).

[IMSER] Informe 2010 de las Personas Mayores en España. Observatorio de Personas Mayores del IMSERSO. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Gobierno de España. Datos extraídos del INE, (2010).

[INBIOBANK] <http://www.inbiobank.org>

[INJ] <http://www.lovimedica.com.mx/hueso.asp>

[ISO] <http://www.iso.org/iso/home.html>

[Iyer2007] Iyer S., Schiraldi D.A. Role of specific interactions and solubility in the reinforcement of bisphenol A polymers with polyhedral oligomeric silsesquioxanes. *Macromolecules*, 40, 4942–4952, (2007).

[Janjanin2008] Janjanin S., Li W.J., Morgan M.T., Shanti R.M., Tuan R.S. Mold-shaped, nanofiber *scaffold*-based cartilage engineering using human mesenchymal stem cells and bioreactor. *Journal of Surgical Research*, 149, 47–56, (2008).

[Joshi2004] Joshi M., Butola B.S. Studies on nonisothermal crystallization of HDPE/POSS nanocomposites. *Polymer*, 45, 4953, (2004).

[Jun2003] Jun Z., Hou H.Q., Schaper A., Wendorff J.H., Greiner A. Poly-l-lactide nanofibers by *electrospinning*—influence of solution viscosity and electrical conductivity on fiber diameter and fiber morphology. *e-Polymers*, 9, 1–9, (2003).

[Kalb1980] Kalb B., Pennings A.J. General crystallization behavior of poly(L-lactic acid). *Polymer*, 21, 607–612, (1980).

- [Ke2003] Ke T., Sun X. Melting behavior and crystallization kinetics of starch and poly(lactic acid) composites. *J. Appl. Polym. Sci.*, 89, 1203–1210, (2003).
- [Kim2000] Kim C., Cho K., Choi E., Park J. Effect of P(ILA-co-εCL) on the compatibility and crystallization behavior of PCL/PLLA blends. *J. Appl. Polym. Sci.*, 77, 226–231, (2000).
- [Kim2006] Kim H.W., Lee H.H., Knowles J.C. *Electrospinning* biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.*, 79A, 643–649, (2006).
- [Kim2006b] Taek K.K., Jun J.Y., Doo S.L., Park T.G. Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres. *Biomaterials*, 27, 152–159, (2006).
- [Kim2008] Kim J.K., Yoon K.H., Bang D.S., Park Y.B., Kim H.U., Bang Y.H. Morphology and rheological behaviors of poly(ethylene terephthalate) nanocomposites containing polyhedral oligomeric silsesquioxanes. *Journal Applied Polymer Science*, 107, 272–279, (2008).
- [Kingery1976] Kingery K.D., Bowen H.K., Uhlmann D.R. Introduction to Ceramics, 2<sup>nd</sup> edition, Wiley, New York, (1976).
- [Koh2006] Koh Y.H., Bae C.J., Sun J.J., Jun I.K., Kim H.E. Macrochanneled poly (ε-caprolactone)/hydroxyapatite *scaffold* by combination of bi-axial machining and lamination. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17, 773–778, (2006).
- [Kojima1993] Kojima Y., Usuki A., Kawasumi M., Okada A., Fukushima Y., Kurauchi T., Kamigaito O. Mechanical properties of nylon 6-clay hybrid. *Journal of Materials Research*, 8, 1185, (1993).
- [Kolstad1996] Kolstad J.J. Crystallization kinetics of poly(L-lactide-co-meso-lactide). *J. Appl. Polym. Sci.*, 62, 1079–1091, (1996).
- [Kopinke1996] Kopinke F.D., Remmler M., Mackenzie K., Möder M., Wachsen O. Thermal decomposition of biodegradable polyesters - II. Poly(lactic acid). *Polym. Degrad. Stab.*, 53, 329, (1996).
- [Kowalczyk2008] Kowalczyk T., Nowicka A., Elbaum D., Kowalewski T.A. *Electrospinning* of bovine serum albumin. Optimization and the use for production of biosensors. *Biomacromolecules*, 9, 2087–2090, (2008).
- [Kowalewski2009] Kowalewski T.A., Barral S., Kowalczyk T. Modeling *Electrospinning* of Nanofibers. In: Pyrz R., Rauhe J.C., editors. IUTAM Symposium on Modelling Nanomaterials and Nanosystems, vol.13. Aalborg, Denmark: IUTAM Bookseries, Springer Science+Business Media B.V., pp.279–293, (2009).
- [Kunioka2006] Kunioka M., Ninomiya F., Funabashi M. Biodegradation of poly(lactic acid) powders proposed as the reference test materials for the international standard of biodegradation evaluation methods. *Polymer Degradation and Stability*, 91, 1919–1928, (2006).
- [LaCarrubba2008] Carrubba V.L., Pavia F.C., Brucato V., Piccarolo S. PLLA/PLA *scaffolds* prepared via thermally induced phase separation (TIPS): Tuning of properties and biodegradability. *International Journal of Material Forming*, 1, 619–622, (2008).
- [Lee1998] Lee A., Lichtenhan J.D. Viscoelastic responses of polyhedral oligosilsesquioxane reinforced epoxy systems. *Macromolecules*, 31, 4970, (1998).

- [Lee2005] Lee Y.H., Lee J.H., An I.G., Kim C., Lee D.S., Lee Y.K., Nam J.D. Electrospun dual-porosity structure and biodegradation morphology of Montmorillonite reinforced PLLA nanocomposite *scaffolds*. *Biomaterials*, *26*, 3165–3172, (2005).
- [Lee2010] Lee G., Song J., Yoon K. Controlled wall thickness and porosity of polymeric hollow nanofibers by coaxial electrospinning. *Macromolecular Research*, *18*, 571–576, (2010).
- [Leong2003] Leong K.F., Cheah C.M., Chua C.K. Solid freeform fabrication of threedimensional *scaffolds* for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*, *24*, 2363–2378, (2003).
- [Li2002] Li W.J., Laurencin C.T., Caterson E.J., Tuan R.S., Ko F.K. Electrospun nanofibrous structure: A novel *scaffold* for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.*, *60(4)*, 613–621, (2002).
- [Li2005] Li D., Ouyang G., McCann J.T., Xia Y. Collecting electrospun nanofibers with patterned electrodes. *Nano Lett.*, *5*, 913, (2005).
- [Li2009] Li J., Li Y., Li L., Mak A., Ko F., Qin L. Preparation and biodegradation of electrospun PLLA/keratin nonwoven fibrous membrane. *Polymer Degradation and Stability*, *94*, 1800–1807, (2009).
- [Lichtenhan1995] Lichtenhan J.D., Otonari Y.A., Carr M.J. Linear hybrid polymer building blocks: methacrylate-functionalized polyhedral oligomeric silsesquioxane monomers and polymers. *Macromolecules*, *28*, 8435, (1995).
- [Lien2009] Lien S.M., Ko L.Y., Huang T.J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin *scaffold* for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.*, *5*, 670–679, (2009).
- [Lim2008] Lim L.T., Auras R., Rubino M. Processing technologies for poly (lactic acid). *Progress in Polymer Science*, *33(8)*, 820–852, (2008).
- [Lin2006] Lin H.C., Kuo S.W., Huang C.F., Chang F.C. Thermal and surface properties of phenolic nanocomposites containing octaphenol polyhedral oligomeric silsesquioxane. *Macromol. Rapid. Commun.*, *27*, 537, (2006).
- [Lin2008] Lin Z., Pavlos N.J., Cake M.A., Wood D.J., Xu J., Zheng M.H. Evidence that human cartilage and chondrocytes do not express calcitonin receptor. *Osteoarthr. Cartilage*, *16*, 450–457, (2008).
- [Lu2007] Lu H., Zhang S., Cheng L., Chen P., Zhou W., Liu J., Zhou J. Repair of articular cartilage defect with cell-loaded nano-HA/PLGA composites. *Key Engineering Materials, Vol. 330-332 II*, pp.1185–1188, (2007).
- [Lunt1998] Lunt J. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polymer Degradation and Stability*, *59*, 145–152, (1998).
- [Martin2001] Martin I., Jakob M., Schaefer D., Dick W., Spagnoli G., Heberer M. Quantitative analysis of gene expression in articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Osteoarthr. Cartilage*, *9*, 112–118, (2001).
- [Meaurio2006] Meaurio E., López-Rodríguez N., Sarasua J.R. Infrared Spectrum of Poly(L-lactide): Application to Crystallinity Studies. *Macromolecules*, *39*, 9291–9301, (2006).

- [MEDM] MedMarket Diligence, LLC. "Tissue Engineering, Cell Therapy and Transplantation: Products, Technologies & Market Opportunities, Worldwide, (2009-2018). <http://blog.mediligence.com/wp-content/uploads/2012/01/cell-tissue-forecast.jpg>
- [Meinel2004] Meinel L., Karageorgiou V., Fajardo R., Snyder B., Shinde-Patil V., Zichner L., et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: Effects of *scaffold* material and medium flow. *Annals of Biomedical Engineering*, *32*, 112–122, (2004).
- [Melchels2009] Melchels F.P.W., Feijen J., Grijpma D.W. A poly(d,l-lactide) resin for the preparation of tissue engineering *scaffolds* by stereolithography. *Biomaterials*, *30*, 3801–3809, (2009).
- [Migliaresi1991] Migliaresi C., Cohn D., De Lollis A., Fambri L. Dynamic mechanical and calorimetric analysis of compression molded PLLA of different molecular weights. *J. Appl. Polym. Sci.*, *43*, 83–95, (1991).
- [Mikos1994] Mikos A., Thorsen A., Czerwonka L., Bao Y., Langer R., Winslow D., et al. Preparation and characterization of poly (L-lactic acid) foams. *Polymer*, *35*, 1068–1077, (1994).
- [Mikos2000] Mikos A.G., Temenoff J.S. Formation of highly porous biodegradable *scaffolds* for tissue engineering. *Electron. J. Biotechnol.*, *3*, 114–119, (2000).
- [Minogue2010] Minogue B., Richardson S., Zeef L., Freemont A., Hoyland J. Transcriptional profiling of bovine intervertebral disc cells: implications for identification of normal and degenerate human intervertebral disc cell phenotypes. *Arthritis Res. Ther.*, *12*, 22, (2010).
- [Misra2007] Misra S., Watts P., Valappil S., Silva S., Roy I., Boccaccini A. Poly(3-hydroxybutyrate)/Bioglass composite films containing carbon nanotubes. *Nanotechnology*, *18*, p.075701, (2007).
- [Misra2008] Misra S.K., Mohn D., Brunner T.J., Stark W.J., Philip S.E., Roy I., et al. Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P(3HB)/Bioglass composites. *Biomaterials*, *29*, 1750–1761, (2008).
- [Miyata1998] Miyata T., Masuko T. Crystallization behaviour of poly (L-lactide), *Polymer*, *39*, 5515, (1998).
- [Mooney1996] Mooney D.J., Baldwin D.F., Suh N.P., Vacanti J.P., Langer R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(d,l-lactic-coglycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*, *17*, 1417–1422, (1996).
- [Mu2007] Mu J., Liu Y., Zheng S. Inorganic-organic interpenetrating polymer networks involving polyhedral oligomeric silsesquioxane and poly(ethylene oxide). *Polymer*, *48*, 1176–1184, (2007).
- [Murariu2007] Murariu M., Silva A.D., Degee P., Alexandre M., Dubois P. Polylactide compositions. Part 1: Effect of filler content and size on mechanical properties of PLA/calcium sulfate composites. *Polymer*, *48*, 2613–2618, (2007).
- [Mya2006] Mya K.Y., Pramoda K.P., He C.B. Crystallization behavior of star-shaped poly(ethylene oxide) with cubic silsesquioxane (CSSQ) core. *Polymer*, *47*, 5035–5043, (2006).
- [Nair2007] Nair L.S., Laurencin C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, *32*, 762–798, (2007).

- [Nampoothiri2010] Nampoothiri K.M., Nair N.R., John R.P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource technology*, 101(22), 8493–8501, (2010).
- [Narayanan2004] Narayanan N., Roychoudhury P., Srivastava A. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7, 167–178, (2004).
- [Narladkar2008] Narladkar A., Balnois E., Vignaud G., Grohens Y. Difference in glass transition behavior between semi crystalline and amorphous poly(lactic acid) thin films. *Macromol. Symp.* 273, 146–152, (2008).
- [NATURW] <http://www.natureworksllc.com/>
- [Neves2005] Neves N.M., Kouyumdzhiev A., Reis R.L. The morphology, mechanical properties and ageing behavior of porous injection molded starch-based blends for tissue engineering scaffolding. *Mater. Sci. Eng. C*, 25, 195–200, (2005).
- [Nieddu2009] Nieddu E., Mazzucco L., Gentile P., Benko T., Balbo V., Mandrile R., Ciardelli G. Preparation and biodegradation of clay composites of PLA. *React. Funct. Polym.*, 69, 371–379, (2009).
- [Nofar2013] Nofar M., Tabatabaei A., Park C.B. Effects of nano-/micro-sized additives on the crystallization behaviors of PLA and PLA/CO<sub>2</sub> mixtures. *Polymer*, 54, 9, 2382–2391, (2013).
- [NUHS] NUS Tissue Engineering Programme. National University Health System. <http://www.nuhs.edu.sg/research/programmatic-research/som-registered-programmes/nus-tissue-engineering-programme.html>
- [OBrien2004] O'Brien F.J., Harley B.A., Yannas I.V., Gibson L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 25, 1077–1086, (2004).
- [OBrien2005] O'Brien F.J., Harley B.A., Yannas I.V., Gibson L. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 26, 433–441, (2005).
- [Ochsner2010] Ochsner A., Ahmed W. Bone and cartilage - its structure and physical properties. In: Ochsner A., Ahmed W., editors. *Biomechanics of hard tissues: modelling, testing, and materials*. Germany: WILEY-VCH GmbH & Co. pp.1–75, (2010).
- [OECD] OECD Factbook 2011: Economic, Environmental and Social Statistics. OECD, Biotechnology Statistics Database, (2011). <http://dx.doi.org/10.1787/888932505982>
- [Ogata1997] Ogata N., Jimenez G., Kawai H., Ogihara T. Structure and thermal/mechanical properties of poly (l-lactide)-clay blend. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 35, 389–396, (1997).
- [Pan2010] Pan H., Qiu Z. Biodegradable poly(L-lactide)/polyhedral oligomeric silsesquioxanes nanocomposites: Enhanced crystallization, mechanical properties, and hydrolytic degradation. *Macromolecules*, 43, 1499–1506, (2010).
- [Papageorgiou2010] Papageorgiou G.Z., Achilias D.S., Nanaki S., Beslikas T., Bikiaris D. PLA nanocomposites: Effect of filler type on non-isothermal crystallization. *Thermochimica Acta*, 511, 129–139, (2010).
- [Patkar1993] Patkar M., Jabarin S.A. Effect of diethylene glycol (DEG) on the crystallization behavior of poly(ethylene terephthalate) (PET). *J. Appl. Polym. Sci.*, 47, 1749–1763, (1993).

- [Pei2010] Pei A., Zhou Q., Berglund L.A. Functionalized cellulose nanocrystals as biobased nucleation agents in poly(l-lactide) (PLLA) - Crystallization and mechanical property effects. *Compos. Sci. Technol.*, *70*, 815–821, (2010).
- [Pfaffl2001] Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, *29*:e45, (doi: 10.1093/nar/29.9.e45) (2001). Available from URL: <http://nar.oxfordjournals.org/content/29/9/e45.full>
- [Picard2011] Picard E., Espuche E., Fulchiron R. Effect of an organo-modified montmorillonite on PLA crystallization and gas barrier properties. *Applied Clay Science*, *53*, 58–65, (2011).
- [Pikal1990] Pikal M.J., Shah S., Roy M.L., Putman R. The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *Int. J. Pharm.*, *60*, 203–217, (1990).
- [Puppi2010] Puppi D., Chiellini F., Piras A.M., Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*, *35*, 403–440, (2010).
- [PURAC] <http://www.purac.com>
- [Pyda2004] Pyda M., Bopp R.C., Wunderlich B.J. Heat capacity of poly(lactic acid). *J. Chem. Thermodyn.*, *36*, 731–742, (2004).
- [Qian2010] Qian Y., Su Y., Li X., Wang H., He C. Electrospinning of polymethyl methacrylate-nanofibres in different solvents. *Iranian Polymer Journal*, *19*, 123–129, (2010).
- [Qiu2010] Qiu Z., Pan H. Preparation crystallization and hydrolytic degradation of biodegradable poly(l-lactide)/polyhedral oligomeric silsesquioxanes nanocomposite. *Compos. Sci. Technol.*, *70*, 1089–1094, (2010).
- [Quirk2004] Quirk R.A., France R.M., Shakesheff K.M., Howdle S.M. Supercritical fluid technologies and tissue engineering scaffolds. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, *8*, 313–321, (2004).
- [Ramakrishna2005] Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W.E., Lim T.C., Ma Z. An introduction to *electrospinning* and nanofibers. *World Scientific*, (2005).
- [Raquez2013] Raquez J.M., Habibi Y., Murariu M., Dubois P. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. *Prog. Polym. Sci.*, (2013).
- [Ratner1996] Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E., editors. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. *New York: Academic Press, Biomaterials Science Elsevier*, (1996).
- [Ray2002] Ray S., Maiti P., Okamoto M., Yamada K., Ueda K. New polylactide/layered silicate nanocomposites. 1. Preparation, characterization, and properties. *Macromolecules*, *35*, 3104–3110, (2002).
- [Ricco2005] Ricco L., Russo S., Monticelli O., Bordo A., Bellucci F. E-Caprolactam polymerization in presence of polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS). *Polymer*, *46*, 6810, (2005).
- [Sachlos2003] Sachlos E., Czernuszka J.T. Making tissue engineering scaffolds work. A review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur. Cell Mater.*, *5*, 29–40, (2003).

- [Saeidlou2012] Saeidlou S., Huneault M.A., Li H., Park C.B. Poly(lactic acid) Crystallization. *Progress in Polymer Science*, 37, 1657–1677, (2012).
- [Sánchez2010] Sánchez-Soto M., Illescas S., Milliman H., Schiraldi D.A., Arostegui A. Morphology and thermomechanical properties of melt-mixed polyoxymethylene/polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposites. *Macromolecular Materials and Engineering*, 295, 846, (2010).
- [Sarasua1998] Sarasua J.R., Prud'homme R.E., Wisniewski M., LeBorgne A., Spassky N. Crystallization and melting behavior of polylactides, *Macromolecules*, 31, 3895, (1998).
- [Sarasua2005] Sarasua J.R., López-Arraiza A., Balerdi P., Maiza I. Crystallinity and mechanical properties of optically pure polylactides and their blends. *Polym. Eng. Sci.*, 45, 745 (2005).
- [Scott1946] Scott D.W. Thermal Rearrangement of Branched-Chain Methylpolysiloxanes. *Journal of American Society*, 68, 3, (1946).
- [Seal2001] Seal B., Otero T., Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 34, (2001).
- [Sellinger1996] Sellinger A., Laine T.M. Silsesquioxanes as synthetic platforms. Thermally curable and photocurable inorganic/organic hybrids. *Macromolecules*, 29, 2327 (1996).
- [Simpson2008] Simpson R.L., Wiria F.E., Amis A.A., Chua C.K., Leong K.F., Hansen U.N., et al. Development of a 95/5 poly(L-lactide-coglycolide)/ hydroxylapatite and b-tricalcium phosphate *scaffold* as bone replacement material via selective laser sintering. *J. Biomed. Mater. Res. B*, 84B, 17–25, (2008).
- [Sodergard2002] Södergard A., Stolt M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Prog. Polym. Sci.*, 27, 1123, (2002).
- [Son2004] Son W.K., Youk J.H., Lee T.S., Park W.H. Preparation of antimicrobial ultrafine cellulose acetate fibers with silver nanoparticles *Polymer*, 45, 2959, (2004).
- [Suh2002] Suh S.W., Shin J.Y., Kim J., Beak C.H., Kim D.I., Kim H., Jeon S.S., Choo I.W. Effect of Different particles on Cell Proliferation In Polymer Scaffolds Using a *Solvent-casting* and particulate Leaching Technique. *ASAIJ Journal*, 48(5), 460–464, (2002).
- [Sun2006] Sun D., Chang C., Li S., Lin L. Near-field *electrospinning*. *Nano Letters*, 6, 4, (2006).
- [Tanaka2006] Tanaka T., Hoshina M., Tanabe S., Sakai K., Ohtsubo S., Taniguchi M. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 97, 211–217, (2006).
- [Taubner2001] Taubner V., Shishoo R. Influence of processing parameters on the degradation of poly(L-lactide) during extrusion. *J. Appl. Polym. Sci.*, 79, 2128, (2001).
- [Temenoff2000] Temenoff J.S., Mikos A.G. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 21, 431–440, (2000).
- [Teo2006] Teo W.E., Ramakrishna S. A review on *electrospinning* design and nanofiber assemblies. *Nanotechnology*, 17, 89–106, (2006).

- [Thomson1995] Thomson R., Wake M., Yaszemski M., Mikos A. Biodegradable polymer *scaffolds* to regenerate organs. *Adv. Polym. Sci.*, *122*, 245–274, (1995).
- [Thomson1997] Thomson R.C., Shung A.K., Yaszemski M.J., Mikos A.G. Polymer *scaffold* processing. Principles of tissue engineering, *San Diego: Academic Press*, p.251–262, (1997).
- [Thorvaldsson2008] Thorvaldsson A., Stenhamre H., Gatenholm P., Walkenstrom P. *Electrospinning* of highly porous *scaffolds* for cartilage regeneration. *Biomacromolecules*, *9*, 1044–1049, (2008).
- [Toegel2008] Toegel S., Wu S.Q., Piana C., Unger F.M., Wirth M., Goldring M.B., et al. Comparison between chondroprotective effects of glucosamine, curcumin, and diacerein in IL-1 $\beta$ -stimulated C-28/I2 chondrocytes. *Osteoarthr. Cartilage*, *16*, 1205–1212, (2008).
- [Tsuji1995] Tsuji H., Ikada Y. Properties and morphologies of poly(L-lactide): 1. Annealing condition effects on properties and morphologies of poly(L-lactide). *Polymer*, *36*, 2709–2716, (1995).
- [Tsuji2005] Tsuji H. Poly (lactide) stereocomplexes: formation, structure, properties, degradation, and applications. *Macromol. Biosci.*, *5*, 569–597, (2005).
- [Tuli2003] Tuli R., Li W., Tuan R., et al. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Research and Therapy*, *5*, 235–238, (2003).
- [Van2000] Van der Kooy D., Weiss S. Why stem cells? *Science*, *287*, 1439–1441, (2000).
- [Vasanthakumari1983] Vasanthakumari R., Pennings A.J. Crystallization kinetics of poly(L-lactic acid) *Polymer*, *24*, 175–178, (1983).
- [Vaz2005] Vaz C.M., Van Tuijl S., Bouten C.V.C., Baaijens F.P.T. Design of *scaffolds* for blood vessel tissue engineering using a multi-layering *electrospinning* technique. *Acta Biomater*, *1*, 575–582, (2005).
- [Vink2003] Vink E.T., Rabago K.R., Glassner D.A., Gruber P.R. Applications of life cycle assessment to NatureWorks polylactide (PLA) production. *Polymer Degradation and Stability*, *80*, 403–419, (2003).
- [Voronkov1981] Voronkov M.G., Lavrentyev V. The formation of polyhedral ethylsilsesquioxanes in the process of oligoethylhydrocyclosiloxane polycondensation. *Plenary lecture at the 3rd IRIS meeting; IRIS: Graz, Austria* (1981).
- [Wang2010] Wang Y., Liu L., Guo S. Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous *scaffolds* in degradation *in vitro*. *Polymer Degradation and Stability*, *95*, 207–213, (2010).
- [WILL] The Williams Dictionary of Biomaterials. DF Williams. Liverpool University Press (1999).
- [Williamson2004] Williamson M.R., Coombes A.G.A. Gravity *spinning* of polycaprolactone fibres for applications in tissue engineering. *Biomaterials*, *25*, 459–465, (2004).
- [Witte2007a] Witte F., Ulrich H., Rudert M., Willbold E. Biodegradable magnesium *scaffolds*: Part I: Appropriate inflammatory response. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *81*, 748–756, (2007).

- [Witte2007b] Witte F., Ulrich H., Palm C., Willbold E. Biodegradable magnesium *scaffolds*: Part II: Peri-implant bone remodeling. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *81*, 757–765, (2007).
- [Witzke1997] Witzke D.R. Introduction to properties, engineering, and prospects of polylactide polymers. *PhD thesis. East Lansing, MI: Michigan State University*, (1997).
- [Wozney2004] Wozney J.M., Seeherman H.J. Protein-based tissue engineering in bone and cartilage repair. *Curr. Opin. Biotechnol.*, *15*, 392–398, (2004).
- [Wu2005] Wu C.S., Liao H.T. A new biodegradable blends prepared from polylactide and hyaluronic acid. *Polymer*, *46*, 10017–10026, (2005).
- [Wu2007] Wu D., Wu L., Wu L., Xu B., Zhang Y., Zhang M. Nonisothermal cold crystallization behavior and kinetics of polylactide/clay nanocomposites. *J. Polym. Sci. Part B*, *45*, 1100–1113, (2007).
- [Xing2010] Xing Q., Zhao F., Chen S., McNamara J., DeCoster M., Lvov Y. Porous biocompatible three-dimensional *scaffolds* of cellulose microfiber/gelatin composites for cell culture. *Acta Biomaterialia*, *6*, 2132–2139, (2010).
- [Xu2007] Xu X., Chen X., Liu A., Hong Z., Jing X. Electrospun poly(l-lactide)-grafted hydroxyapatite/poly(l-lactide) nanocomposite fibers. *Eur. Polym. J.*, *43*, 3187–3196, (2007).
- [Yamane2007] Yamane S., Iwasaki N., Kasahara Y., Harada K., Majima T., Monde K., Nishimura S., Minami A. Effect of pore size on *in vitro* cartilage formation using chitosan-based hyaluronic acid hybrid polymer fibers. *J. Biomed. Mater. Res. A*, *81*(3), 586–593, (2007).
- [Yang2002] Yang S., Leong K.F., Du Z., Chua C.K. The design of *scaffolds* for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng.*, *8*, 1–11, (2002).
- [Yang2005] Yang F., Murugan R., Wang S., Ramakrishna S. *Electrospinning* of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, *26*, 2603–2610, (2005).
- [Yang2005b] Yang F., Pitchumani R. Processing-interphase-property relationship in fiber-reinforced thermosetting-matrix composites. *Polymer Composites*, *26*, 193 (2005).
- [Yasuniwa2006] Yasuniwa M., Tsubakihara S., Iura K., Ono Y., Dan Y., Takahashi K. Crystallization behavior of poly(L-lactic acid). *Polymer*, *47*, 7554–7563, (2006).
- [Yasuniwa2007] Yasuniwa M., Iura K., Dan Y. Melting behavior of poly(L-lactic acid): Effects of crystallization temperature and time. *Polymer*, *48*, 5398–5407, (2007).
- [Yasuniwa2008] Yasuniwa M., Sakamo K., Ono Y., Kawahara W. Melting behavior of poly(L-lactic acid): X-ray and DSC analyses of the melting process. *Polymer*, *49*, 1943–1951, (2008).
- [Yoon2005] Yoon K.H., Polk M.B, Park J.H., Min B.G., Schiraldi D.A. Properties of poly(ethylene terephthalate) containing epoxy-functionalized polyhedral oligomeric silsesquioxane. *Polymer International*, *54*, 47, (2005).
- [Yu2011a] Yu J., Qiu Z. Preparation and properties of biodegradable poly(L-lactide)/octamethyl-polyhedral oligomeric silsesquioxanes nanocomposites with enhanced crystallization rate via simple melt compounding. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, *3*, 890–897, (2011).

- [Yu2011b] Yu J., Qiu Z. Effect of low octavinyl-polyhedral oligomeric silsesquioxanes loadings on the melt crystallization and morphology of biodegradable poly(l-lactide). *Thermochim. Acta*, 519, 90–95, (2011).
- [Zamani2010] Zamani M., Morshed M., Varshosaz J., Jannesari M. Controlled release of metronidazole benzoate from poly ( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun nanofibers for periodontal diseases. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75, 179–185, (2010).
- [Zhang1999] Zhang R., Ma P.X. Poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *J. Biomed. Mater. Res.*, 44, 446–55, (1999).
- [Zhang2002] Zhang M., Li X.H., Gong Y.D., Zhao N.M., Zhang X.F. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. *Biomaterials*, 23(13), 2641–2648, (2002).
- [Zhang2005] Zhang J., Sato H., Tsuji H., Noda I., Ozaki Y. Differences in the CH<sub>3</sub>O=C interactions among poly(L-lactide), poly(L-lactide)/poly(D-lactide) stereocomplex, and poly(3-hydroxybutyrate) studied by infrared spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 735-736, 249–257, (2005).
- [Zhang2005b] Zhang J., Duan Y., Sato H., Tsuji H., Noda I., Yan S., et al. Crystal Modifications and Thermal Behavior of Poly(l-lactic acid) Revealed by Infrared Spectroscopy. *Macromolecules*, 38, 8012, (2005).
- [Zhang2006] Zhang Y., Lee S., Yoonessi M., Liang K., Pittman C.U. Phenolic resin-trisilanolphenyl polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) hybrid nanocomposites: Structure and properties. *Polymer*, 47, 2984–2996, (2006).
- [Zhang2006b] Zhang J., Tashiro K., Domb A.J., Tsuji H. Confirmation of Disorder  $\alpha$  Form of Poly(L-lactic acid) by the X-ray Fiber Pattern and Polarized IR/Raman Spectra Measured for Uniaxially-Oriented Samples. *Macromol. Symp.*, 242, 274, (2006).
- [Zhang2007] Zhang Z.Y., Jin B., Kelly J.M. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 251–263, (2007).
- [Zhang2007b] Zhang X., Hua H., Shen X., Yang Q. *In vitro* degradation and biocompatibility of poly(l-lactic acid)/chitosan fiber composites. *Polymer*, 48, 1005–1011, (2007).
- [Zhang2011] Zhang X., Sun J., Fang S., Han X., Li Y., Zhang C. Thermal, crystalline, and mechanical properties of octa(3-chloropropylsilsesquioxane)/ poly(L-lactic acid) hybrid films. *J. Appl. Polym. Sci.*, 122, 296–303, (2011).
- [Zhao2005] Zhao Y., Schiraldi D.A. Thermal and mechanical properties of polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS)/polycarbonate composites. *Polymer*, 46, 11640, (2005).
- [Zheng2002] Zheng L., Waddon A.J., Farris R.J., Coughlin E.B. X-ray characterizations of polyethylene polyhedral oligomeric silsesquioxane copolymers. *Macromolecules*, 35, 2375, (2002).
- [Zong2002] Zong X., Kim K., Fang D., Ran S., Hsiao B.S., Chu B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*, 43, 4403–4412, (2002).
- [Zong2005] Zong X., Bien H., Chung C.Y., Yin L., Fang D., Hsiao B.S., et al. Electrospun fine-textured *scaffolds* for heart tissue constructs. *Biomaterials*, 26, 5330–5338, (2005).