



Trabajo Fin de Máster

Fabricación de andamios poliméricos mediante técnicas de electrohilado y de impresión FDM (modelado por deposición fundida): *Evaluación mecánica y físico-química.*

Fabrication of polymeric scaffolds using electrospinning and 3D printing (FDM): *Mechanical and physico-chemical evaluation.*

Autor:

Julio Rodrigo Rodrigo

Director:

Manuel Arruebo Gordo

Codirector:

Martín Prieto Fraga

Resumen

En nuestros días, uno de los principales problemas que atribula a la población es la salud. Entre las diversas patologías que se pueden encontrar, las afecciones importantes al sistema óseo debido a accidentes, la osteoporosis o los tumores óseos, entre otras, implican desafíos para la medicina actual. Múltiples investigaciones en el campo de la ingeniería de tejidos son llevadas a cabo con la finalidad de subsanar este hándicap. En este trabajo se han creado andamios de policaprolactona y una mezcla de policaprolactona y ácido poliláctico-co-glicólico mediante impresión por deposición de material fundido y mediante electrohilado para analizar comparativamente dos técnicas de fabricación distintas. Para ello, se han caracterizado sus propiedades físico-químicas, observado por microscopía electrónica de barrido y realizado cinéticas de degradación. Finalmente se ha analizado la idoneidad de los materiales utilizados y de las técnicas empleadas para estudiar la viabilidad de los andamios creados como potenciales sustitutos biodegradables de hueso trabecular.

0. Índice

Resumen.....	3
0. Índice	5
I. Introducción	7
1.1 Características del tejido óseo:	8
1.2 Materiales.....	10
1.3 Técnicas de fabricación:	12
II. Objetivos	17
III. Materiales y fabricación de los andamios.....	19
3.0 Equipo básico	19
3.1 Andamios electrohilados	20
3.1.2 Andamios impresos por FDM.....	21
IV. Caracterización	23
4.1 Microscopía electrónica de barrido.....	23
4.2 Caracterización de la porosidad.....	27
4.3 Ensayo de tracción.....	28
4.4 Calorimetría diferencial de barrido.....	32
4.5 Análisis termogravimétrico.....	34
4.6 Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier FTIR.....	36
4.7 Resonancia Magnética Nuclear: RMN.....	37
4.8 Ensayo de degradación en condiciones estáticas.....	39
4.9 Ensayo de degradación en condiciones dinámicas.....	44
V. Conclusiones.....	45
VI. Bibliografía	47

I. Introducción

En los últimos años, el campo de la ingeniería de tejidos ha avanzado en base al desarrollo de nuevos materiales. A semejanza de la naturaleza, se busca la adecuación óptima a la función a desempeñar. Porello, la ingeniería de tejidos se enfoca cada vez más en mimetizar y sustituir temporalmente el tejido, tan dañado que requiere de una ayuda externa para su recuperación, impulsando la regeneración del tejido original del propio huésped. En consecuencia, se necesita que el andamio cumpla unas propiedades muy específicas en su interacción con el organismo.¹ Por un lado, sus propiedades fisicoquímicas deben asemejarse a las originales del tejido para no dañar el entorno, siendo este considerado biocompatible. Por otro lado, su estructura tridimensional, porosidad y superficie deben ser compatibles con el tejido a sustituir, permitiendo la fijación, migración y proliferación celular. Por último, un aspecto fundamental es el carácter biodegradable o bioreabsorbible del andamio, pudiendo regular la velocidad de degradación en el cuerpo en función de los materiales usados en su fabricación.^{2,3}

Actualmente existen dos aproximaciones a la hora de diseñar y crear un andamio sintético para la regeneración tisular: Por un lado, existe la posibilidad de crear un andamio con la finalidad de formar el tejido a regenerar en un bioreactor para, posteriormente, sustituir el tejido dañado del paciente. Este acercamiento permite seleccionar materiales y métodos en la fabricación del andamio que de otra forma serían inviables a causa de unas deficientes propiedades mecánicas. Por el contrario, requiere de un tiempo elevado y un importante aporte de células del paciente para llevar a cabo el método, lo que lo hace inviable en ocasiones donde se necesite sustituir el tejido dañado en poco tiempo.² Por otro lado, se puede crear un andamio con una primera función similar a la de una prótesis. Este debería de tener unas propiedades mecánicas acordes y permitir la regeneración del tejido al que sustituye y además, degradarse con el tiempo para dejar paso poco a poco al tejido sano. Este acercamiento da lugar a un menor número de materiales y técnicas posible. Por otro lado, el tejido que se forma en el andamio está sometido a los estímulos de tensión-deformación y entorno químico original, por lo que se favorecerá la regeneración con un tejido optimizado por el propio organismo para esos estímulos.²

Dentro del ámbito de la ingeniería de tejidos se está invirtiendo un importante esfuerzo de investigación en la regeneración ósea.^{3,4} Este esfuerzo se debe a su remarcable importancia. Este es un tejido con una amplia variedad de funciones entre las que se encuentran la protección y soporte de los órganos vitales, parte esencial involucrada en el movimiento, producción de sangre, regulación del pH... A consecuencia de esto, un importante número de patologías son causadas por algún defecto en el tejido óseo. Los traumas provocados por accidentes o las resecciones de tumores, pueden provocar grandes defectos óseos incapaces de regenerarse correctamente de forma natural, por lo que pueden requerir de ayuda externa para la completa recuperación.^{3,5}

1.1 Características del tejido óseo:

Con la finalidad de una mimesis perfecta entre el andamio y el tejido, éste debe de cumplir una serie de características tales como una reacción celular positiva, unas prestaciones mecánicas adecuadas o serinocuo para el organismo, tanto el andamio como sus subproductos de degradación.

En cuanto a las propiedades mecánicas cabe destacar la diferenciación entre hueso cortical y trabecular. El hueso cortical presenta una estructura compacta atravesada por finos canales de vasos sanguíneos o fibras nerviosas. El hueso trabecular consiste en una red tridimensional de tabiques y canales, siendo más ligero y conteniendo la médula ósea en los huesos largos, como el fémur y el húmero.⁶ Además, el tejido óseo presenta una clara anisotropía en función de los esfuerzos a los que ha sido sometido en el tiempo.⁷

Hueso Compacto y Esponjoso (Hueso trabecular)

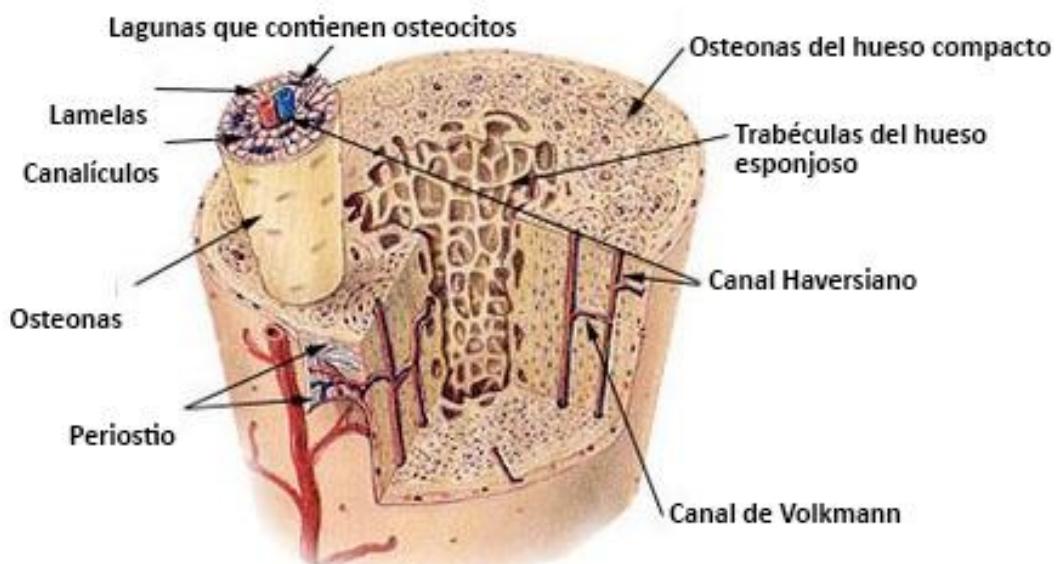


Figura 1: Representación de las partes constituyentes del hueso.³

Debido a que el hueso es un material anisótropo y heterogéneo, sus propiedades mecánicas presentan una elevada variabilidad dependiendo de la muestra tomada, incluso para un mismo individuo.⁸ De esta forma, en la literatura se pueden encontrar valores muy diversos. La porosidad es aproximadamente del 4% para el hueso cortical, debido a los diversos canales de Havers, mientras que para el hueso trabecular puede llegar hasta el 90%. El módulo elástico depende fuertemente del tipo de hueso, las condiciones en las que se ha realizado el ensayo y de la inherente variabilidad de los tejidos biológicos. A continuación se presenta una tabla resumen de diferentes módulos elásticos recogidos en la bibliografía.⁷⁻⁹

Módulo Elástico

Hueso	Fracción tomada	Valor obtenido (GPa)
Fémur ⁸	Cortical	14.1 - 24.6
Promedio de diferentes huesos ⁹	Cortical	3 - 30
Fémur ⁸	Trabecular	1.4 - 9.7
Promedio de diferentes huesos ⁹	Trabecular	0.02 - 0.5
Promedio de diferentes huesos ¹⁰	Trabecular	0.02 - 3
Fémur ⁷	Trabecular	11.5 - 18.6
Vertebra ⁷	Trabecular	8.7 - 11.3
tibia ⁷	Trabecular	20.3 - 26.9

Tabla 1: Módulos elásticos para diferentes huesos según parte de la bibliografía.

El tratamiento más habitual en defectos óseos es el uso de injertos, principalmente del propio paciente. Actualmente y debido a la ya comentada relevancia del tejido óseo, existe n múltiples soluciones a la hora de realizar un injerto. Los tipos de injertos se catalogan en función de su procedencia, presentando entre si diferentes niveles de osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis.^{11,12}

- Auto-injerto: Injerto del propio huésped de otra zona del cuerpo.
- Alo-injerto: Injerto humano de un donante.
- Xeno-injerto: Injerto del tejido similar de otra especie.
- Injertos sintéticos: Son los creados por el hombre.

	Osteoconducción	Osteoinducción	Osteogénesis
Auto-injerto	Si	Si	Si
Alo-injerto	Si	Si	No
Xeno-injerto	Si	No	No
Injertos sintéticos	Si	*En función de la composición	

Tabla 2: Propiedades óseas de los diferentes tipos de injertos.^{11,12}

La compatibilidad biológica del andamio con el tejido viene dada por su interacción físico-química con el mismo. Por ello, es importante que presente una estructura similar a la matriz extracelular del tejido, ofreciendo unas características de porosidad y superficie tales que permitan la migración celular a través de este. De igual manera, es fundamental que ni el material ni sus subproductos de degradación presenten citotoxicidad. En cuanto a sus propiedades mecánicas, deben de parecerse a las del tejido. Unas propiedades pobres darán lugar a un fallo en el andamio mientras que unas excesivas provocarán daños en el tejido circundante debido al efecto de apantallamiento por el cual el hueso deja de recibir tensiones y pierde densidad ósea. Una de las vertientes que se ha extendido ampliamente estos últimos años es el estudio de la capacidad de los materiales como portadores de fármacos con una liberación controlada para proporcionar al andamio una actividad adicional actuando no sólo de soporte integrable sino también para favorecer la liberación *in situ* de moléculas bioactivas que aceleren el proceso regenerativo. Esto permite la mejora del material con la adición al mismo de antinflamatorios, factores de crecimiento, bactericidas u otro tipo de fármacos.¹

1.2 Materiales

Actualmente se utilizan prótesis metálicas basadas en titanio¹⁰ o aleaciones de cromo y cobalto como sustituto de hueso así como implantes cerámicos o de polímeros como la polieteretercetona. En el caso de la fabricación de andamios como sustitutos óseos, son los polímeros los materiales que presentan un mayor interés. Los polímeros que pueden utilizarse en la creación de andamios pueden categorizarse en dos grupos; los materiales sintéticos y los naturales. Los naturales son derivados de proteínas y polisacáridos como el colágeno o el quitosano. Por otra parte, los polímeros sintéticos tienen la ventaja de poder modular sus propiedades según la finalidad buscada. De entre todos los polímeros que cumplen las características necesarias, los poliésteres alifáticos son los más extendidos y de mayor uso.⁹ A continuación se presentan dos de los ésteres alifáticos más estudiados y ampliamente usados en el campo de la medicina; el PLGA y el PCL:

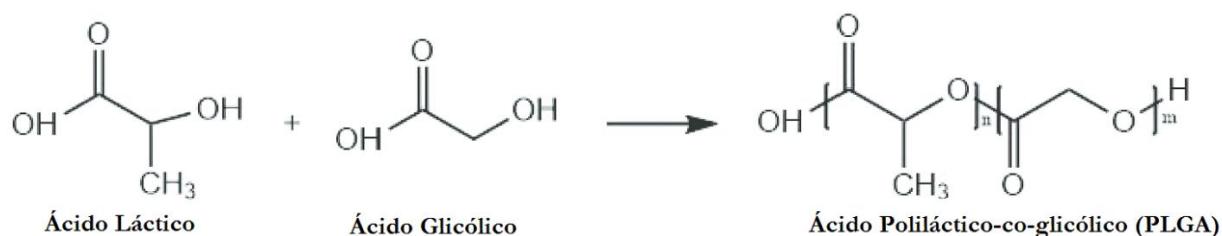


Figura 2: Estructura molecular del PLGA y los monómeros que lo componen

El ácido poliláctico-co-glicólico o PLGA es altamente conocido y empleado en la ingeniería de tejidos. Su degradación por rotura hidrolítica del enlace éster da lugar a sus monómeros que son eliminados por vías naturales. El ácido láctico se incorpora al ciclo de Krebs para su eliminación mientras que el glicolato es convertido en metabolitos y desechado. El copolímero puede estar conformado por diferentes proporciones de sus correspondientes monómeros, siendo el 50/50 el que posee una mayor velocidad de degradación en un periodo entre una y dos semanas.⁹

Polímero	Degradación (semanas)	Aplicaciones
Ácido poliglicólico	6 - 12	Puntos de sutura, dispositivos médicos...
Ácido poliláctico	11 - 15	Implantes ortopédicos, liberación de fármacos...
PLGA 85:15	5 - 6	Puntos de sutura...
PLGA 75:25	4 - 5	Mallas, tack, liberación de fármacos...
PLGA 50:50	1 - 2	Implantes ortopédicos, liberación de fármacos.

Tabla 3: Usos y tiempos de degradación de diferentes proporciones de Acido Poliláctico y Poliglicólico.⁹

En cuanto a su interacción con el organismo es bien conocida y comprobada su biocompatibilidad estando presente como material constituyente en una amplia variedad de materiales médicos biodegradables. Por un lado, debido a sus propiedades mecánicas en puntos de sutura o en implantes ortopédicos, por otro lado como sistema liberador sostenido de diversos fármacos.^{3,13,14}

En lo referente a sus propiedades mecánicas, las diferentes proporciones del copolímero presentan un módulo de elasticidad en torno a 2 GPa y una elongación entre 3-10% en el caso del PLGA 50:50.^{9,15}

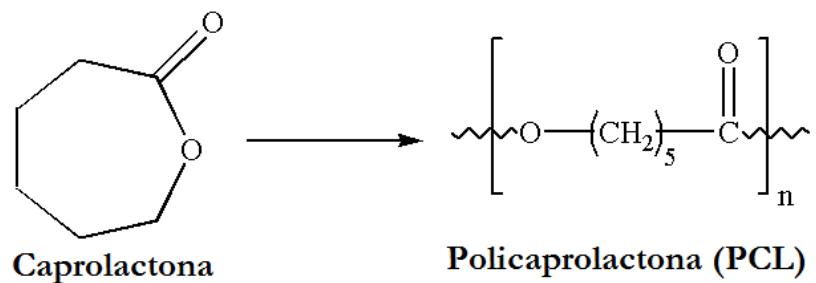


Figura 3: Estructura molecular de la PCL y del correspondiente monómero de partida

La policaprolactona o PCL es el polímero de mayor uso e investigación en el ámbito de la ingeniería de tejidos.⁹ Posee una muy buena osteoinducción, un tiempo de degradación de más de 24 semanas y sus productos degradados no presentan una elevada toxicidad.⁵ Asimismo, entre sus propiedades mecánicas cuenta con un módulo elástico entre 250 y 450 MPa y una posible elongación entre 3 y 5 veces su longitud inicial.^{9,15}

1.3 Técnicas de fabricación:

En el desarrollo de materiales, son tan importantes en su etapa final los elementos que lo componen como la estructura interna que los conforman. Esta estructura suele ser dependiente de los métodos utilizados para su fabricación, influyendo en gran medida en las propiedades finales. En lo referente a la creación de andamios se han estudiado y usado múltiples técnicas o métodos de síntesis.^{2,16,17}

1.3.1 Electrohilado

La técnica conocida como electrohilado está basada en las observaciones realizadas por Rayleigh en 1897 y en el trabajo de Taylor sobre jets impulsados eléctricamente. En la década de 1930 Formhals realizó múltiples patentes sobre la producción de filamentos de hilo mediante un sistema muy similar. A partir de 1980 y mayoritariamente en la última década, el proceso del electrohilado ha sido cada vez más popular debido al aumento en el interés de obtener fibras de tamaño nanométrico.¹⁸

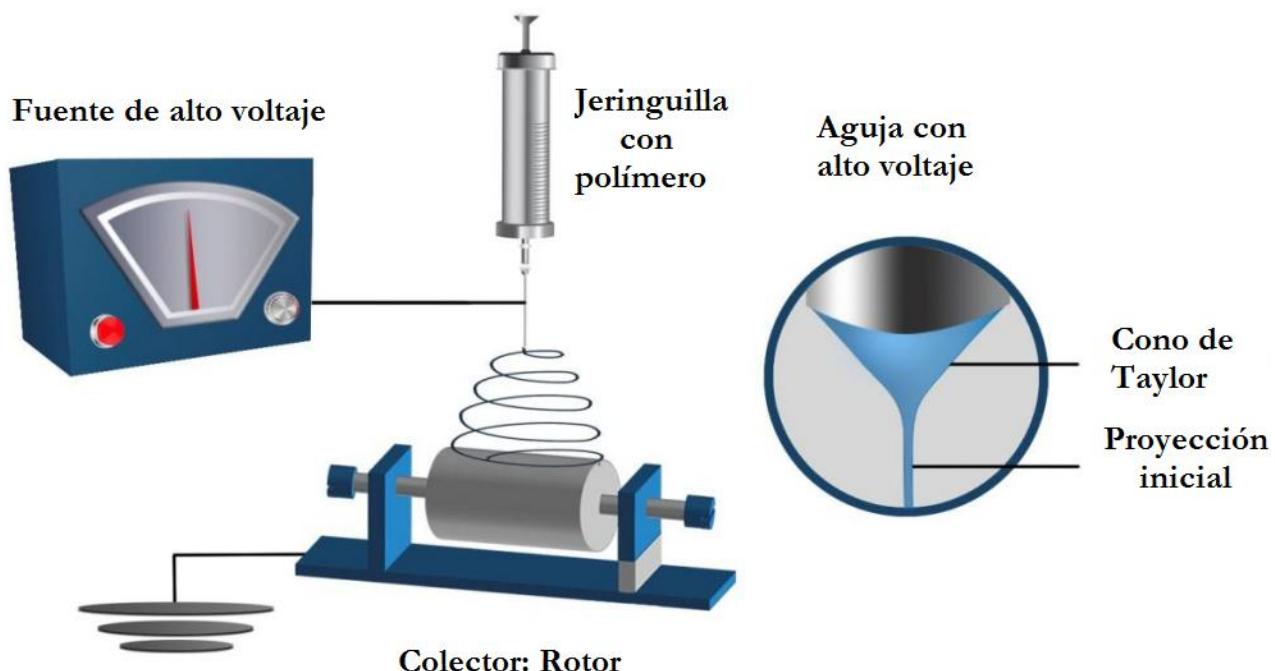


Figura 4: Diagrama de un electrohilador con rotor como colector basado en el del artículo de Gorodzha¹⁹

El electrohilado es una técnica robusta para la obtención de materiales conformados por filamentos de nanómetros hasta varias micras en diámetro. Esto proporciona un importante control en la regulación de la porosidad y tamaño de poro, la relación superficie-volumen o las propiedades mecánicas. Debido a estas prestaciones se puede encontrar en la actualidad en múltiples sectores, desde la biomedicina o farmacia hasta sistemas de filtrado o tejidos.¹⁸ La técnica se basa en hacer pasar por una aguja cargada un material polimérico disuelto en un disolvente apropiado hacia el colector, debido a la diferencia de potencial creado entre ambos componentes, se van formando fibras al evaporarse el disolvente durante la proyección. Para que esto ocurra de forma satisfactoria se requiere de la formación del artefacto físico conocido como cono de Taylor.²⁰

En el proceso de electrohilado, es importante tener en cuenta determinados parámetros fundamentales, como son el tipo de disolvente, los polímeros utilizados y su concentración en el fluido a electrohilado.^{18,21-23} Estos parámetros determinan a su vez la tensión superficial, conductividad y viscosidad del fluido. El rango ideal de viscosidad se encuentra entre 800 y 4000 mPa*s, mientras que a menor tensión superficial, más estable será el cono de Taylor formado.²⁴ La disolución será más fácilmente electrohilada cuanto mayor conductividad presente, necesitando de una menor diferencia de potencial en la síntesis.

Los parámetros que pueden ser modulados para afectar al grosor de las fibras obtenidas sin alterar la composición de la disolución son los siguientes:

- La diferencia de potencial aplicada: siendo la fuerza impulsora de la técnica, un voltaje muy bajo dará lugar a goteo mientras que uno muy elevado producirá una importante inestabilidad en el cono o electrosprayado del polímero.
- Flujo y diámetro de la aguja: influyen en el tiempo de obtención de un espesor adecuado, así como en el grosor de las fibras obtenidas. La relación de flujos cobra aún más importancia en el modo de electrohilado *core-shell*, modo de la técnica en la que se utiliza una aguja interna y externa con el fin de tener un recubrimiento diferente al interior del filamento.
- Temperatura y humedad: afectan indirectamente al resultado final al influir en la conductividad del aire y a la velocidad en la que el disolvente se evapora.
- Distancia entre la aguja y el colector: A mayor distancia entre la aguja y el colector, mayor es el tiempo para la evaporación del disolvente y menor el diámetro de las fibras obtenidas.

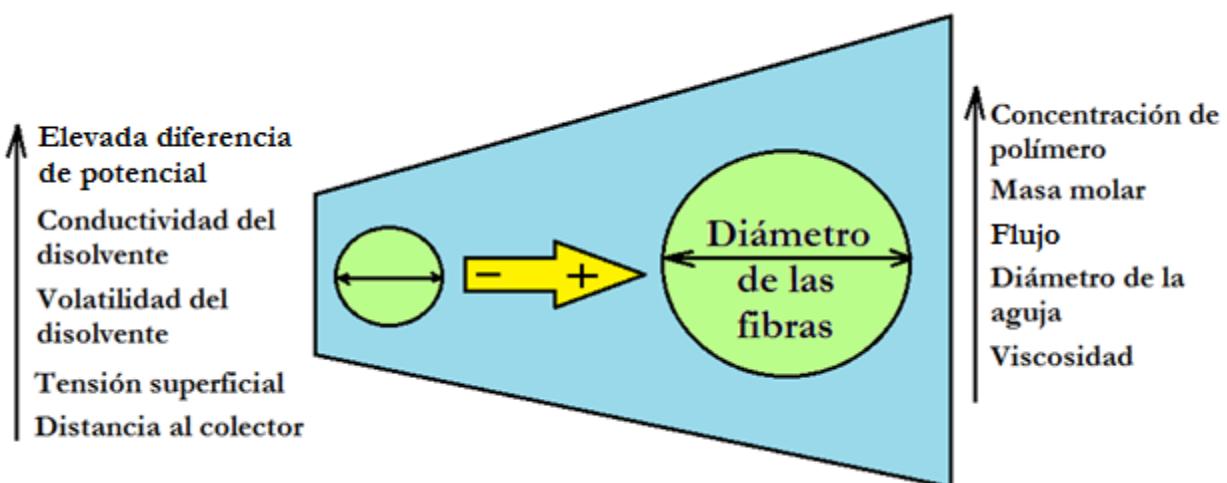


Figura 5: Diagrama de influencia de los parámetros del electrohilado basado en el de Chakoski [9]

1.3.2 Impresión 3D

La impresión sólida se ha visto enormemente impulsada en los últimos años debido a que permite la producción de piezas complejas a partir de un modelo matemático en cortos períodos de tiempo a un costo económico. Su creación se remonta a la década de 1980 con la creación de “Rapid Prototyping”, creado con la finalidad de ser un método rápido y rentable para la industria. Sería el modelado por deposición fundida o FDM patentado por Crump en 1988 el principal causante del auge de esta técnica una vez caducó la patente. Los equipos de FDM presentan desde entonces un precio asequible y unas dimensiones reducidas, fomentando de esta forma su comercialización a pequeños usuarios.²⁵

La impresión sólida se puede clasificar en función de si se substraerá material de una pieza inicial o si se conforma la pieza final mediante la adición de material, conocida también popularmente como impresión 3D. El proceso de sustracción de material puede realizarse mediante diferentes equipos, como pueden ser un torno o una fresadora. El nivel de automatización define el proceso a seguir a la hora de trabajar. Los equipos automatizados, los más comunes hoy en día, suelen operar mediante código G, habitualmente usado en el control numérico computarizado o CNC. El modelo de la pieza final es creado mediante aplicaciones de diseño asistido por ordenador o CAD y transformada al código G mediante software de fabricación asistida por ordenador o CAM. En la actualidad, el modelo puede ser recreado a partir de datos reales tomados.^{16,25} Las impresoras 3D son también máquinas CNC con la diferencia de que la pieza se crea mediante la deposición del material capa a capa. A consecuencia de esto, el código G usado estará diseñado para conformar el objeto final por estratos.²⁵

La Técnica de FMD se basa en la deposición estratificada de materiales plásticos fundidos. Para lograr esto, el material es calentado por una boquilla, la cual puede moverse en tres ejes a partir de motores paso a paso controlados numéricamente. Mediante un engranaje, el material es arrastrado por la boquilla para depositarse según sea necesario. Las posibles desventajas de este método se basan en la necesidad de crear soportes para piezas de geometrías complicadas que pueden dar lugar a imperfecciones o a la dificultad de obtener piezas de múltiples colores. Además, la resolución máxima de la impresión viene limitada por el equipo y en el caso de aplicaciones específicas, puede que el material deseado no esté comercializado en forma de filamento compatible.^{2,25}

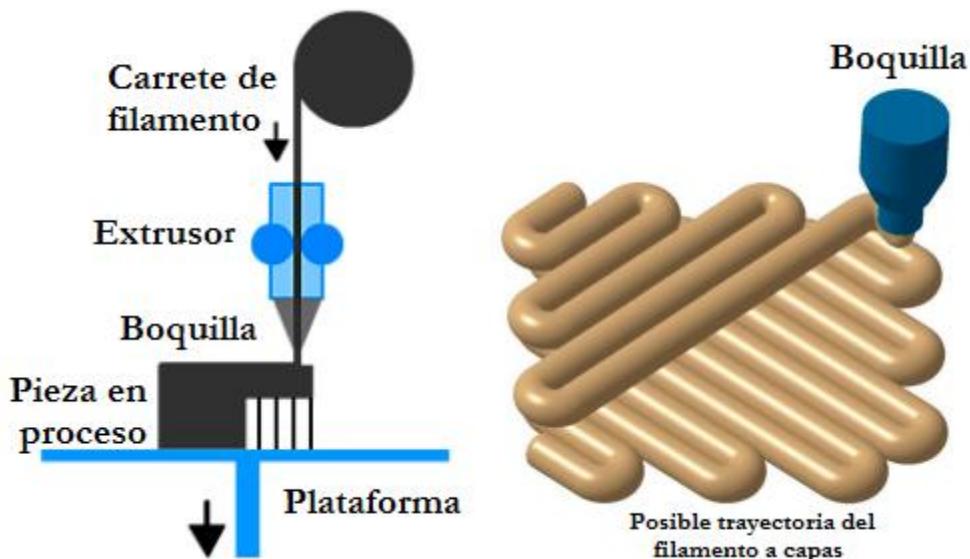


Figura 6: Diagrama sencillo de una impresora FDM basado en el de Gardan.²⁶

Otras técnicas utilizadas de impresión sólida ofrecen otro tipo de ventajas, normalmente a costa de coste y volumen mayores. La clasificación de estas técnicas está basada en el método de obtención de la pieza deseada y en el material utilizado. A continuación se describen las técnicas más comunes:²⁶

- La sinterización selectiva por láser o SLS, principalmente usada en la industria, utiliza un láser como fuente de sinterización de material plástico, cerámico o metálico en polvo, ofreciendo una rugosidad mínima. Tiene la ventaja de permitir la impresión de formas complejas sin necesidad de emplear soportes.
- La estereolitografía o SLA es una técnica de impresión que utiliza un tanque lleno de una resina líquida capaz de polimerizar mediante fotocurado. Un láser UV se proyecta a través de un sistema de espejos creando la forma deseada en la superficie. Posteriormente un pistón baja el tanque con la resina líquida y se repite el proceso capa a capa. Finalmente, el objeto se expone a luz ultravioleta para completar el proceso de curado. La técnica “*Digital Light Processing*” es una actualización del SLS que en lugar de laser utiliza un proyector de una resolución determinada.
- El laminado de capas o LOM consiste en la obtención de láminas o planchas de aluminio, papel o plástico para posteriormente fijarlas entre sí para obtener una pieza tridimensional. Para obtener el producto final suele requerirse de un último paso de abrasión o eliminación del material innecesario.



Figura 7: Figuras de Impresión 3D mediante FMD, SLD y SLA respectivamente.²⁵

Técnica	Tipo	Coste	Facilidad de uso	Complejidad de la pieza	Precisión
Fresado 2.5D CNC	Substractiva	Bajo/medio	Difícil	Baja	Alta
Fresado 6ejes CNC	Substractiva	Alto	Muy difícil	Media	Alta
FMD	Aditiva	Muy bajo/medio	Fácil/Media	Media	Media/Alta
LOM	Aditiva	Medio	Media	Baja	Media
Sinterizado de metal	Aditiva	Muy alto	Difícil	Alta	Media/Alta
Sinterizado de plástico	Aditiva	Muy alto	Media	Alta	Media/Alta
Fotocurado	Aditiva	Alto	Fácil/Media	Media	Alta

Tabla 4: Características de diferentes modelos de impresión sólida.²⁵

En el ámbito médico, la impresión 3D permite un nuevo nivel en la adecuación y especificidad en el diseño de prótesis e implantes para el paciente, optimizando la implantación a un coste asequible. Para la realización de una prótesis mediante esta tecnología se requiere del mismo proceso que para cualquier pieza impresa, pero con una mayor complejidad del modelo y los materiales. Para la obtención del modelo a imprimir se requiere de un elevado conocimiento y concordancia de la estructura a mimetizar, obtenibles generalmente mediante el procesado de imágenes médicas obtenidas por TAC o MRI.¹⁶ Una de las vertientes actuales consiste en la optimización de la geometría interna del andamio de los modelos computacionales. Estas estructuras se optimizan para evitar el fallo de la misma y para conservar en la medida de lo posible las propiedades mecánicas del material a elevadas porosidades.²⁷ Estas técnicas permiten en el ámbito de la ingeniería de tejidos la posibilidad de diseñar y fabricar andamios con una red personalizada, porosa y completamente interconectada, con una elevada reproducibilidad.⁶ El avance en este campo se encuentra en las técnicas de impresión biológica “*bioprinting*” donde se puede lograr la adición de células o incluso la impresión de órganos. A pesar de lo ventajoso que resultaría, en la actualidad aún se encuentra en fase temprana como para ser implementada de forma real y eficaz.^{16,28}

Técnica	Material	Usos en medicina
SLA / DLP	Resina fotocurable	Hueso, odontología, audífonos.
“ <i>Multijet modeling</i> ”	Plásticos y polímeros	Odontología
FDM	Plásticos y polímeros	Dispositivos médicos, órtesis.
SLS	Acero, aluminio, titanio...	Implantes y fijaciones
LOM	Papel, plástico y metal	Ortopedia

Tabla 5: Aplicaciones médicas de diferentes técnicas de impresión aditiva.¹⁶

II. Objetivos

Con todo lo anteriormente mencionado, se puede concluir la necesidad de desarrollar andamios cada vez más específicos para la función a desempeñar. Aquellos dirigidos a sustituir el tejido óseo han sido ampliamente estudiados debido a su relevancia. A pesar de ello, se carece de un enfoque completo y global de la caracterización completa de diversos materiales para esta finalidad. De esta forma, en el presente trabajo se desarrollará la labor de caracterizar y comparar las propiedades de los andamios de PCL y PCL - PLGA creados mediante electrohilado e impresión FDM. Con este fin en mente, en primer lugar, se realizará la fabricación de los andamios a estudiar. Posteriormente se procederá a la caracterización lo más completa posible de sus propiedades físico-químicas. Para finalizar, se discutirá la idoneidad y adecuación de los andamios creados como posibles sustitutos del hueso trabecular. El objetivo del trabajo es el de entender la influencia del método de fabricación en las propiedades mecánicas y físico-químicas de andamios modelo, para ser potencialmente usados como sustitutivos óseos sintéticos.

III. Materiales y fabricación de los andamios

3.0 Equipo básico

En la preparación y realización de los diferentes ensayos se utilizó material básico de laboratorio entre los que se incluyeron material de vidrio, espátula, jeringuillas, placa agitadora y núcleos magnéticos...

Los instrumentos que se usaron en la preparación de las muestras y la toma de datos de las mismas habitualmente fueron:

- * Pipetas y micropipetas de diferentes volúmenes.
- * Balanza "AND GH-120", e = 1mg, d = 0.1 mg.
- * Balanza de precisión "RADWAG MYA 5/2Y" e = 1mg, d = 1 μ g.

Además, durante todo el trabajo se utilizaron dos polímeros de partida para los andamios:

- * Poliacaprolactona (PCL) 80 kDa de Merck/Sigma Aldrich.
- * Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) 50:50 de grado médico "Resomer 504" de Evonik®

Para el procesado de los datos que se presentan, se usaron los programas necesarios para dicho fin entre los que se incluyen:

- * Minitab para el estudio estadístico especializado, como la evaluación de valores anómalos.
- * Programas específicos o proporcionados por el instrumento para la utilización de los mismos.

Para todos los valores estadísticos realizados y presentados en el trabajo se supusieron y utilizó un nivel de significación α del 0.05.

3.1 Andamios electrohilados

En la elaboración de los andamios electrohilados se utilizó un electrohilador “Electrospinner 2.2.D-500 de YFlow Nanotechnology Solutions” cuyas partes destacables son:

- * Cabina de seguridad semi-aislada con interfaz.
- * Bomba de flujo continuo.
- * Base colectora o rotor colector.
- * Conexiones para flujo y aguja de electrohilado.

Para la creación de los andamios se dispuso de dos disoluciones. Una de PCL y otra de PCL - PLGA en relación en masa 1:1. Los polímeros se disolvieron en una mezcla de DCM y DMF (50:50) a una concentración del 10% en masa. Para su obtención se pesaron los reactivos sólidos y se dejaron en agitación hasta su completa solubilización. El DCM es el disolvente principal del material plástico mientras que el DMF se utilizó con la finalidad de aportar conductividad a la disolución para el electrohilado posterior.

Posteriormente, se introdujo la disolución en una jeringuilla y se eliminaron las posibles burbujas mediante diez minutos en un baño de ultrasonidos. La presencia de burbujas durante el electrohilado puede suponer la desestabilización o la interrupción en el cono de Taylor. Esta interrupción puede dar lugar a la proyección de un volumen mayor de disolución que no se evapora antes de la deposición, ocasionando una posible destrucción parcial o total del andamio.

Para cada uno de los dos materiales, se fabricaron andamios con una orientación de fibras aleatoria y con una orientación preferente en una dirección. Para el primer caso, se utilizó una placa colectora plana durante un periodo de síntesis de 10 horas con un barrido lateral de 30cm a 2 cm/s y frontal de 5 cm a 0.5 cm/s. Para los andamios con fibras orientadas en una dirección preferente, se utilizó un rotor a 500 rpm durante 16 horas con un barrido lateral de 5 cm a 0.5 cm/s.

En ambos casos, se usó un flujo de 1 mL/h y una separación de 18cm entre el colectory la aguja. La tensión aplicada se ajustó en cada experimento hasta obtener un cono de Taylor estable. La tensión necesaria varío en función de la temperatura y humedad del entorno, en un rango entre 10 y 20 KV.

Una vez finalizó la síntesis, se dejaron secar las muestras obtenidas durante 4 horas para eliminar las posibles trazas de disolvente. Posteriormente, se almacenaron en bolsas selladas a -20ºC hasta su posterior uso en los ensayos.

3.1.2 Andamios impresos por FDM

Para la obtención de los andamios impresos 3D cabe destacar que los equipos utilizados fueron ensamblados por el equipo de investigación, no se utilizó por tanto un equipo comercial. Por este motivo no se presentan las marcas o modelos de los mismos.

Primero se creó el *blend* de PCL - PLGA 1:1 en masa necesario. Para ello se realizó una disolución homogénea para la cual se pesaron y se disolvieron en la cantidad mínima necesaria de DCM para disolverse en agitación durante 4 horas. Posteriormente se vertió en un cristalizador de vidrio para evaporar todo el disolvente durante la noche. Finalmente se troceó y dejó a vacío una hora para eliminar posibles trazas presentes de DCM. Por otro lado, el filamento de PCL puede ser creado a partir del gránulo del polímero comercial directamente, sin necesidad de realizar los pasos descritos para la obtención de un *blend*.

Para crear los andamios con los mismos polímeros utilizados para el electrohilado se utilizó una extrusora manual con el fin de obtener de los *blends* preparados el filamento necesario para la posterior impresión. La extrusora está compuesta por un tornillo sin fin en una camisa de aluminio calefactada por 3 resistencias con sus respectivos sensores térmicos. Tanto el tornillo como la temperatura están controlados mediante un Arduino. Los dos polímeros se extruyeron a la mínima temperatura posible en la que el polímero fluidifica, en torno a 75º C, ajustando a mano el grosor y longitud de los filamentos.

La impresora 3D que se utilizó está basada en el diseño de hardware libre Prusa i3 del proyecto RepRap (www.reprap.org) y controlada mediante el firmware Marlin v1.0.2 (www.marlinfw.org). La impresión de los andamios y probetas de ensayo mecánico se realizaron en las mismas condiciones de impresión, a una temperatura de 178º C. La velocidad de impresión utilizada fue de 30 mm/s.

IV. Caracterización

4.1 Microscopía electrónica de barrido.

El SEM consiste en un haz enfocado de electrones que barre la muestra punto por punto, detectando en nuestro caso los electrones secundarios despedidos de los átomos ionizados de la muestra. Esto proporciona una imagen de alta resolución de la superficie, permitiendo estudiarla y compararla.

La realización de las imágenes de microscopía electrónica de barrido o SEM se llevó a cabo en un equipo SEM Inspect F50 de FEI.

Para la utilización del SEM se requirió en primera instancia de la preparación de las muestras de una forma concreta. Las muestras se adhirieron a un porta-muestras de SEM mediante una cinta de carbono adherente por ambos lados para posteriormente someterla a un recubrimiento superficial de Paladio de 14 nm para hacerla conductora. En este proceso se tuvo que tener cuidado en el tratamiento de la muestra para evitar contaminaciones por polvo y otros elementos exógenos que pudiesen aparecer después en las imágenes.

Posteriormente las muestras fueron enviadas al servicio del Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) para la toma de las imágenes en el instrumento con los siguientes parámetros:

- * Voltaje: 5 kV
- * Tamaño del haz incidente: 2.5 nm
- * Distancia de trabajo a la muestra: 10.0 mm
- * Inclinación: 0°

A continuación, se presentan una selección de las imágenes obtenidas para los diferentes andamios:

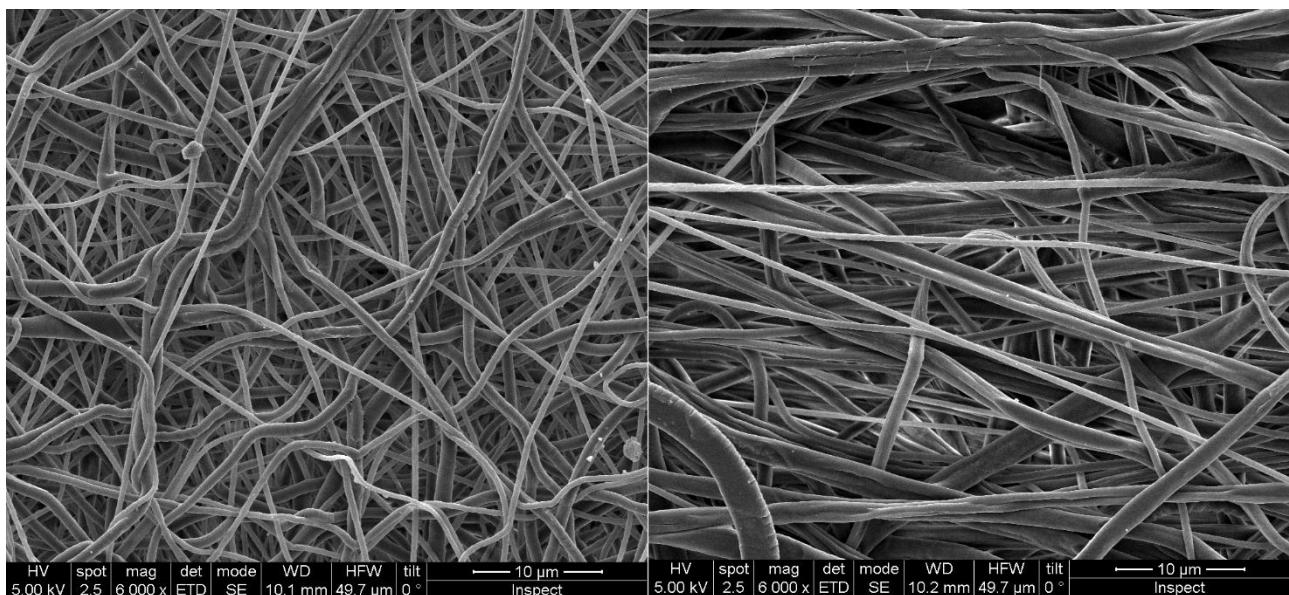


Figura 8: Imágenes de SEM de PCL electrohilado directamente (Izquierda) y orientado mediante rotor (Derecha).

Como se puede observar en la figura 8, un andamio electrohilado, sin el influjo de una fuerza orientadora como puede ser el rotor, da lugar a una estructura aleatoria sin dirección preferente en el plano. Por otro lado, si se induce la orientación se observa como una buena parte de las fibras están alineadas parcialmente en una dirección, mientras que unas pocas conservan la aleatoriedad. Esta orientación crea un material completamente anisótropo que ofrecerá propiedades mecánicas más elevadas en la dirección en la que está orientado.

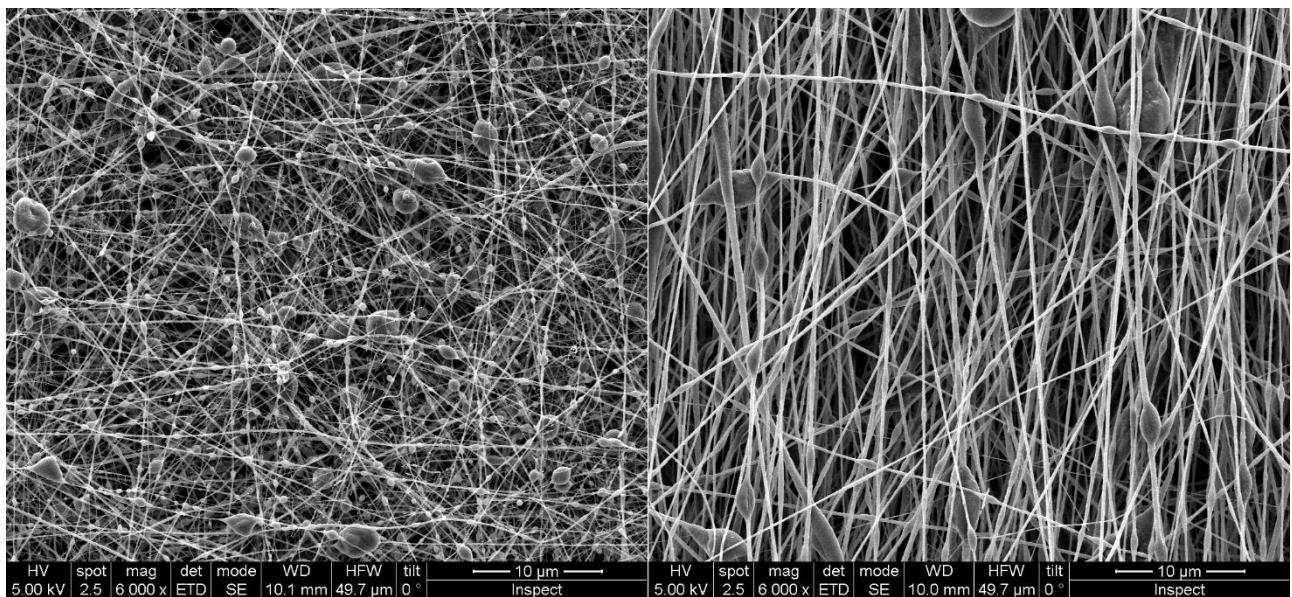


Figura 9: Imágenes de SEM de PCL-PLGA electrohilado directamente (izquierda) y orientado (Derecha).

En la mezcla de PCL-PLGA se puede observar un menor grosor de las fibras así como la presencia de un importante número de partículas más gruesas, debido intrínsecamente al método de electrohilado de este material. Además, se puede ver como al orientar las fibras mediante el rotor, este está ejerciendo en el proceso una fuerza adicional en los filamentos. Esto reduce el número de partículas presentes que pasan a adquirir una forma ovalada.

Una vez vistos los diferentes patrones obtenidos en la creación de los andamios electrohilados, se han contrastado con los obtenidos por otros autores de la literatura.^{29,30} Las distribuciones obtenidas son muy similares a las vistas en las figuras 8 y 9, observándose menos partículas cuando el disolvente es un halogenado como el usado en este trabajo.

Con el fin de caracterizar mejor las fibras, se ha realizado un estudio estadístico de los diámetros de éstas

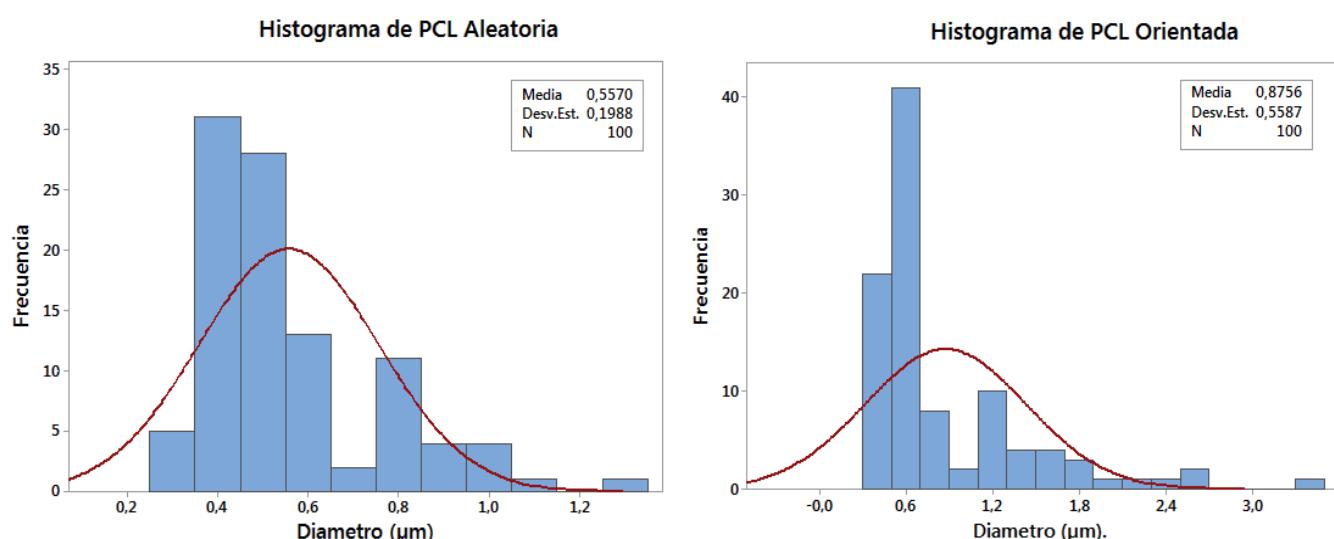


Figura 10: Distribución de grosores de los filamentos de los andamios de PCL electrohilados realizado mediante el programa ImageJ a partir de las imágenes obtenidas por SEM.

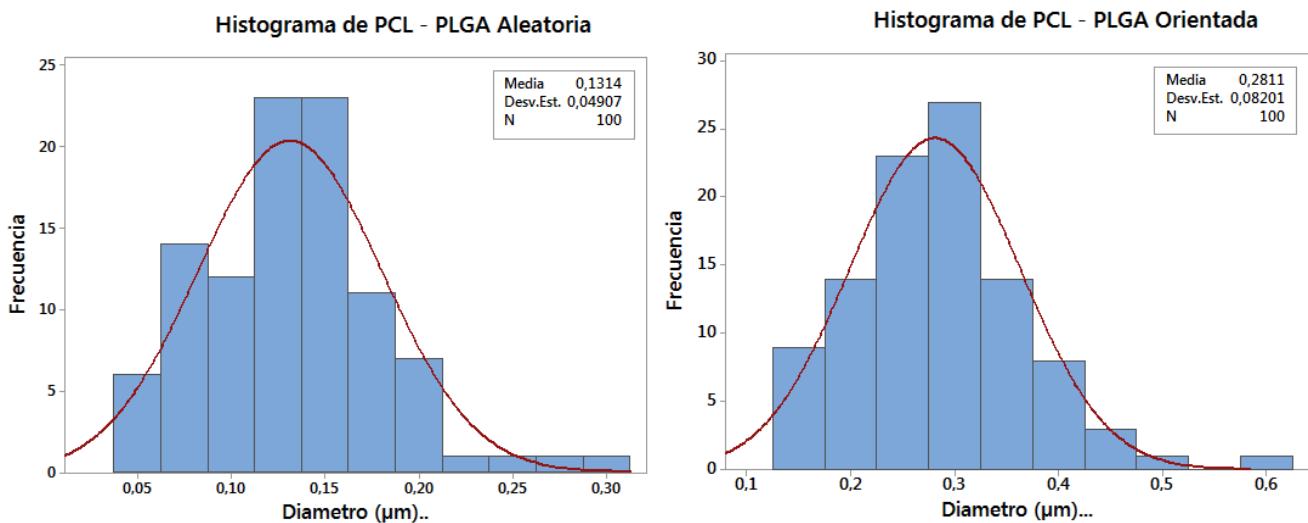


Figura 11: Distribución de grosores de los filamentos de los andamios de PCL - PLGA electrohilados realizado mediante el programa imageJ a partir de las imágenes obtenidas por SEM.

Como puede observarse, las fibras que componen los diferentes andamios están en el mismo orden de magnitud. Los de PCL-PLGA se encuentran en torno a los 131 nm ó 281 nm dependiendo de si son aleatorias u ordenadas mientras que los de PCL están en torno a los 557 nm ó 876 nm dependiendo de si son aleatorias u ordenadas. Entre diferentes polímeros el diámetro de las fibras de PCL es significativamente mayor que las que presenta el PCL - PLGA. Se observa como para el mismo polímero estos diámetros son mayores en los andamios orientados. Esto es debido, como se puede observar en la figura 12, a que parte de los filamentos en una misma dirección se fusionan dando lugar a diámetros mayores.

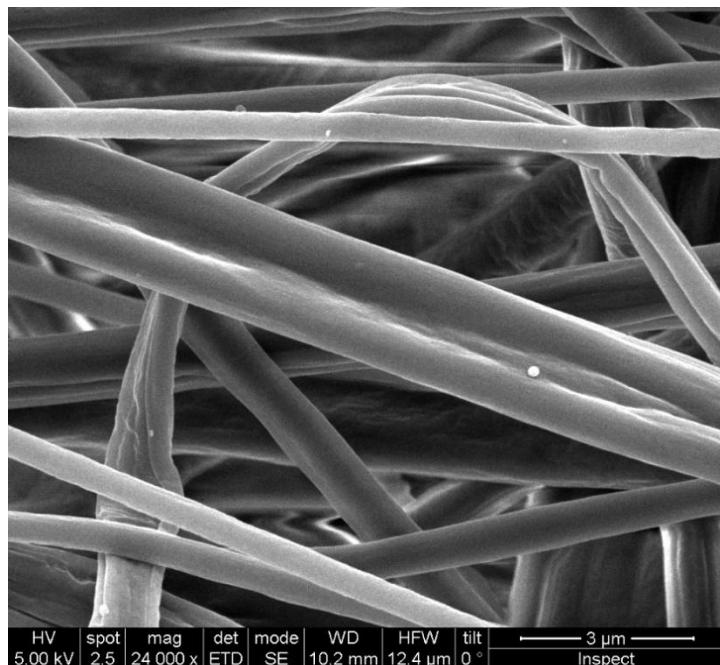


Figura 12: Vista cercana de la unión de fibras electrohiladas.

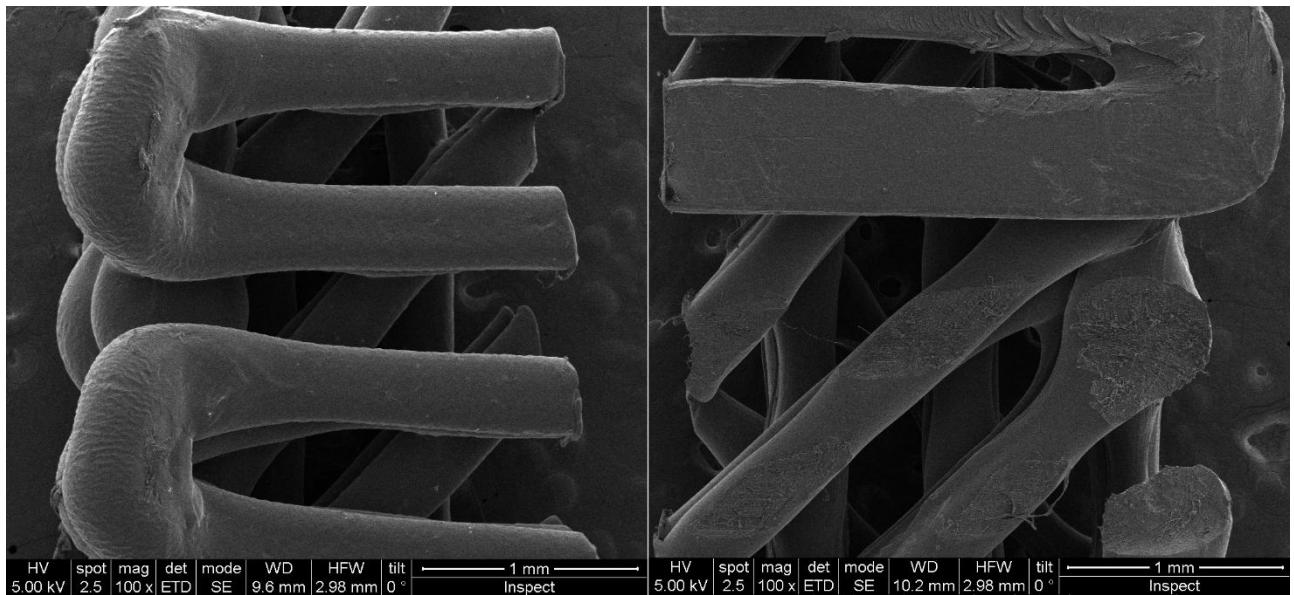


Figura 13: Imágenes de SEM de los andamios impresos 3D, PCL a la izquierda y PCL-PLGA a la derecha.

Comparando las diferentes imágenes presentadas, y como se esperaba, la diferencia de tamaño en las fibras de los andamios fabricados mediante electrohilado e impresión 3D difieren enormemente. Los diámetros obtenidos mediante impresión 3D son de 0.39 ± 0.03 mm y 0.34 ± 0.03 mm para PCL y PCL - PLGA respectivamente. La diferencia de diámetro de las fibras producidas por electrohilado y las producidas por deposición de material fundido es de tres órdenes de magnitud. Esto influye directamente ya no solo en las propias fibras, sino en su separación.

4.2 Caracterización de la porosidad

Para la caracterización de la porosidad (volumen de poros/volumen total) de los andamios electrohilados se utilizó un análisis por porosimetría de mercurio. La porosimetría consiste en la inserción a presión de un gas o fluido en una matriz porosa que se desea estudiar ofreciendo información de la porosidad y tipo de poros del material. Estos parámetros influyen directamente en la degradación, el comportamiento mecánico, la proliferación y migración celular... que puede presentar el material. Para determinar la porosidad de un material microporoso y mesoporoso se utiliza nitrógeno u otro gas como adsorbato, pero para determinar la porosidad de materiales macroporosos se utiliza porosimetría de intrusión de mercurio.

En el ensayo se utilizó un equipo MicroActive AutoPore V9600 Versión 2.02 de Micromeritics Instrument Corporation. La preparación de las muestras consistió en la obtención de cuadrados de 2.5 cm de lado de los diferentes andamios electrohilados. Posteriormente se envió al servicio de caracterización textural y de superficies del instituto de Carboquímica del CSIC para la realización de los ensayos.

Los ensayos se llevaron a cabo con un ángulo de contacto de 130º, una temperatura de 19.87ºC y una rampa de presión desde 689.5 Pa hasta 420.6 MPa.

La porosidad de los andamios impresos 3D puede ser modulada en su creación de forma sencilla. Para obtener la porosidad real que presentan los andamios tras procesos que no se hayan podido tener en cuenta como la contracción del material polimérico, se puede obtener matemáticamente. Se han tomado las medidas para los cálculos de la figura 13. Para los cálculos se han considerado las fibras como cilindros perfectos.

Parámetro estudiado	PCL			PCL - PLGA			Unidades
	Orientada	Aleatoria	Impresa	Orientada	Aleatoria	Impresión	
Diámetro de poro	1.94	1.68	377	1.12	1.37	391	µm
Porosidad	73.4	78.8	60.3	75.7	73.9	63.6	%
Densidad	0.23	0.21	-	0.26	0.27	-	g/ml

Tabla 6: Resumen de los valores de porosidad.

Como puede apreciarse en la tabla anterior, solo 1/4 del volumen total de los andamios electrohilados corresponde al material polimérico en su fabricación. Los andamios presentan un gran volumen vacío que deja expuesta una importante área superficial. Esto da lugar a una reducción en las propiedades mecánicas del material y una menor densidad.¹⁷ Se pueden clasificar todas las muestras debido al tipo de poro como macroporosas, al superar los 50 nm de diámetro de poro.

Contrastando con los parámetros de porosidad normales para el hueso trabecular, la porosidad está en el rango que puede presentar un hueso sano, inferior al 90%. Por otro lado, el hueso trabecular debe presentar poros o canales entorno a las 300 µm para permitir la difusión celular y la creación de vasos.⁶ Así pues, durante o posterior al proceso de conformar la forma final de los andamios electrohilados, se deberá de incluir algún proceso para formar estos canales. Uno de ellos puede ser la inclusión de porógenos, materiales particulados que son embebidos en la estructura pero que pueden ser disueltos fácilmente revelando una estructura porosa en el espacio que ocupaban.

4.3 Ensayo de tracción

Debido a las características de los andamios electrohilados, de entre los posibles ensayos mecánicos, el ensayo de tracción resulta ser el más adecuado de implementar. En este ensayo las probetas son sometidas a un esfuerzo de tracción uniaxial y de velocidad constante. El ensayo aporta información sobre la carga para un momento de elongación o extensión dados, permitiendo calcular el módulo de Young.

El aparato de ensayo que se utilizó para las pruebas de tracción fue un Microtester 5848 de Instron con una célula de carga de 5 N para las muestras electrohiladas y de 50 N para las probetas impresas 3D. Los ensayos de tracción fueron realizados acorde a las normas ISO 527-1:2012, ISO 527-2:2012 e ISO 527-4:1994.

Primero se realizaron las correspondientes probetas de ensayo, que, debido a las propiedades y medidas de los andamios creados, los parámetros del análisis son diferentes entre los electrohilados y los creados por impresión 3D. Por un lado, los andamios electrohilados fueron cortados mediante una plantilla rectangular de 0.8 cm por 2.8 cm. En el caso de los andamios que fueron fabricados mediante impresión 3D, se imprimieron probetas normalizadas tipo AB acordes a la norma ISO 527-1:2012.

En la obtención de los resultados pertinentes se pasa a discutir las gráficas correspondientes de Tensión-Deformación.

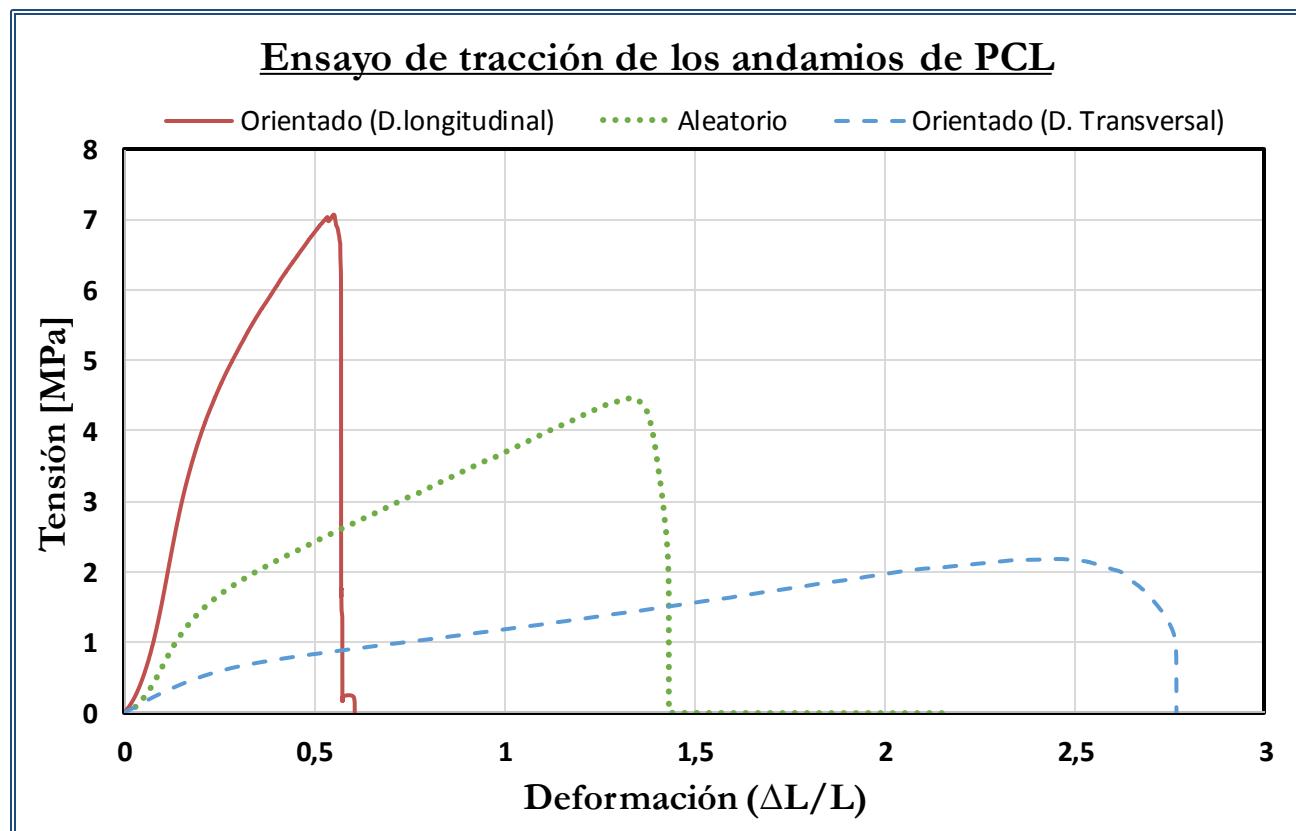


Figura 14: Curvas del ensayo de tracción de los andamios electrohilados de PCL.

Ensayo de tracción de los andamios de PCL-PLGA

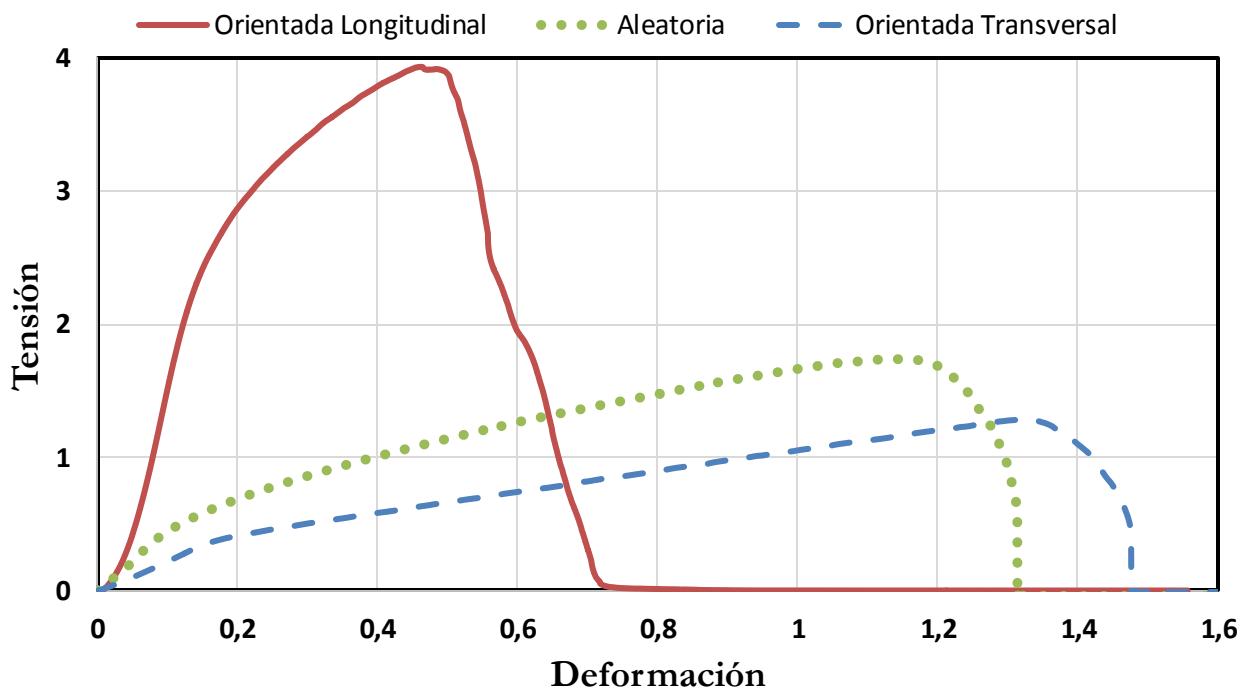


Figura 15: Curvas representativas del ensayo de tracción de los andamios electrohilados de PCL-PLGA.

Estudiando las curvas presentes en las figuras 14 y 15, y como se había supuesto ya anteriormente mediante las imágenes de SEM, las propiedades mecánicas de los andamios están fuertemente condicionadas por la orientación de sus fibras. En el caso de las muestras orientadas, se puede apreciar como presentan unas muy buenas propiedades mecánicas en la dirección preferente en comparación con la transversal. Esto hace que el andamio sea considerado un material anisótropo, como se buscaba en su imitación a unas características más parecidas al tejido óseo. Por el contrario, las probetas de carácter aleatorio no presentan una diferenciación en sus propiedades mecánicas en el plano. Estas propiedades presentan unos valores intermedios entre las direcciones longitudinal y transversal de la muestra orientada. Respecto al análisis de las curvas, se puede apreciar un primer tramo recto de comportamiento elástico seguido de un tramo plástico muy significativo y característico de los materiales poliméricos. Finalmente se puede apreciar el momento en el que las fibras comienzan a romperse, dando lugar a un descenso no abrupto en la tensión debido al elevado número de fibras que componen el andamio.

Ensayo de tracción de las probetas impresas 3D

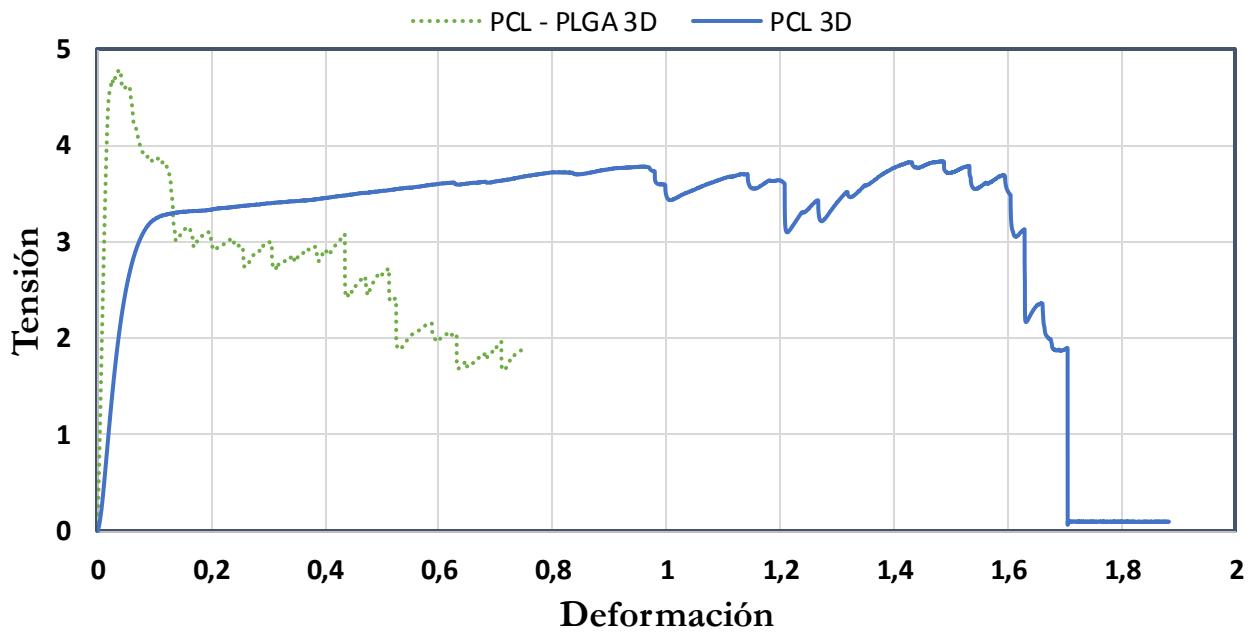


Figura 16: Curvas representativas del ensayo de tracción de los andamios impresos para los dos materiales.

Como se puede observar en la figura 16 en comparación a las anteriormente comentadas, estas curvas presentan un comportamiento marcadamente diferente. Los andamios impresos muestran una mayor pendiente en la recta inicial con un tramo de comportamiento plástico menos prolongado que en el caso de los andamios electrohilados. En la región de comportamiento plástico, el material va liberando poco a poco tensión en cada rotura de filamento. La diferencia entre ambos métodos en el tramo de rotura puede explicarse debido a su estructura. La ruptura de una fibra del material impreso supone una importante diferencia en el conjunto del material. Por otro lado, en los andamios electrohilados la ruptura de una fibra no disminuye significativamente el comportamiento general del material. Esto es debido a que el andamio electrohilado presenta una elevada cantidad de fibras, formando en su conjunto un continuo sin saltos en la zona donde el material quiebra.

Mediante la relación que se presenta en la ecuación 1 y conociendo que el comportamiento elástico de un material se presenta en el primer tramo recto de un ensayo antes de entrar en la región de plasticidad, se han calculado los diferentes módulos elásticos para los andamios, presentes en la tabla 7.

$$E \left(\frac{N}{mm^2} \right) = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F(N)/S(mm^2)}{\Delta L(mm)/L(mm)}$$

Ecuación 1: Obtención del módulo de Young (E) a partir de su relación con la tensión (σ) y la deformación (ε).

Andamio	Modulo (N/mm ²)	Intervalo de Confianza	Desviación Estándar
PCL no orientada	7.6	± 1.8	2.1
PCL orientada (zona preferencial)	11.3	± 1.8	3.1
PCL orientada (zona transversal)	2.2	± 0.5	0.8
PCL-PLGA no orientada	3.5	± 1.5	2.1
PCL - PLGA orientada (zona preferencial)	7.0	± 2.2	3.5
PCL - PLGA orientado (zona transversal)	2.8	± 0.5	0.8
PCL impreso 3D	62.2	± 9.5	11.8
PCL – PLGA impreso 3D	261.3	± 70.6	80.6

Tabla 7: Resumen de los módulos de Young según el tipo y material del andamio.

Los valores del módulo elástico obtenidos mediante el electrohilado no muestran una diferencia significativa entre ellos. Debido a esto, en la creación de nuevos andamios de PCL - PLGA podría utilizarse una combinación igual o superior al 50% en PCL en función de otras propiedades sin tener que tener especial cuidado en la posible variación del módulo elástico. Por otro lado, los andamios impresos 3D presentan una diferencia significativa entre ellos, debido principalmente a la mayor rigidez que aporta el PLGA a la mezcla de PCL - PLGA. Esta diferencia derivada de la rigidez del PLGA no se puede apreciar en los andamios electrohilados debido a que estos no presentan una diferencia significativa en los módulos obtenidos.³¹

Como se ha mencionado anteriormente en la introducción, el valor del módulo elástico del hueso trabecular para un hueso sano se encuentra entre 20 y 500 MPa. Contrastando con los módulos obtenidos en la tabla 7, se puede apreciar como los andamios obtenidos mediante impresión 3D se adecuan a las especificaciones mecánicas. En contraste, los andamios electrohilados poseen un módulo elástico del mismo orden que el mínimo, presentando unas propiedades muy justas respecto al hueso. Si se comparan los valores obtenidos con los de la bibliografía, se puede apreciar en cambio que ambos andamios se encuentran en valores similares o mejores a los presentes en esta, tanto para la misma técnica^{4,32,33} como para otras de creación de andamios porosos.¹⁷

4.4 Calorimetría diferencial de barrido

La técnica consiste en el análisis de la energía que es necesaria aplicar a una muestra frente a una referencia en un aumento lineal de la temperatura con el tiempo. Se puede averiguar cuando el material sufre un cambio de estado o una reacción por los intervalos de temperatura donde se requiere un mayor o menor aporte energético.

Se utilizó un equipo DSC822^e de la casa Mettler Toledo así como los fungibles de aluminio necesarios para el uso del mismo.

En la preparación se realizó una toma de muestras de unos 2 mm y masa conocida. Posteriormente se depositaron en un crisol de aluminio estándar que fue comparado con otro vacío que hacía de blanco de referencia en el instrumento.

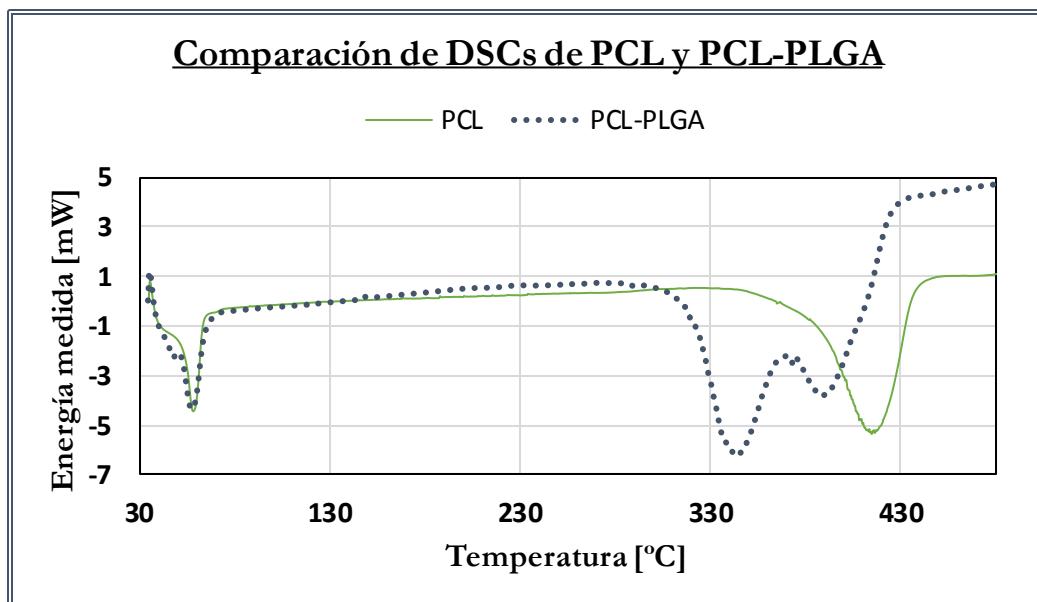


Figura 17: Curvas de DSC de ejemplo para los materiales estudiados, PCL y PCL-PLGA.

Estudiando la figura 17 se pueden observar los puntos característicos de los dos polímeros base estudiados. En la línea continua que representa el PCL, se observa un pico a 60°C correspondiente a la temperatura de fusión y otro pico bastante amplio en torno a 400°C correspondiente a la degradación del PCL. En el caso del PLGA 50:50, este posee su temperatura de transición vítrea entre 20 y 59°C según la fuente tomada, pudiendo reflejarse en el espectro de DSC como uno de los dos primeros picos observados.^{31,34-36} Además, según los datos de TGA obtenidos (ver la siguiente sección), el PLGA se degrada entre 250 y 350°C, pico que se aprecia claramente en la mezcla. Se puede observar como la PCL en la mezcla se ve afectada, disminuyendo su punto de degradación debido a la interacción con el PLGA. Debido al efecto que tiene el PLGA en el DSC se puede concluir que los dos polímeros tienen una interacción positiva entre ellos. Esto repercute en el análisis de la TGA, dando lugar a problemas en la diferenciación o cuantificación de los componentes.

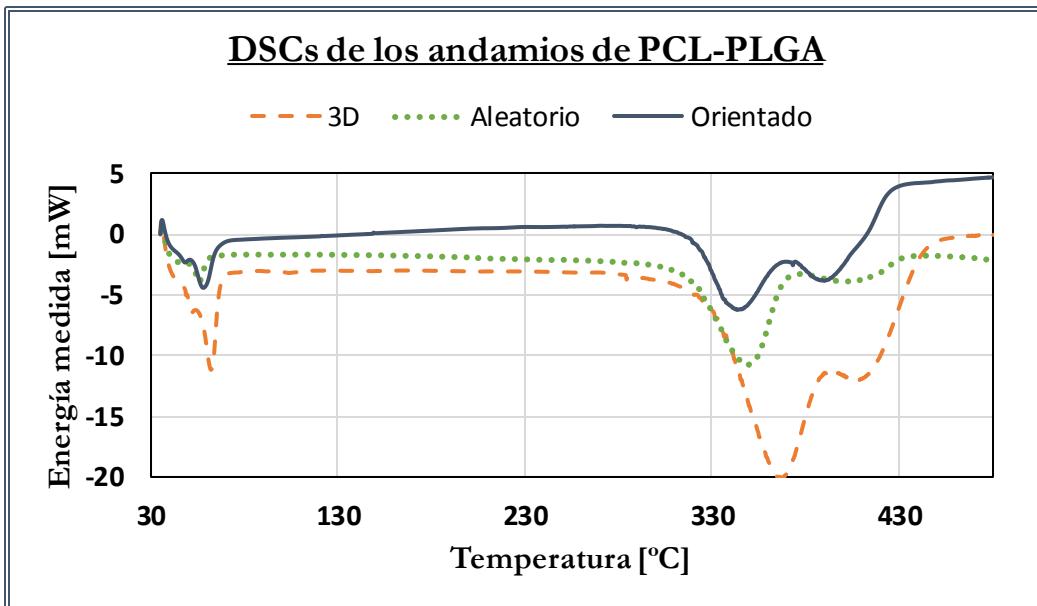


Figura 18: Curvas de DSC obtenidas para los diferentes andamios de PCL-PLGA.

A la vista del gráfico anterior se puede observar como a pesar de ser el mismo material de partida y con la misma referencia para todos ellos, bien debido a una incertidumbre general del instrumento, bien a leves variaciones en las proporciones de los mismos, se percibe un cambio significativo en las curvas obtenidas, mostrando un desplazamiento de los picos de la derecha. La DSC nos sirve para identificar los polímeros y ver que usando las dos técnicas de fabricación, la naturaleza química de los componentes de los andamios no se modifica sustancialmente.

4.5 Análisis termogravimétrico

La técnica consiste en la medida de la pérdida de masa en una muestra en función de la temperatura. Esto aporta información sobre las temperaturas de descomposición de la muestra y con ello información sobre la composición de la muestra.

Se utilizó un equipo TGA/SDTA851^e de la casa Mettler Toledo así como los fungibles de aluminio necesarios para el uso del mismo. Se tomaron muestras cuadradas entorno a los 2 mm de lado. Posteriormente se pesaron y colocaron en un crisol abierto de masa conocida el cual se depositó en el instrumento. Mediante el software pertinente proporcionado por la casa del instrumento se regularon las diferentes opciones disponibles para el método. Por un lado, se puede establecer el caudal y el tipo de flujo de gas que se suministra a la muestra. Por otro lado, se puede programar la rampa de temperatura y sus límites.

En este trabajo se ajustaron los parámetros fijando una atmósfera oxidante con un caudal de 50 ml/min y una rampa de 35°C a 600°C, tomando como variable la pendiente de la rampa.

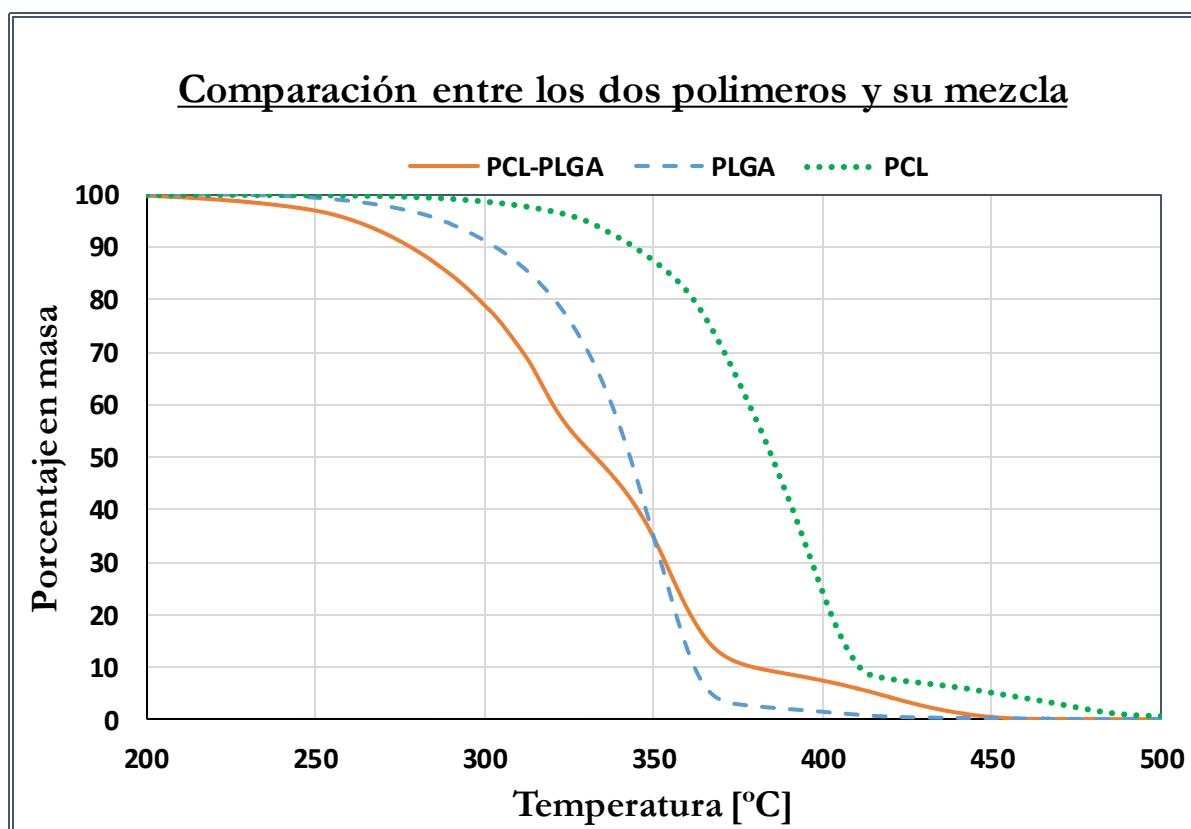


Figura 19: Curvas de TGA de los dos polímeros por separado y de su mezcla electrohilada en atmósfera oxidante.

En la figura anterior se presentan las curvas correspondientes a los polímeros de partida usados en la elaboración de los andamios con la finalidad de deducir cuanto contribuye cada uno en la curva de la mezcla. Como puede verse, aunque se nota un salto en la curva de la mezcla, no es lo suficientemente pronunciado ni largo como para poder realizar una separación cualitativa de la misma, a pesar de las diferentes optimizaciones realizadas en el método. Una peculiaridad que se puede observar respecto a la curva del PCL es que el rango de degradación es algo más amplio mientras que la temperatura de degradación entra en los observados en la literatura, la cual presenta significativas variaciones. Estas variaciones significativas son consecuencia de las propiedades en la fabricación del polímero de partida, influyendo entre otras cosas la longitud de la cadena.³³⁻³⁶

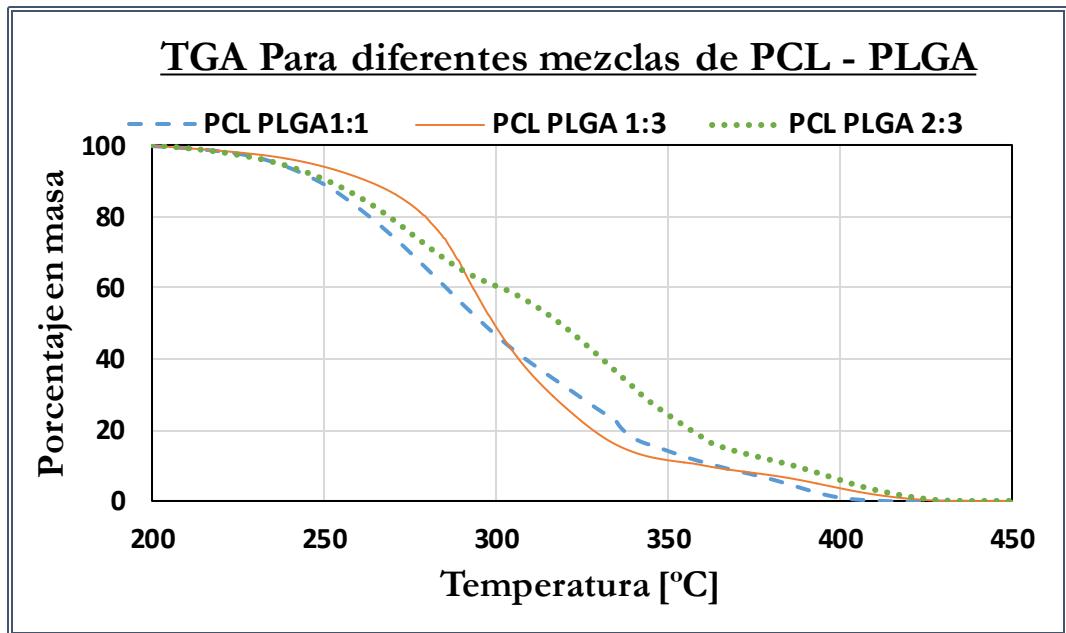


Figura 20: Curvas comparativas para las mezclas de los polímeros en diferentes proporciones realizadas en atmósfera oxidante

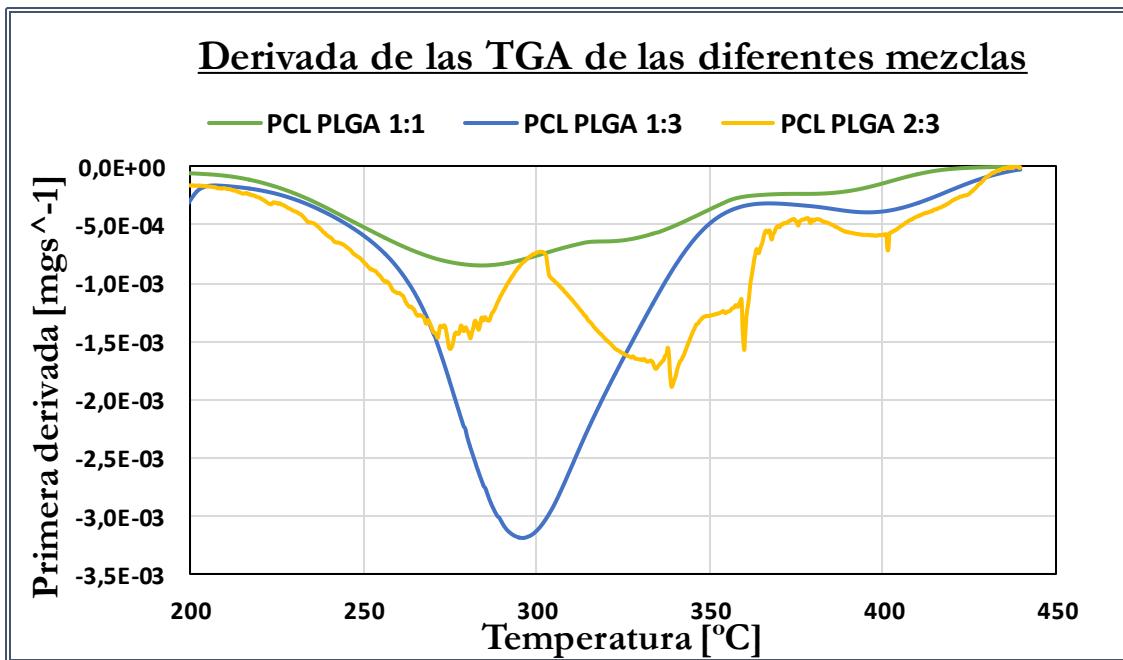


Figura 21: derivadas de las curvas de la figura 19 para las mezclas de los polímeros en diferentes proporciones.

Como ocurría en la figura 19, las curvas se entrecruzan y están estrechamente relacionadas entre sí tanto en la figura 20 como en el estudio de sus pendientes mediante la primera derivada en la figura 21. Esto da como resultado la imposibilidad de utilizar la TGA como método de análisis cuantitativo para el estudio de los porcentajes de las muestras. Al igual que los resultados obtenidos en la DSC, se puede concluir que los dos polímeros tienen una interacción mutua que afecta a sus propiedades individuales. Como conclusión, la técnica analítica mediante TGA no resulta satisfactoria para poder cuantificar la proporción presente en la probeta final obtenida a partir de los polímeros correspondientes.

4.6 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier FTIR

La espectroscopía por infrarrojos consiste en la absorción de un barrido de ondas en el espectro infrarrojo a una muestra, de tal forma que longitudes de onda concretas afectan a los enlaces entre los átomos de las moléculas. Estos absorben una determinada cantidad de la radiación emitida obteniendo el espectro de absorbancia o transmitancia correspondiente. Los datos obtenidos son automáticamente procesados por el equipo mediante la transformada de Fourier dando como resultado el espectro infrarrojo de la muestra realizada. En la realización de los espectros de infrarrojo se utilizó un Vertex 70 de la casa Bruker.

Para la realización de los espectros de infrarrojo de los andamios, debido a su espesor, pudieron ser analizados directamente por el instrumento sin requerirse una preparación previa.

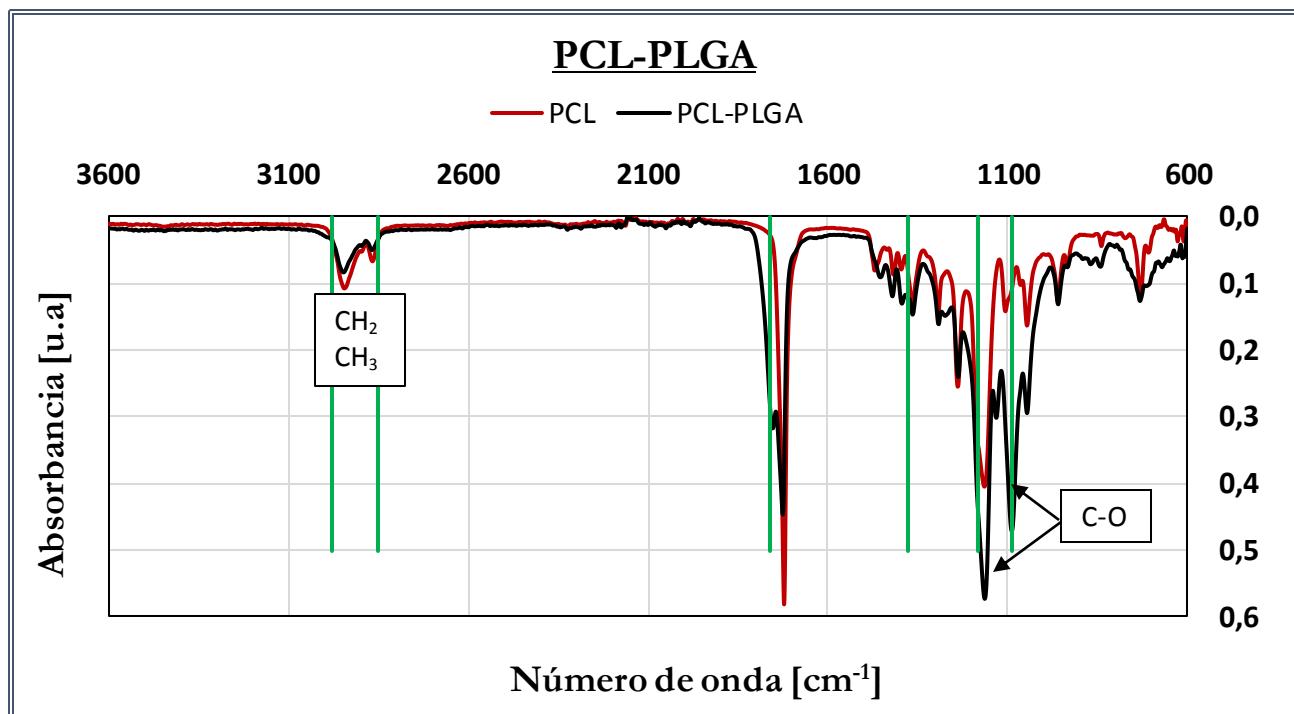


Figura 22: Espectros IR de PCL y PCL-PLGA con los enlaces característicos.

Analizando la figura 22 se puede observar en la región en torno a $2800-2900\text{ cm}^{-1}$ la presencia de grupos alquilo, tanto CH_2 como CH_3 . En 1080 cm^{-1} y 1175 cm^{-1} se observan las vibraciones correspondientes a los enlaces C-O del éster mientras que en $1725-1750\text{ cm}^{-1}$ se presenta el otro pico perteneciente a los ésteres, C=O. En el espectro de PCL-PLGA se solapan dos picos referentes al enlace C=O, por un lado, de la PCL y por otro el que presenta el PLGA. Debido al entorno químico similar, resultan indistinguibles en el pico del éster del PLGA los correspondientes a sus monómeros. El resto del espectro pertenece a sobretonos y picos menos evidentes de los grupos ya mencionados, como los correspondientes en la región característica de bajo número de onda denominada huella dactilar, característica de cada compuesto. Se han marcado los picos característicos de un espectro FTIR del PLGA según la bibliografía.^{31,34,35} Puede apreciarse como los picos de la mezcla son una suma de los mostrados por los polímeros individualmente.

Los espectros que se han obtenido mediante IR concuerdan inequívocamente a los polímeros estudiados. Estos no presentan ningún pico anómalo que pudiese implicar impurezas o la formación de otros compuestos debido a la elevada tensión eléctrica a la que son sometidos los filamentos.

4.7 Resonancia Magnética Nuclear: RMN

La resonancia magnética nuclear consiste en la medida de la recuperación de los espines nucleares, alineados previamente mediante un campo magnético, con el fin de obtener información sobre el entorno químico de estos núcleos. Adecuando la ventana de observación, puede realizarse sobre núcleos cuyo espín sea diferente de cero, siendo el más común el del ^1H . Los valores obtenidos son transformados por el equipo mediante la transformada de Fourier al correspondiente espectro de RMN.

Las medidas de RMN fueron realizadas por un servicio externo. El instrumento que se utilizó para la obtención de los espectros de HRMN fue un NMR spectrometer DPX 400 de la casa comercial Bruker.

Las muestras se disolvieron en cloroformo deuterado. Este sirve tanto como disolvente como para el ajuste de la escala del RMN. También se añadió 0.4 mg de heliotropina como patrón interno para la cuantificación de los polímeros en la mezcla de PCL-PLGA, tomando para ello disoluciones de concentraciones crecientes entre 0.8 y 2.4 mg de la probeta.

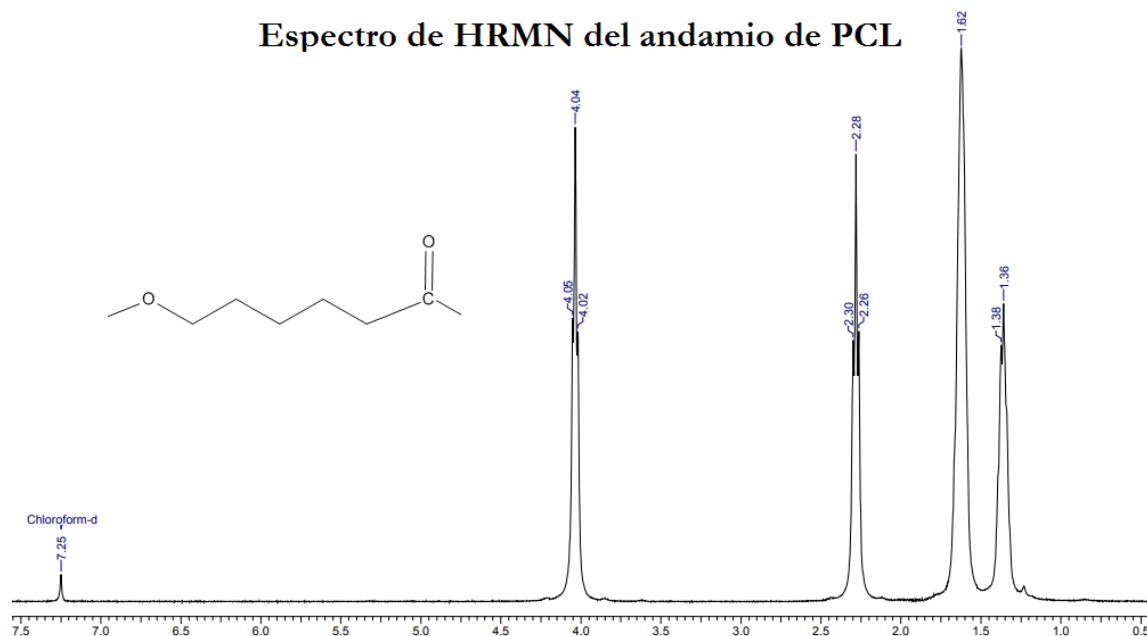


Figura 23: Espectro de HRMN del andamio de PCL realizado en cloroformo deuterado en un RMN de 400 MHz.

En el espectro se observa el pico correspondiente al disolvente, el cloroformo deuterado, a un desplazamiento de 7.25 ppm. El triplete perteneciente a la muestra de más a la derecha, pertenece a al CH_2 del éster que está unido al oxígeno. El siguiente triplete corresponde al CH_2 unido al grupo éster por el otro extremo. Por último, los otros dos quintupletes corresponden a los hidrógenos del centro, siendo los del carbono central los que aparecen más a la izquierda.

En el espectro solo aparecen los picos correspondientes al PCL y el disolvente, concluyendo que en el andamio de partida no había posibles contaminantes o compuestos de reacciones secundarias durante la creación del mismo.

Espectro de HRMN del andamio de PCL-PLGA

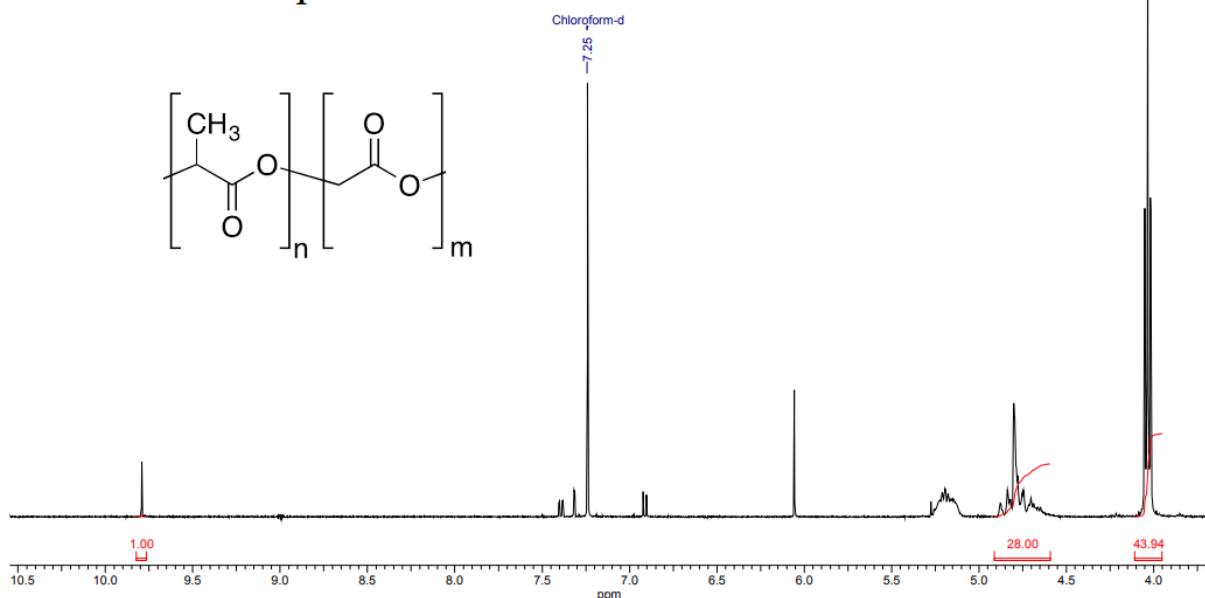


Figura 24: Espectro de HRMN del andamio de PCL realizado en cloroformo deuterado en un RMN de 400 MHz.

El espectro presenta múltiples picos que no corresponden al PLGA, pertenecientes a la heliotropina usada como patrón interno. En un espectro habitual de PLGA encontraríamos un cuadruplete sobre 5.2 perteneciente al CH, un multiplete en 4.7 perteneciente al CH₂ y sobre 1.6 un singlete perteneciente al CH₃. Los picos que se observan en el espectro en las áreas comentadas coinciden con los del PLGA. Sin tener en cuenta la Heliotropina, el espectro presente es acorde al de la literatura.³⁴ En el caso de este espectro, en vez de tratar de mostrar el espectro del PLGA se ha utilizado con el patrón interno y la integración para el cálculo de la relación entre PCL y PLGA existente. Los valores obtenidos para esta relación son en relación de PLGA al total del 33.68% para la muestra orientada y de 31.87% para la muestra aleatoria. Esto puede deberse a dos motivos. Por un lado puede tratarse de que los andamios no son completamente homogéneos o la tamaña de muestra no fue del número suficiente de muestras. La otra posibilidad es la que debido al elevado tiempo que tardó en realizarse el análisis, el PLGA de la muestra de PCL - PLGA se haya degradado, dando lugar a un menor porcentaje del que deberían mostrar los resultados. Para comprobar esto se requiere de un nuevo análisis que confirme o desmienta estas suposiciones.

4.8 Ensayo de degradación en condiciones estáticas

Para la realización del ensayo se utilizó una incubadora además de diversos materiales de laboratorio necesarios en la preparación de disoluciones.

En la preparación del ensayo de degradación en condiciones estáticas se tomó una masa conocida en un rango entre 8 y 16 mg de andamio. Se agregó un volumen de suero fisiológico bovino (PBS) tal que la relación masa/volumen fuese constante para todas las muestras. Se realizó una primera aproximación en el muestreo de los andamios con una medida de peso aproximada para que las muestras se encuentren en el rango de masa fijado. Posteriormente se tomó el valor preciso mediante una balanza de precisión y se añadió a un recipiente individual para analizar su degradación.

Se preparó una disolución de PBS que se dividió en dos fracciones. La primera fracción preparada se utilizó directamente en las muestras. A la otra fracción se le añadió una enzima que, según estudios anteriores³⁰, degrada la PCL. La enzima que se utilizó durante el trabajo fue Lipasa proveniente de *Aspergillus Oryzae* de Sigma Aldrich en una concentración de 15 Unidades/ml.

Una vez fue preparada toda la batería de muestras con su respectivo volumen, con y sin enzima, se dejaron en una incubadora a 37°C durante toda la duración del experimento hasta su recogida según se muestra en la figura 25 a continuación.

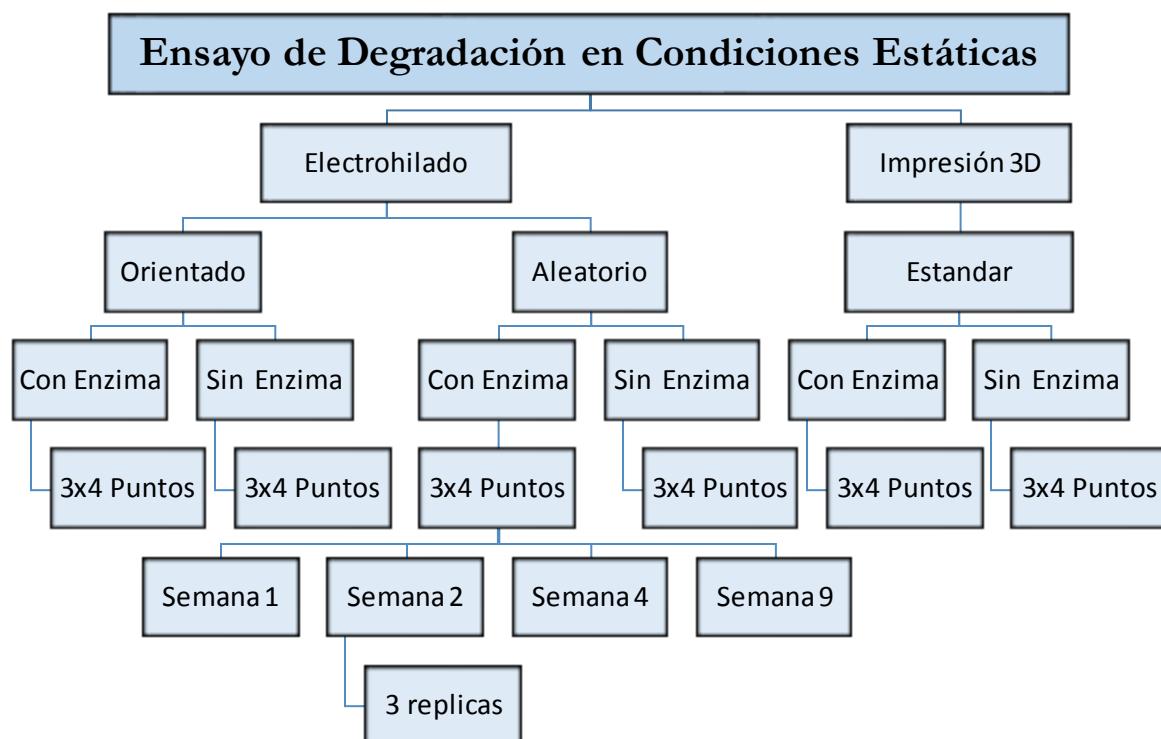


Figura 25: Diagrama de la toma de muestras de los ensayos de degradación en condiciones estáticas.

Una vez fueron retiradas las muestras de la incubadora, se les retiró el fluido contenedor y se dejaron a vacío con desecante durante 24 horas para retirar toda la posible humedad absorbida. Posteriormente se pesaron en la balanza de precisión para la toma de datos. Las muestras obtenidas se analizaron mediante SEM.

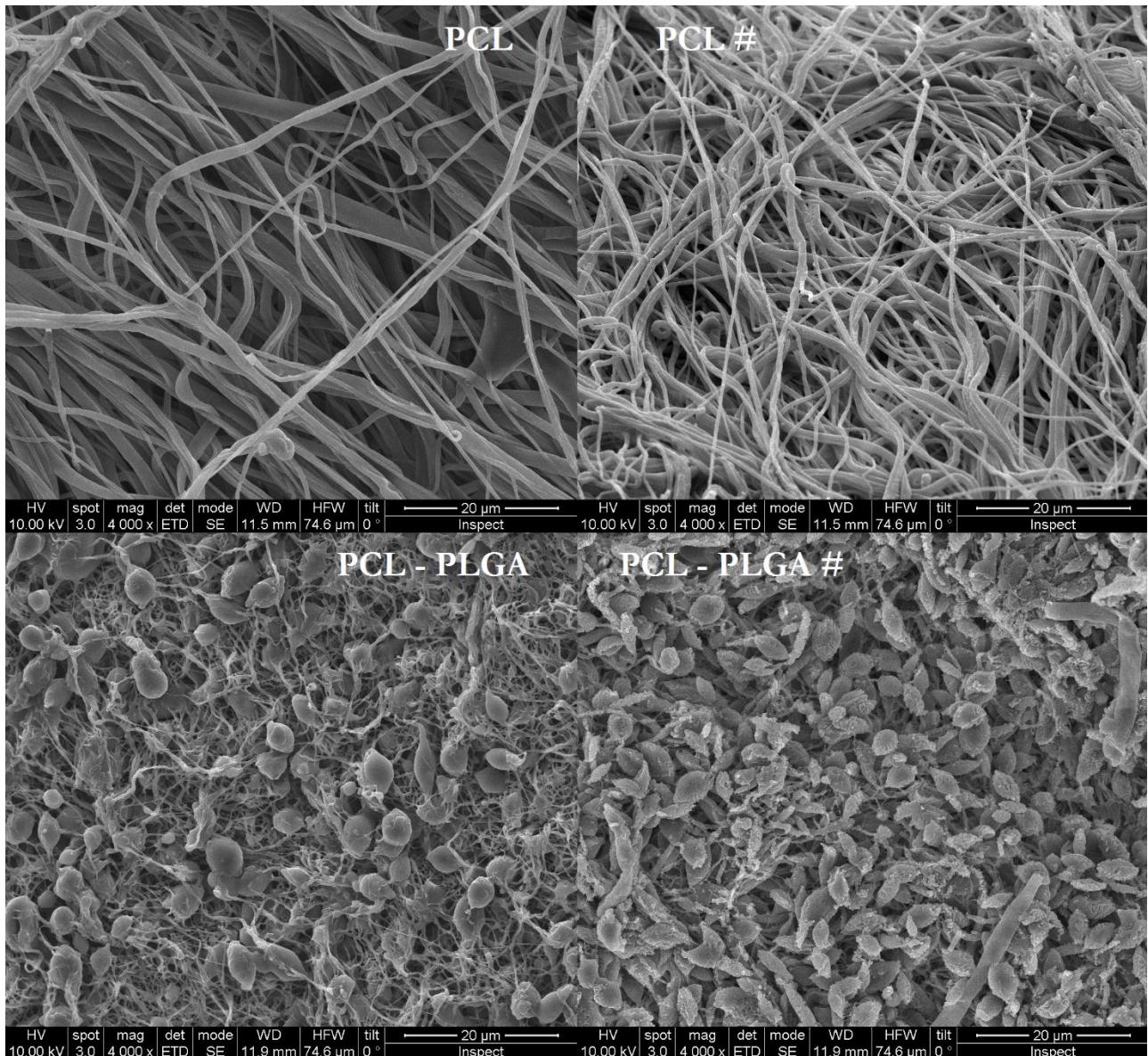


Figura 26: Imágenes de SEM de los andamios electrohilados tras 9 semanas en condiciones estáticas de degradación. Los de arriba corresponden a los de PCL y los de abajo a los de PCL - PLGA. Las imágenes de la derecha son las correspondientes a las degradaciones con enzima Lipasa.

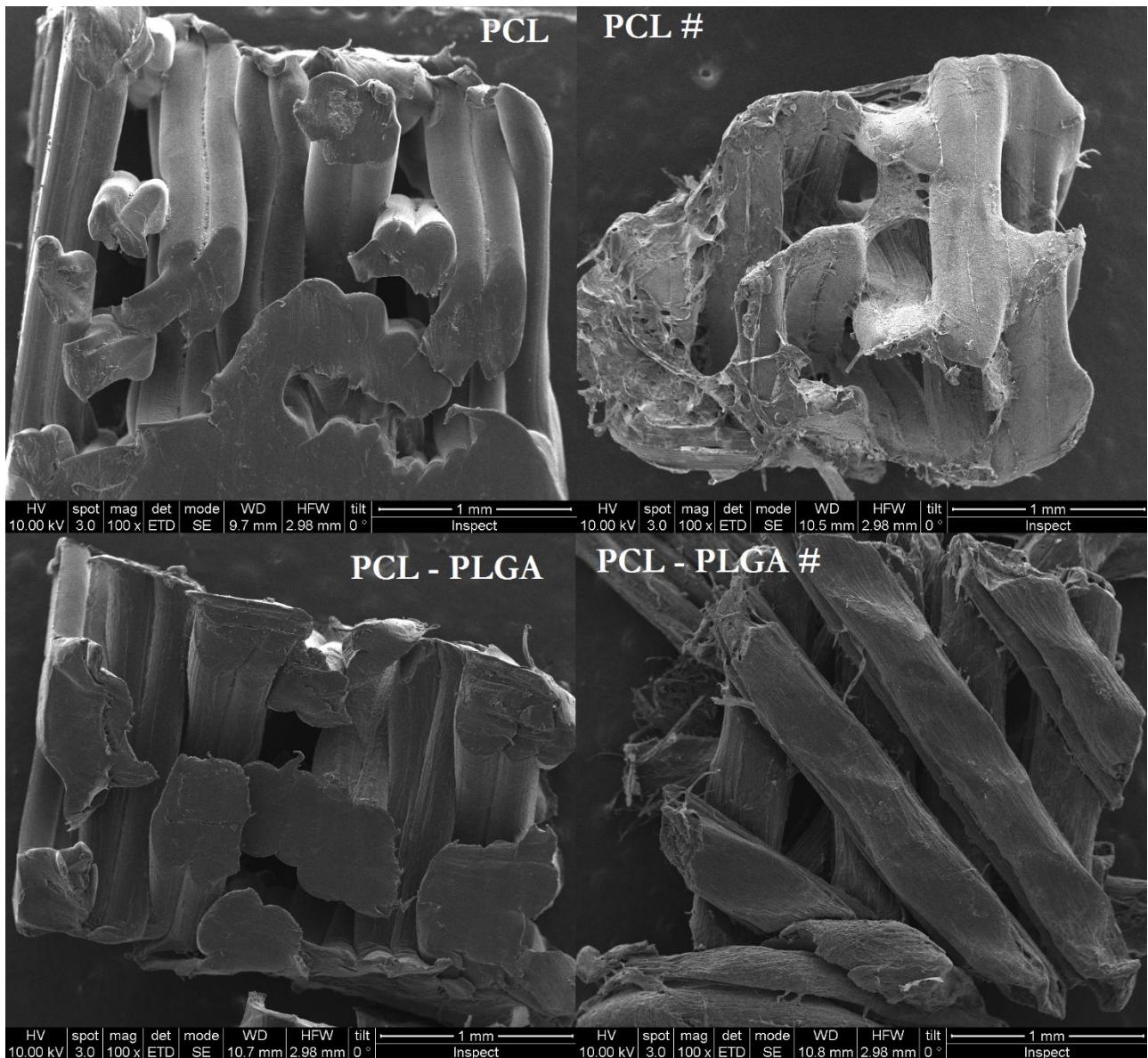


Figura 27: Imágenes de SEM de los andamios impresos 3D tras 9 semanas en condiciones estáticas de degradación. Los de arriba corresponden a los de PCL y los de abajo a los de PCL - PLGA. Las imágenes de la derecha son las correspondientes a las degradaciones con enzima Lipasa.

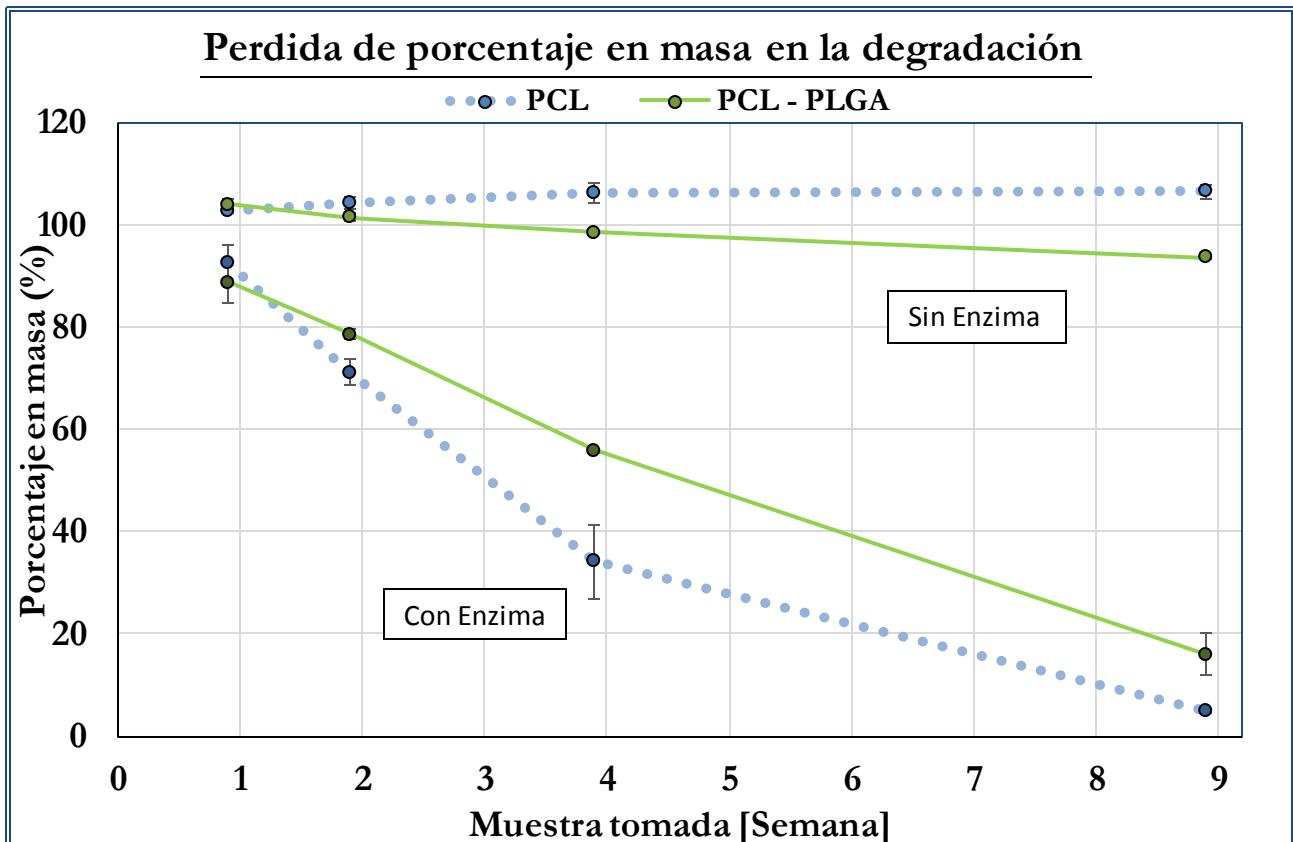


Figura 28: Degradación de los andamios orientados electrohilados con y sin enzima lipasa

Los resultados obtenidos en la degradación en condiciones en estático, visible en el caso de los andamios degradados sin enzima, muestran que, al principio, presentan una absorción de agua en su estructura. Esto da como consecuencia valores superiores al peso inicial en su proyección en el tiempo. En condiciones de PBS sin enzima, el PLGA va perdiendo masa con el tiempo mientras que la PCL, como cabía de esperar desde un inicio, apenas presenta degradación.

Por otro lado, cuando se estudian ambos materiales en presencia de la enzima lipasa, se observa como degrada en mayor medida el andamio de PCL que el de PCL-PLGA debido a cantidad de PCL expuesta en cada caso. La lipasa es la encargada en organismos vivos de hidrolizar el enlace éster de los triacilglicéridos en ácidos grasos y glicerol. En los experimentos llevados a cabo, la Lipasa hidroliza el enlace éster de la PCL rompiendo las cadenas. Esto da lugar a un incremento en la degradación de los dos andamios, afectando principalmente a los compuestos en su totalidad por PCL.³⁰

Comparación del porcentaje de perdida de masa con enzima Lipasa

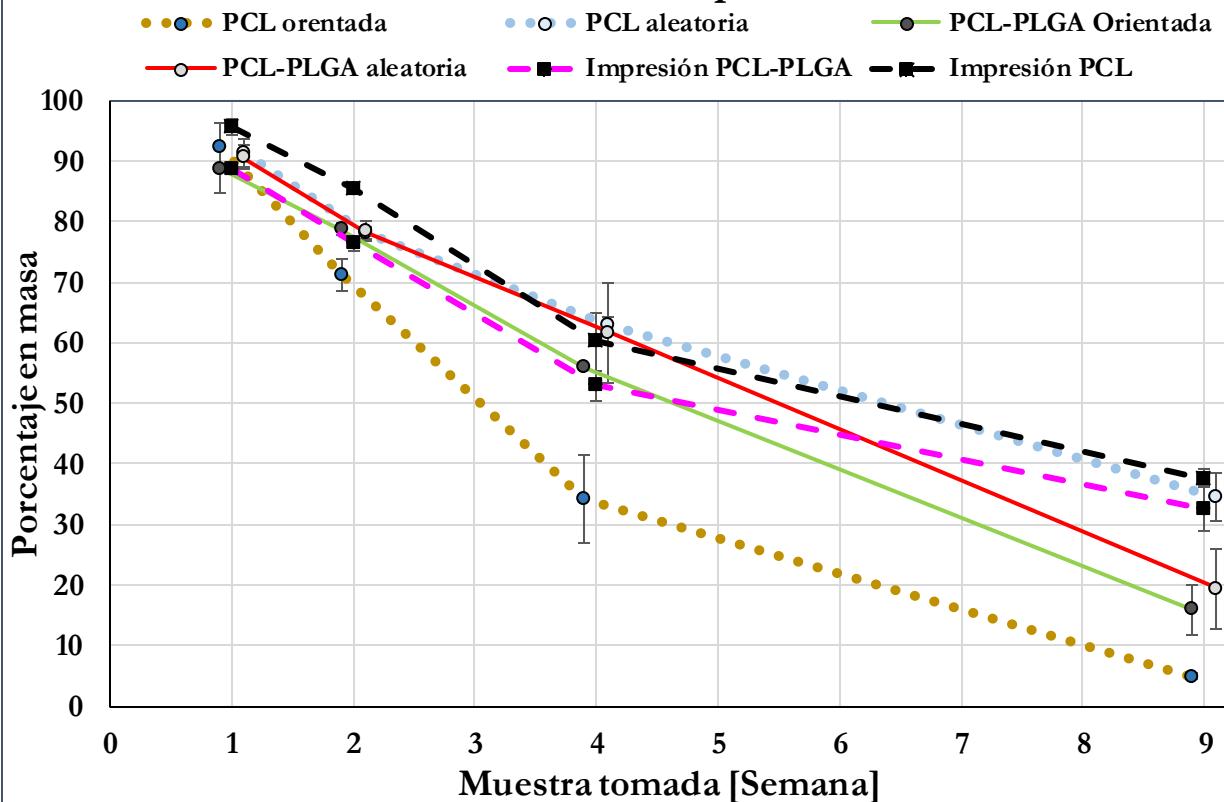


Figura 29: Comparación entre los diferentes tipos de andamios en presencia de enzima Lipasa

En la figura anterior se observa como la orientación de los andamios da lugar a una variación significativa, en el caso de la PCL, en cuanto al grado de degradación en presencia de enzima Lipasa. En cuanto a los andamios de PCL-PLGA, no se puede concluir si la diferencia entre ambos es significativa debido al bajo número de réplicas que se ha realizado, a pesar de que la tendencia general de la media es que afecta levemente en la degradación.

Los andamios fabricados por FDM siguen la misma tendencia general que los electrohilados, siendo el caso de los creados a partir de PCL los que se degradan más que los de PCL-PLGA en presencia de enzima y, por otro lado, siendo solo los creados a partir de la mezcla los que se degradan apreciablemente en presencia de PBS sin enzima. Comparando las técnicas de fabricación, los andamios producidos mediante electrohilado comparados con los fabricados mediante impresión se degradan más. Ello es debido a la mayor relación superficie-volumen expuesta por las fibras electrohiladas.

4.9 Ensayo de degradación en condiciones dinámicas

El ensayo se ha llevado a cabo en un reactor biológico de perfusión Minusheet con la ayuda de una bomba peristáltica de la marca Dinko.

En primer lugar, se requiso de acondicionar las muestras con la finalidad de viabilizar el ensayo. Por un lado, las probetas de impresión 3D se imprimieron con las dimensiones adecuadas para encajar en los soportes del reactor. Por otro lado, y debido a las dimensiones específicas de las muestras electrohiladas, fue necesario el diseño y optimización de unos marcos estructurales de soporte para las muestras, realizados mediante impresión 3D en PC/ABS, material polimérico no degradable en las condiciones estudiadas. Se tomó el valor preciso del peso de las muestras en seco previo al experimento.

Las muestras se sometieron a un flujo de 0,6 mL/min,³⁷ flujo intermedio al que es sometido el hueso trabecular en condiciones fisiológicas, durante una semana. Se realizó el ensayo tanto en PBS como en PBS con enzima lipasa. Las disoluciones fueron preparadas como se ha especificado en el apartado anterior.

Una vez terminado el periodo de ensayo, se eliminó el fluido contenedor de las muestras y se dejaron a vacío durante 24 horas para eliminar la posible humedad absorbida. Posteriormente, las muestras se pesaron en la balanza de precisión para la obtención de la masa degradada por diferencia de pesada. En el caso de las probetas impresas 3D, todo lo introducido en el reactor de degradación es masa de andamio a degradadas. Por el contrario, en el caso de los andamios electrohilados en un marco, solo el área central que el marco no protege es la que está expuesta a la degradación. Por este motivo, hay que tener en cuenta el área expuesta en los andamios electrohilados para conocer el porcentaje de degradación real.

Polímero	Orientado	Sin Enzima		Con Enzima			Unidades
		Sin Orientar	Impreso	Orientado	Sin Orientar	Impreso	
PCL	2.2 ± 0.3	2.3 ± 0.1	0.2 ± 0.2	8.5 ± 1.0	7.0 ± 0.7	4.9 ± 2.2	mg/cm ²
PCL - PLGA	2.3 ± 0.3	2.9 ± 0.7	0.1 ± 0.3	2.7 ± 0.2	2.9 ± 0.7	1.3 ± 0.2	mg/cm ²

Tabla 8: Valores de pérdida de masa porcentual según el área expuesta en los ensayos de degradación en condiciones dinámicas, a un flujo de 0.6 ml/min durante una semana.

Según los valores que se presentan en la tabla 8, se puede observar como la degradación de la PCL y la del PCL - PLGA son prácticamente equivalentes cuando son sometidas a un flujo a su través. Estos resultados contrastan directamente con los obtenidos en la prueba de degradación en condiciones estáticas, donde se podía apreciar una prácticamente inexistente degradación de la PCL. Por otro lado, los valores de degradación obtenidos en presencia de la enzima Lipasa concuerdan con los anteriormente obtenidos. Puede verse como la enzima degrada en gran medida la PCL. Otro aspecto que salta a la vista es el hecho de que, en la degradación en flujo, los andamios electrohilados e impresos tienen un comportamiento marcadamente diferente entre ellos. Los andamios electrohilados muestran una tasa de descomposición 10 veces mayor bajo el efecto de la enzima y una significativa degradación sin el efecto de esta enzima.

V. Conclusiones

Las diferencias más destacadas entre los polímeros estudiados se presentan en el módulo elástico para la impresión FDM, donde la adición del PLGA repercute en un aumento de la rigidez del andamio, y en las degradaciones. En estas se observa como el PLGA tienda a degradarse más que el PCL en presencia de un medio acuoso (PBS), mientras que la degradación del PCL se ve incrementada en gran medida en presencia de la enzima Lipasa.

Los andamios electrohilados presentan una estructura micrométrica ofreciendo una mayor porosidad y relación superficie/volumen en detrimento de una menor capacidad de modular su configuración espacial como ocurre en la impresión 3D.

Las diferencias entre los andamios electrohilados orientados y no orientados son principalmente de carácter mecánico. De esta forma, la elección entre uno y otro depende de si se busca un material anisótropo o no en el plano.

Mediante los análisis de carácter químico se ha establecido y comprobado que los andamios creados mediante el electrohilado no estaban contaminados con trazas de disolvente o excipientes, ni se formaban productos derivados de posibles reacciones al someterse a una elevada diferencia de potencial.

Se ha comprobado como en los ensayos de degradación difieren significativamente los resultados obtenidos mediante los métodos en estático y dinámico. Esto implica y refuerza la necesidad, bien de mejorar los ensayos en estático utilizados, o bien de realizar ensayos que se acerquen más a las condiciones reales de uso de los andamios si se quieren resultados válidos en futuras investigaciones. Se deberían pues estandarizar los métodos para evaluar la biodegradación de los materiales.

Finalmente concluir con la valoración positiva de las propiedades de los andamios creados en referencia a su utilización en la regeneración ósea del hueso trabecular, con las consideraciones ya mencionadas.

La continuación lógica de este proyecto vendría determinada por un lado por el estudio de su biocompatibilidad en ensayos biológicos. Por otro lado, la posibilidad de optimizar y mejorar las propiedades de los andamios creados. Esto puede lograrse con la posible adición de fármacos, factores de crecimiento o de vascularización... o en la impresión 3D la creación enfocada de los andamios para un hueso trabecular concreto, imitando y copiando la disposición y estructura interna de los originales en el caso de que se deseen implantar como sustitutos temporales.

VI. Bibliografía

- (1) Rose, J. C.; De Laporte, L. Hierarchical Design of Tissue Regenerative Constructs. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7* (6), 1–31. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701067>.
- (2) Hutmacher, D. W. Scaffold Design and Fabrication Technologies for Engineering Tissues--State of the Art and Future Perspectives. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2001**, *12* (1), 107–124.
- (3) Porter, J. R.; Ruckh, T. T.; Popat, K. C. Bone Tissue Engineering: A Review in Bone Biomimetics and Drug Delivery Strategies. *Biotechnol. Prog.* **2009**, *25* (6), 1539–1560. <https://doi.org/10.1002/btpr.246>.
- (4) Eshraghi, S.; Das, S. Mechanical and Microstructural Properties of Polycaprolactone Scaffolds with One-Dimensional, Two-Dimensional, and Three-Dimensional Orthogonally Oriented Porous Architectures Produced by Selective Laser Sintering. *Acta Biomater.* **2010**, *6* (7), 2467–2476. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.002>.
- (5) Winkler, T.; Sass, F. A.; Duda, G. N.; Schmidt-Bleek, K. A Review of Biomaterials in Bone Defect Healing, Remaining Shortcomings and Future Opportunities for Bone Tissue Engineering: The Unsolved Challenge. *Bone Jt. Res.* **2018**, *7* (3), 232–243. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.73.BJR-2017-0270.R1>.
- (6) Bose, S.; Vahabzadeh, S.; Bandyopadhyay, A. Bone Tissue Engineering Using 3D Printing. *Mater. Today* **2013**, *16* (12), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.11.017>.
- (7) Oftadeh, R.; Perez-Viloria, M.; Villa-Camacho, J. C.; Vaziri, A.; Nazarian, A. Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review. *J. Biomech. Eng.* **2015**, *137* (1), 010802–010802. <https://doi.org/10.1115/1.4029176>.
- (8) Natali, A. N.; Meroi, E. A. A Review of the Biomechanical Properties of Bone as a Material. *J. Biomed. Eng.* **1989**, *11* (4), 266–276. [https://doi.org/10.1016/0141-5425\(89\)90058-7](https://doi.org/10.1016/0141-5425(89)90058-7).
- (9) Sabir, M. I.; Xu, X.; Li, L. A Review on Biodegradable Polymeric Materials for Bone Tissue Engineering Applications. *J. Mater. Sci.* **2009**, *44* (21), 5713–5724. <https://doi.org/10.1007/s10853-009-3770-7>.
- (10) Xu, W.; Tian, J.; Liu, Z.; Lu, X.; Hayat, M. D.; Yan, Y.; Li, Z.; Qu, X.; Wen, C. Novel Porous Ti35Zr28Nb Scaffolds Fabricated by Powder Metallurgy with Excellent Osteointegration Ability for Bone-Tissue Engineering Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *105*, 110015. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110015>.
- (11) W Bauer, T.; Muschler, G. Bone Graft Materials. An Overview of the Basic Science. *Clin. Orthop.* **2000**, *371*, 10–27.
- (12) Kumar, P.; Fathima, G.; Vinitha, B. Bone Grafts in Dentistry. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2013**, *5* (5), 125. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.113312>.
- (13) Andreu, V.; Mendoza, G.; Arruebo, M.; Irusta, S. Smart Dressings Based on Nanostructured Fibers Containing Natural Origin Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Regenerative Compounds. *Materials* **2015**, *8* (8), 5154–5193. <https://doi.org/10.3390/ma8085154>.
- (14) Seeram Ramakrishna; Zamani, M.; Molamma P Prabhakaran. Advances in Drug Delivery via Electrospun and Electrosprayed Nanomaterials. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, 2997–2997. <https://doi.org/10.2147/ijn.s43575>.
- (15) Gentile, P.; Chiono, V.; Carmagnola, I.; Hatton, P. V. An Overview of Poly(Lactic-Co-Glycolic) Acid(PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (3), 3640–3659. <https://doi.org/10.3390/ijms15033640>.
- (16) Aimar Anna, P. A., and Innocenti Bernardo. The Role of 3D Printing in Medical Applications: A State of the Art," Vol. 2019, Article ID 5340616, 10 Pages, 2019. *J. Healthc. Eng.* **2019**, *2019*, 10–10.
- (17) He, X.; Kawazoe, N.; Chen, G. Preparation of Cylinder-Shaped Porous Sponges of Poly(l-Lactic Acid), Poly(DL-Lactic-Co-Glycolic Acid), and Poly(ϵ -Caprolactone). *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/106082>.
- (18) Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28* (3), 325–347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>.
- (19) Gorodzha, S. N.; Surmeneva, M. A.; Surmenev, R. A. Fabrication and Characterization of Polycaprolactone Cross-Linked and Highly-Aligned 3-D Artificial Scaffolds for Bone Tissue Regeneration

via Electrospinning Technology. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2015**, *98* (1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012024>.

(20) Yarin, A. L.; Koombhongse, S.; Reneker, D. H. Taylor Cone and Jetting from Liquid Droplets in Electrospinning of Nanofibers. *J. Appl. Phys.* **2001**, *90* (9), 4836–4846. <https://doi.org/10.1063/1.1408260>.

(21) Chakraborty, S.; Liao, I. C.; Adler, A.; Leong, K. W. Electrohydrodynamics: A Facile Technique to Fabricate Drug Delivery Systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (12), 1043–1054. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.013>.

(22) Sánchez, L. M. D.; Rodriguez, L.; López, M. ELECTROSPINNING: LA ERA DE LAS NANOFIBRAS. **2013**, *18*.

(23) Rodríguez-Tobías, H.; Morales, G.; Grande, D. Comprehensive Review on Electrospinning Techniques as Versatile Approaches toward Antimicrobial Biopolymeric Composite Fibers. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *101*, 306–322. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.099>.

(24) Choonara, Y. E.; Dott, C.; Kumar, P.; Tomar, L.; du Toit, L. C.; Tyagi, C.; Pillay, V.; Ndesendo, V. M. K. A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications. *J. Nanomater.* **2013**, *2013* (November 2015), 1–22. <https://doi.org/10.1155/2013/789289>.

(25) Balletti, C.; Ballarin, M.; Guerra, F. 3D Printing: State of the Art and Future Perspectives. *J. Cult. Herit.* **2017**, *26*, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2017.02.010>.

(26) Gardan, J. Smart Materials in Additive Manufacturing: State of the Art and Trends. *Virtual Phys. Prototyp.* **2019**, *14* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1080/17452759.2018.1518016>.

(27) Poh, P. S. P.; Valainis, D.; Bhattacharya, K.; van Griensven, M.; Dondl, P. Optimization of Bone Scaffold Porosity Distributions. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 9170. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44872-2>.

(28) Whyte, D. J.; Rajkhowa, R.; Allard, B.; Kouzani, A. Z. A Review on the Challenges of 3D Printing of Organic Powders. *Bioprinting* **2019**, *16*, e00057. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2019.e00057>.

(29) Mochane, M. J.; Motsoeneng, T. S.; Sadiku, E. R.; Mokhena, T. C.; Sefadi, J. S. Morphology and Properties of Electrospun PCL and Its Composites for Medical Applications: A Mini Review. *Appl. Sci.* **2019**, *9* (11), 2205. <https://doi.org/10.3390/app9112205>.

(30) Aragón, J.; Salerno, S.; De Bartolo, L.; Irusta, S.; Mendoza, G. Polymeric Electrospun Scaffolds for Bone Morphogenetic Protein 2 Delivery in Bone Tissue Engineering. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *531*, 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.07.029>.

(31) Marques, D. R.; Alberto, L. Analysis of Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid)/Poly (Isoprene) Polymeric Blend for Application as Biomaterial. **2013**, *23*, 579–584.

(32) Shkarina, S.; Shkarin, R.; Weinhardt, V.; Melnik, E.; Vacun, G.; Kluger, P.; Loza, K.; Epple, M.; Ivlev, S. I.; Baumbach, T.; et al. 3D Biodegradable Scaffolds of Polycaprolactone with Silicate-Containing Hydroxyapatite Microparticles for Bone Tissue Engineering: High-Resolution Tomography and in Vitro Study. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27097-7>.

(33) International Conference on Chemical and Process Engineering; Pierucci, S.; Associazione Italiana di Ingegneria Chimica; International Conference on Chemical and Process Engineering; ICheAP. ICheAP-11 - Special Issue 11th International Conference on Chemical and Process Engineering ; 2-5 June 2013, Milan, Italy. AIDIC 2013.

(34) D'Avila Carvalho Erbetta, C. Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Copolymer. *J. Biomater. Nanobiotechnology* **2012**, *03* (02), 208–225. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2012.32027>.

(35) Silva, A. T. C. R.; Cardoso, B. C. O.; Silva, M. E. S. R. e; Freitas, R. F. S.; Sousa, R. G. Synthesis, Characterization, and Study of PLGA Copolymer <math>in Vitro</math> Degradation. *J. Biomater. Nanobiotechnology* **2015**, *06* (01), 8–19. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2015.61002>.

(36) Aliah, N. N.; Ansari, M. N. M. Thermal Analysis on Characterization of Polycaprolactone (PCL) – Chitosan Scaffold for Tissue Engineering. **2017**, *6* (2), 5.

(37) Hillsley, M. V.; Frangos, J. A. Review: Bone Tissue Engineering: The Role of Interstitial Fluid Flow. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43* (7), 573–581. <https://doi.org/10.1002/bit.260430706>.

