



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



**industrials
valència**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR
ENGINYERS INDUSTRIALS
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

ESTUDIO DE LA BIOACTIVIDAD DE MATERIALES HÍBRIDOS DE POLICAPROLACTONA – ÓXIDO DE GRAFENO

AUTOR: JUAN ALAMÁN, JORGE

TUTORA: VIDAURRE GARAYO, ANA JESÚS

COTUTOR: CAMPILLO FERNÁNDEZ, ALBERTO JOSÉ

CURSO ACADÉMICO: 2017 – 2018

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora, Ana Vidaurre Garayo, la oportunidad de trabajar con ella y de realizar el Trabajo Fin de Grado en el CBIT (Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular), así como el guiarme durante todo el proceso de elaboración del mismo.

Además, me gustaría extender este agradecimiento a todos los trabajadores, investigadores y resto de estudiantes que, de un modo u otro, me han ayudado a resolver los problemas a los que me he tenido que enfrentar en el día a día del laboratorio. Me gustaría realizar un agradecimiento especial a Alberto Campillo Fernández, quien me ha ayudado en numerosas ocasiones durante la realización de este trabajo.

También me gustaría expresar mi agradecimiento a todos los trabajadores del Servicio de Microscopia Electrónica de la UPV, que me enseñaron el manejo básico del microscopio, clave para la realización de este trabajo. De igual modo, agradecer a Bernabé Marí Soucase por su colaboración en la medida de y análisis en la difracción de rayos X.

Finalmente, no puedo olvidarme de todos aquellos que me han apoyado y motivado a lo largo de mi vida hasta el día de hoy: familia, amigos, profesores... Todos ellos han sido en algún momento un apoyo clave sin el cual el camino hubiera sido mucho más duro.

Gracias a todos ellos.

Resumen

En este Trabajo Fin de Grado se estudian las propiedades de un material híbrido: policaprolactona, PCL, en combinación con óxido de grafeno, GO. En particular, se pretende analizar la capacidad del GO como agente de nucleación para el crecimiento de la hidroxiapatita, HA. La PCL es un poliéster alifático ampliamente utilizado en ámbito biomédico por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedades mecánicas adecuadas para numerosas aplicaciones. El GO es un producto derivado del grafeno y añadido en pequeñas cantidades mejora la procesabilidad y actúa como refuerzo mejorando las propiedades mecánicas y las propiedades superficiales. El GO es igualmente biocompatible y su presencia influye en la interacción célula – biomaterial. De esta manera, la incorporación del GO puede resultar clave a la hora de anclar biomoléculas, agentes de crecimiento o cualquier otra sustancia de interés biológico/médico. La hidroxiapatita, un fosfato de calcio cristalino, es el componente mineral del hueso. Tiene propiedades osteoinductivas favoreciendo la regeneración del hueso.

El objetivo central de este trabajo es estudiar la bioactividad de los composites PCL/GO. Es decir, se pretende analizar la influencia de la presencia de GO en el proceso de nucleación de HA al sumergir las diferentes muestras en fluido corporal simulado (SBF). Para ello, se crearon composites PCL/GO utilizando como disolvente el tetrahidrofurano, THF, con diferentes proporciones de GO que varían entre el 0,03% y el 0,1%. Cada semana, hasta un total de cuatro, se extraen una parte de las muestras sumergidas en SBF y se reservan para su posterior análisis.

Las muestras, antes y después del ensayo de bioactividad, se caracterizan a través de: cambio de masa, contenido de agua en equilibrio, análisis termogravimétrico (TGA), difracción de Rayos X y microscopía electrónica de barrido con emisión de campo (FE-SEM). El cambio de masa y el TGA proporcionan información sobre la cantidad de HA depositada y la estabilidad térmica del compuesto. Los resultados de TGA no mostraron cantidades significativas de depósito mineral. Las técnicas de imagen y análisis de FESEM permitieron comprobar que, efectivamente, la nucleación de la HA había tenido lugar, aunque resultó ser demasiado escasa y dispersa. Además, la muestra de PCL era la que mayor presencia de sales minerales presentaba. La técnica de difracción de rayos X no mostró los picos representativos del GO, ni de la HA: probablemente debido al escaso contenido de ambos componentes.

Como conclusión del trabajo se puede destacar el hecho de que aunque la presencia de bajo contenido de GO (menor del 0,1%) tienen efectos en la hidrofobicidad de la muestra y en las propiedades mecánicas (las muestras se vuelven frágiles y quebradizas), no ha tenido efecto en el proceso de nucleación de HA.

Resum

En este Treball Fi de Grau s'estudien les propietats d'un material híbrid: policaprolactona, PCL, en combinació amb òxid de grafè, GO. En particular, es pretén analitzar la capacitat del GO com agent de nucleació per al creixement de la hidroxiapatita, HA. La PCL és un polièster alifàtic àmpliament utilitzat en l'àmbit biomèdic per la seua biocompatibilitat, biodegradabilitat i propietats mecànics adequades per a nombroses aplicacions. El GO és un producte derivat del grafè i afegit en xicotetes quantitats millora la processabilitat i actua com a reforç millorant les propietats mecàniques i superficials, com la hidrofilitat. El GO és igualment biocompatible i la seua presència influeix en la interacció cèl·lula – biomaterial. D'aquesta manera, la incorporació del GO pot resultar clau a l'hora d'ancorar biomolècules, agents de creixement o qualsevol altra substància d'interès biològic o mèdic. La hidroxiapatita, un fosfat de calci cristal·lí, és el component mineral de l'os. Té propietats osteoinductives afavorint la regeneració de l'os.

L'objectiu central d'aquest treball és estudiar la bioactivitat del composites PCL/GO. És a dir, es pretén analitzar la influència de la presència del GO en el procés de nucleació de HA al submergir les diferents mostres en fluid corporal simulat, SBF. Per a ell, es van crear composites PCL/GO utilitzant com a dissolvent el tetrahidrofurà, THF, amb diferents proporcions de GO que varien entre el 0,03% i el 0,1%. Cada setmana, fins a un total de quatre, s'extrauen una part de les mostres submergides en SBF i es reserven per al seu posterior anàlisi.

Les mostres, abans i després de l'assaig de bioactivitat, es caracteritzen a través de: canvi de massa, contingut d'aigua en equilibri, anàlisi termogravimètric (TGA), difracció de raigs X i microscòpia electrònica d'escombrat amb emissió de camp (FE-SEM). El canvi de massa i el TGA proporcionen informació sobre la quantitat de HA depositada i la estabilitat tèrmica del compost. Els resultats de TGA no mostraren quantitats significatives de depòsit mineral. Les tècniques d'imatge i anàlisi de FESEM van permetre comprovar que, efectivament, la nucleació de la HA havia tingut lloc, encara que va resultar massa escassa y dispersa. A més a més, la mostra de PCL era la que major presència de sals minerals presentava. La tècnica de difracció de raigs X no va mostrar els pics representatius del GO ni del HA: probablement a causa de l'escàs contingut de ambos components.

Com a conclusió del treball es pot destacar el fet de que encara que la presència de baix contingut de GO (menor del 0,1%) té efectes en la hidrofilitat de la mostra i en les propietats mecàniques (les mostres es tornen fràgils i trencadisses), no ha tingut efecte en el procés de nucleació de HA.

Abstract

In this End of Degree Project, the properties of a hybrid material are studied: polycaprolactone, PCL, in combination with graphene oxide, GO. In particular, it is intended to analyze the ability of the GO as a nucleating agent for the growth of hydroxyapatite, HA. PCL is an aliphatic polyester widely used in the biomedical field due to its biocompatibility, biodegradability and mechanical properties suitable for numerous applications. The GO is a product derived from graphene and added in small quantities improves the processability and acts as a reinforcement improving the mechanical properties and surface properties. The GO is also biocompatible and its presence influences the cell-biomaterial interaction. In this way, the incorporation of GO can be key when anchoring biomolecules, growth agents or any other substance of biological / medical interest. Hydroxyapatite, a crystalline calcium phosphate, is the mineral component of bone. It has osteoinductive properties favoring bone regeneration.

The main objective of this work is to study the bioactivity of PCL/GO composites. That is, we intend to analyze the influence of the presence of GO in the nucleation process of HA by immersing the different samples in simulated body fluid (SBF). To do this, PCL/GO composites were created using tetrahydrofuran, THF, as a solvent, with different proportions of GO that vary between 0.03% and 0.1%. Each week, up to a total of four, a part of the samples submerged in SBF are extracted and reserved for further analysis.

The samples, before and after the bioactivity test, are characterized by: mass change, equilibrium water content, thermogravimetric analysis (TGA), X-ray diffraction and scanning electron microscopy with field emission (FE-SEM). The mass change and TGA provide information on the amount of HA deposited and the thermal stability of the compound. The TGA results did not show significant amounts of mineral deposit. The FESEM imaging and analysis techniques allowed us to verify that HA nucleation had indeed taken place, although it turned out to be too sparse and too sparse. In addition, the PCL sample had the highest presence of mineral salts. The X-ray diffraction technique did not show the representative peaks of the GO, nor of the HA: probably due to the scarce content of both components.

As a conclusion of the work we can highlight the fact that although the presence of low GO content (less than 0.1%) have effects on the sample's hydrophilicity and on the mechanical properties (the samples become fragile and brittle), has had no effect on the nucleation process of HA.

Contenido

1-	Introducción.....	14
1.1-	Biomateriales.....	16
1.1.1-	Polímeros	16
1.1.2-	Policaprolactona, PCL.....	17
1.1.3-	Tetrahidrofurano, THF.....	20
1.1.4-	Óxido de grafeno, GO.....	21
1.1.5-	Hidroxiapatita, HA.....	22
2-	Objetivos.....	24
3-	Técnicas de caracterización.....	25
3.1-	Hidrofilicidad de las muestras. Ángulo de contacto	25
3.2-	TGA.....	26
3.3-	Difracción de rayos X.....	27
3.4-	Microscopio electrónico de barrido (SEM).....	28
3.5-	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)	28
3.6-	Análisis estadístico	29
4-	Preparación de las muestras y caracterización.	31
4.1-	Materiales.....	31
4.2-	Preparación de las muestras.....	31
4.3-	Caracterización.....	33
4.3.1-	Ángulo de contacto	36
4.3.2-	Contenido de agua en equilibrio	44
4.3.3-	Variación de la masa	46
4.3.4-	FESEM	47
5-	Ensayo de bioactividad. Inmersión en SBF y caracterización.....	50
5.1-	Caracterización	51
5.1.1-	Evolución del ángulo de contacto.....	51
5.1.2-	TGA	60
5.1.3-	FESEM	66
5.1.4-	Difracción de Rayos X.....	75
6-	Conclusiones	82
7-	Especificaciones técnicas.....	84
7.1-	Aparatos	84
7.1.1-	Balanza analítica de precisión.....	84
7.1.2-	Estufa de precisión universal	85
7.1.3-	Baño ultrasónico	86

7.1.4- Bomba de vacío de aceite	86
7.1.5- Desecador	87
7.1.6- Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM)	88
7.1.7- Equipo de TGA	88
7.1.8- Difractómetro de rayos X	89
8- Presupuesto	90
9- Bibliografía	93

1- Introducción

El inexorable avance de la ciencia y la medicina nos han permitido curar muchas enfermedades que hasta hace relativamente poco tiempo se creían incurables. Así, el amanecer de la medicina tal y como la conocemos ahora tuvo lugar en el siglo XIX. Es entonces cuando, gracias a la aparición de la anestesia, empezó a ser posible la realización de cirugías que hasta ese momento eran irrealizables. Sin embargo, en estos inicios las técnicas quirúrgicas eran prácticamente extractivas, lo que desde luego no suponía la consecución de los objetivos finales de la medicina.

Ahora bien, la medicina fue evolucionando y apareció la idea de sustituir las estructuras dañadas. De esta manera, surgieron así los trasplantes. Sin embargo, es bien sabido los inconvenientes que éstos presentan. Así pues, en primer lugar, aparece la baja oferta en comparación con la alta demanda. El aumento de la esperanza de vida y, sobre todo, el descenso que se viene experimentando en los últimos años en muertes en carretera (principal fuente de órganos para trasplantes) junto con otros factores ha derivado en un descenso considerable en la oferta de órganos. Por otro lado, la demanda no ha disminuido y, de hecho, ha ido en aumento precisamente debido a ese incremento de la esperanza de vida. En segundo lugar, no es posible obtener todos los órganos y tejidos que se precisan para trasplantes por motivos técnicos o biológicos. Este es el caso de órganos como el cerebro o el tejido nervioso en general. Así, este tipo de tejidos no pueden ser utilizados para la curación y reparación de diversas lesiones en los pacientes. Finalmente, el problema más conocido quizá sea el del rechazo. Es bien sabido que es preciso suministrar medicamentos que supriman el sistema inmunitario cuando se realiza un paciente con el fin de evitar que el organismo huésped ataque el trasplante, considerándolo un elemento externo. Esto, lógicamente, provoca que el paciente se vuelva mucho más susceptible de sufrir cualquier tipo de enfermedad tipo contagiosa o infección, además de incrementar potencialmente la aparición de tumores.

Y es en este contexto donde nació la medicina regenerativa y, en particular, la ingeniería tisular. Fundamentalmente, la ingeniería tisular se basa en la fabricación de nuevos tejidos biológicos apoyándose en tres pilares fundamentales, también mencionados en ocasiones como la *triada de la ingeniería tisular* [1]. De esta manera, para la creación de los ya mencionados nuevos tejidos, la ingeniería tisular utiliza, en primer lugar, un material (un biomaterial, concretamente), que hará las veces de andamiaje o de estructura (*scaffold*). Este *scaffold* puede estar fabricado en diversos materiales, como pueden ser hidrogeles, polímeros sintéticos, polímeros naturales o, incluso, una matriz extracelular descelularizada. El segundo pilar sobre el que se sustenta la ingeniería tisular son las células. Así, las células crecerán siguiendo la estructura definida por el *scaffold*. Lo que se persigue es la división de estas células para que, posteriormente, formen el tejido. Las células que se cultiven serán bien células diferenciadas con capacidad todavía de división o bien células madre de diferentes tipos: células madre embrionarias, células madre adultas o células madre pluripotentes inducidas (iPSC por sus siglas en inglés). Finalmente, la diferenciación y el crecimiento de estas células vendrán regulado por un conjunto de señales a las cuales serán sometidas. Así, aparecerán señales bioquímicas, como pueden ser factores de crecimiento o de diferenciación, o bien señales físicas, como estímulos mecánicos, rangos de temperatura, presión, condiciones de oxígeno... (figura 1).

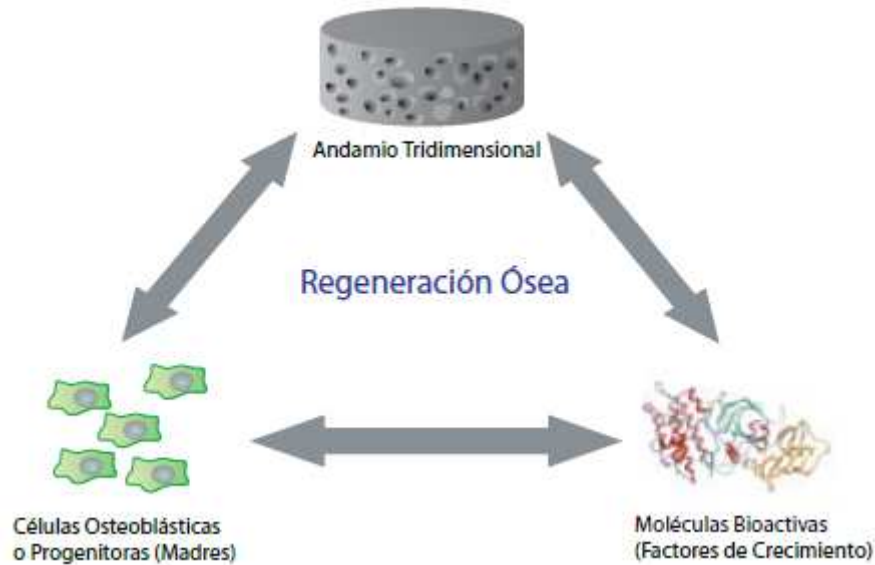


Figura 1, obtenida de [1]

Por tanto, la ingeniería tisular persigue dotar al cuerpo de las herramientas para que sea él mismo quien regenere el tejido dañado. Así, el proceso se inicia con la retirada del tejido dañado sustituido por el scaffold sembrado de células, de manera que se garantice su supervivencia y comiencen así a dividirse, iniciándose entonces el proceso de curación. Es precisamente en esa búsqueda de encontrar el scaffold con la configuración óptima donde es vital la ingeniería tisular, pues es sabido que las células presentan una mayor supervivencia cuando son introducidas con una estructura a la cual seguir que cuando, simplemente, son introducidas en el organismo. [2]

Uno de los tejidos más estudiados actualmente es el tejido óseo. Básicamente, el tejido óseo es un tejido caracterizado por su dureza y consistencia gracias a la mineralización de su matriz extracelular. Este tejido óseo se organiza de dos formas diferentes: tejido óseo esponjoso y tejido óseo compacto. El tejido óseo compacto se localiza en las porciones más externas del hueso, donde predomina la matriz ósea, dando lugar a una estructura dura. En esta zona se localizan los osteocitos dentro de lagunas alrededor de los conductos de Havers. Por otro lado, el tejido esponjoso está formado por delgadas trabéculas que en los huesos ya formados corresponde a tejido óseo laminar rodeada por células de revestimiento óseo. Este tejido se encuentra en el interior de los huesos más grandes y/o largos, como el fémur, el cráneo...

En cuanto a las células presentes en el tejido óseo, encontramos las siguientes:

- Célula osteoprogenitora: células madre indiferenciadas. Esta célula tiene la capacidad de transformarse en tres tipos de células: adipocitos, condroblastos y fibroblastos. Además, también son capaces de dar lugar a osteoblastos, encargadas de la secreción de la matriz ósea.
- Osteoblastos: como ya se ha dicho, esta célula es una célula ya diferenciada. Son las encargadas de la secreción del colágeno, es decir, de la matriz extracelular. Mantienen su capacidad de replicarse hasta que pasan a estar completamente rodeadas de matriz extracelular.
- Osteocitos: son las principales células del tejido óseo y son incapaces de dividirse (pues son el siguiente paso a los osteoblastos una vez éstos han sido rodeados de matriz ósea extracelular).

- Osteoclasto: son las células encargadas de la reabsorción y remodelación ósea.

Una posible aplicación futura de las muestras sintetizadas y estudiadas durante este trabajo sería, precisamente, la de reparación del tejido óseo.

1.1- Biomateriales

Un biomaterial puede ser definido como “un material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” [3]. Ahora bien, la propiedad esencial de un biomaterial es su biocompatibilidad, que es "la capacidad de un material para funcionar con una respuesta de anfitrión apropiada en una aplicación específica". Cuando se trabaja con biomateriales es fundamental conocer dos aspectos: el primero, cuál será el comportamiento del organismo frente a este biomaterial. El segundo, cuál será el comportamiento de dicho biomaterial frente al organismo.

Un biomaterial debe cumplir una serie de características para ser considerado como tal [4]:

- El material no debe provocar una respuesta inflamatoria o tóxica sostenida después de la implantación en el cuerpo.
- El material debe tener una vida útil aceptable.
- El tiempo de degradación del material debe coincidir con el proceso de curación o regeneración.
- El material debe tener propiedades mecánicas apropiadas para la aplicación indicada y la variación en las propiedades mecánicas con la degradación debe ser compatible con el proceso de curación o regeneración.
- Los productos de degradación no deben ser tóxicos y deben poder metabolizarse y eliminarse del cuerpo.
- El material debe tener la permeabilidad y procesabilidad adecuadas para la aplicación prevista.

Por otro lado, desde el punto de vista industrial y económico, también es recomendable que un biomaterial sea fácilmente extraíble de una fuente barata y abundante y que presente un proceso de fabricación sencillo, eficiente y escalable.

Los biomateriales pueden proceder de muy diversos y diferentes orígenes. Así, es posible encontrar biomateriales que sean polímeros, cerámicas, metales... Sin embargo, si es posible destacar un grupo, éste debería ser el de los polímeros, por ser un conjunto de materiales muy versátil con propiedades adecuadas a cada aplicación.

1.1.1- Polímeros

Los polímeros pueden dividirse, según su origen, en dos grupos: los de origen natural y los de origen sintético [4]. Los polímeros naturales presentan algunas ventajas, como son su bioactividad o la presencia de ligandos para las células. Sin embargo, esa bioactividad puede acarrear consigo algunos problemas, siendo el más importante la posible respuesta del sistema inmunológico. La bioactividad es la capacidad que tiene un material de interactuar químicamente con los tejidos del organismo. Esta capacidad puede determinarse mediante la formación de una capa rica en calcio y fósforo, depositada sobre la superficie del material [5].

Por su parte, los polímeros sintéticos son, generalmente, biológicamente inertes, y presentan la gran ventaja de que pueden ser fácilmente manipulados y adaptados a cada situación concreta.

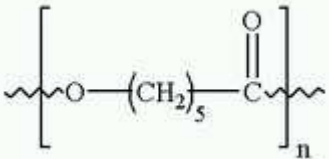
En cualquier caso, ambos tipos han sido ampliamente estudiados como biomateriales poliméricos biodegradables. En este momento aparece una nueva clasificación, una en función de cómo es ese proceso de degradación: enzimática o hidrolítica. Generalmente, los polímeros de origen natural presentan una degradación enzimática, mientras que los de origen sintético presentan de ambos tipos.

Los polímeros hidrolíticamente degradables presentan grupos funcionales susceptibles a la hidrólisis, que incluyen ésteres, ortoésteres, anhídridos, carbonatos, amidas, uretanos, ureas... Para aplicaciones biomédicas se utilizan dos rutas generales para desarrollar polímeros que posteriormente sean susceptibles de ser degradados mediante hidrólisis. La primera de ellas es la polimerización por etapas, usada para preparar una variedad de clases de polímeros sensibles hidrolíticamente, tales como polianhídridos, poliortoésteres y poliuretanos. La segunda de ellas es la polimerización radical, que principalmente da como resultado polímeros no degradables.

1.1.2- Policaprolactona, PCL

La PCL es un poliéster semicristalino obtenido a partir del monómero ϵ -caprolactona [4] con propiedades únicas que le convierten en un material muy óptimo para uso biomédico [6]. Se caracteriza por ser fácilmente procesable por el hecho de ser altamente soluble en una gran cantidad de solventes orgánicos. Además, presenta tanto una baja temperatura de transición (alrededor de -60°C) como una baja temperatura de fusión (de alrededor de 60°C). Tal y como se ha mencionado, la PCL presenta una degradación hidrolítica, debida a la presencia de enlaces alifáticos. Ahora bien, esta degradación es considerablemente lenta (del orden de dos a tres años), lo que ha propiciado dos cosas. En primer lugar, que se estudien sus aplicaciones para la liberación controlada de fármacos a largo plazo, ya que su alta compatibilidad con una amplio rango de fármacos posibilita la liberación de medicamentos de manera uniforme durante meses [7]. Inicialmente esto supuso un problema que derivó en el uso de otros polímeros en detrimento de la PCL, ya que se buscaban polímeros con una degradación mucho más rápida [8].

Tabla 1. Fórmula, estructura y propiedades de la PCL.

PCL	
$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2)_n$	
Temperatura de transición vítrea (a 1 atm)	-60°C
Temperatura de fusión (a 1 atm)	$\approx 60^{\circ}\text{C}$
Densidad	1.145 g/cm^3
Peso molecular	40000 – 80000

Sin embargo, pasados unos años comenzó a estudiarse la posibilidad de combinar la PCL con otros materiales. Así pues, en segundo lugar, apareció la combinación de la PCL con otros materiales, consiguiéndose así una aceleración de la degradación. Esta posibilidad de

combinación le otorga a la PCL una gran versatilidad. De hecho, se conoce que estas combinaciones alteran las propiedades químicas, físicas y biológicas. Además, se ha encontrado que la PCL es cito-compatible con numerosos tejidos corporales, lo que le convierte en un material ideal para la ingeniería tisular.

Por todo ello, se han investigado diferentes copolímeros que contuviesen distintas cantidades de PCL para mejorar las propiedades de ambos polímeros. De esta manera, se consigue un copolímero con buenas propiedades mecánicas y ratios de degradación mucho más cortos (bien conocidos son los casos de PCL – PLLA [ácido poliláctico] o PCL – PGA [ácido poliglicólico]). Dados los buenos resultados que aportaban este tipo de combinaciones, así como las posibilidades que parecían atisbarse con las cada vez más numerosas investigaciones, los artículos científicos basados en la PCL comenzaron a ser cada vez más numerosos hacia finales del siglo pasado (tendencia que ha continuado hasta la actualidad), tal y como se aprecia en la figura 2.

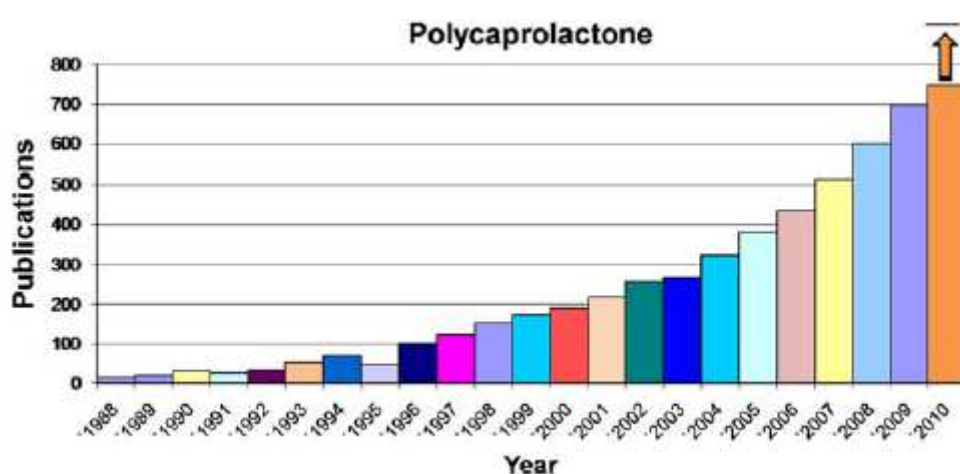


Figura 2. Número de publicaciones sobre la PCL, obtenida de [8]

Ahora bien, en el estudio de un biopolímero no se puede obviar el proceso de degradación del mismo. Además, no se puede olvidar que algo que es biodegradable no implica que a su vez sea biorreabsorbible, esto es, que una vez degradado no tiene por qué ser eliminado del organismo [8]. Por el contrario, la biorreabsorción es un concepto que refleja la total eliminación de los materiales introducidos en el organismo.

Por tanto, es necesario definir y dejar claro tres conceptos:

- Los biodegradables son materiales y dispositivos poliméricos sólidos que se degradan debido a la degradación macromolecular con dispersión in vivo, pero no hay pruebas para la eliminación del cuerpo (esta definición excluye la degradación ambiental, fúngica o bacteriana). Los sistemas o dispositivos poliméricos biodegradables pueden ser atacados por elementos biológicos de modo que la integridad del sistema, y en algunos casos, pero no necesariamente, de las macromoléculas mismas, se ve afectada y produce fragmentos u otros subproductos de degradación. Dichos fragmentos pueden alejarse de su sitio de acción pero no necesariamente del cuerpo.
- Los bioreabsorbibles son materiales y dispositivos poliméricos sólidos que muestran una degradación en masa y una mayor reabsorción in vivo; es decir, polímeros que se eliminan a través de vías naturales ya sea por simple filtración de subproductos de degradación o después de su metabolización. La biorresorción es, por lo tanto, un

concepto que refleja la eliminación total del material extraño inicial y de los subproductos de la degradación a granel (compuestos de bajo peso molecular) sin efectos secundarios residuales. El uso de la palabra "biorreabsorbible" supone que la eliminación se muestra de manera concluyente. Los bioerosionables son materiales o dispositivos poliméricos sólidos, que muestran la degradación de la superficie y además, reabsorben in vivo. La bioerosión es, por lo tanto, un concepto que refleja la eliminación total del material extraño inicial y de los subproductos de degradación de la superficie (compuestos de bajo peso molecular) sin efectos secundarios residuales.

- Los bioabsorbibles son materiales o dispositivos poliméricos sólidos, que pueden disolverse en fluidos corporales sin disociación de la cadena polimérica o disminución de la masa molecular. Por ejemplo, es el caso de la disolución lenta de implantes solubles en agua en fluidos corporales. Un polímero bioabsorbible puede ser biorreabsorbible si las macromoléculas dispersas se excretan.

Volviendo de nuevo a la PCL, la PCL pueden ser biodegradadas por determinados organismos (hongos y bacterias), pero no son biodegradables en los organismos animales debido a la falta de las enzimas necesarias. Pero esto no quiere decir que no es biodegradable, sino que el proceso lleva mucho más tiempo, propagándose primero a través de la degradación hidrolítica.

El homopolímero PCL tiene una degradación total de 2-4 años (dependiendo del peso molecular inicial del dispositivo o implante), aunque la tasa de hidrólisis puede variarse al unir la PCL con otros polímeros. A partir de estudios de degradación presentados en la literatura, se puede concluir que PCL se somete a un proceso de degradación en dos etapas: primero, la división hidrolítica no enzimática de grupos éster, y segundo, cuando el polímero es más altamente cristalino y de bajo peso molecular (menos de 3000) se demuestra que el polímero experimenta degradación intracelular como se evidencia por la observación de captación de fragmentos PCL en fagosomas de macrófagos y células gigantes y dentro de fibroblastos, lo que apoya la teoría de que PCL puede ser completamente reabsorbido y degradado a través de un mecanismo intracelular el peso molecular se redujo a 3000 o menos.

En conclusión, la degradación de PCL en comparación con PLA, PGA, copolímeros de los mismos y muchos otros polímeros reabsorbibles es lenta, lo que la hace mucho más adecuada para aplicaciones de degradación a largo plazo, como la entrega de moléculas encapsuladas durante más de 1 año.

Otro aspecto importante a tener en cuenta la biocompatibilidad. Originalmente, la biocompatibilidad se refería a la capacidad de un material para funcionar con una respuesta de anfitrión apropiada en una aplicación específica. La biocompatibilidad in vitro, o citotoxicidad, generalmente se evalúa a través de sistemas de cultivo celular. También se estudia el examen in vivo, histológico y patológico de las respuestas periimplantarias y del huésped, como las respuestas inmunogénica, carcinogénica y trombogénica. En el campo de los materiales bioestables y los implantes implantados permanentemente, el objetivo principal es minimizar y ajustar las interacciones entre el material y los tejidos. La interacción del entorno de vida y el material debe ser aceptable y estable para las terapias y el rendimiento a largo plazo. Si consideramos el campo de los materiales bioestables y los dispositivos / implantes implantados permanentemente, el objetivo principal es minimizar y ajustar las interacciones entre el material y los tejidos. La interacción entre el entorno de vida y el material debe ser aceptable y estable para las terapias y el rendimiento a largo plazo.

Por el contrario, en el campo de los polímeros biodegradables y biorreabsorbibles, la situación es todo lo contrario con una dimensión añadida de complejidad gracias a la degradación y los subproductos de resorción de los implantes, que pueden interactuar fuertemente con los sistemas vivos. Desde este punto de vista, los polímeros biodegradables y biorreabsorbibles deben considerarse mucho más cercanos a la farmacología que a la ciencia de los materiales. Por lo tanto, la biocompatibilidad es un factor que debe considerarse antes de la selección de polímeros biodegradables para su uso en dispositivos médicos, andamios y sistemas de administración de fármacos.

En general, los polímeros biorreabsorbibles y los dispositivos son bien tolerados por los tejidos vivos, y sus biocompatibilidades dependen principalmente de los factores que se analizan brevemente a continuación. La lixiviación de compuestos de baja masa molecular, ya sea por degradación o por la presencia de impurezas lixiviables, es el principal desencadenante de la inflamación. La liberación de productos de degradación ácida a partir de polímeros e implantes biorreabsorbibles es también un gran contribuyente a las reacciones inflamatorias secundarias observadas. Otro factor importante que influye en las respuestas de inflamación es el sitio de implantación. Si la capacidad de los tejidos circundantes para eliminar los subproductos es baja, debido a la baja vascularización o a la baja actividad metabólica, la composición química de los subproductos puede provocar perturbaciones temporales locales.

Por lo tanto, los problemas de biocompatibilidad de polímeros biorreabsorbibles tales como poliésteres alifáticos están indiscutiblemente relacionados con la biodegradabilidad y la biorreabsorbibilidad.

Sin embargo, es de crucial importancia estudiar la biocompatibilidad no solo desde un punto de vista a corto plazo, sino también a largo plazo. Desafortunadamente, la mayoría de los estudios in vivo en el campo de la ingeniería de tejidos sufren un final prematuro para extraer datos histológicos y/o biomecánicos antes de que el propio andamio PCL haya sido eliminado del sitio de implantación pero, aunque pueda resultar costoso, no se puede olvidar la necesidad de estudiar el comportamiento de los scaffolds de PCL a largo plazo también.

1.1.3- Tetrahidrofurano, THF

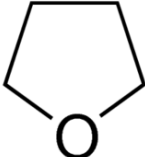
El THF, a temperatura ambiente, es un líquido transparente y de baja viscosidad. Además, es un compuesto orgánico heterocíclico muy utilizado como solvente de polaridad intermedia. De hecho, la principal aplicación a nivel industrial de este compuesto es como solvente, pues puede disolver un amplio rango de compuestos químicos, tanto polares como apolares. Por esta razón, es utilizado en campos muy diversos: desde la fabricación de pinturas o pegamentos hasta la fabricación de envases para alimentos.

El proceso industrial más utilizado para su obtención es la deshidratación catalizada por ácido de 1, 4 – butanodiol. El butanodiol se deriva de la condensación de acetileno con formaldehído seguido de hidrogenación. Otra opción para su obtención implica la hidroformilación de alcohol alílico seguido de hidrogenación a 1, 4 – butanodiol.

Sin embargo, el THF es un contaminante por exposición que, en ese caso, aparece en los biofluidos humanos. El THF se oxida fácilmente, lo que puede provocar inestabilidad y producir toxicidad, si bien es cierto que los casos de intoxicación aguda son muy extraños.

En este caso, para este proyecto se ha utilizado el THF como uno de los usos más comunes y extendidos: la disolución de polímeros (la PCL en este proyecto). Así, se quería estudiar la influencia que pudiese tener el uso del THF en vez de otros disolventes ya probados, tales como, por ejemplo, el dioxano.

Tabla 2. Fórmula, propiedades y estructura del THF.

THF	
C ₄ H ₈ O	
Temperatura de fusión (a 1 atm)	-108,5°C
Peso molecular	72,11 g/mol
Densidad	0,89 g/cm ³ a 20°C

1.1.4- Óxido de grafeno, GO

El grafeno es un material opaco compuesto por carbono puro dispuestos en un patrón regular hexagonal. Así pues, el grafeno es una única capa de átomos de carbono aromáticos dispuestos en una red bidimensional. Por sus propiedades físico – químicas, eléctricas, térmicas y biológicas únicas, el grafeno y sus derivados han llamado la atención de los investigadores en campos como la electrónica, la energía, la biomedicina y la ingeniería tisular [9]. El principal problema que presenta el grafeno es su síntesis. Si bien se sabe cómo hacerlo, aún no existe un método que permita su síntesis a escala industrial de una manera sostenible y eficiente. Además, parece ser que no sería sencilla la dispersión homogénea del grafeno en matrices de diferentes polímeros.

Ante estas dificultades, la reducción química basada en la reducción del GO es la técnica más prometedora para la síntesis del grafeno a escala industrial [6]. La conversión química del grafito en GO y seguidamente a GO reducido ha sido encontrada como una manera viable de sintetizar grafeno a gran escala.

El GO generalmente es sintetizado a partir de la oxidación del propio grafeno (figura 3). Para ello, se utilizan potentes oxidantes, tales como el ácido nítrico (HNO₃), el permanganato potásico (KMnO₄) o el ácido sulfúrico (H₂SO₄). Este método es conocido como el *método de Hummers* [10], aunque actualmente existen otros que también son ampliamente utilizados. Según el *método de Hummers*, la preparación del GO sería (brevemente explicada): los copos de grafito son mezclados con nitrato sódico y ácido sulfúrico para, seguidamente, añadir permanganato potásico. La mezcla es posteriormente diluida y tratada con peróxido de hidrógeno y dióxido de manganeso.

De igual manera que el grafeno es una estructura plana prácticamente bidimensional, así continúa siendo una vez se oxida. Ahora bien, las láminas de GO contienen grupos epoxi e hidroxilo así como grupos carboxilo. Estos grupos funcionales actúan como sitios reactivos que pueden ser utilizados para llevar a cabo modificaciones superficiales. Precisamente por la presencia de estos grupos funcionales, el GO es un material altamente hidrofílico, lo que posibilita que puedan crearse dispersiones estables en agua o en otros solventes polares que contengan prácticamente láminas de una sola capa.

Ahora bien, aunque el GO es un refuerzo eficaz para mejorar las propiedades mecánicas de los polímeros, también supone una alteración en la conductividad de la estructura (es aislante), y

para según qué aplicaciones esto no funcionaría. Sin embargo, esto no supone un problema irreversible, pues es posible restablecer (al menos en parte) la conductividad del material mediante reducción térmica o química.

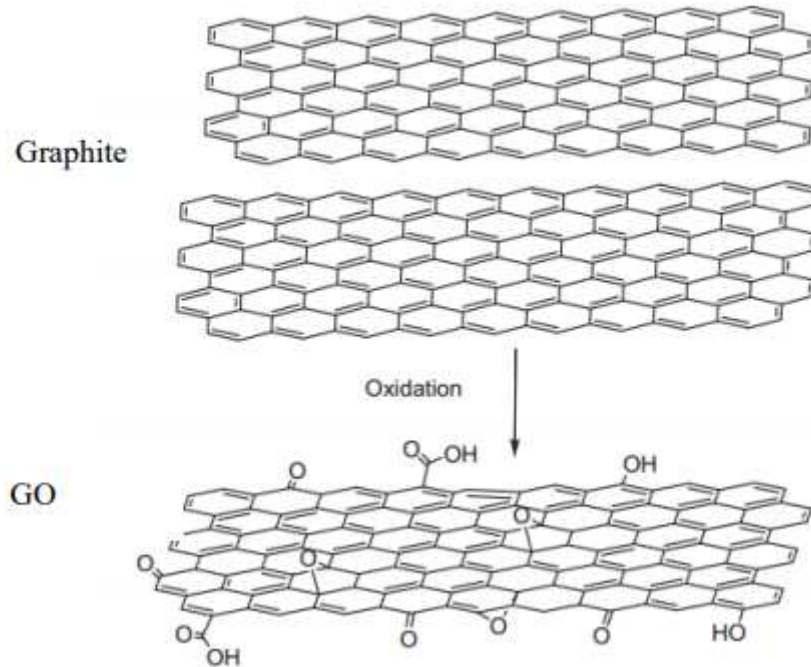


Figura 3. Proceso de oxidación de grafito a GO, obtenida de [6]

Así pues, el interés que en su momento inicial despertó el grafeno se ha trasladado con el paso de los años al GO. Esto se debe a que, como uno de los derivados más importantes del grafeno, el GO presenta algunas ventajas importantes, como pueden ser un alto módulo de Young, excelente flexibilidad... Por todas estas razones el GO se ha considerado como un refuerzo efectivo para polímeros, creándose así compuestos con unas propiedades mecánicas muy mejoradas. Además, la presencia de los ya mencionados grupos hidrofílicos lo hacen material muy prometedor a la hora de la liberación controlada de fármacos o para la regulación de algunos comportamientos celulares. Asimismo, numerosos estudios han demostrado que tanto el grafeno como el GO no son únicamente biocompatibles, sino que además favorecen el crecimiento celular.

1.1.5- Hidroxiapatita, HA

La hidroxiapatita sintética es un fosfato cálcico (figura 4) con una composición química muy similar a la del hueso. La hidroxiapatita, que responde a la fórmula $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, se encuentra también en tejidos como la dentina o el esmalte dental. Desde el punto de vista biomédico, las principales ventajas que presenta son su biocompatibilidad, su estabilidad química, su bioactividad y su capacidad osteoinductiva [11]. Por el

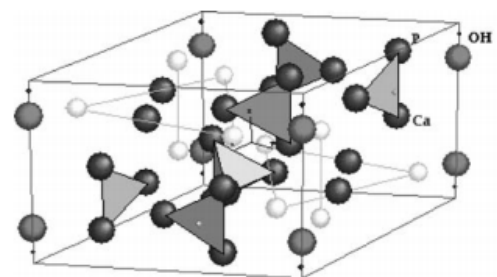


Figura 4. Estructura de la HA, obtenida de [11]

contrario, entre las desventajas de la HA aparecen su débil resistencia mecánica y su fragilidad [12].

Con todo, la HA es un mineral cada vez más utilizado en todo aquello relacionado con el tejido óseo dentro de la ingeniería tisular. Siendo como es clave la interacción entre los implantes y las células, la HA resulta fundamental en este campo. Además, gracias a su capacidad osteoinductiva, es capaz de promover la formación de nuevo tejido óseo, acelerándose así la curación de la lesión [11].

En este trabajo se busca la nucleación de la HA a partir de la SBF. Por ello, mediante las diferentes pruebas se comprobará si, efectivamente, es posible la formación de la molécula de la HA en los scaffolds a partir de un conjunto de iones disueltos simulando la concentración que se encuentra en el cuerpo humano en condiciones fisiológicas.

2- Objetivos

El primer objetivo planteado en este trabajo era el la fabricación de unos híbridos formados por PCL y GO. Se plantearon cuatro muestras: PCL pura, PCL/GO (0,03%), PCL/GO (0,05%) y PCL/GO (0,1%), siendo esos porcentajes relativos al peso. En trabajos previos se había demostrado que las muestras con mayor porcentaje de GO resultaban demasiado frágiles. Se comprobó, en primer lugar, la viabilidad de la utilización del THF como solvente (anteriormente se había utilizado el dioxano) de la PCL y dispersante del GO. Además, lo ideal en este punto sería encontrar un método viable, sistemático, fácilmente escalable y barato.

El segundo objetivo, y el más importante del trabajo, era la consecución de la nucleación de HA en las muestras a partir del fluido corporal simulado (SBF). Por ello, se preparó un SBF siguiendo el método habitual descrito en la literatura. Las muestras sumergidas en SBF fueron analizadas tras tiempos de inmersión entre 1 y 4 semanas. Además, en este trabajo también se perseguía comprobar cómo afectaba la adición de GO a las propiedades de las muestras y si ello tenía efecto en la deposición de HA. Para verificar posibles cambios en la hidrofiliidad de las muestras se midió el ángulo de contacto. Se midió la variación de masa, la presencia de residuo orgánico a través de TGA, los cambios en la morfología a través de FESEM y las posibles variaciones en la estructura cristalina a través de DRX.

3- Técnicas de caracterización

3.1- Hidrofilicidad de las muestras. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto es una medida indirecta de la tensión superficial. Ésta se define como la cantidad de energía necesaria para aumentar la superficie por unidad de área. Esta tensión superficial es causada por los efectos de las fuerzas intermoleculares existentes en la interfase (entre el sólido y un líquido que se deposita sobre él). Generalmente, la tensión superficial disminuye con la temperatura, ya que las fuerzas de cohesión disminuyen al aumentar la agitación térmica.

El ángulo de contacto se refiere al ángulo que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con un sólido [13]. El valor de dicho ángulo depende de la relación existente entre las fuerzas adhesivas del sólido con el líquido y de las fuerzas cohesivas del propio líquido. Así, si se da el caso de que las fuerzas adhesivas con la superficie del sólido son muy grandes en relación a las fuerzas cohesivas, el ángulo de contacto es menor a 90 grados, lo que significa que el líquido moja la superficie. Por el contrario, si el ángulo es mayor a 90 grados, el material se considera hidrófobo. Generalmente, se puede clasificar un material en una de las siguientes cuatro categorías en función del ángulo de contacto que presenta con el agua pura (figura 5):

- Súper-hidrófilo: si el ángulo de contacto del material con el agua pura es menor a 10 grados.
- Hidrófilo: si el ángulo de contacto del material con el agua pura se encuentra entre 10 y 90 grados.
- Hidrófobo: si el ángulo de contacto del material con el agua pura se encuentra entre 90 y 120 grados.
- Súper-hidrófobo: si el ángulo de contacto del material con el agua pura es mayor a 120 grados

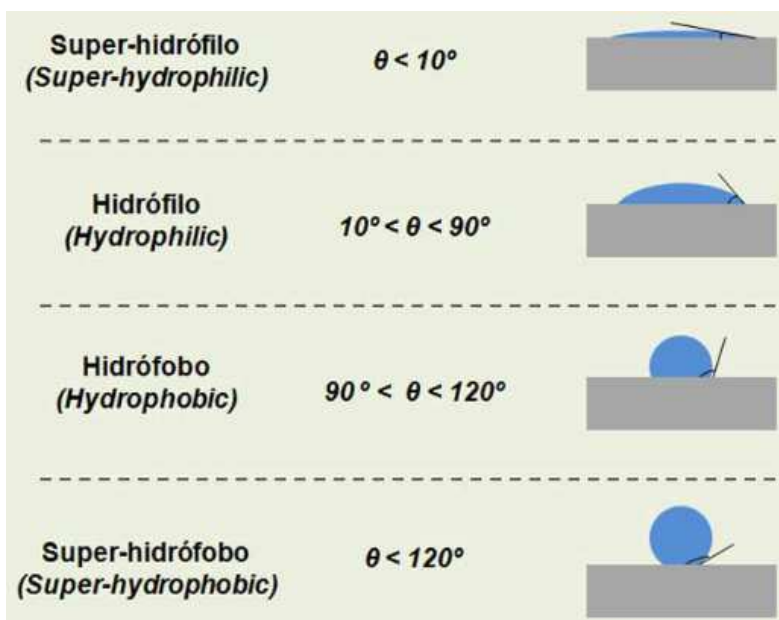


Figura 5, obtenida de [13]

La explicación teórica a este fenómeno se basa en el equilibrio termodinámico de tres fases: la fase líquida de la gota (L), la fase sólida de la superficie (S) y la fase gas del aire presente en el ambiente (V). Por tanto, con este equilibrio, aparece la ecuación:

$$0 = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \gamma_{LG} \cos \theta_C$$

Ecuación 1

Donde cada componente está explicada en la siguiente figura (figura 6):

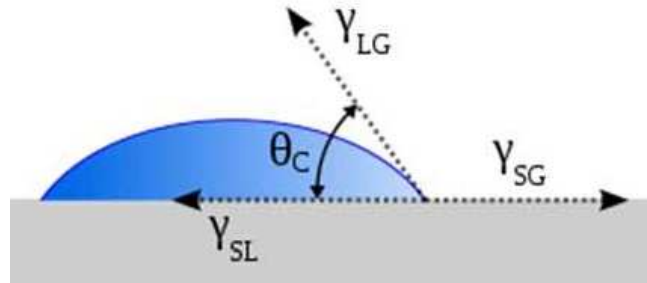


Figura 6, obtenida de [13]

Donde:

- γ_{SV} : tensión superficial entre el sólido y el gas
- γ_{SL} : tensión superficial entre el sólido y el líquido
- γ_{LV} : tensión superficial entre el líquido y el gas
- θ_C : ángulo de contacto

3.2- TGA

El análisis termogravimétrico es un método de análisis térmico en el que la masa de una muestra es medida a lo largo del tiempo conforme la temperatura cambia. Esta medida ofrece información sobre los fenómenos físicos que sufre la muestra, como las transiciones de fase, o sobre fenómenos químicos, como podría ser la descomposición térmica, por ejemplo.

El TGA es llevado a cabo en una máquina muy sensible donde, además de tiempo, masa y temperatura (considerados como parámetros base), pueden incluirse otros parámetros (figura 10). Durante el proceso de medida, la temperatura suele crecer de manera constante y, siempre que el equipo lo permita, se puede controlar la atmósfera (alto vacío, baja presión, alta presión...). En general, lo que se obtiene es una pérdida de peso debido a la degradación de la muestra (por varios motivos, como descomposición, sublimación, desorción, absorción...).



Figura 7. Máquina de TGA utilizada.

3.3- Difracción de rayos X

La difracción de rayos X (DRX) es de las técnicas más eficaces y, por tanto, de las más utilizadas, para el estudio y análisis tanto cualitativo como cuantitativo de fases cristalinas de cualquier tipo de material, tanto natural como sintético.

La difracción de rayos X es uno de los fenómenos físicos que se producen al interaccionar un haz de rayos X, de una determinada longitud de onda, con una sustancia cristalina. La difracción de rayos X se basa en la dispersión coherente del haz de rayos X por parte de la materia (se mantiene la longitud de onda de la radiación) y en la interferencia constructiva de las ondas que están en fase y que se dispersan en determinadas direcciones del espacio.

Para los experimentos de difracción se suelen utilizar rayos X de energía relativamente alta, del orden de 10 keV, con longitudes de onda del orden de 0,1 nm. Los rayos X se describen como una onda sinusoidal [14], donde el valor del campo magnético E se puede escribir en función del tiempo como:

$$E(t)=A\exp(2\pi i c t/\lambda)$$

Ecuación 2

Siendo A la amplitud de la oscilación, λ la longitud de onda y c la velocidad de la luz. Por tanto, la difracción de rayos X consiste, básicamente, en un proceso de interferencias constructivas de ondas de rayos X que se produce en determinadas direcciones del espacio [14].

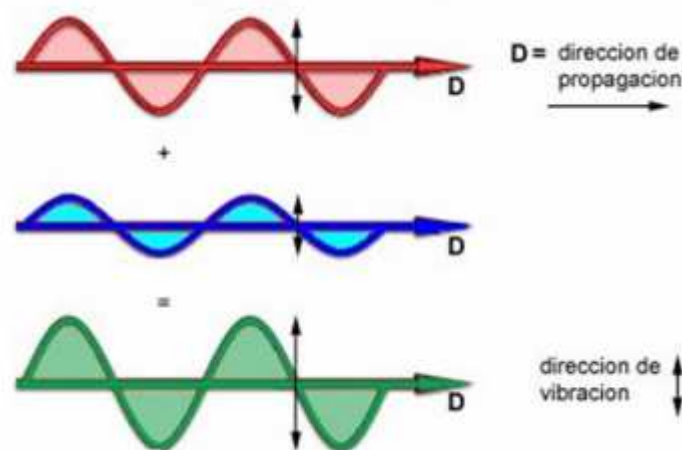


Figura 8. Esquema mostrando interferencia constructiva de ondas, obtenida de [14]

Finalmente, un concepto fundamental a conocer es la Ley de Bragg. Así, la interferencia entre los rayos X y los electrones será constructiva cuando la diferencia de fase entre la radiación emitida por diferentes átomos es proporcional a 2π . Todo esto se expresa en la ecuación:

$$n\lambda=2d\cdot\text{sen}\theta$$

Ecuación 3

Siendo n un número entero, λ la longitud de onda de los rayos X, d es la distancia entre los planos de la red cristalina y θ es el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión.

3.4- Microscopio electrónico de barrido (SEM)

El fundamento del SEM se encuentra en que los electrones, emitidos por un cátodo de tungsteno, pasan a través de una columna en la cual se ha realizado el vacío. El haz de electrones es focalizado mediante una serie de lentes electromagnéticas (condensadores, concretamente).

El haz de electrones se va desplazando por toda la superficie de la muestra, casi a modo de escáner que barre toda la muestra. Sin embargo, una pequeña limitación a la hora del uso de esta técnica es que las muestras han de ser conductoras. Por esa razón, son recubiertas generalmente por una capa de algún material, como oro, platino o carbono.

Cuando el haz de electrones incide sobre la superficie de la muestra, se generan electrones secundarios, que son detectados en el detector para, después, incidir sobre un centelleador donde cada electrón origina varios fotones. Acto seguido, estos fotones generarán a su vez fotoelectrones en un fotomultiplicador, que darán lugar a una gran cantidad de electrones secundarios. Los electrones, después de pasar por un videoamplificador se envían a un tubo donde producen la imagen de aquello que está siendo analizado en el microscopio.

3.5- Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

El FESEM es un instrumento que, al igual que el SEM, es capaz de ofrecer una amplia variedad de información acerca de la superficie de la muestra, con la diferencia de que ofrece una mayor resolución y utiliza un rango de energía mucho mayor. El funcionamiento es igual al de un SEM convencional: se abre un haz de electrones sobre la superficie de la muestra mientras que, en un monitor, se visualiza la información que nos interesa en función de los detectores disponibles.

La mayor diferencia entre un SEM y un FESEM radica en el sistema de generación de electrones. El FESEM utiliza como fuente de electrones un cañón de emisión de campo que proporciona haces de electrones de alta y baja energía muy focalizados. Esto mejora considerablemente la resolución espacial y permite trabajar a muy bajos potenciales (del orden de 0,02 – 5 kV).

Otra característica muy destacable del FESEM es la utilización de detectores dentro de la lente. Estos detectores están optimizados para trabajar a alta resolución y muy bajo potencial de aceleración, por lo que son fundamentales para obtener el máximo rendimiento al equipo. En el servicio de microscopía de la UPV el FESEM cuenta con los siguientes detectores:

- Detector de electrones secundarios *SE2*: ofrece la imagen SEM típica de la topografía de la superficie de la muestra con una gran profundidad de campo. Es el más adecuado para obtener resoluciones medias y bajas con potenciales de aceleración altos. Se utiliza principalmente para navegar por la muestra a bajos aumentos buscando puntos de interés y para estudiar muestras con mucha información topográfica.
- Detector de electrones retrodispersados *AsB*: es sensible a la variación de número atómico de los elementos presentes en la muestra, por lo que se utiliza para observar los cambios en la composición química del espécimen. El detector *AsB* cuenta con cuatro cuadrantes y permite seleccionar entre imagen con contraste topográfico y composicional. Además, gracias al modo de trabajo con alto ángulo, permite observar contraste estructural en muestras cristalinas.

- Detector de energía dispersiva de Rayos X, *EDS* (OXFORD INSTRUMENTS): recibe los Rayos X procedentes de cada uno de los puntos de la superficie sobre los que pasa el haz de electrones. Como la energía dispersada de los Rayos X es característica de cada elemento químico, proporciona información analítica cualitativa y cuantitativa de puntos, líneas o áreas seleccionadas en la superficie de la muestra. Esta técnica se conoce como Microanálisis por EDS.

3.6- Análisis estadístico

El análisis de la varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) es una técnica estadística muy poderosa que permite estudiar desde los problemas más sencillos hasta los más complejos. Si bien en un principio el ANOVA se desarrolló como un procedimiento para estudiar posibles efectos sobre las medias de las poblaciones implicadas, es sencillo generalizarlo para permitir estudiar también los posibles efectos sobre las varianzas de dichas poblaciones.

La idea básica del ANOVA consiste en descomponer la variabilidad total observada en unos datos en una serie de términos, asociados a los efectos de cada factor estudiado y a sus posibles interacciones, más una parte residual con la que posteriormente se compararán los primeros.

Finalmente, los resultados de un ANOVA se sintetizan en una tabla. La primera columna, titulada en este caso *Origen de las variaciones*, recoge las diferentes fuentes de variabilidad. La siguiente columna recoge la variabilidad asociada a cada término, cuantificada mediante sus respectivas sumas de cuadrados. Paralelamente, también se realiza una descomposición de los grados de libertad totales, que son siempre el número de datos menos uno, en los grados de libertad asociados a cada término.

Dividiendo cada suma de cuadrados por los grados de libertad correspondiente se obtienen unos estadísticos a los que se denomina *cuadrados medios*. A continuación aparece el valor del F-ratio, que es la clave para conocer si un efecto es significativo o no lo es. Este valor de F-ratio se obtiene dividiendo los promedios de los cuadrados. Ahora bien, la pregunta obvia es cómo comprobar si un F-ratio es, o no, significativamente mayor que 1. Para responder a esta cuestión aparece la distribución F de Fisher (figura 9):

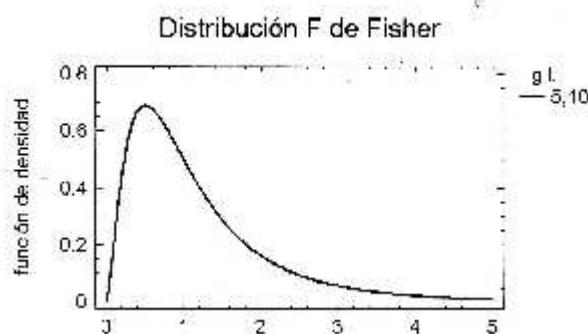


Figura 9, obtenida de [18]

Se demuestra que el cociente s_1^2/s_2^2 de dos estimaciones independientes de una misma varianza (respectivamente con n_1 y n_2) grados de libertad sigue la distribución F de Fisher. Si un efecto es inexistente en las propiedades estudiadas, el F-ratio se distribuye de acuerdo con una F de Fisher, con los correspondientes grados de libertad. Por el contrario, si existe realmente un

efecto, la F ratio tenderá a tomar valores más elevados que los que cabría esperar para una F de Fisher.

En la última columna se calcula la probabilidad de que una F de Fisher con los grados de libertad correspondientes tome los valores tan elevados o más como el valor obtenido para la F-ratio. Cuanto menor sea probabilidad, más fuerte será la evidencia respecto a la existencia poblacional del efecto correspondiente. En general, se considera que un efecto es significativo si esa probabilidad es menor que 0,05 y muy significativo si resulta menor de 0,01.

Sin embargo, cuando el test F resulta significativo, hay que precisar entre cuáles de las variantes del factor existen diferencias significativas en las medias. En efecto, un valor significativo de la F sólo indica que, al menos, una de las medias difiere de las restantes, sin precisar cuál de ellas. Una forma sencilla de precisar esta cuestión es mediante el establecimiento de los intervalos LSD (*Least Significant Difference*). Por tanto, la diferencia entre la media de dos poblaciones será significativa si los intervalos no se solapan.

4- Preparación de las muestras y caracterización.

Con el fin de cumplir los objetivos mencionados con anterioridad, se diseñó un experimento cuya finalidad era comprobar la viabilidad de la síntesis del híbrido PCL/GO utilizando como solvente el tetrahidrofurano (THF). Para la correcta mezcla entre la PCL y el GO de cada muestra se optó por un baño de ultrasonidos. De esta manera, se crearon en primer lugar las disoluciones PCL/THF y GO/THF para, posteriormente, mezclarlas mediante baño ultrasónico. Finalmente, el THF sería eliminado.

Una vez las muestras fueron sintetizadas, éstas fueron troqueladas para posteriormente permanecer en un baño de SBF durante cuatro semanas. Durante ese tiempo, las muestras fueron estudiadas y analizadas semana a semana para comprobar si, efectivamente, tenía lugar la nucleación de la HA.

4.1- Materiales

- PCL: $M_n=43000 - 50000$, de la compañía POLYSCIENCES
- GO, de la compañía GRAPHENEA
- THF, de la compañía SIGMA – ALDRICH

Todos estos materiales fueron utilizados sin ningún tipo de modificación, tal cual llegaron de la empresa.

4.2- Preparación de las muestras

El objetivo era crear cuatro muestras de híbridos de PCL/GO variando el contenido en peso del GO. Por ello, se crearon las siguientes muestras:

- 1- PCL pura
- 2- PCL/GO (0,03%)
- 3- PCL/GO (0,05%)
- 4- PCL/GO (0,1%)

En cada muestra se utilizó la misma masa de PCL y alrededor de cuatro veces esa masa de THF para su disolución, para garantizar así la disolución total de la PCL sin saturación. Por facilidad y rapidez en el proceso de preparación, decidió utilizarse 24 mL de THF en total en cada disolución, lo que se traduce en 21,336 g de THF. De esta manera, se garantizó una completa y correcta disolución de la PCL en el THF. Además, en función de la masa de PCL se calculó la masa de GO a utilizar. De esta manera, las cantidades de PCL, THF y GO utilizadas fueron las siguientes (tabla 3):

Tabla 3. Masas utilizadas para la síntesis de las cuatro muestras.

Sustancia	Masa (g)
PCL	
PCL	6,1136
THF	21,336
PCL/GO (0,03%)	
PCL	6,1106
THF	21,336
GO	$1,8 \cdot 10^{-3}$
PCL/GO (0,05%)	
PCL	6,104
THF	23,336
GO	$3,1 \cdot 10^{-3}$
PCL/GO (0,1%)	
PCL	6,087
THF	21,336
GO	$6 \cdot 10^{-3}$

Para la síntesis, se crearon en primer lugar las disoluciones de PCL/THF. Éstas estaban contenidos en botes de vidrio ISO y se dejaron durante 24h en un horno a 37°C.

Por otro lado, se crearon las tres soluciones de GO/THF, conteniéndolas también en botes de vidrio ISO. Estas soluciones fueron introducidas en un baño de ultrasonidos durante 20 minutos a una temperatura del agua de 50°C (figura 10), tiempo tras el cual el GO se había dispersado perfectamente en el THF (figura 11).



Figura 10. Las tres muestras que contienen GO en el baño de ultrasonidos



Figura 11. Muestras de GO/THF recién sonicadas

Una vez el GO estaba completamente disperso en el THF, los dos tipos de soluciones (PCL/THF y GO/THF) fueron mezcladas. Dado que las disoluciones que contenían la PCL eran bastante más viscosas que las que contenían GO, se introdujeron éstas últimas en las primeras, para así desaprovechar la menor cantidad posible de material. Estas nuevas disoluciones PCL/GO (en THF) fueron removidas con una varilla para, a continuación, ser introducidas de nuevo en el baño de ultrasonidos durante 90 minutos a una temperatura de 50°C. Transcurridos los 90 minutos se comprobó que la disolución de GO y PCL presentaba un aspecto homogéneo.

A continuación, las muestras fueron traspasadas a unos cristalizadores de teflón y llevadas a la campana de extracción en vacío, donde fueron sometidas a media hora de extracción continua para, a continuación, dejarlas en la campana de vacío durante 72h con el fin de eliminar el solvente presente en las muestras.

4.3-Characterización

Una vez estaba la PCL disuelta y el GO dispersado en el THF, se incorporó la dispersión del GO en la disolución de la PCL. A continuación, tras mezclar manualmente y tras un tiempo de sonicación, se comprobó que la mezcla presentaba un aspecto completamente homogéneo. Tras esto, las muestras fueron introducidas en un desecador a vacío, con el fin de extraer el THF de cada una de ellas, permaneciendo así durante 72 horas. Sin embargo, tras este proceso de evaporación, se comprobó que las muestras, paradójicamente, no presentaban un aspecto completamente homogéneo. De hecho, a simple vista se observaba cómo la cara superior de cada muestra presentaba un color más oscuro si en la muestra había presencia de GO. Además, en la muestra de PCL pura se observó también una tonalidad algo diferente en cada una de las caras, siendo la cara inferior algo más translúcida que la cara superior. Por tanto, existen dos fuentes de heterogeneidad en cada una de las muestras.

En primer lugar, el proceso de evaporación aportó una gran heterogeneidad a cada una de las muestras. Así, el THF presente en la parte superior de cada una de las muestras fue eliminado con rapidez, permitiendo a su vez la expansión del polímero. Con ello, se creó una capa superficial más compacta que el resto de la pieza. Por debajo de esta capa el THF presente tuvo muchas más dificultades para ser eliminado de la muestra. Por ello, la parte inferior presenta un aspecto más poroso, debido a esa tardanza por parte del THF en abandonar la muestra. En segundo lugar, la adición del GO también añadió una segunda fuente de heterogeneidad. Esto

posiblemente se deba a la diferencia de los pesos específicos entre la PCL y el GO [15] (es decir, a la diferencia de su densidad). Así, mientras la PCL presenta una densidad de alrededor de $1,145 \text{ g/cm}^3$, el GO tiene una densidad aparente de $0,008 \text{ g/cm}^3$, lo que provoca una distribución heterogénea del GO a lo largo de las muestras, tal y como se observa en las siguientes figuras (figura 12 a 14):



Figura 12. Detalle de la sección transversal de la muestra de PCL/GO (0,03%)



Figura 13. Detalle de la sección transversal de la muestra de PCL/GO (0,05%)



Figura 14. Detalle de la sección transversal de la muestra de PCL/GO (0,1%)

Una vez obtenidas las muestras (cuyo diámetro era de aproximadamente 5,5 cm y cuya altura era de unos 3 mm) éstas fueron troqueladas para obtener pequeñas muestras de 5 mm de diámetro. Ahora bien, debido a la naturaleza más frágil de la muestra con un mayor contenido de óxido de grafeno, los discos troquelados procedentes de esta muestra no presentaban en todos los casos el mismo diámetro. De hecho, en el caso de la muestra de PCL/GO (0,1) algunas se consiguieron troquelar, pero con el paso del tiempo, la torta se fracturó completamente, por lo que la mayoría de las muestras se obtuvieron pedazos de geometría irregular (figura 15).



Figura 15. Las cuatro muestras una vez troqueladas. De izquierda a derecha: PCL, PCL/GO (0,03), PCL/GO (0,05), PCL/GO (0,1)

Una vez troqueladas, se midió su altura y se pesaron, obteniéndose unos datos con la siguiente dispersión (figura 16):

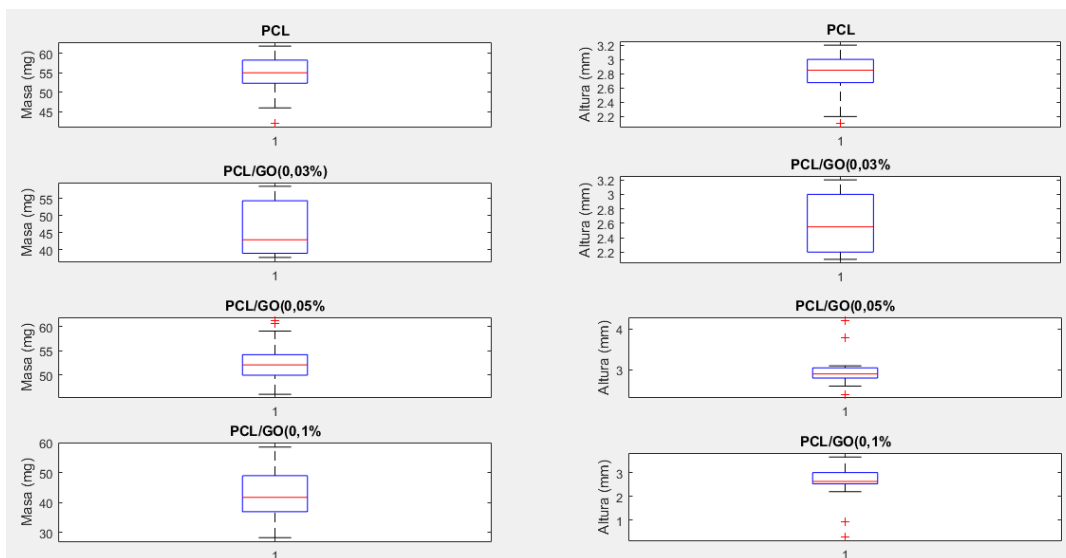


Figura 16. La masa y altura de las muestras troqueladas para los distintos de GO

Debido a la ya mencionada heterogeneidad de las muestras, las muestras presentaban una gran dispersión en cuanto a la masa se refiere. Sin embargo, esta gran dispersión no se debe exclusivamente a la naturaleza heterogénea de las muestras. En el caso de las muestras de PCL, y PCL/GO (0,05) la mitad de las muestras se encuentran entre los 50 y los 60 mg, siendo la dispersión de sus respectivas alturas de una dimensión similar a la de la masa. Por el contrario, las dos muestras restantes, PCL/GO (0,03) y PCL/GO (0,1) presentan un comportamiento algo más extraño. Las muestras de PCL/GO (0,03) presentan una gran dispersión en cuanto a la masa se refiere, pero también la presentan respecto a la altura. Sin embargo, el caso más llamativo es el de la muestra de PCL/GO (0,1). En este caso, la dispersión de la masa es relativamente grande y la de la altura especialmente reducida, lo que rompe la tónica marcada por las tres muestras restantes. Sin embargo, esto se explica porque esta muestra no pudo ser completamente

troquelada. Inicialmente, fue posible obtener algunas muestras con las dimensiones correspondientes al troquel. Pero tras varios troquelados, la muestra se fracturó, lo que imposibilitó el obtener pequeñas muestras de ella. Por ello, muchas pequeñas muestras fueron obtenidas cortando mediante un bisturí los restos fracturados. Por esa razón, la dispersión de la masa es tan amplia en comparación al tamaño de la dispersión de la altura.

Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un pretratamiento antes de su inmersión en SBF, de acuerdo con [16]. Este tratamiento consistía en introducir las muestras en una solución 1M de NaOH durante un día a temperatura ambiente. A continuación, cada muestra es sumergida en una solución 200 mM de CaCl_2 durante 10 segundos para, acto seguido, ser sumergida en agua ultrapura durante 1 segundo. Posteriormente, cada muestra es sumergida en una solución 2000 mM de K_2HPO_4 durante 10 segundos tras haber transcurrido unos minutos, en los que se secan al aire, para, inmediatamente después, ser sumergidas de nuevo en agua ultrapura durante 1 segundo.

4.3.1- Ángulo de contacto

Experimentalmente, se estudió el ángulo de contacto para las cuatro muestras que componen este trabajo: PCL pura, PCL/GO (0,03%), PCL/GO (0,05%) y PCL/GO (0,1%). En el experimento, se trató de estudiar el ángulo de contacto en las dos superficies de las muestras obtenidas: tanto la superior como la inferior (pues a simple vista parecía haber algún tipo de gradiente del grafeno y quería estudiarse si esto influiría en el ángulo de contacto). Además, dada la gran dispersión que en ocasiones presenta este experimento, se realizaron diez medidas en cada cara de cada muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17:

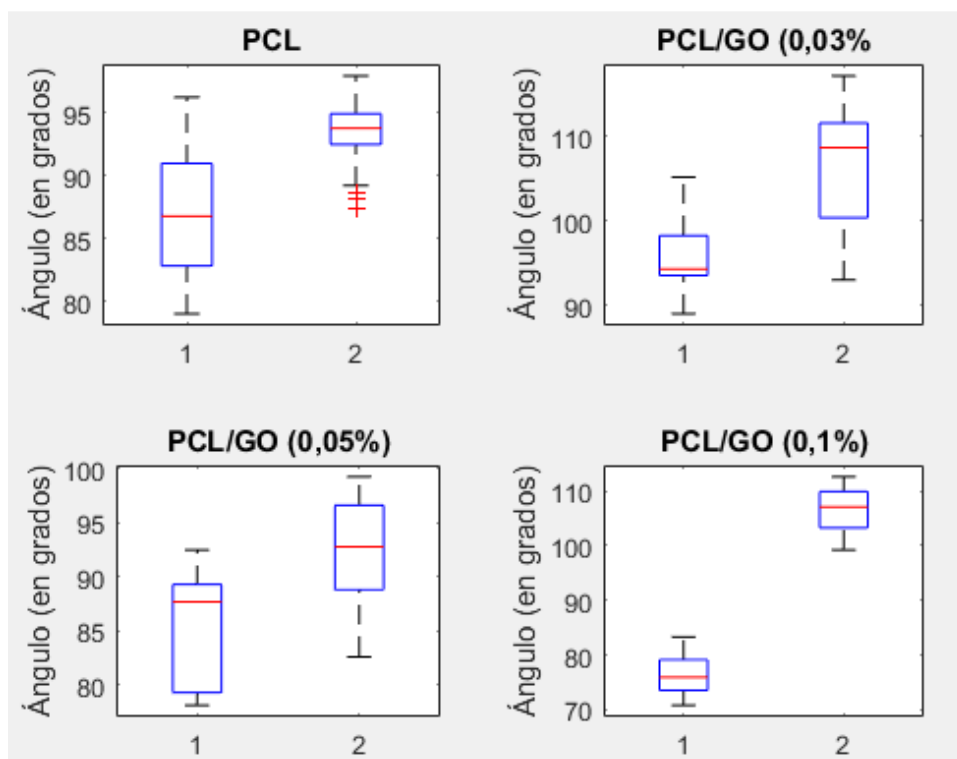


Figura 17. 1: cara superior, 2: cara inferior

Con este gráfico se puede apreciar que en los cuatro tipos de muestra aparece una clara diferencia entre la cara superior (1 en la figura 17), expuesta al aire, y la inferior (2 en la figura 17), en contacto con el recipiente de teflón.

Sin embargo, en los tres primeros casos (aquellos con un contenido de GO menor) se observa claramente una superposición de las dos poblaciones, cosa que no ocurre en el último grupo. Así pues, en el caso de las muestras con un mayor contenido en GO puede decirse que la diferencia entre la cara superior y la inferior de la muestra es estadísticamente significativa. Ahora bien, todavía será necesario realizar un análisis estadístico más profundo para estudiar con más herramientas las diferencias que puedan existir no sólo entre la cara inferior y superior de la misma muestra, sino para responder cuestiones como cuál es la tendencia en función de la variación del contenido en GO de las medias, estudiar con ANOVA si la diferencia será efectivamente significativa, etc.

Así mismo, se analizó el promedio del ángulo de contacto en cada cara de las muestras en función del contenido en GO (figura 18):

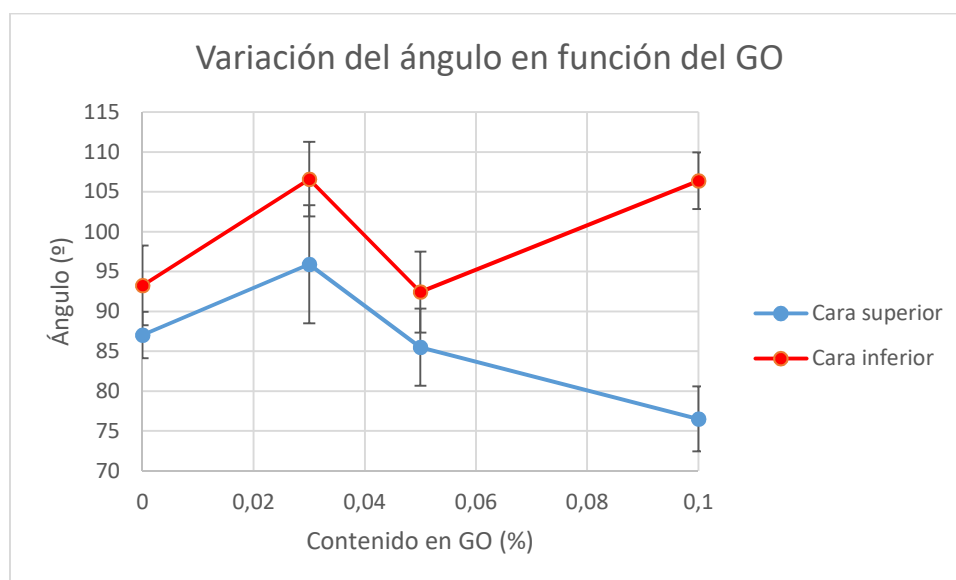


Figura 18

En este gráfico se representa el promedio del ángulo de contacto en cada cara, tanto superior como inferior (se analizó el ángulo de contacto con diez pequeñas muestras de cada tipo, obteniéndose pues veinte datos para cada contenido en GO). En este caso, no parece existir una clara tendencia (bien de crecimiento o de decrecimiento del ángulo de contacto) conforme el contenido de GO es aumentado. Tal y como se observa con claridad en el gráfico, puede verse cómo en los tres primeros casos donde el contenido en GO es menor, la tendencia seguida por ambas caras es la misma. Sin embargo, en el último caso, cuando el contenido en GO de la muestra es del 0,1%, la diferencia entre ambas caras cambia radicalmente, no existiendo una misma tendencia. Este resultado, a priori sorprendente e inesperado, podría deberse, quizá, a un gradiente del GO mucho más marcado en este caso que en los anteriores donde su contenido fuera menor.

Así, una posible hipótesis para explicar este fenómeno podría ser que, a partir de una determinada concentración, el GO se concentrase más en la cara superior de la muestra. Esta hipótesis está basada en el aspecto visual que a simple vista presentaban las muestras con contenido en GO. Así, se observa en todas las muestras que contienen GO una capa superior

mucho más oscura y negra que el resto de la muestra, lo que hace suponer que la concentración de GO es mayor en dicha zona. Además, este detalle es mucho más marcado y exagerado en el caso de la muestra de PCL/GO (0,1) (figura 12 a 14).

De ser cierta esta hipótesis, esto provocaría que el ángulo de contacto en la cara superior sea menor, pues el GO es más hidrófilo, y en la inferior mayor, pues la PCL es más hidrófoba (tal y como, en realidad, ocurre). De esta manera, y tal y como se aprecia en la gráfica, la diferencia se amplifica considerablemente cuando la concentración de GO es del 0,1%.

Así pues, llegados a este punto se puede concluir que, a simple vista, hay diferencias entre las caras superior e inferior de cada tipo de muestra. Por otro lado, también parece haber diferencias entre las diferentes muestras conforme aumenta el contenido de GO en PCL. Es decir, el ángulo de contacto presenta variaciones importantes tanto entre las dos caras de una misma muestra como en la misma cara (entiéndase en este caso por misma cara el hecho de que sea bien superior, bien inferior) de muestras con diferente contenido en GO. La pregunta evidente que cabría hacerse ahora es si las ya mencionadas diferencias son estadísticamente significativas. Para responder a esta cuestión, se realizaron varios test de ANOVA.

Por tanto, en primer lugar, se estudió si las diferencias entre las caras superior e inferior de cada muestra eran estadísticamente significativas. En el caso de la PCL, se obtuvo con el programa EXCEL la siguiente tabla ANOVA (tablas 4 y 5):

Tabla 4. Resumen estadístico de los datos referentes al ángulo de contacto de la PCL.

PCL				
Resumen				
Grupos	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Sesgo estandarizado
Cara superior	20	87,035	5,00087	0,4222232
Cara inferior	20	93,26	2,92222	-1,22629

Tabla 5. Resumen del ANOVA del ángulo de contacto de la PCL.

Análisis de la varianza					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	387,50625	1	387,5062	23,1015	$2,4261 \cdot 10^{-5}$
Dentro de los grupos	637,4135	38	16,7740		
Total	1024,91975	39			

Así, tras el estudio de las muestras de PCL se llega a la conclusión de que las diferencias que había entre la cara superior y la inferior son estadísticamente significativas. Por tanto, puede afirmarse que en este caso la heterogeneidad aportada por el proceso de evaporación del THF es suficiente como para que la hidrofiliidad de la muestra varíe de una cara a otra de la misma. Además, tal y como se ha dicho con anterioridad, un material se considera hidrófilo si su ángulo de contacto es menor a 90 grados, mientras que se considera hidrófobo si el ángulo de contacto es mayor de 90 grados. Por tanto, aunque los valores se encuentran muy cercanos al valor tomado como límite, la cara inferior presenta un comportamiento hidrófobo, mientras que la

cara superior presenta un comportamiento hidrófilo (cosa ciertamente llamativa, puesto que la PCL se considera que presenta un carácter en general hidrófobo).

Seguidamente, se obtuvo también la tabla correspondiente al estudio de la diferencia entre los ángulos de contacto en la cara inferior y superior de la muestra de PCL/GO (0,03%) (tablas 6 y 7):

Tabla 6. Resumen estadístico de los datos referentes al ángulo de contacto de la PCL /GO (0,03%).

PCL/GO (0,03%)				
Resumen				
Grupos	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Sesgo estandarizado
Cara superior	20	95,9	4,67547	1,43631
Cara inferior	20	106,575	7,40831	-0,92465

Tabla 7. Resumen del ANOVA del ángulo de contacto de la PCL/GO (0,03%)

Análisis de la varianza					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	1139,56	1	1139,56	29,70	0,0000
Dentro de los grupos	1458,12	38	38,3715		
Total	2597,67	39			

En esta caso, vuelve a cumplirse que el ángulo de contacto en la cara superior es menor que en la cara inferior, tal y como ocurría con la PCL pura. Sin embargo, en este caso los valores obtenidos hacen suponer que esta muestra sea hidrófoba. Además, las diferencias entre cada una de las caras son de nuevo estadísticamente significativas. Es más, en este caso el p – valor es inferior al de la PCL pura. Esto es algo que cabía esperar porque a la heterogeneidad aportada por el proceso de eliminación del THF (única fuente de heterogeneidad en el caso de la PCL pura) hay que añadir la heterogeneidad aportada por el GP (ya mencionada anteriormente). Por tanto, la heterogeneidad apreciada a simple vista supone, a su vez, un comportamiento diferente en cada una de las caras de la muestra.

Por lo que respecta al análisis de las muestras de PCL/GO (0,05%), se obtuvieron las siguientes tablas (tablas 8 y 9):

Tabla 8. Resumen estadístico de los datos referentes al ángulo de contacto de la PCL /GO (0,05%)

PCL/GO (0,05%)				
Resumen				
Grupos	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Sesgo estandarizado
Cara superior	19	85,5053	5,0827	-0,684206
Cara inferior	19	92,4368	4,83807	-0,780667

Tabla 9. Resumen del ANOVA del ángulo de contacto de la PCL/GO (0,05%)

Análisis de la varianza					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	456,444	1	456,444	18,54	0,0001
Dentro de los grupos	886,334	36	24,6204		
Total	1342,78	37			

En este caso, las diferencias del ángulo de contacto en cada una de las caras son también estadísticamente significativas. Ahora bien, en este caso llaman la atención dos aspectos. En primer lugar, se da un caso similar al que ocurre con la PCL pura: una cara presenta un comportamiento hidrófilo (cara superior) y otra un comportamiento hidrófobo (cara inferior), aunque con valores promedio relativamente próximos al valor tomado generalmente como límite entre uno y otro. En segundo lugar, el p – valor en este caso es mayor que en el de la PCL/GO (0,03), cosa que no era del todo esperable. Al fin y al cabo, la heterogeneidad aportada por el GO en este caso debería ser mayor, pues obviamente la cantidad de GO presente en esta muestra es mayor que en la que contiene un 0,03% de GO.

Finalmente, los datos cosechados de las muestras de PCL/GO (0,1%) fueron analizados para obtener las siguientes tablas (tablas 10 y 11):

Tabla 10. Resumen estadístico de los datos referentes al ángulo de contacto de la PCL /GO (0,1%)

PCL/GO (0,01%)				
Resumen				
Grupos	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Sesgo estandarizado
Cara superior	20	76,515	3,54835	0,757639
Cara inferior	20	106,38	4,07322	-0,853004

Tabla 11. Resumen del ANOVA del ángulo de contacto de la PCL/GO (0,1%)

Análisis de la varianza					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	8919,18	1	8919,18	611,28	0,0000
Dentro de los grupos	554,457	38	14,591		
Total	9473,64	39			

De nuevo en este caso las diferencias son estadísticamente significativas, pero en esta ocasión el comportamiento es completamente distinto al resto de muestras. Por un lado, cada una de las caras presenta un comportamiento claramente diferenciado (hidrófilo en la cara inferior e hidrófobo en la superior), pero se rompe una tendencia que venían marcando las muestras precedentes: si crecía el ángulo de contacto de la cara inferior respecto a la muestra con un menor contenido en GO, también lo hacía el ángulo de la cara superior. Sin embargo, en esta muestra esta tendencia no se presenta. Ahora bien, tampoco puede obviarse que esta muestra presentaba un carácter mucho más heterogéneo que el resto de muestras (apreciable mucho

más claramente incluso a simple vista). De hecho, a simple vista podía apreciarse con mucha claridad una capa superficial más ennegrecida en la parte superior, mucho más diferenciada en esta muestra que en el resto de ellas.

Por tanto, tal y como se observa en estas tablas, en todos los casos las diferencias son estadísticamente significativas. Así pues, existe una evidencia estadística suficiente para afirmar que el comportamiento de las muestras difiere según se tome en consideración la cara inferior o se tome la cara superior. Anteriormente se ha mencionado el hecho de que este comportamiento podría deberse a que la concentración del GO es notablemente mayor en la parte superior de la muestra a partir de una determinada cantidad de GO en la muestra. Ahora bien, la causa de que efectivamente haya diferencias significativas en los cuatro tipos de muestra no puede ser únicamente la presencia de una mayor concentración de GO en la superficie. De hecho, las diferencias son estadísticamente significativas incluso en el caso de la PCL pura, por lo que hay algún otro factor que también influya.

Es por ello que se pensó que una posible explicación podría ser el proceso de síntesis de las muestras, concretamente en el proceso de evaporación del disolvente, como se ha mencionado brevemente con anterioridad. Durante el proceso de fabricación de las muestras se decidió eliminar el THF mediante la colocación de las mismas en una campana de vacío con un breve lapsus de tiempo en extracción continua. Así, durante este proceso, quizá se crease un gradiente de concentración de PCL y de GO, de manera que la concentración de ambos componentes fuese mayor siempre en la cara superior. Esto se respalda en las imágenes transversales de las muestras (imágenes 12 a 14), donde se observa que, en todos los casos, la sección transversal no presenta una coloración homogénea.

Sin embargo, con el análisis realizado hasta ahora se evidencia que existen diferencias significativas entre las caras de una misma muestra. Pero a la vista de la evolución del ángulo de contacto conforme crece el contenido en GO y con los resultados obtenidos en el ANOVA ya realizado, también era necesario estudiar si existen diferencias significativas conforme el contenido en GO va aumentando. Por ello, se realizó un ANOVA entre las poblaciones de la cara inferior de cada muestra, así como de la cara superior (tabla 12 y 13):

Tabla 12. Resumen estadístico de los datos obtenidos de las caras inferiores de todas las muestras.

Caras inferiores				
Resumen				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
PCL	20	1865,2	93,26	8,53967
PCL/GO (0,03%)	20	2131,5	106,575	54,88302
PCL/GO (0,05%)	19	1756,3	92,4368	23,4069
PCL/GO (0,1%)	20	2127,6	106,38	16,5911

Tabla 13. Resumen del ANOVA realizado con las caras inferiores de todas las muestras, agrupadas según su contenido en GO.

Análisis de la varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3669,3142	3	1223,1047	47,24645	$2,9623 \cdot 10^{-17}$	2,726589
Dentro de los grupos	1941,5817	75	25,887756			
Total	5610,8959	78				

Con este ANOVA puede concluirse que las diferencias existentes entre las muestras son estadísticamente significativas, con un p – valor que roza el 0. Por tanto, puede decirse que hay diferencias estadísticamente muy significativas entre, al menos, dos poblaciones. Sin embargo, este análisis no aporta información sobre qué poblaciones existen dichas diferencias. Únicamente informa de que, efectivamente, dichas diferencias realmente existen.

En lo referente a la variación del ángulo de contacto en las caras superiores de las muestras, las tablas obtenidas tras la realización del ANOVA fueron (tablas 14 y 15):

Tabla 14. Resumen estadístico de los datos obtenidos de las caras superiores de todas las muestras.

Caras superiores				
Resumen				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
PCL	20	1740,7	87,035	25,00871
PCL/GO (0,03%)	20	1918	95,9	21,86
PCL/GO (0,05%)	19	1624,6	85,50526	25,83385
PCL/GO (0,1%)	20	1530,3	76,515	12,59081

Tabla 15. Resumen del ANOVA realizado con las caras superiores de todas las muestras, agrupadas según su contenido en GO.

Análisis de la varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3780,7167	3	1260,2389	59,2685	$9,5502 \cdot 10^{-20}$	2,726589
Dentro de los grupos	1594,7404	75	21,2632			
Total	5375,4572	78				

Tabla 16

A la vista de estos resultados, y dado el pequeñísimo valor que presenta la probabilidad (o p valor), puede afirmarse que las diferencias poblacionales son estadísticamente significativas. Así pues, puede afirmarse que existen diferencias estadísticamente significativas:

- Entre las caras superior e inferior de cada tipo de muestra.
- Entre la misma cara (superior o inferior) de las muestras para distintos valores del contenido en GO.

Sin embargo, cuando el test F resulta significativo, hay que precisar entre cuáles de las variantes del factor existen diferencias significativas en las medias. En efecto, un valor significativo de la F sólo indica que, al menos, una de las medias difiere de las restantes, sin precisar cuál de ellas. Una forma sencilla de precisar esta cuestión es mediante el establecimiento de los intervalos LSD (*Least Significant Difference*). Por tanto, la diferencia entre la media de dos poblaciones será significativa si los intervalos no se solapan.

Lógicamente, en el primer análisis que ha sido realizado y al tener únicamente dos poblaciones (cara inferior y cara superior de cada muestra), no hay duda alguna, puesto que si hay diferencias significativas entre las poblaciones es, obviamente, entre las únicas que forman parte del análisis. Sin embargo, en el último análisis sí es necesario precisar los intervalos LSD, para conocer exactamente entre qué poblaciones hay diferencias significativas. Así, los resultados obtenidos de los análisis LSD fueron (figuras 19 y 20):

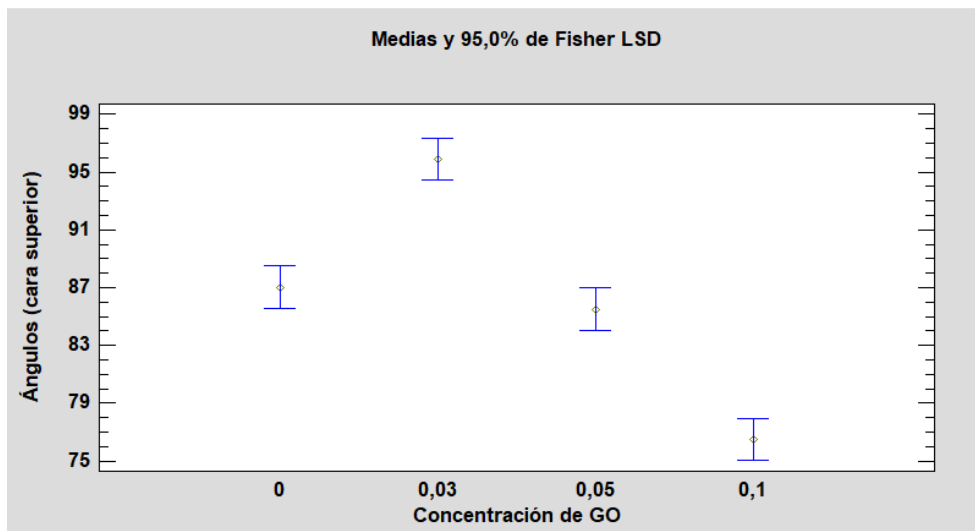


Figura 19. LSD para las caras superiores

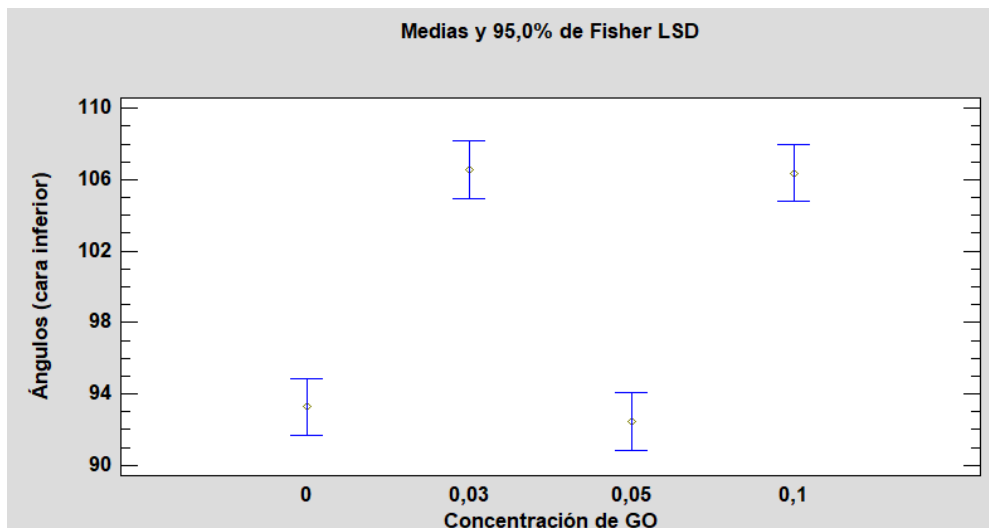


Figura 20. LSD para las caras inferiores

Tal y como se había visto con los valores de la F en la tabla de la ANOVA, hay muestras que presentan diferencias estadísticamente significativas, y con estas imágenes es posible conocer cuáles eran. Así, al observar la figura 19 puede concluirse que el ángulo de contacto no presenta diferencias significativas en la cara superior entre las muestras de PCL pura y de PCL/GO (0,05%). Hablando estrictamente de diferencias significativas, en la cara superior aparecen, pues, tres grupos: el ya mencionado de PCL y PCL/GO (0,05), otro formado únicamente por las muestras de PCL/GO (0,03%) y un último formado por las muestras de PCL/GO (0,1%).

Por el contrario, de la figura 20 puede extraerse que, en cuanto a la cara inferior de las muestras se refiere, aparecen dos poblaciones claramente diferentes. Por una parte, no existen diferencias entre la PCL y la PCL/GO (0,05), así como tampoco lo hacen entre la PCL/GO (0,03) y PCL/GO (0,1).

4.3.2-Contenido de agua en equilibrio

Con la finalidad de estudiar la hidrofiliidad de las muestras y ver cómo ésta cambia (o no) en función de la concentración de GO se estudió el contenido de agua en equilibrio. Esta prueba, o alguna de sus variantes, son muy utilizadas en el estudio de los materiales porosos, y cobran especial importancia en el estudio de polímeros o en aquellos campos donde se realicen estructuras muy porosas, como podía ser el caso de los scaffolds.

Para la realización de esta prueba durante este proyecto, las muestras fueron sumergidas en agua ultrapura. A continuación, y conforme el tiempo estipulado iba pasando, las muestras eran extraídas del agua, secadas superficialmente con un papel secante para eliminar el agua exterior y, finalmente, eran pesadas.

El peso húmedo fue medido para determinar la evolución de la hidrofiliidad de las muestras. El grado de hinchado fue medido comparando el peso húmedo (w_w) con el peso seco (w_d), el cual se considera el inicial, justo el medido en las muestras antes de ser sumergidas en el agua. La ecuación a seguir era:

$$\text{Grado de hinchado (\%)} = \frac{w_w - w_d}{w_d} \cdot 100$$

Ecuación 4

En total, las muestras fueron pesadas en ocho ocasiones: $t=0$; $t=90$; $t=180$; $t=300$; $t=1620$; $t=1740$; $t=2880$ y $t=6060$ siendo todas las unidades los minutos en cualquier caso, obteniéndose la siguiente gráfica (figura 21):

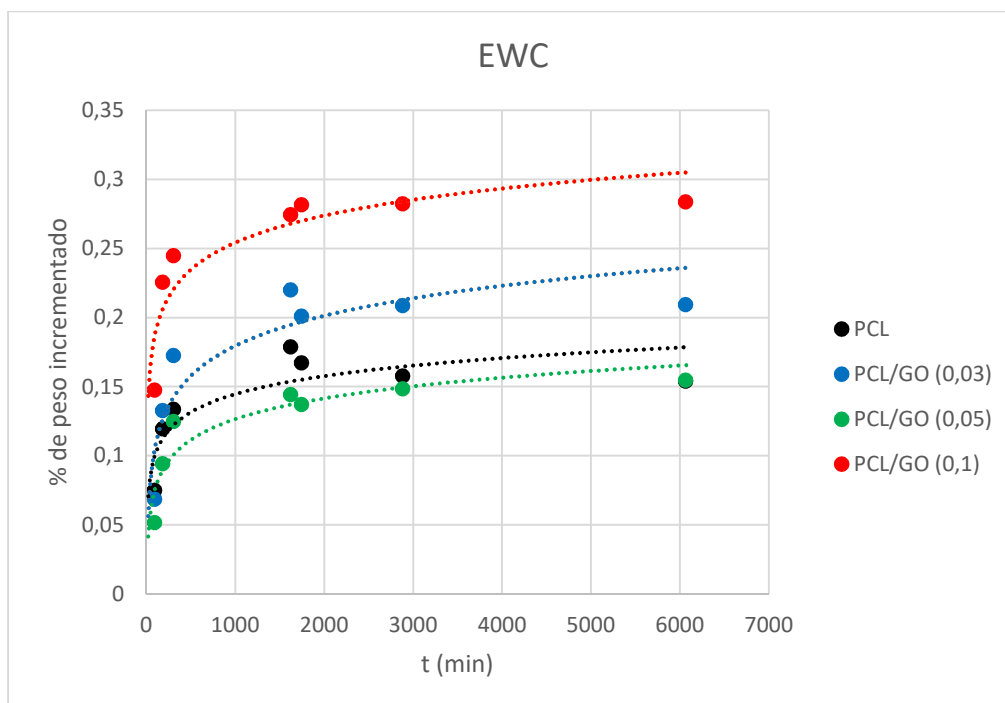


Figura 21. Evolución del grado de hinchado de cada tipo de muestra en función del tiempo

Al observar la gráfica, a simple vista parecen dibujarse tres grupos más diferenciados: por una parte, la muestra PCL/GO (0,1); por otra parte la muestra PCL/GO (0,03); finalmente, un grupo formado por las muestras de PCL pura y PCL/GO (0,05), que ya presentaban un comportamiento similar en la prueba del ángulo de contacto. Sin embargo, es necesario estudiar si las diferencias apreciadas en la figura 21 son estadísticamente significativas o no.

Por ello, se realizó de nuevo un análisis de la varianza, un ANOVA, obteniéndose pues los siguientes resultados con el programa Statgraphics (tabla 17 y 18):

Tabla 17. Resumen estadístico de los datos obtenidos del grado de hinchado de todas las muestras.

Contenido de agua en equilibrio				
Resumen				
Grupos	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Sesgo estandarizado
PCL	12	0,164458	0,0475055	0,547877
PCL/GO (0,03%)	12	0,20982	0,0483053	-0,796343
PCL/GO (0,05%)	12	0,146175	0,0215707	0,202733
PCL/GO (0,1%)	12	0,280535	0,0388823	-0,0384443

Tabla 18. ANOVA del grado de hinchado de todas las muestras.

Análisis de la varianza					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	0,12891	3	0,0429701	26,17	0,0000
Dentro de los grupos	0,0072403	44	0,001641		
Total	0,201151	47			

Tal y como se observa en la tabla, dado que el valor de la probabilidad (p-value) es menor que 0,05 e, incluso, de 0,01, se concluye que las diferencias entre los diferentes grupos son estadísticamente muy significativas. Por ello, es necesario realizar algún test más para conocer entre qué grupos aparecen estas diferencias, siendo los resultados los siguientes (figura 22):

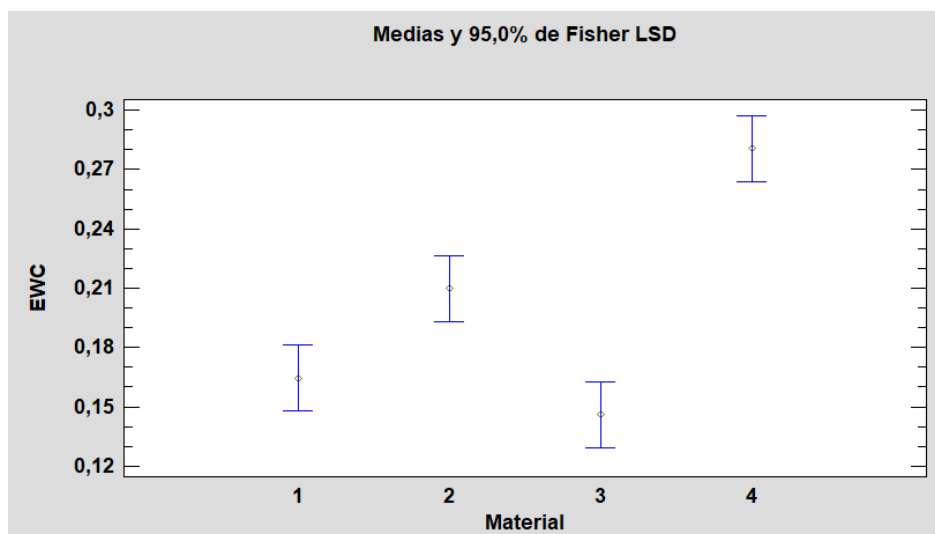


Figura 22. 1=PCL; 2=PCL/GO (0,03); 3=PCL/GO (0,05); 4=PCL/GO (0,1)

Así pues, se confirma la predicción realizada tras la observación de la figura 21: aparecen diferencias entre tres grupos: en primer lugar, las muestras de PCL y PCL/GO (0,05) no muestran diferencias significativas entre ellos, mientras que sí lo hacen con respecto a los otros dos tipos de muestras. Precisamente, las muestras de PCL/GO (0,03) presentan diferencias significativas respecto al resto de grupos, pero destaca, sobre todo, el grupo formado por las muestras de PCL/GO (0,1). De hecho, estas muestras presentan unas diferencias que son muy significativas.

Por tanto, podría concluirse que la capacidad de absorber agua aumenta conforme lo hace el contenido en GO de no ser por el comportamiento de la muestra con un 0,05% de GO. Por ello, si bien la muestra de PCL/GO (0,1) presenta un comportamiento claramente diferente al resto, no se aprecia una tendencia clara que relacione el grado de hinchado con la cantidad de GO de la muestra.

4.3.3-Variación de la masa

Durante el trabajo se midió la masa de cada muestra con el fin de estudiar cómo ésta variaba de acuerdo con el tiempo que cada muestra permanecía sumergida en SBF. Así, se trataba de estudiar si el crecimiento de la HA que se persigue durante el proyecto se apreciaba, simplemente, mediante un cambio en la masa de las muestras.

Ahora bien, las muestras con un mayor contenido en GO, es decir, las muestras de PCL/GO (0,1), se fragmentaron mientras estuvieron sumergidas en el SBF (figura 23), siendo imposible la recuperación total de la masa inicial, puesto que gran parte de los fragmentos presentaban un tamaño demasiado pequeño. Por esa razón, los datos obtenidos mediante esta prueba relativos a las muestras de PCL/GO (0,1) no pudieron ser analizados.



Figura 23. PCL/GO (0,1) sumergido en SBF. Puede observarse claramente la fragmentación de la muestra.

En cuanto a los tres tipos de muestra restantes, se estudió la variación de su masa en las muestras semana a semana. Sin embargo, los datos obtenidos tras esta prueba resultaron no ser de utilidad, puesto que la variación percibida no fue estadísticamente significativa. Por esa razón, la variación se puede deber, simplemente, a la propia variabilidad del estudio, a la precisión de la balanza...

4.3.4- FESEM

Con el fin de conocer cuál era la apariencia microscópica de las muestras se realizó una observación de las mismas mediante un microscopio electrónico de barrido. Por ello, se obtuvieron imágenes de las muestras que no estuvieron sumergidas en ningún momento en el SBF, las que estuvieron dos semanas y, finalmente, las que estuvieron la duración total del experimento, esto es, cuatro semanas.

Las muestras se dispusieron de diferentes modos según el tiempo que estuvieron sumergidas en el SBF. Aquéllas que no estuvieron sumergidas (denominadas como semana 0) se partieron por la mitad tras haber sido sumergidas en nitrógeno líquido (es decir, fueron fracturadas mediante fractura frágil) y se observó la sección transversal (figura 24; derecha). Por otro lado, las muestras que estuvieron sumergidas tanto dos como cuatro semanas fueron cortadas por la mitad con un bisturí para observar tanto la cara superior como la inferior (figura 24; izquierda), pues en la prueba del ángulo de contacto ya se había apreciado la existencia de diferencias

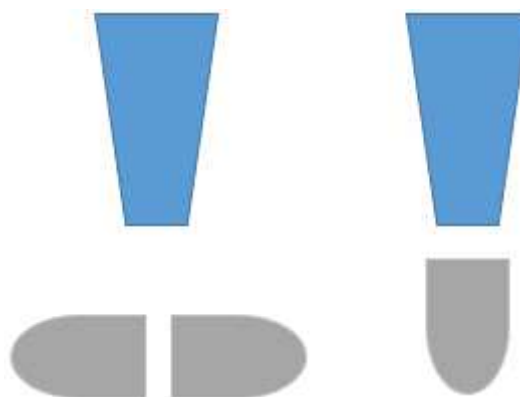


Figura 24. Disposición de las muestras (gris) respecto al detector del microscopio electrónico (azul)

significativas, y comprobar si, efectivamente, existía alguna diferencia en cuanto a su estructura microscópica.

Tras analizar las muestras de la semana 0 se observa un hecho que, además, se repetirá en el resto de las muestras. Tal y como ya se ha dicho, la prueba del ángulo de contacto mostraba diferencias que, tras realizar un análisis estadístico, resultaban ser significativas. Por ello, cabía esperar que al microscopio se observaran diferencias evidentes entre la cara superior e inferior de cada muestra. Y, efectivamente, así fue. Tal y como se observa en la figura 25 se aprecia con claridad una capa mucho más lisa y compacta en una de las caras de cada muestra (que es la que en el trabajo se ha considerado como superior). Ahora bien, en la imagen correspondiente a la muestra de PCL/GO (0,05) dicha capa no se aprecia. Esto seguramente se deba a que dicha capa se ha desprendido de la muestra a la hora de realizar la fractura previa a la observación en el microscopio.

En cualquier caso, esta diferencia (que incluso era apreciable a simple vista) puede explicarse por el método de preparación de las muestras, como se ha comentado en este trabajo anteriormente. Tras mezclar la PCL con el GO (en caso de que éste esté presente en la muestra), dicha mezcla fue depositada en un desecador a vacío para eliminar el disolvente, THF, presente. En la parte superior de cada muestra el THF fue eliminado con relativa facilidad y rapidez de la muestra, lo que provocó la expansión de la matriz polimérica en dicha capa. Esto se tradujo en que la parte superior quede mucho más compacta, dificultando considerablemente la eliminación del THF presente en el resto de la muestra. Por ello, dada la tardanza a la hora de eliminar el THF presente en la parte media e inferior de cada muestra se crearon burbujas que, tras la total eliminación del disolvente, se tradujeron en una estructura mucho más porosa y trabecular (figura 25):

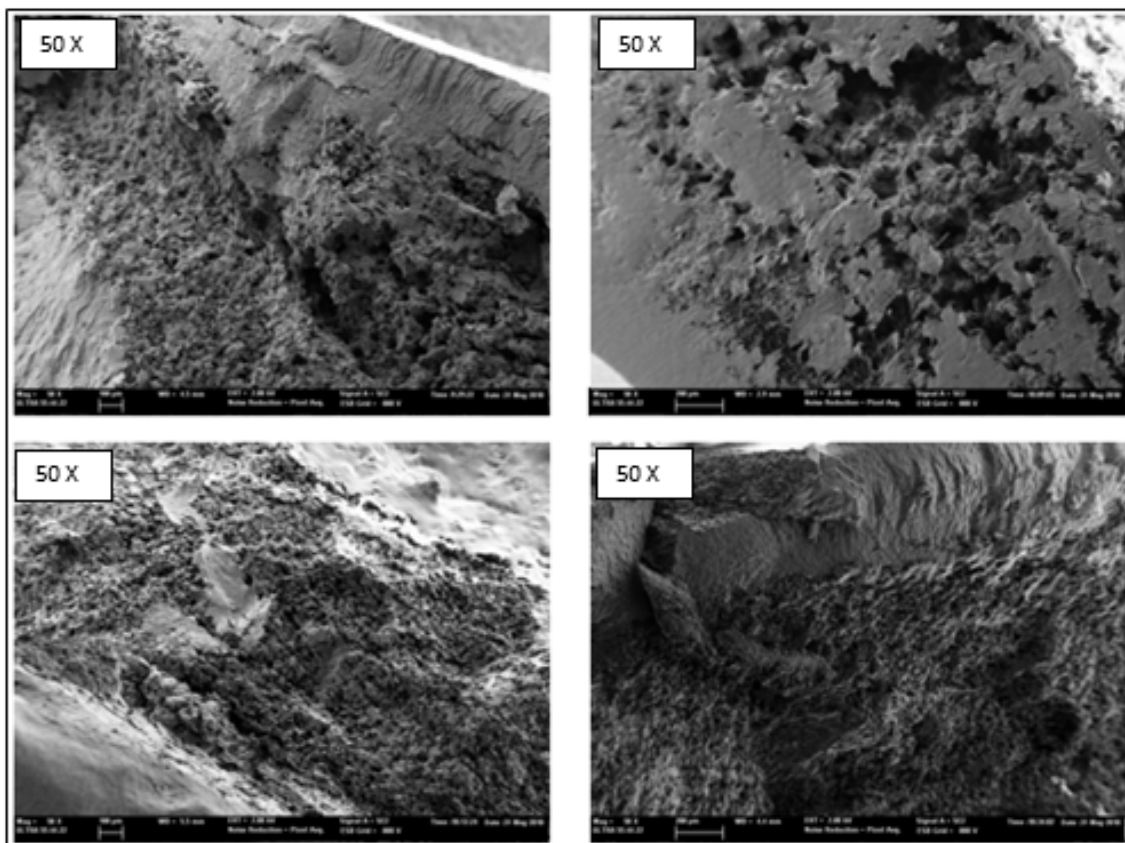


Figura 25. De izquierda a derecha y de arriba abajo: PCL, PCL/GO (0,03), PCL/GO (0,05), PCL/GO (0,1).

Además, llama la atención la naturaleza brusca y repentina que presenta el cambio entre la estructura más porosa y la más lisa y compacta. Este cambio es mucho más llamativo en la muestra de PCL/GO (0,1), tal y como se observa, con algo más de detalle, en la figura 26:

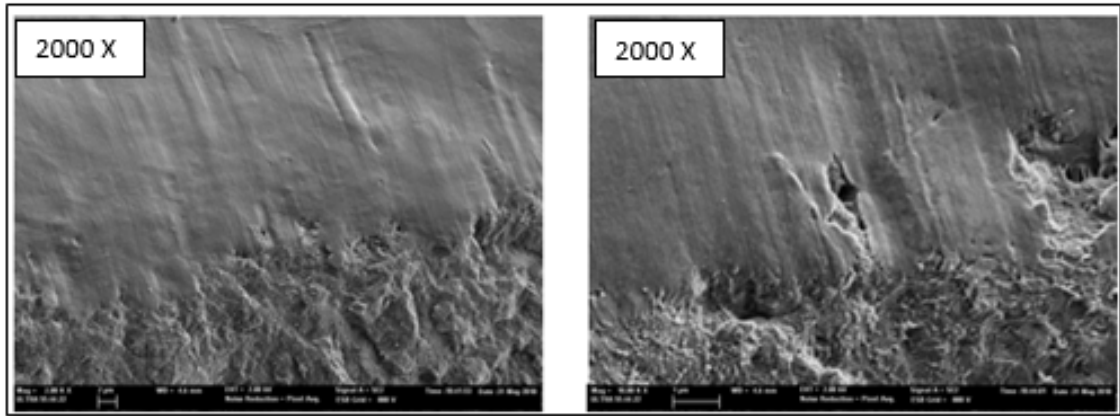


Figura 26. Detalle de la transición en las muestras de PCL/GO (0,1).

Finalmente, con la observación de estas muestras se buscaba conocer cómo estaba repartido el GO por la matriz de PCL. De acuerdo con la literatura [17], el GO se aprecia al microscopio con colores blancos y brillantes y formas tipo río. Así, en la figura 27 izquierda, se observan zonas blancas como si fuesen ríos (o gusanos, por ejemplo), así como en la misma imagen, pero a la derecha, donde se observa una lámina de lo que posiblemente sea GO (figura 27):

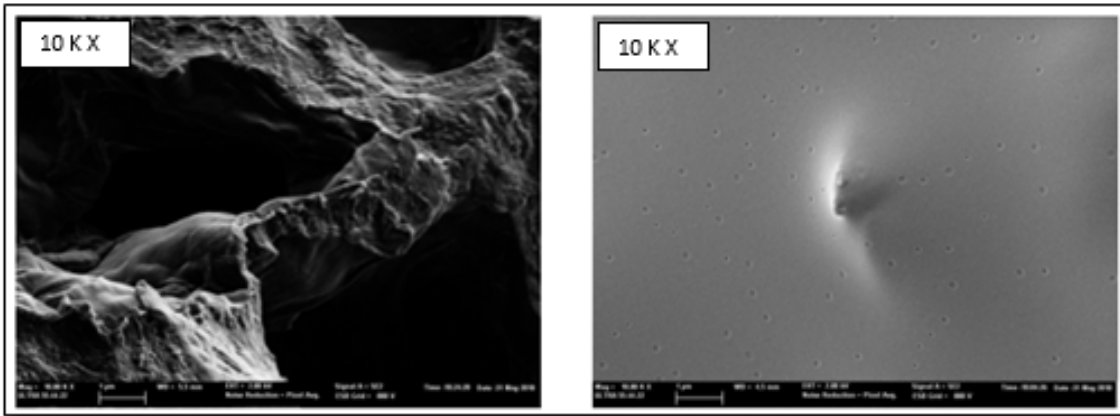


Figura 27. Derecha: PCL/GO (0,05), cara inferior. Izquierda: PCL/GO (0,03), cara superior.

5- Ensayo de bioactividad. Inmersión en SBF y caracterización

Simultáneamente a la síntesis de las muestras de PCL/GO se creó el fluido corporal simulado (SBF, por sus siglas en inglés). Para ello, se siguió el método descrito por Kokubo y Takadama en [18]. En resumen, la idea consistía en crear una disolución que simulase las diferentes concentraciones de las distintas sales presentes en el organismo. Así pues, se creó un litro del ya mencionado SBF con las cantidades indicadas en la tabla 19, obteniendo finalmente un litro de SBF (figura 29). Para el proceso de creación del mencionado SBF el orden de incorporación de los diferentes componentes era fundamental. De lo contrario, podría precipitarse la muestra, quedando el SBF inservible.

Tabla 19. Composición del SBF.

SBF			
Orden	Componente	Cantidad teórica	Cantidad real
1º	NaCl	8,035 g	8,0355 g
2º	NaHCO ₃	0,355 g	0,357 g
3º	KCl	0,255 g	0,2499 g
4º	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,231 g	0,23089 g
5º	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,311 g	0,312 g
6º	1M HCl	39 mL	39 mL
7º	CaCl ₂	0,292 g	0,2923 g
8º	Na ₂ SO ₄	0,163 g	0,1632 g

Durante el proceso de creación del SBF se tuvo que ir midiendo el pH a una determinada temperatura (puesto que el pH varía en función de la temperatura) durante diferentes puntos de su creación. Para ello, se utilizó un pHmetro, tal y como se observa en la figura 28.



Figura 28. pHmetro utilizado para ajustar el pH durante el proceso de elaboración del SBF



Figura 29. SBF creado

5.1- Caracterización

5.1.1- Evolución del ángulo de contacto

Anteriormente se ha estudiado cómo variaba el ángulo de contacto en las muestras de la semana 0. Sin embargo, tras sumergir las muestras en el SBF, se estudió también cómo evolucionaba el ángulo de contacto conforme el tiempo de sumergimiento aumentaba. Por ello, se midió el ángulo de contacto de cada tipo de muestra durante cada semana, obteniendo la siguiente evolución (figura 30):

Evolución del ángulo de contacto

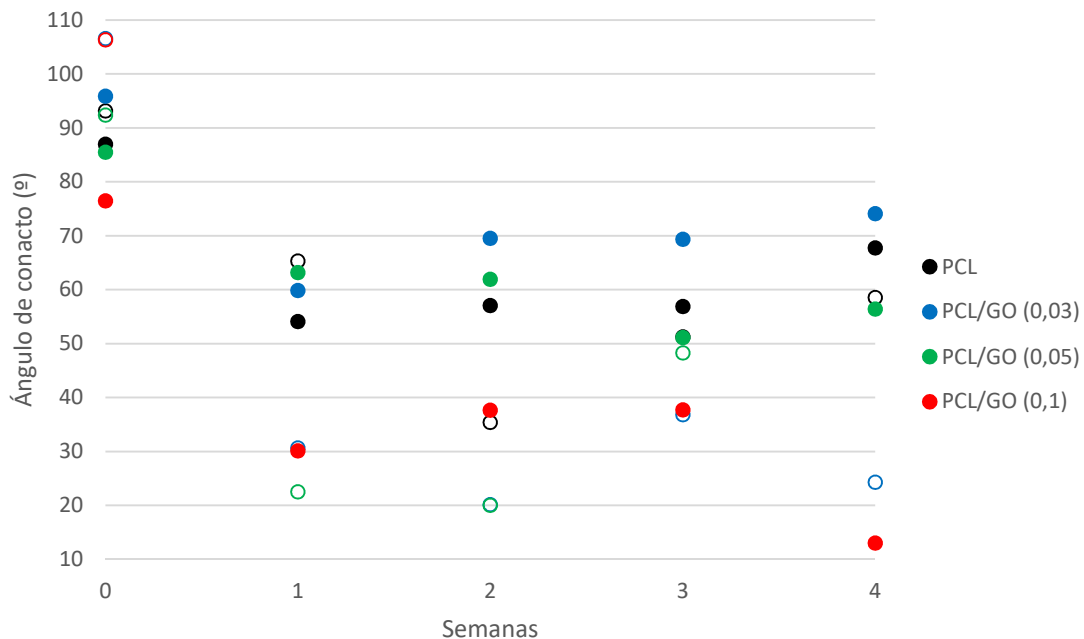


Figura 30. Los puntos rellenos representan los datos de la cara superior, mientras que los puntos huecos representan los datos de la cara inferior.

Así, a la vista de la gráfica es obvio que el ángulo de contacto presenta un descenso considerable en todas y cada una de las muestras, sobre todo en las muestras de PCL/GO (0,1). Sin embargo, medir el ángulo de contacto en la cara inferior de algunas muestras resultó ciertamente imposible, pues la gota no permanecía en la superficie de la muestra, sino que se introducía en ella, desapareciendo de la superficie. Por esta razón, solamente fue posible medir, por ejemplo, el ángulo de contacto en la cara inferior de las muestras de PCL/GO (0,1) en la semana cero, siendo inviable medirlo en las posteriores semanas. Esta situación también se dio en algunas muestras que contuviesen algo de GO, si bien solo resultó imposible obtener algún dato de las muestras de PCL/GO (0,1), pues en todas y cada una de ellas el agua desaparecía de la superficie.

Así, se han de analizar, de nuevo, hasta qué punto son importantes y reseñables estas diferencias. Con este fin, se realizó otro análisis de la varianza. En este caso, se estudiaron dos cosas. En primer lugar, si las diferencias que presentaban las muestras al final del experimento (semana 4) eran estadísticamente relevantes entre sí (pues ya se ha estudiado que al inicio del experimento existen diferencias estadísticamente significativas entre algunas poblaciones) y si la diferencia entre la semana 0 y la 4 de una misma muestra es estadísticamente significativa.

Así pues, el estudio de la varianza de los datos de cómo varía el ángulo de contacto conforme avanzan las semanas resulta en las siguientes tablas ANOVA:

Tabla 20. ANOVA de la variación del ángulo de contacto en la cara superior de la PCL con el paso de las semanas.

Análisis de la varianza					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	10553,2	4	2638,3	36,39	0,0000
Dentro de los grupos	3407,49	47	72,4999		
Total	13960,7	51			

Tras este análisis, y dado el valor de la probabilidad, es obvio que las diferencias son estadísticamente significativas. Por ello, se hace necesario la realización del gráfico de Fisher LSD, para conocer entre qué grupos las diferencias son, efectivamente, significativas (figura 31):

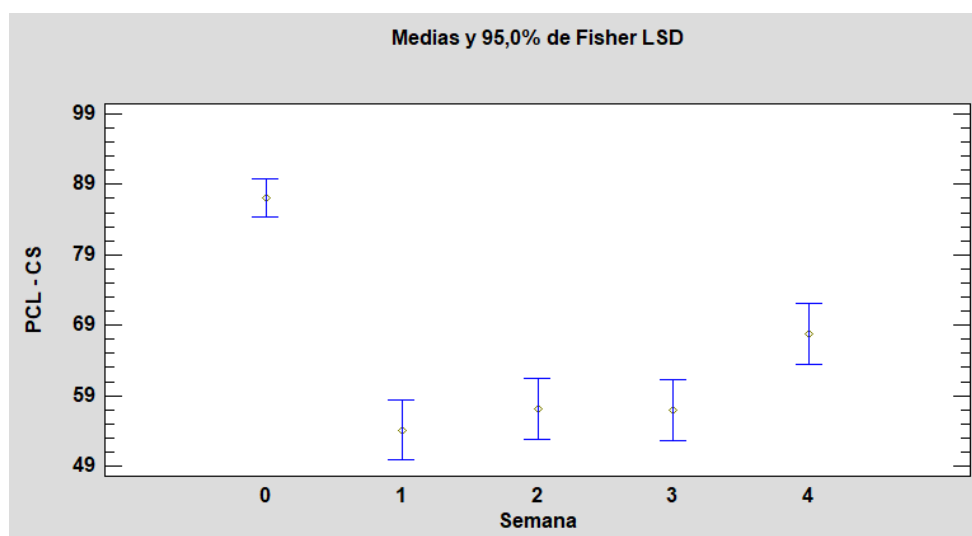


Figura 31. Intervalos LSD de la cara superior de las muestras de PCL

Por tanto, con estos resultados, se puede afirmar que claramente las muestras sufren un cambio en cuanto al ángulo de contacto se refiere en cuanto reciben el pretratamiento y son sumergidas en SBF. De acuerdo con el análisis LSD (figura 31) aparecen tres grupos diferenciados: la PCL antes de recibir el pretratamiento, la PCL sumergida en SBF durante las tres primeras semanas y un último que corresponde a la PCL tras cuatro semanas en SBF.

Por otro lado, el análisis de la varianza de la cara inferior de la PCL aportó los siguientes resultados (tabla 21):

Tabla 21. ANOVA de la variación del ángulo de contacto en la cara inferior de la PCL con el paso de las semanas.

Análisis de la varianza					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	23320,2	4	5830,05	305,91	0,0000
Dentro de los grupos	838,545	44	19,0578		
Total	24158,8	48			

En este caso, tras el análisis de esta tabla ANOVA, también es necesaria la realización del gráfico de Fisher (figura 32) para conocer entre qué grupos existen las ya sabidas diferencias significativas:

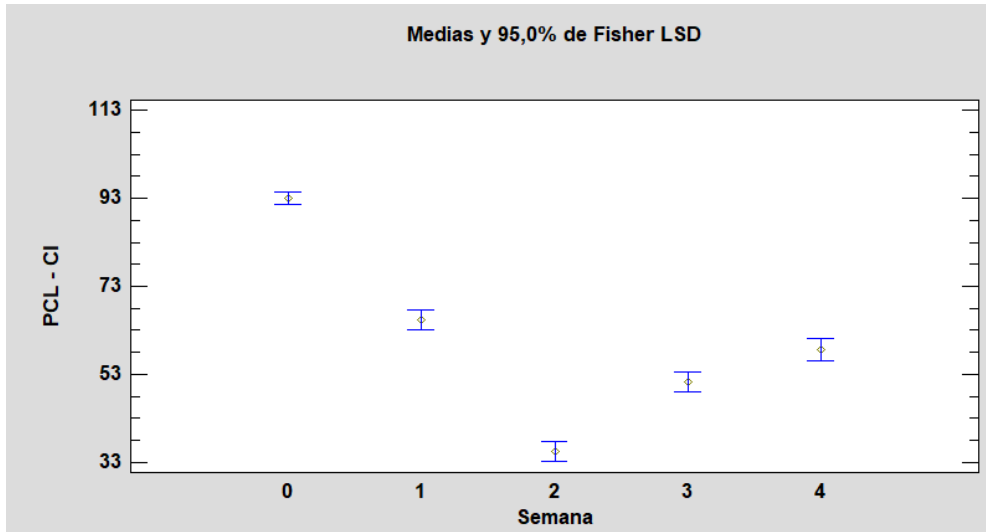


Figura 32. Intervalos LSD de la evolución del ángulo de contacto de la cara inferior de las muestras de PCL

En este caso, además de la clara diferencia de las muestras que no han sufrido un tratamiento y posterior sumergimiento en SBF respecto al resto, también existen diferencias estadísticamente significativas entre cada una de las semanas (excepto entre la primera y la cuarta semana, donde se observa un ligero solapamiento de los intervalos LSD).

De igual manera, se analizaron los datos obtenidos de la muestra PCL/GO (0,03) (tabla 22):

Tabla 22. ANOVA de la variación del ángulo de contacto en la cara superior de la PCL/GO (0,03) con el paso de las semanas.

Análisis de la varianza					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	9522,56	4	2380,64	69,70	0,0000
Dentro de los grupos	1536,98	45	34,1551		
Total	11059,5	49			

De nuevo, se hace necesario la realización de los intervalos LSD (figura 33) debido al valor de la probabilidad del ANOVA, donde se muestra la existencia de diferencias muy significativas:

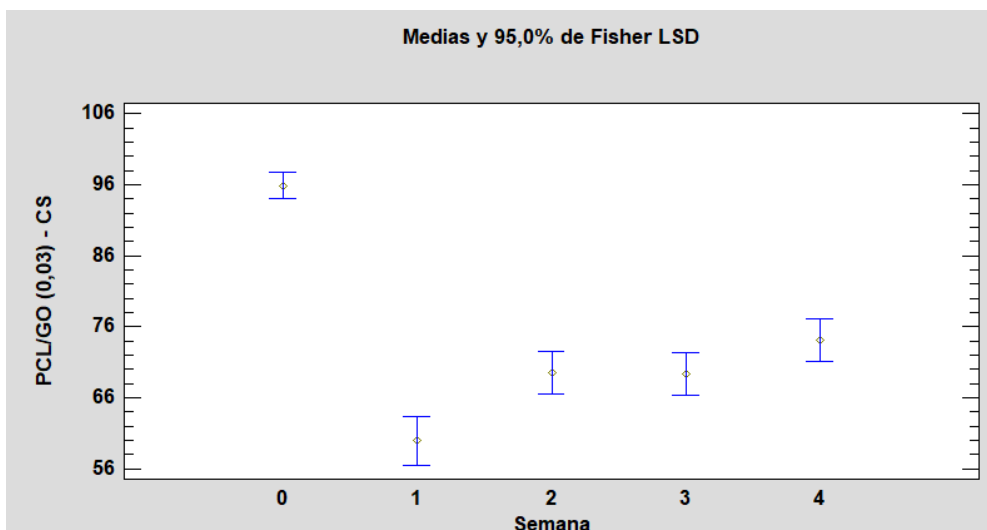


Figura 33. Intervalos LSD de la evolución del ángulo de contacto de la cara superior de las muestras de PCL/GO (0,03)

En este caso, aparece (tal y como ocurría en el caso de la PCL), aparece un gran descenso en cuanto las muestras son sumergidas en SBF para luego, estabilizarse ligeramente. Por tanto, el comportamiento de esta muestra es muy similar al de la PCL pura.

Tal y como se realizó el estudio y análisis de la varianza de la evolución del ángulo de contacto de la cara superior, se realizó a su vez lo mismo con la cara inferior, obteniendo los siguientes resultados (tabla 23 y figura 34):

Tabla 23. ANOVA de la variación del ángulo de contacto en la cara inferior de la PCL/GO (0,03) con el paso de las semanas.

Análisis de la varianza					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	51409,8	4	12852,5	77,09	0,0000
Dentro de los grupos	5168,16	31	166,715		
Total	56578,0	35			

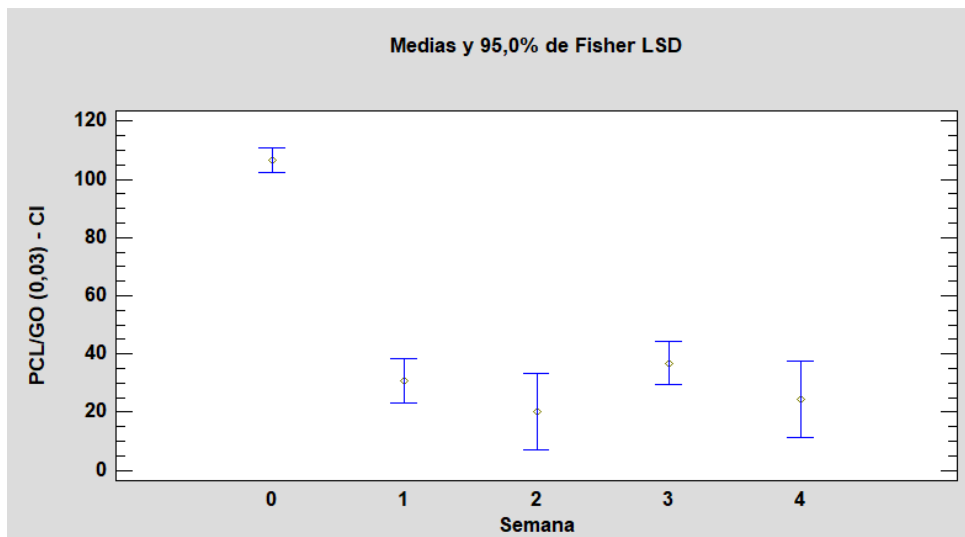


Figura 34. Intervalos LSD de la evolución del ángulo de contacto de la cara inferior de las muestras de PCL/GO (0,03)

En este caso, la única población que presenta diferencias estadísticamente significativas es la formada por el conjunto de muestras que no han sufrido un pretratamiento y posterior sumergimiento en SBF. Por el contrario, el resto de poblaciones no presenta diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Así, si en la cara superior de esta muestra el comportamiento era muy similar al de la PCL pura, en el caso de la cara inferior el comportamiento es claramente diferente.

Igualmente, la muestra PCL/GO (0,05) se estudió, obteniendo los siguientes resultados referentes a la cara inferior de la misma (tabla 24 y figura 35):

Tabla 24. ANOVA de la variación del ángulo de contacto en la cara superior de la PCL/GO (0,05) con el paso de las semanas

Análisis de la varianza					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	9324,35	4	2331,09	46,69	0,0000
Dentro de los grupos	2196,56	44	49,9219		
Total	11520,9	48			

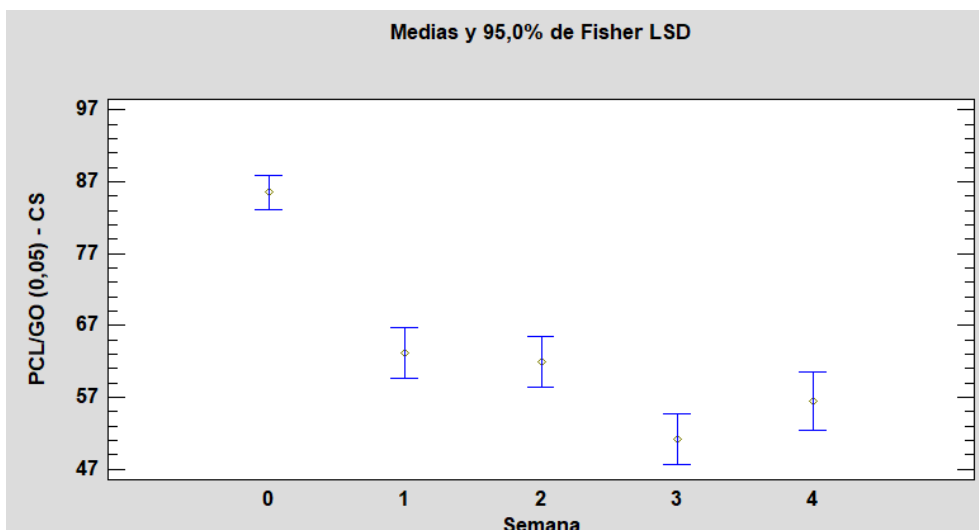


Figura 35. Intervalos LSD de la evolución del ángulo de contacto de la cara superior de las muestras de PCL/GO (0,05)

De nuevo, en el análisis del ángulo de contacto en la cara superior del conjunto de muestras de PCL/GO (0,05), se observa claramente cómo aquellas muestras de la semana 0, que no han sufrido pretratamiento ni sumergimiento en SBF, presentan diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, en el caso de aquellas que ya han sufrido el mencionado pretratamiento y hundimiento en SBF, existen diferencias únicamente significativas entre la semana 3 y las dos primeras semanas.

Por lo que respecta a las muestras de PCL/GO (0,05) analizando la cara inferior, se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 25 y figura 36):

Tabla 25. ANOVA de la variación del ángulo de contacto en la cara inferior de la PCL/GO (0,05) con el paso de las semanas.

Análisis de la varianza					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	40260,2	3	13420,1	139,46	0,0000
Dentro de los grupos	3464,31	36	96,2309		
Total	143724	39			

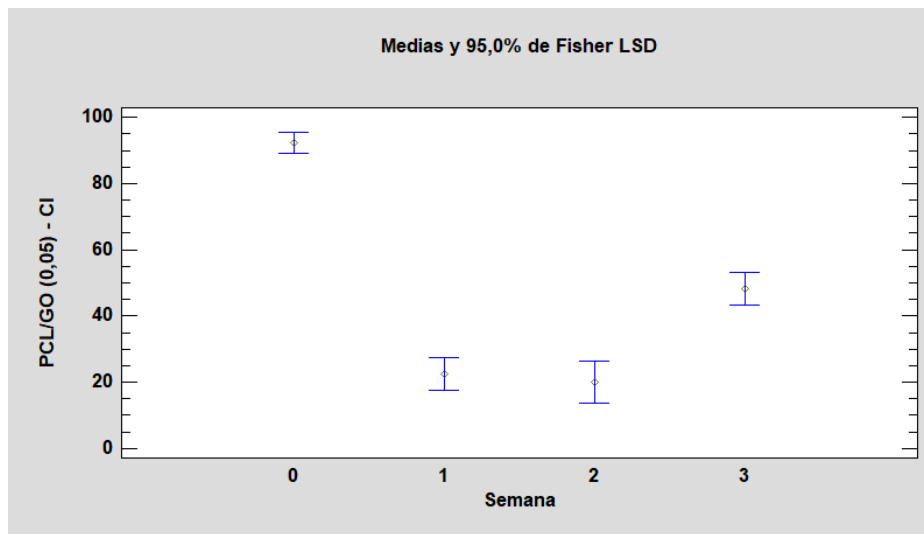


Figura 36. Intervalos LSD de la evolución del ángulo de contacto de la cara inferior de las muestras de PCL/GO (0,05)

A la vista de este gráfico se observan claramente cuáles son las diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, se aprecia también la falta de la última semana. Esto se debe a que resultó imposible medir el ángulo de contacto en las muestras de la última semana (tal y como se ha comentado con anterioridad en el trabajo). Además, la cantidad de datos obtenida para este estudio es algo menor que en los análisis previos, lo que quizá resulte en un estudio menos exacto y acertado. Sin embargo, con los datos que fue posible obtener, se observa cómo en la semana 0 las muestras presentan un comportamiento muy diferente al del resto de semanas; aunque en la semana 3 las muestras también presentaban un comportamiento estadísticamente diferente al del resto de semanas.

Finalmente, el análisis de la muestra PCL/GO (0,1) aportó los siguientes resultados:

Tabla 26. ANOVA de la variación del ángulo de contacto en la cara superior de la PCL/GO (0,1) con el paso de las semanas

Análisis de la varianza					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	17272,2	4	4318,05	137,23	0,0000
Dentro de los grupos	912,483	29	31,4649		
Total	18184,7	33			

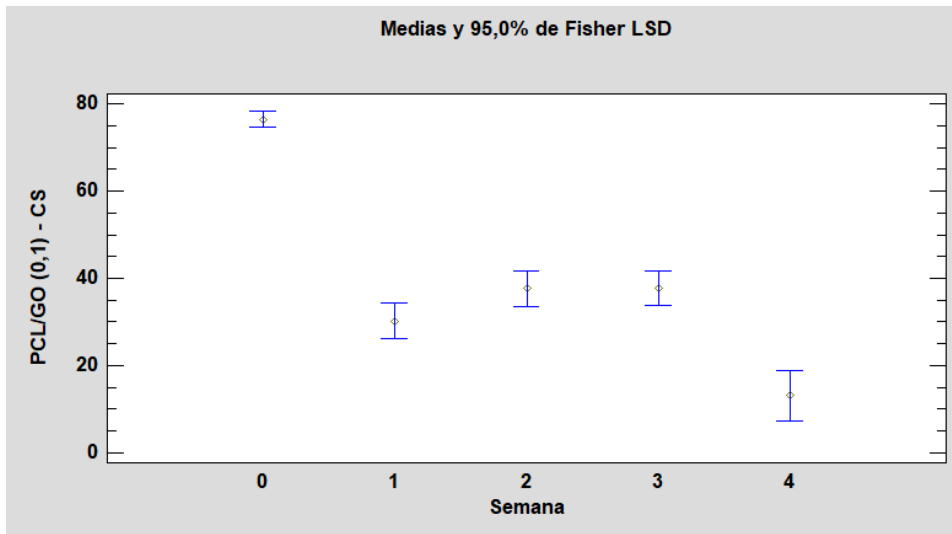


Figura 37. Intervalos LSD de la evolución del ángulo de contacto de la cara superior de las muestras de PCL/GO(0,1)

De igual manera que ocurría con el anterior análisis, en este caso el número de datos fue algo menor debido a la naturaleza frágil de estas muestras, que dificultaba considerablemente la obtención de pequeñas piezas con un perfil plano sobre el que analizar el ángulo de contacto. Aun así, se observa una diferencia más que evidente entre las muestras de la semana 0 y aquellas que han sufrido el pretratamiento y hundimiento en SBF. Además, en este caso, aparecen diferencias también significativas entre las muestras que permanecieron cuatro semanas sumergidas en SBF y aquellas que estuvieron menos tiempo.

En cuanto a la cara inferior de las muestra de PCL/GO (0,1) no fue posible obtener datos más allá de la semana 0.

Finalmente, tras haber estudiado la evolución del ángulo de contacto con el paso de las semanas, es interesante estudiar si, al igual que ocurría en la semana 0, el ángulo de contacto en la cara superior de cada una de las muestras presenta diferencias significativas en la última semana del experimento. Por ello, se realiza un ANOVA del ángulo de contacto en la cuarta semana de cada una de las muestras (tabla 27):

Tabla 27. ANOVA de la variación del ángulo de contacto en la cara superior de las muestras tras cuatro semanas sumergidas en SBF.

Análisis de la varianza					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	6401,65	3	2133,88	38,42	0,0000
Dentro de los grupos	1110,74	20	55,5369		
Total	7512,39	23			

De nuevo, es necesario graficar los intervalos LSD para conocer entre qué muestras existen las diferencias que son estadísticamente significativas (figura 38):

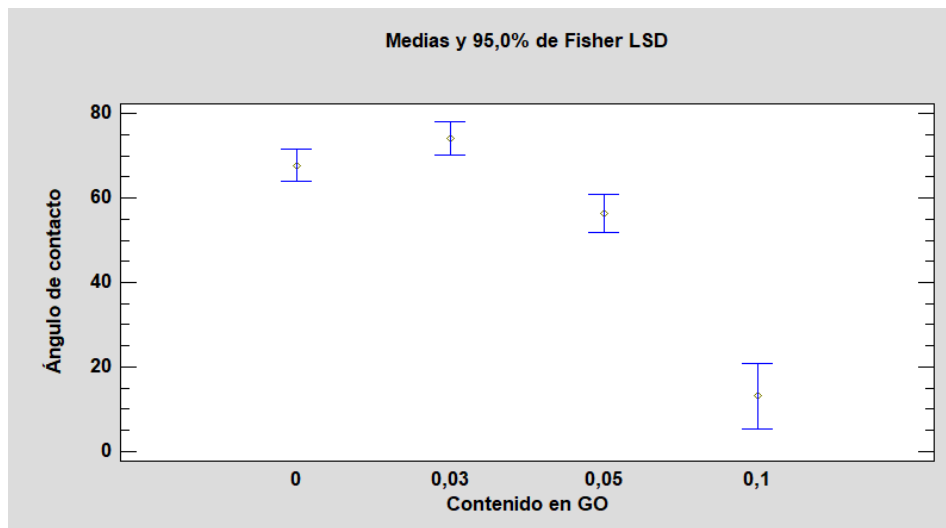


Figura 38. Intervalos LSD del ángulo de contacto de la cara superior en función del contenido de GO tras cuatro semanas sumergidas en SBF.

Tal y como se observa, la mayor diferencia aparece entre las muestras con mayor contenido en GO. Por otro lado, las muestras con un 0,05% de contenido en GO presentan diferencias significativas respecto a las que únicamente contienen un 0,03%, si bien no lo hacen respecto a la PCL pura. Sin embargo, las muestras de PCL/GO (0,1) presentan un comportamiento muy diferente al resto de muestras. Por ello, y dado que es una tendencia que ha venido ocurriendo durante todos los análisis realizados, podría afirmarse que a partir de una determinada concentración de GO en la muestra (posiblemente entre 0,05% y 0,1%) las propiedades físicas y químicas de la muestra cambian considerablemente. De hecho, las muestras PCL/GO(0,1) eran, con diferencia, las muestra más frágiles y presentan un comportamiento diferente tanto en el grado de hinchado como en el ángulo de contacto.

5.1.2- TGA

Otra prueba que se utilizó para la caracterización de las muestras fue el TGA. Así, se realizó el estudio programando una curva con dos zonas claramente diferenciadas. En primer lugar, durante los dos primeros minutos, la temperatura permaneció constante a veinticinco grados. A continuación, la temperatura comenzaba a crecer a razón de dos grados centígrados por minuto, llegando hasta los 800 grados centígrados.

El estudio se realizó primeramente con las muestras que no estuvieron sumergidas y contenían GO, es decir, con las muestras de PCL/GO (0,03), PCL/GO (0,05) y PCL/GO (0,1) para, también, estudiar todas las que permanecieron cuatro semanas sumergidas (figuras 39 a 42):

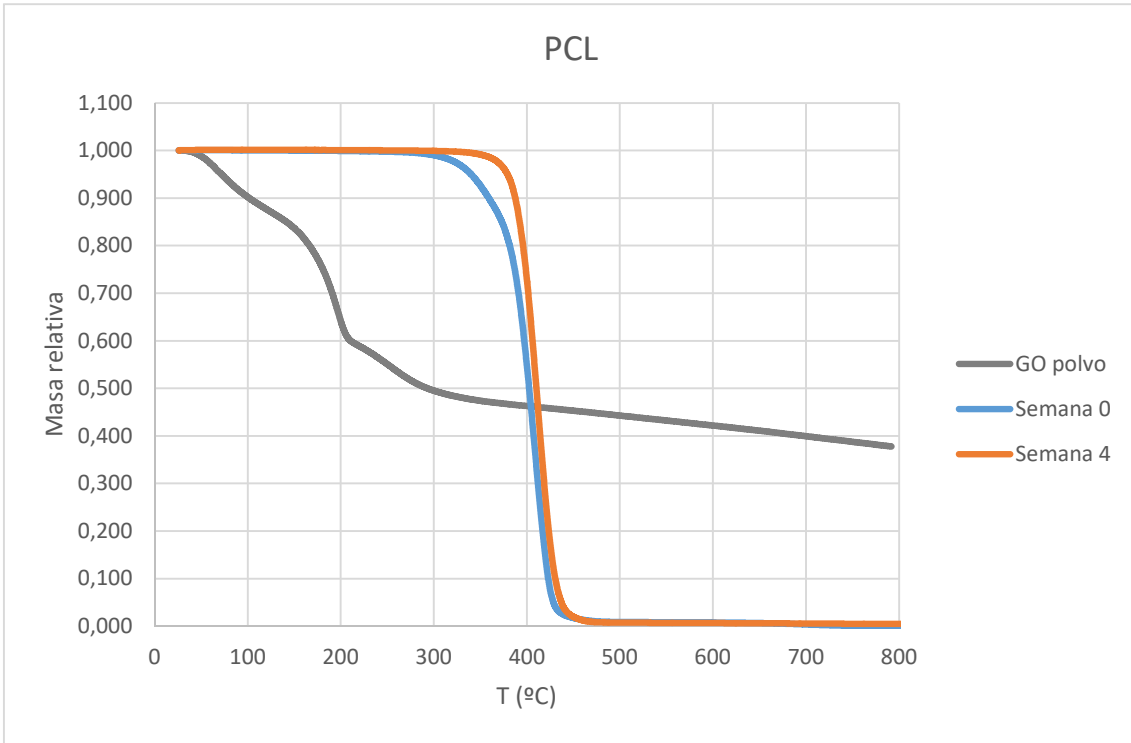


Figura 39. Comparativa de resultados de las muestras de PCL habiendo sido sumergidas en SBF durante cuatro semanas y sin haber sido sumergidas.

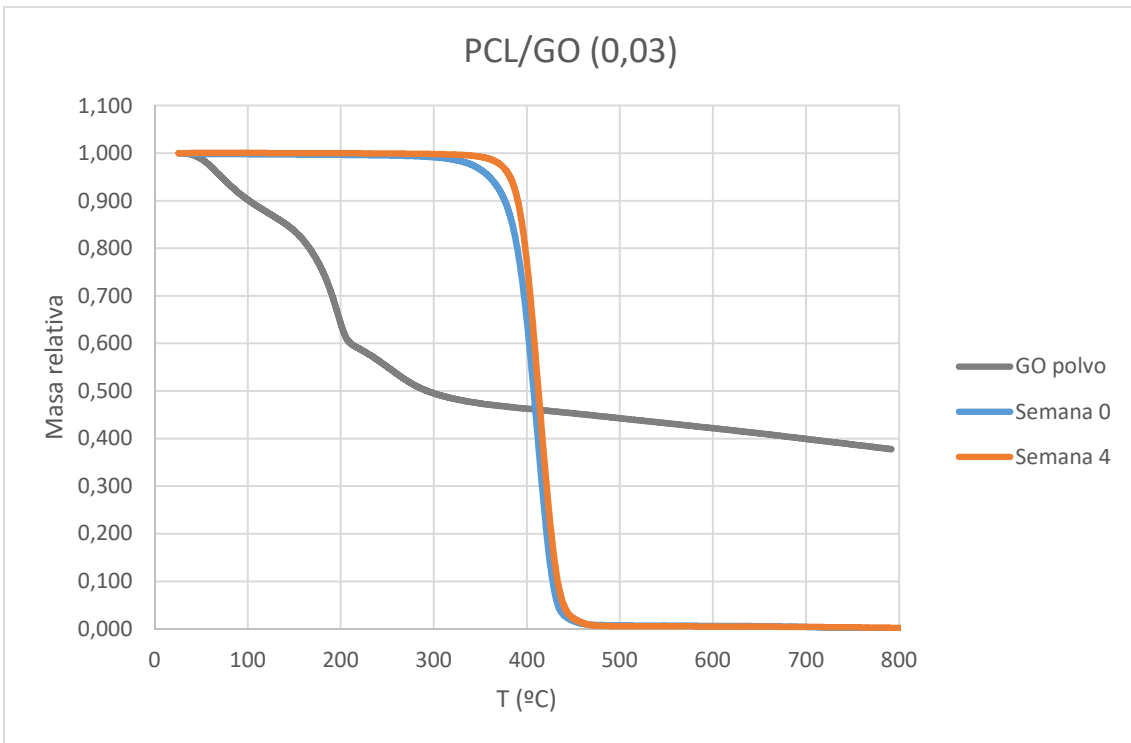


Figura 40. Comparativa de resultados de las muestras de PCL/GO (0,03) habiendo sido sumergidas en SBF durante cuatro semanas y sin haber sido sumergidas.

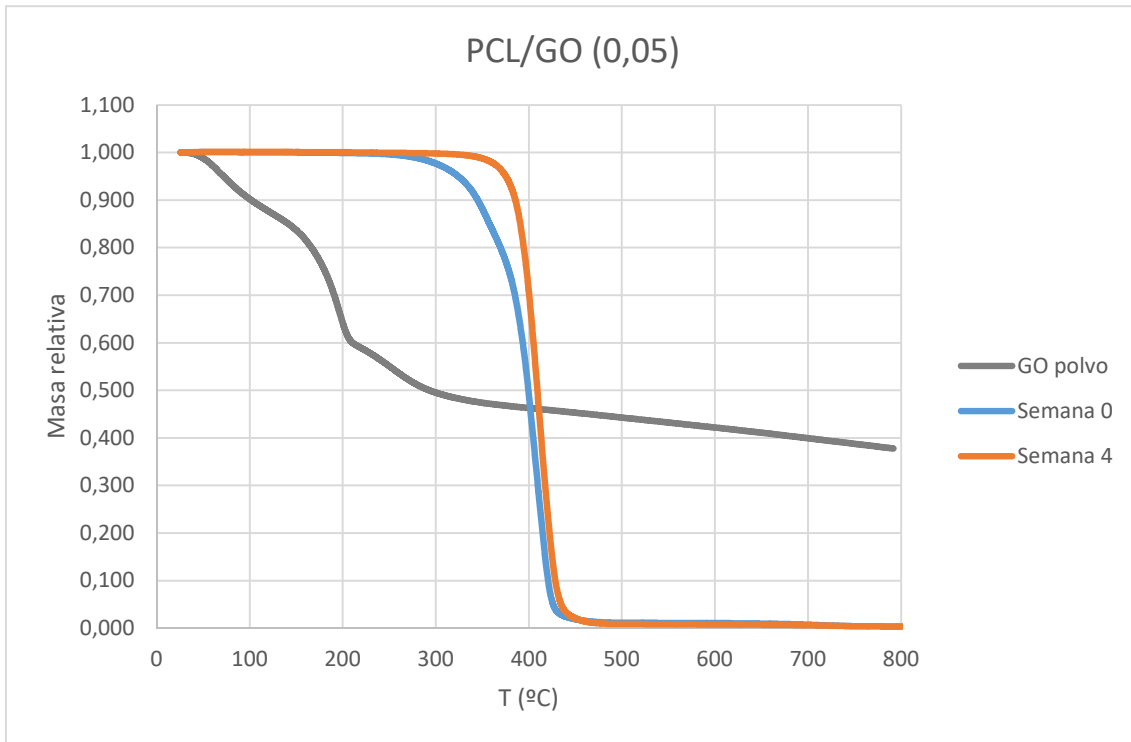


Figura 41. Comparativa de resultados de las muestras de PCL/GO (0,05) habiendo sido sumergidas en SBF durante cuatro semanas y sin haber sido sumergidas.

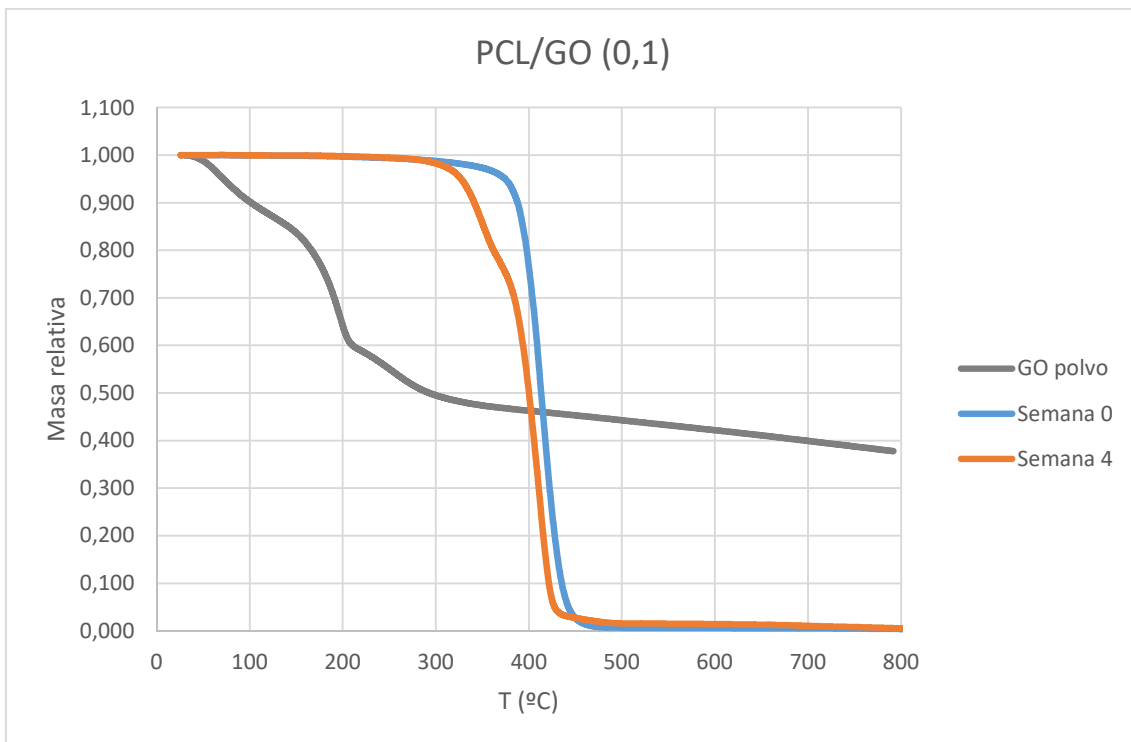


Figura 42. Comparativa de resultados de las muestras de PCL/GO (0,1) habiendo sido sumergidas en SBF durante cuatro semanas y sin haber sido sumergidas.

De la figura 24 a la 27 se observan las gráficas de las curvas resultantes del TGA de manera que se comparan las muestras clasificadas según su contenido en GO habiendo permanecido bien cuatro semanas sumergidas en SBF o bien no habiendo estado sumergidas en él en ningún momento. Observando las gráficas, se puede apreciar que existe alguna diferencia entre las

muestras a la hora de degradación de las mismas. Sin embargo, es probable que esta diferencia no sea significativa. Por otro lado, gráficamente tampoco se ve diferencia respecto a los residuos.

Ahora bien, un hecho que llama la atención aparece en la figura 42. En este caso, se observa cómo la muestra de la semana 4 comienza a degradarse antes que la de la semana 0, presentando además una caída algo más lenta que, seguramente, podrá apreciarse al comparar las derivadas de las curvas. Sin embargo, esa muestra es la única en la cual la correspondiente a la semana 4 comienza su degradación antes que la correspondiente a la semana 0.

También es necesario comparar las muestras agrupadas por el tiempo que éstas estuvieron sumergidas en el SBF. Con esta finalidad, se obtuvieron las gráficas de todas las muestras que no fueron sumergidas en SBF y de aquellas que estuvieron durante cuatro semanas (figuras 43 y 44):

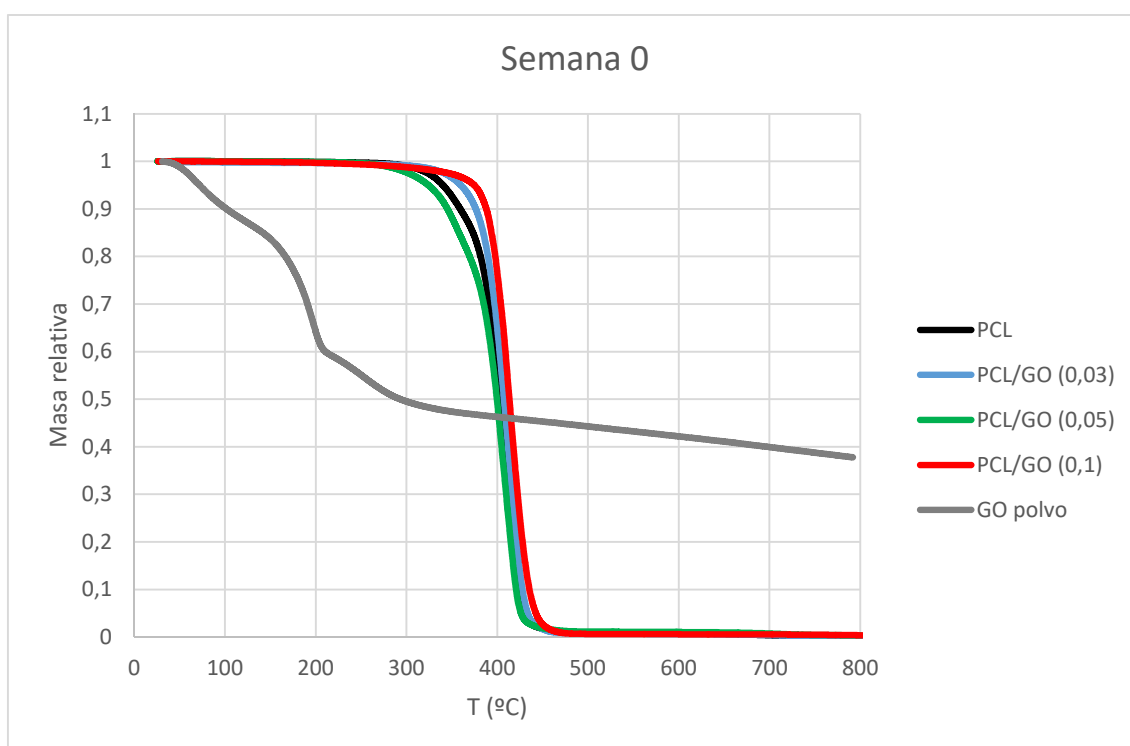


Figura 43. Gráfica comparativa de todas las muestras sin haber sido sumergidas en SBF.

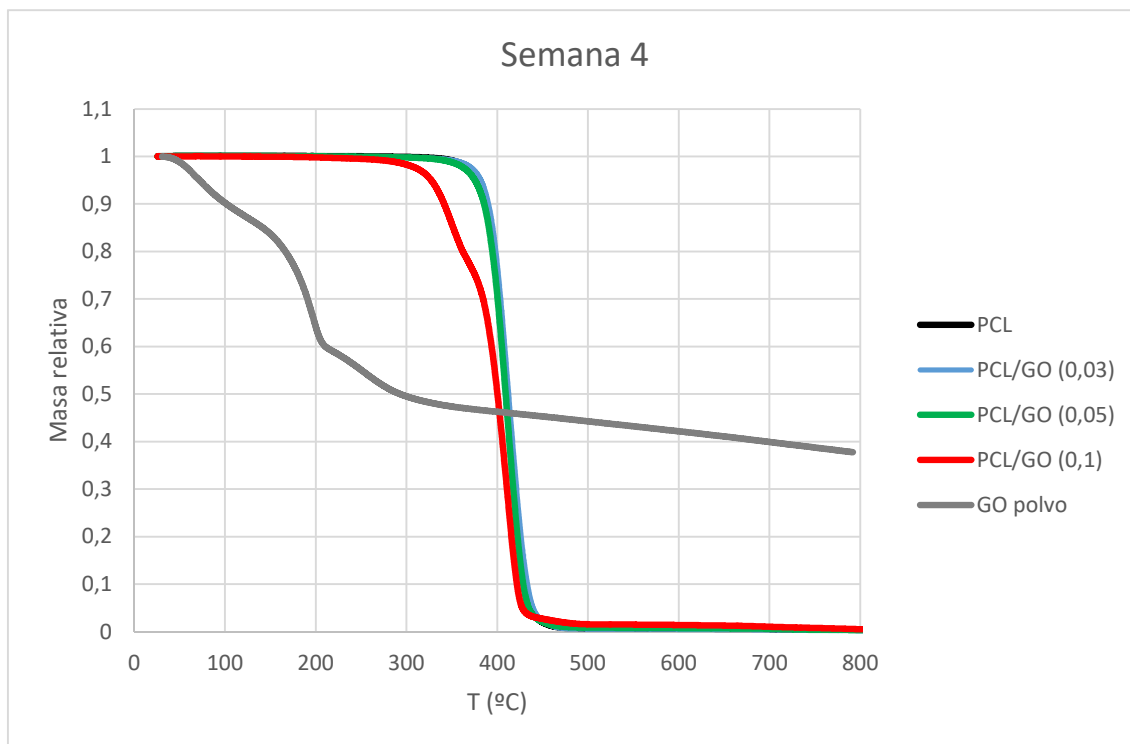


Figura 44. Gráfica comparativa de todas las muestras tras haber estado cuatro semanas sumergidas en SBF.

Analizando ambas gráficas se puede concluir que no hay prácticamente diferencia alguna entre ellas, por lo que el GO parece no aportar diferencias importantes en cuanto a la temperatura de degradación se refiere (al menos, en las concentraciones tan bajas que se han utilizado en este trabajo). La única diferencia vuelve a darse en la muestra de PCL/GO (0,1). En este caso, en la semana 0 es la que presenta una temperatura de degradación mayor, mientras que en la semana 4 es la que presenta una temperatura de degradación menor.

Por tanto, y asumiendo que el GO no debería degradarse al estar cuatro semanas en SBF y que, además, se debería formar HA (cosa que se comprobará en las imágenes de microscopía electrónica), el residuo debería ser algo mayor en la semana 4 que en la 0 (si bien, por la resolución de la gráfica, la diferencia quizá no sería apreciable).

Para completar el análisis, se estudió también la derivada de cada muestra junto con la del GO polvo puro, obteniendo los siguientes resultados (figuras 45 y 46):

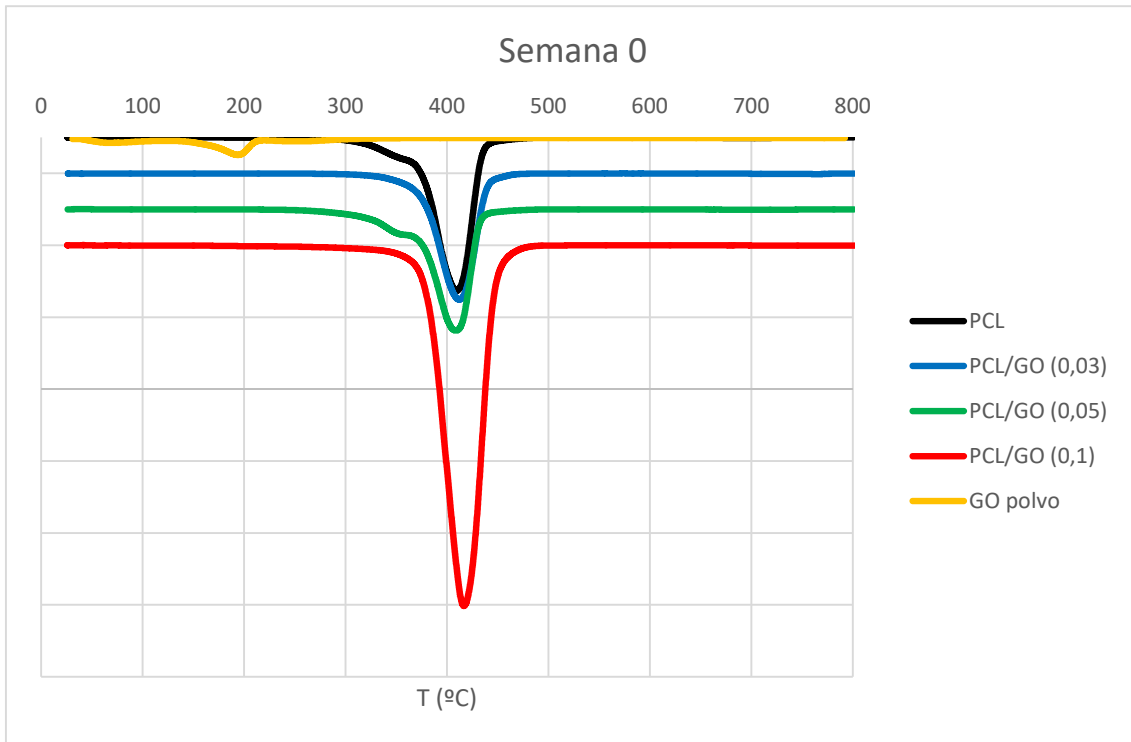


Figura 45. Primera derivada de cada una de las muestras correspondientes a la semana 0 junto con la del GO polvo

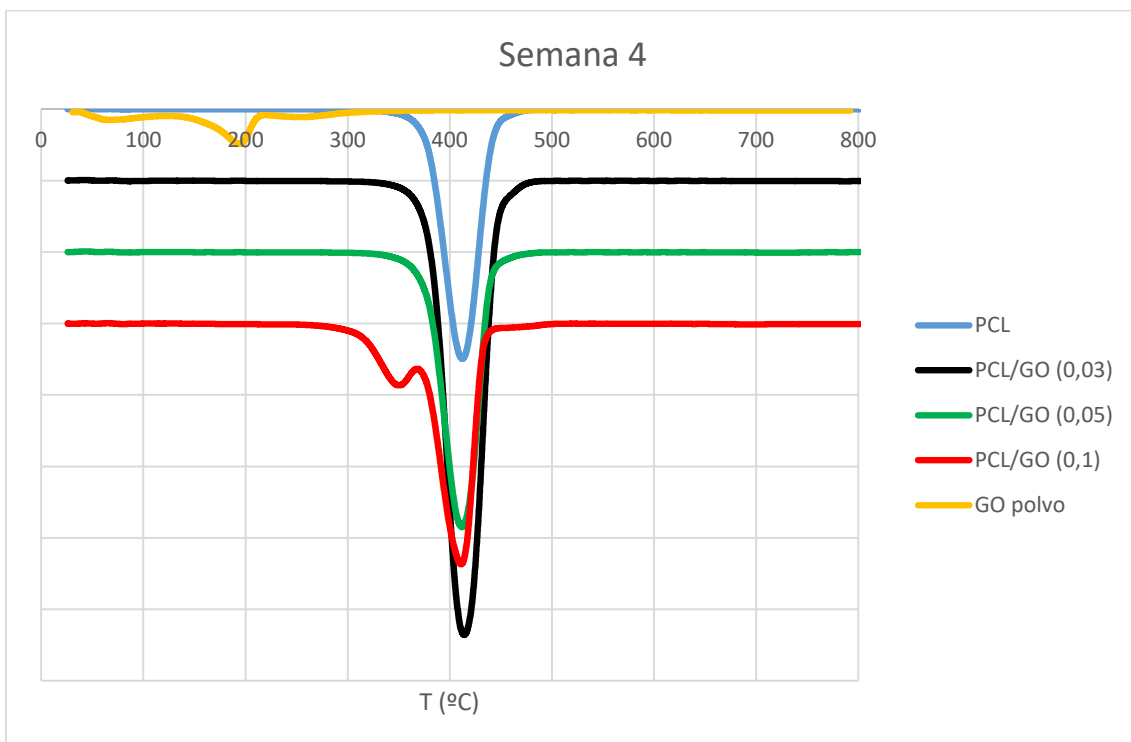


Figura 46. Primera derivada de cada una de las muestras correspondientes a la semana 0 junto con la del GO polvo

Con el estudio de las derivadas se observa cómo la derivada de la PCL crece considerablemente tras cuatro semanas en SBF. El resto de muestras por su parte presentan cambios a su vez, pero éstos son muy pequeños, por lo que no parecen ser especialmente importantes en comparación con el sufrido por la PCL.

Ahora bien, dada la resolución de las gráficas y para no perderse información relevante, se decidió estudiar el residuo que dejaba cada muestra. Para ello, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = w_{PCL} \frac{\Delta m_{PCL}}{m_{0PCL}} + (1 - w_{PCL}) \frac{\Delta m_{GO}}{m_{0GO}}$$

Ecuación 5

Así, a 700 °C, se obtuvieron los siguientes valores (tabla 28 y figura 47):

Tabla 28. Valores teóricos y prácticos del residuo calculados y obtenidos, respectivamente, de cada muestra, tanto en la semana 0 como en la semana 4.

		PCL	PCL/GO (0,03)	PCL/GO (0,05)	PCL/GO (0,1)
	Teórico (%)	0	0,012	0,02	0,04
Semana 0	Práctico (%)	0,3516	0,3942	0,7368	0,5411
Semana 4	Práctico (%)	0,5682	0,4049	0,6174	1,0629

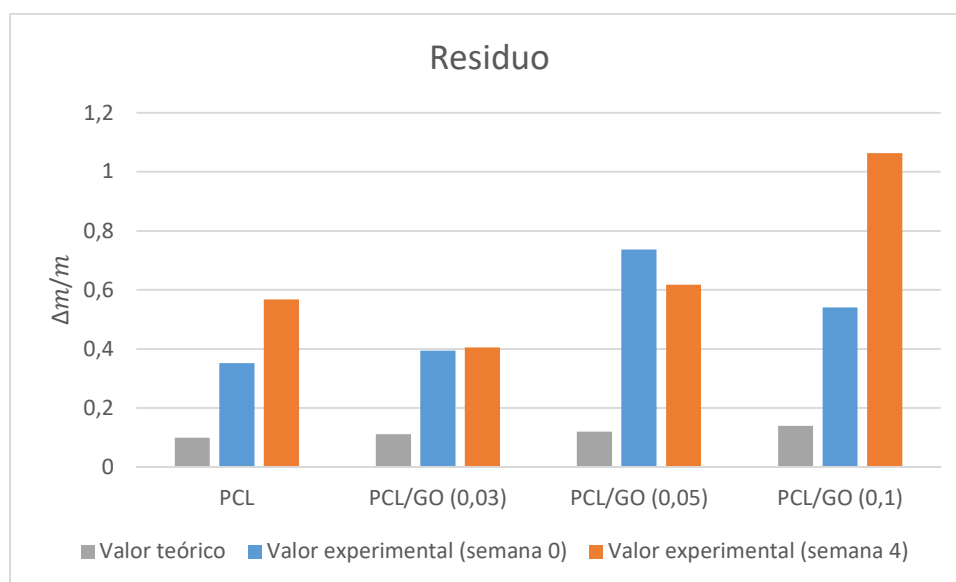


Figura 47. Residuos teóricos y experimentales, calculados y obtenidos respectivamente, para cada muestra, tanto en la semana 0 como en la semana 4.

Tal y como se aprecia tanto en la tabla de los datos como en la gráfica, los valores experimentales obtenidos tanto en la semana 0 como en la 4 son mucho mayores que los valores teóricos esperados calculados de acuerdo con la ecuación 5. Con el análisis de este residuo se pretendía explicar cómo afectaba la adición del GO para la nucleación de la HA. Pero tal y como se observa en el gráfico, no existe una tendencia clara que explique la variación de este residuo ni en las muestras de la semana 0 ni en aquéllas de la semana 4. Es más, las únicas muestras con resultados prometedores serían las de PCL pura y PCL/GO (0,1), pues el incremento del residuo observado entre la semana 0 y la 4 puede deberse a la nucleación de la HA. Sin embargo, las otras dos muestras presentan resultados contradictorios. Por tanto, con esta prueba y a falta del FESEM, no se extraen conclusiones firmes y concluyentes sobre la nucleación de la HA ha tenido lugar.

5.1.3- FESEM

Una vez estudiadas las muestras correspondientes a la semana 0, se realizó lo mismo con las muestras de la semana 2 (aquéllas que habían permanecido dos semanas en SBF), estudiándose

la cara superior y la inferior. En cualquier caso y con independencia de la muestra, se observó que la HA crecía en zonas muy concretas y en absoluto por toda la muestra. De hecho, resultó imposible detectar HA en la propia superficie de la muestra, ya que las aglomeraciones de HA se encontraban en grietas, recovecos o poros de la muestra. Además, el lavado expresado en el protocolo seguido resultó ser insuficiente, y en las imágenes era evidente la presencia de algunas sales presentes en el SBF. Este fenómeno se aprecia claramente en la parte inferior izquierda de la figura 48, donde se observan grandes estructuras cúbicas (que son las ya mencionadas sales) junto con alguna esfera que podría ser HA. Por el contrario, en la parte inferior derecha de la misma imagen se puede observar claramente una zona invadida por estructuras de HA.

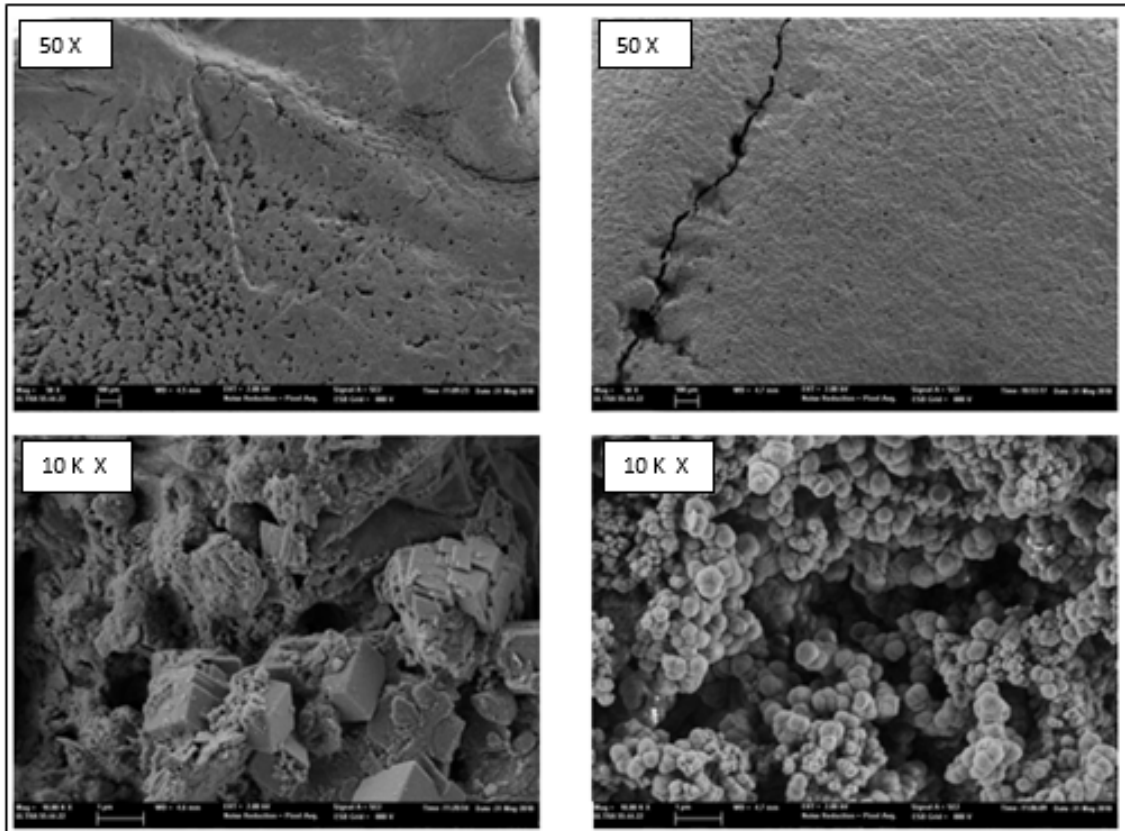


Figura 48. PCL tras dos semanas sumergida en SBF. Las imágenes de la izquierda corresponden con la cara inferior de la muestra. Las imágenes de la derecha corresponden a la cara superior de la muestra.

En el caso de las muestras de PCL/GO (0,03), de manera inversa a como ocurría con la PCL únicamente, aparecen concentraciones o aglomerados considerablemente mayores en la cara inferior. Sin embargo, en ningún caso se ha logrado encontrar un patrón de crecimiento de la HA, pues aunque la HA encontrada aparece en poros o grietas, no lo hace en todos los presentes en la muestra (figura 49):

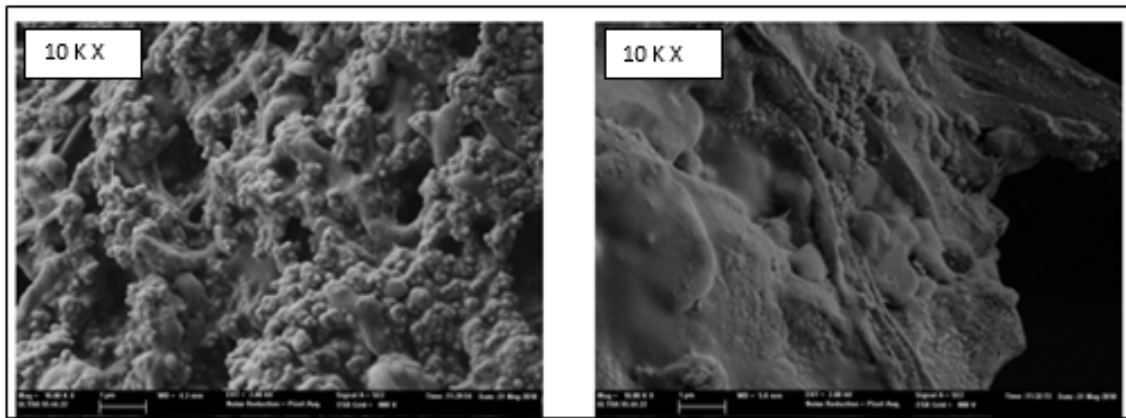


Figura 49. PCL/GO (0,03) tras dos semanas en SBF. Las imágenes de la izquierda corresponden con la cara inferior de la muestra. Las imágenes de la derecha corresponden a la cara superior de la muestra.

Tal y como ocurrió con las muestras de PCL/GO (0,03), en el caso de las de PCL/GO (0,05) tampoco se aprecia nucleación de HA. Tan solo se observaron agrupaciones de sales pero, en cualquier caso, no se ha encontrado tampoco un patrón de crecimiento de la HA a lo largo de la superficie de la muestra, pues únicamente se encontraron pequeñísimas agrupaciones de esferas que, quizá, podrían ser HA. Este fenómeno se da en ambas caras, tanto en la cara inferior como en la superior de la muestra (figura 50).

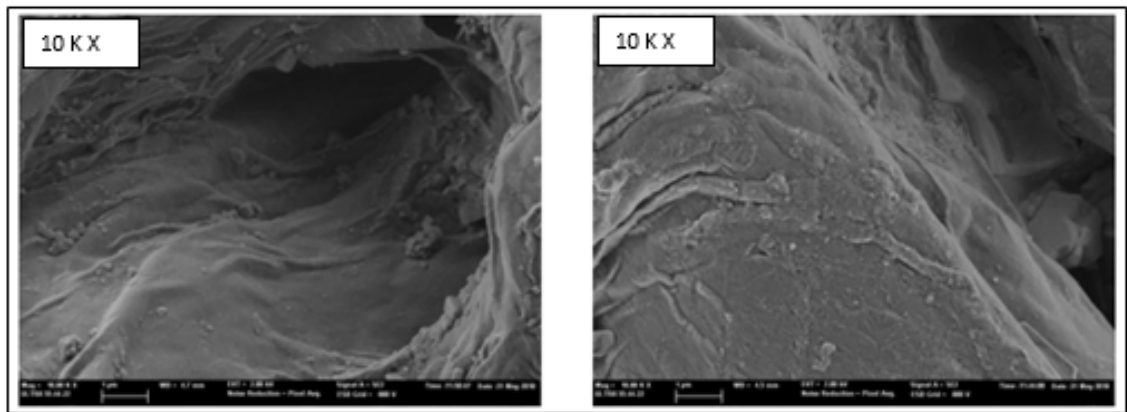


Figura 50. PCL/GO (0,05) tras dos semanas en SBF. La imagen de la izquierda corresponde con la cara inferior de la muestra. La imagen de la derecha corresponde a la cara superior de la muestra.

Finalmente, las muestras de PCL/GO (0,1) presentaban también agrupaciones de sales en ambas caras de la muestra. Ahora bien, en cuanto a la HA, no se encontró en este caso una nucleación por toda la muestra, si bien había zonas concretas donde sí tuvo lugar. Sin embargo, la realidad es que la muestra no presentaba un recubrimiento de HA en general, y las zonas donde la nucleación había tenido lugar eran escasas y reducidas (figura 51):

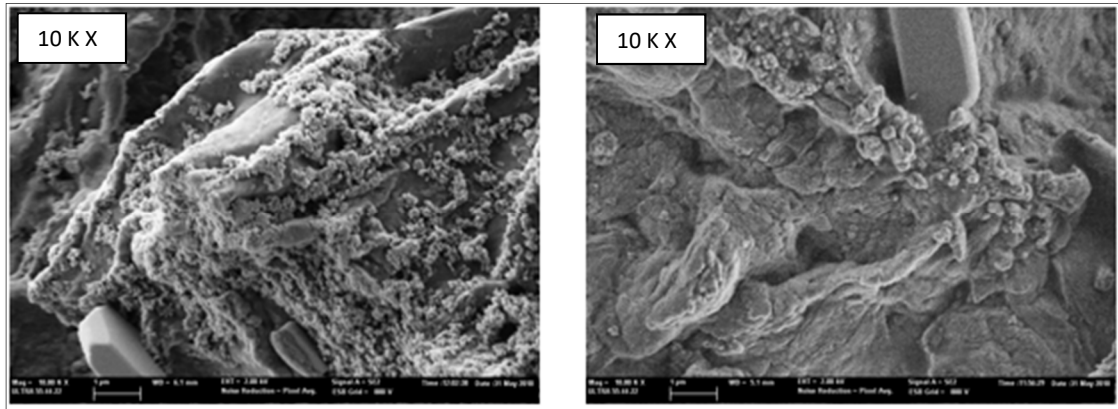


Figura 51. PCL/GO (0,1) tras dos semanas en SBF. La imagen de la izquierda corresponde con la cara inferior de la muestra. La imagen de la derecha corresponde a la cara superior de la muestra.

Tras el estudio de las imágenes de los cuatro tipos de muestra se pueden llegar a dos conclusiones. En primer lugar, que los puntos de nucleación de HA suelen ser grietas o poros en la muestra, es decir, no crece directamente sobre la superficie más externa de la muestra. En segundo lugar, que no todos los poros o grietas presentan dicha deposición. Es más, hay una mayor cantidad de poros que no presentan deposición de HA que de aquéllos que sí la presentan. Y, finalmente, en contra de lo que se creía en un principio, la adición de GO parece no ser incentivo para la nucleación de HA, puesto que los aglomerados de HA eran mucho más comunes en la muestra de PCL pura que en el resto de muestras.

A continuación, también se estudiaron las muestras al microscopio tras cuatro semanas sumergidas en SBF. En este caso, paradójicamente, no aparecieron las aglomeraciones vistas por ejemplo en la PCL que había estado dos semanas únicamente en el SBF. En cuanto a la presencia de sales, también era algo común en estas muestras (puesto que se había seguido el mismo protocolo para lavar las muestras) (imagen 52 a 55):

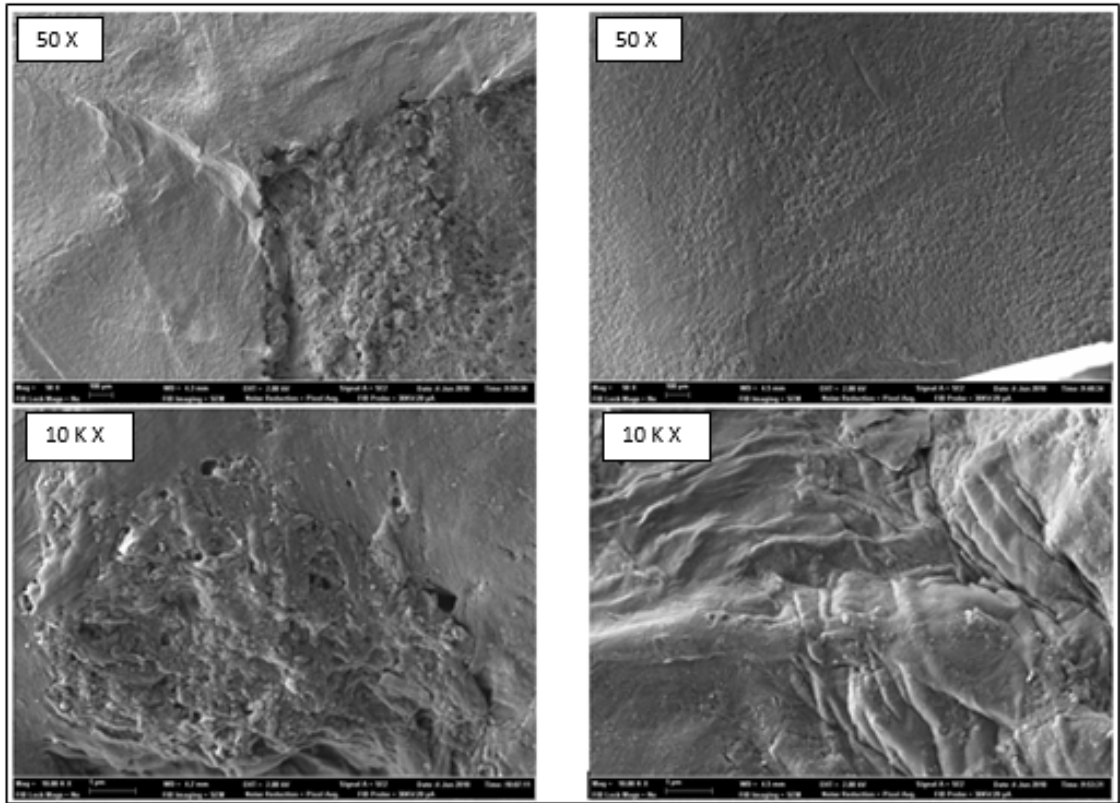


Figura 52. PCL tras cuatro semanas en SBF. Las imágenes de la izquierda corresponden con la cara inferior de la muestra. Las imágenes de la derecha corresponden a la cara superior de la muestra.

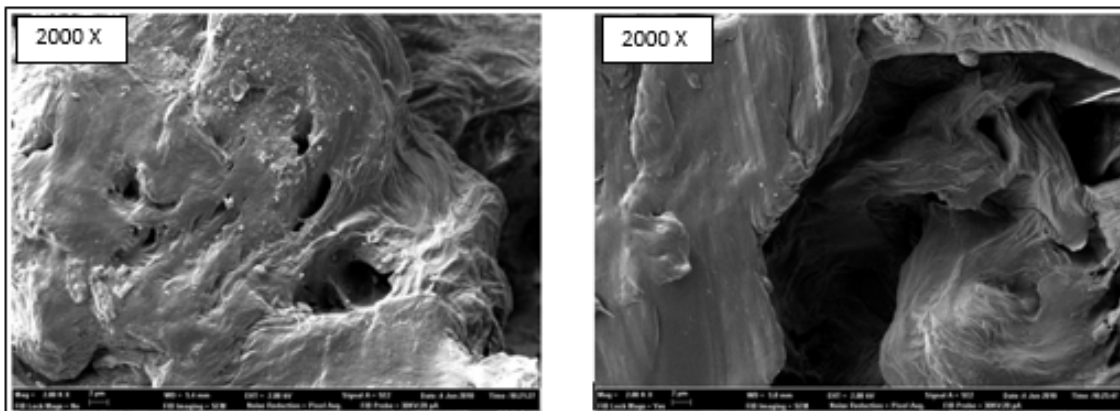


Figura 53. PCL/GO (0,03) tras cuatro semanas en SBF. Las imágenes de la izquierda corresponden con la cara inferior de la muestra. Las imágenes de la derecha corresponden a la cara superior de la muestra.

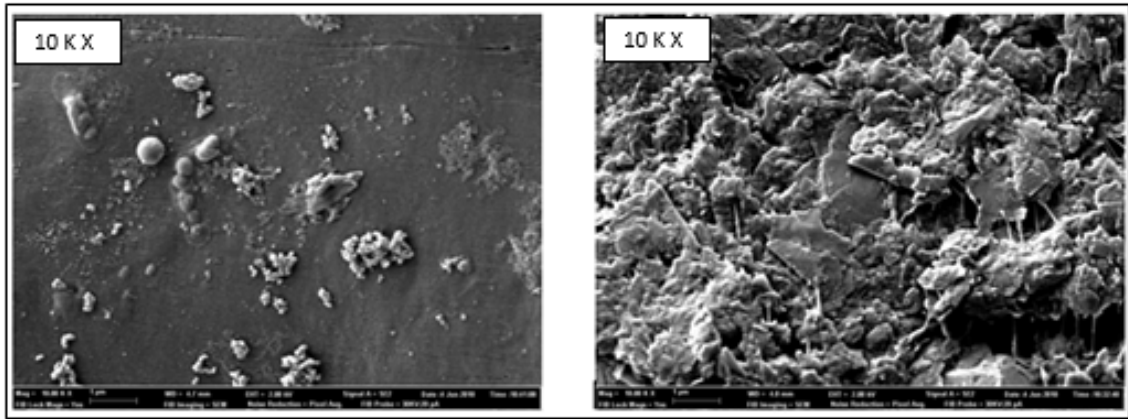


Figura 54. PCL/GO (0,05) tras cuatro semanas en SBF. Las imágenes de la izquierda corresponden con la cara inferior de la muestra. Las imágenes de la derecha corresponden a la cara superior de la muestra.

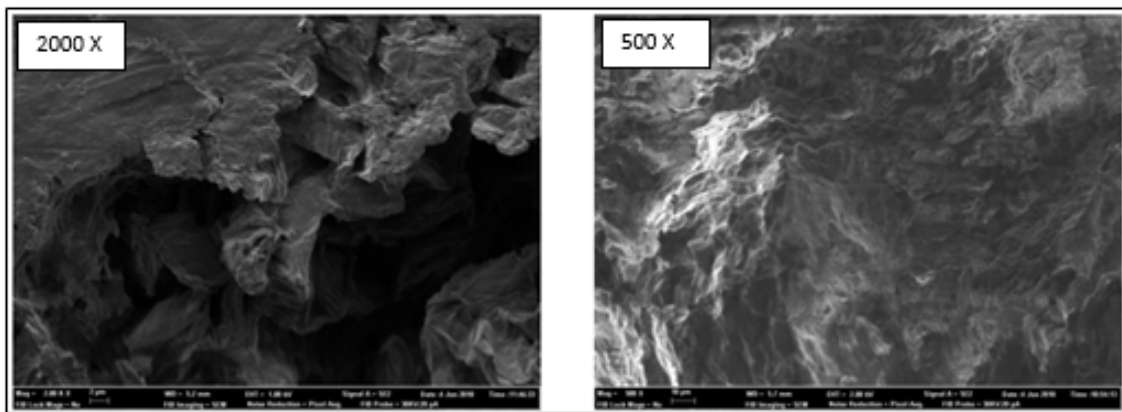


Figura 55. PCL/GO (0,05) tras cuatro semanas en SBF. Las imágenes de la izquierda corresponden con la cara inferior de la muestra. Las imágenes de la derecha corresponden a la cara superior de la muestra.

Tras la observación de las imágenes, se concluye que la formación de HA, contrariamente a lo que se creía en un principio, no ha sido mayor tras cuatro semanas en SBF. Si bien en esta ocasión la presencia de sales es menor, también lo es la presencia de HA. De hecho, es tan reducido el crecimiento de la misma que no hay diferencia entre una composición y otra para la nucleación de HA si permanecen cuatro semanas en SBF, puesto que en los cuatro casos su crecimiento es mínimo.

Ahora bien, la obtención de imágenes de la muestra de PCL/GO (0,1) de la semana 4 en las mismas condiciones que las del resto de muestras resultó imposible, puesto que debido al voltaje la muestra se movía, imposibilitando el enfoque y posterior toma de la fotografía. Por ello, no hubo más remedio que tomar las fotografías a menos aumentos, perdiendo quizá algo de información importante.

Observadas las imágenes, se decidió realizar un análisis para conocer qué elementos estaban presentes en las muestras y poder verificar así si, efectivamente, se trataba de HA (imagen 56 a 63):

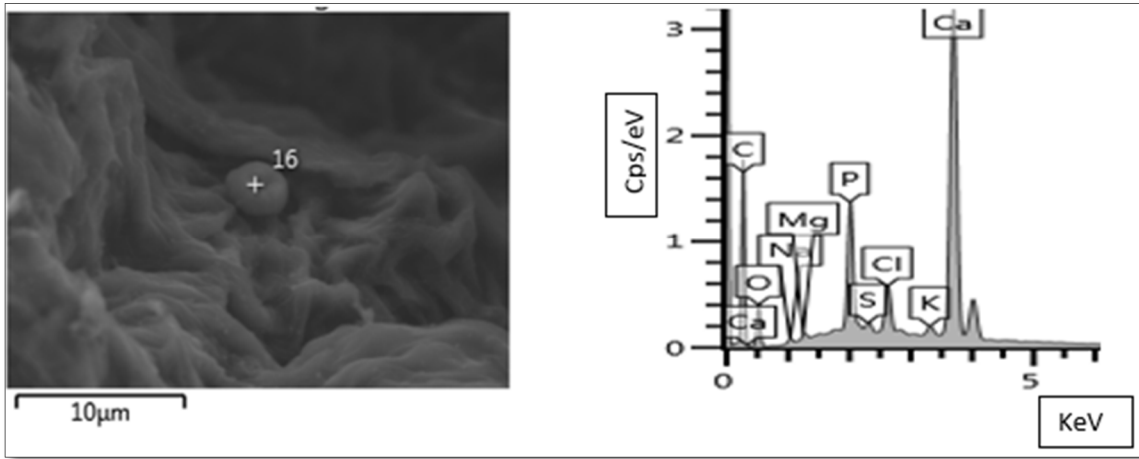


Figura 56. PCL tras dos semanas en SBF.

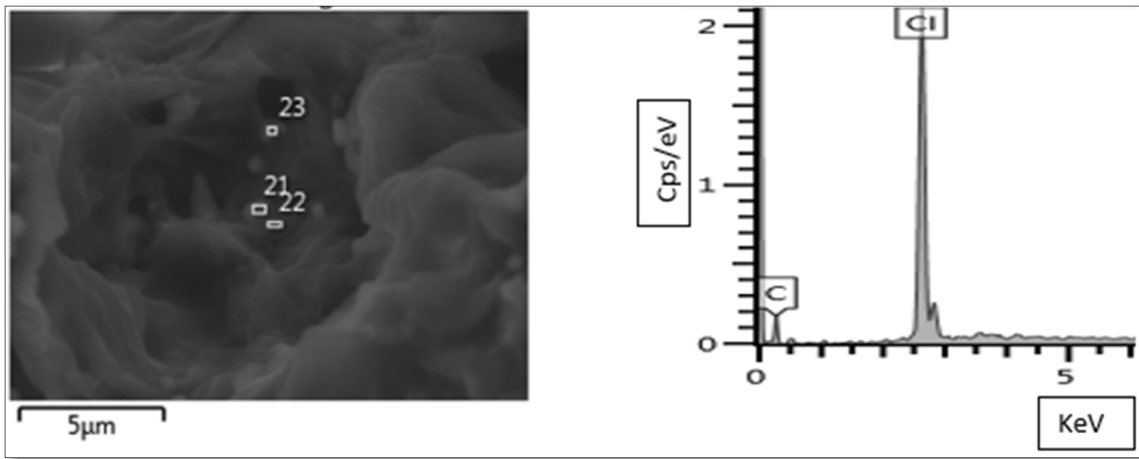


Figura 57. PCL/GO (0,03) tras dos semanas en SBF.

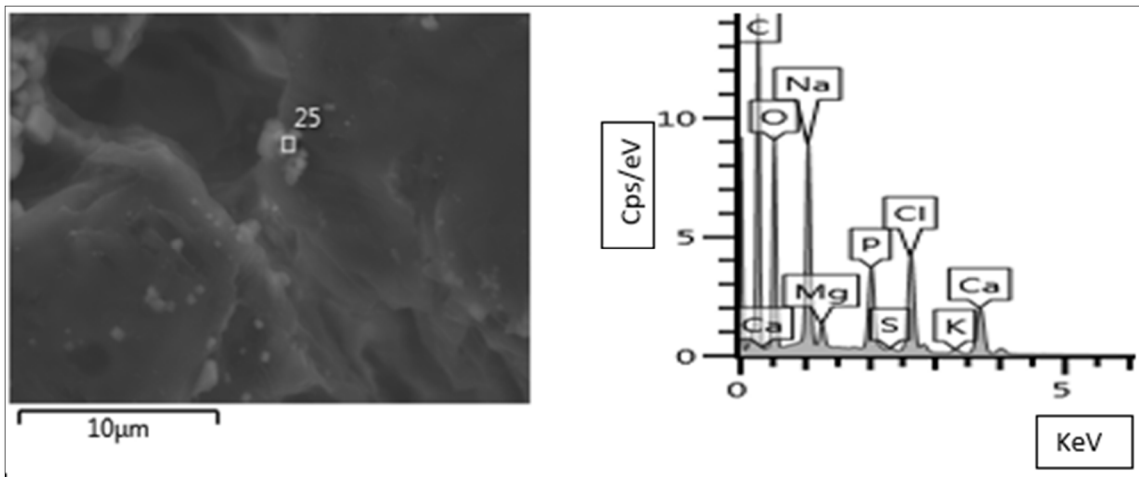


Figura 58. PCL/GO (0,05) tras dos semanas en SBF.

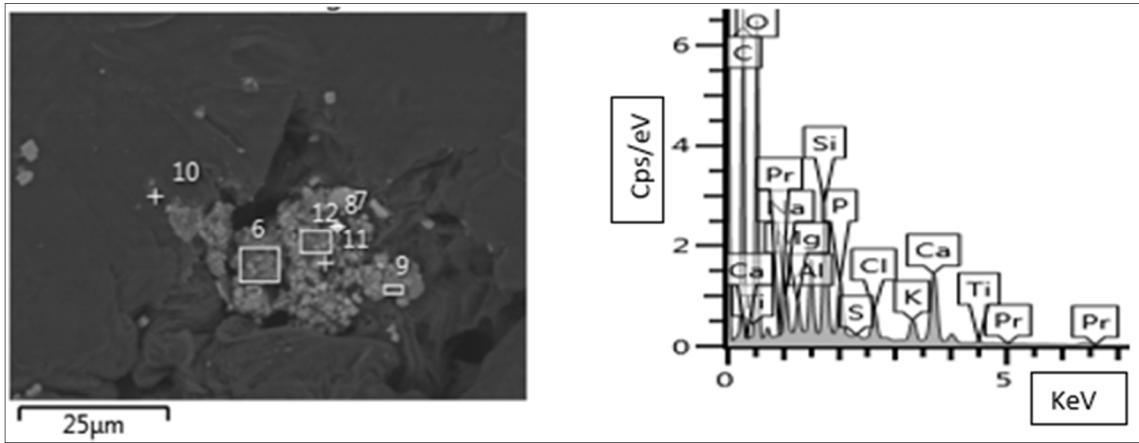


Figura 59. PCL/GO (0,1) tras dos semanas en SBF

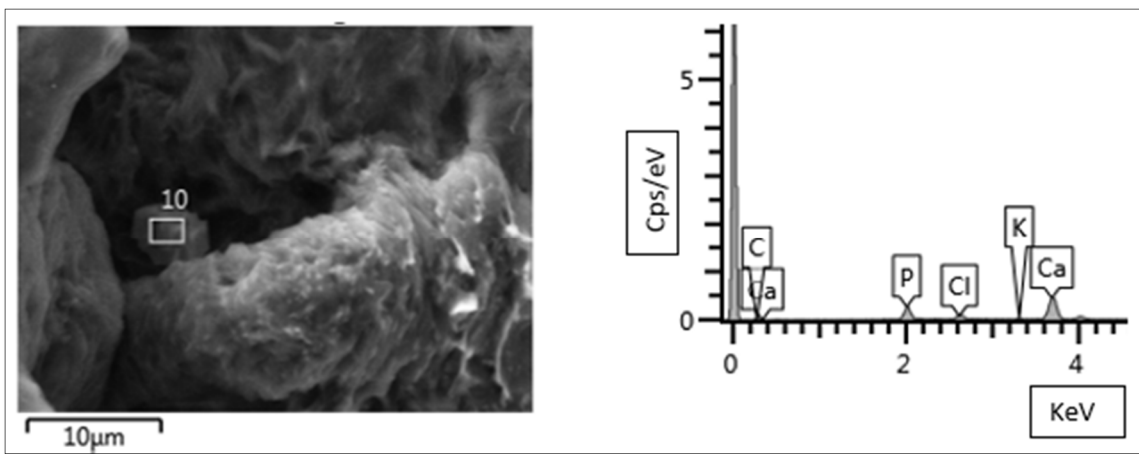


Figura 60. PCL tras cuatro semanas en SBF.

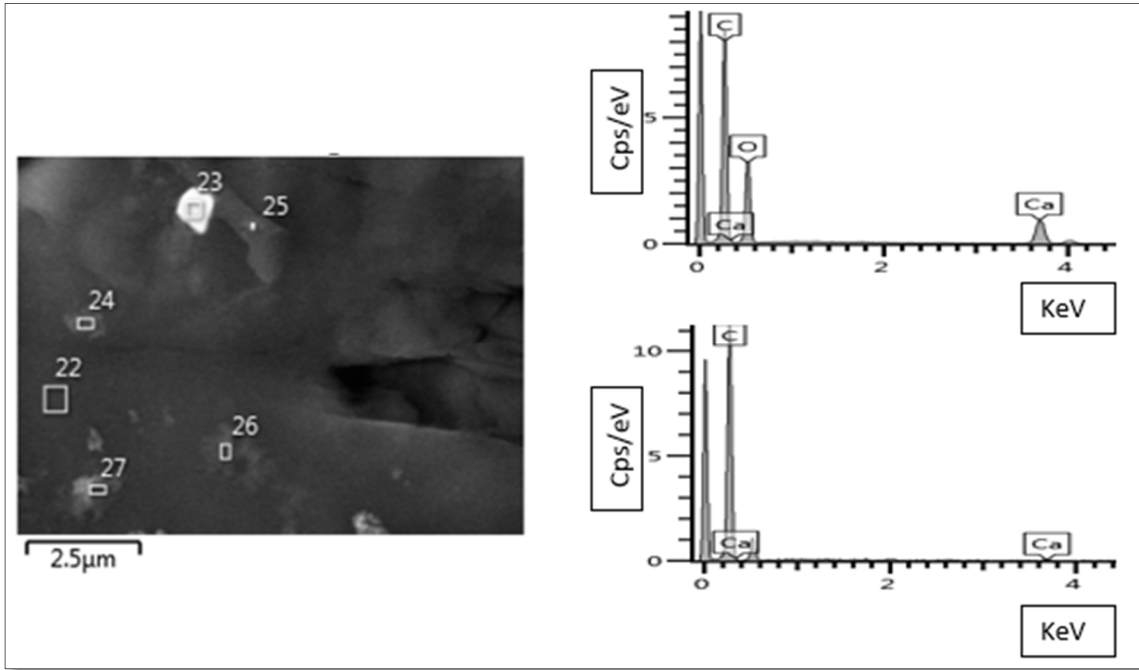


Figura 61. PCL/GO (0,03) tras cuatro semanas en SBF.

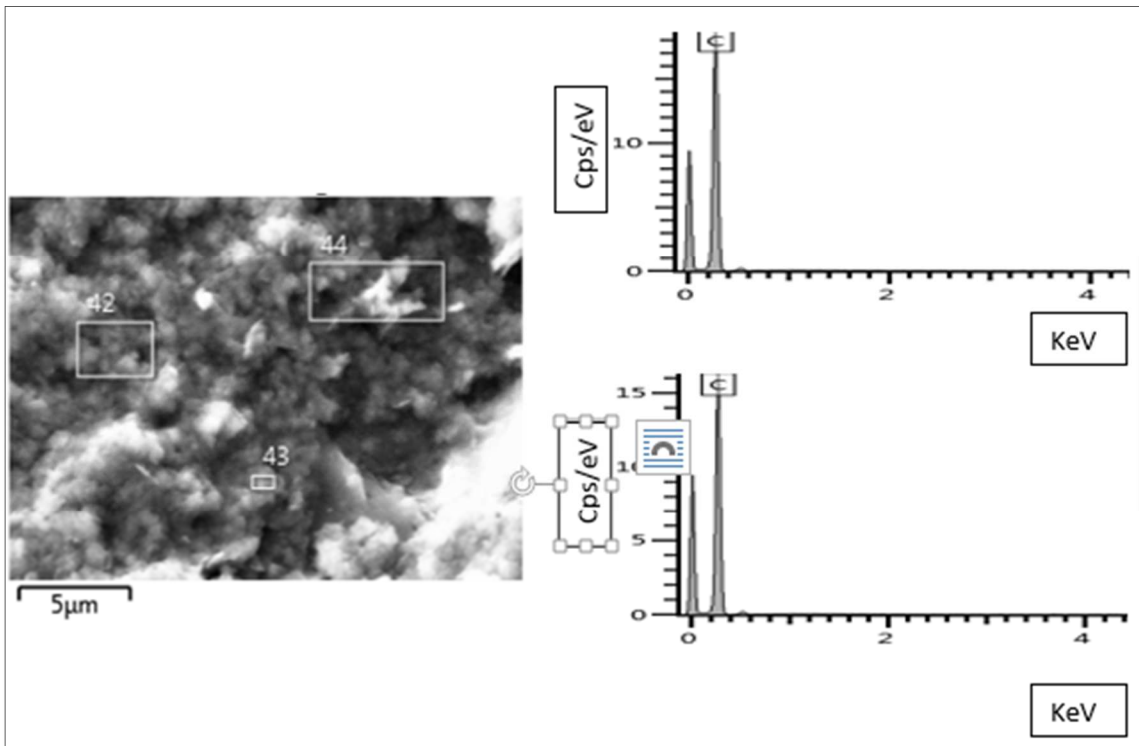


Figura 62. PCL/GO (0,05) tras cuatro semanas en SBF.

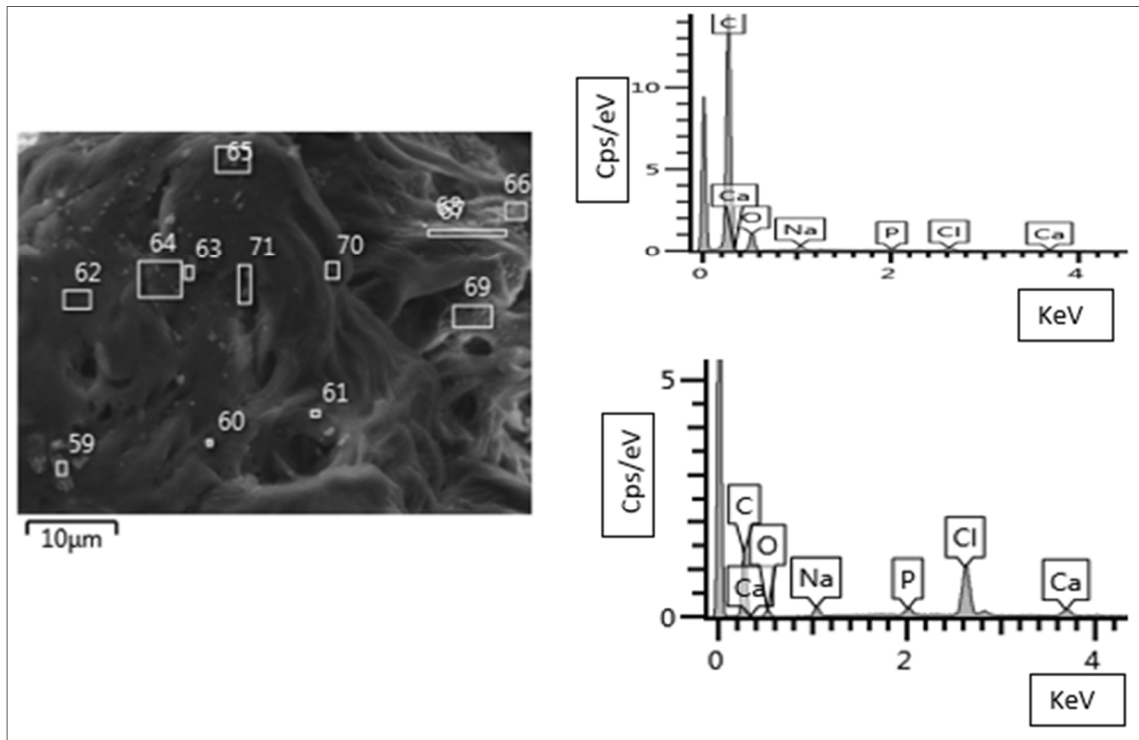


Figura 63. PCL/GO (0,1) tras cuatro semanas en SBF.

Así pues, con estas imágenes se pueden concluir dos cosas. En primer lugar, la HA parece estar en algunos sitios (quizá escasos) concretos de las muestras (figura 56). Sin embargo, tras el análisis de las sustancias puede afirmarse que en la gran mayoría de los casos se trata únicamente de depósitos inespecíficos de sales minerales. Por tanto, a la vista de estos resultados, puede decirse que la nucleación de HA en las muestras es bastante escasa, poco homogénea y dispersa.

5.1.4- Difracción de Rayos X

La última prueba realizada en este trabajo fue la difracción de rayos X. Dado que esta prueba fue realizada posteriormente al FESEM, no se esperaba encontrar grandes diferencias entre las muestras que hubiesen estado sumergidas en SBF y aquéllas que no lo habían estado. Por otro lado, debido a la pequeña cantidad de GO presentes en las mismas tampoco se esperaba observar un pico correspondiente a dicho material. Para analizar la muestra se realizó un barrido desde los cinco hasta los cincuenta grados. En experimentos anteriores similares, en los cuales también se buscaba la nucleación de la HA aunque la composición de las muestras era algo diferente, se utilizaron rayos desde los cinco hasta los cuarenta grados. En esta ocasión, y por no perder posible información importante (que luego resultó no existir), se amplió el rango hasta los 50 grados. Aun así, los picos característicos de la HA pueden ser observados sobre los 26 grados y alrededor de los 33 – 34 grados [19]. Sin embargo, esos diez grados no aportaron información relevante acerca de la composición de la muestra (figura 64 y 65):

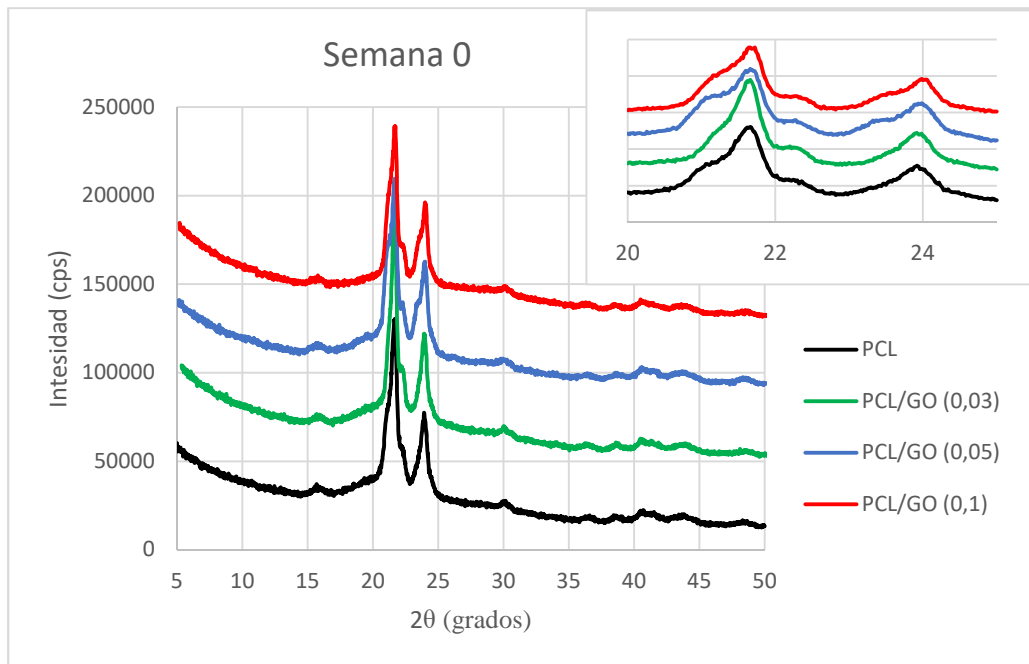


Figura 64. DRX de las muestras de la semana 0

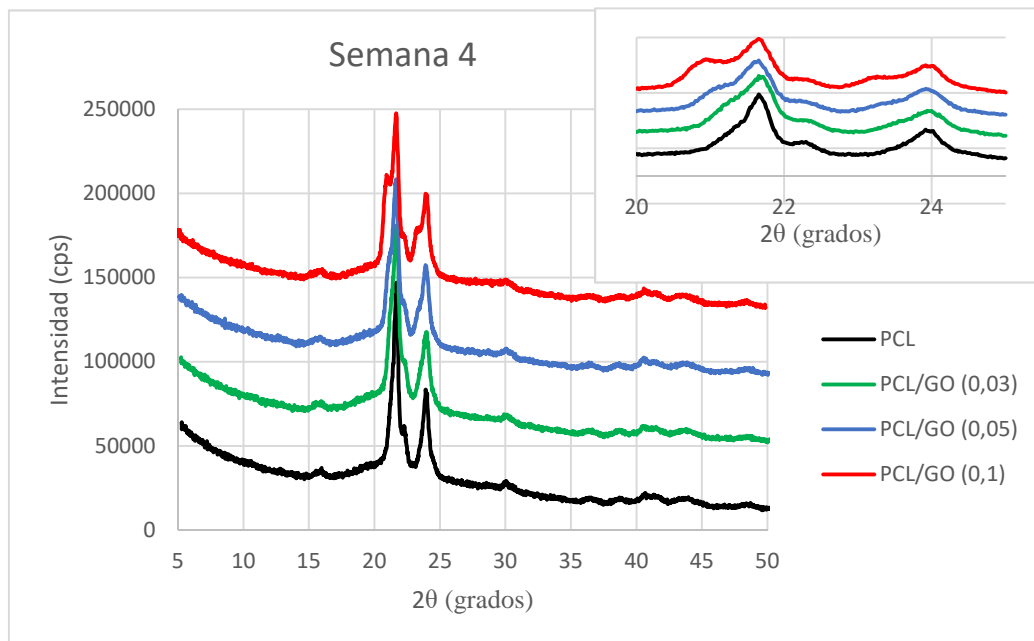


Figura 65. DRX de las muestras de la semana 4

Además de los dos picos característicos de la PCL ($2\theta=21,6^\circ$ y $2\theta=23,8^\circ$, que dan cuenta de la difracción en los planos [1 1 0] y [2 0 0] respectivamente) [20] aparece un nuevo pico a la izquierda del de $21,6^\circ$ característico de la PCL conforme aumenta el contenido en GO de la muestra que, además, se evidencia más en el caso de las muestras que permanecieron cuatro semanas en SBF. Este fenómeno se muestra con mayor claridad en las gráficas detalle de las figuras 65 y 66. Una posible explicación a dicho fenómeno podría ser la siguiente. El GO afecta a

la cristalinidad de la PCL. De hecho, en estudios realizados paralelamente a este trabajo se observó que las partículas de GO internadas en la estructura de la PCL actúan a modo de agentes nucleantes, siendo pues, puntos de inicio de formación de cristales. Así, se apreció cómo aumentaban tanto la velocidad de formación de esos cristales como el tamaño de los mismos. Por tanto, podría afirmarse que la cristalinidad de las muestras varía de acuerdo con el contenido de GO en las mismas, lo que provocaría, a la postre, la aparición de ese pico más fácilmente reconocible sobre todo en el caso de la muestra de PCL/GO (0,1).

Sin embargo, tal y como se ha venido haciendo a lo largo de este trabajo, es necesario la comparación del comportamiento de las muestras de acuerdo a su tiempo de sumergimiento en el SBF. Para ello, se obtuvieron las siguientes gráficas (figuras 66 a 69):

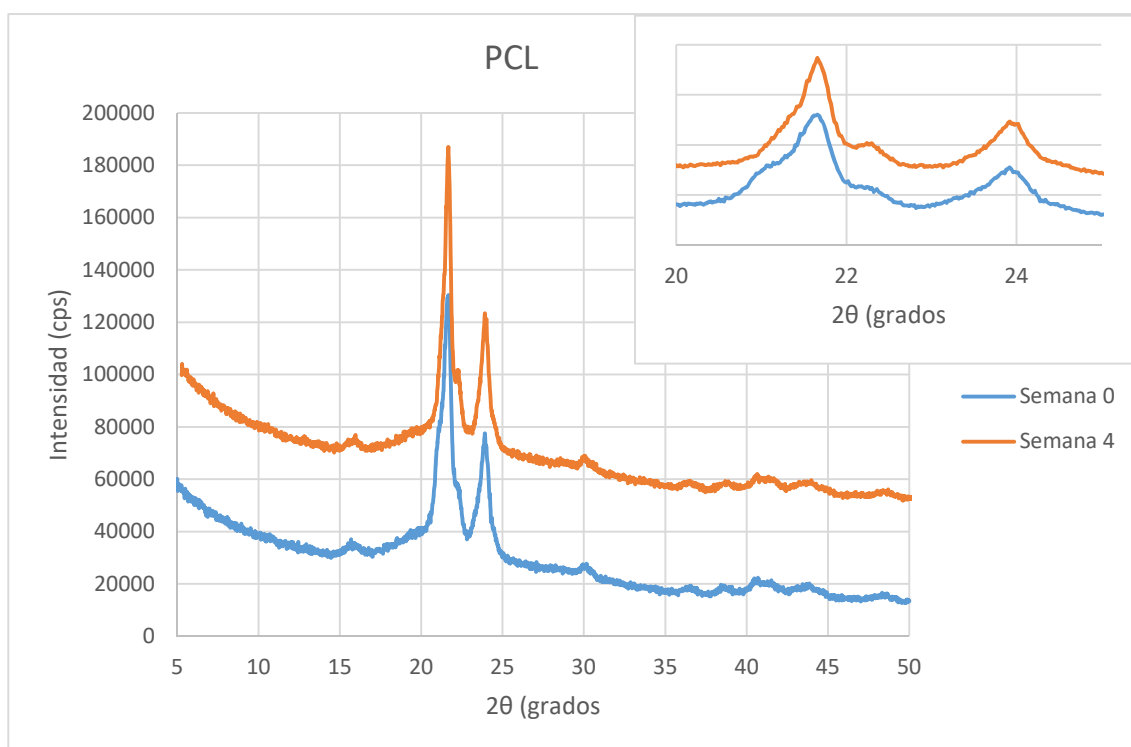


Figura 66. Comparativa de la PCL en la semana 0 respecto a la semana 4

En el caso de la PCL, los espectros de la DRX no presentan a simple vista prácticamente diferencias entre las muestras de PCL pura y aquellas que habían permanecido 4 semanas sumergidas en SBF. La diferencia quizá más evidente aparezca a la izquierda del primer pico característico de la PCL, donde en el caso de la semana 0 aparece un “hombro” que no aparece en la muestra de la semana 4. Sin embargo, y tal y como se esperaba, no aparecen en ningún caso los picos característicos de la HA.

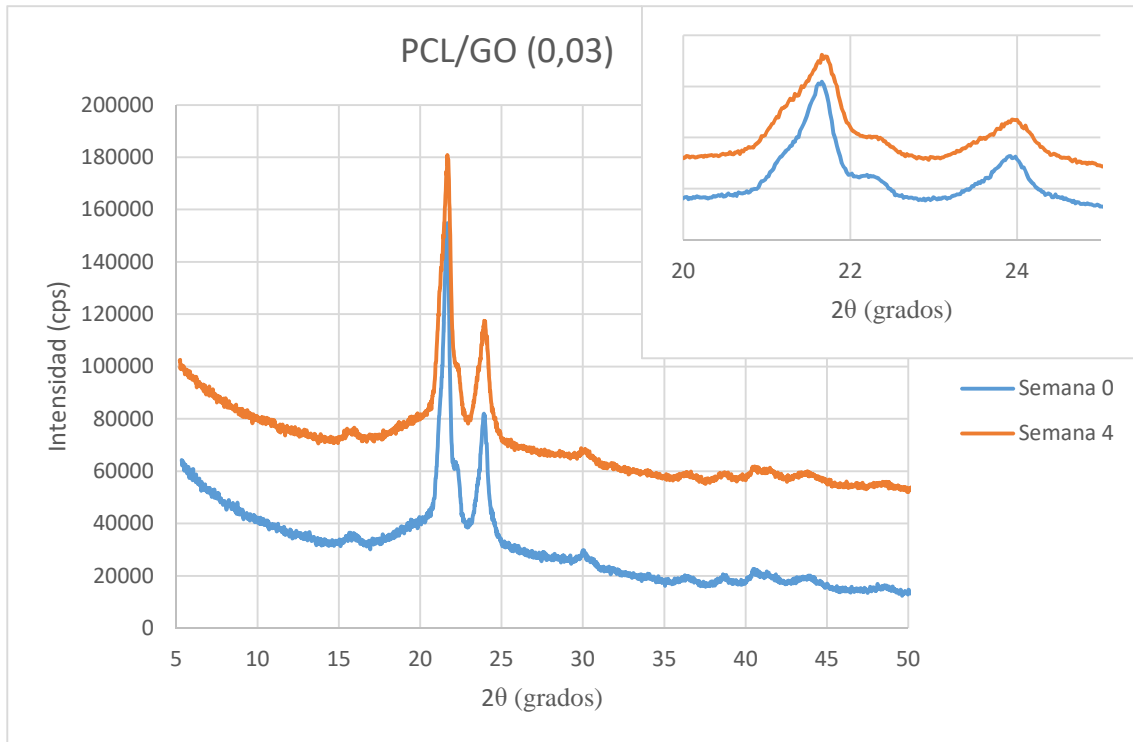


Figura 67. Comparativa de la PCL/GO (0,03) en la semana 0 respecto a la semana 4

En este caso, tal y como ya ocurría con la PCL, no aparecen los picos característicos de la HA debido a la escasa cantidad de la misma presente en la muestra. Por otro lado, llama la atención que el “hombro” que en la DRX de la PCL sí se formaba aquí no aparece (y, de hecho, será el único caso, pues en el resto de muestras dicho “hombro” aparece). Además, en este caso, el “hombro” es algo más evidente en la muestra que había permanecido sumergida en SBF 4 semanas que en la que no había sufrido tan siquiera el pretratamiento.

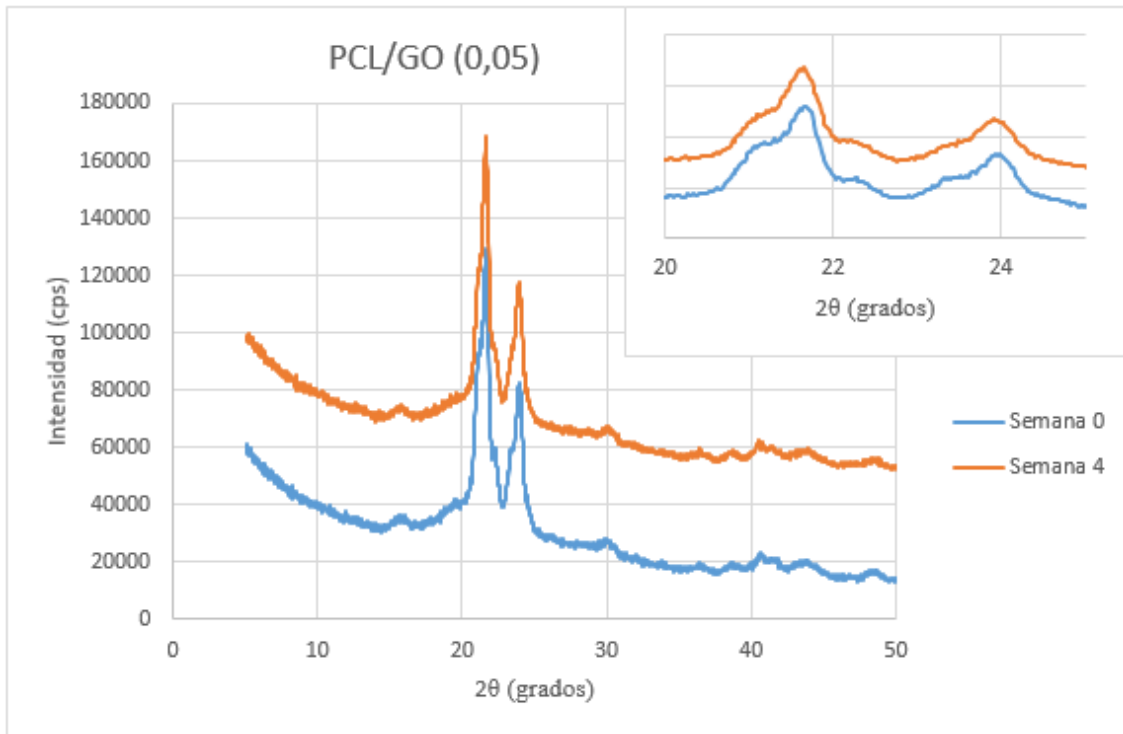


Figura 68. Comparativa de la PCL/GO (0,05) en la semana 0 respecto a la semana 4

De nuevo, en esta ocasión no aparecen los picos característicos de la HA. Por otro lado, el ya mencionado “hombro” que ya ha aparecido con anterioridad aquí se hace todavía más evidente. Además, parece haber alguna ligera diferencia en la forma de dicho “hombro” entre la muestra correspondiente a la semana 4 y la correspondiente a la semana 0 (parece que crezca algo más rápido en este último caso además de presentar una especie de “meseta” que finalmente termina con la aparición del pico característico de la PCL).

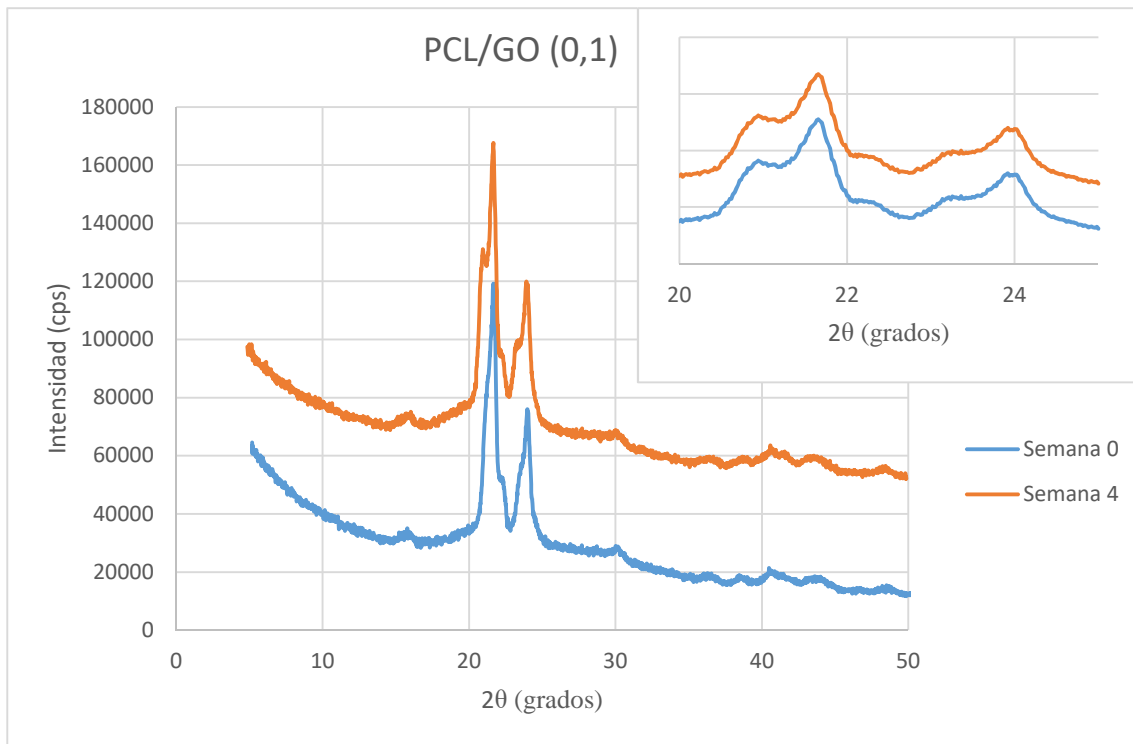


Figura 69. Comparativa de la PCL/GO (0,1) en la semana 0 respecto a la semana 4

Finalmente, en el caso de las muestras con mayor contenido en GO tampoco aparecen los picos correspondientes a la HA. Además, el “hombro” es más evidente tanto en la muestra de la semana 0 como en la de la semana 4. Y, también relacionado con el “hombro”, la meseta que ya aparecía en la muestra de la semana 0 de la muestra de PCL/GO (0,05) aparece también aquí, si bien en este caso no aparece una diferencia tan evidente en cuanto a su forma se refiere como sí ocurría en el caso anterior.

Así pues, tras la comparación de las muestras según el tiempo sumergidas en SBF se aprecia que el ya varias veces mencionado pico “inesperado” presenta algunas muy ligeras diferencias. Estas ligeras diferencias se aprecian con algo más de claridad en el caso de las muestras con mayor contenido en GO (figura 69), si bien la diferencia es prácticamente inexistente.

Por tanto, a la vista de estos resultados, puede concluirse que la aparición de un pico extraño e inesperado formado a la izquierda del pico característico de la PCL y muy cercano a él puede explicarse por la adición del GO, puesto que el sumergimiento o no en SBF no aporta diferencias al respecto. Así, y tal y como ya se ha mencionado con anterioridad, parece lógico afirmar que la adición de pequeñas cantidades de GO afecta a la cristalinidad de la muestra.

Para corroborar dicha hipótesis se estudió también la cristalinidad de cada una de las muestras con los datos obtenidos con esta prueba. Para ello, se utilizó la sencilla ecuación:

$$\text{Grado de cristalinidad} = \frac{\Sigma S_{\text{cristalinos}}}{\Sigma S_{\text{total}}}$$

Ecuación 6

Donde S es el área bajo el pico.

Aplicando dicha ecuación a cada una de las muestras, se obtiene la siguiente tabla, que es representada a continuación (tabla 29 y figura 70):

Tabla 29. Grado de cristalinidad de cada muestra.

Grado de cristalinidad		
	Semana 0	Semana 4
PCL	0,6743	0,5728
PCL/GO (0,03)	0,4892	0,556
PCL/GO (0,05)	0,7011	0,7294
PCL/GO (0,1)	0,7011	0,7932

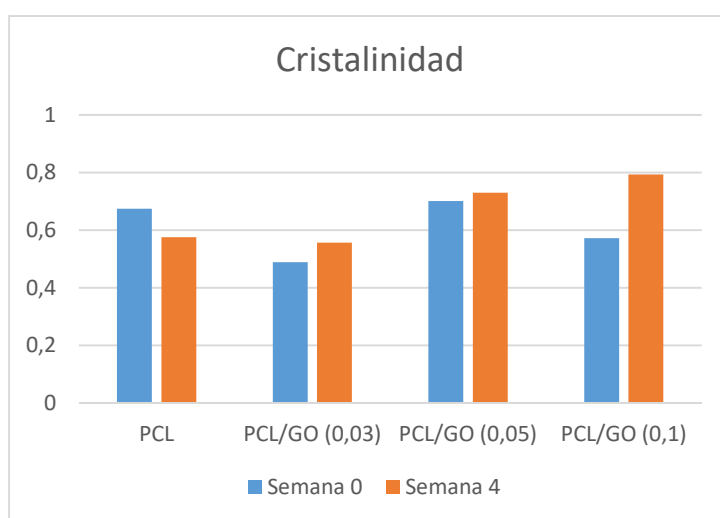


Figura 70. Comparativa del grado de cristalinidad de cada muestra, tanto en la semana 0 como en la semana 4

A la vista de los resultados obtenidos tanto en la tabla como observados en la gráfica, es evidente que no existe una tendencia clara en la semana 0 que explique un aumento de la cristalinidad, mientras que en las muestras de la semana 4 sí parece haber una mínima tendencia.

Sin embargo, a pesar de los resultados obtenidos en esta prueba, la muestra de PCL/GO (0,1) presentaba una fragilidad muy superior al resto de muestras (lo que, por ejemplo, hacía prácticamente imposible su troquelación), por lo que, y a pesar de la figura 48, podría afirmarse que la cristalinidad sí se ve afectada por la adición de las partículas de GO a la matriz polimérica de PCL.

6- Conclusiones

En este trabajo se han preparado híbridos formados por un polímero biodegradable, semicristalino, PCL, y una fase mineral de GO. Para preparar las muestras se ha disuelto el polímero en un buen solvente, THF, y se ha dispersado el GO en el mismo solvente. Tras la homogeneización en baño de ultrasonidos se han mezclado ambos componentes y se ha procedido a la evaporación del solvente. Se han preparado híbridos con diferentes proporciones del componente mineral: 0; 0,03; 0,05 y 0,1 % en masa. Los materiales así formados se han troquelado en muestras de 5 mm de diámetro y, aproximadamente 1 mm de espesor para su posterior análisis.

Aunque se ha tratado de obtener muestras homogéneas, la inspección visual de las muestras indica que esto no se ha logrado ya que se observa una cara más lisa y oscura (la expuesta al aire) que la otra, en contacto con el molde de teflón. Por otra parte, la muestra con mayor contenido en GO era claramente más frágil que el resto de muestras, siendo muy difícil de troquelar. Este resultado había sido obtenido previamente en otros trabajos del CBIT. Uno de esos trabajos (no publicado) se analizó la formación de cristales de PCL, bajo el microscopio óptico, tras la fusión del híbrido y su posterior enfriamiento. El resultado que se observó es que el GO juega el papel de agente nucleante para la formación de los cristales de PCL. Cuando el contenido de GO aumenta, además de las láminas de GO que forman el núcleo de los cristales, otros fragmentos se van acumulando en las fronteras de los granos, provocando imperfecciones, lo que, a su vez, provocaría la fragilidad de la muestra.

Por otro lado, la adición del GO a la matriz de PCL también afecta al comportamiento de las muestras tanto en el ángulo de contacto como en el contenido de agua en equilibrio. Sin embargo, no se ha encontrado una tendencia en el comportamiento de las muestras conforme crecía su contenido en GO. De hecho, resulta llamativo cómo las muestras podrían clasificarse, según su comportamiento, en dos grupos básicamente: por un lado, las muestras de PCL y las de PCL/GO (0,05); mientras que por el otro lado, las muestras de PCL/GO (0,03) y las de PCL/GO (0,1).

Por lo que respecta a las pruebas de TGA y DRX, las diferencias entre unas muestras y otras no eran tan evidentes. De hecho, no se observaron grandes diferencias entre las muestras que habían sido tratadas y sumergidas en SBF respecto a aquellas que no lo habían sido, así como tampoco se encontraron grandes diferencias entre las muestras conforme crecía el contenido en GO.

Ahora bien, el principal objetivo de este trabajo era comprobar si el híbrido de PCL/GO podría albergar la nucleación de HA y, además, en caso de que esto tuviese lugar, estudiar cuál sería el papel del GO en dicho proceso. Sin embargo, este proceso no tuvo lugar. Las diferentes pruebas corroboraron que la nucleación de HA fue tremendamente escasa, casi inexistente. De hecho, la muestra que presentó una mayor cantidad de nucleación de HA fue la PCL pura (que de hecho fue la única muestra de la que puede afirmarse que la nucleación de HA fue relativamente exitosa). Por tanto, es evidente que este híbrido no representa una buena opción para conseguir la nucleación de HA y, por tanto, su hipotética futura aplicación en el campo de la ingeniería tisular centrada en la regeneración ósea quedaría en principio descartada. De hecho, lo que parece que tuvo lugar fue una deposición de sales inespecíficas. Por tanto, si bien la nucleación de HA sí tuvo lugar en algunas zonas concretas de algunas muestras, no se cumplió el objetivo de lograr un gran recubrimiento de HA en toda la muestra de manera uniforme.

Aunque en este trabajo no se ha podido concluir que la presencia de GO favorezca el proceso de nucleación de la HA, la utilización de materiales híbridos en las aplicaciones de ingeniería tisular, en particular en las de regeneración ósea sigue siendo interesante. En diversos trabajos se ha comprobado que la adición de una fase mineral bien dispersa juega un papel de refuerzo mecánico del material polimérico.

En caso de que se considerase importante el pretratamiento del material híbrido para formar una capa superficial de HA, se podría recurrir a varias estrategias: variando la concentración de iones se consigue la deposición de HA en pocas horas[21], por ejemplo, o bien activando la superficie mediante un tratamiento de plasma [19].

7- Especificaciones técnicas

A continuación se ofrece una guía de los dispositivos utilizados a lo largo de la realización del presente trabajo.

7.1- Aparatos

7.1.1- Balanza analítica de precisión



Nombre del equipo	Balanza analítica de precisión
Marca y modelo	XS105DU
Capacidad máxima de pesado	120g/41g
Legibilidad	0.1 mg; 0.01 mg
Repetibilidad	0.02 mg (5g)
Ajuste	Interno / FACT
Dimensiones del plato de pesaje	78 mm
Tiempo de estabilización	1.5 s
Repetibilidad (típica)	0.01 mg
Linealidad \pm	0.2 mg
Dimensiones (alto x ancho)	322 mm x 263 mm

7.1.2- Estufa de precisión universal



Nombre del equipo	Estufa de precisión universal
Marca y modelo	DIGITRONIC 1451 referencia: 2005161
Dimensiones (alto x ancho x largo) (cm)	70 x 95 x 72
Peso (kg)	74
Capacidad	145
Dimensiones internas (alto x ancho x largo) (cm)	50 x 58 x 50
Consumo	2000
Regulación de temperatura	Digital con microprocesador
Distribución del calor	Aire forzado
Temperatura máxima (°C)	250
Temperatura mínima (°C)	Temperatura ambiente + 5°C
Estabilidad	± 0.25°C a 100°C
Homogeneidad	± 1 ° C a 100 ° C
Error de punto de ajuste	± 2%, a temperatura de trabajo
Resolución	1 ° C
Tiempo para alcanzar el punto de ajuste 100 ° C (min)	17
Tiempo de recuperación (min)	10
Renovaciones de aire por hora	12
Suministro de energía eléctrica	115-230 V 50-60Hz

7.1.3- Baño ultrasónico



Nombre del equipo	Baño ultrasónico
Marca y modelo	USC 600 TH
Capacidad (L)	5.4
Potencia ultrasónica ef. (W)	120
Potencia de calentamiento (W)	400
Dimensiones internas (ancho x profundidad x altura) (cm)	300 x 150 x 150
Dimensiones externas (ancho x profundidad x altura) (cm)	325 x 175 x 295
Categoría no.	142-0091
Frecuencia (kHz)	45
Calentador de tanque	20 °C a 80 °C
Temporizador digital (min)	1 - 99

7.1.4- Bomba de vacío de aceite



Nombre del equipo	Bomba de vacío de aceite
Marca y modelo	Vacuubrand de SIGMA ALDRICH - RZ 2
Límite de tasa de flujo de vacío	2.2 - 2.5 m ³ /h
Último vacío (parcial) sin lastre de gas (mbar)	4 x 10 ⁻⁴
Vacío definitivo (total) sin lastre de gas (mbar)	2 x 10 ⁻³
Máximo vacío (total) con lastre de gas (mbar)	1 x 10 ⁻²
Dimensiones (largo x ancho x alto) (mm)	308 x 122 x 160

7.1.5- Desecador



Nombre del equipo	Desecador
Marca y modelo	Vacuo-Temp 4000474
Vacío máximo	10-2 mmHg
Volumen	3 L
Diámetro de la placa calefactora	23,5 cm
Dimensiones (alto x ancho x largo)	17 x 28 x 34 mm
Consumo	540 W
Peso	9 kg
Estabilidad	$\pm 1^{\circ}\text{C}$
Precisión	$\pm 1^{\circ}\text{C}$

7.1.6- Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM)



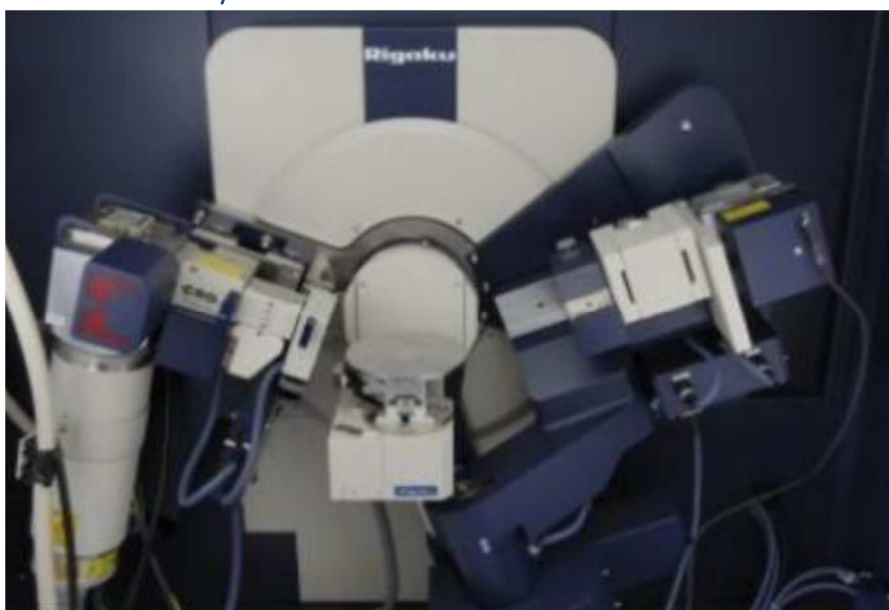
Nombre del equipo	Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM)
Resolución	1 nm a 15 kV 1,7 nm a 1 kV 4 nm a 0,1 kV
Magnificación	12-900000 x
Estabilidad del emisor	0,2%/h
Aceleración del voltaje	0,1 – 30 kV
Sonda de corriente	4 pA – 10 nA
Cámara	330 nm (∅) x 720 nm (h)
Resolución de imágenes	3072 x 2304 px
Filtrado de tensión de red	0 a 1500 V

7.1.7- Equipo de TGA



Nombre del equipo	Analizador termogravimétrico
Rango de T (K)	RT hasta 1873
Precision (K)	±0,3
Tiempo de calentamiento (min)	10 (RT hasta 1873 K)
Tiempo de enfriamiento (min)	27 (RT hasta 1873 K)
Tiempo de enfriamiento con hielo (min)	13 (1373 a 373 K)
Velocidad de calentamiento (K/min)	100
Velocidad de enfriamiento (K/min)	-20 (>473K)
Volumen de muestra (μL)	<900

7.1.8- Difractómetro de rayos X



Nombre del equipo	Difractómetro de rayos X	
Marca y modelo	Rigaku Ultima IV	
Generador de rayos X	Salida nominal máxima (kW)	3
	Tensión nominal del tubo (mA)	20-60
	Corriente nominal del tubo	2.0-6.0
	Objetivo	Cu (otros: opcional)
	Tamaño de enfoque (mm)	0.4 x 12 (otros: opcional)
Goniómetro	Modo de escaneo	θ_s / θ_d acoplado o θ_s, θ_d independiente
	Radio del goniómetro (mm)	285
	2θ rango de medición	2θ rango de medición
	Tamaño de paso mínimo	0.0001 °
Detector	Detector	Contador de centelleo
Dimensiones	H x W x D (mm)	1600 x 1100 x 800
	Altura de muestra (mm)	1050

8- Presupuesto

Personal del TFG					
Número	Descripción	Unidad	Precio unitario (€)	Cantidad	Coste total (€)
1	Directora del proyecto	h	24	40	960
2	Técnico de laboratorio	h	12	10	120
3	Ingeniero biomédico	h	18	250	4500
SUBTOTAL					5580

Maquinaria				
Número	Descripción	Precio unitario (€)	Cantidad	Coste total (€)
1	Balanza analítica de precisión	0,2	7	1,4
2	Estufa de precisión universal	0,08	672	53,76
3	Baño ultrasónico	0,11	3	0,33
4	Bomba de vacío en aceite	0,19	1	0,19
5	Desecador	0,1	192	19,2
6	TGA	0,95	18	17,1
7	FESEM	25	9	225
8	Difractómetro de rayos X	15	4	60
9	pHmetro	0,12	2	0,24
SUBTOTAL				377,22

Materiales				
Material de laboratorio				
Número	Descripción	Precio unitario (€)	Cantidad	Coste total (€)
1	Vial de vidrio (20 mL)	0,1	160	16
2	Cristalizador de tefón	22	4	88
3	Vaso de precipitado (100 mL) de vidrio borosilicatado	5,4	5	27
4	Cuchara de acero inoxidable	4,95	1	4,95
5	Pinzas de acero inoxidable	4,4	3	13,2
6	Bote ISO 100 mL	11,05	8	88,4
7	Barra de agitación magnética	1,43	1	1,43
8	Bote ISO 1L	6,99	5	34,95

9	Pipeta Pasteur 1000 µL	11,5	1	11,5	
10	Cápsulas de aluminio (TGA)	2,85	7	19,95	
11	Plataforma de aluminio	5,1	1	5,1	
12	Papel secante	0,05	40	2	
13	Parafilm	38	0,3	11,4	
14	Cutter	1,3	3	3,9	
15	Placa Petri	1,33	5	6,65	
16	Aguja	0,1	2	0,2	
17	Martillo	15	1	15	
18	Troquel (5 mm)	1,55	1	1,55	
19	Base de troquelación	20	1	20	
20	Cinta adhesiva	1	1	1	
21	Pinza metálica con tres puntos de anclaje	7,32	2	14,64	
22	Pie de rey	14,12	1	14,12	
23	Jeringuilla 10 mL	0,36	5	1,8	
24	Tubos de la centrífuga (15 mL)	68,607	0,32	21,95	
SUBTOTAL				424,70	
Material de protección individual					
Número	Descripción	Precio unitario (€)	Cantidad	Coste total (€)	
1	Máscara de gases tipo V de protección de vías respiratorias	40	1	40	
2	Guante de protección térmica	4,21	2	8,42	
3	Bata de laboratorio (algodón)	15,15	1	15,15	
4	Caja de guantes de nitrilo	7	1	7	
5	Máscara contra el polvo	10	1	10	
6	Gafas de laboratorio	8	1	8	
SUBTOTAL				88,57	
Reactivos					
Número	Descripción	Unidad	Precio unitario (€)	Cantidad	Coste total (€)
1	PCL	g	7,84	48	376,32
2	Óxido de grafeno	g	58	0,2	11,6
3	Acetona	L	70,3	0,5	35,15
4	Etanol	L	70,3	0,5	35,15
5	THF	L	154,88	0,0768	11,9

6	NaCl	g	44,63	0,008035	0,36
7	NaHCO ₃	g	32,07	0,000355	0,01
8	KCl	g	81	0,000255	0,02
9	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	g	204,25	0,000231	0,05
10	MgCl ₂ ·6H ₂ O	g	199,65	0,00031	0,06
11	1M HCl	L	103,94	0,0156	1,62
12	CaCl ₂	g	212	0,000292	0,06
13	Na ₂ SO ₄	g	53,85	0,000163	0,01
SUBTOTAL					472,31
SUBTOTAL (materiales)					985,57

TOTAL					6942,79 (€)
-------	--	--	--	--	-------------

9- Bibliografía

- [1] J. F. A. Barreto, "Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos : una introducción Osseous Regeneration through Tissue Engineering :," *Rev. Estud. Transdiscipl.*, vol. 1, no. 2, pp. 98–109, 2009.
- [2] R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, *Principles of Tissue Engineering*. 2018, , E. Science
- [3] F. J. O. Brien, "Biomaterials & scaffolds Every day thousands of surgical procedures are performed to replace," *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011.
- [4] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," vol. 32, pp. 762–798, 2007.
- [5] H. Castro and O. E. Ledea, "Determinación de la Bioactividad in vitro de la Polipapatita," vol. 12, no. January 2011, 2016.
- [6] S. Sayyar, "The Development of Graphene / Biocomposites for Biomedical Applications," *UOW thesis*, no. October, 2014.
- [7] T. K. Dash and V. B. Konkimalla, "Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review," *J. Control. Release*, vol. 158, no. 1, pp. 15–33, 2012.
- [8] M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, "The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 10, pp. 1217–1256, 2010.
- [9] J. Song, H. Gao, G. Zhu, X. Cao, X. Shi, and Y. Wang, "The preparation and characterization of polycaprolactone/graphene oxide biocomposite nanofiber scaffolds and their application for directing cell behaviors," *Carbon N. Y.*, vol. 95, pp. 1039–1050, 2015.
- [10] W. S. Hummers and R. E. Offeman, "Preparation of Graphitic Oxide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 80, no. 6, p. 1339, 1958.
- [11] A. Echavarría, M. E. Londoño, and F. De la Calle, "Características Cristaloquímicas de La Hidroxiapatita Sintética Tratada a Diferentes Temperaturas," *Rev. EIA*, no. 5, pp. 109–118, 2006.
- [12] J. A. Rivera, C. H. Riaño, A. Echavarría, and P. A. Monsalve, "Injertos óseos - Nueva alternativa . Fase III . Obtención , caracterización y evaluación de Hidroxiapatita Sintética y el compuesto de Hidroxiapatita Sintética porosa – Proteínas Morfogenéticas Óseas en un modelo experimental Lapino," *Rev Col Cienc Pec Vol.*, vol. 17, no. April, pp. 20–28, 2004.
- [13] R. La, "Ángulo de contacto.", online: <http://atriainnovation.com/que-es-el-angulo-decontacto/>, [junio 2018]
- [14] C. Marcos Pascual, "Los cristales, los minerales y los rayos X," pp. 1–19, 2011.
- [15] A. Vidaurre, J. M. M. Dueñas, J. M. Estellés, and I. C. Cortázar, "Influence of enzymatic degradation on physical properties of poly(ϵ -caprolactone) films and sponges," *Macromol. Symp.*, vol. 269, no. 1, pp. 38–46, 2008.
- [16] M. Lebourg, J. S. Antón, and J. L. G. Ribelles, "Hybrid structure in PCL-HAp scaffold resulting from biomimetic apatite growth," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 1, pp. 33–44, 2010.

- [17] L. C. Tang *et al.*, "The effect of graphene dispersion on the mechanical properties of graphene/epoxy composites," *Carbon N. Y.*, vol. 60, pp. 16–27, 2013.
- [18] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.
- [19] H. Deplaine *et al.*, "Biomimetic hydroxyapatite coating on pore walls improves osteointegration of poly(L-lactic acid) scaffolds," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 101 B, no. 1, pp. 173–186, 2013.
- [20] M. Lebourg, J. Suay Antón, and J. L. Gomez Ribelles, "Characterization of calcium phosphate layers grown on polycaprolactone for tissue engineering purposes," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 70, no. 13, pp. 1796–1804, 2010.
- [21] V. Thomas, X. Zhang, S. A. Catledge, C. Wan, and B. Chen, "biocomposites : mechanical properties and bioactivity."